

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09214

研究課題名(和文) 生分解性ナノ粒子を用いた結核感染症に対する新規樹状細胞ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of novel dendritic -cell vaccine with biodegradable nanoparticles for tuberculosis

研究代表者

須田 隆文 (SUDA, TAKAFUMI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：30291397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：結核を含む細胞内寄生菌感染症に対して、樹状細胞(DC)とpoly(lactic coglycolic acid (PLGA)を用いたナノ粒子を組み合わせた新規細胞ワクチンの開発を行った。抗原蛋白をコートしたPLGAをマウスの骨髄由来DC(BM-DC)にパルスし、DC-PLGA/OVAワクチンを作成した。このDC-PLGA/OVAは、in vitroにて蛋白抗原のcross presentationを効率よく誘導し、ペプチド特異的T細胞の活性化した。しかし、DC-PLGA/OVAをマウスに接種したin vivoの実験では、本ワクチンはペプチド特異的T細胞を強くは誘導しなかった。

研究成果の概要(英文)：We attempted to develop a novel cell-based vaccine using dendritic cells (DC) and biodegradable poly(lactic glycolic acid (PLGA)-nanoparticles (PLGA) for intracellular infections, such as tuberculosis. Bone marrow-derived DC pulsed with PLGA, which was coated with ovalbumin protein (OVA) (DC-PLGA/OVA), potently induced a peptide-specific T cell response through efficient cross-presentation in vitro, assessed by peptide-specific T cell proliferation and IFN-gamma production. However, in vivo, immunization with DC-PLGA/OVA failed to elicit a strong peptide-specific T cell response, based on the results of peptide-specific T cell proliferation and the number of peptide-specific T cell determined with tetramer.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：ワクチン 樹状細胞 結核 細胞内寄生菌

1. 研究開始当初の背景

結核感染症は、21世紀においても尚、最も深刻な感染症の一つであり、全世界で年間約870万人の新規発病がみられ、140万人以上が死亡している。本症による社会的損失は多大あり、WHOの緊急宣言にもあるように結核感染症に対する新たな予防および治療戦略が求められている。結核感染症において、今日、我々に課された最大の課題は、一つは本症に対する有効なワクチンの開発であり、もう一つは近年、増加しつつある多剤耐性結核菌(MDR-TB)に対する治療法の確立である。現在、代表的なワクチンとしてはBCG生菌が用いられているが、その予防効果は不十分であり、さらに生菌免疫であるため本症のハイリスク患者であるimmunocompromized hostに接種できないなどの決定的な弱点がある。したがってBCG生菌免疫より優れた効果を持った安全なワクチンの開発が切望されている。一方、MDR-TBはAIDS患者の多発地域を中心に増加してきており、全く抗結核薬が効かない超多剤耐性結核菌(XDR-TB)による健常者への集団感染も報告されるに至った。最近、これらのMDR-TBに対して、強力なワクチン接種による抗結核免疫の賦活が新たな治療戦略として注目されつつあり、実際、化学療法が無効であったMDR-TB感染症に生菌ワクチンの併用有効であったとする報告がされた。

我々は、生体で最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞(dendritic cell, DC)に着目し、このDCを遺伝子工学的に加工し、細菌由来の感染防御抗原や細胞障害性T細胞(CTL)のdominant epitopeをレトロウイルスによって遺伝子導入し、結核菌などの細胞内寄生菌感染症に対して極めて有効な細胞ワクチンを開発した(*Infect Immun*, 2003, *Vaccine*, 2006)。さらに、NKT細胞のligandである α -galactosylceramide(α -GalCer)を添加することによって、NKT細胞の活性化を介して、このDCワクチンの効果を増強させることに成功した(*FEMS Immunol*, 2007)。これらのDCワクチンに加え、細胞内寄生菌であるリステリア菌を感染細胞内で増殖できなくした変異リステリア菌をvectorとして、結核菌由来の感染防御抗原を生体に導入する抗結核細菌ワクチンも開発し(*Infect Immun*, 2003)、さらに、粘膜面に効率よく獲得免疫を誘導する粘膜免疫システムを利用した抗結核粘膜ワクチンの開発も試み、感染防御抗原を組み込んだレンチウイルスやDCを経気道的に投与することによって、肺局所に強力な感染防御免疫を誘導することに成功した(*Vaccine*, 2008)(*Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010)。また、結核菌由来の感染防御抗原(Ag85A, MPT51)の新たなdominant CTL epitopeを発見し、このepitopeをコードするDNAワクチンを接種することによって、epitope特異的抗結

核CTLの誘導を可能にした(*Infect Immun*, 2004, *Vaccine*, 2010に3報)。以上から、我々が開発、改良してきた抗結核細胞ワクチンは結核菌に対する免疫応答を効率よく誘導し、感染防御能を獲得させることは証明されたが、残念ながら結核感染症モデルにおいては、未だ生菌免疫を凌駕するほどの完全なワクチン効果を得るには至っていない。したがって、治療応用も視野に入れたさらに強力な抗結核ワクチンの開発が望まれている。

結核菌に対する感染防御には、結核菌特異的なCD4陽性ヘルパーT細胞(Th細胞)のみならず、CD8陽性細胞障害性T細胞(CTL)の両者の誘導が重要である。一般に、外来性抗原は抗原提示細胞に貪食され、processingを受けた後に、MHC class II分子によってTh細胞に呈示される。一方、内在性抗原(ウイルスや細胞内寄生菌などの細胞質内に存在する抗原)はMHC class I分子によって呈示され、CTLを誘導する。つまり、抗原提示細胞に抗原蛋白を外から添加しただけでは、Th細胞は誘導できるが、CTLは誘導できない。したがって、我々はCTLを誘導できるDCワクチンを作製するために、レトロウイルスで抗原蛋白を細胞質内に発現させたり、あるいはCTLを誘導するCTL dominant epitope peptideをパルスするなどの工夫をしてきた。しかし、レトロウイルスを用いた抗原蛋白のDCへの遺伝子導入は、煩雑であり、しかも安全性の問題もある。また、CTL epitope peptideを単純にDCにパルスする方法は、Th細胞を誘導することができない。したがって、簡便で、かつ効率よく抗原特異的Th細胞とCTLの両方を誘導できるDCへの感染防御抗原の導入方法の開発が求められている。

近年興味あることに、抗原提示細胞の中でもDCは特殊な抗原提示経路をもっており、一部のDCは外来性抗原をMHC class I分子とともに提示し、CTLを誘導できること(クロスプレゼンテーション)が示された。この点で、最近、驚くべきことに生分解性ポリマーであるpolylactic coglycolic acid(PLGA)を用いたナノ粒子(生分解性ナノ粒子, biodegradable nanoparticles)を抗原蛋白と共に生体へ投与することにより、両者が生体のDCに取り込まれ、DCのクロスプレゼンテーション能力を飛躍的に高め、CTLを効率よく誘導することが報告された(*PNAS* 2010, *J Immunol* 2011)。さらに、生分解性ナノ粒子そのものがアジュバント作用を持ち、DCを活性化し、その抗原提示能を高めることも明らかとなった。抗原をコートされたナノ粒子は、エンドサイトーシスを介してDCに取り込まれ、エンドソームから細胞質内に移行し、この抗原を細胞質内で放出することによってクロ

スプレゼンテーションを促進し、MHC class I 分子を介して CTL に抗原を呈示する。また、同時に通常の MHC class II 分子を介した Th 細胞に対する抗原提示も行われる。以上の最近の知見から、我々は生分解性ナノ粒子と結核菌の感染防御蛋白を用いることによって、特異的な Th 細胞と CTL の両方を効率よく誘導できる新規 DC ワクチンの開発が可能であるとの仮説を立てた。そこで、この仮説の基盤となる基礎的知見を検証するために、抗原蛋白をコートした PLGA を用いた DC ワクチンが抗原特異的な免疫応答を効率よく誘導できるか否かを検討した。

2. 研究の目的

PLGA に抗原蛋白をコートした DC ワクチン (DC-PLGA) を用いて、Th 細胞および CTL の双方を誘導できる細胞ワクチンを開発するために、その基礎的段階として、DC-PLGA が cross presentation を介した免疫応答を誘導できることを明らかにする。

3. 研究の方法

DC-PLGA のモデル実験として、卵白アルブミン (OVA) 抗原と、OVA 由来のクラス I エピトープとクラス II エピトープにそれぞれ特異的な T 細胞受容体 (TCR) をもつ遺伝子改変マウス (OT-I と OT-II マウス) を用いて研究を行った。

- (1) PLGA の作成と抗原蛋白のコート：nanoprecipitation 法あるいは double emulsion 法を用いて、PLGA 粒子を作成すると共に、抗原蛋白 (OVA) およびペプチド (SINFEKLE) をコートを行った。
- (2) DC ワクチンの作成：BALB/c マウスの骨髄細胞から GM-CSF と IL-4 を添加し、骨髄由来の DC (BM-DC) を分化させ、CD11c 結合磁気ビーズを用いて BM-DC を精製した。この BM-DC を、LPS などの Toll-like receptor (TLR) のリガンドで成熟させた。その後、成熟させた BM-DC に、OVA 蛋白あるいはエピトープ・ペプチドを添加し、DC ワクチンを作成した (それぞれ、DC-PLGA/OVA, DC-SINFEKLE)。
- (3) In vitro での PLGA の cross presentation ならびペプチド特異的 T 細胞活性化能の検討：上記の方法で作成した DC-OVA と DC-SINFEKLE を、OT-I あるいは OT-II マウスの T 細胞と混合培養し、エピトープ特異的な T 細胞の増殖能と IFN 産生能を検討した。
- (4) In vivo での PLGA-OVA をパルスした DC ワクチン (DC-PLGA/OVA) の抗原特異的免疫誘導能の検討：DC-PLGA/OVA と DC-SINFEKLE を 1~3 回、naive BALB/c マウスに皮下注射し、所属リンパ節および脾臓を回収して、抗原特異的免疫応答が誘導されているか否かを、SINFEKLE ペ

プチドを添加した細胞増殖アッセイ、IFN 産生能と、SINFEKLE 特異的テトラマーを用いて、CD8 エピトープ特異的 TCR を持つ細胞の量的評価で検証した。

4. 研究成果

- (1) Double emulsion 変法を用いることにより、図 1 の電子顕微鏡写真に示すように、球形の比較的均一な PLGA を作成することに成功した。また、作成した PLGA 粒子の粒子径は平均 276 nm であった (図 2)。

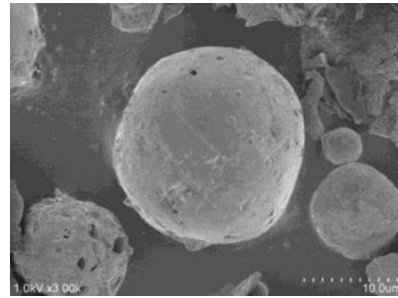


図 1. PLGA の電顕像

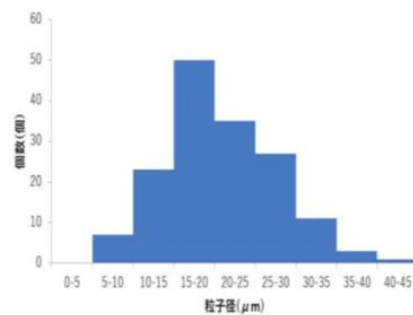


図 2. PLGA の粒子径

- (2) 種々の粒子径の PLGA に OVA 蛋白をコート (PLGA-OVA) して BM-DC にパルスし、OT-I 由来の T 細胞の活性化能を検討したところ、いずれの粒子径の PLGA においても、OT-I 由来 T 細胞の活性化が認められた (図 3)。これは SINFEKLE ペプチドのパルスした場合と比較し、若干劣っていたが、PLGA-OVA が cross presentation を誘導することが証明された。また、同時に SINFEKLE 特異的な IFN 産生誘導も確認された。

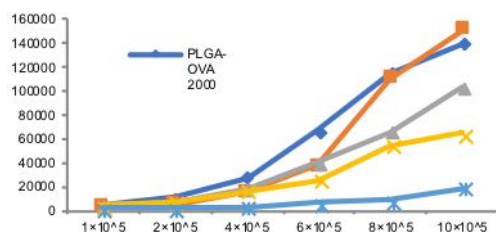


図 3. PLGA-OVA をパルスした DC (DC-PLGA/OVA) の OT-I 由来 T 細胞の活性化能

- (3) DC-PLGA/OVA で免疫したマウスの所属リンパ節および脾臓に、OVA 蛋白あるいは SYNFEKLE ペプチドを添加したところ、安定した抗原蛋白あるいはペプチド特異的な増殖は認められなかった(図4)。また、同じく IFN 産生誘導も低かった。さらに、所属リンパ節および脾臓におけるテトラマーを用いた解析でも、CD8 エピトープ特異的ペプチドに対する TCR 陽性の T 細胞の誘導能は低かった(図5)。

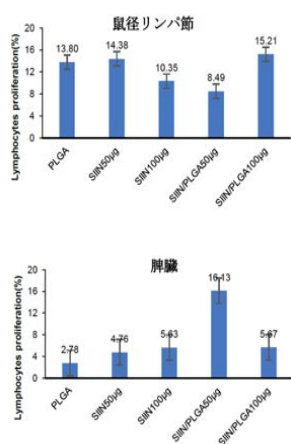


図4. DC-PLGA/OVA で免疫したマウスの所属リンパ節と脾臓の SYNFEKLE 特異的増殖能

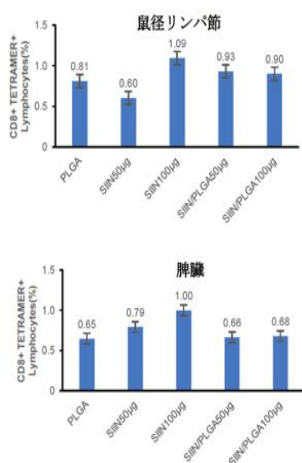


図5. DC-PLGA/OVA で免疫したマウスの所属リンパ節と脾臓のテトラマー陽性 T 細胞

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19 件)

1. Yamanaka K, Fujisawa T, Kusagaya H, Mori K, Niwa M, Furuhashi K, Kono M, Hamada E, Suda T, Maekawa M. IL-13 regulates IL-17C expression by suppressing NF-kappaB-mediated transcriptional activation in airway epithelial cells.

Biochemical and Biophysical Research

Communications. 2018, 495:1534-40. (査読あり)

2. Miyashita K, Matsuura S, Tajima K, Tajima S, Aoki A, Sakagami T, Koshimizu N, Toyoshima M, Suda T. Disseminated mycobacterium avium infection presenting with bladder lesions in a patient with interferon-gamma-neutralizing autoantibodies. *Internal Medicine*. 2018, In press. (査読あり)
3. Fukada A, Toyoshima M, Akahori D, Suda T. Pulmonary aspergilloma with oxalosis. *Internal Medicine*. 2018, In press. (査読あり)
4. Tani S, Takano R, Tamura S, Oishi S, Iwaizumi M, Hamaya Y, Takagaki K, Nagata T, Seto S, Horii T, Kosugi I, Iwashita T, Osawa S, Furuta T, Miyajima H, Sugimoto K. Digoxin attenuates murine experimental colitis by downregulating Th17-related cytokines. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2017, 23:728-38. (査読あり)
5. Suzuki Y, Shirai M, Asada K, Miwa S, Karayama M, Nakamura Y, Inui N, Shirai T, Hayakawa H, Baba S, Suda T. Utility of macrophage-activated marker CD163 for diagnosis and prognosis in pulmonary tuberculosis. *Annals of the American Thoracic Society*. 2017, 14:57-64. (査読あり)
6. Satake Y, Nakamura Y, Kono M, Hozumi H, Nagata T, Tsujimura K, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Fujiyama T, Tokura Y, Matsui T, Yokomura K, Shirai M, Hayakawa H, Suda T. Type-1 polarised dendritic cells are a potent immunogen against Mycobacterium tuberculosis. The international journal of tuberculosis and lung disease. *International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2017, 21:523-30. (査読あり)
7. Harada M, Sakai S, Ohhata T, Kitagawa K, Mikamo M, Nishimoto K, Uchida C, Niida H, Kotake Y, Sugimura H, Suda T, Kitagawa M. Homeobox transcription factor NKX2-1 promotes cyclin D1 transcription in lung adenocarcinomas. *Molecular Cancer Research*. 2017, 15:1388-97. (査読あり)
8. Enomoto Y, Yokomura K, Hasegawa H, Ozawa Y, Matsui T, Suda T. Healthcare-associated pneumonia with positive respiratory methicillin-resistant Staphylococcus aureus culture: Predictors of the true pathogenicity. *Geriatrics & Gerontology International*. 2017, 17:456-62. (査読あり)
9. Chida T, Ito M, Nakashima K, Kanegae Y,

- Aoshima T, Takabayashi S, Kawata K, Nakagawa Y, Yamamoto M, Shimano H, Matsuura T, Kobayashi Y, Suda T, Suzuki T. Critical role of CREBH-mediated induction of transforming growth factor beta2 by hepatitis C virus infection in fibrogenic responses in hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2017, 66:1430-43. (査読あり)
10. Suzuki Y, Imokawa S, Sato J, Uto T, Suda T. Cumulative incidence of tuberculosis in lung cancer patients in Japan: A 6-year observational study. *Respiratory Investigation*. 2016, 54:179-83. (査読あり)
11. Suzuki Y, Enomoto Y, Yokomura K, Hozumi H, Kono M, Karayama M, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Suda T. Soluble hemoglobin scavenger receptor CD163 (sCD163) predicts mortality of community-acquired pneumonia. *Journal of Infection*. 2016, 73:375-7. (査読あり)
12. Oishi S, Takano R, Tamura S, Tani S, Iwaizumi M, Hamaya Y, Takagaki K, Nagata T, Seto S, Horii T, Osawa S, Furuta T, Miyajima H, Sugimoto K. M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation. *Immunology*. 2016, 149:320-8. (査読あり)
13. Noritake H, Kobayashi Y, Ooba Y, Matsunaga E, Ohta K, Shimoyama S, Yamazaki S, Chida T, Kawata K, Sakaguchi T, Suda T. Successful interferon therapy reverses enhanced hepatic progenitor cell activation in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2015, 35:956-62. (査読あり)
14. Mori K, Fujisawa T, Kusagaya H, Yamanaka K, Hashimoto D, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Maekawa M, Suda T. Synergistic proinflammatory responses by IL-17A and toll-Like Receptor 3 in human airway epithelial cells. *PLoS One*. 2015, 10:e0139491. (査読あり)
15. Mochizuki E, Furuhashi K, Fujisawa T, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Kono M, Hamada E, Maekawa M, Suda T. A case of treatment with voriconazole for chronic progressive pulmonary aspergillosis in a patient receiving tacrolimus for dermatomyositis-associated interstitial lung disease. *Respiratory Medicine Case Reports*. 2015, 16:163-5. (査読あり)
16. Kato S, Fujisawa T, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Suda T. Severe respiratory failure associated with influenza B virus infection. *Respirology Case Reports*. 2015, 3:61-3. (査読あり)
17. Ikeda M, Enomoto N, Hashimoto D, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Suda T, Nagata T. Nontypeable Haemophilus influenzae exploits the interaction between protein-E and vitronectin for the adherence and invasion to bronchial epithelial cells. *BMC Microbiology*. 2015, 15:263. (査読あり)
18. Enomoto Y, Oba M, Ishii N, Nakanaga K, Yagi Y, Hasegawa H, Ozawa Y, Matsui T, Yokomura K, Suda T. Rhinosinusitis and disseminated cutaneous infection caused by Mycobacterium chelonae in an immunocompromised patient. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2015, 21:691-4. (査読あり)
19. Akamatsu T, Inui N, Kusagaya H, Nakamura Y, Suda T, Chida K. Evaluation of antibody levels over 3 years after 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccination in patients with pulmonary diseases receiving steroids and immunosuppressive agents. *Clinical Biochemistry*. 2015, 48:125-9. (査読あり)
- [学会発表](計 12件)
- [図書](計 0件)
- [産業財産権]
- 出願状況(計0件)
なし
- 取得状況(計0件)
- [その他]
6. 研究組織
- (1)研究代表者
須田 隆文(SUDA, Takafumi)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30291397
- (2)研究分担者
中村 祐太郎(NAKAMURA, Yutaro)
浜松医科大学・医学部・講師
研究者番号: 60436962
- 永田 年(NAGATA, Toshi)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90275024
- 榎本 紀之(ENOMOTO, Noriyuki)
浜松医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50436961
- (3)研究協力者
なし