

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17950

研究課題名（和文）肺指向性ナノパーティクルPNAG-DNAワクチンによる肺感染症の発症/重症化予防

研究課題名（英文）Development of nano-particle PNAG-DNA vaccine for prevention of severe bacterial pneumonia

研究代表者

賀来 敬仁 (KAKU, Norihito)

長崎大学・病院（医学系）・助教

研究者番号：40770491

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：黄色ブドウ球菌ATCC株から抽出したcDNAを抽出し、プラスミドベクターにライゲーションし、PNAG-DNAを作成した。これを元に肺指向性ナノパーティクルPNAG-DNAワクチンを作成した。BALB/cマウスおよびC57BL/6マウスを用いて作成したESBL産生*Klebsiella pneumoniae* (ESBL-Kpn) 肺炎マウスモデルにおいて、細菌感染前にPNAG-DNAワクチンを投与した。BALB/cマウスおよびC57BL/6マウスのいずれにおいても、コントロール群と比較してPNAG-DNAワクチン投与群は生存期間を延長した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ワクチンについては、これまでに特定の菌種を対象としたワクチンしか存在していない。今回の研究成果によって、肺炎を発症する細菌で広く発現している遺伝子を抗原として用いれば、一種類のみで多くの肺炎の発症もしくは重症化を予防できるワクチンを開発できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：PNAG-DNA was generated from cDNA extracted from *Staphylococcus aureus* ATCC strain and plasmid-vector. PNAG-DNA vaccine was generated by using the plasmid-vector and lung-targeted nanoparticle. An efficacy of PNAG-DNA vaccine was evaluated in a pneumonia mouse model caused by ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-Kpn). A mean survival time in the BALB/c and C57BL/6 treated with the PNAG-DNA vaccine was longer than those in control mice.

研究分野：感染症

キーワード：重症感染症 肺炎 ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 院内肺炎の死亡率は20%程度と高く、市中肺炎の2倍である。院内肺炎のなかでも、人工呼吸器関連肺炎(VAP)の死亡率は約29%と非常に高い(Kollef MH, et al. Chest 2005)。VAPの原因菌としては、緑膿菌、MRSAを含む黄色ブドウ球菌、近年ESBL産生菌やカルバペネマーゼ産生菌などの増加が問題となっている腸内細菌科細菌など有効な治療薬が限られている菌の割合が高い。また、気管挿管期間が長くなるにつれて肺炎発症率が高くなることが知られているため、VAPの発症を予防することが非常に重要である。
- (2) 近年、市中肺炎および医療・介護関連肺炎では肺炎ワクチンによる肺炎の発症もしくは重症化の予防効果が報告されている(Maruyama T, et al. BMJ. 2010; Kawakami, et al. Vaccine. 2010)。医療・介護関連肺炎では、肺炎球菌やインフルエンザ菌など市中肺炎と同様の原因菌が多く認められるが(Kaku N, et al. J Infect Chemother. 2013)、VAPをはじめとする院内肺炎は市中肺炎と原因菌が異なるため、肺炎球菌ワクチンの効果は限定的であると考えられている。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では院内肺炎を予防するためのワクチンを開発し、研究代表者がこれまでに報告しているESBL産生 *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-Kpn) 肺炎モデル(Harada Y, Kaku N, et al. Clin Microbiol Infect. 2014)などの肺感染症マウスモデルにおける有効性を評価する。
- (2) ワクチンのターゲットについては、細菌だけでなく真菌にも発現している α -(1-6)-linked poly-N-acetyl-D-glucosamine (PNAG)に着目した。PNAG抗体は *in-vitro* および *in-vivo* での有効性が報告され、Phase II の臨床試験が実施された(Cywes-Bentley C, et al. Proc Natl Acad Sci. 2013)。そのため、本研究ではPNAGを抗原としたDNAワクチンを開発する。DNAワクチンでは投与方法が問題となるが、ナノパーティクル技術を応用してPNAG-DNAワクチンを精製する。本技術は長崎大学が特許(WO2011/105520)を保有し、すでにマラリアDNAワクチンで有効性が示されている(Cherif MS, et al. Vaccine. 2014)。また、肺指向性のナノパーティクルを作成することが可能である。

3. 研究の方法

(1) PNAG-DNA ワクチンの精製

Phase II の臨床試験が行われたPNAG抗体ワクチンについては、黄色ブドウ球菌が発現しているPNAGを抗原として精製されている(Cywes-Bentley C, et al. Proc Natl Acad Sci. 2013)。そのため、本研究でもPNAG遺伝子の解析結果が報告されている黄色ブドウ球菌の標準株(ATCC株)からPNAG-DNAプラスミドを作成する。具体的には、ATCC株からPCR法でPNAG遺伝子がコードされている領域を増幅する。増幅した遺伝子を制限酵素で切断してプラスミドに組み込み、大腸菌へ導入してプラスミドを増やす。長崎大学病院薬剤部のナノパーティクル技術(国際特許WO2011/105520)を応用して、PNAG-DNAワクチンを精製する(Mbanefo EC, et al. Parasitol Int. 2015; Cherif MS, et al. Vaccine. 2014; Kodama Y, et al. Eur J Pharm Biopharm. 2014)。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

(2) PNAG-DNA ワクチンの肺感染マウスモデルでの有効性評価

菌液を経気道投与して作成する ESBL-Kpn 肺炎マウスモデルに PNAG-DNA ワクチンを投与し、その有効性を評価する。

4. 研究成果

(1) PNAG-DNA ワクチンの精製

黄色ブドウ球菌 ATCC 株から cDNA を抽出し、PCR を施行した。増幅産物を 1% agarose gel で電気泳動し、目的とする増幅産物が得られたことを確認して精製を行った。精製後に制限酵素で切断し、プラスミドベクターにライゲーション反応で連結した。大腸菌導入してプラスミドを増幅した。大腸菌から抽出したプラスミドについては、PCR を行い電気泳動で PNAG-DNA を組み込んだプラスミドが増幅されたことを確認した。この PNAG-DNA プラスミドを用いて PNAG-DNA ワクチンが生成できた。

(2) PNAG-DNA ワクチンの肺感染マウスモデルでの有効性評価

精製した PNAG-DNA ワクチンを BALB/c マウスで作成した ESBL-Kpn 肺炎マウスモデルに投与したところ、精製した PNAG-DNA ワクチンを ESBL-Kpn 肺炎マウスモデルに投与したところ、死亡までの平均時間が Control で 38.0 ± 4.9 時間であったのに対して、PNAG-DNA ワクチン投与群では 58.0 ± 27.8 時間と生存期間を延長できた。今回の検討では ESBL-Kpn 肺炎マウスモデルにおいて生存期間を延長したため、ワクチンの投与効果はあったと考えられる。しかし、感染 108 時間の時点で生存率が 0% となったため、救命するまでの効果は認められなかった。

マウスに高菌量を投与して作成する肺炎マウスモデルであったことが影響していると考えられたため、マウスへの投与菌量を減らして検討したところ、感染 120 時間後の control の生存率が 12.5% であったのに対して PNAG-DNA ワクチン投与群は 37.5% と高い生存率を示した。死亡までの平均時間が Control で 38.0 ± 4.9 時間であったのに対して、PNAG-DNA ワクチン投与群では 58.0 ± 27.8 時間と生存期間を延長できた。

また、別のマウス種でも効果があるかを確認するために、C57BL/6 マウスを用いて ESBL-Kpn 肺炎マウスモデルを作成して、PNAG-DNA ワクチンを投与したところ、コントロールマウスの平均生存期間が 48.0 ± 14.7 時間であったのに対して、PNAG-DNA ワクチン投与群では、平均生存期間が 86.4 ± 31.1 時間であった。また、ESBL-Kpn 感染 120 時間後の時点においてワクチン投与群のマウスの生存率は 40.0% であり、BALB/c マウスと同じような効果を示した。

(3) まとめと今後の展望

本研究の結果から、特定の菌種ではなく幅広い細菌に効果を示す肺指向性の DNA ワクチンによって、肺炎の重症化を抑制できることが示された。ただし、ワクチン投与群でも生存率は 40% であったため、DNA ワクチンのベクターおよびターゲット遺伝子、さらには投与方法などについて改良を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	柳原 克紀 (YANAGIHARA Katsunori)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	
研究協力者	佐々木 均 (SASAKI Hitoshi)	長崎大学・病院(医学系)・教授 (17301)	
研究協力者	兒玉 幸修 (KODAMA Yukinobu)	長崎大学・病院(医学系)・准教授 (17301)	
研究協力者	佐々木 大介 (SASAKI Daisuke)	長崎大学・病院(医学系)・技術職員 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of Michigan		