

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07800

研究課題名（和文）結核に対するシアリダーゼを用いた新規ナノ粒子ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of a novel nanoparticle vaccine using sialidase against tuberculosis

研究代表者

榎本 紀之（Noriyuki, Enomoto）

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50436961

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）：OVA由来の細胞障害性T細胞(CTL) およびヘルパーT細胞(Th)エピトープを連結したハイブリッドエピトープ長鎖ペプチド(long epitope)を作成し、シアル酸・Siglec-G・CD24複合体を分解しTLRシグナルを増強するシアリダーゼと共に、生分解性ナノ粒子(PLGA)と混合した。これをBMDCへパルスし、抗原特異的リンパ球(OT-I細胞、OT-II細胞)と共培養したところ、long epitope単独群と比較し、両細胞の強い増殖能を誘導する傾向を確認した。しかし、実験を反復したが有意差は認められなかった。シアリダーゼと、担体であるPLGAの相互作用の問題が存在する可能性もある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シアル酸・Siglec-G・CD24複合体を分解しTLRシグナルを増強するシアリダーゼとの混合が、ナノ粒子ワクチンの有意な増強効果を示せば、新規アジュバントとして様々なワクチンへの応用も可能であると考えられたが、今回の実験では有意差を示す事ができなかった。

研究成果の概要（英文）：Ovalbumin (OVA)-derived hybrid long epitope peptide, which can induce both cytotoxic T-cell and helper T-cell, were prepared. In addition, this hybrid long epitope peptide was mixed with polylactic coglycolic acid (PLGA) and sialidase, which can degrade a complex of sialic acid/Siglec-G/CD24 and enhance Toll-like receptor signal. Bone marrow-derived dendritic cell (BMDC) was pulsed with this hybrid long epitope peptide/sialidase/PLGA complex, and cocultured with OT-I and OT-II cells. As a results, the tendency that this hybrid long epitope peptide/sialidase/PLGA complex induced more OT-I and OT-II cell proliferation compared to hybrid long epitope peptide/PLGA. However, this difference in the proliferation of OT-I and OT-II cells was not statistically significant. The problem in the interaction between sialidase and PLGA may have existed.

研究分野：細胞性免疫学

キーワード：シアリダーゼ ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

結核感染症は現在も尚、最も深刻な感染症の一つであり、全世界における年間の結核罹患数は1,040万人、結核死亡数は130万人とされている。現在、代表的なワクチンとしてはウシ型結核菌(BCG)の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免疫抑制状態の患者に接種できないなどの決定的な弱点がある。従って、BCG生菌免疫よりも効果の優れた、より安全な細胞内寄生菌感染症に対するワクチンの開発が切望されている。

今回、先行する直近の研究では、細胞内寄生菌の CTL エピトープと CD4 陽性 T 細胞 (ヘルパー T 細胞: Th 細胞) のエピトープを結合させたハイブリッド長鎖エピトープ(long-ep)、およびそのキャリアとして生体内で持続的に抗原を放出し、かつ CTL の誘導に必要な抗原のクロスプレゼンテーション促進作用をもつ生分解性ナノ粒子(poly-lactic coglycolic acid: PLGA)から成るハイブリッド長鎖エピトープ含有ナノ粒子 (long-ep/PLGA)を開発した。この long-ep/PLGA を骨髄由来 DC(BMDC)へパルスした DC ワクチンは、in vitro において抗原特異的 CTL および Th 細胞の双方を誘導し、細胞内寄生菌であるリステリア感染モデルにおいても強力な感染防御効果を示した。しかし、このワクチン効果をさらに増強するため、強力なアジュバントを加える必要がある。

そこで、前述の long-ep/PLGA を用いて、様々なアジュバントのスクリーニングを行った結果、菌体成分などの古典的なアジュバントではなく、免疫チェックポイント分子を阻害することが最もアジュバント効果が高いことを見出した。シアリダーゼは、糖タンパク質や糖脂質に含まれる糖鎖シアル酸残基を分解する酵素であり、哺乳動物から微生物まで自然界に広く分布し、細胞内では主にリソソーム、細胞質、細胞膜に局在している。抗原提示細胞上に発現する「シアル酸+sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-G (Siglec-G) +CD24 複合体 (シアル酸・Siglec-G・CD24 複合体)」が、Toll-like 受容体 (TLRs) のシグナル抑制などを介して強力に免疫を抑制し、抗原提示細胞における重要な免疫チェックポイント機構であることが明らかとなった (Nature 2019)。さらに、酵素に過ぎないシアリダーゼが、このシアル酸・Siglec-G・CD24 複合体の分解を介して、抗原提示細胞の成熟を促進し、貪食した抗原から MHC クラス I 経路での CTL の誘導を可能とするクロスプレゼンテーションを促進するという結果が報告された (Nat Immunol 2016、Oncotarget 2016)。そこで我々は、シアリダーゼは生体に既に存在する安全性の高い酵素でもあり、前述の long-ep/PLGA 単独のワクチンにシアリダーゼを組み合わせることによって、生体に存在する DC などの抗原提示細胞の機能を増強できる画期的な新規ナノ粒子ワクチンの開発が可能であると考えた。さらに、塩化アンモニウム (NH₄Cl) はエンドソーム内の pH 低下を抑制し、貪食された抗原の分解を抑制すると報告されており、NH₄Cl を添加することによる long-ep/PLGA ワクチンの増強効果も期待されると考えられた。

2. 研究の目的

ハイブリッド長鎖エピトープ含有ナノ粒子ワクチン (long-ep/PLGA) へシアリダーゼおよび NH₄Cl をアジュバントとして添加することにより、さらに強力かつ安全な細胞内寄生菌感染症に対するワクチンを開発する。

3. 研究の方法

まず新規ワクチンの in vitro での効果を確認するため、卵白アルブミン (OVA) 由来のエピトープを使用し、シアリダーゼあるいは NH₄Cl 添加 long-ep/PLGA ワクチンを作成する。これを骨髄由来の樹状細胞(BMDC)へパルスし、抗原特異的リンパ球(OT-I 細胞、OT-II 細胞)と共培養することにより、抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) とヘルパー T 細胞 (Th 細胞) の誘導能を検討する。以上の実験から有意な結果が得られれば、その後は細胞内寄生菌感染症のマウスモデルとして、まずリステリア菌を使用する。リステリア菌由来のエピトープを使用したシアリダーゼあるいは NH₄Cl 添加 long-ep/PLGA ワクチンを作成し、その機能解析、およびリステリア菌感染症へのワクチン効果(感染防御能の獲得)の検討を行う。具体的には以下の実験を実施した。

OVA 由来のエピトープを使用したシアリダーゼあるいは NH₄Cl 添加 long-ep/PLGA

ワクチンの作成と、抗原特異的 CTL および Th 細胞増殖能の検討 (*in vitro*)

Long-ep(OVA 由来の CTL エピトープ: OVA257-264 (SIINFEKL)と Th エピトープ: OVA323 339 (ISQAVHAAHAEINEAGR)を glycine linker により結合した SIINFEKLGSGGGG ISQAVHAAHAEINEAGR)を、Double emulsion 法により PLGA でコーティングし、安定な PLGA 粒子を作成した。

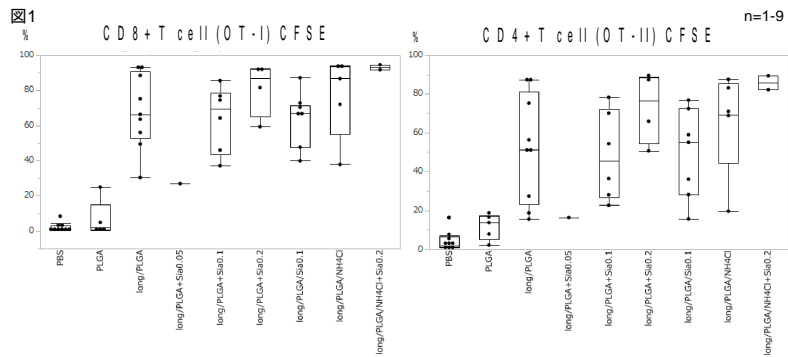
これらの long-ep/PLGA へ、Double emulsion 法の段階においてシアリダーゼを添加した。NH₄Cl は BMDC へパルスする段階で添加した。この BMDC を抗原特異的リンパ球(OT-I 細胞、OT-II 細胞)と共培養し、OT-I 細胞、OT-II 細胞の増殖能を評価した。

4 . 研究成果

上記の方法により作成した OVA 抗原特異的 long-ep/PLGA において、Double emulsion 法の段階で様々な濃度のシアリダーゼ(0.05, 0.1, 0.2 U/mL)を加えた。また、BMDC へパルスする段階で NH₄Cl を添加した。以上のように作成した long-ep/PLGA パルス BMDC を抗原特異的リンパ球(OT-I 細胞、OT-II 細胞)と共培養し、OT-I 細胞、OT-II 細胞の増殖能を評価した。その結果、シアリダーゼ濃度は 0.2 U/mL において最も OT-I 細胞、OT-II 細胞の増殖能が高い傾向が示された (図 1)。BMDC へ long-e をパルスする段階でもシアリダーゼを添加したが、増殖効果の増強はみられなかった。また、NH₄Cl を添加した群でも増殖能の増強がみられた。さらに long-ep/PLGA/シアリダーゼに NH₄Cl を添加した群では、最も強い抗原特異的リンパ球増殖能を示す傾向が、OT-I 細胞、OT-II 細胞の両者において示された。

しかし、実験を反復したものの、統計学的有意差は得られなかった (図 1)。

以上の結果を基に、担体としての PLGA とシアリダーゼの相互作用が負の影響を及ぼした可能性もあるため、この担体をリポソームへ変更し実験を繰り返したが、有意差のある OT-I 細胞、OT-II 細胞の増殖結果は得られなかった。



* Long/PLGA/Sia: double emulsion法でのPLGA作成時にsialidaseを混入。 * Long/PLGA + Sia: BMDCへのパルス時にsialidaseを添加。

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
研究分担者	須田 隆文 (Suda Takafumi) (30291397)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究分担者	永田 年 (Nagata Toshi) (90275024)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	

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
---------	---------