

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591152

研究課題名(和文) 新たな緑膿菌感染症の予防戦略 - 線毛の断片化ペプチドによるワクチンの開発

研究課題名(英文) A novel protective strategy for Pseudomonas aeruginosa infection-Development of vaccine using pilus peptide

研究代表者

門田 淳一 (Kadota, Junichi)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：50233838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：緑膿菌の線毛蛋白やそのペプチドで刺激して得られた成熟樹状細胞とマウスの幼若なT細胞を混合培養した。精製線毛蛋白の刺激によって培養上清中のサイトカインの産生量は陰性コントロールと比べて上昇し、幼若T細胞から成熟T細胞への分化がみられた。一方、ペプチドによる効果は線毛蛋白よりは弱かった。この結果は、線毛蛋白や弱いけれどもペプチドによる獲得免疫が樹状細胞を介して成立することを示唆している。今後、本研究では明らかにできなかった線毛蛋白あるいはペプチド刺激樹状細胞のマウスへの移入効果実験を行い、宿主におけるワクチン効果の検証を行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Murine naive T cells were incubated with mature dendritic cells stimulated by pili of Pseudomonas aeruginosa or by its peptide. The concentration of cytokines in the culture supernatant stimulated with pili or peptide increased compared to that in control and naive T cells proliferated to mature ones. This result indicates that adaptive immunity by pili but less peptide occurred through dendritic cells. In the future, the efficacy of vaccine by inoculation of pili- or peptide-stimulated mature dendritic cells into mouse should be investigated.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：緑膿菌線毛蛋白 ペプチド 樹状細胞 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

緑膿菌は院内肺炎や敗血症などの院内感染症の主要原因菌で、患者の予後を左右する因子として重要である。特に我が国では多剤耐性菌(MDRP)によるアウトブレイクが問題となってきたが抗菌薬を含め有効な治療法がないため、緑膿菌感染症を制御する上では治療薬および予防薬の開発が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究では、緑膿菌の感染成立過程(緑膿菌線毛と気道上皮細胞への付着機能)に着目し、緑膿菌線毛蛋白の断片ペプチドを用いて樹状細胞を刺激して成熟樹状細胞を確立した後、成熟樹状細胞を経気道的にマウスに導入し、線毛と気道上皮細胞との付着の阻害効果(ワクチン効果)を検討する。この研究から緑膿菌感染症が制御できるかを明らかにし、実用化に向けた基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 線毛蛋白ペプチドの合成

合成ペプチド(pili 6)は、標準株の PA01 株と全く同一のアミノ酸配列を有している緑膿菌線毛を多く発現している変異株 PA02001.2 株を用い、PA01 の *pilA* 遺伝子アミノ酸配列に基づきキアゲン(株)に依頼して合成する。

(2) 線毛蛋白および pili 6 によって刺激されたマウス骨髄由来成熟樹状細胞の樹立

マウス骨髄由来樹状細胞株 Jaw 細胞を精製した線毛蛋白および pili 6 100 µg/ml の濃度で刺激し、ナイーブマウスの脾臓から分離した T 細胞と共培養を行う。Jaw 細胞表面の抗原提示補助分子 MHC class の発現を FACS scan で解析し、成熟樹状細胞への分化

を確認するとともに、BrdU uptake や interferon-、interleukin-10 などのサイトカインの定量を行って T 細胞の活性化を確認する。

4. 研究成果

緑膿菌線毛蛋白の 101-120 残基合成ペプチド(TFQTGTSSPKNATKVITLNR ; pili 6)、PBS(negative control)、緑膿菌 PAO-1 株超音波破碎抗原(positive control)でそれぞれ刺激したマウス骨髄由来樹状細胞(Jaws)をホルマリン処理後、ナイーブ T 細胞と混合培養した。混合培養上清中の IFN-、IL-10 濃度やナイーブ T 細胞への BrdU の取り込みを検討したところ、pili 6 刺激群では培養上清中の IFN- 濃度は negative control と比べて上昇していたが、IL-10 濃度の明らかな上昇は認めなかった。また positive control ではナイーブ T 細胞の BrdU の取り込みが増加していたのに対して、ペプチド刺激群では明らかな取り込みの増加は認めなかった。一方、精製線毛蛋白を用いた検討では、線毛蛋白の刺激によって Jaws 細胞は TNF- や IL-12 などのサイトカインを産生し、MHC-class 発現の誘導を認めた。さらに精製線毛蛋白で刺激した Jaws 細胞とナイーブ T 細胞を混合培養したところ、培養上清中の IFN- や IL-10 の産生量は negative control に比べ上昇し、ナイーブ T 細胞への BrdU の取り込みも増加していた。こうした結果は、線毛蛋白による獲得免疫が樹状細胞を介して成立することを示唆している。さらに線毛蛋白に比べると弱いものの、pili 6 も線毛蛋白同様、樹状細胞を介した獲得免疫成立に寄与していることが示された。しかし、樹状細胞とナイーブ T 細胞を混合培養しナイーブ

ブT細胞の活性化を検証する実験が、当初想定していた細胞比率では十分な活性化を検出できず様々な細胞比率での検討が必要であったため、本研究中に予定していた実験のうちマウスを使用した *in vivo* での検討が実施できなかった。今後、本研究では明らかにできなかった線毛蛋白あるいは pili 6 刺激成熟樹状細胞のマウスへの移入効果実験を行い、*in vivo* におけるワクチン効果の検証を行っていく予定である。

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 0件)

[学会発表](計 4件)

橋永一彦, 横山敦, 吉川裕喜, 岡宏亮, 串間尚子, 甲斐直子, 鳥羽聡史, 石井寛, 白井亮, 岸建志, 時松一成, 平松和史, 門田淳一. 樹状細胞を介した緑膿菌線毛蛋白ワクチンの可能性の検討. 第 87 回日本感染症学会学術講演会・日本化学療法学会総会合同学会, 横浜, 6/5-7, 2013.

橋永一彦, 横山敦, 吉川裕喜, 岡宏亮, 串間尚子, 甲斐直子, 鳥羽聡史, 石井寛, 白井亮, 岸建志, 時松一成, 平松和史, 門田淳一. 樹状細胞を介した緑膿菌線毛蛋白ワクチンの可能性の検討. 第 60 回日本化学療法学会西日本支部総会, 第 55 回日本感染症学会中日本地方学術集会, 第 82 回日本感染症学会西日本地方学術集会, 福岡, 11/5-7, 2012.

橋永一彦, 横山敦, 岡宏亮, 串間尚子, 吉岡大介, 大谷哲史, 鳥羽聡史, 梅木健二, 石井寛, 白井亮, 岸建志, 時松一成, 平松和史, 門田淳一. 樹状細胞を介した緑膿菌線毛蛋白ペプチドによるワクチンの可能

性の検討. 第 86 回日本感染症学会学術講演会, 長崎, 4/25-26, 2012.

橋永一彦, 岩田敦子, 園田尚子, 大谷哲史, 吉岡大介, 梅木健二, 石井寛, 岸建志, 白井亮, 時松一成, 平松和史, 門田淳一. 特異的免疫誘導因子としての緑膿菌線毛蛋白構成ペプチドの機能解析. 第 85 回日本感染症学会総会学術講演会, 東京, 4/21-22, 2011.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

門田 淳一 (KADOTA, Junichi)

大分大学・医学部・教授

研究者番号: 50233838

(2)研究分担者

平松和史 (HIRAMATSU, Kazufumi)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号: 80301381

白井 亮 (SHIRAI, Ryo)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60437837

平成 23 年度～平成 24 年度

岸 建志 (KISHI, Kenji)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：20347024

石井 寛 (ISHII, Hiroshi)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60398146

平成 25 年度

時松一成 (TOKIMATSU, Issei)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：20347032

(3)連携研究者

()

研究者番号：