

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461163

研究課題名(和文) 緑膿菌性肺感染症の新しい制御戦略-抗原刺激成熟樹状細胞の移入によるワクチン開発

研究課題名(英文) New strategy for protection against respiratory infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

門田 淳一 (KADOTA, Jun-ichi)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：緑膿菌性肺感染症に対する新たな予防法として、緑膿菌線毛蛋白やその合成ペプチドを抗原とする樹状細胞を介したワクチンの可能性に関して検討を行った。線毛蛋白に混入したLPS除去の過程で線毛蛋白を多く喪失し、十分量の線毛蛋白が得られなかった。線毛蛋白のN末端からのアミノ酸残基94-143残基に相当するペプチド(Pili 303)を合成した。合成ペプチドにて刺激したマウス樹状細胞と、マウス脾臓由来のナイーブT細胞との混合培養を行ったところ、ペプチドpili303刺激群においてIFN-gamma、IL-10の産生亢進の傾向を認め、特異的免疫反応が誘導される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the potential for developing vaccines mediated by dendritic cells pulsed with *P.aeruginosa* pili protein or its peptides. Since we lost a large amount of the pili protein in the process removing LPS contamination, it was difficult to obtain enough quantity of pili protein for pulsing dendritic cells. Peptide (pili303) corresponding to the part from 94th to 143rd amino acid residues of pili protein of *P.aeruginosa* were synthesized. After dendritic cells pulsed with the peptide were co-cultured with the naive T-cells obtained from mouse spleens, the culture medium was harvested, and IFN-gamma and IL-10 were examined using ELISA. The naive T cells exposed to the peptide-pulsed dendritic cells produced a larger amount of IFN-gamma and IL-10 compared to those of the other peptide (pili6: 101st -120th amino acid of the pili protein). These results suggest that the antigenic presentation performed strongly by the peptide pili303-pulsed dendritic cells activates naive T cells.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：緑膿菌 線毛 樹状細胞 ワクチン 呼吸器感染症

1. 研究開始当初の背景

緑膿菌性肺炎は院内感染症において患者の予後を左右する重要な疾患であり、特に好中球減少、免疫抑制剤使用、慢性閉塞性肺疾患、人工呼吸器装着などの患者において致死的原因となる。特に超高齢社会や先進医療の進歩による易感染性宿主の増加が顕著な我が国においては、その治療薬ならびに予防法の開発が急務である。

緑膿菌は外膜の抗菌薬透過性が低いことなど、抗菌薬耐性に働く因子を元来有しており、これによって多くの抗菌薬に感受性が低い。そのため有効な抗菌薬は限られ、さらに緑膿菌は多様な耐性機序による耐性を獲得しやすいことから、抗菌薬の使用は多剤耐性菌の出現を促す結果となってしまう。このため、抗菌薬に頼らない緑膿菌感染症の予防・治療法の開発が望まれており、ワクチン療法はその候補の一つと考えられる。

細菌感染症では、局所に病原細菌が侵入すると末梢に存在する未熟な樹状細胞が細菌を捕捉する。その後細菌は、樹状細胞内において消化されペプチド断片としてMHC分子との複合体を形成し抗原提示され成熟する。成熟した樹状細胞は貪食能が低下する一方で移動能が亢進して二次リンパ器官に遊走し、遊走先でナイーブなT細胞を活性化する。このような免疫反応を利用した樹状細胞ワクチン療法は、感染症分野より先行して腫瘍免疫の分野において臨床研究が行われている。樹状細胞ワクチン療法の概要は、生体外において標的となる病原体の特異抗原で樹状細胞を刺激することで効率よく抗原提示させ、生体内に戻すというものである。既に効率よく抗原提示させた樹状細胞を生体に移入することは、抗原を直接移入する場合と比較して、生体内でのいくつかの免疫学的段階や副反応を避けられるという安全性上の利点も有すると考えられる。

以上のような背景から、我々は樹状細胞を介した緑膿菌線毛蛋白ペプチドワクチンの可能性に関する検討を計画するに至った。

2. 研究の目的

緑膿菌の気道感染において、線毛は炎症誘導の初期過程で主要な役割を担っている。緑膿菌線毛が気道上皮細胞上の asialoGM1 と Toll-like receptor の受容体に結合すると、細胞内に Ca イオンが流入し、細胞内の各種カインースを活性化し NFκB を介して、サイトカイン特に IL-8 の mRNA 合成が促進されることが考えられている。我々はこれまでに緑膿菌線毛蛋白の経気道免疫により、緑膿菌線毛特異的 IgA 抗体が肺内で有意に産生されることを明らかにし、さらに *in vivo* で緑膿菌肺炎の成立を抑制し、生存率が上昇することを報告した

(Ohama M, Kadota J et al. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 47: 107-115, 2006)。

本研究では、緑膿菌感染の初期過程である気道上皮細胞への緑膿菌の付着に着目し、その最も重要な機能を持つ緑膿菌線毛および線毛の合成ペプチドを用いてマウス由来の樹状細胞を *in vitro* で刺激し、それによって得られる線毛蛋白抗原刺激成熟樹状細胞をマウスに導入して線毛蛋白のワクチン効果を検討し、緑膿菌性肺炎に対する予防戦略の実用化に向けての基盤を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 緑膿菌線毛蛋白の精製

緑膿菌 PA02001-2 株を Mueller-Hinton 寒天培地で培養した。寒天培地上の菌を集菌し、15%スクロース + Standard saline citrate buffer に懸濁し、スターラーで攪拌して溶菌させた。10000g 15 分間、遠心分離

を行い、上清を回収し蒸留水中で透析を行った。硫酸アンモニウム飽和溶液にて塩析を行い、27000g 1時間、遠心分離を行い沈渣を回収した。再懸濁した沈渣を、濃度勾配スクロース溶液(30~70%)の層の上に重ね、11000g 24時間、超遠心を行い、線毛のバンドを回収し蒸留水中で透析を行った。得られた線毛を多く含む検体をさらに精製するために SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、17.8kDa の線毛蛋白のバンドの領域のゲルを切り出し、線毛蛋白を電気溶出によりゲルから抽出した。蒸留水での透析の後、凍結乾燥を行い緑膿菌線毛蛋白を精製した。

こうして得られた線毛蛋白中には LPS が混入しているため、線毛蛋白懸濁液をポリミキシン B を固定化したレジンを充填したカラム (Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Columns, Thermo SCIENTIFIC) に通すことにより、線毛蛋白に混入している LPS の除去を試みた。

(2) 線毛蛋白ペプチドの合成

以前の検討で 143 のアミノ酸残基よりなる緑膿菌 PAO-1 株の線毛蛋白の N 末端からのアミノ酸残基 101-120 残基に相当する合成ペプチド pili6 (アミノ酸配列: TFQGTGSSPKNATKVITLNR) は、Jaws 細胞からの炎症性サイトカイン産生を誘導し、同ペプチドで刺激した Jaws 細胞とマウス脾臓より分離したナイーブ T 細胞との共培養で、ナイーブ T 細胞の活性化を認めていた。この合成ペプチド pili6 を樹状細胞抗原刺激物質として用いるため、外部業者に委託してその合成を行った。

また、アミノ酸残基数が増えることにより免疫原性が高まる可能性を期待して、今回緑膿菌 PAO-1 株の線毛蛋白の N 末端からのアミノ酸残基 94-143 残基に相当するペプチド(アミノ酸配列:

GAGDITFTFQGTGSSPKNATKVITLNRADGVWACKSTQ
DPMFPTKGCND) (pili303) を外部業者に依頼

して合成した。

(3) マウス骨髄樹状細胞の樹立

BALB/c マウスの大腿骨を phosphate-buffered saline でフラッシュし、骨髄液を採取した。採取した骨髄液を細胞濃度が 2×10^6 cells/mL の濃度となるように調整して、10% FCS、penicillin(100units/ml) -streptomycin(100 μ g/ml)、50 nM 2-mercaptoethanol ならびに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を含む RPMI-1640 培地にて培養し、骨髄細胞の樹状細胞への分化を試みた。各種条件下で培養した細胞を回収して、フローサイトメトリを用いて CD11c 陽性細胞であることの確認実験を行った。

(4) 抗原刺激されたマウス由来樹状細胞のナイーブ T 細胞に対する効果

合成ペプチド pili6 または pili303 を細胞培養液中の濃度が 250 μ g/ml となるようにマウス由来樹状細胞 (Jaws 細胞: 4×10^4 /well) 培養液に加え 48 時間刺激した後にホルマリン固定を行い、C57BL/6 マウスの脾臓から磁気細胞分離法により抽出したナイーブ T 細胞 (2×10^5 /well) と混合培養を行い、96 時間後の細胞培養液上清中の IFN- γ 、IL-10 を ELISA で定量した。

4. 研究成果

(1) 緑膿菌線毛蛋白の精製

スクロース濃度勾配超遠心法および SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、線毛蛋白の精製を行った。当初は緑膿菌線毛蛋白の精製に問題が生じていたが、精製過程の透析時間が長くなりすぎると線毛が分解され、その精製量が大幅に低下することが明らかとなった。その後は安定して線毛蛋白の精製が出来るようになった。

線毛蛋白に少量混入している LPS を除去す

るために、エンドトキシン除去カラムを用いて LPS の除去を試みた。線毛蛋白を蒸留水に溶解したものをエンドトキシン除去カラムに通した場合、線毛蛋白の喪失が非常に多いことが問題となった。その原因として、まずポリミキシン B と線毛蛋白とにイオニックな非特異的結合が生じている可能性を疑い、溶媒に炭酸水素アンモニウム溶液や塩化ナトリウム溶液を用いたが、線毛蛋白の喪失は依然多かった。このことから、線毛蛋白と LPS とが強固に結合している可能性が考えられた。この結合の解除を目的に、溶媒として界面活性剤であるデオキシコール酸ナトリウム溶液を溶媒として用いて検討を行った。デオキシコール酸ナトリウム溶液の濃度を 0.0625、0.125、0.25、0.5、1% の 5 段階に調整して検討した。0.25% 以下の濃度では線毛蛋白は回収できなかった。一方、デオキシコール酸の濃度が 1% では LPS の除去がほとんどなされなかった。0.5% の濃度において、線毛蛋白の回収率と LPS の除去効率が最も良好であったが、この条件においても線毛蛋白の回収率は 5~10% 程度と低値であり、樹状細胞に対する抗原刺激実験において必要となる量の緑膿菌線毛蛋白の獲得は困難であった。

(2) マウス骨髄樹状細胞の樹立

BALB/c マウスの大腿骨から骨髄細胞を採取し、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子と共に培養することで、樹状細胞へと分化させる実験を行った。まず BALB/c マウスの大腿骨を phosphate-buffered saline でフラッシュし、骨髄液を採取し、その中に存在する骨髄細胞を得る実験を実施した。当初は目標としていた 2×10^6 個/mL の骨髄細胞が十分に得られなかったが、手技の習熟により効率化、処理時間を短縮することで、骨髄細胞を予定の細胞数確保することが可能となった。さらに、得られた骨髄細胞を GM-CSF で培養し、細胞を回収してフローサイトメトリを用

いて CD11c 陽性細胞であることの確認実験を行った。細胞の分化が高効率となる条件を探るために、培養液中の GM-CSF の濃度と培養日数を変更し検討したところ、GM-CSF の濃度は 20ng/mL、培養日数は 8 日間が最も良好であった。しかしこの条件下で得られた細胞は CD11c 陽性細胞が 60% 程度であり、目標とする 90% 以上までには至らなかった。

(3) 抗原刺激されたマウス樹状細胞のナイーブ T 細胞に対する効果

当初は抗原提示細胞として、BALB/c マウス骨髄細胞から樹立した樹状細胞を用いる予定であったが、先述のように目標とする純度の樹状細胞が得られなかったため、代わりに C57BL/6 マウスの骨髄系樹状細胞株である Jaws 細胞を抗原提示細胞として使用した。以前の検討(基盤研究(C)課題番号: 23591152)でも検討したように、合成ペプチド pili6 刺激群ではコントロール群(PBS 刺激群)と比較して、IFN- γ 産生の軽度亢進の傾向を認めたが、IL-10 の産生亢進は認めなかった。

一方、今回の検討で新たに作成した合成ペプチド pili303 刺激群においては IFN- γ 、IL-10 双方の産生亢進の傾向を認め、合成ペプチド pili303 でより強く特異的免疫が誘導される可能性が示唆された。

今後、pili303 を用いて本研究で明らかにできなかった in vivo における効果を検討していく予定である。

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 5 件)

(1) 門田 淳一、呼吸器感染症の最近の話題、第 54 回日本呼吸器学会学術講演会、2014 年 4 月 25 ~ 27 日、大阪

(2) 平松 和史、緑膿菌線毛を標的とした感染制御の可能性、第 49 回緑膿菌感染症研究会、2015 年 2 月 6 ~ 7 日、東京

(3) 門田 淳一、高齢社会における呼吸器感染症をどうマネジメントするか？ ~ 肺炎から慢性気道感染症まで ~、第 89 回日本感染症学会総会学術講演会、2015 年 4 月 16 ~ 17 日、京都

(4) Kazuhiko Hashinaga, Hiroki Yoshikawa, Kenji Umeki, Kazufumi Hiramatsu, Jun-ichi Kadota. The potential for developing vaccines mediated by dendritic cells pulsed with *Pseudomonas aeruginosa* pili protein, The 16th Asia Pacific Congress of Clinical Microbiology & Infection (APCCMI), 30 November ~ 3 December 2016, Melbourne, Australia

(5) 橋永 一彦、平松 和史、山末 まり、吉川 裕喜、鳥羽 聡史、梅木 健二、安東 優、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に関する検討、第 51 回緑膿菌感染症研究会、2017 年 2 月 10 ~ 11 日、大分

〔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, Jun-ichi)
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・教授
研究者番号：80301381

橋永 一彦 (HASHINAGA, Kazuhiko)
大分大学・医学部・病院特任助教
研究者番号：80649773

(3) 連携研究者

()

(4) 研究協力者

()