

令和元年6月12日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08024

研究課題名(和文) M13ファージワクチンによるB細胞活性化機構の解明とワクチン効果の検討

研究課題名(英文) Immunological mechanism for M13-phage-based vaccine immunogenicity and its application.

研究代表者

橋口 周平 (Hashiguchi, Shuhei)

鹿児島大学・理工学域工学系・助教

研究者番号：40295275

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)：M13ファージ表面に、スギ花粉アレルゲンCry j 1のB細胞エпитープを提示させた粒子をワクチンとしてマウスに免疫したところ、スギ花粉感作マウスにおいてアレルギー症状の緩和が認められた。ファージワクチン接種によるIgE抗体価への影響は認められなかった。M13ファージを骨髄由来マクロファージあるいは骨髄由来樹状細胞と共培養した結果、炎症性サイトカインの産生を伴わないマクロファージへの明確な取り込みが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の推進により、M13ファージは、病原体に対する予期しない炎症反応を惹起することがないワクチン担体として、特に抗体が有効とされる疾患や感染症を対象としたワクチン開発に有用であることを見出した。また、本研究課題で得られたファージに対する免疫応答誘導のメカニズムに関する詳細は、近年、国内外において注目されているファージセラピー(ファージ療法)におけるファージに対する免疫応答の影響を考察する上で有用な知見となり得る。

研究成果の概要(英文)：Immunization of M13 phage displaying B-cell epitope of Cry j 1 was effective in suppressing Cry j 1-induced allergic symptoms in Japanese cedar pollen-sensitized mice. No significant changes in the amount of Cry j 1-specific IgE were observed. M13 phage was preferentially taken up by bone marrow-derived macrophages (BMM) compared to bone marrow-derived dendritic cells (BMDC). Both of BMM and BMDC did not produce TNF-alpha, IL-6 and IL-1beta upon stimulation with M13 phage alone or M13 phage and Alum.

研究分野：免疫学

キーワード：ワクチン バクテリオファージ ファージディスプレイ ペプチドワクチン スギ花粉症 ファージ療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ファージディスプレイ法で広く用いられている M13 ファージをリン酸緩衝液に溶かしてマウスの皮下もしくは腹腔内投与すると一次応答の段階から抗原特異的 IgG 抗体の誘導が認められる。また、M13 ファージ表面に外来の抗原分子を提示させたファージ粒子の免疫では、ファージだけでなくファージ表面に提示されているペプチド抗原に対しても特異的 IgG 抗体も誘導される。以前の研究で、M13 ファージに対する抗体応答には MyD88 シグナルが必須であることを明らかにしていたが、M13 ファージを免疫した際に起こる免疫応答の詳細については不明な点が多く、また、ファージを担体としたワクチンの設計法についても十分な検討がなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、ファージワクチンを様々な感染症、疾病対策のためのワクチン開発に応用することを目的として、ペプチド抗原の提示方法の違いによる M13 ファージワクチンの抗原性の検討、疾病モデルマウスでのファージワクチンの効果の検討および M13 ファージ免疫における抗原提示細胞の同定、ファージ刺激により産生される炎症性サイトカインについて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) M13 ファージ表面に存在する g3 蛋白および g8 蛋白の両方に、スギ花粉アレルゲン Cry j 1 の B 細胞エピトープあるいはアミロイド ペプチドの N 末側のアミノ酸配列を融合蛋白として、ファージ表面に多価で提示させた組み換えファージを単離・精製した。作製したファージ粒子 (エンドトキシン濃度: <0.05 EU/ml) をマウスに免疫し、Cry j 1 あるいはアミロイド ペプチドに対する抗体価を ELISA 法により解析した。

(2) スギ花粉抽出物を alum アジュバントと共に腹腔内免疫したスギ花粉感作マウスに、スギ花粉アレルゲン Cry j 1 の B 細胞エピトープを提示させたファージを免疫し、ファージ免疫前後での Cry j 1 特異的 IgG サブクラス応答、Cry j 1 の経鼻投与により誘発されるアレルギー症状の緩和効果を検討した。

(3) M13 ファージが誘導する免疫応答に関して、蛍光標識した M13 ファージを作製し、骨髄由来樹状細胞 (BMDC) および骨髄由来マクロファージ (BMM) と共培養し M13 ファージの取り込みを解析した。また、BMDC および BMM にアラムアジュバント存在下あるいは非存在下で M13 ファージを加えて刺激し、培養上清中に産生される炎症性サイトカイン (TNF-alpha, IL-6, IL-1beta) を測定した。

4. 研究成果

(1) ペプチド抗原 (スギ花粉アレルゲン Cry j 1 の B 細胞エピトープあるいはアミロイド ペプチドの N 末側の配列) を M13 ファージ表面の g3 蛋白、g8 蛋白あるいは g3 蛋白および g8 蛋白の両方に提示させたファージを構築した。精製した組み換えファージをマウスに免疫後、血清中の Cry j 1 あるいはアミロイド ペプチド特異的 IgG 抗体価を ELISA 法により解析した。その結果、抗原エピトープを g8 蛋白に多価で提示させたファージの免疫では、C57BL/6 マウスおよび BALB/c マウスいずれのマウスにおいても、ファージの皮下あるいは腹腔内への単回投与により抗原特異的 IgG 抗体の誘導が認められた。一方、抗原エピトープを M13 ファージの g3 蛋白に提示させたファージの免疫では、2 回目の免疫後に抗原特異的 IgG 抗体の誘導を認めた。抗原ペプチドを g3 蛋白および g8 蛋白の両方に提示させたファージについては、g3 蛋白あるいは g8 蛋白の融合蛋白として単独でファージ表面に提示させたファージと比較して、2 回目の免疫後の血清中において IgG 抗体価の増強が認められた。

(2) スギ花粉抽出物を alum アジュバントと共に免疫したスギ花粉感作マウスに、スギ花粉アレルゲン Cry j 1 の B 細胞エピトープを M13 ファージの g3 蛋白および g8 蛋白の両方に提示させたファージ (Cry j 1 組み換えファージ) を皮下投与し、ファージ免疫前後での抗体応答を解析した。その結果、ファージ接種前に認められる IgG1 および IgE クラスの抗体価はそのままに、スギ花粉抽出物感作マウスへの Cry j 1 組み換えファージ接種後では、スギ花粉抽出物感作時には観察されなかった IgG2a, IgG2b および IgG3 クラスの抗体の誘導が認められた。スギ花粉感作マウスへのファージ接種後に、Cry j 1 の経鼻投与によるアレルギー誘発試験を行った結果、リン酸緩衝液を投与した対照群と比較してアレルギー症状が緩和する様子が観察された。

(3) M13 ファージを蛍光標識後、骨髄由来樹状細胞 (BMDC) および骨髄由来マクロファージ (BMM) と共培養し M13 ファージの取り込みを解析した結果、蛍光標識 M13 ファージの取り込みは、BMDC より BMM において高頻度で観察された。一方、M13 ファージと共培養した BMM および BMDC の培養上清に含まれる TNF-alpha, IL-6, IL-1beta 産生量を測定した結果、いずれも測定限界値以下であった。IL-1beta はファージとアラムアジュバントの共培養においても検出されなかった。

(4) 以上の結果より、M13 ファージは炎症性サイトカインの産生を伴うことなく IgG 抗体応答を誘導できると考えられることから、安全なワクチン担体としての利用が期待される。また、スギ花粉アレルゲンの B 細胞エピトープを提示させたファージワクチンはスギ花粉症の治療に有効であることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Kei Nakagawaji, Shuhei Hashiguchi, Akikazu Murakami, Masahito Hashimoto. Preferential uptake of M13 phage vaccine by murine macrophages without the production of proinflammatory cytokines. 第 47 回日本免疫学会学術集会、2018 年
2. 橋口周平、辻村誠一、Diurnal variations in humoral immune response against bacteriophage in mice. 第 24 回日本時間生物学会学術大会、2017 年
3. 宮原隆二、篠崎太亮、中西美加、中川路けい、橋本雅仁、橋口周平、抗原エピトープ特異的 IgG 抗体を誘導するファージワクチンの分子設計法、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年
4. 宮原隆二、樋口雄介、橋本雅仁、橋口周平、M13 ファージペプチドワクチンの設計法：抗原提示方法の改良による抗原性の増強、平成 29 年度日本生化学会九州支部例会、2017 年
5. 中川路けい、宮原隆二、橋本雅仁、橋口周平、M13 ファージを担体としたワクチンによる自己抗体誘導の可能性、平成 29 年度日本生化学会九州支部例会、2017 年
6. Ryuji Miyahara, Yui Matsushita, Akiko Shimotsu, Taisuke, Shinozaki, Masahito Hashimoto, Kazuhisa Sugimura, Shuhei Hashiguchi, M13 phage vaccine for Alzheimer's disease that induce T-cell independent IgG response against A β peptide. 第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年
7. 宮原隆二、下津堯子、松下由依、篠崎太亮、橋本雅仁、橋口周平、M13 ファージペプチドワクチンの設計法：抗原分子の提示方法の違いと抗原性、ファージ・環境ウイルス研究合同シンポジウム、2016 年
8. Ryuji Miyahara, Akiko Shimotsu, Yui Matsushita, Mai Tsukada, Masahito Hashimoto, Kazuhisa Sugimura, Shuhei Hashiguchi, Immunogenicity of M13 phage vaccine displaying N-terminal region of amyloid beta peptide: comparison of M13 phage vaccine expressed as g3p fusion and g8p fusion. International Congress of Immunology 2016, 2016 年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.cb.kagoshima-u.ac.jp/staff/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岩野 英知

ローマ字氏名：(IWANO, hidetomo)

所属研究機関名：酪農学園大学

部局名：獣医学群

職名：教授

研究者番号（8桁）：60382488

研究分担者氏名：村上 明一

ローマ字氏名：(MURAKAMI, akikazu)

所属研究機関名：琉球大学

部局名：医学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：60382488

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。