

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06386

研究課題名（和文）ファージワクチンの免疫応答誘導メカニズムの解明とB細胞移入療法への応用の試み

研究課題名（英文）Immunological mechanism of action of bacteriophage-based vaccines and its application for in vitro immunization

研究代表者

橋口 周平（Shuhei, Hashiguchi）

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：私どもは、ファージディスプレイ技術に基づいたワクチンの開発を行う過程で、M13ファージは既存のアジュバントとは異なるメカニズムで免疫応答を誘導することを見出している。本研究では、M13ファージワクチンが誘導する免疫応答について解析した。緑膿菌を溶菌するファージを単離しマウスにPBS溶液として投与したところ、M13ファージと同様にファージ特異的IgG抗体の誘導が認められた。アジュバントの添加を必要とすることなく一次応答の段階からIgG抗体応答を惹起させる現象は、ファージ全般に特徴的な性質であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌に感染し死滅させるバクテリオファージを利用したファージ療法の有用性が再認識されはじめ、ファージワクチンへの関心が国際的に高まりつつある。ファージ特有の免疫誘導のメカニズムを解明することは、ファージを担体としたワクチン開発に限らず、共生関係にあるファージ・腸内細菌・哺乳動物間の相互作用の理解、ファージ療法における免疫応答の影響を考慮する上で重要な知見となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the details of the immune response induced by the M13 phage vaccine and found that the M13 phage induces an immune response through a mechanism of action different from that of adjuvants such as Alum salts. We isolated *Pseudomonas aeruginosa* phage from the environment, and tested the immunogenicity of isolated phage in mice. Induction of antibody response was observed without the addition of any adjuvants, suggesting that it is a common feature that may be shared by bacteriophages.

研究分野：生物化学、免疫学

キーワード：ファージ バクテリオファージ ワクチン アジュバント ファージワクチン ファージセラピー ファージ療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌に感染し死滅させるバクテリオファージを利用したファージ療法の有用性が再認識されはじめ、ファージワクチンへの関心が国際的に高まりつつある。私どもはファージディスプレイ技術に基づいたファージワクチンの開発を行う過程において、M13 ファージがアジュバントなどの免疫賦活剤を必要とせず MyD88 を必須とするメカニズムで M13 ファージに対する非常に強力な IgG 抗体応答が誘導されることを報告したが、その後の基盤研究において、MyD88 をアダプター分子にもつパターン認識分子である TLR2, 4, 7 および 9 を必要とすることなく IgG 抗体応答を誘導した。同様の現象がアデノ随伴ウイルスで報告されているが、M13 ファージに対する免疫応答誘導機構については、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、M13 ファージワクチンにより惹起される免疫誘導機構の解明を目的として、ペプチド提示ファージを野生型マウス、MyD88 欠損マウス、もしくは、TLR9 欠損マウスに免疫し、ファージ表面に提示させた抗原分子および M13 ファージに対する抗体応答を解析した。ファージワクチンの抗体応答誘導能の活用方法の一つとして *in vitro* で B 細胞活性化する可能性について検討した。また、哺乳動物には感染しないファージが生体に与える影響に関して、M13 ファージとは形態が異なる溶菌ファージを用いてマウスにおける免疫応答を解析した。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6 マウス、MyD88 欠損マウスおよび TLR9 欠損マウス (C57BL/6 バックグラウンド) に、スギ花粉アレルゲンである Cry j 1 の B 細胞エпитープのアミノ酸配列を M13 ファージの g8p 分子に提示させた Cry j 1-g8p ファージ (1×10^{12} virion/100 μ l) を腹腔内投与した。Alum アジュバントを用いた免疫実験では、C56BL/6 マウスに M13 ファージあるいは Cry j 1-g8p ファージ (1×10^{11} virion/100 μ l) を Alum (0.5 mg) 存在下/非存在下で皮下投与した。抗体の測定は ELISA 法により解析した。96 穴プレートに M13 ファージ (1×10^{10} virion /40 μ l/well) または Cry j 1 (80 ng/40 μ l/well) を 4 で一晚コートした。0.25% ウシ血清アルブミン/0.1% Tween20 を含むリン酸緩衝液 (Phosphate-Buffered Saline ; PBS) でブロックし、希釈したマウス血清を加えた。検出抗体としてアルカリフォスファターゼ標識した抗マウス IgM 抗体、抗マウス IgG 抗体、もしくは、4 種類の抗マウス IgG サブクラス抗体を加え、*p*-ニトロフェニルリン酸を含む基質溶液と反応させ 405 nm の吸光度を測定した。

(2) 自然環境中から緑膿菌 PA-01 株に感染し溶菌するファージクロンを単離した。*in vivo* において殺菌活性が認められた PA-V1 ファージを、超遠心分離による密度勾配遠心でファージを精製後、2% リンタングステン酸溶液を用いてネガティブ染色し透過型電子顕微鏡を用いて加圧電圧 80 kV で観察を行った。PA-V1 ファージ BALB/c マウスの腹腔内に免疫し、誘導されるファージ特異的抗体応答を、PA-V1 あるいは M13 ファージをコートしたプレートを用いて、(1)に記載の方法で解析した。

4. 研究成果

(1) 外来抗原を提示させた Cry j 1-g8p ファージを用いて、提示抗原に対する抗体応答の誘導に MyD88 および TLR9 が関係するか解析を行った。Cry j 1-g8p ファージを MyD88 欠損マウスおよび TLR9 欠損マウスに免疫し Cry j 1 に対する IgG 抗体を解析した結果、M13 ファージに対する抗体応答を解析した以前の研究結果と同様に MyD88 を必須とする抗体応答が認められた。IgG

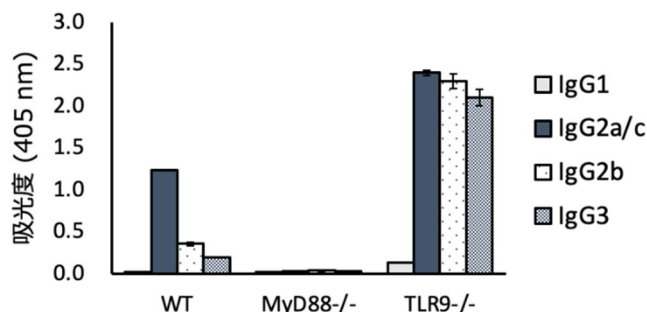


図1 Cry j 1 特異的 IgG サブクラス応答

サブクラス応答を解析した結果、Cry j 1 に対する抗体応答は野生型マウスでは IgG2c クラスが顕著な抗体応答が、TLR9 欠損マウスでは Cry j 1 に対する抗体応答の増強が認められた(図1)。

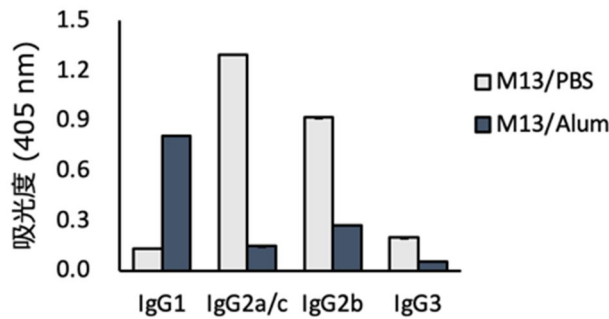
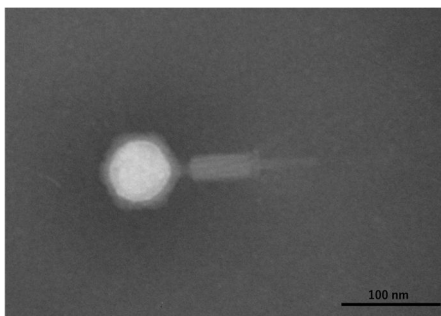


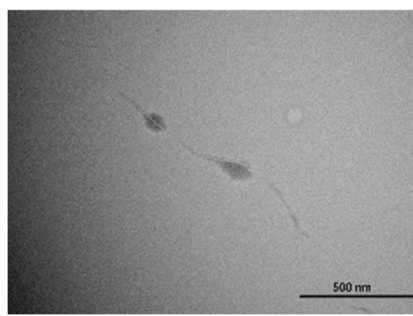
図 2 M13 ファージとアラムアジュバントの併用により誘導されるファージ特異的 IgG 抗体応答

M13 ファージをアラムアジュバントとともに皮下投与し誘導される抗体応答を解析した結果、M13 ファージ単独免疫群では投与後 7 日目から M13 ファージ特異的 IgG 抗体の誘導が認められ、免疫後 14 日後は、どちらのマウス群でも M13 ファージ特異的抗体応答の誘導が認められた。一次免疫後 62 日目の血清を用いて IgG サブクラス応答を解析したところ、M13 ファージ単独で免疫したマウスでは IgG2c、IgG2b クラスの抗体が誘導され、アラムアジュバントを用いて免疫したマウスでは IgG1 クラスの抗体が誘導された (図 2)。Cry j 1 提示ファージをアラムアジュバント存在下あるいは非存在下でマウスに皮下投与し誘導される抗体応答を解析した結果においては、Cry j 1 ファージを単独で免疫したマウスでは Cry j 1 特異的 IgG 抗体の誘導が認められたが、アラムアジュバントと共に免疫したマウスでは Cry j 1 特異的 IgG 抗体の誘導は認められなかった。M13 ファージとアラムアジュバントを混合した溶液画分にはファージの感染価は検出限界以下であり、ほとんどの M13 ファージはアラムアジュバントに吸着されていた。M13 ファージを単独で投与した際に誘導される免疫応答は、アラムアジュバントとは異なる作用機序で誘導されると考えられる。また、M13 ファージを脾臓細胞とインキュベートし *in vitro* 刺激により IgG クラススイッチの誘導を試みた結果、IgG 抗体の産生は認められなかった。

(2) 緑膿菌 PA01 株を溶菌するファージを鹿児島市内の河川から単離し PA01 株に対する溶菌活性を有するファージを単離した。単離されたファージクローン (PA-V1) の電子顕微鏡観察を行った結果、PA-V1 は頭部、尾部、脚部を有する形態であり、頭部約 90 nm、尾部約 80 nm、脚部約 60 nm のファージであることが明らかとなった (図 3A)。M13 ファージでは繊維状の形態が観察された (図 3B)。



(A) PA-V1 ファージ



(B) M13 ファージ

図 3. 透過型電子顕微鏡による緑膿菌ファージの形態観察

超遠心分離装置を用いた密度勾配遠心により精製した PA-V1 ファージを PBS に溶解後、BALB/c マウスの腹腔内に投与し (5×10^{10} pfu (plaque forming unit)/100 μ l)、ファージ投与から 14 日および 26 日後の血清を用いて、PA-V1 ファージに結合する IgG 抗体を解析した。その結果、免疫から 14 日後の血清において、PA-V1 ファージに結合する IgG 抗体の誘導が認められ、26 日後では IgG 抗体価の増加が認められた (図 4)。

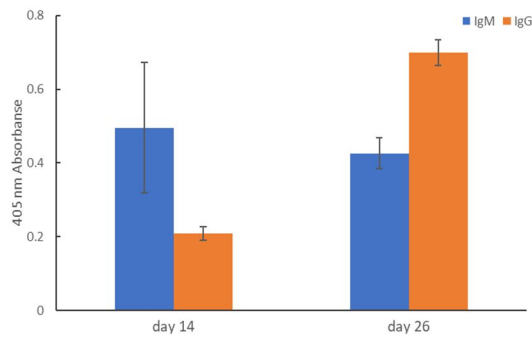


図 4 PA-V1 フェージの腹腔内投与により誘導される PA-V1 フェージに対する抗体応答

M13 フェージと同様にアジュバントなしの免疫で、一次応答の段階から IgG 抗体の誘導が認められたことから、PA-V1 あるいは M13 フェージの免疫から 26 日後の血清を用いて、それぞれのフェージに対する IgG サブクラス抗体を解析した。その結果、M13 フェージを免疫したマウス群においては、これまでの報告の通り、IgG2a クラスが顕著な IgG サブクラス応答が観察されたのに対して、PA-V1 フェージ群においては、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 の全ての IgG サブクラス抗体の誘導が認められた (図 5)。

PA-V1フェージに対するIgGサブクラス

M13フェージに対するIgGサブクラス

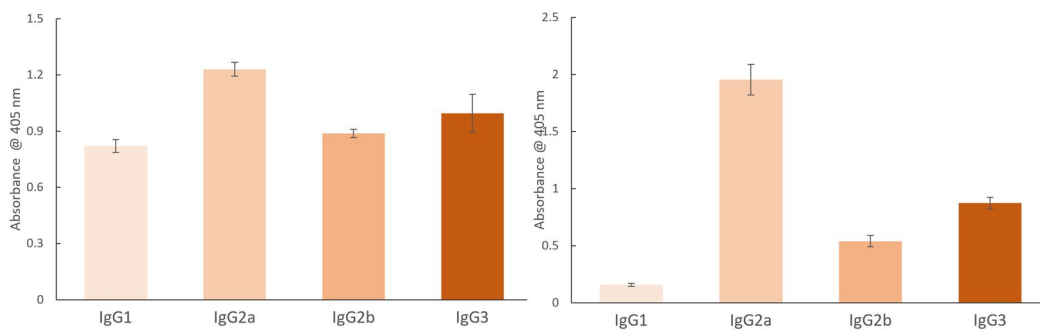


図 5 PA-V1 フェージ(左)あるいは M13 フェージ(右)の投与により誘導された IgG サブクラス抗体

PA-V1 フェージをマウスに免疫すると M13 フェージと異なる免疫応答を誘導することから、新たなフェージワクチン担体としての可能性が示唆された。

M13 フェージに代表される繊維状フェージだけでなく、大腸菌に感染する T4、T7、フェージを担体とするワクチン開発が国際的に行われている。今後、様々な形態のフェージで検証する必要があるが、M13 フェージに特有の免疫応答誘導能は、フェージ全般に備わった性質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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 橋口周平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 6
3. 書名 医学のあゆみ、細菌に感染するバクテリオファージを担体とするファージワクチン設計	

〔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	岩野 英知 (Iwano Hidetomo) (60382488)	酪農学園大学・獣医学群・教授 (30109)	
研究分担者	村上 明一 (Murakami Akikazu) (00733635)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授 (16101)	

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