

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09565

研究課題名(和文) 結核菌抗原による形質細胞様樹状細胞の活性化を介する新しい結核防御免疫機構の解明

研究課題名(英文) Study of the protective immune mechanism against tuberculosis through pDC activation induced by CpG-ODN and Mycobacterium tuberculosis antigen

研究代表者

鈴木 史子 (Suzuki, Fumiko)

福井大学・学術研究院医学系部門・特命助教

研究者番号：80291376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：増殖期および休止期の結核菌が発現するタンパク質抗原である「M」はDNA結合性を保持している。一方、天然型CpGオリゴDNAである「G」は形質細胞様樹状細胞を活性化する。この2つを組み合わせると動物に投与すると結核菌感染への抵抗性が増すことが示唆されたため、本研究はこのメカニズム解明を目的とした。その結果、ヒト末梢血単核球細胞をこの抗原とCpG-DNAと共培養するとIFN- γ 産生の増強と共刺激分子の発現亢進が誘導されること、この増強作用はこの抗原を介したCpG-DNAの細胞内移行の亢進に起因すると考えられることを明らかにした。

本研究成果は結核ワクチンの創製につながる重要なものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The major protein of Mycobacterium tuberculosis, "M", is expressed both in the growth phase and in the resting phase. On the other hand, the palindromic deoxyoligonucleotide, "G", containing a CpG motif induces the activation of plasmacytoid dendritic cells (pDCs). Human peripheral mononuclear cells co-cultured with a combination of "M" and "G" showed enhanced IFN- γ production from the pDCs and upregulation of costimulators on the surface of dendritic cells (DCs). It is suggested that both increases in IFN- γ production and costimulator expression are dependent on efficient transfer of "G" to DCs mediated by "M". The synergistic immune mechanism induced by the combination of "M" antigen and "G" adjuvant is valuable as the scientific basis for the development of new vaccines against tuberculosis.

研究分野：分子免疫

キーワード：結核 CpGオリゴDNA 形質細胞様樹状細胞 骨髄系樹状細胞 共刺激分子

1. 研究開始当初の背景

増殖期および休止(潜在)期の結核菌が持続的に発現するタンパク質抗原である「M」はDNAと結合する性質を保持している。

一方、BCG DNAを模倣するパリンドローム様 CpG オリゴDNAである「G」は形質細胞様樹状細胞(pDC)のToll-Like Receptor 9 (TLR9)に作用してInterferon(IFN)-産生を強く誘導する。すべての塩基がホスホジエステル結合の天然型であることから、副作用を起こさない感染症ワクチンのアジュバントとして有用性が強く期待されている。

本研究は、「M」を抗原、「G」をアジュバントとして投与した動物に、結核菌感染に対する抵抗性の増強が見られたことに着想を得た。

日本の結核罹患率は先進国中でも高く、年間2万人以上が発病している(厚労省)ことから、新規結核ワクチンの開発は国内外の重要課題である。この現状を踏まえ、我々は、「M」と「G」の組み合わせによる結核防御免疫増強のメカニズムを明らかにすることにより、新しい結核ワクチンの創製を目指すこととした。

2. 研究の目的

本研究は、「M」が「G」によるpDCの活性化を亢進して結核菌感染に対する抵抗性を増強するという、新しい結核防御免疫のメカニズムを明らかにすることを目的とした。将来的には、本研究成果を科学的基盤として取り入れた新しい結核ワクチンの創製につなげることを目標としている。

3. 研究の方法

(1) ヒト末梢血単核球細胞(PBMC)およびpDCの分離と培養: ヒト末梢血からパーコール(GEヘルスケア社)を用いて定法に従いPBMCまたはpDCを分離し実験に供した。ヒト末梢血は、同意を得られた患者様の自己血貯血の不要部分をいただき、これを使用した(福井大学医学部倫理審査委員会 第851号)。

分離したPBMCまたはpDCを「G」ならびに「M」の存在下または非存在下で、目的に応じた時間の培養を行った。培地はRPMI 1640(半井、10% FCSならびにPC/SM含有)を用いた。

(2) IFN- 測定: PBMCから産生されたIFN-量は、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA法)に基づいたヒトIFN-マ

ルチサブタイプエライザキット(PBL社)を用いて測定した。

(3) フローサイトメトリー解析: 培養後のPBMCまたはpDCを、細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体(BioLegend社、BD Pharmingen社)を用いて多重染色し、固定した。フローサイトメーター(FC)を用いてpDCならびに骨髄系樹状細胞のmDC1/mDC2をクラス分けしたうえで(図参照)各解析を行った。

共刺激分子の発現解析の場合には、PBMCを「G」±「M」と共培養後、共刺激分子に対する抗体を含む蛍光標識抗体にて多重染色して固定し、FCを用いて解析を行った。

IFN-産生細胞の同定の場合には、PBMCを「G」と共培養後、多重染色・固定し、細胞膜を可溶化後、蛍光標識抗IFN-抗体にて染色し、FCにより解析した。培養はBrefeldin A存在下で行った。

細胞内取り込み実験の場合には、PBMCに、蛍光標識の「G」と「M」を単独または組み合わせで添加し、37°Cでインキュベーションした後、多重染色・固定し、FCを用いて解析した。

(4) Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA法): 「G」と「M」を混合(「G」:「M」モル比は1:2から1:0.2)して、37°Cでインキュベーションした後に電気泳動を行い、「G」バンドの位置の変化により「M」との結合の有無を確認した。

(5) 共焦点レーザー顕微鏡による解析: pDCに蛍光標識「G」を添加して37°Cで15分~1時間インキュベーションした後、蛍光標識CD303染色後に固定した。続いて細胞膜を可溶化し、細胞小器官に対する蛍光標識抗体を用いて染色した。共焦点レーザー顕微鏡(OLYMPUS)を用いて、CD303陽性によりpDCを確認したうえで各蛍光の細胞内局在を解析した。

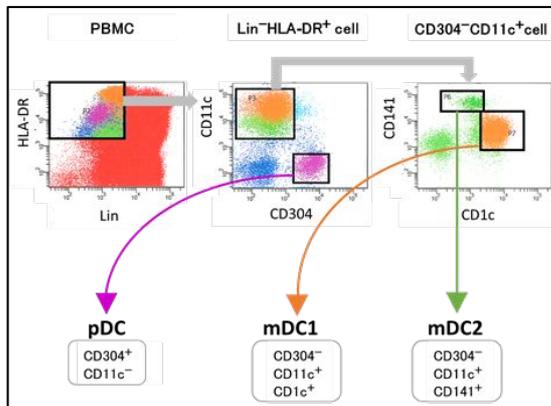
(6) 「G」と「M」の合成および調整方法: 「G」は北海道システム・サイエンス株式会社に合成を依頼した。乾燥原末は大塚蒸留水を用いて1mMに調整(OD260値を指標とした)し、使用時まで-80°C保存とした。「M」は連携研究者である松本壮吉先生から譲渡していただいた。

4. 研究成果

(1) IFN-産生誘導活性

「G」は TLR9 に作用し IFN- γ 産生誘導シグナルを活性化する (ref)。本研究ではまず、「G」により IFN- γ を産生する細胞の同定を試みた。その結果、「G」により産生された IFN- γ は pDC に検出されたが、mDC1/mDC2 には検出されなかった。そこで次に、細胞内に発現している TLR9 を FC にて解析した。その結果、TLR9 は pDC に有意に発現していることが示された。

一方、ELISA 法による IFN- γ 測定の結果、「M」は単独では IFN- γ 産生を誘導しないが、「G」と組み合わせると、「G」の IFN- γ 産生を増強する効果を示した。



上図：FC 解析による pDC/mDC1/mDC2 の分離・同定例

(2) 共刺激分子の発現

DC の成熟における「G」の効果調べるため、共刺激分子(CD80/CD86/CD40)の発現レベルを FC により解析した。その結果、「G」は pDC/mDC1/mDC2 のいずれにも濃度依存性 (0.05-0.8 μ M) に共刺激分子の発現を誘導することが明らかになった。さらに、CD80 の発現誘導における IFN- γ の関与を調べたところ、IFN- γ / -R-Ab 存在下では発現抑制がみられたことから、CD80 の発現誘導は IFN- γ 産生を介することが示唆された。

一方、「M」(0.005 μ M) は mDC1/mDC2 に CD80 の発現を誘導したが、pDC にほとんど影響はみられなかった。さらに「G」と「M」の組み合わせでは、すべての DC において、「G」または「M」のみと共培養した場合よりも強い CD80 発現誘導が観察された。

(3) 「G」と「M」の結合

上記のように、「G」と「M」を組み合わせるとサイトカイン産生や共刺激分子発現において増強作用が認められたことから、「G」と「M」は密接に関与しながら細胞に作用していると考えられた。そこで、「G」と「M」

が結合する可能性について EMSA 法を用いて検討した。その結果、「G」と「M」は直接結合すること、結合のモル比は、IFN- γ 産生において増強がみられる混合比とよく相関することが明らかになった。

(4) 細胞への取り込み

次に、「G」および「M」の蛍光標識体を作製し、細胞への取り込みを FC にて解析した。その結果、蛍光標識「G」は、いずれの DC にも取り込まれていることが示唆された。さらに、蛍光標識「G」を非標識「M」と組み合わせると、いずれの DC にも「G」蛍光の増強が見られた。このことから、「G」の取り込みは「M」との組み合わせにより亢進する可能性が示唆された。

一方、蛍光標識「M」はいずれの DC も染めることが示されたが、非標識「G」との組み合わせの有無による影響は見られなかった。

(5) 細胞内局在

pDC を蛍光標識「G」とインキュベーションし、その細胞内局在を観察した。「G」蛍光の局在と、Transferrin 受容体(early endosome マーカー)ならびに LAMP1 (late endosome マーカー)に対する抗体による染色とのオーバーラップを解析した結果、インキュベーション時間による変化が示唆された。

(6) まとめと考察

「G」と「M」を組み合わせると、PBMC に作用させると、IFN- γ 産生の増強と共刺激分子の発現亢進が認められた。また、「G」と「M」は直接結合することが示された。さらに、「G」に「M」を組み合わせると「G」の細胞内への取り込みが亢進することが示唆された。以上の結果から、「M」と「G」による免疫反応増強作用のメカニズムとして以下の3つの可能性が考えられた。

- 「M」による「G」の細胞内取り込み亢進
「M」は細胞膜に結合しやすい性質を保持していること、「M」と「G」は直接結合することから、「G」の pDC への取り込みは細胞膜に結合する「M」を介して亢進されると推測された。
- 「M」による「G」の細胞内局在変化
細胞膜に結合する「M」を介して「G」が endosome に停留しやすい場合、TLR9 の活性化状態の持続または DNase による分解の回避が生じる可能性があると考えられた。
- DC の分化成熟の亢進

「G」による IFN- γ の産生は「M」により増強されること、DC の共刺激分子 (CD80) の発現は IFN- γ を介すること、「M」と「G」により DC の CD80 発現が増強されることが示された。このような DC の分化成熟の亢進を受けて、T 細胞の活性化が亢進される可能性があると考えられた。

本研究により、「M」と「G」の組み合わせによる免疫反応増強作用とそのメカニズムの重要点が明らかになった。動物における結核菌感染抵抗性の増強との関連についてはさらに詳細な検討が必要であるが、本研究で得られた成果は新しい結核ワクチンの創製において重要かつ有意義であると考えられる。

reference

A palindromic CpG-containing phosphodiester oligodeoxynucleotide as a mucosal adjuvant stimulates plasmacytoid dendritic cell-mediated TH1 immunity. Maeyama J-i, Takatsuka H, Suzuki F, Kubota A, Horiguchi S, Komiya T, Shimada I, Murata E, Osawa Y, Kitagawa H, Matsuki T, Isaka M, Yamamoto S, Iho S. *PLoS One*. 9, e88846 (2014).

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7件)

Phosphodiester-linked new oligodeoxynucleotide promotes vaccine ability to tuberculosis. Maeyama J-I, Hayashi D, Yamamoto T, Yamazaki T, Suzuki F, Ozeki Y, Matsumoto S, Iho S, Yamamoto S. The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting (2018).

The effects of booster vaccine composed of MDP1 and G9.1 against tuberculosis in cynomolgus monkeys. Hayashi D, Maeyama J-I, Yamamoto T, Yamazaki T, Mukai T, Tamura T, Okabayashi S, Suzuki F, Ozeki Y, Yokoyama A, Suzaki Y, Ami Y, Goto Y, Iho S, Matsumoto S and Yamamoto S. The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting (2018).

Study of a novel CpG

oligodeoxynucleotide to promote vaccine ability against TB or Flu. Maeyama J-I, Suzuki F, Ozeki Y, Asanuma H, Matsumoto S, Iho S, Yamamoto S. The 2017 International Society for Vaccines Congress (2017).

前山順一、山崎利雄、林大介、山本十糸子、尾関百合子、鈴木史子、山田雄大、松本壮吉、伊保澄子、山本三郎. 遅延性過敏反応から検討した MDP1 および G9.1 からなる結核ブースターワクチン候補の免疫条件. 第 90 回日本細菌学会 (2017). 鈴木史子、岩崎博道、前山順一、松本壮吉、山本三郎、伊保澄子. 形質細胞様樹状細胞を標的とする TLR9 リガンド G9.1 のアジュバントとしての作用メカニズム. 第 20 回日本ワクチン学会 (2016).

前山順一、山崎利雄、山本十糸子、林大介、鈴木史子、尾関百合子、松本壮吉、伊保澄子、山本三郎. 組み換え結核菌抗原 MDP1 および DNA アジュバント G9.1 からなる結核ブースターワクチン候補の最適化の試み. 第 89 回日本細菌学会 (2016). Maeyama J-I, Suzuki F, Ozeki Y, Matsumoto S, Yamamoto S. Development and evaluation of new tuberculosis booster vaccine candidates. 2015 日本免疫学会 (2015).

[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

鈴木 史子 (SUZUKI, Fumiko)
福井大学・学術研究医学系部門・特命助教
研究者番号：80291376

(2) 研究分担者

島田 一郎 (SHIMADA, Ichiroh)
福井大学・学術研究医学系部門・教授
研究者番号：20272908

西山 晃史 (NISHIYAMA, Akihito)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号：80452069

(3) 連携研究者

松本 壮吉 (MATSUMOTO, Sohkiichi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：30244073

(4) 研究協力者

なし