

令和元年6月28日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19127

研究課題名(和文) 乳酸菌を利用した経口ワクチン系の開発

研究課題名(英文) Development of oral vaccine platform using lactic acid bacteria

研究代表者

高橋 圭太 (Takahashi, Keita)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50634929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳酸菌をワクチン抗原の送達体として用いる新規経口ワクチン系の構築とその免疫誘導効果の改良を行い、以下1)～3)の成果を得た。1)モデル抗原を発現する乳酸菌の経口投与により抗原特異免疫の誘導が可能であると実証した。さらにM細胞標的化により、その免疫誘導能を増強できることを明らかにした。2)経口DNAワクチンの送達体として乳酸菌を用いた場合のDNAの送達機序の一部を明らかにした。3)新規経口ワクチン系の感染防御効果の評価が可能実験系をマウスの病原細菌(*C. rodentium*)を用いて確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸菌をキャリアとして用いることで、現行の注射型ワクチンでは誘導が難しい粘膜免疫の誘導が可能なワクチン系を実現できる可能性を示した。経口ワクチンの有効性を増強する方法として提唱されているM細胞標的化が乳酸菌ワクチン系においても有効に働くことを示すとともに、M細胞標的化の有効性を裏付ける成果を得た。本研究で確立した実験系を用いることで、これまでほとんど行われていない乳酸菌ワクチン系の有効性の比較評価が可能になった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel oral vaccine system using lactic acid bacteria as a carrier of vaccine and obtained the following results. 1) We demonstrated that oral administration of lactic acid bacteria-expressing model antigen can induce antigen-specific immunity in mice. Furthermore, targeting to M cells, specialized intestinal epithelial cells for luminal antigen uptake to Peyer's patches, can enhance the ability of antigen expressing lactic acid bacteria to induce antigen-specific immunity. 2) We revealed the mechanism of plasmid DNA delivery to host intestinal cells from orally administered lactic acid bacteria. 3) We established an experimental system capable of evaluating the protective effect of the novel oral vaccine system, including lactic acid bacteria vaccine, using murine pathogenic *C. rodentium* infection model.

研究分野：細菌学

キーワード：ワクチン 粘膜ワクチン 経口ワクチン DNAワクチン 腸管出血性大腸菌 *Citrobacter rodentium* 乳酸菌

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

1. 研究開始当初の背景

ワクチンは感染症予防の手段として最も効率の良い方法である。現行のワクチン接種は主に筋肉内注射や皮下注射によって行われている。これらの注射型ワクチンは、体内に侵入した病原体に対して有効な免疫（全身性免疫）を誘導することができるが、多くの病原体の侵入門戸である呼吸器粘膜、消化管、生殖器等の粘膜面での免疫（粘膜免疫）を誘導できない。そのため、注射型ワクチンで粘膜局所での感染およびそれに伴う疾患を防御することは難しい。

近年、経口・経鼻等のルートでワクチンを接種し、粘膜面からワクチン成分を吸収させることで全身性免疫と粘膜免疫の両方を誘導する粘膜ワクチン系が注目されている。これまでに、ポリオウイルスやロタウイルス感染症に対する経口ワクチンが使用されてきた。また、インフルエンザウイルス感染症に対する経鼻ワクチンも実用化に向けて臨床試験が行われている。しかし、これらは全て生きた病原体を用いた生ワクチンであるため安全性や有効性に一定の限界が生じる。そのため、より安全性が高い新たな粘膜ワクチン系の開発が求められている。

2. 研究の目的

長年の食経験からヒトでの安全性が担保された乳酸菌をワクチン抗原の送達体として用いることで、安全かつ効率的に腸管の免疫担当細胞にワクチン抗原を送達できる系の開発を目指す。

3. 研究の方法

1) 抗原発現乳酸菌の免疫誘導能および感染防御効果に及ぼす M 細胞標的化の影響の検討：パイエル板は腸管内に存在する抗原を取込み、その抗原に特異的な免疫応答の誘導に關与する腸管免疫組織である。パイエル板への抗原取込みは、パイエル板を覆う上皮細胞の約 10% を構成する M 細胞によって起こる。M 細胞の管腔側表面に結合する蛋白をキャリアとして用い、ワクチン抗原を積極的に M 細胞に送達する「M 細胞標的化」は、経口ワクチンの免疫誘導能を増強する方法論として提唱されている。本研究では、大腸菌の線毛構成蛋白 FimH および *Yersinia enterocolitica* の外膜蛋白 OmpH をキャリアとして用い、乳酸菌に M 細胞への移行性を付与した。M 細胞標的化により抗原発現乳酸菌の抗原特異的免疫誘導能および CR 感染に対する感染防御効果の向上が可能か検討した。

2) 経口 DNA ワクチンの輸送体としての乳酸菌の応用：蛋白遺伝子をコードする真核細胞発現プラスミド DNA を保持する乳酸菌の経口投与により、宿主の腸細胞でコードされた蛋白の発現が起こることが知られており、この現象を利用した DNA ワクチンの送達系の検討が行われてきた。本研究では、レポーター蛋白遺伝子をコードするプラスミド DNA を保持する乳酸菌を構築し、乳酸菌から腸細胞へのプラスミド DNA 輸送が腸管のどの部位で起こるか検討した。

4. 研究成果

本研究では、ヒトに対して安全性が高いと考えられる乳酸菌をワクチン抗原の送達体として用いる新規経口ワクチン系の構築とその免疫誘導効果の改良を行い、以下(1)～(3)の成果を得た。

- (1) 黄色ブドウ球菌由来のヌクレアーゼをモデル抗原として発現する乳酸菌を構築した。さらに FimH および OmpH を乳酸菌発現プラスミドにクローニングし、これらの分子をヌクレアーゼと融合蛋白としてまたは別の蛋白として同時に発現する乳酸菌(M 細胞標的化乳酸菌)を構築した。これらの組換え乳酸菌をマウスに経口投与し、抗原特異的抗体応答を解析した結果、M 細胞標的化により組換え乳酸菌の経口投与による抗原特異的抗体応答の誘導が増強されることを明らかにした (Takahashi K 他, 2018)。
- (2) 経口 DNA ワクチンの送達体として乳酸菌を用いるため、細胞内寄生性細菌である *Listeria monocytogenes* の細胞侵入に関わる蛋白である Internalin A を乳酸菌発現プラスミドにクローニングし、細胞侵入性を有する乳酸菌を構築した。レポーター蛋白としてルシフェラーゼを真核細胞発現プラスミドにクローニングし、細胞侵入性乳酸菌を導入した。培養腸上皮細胞株 Caco-2 を用いて、細胞侵入性乳酸菌の DNA 送達を、レポーター遺伝子の活性を指標に評価した結果、細胞侵入性乳酸菌が細胞非侵入性乳酸菌よりも効率よく DNA を Caco-2 へ送達できることを明らかにした。続いてマウスを用いた In vivo での DNA 送達を細胞侵入性乳酸菌と細胞非侵入性乳酸菌で比較した。その結果、両者は同程度の DNA 送達を示した。この結果は In vivo での DNA 送達は細胞侵入性に非依存的な機序で起こることを示唆するものであった。そこで、経口投与した乳酸菌が腸管内のどの部位で DNA を送達するか明らかにするため、蛍光色素で標識した乳酸菌を腸管に直接投与し、顕微鏡解析により、乳酸菌の局在を解析した。その結果、細胞侵入性の有無に関わらず、乳酸菌がパイエル板に集積していることを見出した。この結果は乳酸菌から宿主細胞へのプラスミド DNA 送達はパイエル板で起こる可能性を示唆するものである (Yano A, Takahashi K 他, 2018)。
- (3) 抗原を発現する乳酸菌の経口投与により抗原特異的な免疫応答の誘導が可能であることは複数の研究により明らかになっているが、その感染防御効果を既存のワクチン系と比較

した研究はほとんどない。本研究では、マウスの病原細菌 *Citrobacter rodentium* の感染を防御可能な死菌ワクチンを確立した (Takahashi K 他, 2018)。死菌ワクチンは伝統的なワクチン製造方法であるホルマリン固定により調製した。本実験系の利用により乳酸菌ワクチンを含む新規経口ワクチン系の感染防御効果の評価が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- (1) J Microbiol Methods. 2019;159:62-68. Protective effects of oral immunization with formalin-inactivated whole-cell *Citrobacter rodentium* on *Citrobacter rodentium* infection in mice. Takahashi K, Hanamura Y, Tokunoh N, Kassai K, Matsunishi M, Watanabe S, Sugiyama T, Inoue N.
- (2) Appl Microbiol Biotechnol. 2018;102(24):10703-10711. M cell-targeting strategy enhances systemic and mucosal immune responses induced by oral administration of nuclease-producing *L. lactis*. Takahashi K, Yano A, Watanabe S, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, Inoue N.
- (3) Biol Pharm Bull. 2018;41(2):190-197. Peyer's Patches as a Portal for DNA Delivery by *Lactococcus lactis* in Vivo. Yano A, Takahashi K, Mori Y, Watanabe S, Hanamura Y, Sugiyama T, Inoue N.

〔学会発表〕(計13件)

- (1) 第20回日本ワクチン学会、一般演題 1-4-05、モデル抗原を発現する組換え乳酸菌を用いた免疫条件の検討と免疫誘導の評価、渡邊 詩織、矢野 歩、森 祐介、花村 有希、高橋 圭太、杉山 剛志、井上 直樹、Philippe Langella, Luis G. Bermúdez-Humarán, Tarik Issad
- (2) 第92回日本細菌学会年会、WS5-8、M cell-targeting enhances immune responses induced by nuclease-producing *Lactococcus lactis*、Keita Takahashi, Ayumu Yano, Shiori Watanabe, Yusuke Mori, Tsuyoshi Sugiyama, Naoki Inoue
- (3) 第92回日本細菌学会年会、WS10-5、Development of a Rapid and Convenient Method for Quantification of *Citrobacter rodentium*、Yuki Hanamura, Keita Takahashi, Masaru Matsunishi, Kohei Kassai, Shiori Watanabe, Yusuke Mori, Nozomi Orito, Tsuyoshi Sugiyama, Naoki Inoue

他 10 件

〔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

岐阜薬科大学 感染制御学研究室 <http://sv1.gifu-pu.ac.jp/lab/kansen/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。