

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09650

研究課題名(和文) 結核菌のハイブリッドエピトープ長鎖ペプチドを用いた新規ナノ粒子ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of a novel T cell-oriented vaccine using CTL/Th-bi-epitope long peptide and biodegradable microparticles, against an intracellular bacterium

研究代表者

榎本 紀之(Enomoto, Noriyuki)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50436961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生分解性ナノ粒子(PLGA)によりコートされたCTL およびThエピトープを連結したバイエピトープ長鎖ペプチド(long peptide)を作成し樹状細胞へパルスしたところ、抗原特異的CTLとThの強い増殖能を確認した。この効果はshort peptideの混合+PLGAあるいはlong peptide単独よりも高かった。さらに細胞内寄生菌であるリステリアのlong peptide+PLGAを樹状細胞へパルスしマウスへ皮下注射したところ、リステリア感染マウスの脾臓での有意な菌量低下を確認した。以上より、long peptide+PLGAによる新規ワクチンは有効であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生分解性ナノ粒子(poly(lactic-co-glycolic acid): PLGA)を用いて抗原ペプチドをコートすることにより、生体内でのペプチドの分解を抑制し、ワクチンとして必要な高価なペプチド量を減量することが可能である。また、リンパ球への効率的な抗原提示にも寄与する。さらに、ワクチン効果の発現には細胞障害性T細胞(CTL)とヘルパーT細胞(Th)の両者の協調が必要であるが、両者のエピトープを連結したバイエピトープ長鎖ペプチドをPLGAによりコートするため、効率的に抗原特異的なCTLとThを誘導可能となる。細胞内寄生菌に対する有望な新規ワクチン療法となり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The median diameter of poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA) spheres was 1.38 μm. PLGA particles were taken up into 48.8% of mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) after two-day coincubation and found mainly in endosome and lysosome by fluorescent microscopy. Both *L. monocytogenes* listeriolysin O (LLO)- and OVA-CTL/Th-bi-epitope long peptide (long peptide)/PLGA showed significantly more robust antigen-specific CTL and Th proliferations with higher interferon-γ production than the long peptide alone or CTL and Th short peptides/PLGA vaccination. Furthermore, the LLO-long peptide/PLGA vaccination showed significantly lower bacterial burden in spleens compared with the long peptide alone or the CTL and Th short peptides/PLGA vaccination after the challenge of lethal amounts of *L. monocytogenes*. These results suggest that the novel vaccine taking advantages of CTL/Th-bi-epitope long peptide and PLGA microparticle is effective for protection against intracellular bacteria.

研究分野：細胞性免疫学

キーワード：生分解性ナノ粒子 バイエピトープ長鎖ペプチド 細胞内寄生菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は過去に細胞内寄生菌であるリステリアの CD8 陽性 (細胞障害性) T リンパ球 (CTL) のエピトープを用いた樹状細胞 (DC) ワクチンを開発した (Nakamura Y, *Infect Immun* 2003; Enomoto N, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2007)。抗原特異的 CTL の誘導に CTL エピトープペプチド (short peptide) は有用であるが、抗原特異的 CD4 陽性ヘルパー T リンパ球 (Th) の誘導はできず、また生体内で分解され易いという問題があった。このため生体への大量投与を行わなければならないが、ペプチドは高価であり費用対効果が低い。そこで安全性の高い生分解性ナノ粒子 (**polylactic coglycolic acid: PLGA**) によりペプチドをコートし、ペプチドの分解を抑制しようと試みた。さらに **CTL** および **Th** エピトープを連結したバイエピトープ長鎖ペプチド (**long peptide**) を作成し、抗原特異的 **CTL** に加えて **Th** 細胞の誘導も試みた。

2. 研究の目的

本研究では、結核などの細胞内寄生菌に対する、抗原特異的 **CTL** および **Th** 細胞の双方を効率よく誘導する画期的な新規ナノ粒子ワクチンを開発する。

3. 研究の方法

PLGA と各種抗原ペプチドを混合し、double emulsion 法により安定かつ微細な複合物質を作成した。PLGA と卵白アルブミン (OVA) 由来の long peptide をマウスの骨髄由来樹状細胞 (BMDC) へパルスし、OT-I 細胞 (OVA 特異的 CTL) および OT-II 細胞 (OVA 特異的 Th) と共培養し、CFSE 希釈法により、ペプチド刺激後の細胞増殖能を確認した。さらに細胞内寄生感染症のモデルであるリステリア (LL0) 由来 long peptide と PLGA の複合体を作成し、BMDC へパルス後にマウスへ皮下注射した。2 回の免疫後に脾細胞を採取し、CFSE 希釈法によりペプチド刺激後の細胞増殖能を評価した。また、致死量のリステリア菌を腹腔内投与し、その後の脾臓内の菌量を測定した。long peptide + PLGA 群を long peptide 単独群、あるいは CTL+Th short peptide の混合+PLGA 群等と比較検討した

4. 研究成果

電子顕微鏡による観察では、PLGA の直径の中央値は 1.38 μm であった。蛍光 PLGA は、2 日間で BMDC の 48.8% に取り込まれ、PLGA は細胞内のエンドゾームおよびライソゾーム内に存在していた。OVA-peptide を用いた *in vitro* の細胞増殖試験では、long peptide 単独群、あるいは CTL + Th short peptide の混合+PLGA 群と比較し、long peptide + PLGA 群において最も強い CTL および Th 細胞の増殖とインターフェロン 産生を認めた。同様にリステリア LL0-peptide を用いた *ex vivo* の細胞増殖試験でも、long peptide + PLGA 群での最も強い CTL および Th 細胞の増殖とインターフェロン 産生を認めた。また、LL0-long peptide + PLGA をパルスした BMDC の投与後には、致死量のリステリア投与後の脾臓における最も少ない菌量を確認した。以上の結果

から、long peptide + PLGA 複合体は、細胞内寄生菌感染症に対する、有望な新規ワクチンとしての利用が期待できると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中和樹
2. 発表標題 細胞内寄生菌感染症に対するロングエピトープ及び生分解性微細粒子を用いた 新規ワクチン療法の開発
3. 学会等名 日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuki Tanaka
2. 発表標題 Development of a novel T cell-oriented vaccine, which is composed of biodegradable microparticles and T-cell-hybrid epitope long peptide, against intracellular bacteria
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	須田 隆文 (Suda Takafumi) (30291397)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究分担者	永田 年 (Nagata Toshi) (90275024)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	