

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02852

研究課題名(和文)「脂質免疫」に着目した新ワクチンコンセプトの確立～結核とエイズをモデルとして～

研究課題名(英文)Vaccine development against tuberculosis and AIDS by the use of lipid immunity

研究代表者

杉田 昌彦(Sugita, Masahiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：80333532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスリポペプチドを標的とした新しい免疫応答の存在が明らかになりつつある。本研究においてはその機構を明らかにするとともに、新しいワクチンの開発を視野に、解析に適した小動物モデルを確立することを目標として研究を展開した。その結果、ウイルスリポペプチドに対する免疫応答が構築された遺伝子改変マウスの作出に成功した。さらにこのマウスを用い、リポペプチドを搭載したBCGワクチンを接種することにより、効率的に特異的応答を誘導できることが示された。以上によりリポペプチドを主体とした脂質ワクチン開発の基盤が確立された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスリポペプチドを標的とした新しい免疫応答がどのようにして起きるのか、そのメカニズムを明らかにしました。またリポペプチド免疫を起こりやすくしたマウスモデルを樹立し、どのようにリポペプチドを接種すればリポペプチド特異的免疫応答が効率的に惹起できるのか、その方法を発見しました。これらの成果は、リポペプチドを主体とした新しいタイプのワクチン開発へと結実する可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Recent evidence indicated that lipopeptides comprise a novel class of antigen recognized by T cells. We aimed at elucidating how this immune pathway functions and establishing valuable small animal models that are suitable for lipopeptide immunity research, hoping to contribute to the development of new type of vaccines. Indeed, we were able to establish murine models equipped with the ability to respond to lipopeptides when sensitized with lipopeptide-loaded BCG vaccines. Therefore, this study served to construct an important basis for developing a new type of lipopeptide vaccines.

研究分野：感染症免疫学

キーワード：リポペプチド MHC 脂質免疫 ワクチン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 結核、エイズ、B型肝炎など、人類の脅威となるグローバルな慢性感染症において、有効な治療薬の開発とともに感染予防ワクチンの開発が医学的にも社会的にも重要な課題となっている。タンパク質ワクチンやそれをコードする核酸ワクチンは、多くの感染症において優れた予防効果を発揮するが、標的タンパク質の変異導入により病原体の免疫逃避が比較的起こりやすいことが懸念されている。グローバルヘルスを見据えた社会の要請として、新しいコンセプトのワクチン開発が望まれている。

(2) 研究代表者の研究(文献1-7)から、結核菌脂質やウイルスリポペプチドを標的にした細胞傷害性 T 細胞の存在が明らかとなり、その人為的賦活化は防御免疫を賦与できる可能性が高い。これらの脂溶性分子は変異導入が困難であることから、タンパク質ワクチンでみられる免疫逃避機構が成立しにくい利点がある。たとえば宿主体内で増殖する結核菌は宿主グルコースを基質としたミコール酸転移反応によりグルコースモノミコール酸を生成する。この糖脂質を認識する CD1 拘束性細胞傷害性 T 細胞は活性化に伴い防御応答に重要なインターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) や腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) を産生するとともにメモリー応答を担う(文献1-4)。グルコースモノミコール酸は結核菌細胞壁を構成する重要な分子であり変異導入も困難であることから、新たなワクチン候補の一つと考えられている。

(3) ウイルスタンパク質の N 末端ミリスチル化はウイルスタンパク質の局在や機能を制御する重要な脂質付加反応である。ヒト/サル免疫不全ウイルス (HIV/SIV) Nef タンパク質は N 末端にミリスチル化配列 (Gly-X-X-Ser/Thr) を有し、グリシン残基に C14 直鎖脂肪酸であるミリスチン酸が結合することによりその免疫抑制機構を発揮する。逆に、ミリスチル化 SIV Nef タンパク質の N 末端リポペプチド断片 (4-mer あるいは 5-mer) は宿主細胞傷害性 T 細胞の標的分子となることが解明された(文献5-7)。ミリスチル化配列を維持したまま免疫逃避を可能にする変異を導入することは比較的困難であることから、リポペプチドもまた免疫逃避を許容しにくいワクチンの候補となる可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

(1) 研究代表者のリポペプチド免疫研究の主体はアカゲザルを用いたものであった。詳細な解析にはリポペプチド免疫系を再構築した小動物モデルが必須と判断し、サルリポペプチド提示分子 (Mamu-B\*098) (文献7) を発現したトランスジェニックマウス (B098 Tg マウス) を作出する。

(2) リポペプチドは脂溶性分子であり、従来のタンパク質・ペプチドワクチンとは異なる免疫プロトコールが必要である。リポペプチドワクチン開発を視野に、リポペプチド免疫を効率的に賦活化する感作手法を確立する。

(3) BCG は長年にわたって安全かつ有効な抗結核ワクチンとして多くの国々で使用されてきた。BCG 接種 B098 Tg マウスを活用し、リポペプチド免疫の切り口から、新たな BCG 由来免疫標的分子の探索、同定を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) B098 Tg マウス系統の作出

マウス H-2Kb プロモーター下流に Mamu-B\*098 重鎖アルファ 1, アルファ 2 ドメインをコードする cDNA 配列を挿入し、さらにその下流にはマウス MHC クラス 1 (H-2Kb) アルファ 3 ドメインからポリ A シグナルに至るまでのゲノム配列を連結したトランスジーンコンストラクトを作製した。このトランスジーンをマウス受精卵前核に注入し仔を得た。トランスジーンのゲノムへの挿入は、ゲノム遺伝子を鋳型とした特異的 PCR により確認した。またゲノムウォーキングの手法により、トランスジーンが挿入された染色体位置を決定し、それをもとにホモ接合体マウスを作出した。他方、Mamu-B\*098 分子の細胞表面発現がペプチドトランスポーター (Transporter associated with antigen processing; TAP) に依存しないという予備実験結果をもとに TAP ノックアウト (TAP KO) マウスとの交配を進め、B098 Tg/TAP KO マウス系統を樹立した。

#### (2) リポペプチド搭載 BCG の作成

培地より回収した BCG (Tokyo 172 株) をガラススピッツ管に集め、石油エーテルに懸濁し室温で 5 分間静置することにより細胞壁表層糖脂質群の抽出操作を行なった。この操作をさらに 2 回繰り返したのち、菌体ペレットに対して、有機溶媒に溶解したリポペプチドリガンドを加え懸

濁したのち、窒素乾固を行なった。最後に菌体ペレットをPBSで懸濁し、ソニケーションにより菌体を分散させたのち、動物接種を行なった。概略を図1に示す。

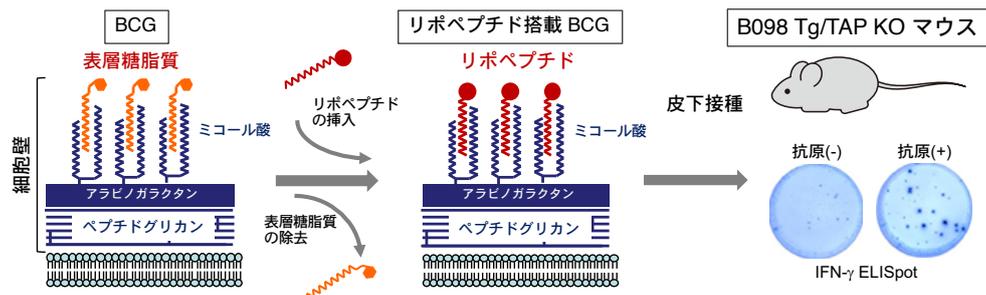


図1 リポペプチド搭載BCG作製の概略

### (3) マウスの免疫と基本解析

B098 Tg/TAP KO マウスの皮下にリポペプチド搭載BCGを3週間間隔で2回接種したのち、脾臓を採取して基本解析を行なった。定法に従い、細胞 lineage マーカーを用いたフローサイトメトリーを施行するとともに、MACS ビーズを用いたCD8陽性T細胞のソーティングを行なった。この細胞群をレスポンド細胞とし、B098 Tg/TAP KO マウス骨髄由来樹状細胞(抗原提示細胞)と抗原リポペプチドの存在下での応答をIFN- $\gamma$  ELISPOT法を施行した。またCD8陽性細胞をリポペプチド抗原存在下あるいは非存在下に6時間培養したのち、さらにプレフェルジンAを添加して6時間の追加培養を行った。培養後細胞を回収し、抗CD3 $\epsilon$ 抗体(FITC)で標識したのち、細胞固定と膜透過処理を行った。さらに抗IFN- $\gamma$ 抗体(BV-421)によるマルチカラー標識を行い、フローサイトメトリーにより解析した。

### (4) BCG菌体からの脂質フラクションの調製

BCG菌体のメタノール抽出を行ったのち、上清を回収して乾固しメタノールフラクションとして保管した。メタノールに不溶のペレットはクロロホルム:メタノール/2:1と蒸留水の存在下で2層分配を行い、有機層を回収して乾固したものをクロロホルム・メタノールフラクションとして保管した。水層は遠心ののち上清を回収し水フラクションとして保管した。(帝塚山大学・藤原長年教授のご協力による)

### (5) 動物実験

遺伝子改変マウスの樹立と解析ならびにアカゲザル検体を用いた実験は、法令ならびに学内規則に則り、当該委員会の承認を得て行った。

## 4. 研究成果

### (1) B098 Tg マウスの樹立

genotyping 陽性のB098 Tgマウス1ラインについてゲノムウォーキングを行い、第6染色体へのトランスジーン挿入を確認した。数代にわたる交配によりTAP KOバックグラウンドのB098 Tgホモ接合体マウスの樹立に成功した。トランスジーン産物を特異的に認識する抗体を用い、マウス脾臓細胞のフローサイトメトリーを行なったところ、B220, CD3, CD11b/CD11cで規定されるすべてのcell typeにおいてMamu-B\*098分子が細胞表面発現していた(図2)。また、その他のすべての有核細胞においてトランスジーン産物のタンパク質発現を確認した。これらの観察は、Mamu-B\*098遺伝子をトランスフェクトしたTAP変異細胞のin vitro解析結果と符合し、生体内においてもMamu-B\*098分子の細胞表面発現はTAP機能に依存しないことが明らかとなった。

TAP KOマウスにおいてはペプチド特異的CD8陽性細胞傷害性T細胞が消失するため、CD8陽性T細胞数は激減する。一方、B098 Tg/TAP KOマウスにおいては、CD8陽性T細胞の有意な回復が認められた。これらの事実は、Mamu-B\*098分子の発現だけでなくその機能がTAP非依存的であること、またMamu-B\*098分子に拘束して分化するT細胞がCD8陽性T細胞であることを示唆する。

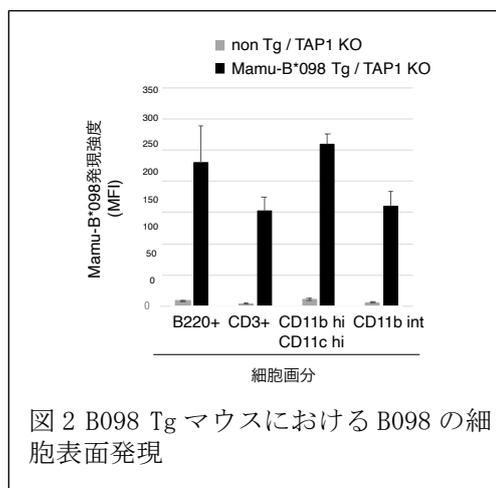


図2 B098 Tg マウスにおけるB098の細胞表面発現

### (2) B098 Tg/TAP KO マウスにおけるリポペプチド特異的 T 細胞応答の誘導

従来のペプチド抗原と比較して、リポペプチド抗原は疎水性が高い。したがって、生体への投与ならびに有効な免疫応答の誘導にはリポペプチド抗原に適した手法が必要となることが予想された。また、さまざまな予備実験の結果から、モデルリポペプチド抗原として B 型肝炎ウイルス S1 タンパク質に由来する 5-mer リポペプチド (C14-Gly-Gln-Asn-Leu-Ser; C14S1) を選択した。フロイントアジュバントや樹状細胞を用いた感作手法によっては、顕著なリポペプチド特異的 T 細胞応答を誘導できなかった。一方、グルコースモノミコール酸を高発現した BCG の接種によりグルコースモノミコール酸に対する T 細胞応答の誘導に成功した過去の経験 (文献 4) を参考に、C14S1 リポペプチドを搭載した BCG を調製し、B098 Tg/TAP KO マウス皮下に接種した。2 回の免疫後脾臓を採取し CD8 陽性 T 細胞をレスポンダーとした IFN- $\gamma$  intracellular FACS を行ったところ、C14S1 リポペプチド特異的に活性化し IFN- $\gamma$  を産生する T 細胞を見出した (図 3)。並行して行った IFN- $\gamma$  ELISpot アッセイにおいても、同様のリポペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞の存在を確認した。

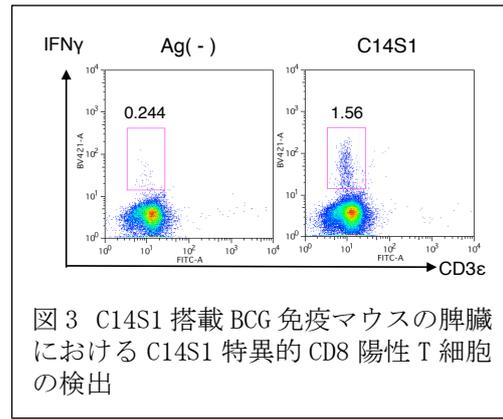


図 3 C14S1 搭載 BCG 免疫マウスの脾臓における C14S1 特異的 CD8 陽性 T 細胞の検出

さらに感作マウス脾臓 CD8 陽性 T 細胞を *in vitro* で C14S1 リポペプチドを用いた抗原刺激を行い、2 回の抗原刺激後安定的に増殖してきた T 細胞株の抗原反応性を評価した。その結果、C14S1 抗原刺激により培養上清中に多量の IFN- $\gamma$  が分泌されることを見出した (図 4)。

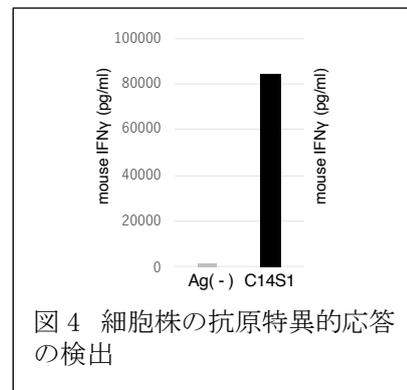


図 4 細胞株の抗原特異的応答の検出

以上の結果から、樹立した B098 Tg マウスにおいてはリポペプチド特異的 T 細胞応答が構築できていること、そしてその応答の主体は CD8 陽性 T 細胞であること、また Mamu-B\*098 分子の発現や機能は TAP に依存しないこと、リポペプチド搭載 BCG を用いることによりリポペプチド特異的 T 細胞応答の賦活化が可能であることが明らかとなった。これらの成果により、リポペプチドワクチン開発に向けた小動物モデルが確立され、今後の研究展開の基盤が確立された。

### (3) Mamu-B\*098 依存的に誘導される BCG 特異的免疫応答

上記の解析のさまざまな予備検討の過程で、リポペプチド非搭載 BCG の B098 Tg/TAP KO マウスへの接種により、BCG 特異的 Mamu-B\*098 拘束性 T 細胞の存在に気づき、その検証を進めた。まず、「研究の方法」に記載の手順に BCG 菌体よりメタノールフラクション (MeOH Fr.)、クロロホルム・メタノールフラクション (C:M Fr.)、水フラクション (H2O Fr.) を分画した。ついでリポペプチド非搭載 BCG を 2 回皮下接種した B098 Tg/TAP KO マウスより脾臓細胞を取り出し、CD8 陽性 T 細胞を単離したのち IFN- $\gamma$  ELISpot アッセイに供した。その際、応答の Mamu-B\*098 拘束性を検証するため、抗原提示細胞として B098 Tg/TAP KO マウス由来の骨髄樹状細胞および非 Tg/TAP KO マウス由来の骨髄樹状細胞を用いた。その結果、リポペプチド非搭載 BCG の感作によりとりわけ H2O Fr. に応答して IFN- $\gamma$  を産生する CD8 陽性 T 細胞が多数存在することがわかった (図 5, 右上のパネル)。この応答は抗原非添加では見られないことから抗原特異的応答と考えられる。また Mamu-B\*098 分子を発現しない骨髄樹状細胞を抗原提示細胞として用いた際には反応が見られないことから、Mamu-B\*098 拘束性の応答であると結論づけた。

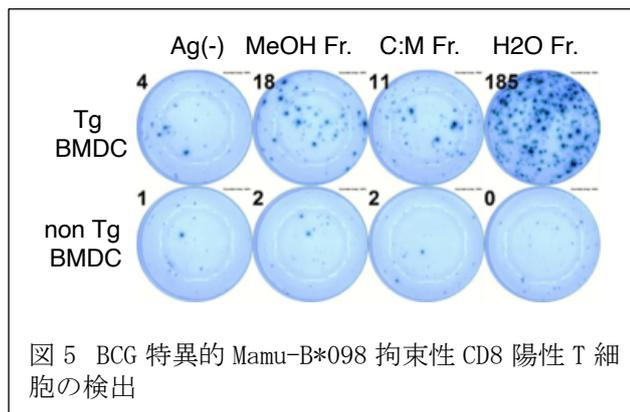


図 5 BCG 特異的 Mamu-B\*098 拘束性 CD8 陽性 T 細胞の検出

抗原同定に向けてまず H2O Fr. を proteinase K したサンプルの抗原活性を検証したところ、完全ではないものの活性の顕著な低下を認めた。したがって、Mamu-B\*098 分子に結合し T 細胞に提示される BCG 抗原は、さまざまな修飾を受けたタンパク質に由来する可能性が示唆された。今後、抗原活性を指標にさらに抗原の絞り込みを行い、分子同定につなげる予定である。

#### <引用文献>

- ① Matsunaga I, et al. Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in Mycobacteria. J Biol Chem. 2008; 283:28835-41.

- ② Komori T, et al. A microbial glycolipid functions as a new class of target antigen for delayed-type hypersensitivity. *J Biol Chem.* 2011; 286:16800-6.
- ③ Morita D, et al. Th1-skewed tissue responses to a mycolyl glycolipid in mycobacteria-infected rhesus macaques. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 441:108-13.
- ④ Morita D, et al. Major T cell response to a mycolyl glycolipid is mediated by CD1c molecules in rhesus macaques. *Infect Immun.* 2013; 81:311-6.
- ⑤ Morita D, et al. Cutting edge: T cells monitor N-myristoylation of the Nef protein in simian immunodeficiency virus-infected monkeys. *J Immunol.* 2011;187:608-12.
- ⑥ Morita D, et al. Molecular requirements for T cell recognition of N-myristoylated peptides derived from the simian immunodeficiency virus Nef protein. *J Virol.* 2013; 87:482-8.
- ⑦ Morita D, et al. Crystal structure of the N-myristoylated lipopeptide-bound MHC class I complex. *Nat Commun.* 2016;7:10356.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shima Y, Morita D, Mizutani T, Mori N, Mikami B, Sugita M.	4. 巻 295
2. 論文標題 Crystal structures of lysophospholipid-bound MHC class I molecules.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6983-6991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.011932	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Y, Morita D, Shima Y, Midorikawa A, Mizutani T, Suzuki J, Mori N, Shiina T, Inoko H, Tanaka Y, Mikami B, Sugita M.	4. 巻 202
2. 論文標題 Identification and Structure of an MHC Class I-Encoded Protein with the Potential to Present N-Myristoylated 4-mer Peptides to T Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3349-3358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita D, Iwashita C, Mizutani T, Mori N, Mikami B, Sugita M.	4. 巻 32
2. 論文標題 Crystal structure of the ternary complex of TCR, MHC class I and lipopeptides.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 805-810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田大輔、嶋燿子、杉田昌彦
2. 発表標題 霊長類研究から見えてきた、非ペプチド抗原を標的とする新しい獲得免疫機構
3. 学会等名 第29回日本生体防御学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 嶋耀子、森田大輔、杉田昌彦
2. 発表標題 リボペプチドを提示するMHC class 1 分子の内因性リガンドの同定
3. 学会等名 第29回日本生体防御学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 水谷龍明、吉岡佑弥、杉田昌彦
2. 発表標題 肉芽腫形成を制御するS100A9
3. 学会等名 第29回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2018年～2019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

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