

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16649

研究課題名(和文) 乳酸菌をベクターとして利用する経口ワクチン系に関する研究

研究課題名(英文) Research on oral vaccine systems using lactic acid bacteria as vectors

研究代表者

高橋 圭太 (TAKAHASHI, Keita)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50634929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では乳酸菌を利用した新しい経口ワクチン系の開発に関わる基礎研究を行なった。ワクチン抗原を発現する乳酸菌、加熱殺菌した乳酸菌の細胞壁表面に大腸菌発現系で発現精製したワクチン抗原を結合させた細菌様粒子、あるいはDNAワクチンとして機能するplasmid DNAを保持する乳酸菌などをマウスに経口(または経鼻)投与し、これらの免疫原性を評価した。いずれの系でも経口投与では強い免疫原性はみられなかったが、経鼻投与では比較的強い免疫原性がみられた。特に細菌様粒子の経鼻投与では全身性の免疫応答に加え、呼吸器粘膜、さらに腸管粘膜にも強力な免疫応答が誘導されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘膜ワクチンは、粘膜組織を介して感染する病原体に対するワクチンとして理想的な系である。本研究は、乳酸菌を利用した安全かつ汎用性の高い粘膜ワクチン系の基盤技術の開発という学術的意義を持つ。本研究成果をさらに発展させ、多様な病原体に対する粘膜ワクチン開発に応用することで、様々な感染症対策に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted basic research related to the development of a novel oral vaccine system using lactic acid bacteria (LAB) as a vaccine carrier. The oral (or nasal) immunogenicity of three different systems, including 1) vaccine antigen-expressing LAB, 2) antigen-bound bacterium-like particles (BLP) which is composed of the cell wall peptidoglycan structure of heat-killed LAB, 3) LAB carrying plasmid DNA that functions as a DNA vaccine, was evaluated in mice. No strong immunogenicity was observed by oral administration in any of the systems, but significant immunogenicity was observed by nasal administration. Among these, the nasal administration of antigen-bound BLP induces a strongest antigen-specific immune responses not only to the systemic but also to the respiratory and the intestinal mucosa.

研究分野：ワクチン学

キーワード：粘膜ワクチン 乳酸菌 DNAワクチン 細菌様粒子

1. 研究開始当初の背景

(1) 経口ワクチン系の特徴と開発に向けた課題

腸管粘膜は多くの病原体の侵入門戸である。この腸管粘膜表面で病原体の体内への侵入を阻止する働きのある免疫応答は粘膜免疫と呼ばれ、体内に侵入した病原体の排除を担う全身性免疫とは区別される。腸管粘膜免疫を誘導できる可能性のある経口ワクチン系は、特に腸管感染症に対するワクチン系として理想的であるが、抗原の分解に伴う抗原性の低下する可能性があること、腸管免疫系を安全かつ効率的に刺激可能なアジュバントが存在しないこと、細胞性免疫の誘導が困難であることなど、開発に向けて克服しなければならない課題がある。

(2) これまでの研究の経緯

我々は経口ワクチン系開発に関する課題を克服するため、乳酸菌をベクターとして用いる経口ワクチン系の開発を以下の2つの系を中心に進めてきた。一つ目は、ワクチン抗原を産生するように遺伝子改変した抗原発現乳酸菌を用いる方法で、二つ目は、DNAワクチンとして機能する真核細胞用抗原発現プラスミドを導入したDNAワクチン保持乳酸菌を用いる方法である。抗原発現乳酸菌系では、腸管内で抗原が産生されるため、抗原の分解を最小に抑えることができると考えられる。一方、DNAワクチン保持乳酸菌から宿主腸管細胞にプラスミドDNAを送達できれば、宿主細胞内で抗原発現 抗原提示が起こり、効率的に抗原特異的細胞性免疫の誘導が可能と考えられる。また、乳酸菌は古来より発酵食品などの形でヒトに摂取されており安全性の高い細菌と考えられる。さらに、細胞壁ペプチドグリカンが自然免疫受容体の刺激を介してアジュバントとして働くことが期待できる。

2. 研究の目的

これまでの研究から明らかになった乳酸菌ベクター経口ワクチン系開発についての課題の解決が本研究の目的(1)(2)である。また、乳酸菌をベクターとして用いる経口ワクチン系の有用性を評価するマウス細菌感染モデルの構築(3)を行った。

- (1) 抗原発現系：遺伝子改変乳酸菌の抗原発現量が少なく、免疫原性が低いことが明らかになった。この課題の解決に向けて、(a) 腸管関連リンパ組織への抗原の標的化、(b) 他の発現系で発現させた抗原の乳酸菌細胞壁への結合、(c) 経鼻投与での免疫原性の評価、を行った。
- (2) DNAワクチン系：経口投与された乳酸菌から宿主腸管細胞にプラスミドDNAの送達が起こることは明らかになっているが、DNA送達機序の詳細は不明である。また、宿主細胞での遺伝子発現効率が低く、十分な免疫原性が得られないことが予想された。これらの課題解決に向けて、(a) 遺伝子発現効率の高いプラスミドを新たに構築した。乳酸菌から宿主腸管細胞へのDNA送達機序の一端を解明するため、この新規プラスミドを導入した乳酸菌がプラスミドDNAを送達する標的細胞の同定を行なった。
- (3) 簡便な評価系の構築：(a) O-157などの腸管出血性大腸菌のモデル細菌として汎用されるマウス病原細菌 *Citrobacter rodentium* の感染モデル及びワクチン評価系を構築した。

3. 研究の方法

1a. 腸管関連リンパ組織への抗原の標的化

パイエル板内部への抗原取り込みを担う特殊な上皮細胞（M 細胞）の抗原取り込みに関わる受容体に結合する分子を M 細胞標的化分子と呼ぶ。M 細胞標的化分子と抗原の融合タンパクを乳酸菌に発現させた。M 細胞標的化分子として大腸菌線毛構成タンパク FimH 及び *Yersinia enterocolitica* 外膜タンパク OmpH をモデル抗原である黄色ブドウ球菌 Nuclease と融合タンパクとして発現するように設計したプラスミドを構築し、乳酸菌 *Lactococcus lactis* NZ9000 株に導入した（LL/Nuc-OmpH、LL/Nuc-FimH）。これらの M 細胞標的化抗原発現乳酸菌または Nuclease 単独を発現する乳酸菌をマウスに経口投与し、Nuclease 特異的抗体価（血清 IgG 及び糞便 IgA）を測定し、M 細胞標的化が免疫原性に及ぼす影響を評価した。

1b. 他の発現系で発現した抗原の乳酸菌細胞壁への結合

乳酸菌を硫酸溶液中で煮沸して細胞壁成分だけを精製し、これを細菌様粒子（Bacterium-like particles, BLP）とした。乳酸菌由来エンドペプチダーゼ AcmA に含まれるペプチドグリカン結合モチーフである LysM を抗原タンパク（モデル抗原として *C. rodentium* の Tir を使用）の C 末端側に融合させた Tir-LysM の大腸菌発現系を構築した。大腸菌で発現・精製した Tir-LysM と BLP を混合し、BLP 表面に Tir-LysM を結合させた。結合は蛍光免疫染色法を用いて確認した。Tir 結合 BLP（BLP-Tir）をマウスに経口投与（3 日連続投与を 2 週間隔で 3 回実施）して免疫後、Tir 特異的抗体価を測定し、免疫原性を評価した。

1c. 経鼻投与での免疫原性の評価

消化管での抗原の分解を回避するため、Tir 発現乳酸菌及び BLP-Tir を経鼻投与し、経口投与の場合と免疫原性を比較した。

2a. 遺伝子発現効率の高い新規プラスミドの構築と DNA 送達標的細胞の同定

遺伝子発現効率を向上させるため、従来のプラスミド pCMV253（他グループの同様の研究で使用されているプラスミドと同等の遺伝子発現効率を有する）の抗原遺伝子翻訳開始コドンの 3'側に human β -globin 及び immunoglobulin heavy chain 遺伝子由来のキメライントロンを挿入し、新規乳酸菌-大腸菌シャトル真核細胞用発現プラスミド（pLEC）を構築した。pLEC に緑色蛍光タンパク EGFP 遺伝子をクローニングし、EGFP 発現プラスミド pLEC-EGFP を得た。HEK293 細胞の一過性発現系で pCMV253-EGFP と pLEC-EGFP の遺伝子発現効率を比較した。pLEC-EGFP を導入した乳酸菌をマウスに経口投与し、GFP 発現細胞を蛍光免疫染色法及びフローサイトメトリー法で解析した。

3-a. *C. rodentium* 感染モデル及びワクチン評価系の構築

C. rodentium をマウスに経口感染させると、大腸組織の肥厚を伴う炎症、下痢などを発症する。*C. rodentium* 感染の指標の一つが糞便中 *C. rodentium* 菌数である。糞便中菌数の定量には膨大な時間、手間、コストがかかる。本研究では、より迅速・簡便な糞便中 *C. rodentium* 菌数定量法の構築のため、luciferase 遺伝子を red recombinase を用いた相同組換えにより *C. rodentium* ゲノムに導入し、luciferase を恒常発現する *C. rodentium* 変異株を作製した。また、乳酸菌ベクターなど新規ワクチン系の有効性評価には、従来法で調製したワクチン（ポジティブコントロール）の感染防御効果との比較が不可欠であることから、*C. rodentium* をホルマリンで不活化処理した不活化全粒子ワクチンの感染防御効果を検証した。

4 . 研究成果

1a. 腸管関連リンパ組織への抗原の標的化

LL/Nuc-FimH では Nuclease-FimH 融合タンパクの発現量が LL/Nuc の Nuclease の発現量を大きく下回ったため、動物実験は実施しなかった。一方、LL/Nuc-OmpH の Nuclease-OmpH 融合タンパクの発現量は、LL/Nuc の Nuclease 発現量と同程度であった。LL/Nuc と LL/Nuc-OmpH をマウスに経口投与し、Nuclease 特異的抗体の誘導を比較した結果、血清中 IgG 及び糞便中 IgA で LL/Nuc-OmpH 投与群の方が LL/Nuc 投与群に比し高値を示した。また、LL/Nuc と LL/Nuc-OmpH の経口投与後のパイエル板表面の Nuclease を可視化したところ、LL/Nuc-OmpH 経口投与群の方が LL/Nuc 経口投与群よりもパイエル板表面の nuclease 量が増加していることが明らかになった。以上の結果から、OmpH の付加による M 細胞標的化は抗原発現乳酸菌の免疫原性を亢進する方法として有用であることが示された。

1b. 他の発現系で発現した抗原の乳酸菌細胞壁への結合

BLP への Tir-LysM の結合量を定量解析した結果、BLP 粒子あたり最大 10^4 分子の Tir-LysM の結合が可能であることが明らかになった。Tir-LysM を $20 \mu\text{g}$ 結合させた BLP をマウスに経口投与した結果、一部の個体で Tir 特異的血清 IgG の産生が誘導されたが、いずれの個体でも糞便中の IgA 抗体は検出されなかった (2019 年 12 月、日本ワクチン学会)。以上の結果から BLP と抗原の結合物の経口ワクチン系への応用には、M 細胞標的化など何らかの工夫が必要と考えられた。

1c. 経鼻投与での免疫原性の評価

Tir 発現乳酸菌または BLP-Tir を経鼻投与したマウスで、Tir 特異的抗体 (血清中 IgG、糞便 IgA、気管支肺胞洗浄液 IgA、鼻腔 IgA) の産生がみられた。Tir 発現乳酸菌を投与したマウスよりも BLP-Tir を投与したマウスで強力な抗体応答が誘導された。これまでの研究結果や 1b の結果も合わせて考えると、いずれの系を用いた場合でも、免疫原性は経口投与よりも経鼻投与が優れていると考えられた (2022 年 3 月、日本細菌学会)。また、呼吸器感染症をターゲットとして従来研究されてきたワクチンの経鼻接種法で、腸管粘膜においても強力な抗体応答が誘導されたことから、抗原結合 BLP の経鼻投与は、呼吸器感染症ワクチンのみならず腸管感染症ワクチンの開発にも応用できる可能性のあるワクチン系であることが示された。

2a. 遺伝子発現効率の高い新規プラスミドの構築と DNA 送達標的細胞の同定⁽¹⁾

本研究で新しく構築した pLEC-EGFP は従来の pCMV253 と比較して 60 倍以上高い遺伝子発現効率を示した。pLEC-EGFP を transform した乳酸菌 *Lactococcus lactis* (LL/pLEC-EGFP) を経口投与したマウスの小腸の GFP 発現細胞を蛍光免疫染色法及びフローサイトメトリーで検出したところ、パイエル板及び小腸粘膜固有層に局在する Siglec-F⁺細胞が大部分を占めることが明らかになった。以上の結果は、乳酸菌から宿主細胞へのプラスミド DNA の送達機序の一端を明らかにするものである。

3-a. *C. rodentium* 感染モデル及びワクチン評価系の構築⁽²⁾

C. rodentium ゲノムの *xylE* 遺伝子座に luciferase 遺伝子を相同組換えにより導入した。luciferase 発現 *C. rodentium* は、親株と同等の増殖速度を示した。luciferase 発現 *C. rodentium* を経口感染したマウスの糞便中 *C. rodentium* の検出感度は $>10^5$ colony-forming units/g feces とそれほど高い感度ではなかったが、感染状況を迅速・簡便にモニターできる系の構築は達成された。

ホルマリン不活化 *C. rodentium* をマウスに経口投与して免疫後、*C. rodentium* 生菌を感染させ、感染防御効果を検証した。免疫マウスでは死亡、体重減少、肝臓や脾臓など全身性臓器への菌

の移行が部分的に抑制され、糞便中菌数がより早期に低下した。以上の結果から、従来のワクチン製造法で調製したワクチンが一定の感染防御効果を有することが示された。今後は、本研究で構築したホルマリン不活化ワクチンの感染防御効果との比較により、乳酸菌ベースのワクチンの有効性を検証する。

<引用文献>

- (1) Takahashi et. al. 2020. Vaccine 38:3330-3338
- (2) Takahashi et. al. 2019. Journal of Microbiological Methods 159:62-68

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keita Takahashi, Yuki Hanamura, Nagisa Tokunoh, Kohei Kassai, Masaru Matsunishi, Shiori Watanabe, Tsuyoshi Sugiyama, Naoki Inoue	4. 巻 159
2. 論文標題 Protective effects of oral immunization with formalin-inactivated whole-cell <i>Citrobacter rodentium</i> on <i>Citrobacter rodentium</i> infection in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 62-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2019.02.016	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 Keita Takahashi, Nozomi Orito, Daiki Yanagisawa, Ayumu Yano, Yusuke Mori, Naoki Inoue	4. 巻 38
2. 論文標題 Eosinophils Are the Main Cellular Targets for Oral Gene Delivery Using Lactic Acid Bacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 3330 - 3338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2020.02.084	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 Keita Takahashi, Nozomi Orito, Nagisa Tokunoh, Naoki Inoue	4. 巻 103
2. 論文標題 Current Issues Regarding the Application of Recombinant Lactic Acid Bacteria to Mucosal Vaccine Carriers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied microbiology and biotechnology	6. 最初と最後の頁 5947 - 5955
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00253-019-09912-x	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 Keita Takahashi, Tsuyoshi Sugiyama, Nagisa Tokunoh, Shun Tsurumi, Tetsuo Koshizuka, Naoki Inoue	4. 巻 5
2. 論文標題 Intimate Adhesion Is Essential for the Pathogen-Specific Inflammatory and Immune Responses in the Gut of Mice Infected with <i>Citrobacter rodentium</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 870-883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/immunohorizons.2100087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Nagisa Tokunoh, Keita Takahashi, Nozomi Orito, Daiki Yanagisawa, Naoki Inoue
2. 発表標題 Evaluation of the mucosal vaccine system using bacterium-like particles prepared from <i>L. lactis</i>
3. 学会等名 第93回日本細菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daiki Yanagisawa, Nozomi Orito, Keita Takahashi, Nagisa Tokunoh, Naoki Inoue
2. 発表標題 Eosinophils are the main cellular target for DNA delivery from orally administrated <i>L. lactis</i>
3. 学会等名 第93回日本細菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keita Takahashi, Nagisa Tokunoh, Daiki Yanagisawa, Naoki Inoue
2. 発表標題 Oral immunization with antigen/adjuvant co-producing <i>Lactococcus lactis</i>
3. 学会等名 第93回日本細菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nozomi Orito, Keita Takahashi, Naoki Inoue
2. 発表標題 <i>Listeria</i> adhesion protein increases the DNA delivery efficiency of Internalin A-expressing invasive <i>Lactococcus lactis</i>
3. 学会等名 第92回日本細菌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keita Takahashi, Nozomi Orito, Nagisa Tokunoh, Naoki Inoue
2. 発表標題 M cell-targeting enhances immune responses induced by oral immunization with Ag-producing <i>L. lactis</i>
3. 学会等名 第92回日本細菌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keita Takahashi, Naoki Inoue
2. 発表標題 Development of the oral vaccine system using lactic acid bacteria
3. 学会等名 第31回微生物シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳納渚沙、高橋圭太、折戸希、柳澤大貴、井上直樹
2. 発表標題 細菌様粒子 (B L P) を抗原送達体として用いる経口粘膜ワクチン系の構築と その免疫誘導能の検討
3. 学会等名 第23回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳納渚沙、高橋圭太、折戸希、柳澤大貴、井上直樹
2. 発表標題 細菌様粒子 (BLP) を抗原送達体として用いる 経口粘膜ワクチン系の構築とその免疫誘導能の検討
3. 学会等名 第10回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keita Takahashi, Nozomi Orito, Daiki Yanagisawa, Naoki Inoue
2. 発表標題 Identification of cellular targets for DNA delivery from recombinant <i>L. lactis</i> strains in vivo
3. 学会等名 27th European Society of Gene and Cell Therapy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keita Takahashi, Tsuyoshi Sugiyama, Nagisa Tokunoh, Shun Tsurumi, Tetsuo Koshizuka, Naoki Inoue
2. 発表標題 Intimate adhesion of <i>Citrobacter rodentium</i> is the cue to initiate anti-pathogen immune responses
3. 学会等名 第95回日本細菌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruka Sudo, Ayato Tsujii, Tetsuo Koshizuka, Naoki Inoue, Keita Takahashi
2. 発表標題 The effect of antigen binding and administration route of BLP on its immunogenicity
3. 学会等名 第95回日本細菌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻井彩人、須藤晴香、徳納渚沙、川嶋更奈、高橋圭太、腰塚哲朗、井上直樹
2. 発表標題 細菌様粒子 (BLP) アジュバントを用いた経鼻ワクチンの腸管感染症に対する防御効果に関する研究
3. 学会等名 第142回日本薬学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳澤大貴、小林 靖、高橋圭太、腰塚哲朗、井上直樹
2. 発表標題 乳酸菌を送達体とした経口DNAワクチン系に関する研究
3. 学会等名 第142回日本薬学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜薬科大学 生命薬学大講座 感染制御学研究室 ホームページ
<http://sv1.gifu-pu.ac.jp/lab/kansen/research/>

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