

機関番号：13802

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590439

研究課題名 (和文) 糖鎖被覆リポソームを利用した抗結核ワクチンの開発

研究課題名 (英文) Establishment of a novel vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* employing carbohydrate-coated liposomes

研究代表者

辻村 邦夫 (TSUJIMURA KUNIO)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10227407

研究成果の概要 (和文) : 結核防御抗原 MPT51 をオリゴマンノース被覆リポソームに封入した新規抗結核ワクチンを開発した。本ワクチンで免疫したマウスでは、抗原特異的な T 細胞応答および抗体産生が効率良く誘導された。また、誘導された免疫応答において産生されるサイトカインの種類や抗体のクラスから、本ワクチンによって結核の防御に重要とされる Th1 型の抗原特異的な免疫応答を誘導できることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : A novel vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* was established employing a tuberculosis-protective antigen MPT51 and oligomannose-coated liposomes. Antigen-specific T-cell responses and antibody production were effectively induced in mice vaccinated with this composition. In addition, induced cytokine profiles and antibody classes suggested that this newly formulated vaccine could elicit Th1-type immune responses known to be important for the protection against tuberculosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：ワクチン、結核菌、糖鎖、リポソーム

1. 研究開始当初の背景

結核に対するワクチンとしては、生菌ワクチンである BCG が現在も用いられている。しかし、BCG の乳幼児粟粒結核に対する有効性は確認されているが、その成人肺結核に対する防御効果は否定的であり、BCG の効果を凌駕あるいは補完する新規ワクチンの開発が急務とされていた (現在もされている)。

2. 研究の目的

新規結核ワクチンの樹立には、①候補抗原の同定と②効果的な免疫手段の開発の両方が必要とされる。我々は本研究を開始する前に、東海大学・小島および産総研・池原との共同で、抗原提示細胞によって効率良く取り込まれる糖鎖被覆リポソーム (OML) を開発していた。本研究は、我々が同定した結核防御抗原 MPT51 を抗原に、糖鎖被覆リポソームを抗原送達システムとして使用した、独創的かつ効果的な新規結核ワクチンの開発を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 仮想抗原を用いた OML の免疫誘導能の検討

仮想抗原として ovalbumin (OVA) を封入した OML で C57BL/6 マウスを免疫 (2 週間隔で 3 回腹腔内注射) した。最終免疫の 2 週間後、免疫マウスの脾細胞を H2-K^b 拘束性の OVA ペプチド (257-264 番目のアミノ酸: CD8 陽性 T 細胞を刺激) および H2-A^b 拘束性の OVA ペプチド (323-339 番目のアミノ酸: CD4 陽性 T 細胞を刺激) で刺激して、非免疫マウスまたは OML 非被覆リポソーム封入 OVA で免疫したマウスの脾細胞と T 細胞応答の誘導効率を比較した。さらに、OVA 遺伝子を導入した EL4 (EG7-OVA) と親株である EL4 を免疫マウスに接種し、マウスの生存を観察した。さらに C57BL/6 マウスを EL4 lysate を封入した OML で免疫し、EL4 特異的な抗腫瘍活性が誘導できるか検討した。

(2) 結核防御抗原 MPT51 を封入した OML による抗原特異的免疫応答の誘導

大腸菌で大量発現させた MPT51 を OML に封入してマウス (C57BL/6 および BALB/c) を免疫し、抗原特異的な免疫応答の誘導能を検討した。T 細胞応答はマウスの脾細胞を MPT51 由来抗原ペプチドで刺激し、上清へのサイトカイン産生を ELISA で測定して検討した。抗原ペプチドとして、H2-D^d 拘束性の MPT51 ペプチド (24-32 番目のアミノ酸: CD8 陽性 T 細胞を刺激) および H2-A^b 拘束性の MPT51 ペプチド (171-190 番目のアミノ酸: CD4 陽性 T 細胞を刺激) をそれぞれ BALB/c および C57BL/6 の脾細胞刺激に使用した。血清中の抗原特異的な抗体価は、大腸菌で発現させた MPT51 蛋白質を抗原として ELISA で測定した。

4. 研究成果

OML に封入した OVA は、非封入 OVA や OML 非被覆リポソームに封入された OVA の約 1/50 量で効率良く CD4 および CD8 陽性 T 細胞の免疫応答を誘導し、アジュバントを特に必要としなかった。また、OML 封入 OVA で免疫したマウスは、OVA 遺伝子導入した EL4 細胞を抗原特異的に拒絶した。また、親株として用いた EL4 の免疫原性は弱く、同系マウスに接種しても拒絶されないが、その lysate を封入した OML でマウスを免疫すると、EL4 特異的な抗腫瘍活性が効率良く誘導され、免疫マウスは移植された EL4 を拒絶した。この結果は、OML に封入することによって、OVA のような免疫原性の強い抗原だけではなく、通常では免疫原性を持たないような弱い抗原を用いた場合にも、効率よく免疫応答

を誘導できることを示唆している。

これらの実験結果を基に、大腸菌で大量発現させた MPT51 蛋白質を OML に封入してマウスに免疫し、抗原特異的な T 細胞応答および抗体産生の誘導能を検討した。OML に封入した MPT51 で免疫したマウスでは、CD4 (C57BL/6) および CD8 陽性 T 細胞 (BALB/c) の両方の免疫応答が誘導できたのに対し、オリゴマンノース非被覆リポソームに封入した MPT51 や MPT51 単独では両応答とも惹起されなかった。産生されたサイトカインは IFN- γ 優位であり、抗原特異的な IL-4 産生はほとんど検出できなかった。また、OML に封入した MPT51 で免疫したマウスの血清では、IgG2a/IgG2c クラスの MPT51 特異的な抗体価の上昇が確認できた。これらの結果から、OML に封入した結核防御抗原で免疫することにより、結核に対する免疫応答で重要とされる Th1 型の免疫応答を効率良く誘導できる可能性が示唆された。

今回我々が開発した糖鎖被覆リポソームは結核抗原のみならず、がん等の様々なワクチンに応用が可能な抗原送達技術であり、既に 1 件の国外特許を取得し、さらに複数国へ出願中である。

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 35 件)

1. 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫: 結核菌ファゴソームの成熟阻害機構. 化学療法領域 (印刷中) 査読無
2. 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫: 結核菌の細胞内寄生メカニズム. 日本臨床 (印刷中) 査読無
3. Seto S, Tsujimura K, Koide Y: Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. *Traffic* 12: 407-420, 2011. 査読有
4. Uto T, Tsujimura K, Uchijima M, Seto S, Nagata T, Suda T, Chida K, Nakamura H, Koide Y: A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of Heat Shock Protein 70. *FEMS Immunol Med Microbiol* 61: 189-196, 2011. 査読有
5. Yokoyama N, Ikehara Y, Tiwananthagorn W, Ota N, Igarashi I, Kojima N, Taguchi O, Tsujimura K: Differences in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell-depletion between *Babesia microti* and *Babesia rodhaini* infections in mice. *J Protozool Res* 20: 20-30, 2010. 査読有

6. Yamamura Y, Seto S, Uchijima M, Hozumi H, Nagata T, Tsujimura K, Koide Y: Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. *Procedia Vaccinology* 3: 19-26, 2010. 査読有
7. Nagata T, Koide Y: Induction of specific CD8 T cells against intracellular bacteria by CD8 T-cell-oriented immunization approaches. *J. Biomed. Biotechnol.* 764542, 2010. 査読有
8. 永田 年、小出幸夫：結核菌に対するT細胞誘導ワクチンの試み。日本細菌学雑誌 65: 309-324, 2010. 査読無
9. 辻村邦夫、小出幸夫：結核菌抗原認識とT細胞免疫。結核 85: 509-514, 2010. 査読無
10. Eweda G, Suzuki D, Nagata T, Tsujimura K, Koide Y: Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 28: 4616-4625, 2010. 査読有
11. Seto S, Matsumoto S, Tsujimura K, Koide Y: Differential recruitment of CD63 and Rab7-interacting-lysosomal-protein to phagosomes containing *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. *Microbiol Immunol* 54: 170-174, 2010. 査読有
12. Mitsui S, Torii K, Fukui H, Tsujimura K, Maeda A, Nose M, Nagatsu A, Mizukami H, Morita A: The herbal medicine compound faltarindiol from *Notopterygii Rhizoma* suppresses dendritic cell maturation. *J Pharmacol Exp Ther* 333: 954-960, 2010. 査読有
13. Wang L-X, Nagata T, Tsujimura K, Uchijima M, Seto S, Koide Y: Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secretory protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination. *Vaccine* 28: 2026-2031, 2010. 査読有
14. Suzuki D, Nagata T, Eweda G, Matsumoto S, Matsumoto M, Tsujimura K, Koide Y: Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) using DNA vaccination. *Vaccine* 28: 2020-2025, 2010. 査読有
15. Ichikawa T, Kageyama Y, Kobayashi H, Kato N, Tsujimura K, Koide Y: Etanercept treatment reduces the serum levels of interleukin-15 and interferon-gamma inducible protein-10 in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 30: 725-730, 2010. 査読有
16. Enomoto M, Goto H, Tomono Y, Kasahara K, Tsujimura K, Kiyono T, Inagaki M: A novel positive feedback loop between Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) and CHK1 in the nucleus during the G2/M transition. *J Biol Chem* 284: 34223-34230, 2009. 査読有
17. Tsujimura K, Ikehara Y, Nagata T, Koide Y, Kojima N: Induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to peritoneal macrophages. *Procedia Vaccinology* 1: 127-134, 2009. 査読有
18. Seto S, Matsumoto S, Ohta I, Tsujimura K, Koide Y: Dissection of Rab7 localization on *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Biochem Biophys Res Commun* 387: 272-277, 2009. 査読有
19. Ozawa Y, Suda T, Nagata T, Hashimoto D, Nakamura Y, Enomoto N, Inui N, Koide Y, Nakamura H, Chida K. Mucosal vaccine using CTL epitope-pulsed dendritic cell confers protection for intracellular pathogen. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 440-448, 2009. 査読有
20. Kamei M, Nannya Y, Torikai H, Kawase T, Taura K, Inamoto Y, Takahashi T, Yazaki M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Ito T, Togari H, Riddell SR, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y: HapMap scanning of novel human minor histocompatibility antigens. *Blood* 113: 5041-5048, 2009. 査読有
21. Aoshi T, Carrero JA, Konjufca V, Koide Y, Unanue ER, Miller MJ: The cellular niche of *Lesteria monocytogenes* infection changes rapidly in the spleen. *Eur J Immunol* 39: 417-425, 2009. 査読有
22. Aoshi T, Zinselmeyer BH, Konjufca V, Lynch JN, Zhang X, Koide Y, Miller MJ: Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8⁺ T cells. *Immunity* 29: 476-486, 2008. 査読有
23. Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 protein efficiently induces antigen-specific T-cell responses. *Vaccine* 26: 5165-5169, 2008. 査読有
24. Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Koide Y: In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium. *Vaccine* 26: 5123-5127, 2008. 査読有
25. Hashimoto D, Nagata T, Uchijima M, Seto S, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nakamura H, Koide Y: Intratracheal administration of

- third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific CD8⁺ T-cell responses in the lung. *Vaccine* 26: 5095-5100, 2008. 査読有
26. Aoshi T, Nagata T, Suzuki M, Uchijima M, Hashimoto D, Rafiei A, Suda T, Chida K, Koide Y: Identification of an HLA-A*0201-restricted T-cell epitope on the MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis*, by MPT51 overlapping peptide screening. *Infect Immun* 76: 1565-1571, 2008. 査読有
 27. Namangala B, Yokoyama N, Ikehara Y, Taguchi O, Tsujimura K, Sugimoto C, Inoue N: Effect of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell-depletion on acute lethal infection of mice with *Trypanosoma congolense*. *J Vet Med Sci* 70: 751-759, 2008. 査読有
 28. Demachi-Okamura A, Ito Y, Akatsuka Y, Tsujimura K, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K: Epstein-Barr virus nuclear antigen 1-specific CD4⁺ T cells directly kill Epstein-Barr virus-carrying natural killer and T cells. *Cancer Sci* 99: 1633-1642, 2008. 査読有
 29. Shimato S, Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, Nakahara N, Ishii J, Ito M, Akatsuka Y, Kuzushima K, Yoshida J: Identification of a human leukocyte antigen-A24-restricted T-cell epitope derived from interleukin-13 receptor $\alpha 2$ chain, a glioma-associated antigen. *J Neurosurg* 109: 117-122, 2008. 査読有
 30. Isomura I, Shintani Y, Yasuda Y, Tsujimura K, Morita A: Induction of regulatory dendritic cells by topical application of NF- κ B decoy oligodeoxynucleotides. *Immunol Lett* 119: 49-56, 2008. 査読有
 31. Kojima N, Biao L, Nakayama T, Ishii M, Ikehara Y, Tsujimura K: Oligomannose-coated liposomes as a therapeutic antigen-delivery and an adjuvant vehicle for induction of in vivo tumor immunity. *J Control Release* 129: 26-32, 2008. 査読有
 32. Hara M, Nakanishi H, Tsujimura K, Matsui M, Yatabe Y, Manabe T, Tatsumatsu M: Interleukin-2 potentiation of cetuximab antitumor activity for epidermal growth factor receptor-overexpressing gastric cancer xenografts through antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Sci* 99: 1471-1478, 2008. 査読有
 33. Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, Shimato S, Ito M, Kuzushima K, Kondo Y, Sekido Y, Kawatsura H, Narita Y, Yoshida J: The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma. *Int J Cancer* 122: 2542-2553, 2008. 査読有
 34. Kawase T, Nanya Y, Torikai H, Yamamoto G, Onizuka M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y: Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA. *Blood* 111: 3286-3294, 2008. 査読有
 35. Ikehara Y, Shiuchi N, Kabata-Ikehara S, Nakanishi H, Yokoyama N, Takagi H, Nagata T, Koide Y, Kuzushima K, Takahashi T, Tsujimura K, Kojima N: Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells. *Cancer Lett* 260: 137-145, 2008. 査読有
- [学会発表] (計 39 件)
1. Tsujimura K, Yamamura Y, Hozumi H, Seto S, Uchijima M, Koide Y: Immunogenicity of latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. The 10th Kyungpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium. 2010. 浜松
 2. Seto S, Tsujimura K, Koide Y: Proteomic analysis revealed the interaction of endoplasmic reticulum with the phagosomes containing *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages. The 10th Kyungpook-Hamamatsu Joint Medical Symposium. 2010. 浜松
 3. Yamamura Y, Seto S, Uchijima M, Tsujimura K, Koide Y: Immune responses against dormancy-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. 45th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. 2010. Cambridge/USA
 4. Koide Y, Seto S, Tsujimura K: Proteomic analysis reveals the interaction of endoplasmic reticulum with the phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis*. 45th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. 2010. Cambridge/USA
 5. Eweda G, Suzuki D, Nagata T, Tsujimura K, Koide Y: Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis* with DNA immunization. DNA vaccine 2010. 2010. New Orleans/USA

6. Yamamura Y, Seto S, Uchijima M, Hodumi H, Nagata T, Tsujimura K, Koide Y: Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. DNA vaccine 2010. 2010. New Orleans/USA
7. Uto T, Uchijima M, Seto S, Nagata T, Suda T, Chida K, Nakamura H, Tsujimura K, Koide Y: Genetic fusion of heat-shock protein 70 to a mycobacterial antigen enhances the antigen-specific T cell responses. Vaccine 3rd Global Congress. 2009. Singapore/Republic of Singapore
8. Seto S, Koide Y: Alternative localization of Rab GTPases to phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis* in inhibition of phagolysosome biogenesis. 44th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. 2009. 福岡
9. Ikehara Y, Ikehara SK, Yokoyama N, Kuzushima K, Takahashi T, Kojima N, Tsujimura K: Cancer vaccine delivery using oligomannose coated liposomes. AACR 100th Annual Meeting. 2009.
10. Seto S, Koide Y: *Mycobacterium tuberculosis* modulates the network of Rab GTPases in attenuation of phagosome maturation. Keystone symposium. 2009. Keystone/USA
11. Goto H, Enomoto M, Tomono Y, Kasahara K, Ikegami Y, Tsujimura K, Kiyono T, Inagaki M: Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent kinase 1 promotes mitotic entry. 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 2008. San Francisco/USA
12. Nagata T, Wang L-X, Koide Y: Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening. DNA Vaccines 2008, 2008. Las Vegas/USA
13. Suzuki D, Nagata T, Matsumoto S, Koide Y: Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1). DNA Vaccines 2008, 2008. Las Vegas/USA
14. Tsujimura K, Ikehara Y, Nagata T, Koide Y, Kojima N: Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to intraperitoneal macrophages. Vaccine 2nd Global Congress. 2008. Boston/USA
15. Seto S, Koide Y: *Mycobacterium tuberculosis* modulates the network of Rab GTPases to inhibit phagolysosome

biogenesis in macrophage. 第8回あわじ感染症・免疫フォーラム. 2008. 淡路

16. Seto S, Koide Y: Live *Mycobacterium tuberculosis* inhibits phagolysosome biogenesis in macrophages by modulating localization of Rab GTPase proteins on its phagosomes. 43rd US-Japan conference on tuberculosis and leprosy. 2008. Baltimore/USA
17. Natsume A, Wakabayashi T, Shimato S, Tsujimura K, Kuzushima K, Yoshida J: The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine induces the expression of cancer-testis antigens in human gliomas: epigenetic target for tumor immunotherapy. The 17th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. 2008. 函館

〔図書〕 (計1件)

1. Nagata T, Koide Y: Chapter 15. Anti-infective vaccine strategies. Handbook of *Listeria monocytogenes*. CRC Press. pp.449-480, 2008.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称 : Liposome composition for immune induction

発明者 : Kojima N, Ikehara Y, Tsujimura K

権利者 : Tokai University Educational system, Aichi Prefecture

種類 : 特許

番号 : CA 2634038 (PCT/JP2006/306483)

出願年月日 : 平成20年6月12日

国内外の別 : 国外

名称 : Liposome composition for immune induction

発明者 : Kojima N, Ikehara Y, Tsujimura K

権利者 : Tokai University Educational system, Aichi Prefecture

種類 : 特許

番号 : 11/909,912 (PCT/JP2006/306483)

出願年月日 : 平成21年5月29日

国内外の別 : 国外

○取得状況 (計1件)

名称 : Liposome composition for immune induction

発明者 : Kojima N, Ikehara Y, Tsujimura K

権利者 : Tokai University Educational system, Aichi Prefecture

種類 : 特許

番号 : EA 012618 (PCT/JP2006/306483)

取得年月日 : 平成21年10月30日

国内外の別：国外

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻村 邦夫 (TSUJIMURA KUNIO)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10227407

(2) 研究分担者

小出 幸夫 (KOIDE YUKIO)

浜松医科大学・医学部・理事

研究者番号：30126809

永田 年 (NAGATA TOSHI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：90275024

内嶋 雅人 (UCHIJIMA MASATO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：20252174

瀬戸 真太郎 (SETO SHINTARO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：50383203

(3) 連携研究者