

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590929

研究課題名（和文） 緑膿菌感染症の制御に向けた新戦略
—線毛を標的としたワクチン療法の開発—研究課題名（英文） New approaches for control of *Pseudomonas aeruginosa*-infections
-vaccine development associated with pili-

研究代表者

門田 淳一（KADOTA JUN-ICHI）

大分大学・医学部・教授

研究者番号：50233838

研究成果の概要（和文）：

緑膿菌は易感染宿主において重要な病原体であり、その感染症の治療や予防法の開発は喫緊な課題である。本研究では緑膿菌線毛蛋白ペプチドにおける樹状細胞を介したワクチン効果の検討を行った。断片化した緑膿菌線毛蛋白の合成ペプチドではアミノ残基 101-120 残基のペプチドが樹状細胞（Jaws-II）からの IFN- γ や IL-12 の産生を亢進させた。その他の 12 種類の合成ペプチドではサイトカインの産生亢進を認めなかった。さらにこのペプチドは樹状細胞の成熟化を促していた。しかしながら、同ペプチドで刺激した樹状細胞とナイーブ T リンパ球の混合培養ではリンパ球の増殖やリンパ球からのサイトカイン産生は認めなかった。混合培養時の樹状細胞比をさらに大きくするなど、今後もさらに詳細な検討を進めていく必要がある。

研究成果の概要（英文）：

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common pathogens for immunocompromized patients. Therefore, it is important for the development to treat and prevent for *P.aeruginosa*-infection. In this study, we investigated the pili-associated vaccine development using dendritic cell. Jaws-II cell was used in this study as dendritic cell. Pulsed Jaws-II cell with synthetic peptide aa.101-120 produced IFN- γ and IL-12 although the other peptides did not induced any cytokines. Furthermore, Jaws II cell was matured by stimulation with the peptide aa.101-120. However, co-culture of the stimulated Jaws-II and naïve T cells did not show proliferation of T cell and cytokine-production. Further examinations are needed for the development of vaccine using dendritic cell and pili-peptides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：呼吸器病学・感染症学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：緑膿菌、ワクチン、ペプチド、線毛蛋白、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、多剤耐性緑膿菌 (MDRP) による院内感染が社会的問題となっているが、MDRP に対して抗菌薬を含めて有効な治療法が現在のところない。また、びまん性汎細気管支炎 (DPB) や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などの慢性呼吸器疾患および易感染性宿主における緑膿菌感染症は患者の予後を大きく左右する。特に高齢化社会を迎えるわが国においては緑膿菌感染症の制御に取り組むことは極めて重要である。

緑膿菌感染症は緑膿菌線毛が気道上皮細胞に存在する糖脂質の asialoganglioside (aGM1) と Toll-like receptor (TLR) 2 との複合受容体に付着・定着することから始まる。その後、緑膿菌は twitching motility という IV 型線毛の働きによって生体あるいは非生体表面を移動し、感染巣を拡大し、バイオフィルムを形成し、また宿主側を Th2 系にシフトさせ、病原性を発揮する。私たちはこの緑膿菌線毛の機能に注目し、これまでにマクロライド系抗菌薬や short interfering RNA による遺伝子干渉が線毛の twitching motility 機能を抑制し、緑膿菌感染症を制御し得ることを明らかにしてきた。

しかし、緑膿菌感染が成立してからのこれらの方法による機能制御は完全ではないため、緑膿菌による感染自体の成立を阻止する戦略が必要となる。即ち、緑膿菌感染の制御には線毛機能を抑制して付着を阻止することが一義的に重要であると考えられる。私たちは現在までに、精製した緑膿菌線毛蛋白をワクチンとして投与することで、マウス緑膿菌感染症の成立を抑制し、生存率が上昇することを明らかにした (Ohama M, et al. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47:107-115, 2006)。

2. 研究の目的

緑膿菌からの線毛精製には大量の菌の確保と長期間の労力を要することから、今後の実用化に向けて困難な面が多い。従って今回の研究では、線毛蛋白のアミノ酸配列に基づき数種類の合成ペプチドを作成し、そのペプチドで刺激した樹状細胞をマウスに導入してワクチン効果を検討し、実用化に向けての基盤を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ペプチドの作成

143 アミノ残基より構成される緑膿菌線

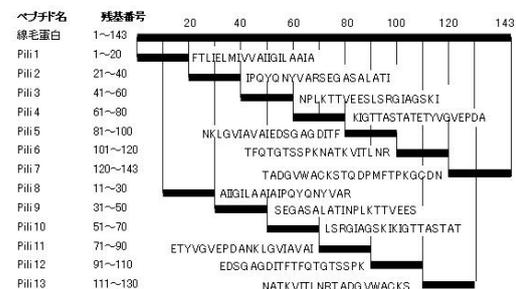


図1. 合成した緑膿菌線毛蛋白ペプチド

毛蛋白を図1に示すような20アミノ残基ごとにペプチドを作成した。ペプチドの作成は外部機関に依頼した。

(2) 各緑膿菌線毛蛋白ペプチドによる各種培養細胞の刺激

ヒト気道上皮細胞株である BEAS-2B 細胞、ヒト急性単球性白血病細胞株である THP-1 細胞、マウス骨髄系樹状細胞株の Jaws-II 細胞の3種の細胞にそれぞれ13種類の緑膿菌線毛蛋白合成ペプチドを 100 μ g/ml となるよう添加し、刺激48時間後の培養上清を採取した。positive control として LPS、negative control として PBS 添加群を用いた。

(3) サイトカイン産生量の ELISA 法による測定

BEAS-2B 細胞の上清については IL-8、THP-1 細胞上清は TNF- α 、Jaws-II 細胞上清は、TNF- α および IL-12(total) を定量した。各サイトカイン量は、キット化されている ELISA 法を用い、その手順に沿って定量した。

(4) 線毛蛋白ペプチドによる Jaws-II 細胞の成熟化の検討

合成ペプチドを細胞培養液中の最終濃度が 100 μ g/ml となるように Jaws-II 細胞培養液に添加した。negative control として PBS 添加群、ポジティブコントロールとして緑膿菌 PAO-1 株を超音波破砕した刺激群を作成した。各検体添加48時間後に Jaws-II 細胞表面の抗原提示分子 MHC-class II の発現状況は FACS を用いて解析した。

(5) 抗原刺激 Jaws-II 細胞とマウスリンパ球の共培養

in vitro において抗原刺激した Jaws-II 細胞のナイーブ T 細胞への抗原提示能を検討するため、マウス脾細胞より T リンパ球を分離した。C57BL/6 マウスより脾臓を摘出し、ホモジネートを行った。得られた細胞を磁気ビーズ法で CD4⁺、CD62L⁺ のナイーブ T 細胞を分離した。一方で Jaws-II 細胞を PAO-1 株全菌体超音波破碎検体、PBS をそれぞれ positive control、negative control として、また合成ペプチド pili6 で 48 時間刺激を行った。それぞれの抗原で刺激した Jaws-II 細胞を 0.75%ホルマリン液で 30 分間固定し洗浄後、前述したナイーブ T 細胞とを混合培養した。培養は Jaws-II 細胞 1 x 10⁴ とナイーブ T 細胞 2 x 10⁵ で共培養した。培養後 24、48、72、96 時間後の培養上清を採取し、上清中の IFN- γ 、IL-10 濃度の測定を ELISA 法で行った。また培養後 72 時間後の BrdU のリンパ球への取り込みを ELISA 法で検討した。

4. 研究成果

(1) 各種細胞における緑膿菌線毛蛋白ペプチド刺激によるサイトカイン産生

ヒト気道上皮細胞 BEAS-2B を刺激後に上清中の IL-8 を ELISA 法で定量したところ、positive control の LPS 刺激群では 1400pg/ml 程度の上昇を認めていたが、ペプチド刺激群ではいずれの群でも上昇を認めなかった。ヒト急性単球性白血病細胞 THP-1 を刺激したところ LPS 刺激群では有意に TNF- α の産生亢進を認めたが、13 種類の緑膿菌線毛蛋白ペプチド刺激群においては、いずれの群でも検出可能限界以下であった。マウス骨髄系樹状細胞 Jaws-II 細胞を各種ペプチドおよび LPS で刺激後に培養上清中の TNF- α を ELISA 法で定量したところ、LPS 刺激群のほか、合成ペプチド pili6 刺激群において、有意に TNF- α の産生亢進を認めた(図 2)。

同様に Jaws-II 細胞を刺激後に IL-12 の産生量を ELISA 法で検討した結果を図 3 に示す。LPS 刺激群で有意に IL-12 の産生亢進を認め

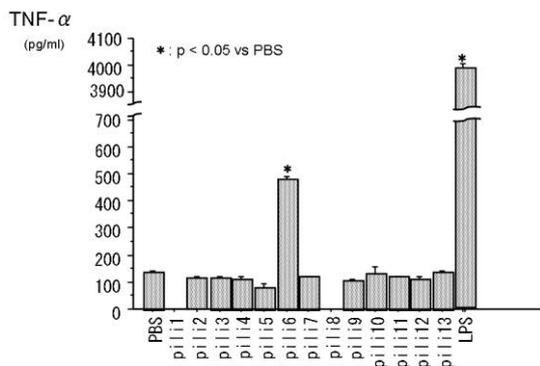


図2 各種緑膿菌線毛蛋白ペプチド刺激によるJaws-II 細胞におけるTNF- α 産生

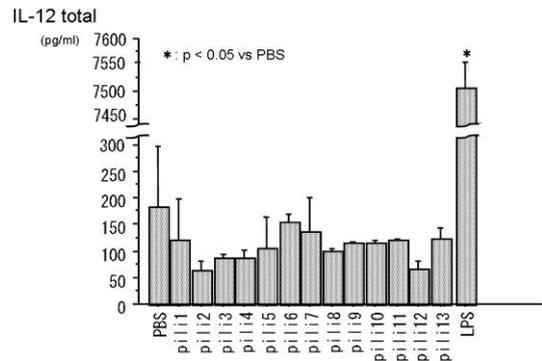


図3 各種緑膿菌線毛蛋白ペプチド刺激によるJaws-II 細胞におけるIL-12産生

たが、ペプチド刺激群においてはいずれの群でも有意な産生亢進は認めなかった。しかしながら、pili6 群では IL-12 の産生が他のペプチド刺激群に比較し亢進している傾向にあった。

Jaws-II 細胞におけるペプチド pili6 の TNF- α 産生促進作用の濃度依存性の有無について検討した。ペプチドの濃度をこれまでの 100 μ g/ml のほか、10 μ g/ml、1 μ g/ml の刺激群を作成した。TNF- α 産生亢進の傾向がみられたのは 100 μ g/ml 刺激群のみであり、それ以下の濃度での刺激群においては、TNF- α 産生亢進は認めなかった。同様に、Jaws-II 細胞におけるペプチド pili6 の IL-12 産生促進作用の濃度依存性の有無について検討した。ペプチドの濃度 100 μ g/ml、10 μ g/ml、1 μ g/ml の 3 つの刺激群のうち、IL-12 産生亢進の傾向がみられたのは 100 μ g/ml 刺激群のみであり、それ以下の濃度での刺激群においては、IL-12 の産生亢進はみられなかった。

(2) 抗原刺激による Jaws II 細胞の成熟化

Jaws-II 細胞を PBS で刺激した negative control 群では MHC-class II 発現細胞が 3.99% であった(図 4 A)。一方 positive control である緑膿菌 PAO1 株超音波破碎抗原刺激群では MHC-class II 抗原発現細胞は 17.77%へと増加していた(図 4 B)。

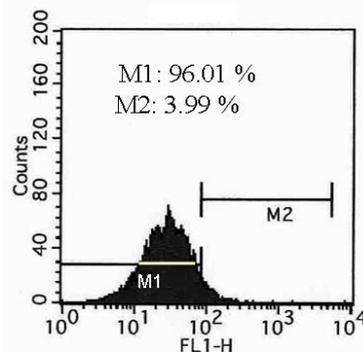


図4A. MHC-class II 発現状況(PBS刺激群)

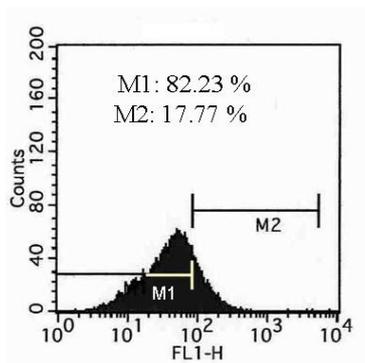


図4B. MHC-class II 発現状況(緑膿菌 PAO-1株
全菌体超音波破砕抗原刺激群)

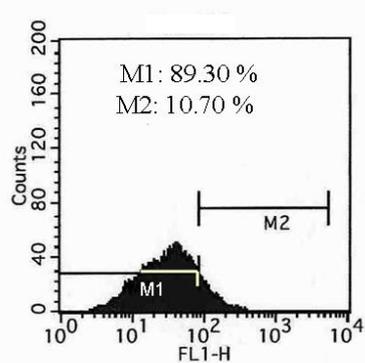


図4C. MHC-class II 発現状況(pili 6刺激群)

これまでの結果で炎症性サイトカインの誘導能を有していた合成ペプチド pili6 による刺激では図4Cに示すように 10.7%の細胞が MHC-class II 抗原を提示し、成熟化していることが明らかとなった。

(3) Jaws-II 細胞のナイーブ T 細胞への抗原提示能の検討

抗原刺激により成熟化した Jaws-II 細胞が抗原提示能を有するかどうかを抗原刺激後ホルマリン固定した Jaws-II 細胞とマウスの脾臓から抽出したナイーブ T 細胞を混合培養し、サイトカイン産生状況やリンパ球への BrdU の取り込みを測定し、検討を行った。緑膿菌 PAO-1 株破砕菌体刺激群では培養上清中の IFN- γ 濃度は、培養開始後 48、72、96 時間後でそれぞれ 500、700、900pg/ml と上昇を認めていたが、合成ペプチド pili6 では IFN- γ 濃度の上昇は認めなかった。また IL-10 の濃度は negative control である PBS 刺激群、PAO-1 株破砕菌体刺激群、pili6 刺激群いずれも上昇を認めなかった。さらに BrdU のリンパ球への取り込みもいずれの刺激群でも検出できなかった。

考察

緑膿菌線毛は菌の上皮などへの付着に重要な役割を果たし、twitching motility と呼ばれる移動能により biofilm 形成に關与して

いることが知られている。こうした重要な役割を果たしている線毛を標的としたワクチンの基礎的検討を行った。

樹状細胞は緑膿菌線毛蛋白の 101-120 番目のアミノ残基を認識しサイトカインの産生を亢進させ、MHC-class II 抗原を発現し成熟していた。しかしながら、ナイーブ T リンパ球との混合培養では同ペプチドによるリンパ球からの産生亢進やリンパ球の増殖は認めなかった。こうした結果の一部、すなわち樹状細胞からのサイトカイン産生や MHC-class II の発現亢進は下図に示すような線毛に対するワクチンの効果を検証する上

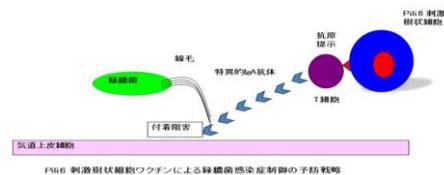


図6 刺激樹状細胞ワクチンによる緑膿菌感染症制御の予防戦略

で重要な意義を有しているものと考えられる。これまで線毛蛋白の抗原決定には線毛蛋白の C 末端側にある 2 つのシステイン残基が重要な役割を果たしていると考えられていた。今回の結果はこれまでの結果と異なる結果であり、興味深い。一方、刺激後の樹状細胞がリンパ球の増殖やサイトカイン産生亢進を誘導しなかったことは、実験系にいくつかの問題点がある可能性が考えられる。その第一に混合培養時の樹状細胞とナイーブ T 細胞との割合を変化させる必要があるかもしれない。また、今回はホルマリン固定した刺激後の樹状細胞を用いたが、固定を行わずに実験を行う必要がある。こうした点を改善し、さらに詳細な検討を行い緑膿菌ワクチンの実用化へ向けた研究を進めていきたい。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- 橋永一彦、岩田敦子、園田尚子、大谷哲史、吉岡大介、梅木健二、石井 寛、岸 建志、白井 亮、時松一成、平松和史、門田淳二：特異的免疫誘導因子としての緑膿菌線毛蛋白構成ペプチドの機能解析：第 85 回日本感染症学会総会、平成 23 年 4 月 21~22 日、東京
- 橋永一彦、岩田敦子、園田尚子、大谷哲史、吉岡大介、梅木健二、石井寛、岸建志、

白井亮、時松一成、平松和史、門田淳一：炎症誘導因子としての緑膿菌線毛蛋白の構成ペプチドの機能解析：第 80 回日本感染症学会西日本地方会、平成 22 年 11 月 19～20 日、松山市

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門田 淳一 (KADOTA JUN-ICHI)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：50233838

(2) 研究分担者

平松 和史 (HIRAMATSU KAZUFUMI)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：80301381

白井 亮 (SHIRAI RYO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：60437837

岸 建志 (KISHI KENJI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：20347024

(3) 連携研究者

なし