

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07542

研究課題名(和文)糖鎖依存的貪食による単核貪食細胞の活性化と細胞性免疫応答誘導に関する研究

研究課題名(英文) Activation of mononuclear phagocytes by phagocytosis of carbohydrate-decorated particles

研究代表者

小島 直也 (Kojima, Naoya)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：30183338

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)：ウイルス感染症予防には細胞性免疫の誘導が可能なワクチンの開発が必須である。オリゴマンノース被覆リポソーム(OML)は有効な細胞性免疫を誘導できるアジュバントとして機能する。本研究では、糖鎖提示粒子としてOML及び乳酸菌細胞壁を用いて、単核貪食細胞の活性化と糖鎖依存的貪食との関連性の解析を目的とした。

研究の結果、糖鎖提示粒子によるIL-12とTh1免疫応答誘導には600 nm以上の大きな粒子径を持つ粒子による糖鎖認識を起点としたアクチンの再構成とPhagocytosisが必須であることを示され、糖鎖提示粒子の大きさと形状が免疫応答の方向性を決定する重要なファクターであ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

研究代表者は、OMLが抗原提示細胞(MNP)からのIL-12の優先的な産生を誘導できる効率的な細胞性免疫誘導型ワクチンアジュバントとして機能することを示してきたが、糖鎖提示粒子によるMNPからのIL-12の産生誘導には到底の糖鎖だけでなく粒子の形状とサイズが必要があることを見出した。このことは糖鎖提示粒子の大きさと形状が免疫応答の方向性を決定する重要なファクターになっており、粒子上に提示された糖鎖、粒子のサイズと形状を制御することで免疫応答を制御できることを意味している。従って、本成果が細胞性免疫誘導を目的とした新たなワクチン戦略に寄与できる可能性を示したと考えている。

研究成果の概要(英文)：Development of vaccines capable of inducing cell-mediated immunity is essential for the prevention of viral infections. Oligomannose-coated liposomes (OML) function as adjuvants that can efficiently induce effective cell-mediated immunity. In this study, using OML and lactobacillus cell walls as glycan-displaying particles, we analyzed the relationship between activation of mononuclear phagocytic cells and glycan-dependent phagocytosis. We showed that actin remodeling and phagocytosis triggered by glycan recognition by particles with a diameter of 600 nm or larger are essential for the induction of IL-12 and Th1 immune responses by glycan-presenting particles, and clarified that the size and shape of glycan-presenting particles are important factors that determine the direction of immune response.

研究分野：細胞生物学

キーワード：単核貪食細胞 ファゴサイトーシス IL-12 糖鎖 リポソーム 細菌細胞壁 アクチン

1. 研究開始当初の背景

効果的な抗腫瘍免疫や抗ウイルス免疫を誘導するためには抗原特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導する必要があり、CTL の機能が十分に発揮されるためには Th1 細胞の介助が重要である。研究代表者らはこれまでの研究から、オリゴマンノース残基をもつ人工糖脂質で被覆したリポソーム (オリゴマンノース被覆リポソーム; OML) が樹状細胞などの貪食単核細胞 (MNP) への物質送達能及び MNP の活性化と IL-12 の選択的誘導能を持つユニークなアジュバントであり (Takagi et al., *Cytokine*, **40**, 241-250, 2007; Ikehara et al., *Cancer Lett.* **260**, 137-145, 2008; Matsuoka et al. *Glycoconj. J.*, **36**, 185-197, 2019)、原虫感染症・がん・1 型アレルギーなど抗原特異的 Th1 免疫応答及び CTL がエフェクターをなるような様々な疾患の病態局面へ介入できることを明らかにしてきた (Shimizu et al., *Parasit. Immunol.* **29**, 229-239, 2007; Kojima et al., *J. Control. Release*, **129**, 26-32, 2008; Ishi et al. *Int Immunopharm*, **10**, 1041-1046, 2010; Nishimura et al., *Vaccine*, **31**, 3528-3535, 2013)。人工糖脂質とは、天然に存在するオリゴ糖と天然のリン脂質であるジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) とを還元アミノ化により縮合した非天然型糖脂質であり、主にマンノトリオース (Man3) をオリゴ糖とした人工糖脂質である Man3-DPPE を指す。また OML は Man3-DPPE, cholesterol, dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) がモル比 1:10:10 で構成される粒子サイズ約 1000 nm のリポソームである (Fig. 1)。

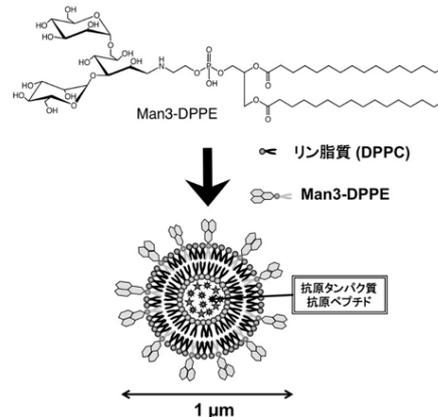


Fig. 1. OMLの概念図

2. 研究の目的

OML は優れた抗原送達媒体および細胞性免疫誘導能を持つアジュバントとして機能するが、その詳細な機序の解明にまでは至っていない。糖鎖を表面にもつ粒子による免疫応答誘導に関する報告は数多く存在しており、これらのいずれのリポソームも MNP への抗原送達は可能である。しかし OML のようにリポソーム単独では抗原提示細胞の活性化を誘導することはなく、ほとんどの場合 TLR リガンドなど別途アジュバントを活性化に必要とする。それに対して OML は単独で MNP への抗原送達と MNP の活性化、特に MNP からの IL-12 の産生を誘導できるところに最大の特徴がある。しかしその理由は明確ではなかった。研究代表者はその違いの原因として粒子サイズに着目した。微粒子キャリアの取り込みは、サイズや形状、受容体相互作用など、粒子のいくつかの特性に依存するが、200 nm 以下のナノ粒子が、投与後数時間以内にリンパドレナージを介して直接リンパ器官に到達することが示されているため、抗原提示細胞への抗原送達を目的としたリポソームの多くは 500 nm 以下の小さい粒子径を採用している。一方で研究代表者が使用している OML の粒子径は約 1000 nm であり、この粒子サイズの違いが糖鎖で被覆された粒子 (リポソーム) を投与した場合の応答の違いとなっている可能性が考えられた。MNP はエンドサイトーシスとファゴサイトーシス (貪食) という二つの異なる過程で外来性物質を細胞内に取り込む。ファゴサイトーシス (貪食) は一般的に 500 nm 以上のサイズを持つ大きな粒子をアクチンに依存して取り込む過程である。そのため、IL-12 の産生を誘導する OML はファゴサイトーシスで、そのほかのリポソームはエンドサイトーシスで取り込まれていると考えられ、IL-12 の産生誘導には糖鎖依存的なファゴサイトーシスが必要であるという仮説を立てた。本研究計画の目的は上記仮説を証明するため、OML による抗原特異的な Th1 応答誘導が OML の粒子サイズに依存しているのかを明らかにするとともに、MNP による糖鎖提示粒子の糖鎖依存的な貪食及びアクチンの再構成が MNP からの特定のサイトカイン (IL-12) の産生に必

須であることを示すことにあった。この目的を達成するために申請者は、糖鎖提示粒子として粒子サイズの異なる OML (200-1000 nm) 及び乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* の Intact cell wall (ICW) を用いて、MNP からの IL-12 の産生と粒子サイズとの関係及びアクチンの関与について検討した。

3. 研究方法

(1) OML の調製

粒子サイズ約 1000 nm の OML は常法に従い調製した。粒子サイズの異なる OML は約 1000 nm の OML を 800, 600, 400, 200 nm ポアサイズのフィルターを順次通すことで調整した。それぞれの OML の平均粒子サイズは 1080 ± 114 , 833 ± 39 , 692 ± 40 , 403 ± 27 , 210 ± 31 nm であった。

(2) ICW の調製

Intact cell wall (ICW) とは物理的・機械的に菌体を破壊することなく菌体の形状を保持した細胞壁を指す。乳酸菌の ICW の調整は以下のように行なった。乳酸菌の Heat-killed cell を 1% SDS, Pronase, Nuclease で順次複数回処理することで、脂質、タンパク質、核酸を可能な限り取り除き、その残渣すなわちペプチドグリカンとテイコ酸などの細胞壁多糖のみからなる細胞壁を ICW とした。透過電顕による観察により ICW は Heat-killed cell と同様に細菌の形状を保持していることを確認した。また、ICW をジルコニアビーズで破碎することで disrupted cell wall (DCW) を調製した。また ICW に対してさまざまな化学的処理を施すことで、特定の細胞壁多糖を欠損した ICW を調製した。

(3) MNP からの IL-12 の産生の検討

それぞれのサイズの OML を C57BL/6 マウス腹腔内に投与し 30 分後に腹腔内の常在性 MNP を回収した。細胞をプレートに播種し 24 時間後に培養上清を回収し、上清中の IL-12 を ELISA で測定した。ICW の場合には、C57BL/6 マウスの骨髄細胞より作成した Bone marrow-derived macrophage (BMM) (5×10^4 /mL) もしくは J774.1 細胞 (5×10^5 /mL) を 10 μ g/mL の ICW で刺激し 24 時間後の IL-12 の産生を測定した。

(4) OML による Th1 免疫誘導

抗原を封入した OML (抗原量 20 μ g/head) を C57BL/6 マウス腹腔内に 2 週間隔で 2 回免疫した。最終免疫より 1 週間後に脾臓細胞を調製し、抗原刺激した後、48 時間後の上清に分泌された IFN- γ を E ILSA で測定した。

(5) アクチン再構成の阻害

ファゴサイトーシスはアクチン依存性であるため、アクチンの融合阻害剤として cytochalasin Dy および latrunculin B をアクチンの脱重合阻害剤として jasplakinolide を、またクラスリン依存性のエンドサイトーシス阻害剤として chlorpromazine を用いた。これらの阻害剤で細胞を 30 分間処理した後、等差を提示した粒子 (OML または ICW) で刺激した。

4. 研究の成果

I. OML による抗原特異的な Th1 応答誘導における OML の粒子サイズの影響

(1) サイズの異なる OML による Th1 免疫誘導

粒子サイズがおよそ 1000, 800, 400, 200 nm である抗原封入 OML で免疫後、血清中の抗原特異的な IgG レベルを測定したところ、すべてのサイズの OML で免疫したマウスの血清中に十分な抗体価の IgG の生成が確認できた。一方、粒子サイズ 1000 nm および 800 nm の OML で免疫したマウスの脾臓細胞からは十分な量の抗原特異的な IFN- γ の分泌が確認されたが、粒子サイズ 400 nm の OML で免疫した

マウスの脾臓細胞からの IFN- γ の分泌量は前者に比べ著しく減少しており、粒子サイズ 200 nm の OML で免疫したマウスの脾臓細胞からの IFN- γ の分泌は認められなかった (Fig. 2)。さらに粒子サイズ 1000 nm および 800 nm の OML で免疫したマウス血清中においては抗原特異的な IgG2a が IgG1 より優勢であったが、400 nm の OML で免疫したマウス血清中の IgG2a と IgG1 の抗体価レベルはほぼ同じであった。以上のことから、OML は粒子サイズに関わらず液性免疫を誘導することができるが、粒子サイズが 400 nm より小さい OML では効果的な Th1 免疫応答を誘導することができないことが示された。

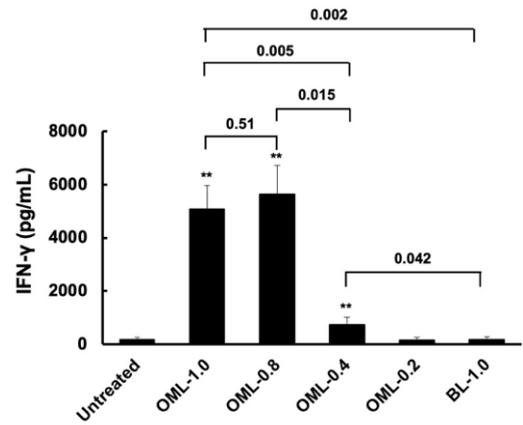


Fig. 2. 粒子サイズの異なるOMLによるTh1免疫誘導 OML-1.0は1000 nmのOML。BLは糖鎖を提示していないリポソーム。

(2) サイズの異なる OML による MNP からの IL-12 の産生

Th1 への分化には MNP から産生される IL-12 の介助が必要であるため、次にサイズの異なる OML による MNP からの IL-12 の産生を検討した。その結果、粒子サイズが 600 nm 以上の OML を取り込んだ常在性腹腔 MNP からは有意なレベルの IL-12 の産生が認められたが、400 nm 以下の OML を取り込んだ MNP からの IL-12 の産生は認められなかった (Fig. 3)。この結果は OML の粒子サイズ 500 nm 付近に MNP からの OML の IL-12 の産生能とそれに引き続く Th1 免疫応答誘導能の閾値が存在していることを示している。一般的に MNP は 500 nm 以上の粒子をアクチンに依存したファゴサイトーシスで取り込むとされているため、OML を糖鎖に依存したファゴサイトーシスによって取り込まれることが MNP からの IL-12 の産生に必要であると考えられた。実際に粒子サイズ 1000 nm による OML による MNP からの IL-12 の産生はアクチン重合阻害剤である cytochalasin D 処理によって著しく阻害された。

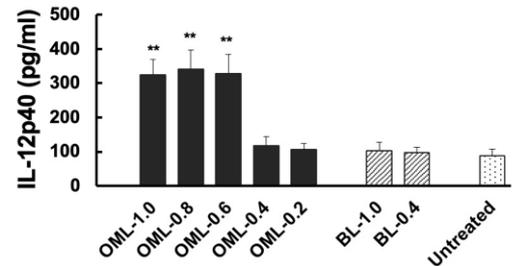


Fig. 3. 粒子サイズの異なるOMLによるMNPからのIL-12産生

以上の結果から、MNP からの IL-12 とそれに引き続く Th1 免疫応答誘導には MNP による 600 nm 以上の大きな粒子径を持つ OML のファゴサイトーシスが必須であり、OML の粒子サイズが免疫応答の方向性を決定する重要なファクターであることが明らかになった。

II. 乳酸菌 *Lactiplantibacillus plantarum* の Intact cell wall(ICW)の糖鎖依存的ファゴサイトーシスによる MNP からの IL-12 産生の検証

(1) *L. plantarum* の ICW は細胞壁テイコ酸依存的に MNP からの IL-12 の産生を誘導する：

上記の研究では、OML のファゴサイトーシスが MNP からの IL-12 の産生には必要であることを示した。この現象が OML に特徴的なものであるのか一般的な糖鎖提示粒子についても適応できるのかを検証するため、およそ 1000 nm の粒子サイズを持つ糖鎖提示粒子としてグラム陽性菌である乳酸菌の ICW を選択し、ICW によるマウス MNP からの IL-12 の産生誘導について検討した。さまざまな乳酸菌から細菌の形状を保持した ICW を調製し、IL-12 の産生誘導能を調べた結果、細胞壁テイコ酸(WTA)を発現している複数株の *L. plantarum* と *L. helveticus* の ICW に IL-12 の産生誘導能が認められた。しか

し WTA を発現していない *L. gasei*, *L. ferumentum*, *L. rhamnosus* の ICW には MNP からの IL-12 産生誘導能は認められなかった。また、過ヨウ素酸酸化もしくは HF 処理し細胞壁多糖をすべて除去した *L. plantarum* と *L. helveticus* の ICW では IL-12 産生誘導能が完全に消失したことから、ICW の IL-12 産生誘導能には細胞壁多糖が必須要素となっていることが判明した。そこで次に ICW の細胞壁多糖のうち WTA のみを選択的に除去、あるいは WTA のみを選択的に残した ICW を作成し、それぞれの IL-12 産生誘導能を検討したところ、WTA のみを除去した ICW では IL-12 産生誘導能が完全に消失したが、WTA のみを選択的に残した ICW ではその誘導能が完全に保持された。従って、*L. plantarum* と *L. helveticus* の ICW は ICW 上に提示されている WTA 依存的に MNP からの IL-12 の産生を誘導することが明らかになった。一方、TLR2 及び 4 の欠損マウスの骨髄由来マクロファージを用いた検討から TLR2/4 は ICW による IL-12 の産生誘導に関与していないことが明らかになった。

(2) *L. plantarum* の ICW は細胞壁テイコ酸依存的に MNP に素速く取り込まれる：

IL-12 産生誘導能を有する *L. plantarum* の ICW は MNP に 30 分程度で素早く取り込まれたが、IL-12 産生誘導能のない *L. gasei*, *L. ferumentum*, *L. rhamnosus* の ICW の取り込みは非常に低いレベルであった。また *L. plantarum* の ICW からテイコ酸を取り除くと取り込みのレベルは *L. gasei*, などの ICW と同程度に低下した。またアクチン重合阻害剤である cytochalasin D, latrunculin B 及びアクチンの脱重合阻害剤 jasplakinolide によって ICW の素速い取り込みと ICW による IL-12 産生誘導は著しく阻害された (Fig. 4)。このことから MNP による ICW 上の WTA の認識とそれに引き続く糖鎖認識依存的な ICW のファゴサイトーシス及びアクチンの再構成が ICW による MNP からの IL-12 産生誘導に必須となっていることが判明した。

(3) ICW の形状の破壊を伴う ICW による IL-12 誘導の喪失：

ジルコニアビーズで物理的に破壊された ICW (disrupted ICW; DCW) は全体的な形状が粒子状から繊維状に変化した (Fig. 4)。DCW は 30 分以内に ICW よりも効果的に MNP に取り込まれるが、DCW の HF 処理によりその取り込みが著しく減少したことから DCW は WTA 依存的に取り込まれていることが判明した。しかし DCW は MNP からの IL-12 誘導能を完全に消失していた (Fig. 4)。またこの時、DCW はアクチン非依存的な経路で細胞に取り込まれていた。しかし、DCW は ICW による MNP からの IL-12 の産生誘導を濃度依存的に阻害し、可溶性 WTA は、ICW による IL-12 分泌を部分的に阻害したことから、ICW と DCW は WTA を認識する細胞上の受容体または結合部位を共有していると考えられた。それにも関わらず DCW は IL-12 産生誘導能を喪失していることから、ICW 上の WTA だけでなく、ICW のサイズと形状が、MNP におけるアクチンの再構成とその後の IL-12 産生に影響を与えていると推察された。

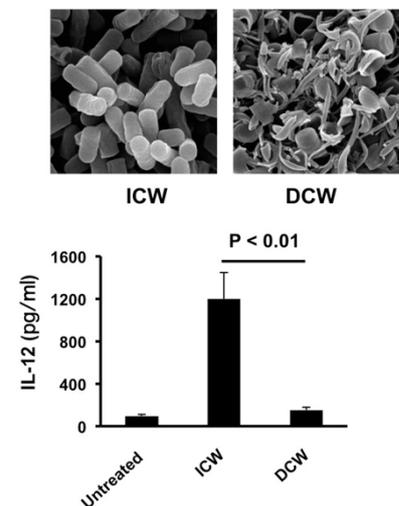


Fig. 4. ICWとDCWの透過電顕像 (上) とそれぞれのIL-12産生誘導能 (下)

以上の結果から、特定の大きさや形状を有した粒子上に提示されている糖鎖の密度と方向性を MNP が認識することで、免疫学的シナプスのような細胞上の molecular assembly 形成が促され、その molecular assembly がシグナル伝達とアクチンの再構成を引き起こすことで MNP からの IL-12 の産生が誘導されると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Matsuoka Yuko, Onohara Emi, Kojima Naoya, Kuroda Yasuhiro	4. 巻 99
2. 論文標題 Importance of particle size of oligomannose-coated liposomes for induction of Th1 immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 108068 ~ 108068
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2021.108068	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 Kojima Naoya, Kojima Shohei, Hosokawa Shin, Oda Yoshiki, Zenke Daisuke, Toura Yuta, Onohara Emi, Yokota Shin-ichi, Nagaoka Masato, Kuroda Yasuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Wall teichoic acid-dependent phagocytosis of intact cell walls of <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> elicits IL-12 secretion from macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.986396	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9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 細川 伸、小島匠平、横田伸一、小島直也、黒田泰弘
2. 発表標題 Lactobacillus plantarumの細胞壁テイコ酸に依存したファゴサイトーシスによるマクロファージの活性化
3. 学会等名 日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野原えみ、松岡祐子、小島直也、黒田泰弘
2. 発表標題 OMLによる細胞性免疫誘導には糖鎖依存的なファゴサイトーシスによるOMLの取り込みが必要である
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会、
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細川 伸、小島匠平、横田伸一、小島直也、黒田泰弘
2. 発表標題 Lactobacillus plantarumの細胞壁テイコ酸に依存したファゴサイトーシスによるマクロファージの活性化
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shin Hosokawa, Naoya Kojima
2. 発表標題 Induction of IL-12 from murine macrophages by intact particulate cell wall of Lactobacillus plantarum through cell wall teichoic acid-dependent phagocytosis
3. 学会等名 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoya Kojima, Yuko Matsuoka, Yasuhiro Kuroda
2. 発表標題 Carbohydrate dependent phagocytosis of oligomannose-coated liposomes induces IL-12 production from mononuclear phagocytes
3. 学会等名 16th International Meeting of Endotoxin and Innate Immunity Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野原えみ、石川智雪、松岡祐子、小島直也
2. 発表標題 オリゴマンノース被覆リポソーム (OML) による細胞生免疫誘導にはリポソーム粒子の大きさが重要である
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細川 伸、小島匠平、小島直也
2. 発表標題 Lacobacillus plantarum TUA5099Lのintact cell wallによるマクロファージの活性化
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoya Kojima, Yuta Toura, Emi Onohara, Shohei Kojima.
2. 発表標題 Recognition of cell wall teichoic acids displayed on intact cell walls of L. plantarum by murine macrophages leads to I-12 secretion
3. 学会等名 10th Annual meeting of the international cytokines and interferon society (Cytokine 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小島直也、横田伸一、長岡正人、小田慶喜、黒田康弘
2. 発表標題 L. plantarumのIntact cell wallによるマクロファージの活性化 細胞壁テイコ酸の役割
3. 学会等名 第41回日本糖質学会
4. 発表年 2022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
---------	---------