

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461186

研究課題名(和文) ナノ粒子によるクロスプレゼンテーション機構を利用した新規喘息ワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel vaccine therapy using nanoparticles and cross-presentation machinery

研究代表者

榎本 紀之(Enomoto, Noriyuki)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50436961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では気管支喘息における肺樹状細胞(DC)をアレルギー特異的に障害するCD8陽性T細胞(CTL)を誘導するため、抗原提示細胞のクロスプレゼンテーションを促進するナノ粒子である生分解性ポリマー(PLGA)を用いた。

リンパ球増殖試験では、PLGAによる卵白アルブミン(OVA)特異的なCTL増殖促進効果を認めた。次にOVA喘息モデルマウスにPLGA/OVAを経鼻投与したが、無治療群と比較しCTLの誘導と好酸球性気道炎症の改善は認められなかった。効率の良い抗原提示細胞への抗原の受け渡しとクロスプレゼンテーション促進のため、更にPLGA/OVAを修飾する必要があると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, nanoparticle, which consists of polylactic coglycolic acid (PLGA), was used to induce allergen specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL). PLGA facilitates the induction of CTL via cross-presentation machinery in antigen-presenting cells (APC), and these CTL can kill dendritic cell (DC) that plays a role in bronchial asthma.

We found PLGA efficiently induced ovalbumin (OVA)-specific CTL via antigen-presenting cells in vitro. Next, PLGA/OVA was intranasally administered to OVA-induced asthma model mice. PLGA/OVA reduced eosinophil number in bronchoalveolar lavage compared to that after treatment with OVA alone. However, PLGA/OVA could not significantly reduce eosinophil number or induce allergen-specific CTL compared to those of untreated mice. There is a possibility that more manipulation of PLGA/OVA is necessary to improve the delivery and phagocytosis of allergen in APC and to facilitate cross-presentation in vivo.

研究分野：細胞性免疫学

キーワード：気管支喘息 ワクチン療法 ナノ粒子 樹状細胞 細胞障害性T細胞

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は吸入ステロイド治療などにより疾患のコントロールは改善されてきているが、現在もなお世界中で 250,000 人/年の患者が死亡しており、とくに難治性気管支喘息に対する新たな治療法の開発が求められている。アレルギー性気道炎症では樹状細胞 (DC) が Th2 細胞 (CD4 陽性 T 細胞) を誘導し病態の中心的役割を担っており、有力な治療ターゲットとなりうる (*Nat Rev Immunol* 2003, *J Exp Med* 2005)。一方で、CD8 陽性 T 細胞 (細胞障害性 T 細胞: CTL) の役割はまだほとんど解明されていない。近年、CTL が抗原と MHC-class I 分子を介して DC を直接障害 (DC-killing) する興味あるネガティブフィードバック機構が発見された (*PNAS* 2006)。これは抗原蛋白由来の CTL エピトープ (抗原決定基) を MHC-class I 分子と共に発現した DC のみを選択的に killing するネガティブフィードバック機構である。我々はこの CTL のネガティブフィードバック機構を利用して喘息のワクチン療法の開発を行い、CTL がパーフォリン依存的な DC-killing により、アレルギー性気道炎症を強く抑制することを見出した (*Enomoto et al., J Immunol* 2012, *PLoSOne* 2012)。

しかし、我々の喘息ワクチンには臨床応用を考えた場合、大きな弱点が 2 つある。1 つは、*ex vivo* で培養した DC ワクチンを用いるため、患者由来の抗原提示細胞を採取し、増殖させる必要があり、非常に煩雑な作業となることである。もう 1 つは、アレルギーの CTL エピトープの添加が必要なため、効率よく DC-killing を誘導できる各種アレルギーの CTL エピトープ～アレルギー蛋白由来の 10 前後のアミノ酸から成る抗原決定基～を同定しなければならぬことである。これらの弱点を克服するために、我々はナノ粒子のクロスプレゼンテーション誘導能を利用した喘息ワクチンの開発に取り組むこととした。

一般的に抗原提示細胞が CTL を誘導するためには、内因性抗原が MHC-class I 分子と共に提示される必要があり、一方貪食された外来性抗原は MHC-class II 分子によって CD4 陽性 T 細胞に提示される。しかし、抗原提示細胞の中でも特に DC は特殊な抗原提示経路をもっており、外来性抗原を MHC-class I 分子とともに提示し、CTL を誘導すること (クロスプレゼンテーション) ができる。最近、生分解性ポリマー (Polylactic coglycolic acid: PLGA) を用いたナノ粒子を蛋白と共に生体へ投与することにより、両者が生体の DC に取り込まれ、DC のクロスプレゼンテーションを強く促進し CTL を効率よく誘導することが報告された (*PNAS* 2010, *J Immunol* 2011)。この PLGA と共にアレル

ゲン蛋白を経気道的に投与することによって、*ex vivo* で培養した抗原提示細胞を用いることなく、またアレルゲン蛋白の CTL エピトープを同定しなくとも、アレルゲン特異的 CTL を肺局所に効率よく誘導できる可能性がある。さらに、この CTL は、理論上、アレルゲン由来の CTL エピトープを MHC-class I 分子と共に発現し、喘息の病態に関与している肺 DC のみを選択的に killing するため過剰な免疫抑制は誘導しない。以上より、ナノ粒子 PLGA のクロスプレゼンテーション誘導能を利用し、DC をターゲットとした本治療法の研究は、新たな喘息のワクチン療法の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

アレルゲン蛋白と共にナノ粒子を経気道的に投与することによって、アレルゲン特異的 CTL を誘導し、喘息に対する新たなワクチン療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) による、PLGA 結合卵白アルブミン (PLGA/OVA) に対するクロスプレゼンテーションの評価 (*in vitro*): OVA 蛋白と PLGA 溶液を 37°C にて 1 時間混合あるいは double emulsion 法により PLGA 結合蛋白を作成する。Double emulsion 法では OVA と PLGA に methylene chloride と 2.5%W/V Polyvinyl alcohol (PVA) を混合し 16 時間攪拌した後に凍結乾燥する。BMDC は C57BL/6 マウスの骨髄から GM-CSF と IL-4 を用いて培養する。この BMDC に PLGA/OVA または比較として PLGA, OVA, PBS を添加し、OVA の dominant-CTL エピトープ (SIINFEKL) に特異的な CTL (OT-I 細胞) の増殖反応を比較する。

(2) OVA 誘導マウス喘息モデルにおける PLGA/OVA 投与後の好酸球性気道炎症の評価 (*in vivo*): OVA+Alm を 2 週間毎に C57BL/6 マウスの腹腔へ投与し、喘息モデルを作成する。Day25 に OVA を経鼻投与しアレルギー性気道炎症を増強し、3 日後に気管支肺泡洗浄 (BAL) を実施する。BAL 細胞分画は好酸球、好中球、CD4 陽性リンパ球、CD8 陽性リンパ球、マクロファージなどをフローサイトメトリーにより評価する。Day18 に、この喘息モデルへ PLGA/OVA, PLGA, OVA, PBS を経鼻投与しアレルギー性気道炎症の治療効果を確認する。

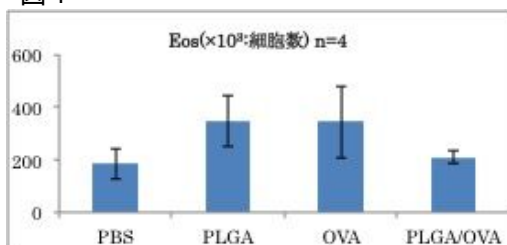
4. 研究成果

(1) マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) による、PLGA 結合卵白アルブミン (PLGA/OVA) に対するクロスプレゼンテーションの評価 (*in vitro*): PLGA/OVA を作成し、マウスの骨髄から培養・作成した BMDC と共培養した。さらに OVA の dominant-CTL エピトープ (SIINFEKL) に特異的な CTL (OT-I 細胞)

胞)と共培養し、CTLの増殖反応を比較した。有意ではないものの、OVA 単独と比較し PLGA/OVA でのOVA 特異的CTLの増殖促進効果が認められた。OVA 蛋白と PLGA 溶液の混合あるいは double emulsion 法により作成した PLGA/OVA も同様の結果であった。さらに、dominant-CTL エピトープである SIINFEKL ペプチドを用いて同様に PLGA 結合ペプチドを作成したが、明らかなクロスプレゼンテーションの増強効果は認められなかった。PLGA の粒子径の検討では 500nm, 1000nm, 2000nm を比較したが、CTL 増殖能の増強効果に相違は認められなかった。

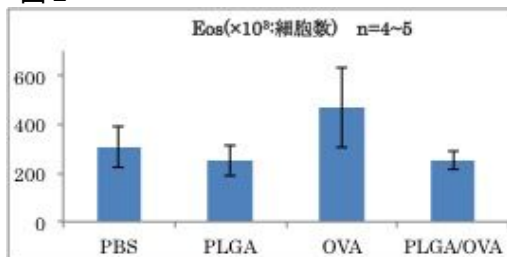
(2) OVA 誘導マウス喘息モデルにおける PLGA/OVA 投与後の好酸球性気道炎症の評価 (*in vivo*): OVA 誘導喘息モデルのマウス気道へ、OVA による発作誘発の 7 日前 (day18)に PLGA/OVA, PLGA, OVA または PBS などを経鼻投与し好酸球性気道炎症の治療効果を評価した。OVA 単独治療群と比較し PLGA/OVA 治療により BAL 好酸球分画は低下傾向を示したが、PBS 群(無治療群)と比較すると好酸球数はほぼ同等であった(図1)。

図 1



続いて OVA に含まれるエンドトキシンの影響を考慮し、エンドトキシンフリー OVA/PLGA を作成した。OVA による発作誘発 7 日前に喘息モデルマウスへ経鼻投与したが、同様の結果であった(図2)。

図 2



また、各群とも CD8 陽性 T 細胞数に相違は認められなかった。さらに OVA/PLGA などの経鼻投与を 2 回実施したところアレルギー性気道炎症は逆に増強してしまった。次に、dominant-CTL エピトープである SIINFEKL ペプチドを用いて同様に PLGA 結合ペプチドを作成し経鼻投与したが、明らかなアレルギー性気道炎症の治療効果は

認められなかった。

上記の様に、OVA 単独治療群と比較し PLGA/OVA 治療および PLGA/SIINFEKL 投与では BAL 好酸球分画は低下傾向を示したが、その治療効果は弱く不十分な結果であった。OVA 投与によるアレルギー性気道炎症の増強効果と相殺してしまったものと考えられた。また、*in vivo*では、PLGA 存在下での抗原提示細胞への抗原の受け渡しと取り込みに何らかの障害がある可能性もある。さらに、クロスプレゼンテーションの促進効果を増強するため、PLGA/OVA 比率の変更や Toll-like receptor agonist を添加するなど、作成法に更なる修飾が必要であると考えられた。

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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本紀之 (Enomoto, Noriyuki)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 50436961

(2) 研究分担者

須田隆文 (Suda, Takafumi)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号： 30291397

(3)連携研究者
()

研究者番号：