



Title	樹状細胞標的化ペプチドを用いたワクチン基盤の構築
Author(s)	松田, 鉄平
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92115
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (松 田 鉄 平)	
論文題名	樹状細胞標的化ペプチドを用いたワクチン基盤の構築
論文内容の要旨 (2500字程度)	
未だ猛威を振るい続けている新型コロナウイルス感染症の事例から、ワクチンの必要性が再認識されている。ワクチンには、従来から使用されている生ワクチンや不活化ワクチンだけでなく、病原体由来の蛋白質やペプチドを抗原として用いたサブユニットワクチンも汎用されている。しかし、蛋白質やペプチドをワクチン抗原として単独で投与しても、樹状細胞への抗原送達効率は乏しいことから、感染を防ぐのに十分な免疫応答を誘導することは困難である。そこでワクチン効果を向上させるため、アジュバントや抗原送達効率を改善出来る抗原送達キャリアを利用することで、効率的に免疫応答を誘導する戦略が重要視されている。抗原送達キャリアには、抗体やリボソームがあるが、これらキャリアは抗原の内封効率が低い微粒子が多いことや、製造工程が煩雑であること、また抗体は抗体自身の抗原性が課題として挙げられている。 本観点から私は、上記の抗原送達キャリアとしての問題点を克服するべく、微粒子や抗体に代わるキャリアとしてペプチドに注目した。ペプチドは、標的分子に特異的に結合することが出来るだけでなく、分子量が小さいことから、ペプチドに対する抗体は作られにくいことが知られている。そのため、抗体とは異なり、抗原特異的な抗体のみを誘導出来る安全なキャリアと考えられている。そこで、樹状細胞に強力に結合可能な新規ペプチドの同定を図った上で、取得したペプチドの抗原送達キャリアとしての有用性を評価した。その結果、樹状細胞に効率的に抗原を送達可能なDp1 (dendritic cell-targeting peptide 1) の取得に成功し、今後のワクチン開発に資する知見も取得するに至ったため、博士論文としてまとめた次第である。 まず、樹状細胞選択的に結合するペプチド (樹状細胞標的化ペプチド) を探索するため、ファージ表面提示法によるペプチドのスクリーニングを行った。その結果、数種類の樹状細胞選択的に結合するペプチドを同定することに成功し、取得したペプチドがC末端にR/K-X-X-R (R: アルギニン、K: リジン、X: 任意のアミノ酸) という特徴的なモチーフを有することを明らかとした。続いて、取得した樹状細胞標的化ペプチドの抗原送達キャリアとしての有用性を評価するため、Neutravidin (NA) をモデル抗原として用いて、R/K-X-X-Rモチーフを有するペプチドとの融合蛋白質を作製し、マウスに投与した。その結果、取得した樹状細胞標的化ペプチドの中でもDp1と名付けたペプチドとNAとの融合蛋白質免疫群で、NA特異的な抗体産生が顕著に上昇することが明らかとなった。したがって、Dp1は抗原送達キャリアとして有用であることが示唆された。 次に、Dp1の結合分子の探索を図った。これまでの報告で、Dp1を含めたR/K-X-X-Rモチーフを有するペプチドは、細胞表面のNeuropilin-1 (NRP-1) 蛋白質に結合することが知られている。そこでまず、取得したR/K-X-X-Rモチーフを有するペプチドが報告通り、NRP-1に結合するか評価した。その結果、R/K-X-X-Rモチーフを有するペプチドは全て、NRP-1に結合することが認められた。続いて、樹状細胞標的化ペプチドの樹状細胞への結合がNRP-1依存性であるか、抗NRP-1抗体を用いて評価した。その結果、Dp1以外の樹状細胞標的化ペプチドの結合性は、抗NRP-1抗体存在下で低下するのに対して、Dp1のみ、抗NRP-1抗体存在下でも樹状細胞への結合性に有意な変化が認められなかった。従って、Dp1は、NRP-1に結合し得るものの、樹状細胞への結合は、NRP1非依存性であると考えられた。 そこで、Dp1のNRP-1以外の結合分子を探索した。まずDp1をビーズに固定し、ペプチドに結合する細胞膜タンパク質を解析したところ、ヌクレオリン (NCL) 蛋白質が同定された。そこで、Dp1の樹状細胞への結合がNCL依存性であるか、NCLに対するDNAアプタマーを用いて評価した。その結果、NCLに対するDNAアプタマーの存在下で、Dp1の樹状細胞への結合性は、有意に低下することが明らかとなった。したがって、Dp1は、NCL依存的に樹状細胞に結合することで効率的に抗原送達することが認められた。 続いて、Dp1が感染症ワクチンにおける抗原送達キャリアとして有用か評価するため、肺炎球菌表層蛋白質 (PspA) を抗原として用いて、Dp1とPspAの融合蛋白質を作製し、マウスに免疫することで、PspA特異的な抗体価が	

上昇するか評価した。その結果、PspA単独群では抗体価の上昇は認められなかった一方で、Dp1とPspAの融合蛋白質免疫群ではアジュバントを用いなくとも、PspAとアジュバントを併用した群と同等程度のPspA特異的抗体価が確認された。さらに免疫後、肺炎球菌を感染させ、体重変化および生存率を評価したところ、PspA単独群では、急激な体重減少と生存率の低下が観察され、感染防御は認められなかった。一方で、PspAとアジュバント共免疫群では、一時的な体重減少は認められたものの、感染数日後には、体重の回復がみられ、肺炎球菌への感染防御効果が観察された。さらに、Dp1とPspAの融合蛋白質免疫群では、アジュバントを用いなくとも、PspAとアジュバント共免疫群と同等の感染防御効果を示した。以上の結果より、Dp1はアジュバント非存在下でも、ワクチン効果を飛躍的に向上可能であることが示された。

さらに、Dp1によって抗原特異的なCD8陽性T細胞の誘導能を向上出来るか検証するため、OVA由来のMHCクラス I エピトープペプチドにDp1を融合し、マウスに免疫した後、抗原特異的CD8陽性T細胞の誘導を評価した。その結果、Dp1融合ペプチド単独でも、抗原特異的なCD8陽性T細胞が誘導され、さらに、アジュバントとの共免疫で、より強力にCD8陽性T細胞を誘導可能であることが認められた。さらにDp1によって誘導が増強されたCD8陽性T細胞は、抗腫瘍効果をもたらすことが明らかとなり、Dp1は細胞性免疫も誘導可能であることが示された。

以上、本研究ではファージ表面提示法によって同定したDp1が、樹状細胞に効率的に抗原を送達することの出来るワクチン抗原送達キャリアであることを示した。またDp1は、液性免疫および細胞性免疫の両方ともを誘導することの出来るキャリアであることを明らかとした。さらに、Dp1は細胞表面に発現するNCLを介して抗原を送達することが認められており、今後のワクチン開発において、NCLがワクチンターゲットとして非常に重要な蛋白質となることが推察される。将来的に本研究が、感染症ワクチンの開発に向けた基盤情報となり得るものと期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (松 田 鉄 平)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	吉岡 靖雄
	副 査	教授	近藤 昌夫
	副 査	准教授	武村 直紀

論文審査の結果の要旨

ワクチンには、従来から使用されている生ワクチンや不活化ワクチンだけでなく、病原体由来の蛋白質やペプチドを抗原として用いたサブユニットワクチンも汎用されている。しかし、蛋白質やペプチドをワクチン抗原として単独で投与しても、樹状細胞への抗原送達効率は乏しいことから、感染を防ぐのに十分な免疫応答を誘導することは困難である。そこでワクチン効果を向上させるため、アジュバントや抗原送達効率を改善出来る抗原送達キャリアを利用することで、効率的に免疫応答を誘導する戦略が重要視されている。抗原送達キャリアには、抗体やリポソームがあるが、これらキャリアは抗原の内封効率が低い微粒子が多いことや、製造工程が煩雑であること、また抗体は抗体自身の抗原性が課題として挙げられている。本観点から申請者は、上記の抗原送達キャリアとしての問題点を克服するべく、微粒子や抗体に代わるキャリアとしてペプチドに注目し、樹状細胞に強力に結合可能な新規ペプチドの同定を図った上で、取得したペプチドの抗原送達キャリアとしての有用性を評価した。

その結果、以下の結論を得た。

1. ファージ表面提示法により、樹状細胞選択的に結合するペプチドを同定することに成功し、得られたペプチドの中でもDp1ペプチドが、ワクチン効果を増強出来る。
2. Dp1ペプチドはヌクレオリン依存的に結合することで、免疫応答を誘導する。
3. Dp1ペプチドを肺炎球菌由来のPspAと融合させることで、PspA特異的な抗体産生を増強し、肺炎球菌の感染を防御することが出来る。
4. Dp1ペプチドをMHCクラスIエピトープペプチドと融合することで、抗原特異的なCD8⁺細胞T細胞の誘導を促進することが出来る。

以上、本論文の成果は、新規ワクチン開発に向けた新たな概念を提供するものであり、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。