



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

2022 年度（令和 4 年度）博士論文

樹状細胞標的化ペプチドを用いた ワクチン基盤の構築

大阪大学大学院薬学研究科 医療薬学専攻

創薬ナノデザイン学分野

博士課程 松田鉄平

目次

略語一覧	2
緒論	3
本論	
第一節 樹状細胞標的化ペプチドの取得と免疫応答メカニズム	5
第二節 Dp1 ペプチドを用いたワクチン開発	29
第三節 Dp1 ペプチドを用いた抗原特異的 CD8 ⁺ T 細胞の活性化誘導	59
結論	69
謝辞	70
参考文献	71

略語一覽

alum	• • •	aluminium hydroxide gel
ADCC	• • •	antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADCP	• • •	antibody-dependent cellular phagocytosis
BSA	• • •	bovine serum albumin
BMDC	• • •	bone marrow-derived dendritic cell
cDC	• • •	conventional dendritic cell
cfu	• • •	colony forming unit
Dp	• • •	dendritic cell-targeting peptide
DMSO	• • •	dimethyl sulfoxide
ELISA	• • •	enzyme-linked immunosorbent assay
IFN	• • •	interferon
IPTG	• • •	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
Ig	• • •	immunoglobulin
IL	• • •	interleukin
mDC	• • •	migratory dendritic cell
NA	• • •	neutravidin
NCL	• • •	nucleolin
NLR	• • •	nod-like receptor
NRP	• • •	neuropilin
OVA	• • •	ovalbumin
pfu	• • •	plaque forming unit
PspA	• • •	pneumococcal surface protein A
SDS-PAGE	• • •	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	• • •	small interfering RNA
TLR	• • •	toll-like receptor

緒論

2019 年、中国の武漢市から流行が始まった新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、2022 年 11 月現在も未だ猛威を振るい続けている。流行から約 3 年で、世界中で新型コロナウイルスに罹患した患者数は 6 億人超、死者数は 600 万人以上にも及び、改めて感染症の恐ろしさを世界中に知れ渡らせることとなった。しかし、ファイザーやモデルナ社による mRNA ワクチンをはじめとした様々なワクチンの迅速な開発や普及により、重症者の数は減少傾向にある¹。

ワクチンは、1798 年にエドワード・ジェンナーが牛痘を用い、天然痘に対するワクチンを開発したのが始まりであり、パンデミックを引き起こしていた天然痘を撲滅できたのも、ワクチンの功績である²。これを契機に、病原体を弱毒化した生ワクチンや、ホルマリンなどで不活化処理した不活化ワクチンが盛んに研究されることになった。特に不活化ワクチンは、不活化したウイルスを精製した不活化全粒子ワクチンや、副反応の原因となる脂質膜成分を取り除いたスプリットワクチン、抗原性を有する病原体由来成分からなるサブユニットワクチン、細菌性の毒素を不活化したトキソイドワクチンなど、多岐に渡っている³。一方で、スプリットワクチンやサブユニットワクチンなどは、安全性が高い反面、細胞性免疫誘導能が低いものや、感染防御に必要な抗体を十分に誘導できないものも存在する。

一般に抗原は、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に取り込まれた後、B 細胞や T 細胞による獲得免疫を誘導する。抗原提示細胞の中でも樹状細胞は、抗原提示効率に優れ、効率的に獲得免疫を誘導し得る^{4,5}。そこで、免疫応答の増強を目的に、樹状細胞を活性化し得る免疫活性化剤 (アジュバント) が使用されている³。アジュバントは、toll-like receptor (TLR) や nod-like receptor (NLR) などの自然免疫の活性化に寄与するものや、投与部位での抗原の徐放化 (depot 効果) によって、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞を活性化するものがある⁶。代表例として、現行のワクチンにも使用されている水酸化アルミニウムや、欧米で承認された B 型肝炎ワクチンに使用される CpG 核酸が挙げられる⁷⁻⁹。

さらに、アジュバントの他にも、樹状細胞への抗原送達効率を改善することで、ワクチン効果を向上させる戦略も重要視されている。一般的に、蛋白質抗原やペプチド抗原を投与しても、リンパ節への移行性が乏しいことから、樹状細胞に効率的に抗原を送達することは困難とされている。そのため、抗原を樹状細胞に効率的に送達し得る抗原送達キャリアの開発が精力的に進められている。抗原送達キャリアとして、微粒子や抗体などが汎用されており、ワクチン効果の増強により、抗原量やアジュバント量の削減に繋がる可能性もある。微粒子

キャリアとしては、脂質二重膜からなるリポソームや、生分解性ポリマーからなる微粒子が汎用されており、抗原を内封することで、樹状細胞に効率的に抗原を送達し、ワクチン効果を増強可能であることが示されている¹⁰⁻¹²。一方で、抗原の内封効率が低い微粒子が多いことや、製造工程が煩雑になるなどの課題も生じている。また、樹状細胞に高発現する膜蛋白質に対する抗体を抗原と結合させ、抗原を樹状細胞に送達する試みもなされている¹³。しかし、抗体を用いた抗原送達の課題の一つに、抗体自体の抗原性が挙げられる。例えば、ヒト化抗体治療薬の trastuzumab を投与した際に、trastuzumab に対する抗体が誘導されることが報告されている¹⁴。

上記の抗原送達キャリアの問題点を克服すべく、微粒子や抗体に代わるキャリアとしてペプチドに注目が集まっている。ペプチドは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く、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る。例えば、Gou らは、樹状細胞に発現する Clec9a 特異的に結合するペプチドの開発に成功しており、同定したペプチドと抗原ペプチドの融合体をマウスに投与することで、抗原特異的な CD8⁺ T 細胞を効率的に誘導出来ることを示している¹⁵。一方で、既存のペプチドは、抗体と比較して標的分子に対する結合力が極めて低く、効果の面では抗体に及ばない。したがって、実用化に向けてはさらなるペプチドの探索が必要となっている。

そこで私は、感染症ワクチンの最適化を最終目標に、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うえで、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 ペプチドの取得に成功し、抗原と Dp1 を融合することで、優れたワクチン効果をもたらすことが確認された。また、Dp1 ペプチドの免疫誘導メカニズムの解析により、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。

本論

第一節 樹状細胞標的化ペプチドの取得と免疫応答メカニズム

古くから新規機能性ペプチドの同定に用いられてきた手法の一つに、ファージ表面提示法がある^{16,17}。ファージ表面提示法は、G. Smith らによって開発された手法で、細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージの表面に、膨大な種類のペプチドや蛋白質を提示する技術である¹⁸。本技術を用いることで、特定の蛋白質に選択的に結合するペプチドのみならず、特定の細胞特異的に結合可能なペプチドも同定可能となる¹⁹⁻²¹。例えば Ruoslati らは、ファージ表面提示法により、がん細胞やがん血管内皮細胞特異的に結合する新規ペプチドを多数同定している²²。

そこで本研究では、ファージ表面提示法を用いることで、樹状細胞特異的に結合し得る樹状細胞標的化ペプチドの同定を試みた。まず初めに、樹状細胞特異的に発現することが知られている膜蛋白質に対するペプチドを同定することを考えた。例えば、DEC205 などは樹状細胞に高発現していることから、抗原送達の標的として盛んに研究されており、抗 DEC205 抗体を抗原に結合させることで、ワクチン効果を高めることが知られている²³。一方で、抗原送達の標的として認識されていない蛋白質に対するペプチドを同定したほうが、興味深い知見を得られると考えた。そこで、特定の蛋白質ではなく、樹状細胞に結合するペプチドを同定したうえで、その後、ペプチドの標的蛋白質を同定することとした。本研究戦略により、優れた樹状細胞標的化ペプチドを得るだけでなく、抗原送達の新たな標的蛋白質に関する知見をも提供可能になると考えられる。

【実験材料と方法】

試薬

ペニシリン-ストレプトマイシン溶液は、富士フイルム和光純薬株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。Human Fms-related tyrosine kinase 3 ligand は Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Germany) より購入した。BL21 Competent E. coli は New England Biolabs (Ipswich MA, USA) より購入した。LB Agar, Lennox は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) より購入した。Recombinant mouse neuropilin-1 (NRP-1) protein、Anti-NRP-1 ポリクローナル抗体、Normal Goat immunoglobulin G (IgG) Control 抗体は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) より購入した。Liberase TL、DNaseI は Roche (Basel, Switzerland) より購入した。pET11a ベクター、Dimethyl sulfoxide、T7 Tail Fiber モノクローナル抗体、Horseradish peroxidase goat anti-mouse IgG、neutravidin (NA) は Merck Millipore (Darmstadt, Germany) より購入した。Biotin 化 anti-mouse IgG2a (clone: RMG2a-62)、Mouse IgG1 isotype control 抗体 (clone: MOPC-21)、anti-CD16/CD32 抗体 (clone: 93)、PerCP/Cy5.5 anti-CD11c 抗体 (clone: N418)、APC/Cy7 anti-CD11c 抗体 (clone: N418)、BV421 anti-I-A/I-E 抗体 (clone: M5/114.15.2)、BV421 anti-NRP-1 抗体 (clone: 3E12)、BV785 anti-CD11b 抗体 (clone: M1/70)、PE/Cy7 anti-C45R/B220 抗体 (clone: RA3-6B2)、APC anti-PDCA1 抗体 (clone: 927)、Alexa Fluor 700 anti-CD19 抗体 (clone: 6D5) PE-Streptavidin、7-AAD Viability Staining Solution は Biolegend (San Diego, CA, USA) より購入した。Fixable Viability Dye eFluor™ 780、biotin 化 Y-ae モノクローナル抗体は eBioscience (San Diego, CA, USA) より購入した。aluminium hydroxide gel (alum) は Invivogen (San Diego, CA, USA) より購入した。CpG 核酸 (5'-atcgactctcgagcgttctc-3') は GeneDesign (Osaka, Japan) より購入した。Anti-nucleolin モノクローナル抗体 (clone: MS-3) は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。抗ヌクレオリン核酸アプタマーである AS1411 (5'-tttggtggtggtggttggtggtggtggtg-3')、biotin 化 AS1411、AS1411 のコントロール核酸である CRO (5'-tttctctctctctcttctctctctctctct-3')、biotin 化 CRO は Hokkaido System Science (Hokkaido, Japan) で合成して頂いた。ファージライブラリは、Dr. Erkki Ruoslati (Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA, USA) より分与して頂いた。

実験動物

6～7 週齢の C57BL6/J マウス (雄性) は、日本エスエルシー (Shizuoka, Japan) より

購入した。マウスは室温で 12 時間ごとの点灯、消灯のサイクルで飼育した。全ての動物実験は、大阪大学微生物病研究所の動物実験施設で行い、大阪大学動物実験規定に準じた。

ペプチド

N 末端ビオチン化ペプチドはスクラム株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。購入したペプチドの配列は Table 1 に記載した。

Table 1. List of purchased peptide sequences.

Name	Modification	Linker	Peptide
Biotin-Dp1	Biotin	-	Dp1 (VSYKAIR)
Biotin-Dp2	Biotin	-	Dp2 (GGSKPVR)
Biotin-Dp3	Biotin	-	Dp3 (ASARGPR)
Biotin-Dp4	Biotin	-	Dp4 (IGSRPIR)
Biotin-Dp5	Biotin	-	Dp5 (VSSRPAR)
Biotin-Dp6	Biotin	-	Dp6 (GSAKMSR)
Biotin-Dp7	Biotin	-	Dp7 (PVGRSVR)
Biotin-Dp8	Biotin	-	Dp8 (NGVKQAR)
Biotin-Dp9	Biotin	-	Dp9 (GLGKGLR)
Biotin-Dp10	Biotin	-	Dp10 (GDSRNAR)
Biotin-Dp11	Biotin	-	Dp11 (MRVKEMR)
Biotin-Dp12	Biotin	-	Dp12 (SPDRLPR)
Biotin-Dp13	Biotin	-	Dp13 (GTSHRLR)

The sequence of the acquired dendritic cell-targeting peptide fused with biotin is shown.

細胞培養

マウスリンパ腫由来 EL4 細胞および悪性黒色腫由来の B16-F10 細胞は、American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。EL4 細胞および B16-F10 細胞の培養には、10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む DMEM 培地を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。DC2.4 細胞は Dr. KL Rock (Department of Pathology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA) より分与して頂いた。DC2.4 細胞の培養には、10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、1% 非必須アミノ酸溶液、10 mM HEPES、2-mercaptoethanol を含む RPMI1640 培地を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。CAL-1 細胞は Dr. Takahiro Maeda (Nagasaki University, Nagasaki, Japan) より分与して頂いた。CAL-1 細胞の培養には、10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、1% 非必須アミノ酸溶液、10 mM HEPES、1 mM ピルビン酸ナトリウム溶液を含む RPMI1640 培地を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

骨髓由来樹状細胞の誘導

マウスの両脚の大腿骨および脛骨を 0.5% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む RPMI1640 培地に回収し、両骨端を切除した。その後、5 mL シリンジ (Terumo Corporation, Tokyo, Japan) と 25 G 注射針 (Terumo Corporation) を用い、0.5% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む RPMI1640 培地を片脚にそれぞれ、5 mL ずつ、計 2 回髓腔に流し、骨髓細胞を回収した。回収した骨髓細胞を注射器のプランジャーを用いてすり潰した後、70 μ m セルストレーナー (Corning Inc., NY, USA) に細胞液を通すことで凝集物を取り除き、50 mL 遠沈管 (Corning Inc.) に回収した。600 \times g、4°C、5 分遠心後、上清を捨て、ACK lysis buffer (0.1 mM EDTA-2Na 二水和物、10 mM KHCO₃、150 mM NH₄Cl 溶解水) を 5 mL 添加し、室温に 5 分静置し溶血させた。その後、10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む RPMI1640 培地を 5 mL 加えることで溶血反応を止め、600 \times g、4°C、5 分遠心した。上清を取り除いた後、10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む RPMI1640 培地を 10 mL 加え、細胞を懸濁した。6 well plate (Corning Inc.) に細胞液を 5 mL 加えた後、human Fms-related tyrosine kinase 3 ligand を終濃度 100 ng/mL になるように添加し、7 日間、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

ファージタイターチェック

大腸菌 BL21 株を LB 培地で 37°C、200 r/min で振盪培養した。大腸菌培養液の OD₆₀₀ を microplate reader (Power Wave HT, BioTek, Winooski, VT, USA) で測定し、1.0 となった時点で振盪を止め、氷上で冷却し、増殖を止めた。LB 培地でファージ溶液を原液から 10 倍ずつ段階希釈した。希釈したファージ溶液 20 μ L に OD₆₀₀ が 1.0 となった大腸菌 BL21 株溶液 (以下、大腸菌液と記載) を 200 μ L 混和し、50°C 程度に温めておいた LB Agar を 5 mL 添加後、100 mm non-treated dish (AGC TECHNO GLASS CO., LTD., Shizuoka, Japan) に播種し、37°C で 2 時間静置した。その後、ファージによる大腸菌溶液のプラーク数を測定し、plaque forming unit (pfu) を算出した。

ファージの単クローン化

OD₆₀₀ が 1.0 となった大腸菌液を LB 培地で 5 倍希釈し、15 mL 遠沈管 (Corning Inc.) に 2 mL 分取した。タイターチェックに用いたプレートから、爪楊枝で単一のプラークを採取し、15 mL 遠沈管に入れ、37°C、200 r/min で 90 分浸透し、溶菌させた。その後、8000 \times g、4°C、10 分遠心し、上清を回収し、単クローンファージを取得した。

ファージ表面提示法による樹状細胞標的化ペプチドの同定

ファージライブラリ、EL4 細胞および B16-F10 細胞をそれぞれ 2 w/v% スキムミルク添加 PBS 中で、25°C で 1 時間、緩やかに振盪しながらブロッキングした。続いて、ブロッキングしたファージライブラリと 1×10^8 EL4 細胞を混和し、25°C で 1 時間、緩やかに振盪した。600 × g、5 分遠心後、上清を回収し、ブロッキングした 1×10^6 B16-F10 細胞と混和し、さらに 25°C で 1 時間、緩やかに振盪した。600 × g、5 分遠心後、上清を回収し、これをインプット用ファージとした。また、一部のインプット用ファージを用いて、上記に従いタイターチェックし、添加したファージ量 (pfu (in)) を算出した。続いて、骨髓由来樹状細胞 (bone marrow-derived dendritic cell、以下 BMDC) は、誘導してから 7 日後に上清を吸引し、PBS を 2 mL 添加しウェルを洗浄した。その後、2 w/v% スキムミルク添加 PBS を 5 mL 添加し、4°C で 1 時間静置することで、BMDC をブロッキングした。1 時間後、BMDC のブロッキング液を除き、そこにインプット用ファージ 500 μ L と 2 w/v% スキムミルク添加 PBS を 500 μ L 添加し、4°C で 1 時間静置することで、ファージと BMDC を結合させた。1 時間後、ファージ液を除き、PBS を 3 mL 添加して吸引する洗浄操作を 10 回繰り返した。洗浄後、1 v/v% Nonidet P-40 添加 PBS を 500 μ L 添加し、ピペッティングにより、ファージを 50 mL 遠沈管に回収した。その後、10 秒間ボルテックスを行い、細胞を溶解し、LB 培地を 5 mL 添加した。再度、10 秒間ボルテックスし、これをアウトプット用ファージとした。アウトプット用ファージのファージタイターは、上記に従いタイターチェックし、樹状細胞に結合したファージ量 (pfu (out)) を算出した。残りのアウトプット用ファージ溶液に、OD₆₀₀ が 1.0 となった大腸菌液 2 mL と LB 培地を 16 mL 添加し、37°C、200 r/min で 90 分振盪し溶菌した後、8000 × g、4°C、10 分遠心し、上清を回収した。増幅したファージは、再度 EL4 細胞に加え、上記の操作をさらに 2 度繰り返した。

BMDC に対するファージクローンの結合性評価

誘導した樹状細胞は、培養しているメディウムを全て 50 mL 遠沈管に回収後、シャーレに PBS を 5 mL 加えて回収した。さらに、0.5 mM EDTA-PBS を 5 mL 添加し、5 分、37°C で静置した後、10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、1% 非必須アミノ酸溶液、10 mM HEPES、2-mercaptoethanol を含む RPMI1640 培地を 5 mL 加えてピペッティングし、接着した細胞を剥がし回収した。回収した細胞は 600 × g、4°C、5 分遠心し、 1×10^5 cells/well となるよう 96 well U-bottomed culture plate (Nunc、Roskilde、

Denmark) に播種した。続いて、600 × g、4℃、5 分遠心し、上清を吸引後、10 w/v% スkimミルク添加 PBS をウェルに添加し、懸濁後、4℃、60 分静置しブロッキングした。同時に、400 μL のファージ溶液に 100 μL の 10 w/v% スkimミルク添加 PBS を加え、4℃、40 分静置し、ブロッキングした。ブロッキングした細胞は、600 × g、4℃、5 分遠心し、上清を廃棄後、ブロッキングしたファージをウェルに 200 μL 添加し、ピペッティング後、4℃、60 分静置し、細胞に結合させた。その後、1% bovine serum albumin (BSA) /PBS で洗浄操作を 3 回行い、anti-CD16/CD32 抗体を終濃度 3 μg/mL となるよう 1% BSA/PBS で調整し、40 μL/well で添加し、4℃、30 分静置した。続いて、T7 Tail Fiber モノクローナル抗体を終濃度 0.1 μg/mL になるよう 1% BSA/PBS で調整し、40 μL/well で添加し、4℃、30 分静置した。その後、1% BSA/PBS で 1 度洗浄し、Biotin 化 anti-mouse IgG2a を 1% BSA/PBS で 1 μg/mL となるよう調整し、40 μL/well で添加し、4℃、20 分静置した。20 分後、1% BSA/PBS による洗浄操作を 1 回行い、APC/Cy7 anti-CD11c 抗体を終濃度 10 μg/mL、BV785 anti-CD11b 抗体を終濃度 2 μg/mL、PE/Cy7 anti-CD45R/B220 抗体を終濃度 2.5 μg/mL、PE-Streptavidin を終濃度 0.25 μg/mL となるよう 1% BSA/PBS で調整し、40 μL/well で添加し、遮光条件下で 4℃、20 分静置した。その後、1% BSA/PBS で 2 回洗浄し、7-AAD Viability Staining Solution を 1 v/v% で添加した 1% BSA/PBS を 100 μL/well で添加、懸濁しフローサイトメーター (NovoCyte Flow Cytometer、ACEA Biosciences、San Diego、CA、USA) を用いて解析した。

BMDC に対するペプチドの結合性評価

ファージクローンの結合評価と同様の手順で、細胞を回収し、 1×10^5 cells/well となるよう 96 well U-bottomed culture plate に播種した。600 × g、4℃、5 分遠心し、上清を廃棄後、anti-CD16/CD32 抗体を終濃度 10 μg/mL となるよう 1% BSA/PBS で調整し、50 μL/well で添加した。4℃、20 分静置した後、600 × g、4℃、5 分遠心し、上清を廃棄した。次に、dimethyl sulfoxide (DMSO) で 10 mg/mL に溶解したビオチン化ペプチドを 50 μg/mL となるよう 1% BSA/PBS で調整し、100 μL/well で添加し、4℃、30 分静置した。30 分後、1% BSA/PBS で 2 回洗浄し、APC anti-PDCA1 抗体を終濃度 0.6 μg/mL、APC/Cy7 anti-CD11c 抗体を終濃度 10 μg/mL、BV785 anti-CD11b 抗体を終濃度 8 μg/mL、PE-Streptavidin を終濃度 0.25 μg/mL となるよう 1% BSA/PBS で調整し、50 μL/well で添加した。遮光条件下で 4℃、30 分静置した後、1% BSA/PBS で 2 回洗浄し、7-AAD Viability Staining Solution を 1 v/v% で添加した 1% BSA/PBS を 100 μL/well で添加、懸濁しフローサイトメーターを用いて解析した。

ビオチン化樹状細胞標的化ペプチド融合 NA の作製

NA は 1 mg/mL となるよう水に溶解し、NA 水溶液に対して、1 mg/mL となるよう 10 w/v% DMSO に溶解したビオチン化樹状細胞標的化ペプチドを 166 μ L 添加した（モル比で NA: ビオチン化樹状細胞標的化ペプチドが 1: 100 となるよう添加）。混和後、室温で 1 時間静置した。その後、PBS を 350 μ L 添加し、Amicon Ultracentrifugal filters (cut-off、10 kDa、Merk Millipore) に添加し、8000 \times g、4°C、8 分遠心した。遠心後、フロースルーを捨て、350 μ L の PBS を添加し、ピペティング後、8000 \times g、4°C、8 分遠心した。PBS による洗浄をさらに 5 回繰り返した後、8000 \times g、4°C、8 分遠心し、液量 100 μ L で回収した。ペプチド未修飾の NA については、10 v/v% DMSO 水溶液を用いて、同様に室温静置後、限外ろ過操作を行い、最終液量 100 μ L で回収した。

ビオチン化ペプチド融合 NA の投与

0、10 日目に、マウスに、樹状細胞標的化ペプチド融合 NA または未修飾 NA を 5 μ g/mouse で単独投与、または alum (250 μ g/mouse) および CpG 核酸 (10 μ g/mouse) と共投与した。投与試料は、生理食塩水 (Otsuka Pharmaceuticals Factory、Inc.、Tokushima、Japan) で調整し、尾根部皮下より、50 μ L/mouse でマイジェクターを用いて投与した。17 日目に眼底より採血し、血漿中 NA 特異的抗体価を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により評価した。

ELISA

NA をカルボネートバッファー (0.1 M Sodium Carbonate、0.1 M Sodium Hydrogen Carbonate 水溶液) で 1 μ g/mL に希釈し、96 well half area microplate (Corning Inc.) に添加し、4°Cで一晩静置し固相化した。固相化したプレートに PBST (0.05% Tween 20 添加 PBS) で洗浄後、4% ブロックエース (DS Pharma Biomedical、Osaka、Japan) を添加し、2 時間室温で静置し、ブロッキングした。次に、プレートを PBST で洗浄後、1 % ブロックエースで希釈した血漿サンプルをブロッキングしたプレートに添加し、2 時間室温で静置した。2 時間後、プレートを PBST で洗浄し、1 % ブロックエースで 5000 倍希釈した horseradish-peroxidase goat anti-mouse IgG を添加し、1 時間室温で静置した。プレートを PBST で洗浄後、終濃度 0.8 mM の tetramethyl benzidine を用いて発色させ、2N H₂SO₄ により発色反応を停止後、microplate reader を用いて OD₄₅₀₋₅₇₀ を測定した。

樹状細胞標的化ペプチドのニューロピリン-1 (NRP-1) 蛋白質への結合性評価

White OptiPlate-96 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) にカルボネートバッファーで 10 µg/mL に希釈した NRP-1 を 50 µL/well で添加し、4°C で一晩静置し固相化した。PBST でプレートを洗浄後、1% BSA/PBS を 200 µL/well で添加し、室温で 1 時間静置しブロッキングした。次に、PBST でプレートを洗浄後、ビオチン化樹状細胞標的化ペプチドを終濃度 10 µg/mL になるよう 1% BSA/PBS で調整し、50 µL/well で添加した後、室温で 2 時間静置した。続いて、PE-Streptavidin を終濃度 10 µg/mL になるよう 1% BSA/PBS で調整し、50 µL/well で添加した後、遮光条件下で室温、1 時間静置した。PBST でプレートを洗浄後、1% BSA/PBS を 100 µL/well で添加し、multi-plate reader (DS Pharma Biomedical) を用いて蛍光を測定した。

樹状細胞標的化ペプチドの結合阻害評価

培養している DC2.4 細胞、CAL-1 細胞、BMDC を回収し、96 well U-bottomed culture plate に 1×10^5 cells/well になるように全量 100 µL/well で播種した。600 × g、4°C、5 分遠心後、上清を捨て、終濃度 18 µg/mL anti-NRP1 抗体あるいは 18 µg/mL isotype 抗体、10 µM AS1411、10 µM CRO、25 µg/mL MS-3 抗体、25 µg/mL isotype 抗体となるよう調整した 1% BSA/PBS を 18 µL/well で添加し、遮光条件下で、4°C、30 分静置した。続いて、終濃度 10、50 あるいは 250 µg/mL ビオチン化樹状細胞標的化ペプチドとなるように 2 µL/well で添加しピペッティングした。4°C、30 分静置した後、600 × g、4°C、5 分遠心後、上清を捨て、PE-Streptavidin を終濃度 0.25 µg/mL となるよう 1% BSA/PBS で調整し、50 µL/well で添加した。遮光条件下で、4°C、30 分静置した後、600 × g、4°C、5 分遠心し、上清を廃棄した。続いて、1% BSA/PBS で 2 回洗浄した後、7-AAD Viability Staining Solution を 1 v/v% で添加した 1% BSA/PBS を 100 µL/well で添加、懸濁しフローサイトメーターを用いて解析した。

NRP-1 の発現評価

DC2.4 細胞を 1×10^5 cells/well になるように 96 well U-bottomed culture plate に播種した。600 × g、4°C、5 分で遠心後、上清を廃棄した後、anti-CD16/CD32 抗体を終濃度 1 µg/mL、BV421-anti-NRP1 抗体を終濃度 1 µg/mL となるよう 1% BSA/PBS で調整し、50 µL/well で添加した。遮光条件下で、4°C、30 分静置した後、600 × g、4°C、5 分で遠心し、上清を廃棄した。続いて、1% BSA/PBS で 2 回洗浄した後、7-AAD Viability Staining Solution を 1 v/v% で添加した 1% BSA/PBS を 100 µL/well で添加、懸濁しフ

フローサイトメーターを用いて解析した。

siRNA を用いた NRP-1 のノックダウン

培養している DC2.4 細胞を回収し、96 well U-bottomed culture plate に 4×10^4 cells/well になるように全量 200 μ L/well で播種した。12 時間後、上清を 150 μ L 回収し、そこに 50 μ L の small interfering RNA (siRNA) 溶液 (Lipofectamine 3000 試薬、10 μ M NRP-1 siRNA (5'-ctgctacttcacagtatggta-3')) を添加し、37°C で 2 日間静置した。2 日後、600 \times g、4°C、5 分遠心し、上清を廃棄後、1% BSA/PBS で 1 回洗浄した。続いて、ビオチン化樹状細胞標的化ペプチドを終濃度 10 μ g/mL なるよう 1% BSA/PBS で調整し、50 μ L/well で添加し、4°C、20 分静置した。その後、600 \times g、4°C、5 分遠心し、上清を廃棄後、1% BSA/PBS で 1 回洗浄した。続いて、PE-StreptAvidin を終濃度 8 μ g/mL、Fixable Viability Dye eFluor™ 780 を 0.1 v/v% となるよう 1% BSA/PBS で調整し、50 μ L/well で添加し、遮光条件下で、4°C、30 分静置した。その後、600 \times g、4°C、5 分遠心し、上清を廃棄後、1% BSA/PBS で 2 回洗浄した。再度、600 \times g、4°C、5 分遠心し、上清を廃棄した後、1% BSA/PBS を 100 μ L/well で添加し、フローサイトメーターを用いて解析した。

NA ビーズによる細胞表面蛋白質の同定

1 μ g の NA ビーズ (多摩川精機、Tokyo、Japan) と 50 μ g のビオチン化 Dp1 または 1 μ g の NA ビーズと 50 μ g のビオチン化 Dp5 をそれぞれ 1.5 mL チューブ内に加え、攪拌しながら 4°C で 1 時間反応させることで、ペプチドをビーズに融合させた。続いて、BMDC を回収し、10 mM HEPES-NaOH (pH7.9)、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、1% Nonidet P-40 と混和することで、細胞膜蛋白質を可溶化させた。その後、20400 \times g、4°C、5 分遠心し、上清を回収した。次に、Dp1 ビーズあるいは Dp5 ビーズを可溶化した細胞膜蛋白質に添加し、攪拌しながら 4°C、2 時間反応させた。その後、0.1 M Glycine-HCl (pH 2.5) を加えることで、ペプチドと結合する蛋白質を溶出した。続いて、溶出したサンプルで sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行い分離した後、ルミテインで染色した。複数のバンドが観察されることを確認した後、Dp1 ビーズから溶出したサンプルでのみ観察されるバンドを切り出し、アミノ酸配列を質量分析で解析した。質量分析は、微生物病研究所中央実験室に依頼した。

樹状細胞の細胞表面上におけるヌクレオリンの発現評価

培養している DC2.4 細胞、CAL-1 細胞、BMDC を回収し、96 well U-bottomed culture plate に 1×10^5 cells/well となるよう、全量 100 μ L/well で播種した。続いて、600 \times g、4°C、5 分遠心後、上清を廃棄し、ビオチン化 AS1411 を終濃度 0.1 μ M あるいは、ビオチン化 CRO を終濃度 0.1 μ M となるよう 1% BSA/PBS で調整し、20 μ L/well で添加した。4°C、30 分静置した後、600 \times g、4°C、5 分遠心し、上清を廃棄した。続いて、1% BSA/PBS でウェルを 1 回洗浄し、PE-StreptAvidin を終濃度 8 μ g/mL となるよう 1% BSA/PBS で調整し、50 μ L/well で添加した。遮光条件下で、4°C、30 分静置した後、1% BSA/PBS で 2 回洗浄した。その後、7-AAD Viability Staining Solution を 1 v/v% で添加した 1% BSA/PBS を 100 μ L/well で添加、懸濁しフローサイトメーターを用いて解析した。

統計解析

Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて統計解析を行った。グラフは平均値と標準偏差で表し、有意差検定は Student's t-test と Tukey's test を用いた。統計学的有意差は、 $P < 0.05$ の場合を有意であるとした。

【実験結果】

樹状細胞標的化ペプチドの取得

本節では、ファージ表面提示法を用いて、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）を探索した。本実験で用いたファージライブラリは、7 アミノ酸からなる直鎖状ペプチドをファージ頭部蛋白質の C 末端側に提示した T7 ファージを用いており、 20^7 （約 12 億）種類のランダムペプチドを提示している。まず、樹状細胞のみに結合するファージを取得するため、ファージライブラリをマウスリンパ腫由来 EL4 細胞および悪性黒色腫由来の B16-F10 細胞と反応させ、これら細胞に結合しないファージを回収した。次に、BMDC に添加し、結合したファージを回収することで、樹状細胞選択的に結合するファージの取得を試みた。続いて、ファージを大腸菌に感染させて増幅させ、再び、EL4 細胞および B16-F10 細胞と反応させた。この一連の操作（パンニング）を 3 回繰り返した後、樹状細胞選択的に結合するファージが濃縮できているか評価した（Fig. 1）。樹状細胞に添加したファージ量（pfu (in)）に対する、樹状細胞に結合したファージ量（pfu (out)）の割合を回収率として評価した。その結果、1 回目のパンニングの回収率と比べて、3 回目のパンニングの回収率は約 6.9 倍まで上昇したため、樹状細胞に結合可能なファージが濃縮されたと考えられた（Table 2）。そこで次に、回収したファージを単クローン化し、BMDC への結合性を、フローサイトメーターを用いて評価した。なお、単クローン化したファージが提示するペプチドの配列の内、樹状細胞に結合性を示したものおよび結合性を示さなかったものを以下の Table にまとめた（Table 3a, b）。その結果、樹状細胞に対して結合性を示したのは、単クローン化した 49 クローン中の 40 クローンであり、残りのクローンは結合性を有さなかった（Fig. 2a, b）。また興味深いことに、樹状細胞に結合性を示したクローンの内、16 クローンにおいては、C 末端側の 4 位と 7 位に R/K-X-X-R モチーフ（R：アルギニン、K：リジン、X：任意のアミノ酸）を提示していることが明らかとなった（Table 3a）。そこで次に、R/K-X-X-R モチーフを有するペプチドが樹状細胞に結合するか評価するため、R/K-X-X-R モチーフを有するペプチドをランダムに選択し、ペプチドのビオチン修飾体を化学合成した。そして、それらのペプチドを BMDC に添加した後、PE 修飾ストレプトアビジンを用いることで、ペプチドの樹状細胞への結合性を評価した。また、Dp13 は、R/K-X-X-R モチーフを有していないものの、4 位に塩基性アミノ酸を有していることから、R/K-X-X-R モチーフと類似しているペプチドとして選択した。その結果、ペプチドにすることによって、Dp1（dendritic cell-targeting peptide 1）や Dp2 などの数種類のペプチドが、樹状細胞に結合性を示すことが明らかとなった（Fig. 2c）。

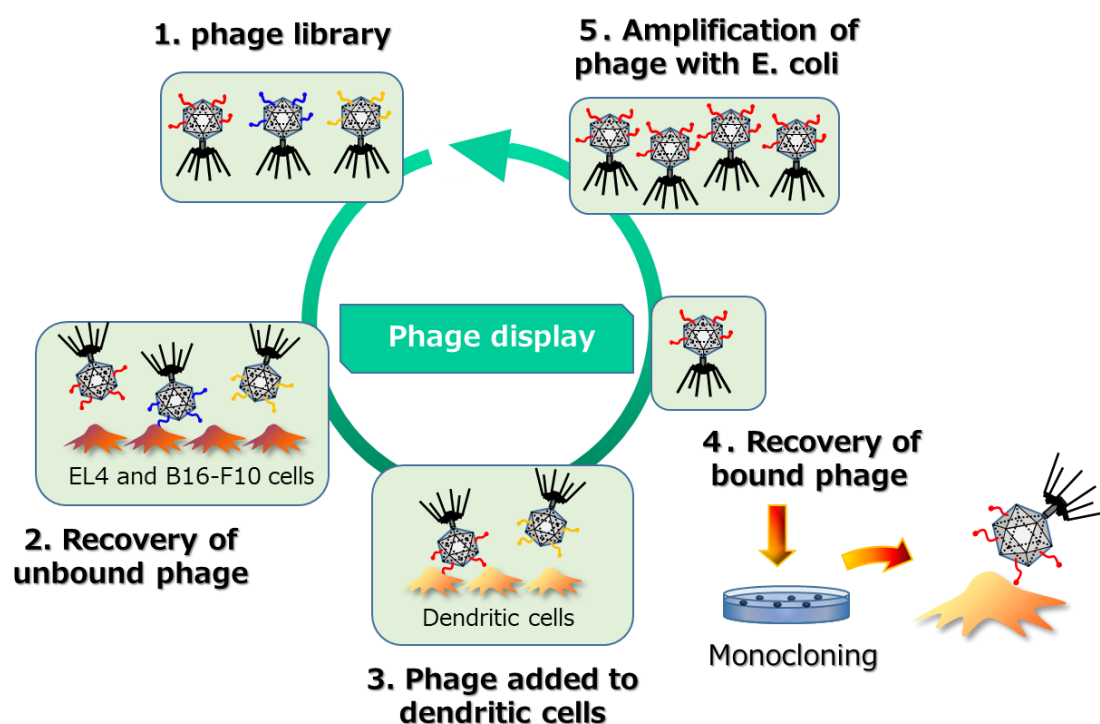


Figure 1. Schematic diagram of panning method.

Table 2. Identification of dendritic cell-targeting peptides by phage display system.

panning	pfu (in)	pfu (out)	recovery rate (pfu (out) / pfu (in))
1st	3.6×10^9	9.5×10^6	2.6×10^{-3}
2nd	2.3×10^9	1.1×10^7	4.8×10^{-3}
3rd	3.3×10^9	6.0×10^7	1.8×10^{-2}

The number of phage clones recovered from mouse-derived BMDCs (out) relative to the total number of added phage (in) at each selection round.

Table 3. Peptide sequences.

(a)

Name	sequence	1	2	3	4	5	6	7	8
Dp1	VSYKAIR	V	S	Y	K	A	I	R	
Dp2	GGSKPVR	G	G	S	K	P	V	R	
Dp3	ASARGPR	A	S	A	R	G	P	R	
Dp4	IGSRPIR	I	G	S	R	P	I	R	
Dp5	VSSRPAR	V	S	S	R	P	A	R	
Dp6	GSAKMSR	G	S	A	K	M	S	R	
Dp7	PVGRSVR	P	V	G	R	S	V	R	
Dp8	NGVKQAR	N	G	V	K	Q	A	R	
Dp9	GLGKGLR	G	L	G	K	G	L	R	
Dp10	GDSRNAR	G	D	S	R	N	A	R	
Dp11	MRVKEMR	M	R	V	K	E	M	R	
Dp12	SPDRLPR	S	P	D	R	L	P	R	
Dp13	GTSHRLR	G	T	S	H	R	L	R	
Dp14	VRKVAVR	V	R	K	V	A	V	R	
Dp15	SGRAEHR	S	G	R	A	E	H	R	
Dp16	RDMPVR	R	D	M	P	V	R		
Dp17	ASAKGR	A	S	A	K	G	R		
Dp18	ESHRLVR	E	S	H	R	L	V	R	
Dp19	KLA	K	L	A					
Dp20	RISAREPR	R	I	S	A	R	E	P	R
Dp21	FLEED	F	L	E	E	D			
Dp22	AMGKVAR	A	M	G	K	V	A	R	
Dp23	RSQVSVR	R	S	Q	V	S	V	R	
Dp24	RMLGTS	R	M	L	G	T	S		
Dp25	GRSVR	G	R	S	V	R			
Dp26	GMPAKRE	G	M	P	A	K	R	E	
Dp27	GNRLGMD	G	N	R	L	G	M	D	
Dp28	NRTSQAR	N	R	T	S	Q	A	R	
Dp29	VKGRER	V	K	G	R	E	R		
Dp30	SARALVR	S	A	R	A	L	V	R	
Dp31	DVPKKLR	D	V	P	K	K	L	R	
Dp32	VRLPR	V	R	L	P	R			
Dp33	AVRMPLR	A	V	R	M	P	L	R	
Dp34	LNRVR	L	N	R	V	R			
Dp35	RAQR	R	A	Q	R				
Dp36	RMQRGER	R	M	Q	R	G	E	R	
Dp37	RHQVGNR	R	H	Q	V	G	N	R	
Dp38	ERLRAR	E	R	L	R	A	R		
Dp39	GGKVAR	G	G	K	V	A	R		
Dp40	RGTSPSR	R	G	T	S	P	S	R	

(b)

Name	sequence	1	2	3	4	5	6	7
Dp41	HGAGDNF	H	G	A	G	D	N	F
Dp42	QKRAALA	Q	K	R	A	A	L	A
Dp43	GHGVVHL	G	H	G	V	V	H	L
Dp44	SGGLATL	S	G	G	L	A	T	L
Dp45	GISKLDL	G	I	S	K	L	D	T
Dp46	QSSGRKG	Q	S	S	G	R	K	G
Dp47	ESRGRDI	E	S	R	G	R	D	I
Dp48	VRVRGSS	V	R	V	R	G	S	S
Dp49	GRAVTRS	G	R	A	V	T	R	S

(a, b) Peptide sequences displayed by selected phage clones (a) with or (b) without binding capacity to BMDCs. Amino acids in boldface type represent those that follow the R/K-X-X-R motif.

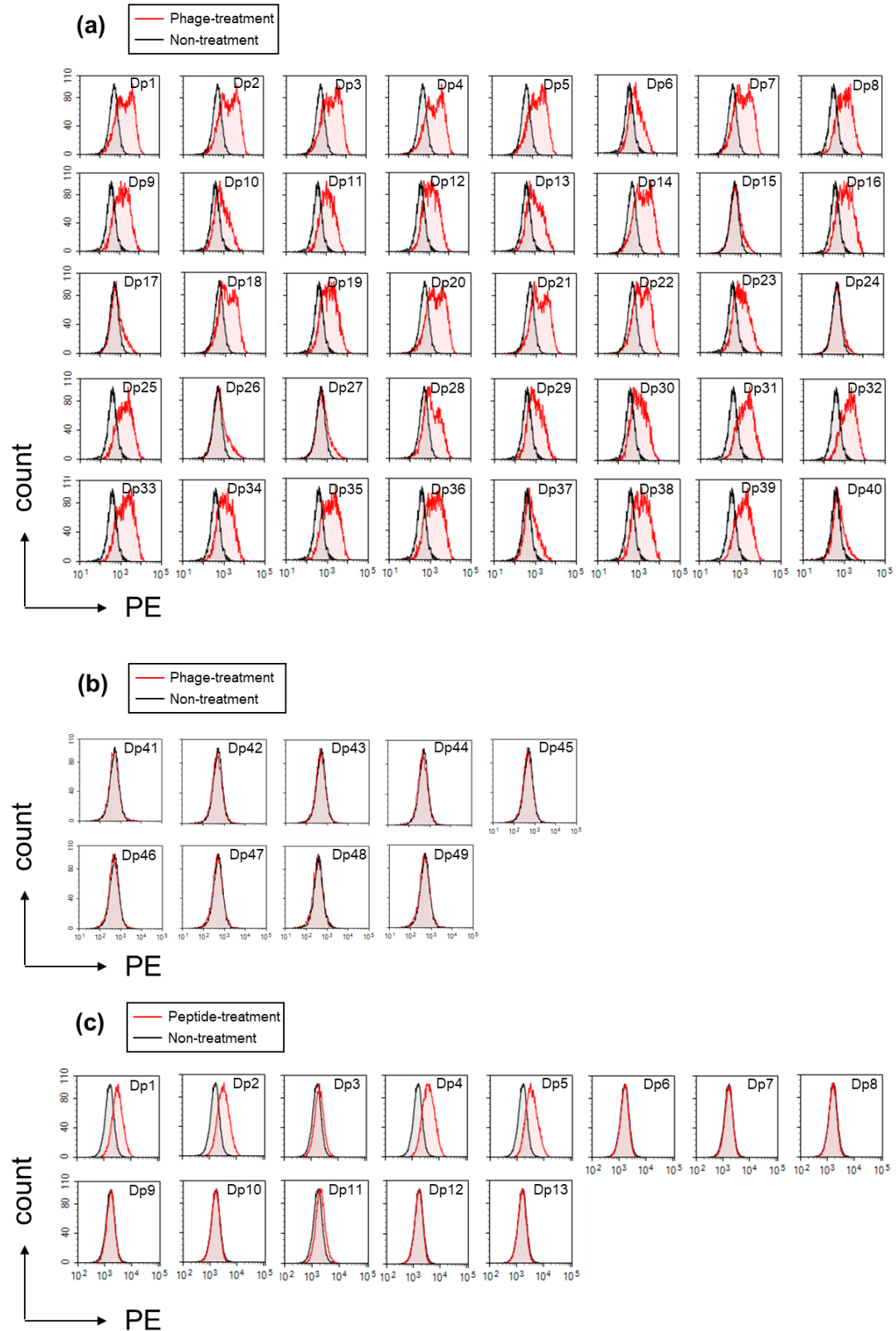


Figure 2. Evaluation of BMDC-binding capacity of phage clones and dendritic cell-targeting peptides. (a, b) The binding of each phage clones from the third round of selection

to BMDCs was evaluated using flow cytometry. (a) The phage clones bound to BMDCs. (b) The phage clones did not bind to BMDCs. (c) The binding of each biotin-labelled dendritic cell-targeting peptide to BMDCs was detected by fluorescent-labelled streptavidin using flow cytometry.

NA を用いた樹状細胞標的化ペプチドの有用性評価

次に、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、NA をモデル抗原として用いて、ワクチン効果を評価した。まず、NA とビオチン修飾ペプチドを結合させた NA-ペプチド複合体を作製した。NA は、ビオチンと結合可能なため、ビオチン修飾ペプチドと混合することで、樹状細胞標的化ペプチドが結合した NA を簡単に作製することが出来る。この NA-ペプチド複合体を C57BL/6J マウスに 0、10 日目に皮下ワクチン後、17 日目に血液を回収し、血漿中の NA 特異的 IgG 抗体価を評価した。またアジュバントとしては、現行のワクチンでも使用されている alum および、TLR9 のリガンドとして知られる CpG 核酸を用いた。その結果、NA と Dp1 の複合体 (NA-Dp1) をワクチンした場合、Dp1 以外の樹状細胞標的化ペプチドと比較して、NA 特異的 IgG 抗体価が有意に上昇することが明らかとなった (Fig. 3a)。また、NA 単独では、NA 特異的な IgG 抗体産生は認められなかったが、NA-Dp1 は、アジュバントを用いなくとも、NA を alum や CpG 核酸と共投与した場合と同等程度の IgG 抗体産生を誘導可能であることが明らかとなった (Fig. 3b)。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。

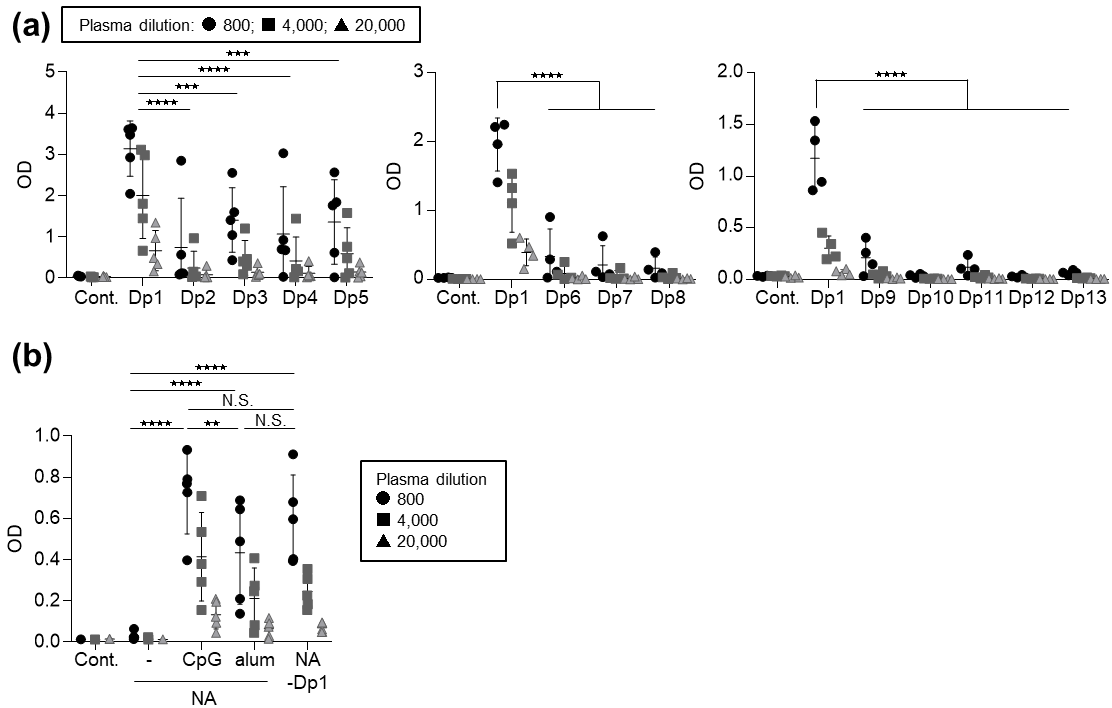


Figure 3. Induction of vaccine effects by dendritic cell-targeting peptides. (a, b) Mice were immunized with (a) 5 μ g neutravidin (NA) and 5 μ g dendritic cell-targeting peptides complex, and (b) 5 μ g NA alone, 5 μ g NA plus 10 μ g CpG ODN, 5 μ g NA plus 250 μ g alum, or 5 μ g NA and Dp1 (NA-Dp1) complex. As control, mice were treated with PBS. Level of NA-specific IgG in plasma was evaluated 7 days after the second immunization using ELISA. We used 800- (●), 4,000- (■), and 20,000- (▲) fold-diluted plasma samples. (a) $n = 4-5$; (b) $n = 5$. (a, b) Data are means \pm SD. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ as indicated by Tukey's test. N.S.: not significant. Significant differences were analyzed only in the 800-fold-diluted plasma samples.

樹状細胞標的化ペプチドの樹状細胞への結合におけるニューロピリン-1の寄与

樹状細胞標的化ペプチドの中でも Dp1 が優れたワクチン効果を示したことから、Dp1 ペプチドの結合分子の探索を図った。Dp1 をはじめとした樹状細胞標的化ペプチドの一部は、C 末端に R/K-X-X-R モチーフを有している (Table 3a)。本モチーフはこれまでに、細胞表面のニューロピリン-1 (NRP-1) に結合することが報告されている^{22,24}。そこでまず、組換え NRP-1 蛋白質を用いて、Dp1 など、R/K-X-X-R モチーフを有する樹状細胞標的化ペプチドの結合性を評価した。その結果、R/K-X-X-R モチーフを持つ全ての樹状細胞標的化ペプチドが NRP-1 に結合することが明らかとなった (Fig. 4a)。次に、樹状細胞標的化ペプチドの樹状細胞への結合が NRP-1 依存的であるかを評価した。なお、NRP-1 に結合することが報告されている、R/K-X-X-R モチーフを有する RPARPAR ペプチドをポジティブコントロールとして用いた。まず、抗 NRP-1 抗体存在下で、樹状細胞標的化ペプチドの樹状細胞への結合性を評価した。その結果、Dp2、Dp4、Dp5 および RPARPAR ペプチドの樹状細胞への結合は、抗 NRP-1 抗体の存在下で阻害されるのに対して、Dp1 の樹状細胞への結合は、抗 NRP-1 抗体存在下でも変化は認められなかった (Fig. 4b)。そこで、NRP-1 に対する siRNA を用いて、樹状細胞上の NRP-1 の発現を低下させた際の、樹状細胞標的化ペプチドの樹状細胞への結合性を評価した。なお、NRP-1 に対する siRNA を用いることで、樹状細胞表面上の NRP-1 の発現は、siRNA 未処置の樹状細胞と比較して、およそ 70%程度に低下することを確認している (Fig. 4c)。その結果、NRP-1 の発現を低下させることで、Dp1 以外の樹状細胞標的化ペプチドは、樹状細胞への結合が低下するのに対して、Dp1 の樹状細胞への結合性に変化は認められなかった (Fig. 4d)。したがって、Dp1 は NRP-1 に結合可能であるものの、NRP-1 以外の蛋白質を介して樹状細胞に結合する可能性が示された。

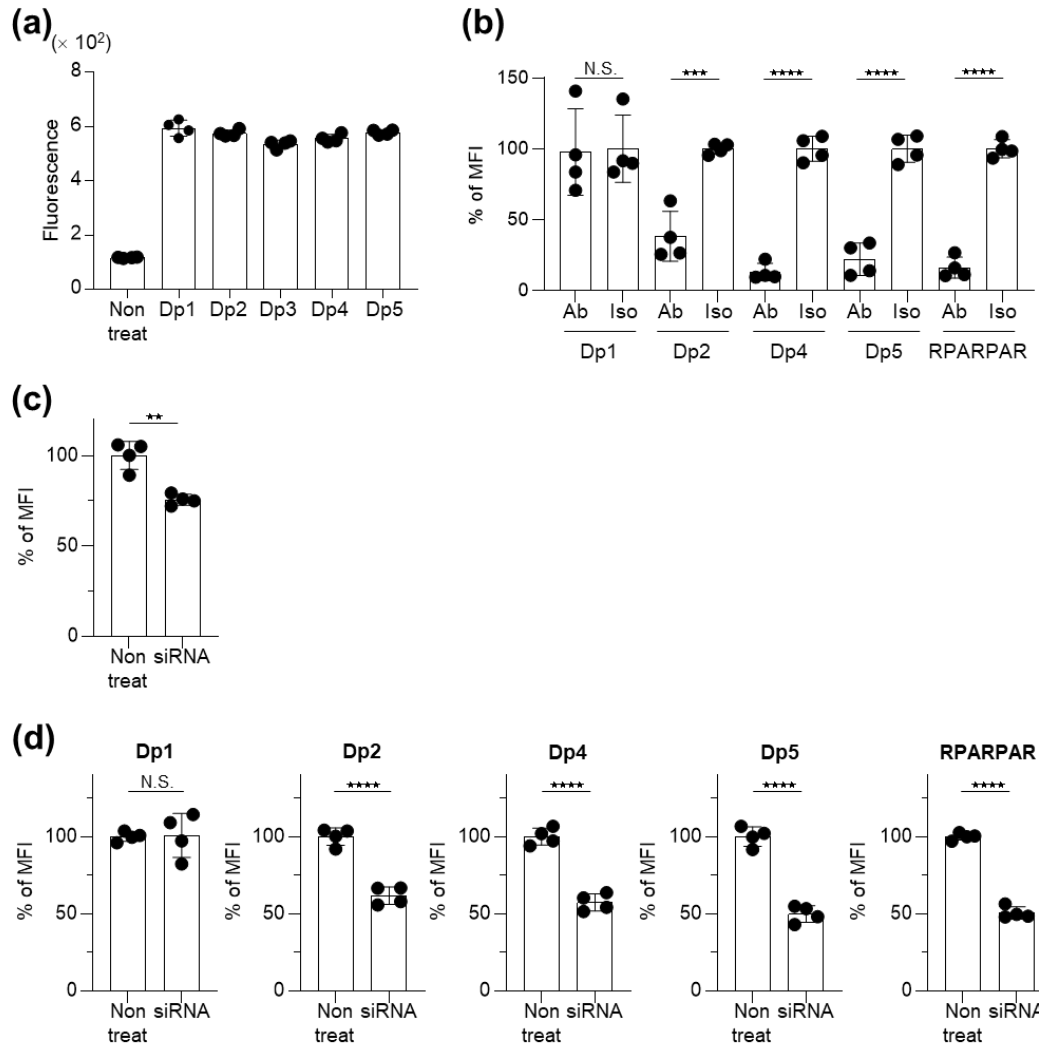


Figure 4. Evaluation of NPR-1-dependent binding of Dp1. (a) The binding of 10 $\mu\text{g/mL}$ biotin-labelled dendritic cell-targeting peptides to NRP-1 protein was detected using fluorescent-labelled streptavidin. (b) The binding of each 250 $\mu\text{g/mL}$ biotin-labelled dendritic cell-targeting peptides and RPARPAR peptide to DC2.4 cells in the presence of 18 $\mu\text{g/mL}$ anti-NRP-1 polyclonal antibody or 18 $\mu\text{g/mL}$ isotype control antibody was detected using flow cytometry using fluorescent-labelled streptavidin. (c) The expression of NRP-1 in DC2.4 cells was suppressed by siRNA against NRP-1. (d) The binding of 10 $\mu\text{g/mL}$ biotin-labelled dendritic cell-targeting peptides and RPARPAR peptide to wild-type DC2.4 cells or DC2.4 cells treated with siRNA against NRP-1 was detected using flow cytometry using fluorescent-labelled streptavidin. (a, b, c, d) $n = 4$. Data are means \pm SD. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ as indicated by (b, c, d) Student's t -test. N.S.: not significant.

Dp1 の標的分子の探索

Dp1 が NRP-1 非依存的に樹状細胞に結合する可能性が示されたため、Dp1 が結合する細胞表面蛋白質を探索した。Dp1 または Dp5 をビーズに結合させ、BMDC の膜画分と反応させた。その後、ペプチドに結合した蛋白質を溶出し、SDS-PAGE にて解析した (Fig. 5a)。その結果、複数のバンドが観察され、Dp1 結合ビーズから溶出したサンプルでのみ観察されるバンドも複数存在した。それらのバンドを切り出し、アミノ酸配列を質量分析で解析した。その結果、Dp1 結合ビーズでのみ観察された 87 kDa のバンドが、ヌクレオリン (NCL) 蛋白質と同定された。NCL は、あらゆる細胞の核内、細胞質内に存在する蛋白質であり、リボソームの形成などに関与している²⁵。また、がん細胞など、一部の細胞では、他の蛋白質と会合することで細胞表面にも局在していることが報告されている²⁵。

Dp1 の樹状細胞への結合におけるヌクレオリンの寄与

樹状細胞表面にも NCL が発現しているか評価するため、NCL に対して高い親和性と特異性を有する DNA アプタマーである AS1411 と、AS1411 のコントロール核酸である CRO を用いた²⁶。まずマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞あるいは BMDC にビオチン修飾 AS1411 あるいはビオチン修飾 CRO を添加し反応させた後、PE 修飾ストレプトアビジンを用いて、AS1411 の樹状細胞への結合性を評価した。その結果、DC2.4 細胞、BMDC のいずれにおいても、CRO 添加群と比較して、AS1411 添加群で樹状細胞への結合が有意に上昇したことから、樹状細胞表面上に、NCL が局在していることが明らかとなった (Fig. 5b, c)。

次に、AS1411 を用いた競合阻害実験により、Dp1 の樹状細胞への結合が NCL 依存的か評価した。その結果、Dp2 や Dp4 または Dp5 の樹状細胞への結合は、AS1411 を共添加しても変化は認められない一方で、Dp1 の樹状細胞への結合は、CRO 共添加群と比較して、AS1411 の共添加群で、有意に低下することが明らかとなった (Fig. 5d)。さらに、NCL に結合するモノクローナル抗体 (MS-3) を用いて、DC2.4 細胞で同様の実験を行なった (Fig. 5e)。その結果、Dp5 の樹状細胞への結合は、isotype 抗体および MS-3 抗体を共添加しても、変化は認められなかった。一方で Dp1 の樹状細胞への結合は、isotype 抗体共添加群と比較して、MS-3 共添加群で有意に低下した。また、ヒトへの展開を目指し、ヒト樹状細胞株である CAL-1 細胞を用いて同様に検討した。その結果、Dp1 の樹状細胞への結合は、CRO 共添加群と比較して、AS1411 の共添加群で有意に低下した (Fig. 5f)。さらに MS-3 を用いた場合でも、Dp1 の CAL-1 細胞への結合は、isotype 抗体共添加群と比較して、MS-3 抗体の共添加群で、有意に低下することが明らかとなった (Fig. 5g)。以上の結果から、*in vitro* において、Dp1 が NCL を介して樹状細胞に結合することが明らかとなった。

Dp1 の樹状細胞への結合におけるアミノ酸の重要性

Dp1 の配列の内、どのアミノ酸が樹状細胞への結合に寄与しているか評価するため、VSYKAIR からなる Dp1 の配列を一つずつ A (アラニン) に置換したペプチドを合成し、これらペプチドの樹状細胞への結合性を評価した (Fig. 5h)。その結果、VSYKAIR の 1 位と 2 位を A に置換した ASYKAIR および VAYKAIR の樹状細胞への結合性は、VSYKAIR と比較して、有意に上昇することが明らかとなった。一方で、VSYKAIR の 3 位から 7 位のアミノ酸を A に置換したペプチドの場合では、VSYKAIR と比較して、樹状細胞への結合性が低下することが認められた。したがって、Dp1 の樹状細胞への結合には、3 位から 7 位のアミノ酸が関与することが示された。続いて、Dp1 の配列の内、どのアミノ酸が NCL への結合に寄与しているか評価するため、AS1411 を用いて、樹状細胞への競合阻害実験を行った。その結果、VSYKAIR および ASYKAIR の樹状細胞への結合は、AS1411 の共添加で、有意に低下することが明らかとなった (Fig. 5i)。以上の結果から、Dp1 の NCL への結合には、1 位のアミノ酸が関与することが示唆された。

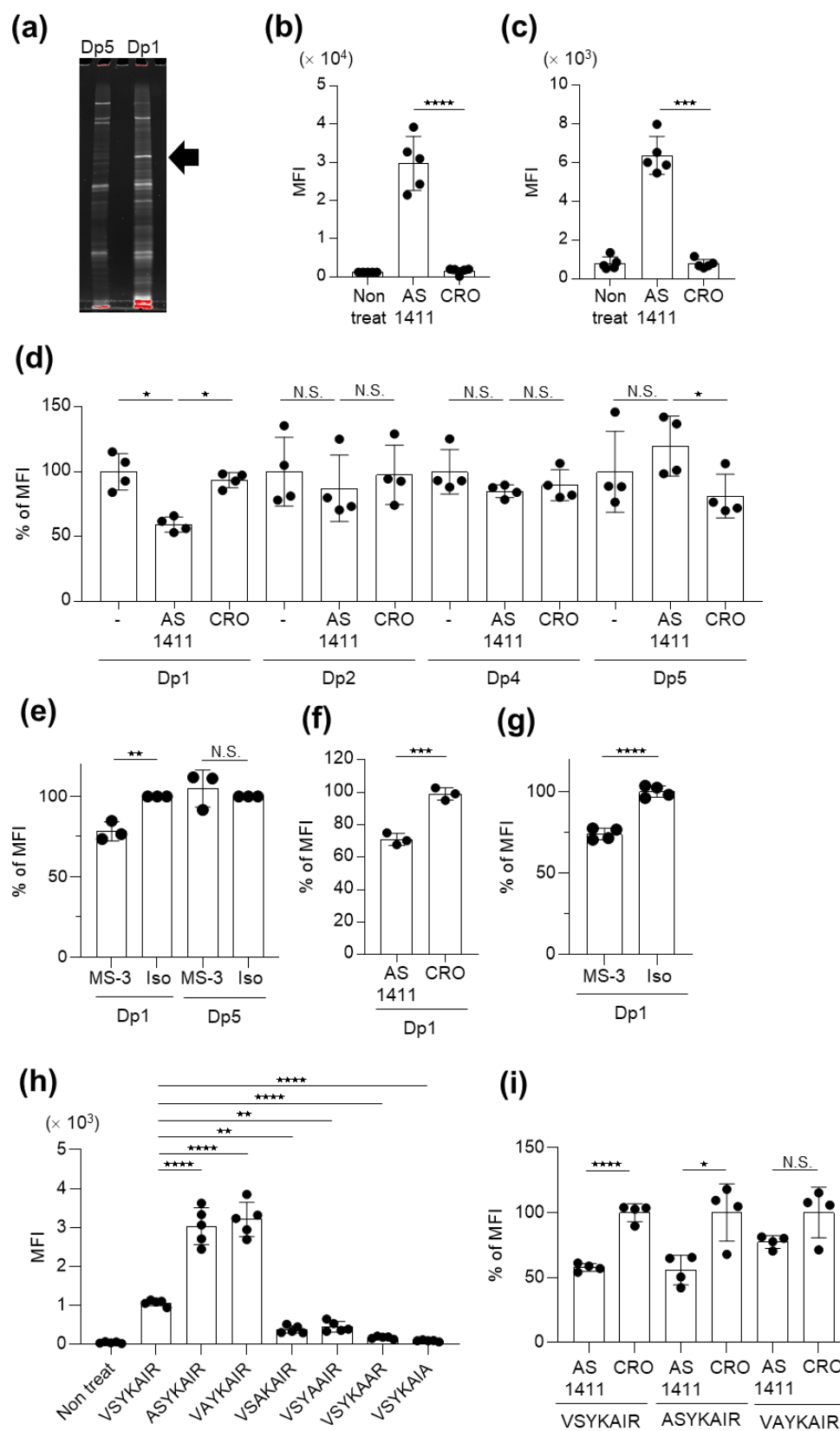


Figure 5. NCL as the cell receptor to Dp1 peptide. (a) The membrane fraction of BMDCs

was incubated with Dp5-conjugated beads or Dp1-conjugated beads. The bead-bound proteins were eluted using an acid solution and the eluted solution was analyzed using Lumitein staining gel after SDS-PAGE. The arrow indicates the band of nucleolin. (b, c) The expression of nucleolin on (b) DC2.4 cells or (c) BMDCs under 4 °C conditions was evaluated by flow cytometry using 0.1 μ M fluorescent-labelled AS1411 or CRO. (d) The binding of 10 μ g/mL biotin-labelled Dp1, Dp2, Dp4, or Dp5 to DC2.4 cells in the presence of 10 μ M AS1411 or CRO was detected using flow cytometry using fluorescent-labelled streptavidin. (e) Flow cytometry was used to detect the binding of 10 μ g/mL biotin-labelled Dp1 or Dp5 to DC2.4 cells in the presence of 50 μ g/mL MS-3 or isotype control antibody using fluorescent-labelled streptavidin. (f) The binding of 50 μ g/mL biotin-labelled Dp1 to human CAL-1 cells in the presence of 10 μ M AS1411 or CRO was evaluated using flow cytometry using fluorescent-labelled streptavidin. (g) The binding of 50 μ g/mL biotin-labelled Dp1 to human CAL-1 cells in the presence of 50 μ g/mL MS-3 or isotype control antibody was detected using flow cytometry using fluorescent-labelled streptavidin. (h) The binding of 10 μ g/mL biotin-labelled VSYKAIR, ASYKAIR, VAYKAIR, VSAKAIR, VSYAAIR, VSYKAAR or VSYKAIA to DC2.4 cells was detected using flow cytometry using fluorescent-labelled streptavidin. (i) The binding of 10 μ g/mL biotin-labelled VSYKAIR, ASYKAIR or VAYKAIR to DC2.4 cells in the presence of 10 μ M AS1411 or CRO was detected using flow cytometry using fluorescent-labelled streptavidin. (b, c) $n = 5$; (d, g, h, i) $n = 4$; (e, f) $n = 3$. Data are means \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ as indicated by (e, f, g, h) Student's t -test and (b, c, d, i) Tukey's test. N.S.: not significant.

【考察】

本検討では、ファージ表面提示法によって、樹状細胞に選択的に結合可能な樹状細胞標的化ペプチドの同定を試みた。その結果、40 クローンもの、樹状細胞に結合するペプチドを発現するファージの取得に成功した (Fig. 2a)。しかし、ファージクローンでは樹状細胞への結合性を示していたものの、ペプチドの状態では Dp1 や Dp2 など、一部のペプチドしか結合性を有していなかった (Fig. 2c)。これは、各ファージが 415 個のペプチドを表面に提示しているのに対し、樹状細胞への結合性を評価する際に用いたビオチン修飾ペプチドは単量体であるため、結合力 (avidity) の違いに起因していると考えられる²⁷。

取得した樹状細胞標的化ペプチドの中でも 16 種類のペプチドにおいて、ペプチドの C 末端に R/K-X-X-R モチーフを有していることが明らかとなった (Table 3a)。また、前述の通り、このモチーフを有するペプチドは細胞表面蛋白質の NRP-1 に結合することが知られている^{22,24}。NRP-1 は、神経細胞や血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞などに発現している膜貫通蛋白質であり、樹状細胞やマクロファージなどの免疫細胞にも発現している²⁸。つまり、R/K-X-X-R モチーフを有する樹状細胞標的化ペプチドは全て、樹状細胞表面に発現する NRP-1 に結合する可能性がある。

NA と R/K-X-X-R モチーフを有する樹状細胞標的化ペプチドとの融合蛋白質の中でも、NA-Dp1 が最も NA 特異的な免疫応答を誘導していた (Fig. 3a)。一方で、Dp2 や Dp4、Dp5 も Dp1 と同等程度の樹状細胞への結合性を示しているにも関わらず、Dp1 ほど抗原特異的な抗体産生の誘導は認められなかった (Fig. 2c, Fig. 3a)。樹状細胞への結合性は同等であるのに、なぜ、NA-Dp2 や NA-Dp5 は、NA-Dp1 ほど免疫応答を誘導出来なかったのか、詳細については不明である。しかし、これまでの報告では、正常細胞における NRP-1 は、一部の樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell、以下 pDC など)、マクロファージなどの免疫細胞表面にも発現していることが報告されているものの、その大部分は T 細胞であり、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞にはあまり発現していないことが知られている²⁹⁻³¹。また、NRP-1 の発現が報告されている pDC は、樹状細胞の一つではあるものの、cDC よりも抗原提示能は乏しいことから、抗原特異的な抗体産生への寄与は少ないことが想定される^{32,33}。つまり、NRP-1 依存的に結合する、Dp1 以外の樹状細胞標的化ペプチドでは、抗原提示細胞に効率的に抗原を送達できないために、ワクチン効果を強く誘導出来ないと考えられる。一方で、Dp1 は、他の樹状細胞標的化ペプチドを融合した場合よりも、ワクチン効果を増強出来ることから、Dp1 は、NRP-1 への依存性は低く、NRP-1 以外にも別の標的分子が存在することで、抗原提示細胞に効率的に抗原を送達することが出来たと考えられた。

Dp1 は、細胞表面の NRR-1 だけでなく、NCL にも結合することが認められた (Fig. 4a、Fig. 5a)。NCL は、核小体の主要な構成要素の一つであり、RNA、DNA、および他の蛋白質と相互作用することが知られている²⁵。また、NCL は核や細胞質にのみ局在するだけでなく、一部の正常細胞では細胞表面にも局在することが報告されている^{34,35}。細胞表面の NCL は、ラミニン-1 や L-セレクトリン、肝細胞増殖因子などの腫瘍の発生や細胞分化の誘導、細胞接着、白血球の輸送、炎症、血管新生に関する蛋白質と相互作用することから²⁵、がん細胞表面上では、NCL が多く発現していることが知られている^{36,37}。さらに、肝細胞がん表面の NCL は、肝細胞の増殖を促進する肝細胞増殖因子の受容体としての機能を持っており、NCL と結合した肝細胞増殖因子は細胞内に取り込まれることが報告されている³⁸。また、NCL の C 末端に結合する特異的アンタゴニストとして知られる HB-19 ペプチドは、がん細胞表面の NCL に結合し取り込まれることで、腫瘍細胞の増殖や血管新生を抑制することが認められている³⁹。本検討で使用した AS1411 も、抗がん剤をがん細胞に送達するためのターゲティング担体として用いられていることから²⁶、細胞表面の NCL に結合した物質は細胞内に速やかに取り込まれることが予想される。これまでの報告で、NCL は樹状細胞やマクロファージを含む抗原提示細胞にも発現することが明らかとなっており³⁵、本研究結果でも、樹状細胞表面に NCL が発現していることを示した。また、*in vitro* において、Dp1 が樹状細胞表面上の NCL を介して結合することを明らかとした (Fig. 5b-g)。したがって Dp1 は、細胞表面の NCL を介して樹状細胞に結合することで、樹状細胞へ効率的に抗原を送達していると考えられる。さらに、ヒト樹状細胞株を用いた検討でも、Dp1 によって細胞表面への抗原の結合を促進できたことから (Fig. 5f、g)、Dp1 はヒトにも応用できる抗原送達キャリアであると予想される。一方で、現在までに NCL を標的とする感染症ワクチンキャリアは開発されておらず、ワクチンターゲットとしての NCL の機能解明も不十分なままである。本検討で用いた AS1411 は、がん治療薬として非臨床試験も実施された実績があることから²⁶、NCL への抗原送達は、臨床的にも非常に意義深いと考えられる。今後、Dp1 がどのように NCL に結合しているのか、樹状細胞表面の NCL はどのような蛋白質と相互作用しているのかなど、更に解明していく必要がある。また、NCL への結合には、Dp1 の配列の内、1 位のアミノ酸が重要であることが示唆されたものの (Fig. 5h、i)、なぜ NCL への特異性がもたらされているかは不明であり、今後更なる解明が必要であると考えられる。

第二節 Dp1 ペプチドを用いたワクチン開発

感染症は世界の死因の中でも上位に位置しており、肺炎や細気管支炎などの下気道感染症は、多くの命を奪っている現状にある。日本においても肺炎は、高齢者の主要な死亡原因の一つであり、高齢化社会の現代において、肺炎を予防することは重要性を増している。肺炎の原因病原体には様々な細菌やウイルスがあるが、中でも肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は、分離頻度が最も高いグラム陽性の双球菌で、90 種類以上の血清型が存在することが分かっている^{40,41}。また、乳幼児に感染し重症化すると、髄膜炎や敗血症を引き起こすことがあるため、高齢者や乳幼児には、肺炎球菌ワクチンの予防接種が推奨されている^{42,43}。

現行の肺炎球菌ワクチンは、菌体表面の莢膜ポリサッカライドを用いたワクチンであり、接種することで、莢膜に対する抗体価が上昇し、肺炎球菌の感染および重症化を防ぐことが出来る^{44,45}。高齢者に使用される 23 価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチンは、5 年ごとの定期接種が推奨されており、この 23 種類の血清型を防御することで、肺炎球菌感染症の約 6 割～7 割を防ぐことが出来るとされている。また乳幼児に使用される 13 価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチンは、キャリア蛋白質である無毒性変異ジフテリア毒素 (CRM197) と結合させることで、乳幼児においても免疫応答を誘導出来る工夫がなされている^{46,47}。

しかし近年、現行のワクチンで防御出来ない血清型の肺炎球菌感染症の増加が報告されている。これは、現行の莢膜ポリサッカライドワクチンの限界を示しており、全ての血清型に対する次世代型の肺炎球菌ワクチンの開発が待望されている⁴⁸。肺炎球菌における病原性に関連する細胞表面、細胞内蛋白質には、choline-binding protein A、pneumococcal surface adhesin A、phosphorylcholine などがあるが⁴⁹⁻⁵²、中でも pneumococcal surface protein A (PspA) は、全ての血清型の肺炎球菌表層に存在する蛋白質として知られており、PspA 特異的な抗体を誘導することが出来れば、全ての肺炎球菌を防御出来ると考えられている⁵³⁻⁵⁵。

そこで第一節で取得した Dp1 と PspA を融合した蛋白質を作製し、マウスに投与することで、PspA 特異的な免疫応答を誘導することが出来るか検討した。また同時に、肺炎球菌への感染防御効果について評価することで、Dp1 のワクチン抗原送達キャリアとしての有用性を検証した。さらに、Dp1 が肺炎球菌ワクチン以外にも応用することが出来るか評価するため、ニワトリ卵白アルブミン (ovalbumin、以下、OVA) の MHC クラス II エピトープ由来のペプチド (OTII) をワクチン抗原として用いることで、Dp1 のキャリアとしての

汎用性についても検討した。

【実験材料と方法】

試薬

pET28 ベクターは Merck Millipore より購入した。cOmplete® mini EDTA-free protease inhibitor は Roche (Basel, Switzerland) より購入した。2 × sample buffer、isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) は Nacalai Tesque より購入した。Horseradish peroxidase goat anti-mouse IgG1、IgG2c は SouthernBiotech (Birmingham, AL, USA) より購入した。PE/Cy7 anti-CD86 抗体 (clone: PO3) は Biolegend より購入した。AddaVax は Invivogen より購入した。Limulus Color KY Test は富士フイルム和光純薬株式会社より購入した。OVA with low endotoxin content は富士フイルム和光純薬株式会社より購入し、マウスの免疫実験に使用した。Grade V OVA は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入し、血漿中における OVA 特異的抗体価の測定に使用した。

実験動物

6～7 週齢の C57BL/6J (雄性)、BALB/c (雄性) は、日本エスエルシーより購入した。これらマウスの飼育方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

組み換え蛋白質の作製

ヌクレオリンのアミノ酸配列 (286-707) は、GenBank accession number: X07699.1 に由来している。また、ヌクレオリンの RNA 結合領域 (RRM) の 4 つのドメインである RRM1 (309-385)、RRM2 (395-468)、RRM3 (487-561)、RRM4 (569-644) をコードする cDNA の配列を大腸菌発現のために最適化している。WU2 株由来の組み換え PspA のアミノ酸配列 (32-414) は、GenBank accession number: AF071814 に由来している。PspA-Dp1、PspA-Dp1×2、PspA-Dp1×3 はそれぞれ、PspA の C 末端側に Dp1 を 1 つ、2 つあるいは 3 つ融合している。また、PspA-Dp1×3 のコントロール蛋白質として、PspA-Dp2×3、PspA-Dp3×3 を作製し、これらは PspA の C 末端側にそれぞれ Dp2、Dp3 を 3 つ融合している。PspA とそれぞれの樹状細胞標的化ペプチドの間は G4S リンカー (GGGGS) で連結した。作製した融合蛋白質の配列は Table 4 に記載した。まず、PspA 発現プラスミドを人工合成により作製した。続いて、N 末端に、His タグを有する PspA 蛋白質の cDNA を pET28 ベクターに挿入した。次にトランスフォーメーションするために BL21 (DE3) Competent E. coli を PspA 発現プラスミドと共に、氷上で 30 分静置し、42°C、45 秒間ヒートショックした後、氷上で 5 分静置した。その後、BL21 細胞を LB プレートに播種し、37°C、1 日間静置した。1 日後、形成されたコロニーを爪楊枝でつつき、30 µg/mL カナマ

イシンを含む LB 培地 1 mL の中に爪楊枝を浸した後、37°C、200 r/min で振盪し、1 日間培養した。培養後、終濃度 8% となるようにグリセロールを加え、-80°C で保存し、組換え PspA 蛋白質を発現する大腸菌を作製した。作製した PspA 発現の大腸菌を爪楊枝でつき、30 µg/mL カナマイシンを含む LB 培地 3 mL の中に爪楊枝を浸し、37°C、200 r/min で振盪し、1 日間培養した。1 日後、30 µg/mL カナマイシンを含む LB 培地 500 mL の中へ前日培養した大腸菌を加え、OD₆₀₀ が 0.5 に達するまで、37°C、200 r/min で振盪した。その後、IPTG を終濃度 0.5 mM となるように添加し、37°C、4 時間培養することで、PspA 蛋白質の発現を誘導した。培養後、培養液 500 mL を 50 mL チューブに分注し、8000 × g、4°C、10 分遠心して、上清を取り除き、ペレットを回収した。ペレットは、cComplete® mini EDTA-free protease inhibitor を加えた binding buffer 10 mL (20 mM Tris-HCl [pH 7.0]、500 mM NaCl、20 mM imidazole) で懸濁し、超音波ホモジナイザー (Tomy International、Tokyo、Japan) を用いて、大腸菌を破碎した。その後、破碎した懸濁液を 50 mL 遠沈管に分注し、7500 × g、60 分遠心して、上清を回収した。回収した上清は、0.45 µm フィルター (Merk Millipore) を用いて、細胞断片等を取り除いた。その後、Ni-Sepharose HisTrap FF column (GE Healthcare、Diegem、Belgium) を取り付けた AKTA explorer chromatography system (GE Healthcare) を用いて精製した。まず、回収した上清を His Trap FF column に流し、His タグ付き各組換え蛋白質をカラムに吸着させた。その後、elution buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.0]、500 mM NaCl、500 mM imidazole) で溶出した。さらに、回収した組換え PspA は Amicon Ultracentrifugal filters を用いて 500 µL に濃縮し、ゲル濾過カラムである Superose 6 Increase 10/300 GL column (GE Healthcare) に流した。A high-molecular-weight standard kit (Bio-Rad、Hercules、CA、USA) を用いて、目的の蛋白質画分だと推定される画分だけを回収した。回収した組換え蛋白質溶液は、EndoTrap® HD column (LIONEX、Braunschweig、Germany) を用いて、エンドトキシンを取り除き、Amicon Ultracentrifugal filters を用いて約 500 µL に濃縮した。精製した組換え蛋白質溶液に含まれるエンドトキシン量は、Limulus Color KY Test を用いて測定した (< 0.05 EU/µg)。蛋白質量は、a Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific、Hampton、NH、USA) を用いて測定した。さらに、組換え蛋白質 1 µg を 5% 2-mercaptoethanol を含む 2 × sample buffer と混合して、95°C で 5 分熱処理した後、10% Mini-PROTEAN TEX Precast Protein Gel (Nacalai Tesque) に泳動した。

核酸は 10 および 50 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で抗原と共に投与した。Dp1 \times 3 および Dp5 \times 3 は 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で共投与した。投与試料は PBS で調整し、尾根部皮下より、50 $\mu\text{L}/\text{mouse}$ でマイジェクターを用いて投与した。0、10 日目に投与した場合は 17 日目、0、21 日目に投与した場合は 28 日目に眼底より採血し、血漿中抗原特異的抗体価を ELISA により評価した。また、PspA-Dp1 \times 3 が長期的な抗体価に与える影響を評価する際には、0、21 日目に PspA-Dp1 \times 3 を投与した後、28、56、84、112、140、168 日目に眼底より採血し、血漿中の抗原特異的抗体価を ELISA により評価した。また、in vivo における NCL の寄与を評価する検討においては、-1、0、1 の 3 日間、5 nmol/mouse AS1411 または 5 nmol/mouse CRO を尾根部より投与した。続いて、0 日目に 1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ PspA-Dp1 \times 3 を尾根部より投与し、20 日目に血液を回収することで、血漿中の抗原特異的抗体産生を ELISA により評価した。

樹状細胞標的化ペプチドの結合評価

培養している DC2.4 細胞を回収し、96 well U-bottomed culture plate に 1×10^5 cells/well になるように全量 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で播種した。600 \times g、4°C、5 分遠心後、上清を捨て、終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ビオチン化 Dp1 もしくはビオチン化 Dp1 \times 3 となるように 2 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加しピペティングした。4°C、30 分静置した後、600 \times g、4°C、5 分遠心後、上清を捨て、PE-Streptavidin を終濃度 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう 1% BSA/PBS で調整し、50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。遮光条件下で、4°C、30 分静置した後、600 \times g、4°C、5 分遠心し、上清を廃棄した。続いて、1% BSA/PBS で 2 回洗浄した後、7-AAD Viability Staining Solution を 1 v/v% で添加した 1% BSA/PBS を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加、懸濁しフローサイトメーターを用いて解析した。

BMDC の誘導

第一節の実験材料と方法に準じた。

BMDC の刺激

誘導した BMDC を回収し、10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む RPMI 1640 培地で懸濁した後、96 well U-bottomed culture plate に 1×10^5 cells/well になるように 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で播種した。続いて、OTII、OTII-Dp1 \times 3、OTII-Dp2 \times 3 を終濃度 11.3 nM、CpG 核酸を終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように 10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む RPMI 1640 培地で調製し、ウェルに 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、全量を

100 μ L/well とした。その後、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。培養後、600 \times g、4°C、5 分遠心し、培養上清を回収した。培養上清中の IL-6 および IL-12 p40 を ELISA によって測定した。

ELISA

PspA をカルボネートバッファーで 1 μ g/mL になるように希釈した後、96 well half area microplate に添加し、4°C で一晩静置し固相化した。また、OVA または Dp1 \times 3 はカルボネートバッファーで 10 μ g/mL に希釈した後、96 well half area microplate に添加し、4°C で一晩静置し固相化した。以降の操作は第一節の方法に準じた。上清中のサイトカインは ELISA MAX™ Standard Set Mouse interleukin-6 (IL-6) (BioLegend) および ELISA MAX™ Standard Set Mouse IL-12 p40 (BioLegend) を用い、添付のマニュアルに従って測定した。まず、Capture 抗体を 0.1 M カルボネートバッファーで希釈し、50 μ L/well で 96 well half ELISA plate に添加した後、4°C で一晩静置し固相化した。固相化したプレートを PBST で洗浄後、4% ブロックエースを添加し、1 時間室温で静置し、ブロッキングした。次に、プレートを PBST で洗浄後、10 % ブロックエースで調整したサンプル及びスタンダードを 50 μ L/well で添加し、室温で 2 時間反応させた。2 時間後、プレートを PBST で洗浄し、Detection 抗体を 10% ブロックエースで希釈して、50 μ L/well で添加し、室温で 1 時間反応させた。続いて、PBST で洗浄後、Avidin-HRP を 10 % ブロックエースで希釈して、50 μ L/well で添加し、室温で 30 分間反応させた。プレートを PBST で洗浄後、終濃度 0.8 mM の tetramethyl benzidine を用いて発色させ、2N H₂SO₄ により発色反応を停止後、microplate reader を用いて OD₄₅₀₋₅₇₀ を測定した。

肺炎球菌 (WU2 株) ストックの作製

WU2 のグリセロールストックは Dr. Yukihiro Akeda より分与していただいた。WU2 を 50 mL 遠沈管に入れた 40 mL THY メディウム (30 g/L Bacto Todd Hewitt Broth (BD, Sunnyvale, CA, USA)、5 g/L Bacto Yeast Extract (BD)) と混合して、37°C で静置して培養した。OD₆₀₀ が 0.15~0.25 に達した後、上清 20 mL を新しい 50 mL 遠沈管に回収した。5800 \times g、4°C、30 分遠心し、上清を廃棄後、30 mL の THY メディウムを加えた。続けて、5800 \times g、4°C、30 分遠心し、上清を廃棄後、5 mL の 10% グリセロールを含有した THY メディウムで懸濁した。一定量を 1.5 mL チューブに分注して、-80°C で凍結保存した。

WU2 株ストックのタイターの確認

-80°C で保管した WU2 を室温で溶解し、THY メディウムを用いて 10 倍段階希釈 ($10^1 \sim 10^7$) を行った。その後、Sheep Blood Agar K (BD) に希釈した WU2 溶液を 200 μ L ずつプレートに滴下した。滴下した WU2 溶液がプレート上で乾燥したことを確認した後、37°C で一晩培養した。培養後、各希釈倍率におけるコロニー数を算出し、WU2 のタイターを確認した (約 3.0×10^9 colony forming unit (cfu) /mL)。

肺炎球菌の感染

-80°C で保管した WU2 を室温で溶解し、 3.3×10^8 cfu/mL となるように、PBS を加え、調整した。マウスに麻酔をかけた後、WU2 (3.3×10^8 cfu/mL) を片鼻 15 μ L ずつ、計 30 μ L (1.0×10^7 cfu/mouse) で経鼻投与した。感染後は、マウスの体重と生存率を 13 日間モニターした。また、初期体重に対する体重減少率が 75%未満となった日を死亡日とした。

In vivo における Dp1 の移行性評価

マウス耳介部に TAMRA-Dp1 \times 3 および TAMRA-Dp2 \times 3 を 3.5 nmol/mouse で投与した。投与 24 時間後に頸部リンパ節を回収し、200 μ g/mL Liberase TL と 10 U DNaseI を含む RPMI1640 溶液中で、37°C、1 時間振盪した。1 時間後、回収した頸部リンパ節は、5 mL シリンジのガスケット部を用いて破碎し、70 μ m セルストレーナーで濾過し、残渣を取り除いた。濾過した細胞は、600 \times g、4°C、5 分で遠心し、沈殿した細胞を 96 well U-bottomed culture plate に播種した。再度、600 \times g、4°C、5 分で遠心後、1% BSA/PBS で 1 回洗浄した。続いて、Fixable Viability Dye eFluor™ 780 を 0.1 v/v%、anti-CD16/CD32 抗体を終濃度 1 μ g/mL、APC anti-PDCA-1 抗体を終濃度 1 μ g/mL、PerCP/Cy5.5 anti-CD11c 抗体を終濃度 1 μ g/mL、BV421 anti-I-A/I-E 抗体を終濃度 1 μ g/mL、Alexa Fluor 700 anti-CD19 抗体を終濃度 1 μ g/mL となるよう 1% BSA/PBS で調整し、50 μ L/well で添加した。遮光条件下で、4°C、30 分静置した後、600 \times g、4°C、5 分で遠心し、上清を廃棄した。そして、1% BSA/PBS を用いて 2 回洗浄を行った後、1% BSA/PBS で 100 μ L/well で懸濁し、フローサイトメーターを用いて解析した。

E α ペプチドを用いた抗原提示評価

マウス耳介部に E α 、E α -Dp1 \times 3 および E α -Dp2 \times 3 を 18 nmol/mouse で投与し、投与 24、72 あるいは 120 時間後に頸部リンパ節を回収した。細胞は上記の通り、コラゲナー

ぜ処理後、粉碎し、濾過することで残渣を取り除いた。細胞は、 $600 \times g$ 、 4°C 、5分で遠心し、沈殿した細胞を 96 well U-bottomed culture plate に播種した。その後、ビオチン化 Y-ae 抗体を終濃度 0.25 ng/mL となるよう 1% BSA/PBS で調整し、 $50 \mu\text{L/well}$ で添加した。 4°C 、30 分で反応後、1% BSA/PBS で一度洗浄した。続いて、Fixable Viability Dye eFluor™ 780 を 0.1 v/v%、anti-CD16/CD32 抗体を終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ 、APC anti-PDCA-1 抗体を終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ 、PerCP/Cy5.5 anti-CD11c 抗体を終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ 、BV421 anti-I-A/I-E 抗体を終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ 、Alexa Fluor 700 anti-CD19 抗体を終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ 、PE/Cy7 anti-CD86 抗体を終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ 、PE-StreptAvidin を終濃度 $0.25 \mu\text{g/mL}$ となるよう 1% BSA/PBS で調整し、 $50 \mu\text{L/well}$ で添加した。遮光条件下で、 4°C 、30 分静置した後、 $600 \times g$ 、 4°C 、5 分で遠心し、上清を廃棄した。その後、1% BSA/PBS を用いて 2 回洗浄を行った後、1% BSA/PBS で $100 \mu\text{L/well}$ で懸濁し、フローサイトメーターを用いて解析した。

Dp1 のヌクレオリン (NCL) 蛋白質への結合性評価

White OptiPlate-96 にカルボネートバッファーで $10 \mu\text{g/mL}$ に希釈した NCL 蛋白質、RRM1、RRM2、RRM3、RRM4、GST を $50 \mu\text{L/well}$ で添加し、 4°C で一晩静置し固相化した。以降の操作は第一節の方法に準じた。

統計解析

第一節の実験材料と方法に準じた。

【実験結果】

PspA と樹状細胞標的化ペプチドとの融合蛋白質の作製

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、肺炎球菌の細胞表面蛋白質である PspA と Dp1 との融合蛋白質 (PspA-Dp1) を大腸菌により作製した。まず、PspA-Dp1 発現プラスミドを大腸菌に導入し、PspA-Dp1 蛋白質を発現させた。続いて、His trap カラム、ゲル濾過カラムを用いて蛋白質を精製した。精製した蛋白質の純度は、SDS-PAGE を用いて確認した (データ未記載)。また、精製した蛋白質中のエンドキシン量は 0.05 EU 以下であることを確認している (データ未記載)。

PspA と樹状細胞標的化ペプチドとの融合蛋白質を用いた免疫応答評価

融合する Dp1 の数を最適化するため、PspA の C 末端側に Dp1 を 1 個融合した PspA-Dp1、2 個融合した PspA-Dp1₂、そして 3 個融合した PspA-Dp1₃ を作製し、0、21 日に C57BL/6J マウスに皮下ワクチンした。その後、28 日目に血液を回収し、血漿中の PspA 特異的 IgG 抗体価を評価することで、融合する Dp1 の数がワクチン効果に与える影響を評価した。その結果、PspA-Dp1 や PspA-Dp1₂ と比較して、PspA-Dp1₃ のみが PspA 特異的な IgG 抗体産生を誘導することが明らかとなった (Fig. 6a)。また、Dp1 をタンデムにつなげることで、樹状細胞への結合能が向上するか評価するため、Dp1 あるいは Dp1₃ の樹状細胞への結合性を検討した。その結果、Dp1 を 3 個融合した Dp1₃ は、Dp1 と比較して、樹状細胞への結合性が顕著に上昇することが明らかとなった (Fig. 6b) つまり、効率的に免疫応答を誘導するには、抗原に Dp1 を 3 個融合する必要があることが認められた。そこで、以降の実験では、樹状細胞標的化ペプチドを 3 個連結させて検討した。

Dp1 以外の樹状細胞標的化ペプチドでもワクチン効果を誘導することが出来るか検討した。その結果、PspA-Dp2₃ や PspA-Dp3₃ では、PspA 特異的な IgG 抗体産生は認められず、取得した樹状細胞標的化ペプチドの中でも Dp1 だけが免疫応答を誘導出来ることが明らかとなった (Fig. 6c)。以上の結果より、Dp1 はワクチン抗原に対する IgG 抗体産生を誘導出来る抗原送達キャリアであることが実証された。

次に、Dp1 によって誘導される抗体価と、既存のアジュバントによって誘導される抗体価の強さを比較するため、0、21 日目に C57BL/6J マウスに、PspA とアジュバントまたは PspA-Dp1₃ を投与した (Fig. 6d)。その結果、PspA 単独では、PspA 特異的な IgG 抗体産生の誘導はされなかったものの、PspA を alum や CpG 核酸と共投与すると、PspA 単独と比較して、PspA 特異的 IgG 抗体価が有意に上昇した。また PspA-Dp1₃ では、PspA 単独と比べて、アジュバントを用いなくとも PspA 特異的な IgG 抗体産生が有意に上昇した。

しかし、PspA-Dp1×3 は、PspA と alum もしくは PspA と CpG 核酸と共投与した群と比較すると、PspA 特異的な IgG 抗体産生が有意に減少していた。また同時に、Dp1×3 に対する抗体価についても評価したところ、Dp1×3 に対する IgG 抗体は認められなかった (Fig. 6e)。したがって、Dp1 は抗原性が極めて低いと考えられることから、安全に、かつアジュバントを添加せずともワクチン効果を誘導出来る抗原送達キャリアであることが示された。

続いて、マウス種が異なった場合でも、Dp1 が抗原送達キャリアとしての効果を発揮するか評価するため、BALB/c マウスを用いて同様の検討を行った (Fig. 6f)。その結果、C57BL/6J マウスの時と同様に、PspA 単独と比較して、PspA と alum 共投与で PspA 特異的な IgG 抗体産生が有意に上昇した。また、PspA-Dp1×3 は、PspA 単独と比較して、アジュバントなしでも PspA 特異的な IgG 抗体産生が上昇することが認められた。また、BALB/c マウスにおいて、PspA-Dp1×3 により誘導される IgG 抗体価は、PspA と alum 共投与で誘導される IgG 抗体価と同等であることが明らかとなった。したがって、Dp1 による免疫誘導に種差は関与しないことが示された。

肺炎球菌による感染防御効果

次に、肺炎球菌への感染防御効果を評価した。C57BL/6J マウスに、0、21 日に PspA 単独、PspA とアジュバント、PspA-Dp1×3 および PspA-Dp3×3 をワクチンし、最終投与の 10 日後、肺炎球菌を経鼻投与で感染させ、体重および生存率を評価した (Fig. 7a、b)。その結果、肺炎球菌感染後、コントロール群では、急激な体重減少が起こり、感染 6 日目までに全てのマウスが死亡した。また、PspA や PspA-Dp3×3 ワクチン群は、コントロール群と比較すると、生存率の改善が認められたものの、肺炎球菌感染 4 日目までに急激な体重減少が起こり、半数のマウスが死亡した。一方で、PspA と alum や CpG 核酸をワクチンした群では、感染後、一時的に体重が減少したものの、すぐに体重が 100%まで回復した。また、ほぼ全てのマウスが生存していたことから、肺炎球菌への感染防御効果が認められた。PspA-Dp1×3 ワクチン群においては、PspA と alum や CpG 核酸ワクチン群と同様に、PspA や PspA-Dp3×3 ワクチン群と比較して、体重減少の抑制と生存率の改善が認められたことから、PspA-Dp1×3 はアジュバントがなくとも、高い感染防御効果を誘導できることが明らかとなった。

PspA-Dp1×3 とアジュバントとの併用による免疫応答の増強

PspA-Dp1×3 とアジュバントの共投与によって、ワクチン効果がさらに増強されるか評価した (Fig. 8a)。また AddaVax は、製品付属のマニュアル通り、投与体積の半量を投与し

た。その結果、PspA 単独投与と比較して、PspA を alum、CpG 核酸や AddaVax と共投与することで、PspA 特異的 IgG 抗体価が有意に上昇した。また PspA-Dp1×3 では、PspA-Dp1×3 単独と比較して、CpG 核酸や AddaVax との共投与で、PspA 特異的 IgG 抗体価が有意に上昇することが明らかとなった。さらに、PspA-Dp1×3 単独と CpG 核酸の共投与は、PspA と CpG 核酸の共投与と比較して、PspA 特異的 IgG 抗体価が有意に上昇することが示された。しかし、PspA-Dp1×3 と alum の共投与では、PspA-Dp1×3 単独や PspA と alum 共投与と比較して、PspA 特異的 IgG 抗体価に有意な差は認められなかった。続いて、誘導される抗体のサブクラスを評価したところ、PspA と alum の共投与では、PspA 単独投与と比較して、IgG1 が有意に上昇した。また、PspA-Dp1×3 と CpG 核酸との共投与では、PspA-Dp1×3 単独や PspA と CpG 核酸の共投与と比較して、IgG2c が上昇することが明らかとなった。また、PspA と AddaVax との共投与では、PspA 単独投与と比較して、IgG1、IgG2c が有意に上昇した。さらに、PspA-Dp1×3 と AddaVax との共投与では、PspA-Dp1×3 単独投与と比較して、IgG2c が有意に上昇することが認められた。また同時に、PspA-Dp1×3 とアジュバントの共投与によって、Dp1×3 に対する抗体産生が誘導されるか評価したところ、Dp1×3 に対する IgG 抗体は認められなかった (Fig. 8b)。したがって、PspA-Dp1×3 はアジュバントの中でも CpG 核酸との共投与で、ワクチン効果をより増強することが示された。

続いて、PspA-Dp1×3 が長期的な抗体価に与える影響を評価した。まず C57BL/6J マウスに、0、21 日目に PspA と CpG 核酸、PspA-Dp1×3 または PspA-Dp1×3 と CpG 核酸を投与した。その後、5 か月間に渡って、毎月血液を回収し、血漿中の PspA 特異的な IgG 抗体産生を評価することで、時間経過と抗体産生の影響を評価した (Fig. 9a)。その結果、PspA と CpG 核酸共投与群では、PspA 特異的な IgG 抗体産生は時間の経過で減少していくのに対して、PspA-Dp1×3 単独群では、長期に渡って、IgG 抗体産生が持続する傾向がみられた。さらに、PspA-Dp1×3 と CpG 核酸共投与では、PspA と CpG 核酸共投与と比較して、長期に渡って PspA 特異的な IgG 抗体産生が有意に持続していることが明らかとなった。したがって、Dp1 は長期的な抗体産生にも影響を与えることが示唆された。

次に、PspA-Dp1×3 と CpG 核酸を併用した際の T 細胞応答を評価した。まず、C57BL/6J マウスに、0、21 日目に PspA-Dp1×3 と CpG 核酸を投与後、28 日目に脾臓を回収した。その後、PspA 蛋白質と脾臓細胞を 1 日間共培養することで、PspA 特異的 T 細胞が産生する interferon- γ (IFN- γ) を評価した (Fig. 9b)。その結果、PspA 単独と比較して、PspA と CpG 核酸を共投与しても、IFN- γ の上昇は認められなかった。一方で、PspA-Dp1×3 と CpG 核酸を共投与すると、PspA-Dp1×3 単独と比較して、IFN- γ が有意に上昇することが明

らかとなった。つまり、PspA-Dp1×3 と CpG 核酸の共投与によって、抗体産生能の向上だけでなく、T 細胞応答もより活性化出来ることが認められた。

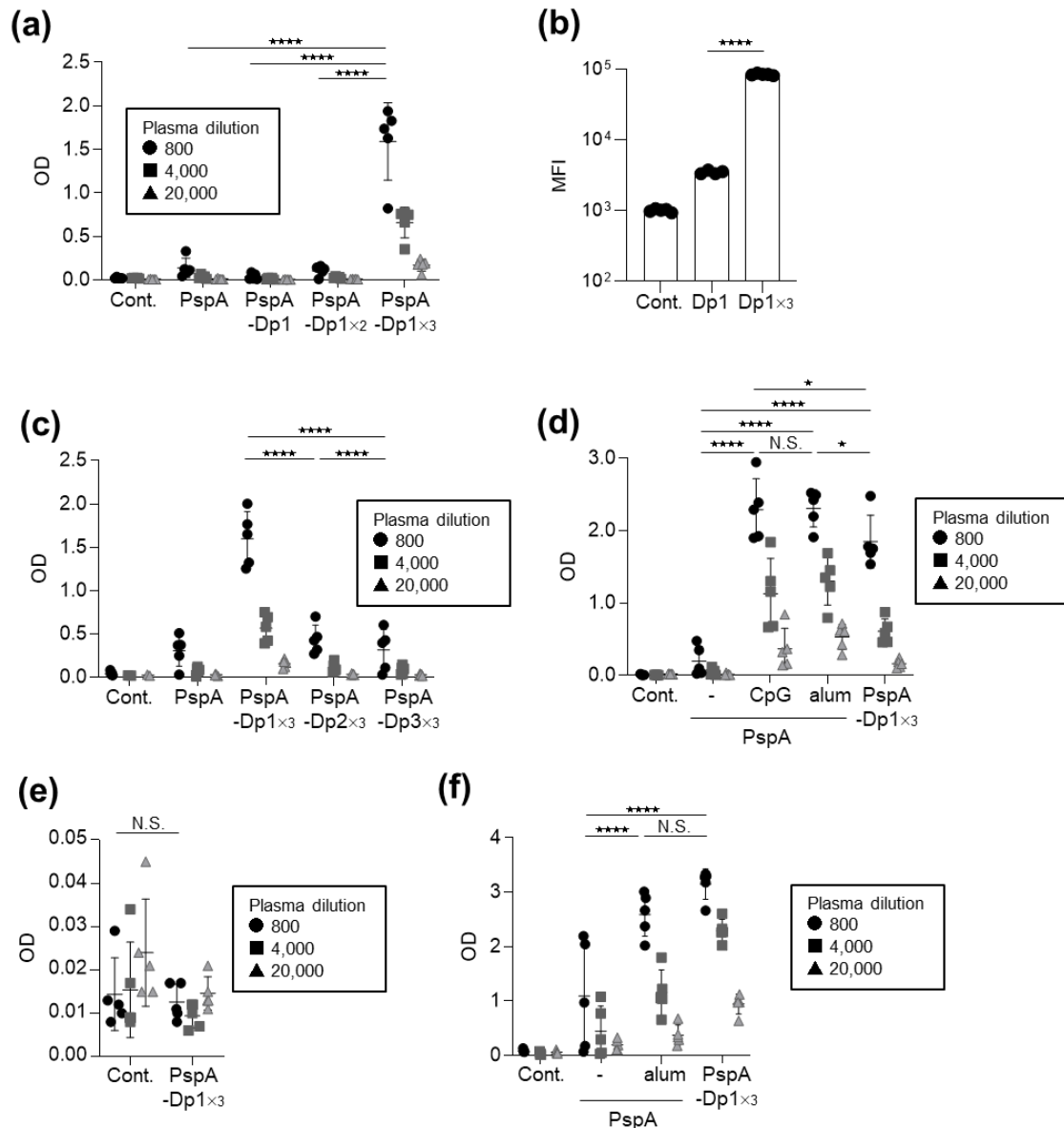


Figure 6. Potential of Dp1 as an antigen-delivery carrier for vaccine against *Streptococcus pneumoniae*. (a) C57BL/6J mice were immunized with 1 μ g PspA alone, or 1 μ g PspA-Dp1 (which have one, two, or three Dp1 at the C-terminal respectively). Plasma levels of PspA-specific IgG were evaluated 7 days after the second immunization using ELISA. (b) The binding of 10 μ g/mL biotin-labelled Dp1 peptide (which have one, or three Dp1 at the C-terminal respectively) to DC2.4 cells was detected using flow cytometry using fluorescent-labelled streptavidin. (c, d, e) C57BL/6J mice or (f) BALB/c mice were immunized with 1 μ g PspA alone, 1 μ g PspA-Dp1 \times 3, 1 μ g PspA-Dp2 \times 3, 1 μ g PspA-Dp3 \times 3, PspA plus 10 μ g CpG ODN or 1 μ g PspA plus 50 μ g alum. Plasma levels of (a, c, d, f) PspA-specific IgG and (e) Dp1 \times 3-specific IgG were evaluated 7 days after the second immunization using ELISA. We used 800- (●), 4,000- (■), and 20,000- (▲) fold-diluted plasma samples. $n = 5$. Data are means \pm SD. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ as indicated by Tukey's test. N.S.: not significant. Significant differences were analyzed only in the 800-fold-diluted plasma samples.

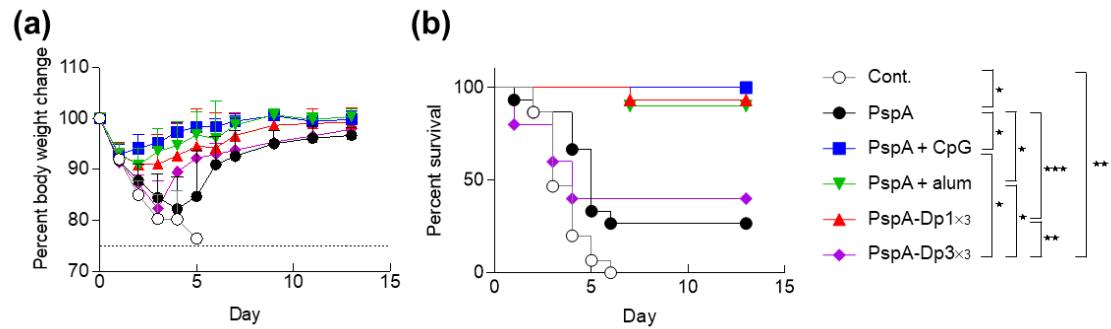


Figure 7. Increased protection against *Streptococcus pneumoniae* infection by Dp1 (a, b) At 10 days after the second immunization, C57BL/6J mice were challenged with *Streptococcus pneumoniae*. Percentage change in (a) initial body weight and (b) survival were monitored after challenge. (a, b) $n = 5-15$. (b) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ as indicated by comparing Kaplan-Meier curves using the log-rank test. We defined the day that the mice had less than 75% body weight to the initial body weight as the day of death.

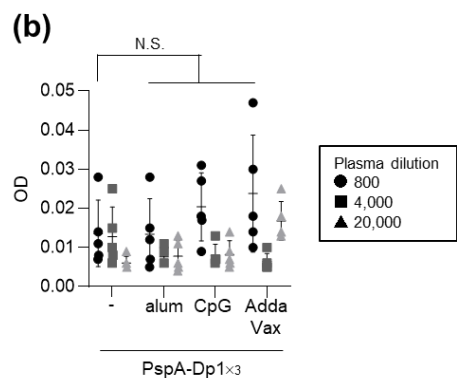
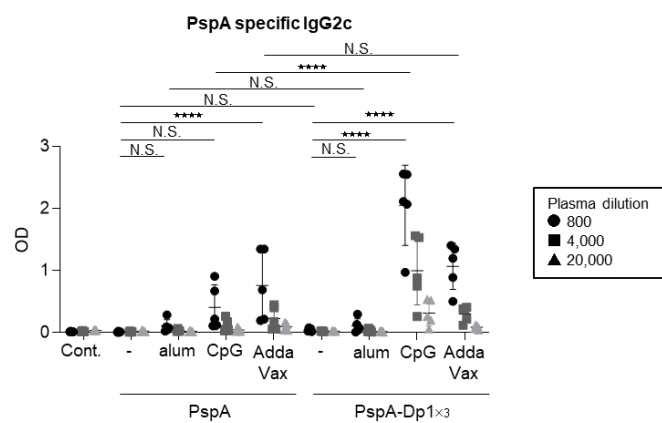
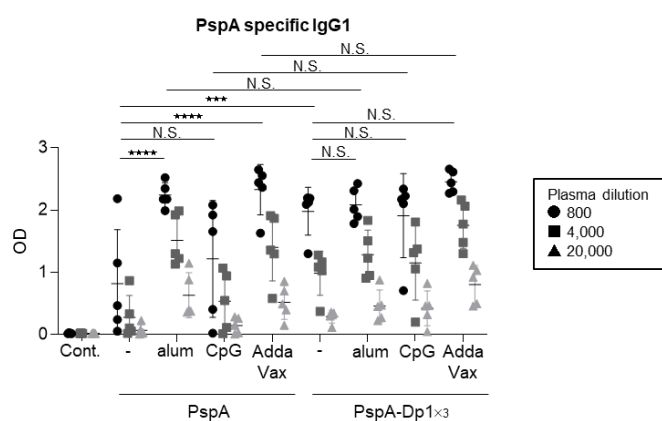
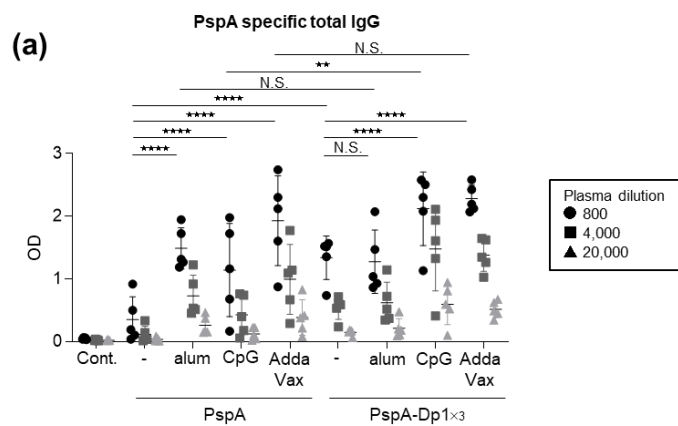


Figure 8. Activation of immune response by coadministration of PspA-Dp1×3 and adjuvant. C57BL/6J mice were immunized with 1 µg PspA alone, 1 µg PspA plus 50 µg alum, 1 µg PspA plus 10 µg CpG ODN, 1 µg PspA plus AddaVax, 1 µg PspA-Dp1×3, 1 µg PspA-Dp1×3 plus 50 µg alum, or 1 µg PspA-Dp1×3 plus 10 µg CpG ODN or 1 µg PspA-Dp1×3 plus AddaVax. Plasma levels of (a) PspA-specific IgG and (b) Dp1×3-specific IgG were evaluated 7 days after the second immunization using ELISA. We used 800- (●), 4,000- (■), and 20,000- (▲) fold-diluted plasma samples. $n = 5$. Data are means \pm SD. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ as indicated by Tukey's test. N.S.: not significant. Significant differences were analyzed only in the 800-fold-diluted plasma samples.

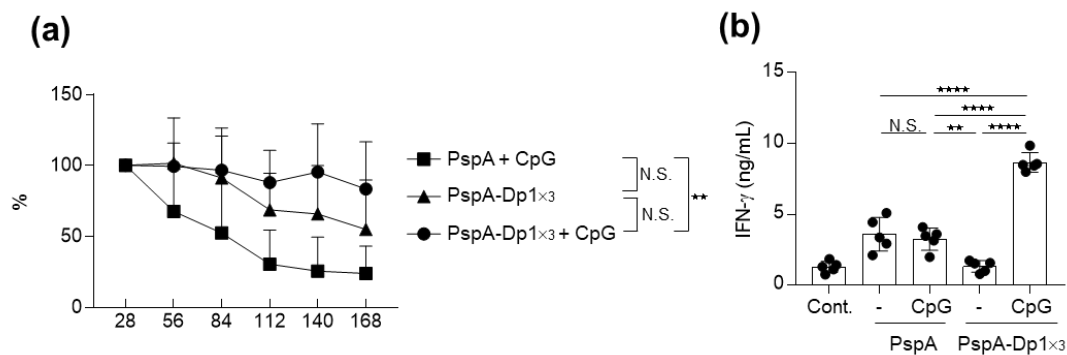


Figure 9. PspA-Dp1×3 plus CpG ODN coadministration for long-term antibody production and T cell response. Mice were immunized with 1 µg PspA or 1 µg PspA-Dp1×3, with or without 10 µg CpG ODN. (a) Several months later after the second immunization, the level of PspA-specific total IgG in plasma was evaluated using ELISA. We used 800-fold-diluted plasma samples. (b) At 7 days after the second immunization, splenocytes obtained from immunized mice were incubated in the presence of PspA in vitro and the level of IFN-γ in the supernatant was measured after 1 day. (a, b) $n = 5$. Data are means \pm SD. $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$ as indicated by Tukey's test. N.S.: not significant.

Dp1×3 の汎用性評価

次に抗原送達キャリアとしての Dp1 の汎用性を評価するため、OVA の MHC クラス II エピトープペプチドである OTII ペプチドを抗原として用いて、ペプチド抗原でもワクチン効果を誘導出来るか評価した。一般に、ペプチドに対する抗体は作られにくい、OTII ペプチドに対しては、抗体が作られることが知られており、この抗体は OVA に対しても反応することが出来る。そこで、OTII と Dp1 を融合した融合ペプチド (OTII-Dp1×3) を化学合成し、マウスに投与することで、OVA 特異的な免疫応答を誘導出来るか検討した。

まず C57BL/6J マウスに、0、10 日目に OTII 単独、OTII と CpG 核酸または OTII-Dp1×3 を投与し、17 日目に血液を回収することで、血漿中の OVA 特異的な IgG 抗体産生について評価した (Fig. 10a)。その結果、OTII 単独だけでなく、OTII と CpG 核酸を共投与しても OVA 特異的な IgG 抗体産生は全く認められなかった。一方で、OTII-Dp1×3 は、OTII 単独および OTII と CpG 核酸と比較して、アジュバントを用いなくとも、OVA 特異的な IgG 抗体産生が有意に上昇することが明らかとなった。

続いて、Dp1 以外の樹状細胞標的化ペプチドでも OVA 特異的な IgG 抗体産生を誘導出来るか検討した。その結果、PspA での検討と同様に、Dp1 以外の樹状細胞標的化ペプチドでは、OVA 特異的な IgG 抗体産生が認められず、OTII-Dp1×3 だけが、OVA 特異的な IgG 抗体産生を誘導し得ることが判明した (Fig. 10b)。また、OTII-Dp1×3 と CpG 核酸を共投与したところ、OTII-Dp1×3 単独と比較して、OVA 特異的な total IgG および IgG2c が有意に上昇することが認められた (Fig. 10c)。したがって、Dp1 は様々な抗原に用いることのできる抗原送達キャリアであり、ペプチド抗原を用いた場合でも、アジュバントとの併用で更に強い免疫応答を誘導出来ることが示された。

Dp1×3 による自然免疫の活性化評価

続いて、Dp1 自体が自然免疫活性化に伴うアジュバント活性を有するか評価するため、PspA と Dp1×3 を融合せずに投与し、PspA 特異的な IgG 抗体産生に与える影響を評価した。まず、0、10 日目に C57BL/6J マウスに、PspA と Dp1×3 を共投与し、17 日目に血液を回収することで、血漿中の PspA 特異的な IgG 抗体価を評価した。その結果、PspA 単独と比較して、PspA と Dp1×3 を共投与しても PspA 特異的な IgG 抗体産生は誘導されなかった (Fig. 11a)。また、0、10 日目に C57BL/6J マウスに、OVA と PspA-Dp1×3 を共投与し、血漿中の OVA 特異的な IgG 抗体価について評価した。その結果、OVA 単独と比較して、OVA と PspA-Dp1×3 を共投与しても、OVA 特異的な IgG 抗体産生は上昇しなかった (Fig. 11b)。したがって、Dp1 自体はアジュバント活性を有しておらず、抗原と Dp1 を

融合することで初めて抗原特異的な免疫応答を誘導出来ることが明らかとなった。

続いて、*in vitro* においても同様に、Dp1 自体が自然免疫活性化に伴うアジュバント活性を有するか評価するため、OTII-Dp1 \times 3 と BMDC を共培養し、24 時間後に産生されるサイトカインについて評価した。その結果、OTII と CpG 核酸を添加した群では、IL-6 や IL-12 p40 が産生される一方で、OTII や OTII-Dp1 \times 3、OTII-Dp2 \times 3 ではサイトカイン産生が認められなかったことから、Dp1 は *in vitro* においても、免疫細胞を直接活性化しないことが認められた (Fig. 12)。

Dp1 \times 3 のキャリア能検討

Dp1 による抗原送達が免疫応答に関与しているか評価するため、OTII-Dp1 \times 3 と Dp1 \times 3 もしくは Dp5 \times 3 を共投与し、OVA 特異的 IgG 抗体価に与える影響を評価した。その結果、Dp5 \times 3 の共投与群と比較して、Dp1 \times 3 の共投与群で、OVA 特異的な IgG 抗体産生が顕著に減少することが明らかとなった (Fig. 13)。つまり、共投与した Dp1 \times 3 が OTII-Dp1 \times 3 と競合することで、OTII を樹状細胞へ効率的に送達できなくなり、その結果、OVA 特異的な IgG 抗体産生が減少したと考えられた。したがって、Dp1 による抗原送達が免疫応答の誘導には重要であることが明らかとなった。

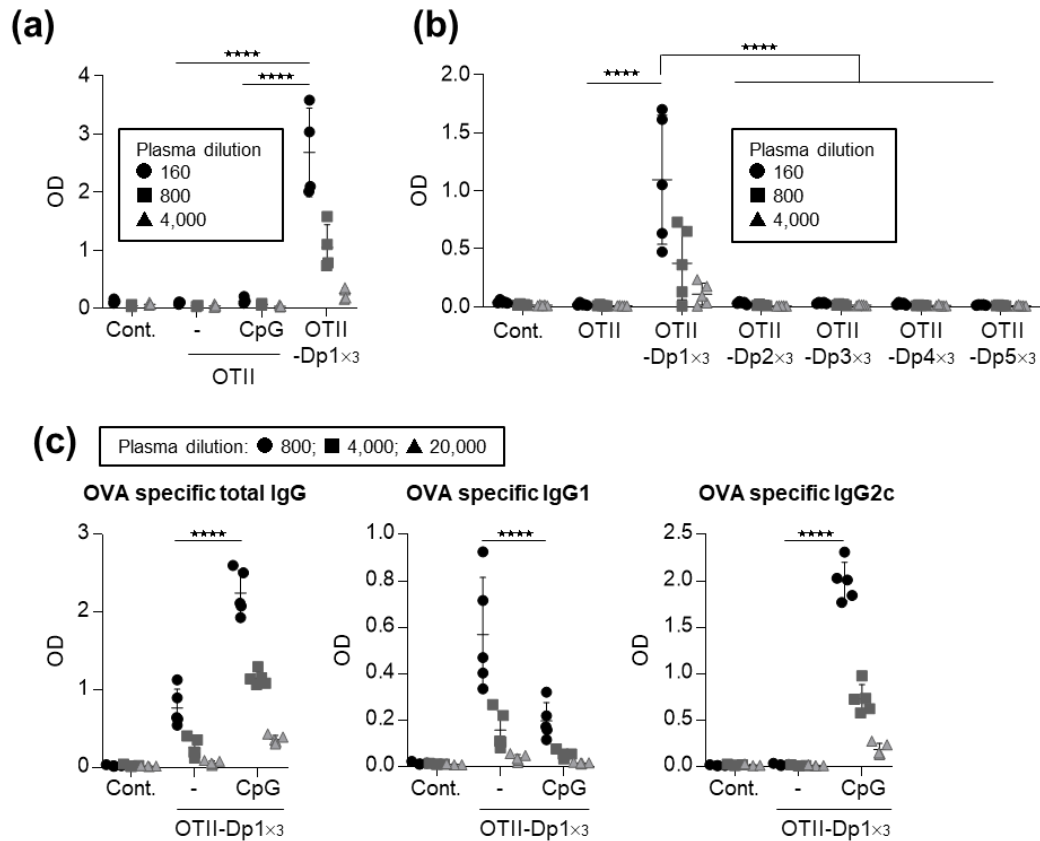


Figure 10. Potential of Dp1 as an antigen-delivery carrier for vaccine against OTII antigens. (a, b, c) Mice were immunized with 1.1 nmol (equivalent to 2 μ g) OTII alone, 1.1 nmol (equivalent to 2 μ g) OTII plus 50 μ g CpG ODN, 1.1 nmol (equivalent to 5 μ g) OTII-Dp1 \times 3, 1.1 nmol (equivalent to 5 μ g) fusion OTII with the other peptides or 1.1 nmol (equivalent to 5 μ g) OTII-Dp1 \times 3 plus 50 μ g CpG ODN. Plasma levels of OVA-specific IgG were evaluated 7 days after the second immunization using ELISA. We used (a, b) 160- (●), 800- (■), and 4,000- (▲) fold-diluted, or (c) 800- (●), 4,000- (■), and 20,000- (▲) fold-diluted plasma samples. (a) $n = 4$ (b, c) $n = 5$. (a, b, c) Data are means \pm SD. **** $P < 0.0001$ as indicated by Tukey's test. N.S.: not significant. Significant differences were analyzed only in the (a, b) 160-fold-diluted or (c) 800-fold-diluted plasma.

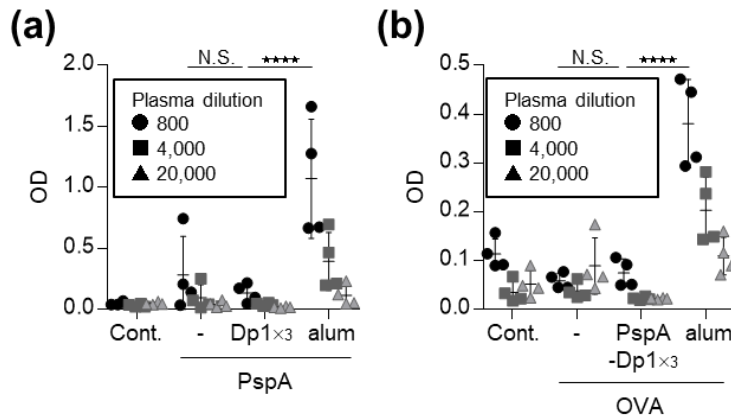


Figure 11. Evaluation of adjuvant activity by Dp1 in vivo. (a) Mice were immunized with 1 µg PspA alone, a mixture of 1 µg PspA and 1 µg free Dp1x3, or 1 µg PspA plus 250 µg alum, and the level of PspA-specific IgG in the plasma samples was evaluated at 7 days after the second immunization using ELISA. (b) Mice were immunized with 10 µg OVA alone, 10 µg OVA plus 1 µg PspA-Dp1x3 or 10 µg OVA plus 250 µg alum, and the level of OVA-specific IgG in the plasma samples was evaluated 7 days after the second immunization using ELISA. We used 800- (●), 4,000- (■), and 20,000- (▲) fold-diluted plasma samples. (a, b) $n = 4$. Data are means \pm SD. **** $P < 0.0001$ as indicated by Tukey's test. N.S.: not significant. Significant differences were analyzed only in the 800-fold-diluted plasma samples.

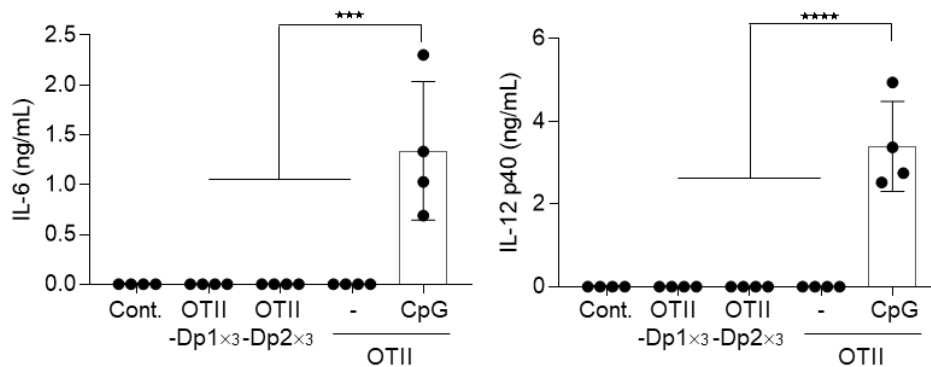


Figure 12. Evaluation of adjuvant activity by Dp1 in vitro. BMDCs were treated with 11.3 nM (equivalent to 50.9 µg/mL) OTII-Dp1x3, 11.3 nM (equivalent to 46.3 µg/mL) OTII-Dp2x3, 11.3 nM (equivalent to 20 µg/mL) OTII, or 11.3 nM (equivalent to 20 µg/mL) OTII plus 10 µg/mL CpG ODN for 24 h, and the levels of IL-6 and IL-12 p40 in the supernatants were determined using ELISA. $n = 4$. Data are means \pm SD. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ as indicated by Tukey's test. N.S.: not significant.

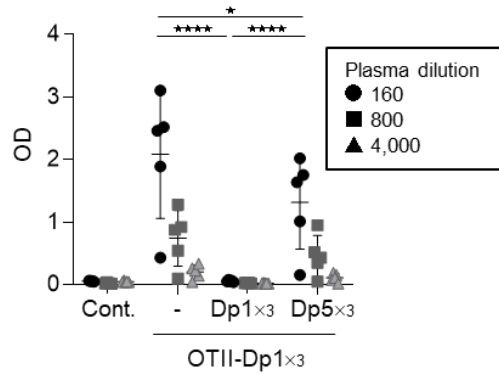


Figure 13. Importance of Dp1 and antigen fusion. Mice were immunized with 1.1 nmol (equivalent to 5 μ g) OTII-Dp1 \times 3, 1.1 nmol (equivalent to 5 μ g) OTII-Dp1 \times 3 plus 4 nmol (equivalent to 100 μ g) free Dp1 \times 3 or 1.1 nmol (equivalent to 5 μ g) OTII-Dp1 \times 3 plus 4 nmol (equivalent to 100 μ g) free Dp5 \times 3, and the level of OVA-specific IgG in the plasma samples was evaluated at 7 days after the second immunization using ELISA. We used 160- (●), 800- (■), and 4,000- (▲) fold-diluted plasma samples. $n = 5$. Data are means \pm SD. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ as indicated by Tukey's test. N.S.: not significant. Significant differences were analyzed only in the 160-fold-diluted plasma samples.

抗原の移行性評価

Dp1 が抗原提示細胞への抗原の移行量を向上させているか評価するため、Dp1 を蛍光色素 TAMRA で修飾した TAMRA-Dp1 \times 3 を作製し、C57BL/6J マウスの耳介部に投与した。1 日後、所属リンパ節を回収し、樹状細胞を含む抗原提示細胞への移行性を、フローサイトメーターを用いて評価した。また、抗原提示細胞のゲーティングは Fig.14a に示した。その結果、コントロール群や TAMRA-Dp2 \times 3 と比較して、TAMRA-Dp1 \times 3 で、conventional dendritic cell (cDC) や migratory dendritic cell (mDC) を含めた全ての抗原提示細胞において、TAMRA の取り込み細胞数が有意に増加していることが明らかとなった (Fig. 14b)。したがって、Dp1 は抗原提示細胞への移行性に優れることが明らかとなった。

抗原提示および副刺激分子評価

次に、E α ペプチドを用いて、抗原提示細胞における抗原提示を評価した。E α ペプチドは、MHC クラス II によって提示されるペプチドであり、E α と I-Ab の複合体を認識する Y-ae 抗体を用いることで、MHC クラス II を介した抗原提示を評価することができる⁵⁶。そこで、E α 、E α -Dp1 \times 3 または E α -Dp2 \times 3 をマウス耳介部より投与し、経時的に頸部リンパ節を回収することで、各細胞における抗原提示の経時変化を評価した (Fig. 15a)。その結果、E α や E α -Dp2 \times 3 においては、どの時点でも抗原提示は認められなかったが、E α -Dp1 \times 3 では、各抗原提示細胞で抗原提示の上昇が認められた。特に cDC では、投与 1 日後で抗原提示の上昇が顕著であった。また、投与から時間が経過するにつれ、mDC における抗原提示が顕著に上昇した。B 細胞とマクロファージにおいては、投与 5 日後のみ有意な上昇が認められた。したがって Dp1 は、樹状細胞を含めた抗原提示細胞への移行性を向上させることで、抗原提示細胞における抗原提示を増強可能であることが明らかとなった。また、投与 3 日後の所属リンパ節における各抗原提示細胞の共刺激分子の発現についても評価した。その結果、E α と CpG 核酸共投与群と比較して、E α 、E α -Dp1 \times 3 または E α -Dp2 \times 3 を投与しても CD86 の発現増強は認められなかった (Fig. 15b)。つまり、Dp1 は共刺激分子の発現を増強することなく、免疫応答を誘導出来ることが明らかとなった。

Dp1 \times 3 における NCL への寄与

Dp1 をタンデムにつなげた際の組換え NCL 蛋白質への結合性を評価した (Fig. 16a)。その結果、Dp1 \times 3 は、コントロール蛋白質である OVA と比較して、NCL 蛋白質に有意に結合することが認められた一方で、Dp2 \times 3 は、OVA にも NCL にも結合しないことが明らかとなった。さらに、Dp1 \times 3 の NCL の認識部位について評価した。これまでの報告で、NCL は

N 末端ドメイン、RNA 認識モチーフ (RRM) を含む中間領域、C 末端のグリシンおよびアルギニンに富んだ (GAR) ドメインからなり、このうち中間領域は、さらに 4 つの RRM ドメインから構成されていることが知られている⁵⁷。そこで、RRM ドメイン間における結合の寄与を評価するため、AS1411、MS-3、Dp1×3 が、どの RRM ドメインに結合するか評価した (Fig. 16b)。その結果、AS1411、MS-3、Dp1×3 はいずれも、コントロール蛋白質である GST と比較して、全ての RRM ドメインに有意に結合することが明らかとなった。また、RRM ドメインの中でも、AS1411 は、RRM3 および RRM4 に対してより強く結合し、MS-3 は、RRM1 および RRM3 に対してより強く結合することが認められた。一方で、Dp1×3 は、RRM ドメインの中でも RRM2 に対してより強く結合することが明らかとなった。したがって、NCL に対するアプタマーや抗体と Dp1×3 は、それぞれ NCL への認識部位が異なることが認められた。

In vivo における NCL の寄与

次に、*in vivo* における NCL の寄与を評価するため、-1、0、1 日目に C57BL/6J マウスに AS1411 または CRO を投与し、0 日目に PspA-Dp1×3 を投与した。その後、20 日目に血液を回収し、血漿中の PspA 特異的な IgG 抗体産生を評価した。その結果、PspA-Dp1×3 と CRO 共投与群と比較して、PspA-Dp1×3 と AS1411 共投与群で、PspA 特異的な IgG 抗体産生が有意に減少することが明らかとなった (Fig. 16c)。したがって、Dp1 は樹状細胞表面上の NCL をターゲットすることで、免疫応答を誘導していることが明らかとなった。

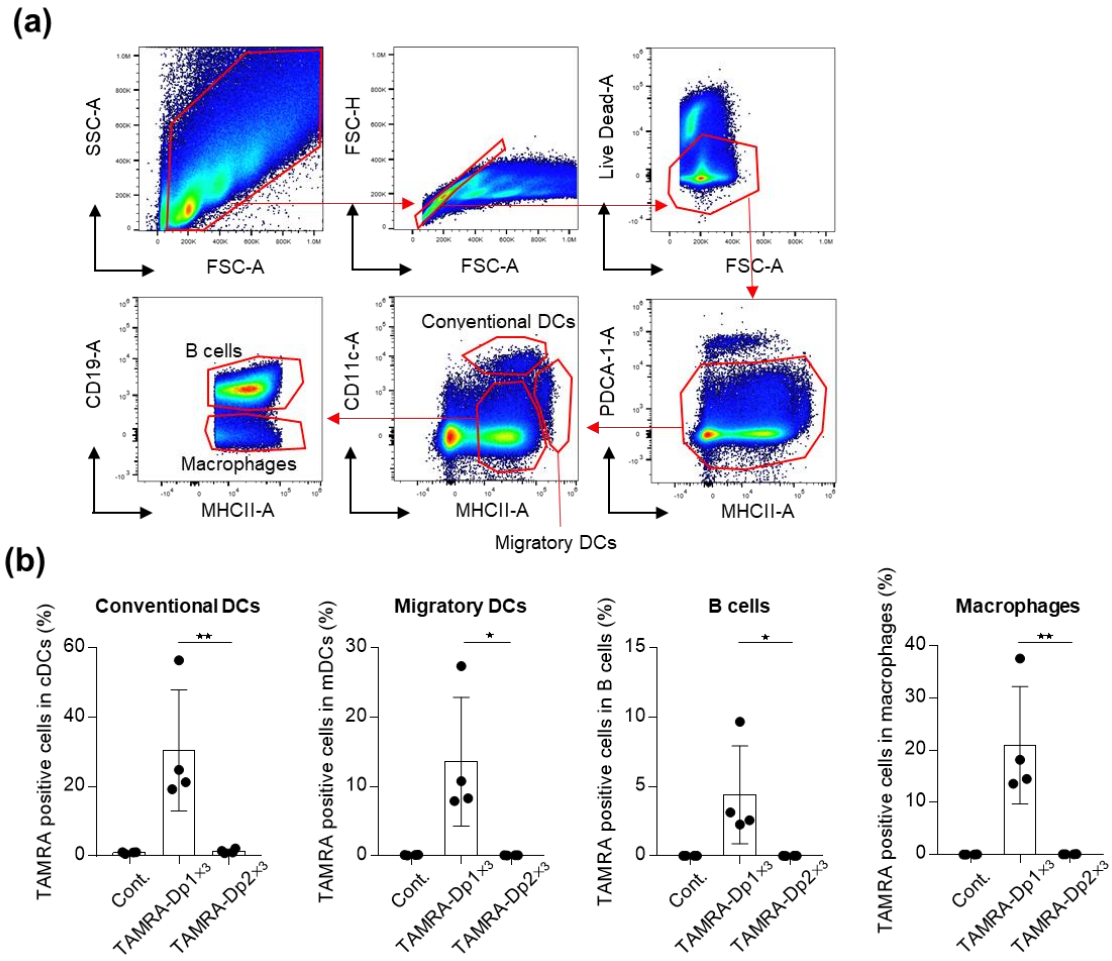


Figure 14. Evaluation of migration of fluorescent-labelled Dp1 in mice. (a) A gating strategy for analyzing immune cells in draining lymph nodes using flow cytometry. (b) Mice were treated with 3.5 nmol (equivalent to 10 μ g) fluorescent-labelled Dp1x3 or 3.5 nmol (equivalent to 8.6 μ g) fluorescent-labelled Dp2x3 via the ear pinna. Fluorescent-positive Conventional DCs, Migratory DCs, B cells, and macrophages in draining lymph nodes were measured 24 h after treatment using flow cytometry. (b) $n = 4$. (b) Data are presented as means \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as indicated by Tukey's test.

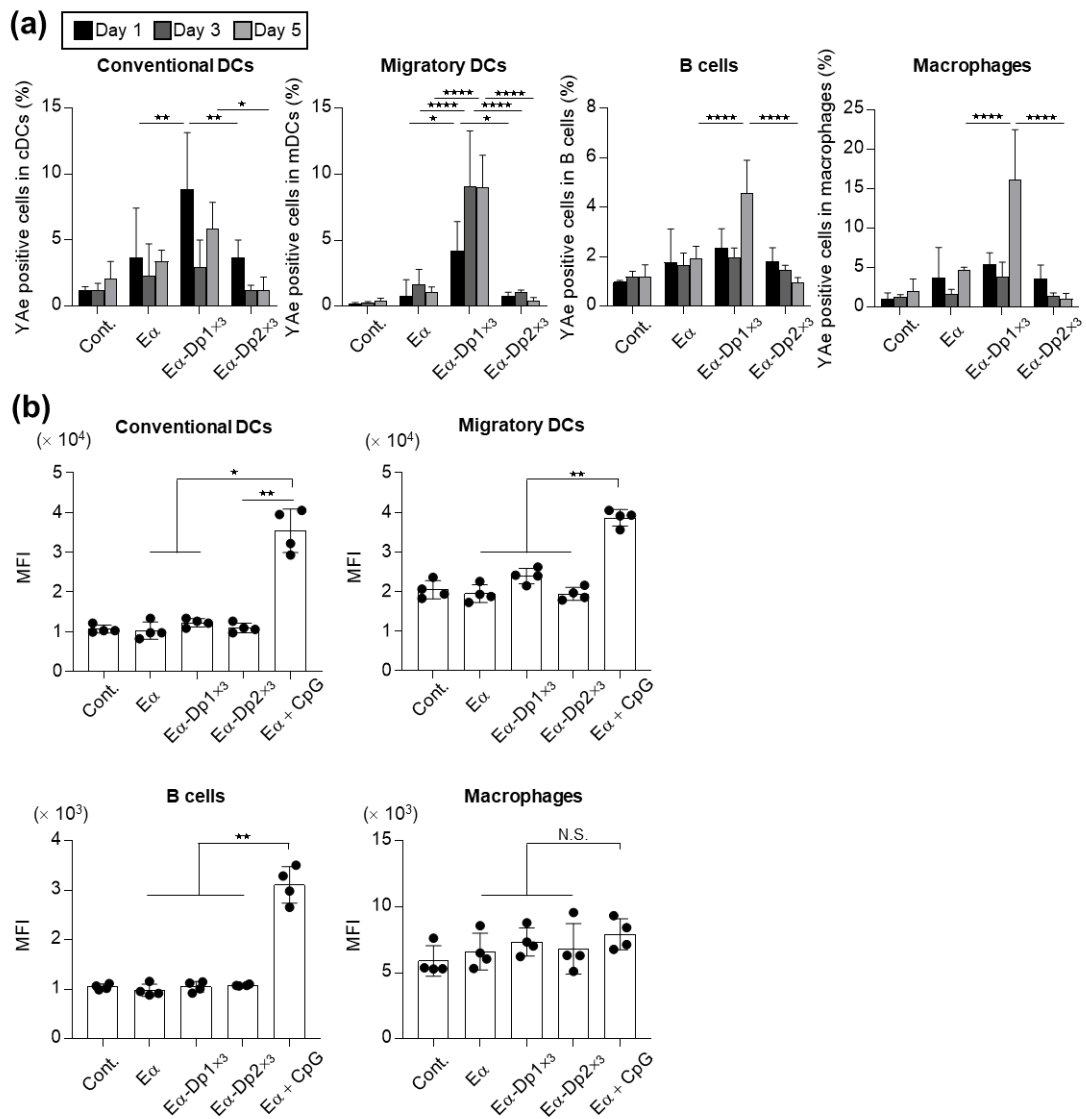


Figure 15. Efficient antigen-presentation by Dp1 in mice. (a,b) Mice were treated with 18 nmol (equivalent to 30 μ g) E α only, 18 nmol (equivalent to 79 μ g) E α -Dp1 \times 3, 18 nmol (equivalent to 72 μ g) E α -Dp2 \times 3, or 18 nmol (equivalent to 30 μ g) E α plus 50 μ g CpG ODN via the ear pinna. (a) The presence of YAc positive cDCs, mDCs, B cells, and macrophages in draining lymph nodes was examined 1, 3, and 5 days after treatment using flow cytometry. (b) The expression of CD86 on cDCs, mDCs, B cells, and macrophages was evaluated 3 days after treatment using flow cytometry. (a, b) $n = 4$. Data are presented as means \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ as indicated by Tukey's test. N.S.: not significant.

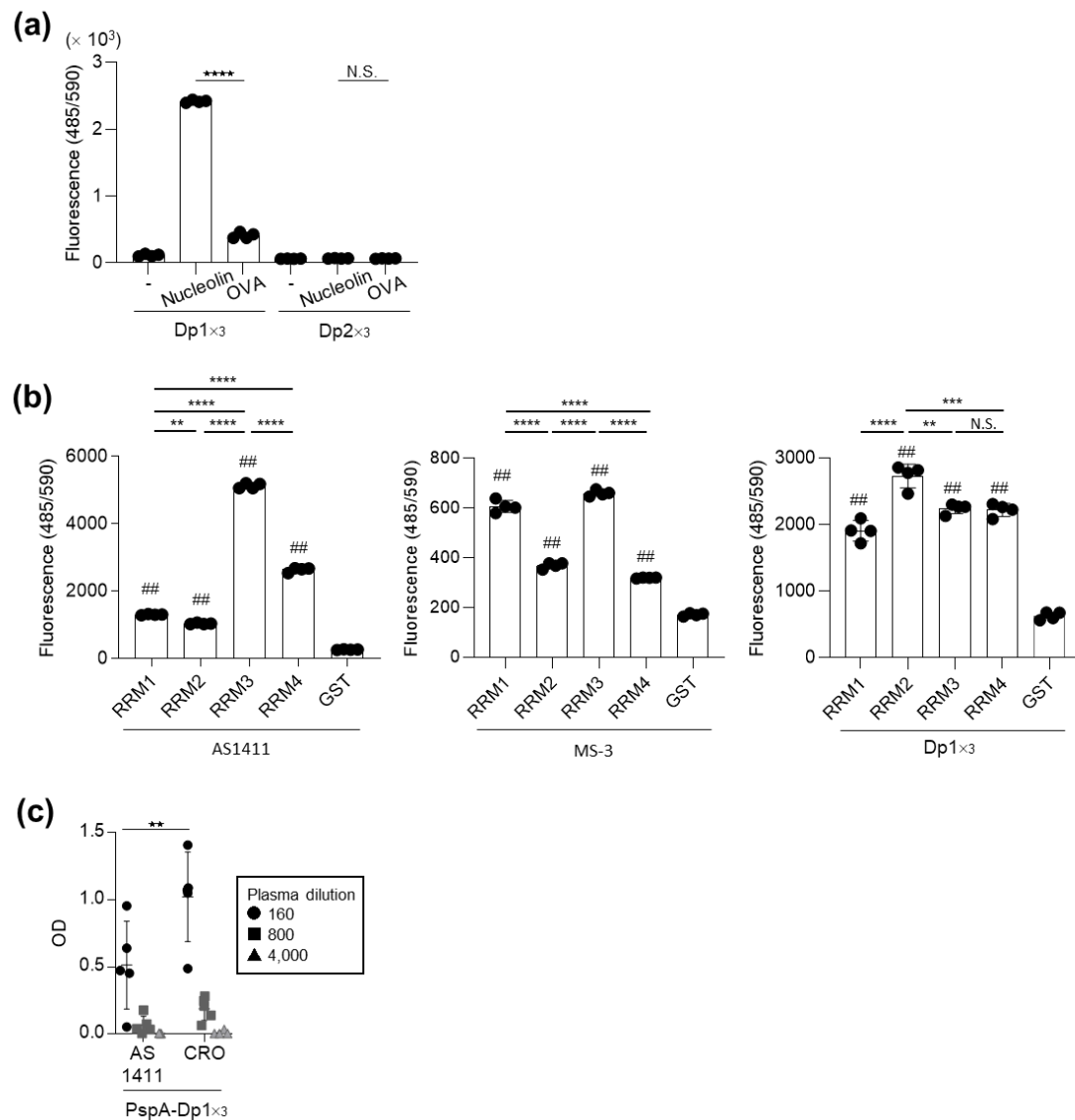


Figure 16. In vitro and In vivo evaluation of NCL contribution. (a, b) The binding of 10 μ g/mL biotin-labelled Dp1 \times 3, biotin-labelled Dp2 \times 3, FITC-AS1411 or PE-MS-3 to Nucleolin, OVA, RRM1, RRM2, RRM3, RRM4, or GST protein was detected using fluorescent-labelled streptavidin. (c) Mice were immunized with 1 μ g PspA-Dp1 \times 3 plus 5 nmol AS1411 or CRO, and the level of PspA-specific IgG in plasma was determined 20 days after the first immunization using ELISA. $n = 5$. Data are means \pm SD. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ as indicated by Student's t -test. N.S.: not significant. (b) ## $P < 0.0001$ vs. GST group by Tukey's test.

【考察】

本節では、Dp1 ペプチド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であるか評価した。その結果、Dp1 と肺炎球菌由来の PspA を融合させることによって、PspA 特異的な IgG 抗体産生が顕著に上昇し (Fig. 6d, f)、肺炎球菌の感染を防御することが明らかとなった (Fig. 7a, b)。また、Dp1 は OTII のようなペプチド抗原と融合させた場合にも抗原特異的な抗体を誘導出来ることから (Fig. 10a-c)、Dp1 は、様々なワクチン抗原との応用も期待できる抗原送達キャリアであることが考えられる。

Dp1 と PspA の融合で、PspA 特異的な抗体の誘導を促進するためには、Dp1 を 3 つ直鎖に連結する必要があることが明らかとなった (Fig. 6a)。一方で、第一節で抗原として用いた NA の場合には、モノマーのビオチン化 Dp1 を NA と混ぜるだけで NA に対する抗体誘導を上昇させることが出来た (Fig. 3a)。一見矛盾するこれらの結果は、NA がビオチンとの結合箇所を 4 つ持つことを踏まえると理解できる可能性がある。すなわち、モノマーのビオチン化 Dp1 を NA と混ぜた際には、NA を介して Dp1 の 4 量体が形成されるため、NA を直鎖状に複数並べることと同じ結合力の向上効果があったものと考えられる。

Dp1 と抗原を融合せず投与した場合には、抗原特異的な抗体産生の上昇は認められなかった (Fig. 11a, b)。また、抗原と Dp1×3 の融合体に Dp1×3 を共投与するとワクチン効果は消失した (Fig. 13)。このことから、抗原を Dp1 と融合することで、抗原提示細胞への抗原送達効率が上昇し、免疫応答を誘導出来ることが明らかとなった。また、Dp1 自身はサイトカインの産生を誘導しないこと (Fig. 12) や、Dp1 に対する抗体産生を誘導しないこと (Fig. 6d) から、Dp1 は安全性に優れる抗原送達キャリアであることが示唆された。

PspA-Dp1×3 と CpG 核酸との共投与で誘導される抗体のサブクラスを評価したところ、IgG2c が顕著に上昇していた (Fig. 8a)。誘導されたマウス IgG2 は、活性化 Fc 受容体に結合し、好中球およびマクロファージによる強い抗体依存性細胞傷害 (antibody-dependent cellular cytotoxicity、以下 ADCC) および抗体依存性細胞貪食 (antibody-dependent cellular cytotoxicity、以下 ADCP) を誘導出来ることが知られている^{58,59}。ADCC および ADCP は、肺炎球菌を含む細菌およびウイルス感染細胞を排除するために重要であるとされている^{60,61}。また、PspA-Dp1×3 と CpG 核酸との共投与で誘導された IFN- γ (Fig. 9b) は、様々な機能を有しており、そのうちの一つに、マクロファージと好中球を活性化することで、病原体を排除する機能が知られている^{62,63}。したがって、Dp1 と CpG 核酸の併用は、肺炎球菌などの細菌に対するワクチン開発のための戦略として効果的だと考えられる。

PspA-Dp1×3 と alum の共投与ではワクチン効果の増強は認められなかった。なぜ、Dp1

と alum では、相乗効果を誘導出来なかったのか、詳細については不明であるが、これは alum による抗原との吸着が関与している可能性がある⁶⁴⁻⁶⁶。一つの仮説として、PspA-Dp1×3 と alum を混合することで、alum によって Dp1 のキャリア部分がマスクされ、Dp1 によるキャリア効果が失われた可能性がある。したがって、Dp1 による抗原送達を妨害しないアジュバントであれば、Dp1 のワクチン効果を更に増強できることが考えられる。

TAMRA を用いた検討から、Dp1 は樹状細胞だけでなく、マクロファージや B 細胞への移行性も大幅に向上することが示された (Fig. 14b)。また、Dp1 を 1 つよりも 3 つ直鎖に連結する方が、樹状細胞への結合親和性が向上し、NCL に強く結合することが認められた (Fig. 6b、Fig. 16a)。さらに、NCL の DNA アプタマーである AS1411 を用いて、PspA-Dp1×3 と NCL の結合を阻害すると、PspA 特異的な抗体産生が有意に減少することが明らかとなった (Fig. 16c)。したがって、Dp1 は、*in vivo* でも NCL への結合依存的に抗体産生を促進していることが認められた。

Dp1 は NCL の RRM ドメインの中でも、RRM2 により強く結合することが示された一方で、AS1411 は RRM3 及び RRM4、MS-3 では、RRM1 及び RRM3 に対して、より強く結合することが認められた (Fig. 16b)。これまでに、RRM1 や RRM2 は、RNA との相互作用部位として特に重要であることが報告されているものの⁶⁷、RRM ドメインの違いがワクチン効果に与える影響については未だ検討されていない。今後、抗原送達と RRM ドメインの関連性も含めて更に研究を進めることで、ワクチンターゲットとしての NCL の機能解明につながる可能性がある。

抗原と Dp1 を融合することでワクチン効果を増強できる一方、Eα-Dp1×3 を投与しても、抗原提示細胞上の共刺激分子の発現上昇は認められなかった (Fig. 15b)。抗原提示細胞が T 細胞を活性化するためには、抗原提示、共刺激分子の発現、サイトカインシグナルの 3 つがそろう必要があり、これらを満たさない場合、アナジー（免疫抑制）状態になることが知られている^{68,69}。しかし、本研究結果はこれと矛盾した結果を示しており、なぜ、共刺激分子の発現を上昇しなくとも免疫応答を誘導することが出来たのか、詳細については未だ不明である。しかし近年、抗原の徐放化によって、長期に渡って抗原を暴露させ続けることで、濾胞ヘルパー T 細胞の分化を促進し^{70,71}、それによる強力な胚中心応答への刺激が、抗体の量と質を改善するという報告がなされている⁷²⁻⁷⁵。本研究結果では、Eα-Dp1×3 を投与することで、cDC が早期に抗原を提示するだけでなく、長期に渡って mDC、B 細胞、マクロファージが抗原を提示することが認められている (Fig. 15a)。また、PspA-Dp1×3 の投与によって、長期間、抗体産生が持続することも認められており (Fig. 9a)、抗体の量や質にも影響を与えている可能性がある^{76,77}。以上の事から、Dp1 は抗原提示細胞を活性化しなく

とも免疫応答を誘導出来る抗原送達キャリアであると考えられる。詳細については更なる検討が必要であるものの、Dp1 で得られた知見は、今後のワクチン開発において重要な知見となり得る可能性がある。

第三節 Dp1 ペプチドを用いた抗原特異的 CD8⁺ T 細胞の活性化誘導

CD8⁺T 細胞、または細胞傷害性 T 細胞と呼ばれる T 細胞集団は、ウイルスに感染した細胞やがん細胞を直接排除する役割を担う⁷⁸。CD8⁺T 細胞の活性化を誘導するには、樹状細胞が抗原を 8~10 アミノ酸程度のペプチドへ分解し、MHC クラス I に結合させた状態で細胞表面に提示する必要がある⁷⁹。しかし、MHC クラス I に提示される多くのペプチドは、細胞質由来の内在性蛋白質に由来するペプチド断片であり、細胞外から取り込まれた外来抗原の多くは、MHC クラス II に提示されることが知られている⁸⁰。ここで重要となるのが、クロスプレゼンテーションと呼ばれる経路である。クロスプレゼンテーションは樹状細胞が外来抗原を取り込んだ後、そのペプチド断片を MHC クラス I に提示する経路であり、この過程は、本来 MHC クラス I に提示されない外来抗原に対して CD8⁺T 細胞の活性化を誘導する上で、必要不可欠である⁸¹。

また、CD8⁺T 細胞を活性化するためには、抗原提示だけではなく、樹状細胞表面上に発現する CD80、CD86 などの共刺激分子およびサイトカインによるシグナルが必要である。細胞性免疫に関わるサイトカインとしては、IL-2 が知られており、CD8⁺T 細胞が IL-2 により活性化し⁸²、増殖することで、パーフォリンやグランザイム、IFN- γ 、TNF- α を産生し、がん細胞や感染細胞などの異常な細胞にアポトーシスを誘導することが出来る⁸³。

前節までに、Dp1 を抗原と融合させることで、抗原特異的抗体産生を強力に誘導できることを示してきた。そこで本節では、Dp1 が抗原特異的な CD8⁺T 細胞の活性化を誘導することが出来るか評価するため、OVA の MHC クラス I エピトープペプチドとして知られる SL8 をモデル抗原として用いて、SL8 と Dp1 の融合体を作製して検討した。

【実験材料と方法】

試薬

Poly(I:C)は、Invivogen より購入した。APC anti-CD44 抗体(clone: IM7)は、BioLegend より購入した。FITC anti-CD8 α 抗体 (clone: KT15) は abcam (Cambridge, MA, USA) より購入した。T-Select H-2Kb OVA Tetramer-SIINFEKL-PE は株式会社医学生物学研究所 (MBL, Tokyo, Japan) より購入した。G-418 Solution は Roche より購入した。

細胞培養

E.G7-OVA 細胞および B3Z 細胞は、ATCC より購入した。E.G7-OVA 細胞の培養には、10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、400 μ g/mL G-418 Solution を含む RPMI 1640 培地を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。B3Z 細胞の培養には、10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、50 mM 2-ME を含む RPMI 1640 培地を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

実験動物

実験動物および飼育方法は、第一節の実験材料と方法に準じた。

ペプチド

SL8 (SIINFEKL)、SL8-Dp1、SL8-Dp1 \times 3、SL8-Dp2 \times 3 または SL8-TAT (HIV の転写促進因子由来のペプチド) は、株式会社スクラムより購入した。また、SL8 とそれぞれの樹状細胞標的化ペプチドまたは TAT の間は G5 リンカー (GGGGG) で連結した。購入したペプチドの配列は Table 6 に記載した。

Table 6. List of purchased peptide sequences.

Name	Peptide antigen	Linker	Peptide
SL8	SL8	-	-
SL8-Dp1	SL8	GGGGG	Dp1 (VSYKAIR)
SL8-Dp1 \times 3	SL8	GGGGG	Dp1 \times 3 (VSYKAIRVSYKAIRVSYKAIR)
SL8-Dp2 \times 3	SL8	GGGGG	Dp2 \times 3 (GGSKPVRGGSKPVRGGSKPVR)
SL8-TAT	SL8	GGGGG	Tat (GRKKRRQRRRPPQ)

The sequence of the acquired dendritic cell-targeting peptide fused with MHC class I epitope peptide is shown.

ペプチドの皮内投与及び所属リンパ節細胞回収

0 日目に、SL8、SL8-Dp1、SL8-Dp1×3 または SL8-Dp2×3 を 51.9 nmol/mouse、CpG 核酸を 50 µg/mouse または poly (I:C) を 10 µg/mouse となるよう PBS で調製した。調製した溶液は、マウスの耳介皮内にマイジェクターを用いて、50 µL/mouse で単回投与した。投与から 7 日後に、頸椎脱臼後、解剖し、頸部リンパ節を 0.5% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む RPMI 1640 培地中に回収した。回収したリンパ節は、5 mL シリンジのガスケット部を用いて破碎し、70 µm セルストレーナーで濾過することで、残渣を取り除いた。その後、600 × g、4°C、5 分間遠心し、沈殿した細胞を回収した。得られた細胞は、CD8⁺T 細胞誘導能の評価及びリンパ節細胞の抗原再刺激によるサイトカイン産生評価に用いた。

CD8⁺細胞傷害性 T 細胞誘導能の評価

回収した細胞を 1% BSA/PBS 溶液で懸濁し、96 well U-bottomed culture plate に 1×10^6 cells/well となるように播種した。600 × g、4°C、5 分遠心後、上清を捨て、anti-CD16/32 抗体を終濃度 3 µg/mL、T-Select H-2Kb OVA Tetramer-SIINFEKL-PE を終濃度 0.8 µg/mL になるよう 1% BSA /PBS 溶液で調整し、80 µL/well で添加した。遮光条件下で、4°C、20 分静置した後、FITC anti-CD8α 抗体を終濃度 5 µg/mL、APC anti-CD44 抗体を終濃度 10 µg/mL になるよう 1% BSA/PBS 溶液で調整し、20 µL/well で添加した。同様に、遮光条件下で、4°C、20 分静置した後、1% BSA/PBS で 2 回洗浄し、7-AAD Viability Staining Solution を 1 v/v% で添加した 1% BSA/PBS を 100 µL/well で添加、懸濁しフローサイトメーターを用いて解析した。

リンパ節細胞の抗原再刺激によるサイトカイン産生評価

回収した細胞を 10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む RPMI 1640 培地で懸濁し、96 well U-bottomed culture plate に 1×10^6 cells/well となるように播種した。600 × g、4°C、5 分遠心後、上清を取り除き、50 µg/mL SL8、10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む RPMI1640 培地を 100 µL/well で添加した。24 時間後、600 × g、4°C、5 分遠心し、上清を回収した。回収した上清中のサイトカインを ELISA により解析した。

担癌マウス作製及び抗腫瘍効果の検討

培養した E.G7-OVA 細胞を、PBS で 2 回洗浄後、 3×10^7 cells/mL となるように、PBS

で懸濁した。C57BL6/J マウスの腹部皮内に E.G7-OVA 細胞を 3×10^6 cells/mouse (100 μ L/mouse) で移植し、担癌マウスを作製した。なお、マウス腹部の体毛は、移植の 2 日前までに、エピラット (クラシエホールディングス株式会社、Tokyo、Japan) を用いて、除毛した。腫瘍に対する治療効果を評価する際には、移植から 5 日後に、腫瘍体積が 25 mm³~60 mm³ になっているマウスを選別した後、各ペプチドと CpG 核酸の混合溶液を、マウス耳介皮内に 29G マイジェクターを用いて投与した。その後、1~3 日おきに腫瘍径を測定した。また、腫瘍に対する予防効果を評価する際には、移植する 7 日前に各ペプチドと CpG 核酸の混合溶液を、マウス耳介皮内に 29G マイジェクターを用いて投与し、腫瘍径を経時的に測定した。腫瘍体積は、(長径) \times (短径)² $\times 0.5$ により、算出した。

B3Z 細胞によるクロスプレゼンテーション評価

誘導した BMDC を回収し、96 well U-bottomed culture plate に 1×10^5 cells/well とするように全量 100 μ L/well で播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で一晩静置した。その後、600 \times g、4°C、5 分遠心し、上清を取り除いた。続いて、ペプチド量が 10 μ g/mL となるように全量 100 μ L/well で添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間静置した。その後、600 \times g、4°C、5 分遠心し、上清を取り除き、PBS でウェルを 3 回洗浄した。次に、 2×10^5 cells/well とするように懸濁した B3Z 細胞を、全量 100 μ L/well で播種した。37°C、5% CO₂ 条件下で 18 時間静置した後、600 \times g、4°C、5 分遠心し、上清を回収した。その後、回収した上清中の IL-2 を ELISA により評価した。

サイトカイン ELISA

上清中のサイトカインは ELISA MAX™ Standard Set Mouse IFN- γ (BioLegend) を用い、添付のマニュアルに従って測定した。以降の操作は、第二節の実験材料と方法に準じた。

BMDC の誘導

第一節の実験材料と方法に準じた。

統計解析

第一節の実験材料と方法に準じた。

【実験結果】

Dp1 による抗原特異的な CD8⁺T 細胞の活性化の誘導促進

Dp1 をペプチド抗原と融合する事で、ペプチド抗原特異的な CD8⁺T 細胞の活性化が効率的に誘導されるかを評価した。抗原としては、OVA の MHC クラス I エピトープペプチドである SL8 及び、SL8 と Dp1 との融合ペプチドである SL8-Dp1₃ を用いた。まず、各ペプチドを C57BL/6J マウスの耳介部に単回投与し、投与から 7 日後に、耳介の所属リンパ節である頸部リンパ節を回収した。続いて、回収したリンパ節中の細胞と SL8 を 24 時間共培養した。その後、上清を回収し、上清中の IFN- γ を評価することで、抗原特異的な CD8⁺T 細胞の活性化を評価した。なお、SL8 は、MHC クラス I で提示されるペプチドであることから、T 細胞の内、CD8⁺T 細胞しか刺激することが出来ない。その結果、SL8 単独投与では IFN- γ の産生は認められなかった一方で、SL8-Dp1₃ 投与では、アジュバントを用いなくとも IFN- γ が有意に上昇した (Fig. 17a)。したがって、ペプチド抗原に対して Dp1 ペプチドを融合することで、CD8⁺T 細胞の活性化を誘導できることが明らかとなった。

SL8-Dp1₃ とアジュバントの併用による CD8⁺T 細胞の活性化

次に、SL8-Dp1₃ とアジュバントを共投与することによって、CD8⁺T 細胞の活性化をより強く誘導出来るか評価した。アジュバントとしては、細胞性免疫が誘導可能な CpG 核酸や poly (I:C) を用いた。また、Dp1 のコントロールペプチドとして、Dp1 と同じ R/K-X-X-R モチーフを有する Dp2 や、既存の抗原送達キャリアの一つとして知られる、HIV の転写促進因子由来の TAT を用いた (Fig. 17b)。その結果、SL8 や SL8-Dp2₃、SL8-TAT 群では、CpG 核酸と共投与しても IFN- γ の上昇は認められなかった。一方で、SL8-Dp1₃ と CpG 核酸共投与群では、SL8 や SL8-Dp2₃、SL8-TAT と CpG 核酸共投与群と比較して、顕著に IFN- γ が上昇していることが明らかとなった。したがって、SL8-Dp1₃ と CpG 核酸を共投与することで、CD8⁺T 細胞がより活性化していることが明らかとなった。また、Dp1 と CpG 核酸による CD8⁺T 細胞の活性化は、TAT のような既存の抗原送達キャリアよりも強いことが認められた (Fig. 17b)。

次に、アジュバントを poly (I:C) に変えて、同様の検討を行った。その結果、SL8-Dp1₃ と poly (I:C) の共投与群は、SL8 と poly (I:C) の共投与群と比較して、IFN- γ が有意に上昇した (Fig. 17c)。したがって Dp1 は、CpG 核酸以外の核酸アジュバントを用いた場合でも CD8⁺T 細胞の活性化を効率的に誘導出来ることが示唆された。

SL8-Dp1₃ と CpG 核酸の共投与による SL8 特異的な CD8⁺T 細胞の活性化の誘導をよ

り直接的に評価するため、投与から 7 日後に、マウス頸部リンパ節を回収し、H-2kb OVA₂₅₇₋₂₆₄ tetramer を用いて SL8 特異的な CD8⁺T 細胞を直接染色し、フローサイトメトリーで評価した。Tetramer とは、MHC クラス I と抗原の複合体を 4 量体化したものをを用いて、抗原を特異的に認識する TCR を有する T 細胞を検出する方法である。その結果、SL8 や SL8-Dp2×3 または SL8-TAT と CpG 核酸の共投与群と比較して、SL8-Dp1×3 と CpG 核酸共投与群で、Tetramer 陽性細胞が増加した (Fig. 17d)。本結果は、前述の ex vivo での IFN-γ 産生の結果とも相関していることから (Fig. 17b)、SL8-Dp1×3 と CpG 核酸の共投与により、SL8 特異的な CD8⁺T 細胞の活性化が強く誘導されていることが確認された。

SL8-Dp1×3 と CpG 核酸共投与による抗腫瘍効果の検討

SL8-Dp1×3 と CpG 核酸の共投与により誘導された CD8⁺T 細胞の機能を評価するため、誘導された抗原特異的な CD8⁺T 細胞が抗腫瘍効果をもたらすか検討した。腫瘍細胞としては、マウスリンパ腫由来 EL4 細胞に OVA を強制発現させた E.G7-OVA 腫瘍細胞を用いた。SL8 または SL8-Dp1×3 と CpG 核酸を共投与した 7 日後、マウス腹部に E.G7-OVA 腫瘍細胞を移植し、腫瘍体積を経時的に観察した。その結果、コントロール群及び SL8 と CpG 核酸の共投与群では、マウスの腫瘍体積が経時的に増加し続けた一方、SL8-Dp1×3 と CpG 核酸の共投与群では、SL8 と CpG 核酸の共投与群と比較して、時間が経過しても腫瘍の増殖は全く認められなかった (Fig. 17e)。したがって、SL8-Dp1×3 と CpG 核酸の共投与で誘導される抗原特異的な CD8⁺T 細胞は、顕著な抗腫瘍効果を誘導出来ることが明らかとなった。次に、共投与した SL8-Dp1×3 と CpG 核酸が、腫瘍を治療できるか検証した。E.G7-OVA 腫瘍細胞をマウス腹部に移植した 5 日後、SL8 または SL8-Dp1×3 と CpG 核酸を共投与し、腫瘍体積を経時的に観察した (Fig. 17f)。その結果、コントロール群及び SL8 と CpG 核酸の共投与群では、腫瘍体積は経時的に増加し続けた。一方で、SL8-Dp1×3 と CpG 核酸の共投与群は、SL8 と CpG 核酸の共投与群と比較して、投与後 7、8 日後 (腫瘍移植から 12、13 日後) から腫瘍の成長抑制が認められ、さらに、その数日後には腫瘍完全拒絶マウスが認められるなど、強い腫瘍の成長抑制が認められた。

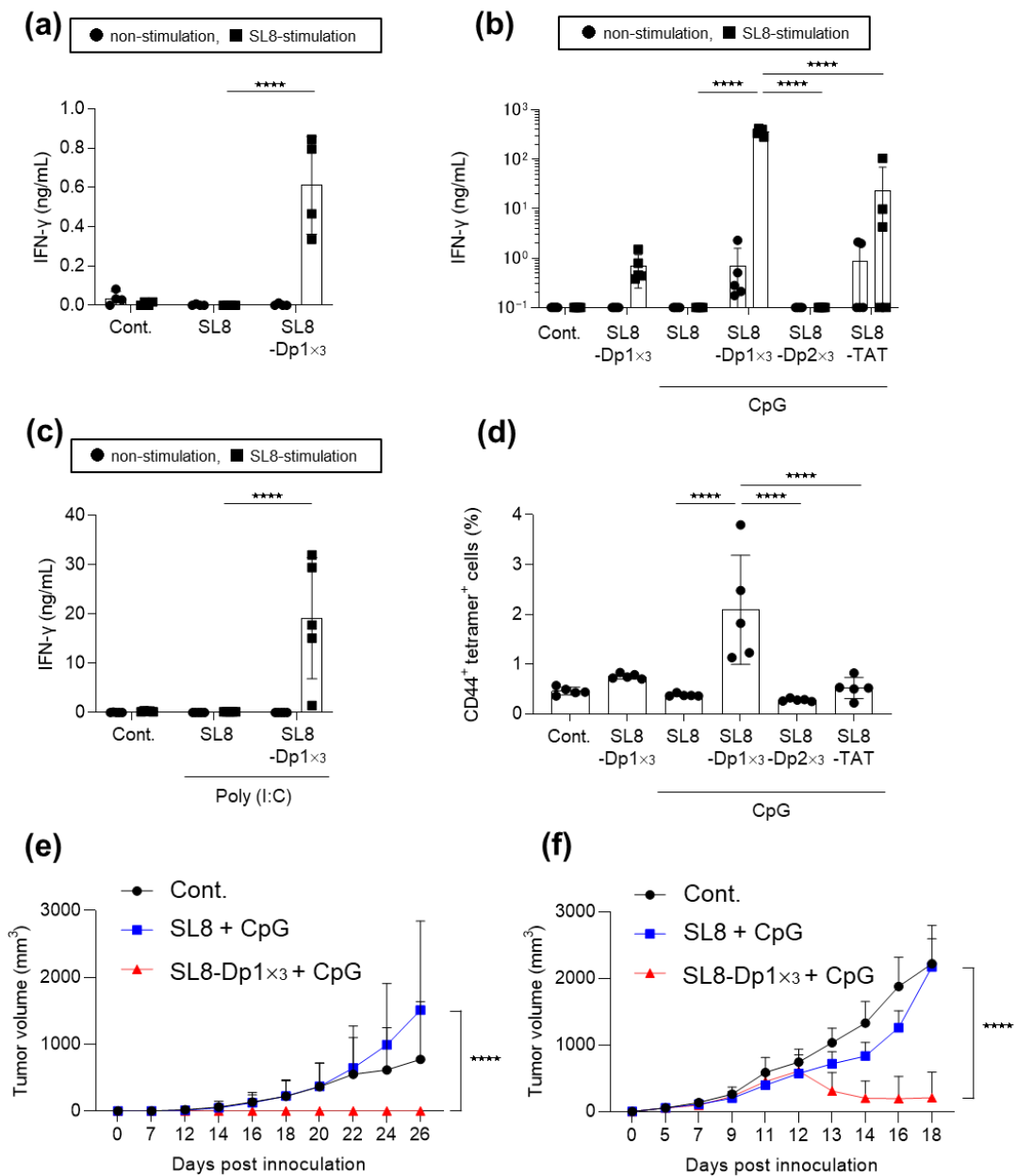


Figure 17. Conjugation of Dp1 to SL8 peptide enhances induction of antigen specific CD8 $^{+}$ T cells. Mice were treated with (a) 51.9 nmol (equivalent to 50 μ g) SL8 or 51.9 nmol (equivalent to 192 μ g) SL8-Dp1 \times 3, (b, d) 51.9 nmol (equivalent to 192 μ g) SL8-Dp1 \times 3, 51.9 nmol (equivalent to 50 μ g) SL8 plus 50 μ g CpG ODN, 51.9 nmol (equivalent to 192 μ g) SL8-Dp1 \times 3 plus 50 μ g CpG ODN, 51.9 nmol (equivalent to 171 μ g) SL8-Dp2 \times 3 plus 50 μ g CpG ODN, or 51.9 nmol (equivalent to 145 μ g) SL8-TAT plus 50 μ g CpG ODN, (c) 51.9 nmol (equivalent to 50 μ g) SL8 plus 10 μ g Poly(I:C) or 51.9 nmol (equivalent to 192 μ g) SL8-Dp1 \times 3 plus 10 μ g Poly(I:C). (a, b, c) At 7 days after administration, draining lymph nodes were collected from treated mice, and were incubated in the presence of SL8 in vitro and the level of IFN- γ in the supernatant was measured after 1 day. (d) The percentage of SL8-specific CD8 $^{+}$ T cells expressing CD44 in draining lymph nodes was evaluated 7 days after treatment.

(e) Mice were treated with 51.9 nmol (equivalent to 50 μ g) SL8 plus 50 μ g CpG ODN or 51.9 nmol (equivalent to 192 μ g) SL8-Dp1 \times 3 plus 50 μ g CpG ODN on day 0, and mice were inoculated subcutaneously with 3×10^6 E.G7-OVA cells on day 7. Tumor growth was assessed by 26 days. (f) Mice were inoculated subcutaneously with 3×10^6 E.G7-OVA cells on day 0, and mice were treated with 51.9 nmol (equivalent to 50 μ g) SL8 plus 50 μ g CpG ODN or 51.9 nmol (equivalent to 192 μ g) SL8-Dp1 \times 3 plus 50 μ g CpG ODN on day 5. Tumor growth was assessed by 18 days. (a, b, c, d, f) $n = 5$; (e) $n = 8$. Data are means \pm SD. **** $P < 0.0001$ as indicated by Tukey's test.

Dp1 によるクロスプレゼンテーション評価

CD8⁺T 細胞の活性化の誘導には、前述のとおり、樹状細胞によるクロスプレゼンテーションが重要とされている。そこで、CD8⁺T 細胞の活性化の誘導メカニズムに、Dp1 によるクロスプレゼンテーションの向上が関与しているか評価するため、MHC クラス I と SL8 の複合体を認識すると IL-2 を産生する B3Z 細胞を用いて検討した⁸⁴。まず、BMDC と SL8-Dp1 \times 3 を 6 時間共培養することで、細胞にペプチドを取り込ませた。続けて、B3Z と共培養し、18 時間後の上清を回収することで、B3Z が産生する IL-2 を評価した (Fig. 18)。その結果、SL8-Dp1 \times 3 添加群は、SL8-Dp2 \times 3 や SL8-TAT 添加群と比較して、IL-2 の産生が有意に上昇することが明らかとなった。また、SL8-Dp1 よりも Dp1 を 3 つ連結させた SL8-Dp1 \times 3 の方が、より IL-2 を産生することが明らかとなった。これは前述の通り、効率的な免疫応答の誘導には、抗原に Dp1 を 3 個融合する必要があることを示している (Fig. 6a, c)。したがって、Dp1 は、樹状細胞によるクロスプレゼンテーションを向上することで、アジュバントを用いなくとも、抗原特異的な CD8⁺T 細胞の誘導を促進していることが認められた。

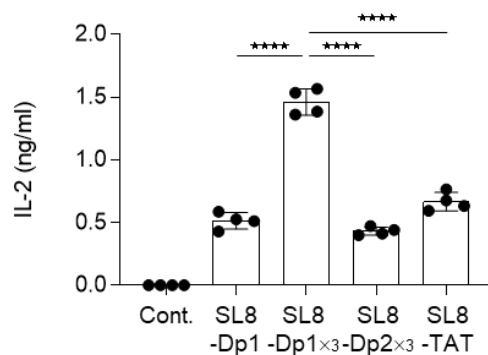


Figure 18. Effect of Dp1 on cross presentation in dendritic cells. BMDCs were treated with 10 μ g/mL SL8-Dp1, 10 μ g/mL SL8-Dp1 \times 3, 10 μ g/mL SL8-Dp2 \times 3 or 10 μ g/mL SL8-TAT

for 6 h. B3Z cells were added and cultured for 18 h, and IL-2 in the supernatant was measured. $n = 4$. Data are means \pm SD. **** $P < 0.0001$ as indicated by Tukey's test.

【考察】

本節では、SL8-Dp1×3 を投与することで、SL8 特異的な CD8⁺T 細胞の活性化を効率的に誘導出来ることが明らかとなり (Fig. 17a-d)、誘導された CD8⁺T 細胞は E.G7-OVA 腫瘍細胞に対して、抗腫瘍効果を発揮することが認められた (Fig. 17e, f)。本検討では、モデル抗原として SL8 を用いたが、がん抗原由来のペプチドである WT1 や Trp2 などの抗原を用いて、WT1-Dp1×3 や Trp2-Dp1×3 を作製することで、がんワクチンへの応用が期待できると考えられる⁸⁵⁻⁸⁷。また近年、肺癌に対して高い奏効率を示した免疫チェックポイント阻害剤は、がん患者の T 細胞に発現する CTLA-4 または PD-1 の度合いによって、効果を示さない人がいることも報告されている⁸⁸。免疫チェックポイント阻害剤は、免疫系の抑制解除に寄与しているため、免疫活性化を担う CD8⁺T 細胞の活性化を誘導することが、相乗的な効果をもたらすうえで重要とされている⁸⁸。そこで、本検討で用いた Dp1 と免疫チェックポイント阻害剤の併用効果を確かめる検討も非常に重要だと考えられる。

SL8-Dp1×3 と CpG 核酸共投与群において、投与から 7、8 日後（腫瘍移植から 12、13 日後）を境にして、急激な腫瘍の成長抑制が認められた (Fig. 17f)。これは SL8-Dp1×3 と CpG 核酸を共投与することで、投与後 7、8 日において抗原特異的な CD8⁺T 細胞の活性化の誘導がピークになったためだと考えられる。

Dp1 は、樹状細胞のクロスプレゼンテーション能を向上することが明らかとなった (Fig. 18)。NCL とクロスプレゼンテーションの直接的な関与は未だ明らかとなっていないものの、前述の通り、細胞表面の NCL に結合したリガンドは、細胞内に取り込まれることが明らかとなっている^{38,39}。したがって、Dp1 も樹状細胞表面の NCL に結合することで細胞内に取り込まれ、その結果、クロスプレゼンテーションが向上したと考えられる。

本検討において、Dp1 は蛋白質抗原だけでなく、ペプチド抗原にも利用できるペプチドキャリアであることが示されただけでなく、液性免疫および細胞性免疫を誘導出来ることが認められた。このことは、Dp1 が既報のキャリアペプチドと比較しても、汎用性の高いキャリアペプチドになり得る事を期待させるものである¹⁵。また、ASYKAIR もしくは VAYKAIR という配列からなるペプチドは、Dp1 よりも樹状細胞への抗原送達効率が優れていることから (Fig. 5h)、Dp1 以上にワクチン効果を増強できる可能性がある。さらに、CD8⁺T 細胞の活性化を誘導することは、感染症においても重要な役割を果たすことが報告されていることから⁸⁹、Dp1 は感染症ワクチンにおける抗原送達キャリアとして有用であることが明らかとなった。

結論

本検討では、感染症ワクチンにおける新たな抗原送達キャリアの創製を目指し、独自の樹状細胞標的化ペプチドを同定すると共にその機能を評価し、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 NCL 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、本結果は、Dp1 ペプチドが抗原提示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、抗原提示細胞に発現する NCL を介して結合するという結果を得ており、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、感染症ワクチンやがん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。

謝辞

本稿を終えるにあたり、大阪大学大学院薬学研究科 創薬ナノデザイン学分野 特任教授 吉岡靖雄先生には、御指導、御鞭撻を賜ると共に、終始御配慮賜りました。ここに、衷心より感謝の意を表します。

大阪大学大学院薬学研究科 創薬ナノデザイン学分野 特任講師 平井敏郎先生には、研究を遂行するにあたり、終始熱心な御指導と御助言を賜り、大変お世話になりました。この場をお借りして、心より御礼申し上げます。

本研究に際し、様々な専門的技術指導と共に、温かいサポートをいただきました国立感染症研究所細菌第一部 明田幸宏先生、大阪府立大学大学院理学系研究科 教授 中瀬生彦先生、兵庫医科大学 免疫学講座 教授 黒田悦史先生、国立健康・栄養研究所 免疫老化研究室 プロジェクト研究員 高濱正吉先生、国立健康・栄養研究所 免疫老化研究室 プロジェクトリーダー 山本拓也先生、京都大学大学院医学研究科 准教授 野中元裕先生、サンフォード・バーナム・プレビス・メディカル研究所 名誉教授 Michiko Fukuda 先生に心より御礼申し上げます。

本稿を纏めるにあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科 教授 近藤昌夫先生、大阪大学大学院薬学研究科 准教授 武村直紀先生に心より御礼申し上げます。

加えて、本研究を遂行するにあたり、昼夜共に汗を流しました、三里一貴研究員、民谷繁幸研究員に厚く御礼申し上げます。

加えて、本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を頂きました、大阪大学微生物病研究所 事務員 稻中雅子様心より御礼申し上げますと共に、研究生活を送るにあたり、終始共に励まし合い、支え合った河合惇志修士、金井優紀修士、白井星記修士、北川聡基修士、吉川英佑修士、河原永悟修士、千福航太修士をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科 創薬ナノデザイン学分野の院生、学生の皆様に謹んで感謝申し上げます。

最後に、在学中の経済的援助を賜りました、BIKEN 谷口奨学金、次世代研究者挑戦的研究プログラム、また、常に温かく見守り支えてくれた家族に心から感謝致します。

参考文献

- 1 Tenforde, M. W. *et al.* Association Between mRNA Vaccination and COVID-19 Hospitalization and Disease Severity. *JAMA* **326**, 2043-2054, doi:10.1001/jama.2021.19499 (2021).
- 2 O'Connell, A. K. & Douam, F. Humanized Mice for Live-Attenuated Vaccine Research: From Unmet Potential to New Promises. *Vaccines (Basel)* **8**, doi:10.3390/vaccines8010036 (2020).
- 3 Plotkin, S. History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 12283-12287, doi:10.1073/pnas.1400472111 (2014).
- 4 Hilligan, K. L. & Ronchese, F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4⁺ T helper cell responses. *Cell Mol Immunol* **17**, 587-599, doi:10.1038/s41423-020-0465-0 (2020).
- 5 Delamarre, L., Holcombe, H. & Mellman, I. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J Exp Med* **198**, 111-122, doi:10.1084/jem.20021542 (2003).
- 6 Del Giudice, G., Rappuoli, R. & Didierlaurent, A. M. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin Immunol* **39**, 14-21, doi:10.1016/j.smim.2018.05.001 (2018).
- 7 Ogawa, M., Akine, D. & Sasahara, T. Comparison of hepatitis B vaccine efficacy in Japanese students: a retrospective study. *Environ Health Prev Med* **24**, 80, doi:10.1186/s12199-019-0837-1 (2019).
- 8 McKee, A. S. & Marrack, P. Old and new adjuvants. *Curr Opin Immunol* **47**, 44-51, doi:10.1016/j.coi.2017.06.005 (2017).
- 9 Lee, S. & Nguyen, M. T. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw* **15**, 51-57, doi:10.4110/in.2015.15.2.51 (2015).
- 10 Gbian, D. L. & Omri, A. Lipid-Based Drug Delivery Systems for Diseases Managements. *Biomedicines* **10**, doi:10.3390/biomedicines10092137 (2022).
- 11 Mai, Y. *et al.* Intranasal delivery of cationic liposome-protamine complex mRNA vaccine elicits effective anti-tumor immunity. *Cell Immunol* **354**, 104143, doi:10.1016/j.cellimm.2020.104143 (2020).
- 12 Joshi, V. B., Geary, S. M. & Salem, A. K. Biodegradable particles as vaccine antigen delivery systems for stimulating cellular immune responses. *Hum Vaccin Immunother* **9**, 2584-2590, doi:10.4161/hv.26136 (2013).
- 13 Idoyaga, J., Suda, N., Suda, K., Park, C. G. & Steinman, R. M. Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8 α ⁺ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1524-1529, doi:10.1073/pnas.0812247106 (2009).
- 14 Nechansky, A. HAHA--nothing to laugh about. Measuring the immunogenicity (human anti-human antibody response) induced by humanized monoclonal antibodies applying ELISA and SPR technology. *J Pharm Biomed Anal* **51**, 252-254, doi:10.1016/j.jpba.2009.07.013 (2010).
- 15 Gou, S. *et al.* Adjuvant-free peptide vaccine targeting Clec9a on dendritic cells can induce robust antitumor immune response through Syk/IL-21 axis. *Theranostics* **11**, 7308-7321, doi:10.7150/thno.56406 (2021).
- 16 Jaroszewicz, W., Morcinek-Orlowska, J., Pierzynowska, K., Gaffke, L. & Wegrzyn, G. Phage display and other peptide display technologies. *FEMS Microbiol Rev* **46**, doi:10.1093/femsre/fuab052 (2022).
- 17 Hess, K. L. & Jewell, C. M. Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development. *Bioeng Transl Med* **5**, e10142, doi:10.1002/btm2.10142 (2020).
- 18 Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317, doi:10.1126/science.4001944

- (1985).
- 19 Staquicini, D. I. *et al.* Targeted Phage Display-based Pulmonary Vaccination in Mice and Non-human Primates. *Med (N Y)* **2**, 321-342, doi:10.1016/j.medj.2020.10.005 (2021).
 - 20 Zhang, R. *et al.* A Novel Peptide Isolated from a Phage Display Peptide Library Modeling Antigenic Epitope of DHAV-1 and DHAV-3. *Vaccines (Basel)* **8**, doi:10.3390/vaccines8010121 (2020).
 - 21 Sioud, M., Skorstad, G., Mobergslien, A. & Saeboe-Larssen, S. A novel peptide carrier for efficient targeting of antigens and nucleic acids to dendritic cells. *FASEB J* **27**, 3272-3283, doi:10.1096/fj.12-224758 (2013).
 - 22 Teesalu, T., Sugahara, K. N., Kotamraju, V. R. & Ruoslahti, E. C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16157-16162, doi:10.1073/pnas.0908201106 (2009).
 - 23 Dhodapkar, M. V. *et al.* Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci Transl Med* **6**, 232ra251, doi:10.1126/scitranslmed.3008068 (2014).
 - 24 Haspel, N. *et al.* Binding of a C-end rule peptide to the neuropilin-1 receptor: a molecular modeling approach. *Biochemistry* **50**, 1755-1762, doi:10.1021/bi101662j (2011).
 - 25 Berger, C. M., Gaume, X. & Bouvet, P. The roles of nucleolin subcellular localization in cancer. *Biochimie* **113**, 78-85, doi:10.1016/j.biochi.2015.03.023 (2015).
 - 26 Bates, P. J. *et al.* G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a cancer-targeting agent: Uses and mechanisms. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1861**, 1414-1428, doi:10.1016/j.bbagen.2016.12.015 (2017).
 - 27 Teesalu, T., Sugahara, K. N. & Ruoslahti, E. Mapping of vascular ZIP codes by phage display. *Methods Enzymol* **503**, 35-56, doi:10.1016/B978-0-12-396962-0.00002-1 (2012).
 - 28 Guo, H. F. & Vander Kooi, C. W. Neuropilin Functions as an Essential Cell Surface Receptor. *J Biol Chem* **290**, 29120-29126, doi:10.1074/jbc.R115.687327 (2015).
 - 29 Roy, S. *et al.* Multifaceted Role of Neuropilins in the Immune System: Potential Targets for Immunotherapy. *Front Immunol* **8**, 1228, doi:10.3389/fimmu.2017.01228 (2017).
 - 30 Bruder, D. *et al.* Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* **34**, 623-630, doi:10.1002/eji.200324799 (2004).
 - 31 Corbel, C. *et al.* Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation. *Dev Comp Immunol* **31**, 1082-1094, doi:10.1016/j.dci.2007.01.009 (2007).
 - 32 Villadangos, J. A. & Young, L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* **29**, 352-361, doi:10.1016/j.immuni.2008.09.002 (2008).
 - 33 Young, L. J. *et al.* Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* **9**, 1244-1252, doi:10.1038/ni.1665 (2008).
 - 34 Fujiki, H., Watanabe, T. & Suganuma, M. Cell-surface nucleolin acts as a central mediator for carcinogenic, anti-carcinogenic, and disease-related ligands. *J Cancer Res Clin Oncol* **140**, 689-699, doi:10.1007/s00432-014-1587-5 (2014).
 - 35 Kitagawa, S. *et al.* Elucidation of the role of nucleolin as a cell surface receptor for nucleic acid-based adjuvants. *NPJ Vaccines* **7**, 115, doi:10.1038/s41541-022-00541-6 (2022).
 - 36 Shi, H. *et al.* Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin. *Blood* **110**, 2899-2906, doi:10.1182/blood-2007-01-064428 (2007).
 - 37 Zhuo, W. *et al.* Endostatin inhibits tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis via cell surface nucleolin on lymphangiogenic endothelial cells. *J Pathol* **222**, 249-260, doi:10.1002/path.2760 (2010).

- 38 Chen, S. C. *et al.* Hepatoma-derived growth factor/nucleolin axis as a novel oncogenic pathway in liver carcinogenesis. *Oncotarget* **6**, 16253-16270, doi:10.18632/oncotarget.3608 (2015).
- 39 Destouches, D. *et al.* Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin. *PLoS One* **3**, e2518, doi:10.1371/journal.pone.0002518 (2008).
- 40 Lanks, C. W., Musani, A. I. & Hsia, D. W. Community-acquired Pneumonia and Hospital-acquired Pneumonia. *Med Clin North Am* **103**, 487-501, doi:10.1016/j.mcna.2018.12.008 (2019).
- 41 Gadsby, N. J. *et al.* Comprehensive Molecular Testing for Respiratory Pathogens in Community-Acquired Pneumonia. *Clin Infect Dis* **62**, 817-823, doi:10.1093/cid/civ1214 (2016).
- 42 Isaacman, D. J., McIntosh, E. D. & Reinert, R. R. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among Streptococcus pneumoniae isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis* **14**, e197-209, doi:10.1016/j.ijid.2009.05.010 (2010).
- 43 Fry, A. M., Shay, D. K., Holman, R. C., Curns, A. T. & Anderson, L. J. Trends in hospitalizations for pneumonia among persons aged 65 years or older in the United States, 1988-2002. *JAMA* **294**, 2712-2719, doi:10.1001/jama.294.21.2712 (2005).
- 44 Lewnard, J. A., Givon-Lavi, N. & Dagan, R. Effectiveness of Pneumococcal Conjugate Vaccines Against Community-acquired Alveolar Pneumonia Attributable to Vaccine-serotype Streptococcus pneumoniae Among Children. *Clin Infect Dis* **73**, e1423-e1433, doi:10.1093/cid/ciaa1860 (2021).
- 45 Suzuki, M. *et al.* Serotype-specific effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumococcal pneumonia in adults aged 65 years or older: a multicentre, prospective, test-negative design study. *Lancet Infect Dis* **17**, 313-321, doi:10.1016/S1473-3099(17)30049-X (2017).
- 46 Durando, P. *et al.* Experience with pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (conjugated to CRM197 carrier protein) in children and adults. *Clin Microbiol Infect* **19 Suppl 1**, 1-9, doi:10.1111/1469-0691.12320 (2013).
- 47 Gruber, W. C., Scott, D. A. & Emini, E. A. Development and clinical evaluation of Prevnar 13, a 13-valent pneumococcal CRM197 conjugate vaccine. *Ann N Y Acad Sci* **1263**, 15-26, doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06673.x (2012).
- 48 Kim, G. L., Seon, S. H. & Rhee, D. K. Pneumonia and Streptococcus pneumoniae vaccine. *Arch Pharm Res* **40**, 885-893, doi:10.1007/s12272-017-0933-y (2017).
- 49 Briles, D. E., Paton, J. C., Mukerji, R., Swiatlo, E. & Crain, M. J. Pneumococcal Vaccines. *Microbiol Spectr* **7**, doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0028-2018 (2019).
- 50 Abry, M. F. *et al.* Genetic diversity of the Pneumococcal CbpA: Implications for next-generation vaccine development. *Hum Vaccin Immunother* **11**, 1261-1267, doi:10.1080/21645515.2015.1021521 (2015).
- 51 Gonzalez-Miro, M. *et al.* Self-assembled particulate PsaA as vaccine against Streptococcus pneumoniae infection. *Heliyon* **3**, e00291, doi:10.1016/j.heliyon.2017.e00291 (2017).
- 52 Ohori, J., Iuchi, H., Maseda, Y. & Kurono, Y. Phosphorylcholine intranasal immunization with a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine can boost immune response against Streptococcus pneumoniae. *Vaccine* **38**, 699-704, doi:10.1016/j.vaccine.2019.10.043 (2020).
- 53 Khan, N. & Jan, A. T. Towards Identifying Protective B-Cell Epitopes: The PspA Story. *Front Microbiol* **8**, 742, doi:10.3389/fmicb.2017.00742 (2017).
- 54 Vadesilho, C. F. *et al.* Characterization of the antibody response elicited by immunization with pneumococcal surface protein A (PspA) as recombinant protein or DNA vaccine and analysis of protection against an intranasal lethal challenge with Streptococcus pneumoniae. *Microb Pathog* **53**, 243-249,

- doi:10.1016/j.micpath.2012.08.007 (2012).
- 55 Chang, B. *et al.* Distribution and Variation of Serotypes and Pneumococcal Surface Protein A Clades of *Streptococcus pneumoniae* Strains Isolated From Adult Patients With Invasive Pneumococcal Disease in Japan. *Front Cell Infect Microbiol* **11**, 617573, doi:10.3389/fcimb.2021.617573 (2021).
 - 56 Markey, K. A. *et al.* Immune insufficiency during GVHD is due to defective antigen presentation within dendritic cell subsets. *Blood* **119**, 5918-5930, doi:10.1182/blood-2011-12-398164 (2012).
 - 57 Tajrishi, M. M., Tuteja, R. & Tuteja, N. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun Integr Biol* **4**, 267-275, doi:10.4161/cib.4.3.14884 (2011).
 - 58 Bournazos, S., Wang, T. T., Dahan, R., Maamary, J. & Ravetch, J. V. Signaling by Antibodies: Recent Progress. *Annu Rev Immunol* **35**, 285-311, doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052433 (2017).
 - 59 Bruhns, P. *et al.* Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* **113**, 3716-3725, doi:10.1182/blood-2008-09-179754 (2009).
 - 60 Bournazos, S. & Ravetch, J. V. Fcγ receptor pathways during active and passive immunization. *Immunol Rev* **268**, 88-103, doi:10.1111/imr.12343 (2015).
 - 61 Sadarangani, M. Protection Against Invasive Infections in Children Caused by Encapsulated Bacteria. *Front Immunol* **9**, 2674, doi:10.3389/fimmu.2018.02674 (2018).
 - 62 Gocher, A. M., Workman, C. J. & Vignali, D. A. A. Interferon-γ: teammate or opponent in the tumour microenvironment? *Nat Rev Immunol* **22**, 158-172, doi:10.1038/s41577-021-00566-3 (2022).
 - 63 Sun, K., Salmon, S. L., Lotz, S. A. & Metzger, D. W. Interleukin-12 promotes gamma interferon-dependent neutrophil recruitment in the lung and improves protection against respiratory *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* **75**, 1196-1202, doi:10.1128/IAI.01403-06 (2007).
 - 64 Jones, L. S. *et al.* Effects of adsorption to aluminum salt adjuvants on the structure and stability of model protein antigens. *J Biol Chem* **280**, 13406-13414, doi:10.1074/jbc.M500687200 (2005).
 - 65 Hutcheon, C. J. *et al.* Physicochemical and functional characterization of antigen proteins eluted from aluminum hydroxide adjuvant. *Vaccine* **24**, 7214-7225, doi:10.1016/j.vaccine.2006.06.043 (2006).
 - 66 Huang, M. & Wang, W. Factors affecting alum-protein interactions. *Int J Pharm* **466**, 139-146, doi:10.1016/j.ijpharm.2014.03.015 (2014).
 - 67 San, A., Palmieri, D., Saxena, A. & Singh, S. In silico study predicts a key role of RNA-binding domains 3 and 4 in nucleolin-miRNA interactions. *Proteins* **90**, 1837-1850, doi:10.1002/prot.26355 (2022).
 - 68 Bonifaz, L. *et al.* Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J Exp Med* **196**, 1627-1638, doi:10.1084/jem.20021598 (2002).
 - 69 Waisman, A., Lukas, D., Clausen, B. E. & Yagci, N. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Semin Immunopathol* **39**, 153-163, doi:10.1007/s00281-016-0583-z (2017).
 - 70 Baumjohann, D. *et al.* Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity* **38**, 596-605, doi:10.1016/j.immuni.2012.11.020 (2013).
 - 71 Benson, R. A. *et al.* Antigen presentation kinetics control T cell/dendritic cell interactions and follicular helper T cell generation in vivo. *Elife* **4**, doi:10.7554/eLife.06994 (2015).
 - 72 Cirelli, K. M. *et al.* Slow Delivery Immunization Enhances HIV Neutralizing Antibody and Germinal Center Responses via Modulation of Immunodominance. *Cell*

- 177, 1153-1171 e1128, doi:10.1016/j.cell.2019.04.012 (2019).
- 73 Pauthner, M. *et al.* Elicitation of Robust Tier 2 Neutralizing Antibody Responses in Nonhuman Primates by HIV Envelope Trimer Immunization Using Optimized Approaches. *Immunity* **46**, 1073-1088 e1076, doi:10.1016/j.immuni.2017.05.007 (2017).
- 74 Tam, H. H. *et al.* Sustained antigen availability during germinal center initiation enhances antibody responses to vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E6639-E6648, doi:10.1073/pnas.1606050113 (2016).
- 75 Cirelli, K. M. *et al.* Slow Delivery Immunization Enhances HIV Neutralizing Antibody and Germinal Center Responses via Modulation of Immunodominance. *Cell* **180**, 206, doi:10.1016/j.cell.2019.12.027 (2020).
- 76 Bemark, M. *et al.* A unique role of the cholera toxin A1-DD adjuvant for long-term plasma and memory B cell development. *J Immunol* **186**, 1399-1410, doi:10.4049/jimmunol.1002881 (2011).
- 77 Wong, R. & Bhattacharya, D. Basics of memory B-cell responses: lessons from and for the real world. *Immunology* **156**, 120-129, doi:10.1111/imm.13019 (2019).
- 78 Kurachi, M. CD8(+) T cell exhaustion. *Semin Immunopathol* **41**, 327-337, doi:10.1007/s00281-019-00744-5 (2019).
- 79 Haj, A. K. *et al.* High-Throughput Identification of MHC Class I Binding Peptides Using an Ultradense Peptide Array. *J Immunol* **204**, 1689-1696, doi:10.4049/jimmunol.1900889 (2020).
- 80 Sigal, L. J., Crotty, S., Andino, R. & Rock, K. L. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* **398**, 77-80, doi:10.1038/18038 (1999).
- 81 Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* **12**, 557-569, doi:10.1038/nri3254 (2012).
- 82 Kamimura, D. *et al.* IL-2 in vivo activities and antitumor efficacy enhanced by an anti-IL-2 mAb. *J Immunol* **177**, 306-314, doi:10.4049/jimmunol.177.1.306 (2006).
- 83 Trapani, J. A. & Smyth, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* **2**, 735-747, doi:10.1038/nri911 (2002).
- 84 Zhang, C. *et al.* Targeted antigen delivery to dendritic cell via functionalized alginate nanoparticles for cancer immunotherapy. *J Control Release* **256**, 170-181, doi:10.1016/j.jconrel.2017.04.020 (2017).
- 85 Saxena, M., van der Burg, S. H., Melief, C. J. M. & Bhardwaj, N. Therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Cancer* **21**, 360-378, doi:10.1038/s41568-021-00346-0 (2021).
- 86 Ochsenreither, S. *et al.* "Wilms Tumor Protein 1" (WT1) peptide vaccination-induced complete remission in a patient with acute myeloid leukemia is accompanied by the emergence of a predominant T-cell clone both in blood and bone marrow. *J Immunother* **34**, 85-91, doi:10.1097/CJI.0b013e3181f3cc5c (2011).
- 87 Sin, J. I. *et al.* Intratumoral electroporation of IL-12 cDNA eradicates established melanomas by Trp2(180-188)-specific CD8+ CTLs in a perforin/granzyme-mediated and IFN-gamma-dependent manner: application of Trp2(180-188) peptides. *Cancer Immunol Immunother* **61**, 1671-1682, doi:10.1007/s00262-012-1214-8 (2012).
- 88 Huang, A. C. & Zappasodi, R. A decade of checkpoint blockade immunotherapy in melanoma: understanding the molecular basis for immune sensitivity and resistance. *Nat Immunol* **23**, 660-670, doi:10.1038/s41590-022-01141-1 (2022).
- 89 Young, A. T cells in SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Ther Adv Vaccines Immunother* **10**, 25151355221115011, doi:10.1177/25151355221115011 (2022).