

氏 名 うえだ さおり
上田 紗織

学位の種類 博士（薬学）

報告番号 甲第 1612 号

学位授与の日付 平成 28 年 3 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学位論文題目

感染症予防に向けた免疫活性化物質の探索

論文審査委員（主査）	福岡大学	教授	見明 史雄
（副査）	福岡大学	教授	鹿志毛 信広
	福岡大学	准教授	本田 伸一郎

感染症予防に向けた免疫活性化物質の探索

福岡大学大学院薬学研究科薬学専攻

微生物薬品化学教室

PD121001 上田 紗織

【緒言】

人類は、長年にわたり感染症と闘ってきた。しかし、現在でも世界および日本において、感染症は死因の上位に入っており、より効果的な感染症対策が望まれている。感染症の予防には、病原体の侵入に対して即時的に働く自然免疫の働きと、抗体産生など、病原体特異的に働く獲得免疫の活性化が重要である。一方、天然の有機化合物や乳酸菌などの有用微生物は、安全に使用できる物質としてヒトに使用され、宿主の健康に貢献している。そこで本研究は、自然免疫と獲得免疫を活性化し、さらにヒトに安全に使用できる新たな天然物や有用微生物の探索・評価を行うことを目標とした。

1. ワクチンに添加するアジュバントの探索 ～獲得免疫の活性化～

ワクチン利用は最も効果的な感染症予防である。いくつかのワクチンは、抗体産生能を上昇させるために、

アジュバントを添加している。しかし、表 1 に示すように、現在ヒトに使用できるアジュバントは、アルミニウム塩 (Alum) と oil in water (o/w) 型のエマルジョン (MF59) のみである。しかし、これらのアジュバントは、活性化する免疫型に偏りがあり、場合によって副作用を起こすこともある。そこで、より効果的で安全なアジュバントが望まれている。これまでに当研究室では、テルペン構造を有する昆虫の幼若ホルモン (JH) の誘導体であるピリプロキシフェン (pyriproxyfen) (図 1 (a)) が、アジュバントとして機能し、抗体産生誘導効果を持つことを明らかにした[1]。そして、この効果が、免疫活性化の起点となる病原体のパターン認識受容体 Toll like receptor (TLR) を介すると予想した[1]。そこで、同じテルペン類で、植物に含まれる天然有機化合物のミルセン (Myrcene) (図 1 (b)) の抗体産生誘導効果を検討し、獲得免疫の活性化能を評価した。

アジュバント	活性化する免疫		安全性
	細胞性免疫	体液性免疫	
アルミニウム塩 (Alum)	△	○	△
o/w型エマルジョン (MF59)	△	○	△

表1: 代表的なアジュバントと問題点

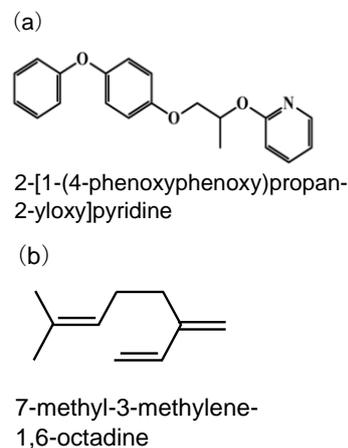


図1: (a)ピリプロキシフェンの構造
(b)ミルセンの構造

実験方法

4週齢のBALB/cマウス(♀)に、0、3、6週目に抗原(50 μ g/mLのovalbumin(OVA)または5 μ g/mLの抗酸菌分泌タンパク(Ag85B)およびアジュバント(40 μ g/mLのAlumまたは4.0mg/mLのミルセン)を腹腔内投与し、投与後、任意の週において、血清中の抗体量と脾細胞中のサイトカイン産生量を測定した。投与群は、抗原のみを投与した群(Control群)、ミルセンのみ投与した群([ミルセン(抗原-)]群)、Alumおよび抗原を投与した群([Alum(抗原+)]群)、ミルセンおよび抗原を投与した群([ミルセン(抗原+)]群)の4群とした。

ミルセンのOVA特異的IgG産生誘導効果

まず、[ミルセン(OVA-)]群は、初回投与後のすべての週において、OVA特異的IgGの産生誘導効果が見られなかった(図(a)、(b)、(c))。[ミルセン(OVA+)]群は、初回投与後3週目から、Control群と比べて有意にOVA特異的IgGの産生誘導効果を示した(図2(a))。一方、[Alum(OVA+)]群は、初回投与後5週目からControl群と比べて抗体産生が観察されたものの(図2(b))、緩やかに上昇し、7週目で初めてControl群と比べて明らかな誘導効果を示した(図2(c))。よって、ミルセンはAlumよりも早期に抗体産生誘導できることが分かった。

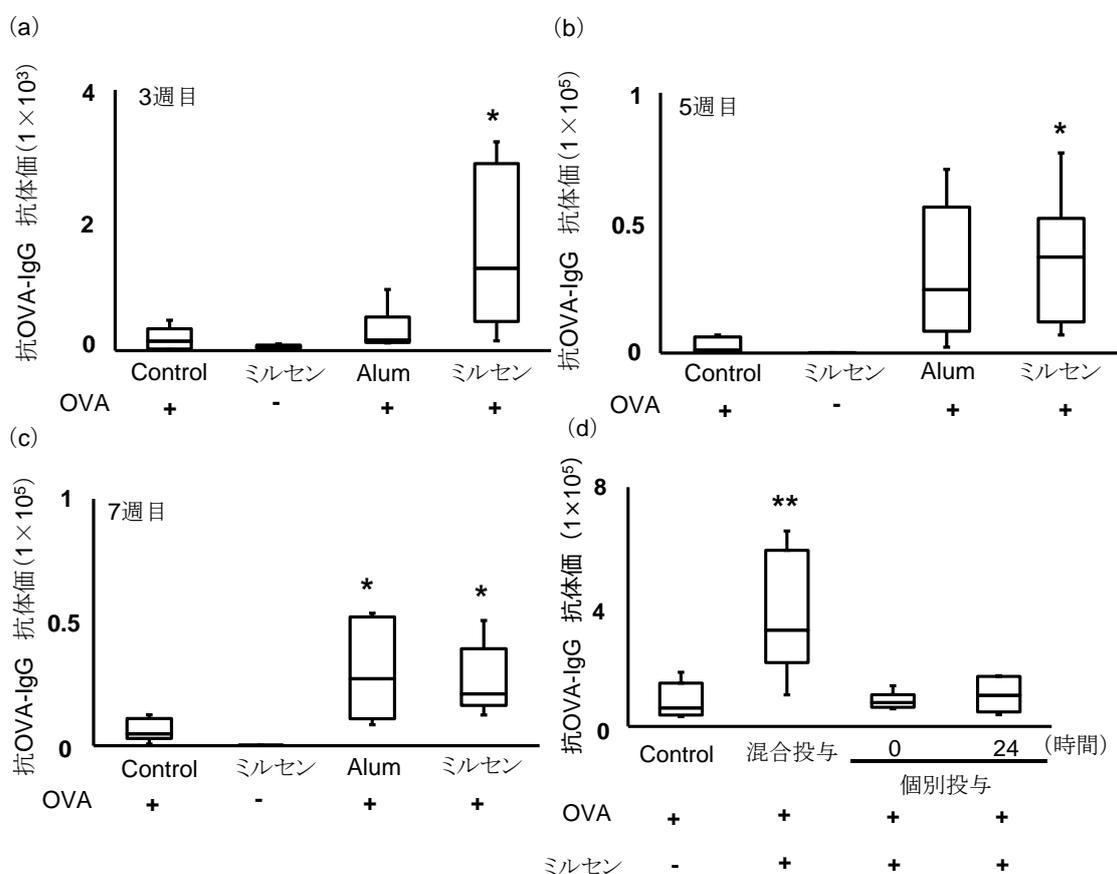


図2: OVA特異的IgGの産生量 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

また、初回投与後 8 週目に、血清中の IgG を測定したところ、ミルセンの抗体産生誘導効果は、OVA とミルセンを投与前に混合して投与した場合のみで現れ、混合せずにミルセンと OVA を個別に投与した場合、あるいは、ミルセン投与 24 時間後に OVA を投与した場合は効果が現れなかった (図 2 (d))。ミルセンは室温で放置するとポリマーを形成することが分かっている[2]。ミルセンの抗体産生誘導効果が誘導された理由は、ポリマー体を形成したミルセンと抗原を混合して投与することにより、混合液の粘度が高くなった結果、抗原提示能が上昇したためと考える。一方、ピリプロキシフェンは、投与前に混合せずに投与した場合でも抗体産生誘導効果を示した。このことより、ミルセンの作用機序はピリプロキシフェンと異なることが考えられる。以上の結果より、以後の実験は投与前にミルセンと抗原を混合したものを投与した。

ミルセンの抗体産生誘導型の検討

図 3 に示すように、獲得免疫は、樹状細胞がヘルパー T 細胞に病原体 (抗原) の情報を提示することで活性化される。ヘルパー T 細胞のうち、1 型 T 細胞 (Th1) は、サイトカイン INF- γ を産生し、キラー T 細胞を活性化するだけでなく、INF- γ が B 細胞を刺激して、IgG2a の産生を誘導する (細胞性免疫活性型)。一方、2 型 T 細胞 (Th2) は、サイトカイン IL-4 や IL-13 を産生し、これらは B 細胞を刺激して IgG1 の産生を誘導する (体液性免疫活性型)。そこで、使用するアジュバントの種類により、活性化されるヘルパー T 細胞に違いがあるか否かを、産生誘導されるサイトカインや IgG サブタイプを調べることに

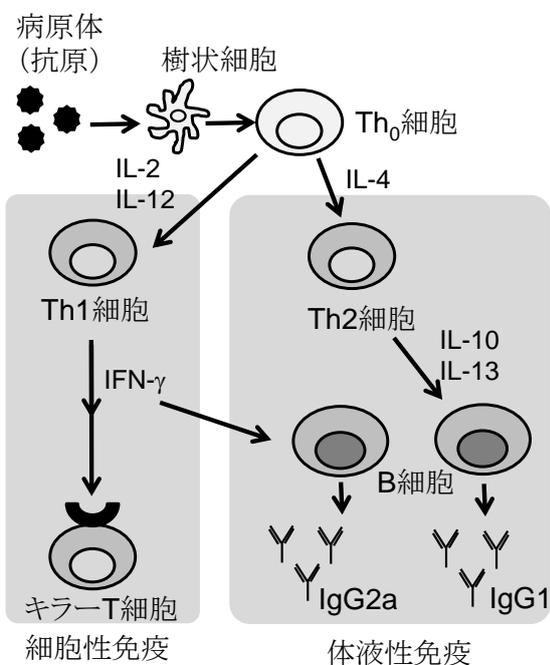


図3:獲得免疫活性化のしくみ

より、検討した。まず、産生誘導されるサイトカインを調べた。その結果を図 4 に示す。INF- γ に関しては、[Alum(OVA+)] 群および[ミルセン(OVA+)] 群ともに初回投与後 3 週目および 8 週目に産生を観察したが、両方に大きな差はなかった (図 4 (a))。ただし、[ミルセン(OVA+)] 群では、8 週目において、Control 群と比べて有意に INF- γ の産生量が増加した (図 4 (a))。IL-4 に関しては、初回投与後 3 週目に比べて 8 週目に、[Alum(OVA+)] 群の IL-4 産生量が多かった (図 4 (b))。IL-13 に関しては、初回投与後 3 週目に比べて 8 週目に[ミルセン(OVA+)] 群において IL-13 の産生量が著しく増加した (図 4 (c))。このことから、Alum およびミルセンには、産生誘導するサイトカインの種類に違いがあることが分かった。次に、産生誘導される IgG サブタイプを調べた。

その結果を図5に示す。[Alum(OVA+)] 群は、初回投与後5週目(図5(a))と8週目(図5(b))にIgG1の産生誘導が確認され、Th2を刺激することが分かった。また、[ミルセン(OVA+)] 群も、5週目(図5(a))と8週目(図5(b))に、IgG1の産生誘導が観察され、Th2を刺激することが分かった。このことから、Alumとミルセンは共に、Th2を刺激することが分かった。さらに、[ミルセン(OVA+)] 群は、投与後5週目(図5(c))と8週目(図5(d))にIgG2aの産生誘導が観察され、Th1を刺激することが分かった。この効果はAlumでは低い、ミルセンではきわめて強い作用を示した。これらの結果より、ミルセンはTh1とTh2の両方を刺激する、細胞免疫活性型および体液性免疫活性型の2つの機能があると考えた。ミルセンは炭素数C₁₀のテルペン類であり、これは、細菌の構成成分Lipid Aの炭素数と類似している。これまでに、Lipid AはTLR4を介してTh1型免疫活性を行うことが知られている[3]。さらに、カルボキシビニルポリマーを使用したポリマー体のアジュバントはTh1/Th2を刺激して獲得免疫を活性化することがわかっている[4]。これらのことから、ミルセンの抗体産生誘導には、TLRを介する作用と、ポリマー体の形成による作用の2つがあると考えた。以上の結果より、ミルセンは、細胞性免疫および体液性免疫の両方の免疫型を活性化する効果的なアジュバントになり得るであろう。

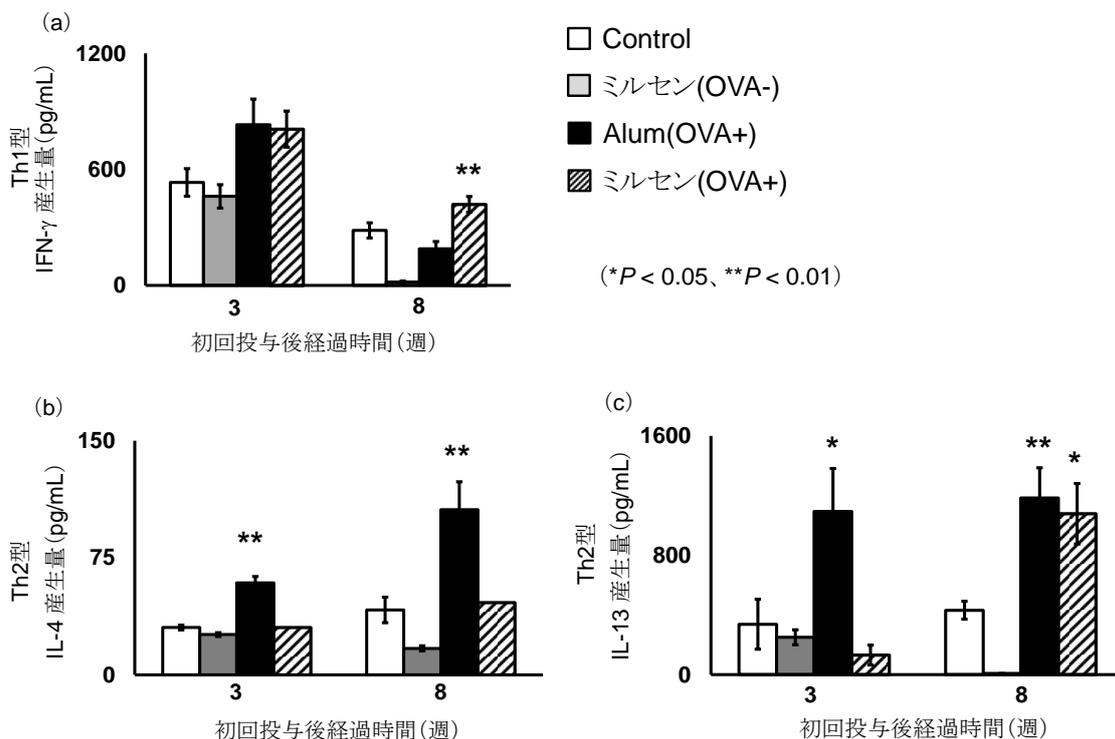


図4: OVAが誘導するサイトカインの種類と産生量

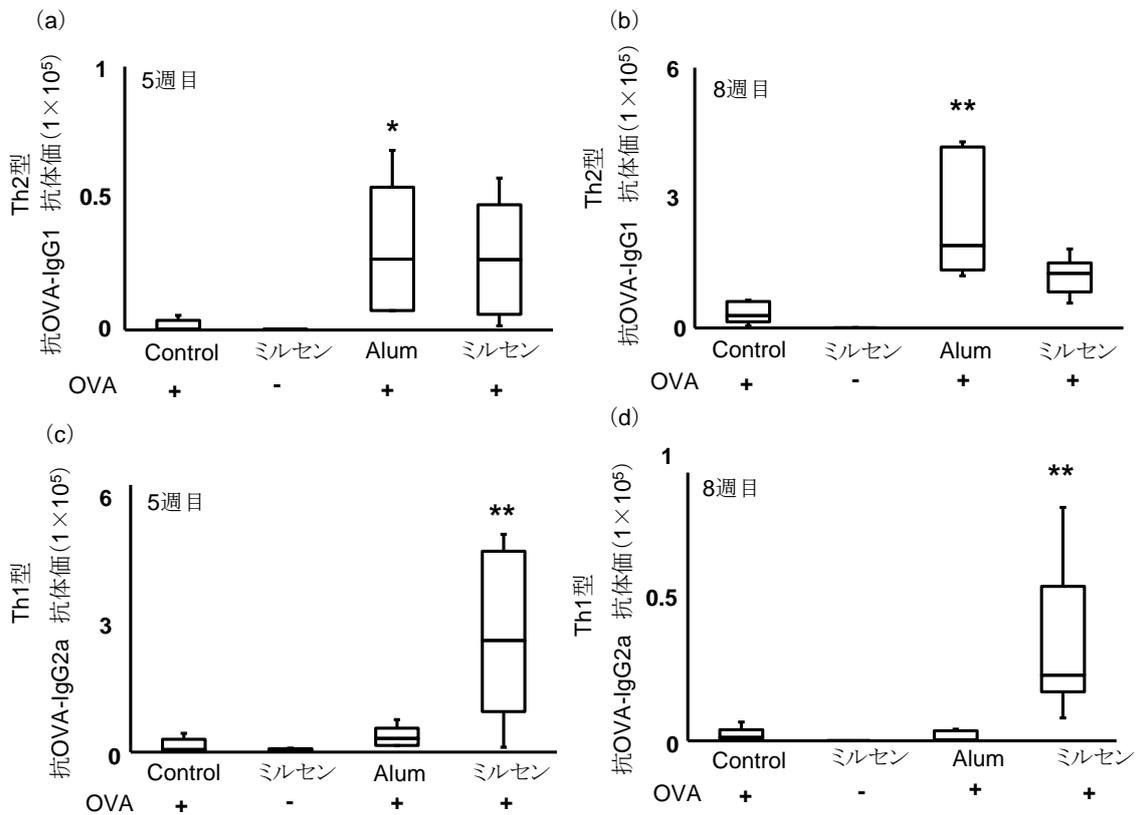


図5: OVA特異的IgGサブタイプの産生量 (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)

ミルセンの結核菌抗原 Ag85B に対する抗体産生誘導効果の検討

[Alum(Ag85B+)] 群および[ミルセン(Ag85B+)] 群は両群ともに、初回投与 3 週目では、Control 群および[ミルセン(Ag85B-)] 群に比べて、抗体誘導効果は観察されなかった(図 6 (a))。しかし、[ミルセン(Ag85B+)] 群は、初回投与後 5 週目で、Control 群と比べて有意に Ag85B 特異的 IgG の産生誘導効果を示した(図 6 (b))。一方、[Alum(Ag85B+)] 群では、初回投与後 5 週目および 7 週目においてこの効果が現れた(図 6 (b)、(c))。よって、ミルセンは Alum よりも効果が低いものの、結核菌抗原 Ag85B 特異的な IgG 抗体の誘導効果を持つことが分かった。このことから、ミルセンを実際の病原体抗原に対しても使用できると考える。

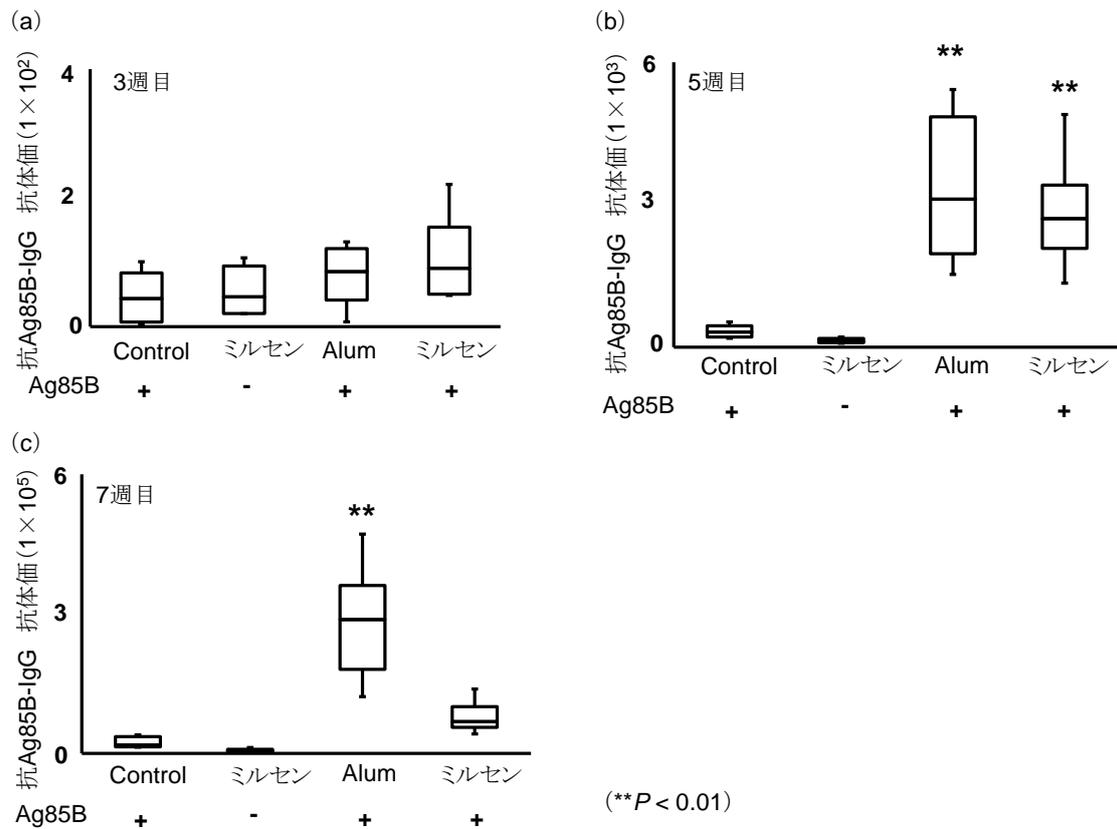


図6: 結核菌抗原Ag85B特異的IgGの産生量

2. 自然免疫活性化物質の探索 ～初期感染防御と獲得免疫の増強～

自然免疫は、病原体に即時的に働くだけでなく、獲得免疫の活性化を助ける働きを持っている。前章で検討したミルセンの抗体誘導効果をさらに上昇させるためには、自然免疫を持続的に活性化することが重要であると考えた。そこで、継続して摂取可能な有用微生物である乳酸菌に注目した。乳酸菌は TLR を介して自然免疫を活性化することが知られている上、近年乳酸菌の継続的な摂取が、ワクチンの抗体産生を上昇させることがわかっている[5]。そこで、自然免疫活性化作用の強い乳酸菌の候補として、自然免疫のみで感染防御を行う昆虫体内に生息する乳酸菌に注目した。近年、昆虫にもヒトと同様に腸内細菌叢が存在し、例えば、ハチの乳酸菌がヒトの免疫を活性化することが明らかにされている[6]。さらに、昆虫の中でも蚊の腸内細菌は、デングウイルスなどの病原性の高いウイルスを含むアルボウイルス群が宿主へ侵入するのを抑制していることがわかり[7]、自然免疫活性化作用が強いと予想した。そこで、本研究では、蚊から乳酸菌を単離・同定し特徴を解析するとともに、自然免疫を活性化するか否か、自然免疫を担う抗菌ペプチドの誘導効果を調べることにより評価した。

蚊からの乳酸菌単離・同定

福岡市中央区の大濠公園で人囮法を用いて 20 匹のヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) のメスを採集した。採集した蚊の中腸を摘出してホモジナイズし、ホモジナイズ液を乳酸菌選択培地の GYP 白亜寒天培地に塗布した。そして、30 °C、48-96 時間通常培養した後、乳酸菌候補を 3 つ単離した。単離した乳酸菌候補の 1 つを Ohori 株と命名した。

蚊由来乳酸菌 Ohori 株の特徴

Ohori 株について形態学的、生理・生化学的、および遺伝学的性質の解析を行った結果、新種の *Enterococcus* 属乳酸菌であることがわかった (表 2)。そこで、Ohori 株を用いて自然免疫活性化効果を検討した。

解析項目	結果
形態学的特徴	
コロニー	正円形、淡黄色、表面は平滑
グラム染色	グラム陽性、卵型球菌
電子顕微鏡	湾曲した細胞、先端に突起 (図7)
生理・生化学的特徴	
発育	<i>Enterococcus</i> 属選択培地で発育
カタラーゼ試験	陰性
発育条件	<i>Enterococcus</i> 属の発育条件に一致 近縁種と異なる特徴あり
GC含有量	<i>Enterococcus</i> 属と一致
代謝様式	<i>Enterococcus</i> 属 近縁種と異なる特徴あり
遺伝学的特徴	
16S rRNA遺伝子塩基配列の決定	<i>Enterococcus</i> 属 既知種と系統樹が分岐 (図8)
<i>pheS</i> 遺伝子塩基配列の決定	既知種と系統樹が分岐
DNA-DNAハイブリダイゼーション	既知種との相同性が低い

表2: 単離した蚊由来乳酸菌 Ohori 株の特徴

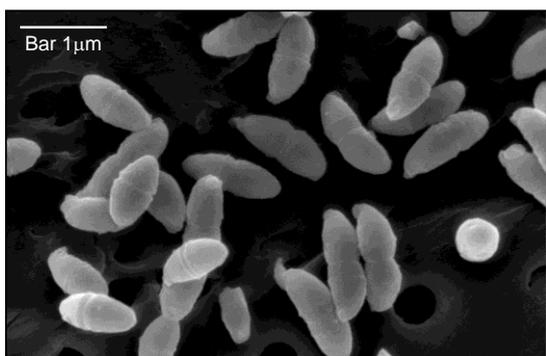


図7: Ohori株の電子顕微鏡写真

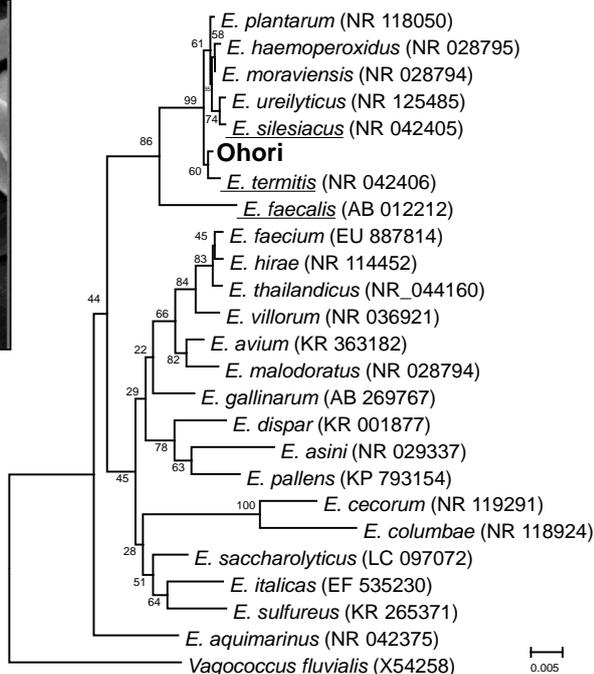


図8: Ohori株と近縁種における 16S rRNA遺伝子に基づく系統樹 ()内はNCBIのアクセッション番号

Ohori 株の抗菌ペプチド誘導作用の検討

病原体感染時に発現が上昇する抗菌ペプチドの中で、Human β -defensin 2 (HBD-2) は、病原体に対する攻撃力が一番高いことが知られている。そこで、ヒト腸管由来の Caco-2 細胞を使用して、Ohori 株の HBD-2 遺伝子の発現誘導について調べた。Caco-2 細胞に Ohori 株の生菌体および熱処理した死菌体を曝露し、6 時間培養した。培養後、Caco-2 細胞より Total RNA を抽出し、逆転写後、cDNA を調製した。この cDNA のうち、HBD-2 遺伝子の発現量を real-time PCR を用いて調べた。その結果、Ohori 株の生菌体は、HBD-2 遺伝子発現を誘導しなかったのに対し (図 9 (a))、Ohori 株の死菌体は、Ohori 株を曝露していない Control 群に対して、有意に HBD-2 遺伝子の発現量が上昇した (図 9 (b))。以上の結果から、Ohori 株の死菌体は、抗菌ペプチドの誘導を介して自然免疫を活性化すると考えられる。また、HBD-2 誘導効果は、生菌体では観察されず、死菌体のみで観察された理由は、熱処理により菌体外に漏出した菌体内成分が TLR に作用するためであると考えた。

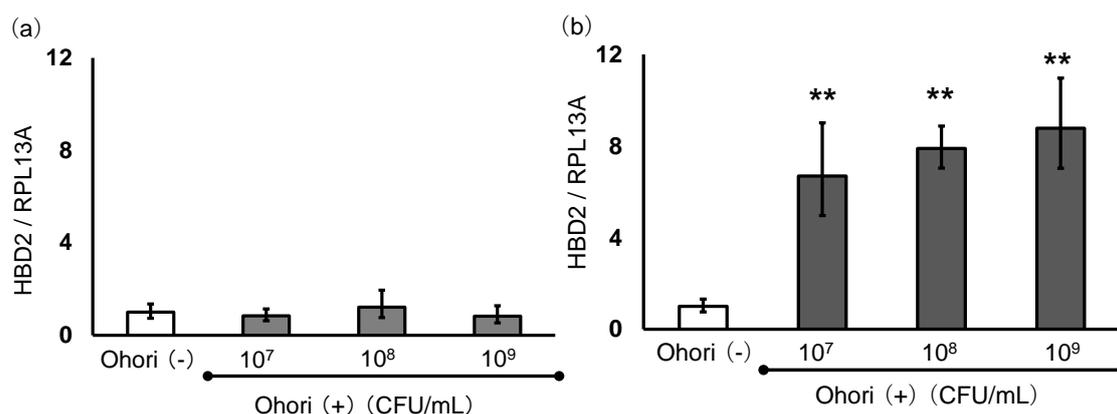


図9: Ohori株を曝露したCaco-2細胞におけるHBD-2遺伝子の発現誘導効果 (** $P < 0.01$)

【総括】

本研究では、天然物や有用細菌から自然免疫および獲得免疫を活性化する安全で効果的な物質の探索を行った。まず、テルペン類の天然有機化合物であるミルセンは、獲得免疫を上昇させ、抗原特異的な IgG の産生を誘導することが分かった。この効果が現れた理由は、ポリマーを形成するミルセンと抗原を投与前に混合したことにより粘度が増し、抗原提示能を上昇させたことや、炭素数 C₁₀ のミルセンが炭素数の類似している Lipid A と同様に TLR を刺激したことによるものと考えられる。さらに、ミルセンの抗体産生誘導効果は、Alum よりも早く現れた上、細胞性免疫および体液性免疫両方の免疫を活性化することから、ミルセンは、Alum よりも効果的なアジュバントになり得るであろう。さらに、Alum よりも効果が低かったものの、結核菌抗原 Ag85B に対しても抗体産生誘導効果を示したことから、今後ミルセンをアジュバントとして臨床応用できる可能性がある。次に、自然免疫を活性化する物質として、蚊の腸管から単離した乳酸菌

Ohori 株の自然免疫活性化作用を確認した。Ohori 株は、同定の結果、*Enterococcus* 属の新種であることがわかった。さらに、Ohori 株の死菌体のみが、腸管細胞において自然免疫を担う抗菌ペプチドの1つである HBD-2 の遺伝子発現を誘導した。この理由は、死菌化处理により細胞外に漏出した菌体内成分が TLR に作用したためと考える。本研究より、今回検討した天然物のミルセンや蚊由来乳酸菌が、獲得免疫あるいは自然免疫を活性化することにより感染症を予防できる可能性を明らかにした。これらの成果は、今後の感染症予防に貢献できることが期待できる。

【引用文献】

- [1] Sharmin T *et al.* *Microbiol and Immunol.* 2013
- [2] Liu B *et al.* *Chem Commun (Camb).* 2015
- [3] Cekic C *et al.* *J Immunol.* 2011
- [4] Kimoto T *et al.* *Influenza Other Respir Viruses.* 2013
- [5] 牧野聖也 *et al.* 日本臨床免疫学会会誌. 2014
- [6] Asama T *et al.* *J Appl Microbiol.* 2015
- [7] Carissimo G *et al.* *PNAS.* 2015

感染症は、現在も世界および日本において死因の上位に入っており、より効果的な対策が望まれている。感染症の予防には、病原体の侵入に対して即時的に働く自然免疫の働きと、抗体産生など、病原体特異的に働く獲得免疫の活性化が重要である。一方、天然の有機化合物や乳酸菌などの有用微生物は、安全に使用できる物質としてヒトの健康に貢献している。本論文では、自然免疫と獲得免疫を活性化し、さらにヒトに安全に使用できる新たな天然物や有用微生物の探索・評価する研究を行っている。

第1章では、テルペン類の天然有機化合物であるミルセンが、獲得免疫を活性化し、抗体産生誘導効果を示すか否かを検討している。その結果、ミルセンが抗原特異的な抗体産生誘導効果を持つことを明らかにしている。また、現在ワクチンへの使用が承認されているアジュバントの塩化アルミニウム (Alum) と比較して、ミルセンが、早期に抗体産生誘導効果を示すことや、Alum が獲得免疫の中の体液性免疫のみを活性化するのと異なり、ミルセンが、細胞性免疫と体液性免疫の両方を活性化することを明らかにしている。さらに、ミルセンが、病原体抗原である結核菌抗原 (Ag85B) に対する抗体産生誘導効果を示すことも明らかにしている。そして、本論文では、ミルセンが抗体産生誘導効果を示した理由として、ミルセンが病原体認識受容体 Toll like receptor (TLR) を刺激した反応であることを予想している。

自然免疫は、病原体への即時的な攻撃だけでなく、獲得免疫を増強することが知られている。第2章では、ミルセンの抗体産生誘導効果を高めるために、自然免疫を活性化することに着想している。そして、継続して摂取可能な乳酸菌を使用して自然免疫を活性化することを目標としている。さらに、自然免疫活性化作用が強い乳酸菌を選択するために、自然免疫のみを持つ昆虫が保有する乳酸菌、中でも蚊の乳酸菌に注目して実験を行っている。その結果、まず、蚊から単離した乳酸菌 (Ohori 株) が、*Enterococcus* 属の新種であることを明らかにしている。さらに、Ohori 株の不活化した死菌体がヒト腸管由来の Caco-2 細胞において、抗菌ペプチドの一種 human β -defensin 2 (HBD-2) 遺伝子の発現を誘導することを明らかにしている。また、Ohori 株の死菌体が抗菌ペプチド誘導効果を示した理由として、死菌化処理で漏出した菌体内成分が TLR を刺激したことを予想している。

感染症の予防には、免疫の活性化が重要である。そのために、ヒトに安全に使用できる免疫活性化物質の探索が進められている。本論文では、天然物や有用微生物から自然免疫および獲得免疫を活性化する安全で効果的な物質の探索を行った。その結果、天然物のミルセンが獲得免疫を活性化し、既存のアジュバントよりも効果的なアジュバントになり得ること、さらに、蚊由来乳酸菌が自然免疫を活性化し、初期感染防御および獲得免疫の増強ができる可能性を明らかにした。そして、これらの物質は、自然免疫および獲得免疫の活性化において TLR を介することを示唆した。本論文で探索した物質は、感染症の予防において有効な免疫活性化物質となることが期待できる。

以上のことから、本論文の結果は、新たな免疫活性化物質の発見として今後の感染症対策に貢献できることが大いに期待でき、学位論文として十分に評価できる。さらに、論文業績および公聴会における申請者の質疑応答は、博士（薬学）の学位を授与するのに適切な能力であると判断した。