

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

## 呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究

所属 国立感染症研究所 免疫部  
研究者 竹森 利忠

### 分担研究者名

- (1) 高須賀直美(国立感染症研究所)
- (2) 大西和夫(国立感染症研究所)
- (3) 高橋宜聖(国立感染症研究所)
- (4) 横田恭子(国立感染症研究所)
- (5) 村上正裕(天籟製薬株)
- (6) 榎並正芳(金沢大学)
- (7) 下田美智子(宇都宮大学)

### 要 旨

粘膜免疫ターゲットを可能とする組み換えインフルエンザウイルス及びシームレスカプセルを作製した。作製されたカプセルは耐酸性を有し人工腸液中で比較的速やかに崩壊しデリバリーとしての条件を満たすことが明らかとなった。一方外来遺伝子を NS-1 領域に組み込んだインフルエンザを経鼻接種することにより、呼吸器リンパ節において外来遺伝子に対する細胞性免疫反応が惹起され、このシステムの有用性が示された。また経鼻を介した免疫により、IgA 陽性記憶 B 細胞と記憶 T 細胞が効率良く産生され、免疫局所と全身に分布することを明らかにした。さらに免疫記憶 B 細胞に特異的に発現する遺伝子を単離した。

### 1. 研究目的

本研究は呼吸器及び腸管粘膜免疫を活性するワクチンデリバリーシステムを開発することを目的とする。またワクチン効果を増強させる手段の構築をはかる目的で、粘膜免疫の活性要因を明らかにするとともに、免疫記憶の誘導と維持に必要な分子を同定し、有効性、持続性に優れた新規ワクチン開発のための知識と材料を蓄積する。

### 2. 研究方法

1) 腸管粘膜デリバリーとして平均粒子径 1mm 前後の微小カプセルを作製し、この製剤の特性を解析した。またワクチンの read out システムの検討を行った。2) 呼吸器粘膜デリバリーシステム

として、NS1 領域に CAT 遺伝子を組み込んだ組み換え型インフルエンザウイルスを作製した。このウイルスをネズミに経鼻接種し、接種後の粘膜免疫反応を解析した。3) 粘膜免疫反応の解析のため、ネズミ経鼻を介して抗原を投与し、投与後の粘膜免疫組織(nasal-associated lymphocyte tissue; NALT)及び附属リンパ節における T、B 細胞反応を免疫学的手法を用いて検討した。4) 記憶 B 細胞誘導維持に必要な分子の同定のため、記憶 B 細胞を精製純化し、DNA サブトラクションにより記憶 B 細胞で発現する遺伝子を単離した。

### 3. 研究成果

#### 1) 腸管粘膜免疫系ターゲットシステムの作製

本研究の最終目的は、油脂製剤化技術を基盤とするコロイド超微粒子作製技術や生体適合性高分子ポリマーを用いたマイクロスフェア等の製剤技術を利用し、粘膜免疫賦活と記憶維持に高度に誘導する新規のワクチン技術を開発することである。13 年度には、経口的に摂取した抗原ペプチドや DNA プラスミドあるいはまたこれらを含むシステムをターゲット部位である小腸粘膜面に効率良く到達させるための工業化に適したデリバリーシステム（担体）の基本設計を目的として腸管への特異的デリバリーを可能にする腸溶性コーティングを施した微小シームレスカプセルの製造方法および条件の基本設定を完了した。すなわち、小動物における免疫評価に資する粒径 1 mm 前後のゼラチン・シームレスカプセルにモデル抗原 OVA を内包させることを達成した。製造条件により、サテライト微小球として、0.85mm 以下の微小球が得ることも可能となった。製造した腸溶性コーティングを施した微小シームレスカプセルの崩壊性を検討したところ、コーティングを行っていないカプセルが、人工胃液中で容易に崩壊・溶解したのに比較して、耐酸性を獲得している結果が得られた。また、人口腸液中では比較的速やかな崩壊性が認められ、これらのコーティングによって、胃内における保護機能が付与できることが示唆された。

#### 2) 呼吸器粘膜免疫系ターゲットシステムの作製

インフルエンザ NS-1 領域に CAT を組み込んだ組み換えウイルスを作製しマウス鼻腔粘膜組織へ接種した。接種後インフルエンザウイルス HA および CAT mRNA が呼吸器組織に発現することを確認した後、抗原特異的な T 細胞の免疫反応および DTH を解析した。この結果感作マウスの肺傍気管支リンパ節より精製した T 細胞は CAT 特異的に反応し IFN $\gamma$ などのサイトカインを産生することが示唆され、また感作されたマウスでは CAT 特異的な DTH が惹起されることが明らかとなった。しかし CAT 特異的な抗体の産生は一部の感作マウスで認められたものの値は低く、このシステムが主として細胞性免疫の活性に関与することが示唆された。

#### 3) 粘膜免疫における B、T リンパ球の選択

経鼻を介した抗原の投与により、上気道粘膜および全身での免疫反応が誘導される。免疫直後鼻腔

粘膜免疫組織(NALT)で胚中心B細胞が増殖し、後に記憶B細胞集団が付属リンパ節および脾臓に認められることを明らかにした。興味あることに記憶B細胞集団ではIgA陽性細胞が優位であるが胚中心B細胞集団においてはその頻度はIgG陽性細胞の頻度よりも少なかった。この結果は粘膜免疫組織でIgA陽性記憶B細胞を濃縮する何らかの機構が存在することが示唆された。一方T記憶B細胞はNALT、頸部後リンパ節(pCLN)および脾臓に長期にわたって維持される可能性が示唆された。これらの異なった組織に局在する記憶細胞の細胞障害活性度発現するT細胞受容体遺伝子は異なり、多様な記憶B細胞が産生維持されることが明らかとなった。

#### 4) 記憶B細胞に特異的に発現する遺伝子の同定

マウスを免疫後産生される記憶B細胞を精製しcDNAライブラリーを作成した。サブトラクション方により記憶B細胞で特異的に発現上昇する遺伝子を濃縮し、既知の遺伝子1つを含めた計4つの遺伝子をクローニングした。

#### 4. 考察

経口摂取後の最初のターゲット部位である小腸へのデリバリーは、胃幽門部を通過することが必要であり、また、胃幽門部を通過した後は、比較的速やかに内包するワクチン本体またはその二次担体を放出する必要がある。コーティング条件にはほぼ適当な条件が得られたが、最適化にはさらに詳細な検討が必要である。コーティング材料としては、シェラックならびにさらにオイドラギットでコーティングしたものが製造可能であることが明らかとなった。ラットにおけるin vivo試験では、カプセル皮膜厚が少ないため比較的溶解性が高く、胃内あるいは腸内での動態を正確に検証するまでには至らなかったものの、腸内でのカプセル崩壊を示唆する結果も得られており、さらに詳細な検討を実施中である。14年度は、上記の腸管内特異的崩壊型微小カプセルの皮膜素材および製造条件の最適化を行う一方、作製されたデリバリーの評価を動物モデルを用いて行う予定である。但し、試作段階においてはコストを考慮して蛋白抗原以外にDNAプラスミド(EGFP,  $\beta$ -galなど)を担持する微小担体の基本設計が必要となろう。

インフルエンザNS-1領域にCATを組み込んだ組み換えウイルスの鼻腔を介した接種で呼吸器付属リンパ節に所属するT細胞の免疫反応が惹起されることが明らかとなった。しかし抗ウイルス免疫反応と比較して弱く、また強力な抗体産生反応の惹起も低く、発現効率の上昇をはかる必要があると思われる。またウイルスベクターによる二次接種も免疫効果を上昇させることが予想され、ウイルス表面抗原を変えたベクターの作成を行っている。

腸管、呼吸器をターゲットとしたワクチン開発のためには、粘膜免疫の作動原理をよく理解することが必要である。また免疫記憶産生と維持を司る因子の同定は特異性に優れたワクチンの設計に寄

与する。本年度記憶 B 細胞に特異的に発現する 4 つの遺伝子が単離され今後の機能解析が待たれる。また鼻腔粘膜免疫活性により IgA 陽性記憶 B 細胞が優位に選択され、また記憶 T 細胞も産生され、それぞれの細胞が粘膜局所と全身の免疫組織に分布することが示唆され、経鼻免疫が上気道粘膜と全身の免疫賦活に効率のよい免疫方法であることが示唆された。

## 5. まとめ

腸管、呼吸器免疫組織活性デリバリーが作製され、その免疫効果の一部が明らかにされた。また記憶 B 細胞特異的遺伝子が単離され粘膜免疫における記憶 B 細胞産生選択に関して新しい知見を得た。

## 6. 研究発表

- 1) Toda, M., Hosokawa, H., Nakano, N., Inouye, S., Kaminogawa, S., Takemori, T., and Sakaguchi, N. Inhibition of allergen-specific IgE responses by DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of CD4<sup>+</sup> T cell epitope peptide. *Eur. J. Immunol.* in press, 2002.
- 2) Takasuka, H., Enami, K., Kuroda, K., Itamura, Y. and Takemori, T. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing the exogenous nucleotides in the NS segment results in immune response against the exogenous gene product within the respiratory immune system. *Vaccine*, 20:1579-1585, 2002.
- 3) Shimoda, M., Nakamura, T., Takahashi, Y., Asanuma, H., Tamura, S., Kurata, T., Azuma, M., Kaneko, C. and Takemori, T. Isotype-specific selection of high affinity memory B cells in nasal-associated lymphoid tissue. *J. Exp. Med.*, 194:1597-1607, 2001.
- 4) Takahashi, Y., Ohta, H., and Takemori, T. Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity*, 14:181-192, 2001.
- 5) Yoshizawa, I., Souda, Y., Mizuochi, T., Yasuda, S., Rizvi, T. A., Mizuochi, T., Takemori, T. and Tsunetsugu-Yokota, Y. Enhancement of mucosal immune response against HIV-1 Gag by DNA immunization. *Vaccine*, 19:2995-3003, 2001.
- 6) Kodama, M., Hayashi, R., Nishizumi, H., Nagawa, F., Takemori, T. and Sakano, H. The Pu.1 and NF-EM5 binding motifs in the *Igk3'* -enhancer are responsible for directing somatic hypermutations to the intrinsic hot spots in the transgenic *Vk* gene. *Int. Immunol.* 13: 1415-1422, 2001.
- 7) Enami, M. Reverse genetics. *Vaccine*, in press, 2002
- 8) 榎並正芳。インフルエンザウイルス(感染・遺伝子機能)ーウイルスの感染と複製機構の分子論的研究の展開ー。ウイルス 52, 印刷中, 2002
- 9) 下田美智子。高親和性 IgA 産生機序。臨床免疫, 36, 67-70, 2001 下田美智子。高親和性 IgA 産生機序。臨床免疫, 36, 67-70, 2001

7. 知的所有権の取得状況

なし

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社