

## 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) 国立感染症研究所免疫部 高須賀直美、橋本修一、横田恭子、大西和夫、高橋宜聖
- (2) 天籟製薬(株)創薬センター 村上正裕、
- (3) 金沢大学医学部 榎並正芳
- (4) 理化学研究所免疫・アレルギー総合科学研究センター 下田美智子・橋本香保子

### 要 旨

腸管免疫へターゲット可能なカプセル製剤を開発し、遺伝子組込みサルモネラ菌の有用性を明らかにした。呼吸器デリバリーとして、これまでに組み換えインフルエンザウィルスの有用性を明らかにしたが、本年度はその免疫学的評価のためワクチン評価のため結核菌/BCG 遺伝子組込みウィルスを作製した。更に、持続効果に優れたワクチン開発のために記憶 B 細胞寿命に関わると考えられる複数の遺伝子をクローニングした。

### 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 1 $\mu$ m 前後の微小カプセルを作製し、この製剤を用い、Ovalbunin 含有キトサンナノ粒子を内層に含むシームレスカプセルの製造に必要な技術を確認した。更にラットを用いたワクチンの read out システムの整備を行い、試作されたカプセルの免疫効果の検討を行った。
- 2) pEGFP-C2 ベクターの C 末に p24 gag を導入し、大腸菌用の発現ベクターに組み込んだ。サルモネラ菌での p24 蛋白の発現は Western Blot で確認した。pEGFP あるいは pEGFP-N1C2 を導入したサルモネラ菌を経口免疫抗原として投与し、マウスへの免疫効果を解析した。
- 3) 呼吸器粘膜デリバリーシステムとして、NS1 領域に CAT 及び結核菌、BCG 共通抗原である Ag85a 遺伝子を組み込んだ組み換え型インフルエンザウィルスを作製した。更に Ag85a の T 細胞エピートープ 198 及び 40 残基の配列を挿入したウィルスを作製した。また Ag85a 免疫反応を特異的に評価するために Ag85a 組込みアデノウィルスを作製した。
- 4) DNA サブトラクションにより平成 13 年度に得られた記憶 B 細胞長期維持に関連すると推定される遺伝子の機能解析を遺伝子強発現細胞株を作製して検討した。また signal sequence trap 法を用いて記憶 B 細胞表面分子及び分泌分子をコードする遺伝子の同定を行った。

### 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
  - (a) 生体適合性高分子ポリマーを用いたマイクロソフエアや油脂制裁化技術を基盤とするコロイド超微粒子作成技術などの製材技術を利用した粘膜免疫賦活を高度に誘導する新規のワクチン技

## 術の開発

実用となり得る要因を考慮した微少ワクチン・デリバリーシステム(VDS)の基本設計と基礎製造技術の開発を検討した。その結果、経口投与した製剤が胃を安定に通過し、一時標的である腸管粘膜部位に送達することができ、工業的製造に適した腸溶性微少シームレスカプセルの製造の基本設計を完了した。さらに、腸管粘膜に到達した抗原ペプチドや DNA プラスミドなどのワクチン本体を、二次標的であるパイエル板等の免疫関連装置内へ効率よく送達するための機能性担体の製造に関する基本設計及び技術開発を検討し、乳化折出法によるアルブミン含有キトサン微粒子(chitosan nanoparticle, CNP)の調製方法を整備した。また Ovalbumin 含有キトサン微粒子(OVA-CNP)を内層に含むシームレスカプセル製剤の開発のため、シームレスカプセル充填の OVA-CNP 濃厚分散液を量産する方法を考案した。これらの確立整備された方法を用い、FITC-BAS を OVA とともに VDS に包有することで、調製した OVA-DVS の消化管内動態の検討を行った。ラットにおける基礎免疫評価検討のために、予定した OVA-CNP 含有シームレスカプセル(VDS)は OVA 含量の不足から改良検討の必要性のあることが明らかにされその改良を現在行っている。

### (b) サルモネラ菌をベクターとした腸管ターゲットワクチン

Gag 遺伝子組み込みサルモネラ菌の経口投与のみでは Gag 特異的な CD8 陽性 T 細胞を腸管膜リンパ節(MLN)や腸管上皮内の中に検出することはできなかった。しかし、p24gag を経鼻に投与後サルモネラベクターを経口的に投与すると、MLN に Gag 特異的な CD8 陽性 T 細胞が誘導されることが明らかとなった。これらの結果は、経鼻免疫でのプライミングを加えることにより、サルモネラ菌の経口免疫による腸管、特に大腸での免疫効果が増強されることが示唆された。

## 2) 呼吸器粘膜免疫系活性ワクチンデリバリーシステムの作製

(a) これまでに、インフルエンザ NS-1 領域に CAT 遺伝子を組み込んだインフルエンザウィルスを経鼻に投与すると CAT 特異的な細胞免疫記憶が誘導された。このシステムの感染防御効果の有用性を検討する目的で、結核菌・BCG 菌共通に発現する遺伝子 Ag85a を挿入したウィルスの作製を行ったが、増殖性が低く回収が困難であった。そこで Ag85a の T 細胞エпитープを 40 及び 198 残基の配列を融合蛋白として発現するリコンビナントウィルスの作製を行い、増殖性の良い NSA Ag85a(40)ウィルスの回収に成功した。しかし、NSA Ag85a(198)に関しては増殖が乏しくベクター構築における改良が必要とされた。

### (b) Ag85a 特異的な免疫反応測定システムの整備

Ag85a 組み込みアデノウィルスを作製した。このウィルスを感染させた樹状細胞を LPS により成熟させ、BCG 接種マウス由来 T 細胞と共培養すると強力な T 細胞反応が誘導されることが明らかにされた。

## 3) 記憶 B 細胞に特異的に発現する遺伝子の同定

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。サブトラクションにより記憶 B 細胞で特異的に発現増強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。同定された遺伝子の全長の cDNA から予想されるアミノ酸配列をもとに抗ペプチド抗体を作製し、これを用いて各遺伝子が記憶 B 細胞に発現することを確認した。更にこれら遺伝子の機能を解析する目的で各遺伝子を強発現した細胞株を作製し、試験管内でのアポトーシス抑制効果を検討したところ、3 つの遺伝子発現によりアポトーシス抑制効果が確認された。更にシグナル・シーケンス・トラップ法を用いて記憶 B 細胞表面に発現する受容体は遺伝子のスクリーニングを行いホーミングと生存に関与すると考えらる 3 つの遺伝子を同定した。

## 4. 考察

胃幽门部を通過後、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経口接種による小腸へのデリバリーの設計に成功した。ラットでの *in vivo* 試験では、腸内でのカプセル崩壊を示唆する結果も得られており、基本的な条件を満足することが示唆された。このように上記の腸管内特異的な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はほぼ終了し、いくつかの技術改善の必

要性が残されているもののようにアジュバントと抗原を組み込んだモデルデリバリーが作製された。しかしこれらの製品は感染含有している抗原の量が少ないため経口投与後の抗原特異的 IgA 抗体反応は惹起されず、今後の改良が必要となった。改良後の免疫学的評価を平成 15 年度に行う。

インフルエンザ NS-1 領域に CAT を組み込んだ組み換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確認された。このデリバリーシステムが呼吸器感染症のワクチンとして有用か否かを検討するために必要となる結核菌・BCG 菌共通遺伝子組込みインフルエンザウイルス作製に成功した。更にワクチン効果を評価する系の作製に成功した。平成 15 年度にそのワクチンデリバリーとしての評価を BCG 接種マウスを用いて行う。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う必要があり作製中である。

粘膜免疫の作動原理をよく理解するとともに免疫記憶産生と長期維持を司る要因を同定することは持属性に優れたワクチンの設計に必要である。この研究項目において、これまでに記憶 B 細胞に特異的に発現する 4 つの遺伝子が単離されの機能解析の結果 3 つの遺伝子が細胞の生存維持の促進に関与することが示唆された。更に記憶 B 細胞のホーミングに関与すると考えられる遺伝子も同定され、今後の生体内での機能の解析が必要とされている。一方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

呼吸器及び腸管粘膜免疫を標的とする特異的なデリバリーの作製を目標とし、Ag85a 組込みインフルエンザウイルスベクターを作製した。また、HIVgag 組込み弱毒サルモネラ菌をデリバリーとして用い腸管内 T 細胞の活性誘導を解析するとともに、経口投与した製剤が胃を安定に通過し、免疫の一次標的である腸管粘膜部位に微粒子ワクチン製剤を健全な状態で送達することができ、かつ、工業的製造に適した腸溶性微小シームレスカプセル（外容器）の製造に関する基本設計を完了した。また持続性の高いワクチン開発の基礎確立を目標として記憶 B 細胞発現増強する遺伝子のクローニングを行い、抗アポトーシスに関与すると思われる 3 つの遺伝子を同定した。

## 6. 研究発表

- 1) Yoshizawa, Y., Mizuochi, T., Ogata, A., Murakami, M., Yagita, H., Takahashi, Y., Mizuochi, T., Takemori, T. and Tsunetsugu-Yokota, Y. Studies on the generation and maintenance of mucosal CTL against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice. *Aids Res. Hum. Retro. in press, 2003*
- 2) Kondo, E., Wakao, H., Koseki, H., Takemori, T., Kojo, S., Harada, M., Takahashi, M., Sakata, S., Shimizu, C., Ito, T., Nakayama, T. Taniguchi, M. Expression of recombination-activating gene in mature peripheral T cells in Peyer's patch. *Int. Immunol., 15: 393-402, 2003*
- 3) Tamura, Y., Kawaguchi, J., Serizwa, N., Hirahara, K., Shiraiishi, A., Nigi, H., Taniguchi, Y., Toda, M., Inouye, S., Takemori, T. and Sakaguchi, M. Analysis of sequential immunoglobulin E-binding epitope of Japanese cedar pollen allergen (Cry j 2) in human, monkeys and mice. *Clin. Exp. Allergy 33: 211-217, 2003*
- 4) Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Takemori, T., Kuroda, Y. and Tokuhisa, T. Generation of memory B cells independent of germinal center formation.

*Immunity 17: 329-339, 2002*

- 5) Tsunetsugu-Yokota, Y., Tamura, H., Tachibana, M., Ogata, K., Honda, M. and Takemori, T. Selective expansion of perforin-positive CD8<sup>+</sup> T cells by immature dendritic cells infected with live Bacillus Calmette-Guérin mycobacteria. *J. Leuk. Biol.* 72: 115-124, 2002
- 6) Toda, M., Kasai, M., Hosokawa, H., Nakano, N., Taniguchi, Y., Inouye, S., Kaminogawa, S., Takemori, T. and Sakaguchi, M. DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of CD4<sup>+</sup> T cell epitope peptide derived from Japanese cedar pollen allergen inhibits allergen-specific IgE response. *Eur. J. Immunol* 32: 1631-1639, 2002
- 7) Takasuka, N., Enami, M., 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
- 8) 大西和夫、「プレ B 細胞レセプターの役割とその機序」、臨床免疫、38、640-647、2002 年
- 9) Enami, M. Reverse genetics. *Vaccine*, 21, S61, 2002
- 10) 榎並正芳。インフルエンザウイルス(感染・遺伝子機能) —ウイルスの感染と複製機構の分子論的研究の展開—。ウイルス 52, 55-59, 2002

7. 知的所有権の取得状況  
なし