

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

目 次

課題番号

20030933A KH51041	臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究	梨井 康 …… 1
934A KH51042	組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立	廣瀬 雅雄 …… 5
935A KH51043	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦 善治 …… 10
936A KH51044	細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究	最上 知子 …… 16
KH51045	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多 徹太郎 …… 21
937A KH51046	日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発	門脇 孝 …… 24
938A KH51047	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	竹森 利忠 …… 27
939A KH51048	ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発	武田 直和 …… 31
940A KH51049	ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島 朝人 …… 38
941A KH51050	食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究	五十君 静信 …… 43
942A KH51051	安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究	後藤 紀久 …… 48
943A KH51052	リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究	内田 哲也 …… 55
944A KH51053	肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究	岡部 信彦 …… 61
945A KH51054	PPAR α をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発	片山 茂裕 …… 64
946A KH51055	感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究	薄井 貢 …… 68
947A KH51056	乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究	西尾 治 …… 71
948A KH51057	可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口 文広 …… 77
949A KH51058	EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究	斎藤 衛郎 …… 86
950A KH51059	エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究	大坂 寿雅 …… 89
951A KH51060	遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化	清水 博之 …… 93
952A		

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

国立感染症研究所 免疫部
竹森 利忠

研究要旨

粘膜免疫をターゲットとするワクチンデリバリー開発を目的として、腸溶性シームレスミニカプセルに充填したキトサンナノ微粒子を作製し、OVAを含有させた。このデリバリーを経口投与すると抗OVA IgM抗体が産生された。一方HIV Gag発現サルモネラ菌ベクターの免疫活性を解析し、経鼻免疫と組合せ腸管リンパ節T細胞の活性を上昇させることを明らかにした。また呼吸器粘膜系ワクチンデリバリーとしてインフルエンザウィルスベクターに結核菌/BCG共通抗原を組み込み免疫活性を評価したがウィルス弱毒化に対応して十分な免疫賦活活性を得ることは出来なかった。また簡単にT細胞によるワクチン活性評価を可能とするシステムを整備した。一方、ワクチン有効性の向上をはかる目的で免疫記憶B細胞長期生存に関わる複数の分子を同定した。

分担研究者

- | | |
|-------------------|-------|
| (1) 国立感染症研究所免疫部 | 高須賀直美 |
| (2) 国立感染症研究所免疫部 | 藤猪 英樹 |
| (3) 国立感染症研究所免疫部 | 横田 恭子 |
| (4) 天籟製薬(株)創薬センター | 村上 正裕 |
| (5) 国立感染症研究所免疫部 | 大西 和夫 |
| (6) 国立感染症研究所免疫部 | 高橋 宜聖 |
| (7) 金沢大学医学部生化学第一 | 榎並 正芳 |

A. 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ことを目的とした。

B. 研究方法

(1) 経口ワクチンデリバリーの開発

経口ワクチン開発において必須となるデリバリー(DDS)技術において、特に、小動物での活性評価が可能で、工業的に製造が容易な経口ワクチンDDSとして、キトサンナノ微粒子を腸溶性シームレスミニカプセルに充填した多層製剤を設計し、抗原の安定性と抗原包含率

の高い製造方法を開発した。作製した腸溶性DDSについては、経口投与後、ゲスト分子の腸管への到達と腸管内での放出を確認した。モデル抗原として、卵白アルブミン(OVA)を用い、トレーサーとしてのFITC蛍光標識アルブミンまたはデキストランとともに、キトサン微粒子に包含させた。DDS機能の確認は、*in vitro*においてはpHの異なる溶液中へのアルブミンの経時放出性と、*in vivo*においては、ラット経口(胃内)投与後、経時的に小腸粘膜上に付着残存する微粒子の個数をカウントする方法で行った。作製された1mgのOVAキトサンを含有するシームレスカプセルをゾンデを介してラットの胃内に経口的に投与した。この操作を1週毎に3回繰り返し、3回投与後の1週目における血清中の抗OVA IgM, IgG抗体及び糞便中の抗OVA, IgA抗体をそれぞれのアイソタイプに対する抗体を用いたELISA法により測定した。

- (2) サルモネラ菌を用いた経口デリバリーの開発
HIVgag遺伝子の一部をPCRで増幅してEGFP-Gag融合蛋白発現ベクターpEGFP-N1C2を構築し、electroporationで遺伝子導入してサルモネラ菌にEGFPあるいはEGFP-Gag融合蛋白を発現させた。経鼻免疫は、p24蛋白抗原5µgをコレラトキシン(CT:シグマ社)2µgとともに一群3から5匹のBALB/cマウスの鼻

より 2~3 週間隔に投与した。これらのマウスあるいはプライムしていないマウスに EGFP あるいは EGFP-Gag 融合蛋白発現弱毒サルモネラ菌(ST:Salmonella typhimurium)を PBS に浮遊させ、マウス一匹あたり 1×10^{10} CFU/200 μ l に調整して経口投与した。

(3) 呼吸器粘膜ワクチンデリバリーの開発

組換え型インフルエンザ株 NSAg85A(40) H1N1 株は、NS1 の一部を欠失した NS fragment に Ag85A のアミノ酸 140-179 番をコードする配列を挿入した。更に NSAg85A(40)H1N1 株の表面抗原を Udorn 株 (H3N2) に変えた NSAg85A(40)H3N2 株を作製した。これらの株を BALB/c マウスに 5×10^6 pfu/head 鼻腔内投与した。追加免疫を行う場合は、表面抗原の異なるウイルスを投与した。投与後の肺内でのウイルスの増殖を調べる目的で、肺により測定した。細胞性免疫を調べるため、追加免疫 10~12 日目に胸部および頸部リンパ節細胞をペプチドで刺激し、IFN- γ 産生細胞数を ELISPOT アッセイで検出した。また、局所リンパ節 T 細胞を正常マウス脾細胞由来の抗原提示細胞と共培養し、WSN ウイルス蛋白あるいは PPD (結核菌蛋白成分) で刺激した場合の、上清中の IFN- γ 濃度を測定した。

(4) ワクチン活性評価技術の開発

Ag85a 組み込みアデノウイルス(pShuttle Ag85a GFP)は Tong-Chen らの提供する A Simplified System for Rapid Generation of Recombinant Adenoviruses を用いて作製した。アデノウイルス作製過程で問題になる E1E3 遺伝子を持つ野生株の出現は、HeLa 細胞を用いてその混入がないことを確認した。Ag85a 組み込みアデノウイルスの樹状細胞への感染のために、正常 BALB/c マウス脾臓より樹状細胞を精製し、アデノウイルスを MOI50 の条件下で感染させた。この際、GM-CSF を添加し、LPS 存在下で 2 日間培養した。BCG 接種後 40 日以上経過したマウスより T 細胞を精製し、Ag85a 組み込みアデノウイルス感染樹状細胞との共培養の結果産生される IFN γ の濃度を測定した。

(5) 記憶 B 細胞生存因子の同定

アミノ末端に FLAG タグをつけた SMN、ES3940 の cDNA をレトロウイルスベクターである pMX に組み込み、PLAT-E 細胞にてレトロウイルスのパッケージングを行った後、B 細胞株 WEHI-231 に感染させた。レポーター遺伝子として組み込んだ Yellow fluorescence protein の蛍光強度を指標として、遺伝子導入細胞をフローサイトメーターにより分離した。

抗 FLAG 抗体により免疫沈降し SDS PAGE により分離した後、特異的なバンドを Mass spectrography に供しアミノ酸配列を同定した。また、酸化ストレスに対する SMN の効果を調べるため、 10μ M H₂O₂ 存在下で SMN 過剰発現 WEHI-231 B 細胞株を 12 時間培養した後、³H-チミジンの取り込み量を指標として細胞増殖を測定した。

C. 研究結果

(1) 経口ワクチンデリバリーの開発として製造したキトサン微粒子は製造時流動パラフィンに分散し、中鎖グリセリド液で適切な粘性に調整することでカプセルに充填した。OVA の含有率と充填工程の改善のため、キトサン微粒子調製時にポリアニオンによる弱い架橋を行い、調整後一旦凍結乾燥したものを再分散し OVA の包含率の向上と濃厚液のカプセルへの充填を可能とすることに成功した。この結果、OVA のキトサン微粒子への包含率は 30-50% となった。作製された微粒子は pH1-2 の溶液中で FITC の放出は認められなかったが、pH6.8 では経時的な放出が認められ、腸溶性被膜の機能を有することが確認された。経口投与した DDS 消化管内移動について、経時的な胃内からのカプセルの消失がみられ、小腸内ではカプセルの原形を保つものは認められなかった。改良された OVA 含有シームレスカプセルをラット胃内に投与し、上記標品の腸管免疫賦活可能について検討した。OVA をゲスト分子として充填した DDS をラットに経口投与し、OVA に対する IgA、IgM、IgG 応答を中心に解析した結果、血中の抗 OVA IgM 応答は対照とした OVA 単独投与よりも有意に高い値を示したが IgA、IgG に対する応答は、OVA 単独投与と同レベルであった。

(2) Gag 発現弱毒サルモネラ菌(ST Gag)のワクチンとしての効用について検討を行った。経鼻に 2 週間おきに 3 回免疫したマウスに EGFP あるいは EGFP-Gag 融合蛋白発現弱毒サルモネラ菌を経口で 2 週間隔で 4 回~6 回投与し、マウスの各組織に存在する Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞を IFN- γ ELISPOT で解析した。この結果、経鼻免疫と組み合わせることにより、鼻リンパ組織(NALT)だけでなく腸管リンパ節(MLN)にも Gag 特異的 CD8 陽性細胞が増加していたが、サルモネラ菌ベクターの経口免疫だけでは MLN に Gag 特異的 CD8 陽性細胞を誘導することはできなかった。一方、ST Gag の 4 回(B 群)あるいは 6 回(C 群)投与により、

大腸あるいは小腸の腸管上皮のリンパ球(IEL)にIFN- γ 産生CD8陽性T細胞が増加した。

- (3) 組換え型インフルエンザウイルスNSAg85A(40)H1N1株あるいはNSAg85A(40)H3N2株を、マウスに鼻腔内投与したところ、4日後の肺胞洗浄液に弱い(max.10³pfu/lung)ウイルスの増殖が認められる。ウイルス表面の異なる株を用いて2次接種を行い、局所リンパ節細胞をウイルスNPのCD8 epitope peptideで刺激したところ、IFN- γ 産生細胞が検出された。しかし、Ag85AのCD8 epitopeとして報告されているp15, p17 peptide刺激では有意なspot数増加が殆ど認められなかった。NP peptide刺激によるIFN- γ 産生細胞の増加は、特にNSAg85A(40)H1N1株で初回免疫し、NSAg85A(40)H3N2株で追加免疫した場合に顕著であった。
- (4) BCG接種マウスよりT細胞を精製し、Ag85a組み込みアデノウイルス感染樹状細胞との共培養により産生されたIFN γ の濃度を測定したところ、ウェル当たり樹状細胞数が1x10⁴、T細胞1x10⁵の際に非特異的反応が最小に抑えられ、特異反応が最大となった。しかし非感作T細胞との共培養ではIFN γ は産生されず特異的な反応であることが示唆された。
- (5) FLAG-SMN発現B細胞株を用いて抗FLAG抗体により免疫沈降を行った結果、17本の特異的なバンドが検出された。58 kDのバンドはアミノ酸配列から酸化ストレス抑制作用を有するAIFと推定されたため、免疫沈降したタンパク質を抗AIF抗体でWestern blottingしたところ、特異的なバンドが検出されることを確認した。SMNが酸化ストレス存在下でのB細胞増殖に与える影響を調べたところ、SMN過剰発現B細胞株ではH₂O₂存在下での細胞増殖が増加していた。さらに、SMNの各エクソンを欠失した変異SMNに対するAIF結合能を測定したところ、AIFはSMN第6エクソンに結合していることが判明した。

D. 考察

病原体は粘膜を介して侵入する。我々のこれまでの基礎研究から従来のワクチン接種のルートでは粘膜免疫賦活が不十分であること、一方ネズミモデルでの経鼻の接種では粘膜及び全身の免疫反応を誘導するとともに両局所で記憶B細胞が維持されることから(Shimada et al. J. Exp. Med. 194:1597-1607, 2001)、理想的なワクチンは粘膜免疫賦活を可能とするワクチンであると考察した。そこで本研究では呼吸器及び腸管粘膜免疫組織に

到達するデリバリーの開発を行った。呼吸器ワクチンデリバリーとしてインフルエンザウイルスベクターを開発し、第1ステップとしてCAT組換えインフルエンザウイルスを経鼻投与後呼吸器附属リンパ節及び全身の免疫反応を解析した。この結果、体液性免疫の誘導は低いもののCAT特異的T細胞反応が誘導されることが明かとなった。この実験を更に発展させ、T細胞免疫反応が重要である結核菌感染症に照準を合わせ、結核菌/BCG菌共通抗原であるAg85A遺伝子組込みインフルエンザベクターによる粘膜賦活誘導能を解析した。しかし、この組換えウイルスは強度に弱毒化され、これを原因としてT細胞免疫反応は予期した値よりも低く改善が要求された。

一方腸管誘導粘膜免疫ワクチンデリバリーとして腸溶性カプセルによりシールされたキトサンナノ粒子を用いたデリバリーを開発した。この標品にOvalbuminを含有させラットに経口投与し、抗OVA免疫反応の有無を検討した。この結果、血中OVA特異的IgM抗体が上昇することが認められたが、IgG, IgA抗体価は低く強力な防御反応を誘導するためには何らかの因子の共作用による免疫亢進が求められた。この問題に関しては、インターフェロン β 等、これまでに免疫賦活作用の知られているサイトカインを添加することで解決はかられるもの期待している。もう一方の腸管デリバリーとしてサルモネラ菌を使用したのが、頻回の投与で腸管粘膜T細胞の活性上昇が認められたものの単独又は2回投与での効果は殆ど認められない。細菌を用いた腸管デリバリーに関しては、現在乳酸菌ベクターを使用した実験が進行中であり、今後を期待している。

これまでにワクチン効果の評価は接種後の抗体価で確認していたが、T細胞への効果を検討する簡便な検査は不可能であった。我々は接種ワクチン特異的T細胞活性の簡便な測定法についてウイルスベクターを用いて、少なくとも現在、マウスモデルで成功した。今後ヒトの検体では同様な結果が得られるが検討が必要である。最後にワクチンの有効性を高めるためにマウスモデルにおいて記憶B細胞特異的遺伝子を単離し、記憶の長期化を可能とする有用な遺伝子をスクリーニングし、最終的にヒトホモログを同定することを想定し作業を行っている。現在抗アポトーシス活性のある細胞内遺伝子をクローニングしたが、今後これまで得られた記憶B細胞に特異的に発現する分泌蛋白質や細胞表面分子の解析を必要としている。

E. 結論

呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとするワクチンのデリバリーの開発を行い腸管デリバリー及び呼吸器粘膜デリバリーについて新しい技術を開発したが、今後の改善が必要とされる。またワクチン有効性を向上させると思われる記憶 B 細胞特異的遺伝子を単離した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kuwahara, K., Fujimura, S., Takahashi, Y., Nakagata, N., Takemori, T., Aisawa, S., Sakaguchi, N. Germinal center-associated nuclear protein contributes to affinity maturation of B cell antigen receptor in T cell-dependent responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101: 1010-1015, 2004**
- (2) Yoshizawa, I., 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 Cytotoxic T Lymphocytes against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice. *Aids Res. Hum. Retro.* **19: 469-479, 2003**
- (3) Tsunetsugu-Yokota, Y., Morikawa, Y., Isogai, M., Kawana-Tachikawa, A., Odawara, T., Nakamura, T., Grassi, F., Autran, B., Iwamoto, A.: Yeast-derived HIV type-1 p55gag virus-like particles activated DCs and induce perforin expression in Gag-specific CD8+ T cells by cross-presentation of DCs. *J. Virol.* **77: 10250-10259, 2003**
- (4) K. Ohnishi, F. Melchers. The nonimmunoglobulin portion of $\lambda 5$ mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nature Immunology* **4, 849-856, 2003.**

2. 学会発表

[RNAウイルス研究の新展開III、鈴鹿、2004年]

- (1) 広瀬敏治、郭潮潭、高須賀直美、竹森利忠、黒田和道、榎並正芳「インフルエンザウイルスベクターを用いた結核ワクチン開発の試み」

[Keystone Symposia, B cells and Antibodies, 2003]

- (2) Y., Takahashi, J., Inamine, T., Takemori. “Ras-mediated signaling pathway is required for the selection of high affinity memory B cells.”

[Options for the Control of Influenza V, Okinawa, 2003]

- (3) M. Enami, N. Takasuka, T. Hirose, C.-T. Guo, K. Kuroda, T. Takemori. “Development of recombinant influenza A viruses expressing the antigen 85A from *Mycobacterium tuberculosis*”.

[第 51 回日本ウイルス学会総会、2003 年]

- (4) 広瀬敏治、竹森利忠、黒田和道、榎並正芳「結核菌由来 Ag85A を発現する遺伝子組み換えインフルエンザウイルスの作成」

[第 33 回日本免疫学会総会、2003 年]

- (5) 高橋宜聖、稲嶺絢子、加地友弘、安達貴弘、鏑田武志、安部良、竹森利忠「Survival motor neuron 遺伝子による記憶 B 細胞生存の制御」
- (6) 稲嶺絢子、高橋宜聖、安達貴弘、鏑田武志、安部良、竹森利忠「記憶 B 細胞に発現増強する新規分子は細胞の生存を支持する」
- (7) Yoshioka, E., Takahashi, Y., Inamine, A., Abe, R., Takemori, T. 「Ras is required for the establishment of functional B cell memory」
- (8) 橋本修一、道祖土陽一、竹森利忠「記憶 B 細胞で高発現する膜蛋白の同定及び既知ケモカインレセプターの解析」

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

村上正裕「経口ワクチン製造法」で知的所有権の取得可能か検討中である

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

平成16年9月30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