

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デリバリーの開発

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(DDS)開発を目的として、抗原 OVA 含有率を 40%に高めた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作製し、経口投与すると抗 OVA IgA 抗体が産生され、この DDS が粘膜免疫指向的な免疫賦活能を有することが明らかとなった。一方サルモネラ菌に codon optimize した HIVgag を発現させ経口投与すると IgA 抗体産生の誘導と粘膜部位 T 細胞活性に対するブースター効果を促し腸管免疫の活性を上昇させることを明らかにし、このベクターが追加免疫において粘膜免疫へ効果を及ぼすことを明らかにした。また腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーとして組換え乳酸菌の開発を行い、溶血活性を失ったリステリオリシンの組込みが免疫活性に必要な自然免疫反応の上昇を促すことが明らかとなった。一方、免疫担当 B リンパ球と腸管上皮に発現する BILL カドヘリン分子の機能を遺伝子欠損マウスを作製し解析したところ、BILL カドヘリンが B1 細胞の動態とサルモネラ菌の腸管細胞侵入に関与することが示唆された。

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) 天籟製薬(株)創薬センター 村上 正裕
- (4) 国立感染症研究所免疫部 大西 和夫
- (5) 国立医薬品食品衛生研究所 五十君静信
食品衛生管理部
- (6) 国立感染症研究所免疫部 横田 恭子

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と、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) 架橋型キトサン微粒子(CNP)の製造と評価：モデル抗原として、卵白アルブミン(OVA)を用い、アジュバントとしてはコレラ

トキシン(CTX)を用い、腸管内移行動態および粘膜取込みを調べる場合、トレーサーとしてFITC蛍光標識アルブミン(またはFITC標識デキストラン)とともに、キトサン微粒子に包含させた(OVA-CNP)。OVA-CNPは超遠心後、洗浄し、凍結乾燥を行い、グラインドして粉末化した。微粒子製剤の物理評価は、動的散乱法により粒度分布を、また、電気泳動光散乱法によりゼータ電位を測定した。また、微粒子に包含されなかったOVAの量から、OVAのCNPへの含有率、および、包含率を求めた。なお、免疫評価試験は、OVAおよびOVAとアジュバントとしてコレラトキシン(CTX)を含有するCNPに関して、ラット評価系において免疫活性評価を行った。

- (2) サルモネラ菌ベクターにおける抗原およびプラスミドの調整：Gag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、大腸菌あるいは弱毒サルモネラ菌(ST:Salmonella typhimurium)にelectroporationで遺伝子導入してEGFPあるいはEGFP-Gag融合蛋白を発現させた。また、ほぼ同じGag蛋白領域のコドンをサルモネラのコドンに置き換えた遺伝子を合成してpEGFPのN末に挿入し(pEGFP-coGag)、同様に大腸菌およびサルモネラ菌に導入した。
- (3) サルモネラ菌ベクターの免疫と解析：経鼻免疫は、p24蛋白抗原5 μ gをコレラトキシン(CT:シグマ社)2 μ gとともに一群3から5匹のBALB/cマウスの鼻より2~3週間隔で投与した。これらのマウスあるいはプライムしてないマウスにEGFPあるいはEGFP-Gag融合蛋白発現弱毒サルモネラ菌を経口投与した。最終免疫後6から7日後

の腸管、脾臓等における液性、細胞性免疫をELISPOT, ELISAにより測定した。

- (4) 乳酸菌ベクターの作製と解析：宿主とする乳酸菌は、Th.1型の免疫反応誘導活性がある*Lactobacillus casei*のATCC 393株を用いプラスミドpLP401に、Th.1誘導作用が知られているListeriolysin O (LLO)を組み込み、乳酸菌を形質転換した。LLOは、溶血活性をもつ1,500bp全長のLLO、溶血活性の失われた変異mLLO、およびLLO遺伝子上流1,000bpのみのsLLOの3種のLLO関連遺伝子を組み込んだ。組換え乳酸菌のマクロファージ系細胞JA-4細胞への接着した菌数の測定は、Triton Xを用い細胞を溶かした後、階段希釈後、寒天平板へ摂取し、CFUを測定した。細胞内に侵入した菌数の測定には、細胞外の菌をゲンタマイシンにより処理後、上述の処理によりCFUを測定した。細胞より産生されたTNF- α の定量は、市販のマウスTNF- α 検出ELISAキットを用いた。
- (5) BILLカドヘリンの粘膜免疫に対する解析：BILLカドヘリン遺伝子欠損マウスにおける腸管免疫機能を、IgA産生B細胞の挙動を中心に解析した。小腸上皮に発現するBILLカドヘリンの機能を知るためにBILLカドヘリン分子遺伝子欠損マウスにおける腸管指向性病原体(*Salmonella*, *Listeria*,等)の感染に対する抵抗性を検討した。

C. 研究結果

- (1) 架橋型キトサン微粒子(CNP)の製造と評価：ポリアニオニックな化合物であるTPPにより架橋を行った架橋型キトサン微粒子(CNP)に関して、その平均粒子系は377nmであり、ゼータ電位は+36mVであった。

また、OVA-CNP の OVA 含有率、包含率はそれぞれ約 35%および約 37%で安定しており、試験管内での OVA の放出性は極めて緩やかな徐放性パターンを示した。上記 DDS 標品をラットに経口投与し、腸管免疫賦活化能について検討した結果、小腸粘膜における抗 OVA-IgA 抗体の有意な誘導を確認した。この時、OVA 単独経口投与では血清中の抗 OVA-IgG 抗体の上昇が認められたが、DDS 標品の経口投与では血清中の抗 OVA-IgG 抗体の上昇がほとんど見られなかった。この結果は、キトサン・ナノ粒子 DDS による OVA 投与が、粘膜免疫指向的な免疫賦活化能を有することを示唆した。しかし、産生される抗体量は低く、デリバリーの更なる改善の必要性が示唆された。一つの改善策として腸管粘膜上皮細胞と B リンパ球に限局的に発現する BILL カドヘリン分子(cadherin-17)は、アルギニンの陽性電荷に特異性を示すことが予想されているため、PTD(protein transduction domain)あるいは CPP(cell penetrating peptide)と呼ばれるおもにアルギニン・リジンなどの陽性電荷を持ったアミノ酸配列群を組み込んだ陽性電荷 DDS を新らしく設計した。

- (2) サルモネラ菌ベクターの免疫学的評価: HIV gag コドンを転換した pEGFP-coGag を導入したサルモネラ菌を経口投与し、pEGFP のみを導入したサルモネラ菌を対照としてワクチン効果について検討した。この結果、半数のマウスで抗体産生が誘導されることが認められた。更に、腸管洗浄液中の IgA 抗体価は経鼻免疫群よりも経口サルモネラ免疫群の方が高い個体が多かった。これらはまた、同一抗原により経鼻免疫を介して 1 回プライムされたマウスへの PEGFP-Co

Gag 発現サルモネラ菌の投与は NALT 及び MLN における Gag 特異的 CD8 陽性 T 細胞の頻度を高め、本デリバリーが腸管へのブースターとして有用であると考えられた。

- (3) 溶血活性をもつ LLO、変異により溶血活性の失われた mLLO、および上流 1,000bp のみの sLLO に組み込む乳酸菌を抗原提示細胞株である JA-4 に加え、接着、侵入、生残を調べた。接着では、LLO、mLLO および宿主菌は、ほぼ同数が接着し、細胞内の取り込みは、LLO、mLLO、sLLO の発現で増強し高い値を示した。JA-4 内に侵入 12 時間後の生残数と TNF- α 産生量は、いずれの LLO の発現により非発現乳酸菌と比較し増強した。
- (4) 腸管における B 細胞の挙動に BILL カドヘリンが関与している可能性を検討するために、IgA 産生 B 細胞の局在性を正常マウスと BILL カドヘリン・ノックアウトマウスの小腸組織切片にて比較した。その結果、粘膜基底層に存在する IgA 陽性 B 細胞の数と局在に差異を認めた。その詳細なパターンと機序について現在検討中である。BILL カドヘリン欠損マウスと正常マウスに *Salmonella typhimullium* を 10^8 CFU 経口投与すると、BILL カドヘリン欠損マウスの感受性は有意に低下していた。これは、Listeria の腸内レセプターが E カドヘリンであることを考えると、BILL カドヘリンが *Salmonella* の腸管細胞侵入に何らかの役割を果たしている可能性が強い。現在、GFP を発現させた *Salmonella* 菌を用いて、この菌の細胞侵入機構における BILL カドヘリンの関与機構を解析している。

D. 考察

経口ワクチンデリバリーとしてキトサン微粒子抗体、サルモネラ菌ベクター及び組換え乳酸菌ベクターの開発整備を行った。このため工業的に製造可能な腸溶性 DDS を設計・製造し、性能試験を行い、経口ワクチン DDS の製造過程におけるゲスト分子充填法を改善し、抗原として用いる OVA の含有率を約 40%にまで高めることが出来た。また、この過程で、腸管免疫アジュバントであるコレラトキシンを添加したものを作製した。これらのキトサン・ナノ粒子製剤(DDS)の腸管免疫活性化能を測定した結果、腸管粘膜における抗 OVA-IgA の産生を確認したが活性は低く更なる改良が要求される。このため DDS に 2 次ターゲティング(腸管粘膜移行)能を付与するために、PTD(protein transduction domain)あるいは CPP(cell penetrating peptide)と呼ばれる、細胞膜通過能のあるアミノ酸配列群に注目し、これを DDS に応用することを現在試みている。

一方他の DDS としてサルモネラ菌に codon optimize した HIV-1 Gag を発現させることにより、経口投与のみでも低レベルではあるが血中 IgG 抗体および腸管粘膜面での IgA 抗体産生を誘導できた。更に、細胞性免疫においても粘膜部位共通ブースター効果を認めた。従ってサルモネラ菌ワクチンは単独では免疫効果が弱いものの、腸管に粘膜 IgA 抗体のみならず細胞傷害性 T 細胞を誘導するための補助的なデリバリーとして利用可能であることが示唆された。

第 3 番目の腸管 DDS としての宿主乳酸菌である *L.casei* ATCC393 株の Th.1 誘導作用はなく、細胞性免疫を誘導するワクチンの抗原運搬体として用いるためには、さらに強い Th.1 型の免疫反応を誘導必要がある。本研究では Th.1 誘導作用の知られている LLO を組み込むことにより

その作用が増強されることを期待してプラスミドの構築を行った。プラスミド pLP401 は、組み込んだ遺伝子産物を菌体表層に固定化して発現するが、プラスミド上に、さらに Th.1 型の免疫を誘導する働きのある Listeriolysin O (LLO) 関連遺伝子を組み込むことにより、乳酸菌表層に LLO 関連遺伝子産物が固定化して発現し、細胞性免疫誘導作用を強めることが期待できる。LLO は、溶血素であり、この働きは細胞の膜障害性を示すことから、溶血活性を欠落し免疫への刺激活性のみを残すことが期待できる変異体組込み乳酸菌を作製した。この遺伝子発現組換え体は、JA-4 細胞への接着は、もとの宿主乳酸菌と全く同等であったが、抗原提示細胞株への取り込みは宿主乳酸菌と比べ有意に増強された。抗原提示細胞内に、LLO 関連タンパクを発現した乳酸菌組換え体を取り込まれると、TNF- α の産生が見られ自然免疫産生に有効な活性を有することが推察される。今回得られた結果は LLO の免疫系への刺激ドメインが溶血活性とは別に存在することを強く支持するもので、mLLO と sLLO の活性が溶血性を有する LLO とほぼ同様であったことから、より安全性の高いと思われる sLLO を用いることにより、当初の目標達成が可能と思われる。

B 細胞と粘膜免疫系に発現する BILL カドヘリン分子(cadherin-17)に間する機能解析を行った結果、小腸粘膜固有層に存在する IgA 陽性 B 細胞の局在性と *Salmonella* 菌に対する感受性、おそらくはこの菌の細胞侵入機構に関与している可能性が示唆された。これまでの研究により明らかとなった B1 細胞の機能・動態制御への関与と合わせて、BILL カドヘリンが腸管免疫に役割を果たし、分子的枠組みの一つを担っていることが明らかになりつつある。この分子を足がかりとして、腸管・腹腔の免疫系を標的とし、

効率良く賦活化するワクチン・デリバリー法の開発を進めて行く。

E. 結論

粘膜免疫をターゲットとするワクチンデリバリー(DDS)開発を目的として、抗原 OVA 含有率を 40%に高めた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作製し、経口投与すると抗 OVA IgA 抗体が産生され、この DDS が粘膜免疫指向的な免疫賦活能を有することが明らかとなった。一方サルモネラ菌に codon optimize した HIVgag を発現させ経口投与すると IgA 抗体産生の誘導と粘膜部位 T 細胞活性に対するブースター効果を促し腸管免疫の活性を上昇させることを明らかにし、このデリバリーが追加免疫のための有効な手段となることが示唆された。また腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーとして組換え乳酸菌の開発を行い、溶血活性を失ったリストリオリシンの組込みが免疫活性に必要な自然免疫反応の上昇を促すことが明らかとなった。今後このデリバリーの免疫学的評価が必要とされる。一方、免疫担当 B リンパ球と腸管上皮に発現する BILL カドヘリン分子の機能を遺伝子欠損マウスを作製し解析したところ、BILL カドヘリンが B1 細胞の動態とサルモネラ菌の腸管細胞侵入に関与することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ohnishi, K., Sakaguchi, M., Kaji, T., Akagawa, K., Taniyama, T., Kasai, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohshima, M., Yamamoto, K., Takasuka, N., Hashimoto, S., Ato, M., Fujii, H., Takahashi, Y., Morikawa, S., Ishii, K., Sata, T., Takagi, H., Itamura, S., Odagiri, T., Miyamura, T., Kurane, I., Tashiro, M., Kurata, T., Yoshikura, H. and Takemori, T. Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *JJID, in press., 2005*
- (2) K. Ohnishi, F. Melchers, T. Shimizu. Lymphocyte-expressed BILL-cadherin/cadherin-17 contributes to the development of B cells at two stages. *Eur. J. Immunol., 35(3), 957-963, 2005.*
- (3) Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, Fujii H, Moriyama M, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H. Double-Stranded RNA Poly(I:C) Combined with Mucosal Vaccine Protects against Influenza Virus Infection. *J Virol. 79: 2910-2919, 2005*
- (4) Takasuka, N., Fujii, H., Takahashi, Y., Kasai, M., Morikawa, S., Itamura, S., Ishii, K., Sakaguchi, M., Ohnishi, K., Ohshima, M., Hashimoto, S-I., Odagiri, T., Tashiro, M., Yoshikura, H., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y. A Subcutaneously Injected UV-inactivated SARS Coronavirus Vaccine elicits Systemic Humoral Immunity in Mice. *Int. Immunol. 16:1423-1430, 2004.*
- (5) Cheun HI, Kawamoto K, Hiramatsu M, Tamaoki H, Shirahata T, Igimi S and Makino S-I. Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. *J Appl Microbiol. 96:1347-1353, 2004*
- (6) 五十君静信. 乳酸菌組換えとその応用。バイオインダストリー。22 巻 1 号: 38-45, 2005
- (7) 五十君静信, 梶川揚申, 浅井美里, 金台運。乳酸菌ベクターワクチン。獣医畜産新報。

2. 学会発表

[XV International Symposium on Problems of Listeriosis Uppsala, Sweden, 2004.]

- (1) A. Kajikawa, M. Asai, E. Satoh, A. Okutani, Y. Okada, M. Yamasaki, S. Yamamoto, S. Igimi. PROTECTIVE IMMUNITY AGAINST LISTERIA MONOCYTOGENES BY RECOMBINANT LACTOBACILLUS CASEI EXPRESSING LISTERIOLYSIN O.
- (2) S. Igimi, A. Kajikawa, T.W. Kim, A. Okutani, E. Satoh and Makino S-I. DEVELOPMENT OF LISTERIA VACCINE USING RECOMBINANT LACTIC ACID BACTERIA.

[第34回日本免疫学会総会、札幌、2004年]

- (3) 横田(恒次) 恭子、石毛真行、村上正裕、竹森利忠。弱毒サルモネラ菌ワクチンの経口投与による抗HIV粘膜免疫効果の解析。
- (4) 高須賀直美、藤猪英樹、高橋宜聖、大島正道、阪口雅弘、大西和夫、橋本修一、竹森利忠、横田(恒次) 恭子。UV不活化SARSウイルス全粒子ワクチンの経皮免疫は、強く持続的な液性免疫を誘導する。

[RNAウイルス研究の新展開III、鈴鹿、2004年]

- (5) 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」

[第137回日本獣医学会学術集会、藤沢、2004年]

- (6) 五十君静信。乳酸菌ベクターワクチン。シ

ンポジウム「ワクチン研究の新展開：多様な手法が切り開く‘ワクチン’の可能性」。

[第13回腸内フローラシンポジウムー腸内フローラと感染免疫ー、東京、2004年]

- (7) 五十君静信、梶川揚申、浅井美里、佐藤英一。乳酸菌を抗原運搬体とするワクチン。

[日本学術会議・日本乳酸菌学会シンポジウム。乳酸菌と健康(乳酸菌を用いた健康増進・疾病予防の試み)、福岡、2004年]

- (8) 五十君静信。組換え乳酸菌を用いた感染症予防の試み。

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