

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 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

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第1分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
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デリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
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デリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	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 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

## 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

## 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（総合研究報告）

国立感染症研究所 免疫部

竹森 利忠

平成16年4月～平成18年3月

### 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 IgM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。更に効果を上昇させるため、2次ターゲティング機能を賦与し、この結果、免疫活性が増しIgM抗体産生のみならずIgA抗体産生量の増加が認められた。

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を明らかにした。ワクチンデリバリー有効性の評価のために感染防御に有効なTh1誘導ドメインをプラスミドに導入し、SARS CoVのS、N蛋白をコードする遺伝子を組み込んだ。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。更にこの分子が免疫記憶B細胞の産生に影響を与えることを明らかにした。

### 分担研究者

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

### 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) DDS ナノ粒子製剤の基本素材としてキトサン (CMP)を用い、工業的製造が可能な工程でナノ粒子製剤の設計・製造を行う。この過程で、モデル抗原分子として OVA、粘膜免疫賦活化アジュバントとしてコレラトキシン(CTX)をナノ粒子に含有させ、粒径数百 nm のキトサン微粒子担体を分散法にて製造した。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、抗原タンパク質の腸管内での放出制御を可能にする目的でポリアニオン架橋剤を用いた微粒子の安定化法について検討した。さらに、この DDS 製剤に 2 次ターゲットティング (腸管粘膜移行) 能を付与するため強い陽性荷電を持つ Oligo-L-lysine や Oligo-L-arginine を組み込んだ微粒子の作製を行い、それぞれのコンポーネントの有効性を検討した。またラットを用いた上記 DDS 標品の免疫賦活性化能の評価を行う目的で、1 群 4 匹のラットに対して、抗原 (OVA) 10mg 相当 / ラットの DDS 標品を 0.5% Methyl cellulose/PBS に懸濁して経口投与した。1 週間後に血清中の抗 OVA-IgM と抗 OVA-IgG 及び糞便中の抗 OVA-IgA を ELISA にて測定した。1 ヶ月後に初回免疫と同量の DDS 経口投与によりブーストし、同様の ELISA で抗 OVA 抗体を測定した。さらに 1 ヶ月後、同量の DDS 経口投与により 2 回目のブーストを行い、1 週間後に血清および回腸粘膜分画 (回腸 20cm 長の腸内腔洗浄液) を得、同様の ELISA で抗 OVA 抗体を測定した。
- (2) 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) 経鼻免疫は、p24 蛋白抗原 5  $\mu$ g をコレラトキシン (CT:シグマ社) 2  $\mu$ g とともに一群 3 から 5 匹の BALB/c マウスの鼻腔より 2~3 週間隔で投与した。これらのマウスあるいは非感作マウスに 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) Th.1 型の免疫反応誘導活性がある乳酸菌は、*Lactobacillus casei* の ATCC 393 株を宿主とした。本菌の形質転換に実績のあるプラスミド pLP401 に、Th.1 誘導作用が知られている Listeriolysin O (LLO)の Th.1 誘導ドメインのみを組み込み、乳酸菌を形質転換した。ウイルス由来の抗原は通常乳酸菌において発現が難しいため、乳酸菌におけるコドン情報を基に、乳酸菌に適する遺伝子配列に変換したを組み込んだ。エピトープの菌体表層への固定は、菌体内発現用のプラスミドを構築し、SARS-CoV の S, N 蛋白の単独での発現も検討した。
- (5) 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。BILL カドヘリン分子が、記憶 B 細胞の発生・分化の過程に関与しているか否かを BILL カドヘリン欠損マウスを用いて検討した。すなわち遺伝子欠損マウスと野生型マウスを NP-CG をアラムアジュバントを用

いて免疫し、14日目と40日目の血清中の抗体価をELISAで解析した。40日後の脾臓中の記憶B細胞と胚中心B細胞、または骨髄の抗体産生細胞をFACSとELISPOTで解析した。次に2次免疫応答を観察するために、NP-CG免疫後40日目の脾臓から精製したB細胞と、CGで免疫したT細胞をRAG2<sup>+</sup>マウスへ移入し、NP-CGで二次免疫刺激した。抗体産生細胞への分化がほぼ完了する7日目と10日目の血清中IgG1抗体価をELISAで解析した。

### C. 研究結果

(1) 架橋型キトサン微粒子(CNP)の製造と評価：これまでにモデル抗原OVAを高濃度含有し、アジュバントとしてコレラトキシンを含有するDDS製剤を作製した。ポリアニオン性化合物である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、その平均粒子径は377nmであり、ゼータ電位は+36mVであった。このDDS製剤にさらに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)要素としてPoly-L-arginineとOligo-L-lysineの付加を試みた。Poly-L-arginineについては、有機合成法の難点から、工業的に可能な充分な量を確保できず作製を断念した。Oligo-L-lysine(OLL)を付加要素としたDDS製剤は予定通り作製できたので、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。対照実験として、DDS化していないOVA抗原+コレラトキシン(OVA-CTX)とOligo-L-lysineを付加していないDDS標品(OVA-CTX/CMP)を経口投与して比較した。

2回目のブースト後の回腸粘膜分画に含まれるOVA特異的IgA濃度の平均値はOligo-L-lysine付加DDS標品(OVA-CTX-OLL/CMP)を経口投与した群で最も高く、PTDコンポーネントとして付加したOligo-L-lysineが、2次ターゲティング(腸管粘膜移行)機能を

保持することが示唆された。血清中のOVA特異的IgMの濃度についても、Oligo-L-lysine付加DDS標品(OVA-CTX-OLL/CMP)を与えた群は最も高い平均値を示した。以上の結果はOligo-L-lysineをPTDとして付加することによりDDSの免疫賦活化能を改善できることを示しているが、しかし増加率は我々の予想を下回るものであった。

- (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) 組換え乳酸菌ワクチンデリバリーの開発：溶血活性を持たない上流1,000bpのみのsLLOの下流に挿入する遺伝子として、SARS-CoVのS、N蛋白を選び、乳酸菌に適したコドン配列に変換した遺伝子を準備した。この遺伝子をsLLOと融合蛋白として共発現した組換え乳酸菌菌体表層への発現は確認できなかった。そこで、乳酸菌菌体内に発現が期待されるプラスミドpLP400にSARS-CoVのSまたはN蛋白を単独で組み込み、プロモーターを変化させながら発現を試みた。この検討により、N蛋白について、発現株を得ることができた。
- (4) BILLカドヘリンの一次免疫応答に対する影響の検討：NP-CGに対する一次免疫応答において、胚中心B細胞の数およびIgG1抗体のレベルと親和性成熟の過程は、野生型とBILLカド

ヘリン欠損マウスで有意な差は認められなかった。このことから BILL カドヘリンの発現は、一次免疫刺激による胚中心での B 細胞分化には関与していないことが示唆された。二次免疫応答において、血清中の抗 NP 総 IgG1 抗体価および高親和性抗体価は、BILL カドヘリン欠損マウスでは野生型に比べて著しく低下していた。一次免疫応答において BILL カドヘリン欠損マウスと野生型では記憶 B 細胞数に変化がないことから、これらの結果は BILL カドヘリン分子の発現が欠損することにより二次免疫応答での記憶 B 細胞から抗体産生細胞への分化が阻害されている可能性が考えられた。現在、BILL カドヘリンと記憶 B 細胞の機能発現の関連を検討している。

#### D. 考察

(1) 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。モデル抗原として OVA を高濃度含有し、粘膜免疫アジュバントとしてコレラトキシンを含有する DDS 製剤に、2 次ターゲッティング（腸管粘膜移行）能を付与する PTD (protein transduction domain) 要素として Poly-L-arginine と Oligo-L-lysine の 2 つについて検討した。Poly-L-arginine は有機合成法が複雑で工程的に無理があるため作製を断念した。Oligo-L-lysine については、免疫賦活化能を評価することができた。PTD 機能を有する低分子ペプチドはこれまでに数多く報告されており、その性質・活性強度は多岐にわたっている。細胞接着因子である BILL カドヘリン分子の作用機作が arginine に依存するという観察を考慮すると Poly-L-arginine と Oligo-L-lysine の陽性電荷の強度は両者で同等であるが、アミノ酸としての生理活性は arginine が適格であると考えられる。この BILL カドヘリンは、小腸パイエル板の M 細胞を含む上皮細胞に非常に強く発現し、抗体産生 B 細胞にも分化時

期特異的に発現し、ワクチン効果のターゲットである免疫記憶 B 細胞の機能にも関与していることが示されている。一方、Oligo-L-lysine は強い陽性荷電を持つことから PTD 機能を持つことが知られているが、BILL カドヘリンとの相互作用・親和性については未検討である。今後、BILL カドヘリンをターゲットした PTD 化合物を BILL カドヘリン分子との結合性を指標としてスクリーニングすることにより、より効果的な 2 次ターゲッティング（腸管粘膜移行）機能を実現することが可能であると考える。Oligo-L-lysine を付加した DDS 標品 (OVA-CTX-OLL/CMP) は、ラットに経口投与することにより効果的に抗原特異的 IgA の腸管粘膜への分泌を誘導した。このことは、キトサン・ナノ粒子 DDS 製剤による腸管指向性ワクチン化の基本的な戦略が正しかったことを示している。今後、PTD 要素のスクリーニングによる 2 次ターゲッティング（腸管粘膜移行）機能の最適化と粘膜免疫アジュバントの改良を行うことが必要であると考える。

(2) 宿主乳酸菌である *L. casei* ATCC393 株に Th.1 誘導作用の知られている LLO を組み込むことによりワクチン効果が増強されることを期待し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発現するが、さらに Th.1 型の免疫を誘導する Listeriolysin O (LLO) 関連遺伝子を組み込むことにより、細胞性免疫誘導作用を強めることが期待できる。一方、LLO は、溶血素であり、この働きは細胞の膜障害性を示し、免疫担当細胞への細胞障害性を示す可能性がある。そこで、LLO の溶血活性と免疫への刺激活性が遊離できるものであれば、溶血活性を取り除き、免疫への刺激活性のみを残すことが期待できる。昨年までの検討で得られた結果は、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支持する。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。今後この下流に SARS-CoV の S または N 蛋白を融合蛋白として共発現することは、以下の3点からその免疫効果を高めることが期待される。

乳酸菌組換えにおいてウイルス由来の遺伝子は発現が難しく、今回検討した SARS-CoV の S または N 蛋白と LLO の Th.1 ドメインの融合蛋白は乳酸菌菌体表層に発現しなかった。しかし、SARS-CoV 由来遺伝子の乳酸菌における発現の可能性について、分泌シグナル、菌体表層への固定に必要なアンカー配列、LLO といった遺伝子を除いて、SARS-CoV 由来遺伝子のみを単独で組み込み発現を試みたところ、N 蛋白について発現株を得ることができた。

#### E. 結論

PTD (protein transduction domain) 要素として、Oligo-L-lysine を現開発段階の DDS に組み込むことにより、抗原特異的な IgA の腸管粘膜への分泌応答の誘導が改善された。このことは、PTD の付与によって、キトサン・ナノ粒子 DDS に2次ターゲティング (腸管粘膜移行) 機能を持たせるという基本戦略が有効であることを示している。PTD 要素化合物のスクリーニングと粘膜免疫アジュバントの改善により、実用化に向けた腸管指向性ワクチン・デリバリーシステムの性能の最適化が可能であると考えられる。

また、細胞性免疫の誘導に有用な Th.1 型免疫反応を増強するために、LLO の Th.1 誘導ドメインと SARS-CoV の S, N 蛋白を融合蛋白として乳酸菌菌体表層に固定化して発現させることを試みたが、発現株は得られなかった。しかしプラスミドベクターの検討により、SARS-CoV の N 蛋白については、単独で乳酸菌菌体内へ発現することに成功した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Hasegawa, H., Sawa, H. Lewis, M.J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., Matsuda, J., Sata, T., Kurata, T., Nagashima, K., and Hall, W.W. Development of thymus-Derived T-cell leukemia/lymphoma in mice transgenic for the tax gene of human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *Nature Medicine* 2006, in press.
- (2) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ohnishi, K., and Takemori T. Serological diagnosis for SARS Corona virus. *Review Medical Virology* 16: 117-131, 2006
- (3) Ohnishi, K., Sakaguchi, M., Kaji, T., Akagawa, Taniyama, T., K., Kasai, M., Yokota-Tsunetsugu, Y., Ohshima, M., Yamamoto, K., Takasuka, N., Hashimoto, S.-I., 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. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58:88-94, 2005.
- (4) Inamine, A., Takahashi, Y., Tokuhisa, T., Miyae K., Takemori, T. and Abe, R. Two waves of memory B cell generation in the primary immune response. *Int. Immunol.* 17:581-589, 2005.
- (5) Takahashi, Y., Inamine A., Hashimoto, S.-I., Yoshioka, E., Kojima, N., Abe, R. and Takemori T. A unique role of Ras in memory B cell response. *Immunity* 23:127-138, 2005.
- (6) Honnma, K., Udono, H., Ohkusu-Tsukada, K., Khono, T., Yamamoto, K., Ogawa, A., Takemori, T. Kumatori, A., Suzuki, S., Matsuyama, T. and Yui, K. Interferon regulatory factor-4 negatively regulates the product of proinflammatory cytokines by macrophages in response to LPS.

- Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:16001-16006, 2005.
- (7) 五十君静信。(2005) 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
- (8) 五十君静信。(2005) CODEX 基準 微生物ガイドライン。新しい遺伝子組換え体 (GMO) の安全性評価システムガイドブック。エヌ・ティー・エス。P119-134
- (9) 五十君静信。(2005) 微生物および食品添加物としての安全性評価。新しい遺伝子組換え体 (GMO) の安全性評価システムガイドブック。エヌ・ティー・エス。P274-280
- (10) 五十君静信。(2005) プロバイオティクスの安全性。プロバイオティクスとバイオジェニクス～科学的根拠と今後の開発展望～。エヌ・ティー・エス。P335-342
- (11) 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。腸内フローラと免疫・感染。学会出版センター。P149-173。(2005)
- (12) 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).
- (13) 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*
- (14) 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.
- (15) 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**
- (16) 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.**
- (17) 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**
- (18) 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
- (19) 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。57:748-752, 2004
2. 学会発表  
(15<sup>th</sup> Germinal centre conference Potsdam, Germany, April, 2005)
- (1) Takemori, T. “Ras is essential for memory B cell survival (招待講演)”  
(Symposium on regulation of immune diversity and surveillance. Kyoto, March, 2005)
- (2) Takemori, T. “Unique role of the Ras in memory B cell response (招待講演)”  
(Seventh International Congress on AIDS in Asia and the Pacific, Kobe, July 1-5, 2005.)
- (3) Yamamoto, T., Isogai, M., Inoue, J.-I.,

Tsunetsugu-Yokota, Y. Inhibition of HIV-1 replication in primary macrophage by a Nef-specific short hairpin RNA expressing lentivirus vector.

(8th Symposium on Lactic Acid Bacteria. 2005)

- (4) Kajikawa A, Asai M, Satoh E, Yamasaki M, Kim T, Yamamoto S, and Igimi S. Protective immunity against *Listeria monocytogenes* by recombinant *Lactobacillus casei* expressing listeriolysin O.

(第35回日本免疫学会総会、横浜、2005年12月)

- (5) Takemori, T., Takahashi, Y., Kaji, T., Hashimoto, S.-I., and Kuraoka, M. "Memory B cells express a set of unique genes, associated with anti-apoptotic activity" (Symposia: from germinal center to memory: affinity selection and cell fate decisions) (シンポジスト：口演)
- (6) 加地友弘、高橋宜聖、竹森利忠「Survival of motor neuron(SMN)蛋白質による抗酸化作用抵抗性の賦与」(口演)
- (7) 高橋宜聖、加地友弘、稲嶺絢子、橋本修一、広瀬幸子、竹森利忠「マウス記憶 B 細胞に発現増強するアポトーシス抑制分子の作用機序」(口演)
- (8) 窪田真澄、高橋宜聖、竹森利忠、大西和夫 B 細胞分化の過程で発現する BILL-cadherin は二次免疫応答における抗体産生細胞の分化に関与する」(口演)
- (9) 藤猪英樹、阿戸学、高橋宜聖、橋本修一、中山俊憲、谷口克、小安重夫、竹森利忠「HIVnef 発現により誘導される成熟 T 細胞の機能低下」(ポスター)
- (10) 山本紀一、阿戸学、藤猪英樹、高橋宜聖、橋本修一、加地友弘、竹森利忠「不活化インフルエンザウイルスに含まれる白血球数減少活性の刺激」(ポスター)
- (11) 窪田真澄・高橋宜聖・竹森利忠・大西和夫「B 細胞分化の過程で発現する BILL-cadherin は二次免疫応答における抗体産生細胞の分化

に関与する」

(第53回ウイルス学会、横浜、2005)

- (12) 山本拓也、井上純一郎、横田 (恒次) 恭子 : HIV-1 nef発現を抑制するshRNA発現システムの構築とマクロファージにおけるNefの機能解析。

(第9回腸内細菌学会特別講演。2005)

- (13) 五十君静信。組換え微生物の安全性を考える。

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

- (14) 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.
- (15) 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]

- (16) 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。
- (17) 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]

- (18) 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]

- (19) 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]

- (20) 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]

- (21) 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

---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31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