

密着結合蛋白質を利用した経鼻エイズワクチン基盤技術の開発

所 属 大阪大学薬学研究科
研究者 近藤 昌夫

研究要旨

周知のように、単回投与で病原体特異的かつ長期にわたる免疫反応を惹起可能であること、副作用がほとんどないことから、有効かつ安心・安全な次世代エイズ治療法としてワクチンが注目されている。とりわけ粘膜ワクチンは、①HIV の初発感染部位（粘膜面）における感染予防作用、②体内に侵入した HIV に対する体液性免疫誘導作用、③細胞障害性 T 細胞活性化による HIV 感染細胞排除活性を併せ持つことから、夢のエイズ治療薬として注目されているものの、粘膜免疫組織に効率的に抗原を送達する技術開発の遅延から、エイズ粘膜ワクチンの開発は遅々として進展していない。

本研究は、粘膜免疫組織に高発現している claudin-4 (CL4) に着目し、独自に最近見出した CL4 binder を利用した経鼻ワクチン開発の萌芽を、経鼻エイズワクチン基盤技術として三ヶ年計画で顕在化することを目的としている。一年目の本年度は、鼻粘膜免疫組織における CL4 発現を解析し、卵白アルブミンをモデル抗原として用いて CL4 binder を利用した経鼻ワクチンの免疫賦活化特性を解析し、既存の CL4 binder に比して優れた物性を有する新規 CL4 binder の作製を試みた。

A. 研究目的

本研究は、独自かつ世界唯一の claudin-4 (CL4) binder 技術を有効活用することにより初めての経鼻エイズワクチン基盤技術を創出し、大阪大学が中核となる先端医療開発特区（スーパー特区）と密接に連携し、本課題終了後可及的速やかに実用化研究へ展開することを目的とする。

周知のように、粘膜ワクチンはヒト免疫不全ウイルス (HIV) の侵入門戸である粘膜面での HIV 侵入防御網構築、体内に侵入した HIV の排除機構の活性化能を併せ持つことから、夢の HIV 感染予防・治療薬として期待されているものの、粘膜免疫組織に効率良く抗原をデリバリーするシステムの開発遅延と相俟って、有効かつ安全な粘膜ワクチンの創出は立ち遅れている。最近粘膜免疫組織を覆う上皮細胞に密着結合構成蛋白質 CL4 が高発現していることが示され、CL4 を利用した粘膜免疫組織への抗原デリバリー法が提唱された。しかしながら、CL4 は抗原性が低く CL4 の細胞外領域に対する抗体作製は著しく立ち遅れており、特許および論

文を見ても分かるように、CL4 を利用した粘膜ワクチン開発は皆無である。

既に申請者近藤は、CL4 binder (C-CPE、ウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体結合ドメイン) とトキシンの融合蛋白質が CL4 発現細胞特異的に細胞障害性を発揮することを見出し、C-CPE が CL4 ターゲッティング分子として利用できること明らかにしていた (J. Pharmacol. Exp. Ther, 2006 他)。さらに、C-CPE を経鼻投与することでペプチド性医薬品の粘膜吸収が促進することを見出し、CL4 binder を利用した経鼻デリバリーの可能性を見出している (Biochem. Pharmacol., 2010)。

これら独自の研究成果を踏まえ、本研究では三ヶ年計画で CL4 binder を利用した経鼻ワクチンを開発することを目的としている。一年目の本年度は、①鼻粘膜免疫組織 (NALT) における CL4 発現を解析し、②卵白アルブミン (OVA) をモデル抗原として用いて CL4 を利用した経鼻粘膜ワクチンの免疫賦活化特性を解析し、③C-CPE に比して優れた物性を有する新

規 CL4 binder の創製を試みた。

B. 研究方法

① NALT における CL4 発現解析

1) RT-PCR 法による鼻腔組織における CL4 の発現

マウスより鼻腔組織を摘出し、ISOGEN (WAKO) を用いて RNA を回収した。回収した RNA 量は、分光光度計 (DU640: BECKMAN) を用いて波長 260 nm で吸光度を測定し、40 µg/ml RNA 溶液の吸光度を 1.0 として算出した。約 1 µg の RNA に対して TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TAKARA) を用いて逆転写反応を行った。得られた転写産物を用い、PCR により CL4 (Forward primer: 5'-tggatgaactgcgtggtg-3'、Reverse primer: 5'-gggtgtagaagtcgcatg-3'、94 °C、45 sec、52 °C、60 sec、72 °C、30 sec、35 cycles) を、またポジティブコントロールとして β-actin (Forward primer: 5'-tagatgggcacagtgtggg-3'、Reverse primer: 5'-ggcgtgatgtgggcatgg-3'、94 °C、30 sec、58 °C、60 sec、72 °C、30 sec、30 cycles) を増幅し、得られた PCR 産物を 2% TBE ゲルにて、泳動、検出した。

2) Western blot 法による鼻腔組織における CL4 の発現

マウス鼻腔組織は、組織溶解 buffer (50 mM Tris buffer [pH 7.5]、150 mM NaCl、0.1% Triton X、0.1% SDS、1 mM オルトバナジン酸、1 mM EDTA、10 mM NaF、1 mM PMSF) 200 µl に溶解し、4 °C、20,000 ×g で 20 分間遠心し、上清を Western blot に使用した。

3) 免疫組織染色法による鼻腔組織における claudin-4 の発現

安楽死させたマウスの頭部を切断し、4%パラホルムアルデヒドを用い 4 °C にて一晩固定した。翌日、PBS に置換し、EDTA 法にて脱灰後、パラフィン包埋し、マイクロトームにて 4 µm 厚の切片を作製した (アプライドメディカルリサーチにパラフィン切片の作製を依頼)。得られた切片を 60 °C で加温し、パラフィンを溶かした。その後、すぐにキシレンに浸し、脱パラフィン操作を行なった。脱パラフィン操作をした切片

を徐々にエタノール濃度を下げることで親水性にした。その後、Target Retrieval Solution (pH 9.0、Dako) に浸し、Pascal (Dako) を用いて抗原の賦活化を行なった。

賦活化した切片の CL4 の染色には AutoStainer (Dako) を用い、End. Enz. には POD Blocking Solution、Protein Blocking には 10% BSA、primary Ab には Rabbit anti-CL4 mAb、Secondary Ab には Envision + anti-rabbit、Substrate には DAKO DAB+を使用した。

染色後の切片をヘマトキシリン (Dako) に 1 分間浸し、水道水ですすぎ、10 分間流水に浸した。その後、徐々にエタノール濃度を上げ、さらにキシレンに浸すことで脱水操作を行なった。脱水した切片を MOUNT-QUICK (DAIDO SANGYO) を用いて封入し、顕微鏡下で観察した。

② CL4 を利用した粘膜ワクチンの免疫賦活化特性解析

1) OVA-C-CPE をコードしたプラスミドの作製

pCMV-Script/OVA プラスミドを鋳型とし、5' -gcggtaccatgggctccatcgggcgcagc-3' (Forward primer、the underline indicates *KpnI* site)、5' -ccttaattaaaggggaacacatctgccaa-3' (Reverse primer、the underline indicates *PacI* site) を用いて OVA を含む領域 KOD-plus-にて増幅させた。得られた PCR 産物を PCR Purification Kit を用いて精製し、*KpnI*、*PacI* を用いて 37 °C にて一晚制限酵素処理した。T4 DNA ligase を用いて 16 °C にてあらかじめ *KpnI*、*PacI* にて制限酵素処理した pET-MCS-C-CPE と一晚ライゲーション反応を行い、インサートの確認およびシーケンス解析を行い、OVA-C-CPE をコードしたプラスミド (pET-OVA-C-CPE) を得た。

2) OVA-C-CPE303 をコードしたプラスミドの作製

C-CPE303 をコードする発現ベクターを用い、pET-MCS-C-CPE303 を作製した。なお、MCS の挿入には、両端に *NdeI* binding サイトを持つ 5'-tataggtaccgggactagtaattaagggaggaggaggatctgga

ggaggaggatctggaggagc-3'、5'-tagctcctccagatccctcctccagatccctcctcctcccttaattaactagtcgccgggtaccta-3'を用いた。pET-OVA-C-CPEを*KpnI*、*PacI*を用いて37°Cにて2時間制限酵素処理し、1% TAEゲルを用いて、OVA遺伝子を分離した。OVA遺伝子を含むゲルを切り出し、QIAEX II Agarose Gel Extraction kit (QIAGEN)を用いて精製した。精製したOVA遺伝子とあらかじめ、*KpnI*、*PacI*処理したpET-MCS-C-CPE303とを混合し、T4 DNA ligaseを用いて16°Cで一晩ライゲーション反応を行った。ライゲーション産物からプラスミドを精製し、インサートの確認およびシーケンス解析を行い、OVA-C-CPE303をコードしたプラスミド(pET-OVA-C-CPE303)を得た。

3) OVA-C-CPEの発現誘導条件の検討

OVA-C-CPE、OVA-C-CPE303発現プラスミドをヒートショック法にて大腸菌 BL21 (DE3) (Novagen) にトランスフォーメーションし、LAプレートに播種し一晩培養した。翌日コロニーをピックアップし、LA培地3 mlにて37°Cで一晩振盪培養した。LA培地を2 mlずつ分注したSterile Culture Tubes (IWAKI) に大腸菌培養液を50 µlずつ加え、37°Cで3時間振盪培養した。その後、isopropyl-β-D (-) thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度0、0.25、0.5、または1.0 mMとなるように添加し、さらに37°Cで3時間振盪培養した。遠心分離により大腸菌を回収後、200 µlのLaemmli's sample buffer (12.5% glycerol、31.25 mM Tris-HCl (pH 6.8)、1% SDS、0.02% bromophenol、1.25% 2-mercaptoethanol) に懸濁し、氷冷しながら20秒間超音波処理を行い、大腸菌を破碎した。4°C、14000 rpmで10分間遠心分離し、上清を回収して99°Cで5分間加熱し、これを泳動用サンプルとした。泳動用サンプルをSDS-PAGEに供し、coomassie brilliant blue (CBB、Bio-Rad) 染色液で1時間染色後MilliQ水を用いて脱色洗浄し、OVA-C-CPE、OVA-C-CPE303が多く産生されているIPTG濃度を示適濃度に設定した。

4) OVA-C-CPEの可溶化条件の検討

OVA-C-CPE、OVA-C-CPE303の発現誘導条件の

検討に準じ、大腸菌を回収した。大腸菌をbuffer A (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、400 mM NaCl、5 mM MgCl₂、0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride、1 mM 2-mercaptoethanol、10% glycerol) 1 mlに懸濁し、氷冷しながら40秒間3回超音波処理を行い、大腸菌を破碎した。4°C、14,000 rpmで15分間遠心分離し、上清を回収した後、沈殿に2% TritonX-100含有buffer Aを1 ml加え、超音波処理を行った。遠心分離後、沈殿に8 M urea含有buffer Aを1 ml加え、超音波処理をした。遠心分離後上清を回収し、適宜4 × Laemmli's sample bufferを添加し、99°Cで加熱することで泳動用サンプルとした。泳動用サンプルをSDS-PAGEに供し、CBB染色した後、DTAまたはDTA-C-CPEが多く可溶化していた画分の可溶化条件を基に精製条件を設定した。

5) OVA-C-CPEの精製

OVA-C-CPEを発現させた大腸菌(500 ml culture分)を5 mlの可溶化bufferに懸濁し、氷冷しながら40秒間超音波処理を3回を行い、4°C、14,000 rpmで15分間遠心分離し、上清を回収した。予め6 M guanidine/EDTA、MilliQ水、0.1 M NiSO₄、buffer Aを順に流して平衡化しておいたHiTrap™ Kit (GE Healthcare)を用いてAKTAprime plus (GE Healthcare)により精製した。すなわち、buffer Aおよび100 mM imidazole 10 mlずつで洗浄後、10 mlで100-500 mM imidazoleのグラジエントとなる条件にて精製し、UVの値を元にフラクションを回収した。

OVA-C-CPEが溶解しているbufferをPBS (137 mM NaCl、2.68 mM KCl、8.14 mM Na₂HPO₄、1.15 mM KH₂PO₄)に置換するためPD-10 column (GE Healthcare)を用いた。あらかじめPD-10 columnにPBSを30 ml流して平衡化しておき、HiTrap™ Kitで得た溶出液1 mlを流した。PBSを500 µlずつ流しPD-10 columnから溶出液を分取した。BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE)を用い、560 nmにおける吸光度を測定することでタンパク質濃度を算出した。なお、検量線には標準タンパク質としてBSAを用いた。

6) pFastBac-CL4の作製

マウス CL4 の遺伝子を T-Easy vector に挿入した pGTCL-4 (神戸大学大学院医学研究科 古瀬幹夫博士より供与) を鋳型とし、KOD-plus-を用いて PCR を行った。なお、Forward primer として 5'-gctctagaatggattacaaggatgacgacgataagatggcgtctatggactacaggctcctgggaatctccttagca-3', the underline indicates *XbaI* site)、Reverse primer として 5'-ggggtaccttacacatagttgctggcggggacagagcgggc-3', the underline indicates *KpnI* site) を使用した。得られた PCR 産物を PCR Purification Kit を用い精製後、*XbaI* および *KpnI* により、37 °C にて一晚制限酵素処理した。あらかじめ *XbaI* および *KpnI* 処理した pFastBac1 と T4 DNA ligase を用いて 16 °C にて一晚ライゲーション反応を行い、インサートの確認およびシークエンス解析を行い、マウス CL4 をコードしたプラスミド (pFastBac-CL4) を得た。

7) Bacmid の作製

pFastBac-CL4 をヒートショック法にて大腸菌 DH10Bac (Invitrogen) にトランスフォーメーションし、50 µg/ml kanamycin、7 µg/ml gentamicin、10 µg/ml tetracycline を含み、2% 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside (X-gal) 100 µl および 50 mM IPTG 100 µl を塗布した LB 培地プレートに播種し、37 °C で 24 時間培養した。任意の白コロニーをピックアップし、アルカリプレップにて大腸菌から bacmid を精製した。精製した bacmid に目的とする遺伝子が挿入されていることを PCR 法にて確認した。なお、Forward primer として 5'-gttttccagtcacgac-3'を、Reverse primer として 5'-ggaaacagctatgacctg-3', 5'-ggggtaccttacacatagttgctggcggggacagagcgggc-3' を用いた。目的とする遺伝子断片の挿入が確認された bacmid をヒートショック法にて大腸菌 DH5α にトランスフォーメーションし、50 µg/ml kanamycin を含む LB 培地 (LK) プレートに播種し、37 °C で一晚培養し、コロニーをピックアップ後、LK 培地 100 ml でさらに一晚培養した。大腸菌を回収し、QIAfilter™ plasmid Midi kit (QIAGEN) を用いて bacmid-CL4 を精製した。

8) Budded baculovirus (BV) -CL4 の作製

培養用 6 穴プレートに 2×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞 (Invitrogen) を播種し、室温で 1 時

間静置した。静置中に tube A (cellfectin (Invitrogen) 6 µl、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 (Invitrogen) 100 µl) と tube B (bacmid-CL4 1 µg、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100 µl) を用意し、tube A と tube B とをよく混和し、泡立てないようにゆっくりピペティングした後、室温で 30 分間放置した。

1 時間静置することで接着させた Sf9 細胞を血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地で洗浄後、培地を除去し、tube A と tube B との混合溶液に血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 800 µl を加え、ウェルに全量 (1 ml) 添加し、プレートをビニールテープで密封して 5 時間、27 °C で培養した。その後、培地を除去し、血清と抗生物質を含む 2 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen) に交換し、27 °C で 3 日間培養した。3 日後、培養上清を $800 \times g$ で 10 分間遠心することで回収した (P1 ストックと称する)。続いて、 2×10^6 cells/ml の Sf9 細胞 200 ml に対して、P1 ストック 2 ml を加え、27 °C で 2 日間培養した。2 日後、培養上清を $800 \times g$ で 10 分間遠心することで回収した (P2 ストックと称する)。

培養用 6 穴プレートに 2×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞を播種し、P2 ストックを 10、100、1000 µl ずつ加え、27 °C で 3 日間培養した (全量 2 ml)。3 日後、 $800 \times g$ で 10 分間遠心し、上清を回収した。Protease inhibitor (SIGMA) および 1% Triton-X を含む PBS で細胞ペレットを懸濁後、超音波処理で破碎し細胞可溶化液とした。培養上清および細胞可溶化液を用いて、Western blot 法にて目的とするタンパク質の発現を確認した。

2×10^6 cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに用意し、発現確認のできた P2 ストックを適量加え、27 °C で 3 日間培養した。3 日後、培養上清を $800 \times g$ で 10 分間遠心することで回収した。回収した培養上清を $10,000 \times g$ で 25 分間さらに遠心した。得られた沈殿を PBS で懸濁後、 $800 \times g$ で 10 分間遠心し、上清をさらに $10,000 \times g$ で 25 分間遠心した。得られた沈殿を protease inhibitor を含む TBS 250 µl で懸濁し、BCA™ Protein Assay Kit を用いてタンパク質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用いた。

9) BV ELISA

96穴 ELISA plate (Greiner) に BV-CL4 (ネガティブコントロールとして BV-WT および BV-CL1) を 0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 、over night で固相化した。1.6% ブロックエース (DS PHARMA BIOMEDICAL) を用いて、室温で2時間ブロッキングした。サンプルを 0.02 $\mu\text{g}/\text{well}$ で添加し、室温で2時間反応させた。1.6% ブロックエースで3000倍に希釈した mouse anti His-tag mAb (Zymed) を加え、室温にて2時間反応させ、さらに 0.4% ブロックエースで2000倍に希釈した HRP 標識 goat anti-mouse IgG を添加し、室温にて1時間反応させた。TMB solution (Thermo Scientific) を加え、20分間反応させ、2 M 硫酸を加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。なお、プレートから各溶液を除去する際には、0.05% Tween 20-PBS (T-PBS) による洗浄操作を5回行なった。

1 0) マウスへの免疫とサンプル回収

BALB/c マウスに週1回、計3回、ovalbumin (OVA, SIGMA) 単独、OVA + C-CPE 混合液、OVA-C-CPE、OVA-C-CPE303 を経鼻より投与した。なお、すべての群において1匹、1回当たりの投与量は OVA として 5 μg とし (OVA + C-CPE 混合液投与群では OVA 5 μg と C-CPE 1.89 μg 、OVA-C-CPEs 投与群では融合蛋白 6.89 μg)、投与量が 10-15 μl となるように PBS に溶解した。最終投与より1週間後に、血清、鼻腔洗浄液、膣洗浄液、および糞便抽出液を回収した。

・血清

麻酔したマウスから眼底採血により血液を回収し、3000 \times g で10分間遠心し、上清を PBS にて10倍に希釈し、-20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

・鼻腔洗浄液

安楽死させたマウスの気道から鼻腔にむけて 200 μl の PBS を流し込み、その洗浄液を回収し、-20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

・膣洗浄液

マウスの膣口に 50 μl \times 2 の PBS を流し込み、10回ピペッティングを行い回収し、-20 $^{\circ}\text{C}$ で保

存した。

・糞便抽出液

マウスの糞便を回収し、糞便 10 mg につき 100 μl の割合で PBS を加え、4 $^{\circ}\text{C}$ 、で10分間ボルテックスを行った。その後、3000 \times g、10分間遠心し、上清を回収し、-20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

1 1) ELISA 法による OVA 特異的抗体価の測定

OVA を炭酸緩衝液 (0.19 M Na_2CO_3 、1.67 M NaHCO_3 (pH 9.6)) に溶解し、96穴 NUNC Immuno plate に 100 $\mu\text{g}/\text{well}$ となるように分注し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、over night で固相化した。4% ブロックエースを用いて、室温にて2時間ブロッキングした。TBS-T にて10倍希釈したブロックエース (sample diluent) を用いて各種サンプルを適宜希釈し、50 $\mu\text{l}/\text{well}$ でプレートに添加し、室温にて2時間反応させた。その後、sample diluent にて HRP detection antibody (IgG, IgA, IgG1, IgG2a (BETHYL)) を 1/10,000 に希釈し、100 $\mu\text{l}/\text{well}$ となるように加え、室温にて1時間反応させた。TMB solution を加え、室温で20分間反応させ、2 M 硫酸を加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定し、吸光度を log 10 の力価として表記した。なお、プレートから各溶液を除去する際には、T-TBS による洗浄操作を5回行なった。

1 2) 脾臓細胞の回収

最終投与より1週間後に、BALB/c マウスを安楽死させ、消毒用アルコールで消毒し、無菌的に脾臓を回収した。5 ml の注射筒を用いて、70 μm のセルストレイナー (FALCON) 上で脾臓をホモジナイズし、50 ml チューブに回収した。2000 rpm で5分間遠心し、ペレットに氷冷した ACT 溶液 (15 M NH_4Cl 、1 mM KHCO_3 、1 mM EDTA) を加えよく懸濁し、氷中で5分間インキュベートした。その後、さらに 10% FBS を含む RPMI1640 (NISSUI) 5 ml を添加し、セルストレイナーを通して別の 50 ml チューブに移した。2000 rpm で5分間遠心し、上清を除去後、10% FBS を含む RPMI1640 で再懸濁した。懸濁した脾臓細胞を 96-well plate (FALCON) に 1×10^6

cells/well で播種し、1 mg/ml OVA 溶液存在下、37 °C で 24 時間培養し、培養上清を回収し、-80 °C で保存した。

1.3) サイトカイン ELISA

回収した培養上清をサイトカインアッセイキット (R&D SYSTEMS) を用いて測定した。測定方法はキットのプロトコールに従った。

③ 新規 CL-4 binder の作製

1) C-CPE 変異体の作製

各種 C-CPE 変異体は天然型 C-CPE を鋳型として用いた PCR 法による変異導入後にクローニングし、His タグ融合蛋白質発現ベクター pET16b に挿入した。当該プラスミドを *E. Coli* BL21 にトランスフォーメーションし、過去の精製法に準じ Ni カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィ法により精製した (Biochem. Pharmacol., 75, 1639, 2008)。蛋白質の精製は SDS-PAGE 後 Coomassie Brilliant Blue 染色により確認した。尚、精製蛋白質は溶媒を PBS に置換後 -80 °C に凍結保存した。

2) 溶解度試験

0.4 M Imidazole 含有 PBS (pH 7.4) に溶解した各変異体を限外濾過フィルター (Amicon Ultra-4 : MW 10K cut) を使用して 15 °C、4000×g で濃縮、10 分おきに濃縮状況を確認し、濾液量が一定になったところを濃縮限界とした。濃縮限界に到達した濃度を飽和濃度 (最大到達濃度) として各種 C-CPE 変異体の溶解度とした。

3) CL4 結合性の解析

Biacore を用いて、各種 C-CPE の CL4 結合性を解析した。センサーチップ CM5 に CL4 を固定化後、各種 C-CPE 変異体を 1.25、2.5、5、10、20 nM になるように添加し、センサーグラムを解析することで結合速度定数 K_a 、解離速度定数 K_d 、解離定数 $KD (=K_d/K_a)$ を算出した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

① NALT における CL4 発現

腸管粘膜組織パイエル板には CL4 が高発現していることが知られている。そこで、まず NALT における CL4 の発現を確認した。まず、NALT 組織を用いて RT-PCR およびウエスタンブロットティングにより、CL-4 発現の有無を解析したところ、mRNA レベルおよび蛋白質レベルいずれにおいても NALT における CL4 発現が観察された (Fig. 1A and 1B)。そこで次に、NALT における CL4 発現を免疫染色により解析したところ、NALT を覆う上皮細胞層において CL4 の強い染色像が認められた (Fig. 1C)。以上の結果から、CL4 を利用した NALT への抗原送達の可能性が示唆された。そこで次に、卵白アルブミン (OVA) をモデル抗原として用いて CL4 を利用した粘膜ワクチンの活性を解析した。

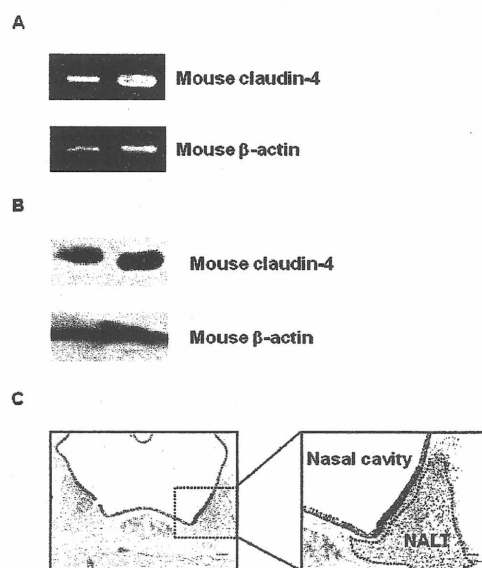


Figure 1 Expression of claudin-4 in NALT
A) RT-PCR analysis: mRNA was isolated from NALT of mice, and expression of claudin-4 was assayed by RT-PCR. B) Immunoblot analysis: The lysate of NALT was subjected to SDS-PAGE, followed by western blotting with anti-claudin-4 Ab. β -actin was used as an internal control. C) Immunohistochemical analysis: Specimens were cryosectioned (4 μ m) and stained with anti-claudin-4 Ab, followed by horseradish peroxidase-labeled secondary Ab. The immunoreactive regions were stained with a commercially available staining kit.

② CL4 を利用した粘膜ワクチンの免疫賦活化特性の解析

1) OVA-C-CPE の作成

まず、OVA と天然型 C-CPE の融合蛋白質を作製した (Fig. 2A and 2B)。次に、OVA-C-CPE の CL 発現 BV に対する結合性を C-CPE をポジティブコントロールとして用いて解析したところ、OVA-C-CPE は CL 非発現 BV (BV-WT) お

よび CL1 発現 BV (BV-CL1) には結合性を示さず、BV-CL4 に対してのみ結合性を示したことから (Fig. 2C)、OVA-C-CPE は CL4 指向性を有するものと推察される。

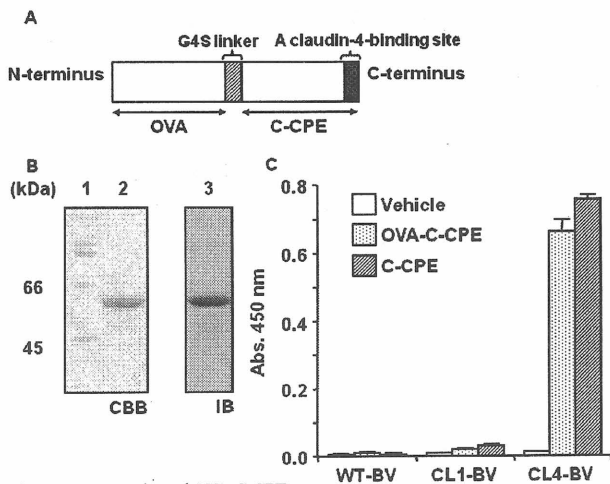


Figure 2. Preparation of OVA-C-CPE. A) Schematic illustration of OVA-C-CPE. The claudin-4-binding site of C-CPE is located in the C-terminal 16 amino acids. OVA was fused with C-CPE at the N-terminal of C-CPE, resulting in OVA-C-CPE. B) Purification of OVA-C-CPE. OVA-C-CPE was expressed in *E. Coli* as a his-tagged protein and isolated by Ni-affinity chromatography. The purification of OVA-C-CPE was confirmed by SDS-PAGE followed by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB, left panel) and by immunoblotting with an anti his-tag antibody (IB, right panel). Lane 1: molecular weight marker; lane 2, 3: OVA-C-CPE. The putative molecular mass of OVA-C-CPE is 62 kDa. C) Binding of OVA-C-CPE to claudin-4. Wild-type BV (WT-BV), BV displaying claudin-1 (CL1-BV) or -4 (CL4-BV) was absorbed onto a 96-well immunoplate, and then vehicle or OVA-C-CPE was added to the well. OVA-C-CPE bound to BV was detected by an anti-his-tag Ab followed by horseradish peroxidase-labeled secondary Ab. C-CPE was used as a positive control for a claudin-4 binding. Data are means \pm SD (n=4).

2) OVA-C-CPE の免疫賦活化作用

次に、作製した OVA-C-CPE の経鼻投与による免疫賦活化作用について評価した。6 週齢の雌性 BALB/c マウスに 1 匹当たり OVA 量として 5 μ g となるように調製し、週 1 回、計 3 回経鼻投与し、最終投与より 1 週間後に血清、鼻腔洗浄液、膈洗浄液、および糞便抽出液を回収し、各種サンプル中の OVA 特異的な抗体価を ELISA 法により解析した。その結果、OVA 単独投与群および OVA と C-CPE との混合液投与群では血清中の IgG 抗体価の上昇が認められないのに対して、OVA-C-CPE 投与群では有意な上昇が観察された (Fig. 3A)。さらに、OVA 量依存的な抗体産生も認められた (data not shown)。投与粘膜面である鼻粘膜中の IgA 抗体価も血清中 IgG 抗体価と同様に OVA-C-CPE 投与群でのみ有意に上昇していた (Fig. 3B)。また、遠隔粘膜面である膈粘膜および糞便中の IgA 抗体価も OVA-C-CPE 投与群でのみ有意な抗体価の上昇が認められた (Fig. 3C and 3D)。

C-CPE は TJ の claudin-4 に作用することで

バリア機能を破壊させ、細胞間隙を介した物質吸収促進作用を示すものの、分子量が 20 kDa 以下の物質に限られる。OVA の分子量は 45 kDa であることから、OVA が細胞間隙を通過することができず、OVA と C-CPE との混合液投与群では免疫応答が惹起されなかったものと推察される。以上の結果より、OVA-C-CPE を経鼻投与することで、全身面のみならず粘膜面において抗原特異的な免疫応答を惹起することを見出した。

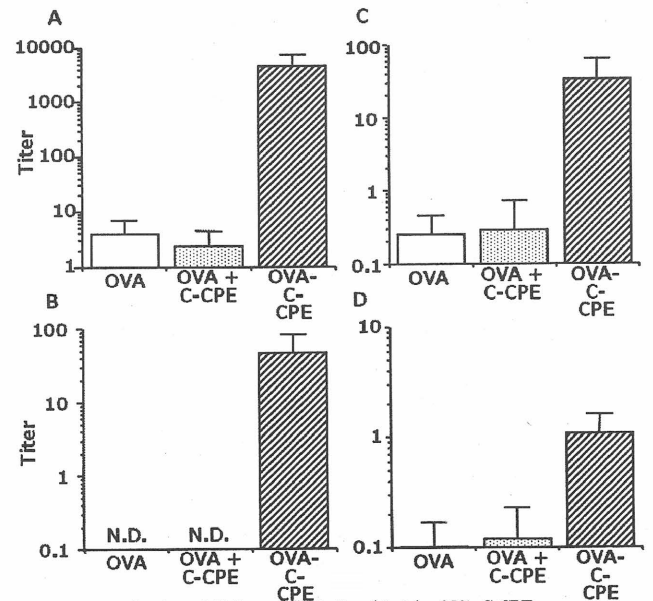


Figure 3. Production of OVA-specific IgG and IgA by OVA-C-CPE. Mice were nasally immunized with vehicle, OVA, a mixture of OVA and C-CPE, or OVA-C-CPE (5 μ g OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the levels of serum IgG (A), nasal IgA (B), vaginal IgA (C) and fecal IgA (D) were determined by ELISA. Data are means \pm SD (n=4). N.D., not detected.

3) OVA-C-CPE の免疫活性化における CL4 の関与

OVA-C-CPE 投与による免疫賦活化作用における CL4 の関与を検証するために、CL4 結合性を消失させた OVA-C-CPE303 を作製した (Fig. 4A)。まず、作製した OVA-C-CPE303 の CL4 結合性を BV ELISA 法により確認したところ OVA-C-CPE303 は CL4 結合性を消失していた (Fig. 4B)。

そこで次に、OVA-C-CPE303 を経鼻投与し免疫賦活化作用を検討した。その結果、OVA-C-CPE 投与群で認められた血清、鼻粘膜、膈粘膜および糞便中における OVA 特異的な抗体価の上昇が、OVA-C-CPE303 投与群では認められなかった (Fig. 4C-F)。

これらの結果は OVA-C-CPE による抗原特異的な免疫応答の活性化には、その C-CPE と CL4 との相互作用が関与していることを示唆するものであり、CL4 を標的とした粘膜ワクチン技術開発の可能性が示された。

4) CL4 指向性ワクチンの免疫活性化能の解析
細胞性免疫を主とする Th1 系はインターフェロン (IFN) γ やインターロイキン (IL) -2 を産生して IgG2a 産生を誘導し、液性免疫を主とする

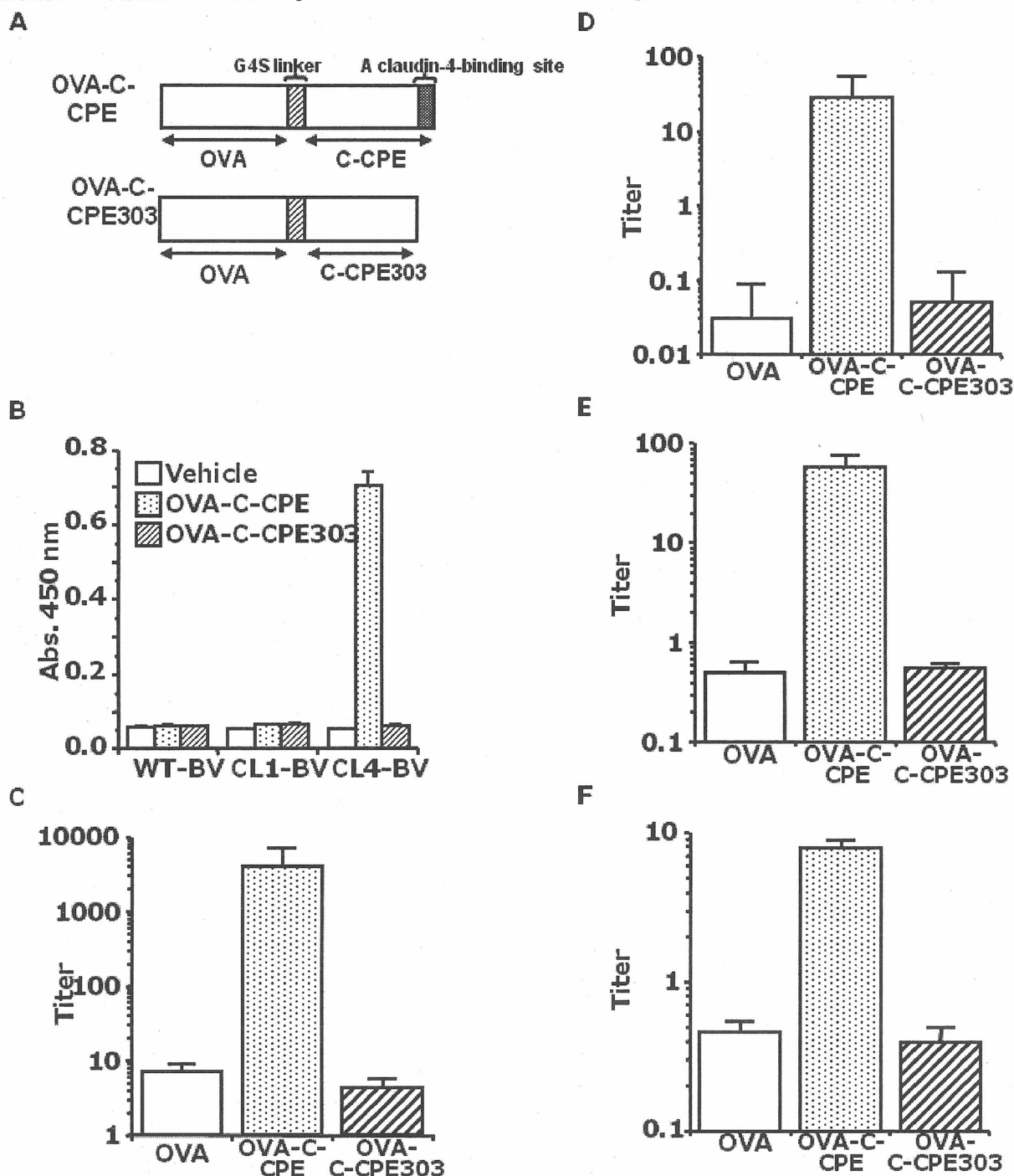


Figure 4. Involvement of claudin-4 in the immune responses to OVA-C-CPE
A) Schematic illustration of OVA-C-CPE mutant. The C-terminal 16 amino acid-deleted C-CPE mutant (C-CPE303) did not bind to claudin-4. To clarify the involvement of claudin-4 in the immune response initiated by OVA-C-CPE, OVA was fused with C-CPE303, resulting in OVA-C-CPE303. B) Interaction of OVA-C-CPE303 with claudin-4. Binding of OVA-C-CPE303 to claudin-4 was investigated by ELISA with wild-type BV (WT-BV), claudin-1 or -4-displaying BV (CL1-BV, CL4-BV). C) Immune responses by OVA-C-CPE303. Mice were nasally immunized with OVA, OVA-C-CPE or OVA-C-CPE303 (5 mg OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the levels of serum IgG (C), nasal IgA (D), vaginal IgA (E) and fecal IgA (F) were measured by ELISA. Data are means \pm SD (n=4).

Th2系はIL-4やIL-13を産生しIgG1産生を誘導する。そこで、これらを測定することでOVA-C-CPEによる免疫賦活化特性を解析した。その結果、BALB/cマウスをOVA-C-CPEで免疫すると2型ヘルパーT細胞誘導型のIgG1に加え、1型ヘルパーT細胞誘導型のIgG2a抗体価の上昇が観察された。一方、OVA-C-CPE303投与群ではこれらサブクラスの産生は認められなかった (Fig. 5A)。

続いて、OVA-C-CPEで免疫したマウスより脾臓細胞を摘出し、*in vitro*でOVAにより再刺激することで産生したサイトカイン量を測定した。その結果、OVA-C-CPEで免疫したマウスより摘出した脾臓細胞にOVAで再刺激した群でのみTh1系サイトカイン (IFN- γ) およびTh2系サイトカイン (IL-13) の産生が認められた。一方、OVA-C-CPE303投与群ではこれらサイトカイン産生は認められなかった。

これらの結果より、CL4指向性ワクチンはTh1系およびTh2系の免疫応答も惹起するものと推察される。

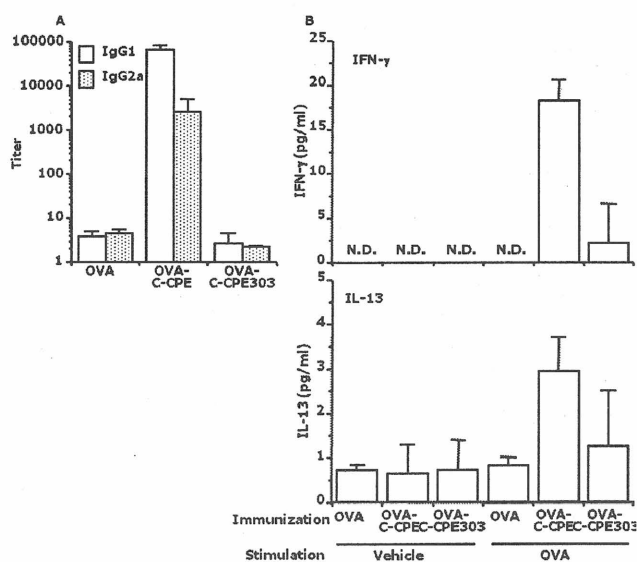


Figure 5. Th1 and Th2 responses induced by OVA-C-CPE. Mice were nasally immunized with vehicle, OVA, a mixture of C-CPE with OVA, or OVA-C-CPE (5 μ g OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, serum and splenocytes were collected. Serum IgG subclass (IgG1 and IgG2a) was determined by ELISA (A). The splenocytes isolated from the immunized mice were stimulated with vehicle or OVA (1 mg/ml) for 24 h, and the cytokines (IFN- γ and IL-13) in the conditioned medium were measured by ELISA (B). Data are means \pm SD (n=4). N.D., not detected.

③ 新規 CL-4 binder の創製

天然型 C-CPE を prototype として用いて、各種変異体を作製したところ、天然型 C-CPE (約 0.3 mg/ml) に比して溶解性に優れた C-CPE 変異体

A、B、Cを見出した。さらに、各種 C-CPE 変異体の CL4 結合性を解析したところ、天然型 C-CPE に比して 4~20 倍高い CL4 親和性を有する各種 C-CPE 変異体の取得に成功した (Table 1)。次年度以降は、これら変異体のワクチン活性についても随時検討していく予定である。

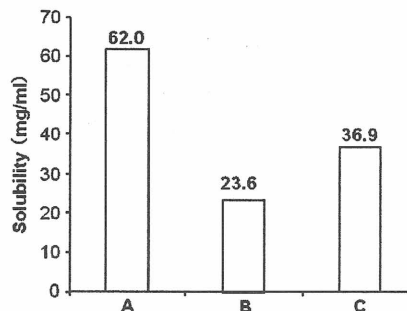


Figure 6. Solubility of the C-CPEmutants. C-CPEmutants was investigated in PBS (pH 7.4) containing 0.4 M imidazole at 15 $^{\circ}$ C. The number over the column indicated the solubility (mg/ml).

Table 1. Binding kinetics of C-CPEs to claudin-4

Derivatives	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D
C-CPE184	5.96×10^5	2.55×10^{-4}	429 pM
A	6.50×10^5	2.93×10^{-4}	451 pM
B	5.59×10^5	6.53×10^{-5}	117 pM
C	6.67×10^5	3.05×10^{-5}	46 pM
D	7.13×10^5	3.24×10^{-4}	455 pM
E	7.67×10^5	2.87×10^{-4}	374 pM
F	7.55×10^5	1.45×10^{-5}	19 pM

E. 結論

1. NALT においても、既に報告されている GALT と同様に CL4 が高発現していることを見出した。
2. CL4 binder と OVA との融合蛋白質を経鼻投与することで血中抗 OVA IgG 価、鼻粘膜面のみならず遠隔粘膜面である膣粘膜、腸管粘膜における抗 OVA IgA 抗体価が上昇すること、CL4 結合ドメインを欠損した変異体ではいずれの抗体価上昇も消失していることを見出し、CL4 を利用した経鼻粘膜ワクチン開発の可能性を見出した。

3. CL4 指向性粘膜ワクチンは、Th1 系、Th2 系の免疫応答を活性化することを見出した。

4. 溶解度が低く実用化の点で課題のあった天

然型 C-CPE の物性改善を試み、溶解性および CL4 結合性に優れた新規 CL4 binder の創出に成功した。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

Matsuhisa K, Kondoh M, Takahashi A and Yagi K (2009) Tight junction modulator and drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 6(5):509-515.

Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y and Yagi K (2009) A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol* 76(4):918-926.

近藤昌夫、高橋梓、佐伯理恵、八木清仁、生体バリアを利用した創薬研究、*Drug Delivery System*, 24, 532-537, 2009

Uchida H, Kondoh M, Hanada T, Takahashi A, Hamakubo T and Yagi K. A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochem Pharmacol*, 79, 1437-1444, 2010

Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T and Yagi K. Mucosal vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials*, accept

G-2 学会発表

生体バリアを利用した薬物送達研究

近藤昌夫 (阪大院薬)

日本薬剤学会第 25 年会、平成 21 年 5 月 21-23 日、静岡

生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究

近藤昌夫 (阪大院薬)

第 25 回日本 DDS 学会学術集会、平成 21 年 7 月 3、4 日、東京

生体バリアの分子基盤を利用した経粘膜 DDS

近藤昌夫、八木清仁 (阪大院薬)

第 25 回日本 DDS 学会学術集会、平成 21 年 7 月 3、4 日、東京

Claudin を利用した創薬研究の可能性

近藤昌夫 (阪大院薬)

彩都バイオサイエンスセミナー、平成 21 年 10 月 15 日、大阪

創薬ターゲットとしてのタイトジャンクションの可能性

近藤昌夫、八木清仁 (阪大院薬)

創剤フォーラム 第 15 回シンポジウム「タイトジャンクションをめぐる最近の研究成果と創薬への応用」、平成 21 年 10 月 23 日、東京

A novel type of absorption enhancer, claudin-4 modulator

Koji Matsuhisa, Ryota Okude, Masuo Kondoh and Kiyohito Yagi

36th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 18-22, 2009, Copenhagen, Denmark.

Claudin as a target molecule for mucosal absorption of peptide drug

Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA.

Development of a novel screening system for claudin binder using baculovirus display.

Toshiaki Yamaura, Azusa Takahashi, Hideki Kakutani, Masuo Kondoh, Toshiko Sakihama,

Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA

Preparation of a controllable RNA polymerase I-dependent expression vector

Takeshi Yoshida, Manabu Ojima, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA

Claudin-4を介した新規粘膜ワクチンの創製
鈴木 英彦、角谷 秀樹、深坂 昌弘、近藤 昌夫、八木 清仁（阪大院薬）、日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

出芽バキュロウイルスを用いた claudin binder スクリーニング系の構築
松下 恭平¹、角谷 秀樹¹、高橋 梓¹、山浦 利章¹、浜窪 隆雄²、近藤 昌夫¹、八木 清仁¹（¹阪大院薬、²東大先端研）、日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

ウエルシュ菌エンテロトキシン断片をプロトタイプとした新規claudin-4 modulator の創製
各務 洋平¹、山浦 利章¹、松下 恭平¹、高橋 梓¹、内田 博司²、花田 雄志²、松久 幸司¹、渡利 彰浩¹、近藤 昌夫¹、八木 清仁¹（¹阪大院薬、²アスピオファーマ）、日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

Claudin発現の迅速かつ簡便なモニタリングシステムの開発
渡利 彰浩、近藤 昌夫、八木 清仁（阪大院薬）、日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

出願番号:PCT/JP2009/71291

出願日：2009年12月22日

発明の名称：粘膜ワクチン

発明者：八木清仁、近藤昌夫、磯田勝広、堀口安彦

出願人：大阪大学

H-2 実用新案登録

該当事項なし

H-3 その他

該当事項なし

新規多機能性キトサンによる遺伝子導入システムの 開発とDNAワクチンへの応用

所属 京都大学大学院薬学研究科
研究者 樋口 ゆり子

研究要旨 分子量、脱アセチル化率の異なるキトサンを合成し、プラスミド DNA との複合体を調製し遺伝子発現の評価および最適化を行った。ヒスチジン修飾率の異なるキトサンを作成し、キトサンにバッファリング能の付加、中性領域での溶解度の増大ができた。

A. 研究目的

エイズ感染患者の増加に伴い予防・治療法の開発が必要とされている。未だ治療法の確立されていない現在、エイズの流行と甚大な被害を食い止める最も有効な長期的対策はエイズの予防ワクチンの開発である。中でも DNA ワクチン療法は、体性免疫のみならず全身系における細胞障害性 T 細胞による細胞性免疫の誘導が可能であり、従来のワクチンに比べ多様な抗原に速やかに対応できる点で高い治療効果が期待できる。

本研究の目的は、エイズ予防 DNA ワクチンのためのキトサンを用いた新規遺伝子導入キャリアの開発である。キトサンは、バイオマス資源キチンから合成可能かつ生体分解性を有する安価で安全なキャリア素材であるだけでなく、キトサン自体の免疫賦活作用がワクチン効果を増強するという DNA ワクチンに有効な特色を有する。しかしながら、既存のカチオン性リポソームやポリマーに比べ遺伝子導入効率が極めて低いことが問題となっている。その原因としては、中性領域の水溶液中において、キトサンは凝集またはゲル化により溶解度または分散性が低い点、細胞膜へ吸着した後エンドサートーシスにより細胞内へ取り込まれるがエンドソーム内へ長時間滞留するためプラスミド DNA が分解されてしまう点、などが考えられる。そこで本研究では、生分解性や生体親和性の高さなど、キトサンの有する特長を損なうことなく、遺伝子発現効率を増大させることを目的に、まず、キトサン自身の分子量やア

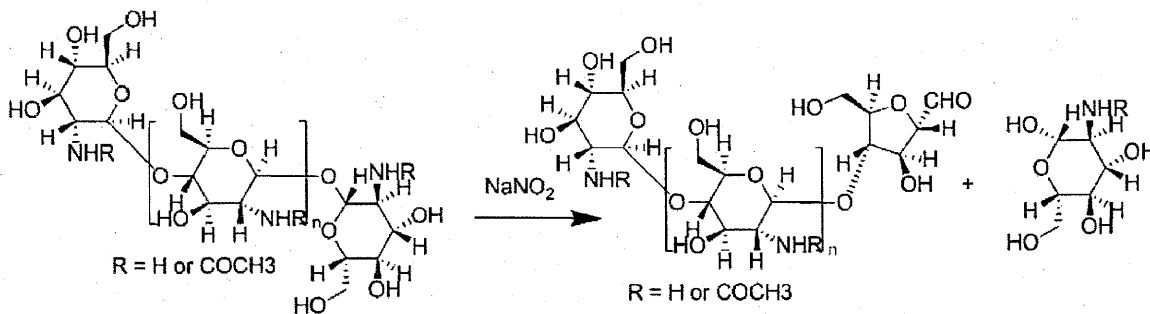
セチル化率の遺伝子発現に対する影響の評価および最適化を行う。更にエンドソームからの脱出促進を目的に、生体構成成分の一つであり、pH の低い環境において高いバッファリング能を有するヒスチジンをキトサンに修飾した新規遺伝子導入キャリアを作成する。

初年度である平成 21 年度は、まずキトサンを用いた遺伝子導入キャリア開発の基礎となる、各種サイズのキトサンの作成および各種脱アセチル化率のキトサンの作成を行った。さらに、次年度の実験計画を繰り上げて、バッファリング能を有するヒスチジン修飾キトサンの合成を開始した。また、同時並行で、遺伝子導入効率におけるキトサンとプラスミド DNA との複合体の混合比 (A/P 比: アミノ基/リン酸基) の影響の評価を行った。

A. 研究方法

分子量の異なるキトサンの作成: キトサンを各濃度に調製した NaNO_2 水溶液中で、窒素気流下において室温で 2 時間反応させた後、透析により精製した (Scheme 1)。平均分子量は GPC により測定を行った。

キトサンの脱アセチル化: キトサンを 47% NaOH 水溶液中で、60°C、2 時間灌流させた後、60°C の熱水で洗浄した。得られたキトサンを 2% 酢酸に溶解させ、1N の NaOH 中にて数回洗浄を繰り返して、得られたキトサンは凍結乾燥を行った。



Scheme 1. Chitosan depolymerization

キトサンのアセチル化：キトサンを 1%の酢酸中に溶解し、さらに無水酢酸を添加し、室温で 15 分間反応させた後、methanol/ammonia に分散させ、ethanol と水で洗浄し、凍結乾燥を行った。

脱アセチル化率の測定：5 mg のキトサンを 85% のリン酸水溶液中で 60°C で 40 分間加熱して完全に溶解させた後、水で希釈し 2 時間 60°C で反応させた。得られた溶液は、203 nm における一次微分吸光度を算出し、N-Acetyl-D-(+)-glucosamine を用いて作成した検量線をより定量を行った。

ヒスチジン修飾キトサンの合成：Histidine-Cysteine-OMe は液相合成により合成した。Cys(Acm)-OMe は、Boc-Cys(Acm)-OH の脱保護、メチル化により合成した。Boc-His(Boc) は、di-tert-butyl dicarbonate より作成した。次に両化合物をカップリング試薬 O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate によりカップリングを行い Boc-His(Boc)-Cys(Acm)-OMe を合成した。最後 dipeptide を脱保護した。キトサンを 2-iminothiolane · HCl と反応させることにより thionylated chitosan を合成し、透析により精製した。

Dipeptide を dimethyl sulfoxide 中にて thionylated chitosan 混合しヒスチジン修飾キトサン (Chitosan-CH) を合成し、透析により精製を行った。反応生成物は、NMR と ESI-MS により確認を行った (Scheme 2)。

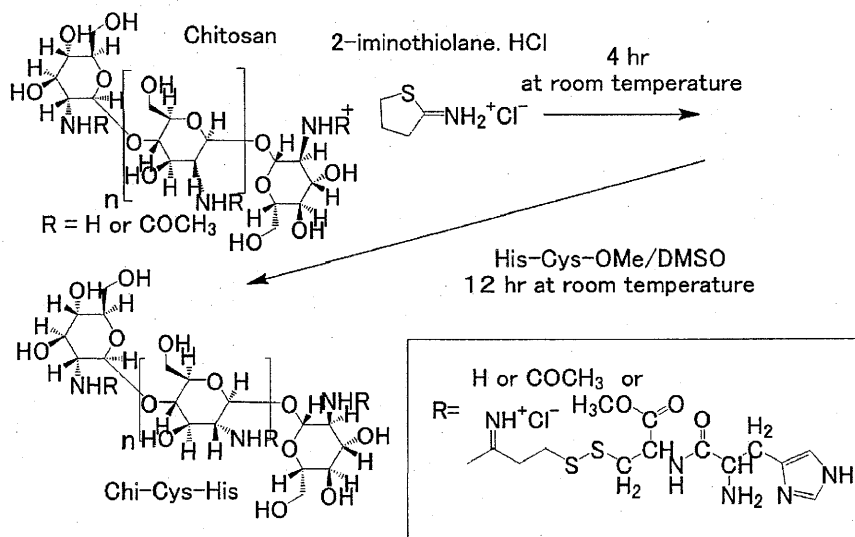
各種混合比により修飾率の異なるヒスチジン修飾キトサンを作成し、滴定法によりバッファリング能の評価を行った。
プラスミド (pCMV-Luc)：

CMV プロモーター、firefly luciferase 遺伝子を搭載したプラスミド DNA を用いた。

キトサンとプラスミド DNA 複合体の調製：キトサン溶液とプラスミド DNA 溶液をそれぞれの濃度で調製し、キトサン上のアミノ基およびプラスミド DNA 上のリン酸基の各種モル比 (A/P 比) で室温にて混合して調製した。複合体形成の確認は、アガロース電気泳動により行った。

細胞：細胞は、human embryonic kidney (HEK293) cells (理研細胞バンクより譲渡) を用いた。培養には、10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、2 mM L グルタミンを添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いた。

遺伝子発現の評価： 1.5×10^5 cell/well の濃度で 24 well プレートに播種して 24 時間後、キトサンとプラスミド DNA の複合体を含有する Opti-MEM® に変更し 6 時間培養後、DMEM 中で 48 時間培した後に洗浄した細胞を回収した。細胞は、lysis buffer に溶解させ遠心後、ルシフェリンを添加し、ルシフェラーゼ活性はルミノメーター



Scheme 2. Synthesis of chitosan-CH

を用いて測定した。

Table 1. Number-average molecular weight of chitosan after chitosan depolymerization

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験はすべて京都大学の規定に基づき行った。

B. 研究結果

分子量の異なるキトサンの作成

分子量が 100k のキトサンを NaNO_2 により分解し、条件を最適化することにより、1k、5k、10k のキトサンを精製することができた。精製した各サイズのキトサンの数平均分子量 (Mn) と重量平均分子量 (Mw) を測定し、分子量分布を評価したところ、Mw/Mn はおよそ 2 程度の分散となり、うまく分離できていることが確認できた (Table 1)。

脱アセチル化率の異なるキトサンの作成

得られた 1k、5k、10k のキトサンに対して、アセチル化、または、脱アセチル化を行い、脱アセチル化率を測定した。アセチル化および脱アセチル化を行わないキトサンの脱アセチル化率は約 85% であった。それに対し、約 100% 脱アセチル化されるように反応の最適化を行い、それぞれ脱アセチル化率が、97% (1k)、99% (5k)、99% (10k) のものを得ることができた (Table 2)。

さらに、キトサンにアセチル化を行い、71% (1k)、73% (5k)、75% (10k) の脱アセチル化率のキトサンを得ることができた (Table 2)。キトサンの脱アセチル化率が下がるとアミノ基に由来する正電荷が減少するため、プラスミド DNA との複合体形成が困難になる。Lavertu らの報告 (Biomaterials 27, 4815-4824, 2006) では、脱アセチル化率が 70% 以下になると遺伝子発現効率が激減するため、本研究では、脱アセチル化率の低いサンプルとして 70% 程度になるように最適化を行った。各サンプルの数平均分子量と重量平均分子量を測定

DDA \ MW	1k		5k		10k	
	Mn	Mw/Mn	Mn	Mw/Mn	Mn	Mw/Mn
Deacetylated chitosan	2136	1.55	5078	2.40	15027	2.40
Original chitosan	2479	2.37	6313	2.59	13092	2.71
Acetylated chitosan	2500	2.46	6335	3.95	20649	2.14

Table 2. Degree of deacetylation of chitosan after NaOH treatment

DDA \ MW	1k	5k	10k
Deacetylated chitosan	97.00	99.00	99.00
Original chitosan	84.00	84.00	85.00
Acetylated chitosan	71.00	73.00	75.00

したところ、それぞれの Mw/Mn は、およそ 2 程度となり、うまく分離できていることが確認できた (Table 1)。

ヒスチジン修飾キトサンの合成：

各種混合比により作成したヒスチジン修飾キトサンそれぞれのバッファリング能を評価したところ、2-Iminiothiolane · HCl を重量比で 100 に対して Histidine · Cysteine · OMe を 400 の割合で混合したものが、一番バッファリング能が高かつ

Weight ratio of the reagents

Material	Chitosan	2-Iminiothiolane.HCl	Histidine-Cysteine-OMe
Chitosan-CH A	100	15	200
Chitosan-CH B	100	35	200
Chitosan-CH C	100	100	400

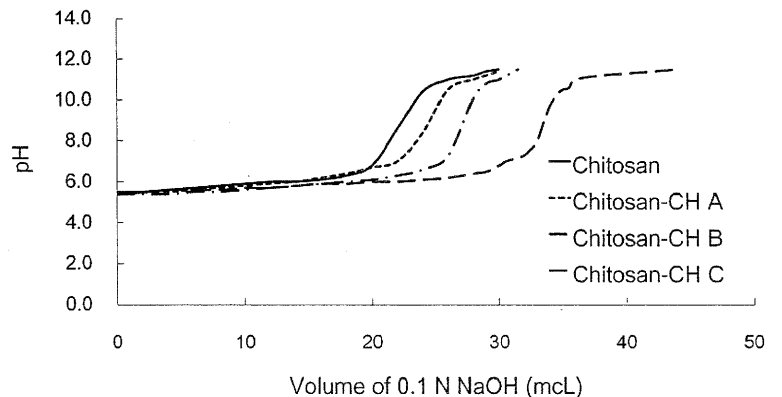


Figure 1 Buffering capacity of Chitosan-CH

た (Figure 1)。以降の実験ではバッファリング能の高いこのサンプルを用いることにした。さらに、pH7.4 または pH5.5 における水への溶解度を評価したところ、キトサンでは pH7.4 では全く溶解しなかったのに対して、ヒスチジン修飾キトサンは溶解し、その溶解度は pH5.5 におけるキトサンの溶解度にほぼ匹敵する高さであった (Table 3)。

Table 3. Solubility of Chitosan and Chitosan-CH

Material	Dissolution		Solubility	
	pH 5.5	pH 7.4	pH 5.5	pH 7.4
Chitosan	O	X	13 mg/mL (in 1% acetic acid)	X
Chitosan-CH	O	O	≥15 mg/mL	10 mg/mL

キトサンとプラスミド DNA の複合体形成の確認

キトサンとプラスミド DNA の複合体が形成されていることをアガロース電気泳動にて確認した。100k のキトサンとプラスミド DNA を、A/P 比が 1 ~ 10 の間で複合体を形成させたところ、A/P 比が 1 の場合においてのみ、今回使用したプラスミドのサイズ (5k bp) のあたりに濃いバンドが認められ、A/P 比が 2 以上の場合は、ウェルのあたりに強いバンドが認められた。一方、10k のキトサンとプラスミド DNA の複合体について複合体形成を確認したところ、A/P 比が 2.4 ~ 57.6 の間においては、いずれの場合も 5k bp のあたりにはバンドは認められず、ウェルのあたりに濃いバンドが認められた (Figure 2)。

キトサンとプラスミド DNA 複合体による遺伝子発現の評価

100k または 10k のキトサンとプラスミド DNA を各種 A/P 比で調製した複合体を細胞へ投与した場合の遺伝子発現量を測定した。100k のキトサンとプラスミド DNA を A/P 比 1 で調製した場合は遺伝子発現が認められなかった。100k のキトサンの場合は A/P 比 5 の時の発現が A/P 比 10 の時の発現と比較して高かった。一方、10k のキトサンの場合は、A/P 比 4.8 ~ 76.8 の間において A/P 比 19.2 の時が最も遺伝子発現が高く、その値は、100k のキトサンで最も高い遺伝子発現を示した A/P 比 5 の時の遺伝子発現の約 8 倍であった。さらに、同じ A/P 比が約 5 の時の遺伝子発現を比較すると、10k の場合は 100k の場合の約 3 倍であった (Figure 3)。

C. 考察

合成法の最適化により、分子量の異なるキトサン (Table 1)、脱アセチル化の異なるキトサン (Table 1, 2)、ヒスチジン修飾率の異なるキトサン (Figure 1) を合成することができた。ヒスチジン修飾率の異なるキトサン間でのバッファリング能を評価したところ、ヒスチジン-システインジペプチドの混合率を高くして合成したヒスチジン修飾キトサンの方がより強いバッファリング能を有することが分かった (Figure 1)。したがって、混合比を変えることによりより高効率にヒスチジンを修飾できていることが示唆される。

また、最もバッファリング能が高かったヒスチジン修飾キトサンについて、酸性または中性における水への溶解度を評価した (Table 3)。未修飾キトサンは一般的に酸性条件下では溶解しやすいが、中性ではゲル化または沈殿を生じるため溶解しにくいことが知られている。一方、ヒスチジン

修飾キトサンは pH 5.5 においても、pH7.4 においても同様によく分散した。更に、pH7.4 では、未修飾キトサンは全く解けなかったのに対し、ヒスチジン修飾キトサンは 10 mg/ml まで溶解した。これは、ヒスチジン修飾によりキトサンの表面にアミノ基が導入されたために、中性領域においてもイオン化しやすくなり水へ溶解しやすくなったと考えられる。

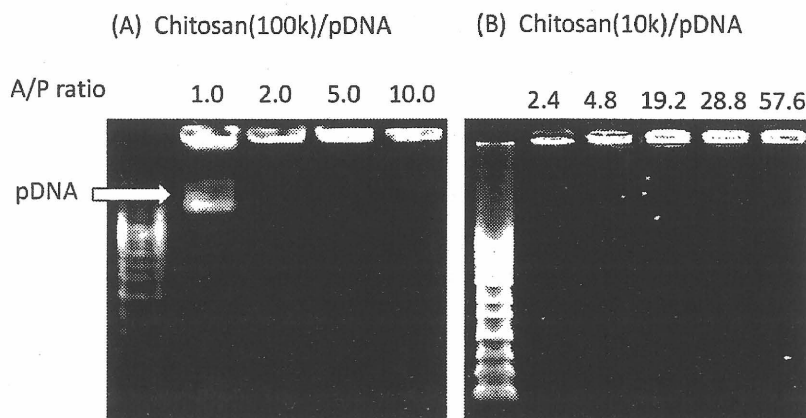


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of chitosan/pDNA complexes

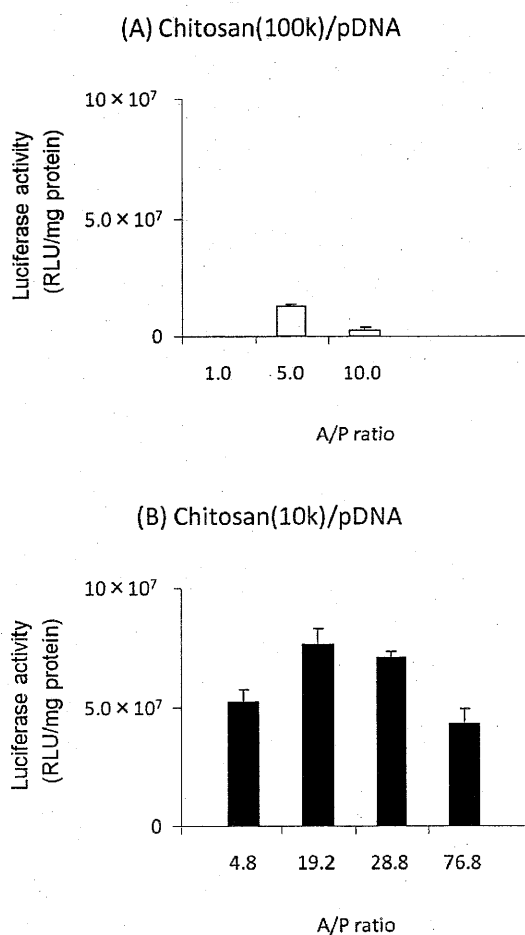


Figure 3. Gene transfection efficiency of Chitosan/pDNA complexes

キトサンを用いた遺伝子導入キャリア開発において、細胞や組織が正常に機能する環境である pH7.4 において溶解度が飛躍的に上昇させることができたことは、非常に有益である。

アガロース電気泳動により複合体の形成を確認した。複合体を形成するとキトサンにトラップされたプラスミド DNA はアプライしたウェルから泳動することができない。従って、ウェルに濃いバンドが観察される場合は複合体が安定に形成されていることが示唆される (Figure 2)。遊離したプラスミド DNA のサイズ付近に強いバンドの観察される 100k のキトサンとプラスミド DNA を A/P 比 1.0 で調製した場合を除くと、今回調製した範囲において、安定に複合体が形成されていることが示唆される。

培養細胞における遺伝子発現効率を比較すると、10k のキトサンの方が、100k のキトサンに比べて有意に高い発現を得ることができた (Figure 3)。従って、サイズの小さなキトサンの方がより遺伝子導入効率が高い傾向があること

が示唆される。また、10k のキトサンを用いた遺伝子発現において、A/P 比の最適値が存在した。

D. 結論

サイズ、脱アセチル化率の異なる各種のキトサンを作成し、合成条件の最適化を行った。キトサンとプラスミド DNA の複合体形成および遺伝子発現には、複合体を調製する際の A/P 比が重要な要素となり、最適化する必要があることが明らかになった。さらに、各種の修飾率の異なるヒスチジン修飾キトサンを作成し、最適化を行った。ヒスチジン修飾により、キトサンにバッファリング能を付加することができた。さらに、中性 (pH7.4) におけるキトサンの溶解度を飛躍的にあげることができた。

以上、新規遺伝子導入キャリア開発のためのキトサン合成法の確立および最適化、ならびにプラスミド DNA との複合体調製の最適化を行った。

E. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

1. Kai Ling Chang, Yuriko Higuchi, Sigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida、Improvement of the endosomal escape of chitosan by histidine modification、遺伝子・デリバリー研究会第 9 回シンポジウム、大阪、2009 年 7 月 9-11 日
2. Kai Ling Chang, Yuriko Higuchi, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida、Observation of Histidine-modified Chitosan/pDNA Complexes Escaping from Endosomes、岡山、第 18 回日本バイオイメージング学会学術集会、2009 年 9 月 3-5 日

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

平成21年度
政策創薬総合研究事業
エイズ医薬品等開発研究
研究報告書
重点研究・若手研究者奨励研究

平成22年3月

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 タナカ印刷株式会社

