

201225050A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

パイエル板指向性分子を利用した経口ワクチンの開発
に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
パイエル板指向性分子を利用した経口ワクチンの開発 に関する研究	-----	1
渡利 彰浩		
II. 分担研究報告		
Claudin-4 binder 修飾リポソームの作製	-----	19
鈴木 亮		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	24

総括研究報告書

「パイエル板指向性分子を利用した経口ワクチンの開発」

研究代表者 渡利 彰浩 大阪大学大学院薬学研究科 助教

研究要旨

昨今の新型インフルエンザの世界的流行でも明らかなように、依然として感染症は人類に立ちはだかる大きな脅威であり、感染症によって毎年 2000 万人の命が失われている。患者の生活の質・有効性・安全性を考慮すると、非侵襲性投与が可能であること、多くの感染性病原体の侵入門戸（粘膜面）における防御網を構築できること、生体内に侵入した病原体の排除活性をも有することから、『経口ワクチン』は理想的な感染予防法である。しかしながら、経口ワクチンが有効に機能するには、消化酵素による分解を回避しつつ、腸管粘膜免疫組織に抗原を効率良く送達する必要がある。以上の背景を踏まえ、本研究では腸管粘膜免疫組織パイエル板(PP)に claudin-4 (CL-4) が高発現していることに着目し、CL-4 指向性分子を有効活用することで、初めてのパイエル板指向性経口ワクチンを開発することを目的とする。当研究グループはこれまでに、独自の CL-4 binder (C-CPE) を用いて、CL-4 を標的とした粘膜ワクチンの可否を検証し、CL-4 ターゲティングによる粘膜ワクチン技術を世界に先駆けて確立してきた。本研究は、これらの CL-4 を標的とした粘膜ワクチン技術とリポソーム技術を融合・システムアップすることで、PP 指向性経口ワクチンの開発を試みる。

昨年度は、C-CPE の C 末端側に存在し CL-4 への結合性に重要なアミノ酸残基を改変した C-CPE 構造変異体ライブラリから、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体の取得に成功した。本年度は、パイエル板指向性経口ワクチン開発のため、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体を修飾したリポソームを複数作製し、本リポソームの中から CL-4 への結合性が高いリポソームを選別した。さらに、OVA を封入した C-CPE 変異体修飾リポソームも作製し、本リポソームにおいても CL-4 への結合性を確認した。

また、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体の抗原送達能を検証するため、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体とモデル抗原である卵白アルブミン (OVA) との融合タンパク質を作製し、経鼻投与を行った。その結果、高い免疫賦活化作用およびワクチン効果が確認されたことから、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体は既存の C-CPE に比して高い抗原送達能を有することが明らかとなった。一方、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体と HIV のモデル抗原 (V3 抗原) との融合タンパク質では、有効な免疫賦活化作用が確認されなかった。V3 抗原は 20 アミノ酸程度からなる抗原であるため、より大きな疾患モデル抗原として、肺炎双球菌抗原の PspA (約 45 kDa) を用い、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体との融合タンパク質を作製した。

平成 25 年度は C-CPE 変異体修飾リポソームの経口ワクチンとしての機能評価および疾患モデル抗原融合タンパク質による免疫賦活化作用を検証する予定である。

研究分担者

鈴木 亮 帝京大学薬学部 准教授

A. 研究目的

インフルエンザウイルス、エイズウイルスなど感染性病原体の多くは粘膜面を介して生体内に侵入

することから、感染症対策の最重要基本戦略の第一は粘膜面に免疫防御網を構築し生体内への侵入を阻止すること、第二は粘膜面の防御網をすり抜け体内に侵入した病原体および感染細胞を排除するために全身系の体液性・細胞性免疫機構を構築することにある。ワクチンは感染症対策の切り札として期待されているものの、現在汎用されている注射型ワクチンでは全身系体液性免疫の誘導に限局され、粘膜面における侵入防御網の構築活性を持たず感染予防効果を期待できない。一方、粘膜ワクチンは、粘膜系免疫と全身系体液性・細胞性免疫の活性化能を併せ持つことから、効果的な感染予防・治療法であると言える。なかでも経口ワクチンは、粘膜系免疫と全身系体液性・細胞性免疫の活性化能をもち、抗原分子の脳内移行の危険性が拭いきれない経鼻ワクチンと異なり、安全性も高いことを考慮すると理想的なワクチンと考えられる。しかしながら、消化酵素による分解を回避しつつ腸管粘膜免疫誘導組織パイエル板に抗原を効率的に送達するシステムが開発されていないことから、経口ワクチンの開発は立ち遅れている。

近年、粘膜免疫組織に tight junction 構成タンパク質である claudin-4 (CL4) が高発現しており、CL4 を標的とした粘膜ワクチン開発の可能性が示唆されている。そこでこれまでに当研究グループは CL4 binder として知られるウエルシュ菌毒素 C 末断片である C-CPE を利用し、CL4 を標的とした経鼻粘膜ワクチン開発を試みた。モデル抗原として卵白アルブミン OVA と C-CPE 融合タンパクを用いて検証した結果、CL4 を標的とした粘膜ワクチンの proof of concept の実証に成功した。

次に、腸管粘膜免疫誘導組織パイエル板にも CL4 が高発現していたことから、腸管粘膜免疫組織を標的とした経口粘膜ワクチンの開発を試みたが、抗体価の上昇は観察されなかった。この原因として、(1) 経口ワクチンは経鼻ワクチンに比して 10 倍以上の抗原を粘膜免疫組織に送達する必要があるため抗原送達量が低かったこと、(2) 抗原が消化酵素分解により分解されることが考えられた。この解決法として、(1) 腸管粘膜免疫組織への抗原送達率を高め

るため、既存の C-CPE よりも高い CL4 結合性を示す C-CPE 変異体の創出する、(2) 消化酵素耐性であるリポソームに抗原を封入することにより、抗原の分解を回避するという方法を考案した。

本研究で開発を試みるパイエル板への抗原送達システムは、従来まで注射による投与を余儀なくされていたワクチンを経口投与化する技術であり、医師や看護師などの医療従事者が居なくても簡便に投与可能であり、利便性および汎用性を兼ね備えていること、多くの病原体の侵入門戸である粘膜面に感染防御網を構築できることから、少子高齢社会を迎えた我が国の健康寿命の延伸、特徴あるワクチン開発技術を用いた本邦ワクチン産業の育成など、厚生労働行政に多方面から貢献できると考えられる。

B. 研究方法

B-1. V3 融合 C-CPE 変異体タンパク質による免疫賦活化作用の検討

B-1. 1. V3 融合 C-CPE 変異体タンパク質の作製

V3-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 μ l を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd) 10 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い、3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え、37°C で 1 時間培養し、LA プレートに播種した後、一晚培養した。LA 培地 3 ml を分注した Sterile Culture Tubes に 1 コロニーをピックアップし、37°C で一晚振盪培養し、翌日 LA 培地を 2 ml ずつ分注した Sterile Culture Tubes を 4 本用意し、大腸菌培養液を 200 μ l ずつ加え、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、isopropyl- β -D (-) thiogalactopyranoside (IPTG, Wako Pure Chemicals Ind., Japan) を終濃度 0、0.25、0.5、1.0 mM となるように添加し、37°C で 3 時間振とう培養した。遠心分離により大腸菌を回収後、200 μ l の 1 \times SDS (62.5 mM Tris-HCl, 5% 2-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) に懸濁し、氷冷しながら超音波処理 20 秒 \times 3 回行い、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 分間加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて 30 mA で電

気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB (Bio-Rad laboratories, Inc., USA) で 1 時間染色し、MilliQ で脱色した後、19.2 kDa 付近の V3-C-CPE 194 N309A/S313A が多く産生されている IPTG 濃度を最適なものとした。

V3-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 μ l を BL21(DE3)(Novagen, Co., Ltd) 10 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い、3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え 37°C で 1 時間培養し、LA プレートに播種した後、一晚培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 50 ml に移し、37°C で一晚培養した (少量培養)。翌日 TA (TERRIFIC BROTH/amp, Invitrogen, Co., Ltd) 培地 500 ml に大腸菌培養液全てを移し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、決定した発現誘導条件に従い IPTG を添加し、37°C で 3 時間振とう培養した (大量培養) 後、10,000 rpm で 1 分間遠心分離し大腸菌を回収した。

500 ml の大腸菌培養液のうち 100 ml を可溶化条件の検討に用い、400 ml は精製条件の検討に用いた。100 ml culture の大腸菌を 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、氷冷しながら超音波処理 40 秒を 3 回行い、大腸菌を破碎した。4°C, 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収後、沈殿に 2% TrironX-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、沈殿に buffer A を 1 ml 加え、超音波処理を行い懸濁させた。それぞれの溶液画分 20 μ l に 4 \times SDS を 6.7 μ l 加え、99°C で加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行い、CBB 染色した後、V3-C-CPE 194 N309A/S313A が可溶化した画分の buffer を可溶 buffer とした。

V3-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 μ l を BL21 10 μ l に加え、氷上で 15 分間なじませ、45 秒間 heat shock を行い、15 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え 37°C で 45 分間培

養し、LA プレートに播種し、一晚培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 100 ml に移し、37°C で一晚培養した。翌日 TA 培地 1 リットルに大腸菌培養液すべてを移し、37°C で 2 時間振とう培養した後、最適濃度の IPTG を添加し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後 10,000 rpm で 1 分間遠心分離して大腸菌を回収し、-20°C で凍結保存した。

大腸菌を氷上で溶解した後、可溶化条件の検討結果に従い、buffer A を用いて V3-C-CPE 194 N309A/S313A の可溶化を行った。buffer A を 1 ml/100 ml culture の割合で添加し、40 秒間の超音波処理を 3 回行った後、14000 rpm, 15 分にて遠心分離を行い、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA, MilliQ, NiSO₄, buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Chelating HP (GE Healthcare) にサンプルを流し、V3-C-CPE 194 N309A/S313A を吸着させた。100 μ m の imidazol 溶液 10 ml で洗浄した後、400 μ M の imidazol 溶液 10 ml で V3-C-CPE 194 N309A/S313A を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。

V3-C-CPE 194 N309A/S313A 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 Bio-Sciences Corp., USA) 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™ Chelating HP で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500 μ l ずつ流して PD-10 column から溶出液を分取した。次にウシ血清アルブミン (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を標準液として BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用い、560 nm における吸光度を測定し、V3-C-CPE 194 N309A/S313A タンパク質の濃度を算出した。

B-1. 2. V3-C-CPE 194 N309A/S313A および V3-C-CPE303 タンパク質の経鼻投与と各種サンプルの回収

週 1 回、計 4 回、BALB/c マウスに経鼻投与を行った (n=5)。すべての群において一匹、一回あたりの投与量は V3 量として 5 μ g とし投与量が

10~15 μ l となるように PBS に溶解した。最終投与より一週間後、マウスより下記に示す方法により各種サンプルを回収した。また、同様にコレラトキシン(GT)をV3融合タンパク質に混合したものをマウスに経鼻投与した。

血清サンプル (serum sample)

マウスから眼底採血により血液を回収し、3000 \times g、10 分にて遠心分離を行った。上清を PBS にて 10 倍に希釈し、 -80°C で保存した。

B-1. 3. V3-C-CPE 194 N309A/S313A タンパク質の経鼻投与に伴う V3 特異的抗体価の測定

前日に V3 が 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように V3-KLH を炭酸緩衝液 (pH 9.6, Na_2CO_3 0.19 M, NaHCO_3 1.67 M) に溶解し、96 穴 NUNC Immuno plate に 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ で分注し、 4°C で保存した。翌日、T-TBS (0.05% Tween20-TBS) にてプレートを 3 回洗浄し、4%ブロッカーを 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添加した。室温にて 2 時間インキュベートした後、T-TBS で 3 回洗浄した。T-TBS にて 0.4%に調整したブロッカー (sample diluent) を用いて血清を 1/10~1/100000 希釈し、50 $\mu\text{l}/\text{well}$ にて添加した。室温にて 2 時間インキュベートした後、T-TBS で 5 回洗浄した。sample diluent にて HRP detection antibody (IgG) (BETHYL Laboratories, Inc.) を 1/10000 に希釈し、100 $\mu\text{l}/\text{well}$ にてプレートに添加した。室温で 1 時間インキュベートした後、T-TBS にて 5 回洗浄した。TMB solution を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 添加し、20 分インキュベート後、2M 硫酸を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加え、吸光度を測定した (450 nm, ref 595 nm)。

B-2. PspA 融合 C-CPE 変異体タンパク質の作製

B-2. 1. PspA および PspA-C-CPE 変異体 plasmid の作製

卵白アルブミン OVA と各種 C-CPE の cDNA を pET16b に組み込んだ pET16b-OVA-C-CPE を Pac I および Kpn I (NEB) にて 37°C 、2 時間処理し、アガロース電気泳動によりフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。

一方、PspA の cDNA を鋳型とし、10 \times PCR buffer for KOD plus 2 μl 、2.5 mM MgSO_4 1 μl 、2.5 mM dNTP mix 2 μl 、10 μM primers 1.6 μl 、滅菌精製水 10.4 μl 、5 U/ μl Takara kod plus 0.4 μl を混合し PCR を行った。PspA クローニング用プライマーは、forward primer (5' -AGggtaccGAAGAATCTCCCGTAGCC-3')、reverse primer (5' -GCttaattaATTCTGGGGCTGGAGTTTC-3') を用いた。PCR の条件は 94°C 、2 min の後、 94°C 、15 sec、 66°C 、30 sec、 72°C 、1 min を 30 サイクル、 72°C 、5min を 1 サイクル行った。PCR 産物をアガロース電気泳動により、分離、精製を行い、Pac I および Kpn I にて切り断した。Pac I および Kpn I にて切り断した pET16b-OVA-C-CPE および PspA と T4 DNA ligase (New England Biolabs., Inc) を用いて 16°C にて一晩ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿し、大腸菌 DH5 α (TOYOBO, Co., Ltd, Japan) を氷上で 15 分なじませた後、 42°C で 40 秒 heat shock を行い、氷上で 3 分間静置した。その後、SOC 培地を添加し 37°C にて 50 分培養した後、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した LB 培地 (LA 培地) プレートに播種し、一晩培養した。LA 培地を 3 ml 分注した Sterile Culture Tubes (IWAKIGLASS, Co., Ltd) に 1 コロニーずつピックアップし、一晩振盪培養した後、遠心分離し大腸菌を回収した。QIA prep Spin Miniprep kit (50) (QIAGEN Sience, USA) にて大腸菌より plasmid を精製した。得られた plasmid を Pca I および Kpn I で処理し、アガロース電気泳動により PspA のバンドが認められたクローンに関してシーケンス解析し、目的の遺伝子配列と一致したクローンを得た。

一方、PspA 発現 plasmid に関しては、まず PspA の cDNA を鋳型とし、10 \times PCR buffer for KOD plus 2 μl 、2.5 mM MgSO_4 1 μl 、2.5 mM dNTP mix 2 μl 、10 μM primers 1.6 μl 、滅菌精製水 10.4 μl 、5 U/ μl Takara kod plus 0.4 μl を混合し PCR を行っ

た。PspA クローニング用プライマーは、forward primer (5'-atgatgatgCATATGgaagaatctcccgtagc-3')、reverse primer (5'-GCGgggatccTTATTCtgggctggagtcttc-3')を用いた。PCR の条件は 94°C, 2 min の後、94°C, 15 sec、59°C, 30 sec、72°C, 1 min を 30 サイクル、72°C, 5min を 1 サイクル行った。得られた PCR 産物をアガロース電気泳動により分離、精製を行い、Nde I および BamH I により処理した。また、pET16b も Nde I および BamH I により処理し、フェノール/クロロホルム抽出した。Nde I および BamH I で処理した PspA cDNA および pET16b を 4 DNA ligase (New England Biolabs., Inc) を用いて 16°C にて一晩ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿し、Xho I 処理により plasmid を self cut した。得られた plasmid をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿し、plasmid と大腸菌 DH5 α (TOYOBO, Co., Ltd, Japan) を氷上で 15 分なじませた後、42°C で 40 秒 heat shock を行い、氷上で 3 分間静置した。その後、SOC 培地を添加し 37°C にて 50 分培養した後、100 μ g/ml ampicillin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した LB 培地 (LA 培地) プレートに播種し一晩培養した。LA 培地を 3 ml 分注した Sterile Culture Tubes (IWAKIGLASS, Co., Ltd) に 1 コロニーずつピックアップし、一晩振盪培養した後、遠心分離し大腸菌を回収した。QIA prep Spin Miniprep kit (50) (QIAGEN Sience, USA) にて大腸菌より plasmid を精製した。得られた plasmid を Nde I および BamH I で処理し、アガロース電気泳動により PspA のバンドが認められたクローンに関してシーケンス解析し、目的の遺伝子配列と一致したクローンを得た。

B-2. 2. PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質の作製

PspA および PspA-C-CPE 変異体発現 plasmid 1 μ l を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd) 5 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock

を行い 3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 50 μ l を加え、37°C で 45 分間培養し、LA プレートに播種し、一晩培養した。LA 培地 3 ml を分注した Sterile Culture Tubes に 1 コロニーをピックアップし、37°C で一晩振盪培養し、翌日 LA 培地を 2 ml ずつ分注した Sterile Culture Tubes を 4 本用意し、大腸菌培養液を 200 μ l ずつ加え、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、isopropyl- β -D (-) thiogalactopyranoside (IPTG, WaKo Pure Chemicals Ind., Japan) を終濃度 0、0.25、0.5、1.0 mM となるように添加し、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 μ l の 1 \times SDS (62.5 mM Tris-HCl, 5% 2-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) に懸濁し、氷冷しながら超音波処理 20 秒 \times 3 回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 分間加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて 30 mA で電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB (Bio-Rad laboratories, Inc., USA) で 1 時間染色し MilliQ で脱色した後、PspA および PspA-C-CPE 変異体発現が多く産生されている IPTG 濃度を最適なものとした。

PspA および PspA-C-CPE 変異体発現 plasmid 1 μ l を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd) 5 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い、3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 50 μ l を加え 37°C で 45 分間培養し、LA プレートに播種し、一晩培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 50 ml に移し、37°C で一晩培養した。翌日 TA (TERRIFIC BROTH/amp, Invitrogen, Co., Ltd) 培地 500 ml に大腸菌培養液全てを移し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、決定した発現誘導条件に従い IPTG を添加し、37°C で 3 時間振とう培養した後、10,000 rpm で 2 分間遠心分離し、大腸菌を回収した。

500 ml の大腸菌培養液のうち 3 ml を可溶性条件の検討に用い、497 ml は精製条件の検討に用いた。3 ml culture の大腸菌を 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) 300 μl に懸濁し、氷冷しながら超音波処理 40 秒を 3 回行い、大腸菌を破碎した。4°C, 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収後、沈殿に 2 % TrironX-100 含有 buffer A を 300 μl 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 300 μl 加え、超音波処理をしたそれぞれの溶液画分 20 μl に 4×SDS を 6.7 μl 加え、100°C で加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行い CBB 染色した後、PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質が可溶化した画分の buffer を可溶 buffer とした。

大腸菌を氷上で溶解した後、可溶化条件の検討結果に従い、buffer A を用いての可溶化を行った。buffer A を 1 ml/100 ml culture の割合で添加し、40 秒間の超音波処理を 3 回行った後、14000 rpm, 15 分にて遠心分離を行い、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA, MilliQ, NiSO₄, buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Chelating HP (GE Healthcare) にサンプルを流し、PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質を吸着させた。100 μm の imidazol 溶液 10 ml で洗浄した後、400 μM の imidazol 溶液 10 ml で PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。

PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質が溶解している 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 Bio-Sciences Corp., USA) 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™ Chelating HP で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500 μl ずつ流して PD-10 column から溶出液を分取した。次にウシ血清アルブミン (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を標準液として BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用い、560 nm における吸光度を測定し、PspA および

PspA-C-CPE 変異体タンパク質の濃度を算出した。

B-2. 3. PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質の発現確認

上記の操作により得た PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質を 1 μg/13.4 μl になるよう PBS で調整した。その溶液 13.4 μl に 4×SDS を 6.6 μl を加え、100°C で 5 分間加熱しサンプルとした。サンプルは 20 μl (タンパク質量として 1 μg) アプライした。一方分子量マーカーとして Broad Range (BIO-RAD Laboratories, Inc., USA) を用いた。10% polyacrylamide gel を用いて 20 mA で電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB で 1 時間染色し MilliQ で脱色した後、PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質を確認した。

また、上記と同様に SDS-PAGE を行い、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間タンパク質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.,) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪し、ブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回洗浄し、Canget 1 (TOYOBO) により 2000 倍に希釈した一次抗体 : Mouse anti His-tag antibody (ZYMED) と 21 時間反応させた。T-TBS で 3 回洗浄し、Canget 2 により 2000 倍に希釈した二次抗体 : Goat anti-Mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 3 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて発光させ、ImageQuant LAS 4000 により PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質の検出を行った。

B-2. 4. PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク

質の mCL-4 結合性 (ELISA)

96 穴 ELISA plate (Greiner Bio-One GmbH, Germany) に mCL-4-BV (ネガティブコントロールとして wild type BV および mCL-5-BV) を 0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ の条件で 4°C、一晩インキュベーションし、固相化した。翌日、PBS(-)で 3 回洗浄後、1.6 % ブロックエース(DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で室温、2 時間ブロッキングし、PBS(-) で 3 回洗浄した。続いて、C-CPE 変異体タンパク質量として 0.02 $\mu\text{g}/\text{well}$ の条件で各種タンパク質を添加し、室温で 2 時間インキュベーションした。インキュベーション後、0.05% tween-PBS(-) (T-PBS) で 3 回洗浄後、0.4% ブロックエースで 3,000 倍に希釈した Mouse anti His-tag Ab (Zymed Laboratories Inc., Co, USA) を加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、T-PBS で 3 回洗浄後、0.4% ブロックエースで 2,000 倍に希釈した Goat anti-Mouse IgG HRP conjugated を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応後、T-PBS で 5 回洗浄後、TMB solution (Thermo Scientific, Rockford, IL) を加えた。5 分間インキュベート後、2 M 硫酸を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加え、吸光度を測定した。(450 nm , ref 595 nm)

B-2. 5. PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質の mCL-4 結合性 (FACS)

mCL-4、-5 発現 L 細胞を 5.0×10^5 cells/sample となるように 96 well plate に播種し、1% BSA-PBS にて希釈した各種タンパク質を添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、1% BSA-PBS にて 1/200 に希釈した Mouse anti-His tag 抗体(Thermo)を添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、1% BSA-PBS にて 1/1500 に希釈した Goat anti-mouse IgG(H+L)-FITC 抗体(ROCKLAND)を添加、攪拌した後、氷上で遮光し、30 分静置した。0.2% BSA-PBS にて 3 回洗浄後、0.2% BSA-PBS にて終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように希釈した PI (Miltenyi Biotec)を加え、FACSCalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B-3. C-CPE 変異体修飾リポソームの作製

B-3. 1. C-CPE 変異体修飾リポソームの準備

リポソーム凍結乾燥品に超純水 500 μl を加え、緩やかに混和した。

B-3. 2. C-CPE 変異体修飾リポソームの mCL4 結合性

mCL4 発現 L 細胞を 5.0×10^5 cells/sample となるように 96 well plate に播種し、1% BSA-PBS にて希釈した各種リポソームを添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、1% BSA-PBS にて希釈した Mouse anti-His tag 抗体(Thermo)を添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、1% BSA-PBS にて希釈した Goat anti-mouse IgG(H+L)-FITC 抗体(ROCKLAND)を添加、攪拌した後、氷上で遮光し、30 分静置した。0.2% BSA-PBS にて 3 回洗浄後、0.2% BSA-PBS にて終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となつように希釈した PI (Miltenyi Biotec)を加え、FACSCalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B-3. 3. OVA 封入 C-CPE 変異体修飾リポソームの作製

リポソーム凍結乾燥品に 15 mg/mlとなるように調整した卵白アルブミン溶液を 500 μl 添加し、緩やかに混和した。

前日に Rabbit-anti-OVA antibody を 10 μg となるように炭酸緩衝液 (pH 9.6.) に溶解し、96 穴 NUNC Immuno plate に 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ で分注し、4°C で保存した。翌日、PBS にて 4 回洗浄後、4% ブロックエースを 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添加した。室温にて 90 分間インキュベートした後、PBS にて 4 回洗浄した。検量線コントロールとして PBS にて種々の濃度に希釈した OVA 溶液、PBS にて希釈した OVA 封入修飾リポソームおよび 1% T-PBS (Tween 20-PBS) にて希釈し、60°C で 5 分間煮沸することでリポソームを破壊した溶液をそれぞれプレートに 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添加した。室温で 90 分間インキュベート後、PBS で 4 回洗浄した。T-PBS にて 0.4%に調整

したブロックエース (sample diluent) を用いて mouse-anti-OVA antibody を 1/3000 に希釈し、100 μ l/well で添加した。室温で 90 分間インキュベート後、PBS で 4 回洗浄した。sample diluent にて 1/1000 に希釈した Goat-anti-mouse IgG (H+L)-HRP antibody (xxx) を 100 μ l/well で添加した。室温で 1 時間インキュベート後、PBS で 5 回洗浄した。TMB solution を 100 μ l/well で添加し、10 分間インキュベート後、2M 硫酸 100 μ l/well で加え、反応停止後、吸光度を測定した(450 nm, ref 595 nm)。

B-3. 4. OVA 封入 C-CPE 変異体修飾リポソームの mCL4 結合性

mCL4 発現 L 細胞を 5.0×10^5 cells/sample となるように 96 well plate に播種し、1% BSA-PBS にて希釈した各種リポソームを添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、1% BSA-PBS にて希釈した Mouse anti-His tag 抗体 (Thermo) を添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、1% BSA-PBS にて希釈した Goat anti-mouse IgG (H+L)-FITC 抗体 (ROCKLAND) を添加、攪拌し、氷上で遮光した後、30 分静置した。0.2% BSA-PBS にて 3 回洗浄後、0.2% BSA-PBS にて終濃度 5 μ g/mL となつように希釈した PI (Miltenyi Biotec) を加え、FACSCalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

C. 研究結果

C-1. V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A による免疫賦活化効果の検証

HIV に対するワクチン効果を検証するため、HIV 関連抗原である V3 と C-CPE194 N309A/S313A との融合タンパク質を作製し、CL4 への結合性を確認した。本融合タンパク質を用い、マウスに経鼻投与することにより抗原特異的抗体が誘導されるかを検証した。その結果、いずれの C-CPE 変異体融合タンパク質投与群においても抗原特異的抗体価の上昇は観察されなかった。(Fig. 1)

C-2. PspA および PspA-C-CPE 変異体の作製

CL4 を標的とした粘膜ワクチン開発のために肺炎球菌のワクチン抗原として期待されている PspA と各種 C-CPE 変異体との融合タンパク質を作製した。まず、pET16b に PspA および各種 C-CPE の cDNA を組み込み、pET16b-PspA および pET16b-PspA-C-CPE 変異体 plasmid を作製した。作製した plasmid を BL21 にトランスフォーメーションし、IPTG および可溶化バッファの検討を行った。決定した IPTG 濃度および可溶化バッファを用い、AKTA により各種タンパク質の精製を行った。精製したタンパク質の CBB 染色および Western blot 法を行い、それぞれのタンパク質の発現が認められた。(Fig. 2)

続いて、作製した PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質の CL 結合性を mCL 発現 BV を用いた ELISA 法および CL 発現 L 細胞を用いた FACS により検証した。各種 BV を 96 well プレートに固相化し、PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質を添加し、His tag 抗体、HRP 標識抗体の順に作用させ、その結合性を評価した。その結果、PspA および PspA と mCL4 に結合性を示さない C-CPE Y306A/L315A との融合体はいずれの BV に対しても結合性を示さなかった。一方で、PspA と mCL4 に結合性を示す C-CPE、C-CPE194 N309A/S313A および C-CPE205 N309A/S313A 融合体は mCL4 に対する結合性が認められた (Fig. 3)。

さらに、mCL 発現 L 細胞を用いた FACS により PspA および PspA-C-CPE タンパク質の結合性を検証した所、ELISA 法の結果と同様に、PspA および PspA-C-CPE Y306A/L315A は mCL4 に結合性を示さず、PspA-C-CPE、PspA-C-CPE194 N309A/S313A および PspA-C-CPE205 N309A/S313A は mCL4 結合性を有していた。(Fig. 4)

C-3. C-CPE 変異体修飾リポソームの作製

消化酵素による抗原分解回避のために C-CPE 変異体を修飾したリポソームを作製した。

まず、作製した C-CPE 変異体修飾リポソームを復水し、mCL4 発現 L 細胞を用いた FACS によりその結合性を検証した。その結果、未修飾リポソームは mCL4 発現 L 細胞に対し結合性が認められなかったのに対し、C-CPE194 N309A/S313A 修飾リポソームは mCL4 発現 L 細胞に対して結合性を示した。(Fig. 5)

上記の結果を受け、各種リポソームに OVA を封入したリポソームを作製し、その mCL4 結合性を維持しているかを mCL4 発現 L 細胞を用いた FACS により検証した。その結果、未修飾および C-CPE Y306A/L315A 修飾リポソームでは mCL4 発現 L 細胞に対して結合性を示さなかったのに対し、C-CPE194 N309A/S313A 修飾リポソームは mCL4 発現 L 細胞に対し結合性を示した。しかしながら、C-CPE194 N309A/S313A 同様に mCL4 結合性に優れる C-CPE205 N309A/S313A を修飾したリポソームは結合性を示さなかった。(Fig. 6)

D. 考察

CL-4 を標的とした経口ワクチン開発のため、既存の CL-4 binder である C-CPE を prototype として利用し、昨年度は C-CPE に比して約 10 倍以上も結合性が高まった C-CPE 変異体の取得に成功した。そこで、本年度はこの C-CPE 変異体と抗原との融合タンパク質を作製し、本融合タンパク質を投与した際の免疫賦活化作用を検証した。まず、HIV のモデル抗原として利用されている V3 との融合タンパク質を作製し、経鼻投与による V3 特異的抗体の産生誘導を調べたところ、抗体価の上昇は観察されなかった。一方、モデル抗原として汎用されている OVA との融合タンパク質では、既存の C-CPE に比して高い免疫賦活化作用が検出された。V3 は 20 アミノ酸程度と抗原サイズが小さいため、免疫誘導が起きにくかった可能性を考え、疾患モデル抗原を肺炎双球菌抗原である PspA (サイズ約 45 kDa) に変更することにした。PspA と C-CPE 変異体との融合タンパク質を作製し、CL-4 との結合性を確認したところ、十分な CL-4 結合性を示した。そこで、来年度は PspA-C-CPE 変異体での PspA 特異的抗体価の誘導活性を検証する

予定である。

また、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体の取得に成功したことから、本 C-CPE 変異体修飾リポソームの作製に着手した。研究分担者である鈴木が作製した C-CPE 変異体修飾リポソームの CL-4 結合性を当ラボにおいて確認したところ、C-CPE194 N309A/S313A 修飾リポソームにおいて CL-4 への結合性が確認できた。次に、OVA を封入した C-CPE194 N309A/S313A 修飾リポソームの CL-4 結合性を確認したところ、こちらも CL-4 への結合性を確認した。以上、経口ワクチン開発の土台となる C-CPE 変異体修飾リポソームの作製に成功した。

E. 結論

本年度は、昨年度に取得した CL-4 高結合性 C-CPE 変異体である C-CPE194 N309A/S313A を利用し、以下の成果を得た。

① C-CPE194 N309A/S313A を用いた免疫誘導活性およびワクチン効果

C-CPE194 N309A/S313A と OVA との融合タンパク質を経鼻投与した結果、OVA-C-CPE194 N309A/S313A 投与群は OVA-C-CPE194 投与群に比して有意な免疫誘導能および抗腫瘍ワクチン効果を発揮した。

② C-CPE194 N309A/S313A を用いた感染症関連抗原融合タンパク質の作製

CL4 を標的とした感染症に対するワクチン効果を検証するため肺炎双球菌抗原である PspA と C-CPE194 N309A/S313A との融合タンパク質を作製した。本融合タンパク質の mCL 結合性を検証した結果、mCL4 に対する結合性を有していた。

③ C-CPE194 N309A/S313A 修飾リポソームの作製

C-CPE194 N309A/S313A を修飾したリポソームを作製し、CL-4 への結合性を確認した。また、OVA を封入した C-CPE194 N309A/S313A 修飾リポソームにおいても CL-4 結合性を確認した。

上記の結果を踏まえ、来年度は C-CPE194 N309A/S313A 修飾リポソームを経口投与した際の抗原送達、および免疫賦活化作用などを検証する予定である。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watari A, Yagi K, Kondoh M. : A simple reporter assay for screening claudin-4 modulators., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 426(4):454-60, 2012.
2. Yamagishi Y., Watari A., Hayata Y., Li X., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K. : Hepatotoxicity of sub-nanosized platinum particles in mice. *Pharmazie*, 68(3):178-82, 2013.

2. 学会発表

1. Suzuki H., Takahashi A., Matsushita K., Li X., Tsujino H., Watari A., Kondoh M., Aoyama H., Uno T., Yagi K., Preparation of a broad-specific claudin binder by using *Clostridium perfringens* enterotoxin., *Experimental Biology* 2012, Apr 21-25, SanDiego, USA.
2. Yagi K., Yoshida T., Yamane S., Takayama K., Watari A., Kondoh K., Sakurai F., Sakamoto N., Matsuura Y., Mizuguchi H., Evaluation of HCV infection and replication using human iPS cell-derived hepatocytes., *HCV2012 19th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses* 2012, Oct 5-9, Venice, ITALY.
3. Watari A., Hasegawa M., Kondoh M. Yagi K., Establishment of a cell-based screening system for chemical modulators of claudin expression., *Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia*, 2012, Nov 1-4, Merida, MEXICO.
4. Doyama R., Suzuki H., Matsushita K., Li X.,

Takahashi A., Matsuhisa K., Tsujino H., Watari A., Kondoh M., Aoyama H., Uno T., Yagi K., *Biochemical analysis of a claudin ligand that exhibits a broad binding specificity.*, *Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia*, 2012, Nov 1-4, Merida, MEXICO.

5. 鈴木英彦、山根誠司、角谷英樹、高橋 梓、内田博司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、Claudinを標的とした動態制御技術の現状と課題、第28回DDS学会学術集会、平成24年7月4日、札幌市、北海道
6. 土山 亮、長瀬翔太郎、鈴木英彦、李相儒、山根誠司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、*Clostridium perfringens* enterotoxin断片を利用した claudin指向性吸収促進技術の安全性評価、第59回トキシシンポジウム平成24年年8月30-31日、帯広市、北海道
7. 山下真代、長瀬翔太郎、高橋梓、岩成宏子、近藤昌夫、渡利彰浩、浜窪隆雄、八木清、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第2報～免疫抗体ライブラリの最適化～、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
8. 長瀬翔太郎、山下真代、飯田愛未、渡利彰浩、近藤昌夫、深澤征義、八木清、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第2報～免疫抗体ライブラリの最適化～、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
9. 平垣有史、李相儒、清水芳実、渡利彰浩、近藤昌夫、深澤征義、八木清、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第4報～claudin-4特異的 binderの創製～、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
10. 長谷川真希、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第5報～低分子tight junction modulatorの創製～、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
11. 早石知浩、近藤昌夫、渡利彰浩、永浜政博、八木清、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究

第6報～ Tricellular junction modulatorの創製～、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県

12. 李相儒、近藤昌夫、渡利彰浩、八木清仁、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第7報～ claudin-3/-4結合分子(C-CPE)の体内動態解析～、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
13. 山岸喜彰、渡利彰浩、李相儒、吉岡靖雄、近藤昌夫、堤康央、八木清、ナノ・サブナノ白金のマウス肝臓における毒性評価、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
14. 山岸喜彰、渡利彰浩、李相儒、吉岡靖雄、近藤昌夫、堤康央、八木清、ナノ・サブナノ白金のマウス腎臓における毒性評価、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
15. 清水芳実、近藤昌夫、渡利彰浩、深揮征義、八木清仁、タイトジャンクションによる薬物代謝活性制御の可能性、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

I. 研究協力者

大阪大学大学院薬学研究科:

- ・ 八木清仁(教授)
- ・ 近藤昌夫(准教授)
- ・ 松久幸司(大学院生)
- ・ 鈴木英彦(大学院生)

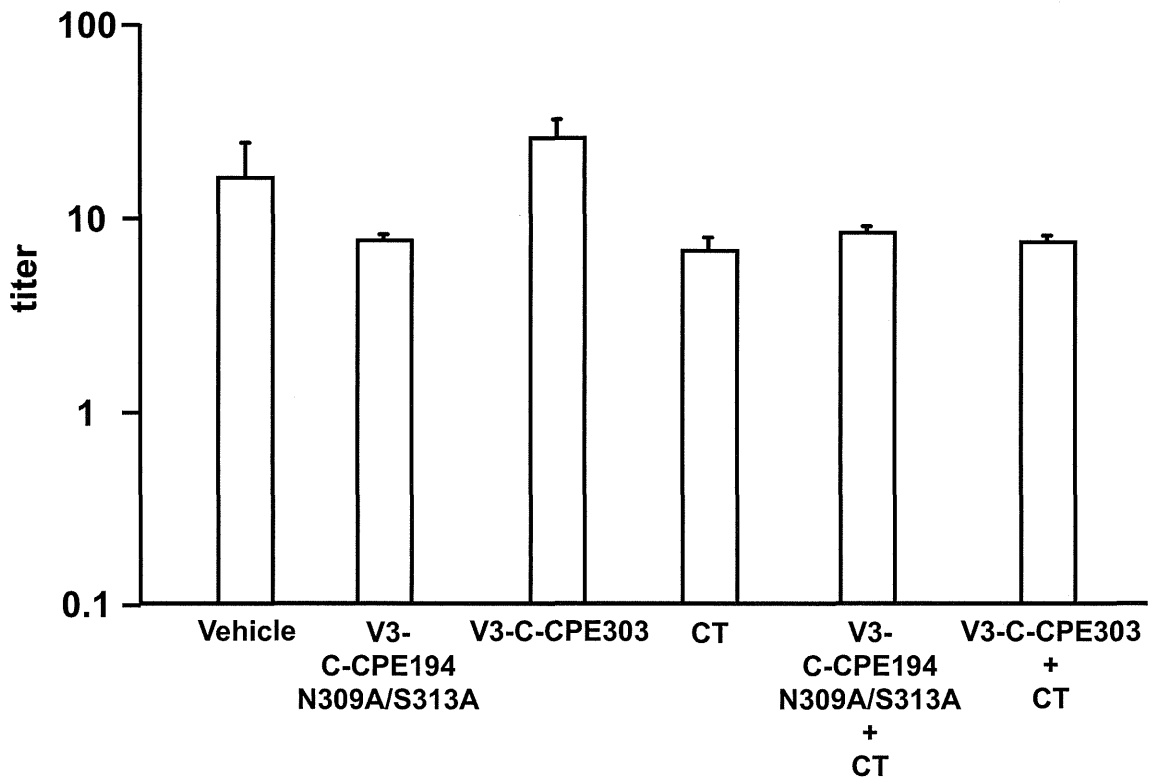


Fig.1 Production of V3 specific IgG in serum by V3-C-CPE194 N309A/S313A.

Mice were nasally immunized with V3-C-CPE194 N309A/S313A, V3-C-CPE 303, cholera Toxin (CT), V3-C-CPE194 N309A/S313A and CT, V3-C-CPE 303 and CT (5 μ g of V3) once a week for three weeks. Seven days after the last immunization, the levels of serum IgG were determined by ELISA. Data are means \pm SEM (n=3~5).

A

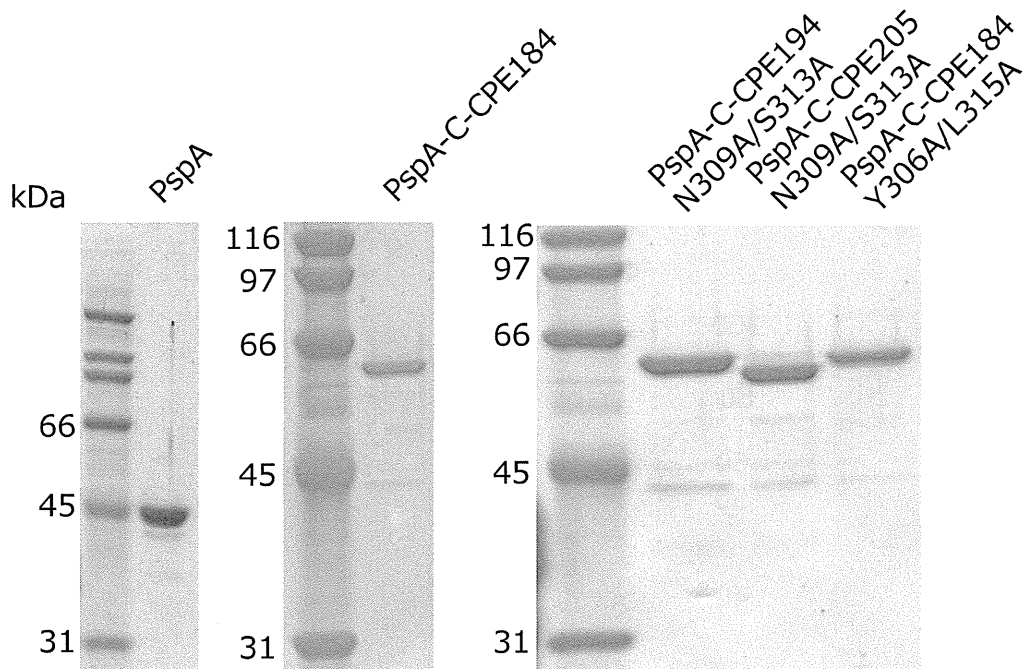


Fig.2 Preparation of PspA, PspA-C-CPE and PspA mutants. Purification of PspA, PspA-C-CPE and PspA-C-CPE mutants. These proteins were expressed in *E. coli* and isolated by anti-His tag affinity chromatography. The purification of PspA, PspA-C-CPE and PspA mutants were confirmed by SDS-PAGE followed by staining with Coomassie Brilliant Blue (A) and by immunoblotting with an anti-his-tag antibody (B).

B

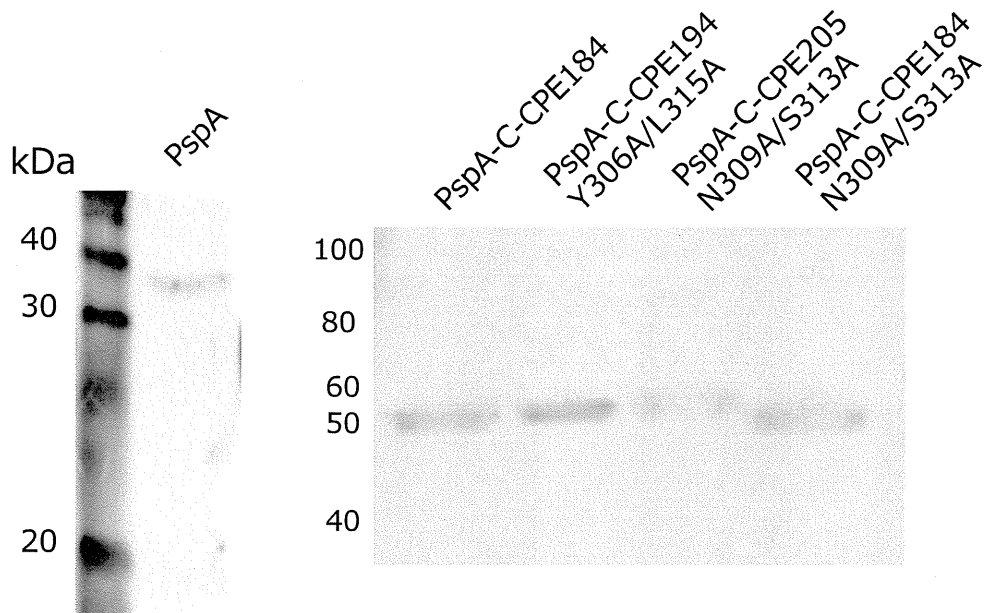


Fig.2 Preparation of PspA, PspA-C-CPE and PspA mutants. Purification of PspA, PspA-C-CPE and PspA-C-CPE mutants.

These proteins were expressed in *E. coli* and isolated by anti-His tag affinity chromatography. The purification of PspA, PspA-C-CPE and PspA mutants were confirmed by SDS-PAGE followed by staining with Coomassie Brilliant Blue (A) and by immunoblotting with an anti-his-tag antibody (B).

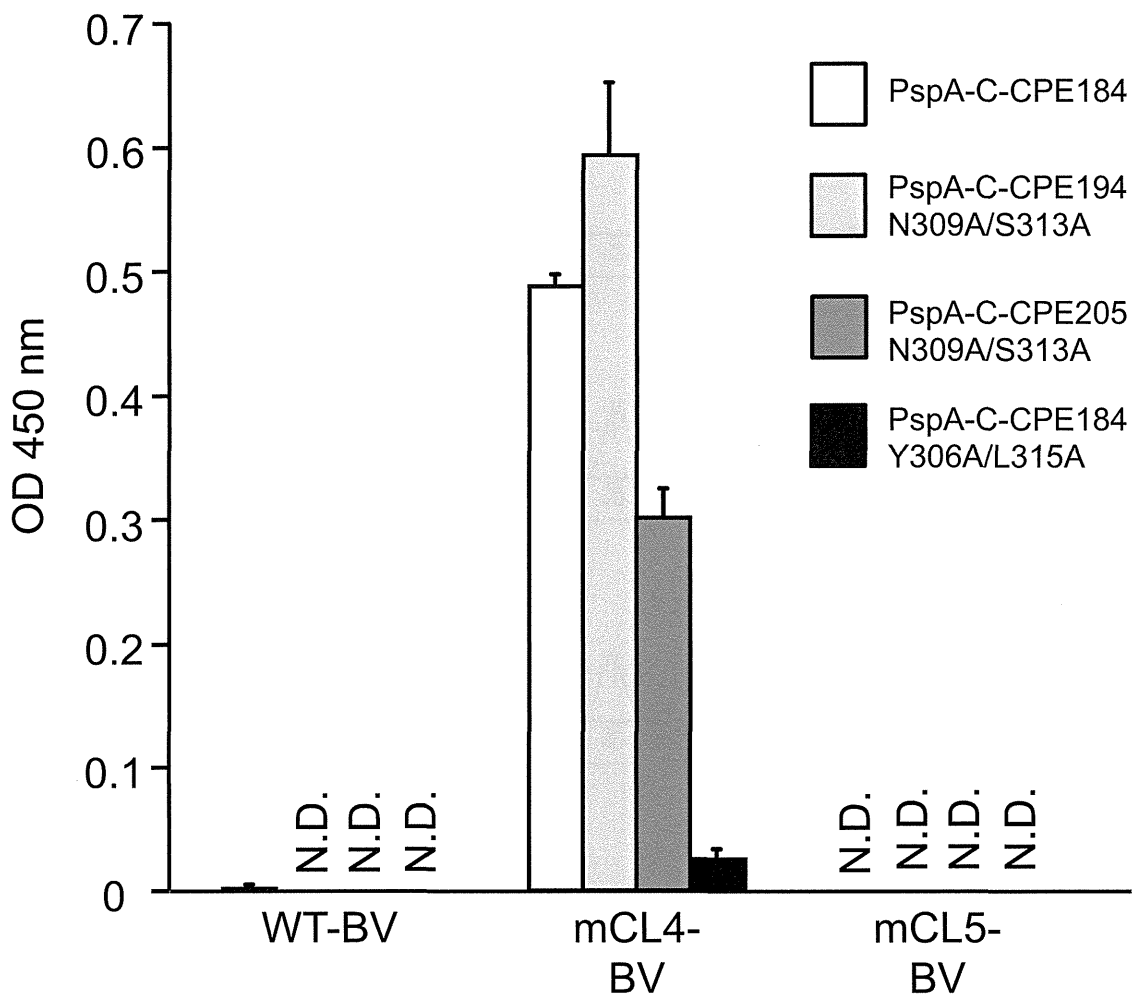


Fig.3. Binding of PspA-C-CPEs to claudin-4 displaying BV. Wild-type BV (WT-BV), mouse claudin-4 displaying BV (mCL4-BV) or -5 (mCL5-BV) was absorbed onto immunoplate, and then PspA-C-CPEs were added to the well. PspA-C-CPEs bound to BV was detected by an anti-his-tag antibody followed by goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP. Data are means \pm SD (n=4).

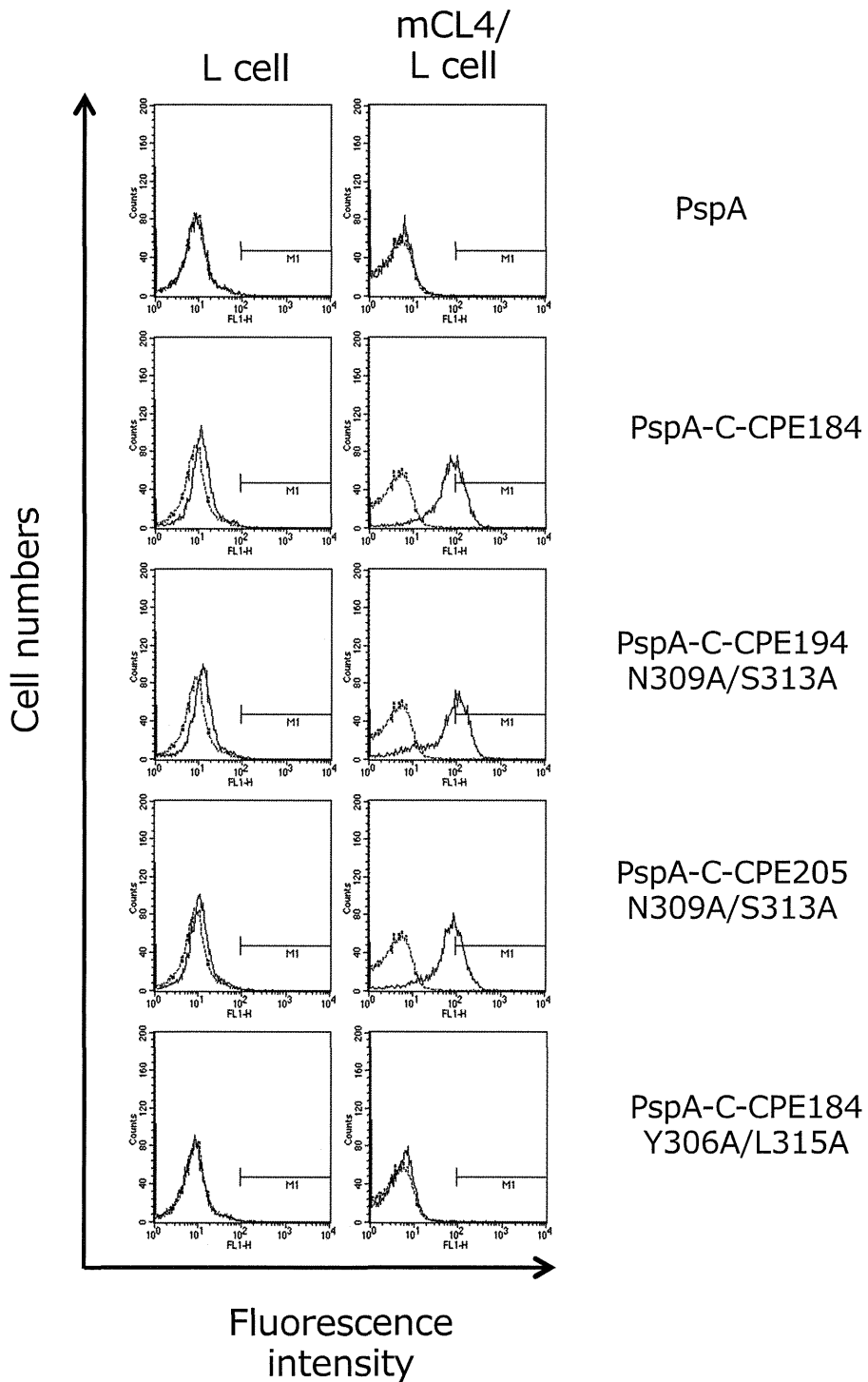


Fig. 4 Binding of PspA-C-CPEs to claudin-4-expressing cell. Claudin expressing L cells were incubated with PspA-C-CPEs followed by anti-his-tag antibody. Cells were stained with FITC-conjugated goat-anti mouse IgG (H+L) and analyzed by flow cytometry (solid line). Dotted line represents control cells incubated with the second and third step reagent alone. (n=3)

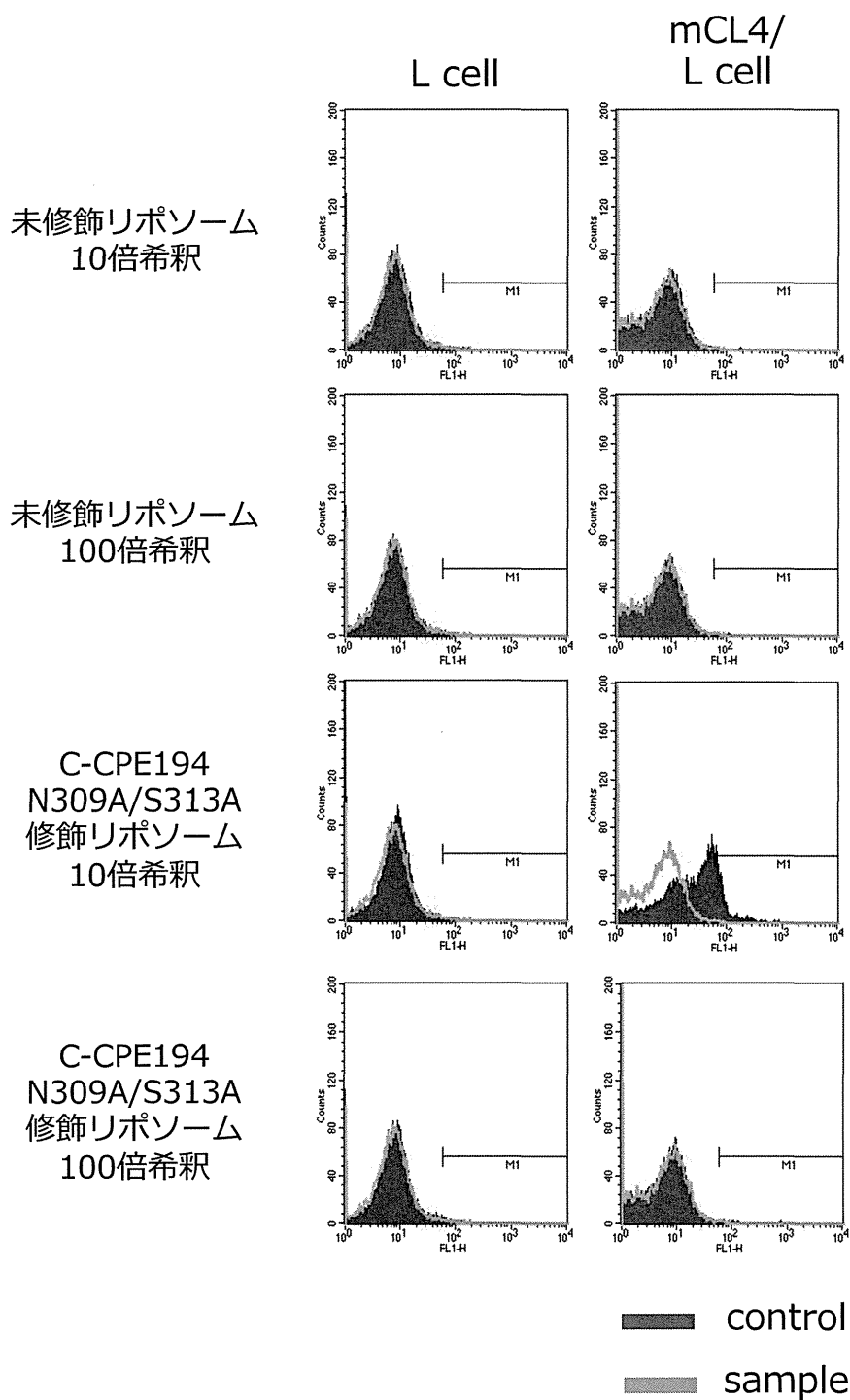


Fig. 5 C-CPE修飾リポソームのclaudin-4結合性
 L細胞およびclaudin-4発現 L細胞にC-CPE194 N309A/S313Aを
 修飾したリポソーム（10倍希釈と100倍希釈液）を作用させた後、
 FACSにより結合性を確認した。

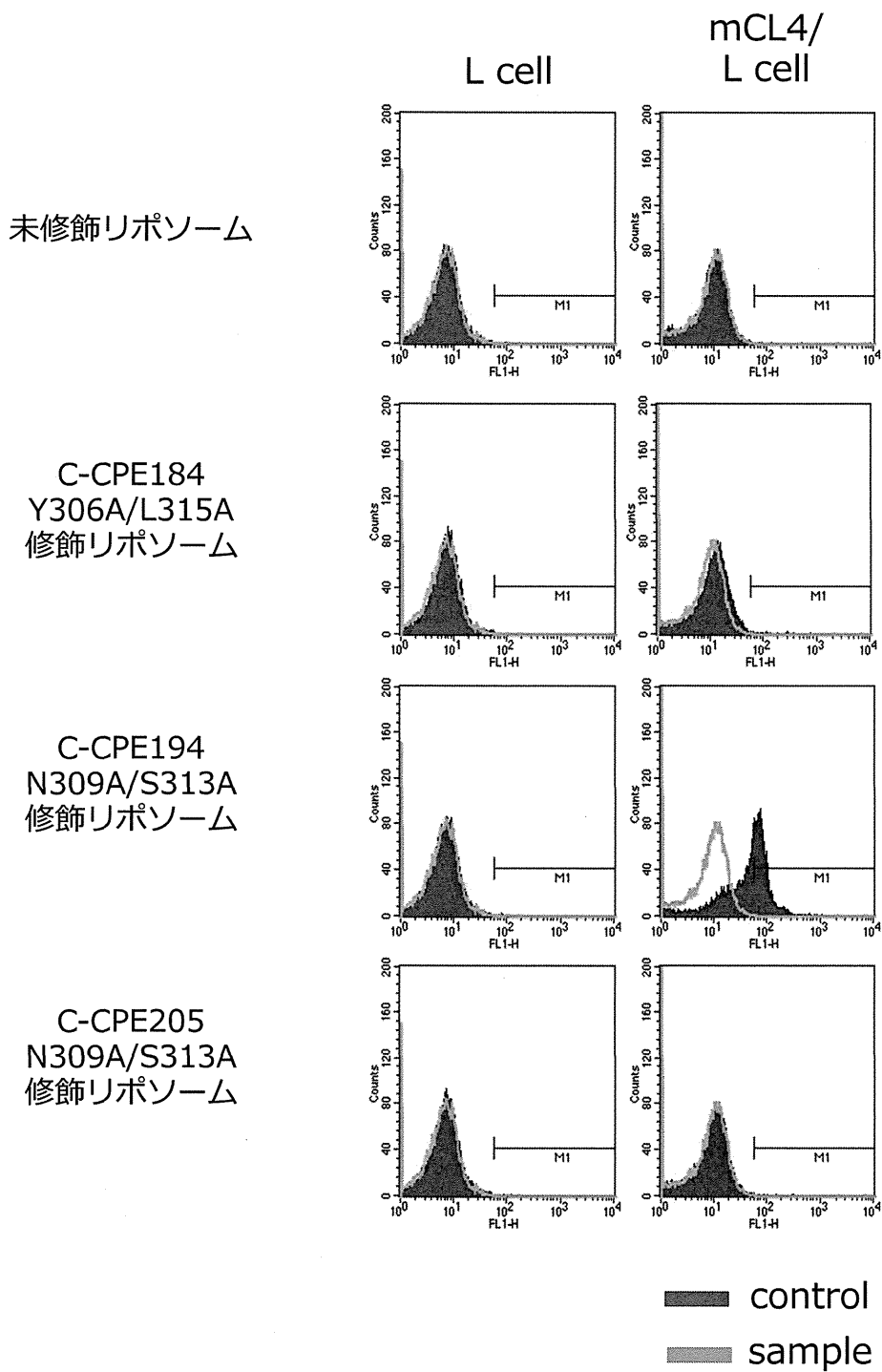


Fig. 6 OVA封入C-CPE修飾リポソームのclaudin-4結合性 L細胞およびclaudin-4発現 L細胞にC-CPE184 Y306A/L315A, C-CPE194 N309A/S313A, C-CPE205 N309A/S313A を修飾したOVA封入リポソームを作用させた後、FACSにより結合性を確認した。