

201318065A

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



平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成26(2014)年 5月

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成26（2014）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	----- 12
鈴木 亮	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 21

「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のように、依然として感染症は人類に立ちほ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、初年度に取得した 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、経鼻投与を行った結果、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。そこで、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体を修飾したリポソーム(OVA 封入)を作製し、本リポソームが CL-4 への結合性を示すことを確認した。本年度は、C-CPE を利用した際の安全性を考慮するため、蛍光標識した C-CPE を用い、*in vivo* イメージング装置により C-CPE の体内動態を観察した結果、一時的に肝臓に蓄積する可能性が示された。従って、C-CPE を用いる際には肝臓への影響について考慮する必要がある。

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、粘膜免疫組織を覆う上皮組織に tight junction 構成タンパク質である claudin-4 (CL4) が高発現していることから、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。そこで当研究グループはこれまでに 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を覆う上皮組織にも CL4 が高発現していることから、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. C-CPE タンパク質の作製

B-1. 1. C-CPE タンパク質の精製

C-CPE 194 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 (-) thio galactopyranoside (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 C-CPE 194 タンパク質が多く産生されている IPTG 濃度を最適なものとした。

C-CPE 194 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、大腸菌を破砕した。4°C, 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収後、沈殿に 2% 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、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 ml に 4×SDS を 6.7 μl 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、C-CPE 194 タンパク質が可溶化した画分の buffer を可溶 buffer とした。

C-CPE 194 発現 plasmid 1 μl を BL21 10 μl 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 μl 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で一晩培養した。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 C-CPE 194 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、C-CPE 194 タンパク質を吸着させた。100 mM の imidazol 溶液 10 ml で洗浄した後、400 mM の imidazol 溶液 10 ml で C-CPE 194 タンパク質を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。

C-CPE 194 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、C-CPE 194 タンパク質の濃度を算出した。

B-1. 2. C-CPE N306A/S315A(C-CPE mutant)タンパク質の精製

CL への結合性が低下した C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)の発現 plasmid 1 μl を BL21(DE3)(Novagen, Co., Ltd) 10 μl 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 μl 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 μl 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 μl の 1×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×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 C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)タンパク質が多く産生されている IPTG 濃度を最適なものとした。

C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)発現 plasmid 1 µl を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd) 10 µl 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 µl を加え 37°Cで 1 時間培養し、LA プレートに播種した後、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 (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 ml に 4×SDS を 6.7 µl 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、C-CPE 194 N306A/S315A

(C-CPE mutant)タンパク質が可溶化した画分の buffer を可溶 buffer とした。

C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)発現 plasmid 1 µl を BL21 10 µl 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 µl 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 100 ml に移し、37°Cで一晩培養した。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 C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)タンパク質の可溶化を行った。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、C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)タンパク質を吸着させた。100 mm の imidazol 溶液 10 ml で洗浄した後、400 mM の imidazol 溶液 10 ml で C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)タンパク質を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。

C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)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 ml 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、C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)タンパク質の濃度を算出した。

B-1. 3. C-CPE タンパク質の発現確認

上記の操作により得た C-CPE および C-CPE mutant タンパク質を 1 mg/13.4ml になるよう PBS で調整した。その溶液 13.4 μ l に 4 \times SDS を 6.6 ml を加え、100 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱しサンプルとした。サンプルは 20 μ l (タンパク質量として 1 μ g) 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、各種 C-CPE 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 により各種 C-CPE タンパク質の発現検出を行った。

B-2. C-CPE の体内動態解析

B-2. 1 細胞培養

マウス線維芽細胞由来 L 細胞は 10% FBS, 20 mM NaHCO₃, 2 mM L-gultamine を含む Eagle's MEM 培

地 (MEM 培地), 各種 CL 発現 L 細胞は MEM 培地にさらに 500 mg/ml G418 を加えて用いて 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下で培養した。

B-2. 2 C-CPE の蛍光標識体の作製

XenoLight CF[™] 蛍光標識キット (Caliper) のプロトコールに準じて、C-CPE または C-CPE mutant のリジン残基を CF750 で化学修飾することで蛍光標識体を作製した。1 mg の C-CPE または C-CPE mutant に対し 900 μ L の PBS を加え調整し、1 M Sodium bicarbonate (pH 8.3) を加えた。DMSO で溶解した 0.05 μ mole の CF750 12 μ L と混合し、常温で 1 h 遮光反応させた。混合物を 10kD MWCO ultrafiltration vial に添加し、14,500 rpm、4 $^{\circ}$ C で遠心を行い、CF750 標識 C-CPE を vial のフィルターにトラップすることで分子量の小さい非標識 CF750 を除去した。チューブに 600 μ L の PBS を添加し、遠心により CF750 標識 C-CPE を三回 wash した。1 mL の PBS をチューブに添加・ピペティングし、CF750 標識 C-CPE を回収した。さらに 0.22 μ m のフィルターで濾過し、無菌にした。最後に吸光度法により OD 280 nm および OD 755 nm の吸光度を測定し、プロトコールにある公式に準じてタンパク質濃度を計算した。

B-2. 3. C-CPE の各種 L/CL 細胞への結合性確認

mCL-1、-2、-3、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 にて希釈した蛍光標識 C-CPE および C-CPE mutant 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 mg/mL となるように希釈した PI (Miltenyi Biotec) を加え、FACSGalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B-2. 4. 正常マウスにおける C-CPE の体内分布

BALB/c マウス(雌性、8 週齢)に CF750-C-CPE または CF750-C-CPE mutant を 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ となるように調製し、尾静脈内投与した。投与 10 min、30 min、1 h、3 h、6 h、24 h、48 h、72 h、96 h 後、体重を測定し、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、甲状腺、胃、腸、脳、精巣を単離した。また、血液を心採血により 100 μL 収集した。イメージング装置(Maestro™ EX)にて蛍光強度を測定し、ソフトウェア Maestro 2.10.0 にて解析した。各臓器の蛍光強度は%ID(%Injected dose)の標記で求めた。血液に関して、マウス体重の 8%に相当する量で計算した。

C. 研究結果

まず、蛍光物質 CF750 標識 C-CPE (CF750-C-CPE)および CL-4 への結合性が低い C-CPE (CF750-C-CPE mutant)の各種 mCL 発現 L 細胞に対する結合性を調べた。その結果、CF750-C-CPE mutant はいずれの mCL 発現細胞にも結合性を示さないのに対し、CF750-C-CPE は mCL-3 および mCL-4 のみに対し結合性を示した。この結果から、蛍光物質 CF750 によるリジン残基の修飾は、C-CPE の CL 結合性に影響を及ぼさないことを確認した(Figure 1)。

次に、蛍光標識 C-CPE および C-CPE mutant の正常マウスにおける体内分布を検討した。BALB/c マウスに蛍光標識した C-CPE もしくは C-CPE mutant を尾静脈投与したところ、10 分後には C-CPE のほとんどが代謝関連組織である肝臓および腎臓に蓄積することが観察された。C-CPE mutant の分布と比べ、C-CPE は一時的に肝臓への蓄積が観察されたが、30 分後から徐々に排出され、すみやかに C-CPE mutant と同様なレベルとなった。また、腎臓においては C-CPE および C-CPE mutant とともに同様な蓄積パターンが観察されたことから、CL への結合性とは無関係な非特異的な集積であると考えられた(Figure 2)。他の組織への分布に関して、C-CPE は甲状腺、腸へ蓄積することが観察されたが、蓄積量は肝臓および腎臓と比べ低かった(Figure 3)。さらに、C-CPE 投与 6 時間後から 96 時間まで観察した結果、

全身から徐々に排出されることが観察された(Figure 2, 3)。以上の結果から、C-CPE は一時的に肝臓への集積性を示すことが観察された。

D. 考察

CL-4 は TJ 構成タンパク質として、肝臓、腎臓、甲状腺、腸などの様々な正常組織にも発現していることが報告されていることから、C-CPE を利用した際の安全性を検討する目的で、C-CPE の体内動態を検討した。評価する CL-4 binder として、C-CPE および比較対照群として mCL-4 に結合性を有することが報告されているラット抗体 HKH189.J9 (Data not shown)を実験に用いた。

それぞれの CL-4 binder の体内動態を検討した結果、C-CPE および HKH189.J9 はともにそれぞれのネガティブコントロールと比べ一時的な肝臓への蓄積性が観察された。また、C-CPE は甲状腺および腸において、きわめて低い蓄積性しか観察されず、HKH189.J9 は一時的に脾臓および腎臓への蓄積が観察された。体内分布の観察結果から、CL-4 binder を体内に投与した際、CL-4 結合性による生体への影響はきわめて低いと考えられた。ここで、C-CPE および HKH189.J9 の組織蓄積性が異なる原因は以下の二点が考えられる。第一の原因として、C-CPE は CL-4 だけではなく、CL-3 にも結合性を示すことから、C-CPE の体内分布には CL-3 への結合性が影響すると考えられる。第二の原因として、C-CPE の分子量(14 kDa)と抗体 HKH189.J9 の分子量(150 kDa)は約 10 倍もの差があることから、組織浸透性の違いが原因になると考えられる。また、今回の体内動態検討では、蛍光で評価したため、抗体の真の動態を評価しているとは限らない。したがって、蛍光物質標識抗体の安定性を今後検討する必要があると考えてられる。今回の検討では C-CPE を静脈内に投与することで C-CPE が体内に侵入した際の動態を調べたが、C-CPE を経口ワクチンとして利用するには経口投与した際の動態を調べる必要がある。

E. 結論

本年度は、C-CPE を投与した際の安全性を評価

するため、蛍光標識 C-CPE の体内動態を解析したところ、以下の結果を得た。

① 蛍光標識 C-CPE の作製

CF750 で化学修飾した C-CPE を作製し、各種 CL 発現 L 細胞での結合性を確認した結果、修飾無しの C-CPE と同じ L/CL-3 及び L/CL-4 細胞への結合性を示した。

② 蛍光標識 C-CPE の体内動態

蛍光標識した C-CPE はネガティブコントロールと同様な体内動態を心臓、肺、脾臓、腎臓、甲状腺、胃、腸、脳、精巣において示した。一方、肝臓へは一時的な集積が観察された。

以上、今後の C-CPE の安全性を評価する上で、肝臓への影響を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Li X., Saeki R., Watari A., Yagi K., Kondoh M., Tissue distribution and safety evaluation of a claudin-targeting molecule, the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *Eur. J. Pharm.Sci.*, 14(52), 132-7, 2014.
2. Iida M., Yoshida T., Watari A., Yagi K., Hamakubo T., Kondoh M. A baculoviral display system to assay viral entry. *Biol. Pharm. Bull.*, 36(11), 1867-9, 2013.

2. 学会発表

1. Li X., Watari A., Yagi K, Kondoh M., Tissue-distribution and safety evaluation of a claudin-3/4 binder in mice., The American society for Cell Biology, Dec 14-18, New Orleans, U.S.A.
2. Watari A., Hasegawa M., Yagi K., Kondoh M.,

Identification of chemical compounds that modulate claudin-4 expression by cell-based screening. The American society for Cell Biology, Dec 14-18, New Orleans, U.S.A.

3. Doyama R., Matsuhisa K., Takahashi A., Matsuhisa K., Watari A., Hamakubo T., Yagi K., Kondoh M., Creation of a broadly specific claudin binder and its absorption-enhancing activity., 2013 AAPS Annual Meeting and Exposition, Nov 10-14, San Antonio, U.S.A.
4. Suzuki H., Kunisawa J., Watari A., Yamashita M., Yagi K., Kondoh M., An improved claudin-targeting mucosal vaccine using a double alanine-substituted Mutant of the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin., 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society 2013, Jul 21-24, Honolulu, HI, U.S.A.
5. Li X., Kondoh M., Watari A., Yagi K., Tissue-distribution of claudin-3/-4 binder, the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, in mice., Experimental Biology 2013, Apr 20-24, Boston, U.S.A.
6. Yamashita M., Nagase S., Takahashi A., Iwanari H., Kondoh M., Watari A., Hamakubo T., Yagi K., Characterization of scFv libraries derived from mice differently immunized with Claudin., Experimental Biology 2013, Apr 20-24, Boston, U.S.A.
7. Shimizu Y., Kondoh M., Watari A., Fukasawa M., Yagi K., Effect of claudin on cytochrome P450 activity., Experimental Biology 2013, Apr 20-24, Boston, U.S.A.
8. 土山遼、鈴木英彦、角谷英樹、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、Claudinを標的とした粘膜ワクチン技術の開発、第32回分子病理研究会 平成25年7月20-21日、奈良県、吉野町
9. 李相儒、近藤昌夫、渡利彰浩、八木清仁、Claudin-3 and -4 binderの体内動態解析および安全性評価、第32回分子病理研究会、平成25

年7月20-21日、奈良県、吉野町

10. 飯田愛未、鈴木英彦、李相儒、近藤昌夫、渡利彰浩、八木清仁、Claudinを標的とした粘膜吸収促進法の開発、第32回分子病理研究会、平成25年7月20-21日、奈良県、吉野町
11. 早石知浩、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、ウエルシュ菌イオタ毒素を用いた tricellular tight junction制御法の開発、第60回毒素シンポジウム、平成25年7月17-19日、兵庫県、宍粟市
12. 清水芳実、李相儒、渡利彰浩、近藤昌夫、深澤征義、多田稔、石井明子、國安弘基、八木清仁、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第3報 ～ claudin-4特異性抗体の創製～、第29回DDS学会学術集会、平成25年7月4-5日、京都市

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)
- ・ 李相儒(大学院生)
- ・ 土山遼(大学院生)
- ・ 山下真代(大学院生)
- ・ 早石知浩(大学院生)
- ・ 井口大輔(大学院生)
- ・ 畑智幸(大学院生)

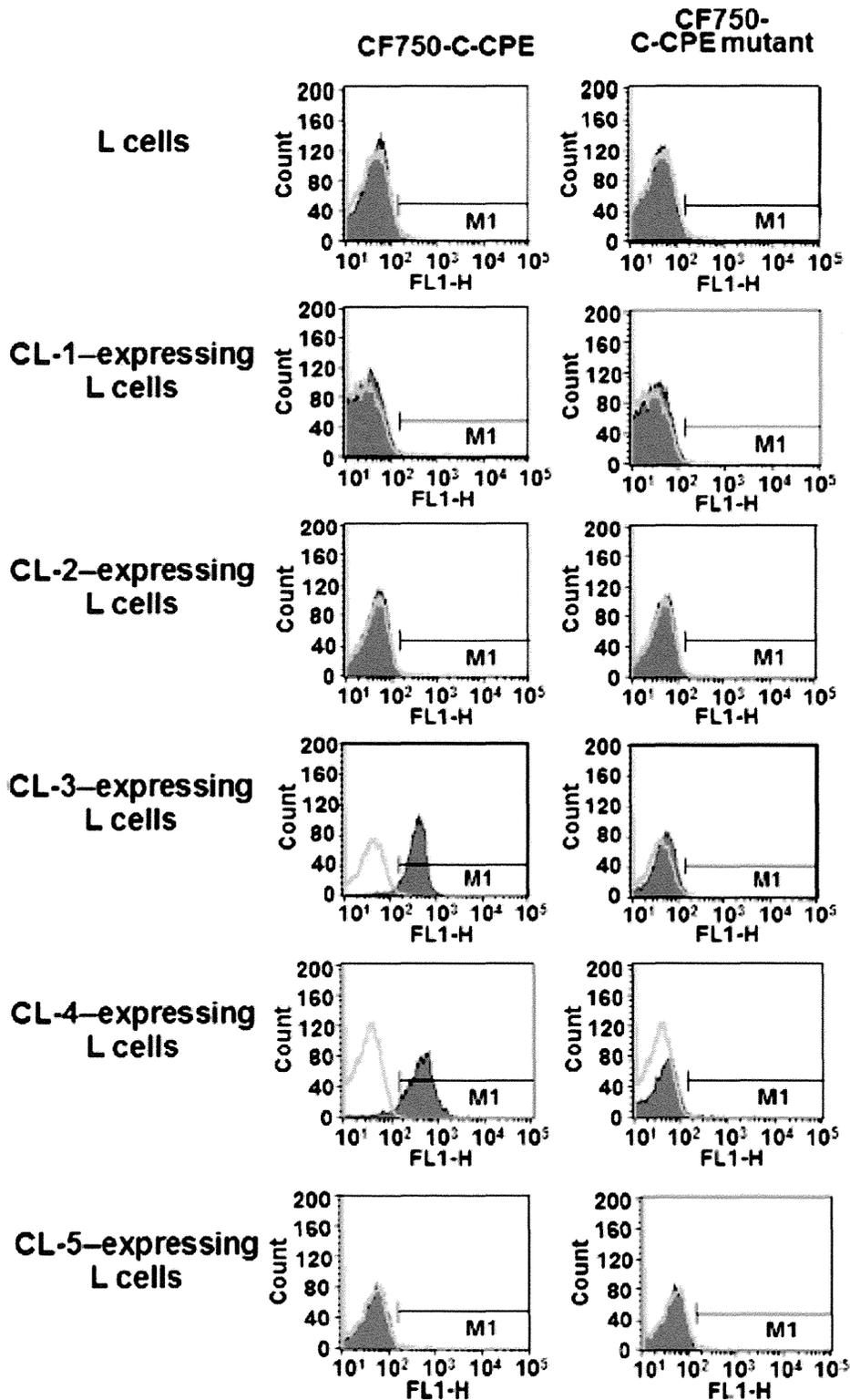


Fig. 1. Flow cytometric analysis of the interaction of claudins (CLs) with the CF750-labeled C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin (C-CPE). Mouse fibroblast L cells were incubated with 10 μ g/ml CF750-labeled C-CPE or a mutant form of C-CPE (also labeled with CF750) for 1 h and then subjected to fluorescence-activated cell sorter analysis as described in the Materials and Methods. Unfilled curves show the results obtained when cells were not treated with C-CPE proteins. Filled curves show data from C-CPE-treated cells. FL1-H indicates fluorescent intensity and M1 indicates C-CPE-bound cells.

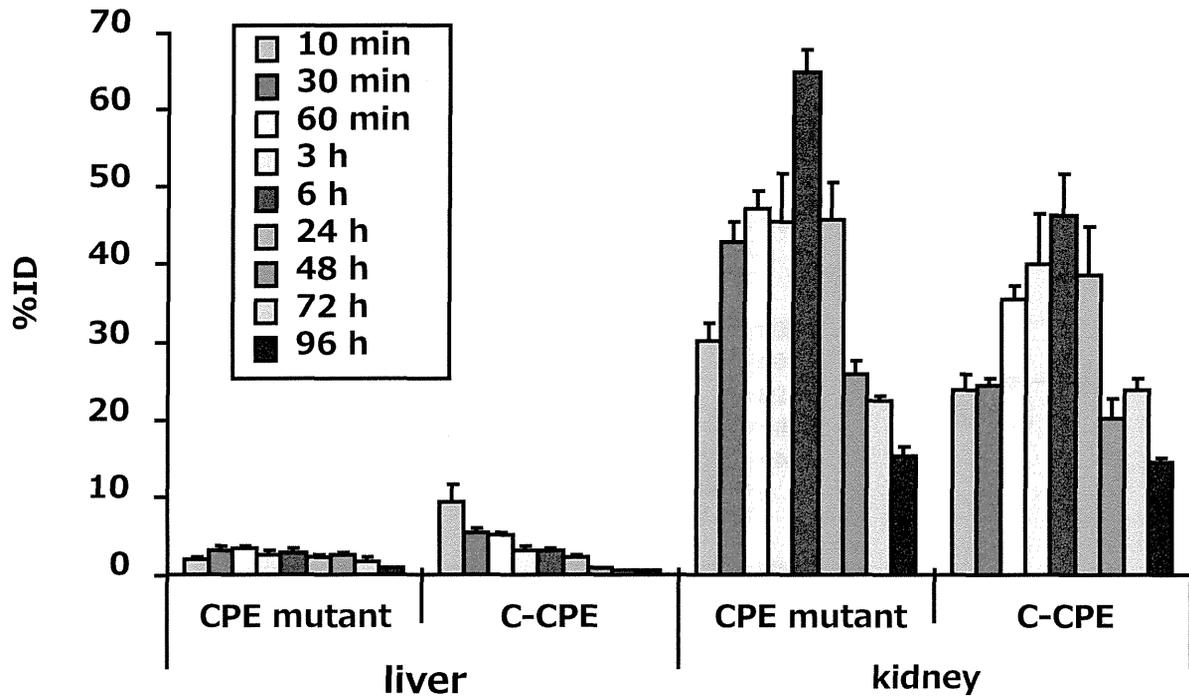


Fig. 2. *In vivo* distribution of the CF750-labeled C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE). Mice were intravenously injected with 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ CF750-labeled C-CPE or a CF750-labeled C-CPE mutant. Liver and kidney were removed at the indicated times after injection and the intensity of fluorescence of each tissue was measured. Tissue C-CPE levels were calculated as percentages of injected doses. Data are means \pm SEM (n = 5). ID, injected dose.

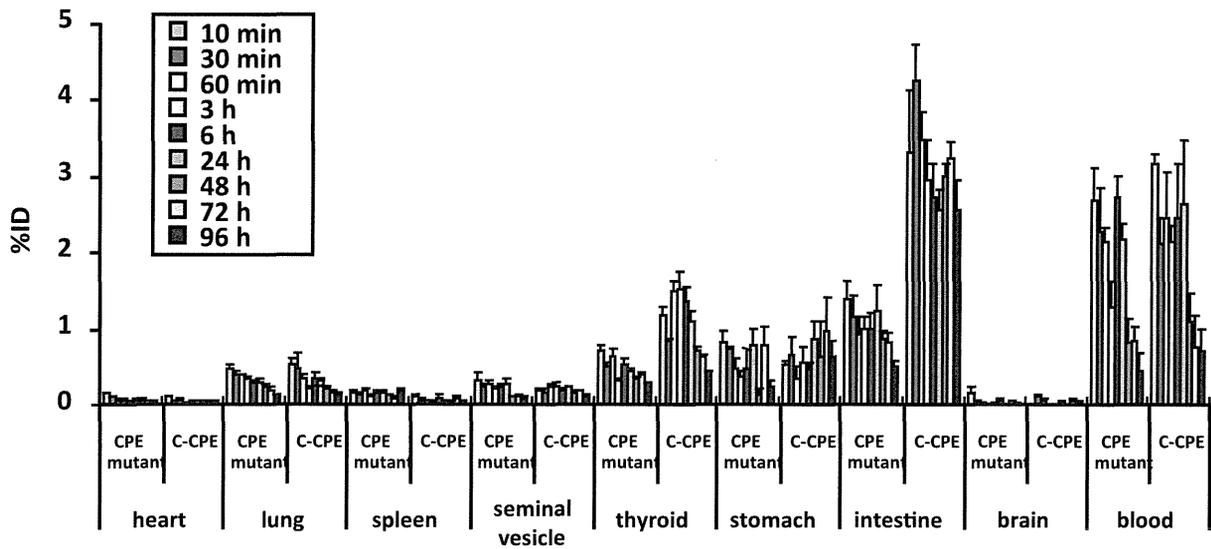


Fig. 3. The distribution of the CF750-C-CPE in mice. Mice were intravenously injected with 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ CF750-labeled C-CPE or a CF750-labeled C-CPE mutant. Heart, lung, spleen, seminal vesicle, thyroid, stomach, intestine, brain, and blood were removed at the indicated times after injection and the intensity of fluorescence of each tissue was measured. Tissue C-CPE levels were calculated as percentages of injected doses. Data are means \pm SEM ($n = 5$). ID, injected dose.

Clouidin-4 binder 修飾リポソームの作製

分担研究者 鈴木 亮 帝京大学薬学部 准教授

研究要旨

Clouidin-4 (CL-4) に親和性を有するペプチド (C-CPE) を修飾したリポソームを創製した。このリポソームの CL-4 発現細胞への特異的な結合性および *in vivo* におけるパイエル板 (PP) への移行性について評価した。その結果、CL-4 に高い親和性を持つ C-CPE 194N309A/S313A を修飾したリポソームの CL-4 発現細胞への特異的な結合を確認した。また、C-CPE 194N309A/S313A を修飾したリポソームの PP への移行を確認した。

A. 研究目的

インフルエンザ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。現行の多くのワクチンは注射による投与であり、全身免疫を誘導し、生体防御を期待したものである。しかしながら、注射によるワクチン接種法では粘膜免疫を誘導することができず、粘膜からの病原微生物の侵入を防ぐことはできない。一方、粘膜ワクチンは、粘膜免疫と全身免疫の両免疫系を賦活化することができることから、理想的な感染予防・治療法であると言える。

これまでに、当該研究者代表の渡利は、パイエル板をはじめとした粘膜免疫組織に Clouidin-4 (CL-4) が高発現していることに着目し、CL-4 binder (C-CPE) と抗原の融合たん白質を経鼻投与することで鼻・腸管粘膜面の IgA、血中 IgG 濃度が上昇することを見出し、世界に先駆けて CL-4 binder を利用した経鼻粘膜ワクチン技術の開発に成功している。

経鼻ワクチンでは抗原分子の脳内移行の危険性があることから、患者の生活の質 (QOL) およびワクチン活性を考慮すると経口ワクチンが理想的なワクチンである。しかし、精製ワクチン抗原単独を経口投与しても、種々の消化酵素や粘膜を覆う粘液による物理的障壁の影響により、腸管粘膜免疫組織パイエル板 (PP) へ抗原を効率よく送達することが困難なことから期待した

ような抗原特異的な粘膜免疫を誘導することは難しい。これらの問題を克服する試みとして、安全でかつ強力な粘膜免疫誘導が可能な粘膜アジュバントの開発や確実に抗原を誘導組織に送達するデリバリーデバイスの開発が望まれている。

これまでに我々は、脂質二重膜からなる閉鎖小胞であるリポソームを用いた薬物デリバリー技術の開発を行ってきた。がん細胞に標的指向性を持つ分子を修飾したリポソームを調製することで、がん細胞選択的に薬物を送達可能であることを明らかとしている。これらの技術を発展させ、抗原封入型 CL-4 binder 修飾リポソームを開発することで、抗原の消化酵素による分解の回避、PP への抗原の効率的なデリバリーが可能になると考えられ、経口粘膜ワクチンの開発につながると期待される。

本年度は、複数の CL-4 binder 修飾リポソームを調製し、CL-4 発現細胞への特異的な結合について検討した。また、調製したリポソームの *in vivo* における PP への移行性について検討した。

B. 研究方法

1. C-CPE (CL-4 binder) について

本実験ではアミノ酸配列の異なる2種類の C-CPE を使用した。C-CPE306A/L315A は CL-4 に結合性を示さないコントロールペプチドである。C-CPE

194N309A/S313A は、CL-4 に特異的に結合するペプチドである。

2. C-CPE 修飾リポソームの調製 (エタノールインジェクション法)

1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) : Cholesterol : N-(Carbonyl-methoxypoly ethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE-PEG2k-OMe) : 3-(N-succinimidylxyglutaryl) aminopropyl, poly ethyleneglycol (2k)-carbonyl distearoylphosphatidyl-ethanolamine (DSPE-PEG2k-NHS) = 63 : 31 : 5 : 1 (モル比) の脂質をエタノール 100 μ L に溶解した。この脂質エタノール溶液を 1 mL の PBS 溶液にボルテックスミキサーによる攪拌下で注入しリポソームを作製した。このリポソームに C-CPE を C-CPE : DSPE-PEG2k-NHS = 1 : 10 となるように混合し、4°C で一晩反応させ C-CPE306A/L315A, C-CPE 194N309A/S313A 1 をリポソーム表面に修飾した。未反応のポリペプチドは超遠心操作により除去し、その後、9%スクロース溶液で置換し凍結乾燥を行った。

3. C-CPE 修飾リポソームの調製 (ハイドレーション法)

1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) : Cholesterol : N-Glutaryl-L- α -phosphatidyl ethanolamine, Distearoyl. (DSPE-Glu) = 63.3 : 31.5 : 5 (モル比) の脂質をクロロホルムに溶解し、NBD で蛍光ラベルした Dipalmitoylphosphatidylethanolamine (NBD-PE) を総脂質量の 1% (モル比) となるように添加した。溶媒を約 60°C の水浴上でロータリーエバポレーターにより減圧留去し、1.5 時間乾燥させ、lipid film を調製した。10 mM MES buffer で再懸濁し、凍結融解を 5 回繰り返す、extrusion 法で平均粒子径を約 150 nm にした。このリポソームに N-hydroxysulfosuccinimide、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide を加え、DSPE-Glu を活性化した。C-CPE を C-CPE : DSPE-Glu = 1 : 20 となるように混合し、4°C で一晩反応させ、C-CPE306A/L315A, C-CPE 194N309A/S313A をリポソームに修飾した。未反応のペプチドは超遠心操作により除去し、その後、9%スクロース溶液で置換し凍結乾

燥を行った。

4. C-CPE 修飾リポソームの CL-4 発現細胞への結合性評価 (フローサイトメトリー)

マウス繊維芽細胞 (L 細胞) および Claudin-1 (CL-1) もしくは CL-4 遺伝子を導入し CL-1, CL-4 を発現させた L 細胞 (L-CL-1, L-CL-4) にそれぞれ C-CPE 修飾リポソームを添加し、4°C で 1 時間、作用させた。細胞を洗浄後、細胞とリポソームの結合をフローサイトメトリーにより評価した。

5. C-CPE 修飾リポソームの CL-4 発現細胞への特異的な結合性評価 (競合阻害実験、フローサイトメトリー)

L-CL-4 細胞に C-CPE 194N309A/S313A ペプチドを添加した。その後、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームを添加し、4°C で 1 時間、作用させた。細胞を洗浄後、細胞とリポソームの結合をフローサイトメトリーにより評価した。

6. C-CPE 修飾リポソームの PP への移行性評価 (ホールマウント、共焦点顕微鏡)

Balb/c マウス (雌, 6 週齢) の十二指腸に Rhodamine により蛍光標識した C-CPE 修飾リポソームを投与した。2 時間後、PP を回収し、FITC 標識 UEA1 (Ulex eruogaeus agglutinin-1) により M 細胞を染色した。封入後、共焦点顕微鏡による Z-stack 解析を行った。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

1. リポソームにペプチドやタンパク質を修飾するために、N-ヒドロキシスクシンイミドを用いた活性エステルを介した方法が知られている。この原理は、活性化されたカルボン酸とアミンの反応によるアミド結合の生成である。しかしながら、この活性エステルは水溶液中で速やかに加水分解されてしまう。そのため、活性エステルを含む DSPE-PEG2k-NHS を構成成分とするリポソームを短時間で調製し

C-CPE ペプチドと反応させることが必要となる。そこで、短時間でリポソームを調製可能なエタノールインジェクション法を用い C-CPE 修飾リポソームを調製し、L-CL-4 細胞との結合性をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、ペプチド未修飾リポソームおよび C-CPE306A/L315A 修飾リポソーム処理群と比較し、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソーム処理群において、高い蛍光強度が認められた (Fig. 1)。この結果から、C-CPE ペプチドは活性エステルを介しリポソームの PEG 末端に修飾されていると考えられる。また、調製したリポソームの粒子径を動的散乱法により測定したところ、いずれのリポソームにおいても、粒子径は 150 nm 程度であった (Table. 1)。

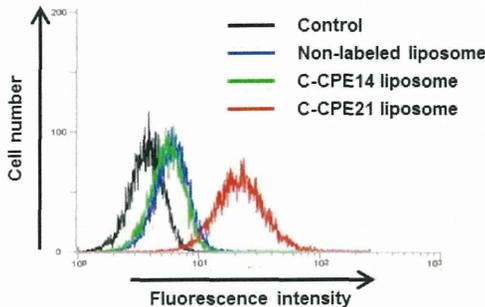


Fig. 1. C-CPE 修飾リポソームの L-CL-4 細胞への結合評価
L-CL-4 細胞に NBD 標識した C-CPE 修飾リポソームを添加し、4℃、1 時間培養した。その後、細胞の蛍光をフローサイトメトリーにより測定した。

Liposome	Particle size
Non-labeled	119.6 nm
C-CPE14	146.2 nm
C-CPE21	166.6 nm

Table 1. C-CPE 修飾リポソームの粒子径

- C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームと L-CL-4 細胞との競合阻害実験を行った。その結果、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソーム処理群で認められた蛍光強度の増大は、C-CPE 194N309A/S313A ペプチドを処理することにより顕著に減弱した (Fig. 2)。このことから、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームは C-CPE 194N309A/S313A を介して L-CL-4 細胞と特異的に結合していることが示唆された。

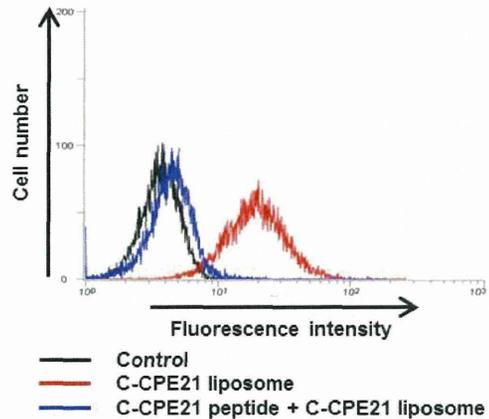


Fig. 2. 競合阻害実験
L-CL-4 細胞に C-CPE 194N309A/S313A ペプチドおよび NBD 標識した C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームを添加し、4℃、1 時間培養した。その後、細胞の蛍光をフローサイトメトリーにより測定した。

- リポソーム内にたん白質等の高分子を封入する方法として凍結乾燥復水法が知られている。これはリポソームを凍結乾燥し、高分子溶液で復水することで、膜の再構成に伴い効率的に高分子がリポソーム内に封入される方法である。凍結乾燥および復水操作により、リポソームの構造変化や C-CPE ペプチドの活性の減弱が起こる可能性がある。そこで、C-CPE 修飾リポソームを凍結乾燥し、復水操作を行った後、リポソームの粒子径および L-CL-4 への結合性を評価した。その結果、調製したリポソームの粒子径は 150-200 nm 程度であった (Table. 2)。また、フローサイトメトリーによる測定を行ったところ、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソーム処理群における蛍光強度の増大は認められなかった (Fig. 3)。この結果から、調製した C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームは凍結乾燥操作により構造変化を起こし、L-CL-4 細胞との結合性を消失したと考えられる。そのため、抗原封入 C-CPE 修飾リポソームを創製するにあたり、エタノールインジェクション法を用いたリポソーム製剤は利用できないと考えられる。

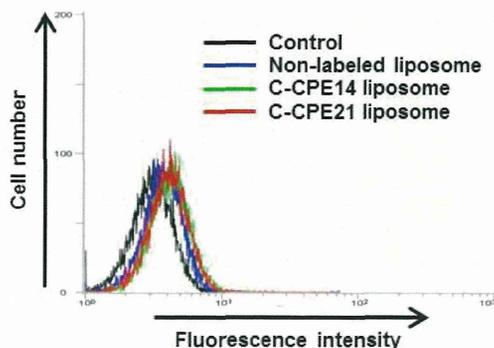


Fig. 3. 凍結乾燥後の C-CPE 修飾リボソームの L-CL-4 細胞への結合評価

L-CL-4 細胞に凍結乾燥後の NBD 標識した C-CPE 修飾リボソームを添加し、4℃、1 時間培養した。その後、細胞の蛍光をフローサイトメトリーにより測定した。

Liposome	Particle size
Non-labeled	193.5 nm
C-CPE14	170.5 nm
C-CPE21	155.1 nm

Table 2. 凍結乾燥後の C-CPE 修飾リボソームの粒子径

4. エタノールインジェクション法を用いて調製した C-CPE 修飾リボソームは凍結乾燥後に L-CL-4 細胞との結合性を示さなかった。この原因の一つとしてエタノールの存在が考えられる。そこで、エタノールを使用しないハイドレーション法を用いた C-CPE 修飾リボソームの調製を行い、L-CL-4 細胞との結合性をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、ペプチド未修飾リボソームおよび C-CPE306A/L315A 修飾リボソーム処理群と比較し、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リボソーム処理群において蛍光強度の増大が認められた (Fig. 4)。また、凍結乾燥および復水操作後のリボソームと L-CL-4 細胞との結合性を評価したところ、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リボソーム処理群において高い蛍光強度が認められた (Fig. 4)。しかしながら、凍結乾燥前と凍結乾燥後を比較すると、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リボソームの L-CL-4 への結合性は若干減弱した (Fig. 4)。これらの結果から、ハイドレーション法により調製した C-CPE 修飾リボソームは凍結乾燥操作による影響を受けるものの、CL-4 に対して結合性を示すことが明らかとなった。今後、C-CPE 修飾リボソームの調製法の最適化、詳細な抗原封入率、抗原封入

リボソームの CL-4 との結合性を検討する予定である。

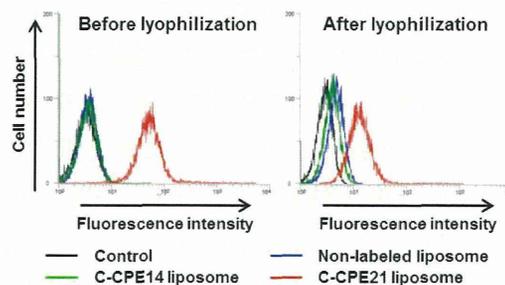


Fig. 4. C-CPE 修飾リボソームの L-CL-4 細胞への結合に及ぼす凍結乾燥操作の影響

凍結乾燥前および凍結乾燥後の NBD 標識した C-CPE 修飾リボソームを L-CL-4 細胞に添加し、4℃、1 時間培養した。その後、細胞の蛍光をフローサイトメトリーにより測定した。

5. C-CPE 194N309A/S313A 修飾リボソームと L-CL-4 細胞との結合が C-CPE 194N309A/S313A を介したものであるか評価するため、競合阻害実験を行った。その結果、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リボソーム処理群で認められた蛍光強度の増大は、C-CPE 194N309A/S313A ペプチドを処理することにより顕著に減弱した (Fig. 5)。このことから、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リボソームは C-CPE 194N309A/S313A を介して L-CL-4 細胞と特異的に結合していることが示唆された。

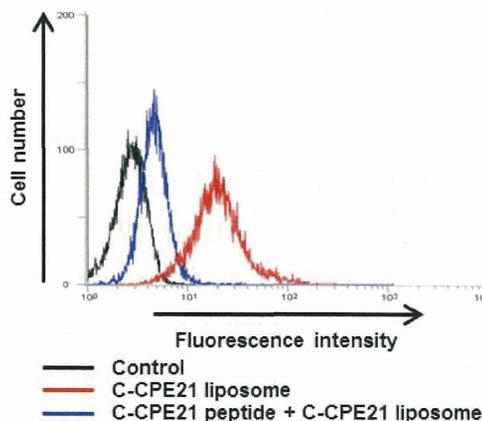


Fig. 5. 凍結乾燥後の C-CPE 修飾リボソームにおける競合阻害実験

凍結乾燥後の NBD 標識した C-CPE21 修飾リボソームおよび C-CPE21 ペプチドを L-CL-4 細胞に添加し、4℃、1 時間培養した。その後、細胞の蛍光をフローサイトメトリーにより測定した。

6. C-CPE 194N309A/S313A 修飾リボソームの CL-4 との特異的な結合を評価するため、L 細胞、

L-CL-1 細胞および L-CL-4 細胞においてリポソームの結合性をフローサイトメトリーにより検討した。その結果、L-CL-4 細胞ではペプチド未修飾リポソームおよび C-CPE306A/L315A 修飾リポソーム処理群と比較し、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソーム処理群において、高い蛍光強度が認められた (Fig. 6)。L 細胞および L-CL-1 細胞では、いずれのリポソーム処理群においても顕著な蛍光強度の増大は認められなかった (Fig. 6)。これらの結果から、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームは CL-4 発現細胞と特異的に結合することが明らかとなった。

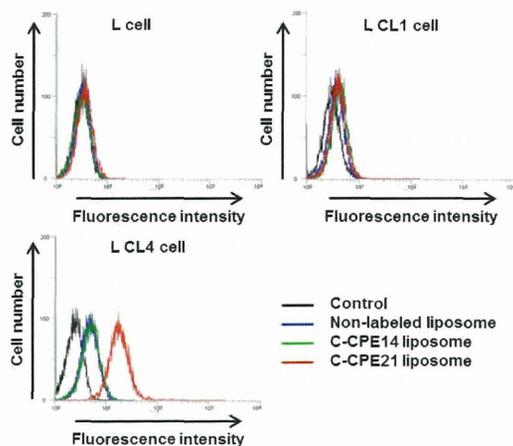


Fig. 6. C-CPE 修飾リポソームの CL-4 発現細胞への結合評価

L、L-CL-1、L-CL-4 細胞に NBD 標識した C-CPE 修飾リポソームを添加し、4℃、1 時間培養した。その後、細胞の蛍光をフローサイトメトリーにより測定した。

7. C-CPE 修飾リポソームにより PP へ抗原を効率的にデリバリー可能か評価するにあたり、C-CPE 修飾リポソームの PP への移行性を評価した。その結果、Rhodamine 標識した C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームの蛍光が PP で認められた。また、M 細胞を染色した緑色の蛍光と C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームの赤色の蛍光が一部重なっていることを確認した (Fig. 7)。今後、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームの調製法を最適化し、PP への移行率を評価する予定である。

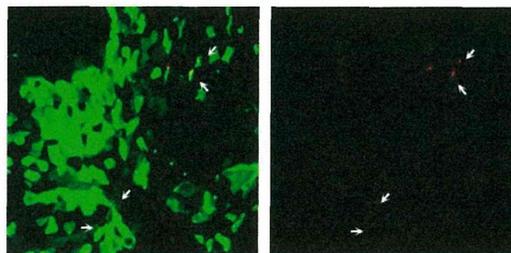


Fig. 7. C-CPE 修飾リポソームの PP への移行性評価

Rhodamine 標識 C-CPE 194N309A/S313A リポソームを十二指腸より投与し、2 時間後、PP を回収した。FITC 標識 UEA1 により M 細胞を染色し、共焦点顕微鏡による Z-stack 解析を行った。(緑 : M 細胞、赤 :

E. 結論

CL-4 binder を修飾したリポソーム経口ワクチンの開発に向けた基礎的な検討を行った。樹状細胞やマクロファージに効率的に抗原をデリバリーするために、PEG を修飾していない粒子径約 150 nm の CL-4 binder 修飾リポソームを調製した。抗原封入のための凍結乾燥復水操作によるリポソームの粒子径への影響は少ないことが明らかとなった。また、凍結乾燥後も CL-4 binder (C-CPE 194N309A/S313A) 修飾リポソームは CL-4 発現細胞に特異的に結合することを確認し、一部パイエル板へも移行することを共焦点顕微鏡による検討から明らかとした。今後、OVA 封入効率の最適化、CL-4 binder 修飾率の最適化検討を進め、*in vivo*での PP への抗原デリバリー、抗体産生について評価していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G-1 論文発表

1. Sugano M, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Hamano N, Usui M, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Yamamoto M.: Gene delivery to periodontal tissue using Bubble liposomes and ultrasound. J. Periodontal Res., *in press*.
2. Hagiwara K, Nishioka T, Suzuki R, Maruyama K, Takase B, Ishihara M, Kurita A, Yoshimoto N, Nishida Y, Iida K, Luo H, Siegel RJ.: Thrombus-targeted perfluorocarbon-containing

- liposomal bubbles for enhancement of ultrasonic thrombolysis: in vitro and in vivo study. *J. Thromb. Haemost.*, 11: 1565-1573 (2013).
3. Sawaguchi Y, Hirata K, Suzuki R, Utoguchi N, Maruyama K.: Suppression of murine collagen-induced arthritis by vaccination of synovial vascular endothelial cells. *Life Sci.*, 92:1125-1130 (2013).
 4. Negishi Y, Tsunoda Y, Hamano N, Omata D, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y.: Ultrasound-mediated gene delivery systems by AG73-modified bubble liposomes. *Peptide Sci.*, 100: 402-407 (2013).
 5. Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Nakamura A, Suzuki D, Ukai S, Sugimoto K, Moriysasu F, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y.: pDNA-loaded Bubble liposomes as potential ultrasound imaging and gene delivery agents. *Biomaterials*, 11: 2807-2813 (2013).
 6. Hamano N, Negishi Y, Omata D, Takahashi Y, Manandhar M, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y.: Bubble liposomes and ultrasound enhance the antitumor effects of AG73 liposomes encapsulating antitumor agents., *Mol. Pharm.*, 10: 774-779 (2013).
 7. Negishi Y, Hamano N, Tsunoda Y, Oda Y, Chojiamts B, Endo-Takahashi Y, Omata D, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Emoto M, Aramaki Y.: AG73-modified Bubble liposomes for targeted ultrasound imaging of tumor neovasculature., *Biomaterials*, 34: 501-507 (2013).
 2. 小田雄介、鈴木 亮、小俣大樹、澤口能一、宇留賀仁史、関むつみ、根岸洋一、川上茂、樋口ゆり子、橋田充、丸山一雄、バブルリポソームの安定性におよぼす脂質組成の影響、第 29 回日本 DDS 学会学術集会、京都、2013 年 7 月 4-5 日
 3. Daiki Omata, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Yoshikazu Sawaguchi, Yoichi Negishi, Kazuo Maruyama, Targeted gene delivery in liver by bubble liposomes and ultrasound, CRS Annual Meeting 2013, Honolulu, 2013 年 7 月 21-24 日
 4. Yusuke Oda, Ryo Suzuki, Daiki Omata, Yoshikazu Sawaguchi, Yoichi Negishi, Kazuo Maruyama, Brain Specific Gene Delivery by Bubble Liposomes and Ultrasound, CRS Annual Meeting 2013, Honolulu, 2013 年 7 月 21-24 日
 5. 関むつみ、小田雄介、鈴木 亮、小俣大樹、澤口能一、岡田直貴、中川晋作、丸山一雄、バブルリポソームによる樹状細胞への超音波抗原送達法における抗原提示経路の解析、遺伝子・デリバリー研究会第 13 回シンポジウム、東京、2013 年 5 月 11 日
 6. 宇留賀仁史、小俣大樹、小沼俊也、鈴木 亮、小田雄介、関むつみ、直井智幸、澤口能一、根岸洋一、丸山一雄、超音波を利用した脳への遺伝子導入に関する基礎的検討、遺伝子・デリバリー研究会第 13 回シンポジウム、東京、2013 年 5 月 11 日
 7. 石川 舞、小田雄介、宇留賀仁史、鬼塚沙也加、鈴木 亮、小俣大樹、関むつみ、直井智幸、澤口能一、根岸洋一、丸山一雄、構成脂質の異なるバブルリポソームを用いた超音波遺伝子導入特性の評価、遺伝子・デリバリー研究会第 13 回シンポジウム、東京、2013 年 5 月 11 日
 8. 竹澤知明、小俣大樹、鈴木 亮、小田雄介、関むつみ、直井智幸、澤口能一、根岸洋一、丸山一雄、超音波を利用した肝臓特異的遺伝子導入に関する基礎的検討、遺伝子・デリバリー研究会第 13 回シンポジウム、東京、2013 年 5 月 11 日

G-2 学会発表

1. 小俣大樹、鈴木 亮、小沼俊也、小田雄介、澤口能一、宇留賀仁史、関むつみ、直井智幸、根岸洋一、丸山一雄、バブルリポソームと超音波による脳選択的遺伝子導入法の開発、第 29 回日本 DDS 学会学術集会、京都、2013 年 7 月 4-5 日