

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18701

研究課題名(和文) 酵素合成リグニンポリマーを応用した非侵襲性新規免疫アジュバントの開発

研究課題名(英文) The development of non-invasive new immune adjuvant using enzymatically synthesized-lignin polymer

研究代表者

山中 大輔 (Yamanaka, Daisuke)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70734599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：リグニンはフェニルプロパノイド類が重合した芳香族ポリマーであり、ヘミセルロース、セルロースと共に植物細胞壁を構成している。腸内環境を整える食物繊維としても知られている一方で、ペルオキシダーゼを用いて作製した可溶性合成リグニンは強力な免疫賦活活性を示すことが明らかとなっている。これを新たな免疫アジュバント素材として応用できるか否か、リグニン-抗原複合体の作製を試み、マクロファージなどの細胞への輸送およびマウス投与時の抗体産生誘導活性について詳細に解析した。

研究成果の概要(英文)：Lignin is the aromatic biopolymer composed by phenylpropanoids and constitutes the plant cell walls together with hemicellulose and cellulose. It is also known as the dietary fiber that regulates the intestinal environment, and soluble synthetic lignin prepared by peroxidase has been shown to exhibit immunoenhancing activity. To evaluate whether the lignin polymer could be applied as a novel immunoadjuvant material or not, a lignin-antigen complex was synthesized and analyzed the transport of the lignin-antigen complex to macrophages and the antibody-producing activity in the mouse.

研究分野：食品免疫学

キーワード：リグニン 抗原リグニン複合体 DDS 抗原特異的IgE

### 1. 研究開始当初の背景

(1) リグニンフェニルプロパノイド類がランダムに重合した芳香族ポリマーであり、ヘミセルロース、セルロースと共に植物細胞壁を構成している。難消化性であり腸内環境を整える食物繊維としても知られている。これまでにフェニルプロパノイド類(カフェ酸、フェルラ酸、クマル酸)とペルオキシダーゼを用いて可溶性合成リグニンを作製し、マウスを用いた解析によって、リグニン類に強力な免疫賦活活性があることが証明された。また、マウスに経口投与することでNK細胞活性を上昇させ、移植した同系腫瘍に対し抵抗性を向上させることが明らかとなった。さらに、リグニンにより産生誘導されるサイトカイン種を網羅的に解析した結果IL-4、IL-13、eotaxin、RANTESなどのアレルギー関連因子の産生はほとんど認めず、IL-2やIFN- $\gamma$ を誘導し、MHC classIIの発現を有意に上昇させたことから、Th1応答の誘導に特化した新規アジュバント素材として応用可能であると考へた。

(2) 生活環境の変化に伴い、アレルギー疾患を有する割合が上昇している。機能性表示食品制度が開始され、食品による健康維持が推奨される現代において、特に食物アレルギーは解決すべき大きな課題の一つとされている。現在、食物アレルギーの治療は原因療法として行う食事療法と、出現した症状に対する対症療法が行われている(診療ガイドライン2012)。また一部の医療機関では減感作療法による対処法が取られているが、現状多くの患者は未治療のままである。2014年10月より、鳥居薬品からスギ花粉症用に花粉舌下液が発売され、一部のアレルギーに対する減感作療法は現実された。食物アレルギーに対する減感作療法では、アレルギー特異的IgGの産生を促し、Fc $\epsilon$ Rを介したアレルギー反応を減弱させているが、Th1誘導アジュバントの選択性が乏しいこと、副作用として全身性アナフィラキシー反応が起り得ること、侵襲的な抗原投与による長期プロトコルが主流であることから、広範囲に浸透しているとはいえない。従って食物アレルギー根治のため、副作用のリスクを排除し、簡便で効率的に中和抗体(IgG)を誘導できる新規システムが必要である。

(3) これまでの解析でリグニン類は短時間で効率よくマクロファージによって取り込まれることを確認している。また、リグニンポリマー内に機能性ペプチドや低分子量蛋白質などを組込むことに成功している。そこでリグニン類の難消化性・免疫賦活性といった特徴を活用し、粘膜経路で抗原提示細胞へ効率良くアレルギー、薬剤、遺伝子等を輸送するための経鼻/経口-ドラッグデリバリーシステム(DDS)への応用を構想し、新規免疫アジュバント並びにDDSとしての特許取得

を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究では、以下の2つの目標項目を設定し、リグニンで被覆したアレルギーの輸送ならびに抗原特異的IgG誘導作用について解析する。

(1) リグニン-抗原複合体の作製及びマクロファージへの輸送評価

モデル抗原として一般に使用されるChicken ovalbumin(OVA)及びOVAペプチドを選択し、可溶性リグニン様ポリマーと複合体を形成させ、食細胞によって取り込まれるか否か明らかとする。

(2) リグニン-抗原複合体の経鼻/経口投与による抗原特異的抗体産生誘導レベルの評価

本研究期間内では、リグニン-抗原複合体における、抗原特異的IgEとの結合活性を検討し、アナフィラキシー等の副作用のリスクを評価する。またマウスへ投与することによるアレルギー特異的IgG産生誘導レベルを解析し、リグニン類の免疫アジュバント活性を評価する。

### 3. 研究の方法

(1) リグニン-抗原複合体の作製

Caffeic acid(CA)(TCI社製)を西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)(SIGMA社製)と混合し、希釈した過酸化水素溶液を滴下し、得られた重合体をpolymerized(p)CAとした。OVA 257-264ペプチド(必要に応じ、チロシンまたはHisタグを各末端に修飾)またはOVAを予めCAと混合しておき、同様に重合させたものをそれぞれOVAペプチド-リグニンポリマー複合体、OVA-リグニンポリマー複合体とした。また、重合反応後に抗原を添加したものを同様に作成し、リグニン-抗原MIXとした。同様に、リグニン前駆体誘導体であるFerulic acid(FA)及び*trans-p*-Coumaric acid(CoA)(TCI社製)を用いて複合体形成を試みた。反応終了時には加熱によりHRPを失活させ、各サンプルの可溶性画分を回収し、凍結乾燥させた。SDS-PAGEによって、抗原の分子量の変化を解析した。

(2) リグニン-抗原複合体のマクロファージへの輸送評価

上記のpCA、OVA、リグニン-抗原複合体、リグニン-抗原MIXをマウスマクロファージ株であるRAW264細胞へ添加し、37度で一晩培養した。培養後に細胞の固定、メタノールによる透過処理を行い、細胞内OVAを市販のOVA特異的抗体及び蛍光標識2次抗体を用いて染色し、蛍光顕微鏡下でマクロファージ細胞内へのOVA取り込みレベルを観察した。

(3) リグニン-抗原複合体の分解性評価

リグニン類は自然免疫活性化作用を示すため、マクロファージへのリグニン-抗原複合

体輸送後に、複合体は細胞内で産生された活性酸素種による影響を受けることが予想された。そこで上記の pCA、OVA、リグニン-抗原複合体、リグニン-抗原 MIX を過酸化水素により処理し、ELISA ならびに Western blotting を用いて抗原性(特異的抗体との結合性)を解析した。

(4) リグニン-抗原-複合体形成によるアレルギー反応性への影響

作成したリグニン-抗原複合体及びリグニン-抗原 MIX について、抗原特異的 IgE との結合性を ELISA によって評価した。さらに、抗 OVA-IgE による抗原抗体複合体と、肥満細胞及び好塩基球細胞膜状に発現する FcεR を介した脱顆粒反応誘導活性を評価するため、ラット好塩基球細胞である RBL-2H3 に各サンプル及び抗原特異性 IgE を添加し、培養後に誘導されたヒスタミンの放出量を LC-MS を用いて測定した。

(5) リグニン-抗原-複合体の免疫アジュバント活性評価

上記の pCA、OVA、リグニン-抗原複合体、リグニン-抗原 MIX をマウス腹腔内へ投与し、誘導される抗 OVA 抗体量を ELISA によって解析した。経口投与、及び経鼻投与のルートによっても抗原を投与し、誘導される抗原特異的抗体量を測定することで、その免疫アジュバント活性を評価した。さらに FA 及び CoA の重合産物をマウス腹腔内へ投与することにより、前駆体の違いによる免疫アジュバント活性への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) リグニン-抗原複合体の作製

HRP を用い、CA、FA、CoA などのフェニルプロパノイド類を重合させることで、リグニン様のポリマーが生成される(図1)。この重合反応時に OVA 257-264 ペプチド (Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu) および OVA を添加し、リグニン-抗原複合体を得た。これらの試験サンプル(乾燥粉末)を水に溶解して各種細菌・真菌培養用の寒天培地に塗布し、菌の混入が無いことを確認した。SDS-PAGE により解析したところ、抗原に由来するバンドの分子量が増大したことから、抗原とリグニンポリマーの複合体が形成されたことを確認した。

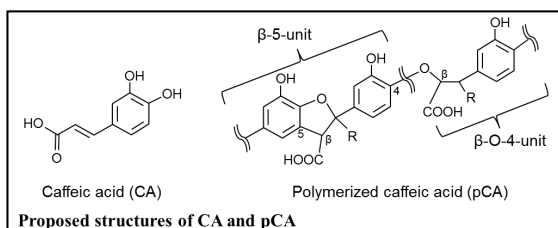


図1: 可溶性リグニン様ポリマーの基本構造

(2) リグニン-抗原複合体のマクロファージへの輸送評価

マウス由来マクロファージ様細胞株 RAW264 細胞に pCA、OVA、リグニン-抗原複合体、リグニン-抗原 MIX を加え、一晚培養を行った。細胞の固定後に透過処理を行い、抗 OVA 抗体を用いて蛍光染色することで細胞質内に OVA が存在していることを確認した。マクロファージはリグニン類を効率よく取り込むことは既に明らかにされていたが、上記の結果によって、抗原-リグニンポリマー複合体が食細胞を標的としたドラッグデリバリーシステムとして利用できる可能性が示された。

(3) リグニン-抗原複合体の分解性評価

無細胞系での抗原再放出の検討を行い、OVA-リグニンポリマー複合体を過酸化水素処理することで、処理前と比べて OVA 特異的抗体との反応性が上昇することを、ELISA ならびに Western blotting を用いて証明した。この結果は、食細胞が複合体を取り込んだ際に、細胞内で活性酸素種と反応し、抗原が再び放出される可能性が高いことを示唆している。抗体の産生誘導のみならず、抗原提示を介した TCR の活性化を目的とした、新規抗原キャリアーとしての応用の可能性が示された。

(4) リグニン-抗原-複合体形成によるアレルギー反応性への影響

本研究では、既にアレルギー疾患を発症した患者に対する抗原-リグニン複合体の応用を想定していたため、複合体形成により特異的 IgE との応答性を減弱させる効果について検討する必要があった。そこで、複合体形成後の抗原と、市販の抗原特異的抗体 (IgE) との反応性を ELISA によって評価した。IgE による抗原の反応性については主に OVA-リグニンポリマー複合体を中心とした解析を進め、リグニンポリマー複合体形成後の OVA は、抗 OVA-IgE との結合能が著しく減少することを ELISA によって確認した。続いて、抗原-リグニン複合体及び抗 OVA-IgE による FcεR を介したアナフィラキシー反応誘発能を評価するため、OVA-IgE とラット好塩基球様株 RBL-2H3 を用いた *in vitro* 脱顆粒評価系を用いて、リグニン-OVA 複合体によるヒスタミン放出誘導作用を評価した。RBL-2H3 に pCA、OVA、リグニン-OVA 複合体、リグニン-OVA-MIX を加え、抗 OVA-IgE の存在・非存在下で 30 分間培養し、上清中に含まれるヒスタミン量を LC-MS により解析した。その結果、リグニン単独添加またはリグニン・IgE 添加によってヒスタミンの放出は誘導されなかった。また OVA 単独添加、OVA・リグニン混合物添加によってヒスタミンの放出は誘導されなかったが、IgE 共存下においてヒスタミンの放出が誘導された。この結果は、リグニン類が好塩基球からヒスタミンの

放出を誘導せず、さらに抗ヒスタミン作用を示さないことを示唆している。一方、リグニン-OVA 複合体は抗 OVA-IgE との結合能が減少しているにもかかわらず、抗 OVA-IgE 存在下でヒスタミンの放出を誘導している事が明らかとなった。

#### (5) リグニン抗原-複合体の免疫アジュバント活性評価

はじめに、カフェ酸重合ポリマーである pCA (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) と OVA 抗原 (5  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) をマウスへ腹腔内投与し、リグニン類のアジュバント活性を評価した。また、重合ポリマーに対する免疫担当細胞の応答性の違いについて *in vitro* において詳細に解析した結果、C3H 系統において IFN- $\gamma$  産生などの Th1 型の応答性が高いことが明らかとなったため、一般的に使用される雌性 BALB/c マウス、雌性 C57BL/6 マウスに加え、雌性 C3H/HeJ マウス (日本 SLC) も同様に用いてアジュバント活性を比較した。投与は初日、7 日後に行い、21 日後に血清を回収し、OVA をコートした ELISA プレートを用いて抗体量を測定した。BALB/c マウスにおいて、OVA 単独投与に比べ、OVA と pCA の同時投与により OVA 特異的 IgG1 の産生が上昇した。一方、IgG2a 及び IgE の産生はほとんど認められなかった。C57BL/6 マウスにおいては、OVA と pCA の混合投与により IgG1 及び IgG2c の強い誘導が認められ、IgE の誘導は確認されなかった。また、C3H/HeJ マウスにおいて、pCA と OVA の投与によって IgG1 の弱い産生誘導が生じ、IgG2a の強い産生誘導が認められたのに対し、IgE はほとんど誘導されなかった。これらの結果から、カフェ酸ポリマーがマウスに対してアジュバント活性を示すことが明らかとなった。また、Th1 型の抗体産生誘導が生じる場合 (C3H/HeJ など) と、Th2 型の抗体が産生される場合 (BALB/c など) があり、マウスの系統によってリグニン類の *in vivo* における応答性が異なることが示唆された。

続いて、リグニン抗原-複合体をマウスに連続して経口摂取させ、血清中の OVA 特異的抗体の誘導量を ELISA により測定した結果、十分に抗体を誘導することは出来なかった。そこで、非侵襲的な投与ルートとして経鼻投与を選択し、pCA、OVA、リグニン-OVA 複合体、リグニン-OVA-MIX を麻酔下の雌性 BALB/c または C3H/HeN マウス (日本 SLC) へ 10  $\mu\text{L}$  ずつ投与 (初日、7 日目、14 日目の 3 回、または初日、7 日目の 2 回) した。BALB/c マウスにおける 3 回の経鼻投与を行った検討において、OVA (5  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) 単独投与と比べて、pCA (100  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) 混合投与では初回投与から 21 日目の血清中の抗 OVA-IgG (IgG1 及び IgG2a) および肺洗浄液中の抗 OVA-IgG、IgA などの産生が有意に上昇していた。これらの結果は、リグニン類が経鼻投与によって粘膜アジュバントとしての作用

を持つことを示唆している。また、C3H/HeN マウスにおいて 2 回の経鼻投与を行った検討では、主にリグニン-OVA 複合体及びリグニン-OVA-MIX による抗原特異的抗体の産生誘導作用について評価した。初回投与から 21 日目の血清中抗 OVA 抗体は、リグニン-OVA 複合体及びリグニン-OVA-MIX 投与群において IgG (IgG1 及び IgG2a) の産生誘導が認められた (図 2A)。両群を比較すると、複合体では混合投与と比べてわずかに産生誘導量が低いものの、特異的抗体を誘導可能であることが明らかとなった。同様の傾向は C3H/HeN マウスへの腹腔内投与においても確認されており (より強い抗体産生量が認められている) pCA と抗原の複合体に、抗体産生誘導作用があることが証明された (図 2B)。

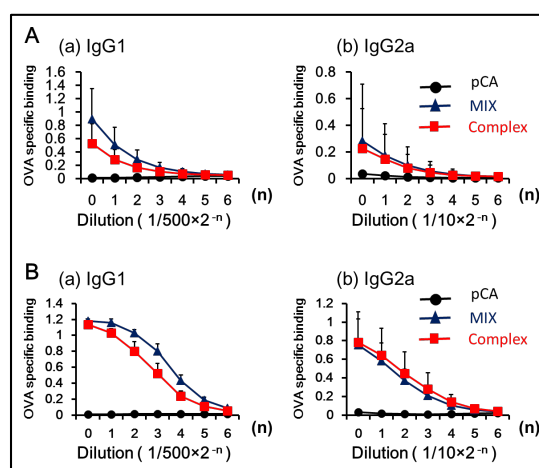


図 2: pCA ポリマーによる抗体産生誘導作用  
A は経鼻投与、B は腹腔内投与後の結果を示している。

CA 以外のリグニンプレカーサー類を用いて重合させたポリマーについてもこれまでと同様に評価した。FA 及び CoA を用いて作成した OVA-リグニン複合体も、CA と同様に OVA 抗原との複合体を形成することを SDS-PAGE により確認した。また、いずれも抗 OVA 抗体との結合活性が低下していることが確認されたが、CA と比較して顕著な差は得られなかった。一方、pFA-OVA 複合体及び pCoA-OVA 複合体によるマクロファージ様細胞株 (RAW264) への OVA 抗原の輸送も、抗 OVA 抗体を用いた蛍光染色により確認された。これら FA 及び CoA 由来のリグニン様ポリマーの免疫アジュバント活性を比較するため、OVA と共に C57BL/6 及び BALB/c マウス腹腔内へ投与し (初日、7 日目の 2 回) 21 日目の血清中抗 OVA 抗体量を ELISA により測定した。結果、pFA 及び pCoA においても pCA と同様に抗原特異的 IgG (IgG1 及び IgG2a) の強い産生が認められ、その一方で IgE の産生は認められなかった。プレカーサーの種類によってアジュバント活性に若干の差は生じたものの、顕著な違いはなかった。

## (6) 研究成果のまとめ

本研究では、食品に由来する分子によって安全性の高い新規粘膜アジュバントを開発することを目標としたが、既にアレルギー疾患を発症している患者にも応用可能で、かつ注射を用いない非侵襲的な使用方法を検討した。抗原とリグニンポリマーの複合体形成は、混合のタイミング等に改良を加えることで比較的IgE結合活性の低い複合体の作成が可能となった。一方で、プレカーサーの種類を変更しても、抗体による抗原認識の抑制レベルに顕著な差は認められなかった。これらの複合体をアレルギーモデルマウスへ投与する前に、RBL-2H3を用いてヒスタミン産生量を解析した結果、抗体との結合力が低下しているにもかかわらず、ヒスタミン産生量を有意に減少させることは出来なかった。アレルギーによる副作用を完全に回避させるためには、抗原とポリマーの複合体形成方法を今後さらに詳細に検討する必要がある。一方、いずれの複合体もマクロファージに効率よく取り込まれていたことから、粘膜の抗原提示細胞への抗原輸送用キャリアーとして機能する可能性が示唆された。実際に、リグニン様ポリマーそのものに抗体産生誘導を促進するアジュバント活性が認められ、さらに非侵襲的な経鼻投与によっても粘膜アジュバント活性があることが明らかとなった。これらの作用は複合体の投与によっても同様に認められたことから、呼吸器感染症などを標的とした粘膜アジュバントとしての応用が考えられた。ポリマー作成に関与する分子は、いずれも食品中の成分であり、変異原性も認められず、安全性は高いと考えられる。本研究で得られた結果から、抗原分子や薬剤のキャリアーとして、リグニンポリマーのさらなる応用に向けた可能性を示すことが出来た。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Daisuke Yamanaka, Ken-ichi Ishibashi, Yoshiyuki Adachi, Naohito Ohno  
Species difference in reactivity to lignin-like enzymatically polymerized polyphenols on interferon- $\gamma$  synthesis and involvement of interleukin-2 production in mice.  
*International Immunopharmacology*. (2016) 38:443-449. (査読有)

### 〔学会発表〕(計6件)

富岡太一、山中大輔、石橋健一、安達禎之、大野尚仁：  
マウスマクロファージによるリグニン標識ビーズ取り込み機構の解析  
日本薬学会 第136年会、2016.03.25(神奈川県横浜市)

遠藤麻穂、山中大輔、石橋健一、安達禎之、大野尚仁：  
磁気ビーズを用いた新規リグニン認識タンパク質の探索

日本薬学会 第136年会、2016.03.25(神奈川県横浜市)

荻島成美、山中大輔、石橋健一、安達禎之、大野尚仁：

リグニンによるマクロファージ活性化と細胞内シグナル伝達機構の解析

日本薬学会 第137年会、2017.03.24(宮城県仙台市)

奥山直哉、山中大輔、石橋健一、安達禎之、大野尚仁：リグニン様ポリフェノールによる新規アジュバントの開発

日本薬学会 第137年会、2017.03.24(宮城県仙台市)

山中大輔、安達禎之、大野尚仁：

マクロファージにおけるリグニンポリマー認識メカニズムの解析

第13回日本食品免疫学会学術大会、2017.11.09(東京都文京区)

坂野由幸、山中大輔、石橋健一、安達禎之、大野尚仁：

リグニン様ポリフェノールによるアジュバント効果の解析

日本薬学会 第138年会、2018.03.25(石川県金沢市)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：免疫アジュバント

発明者：山中大輔/大野尚仁/多田壘/元井益郎/元井章智

権利者：東栄新薬株式会社

種類：特許

番号：特願2016-134901

出願年月日：2016年7月7日

国内外の別：国内

### 〔その他〕

ホームページ等

東京薬科大学・薬学部・免疫学教室

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/menekigaku>

ResearchMap

<https://researchmap.jp/yumnkd/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山中 大輔 (YAMANAKA DAISUKE)

東京薬科大学・薬学部

助教

研究者番号：70734599