

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007~2008
 課題番号： 19590081
 研究課題名 (和文) 核酸医薬の経鼻投与型ワクチンアジュバントへの応用
 研究課題名 (英文) Application of CpG-ODN for nasal vaccine development

研究代表者
 新禎 幸彦 (ARAMAKI YUKIHIKO)
 東京薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号： 90138959

研究成果の概要：本研究は免疫アジュバントとして期待される CpG-oligo-deoxynucleotide (CpG-ODN) の粘膜免疫アジュバントとしての有用性を検討したものであり、CpG-ODN とリポソーム複合体は安全で有用な粘膜ワクチンアジュバントとして期待できることを明らかとした。また、抗原特異的 IgA の誘導に IL-6 が重要なサイトカインとして機能しており、その産生にキャリアーとして用いたリポソームの構成脂質の一つである DC-Chol が深くかかわっていることを明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：CpG-ODN, アジュバント, 粘膜免疫, IL-12, IgA

1. 研究開始当初の背景

現在、SARS, HIV, ヒトインフルエンザ, 結核など多くの新興・再興感染症に対する新たな治療・予防法の確立が急がれている。これらウイルスや細菌との最初の接触面は気道や泌尿生殖器の粘膜であることから、感染初期の防御機構である粘膜免疫を賦活化する粘膜ワクチンの開発に対する期待は高い。粘膜ワクチンの投与ルートとしては経口投与や経鼻投与などが挙げられるが、前者に比べ後者においては、抗原・アジュバントの量が少量で、効率よく付属リンパ装置への送達が可能であること、また胃酸や種々の酵素による分解に対する配慮は少なくてもよい

などの利点を有している。

粘膜免疫の賦活化にはアジュバントの使用が必須であり、これまでの動物実験ではコレラトキシンや大腸菌外毒素などが用いられているが、当然ヒトを対象にした時には毒性が強くなることはできないことから、最近ではこれらのアジュバントの毒性軽減に注目した多くの研究がある。一方で、IL-12が粘膜免疫のアジュバントとして有用であることが最近報告されている。

Oligodeoxynucleotide (ODN) 配列中に Cytosine-Guanine (CpG) を含むある特定の塩基配列 (CpG-モチーフ) を有する CpG-ODN はマクロファージや樹状細胞に作用し、

IL-12 産生を誘導し, Th1/Th2 バランスを Th1 優位な免疫応答に誘導し, また細胞障害性 T 細胞活性を上昇させることが報告されている。

2. 研究の目的

申請者はこれまでの報告から, IL-12 が粘膜免疫のアジュバントとして有用であること, および CpG-ODN がマクロファージや樹状細胞から強力に IL-12 を産生誘導することから, CpG-ODN を粘膜免疫アジュバントに応用することを企図した。

核酸医薬は分子量が大きく, 負電荷を有していること, さらに DNase に対して感受性が高いことから, 多くの研究で様々なキャリアー (ベクター) が利用されている。本研究では DOTAP/Chol あるいは DOTAP/DC-Chol からなる 2 種の正電荷リポソームをキャリアーに用いて免疫アジュバントとして期待されている CpG-ODN の粘膜免疫に及ぼす影響についてマウスを用いて検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) リポソームの調製

DOTAP:Cholesterol (1:1 molar ratio) または DOTAP:DC-Chol (1:1 molar ratio) からなる二種の正電荷 liposome は vortexing 法で作製し, CpG-ODN と混和後, 5 分間超音波処理をして CpG-liposome 複合体を調製した。

(2) *in vivo* 実験

リポソームの脂質重量 200 nmol に対して CpG-ODN 10 · g の複合体を調製し, OVA 50 · g とともに BALB/c マウスの鼻腔に投与し, 一定時間後, 眼窩静脈より採血し血清を調製した。さらに定法により, nasal wash や NALT や nasal passage の単核球細胞を回収した。

(3) サイトカインや抗体価測定

各クラスの抗体や TGF- β や IL-6 などのサイトカインレベルは定法に従い, サンドイッチ ELISA で測定した。また, NALT や nasal passage における IgA 陽性細胞の検出・変動, B-細胞の形質細胞への分化はマーカー抗原の変動を FACS で測定し評価した。

4. 研究成果

免疫アジュバントとして期待される CpG-ODN を DOTAP/Chol あるいは DOTAP/DC-Chol からなる二種の正電荷 liposome を用いてモデル抗原である OVA をマウスに経鼻投与することにより, 経鼻投与型ワクチン開発の可能性について検討を加え以下の結果を得た。

(1) CpG-ODN とリポソーム複合体を OVA とともに経鼻投与することにより, nasal wash 中で粘膜免疫の賦活化の指標である IgA の産

生誘導が観察され (Fig. 1), あわせて Th1 優位な全身免疫応答, および細胞障害性 T 細胞の活性化も認められた。さらに CpG-ODN とリポソーム複合体投与群においては動物実験で粘膜免疫アジュバントとして汎用されているコレラトキシン投与群と同等の IgA 産生の誘導が観察された。正電荷リポソームの使用に際しては常にその細胞毒性を考慮することが指摘されているが, 今回用いた正電荷脂質は細胞毒性も低く, また投与量も低値であることから, 粘膜免疫アジュバントとして興味深い。

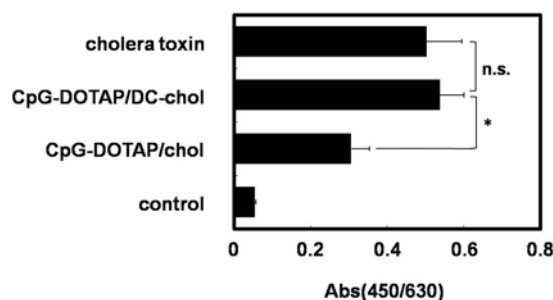


Fig. 1 Comparison of IgA levels following intranasal administration of CpG-ODN liposomes and cholera toxin

(2) CpG-ODN とリポソーム複合体による粘膜免疫賦活化機構を粘膜免疫の誘導組織である NALT における IgA 陽性細胞へのクラススイッチ, および実行組織である nasal passage における B-細胞の形質細胞への分化に関して FACS を用いて検討したところ, いずれも促進されることが分かった。

両者はそれぞれ, TGF- β および IL-6 により制御されていることから両サイトカインをはじめ IL-4 および IL-10 の産生について ELISA で測定したところ CpG-ODE/DOTAP/DC-Chol 投与群の nasal passage において投与後 12 日目において IL-6 の顕著な産生誘導が観察された。一方, TGF- β の産生はコントロールとの間で顕著な差は観察されなかった (Fig. 2)。

さらに, IL-6 の機能を精査すべく, 抗 IL-6 receptor 抗体処理を行ったところ, B 細胞の IgA 陽性細胞へのクラススイッチ (B220⁺/IgA⁺), 形質細胞への分化 (CD138⁺/IgA⁺) (Fig. 3), さらに IgA 産生 (Fig. 4) が顕著に抑制されたことから, CpG-ODN と DOTAP/DC-Chol 投与群による粘膜免疫賦活化に IL-6 の誘導産生が深く関与することが示唆された。

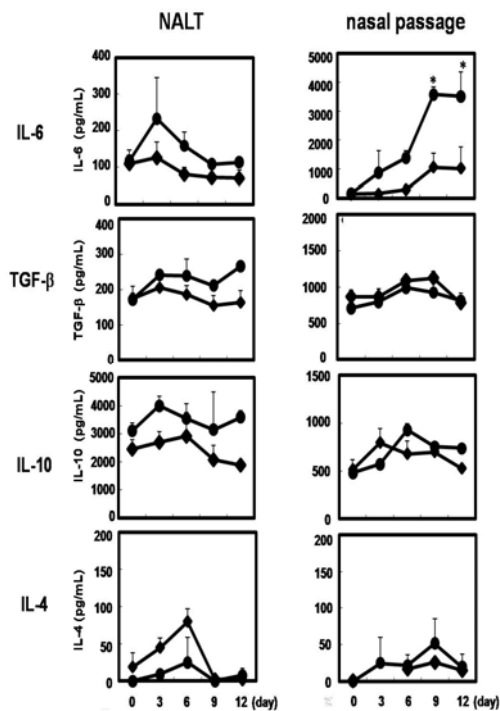


Fig. 2 Changes in cytokine levels in nasal passage following intranasal administration of CpG-ODN/DOTAP/DC-Chol liposomes

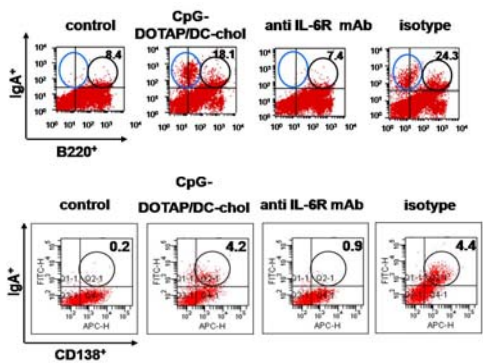


Fig. 3 Effects of anti-IL-6 receptor antibody on IgA class switching (upper) and plasma cell differentiation (lower).

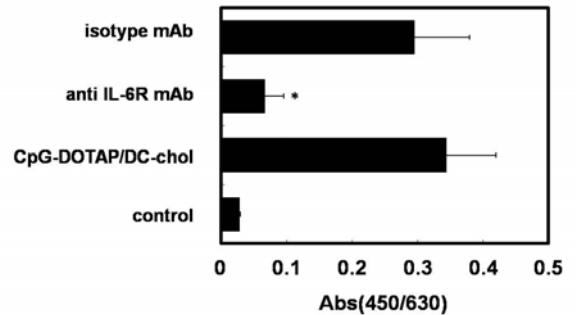


Fig. 4 Effects of anti-IL-6 receptor antibody on IgA production in nasal passage following intranasal administration of OVA with CpG-ODN/DOTAP/DC-Chol

(3) 経鼻投与された抗原に対して、CpG-ODNはTh1優位な全身免疫や細胞性免疫の応答を誘導したが、粘膜免疫の賦活化にはCpG-ODNを含まない正電荷であるDOTAP/DC-Cholでも観察され(Fig. 5)、経鼻投与による粘膜免疫の賦活化にCpG-ODNは必ずしも必須でないことが示唆された。一方、phosphatidylserine(PS)を構成脂質とする負電荷リポソームやphosphatidylcholine(PC)を構成脂質とする中性電荷のリポソームには粘膜免疫賦活化能は観察されず、粘膜免疫の賦活化にはDOTAP/DC-Cholが重要な役割を担っているという大変興味深い結果が得られた。

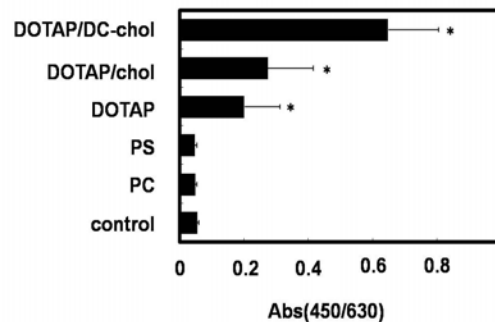


Fig. 5 Effects of liposomal charge on IgA production in nasal passage following intranasal administration

以上の研究から、CpG-DOTAP/DC-Cholの経鼻投与により、十分な体液性免疫と細胞性免

疫を誘導することができ、安全で有用なワクチンアジュバントとして期待できることを明らかとした。さらに抗原特異的 IgA の誘導に IL-6 が重要なサイトカインであることを明らかとした。しかし、IL-6 を産生している細胞や抗原特異的 IgA 産生誘導の中で IL-6 がどのような役割を果たしているかについては明らかとなっておらず、今後さらなる検討が必要である。OVA を DOTAP/DC-Chol とともに経鼻投与することにより、抗原特異的な粘膜免疫が賦活化され、IgA 抗体が誘導されることを明らかとした。DC-Chol によるアジュバント効果についてはこれまでいくつか報告があるものの、その詳細については明らかとなっていない。今回、我々が用いた DOTAP/DC-Chol においても DC-Chol による粘膜免疫のアジュバント機構の詳細については明らかではないことから、今後さらなる検討を行い、その詳細を明らかにしたい。

世界中で SARS や HIV、新型インフルエンザなどの新興・再興感染症が問題となっている昨今、これら感染症に対する有効なワクチンの開発が必要急務とされている。CpG-liposome による免疫賦活化機構には未だ不明な点が残るものの、投与方法が非常に簡便かつ安全性が高く、また高い効果も得られたことから、今後、感染症に対する簡便で効果的な経鼻投与型ワクチンとして実用化されることを期待したい。

以上、得られた知見は、現在投稿論文として纏めている。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 高山典子, 河野麻子, 根岸洋一, 國澤 純, 清野 宏, 櫻井和朗, 新榎幸彦. SPG-R8 を用いた CpG-ODN の経鼻投与による粘膜アジュバント効果の増強. 遺伝子デリバリー研究会 第 7 回シンポジウム (2007 年 5 月 18 日, 東京)
- ② 高山典子, 本庄絵美, 根岸洋一, 國澤 純, 清野 宏, 新榎幸彦. Liposome を用いた CpG-ODN 経鼻投与による粘膜免疫の賦活化. 日本薬剤学会第 22 年会 (2007 年 5 月 21 日, 大宮)
- ③ 高山典子, 根岸洋一, 國澤 純, 清野 宏, 櫻井和朗, 新榎幸彦. SPG-R8 を用いた CpG-ODN の経鼻投与による粘膜免疫の賦活化. 第 23 回日本 DDS 学会 (2007 年 6 月 15 日, 熊本)
- ④ 本庄絵美, 根岸洋一, 國澤 純, 清野 宏,

新榎幸彦. リポソームを用いた CpG-ODN の経鼻投与による粘膜免疫の賦活化. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 (2008 年 12 月 1 日, 京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新榎 幸彦 (ARAMAKI YUKIHIKO)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 9 0 1 3 8 9 5 9

(2) 研究分担者

根岸 洋一 (NEGISHI YOUICHI)
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 5 0 2 8 6 9 7 8

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

高山 典子 (TAKAYAMA NORIKO)
東京薬科大学・薬学部・大学院生

本庄 絵美 (HONJOU EMI)
東京薬科大学・薬学部 大学院生