

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790067  
 研究課題名（和文） MHC 結合性ペプチドを内封したリポソームによる粘膜免疫賦活法の研究  
 研究課題名（英文） Induction of mucosal immunity using liposomes entrapping MHC-binding peptides  
 研究代表者  
 黒羽子 孝太（KUROHANE KOHTA）  
 静岡県立大学・薬学部・助教  
 研究者番号：90333525

## 研究成果の概要：

腸管出血性大腸菌O157:H7由来のペロ毒素の糖鎖認識サブユニット (Stx1B) は、抗原提示細胞の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス II に抗原由来ペプチドが提示されにくいため免疫原性が低いと考えられている。これを改善するために Stx1B と、MHC クラス II に提示される OVA ペプチドを共存させたリポソームを作製しマウスに対して経粘膜免疫を行いその効果を検討した。リポソームワクチンの経鼻免疫により、OVA ペプチド内封リポソームは粘膜での分泌型 IgA の産生を誘導した。またペプチドを内封せずに表面に Stx1B を結合させたリポソームワクチンでも分泌型 IgA 産生が誘導された。さらに、Stx1B をリポソームに内封することで免疫原性を高めることが可能であった。MHC クラス II に提示される OVA 由来のペプチドを内封して Stx1B を表面に修飾したリポソームに改良を加えることで、効果的なリポソームワクチンの開発が期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

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：免疫学 薬物送達学 ワクチン 薬学 感染症 ペロ毒素

## 1. 研究開始当初の背景

粘膜免疫は、粘膜を介した病原体の侵入に対する生体防御で極めて重要な役割を果たしている。獲得免疫により粘膜で産生される分泌型 IgA 抗体 (S-IgA) は、病原体や病原体由来毒素の生体組織への侵入を阻害するなど重要な働きをもつ。粘膜免疫賦活化を目指した研究がこれまでもなされてきたが、分泌型 IgA 抗体の

効果的な誘導法は未だ確立されていない。これらの研究の多くはモデル抗原を用いたものであり、病原細菌由来の抗原を用いたものは少ない。また本研究で用いる、ペロ毒素 B サブユニット (Stx1B) は免疫原性が低いため、粘膜免疫の賦活化自体が困難である。これらの現状を踏まえ、リポソームを応用した経粘膜免疫による、効率的な分泌型 IgA 抗体の誘導法

を確立すること、さらにO157感染症でのペロ毒素特異的な分泌型IgA抗体を*in vitro*で作製するという着想に至った。

## 2. 研究の目的

免疫原性の低い、もしくは抗原性を示さない抗原に対しても、効果的に粘膜免疫を賦活化するワクチンの開発を目的に研究を行った。本研究で抗原として用いる O157:H7 由来のペロ毒素の糖鎖認識サブユニット（ペロ毒素 B サブユニット、Stx1B）は免疫原性が低いために、粘膜免疫の賦活化自体が困難である。これは Stx1B を抗原として投与した際、抗原提示細胞の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC, major histocompatibility complex) クラス II に Stx1B 由来のペプチドが提示されにくいからである。さらに、実験動物に用いるマウスのハプロタイプによっては、Stx1B は全く抗原性を示さないことが明らかとなっている。そこで、Stx1B と MHC クラス II に提示されるペプチド (MHC クラス II 結合性ペプチド) の 2 種類の物質を組み込んだリポソームワクチンの開発を行った。リポソームは、その内水相に MHC クラス II 結合性ペプチド、膜表面に抗原である Stx1B を組み込むことが可能なキャリアである。このワクチンを用いることで、Stx1B 由来のペプチドが MHC クラス II に提示されにくい、もしくは提示されない場合でも、MHC クラス II に提示された MHC 結合性ペプチドを、T 細胞が認識して、効率的な免疫賦活化の誘導が可能になると考えられる

## 3. 研究の方法

### (1) Stx1B内封リポソームの調製

ペロ毒素は、毒性を有したAサブユニットと、糖結合性を有し無毒性のBサブユニット (Stx1B) から成るが、本研究では安全な組換え型 Stx1B を用いた。dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) と cholesterol をモル比で 1:1 で混合し、脂質薄膜を作製した。この脂質薄膜を Stx1B 溶液で水和して Stx1B 内封リポソームを調製した。

### (2) MHC クラス II 結合性ペプチドを内封した Stx1B 修飾リポソームの調製

まず、マウス B 細胞 MHC クラス II に提示される MHC 結合性ペプチド (OVA323-339) をリポソームに内封するために、MHC 結合性ペプチド溶液を用いて、リポソームを調製した。リポソームの構成脂質として DPPC および cholesterol をモル比で 1:1 とし、脂質薄膜を作製した。この時、リポソーム表面に Stx1B を結合させるために 3-(N-succinimidylxyglutaryl)-aminopropyl-polyethylene glycol-carbamyl-distearoylphosphatidylethanolamine (DSPE-PEG-NHS) を加えた。形成された脂質薄膜を OVA323-339 ペプチド溶

液で水和した。その後、遠心操作を行いリポソームに内封されていないペプチドを取り除いた。次に抗原である Stx1B 溶液を加えることで、リポソームを構成している DSPE-PEG-NHS と反応させて Stx1B を表面に結合したリポソームを調製した。リポソーム膜表面に Stx1B が提示されているか確認するために、これまで得られている Stx1B 特異的 IgG を一次抗体、さらに蛍光標識された二次抗体を用いることで、フローサイトメーターでの測定を行った。また Stx1B 特異的 IgG を結合させたセンサーチップを用いて表面プラズモン共鳴法 (SPR) により測定した。

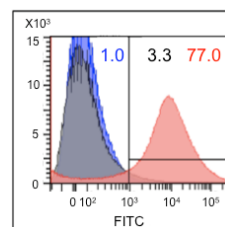
### (3) リポソームワクチンを用いた経鼻免疫による粘膜免疫応答の誘導および抗体の検出

Stx1B内封リポソームおよびOVA323-339ペプチドを内封し、さらに表面をStx1Bで修飾したリポソーム (Stx1B-liposomal OVA) を Stx1B 量として 40 $\mu$ g、粘膜アジュバントとして cholera toxin (CT) を 1 $\mu$ g を含む 15 $\mu$ l の PBS を 1 回の抗原投与液とした。この溶液を一週間おきに 4 回、マウスに経鼻免疫を行った。Stx1B内封リポソームを用いた検討では BALB/c マウス (female, 6-week old)、Stx1B-liposomal OVA を用いた検討では C57BL/6 マウス (female, 6-week old) を用いた。最終免疫から一定期間経過後、鼻洗浄液、糞抽出液、膣洗浄液、血液を採取し抗体測定用のサンプルとして用いた。サンプル中の抗体は ELISA により測定した。

## 4. 研究成果

### (1) MHC クラス II 結合性ペプチドを内封した Stx1B 修飾リポソームの調製

Flow cytometer を用いてリポソーム表面への Stx1B 修飾を確認した。Stx1B-liposomal OVA に、抗 Stx1B-IgG 抗体を加えることでリポソーム表面の Stx1B の検出を試みた。その結果、ピーク (Fig. 1 赤) の移動が観察された。このピークの移動は isotype control 抗体を加えた群 (Fig. 1 黒) では観察されなかった。このことから、リポソーム表面に Stx1B が存在していることが明らかとなった。



赤 : 抗 Stx1B-IgG 抗体  
黒 : isotype control  
青 : control

Fig. 1 flow cytometer を用いたリポソーム表面への Stx1B 修飾の確認



部位である鼻洗浄液中での Stx1B 特異的 IgA 抗体価のどちらも、ペプチドの内封に関わらず抗体価に差は観察されなかった (Fig. 6)。

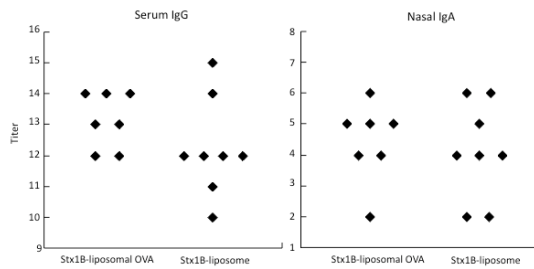


Fig. 6 Stx1B-liposomal OVA による粘膜免疫および全身性免疫応答の誘導

Stx1B-liposomal OVA:OVA ペプチドを内封した Stx1B 修飾リポソーム

Stx1B-liposome:OVA ペプチドを含まない Stx1B 修飾リポソーム

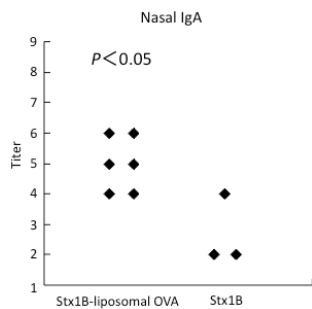


Fig. 7 Stx1B 単独免疫群と Stx1B 修飾 liposomal OVA 投与群との粘膜免疫応答誘導の比較

しかしながら、Stx1B 単独投与群では、ほとんど Stx1B 特異的抗体は誘導されないことから (Fig. 7)、C57BL6 マウスで Stx1B 修飾したリポソームにより免疫応答が誘導されることが明らかとなった。

(4) ここまでの研究により、免疫原性が低いことが明らかとかなっている Stx1B の免疫原性向上のために、リポソームが有効なツールであることが明らかとなった。その効果は、内封だけではなくリポソーム表面に修飾することでも向上させることが可能であった。しかしながら、本研究の目的である MHC クラス II へのペプチド提示を介した免疫原

性の向上に関しては、現段階では更なる詳細は検討が必要である。

具体的には、MHC クラス II に提示させることを目的にリポソームに内封する OVA323-339 ペプチドの内封率の改善が必要であると思われる。Stx1B をリポソーム表面に修飾することでも、免疫原性の向上が観察されることから、さらにリポソームへの OVA ペプチドの封入率を高め、OVA ペプチドが B 細胞の MHC クラス II に効率よく提示されれば、更なる免疫原性の向上が可能であると思われる。

## 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 3 件)

① 深谷 愛、黒羽子孝太、今井康之  
リポソームに内封した志賀毒素 B サブユニットの経鼻免疫による抗原特異的分泌型 IgA の産生促進と維持 第 38 回日本免疫学会 2008 年 12 月 3 日 京都

② Kohta Kurohane, Ai Fukaya, Yasuyuki Imai

Liposomalization of recombinant Shiga toxin 1B augmented production of Stx1B-specific secretory IgA on various mucosal tissues

11th Liposomes Research Days Conference 2008 年 7 月 19 日-22 日 Yokohama

③ 深谷 愛、黒羽子孝太、今井康之  
経鼻投与リポソームを用いたペロ毒素に対する腸管内分泌型 IgA 産生の誘導 日本薬学会 128 年会 2008 年 3 月 28 日 横浜

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒羽子 孝太 (KUROHANE KOHTA)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：90333525