

機関番号：23803

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790086

研究課題名（和文） MHC 拘束性克服可能なりポソームワクチンを応用した抗ペロ毒素分泌型 IgA の開発

研究課題名（英文） Production of secretory IgA against Shiga-like toxin B subunit 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（和文）：ペロ毒素の糖鎖認識サブユニット (Stx1B) の抗原性を改善しワクチンとして用いるために、主要組織適合遺伝子複合体クラス II に提示され T 細胞を活性化するペプチドと Stx1B とを共存させたリポソームを作製した。これをマウスに経鼻免疫した結果、ペプチドの効果は確認出来なかったがリポソーム化により抗 Stx1B 分泌型 IgA が効率的に誘導された。また、分泌型 IgA の *in vitro* 作製方法を検討し、二量体 IgA と組換え型分泌片との反応、poly-Ig 受容体を発現させた上皮細胞株を通過させることで分泌型 IgA を得られた。

研究成果の概要（英文）：B subunit of Shiga-like toxin (Stx1B) has been demonstrated to be a poor immunogenicity in mice. To augment the immunogenicity of Stx1B, Stx1B and major histocompatibility complex class II bind peptides, including T cell epitopes were liposomalized. Mice were given Stx1B-liposomes via nasal cavity. As a result, liposomalization of Stx1B efficiently augmented the immunogenicity of Stx1B in the mucosal immune systems. Moreover, secretory IgA was obtained by incubation of dimeric IgA and recombinant secretory component, or by transcytosis of the dimeric IgA through epithelial cells expressing poly-Ig receptor *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：粘膜免疫 免疫学 リポソーム ワクチン IgA 感染症 ペロ毒素 腸管出血性大腸菌

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。本研究課題で抗原として用いる腸管出血性大腸菌 O157:H7由来のペロ毒素の糖鎖認識サブユニット（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とを明らかとしてきた (Imai, Y., Kurohane, K., et al., *Infect. Immun.* **72**, 889-895, 2004)。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。そこで、Stx1BとT細胞エピトープを有したMHCクラス II に提示されるペプチド (T細胞エピトープ含有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を開発するという着想に至った。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。

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の誘導法を確立すること、さらにO157感染症でのベロ毒素特異的な分泌型IgAを*in vitro*で作製することを目指した。

2. 研究の目的

粘膜での病原細菌、病原細菌由来の毒素に対する分泌型IgA産生を効果的に誘導する経粘膜ワクチンの開発、および経口投与可能な治療用分泌型IgAを*in vitro*で作製することを目指した。粘膜免疫応答を効果的に誘導することができれば、病原細菌の感染防御、および病原細菌由来の毒素に対する防御機構として有効であると考えられる。さらに、粘膜免疫応答を誘導した実験動物から得られる抗原特異的なIgAを持ったB細胞を回収し、それを用いてハイブリドーマを作製することで、経口投与可能な治療用分泌型IgAの開発につながられる。しかしながら、すべての病原細菌由来の蛋白質や、毒素由来の蛋白質を抗原として用いることが出来るわけではなく、免疫原性の低い抗原はワクチンに応用することが困難である。そこで、免疫原性が低く抗原性を示さない抗原に対しても、効果的な粘膜免疫ワクチンおよび経口投与可能な治療用分泌型IgAの開発が必要となる。

免疫動物から作製したハイブリドーマから獲られるIgAは分泌片が結合していないために、腸管粘膜に適用するのは困難である。すなわち経口投与した際に代謝されやすい。そこで分泌片を結合させ、経口投与可能な分泌型IgAの作製を目指した。分泌片は上皮細胞が発現しているpoly-Ig受容体の一部であるが、マウスpoly-Ig受容体のcDNAを発現用ベクターへの組み込んだ安定発現細胞株を用いて、IgAに分泌片を結合させた分泌型IgAの作製を目指す。また、同時にマウス分泌片遺伝子を導入した細胞から獲られた組み換え型分泌片

を用いて、分泌型IgAの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) Stx1B内封リポソームの調製

ベロ毒素は、毒性活性を担うAサブユニットと、標的細胞への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で混合しクロロホルムに溶解した後、減圧下留去して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) T細胞エピトープ含有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 として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-polyethyleneglycol-carbamyl-distearoylphosphatidylethanolamine (DSPE-PEG-NHS) を加えた。形成された脂質薄膜を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 peptides) をStx1B量として40 μ g、粘膜アジュバントとしてcholera toxin (CT) を1 μ gを含む15 μ 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 peptides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、膺

洗浄液中の分泌型IgAおよび血液中のIgGをELISAにより測定し、免疫賦活化の指標とした。

(4) Stx1B特異的IgA抗体の*in vitro*作製

粘膜免疫応答が誘導されたマウスから、IgA産生前駆細胞が誘導分化された鼻咽頭関連リンパ組織を摘出してMagnetic Cell Sorterを用いて表面IgAを発現したB細胞を回収した。このB細胞を用いてハイブリドーマを作製し、Stx1Bに特異的に結合するIgAモノクローナル抗体でかつ人工糖鎖リガンド (Gal α 1-4Gal構造を含むオリゴ糖を複数結合させた人工ポリマー) の結合を妨害するモノクローナル抗体であるG2G7を選択した。

(5) 組み換え型分泌片を用いた分泌型IgAの作製

得られたIgAモノクローナル抗体と組換え型分泌片を反応させることで、分泌型IgAの作製を試みた。組み換え型分泌片を獲るために、マウス pIgR の cDNA (Dr. CS Kaetzel, University of Kentucky, Lexington KY, USA より御供与いただいた) の一部から分泌片をコードした遺伝子を取り出し、発現用ベクターに組み込んだ。これをCHO細胞へ導入し、培養上清中に分泌されている組み換え型分泌片を得た。この組換え型分泌片とIgAを混合し一定時間反応させ、分泌型IgAが形成されているか分泌片に対する抗体を用いたウェスタンブロットティングにより確認した。

(6) マウス poly-Ig受容体 (pIgR) 発現上皮細胞株を用いた分泌型IgAの作製

分泌片は二量体のIgAが上皮細胞の基底膜側のpIgRと結合し、細胞内を通過し管腔側に分泌される際にIgAに付加され分泌型IgAとなる。そこでpIgRを発現させたMDCK上皮細胞株の単層培養の下層に二量体IgAを添加し、上皮細胞を介して輸送させ、培養上清中に分泌片が結合した分泌型IgAが産生されているか分泌片に対する抗体およびIgAに対する抗体を用いたウェスタンブロットティングにより確認した。

4. 研究成果

(1) Stx1B 内封リポソームを用いた経鼻免疫による粘膜免疫応答の誘導

Stx1B をリポソームに内封して免疫原性を向上させることが可能か検討した。最終免疫から1週間後の鼻洗浄液 (Nasal IgA)、膣洗浄液 (Vaginal IgA)、糞抽出液 (Fecal IgA) 中の IgA 力価および血液 (Serum) 中の IgA、IgG 力価を示した (Fig. 1)。

その結果、免疫部位である鼻粘膜から回収した鼻洗浄液中で、Stx1B 特異的 IgA 力価が Stx1B 内封リポソームで有意に高くなることが明らかとなっている。また免疫部位とは離

れた生殖器官 (Vaginal IgA)、腸管 (Fecal IgA) 中でも有意な Stx1B 特異的 IgA 力価の上昇が確認されている。

また全身性免疫賦活化の指標として血液中の Stx1B 特異的 IgG 力価および IgA 力価を測定した。その結果、IgA に関しては Stx1B 内封リポソームにより有意に上昇したものの、IgG 力価は有意な差は確認されていない。

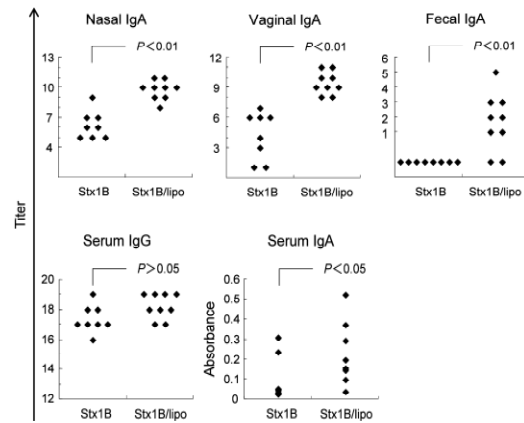


Fig. 1 Stx1B 内封リポソーム投与による粘膜組織での IgA 力価および血液中の抗体力価 (最終免疫から一週間後)

(2) Stx1B 内封リポソームを用いた経鼻免疫による粘膜免疫応答の維持

次に、Stx1B 内封リポソームによる経鼻免疫から1年後の各粘膜組織、および血液中の抗体力価を測定した。

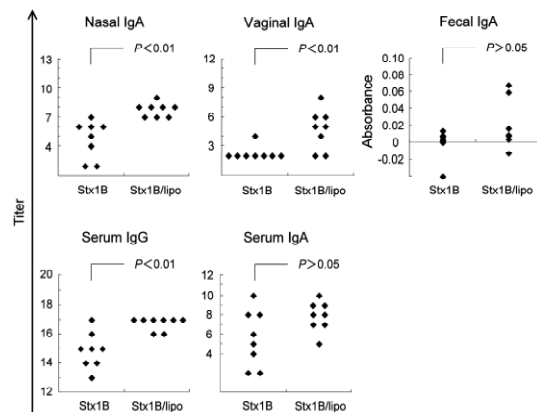


Fig. 2 Stx1B 内封リポソーム投与による粘膜組織での IgA 力価および血液中の抗体力価 (最終免疫から一年後)

その結果、腸管 (Fecal IgA) での Stx1B 特異的 IgA は有意な差は無かったものの Stx1B 内封リポソーム免疫群で Stx1B 特異的 IgA の検出が可能なマウスが存在していた。免疫部位であった鼻では高い IgA 力価が維持

されており Stx1B 内封リポソーム免疫群で有意に高かった。また生殖器官 (Vaginal IgA) でも高い IgA 力価が維持されていた。さらに血液中での抗体力価は IgA は差が無いものの、IgG は有意に高い力価を示した。

(3) 組換え型分泌片を用いた分泌型 IgA の作製

ハイブリドーマより得られた Stx1B 特異的 IgA は分泌片の結合していない二量体 IgA である。そこで組換え型分泌片を作製し、それを反応させることで分泌型 IgA の作製を目指した。まずはじめにモデル IgA としてマウスミエローマ由来の TEPC15 を用いて組換え型分泌片と反応させた。反応後、分泌片に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い、分泌型 IgA が作製されたか確認した (Fig. 3)。

その結果、lane2 の TEPC15 と組換え型分泌片を反応させたサンプルで、lane1 のマウスの唾液中に含まれる分泌型 IgA と同じ大きさのバンドが確認された。

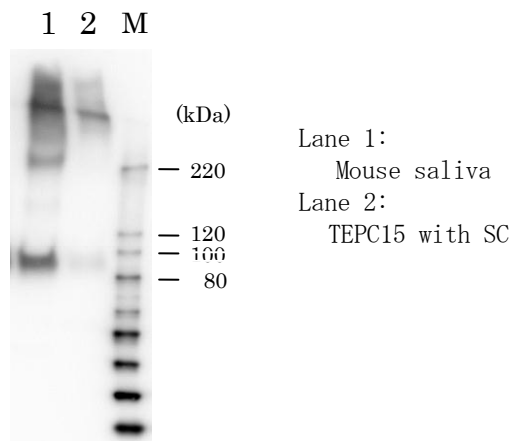
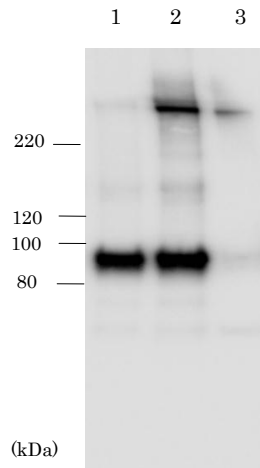


Fig. 3 組換え型分泌片とTEPC15との反応による分泌型IgAの作製

次に実際に治療用抗体の作製を目指して Stx1B 特異的 IgA モノクローナル抗体である G2G7 と組換え型分泌片を反応させ、分泌型 IgA が作製可能かどうか検討した。TEPC15 の時の検討と同様に行った (Fig. 4)。その結果、lane2 で分泌型 IgA のバンドが検出された。



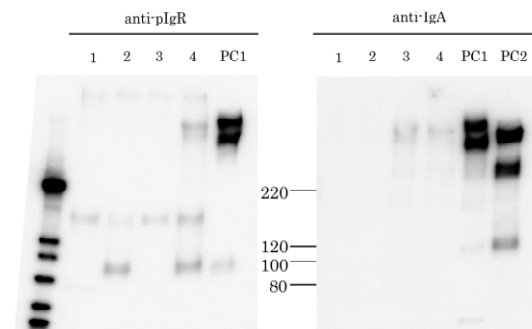
Lane 1: 組換え型分泌片
Lane 2: G2G7 と組換え型分泌片の反応物
Lane 3: Mouse saliva

Fig. 4 組換え型分泌片とG2G7 (Stx1B特異的IgAモノクローナル抗体) との反応による分泌型IgAの作製

(4) poly-Ig 受容体発現上皮細胞株を用いた分泌型 IgA の作製

二量体 IgA は、上皮細胞の基底膜側に存在する pIgR と結合し、細胞内を輸送され管腔側に分泌される際、pIgR の一部が分泌片として結合した分泌型 IgA となる。そこで、pIgR 遺伝子を導入し、pIgR を発現させた MDCK 細胞を単層培養し、その下層に二量体 IgA を添加し、MDCK 細胞内を輸送させることで上層への分泌型 IgA の産生を検討した (Fig. 5)。

その結果、G2G7 を単層培養下層に添加した群で、上層に分泌型 IgA が検出された。このことから上皮細胞の単層培養層を通過して分泌型 IgA が作製されることが明らかとなった。



1: non-transfected MDCK cells
2: pIgR-transfected MDCK cells
3: non-transfected MDCK cells with IgA
4: pIgR-transfected MDCK cells with IgA
PC1: mouse saliva, PC2: Stx1B-specific IgA
Fig. 5 pIgR 発現 MDCK を用いた分泌型 IgA の作製

以上のことから、T細胞エピトープ含有MHCクラスII結合性ペプチドの効果は確認できなかったものの (data not shown)、リポソームにStx1Bを内封することで、有意にその抗原性を高めることが可能であった。さらに、その効果は一年経過後も維持されていることが明らかとなった。さらに、組換え型分泌片やpIgR発現上皮細胞株を用いたin vitroでの分泌型IgA作製に成功した。

病原性細菌由来の抗原に対する分泌型IgAの作製法が確立されることで、感染症に対する治療法の開発に貢献できることが期待される。

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4件)

① 中西勝宏、黒羽子孝太、丹羽康夫、小林裕和、今井康之

植物で発現した分泌片 (SC) を用いた分泌型 IgA の構築 日本薬学会 131 年会
2011 年 3 月 30 日 静岡

② 出口 彩、黒羽子孝太、今井康之

Poly Ig receptor 発現上皮細胞株の構築および機能解析 日本病院薬剤師会東海ブロック/日本薬学会東海支部合同学術大会 2010
2010 年 11 月 28 日 静岡

③ 笹沼康一、岩田皓生、黒羽子孝太、今井康之

組換え型分泌片 (SC) の安定発現株の構築および性状解析 日本病院薬剤師会東海ブロック/日本薬学会東海支部合同学術大会 2010
2010 年 11 月 28 日 静岡

④ Katsuhiko Nakanishi, Koki Iwata, Kohta Kurohane, Yasuo Niwa, Hirokazu Kobayashi, Yasuyuki Imai

IgA plantibody against carbohydrate binding subunits of Shiga toxin. 14th International Congress of Immunology
2010 年 8 月 24 日 神戸

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