

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02644

研究課題名（和文）高活性抗体の特導を実現する抗原発現エクソソームの脾臓免疫技術基盤の構築

研究課題名（英文）Establishment of a spleen immunization technology platform using exosomes to induce antibodies that can recognize the membrane proteins of host cells.

研究代表者

安藤 英紀（ANDO, Hidenori）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・准教授

研究者番号：00735524

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：我々はこれまでに、リポソームを用いた抗原の脾臓免疫技術を開発し、ユニークな抗体の特導に成功している。エクソソームは宿主細胞由来のタンパク質を含む脂質二重膜小胞であるため、エクソソームの脾臓免疫で宿主細胞への認識性が高い抗体を特導できるのではと考えた。がん細胞からエクソソームを回収し、マウスに脾臓免疫した。抗血清を回収し、宿主細胞由来タンパク質への結合性を観察したところ、幾つかのタンパク質に対する抗体の特導が認められ、宿主細胞の膜表面への結合が観察された。以上より、エクソソームの脾臓免疫により、宿主細胞の膜タンパクに対する抗体を特導可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

基礎研究において、特定の細胞を認識する抗体製品の需要は極めて高く、例えばフローサイトメトリーにおいては、蛍光色素を修飾した抗体をプローブとして特定の細胞を標識し、その細胞群の存在割合を解析するが、標識抗体として用いるのはほとんどが膜タンパクに対する抗体製品である。特に、ニッチな細胞集団はある特定の膜タンパクの発現が上昇していることが多く、特定の膜タンパクを高感度かつ特異的に検出できる抗体の創出は、がん領域や免疫領域の研究を加速的に発展させることが期待できる。抗体創薬においては、新規標的分子をターゲットとした抗体創薬あるいはこれまでの性能を凌駕する抗体医薬候補の創出に貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have previously developed a spleen immunization technique using liposomes to deliver antigens, successfully inducing unique antibodies. Exosomes are lipid bilayer vesicles containing proteins derived from host cells, and thus we hypothesized that spleen immunization with exosomes could induce antibodies with high specificity for host cells. We collected exosomes from cancer cells and performed spleen immunization in mice. Upon collecting antisera and observing the binding affinity to host cell-derived proteins, we found that antibodies against several proteins were induced, and binding to the host cell membrane surface was observed. These results demonstrate that spleen immunization with exosomes can induce antibodies against membrane proteins of host cells.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム（DDS）

キーワード：エクソソーム 脾臓免疫 抗体特導 膜タンパク

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体関連製品(抗体医薬、診断薬、研究用試薬等)のプロトタイプとなるモノクローナル抗体は、免疫した後のマウス脾臓細胞を使ったハイブリドーマ法やファージディスプレイ法によって作製される。従来の免疫法(皮下免疫)は、抗原とアジュバントのエマルジョンを調製し、この皮下投与を複数回繰り返す(2週間間隔で4~6回程度、免疫に要する期間:2~3ヶ月程度)ことで抗原特異的抗体を誘導しており、実質的にこの方法以外の免疫法は存在しない。この皮下免疫は、抗原をエマルジョン化することで免疫原性を高め、体液性免疫を刺激して抗体を誘導するが、免疫に要する期間が長い、多様な抗体を得ることができない、膜タンパクや糖鎖抗原に対する特異抗体の作成が極めて困難といった課題がある。

研究代表者らはこれまで、リポソームを用いた抗がん剤デリバリーの研究を行う中で、強力な抗原提示細胞として注目されている脾臓辺縁帯 B 細胞(MZ-B 細胞)に直接抗原を送達できる技術を発見した。MZ-B 細胞は合成高分子のポリエチレングリコール(PEG)を認識する IgM を提示しており、PEG 修飾リポソームを前投与することで活性化され、その後にモデル抗原としてオボアルブミン(OVA)を封入した PEG 修飾リポソームを投与すると、MZ-B 細胞がこれを取り込んで T 細胞領域と近接する濾胞(FO)領域に移動し、OVA に対する抗体を速やかに分泌することを明らかにした(図1)。従来の皮下免疫と比較して、新規免疫法(脾臓免疫)は免疫期間を 1/2~1/3 に短縮し、且つ約 25 倍高い抗体価の IgG 抗体を誘導することが可能であり、皮下免疫と比較して 1/10~1/100 程度の低抗原量での免疫でも IgG 抗体を誘導することができる。また、皮下免疫ではキャリアタンパクを修飾しないと抗体の誘導が困難なペプチド抗原に対して、脾臓免疫では非修飾のペプチド抗原を用いて IgG 抗体の誘導が可能であることを示した。さらに、誘導される IgG 抗体のサブクラスとして、皮下免疫では IgG1 のみが誘導されるが、脾臓免疫では IgG1 に加えて IgG2a、IgG2b、IgG3 を誘導できることを見出している。この脾臓への直接的な抗原送達は世界的にも類を見ない極めてユニークな技術であり、脾臓免疫を用いた抗体製造技術に関して特許出願を行った(PCT/JP2020/020029)。

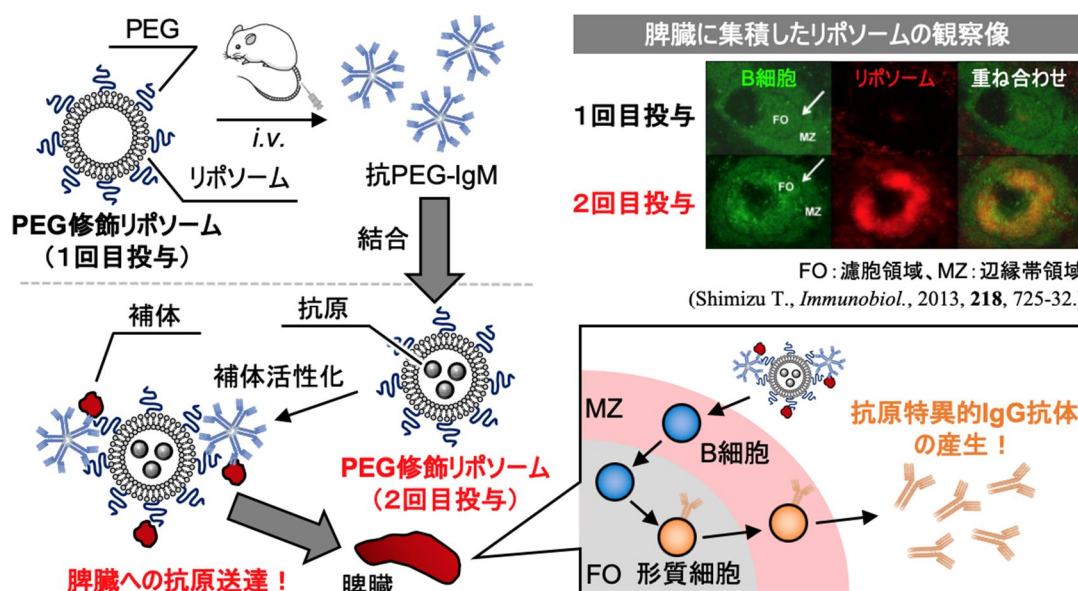


図1. PEG 修飾リポソームを用いた脾臓免疫による抗原特異的 IgG 誘導

一方、既存のリポソームを用いた免疫において、可溶性の抗原であればリポソーム内水層に封入して免疫することができるが、膜タンパクのように膜貫通領域(疎水部)と膜外領域(親水部)からなる複合タンパクはリポソームに封入することが難しく、また結合活性のある抗体を誘導するために立体構造を維持してリポソーム膜上に発現させる必要があるため、そのハードルは極めて高い。これを克服するため、本研究課題では、細胞同様に膜タンパクを発現し、細胞間のシグナル伝達ツールとして生体内で恒常的に分泌されているエクソソームに着目し、これを脾臓免疫に応用することを目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、活性を有した膜タンパクを発現するエクソソームを脾臓免疫に用いることで、膜タンパクに対する高活性な抗体を製造する新たなプラットフォームを構築することである。

3. 研究の方法

エクソソームを回収するホスト細胞として、免疫した際の抗原性を高めるため、免疫する動物 (BALB/c マウス) とは異なるマウス種由来の細胞 (B16 メラノーマ細胞) を拡大培養し、超遠心法を用いて培養上清中のエクソソームを回収した。これに PEG 脂質懸濁液を添加して反応させることで、PEG 修飾エクソソーム (PEG-Exo) を調製した。エクソソームの脾臓免疫として、空の PEG 修飾リポソーム (PEG-Lip) を静脈内投与した 3 日後に PEG-Exo を静脈内投与し、これを 14 日おきに 2 回繰り返した。エクソソームの皮下免疫として、エクソソーム懸濁液とフロイント完全/不完全アジュバントを混合したエマルジョンを皮下投与し、これを 14 日おきに 2 回繰り返した。最終投与 11 日後に抗血清を回収し、全自動ウェスタン装置 (Wes™) でエクソソームタンパクへの結合性を評価し、免疫染色法でホスト細胞への結合性を評価した。プロテイン G カラムでポリクローナル抗体 (pAb) を精製し、エクソソームに対する結合親和性を Octet システムを用いて評価した。各免疫法で誘導された pAb が認識するタンパク質を同定するため、Protein G を結合させた磁気ビーズに各 pAb を結合させ、B16 由来エクソソームのタンパク抽出液を反応させた後、pAb が認識するタンパクの網羅的解析を行った。皮下免疫 pAb あるいは脾臓免疫 pAb がそれぞれ認識するタンパクに対してスカッタープロットを作成した。

次に、ホスト細胞として、免疫する動物とは異種のヒト由来細胞 (HepG2 ヒト肝臓がん細胞) を用いた。HepG2 細胞を 4 日間培養し、培養上清を超遠心することにより、エクソソームを回収した。エクソソーム懸濁液と PEG 脂質溶液を混合することで、PEG-Exo を調製した。上記と同様に、PEG-Lip 静脈内投与後に PEG-Exo を静脈内投与することで脾臓免疫を行った。対照群として、HepG2 細胞とフロイントアジュバントを混合したエマルジョンを皮下投与した。それぞれ 2 週間間隔で合計 2 回免疫し、得られた抗血清を用いて、HepG2 細胞由来タンパク質に対する結合性を Wes™ を用いて評価した。ガラスボトムディッシュに播種した HepG2 細胞に、それぞれの抗血清を添加し、蛍光色素である Alexa Fluor 488 で標識された 2 次抗体を添加することで染色を行い、蛍光顕微鏡で観察を行った。また、同様の染色を行った後、フローサイトメトリーで細胞への結合性を評価した。

4. 研究成果

回収したエクソソームの物性を評価したところ、粒子径が約 100 nm 程度であった。また、マーカータンパクの発現を評価したところ、エクソソームのマーカーとして知られている CD83 および CD9 の発現が認められた。これより、エクソソームは問題なく回収できていると判断した。回収した抗血清のエクソソームタンパクに対する結合性を評価したところ、脾臓免疫および皮下免疫のいずれにおいても、B16 由来エクソソームタンパクに結合性を示す抗体が誘導されていることを示した。また、抗血清の B16 細胞への結合性を免疫染色で評価したところ、皮下免疫と比較して、PEG-Exo の脾臓免疫で得られた抗血清の方で、B16 細胞を認識する抗体が多く含まれている様子が見られた (図 2)。誘導した pAb が認識するタンパク質を網羅的に解析したところ、検出された全 1,626 種類のタンパクの内、皮下免疫 pAb で検出量が上昇したタンパクは全体の 5.78% であったのに対し、脾臓免疫 pAb で検出量が上昇したタンパクは 8.24% であり、脾臓免疫でより多くのタンパクに対する抗体を誘導できることを示した。検出した標的タンパクの細胞内局在 (細胞外領域、細胞膜、細胞質、核) で分類したところ、皮下免疫 pAb あるいは脾臓免疫 pAb のいずれにおいても、細胞内に局在する様々なタンパクに対する抗体の誘導が認められ、特に抗体誘導が難しいとされる細胞膜に局在するタンパクが比較的多く検出された。

HepG2 由来エクソソームの脾臓免疫で得られた抗血清の結合性評価として、Wes™ を用いて HepG2 細胞由来タンパク質に対する結合性を観察したところ、皮下免疫で得られた抗血清ではバンドがほとんど検出されなかったのに対し、脾臓免疫で得られた抗血清では HepG2 細胞由来のタンパク質に対する多くのバンドが認められた。また、HepG2 細胞に対する結合性を蛍光免疫染色法で観察したところ、皮下免疫で得られた抗血清では HepG2 細胞表面への結合性が認められなかったのに対し、脾臓免疫で得られた抗血清においては HepG2 細胞表面への強い結合性を示すことが明らかとなった。また、別に播種した HepG2 細胞を回収し、それぞれの抗血清を添加して同様の 2 次抗体で染色した後にフローサイトメトリーで解析したところ、免疫染色と同様に脾臓免疫で得られた抗血清でのみ細胞を認識する抗体が誘導されていることを示した。これらの結果から、脾臓免疫技術を用いてエクソソームを脾臓免疫することで、ホスト細胞の膜表面に発現する膜タンパクに対する抗体を効率的に誘導可能であることが示された。

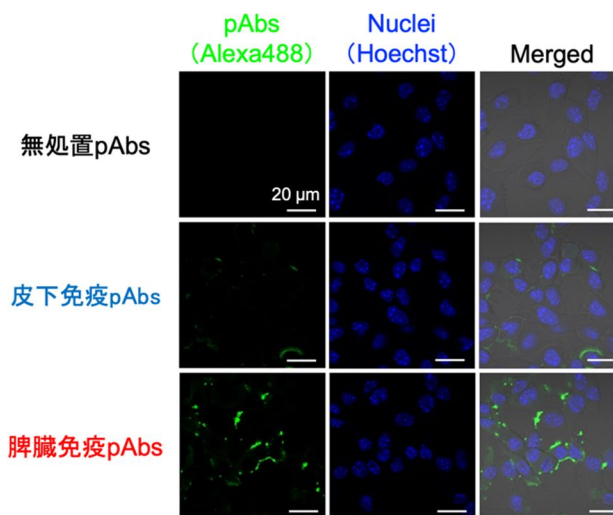


図 2. 脾臓免疫あるいは皮下免疫で得られた抗体のホスト細胞に対する結合性評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福本真子、安藤英紀、倉本伶音、高田春風、石田竜弘
2. 発表標題 エクソソームの脾臓免疫による抗体誘導評価：ホスト細胞膜表面に対する結合性評価
3. 学会等名 第2回日本抗体学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 倉本 伶音、安藤 英紀、清水 太郎、異島 優、石田 竜弘
2. 発表標題 緑色蛍光タンパク質（EGFP）をモデル抗原として封入したPEG修飾エクソソームの脾臓送達による抗原特異的抗体の誘導
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉本伶音、安藤英紀、清水太郎、異島優、石田竜弘
2. 発表標題 エクソソームの脾臓免疫で得た抗血清（ポリクローナル抗体）の結合性評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	清水 太郎 (SHIMIZU Taro) (30749388)	大阪大学・微生物病研究所・特任講師（常勤） (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石田 竜弘 (ISHIDA Tatsuhiro) (50325271)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・教授 (16101)	
研究分担者	小出 裕之 (KOIDE Hiroyuki) (60729177)	静岡県立大学・薬学部・准教授 (23803)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関