

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670462

研究課題名(和文) マグネタイト・ナノ粒子を用いた新規結核ワクチン開発のための基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study for development of a novel anti-tuberculosis vaccine using magnetite nanoparticles

研究代表者

川上 和義 (KAWAKAMI, KAZUYOSHI)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10253973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：結核は今なお健康上の重大な脅威であり、新規ワクチンの開発が求められている。近年、ナノ粒子技術を活用したワクチン開発が行われているが、酸化鉄(マグネタイト)を用いた報告はほとんどない。本研究では、マグネタイト・ナノ粒子を用いた新規ワクチン開発へ向けた基礎的研究を行った。6個のアルギニン(arginine)を付加したgreen fluorescence protein(GFP)をナノ粒子に結合することに成功するとともに、GFP結合ナノ粒子をマウスの肺内に投与することで、樹状細胞に取り込まれ免疫応答が誘導されることを明らかにした。この技術を用いることで、ワクチン抗原を導入した新規ナノ粒子ワクチンの開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Tuberculosis is still an important health problem in the world, and development of a more effective vaccine has been desired. Recently, a novel approach using a nanoparticle technology has been conducted for development of vaccine. In this study, we performed a basic investigation to develop a new vaccine using magnetite nanoparticles. We succeeded in binding green fluorescence protein (GFP) to magnetite nanoparticles by introducing tandemly-arranged 6 arginines into this protein. In addition, we demonstrated that GFP-bound nanoparticles were incorporated by dendritic cells in the lungs of mice after intratracheal inoculation, which led to the immune response to this protein. Development of a novel vaccine may be expected by introducing vaccine antigen into the magnetite nanoparticles.

研究分野：感染症内科

キーワード：ナノ粒子ワクチン

1. 研究開始当初の背景

結核は人類の約 1/3 が感染しており、年間約 950 万人が発症し、約 170 万人が命を落としている。近年は、多剤耐性結核による難治性結核が増加しており重大な問題となっている。肺結核の約 90% は潜伏感染していた結核菌が再活性化（内因性再燃）することで発症することから、休眠状態（dormancy）の結核菌を再活性化させないことが予防には重要である。古くから BCG がワクチンとして用いられてきたが、乳幼児の結核性髄膜炎や粟粒結核への有効性は確立しているものの、成人の肺結核への予防効果は明らかではない（Lancet 379: 1902, 2012）。このように、結核を予防するためには成人結核にも有効なワクチンの開発が不可欠であり、これまで多くの研究が行われてきた。

近年、感染症やがんの領域でナノ粒子技術を活用したワクチン開発の報告がいくつかあるが、その多くが非金属を基剤としており、マグネタイトを用いた研究はほとんどない。これまでに我々は、酸化鉄 Fe_3O_4 （マグネタイト）を基材とするナノ粒子を開発してきた。本ナノ粒子は、反応時間・反応温度を変化させることで自在にサイズを小さくすることができ、水分散性（水溶性）が格段に優れているとともに、表面修飾により種々の物質を結合させることが可能である。また、マグネタイトを基剤とするナノ粒子は、その磁性特性により MRI の造影剤としても活用できる。

本研究では、このような特性を利用し、結核ワクチンの必須要件を満たす有効性の高い酸化鉄ナノ粒子ワクチンの開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、酸化鉄 Fe_3O_4 （マグネタイト）を用いた新規ナノ粒子結核ワクチンの開発を目指し、その基礎的研究を実施する。

3. 研究の方法

(1) FITC の酸化鉄ナノ粒子への結合

カルボキシル基修飾ナノ粒子（ $0.25 \text{ m}^2/2.8 \text{ mg/ml}$ の 20 nm ）（図 1）に $0 \sim 80 \mu\text{M}$ の FITC、

FITC-(Arg)₆ あるいは FITC-(Arg)₈ を 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) バッファー中で室温 10 分間結合させ、遠心上清

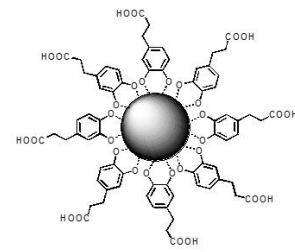


図1. カルボキシル基修飾ナノ粒子

中の蛍光量を SPECRTAmax (Molecular Devices, Ex: 485, Em: 538) で測定した。蛍光量から結合 FITC 量と未結合 FITC 量を算出し、結合曲線（図 2）を作成した。

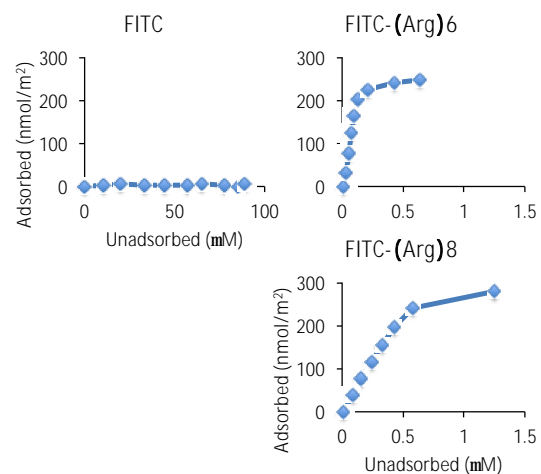


図 2. FITC-(Arg)_n のナノ粒子への結合

(2) GFP の酸化鉄ナノ粒子への結合

GFP 発現プラスミド pET20b-ZnOBP-GFP (J. Phys. Chem. B 2010, 114, 480–486) の ZnOBP 部分を削除したプラスミド pET20b-(Arg)₀-GFP、あるいは (Arg)₆ をコードするオリゴヌクレオチドと入れ替えたプラスミド pET20b-(Arg)₆-GFP を作製し、GFP または GFP-(Arg)₆ を大腸菌で発現させた。これらの精製には His タグを利用した。1)と同じ条件でカルボキシル基修飾 (COOH(+)-) ナノ粒子あるいは非修飾 (COOH(-)-) ナノ粒子に $0 \sim 500 \mu\text{g/ml}$ の GFP および GFP-(Arg)₆ を結合さ

せ、解析した。

(3) 酸化鉄ナノ粒子のマウス肺内への投与

FITC または GFP を結合した、あるいは結合していない酸化鉄ナノ粒子を麻酔下で C57BL/6 マウスの気管内に直接投与した。

(4) 酸化鉄ナノ粒子投与マウスの肺及び所属リンパ節における免疫応答の解析

マウスの気管内に FITC または GFP を結合した、あるいは結合していない酸化鉄ナノ粒子を投与後経時的に肺内白血球及び、所属リンパ節として傍気管リンパ節細胞を採取した。得られた細胞を PE 標識 CD11c 抗体で染色した後、フローサイトメトリーを用いて CD11c 陽性細胞における FITC または GFP の発現を解析した。併せて、ナノ粒子投与後の肺内でのサイトカイン産生についても検討した。

(5) ワクチン抗原の酸化鉄ナノ粒子への結合

結核ワクチン抗原に先立ち、ワクチン抗原の酸化鉄ナノ粒子への導入条件を設定する目的で、肺炎球菌の抗原タンパク質のひとつである PspA を用いた検討を行った。PspA を発現するプラスミド pUAB055 (大阪大学・明田幸宏博士) の PspA 遺伝子上流に (Arg)₆ をコードするオリゴヌクレオチドを組み込んだ。

4. 研究成果

(1) FITC の酸化鉄ナノ粒子への結合

FITC 単独はナノ粒子に全く結合しなかったが、FITC-(Arg)₆ および FITC-(Arg)₈ では結合が見られた(図2)。結合定数は FITC-(Arg)₆

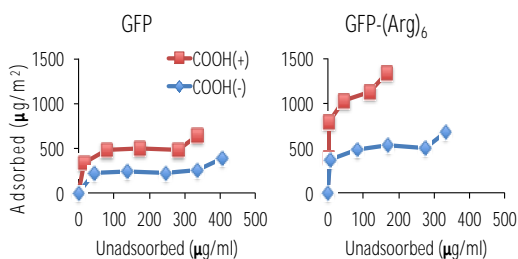


図3. GFP-(Arg)_n のナノ粒子への結合

が 1.4×10^6 、FITC-(Arg)₈ が 4.6×10^5 と算出され、FITC-(Arg)₆ の結合がより強いことが明らかになった。

(2) GFP の酸化鉄ナノ粒子への結合

GFP-(Arg)₆ は COOH(+)-ナノ粒子に強く結合したが、COOH(-)-ナノ粒子にも弱く結合した(図3)。また、GFP のみでも COOH(+)-ナノ粒子との弱い結合および COOH(-)-ナノ粒子とのさらに弱い結合が認められた。(Arg)₆ と COOH 基との間の塩橋反応以外の結合が起こっていると推測される。

(3) FITC 結合酸化鉄ナノ粒子の肺内投与後の樹状細胞への取り込み

肺内に投与した酸化鉄ナノ粒子の動態を調べる目的で、FITC を結合したナノ粒子をマウスの気管内に投与し、2 日後の肺内白血球及び傍気管リンパ節細胞を採取した。樹状細胞による FITC の取り込みをフローサイトメトリーで解析したところ、肺及びリンパ節の樹状細胞で明らかなナノ粒子の取り込みが観察された。

(4) GFP 結合酸化鉄ナノ粒子の肺内投与後の樹状細胞への取り込みと免疫応答

肺内に投与したワクチン抗原結合ナノ粒子の動態を調べる目的で、ワクチンの代わりに GFP を結合した酸化鉄ナノ粒子をマウスの気管内に投与した。1 日、3 日後の肺内白

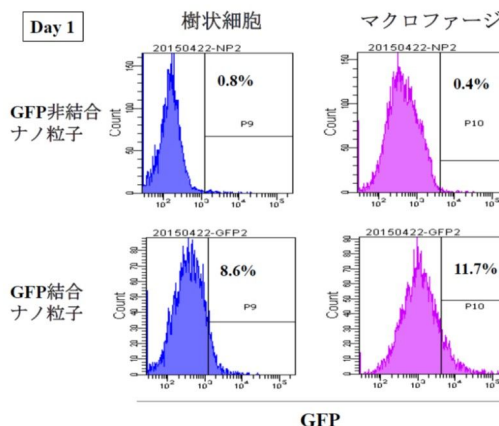


図4. GFP結合ナノ粒子の樹状細胞による取り込み

血球及び傍気管リンパ節細胞を採取し、樹状細胞及びマクロファージへの GFP 結合ナノ粒子の取り込みをフローサイトメトリーで解析したところ、1 日後で GFP を取り込んだ細胞を検出できたものの、3 日後では明らかな陽性細胞は検出できなかった（図 4）。

一方、リンパ節細胞については、24 時間後腫脹したリンパ節が認められなかったため解析ができず、3 日後では GFP 陽性の樹状細胞は検出できなかった。3 日後の肺及びリンパ節で GFP 陽性樹状細胞が検出できなかった理由として、ナノ粒子に結合していた GFP が樹状細胞に取り込まれた後消化された可能性が考えられる。また、GFP 結合ナノ粒子投与 7 日後の肺内で IFN- γ の産生を確認した。

(5) ワクチン抗原結合酸化鉄ナノ粒子作製へ向けた基礎的検討

シークエンスにより PspA-(Arg)₆ を発現するプラスミドが作製できたことを確認した。現在最適発現条件の検討を行っている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

川上 和義 (KAWAKAMI, Kazuyoshi)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 10253973

(2) 研究分担者

石井 恵子 (ISHII, Keiko)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号 : 00291253

高見 誠一 (TAKAMI, Seiichi)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号 : 40311550

富樫 貴成 (TOGASHI, Takanari)

山形大学・理学部・研究支援者

研究者番号 : 80510122

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし