

令和元年6月14日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06589

研究課題名(和文)ヘミン誘導体から構成される免疫活性化剤の開発

研究課題名(英文)Development of a hemin-containing copolymer as a novel immunostimulator

研究代表者

山崎 智彦 (YAMAZAKI, TOMOHIKO)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・主幹研究員

研究者番号：50419264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マalaria原虫が合成するヘム結晶であるヘモゾインは自然免疫受容体であるToll様受容体9を介して免疫を活性化させる。我々はヘモゾインのヘム繰り返し構造に着目し、新規ヘム含有免疫活性化剤を開発した。ヘミンとN-イソプロピルアクリルアミドをラジカル重合させることにより得られた水溶性ヘミン含有共重合体は免疫細胞で構成されるヒト末梢血単核細胞からインターフェロン γ とインターロイキン6の産生を誘導した。またマウスを用いた実験では抗原に対するIgEをほとんど誘導せず、IgG2産出のみを増強した。このことから、アジュバントの候補分子としてワクチン開発への応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヘモゾインのヘム繰り返し構造に着目し、新規ヘム含有免疫活性化剤を開発した。開発した分子は抗体産出を誘導する水溶性分子であることから、ワクチン添加剤としての扱いが容易である。核酸をベースとした既存アジュバントと比較して安定性が高く、また粒子をベースとした既存アジュバントと比較して炎症の誘発が低いことから、安全かつ効果の高いアジュバント分子であり、今後ワクチンへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Toll-like receptor 9 (TLR9) plays an important role in the production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules necessary for the activation of immunity. TLR9 agonists have attracted much attention for the development of vaccine adjuvants or therapeutic reagents for cancer and allergies.

Hemozoin, a biocrystal synthesized by the Plasmodium parasite, is responsible for the induction of a strong inflammatory response mediated by TLR9 activation. We focused on the heme-repeated structure on the hemozoin surface, we synthesized a novel hemozoin mimicking polymer and evaluated its stimulatory effects in vitro. In human immune cells, the hemozoin-mimicking polymer induced the production of large amounts of interferon gamma, which is the major molecule involved in the differentiation of T helper cells to Th1 cells. Therefore, the polymer shows potential as a new adjuvant.

研究分野：蛋白質工学、細胞工学

キーワード：ヘモゾイン トール様受容体 アジュバント ヘミン イソプロピルアクリルアミド インターフェロン インターロイキン 末梢血単核球細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トール様受容体は微生物の持つ共通した分子構造を認識するパターン認識受容体として働き、細菌、真菌、寄生虫、ウイルスでよく保存された特徴的な構成成分である細胞膜成分、DNA、RNAなどを認識することで病原体の侵入を感知し、細胞からのサイトカイン産出を誘導し、免疫細胞を活性化する。トール様受容体の中でもトール様受容体 9 (TLR9) はエンドソーム内に局在し、細菌・ウイルス由来の非メチル化 DNA を認識し、サイトカインを誘導することで免疫細胞を活性化する。また、TLR9 は人工的に合成したシトシン(C)-グアノシン(G)配列を複数有するオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)をリガンド分子とすることから、免疫活性化剤(アジュバンド)として CpG ODN の開発が進められてきた。

現在まで、CpG ODN のヌクレアーゼ耐性の獲得ならびに細胞への取込みの向上を目的とした開発が多く報告されているが、その方法は DNA 鎖の骨格に硫酸基を導入した S 化 ODN を用いるものであった。しかしながら、S 化 ODN は非特異的にタンパク質に吸着するため、それに起因する循環器や肝臓に対する副作用が報告されており、医薬応用に限界がある。

2010 年に阪大の審良教授らのグループがマラリアに感染した場合にマラリア原虫によって産出されるヘモグロビン代謝物であるヘモゾインが TLR9 のリガンド分子であることが報告された(Cell Host & Microbe 7, 50-61, 2010)。ヘモゾインはヘミンの結晶であり、in vitro で合成することができる。合成ヘモゾインも TLR9 のリガンド分子として機能することが報告されている。しかしながら、ヘモゾインならびにヘミンは中性では水に不溶であるため、TLR9 とヘモゾインの相互作用は未解明である。そのため、ヘモゾインを改良しアジュバンドとして臨床に用いるには限界があり、ヘモゾインそのものの臨床応用の報告も数例に留まっている。

2. 研究の目的

本研究ではヘモゾインのヘム繰り返し構造に着目し、新規ヘム含有水溶性ポリマーを合成し、ヘム含有水溶性ポリマーの免疫活性化能の評価を行いワクチンアジュバンドとしての効果を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヘム含有水溶性ポリマー (NIPAM-hemin) の合成

ヘミン (1.50g), NIPAM (25.87 g) と 2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル) (AIBN) (0.39 g) をピリジン (5 mL) と DMF (20 mL) を含む溶液に加え混合し、アルゴンガスを 20 分間注入することで溶液中の酸素を除いた。反応溶液を含む 100mL ナスフラスコは 85 に加温したオイルバス中で 48 時間静置した。未反応のヘミンを除くため、反応後溶液を約 20 倍量のジエチルエーテルに加えた。得られた沈殿物はメタ

ノールに溶解後、メタノールで平衡化したシリカゲル (Silica gel 60) 充填カラムに展開させ、水溶性の画分を回収した。溶媒をエバポレーターで除去し得られた沈殿物 (NIPAM-hemin) は滅菌超純水に溶解させた。

(2) ヘム含有水溶性ポリマー (NIPAM-hemin) の物性解析

NIPAM-hemin は臭化リチウム水和物を含むアセトニトリル/水 (= 2/3) を移動相とするサイズ排除クロマトグラフィー (Shodex SB-804 HQ と SB-802.5 HQ 連結カラム) で分離した。分離ピークの保持時間をポリ (4-スチレンスルホン酸ナトリウム) で作成した検量線と比較し、NIPAM-hemin の数平均分子量 (Mn) と重量平均分子量 (Mw) を求めた。

NIPAM-hemin に含まれる鉄含量を高周波誘導結合プラズマ (ICP-OES) 発光分析法を用いて測定するため、NIPAM-hemin を希硝酸、希硫酸、過塩素酸で処理し分解乾固した。ICP-OES スペクトルは Agilent 720-ES (Agilent technology 社) を用いて測定した。

分光光度計 (U-2900, 日立製作所 (株)) を用いて DMSO に溶解した UV-VIS スペクトルを測定した。IR スペクトルは NIPAM-hemin を臭化カリウム (KBr) と混合してペレットを調製し、積算回数 20 回、分解能 4 cm⁻¹、測定波数領域 400 ~ 400 cm⁻¹ の

条件下のもと、IRTracer-100 (島津製作所 (株)) を用いて測定した。動的光散乱測定は DLS-8000 (大塚電子 (株)) を用いて37 °Cで行った。

(3) 末梢血単核球細胞 (PBMCs) からのサイトカイン誘導評価

PBMCs は96 ウェルプレートに 1.0×10^6 個/ウェルで播種し、NIPAM-hemin、ヘミン、NIPAM およびpoly-NIPAM(MW=66,400 Da)を終濃度が500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。NIPAM-hemin、NIPAM、poly-NIPAM は滅菌超純水に溶解し、ヘミンはDMSO に溶解し調製した。PBMCs は37 °C、5% CO₂ 雰囲気下で48 時間培養後、4 °C、 $10,000 \times g$ で10 分間遠心し培地上清を回収した。培地中に含まれるIFN- γ 、IL-6、IL-1 β およびIFN- α 量はReady-Set-Go! ELISA kits(Thermo社) を用いて測定した。

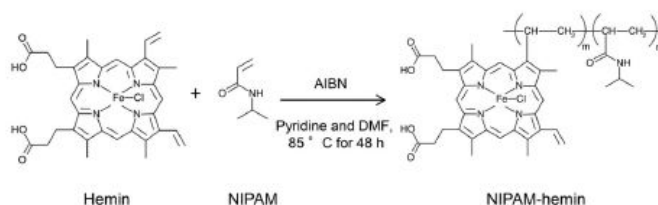
(4) NIPAM-hemin の免疫賦活作用の評価

5 週齢目のBALB/c マウス () に抗原であるオプアルブミン (5 μg) と NIPAM-hemin もしくは既存アジュバンドである水酸化アルミニウム(500 μg)は、0、1 並びに2 週齢目の時点でマウスの皮下に投与した。3 週齢目が経過した時点でマウスの全身血はヘパリンを含む採血管で採取され、遠心分離により血漿を調製した。血漿中のOVA に特異的なIgG1、IgG2a/b並びにIgE 産生量は ELISA を用いて測定した。動物実験はNIMS が定める「動物実験の実施に関する規程」に遵守して行われた。

4. 研究成果

(1) ヘム含有水溶性ポリマー (NIPAM-hemin) の合成

図1 にヘミンとNIPAM の重合方法を示した。ヘミンとNIPAM はモル比で1:100 となるように混合し、85 °Cで48 時間反応させた。未反応のヘミンは再沈殿操作によ



り反応後溶液から取り除き、得られた沈殿物はメタノールに溶解後、シリカゲルクロマトグラフィーを用いて分離した。水溶性画分を回収し溶媒除去後、得られた沈殿を NIPAM-hemin と命名した。NIPAM-hemin は水、DMSO、メタノールに溶解した。

図1 ヘム含有水溶性ポリマーの (NIPAM-hemin) の合成

サイズ排除クロマトグラフィーの結果、NIPAM-hemin の数平均 (M_n) 並びに重量平均 (M_w) 分子量はそれぞれ 1.5×10^3 並びに 3.2×10^3 Da であり、 M_w/M_n で求められる多分散度 (PDI) は2.10 であった

ICP-OES 測定の結果、1 mg のコポリマー中に 11.5 μg の鉄が含まれていた。したがって、鉄とヘミンの数量が等しいことを利用し、NIPAM-hemin 中のヘミンと NIPAM のモノマー比は1:37 と算出された。

NIPAM-hemin の UV-VIS スペクトルの測定の結果を図2 に示した。NIPAM-hemin のスペクトルはヘミンのソーレ帯と Q 帯領域に由来する 398 nm と 570 nm の吸収を有していた。

FTIR 測定の結果、NIPAM-hemin の IR スペクトルには NIPAM の -CH₃ 振動 ($1,458 \text{ cm}^{-1}$)、C-N 振動 ($1,547 \text{ cm}^{-1}$) 並びに C=O 振動 ($1,651 \text{ cm}^{-1}$) に由来するバンドピークが存在していた。NIPAM の C=C 結合に由来する $1,622 \text{ cm}^{-1}$ のピークは、NIPAM-hemin の IR スペクトルに存在しなかった。したがって、NIPAM のビニル基はヘミンとの重

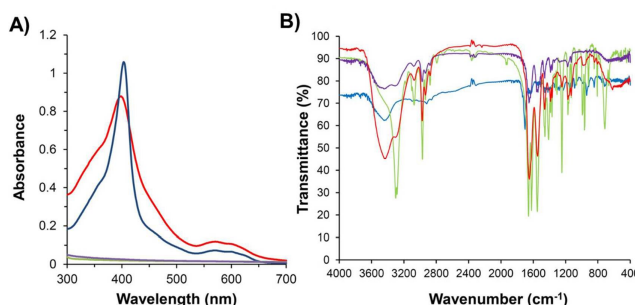


図2 ヘム含有水溶性ポリマー (NIPAM-hemin) の UV-VIS スペクトル (A) と FTIR スペクトル (B) ヘミン (青), NIPAM (緑), and poly-NIPAM (紫).

合反応に使用されたことを確認した

(2) 末梢血単核球細胞 (PBMCs) を用いたNIPAM-Heminの免疫活性化能の評価

図3にNIPAM-hemin によるPBMCs からのIFN-g、IL-6、IL-1bの誘導量を示した。NIPAM-hemin はPBMCs よりIFN-gとIL-6 を誘導した。特にNIPAM-hemin によるIFN- γ の誘導量は

poly-NIPAM による誘導量の約11 倍であった。一方で、NIPAM-hemin によるIL-6 の誘導量はpoly-NIPAM による誘導量と同程度であった。

Poly-NIPAM によるIL-1 β の誘導量が80 pg/mL であったのに対し、NPAM-hemin による誘導量は10 pg/mL であった。IFN- α の誘導量はすべての投与試薬において検出限界以下であった。これらの結果から、NIPAM-heminはIL-1 β を誘導しないことから、

NIPAM-heminによるIL-6の誘導には尿酸結晶やシリカ粒子や水酸化アルミニウムなどにより誘導されるNLRP3のインフラマソームは介していないこと。

顕著にIFN- γ の産生を誘導すること。が明らかとなった。NIPAM-hemin による免疫活性化作用にTLR9 が関与しているか調べるため、TLR9 を発現するレポーター細胞を用いたNF- κ B シグナルの活性化評価を行った。その結果、NIPAM-heminによる免疫活性化にはTLR9は関与していないことが示された。また、マクロファージに対する影響を調べたところIL-6に加えてIL-12を誘導していることが示された。これらの結果から、細胞質に存在する自然免疫受容体でインターフェロン やIL-6 の産生に關与するSTINGやIFI16などのDNA 認識受容体が挙げられ、ヘミン誘導体はこれらの受容体を介して、免疫を活性化している可能性が示唆された。

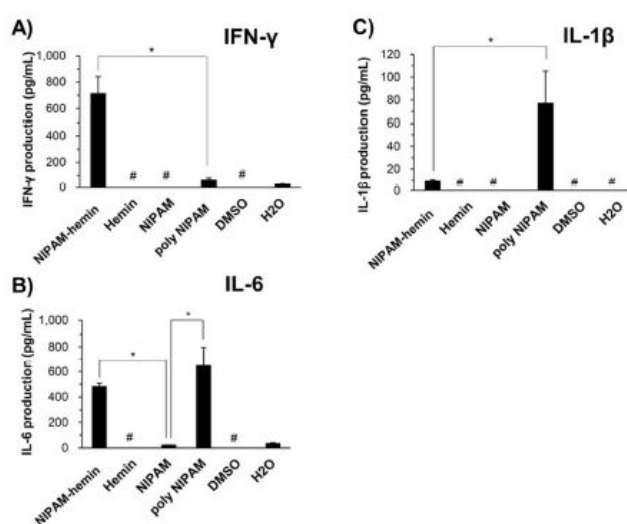


図3 ヘム含有水溶性ポリマー (NIPAM-hemin) によるヒト末梢血単核細胞 (PBMC) からのサイトカイン類の誘導

(3) マウスを用いた NIPAM-hemin の免疫賦活作用の評価

NIPAM-hemin の免疫賦活作用を調べるため、NIPAM-hemin をオブアルブミン (OVA) と共にマウスの皮下に投与した。その後、血漿中に含まれる OVA 特異的 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgE 産生量をELISA 法により測定した。図4に示すように既存のアジュバンドである水酸化アルミニウムがIgE 抗体を誘導するのに対して、NIPAM-hemin はIgE 抗体は誘導しなかった。一方で IgG2 抗体は水酸化アルミニウムと同程度誘導した。これらの結果から、NIPAM-hemin は副作用が低いアジュバンド分子として機能する可能性が示された。

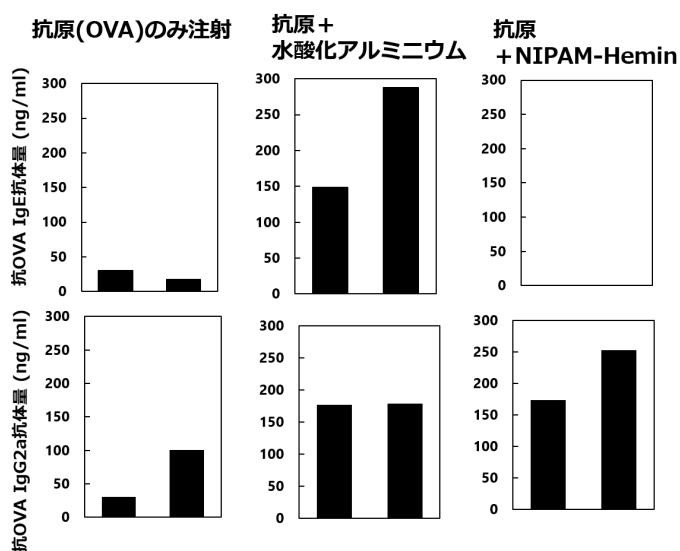


図4 ヘム含有水溶性ポリマー (NIPAM-hemin) のマウスでのアジュバンド効果

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. K. Hoshi, T. Yamazaki *, C. Yoshikawa, W. Tsugawa, K. Ikebukuro, K. Sode, *Synthesis of a hemin-containing copolymer as a novel immunostimulator that induces IFN-gamma production.* Int. J. Nanomedicine, 査読有. **13**, 4461-4472 (2018).
DOI <https://doi.org/10.2147/IJN.S166259>

〔学会発表〕(計6件)

1. T. Yamazaki, Development of a polymer based immunostimulatory ligand mimicking malarial hemozoin. CSIRO-NIMS symposium. 2018 (招待講演)
2. T. Yamazaki, Development of novel immunostimulatory ligands of Toll-like receptor 9 as potent activators of the innate immune system. Second Interdisciplinary and Research Alumni Symposium iJaDe2018. 2018 (招待講演)
3. T. Yamazaki, Development of novel immunostimulatory ligands of toll like receptor 9, as potent activators of the innate immune system. 6th Annual Meeting of Hypoxia and Oxidative Stress Studies. 2018 (招待講演)
4. K. Hoshi, W. Tsugawa, K. Sode, K. Ikebukuro, T. Yamazaki, Development of the immunostimulatory hemin-contained co-polymer. 第27回インテリジェント材料・システムシンポジウム. 2018
5. 星和明, 津川若子, 早出広司, 池袋一典, 山崎智彦, 免疫活性化能を有するヘミン含有ポリマーの開発. 第27回インテリジェント材料・システムシンポジウム. 2018
6. 星和明, 山崎智彦, 津川若子, 早出広司. ヘミン含有免疫活性化剤の開発. 第11回バイオ関連化学シンポジウム. 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：共重合体、免疫アジュバントおよび非ヒト動物を免疫する方法

発明者：山崎智彦、吉川千晶、星和明

権利者：国立研究開発法人物質・材料研究機構

種類：特願

番号：2018-112204

出願年：2018

国内外の別：国内

名称：ヘム骨格を有するポリマーアジュバント

発明者：山崎智彦、吉川千晶、星和明

権利者：国立研究開発法人物質・材料研究機構

種類：特願

番号：2017-171231

出願年：2017

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://samurai.nims.go.jp/YAMAZAKI_Tomohiko-j.html

<http://www.nims.go.jp/group/nanomedicine/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：吉川 千晶

ローマ字氏名：Yoshikawa Chiaki

所属研究機関名：国立研究開発法人物質・材料研究機構

部局名：国際ナノアーキテクトゥクス研究拠点

職名：主任研究員

研究者番号(8桁): 10447930

(2)研究協力者

なし