

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18935

研究課題名(和文) 経鼻投与型リポソームワクチンによる革新的な真菌症治療法の開発

研究課題名(英文) The development of intranasal vaccine using liposomes against fungal infections

研究代表者

多田 塁 (Tada, Rui)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：70635888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年増加傾向にある深在性真菌症には、粘膜ワクチンによる予防あるいは治療が有効だと考えられる。近年申請者は、正電荷リポソーム(DOTAP/DC-choIリポソーム)が種々の蛋白質抗原に対し、経鼻粘膜投与型の粘膜アジュバントとして機能することを報告している。そこで本研究では、真菌症ワクチンの開発を目的とし検討をおこなった。その結果、DOTAP/DC-choIリポソームを粘膜アジュバントとして用いることで、*Candida albicans*および*Aspergillus fumigatus*抗原に対し抗原特異的粘膜IgA、全身IgGおよびTh17応答を誘導可能な粘膜ワクチンシステムの構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：Mucosal vaccine systems are a promising therapeutic strategy for preventing and/or treating fungal infection, which is increasingly becoming associated with immunosuppressive conditions. We have recently found that intranasal administration of an antigenic protein with the DOTAP/DC-choI liposomes induced antigen-specific mucosal and systemic antibody responses in mice. Here, we attempted to develop a cationic liposome-based nasal vaccine against invasive fungal infections. As results, intranasal administration of DOTAP/DC-choI liposomes with CaSap2p and AfAspf3p, which are derived from *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*, respectively, induced antigen-specific mucosal IgA, systemic IgG, Th17 immune responses in mice.

研究分野：薬剤学、免疫学

キーワード：粘膜ワクチン 真菌感染症 リポソーム 粘膜アジュバント

## 1. 研究開始当初の背景

現代医療を以てしても、深在性真菌症など感染症のコントロールは難しい。近年のエイズの増加や免疫抑制療法の発達などによる易感染性患者増加により、真菌感染症は増加の一途を辿っている。これらのことから、新しい真菌感染症の克服法が望まれている。

その1つとして粘膜ワクチンが挙げられる。真菌症を含む感染症の多くは、粘膜面に感染あるいは粘膜を介し感染が成立するため、粘膜面で免疫応答を誘導可能な粘膜ワクチンが有効だと思われるが、実用化例は今のところ無い。この要因として、有効かつ安全な粘膜アジュバントが存在しないことが挙げられる。

即ち、有効かつ安全な粘膜アジュバントを開発することができれば、真菌症に対する新たな粘膜ワクチンを創製することが可能と考えられる。しかしながら、既存の粘膜アジュバントの多くは微生物由来の分子であり、その毒性や抗原性が問題となる方法論的障壁が存在していた。

## 2. 研究の目的

申請者は最近、ある種の正電荷リポソームが経鼻投与型の粘膜アジュバントとして作用することを見いだした。このリポソームは、粘膜免疫だけでなく全身免疫も活性化し、抗原特異的な抗体産生を惹起可能であった。さらに、このリポソームは Th1/Th2/Th17 応答を誘導する性質を有していた。そこで申請者は、粘膜面での抗原特異的 IgA 応答と Th17 応答誘導を利用することで、真菌症に対する新しい粘膜ワクチンを創製可能と考え、研究を着想した。

具体的には、真菌蛋白質抗原をリポソームと共に、経鼻的に免疫することにより、真菌感染に対し防御的な粘膜および全身免疫を誘導可能であると考えた。そこで本研究では、真菌蛋白質抗原に対する粘膜・全身免疫を誘導する新規リポソームワクチンの開発ならびに真菌感染モデルマウスに対する治療効果の検証を行い、真菌症克服に向けたリポソームワクチンの臨床応用を志向した基盤構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 正電荷リポソームの作製

正電荷脂質である 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) および 3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol

(DC-choI)の組成比を 1 : 1 (molar ratio) としたリポソーム(DOTAP/DC-choI liposome)を vortexing 法により調製し、100 nm のメンブランを用い extruder により整粒した。粒子径および 電位は、NICOMP 380ZLS を用いて測定した。

### (2) リコンビナント真菌由来抗原の発現プラスミド構築

真菌症ワクチン用の抗原として用いるリコンビナント蛋白質の作製を行った。*Candida albicans* (*C. albicans*) および *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) 菌体より total RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA ライブラリーを作製した。各遺伝子特異的プライマーを設計し、PCR により目的の DNA 断片を得たのち、pColdI vector へ Seamless Ligation Cloning Extract (SLICE) 法を用いてクローニングした。

### (3) リコンビナント真菌由来抗原の作製

(2)で作製した発現プラスミドを *E. coli* BL21 (DE3)または *E. coli* Shuffle へ形質転換した(可溶性リコンビナント蛋白質を得にくいなど、必要に応じて各種シャペロン発現プラスミドを同時に形質転換した)。スクリーニングにより目的抗原が可溶性蛋白質として得られているかを SDS-PAGE およびウェスタンブロット法により確認した。

得られた可溶性リコンビナント蛋白質は His タグを利用した TALON metal affinity resin によるアフィニティカラム精製、ゲル濾過後、エンドトキシン除去カラムを通した抗原サンプルを以下の実験に使用した。

### (4) 免疫スケジュールとサンプル回収

7 週齢の BALB/cCrSlc 雌性マウスに、作製したリコンビナント真菌抗原と DOTAP/DC-choI liposome を週 1 回経鼻投与した。これを Days 0、7 および 14 の 3 回に渡りおこない、最終投与日の 1 週間後 (Day 21) に血清あるいは粘膜洗浄液 (鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液および膈洗浄液) を採取した。

### (5) 抗原特異的抗体産生の検討

真菌抗原特異的抗体価 (エンドポイントタイター) は、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法にて検討した。リコンビナント真菌抗原を ELISA プレートに固相化後、BSA-PBST にてブロッキングした。PBST で洗浄後、血清もしくは粘膜洗浄液サンプルを添加、インキュベート後洗浄し、HRP 標識抗体 (anti-mouse IgG-HRP、anti-mouse IgG1-HRP、anti-mouse IgG2a-HRP および anti-mouse IgA-HRP) で処理し、TMB を用いて発色させ、1N リン酸にて反応停止後、吸光度を測定した。得られたシグモイド曲線からエンドポイントタイターを算出した。

### (6) 免疫マウス脾細胞からのサイトカイン産生の定量

DOTAP/DC-choI liposome とリコンビナント真菌抗原の経鼻投与により誘導される免疫応答の質的变化について、免疫マウス脾細胞からの各種サイトカイン産生を指標に検討した。7 週齢の BALB/cCrSlc 雌性マウスに、作製したリコンビナント真菌抗原と

DOTAP/DC-cholesterol liposome を週 1 回経鼻投与した。これを Days 0、7 および 14 の 3 回に渡りおこない、最終投与日の 1 週間後 (Day 21) に免疫マウスから脾細胞を調製した。得られた脾細胞に対し、リコンビナント真菌抗原で 2 次刺激をおこない *in vitro* 培養した。72 時間後に培養上清を回収し、ELISA 法によって各種サイトカイン濃度を定量した。

#### 4. 研究成果

本研究により、下記の成果が得られた。

1. *C. albicans* および *A. fumigatus* 可溶性抗原の大腸菌発現系を構築した。
2. DOTAP/DC-cholesterol liposome と共に経鼻投与することにより、*C. albicans* および *A. fumigatus* 抗原に対する特異的抗体産生を粘膜および全身の両面で誘導することが可能となった。
3. DOTAP/DC-cholesterol liposome により誘導される抗原特異的サイトカイン産生の検討から、Th1/Th2/Th17 を効果的に誘導可能であることが示された。

下記に詳細を示す。

##### (1) 可溶性真菌抗原の作製

ワクチン用抗原として必須である可溶性リコンビナント蛋白質の大腸菌発現系を構築することを目的とした。多種の *C. albicans* および *A. fumigatus* 候補抗原を pCold vector ヘクローニングし、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* Shuffle またはシャペロン共発現系を用いて発現誘導をおこなった。その結果、いくつかの可溶性抗原を得た。その中で、発現量が良好であった CaSap2p および AfAspf3p を TALON metal affinity resin によるアフィニティ精製、ゲル濾過クロマトグラフィーとエンドトキシン除去カラムによって高純度 CaSap2p と AfAspf3p を得ることに成功した。

##### (2) DOTAP/DC-cholesterol liposome と真菌抗原の経鼻投与による抗原特異的抗体産生

得られた真菌抗原に対し、効果的に粘膜および全身において免疫応答を誘導可能な条件を探索した。CaSap2p を抗原とした場合、抗原量を 15  $\mu$ g また DOTAP/DC-cholesterol liposome を 400 nmol にて Days 0、7 および 14 に経鼻投与することにより最大限の鼻腔、肺胞、膈および血清における抗原特異的 IgA ならびに IgG 抗体産生が得られた。また、AfAspf3p を抗原とした場合、抗原量を 5  $\mu$ g また DOTAP/DC-cholesterol liposome を 400 nmol にて Days 0、7 および 14 に経鼻投与することにより最大限の鼻腔、肺胞、膈および血清における抗原特異的 IgA ならびに IgG 抗体産生が得られた。

##### (3) DOTAP/DC-cholesterol liposome と真菌抗原の経鼻投与による誘導される免疫応答の質的变化

次に、DOTAP/DC-cholesterol liposome と真菌抗原の経鼻投与により誘導される免疫応答の詳細について抗原 2 次刺激によるサイトカイン産生を指標に検証した。その結果、両抗原において、免疫マウスより調製した脾細胞を抗原で 2 次刺激することによって、IFN- $\gamma$ 、IL-4 および IL-17A の産生亢進がみられた。このことから、DOTAP/DC-cholesterol liposome を粘膜アジュバントとして用いることで、Th1/Th2/Th17 応答が誘導可能であることが示された。特に、Th17 免疫は真菌感染防御に重要な役割を果たすため、本粘膜ワクチンシステムの有用性が示唆された。

以上、本研究よりリポソームを用いた経鼻投与型真菌症ワクチンの開発に向けた基盤を構築することができた。現在、感染モデルマウスに対する治療効果を検証するための準備を進めている。この検証を通じて、新規真菌症ワクチンの開発に繋がると考えている。

#### 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)

[雑誌論文](計 4 件)

Aimanianda V, Simenel C, Garnaud C, Clavaud C, Tada R, Barbin L, Mouyna I, Heddergott C, Popolo L, Ohya Y, Delepieuvre M, Latge JP. The Dual Activity Responsible for the Elongation and Branching of  $\beta$ -(1,3)-Glucan in the Fungal Cell Wall. MBio. 2017;8(3). pii: e00619-17. doi: 10.1128/mBio.00619-17. 査読有

Takahashi S, Tada R, Negishi Y, Aramaki Y. Mechanisms of enhanced antigen delivery to murine dendritic cells by the cationic liposomes. Open Journal of Immunology. 2017;7(4):85-101. doi: 10.4236/oji.2017.74007. 査読有

Tada R, Muto S, Iwata T, Hidaka A, Kiyono H, Kunisawa J, Aramaki Y. Attachment of class B CpG ODN onto DOTAP/DC-cholesterol liposome in nasal vaccine formulations augments antigen-specific immune responses in mice. BMC Res Notes. 2017; 10(1):68. doi: 10.1186/s13104-017-2380-8. 査読有

Tada R, Hidaka A, Iwase N, Takahashi S, Yamakita Y, Iwata T, Muto S, Sato E, Takayama N, Honjo E, Kiyono H, Kunisawa J, Aramaki Y. Intranasal Immunization with DOTAP Cationic Liposomes Combined with DC-Cholesterol Induces Potent Antigen-Specific Mucosal and Systemic Immune Responses in Mice.

PLoS One. 2015; 10(10):e0139785. doi:  
10.1371/journal.pone.0139785. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

Yukihiko Aramaki, Rui Tada, Emi Honjo, Naoko Iwase, Hiroshi Kiyono, Jun Kunisawa, IL-6 acts as a key cytokine in the enhancement of mucosal immunity following intranasal administration of antigen with cationic liposomes, Virus-Like Particle & Nano-Particle Vaccines VLPNPV 2016, Leiden, Netherlands, 6 月 22-24 日, 2016

高橋佐慧子、多田 壘、日高晃、岩田知子、山北悠希、清野宏、國澤純、新槇幸彦、GM-CSF の正電荷リポソームが有する粘膜アジュバント活性に対する寄与の検討、第 31 回 日本 DDS 学会学術集会、東京都新宿区、7 月 2-3 日、2015.

高橋 佐慧子、多田 壘、日高 晃、山北 悠希、清野 宏、國澤 純、新槇 幸彦、正電荷リポソームが有する粘膜アジュバント活性における IL-6 の関与、第 93 回 東京医科大学・東京薬科大学・免疫アレルギー研究会、東京都新宿区、6 月 2 日、2015.

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<https://www.ps.toyaku.ac.jp/yakubutsusotatsu/>

6 . 研究組織  
(1)研究代表者

多田 壘 (TADA, Rui)  
東京薬科大学・薬学部  
講師  
研究者番号：70635888

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )