

令和元年6月26日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08344

研究課題名(和文) 抗ペロ毒素IgA抗体の構築を目指したMHC結合性ペプチド含有ワクチンの開発

研究課題名(英文) Study of liposomal vaccine entrapping MHC-binding peptides for production of secretory IgA against Shiga-like toxin B subunit

研究代表者

黒羽子 孝太 (KUROHANE, KOHTA)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：90333525

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)：ペロ毒素の糖鎖認識サブユニット(Stx1B)は抗原性が低く、抗体誘導が困難であった。抗原性の増大を目的として、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を共存させたリポソームワクチンを作製しマウスに経鼻免疫した。ペプチドの効果についてはさらに検討が必要であったが、Stx1Bのリポソーム化による抗原性の増大が確認できた。Stx1Bで免疫したマウス由来のリンパ組織を用いてハイブリドーマを作製し、抗体遺伝子を獲得した。さらに、毒素中和活性を持つ抗Stx1B分泌型IgAを得ることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘膜免疫の効果的な誘導、抗原特異的IgA抗体産生ハイブリドーマの作製、抗体を構成する遺伝子を用いて分泌型IgAを構築することが可能になれば、粘膜に投与可能な治療用抗体としての分泌型IgAの研究が大きく発展する。本研究では、病原細菌由来の毒素を抗原として用いることで、臨床応用可能な治療用抗体の作製が可能となる点にも特徴がある。本研究の概念を応用すれば、抗原性に関わらず、粘膜免疫を効果的に賦活化できる経粘膜ワクチンの開発、粘膜に適用可能な治療用分泌型IgAの開発につながり、感染症予防に大きく寄与すると思われる。

研究成果の概要(英文)：B-subunit of Shiga-like toxin (Stx1B) has been demonstrated to be a poor immunogenicity. To augment the immunogenicity of Stx1B, major histocompatibility complex class II bind peptides, including T cell epitopes, and Stx1B 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 (SIgA) genes were obtained from anti-Stx1B SIgA producing hybridoma. These genes were transfected into CHO-K1 cells to obtain anti-Stx1B SIgA in vitro. It was able to obtain anti-Stx1B SIgA has neutralizing activity.

研究分野：免疫学

キーワード：IgA ワクチン 免疫学 リポソーム ペロ毒素

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

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感染症でのペロ毒素特異的な分泌型IgAを*in vitro*で作製することを旨とした。

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の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) Stx1B内封リポソームの調製

ペロ毒素は、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-succinimidyl)oxyglutaryl)-aminopropyl-polyethyleneglycol-carbamy-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40μg、粘膜アジュバントとしてcholera toxin (CT) を1μgを含む15μl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、膣洗浄液中の分泌型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み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。この組み換え型分泌片と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ティングにより確認した。

(6) Stx1B特異的分泌型IgAの抗原への結合性

上記方法で得られたStx1B特異的分泌型IgAのStx1Bへの結合性をELISAを用いて検討した。抗原であるStx1Bを96 well plateにコートし、Bovine serum albumin (BSA) にてブロッキング後、得られたStx1B特異的分泌型IgAを添加した。1時間インキュベーション後、抗mouse IgA抗体、あるいは抗SC抗体を添加し、Stx1Bに結合したStx1B特異的分泌型IgAを検出した。

(7) Stx1B特異的分泌型IgAの毒素中和活性

上記方法で作製し、抗原結合性が確認された Stx1B 特異的分泌型 IgA の毒素中和活性を検討した。Vero 細胞を 96well plate に播種し、Stx1 ホロトキシンと Stx1B 特異的分泌型 IgA を混和した溶液を加えた。一定時間後、生細胞を比色定量法を用いて算出し毒素中和活性の指標とした。

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、膣洗浄液、糞抽出液中の IgA 力価および血液中の IgA、IgG 力価を求めた。

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、腸管中でも有意な 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。

(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。

その結果、腸管での 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 については差が無いものの、IgG は有意に高い力価を示した。

(3) 組み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。そこで組み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 を用いて組み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。その結果、TEPC15 と組み換え型分泌片を反応させたサンプルで、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。

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と組み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。その結果、分泌型IgAのバンドが検出された。

(5) Stx1B特異的分泌型IgAの抗原への結合性

組換え型分泌片と二量体IgAであるG2G7を反応させて得られた抗Stx1B分泌型IgAのStx1Bへの結合性をELISAを用いて検討した。その結果、G2G7、および抗Stx1B分泌型IgAともに抗原であるStx1Bへの結合性を濃度依存的に示した。

(6) Stx1B特異的分泌型IgAの毒素中和活性

抗原結合性が確認された Stx1B 特異的分泌型 IgA の毒素中和活性を検討した。その結果、Vero 細胞に対する Stx1 ホロトキシンの毒性を、Stx1B 特異的分泌型 IgA は濃度依存的に抑制した。さらにはその中和活性は同濃度の二量体 IgA よりも強い活性を示した。

以上のことから、T細胞エピトープ含有MHCクラス 結合性ペプチドの効果は確認できなかったものの、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、組換え型分泌片を用いた*in vitro*での分泌型IgA作製に成功し、ペロ毒素に対する中和活性を示した。

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

[学会発表](計5件)

黒羽子孝太、Transient receptor potential (TRP) チャネル活性化を指標としたアジュバント物質の探索 US フォーラム 2017

遠藤由貴奈、黒羽子孝太、今井康之、FITC を用いた経皮免疫による抗 FITC 抗体の誘導 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 2017

黒羽子孝太、遠藤由貴奈、今井康之、FITC 誘導接触性皮膚炎マウスモデルにおける FITC 特異的抗体産生 日本薬学会第 138 年会 2018

黒羽子孝太、今井康之、TRP チャネル活性化物質による FITC 特異的抗体産生誘導 US フォーラム 2018

菊地祐希、松田弥奈美、森兼捷太、中西勝宏、黒羽子孝太、丹羽康夫、小林裕和、今井康之、分泌型 IgA のペプシン抵抗性：植物由来組換え型分泌片を用いた研究 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 2018

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。