

令和元年5月23日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08412

研究課題名(和文) タンパク質ナノカプセルの粘膜免疫誘導機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of induction of mucosal immune responses by protein nano-capsule

研究代表者

川野 雅章 (KAWANO, Masaaki)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30447528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Simian virus 40 (SV40) のウイルス様粒子 (VLP, virus-like particle) タンパク質ナノカプセルに対する免疫応答をマウス脾臓リンパ球と鼻咽腔関連リンパ組織 (NALT, naso-pharynx lymphoid tissue) の間で比較するため、脾臓リンパ球とNALTを調製し、SV40 VLPに対する反応を解析した。また、SV40 VLPと反応した免疫細胞をマウスに戻し、獲得免疫を誘導する系を構築した。また、SV40の侵入経路に存在する因子とSV40 VLPとの相互作用解析を行った。さらに、抗原をSV40 VLPに内包したワクチンを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘膜ワクチンは、医師の介入を必要とせず投与できることから、医療コストの軽減に繋がることが期待される。しかしながら、目的の抗原に対して効率よく粘膜免疫を誘導できるウイルス様粒子を用いたワクチンキャリアは未だ実用化されていない。我々の解析で、simian virus 40のウイルス様粒子は経鼻投与でも脾臓リンパ球に目的の獲得免疫を効率良く誘導することが示された。この未解明の粘膜免疫誘導機構を解明することは学術的意義があり、また、医療コストの削減に繋がるVLP粘膜ワクチンキャリアの開発は、近年問題となっている社会保障費の削減にも繋がるものと考えられるため社会的意義も十分にあるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Simian virus 40 (SV40) is monkey polyomavirus. SV40 capsid has icosahedral structure with 45 nm in diameter and consists only of major structural protein, VP1. In order to construct SV40 capsid, five VP1 molecules form pentamer and then 72 pentamer assembles into SV40 capsid without the need of cellular factors. Virus-like particles (VLPs) of SV40 are assembled when SV40 VP1 is expressed in insect cells by baculovirus vector. In order to analyze differences of immune responses between mouse splenocytes and mouse naso-pharynx lymphoid tissue (NALT) against SV40 VLP protein nano-capsules, SV40 VLPs were incubated with splenocytes or NALT. Also, SV40 VLP-incubated mouse immune cells were introduced to the mice to induce adaptive immune responses against SV40 VLP. Moreover, SV40 VLP binding to cellular factors that localizes on the SV40 entry pathway within the cells was analyzed. Also, in order to construct vaccines using SV40 VLPs, antigens were incorporated within the SV40 VLP.

研究分野：免疫学

キーワード：polyomavirus simian virus 40 virus-like particle mucosal immune response innate immune response adaptive immune response adjuvant vaccine

1. 研究開始当初の背景

標的とする抗原に対して自在に抗体産生や細胞性免疫を誘導することができれば、ウイルス感染や、細菌感染、さらには、がんの除去が可能になると期待される。実際、ワクチン接種によって標的とする抗原に対して、抗体産生や細胞性免疫を誘導することでウイルス感染を防ぐことが可能であるし、抗 CTLA4 抗体、抗 PD-1 抗体による抗体医薬は、がんに対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL, cytotoxic T lymphocyte) を活性化することで、がんを体内から排除することができる。しかしながら、ヒト免疫不全ウイルスなどの難治性ウイルスに対しては未だに有効なワクチンが無く、また、がんに対しても開発されている抗体医薬による効能は患者全体の一部に限られている。これは、原因の 1 つとして、ウイルスやがん自体の抗原としての免疫誘導効果が非常に弱いことが挙げられる。この強度の弱さを補うために、抗原に対して完全フロインドアジュバント (CFA, complete freund' s adjuvant) のような強力な免疫誘導賦活剤を用いることが有効であると考えられるが、副作用の原因となる強い炎症性サイトカインが誘導されるため、ヒトへの投与は困難である。この問題を克服するため、強力な免疫誘導能を有する一方で副作用を誘導しない免疫誘導剤の開発が行われているが有効な免疫誘導剤の構築には至っていない。一方、SV40 VLP (virus-like particle) タンパク質ナノカプセルは、動物実験において、免疫活性はフロインドアジュバントと同等かそれ以上であるが、副作用が検出されていない。また、SV40 VLP タンパク質ナノカプセルの経鼻投与でも目的の抗原に対する CTL を誘導することから、難治性ウイルスワクチンや、がんワクチンのキャリアとして有望であると考えられる。

これまでに我々は、SV40 VLP を医療材料として用いるために、高度に VLP を精製し、VLP を構成しているサブユニットである VP1 五量体を調製して、そこから試験管内 VLP 再構築系を確立し、その中に DNA、タンパク質などの生理活性物質を内包する技術、細胞指向性を変化させるため VLP の表面を遺伝子工学的、化学的手法で改変する技術を確立した。さらに、この技術を利用して、ワクチン製剤を構築することを考え、モデルとして A 型インフルエンザウイルスの M1 タンパク質の CTL エピトープを挿入した SV40 VLP を構築した。この VLP のマウスへの経鼻投与は、副作用を検出すること無く不完全フロインドアジュバント (IFA: incomplete freund' s adjuvant) よりも強力に VLP に挿入したエピトープに対して CTL を誘導した。このことから SV40 VLP は IFA や CFA とは異なる作用機序であるが、経鼻経路でも強力な獲得免疫誘導能を有し、生体内での分散性も優れていることから、非常に優れた抗原運搬体となり得ることが示唆される。

SV40 の属するポリオーマウイルス科ウイルスは、炎症性サイトカインの放出を誘導せず、従って、そのウイルス粒子には免疫活性化能が弱いと考えられていた。そのため、SV40 のように系統立った医療用材料としての開発は行われておらず、積極的なワクチンプラットフォームの構築も行われなかった。VLP を用いたワクチン開発は、B 型肝炎ウイルス (HBV, hepatitis B virus)、および、ヒトパピローマウイルス (HPV, human papillomavirus) で試みられおり、これら VLP は HBV ワクチン、HPV ワクチンとして実用化されている。しかしながら、HBV および HPV VLP を利用した外来の抗原に対して免疫活性化させるナノカプセルの開発は積極的には行われていない。そこで、本研究では、SV40 VLP の優れた粘膜免疫誘導剤としての機能の分子メカニズムを解析し、その機能を用いて難治性ウイルスワクチン、および、がんワクチンを構築することにした。

2. 研究の目的

SV40 VLP タンパク質ナノカプセルによる粘膜免疫の誘導により、全身に獲得免疫を誘導する機構を解明するために、SV40 VLP によるマウス粘膜細胞の活性化を解析することを目的とした。一方、SV40 VLP 内部に抗原を内包し、マウスに経鼻投与することで内包抗原に対し高度に獲得免疫を誘導できるが、SV40 VLP による獲得免疫誘導機構は不明である。仮説として SV40 VLP の細胞表面受容体であるガングリオシド GM1 に結合した後、獲得免疫を誘導する因子を刺激して免疫活性化シグナルを活性化しているものと考えられる。このことを解析するため、SV40 の受容体の一つであるガングリオシド GM1 が鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT, naso-pharynx associated lymphoid tissue) でも発現していることを解析することを目的とした。さらに、SV40 VLP と相互作用する細胞内の細胞性因子を同定することで、ガングリオシド GM1 を介して細胞内に侵入した SV40 VLP に対して細胞が免疫活性化を誘導する機構を解析することを目的とした。これらの結果を踏まえて、高病原性ウイルスとして A 型インフルエンザウイルス、難治性ウイルスとして 2 型単純ヘルペスウイルスのワクチン、また、がんワクチンを構築することを目的とした。ポリオーマウイルス科のウイルスカプシドを基にしたこのような医療材料の技術開発はほとんど行われておらず、従って、IFA よりも強力な免疫誘導能を有しながら副作用が検出されない SV40 VLP を用いたワクチン開発は有意義であると考えられる。従来、経鼻免疫は医療従事者の補助を必要とせず投与できるが、非常に免疫誘導能が弱く組換えワクチンの実用化は困難であった。しかし、SV40 VLP の強力な免疫誘導能を用いてワクチンを構築すれば、患者の負担の少ない低侵襲性経鼻免疫用の組換えワクチンの構築に繋がるものと期待される。また、近年は社会保障費における医療費用の増大が問題になって

いるが、がんワクチンの実用化により、通院、入院する患者が減少し、完治する患者が増大するので、医療費用を大幅に削減できるため、社会への還元性も期待される。

3. 研究の方法

SV40 VLP タンパク質ナノカプセルの経鼻投与で獲得免疫を誘導できることから、SV40 VLP が粘膜細胞を活性化させ、獲得免疫を誘導することを解析し、粘膜細胞の活性化の分子機構を解析して、高病原性・難治性ウイルスのワクチン、および、がんワクチンを構築することを目的とした。SV40 VLP は、マウス脾臓リンパ球の増殖を誘導し、免疫活性化マーカーの発現を上昇させ、さらに、ケモカインの分泌を誘導することから、まず、マウス各種粘膜細胞においても同様のことが検出されるか解析した。このために、マウス各種粘膜細胞を SV40 VLP と反応させ、粘膜細胞の増殖を解析し、蛍光抗体を用いた蛍光染色で各種粘膜細胞を染色した後、各種粘膜細胞の免疫活性化マーカーの発現の上昇をフローサイトメトリーで解析した。また、各種粘膜細胞を反応させた後、培養上清を回収し、ELISA 法でケモカインの分泌を解析した。

さらに、SV40 VLP を用いた経鼻免疫において、NALT に発現する GM1 が重要であることを示すために、NALT でのガングリオシド GM1 の発現を解析した。そのために、抗ガングリオシド GM1 抗体を用いて蛍光染色し、NALT におけるガングリオシド GM1 の発現を解析した。また、タンパク質ライブラリを用いて SV40 VLP と相互作用する細胞性因子を網羅的に解析し、同定した因子を組換え体として調製して、免疫沈降法やショ糖密度勾配遠心法を用いて SV40 VLP との相互作用解析を行った。

さらに、SV40 VLP の粘膜細胞を介した獲得免疫誘導機構を解析するために、まず、SV40 VLP とマウス脾臓リンパ球を体外でインキュベーションした後、SV40 VLP 反応マウス脾臓リンパ球をマウス体内に移植し、SV40 VLP に対する抗体産生を誘導する系の構築を行った。

加えて、SV40 VLP 利用して、高病原性ウイルスの代表として A 型インフルエンザウイルス、難治性ウイルスの代表として 2 型単純ヘルペスウイルスに対するワクチンの構築を試みた。また、がんワクチンの構築を試みた。そのために、高病原性・難治性ウイルスに対するワクチンの構築においては、A 型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン (HA, hemagglutinin) を VP2 の C 末端に融合したタンパク質と SV40 VP1 を共発現することで、VLP に VP2 を介して HA を内包した VLP の構築を試みた。また、同様の方法で、2 型単純ヘルペスウイルスの glycoprotein B を内包した VLP の構築を試みた。さらに、がんに対する粘膜ワクチンの開発として、様々ながんにおいて広範に高発現しており、がん抗原として知られている、Wilms' tumor 1 (WT1) を、上記と同様の方法で内包した VLP の構築を試みた。

4. 研究成果

SV40 VLP タンパク質ナノカプセルが粘膜細胞を活性化することを解析するため、粘膜組織である、NALT、気管支関連リンパ組織 (BALT, bronchus associated lymphoid tissue) を単離した。また、腸管関連リンパ組織 (GALT, gut associated lymphoid tissue) として、腸間膜リンパ節リンパ球 (MLN lymphocyte, mesenteric lymph node lymphocyte)、腸管上皮細胞間リンパ球、粘膜固有層単核球を単離した。これらと VLP を混合することで、VLP に対する免疫応答が誘導されることを解析した。その結果、VLP と各種粘膜組織に含まれる細胞を混合し、24 時間培養すると、どの粘膜組織に含まれる細胞も VLP 依存的に細胞増殖が増大した。また、培養後の上清を回収し、サイトカインおよびケモカインの分泌を ELISA 法で解析すると、NALT, BALT lymphocyte, MLN lymphocyte において、VLP と脾臓リンパ球を混合した際に分泌される特定のケモカインと同様のケモカインの放出が検出された。一方、NALT と VLP を混合し、24 時間培養した後、成熟化マーカーで染色してフローサイトメトリーによる解析を行うと、脾臓リンパ球に VLP を加えた場合とは異なり、NALT においては成熟化マーカーの発現上昇は検出されなかった。このことから NALT では、脾臓リンパ球とは VLP に対する成熟化マーカーの発現挙動が異なるが、細胞増殖やケモカイン分泌に関しては脾臓リンパ球における VLP に対する応答と同様であることが示唆された。これらの結果から、VLP は粘膜細胞にも作用し、免疫応答の活性化を誘導する可能性が示唆された。

次に、SV40 VLP の受容体であるガングリオシド GM1 のマウス NALT における発現解析を行った。マウス NALT におけるガングリオシド GM1 の発現を確認するために、ガングリオシド GM1 を蛍光抗体で標識し、フローサイトメトリーによる解析を行った。その結果、ガングリオシド GM1 特異的な蛍光シフトが観察されたことから、マウス NALT にもガングリオシド GM1 が発現していることが示唆された。また、SV40 VLP が作用する免疫活性化シグナル伝達の最上流因子を解析するために、SV40 VLP を蛍光標識した後、タンパク質ライブラリを利用して、VLP と相互作用する因子の網羅的な解析を行った。その結果、SV40 VLP の細胞内侵入経路に存在し、VLP と高度に結合する膜タンパク質の候補として、SV40 VLP と相互作用する細胞内侵入経路に存在するタンパク質として、ハウスキーピング遺伝子に属するタンパク質を 1 つと、免疫細胞で高度に発現し、炎症性の病気に関連のあることが示唆されるタンパク質を 1 つ同定した。次に、これらの同定した因子と SV40 VLP との相互作用解析として、免疫沈

降法やシヨ糖密度勾配遠心法による相互作用解析を行った。その結果、SV40 VLP と同定した因子との相互作用は検出されなかった。しかしながら、シヨ糖密度勾配遠心法による解析では、シャペロンドメインを有する同定した因子とインキュベーションすると SV40 VLP の一部が VP1 五量体に解離している可能性が示された。このことは、SV40 VLP が同定した因子のシャペロンドメインと相互作用し、SV40 VLP の一部が VP1 五量体に解離した可能性を示唆している。このシャペロンドメインを有する同定した因子は細胞内シグナル伝達ドメインを有するとの報告があるため、SV40 VLP が同定した因子と相互作用することで、細胞内にシグナル伝達が誘導され、免疫担当細胞の活性化を誘導する可能性が示唆された。

加えて、SV40 VLP と粘膜免疫細胞をインキュベーションし、その粘膜免疫細胞をマウス粘膜組織に移植することで、VLP に対する粘膜を介した獲得免疫応答を誘導する系を構築するために、まず、指標として SV40 VLP と脾臓リンパ球をインキュベーションし、その脾臓リンパ球をマウスに移植することで VLP に対する獲得免疫応答を誘導する系の構築を行った。このために、SV40 VLP とマウスの脾臓リンパ球をインキュベーションし、マウスの腹腔に戻すことでマウスに SV40 VLP に対する抗体産生を誘導するための系の構築を行い、SV40 VLP に対して抗体産生を誘導するために必要な細胞の因子、細胞数、細胞量の精密化した。

さらに、VLP を基にして、高病原性・難治性ウイルスに対するワクチン、および、がんワクチンの効能を解析するための抗原内包 VLP の構築を試みた。このために、VP2 の C 末端に抗原を融合したコンストラクトを VP1 と共に昆虫細胞で共発現させることで、抗原内包 VLP の構築を試みた。高病原性・難治性ウイルスに対するワクチンの構築においては、A 型インフルエンザウイルスの HA、また、2 型単純ヘルペスウイルスの glycoprotein B の VLP への内包を試みた。また、がんに対するワクチンの構築においては、がん抗原である WT1 の VLP への内包を試みた。この結果、VLP に内包する抗原によっては、内包効率が高いものと低いものが存在することが明らかとなった。これは、抗原が不溶性である、抗原の大きさが VLP の内包には大き過ぎる、または、抗原の構造による立体障害により VLP 内部の構造に適合しないために内包効率が低下したものと考えられる。このことから、VLP に内包する抗原によって、可溶性タンパク質に融合したり、抗原を遺伝子工学的に分割したりして VLP への内包効率を高める必要があることが示唆された。これらの結果は、SV40 VLP を基にしたワクチン実用化の基礎になるものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Kawano M, Takagi R, Saika K, Matsushita S. Dopamine regulates cytokine secretion during innate and adaptive immune responses. *Int. Immunol.*, 査読有, 30:591-606, 2018. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy057>
- ② Matsuyama M, Kawano M, Takagi R, Nakagome K, Chikamatsu K, Matsushita S. Interleukin-8 produced by T cells is under the control of dopamine signaling. *Clin. Exp. Neuroimmunol.*, 査読有, 9:251-257, 2018. <https://doi.org/10.1111/cen3.12472>
- ③ Nishizawa K, Takagi R, Kawano M, Matsushita S. Protein kinase C activation via serotonin receptor induces IL-8 in antigen-presenting cells stimulated with diazinon. *Curr. Topic. Toxicol.*, 査読有, 14:41-52, 2018.
- ④ Matsueda H, Kawano M, Takagi R, Koshimizu K, Matsushita S. Acetylcholine stored in dendritic cells plays a role in the differentiation of naive CD4⁺T cells into a Th1 phenotype. *Clin. Exp. Neuroimmunol.*, 査読有, 9:115-123, 2018. <https://doi.org/10.1111/cen3.12427>
- ⑤ Itano A, Kawano M, Takagi R, Tokuyama K, Matsushita S. Signaling via FcεRI stimulates human immature dendritic cells to induce Th1 differentiation via IL-12: Novel evidence of a feedback loop of allergic responses mediated by dendritic cells. *Curr. Trend. Immunol.*, 査読有, 18:57-65, 2017.
- ⑥ Enomoto Y, Takagi R, Naito Y, Kiniwa T, Tanaka Y, Hamada-Tsutsumi S, Kawano M, Matsushita S, Ochiya T, Miyajima A. Identification of the novel 3'UTR sequences of human IL-21 mRNA as potential targets of miRNAs. *Sci. Rep.*, 査読有, 7, Article number: 7780, 2017. <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-07853-x>

[学会発表] (計 8 件)

- ① KAWANO Masaaki, SAIKA Kikue, TAKAGI Rie, MATSUI Masanori, MATSUSHITA Sho, Tannic acid affects dopamine receptors, regulates immune responses, and ameliorates experimentally induced colitis, The 47th Annual meeting of the Japanese society for immunology 2018, December 10-12th, 2018, Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan.
- ② KAWANO Masaaki, TAKAGI Rie, SAIKA Kikue, MATSUI Masahori, MATSUSHITA Sho, Dopamine fluctuates cytokine secretion in innate and adaptive immune responses, The 46th Annual meeting of the Japanese society for immunology 2017, December 12-14th, 2017, Okinawa Sendai International Center, Miyagi, Japan.
- ③ KAWANO Masaaki, TAKAGI Rie, MATSUSHITA Sho, Dopamine modulates cytokine secretion in early immune responses as well as the generation of T-helper subsets in adaptive responses, The 45th Annual meeting of the Japanese society for immunology 2016, December 5-7th, 2016, Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan.
- ④ 川野 雅章、高木 理英、松下 祥、初期免疫応答におけるドーパミンによる免疫関連遺伝子発現の解析、第 66 回日本アレルギー学会学術大会、2017 年 6 月 16 日～2016 年 6 月 18 日、東京国際フォーラム、東京都、千代田区
- ⑤ 松枝 秀世、川野 雅章、高木 理英、松下 祥、樹状細胞由来アセチルコリンによる Th1 分化誘導、第 66 回日本アレルギー学会学術大会、2017 年 6 月 16 日～2016 年 6 月 18 日、東京国際フォーラム、東京都、千代田区
- ⑥ 松山 敏之、川野 雅章、高木 理英、松下 祥、T 細胞による IL-8 産生とドーパミンシグナル、第 66 回日本アレルギー学会学術大会、2017 年 6 月 16 日～2016 年 6 月 18 日、東京国際フォーラム、東京都、千代田区
- ⑦ KAWANO Masaaki, TAKAGI Rie, MATSUSHITA Sho, Dopamine modulates cytokine secretion in early immune responses as well as the generation of T-helper subsets in adaptive responses, The 45th Annual meeting of the Japanese society for immunology 2016, December 5-7th, 2016, Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan.
- ⑧ 川野 雅章、高木 理英、橋本 久実子、金子 篤、松下 祥、ドーパミンによる炎症性免疫応答転調機構の解析、第 65 回日本アレルギー学会学術大会、2016 年 6 月 17 日～2016 年 6 月 19 日、東京国際フォーラム、東京都、千代田区

〔図書〕（計 2 件）

- ① Masaaki Kawano, Masanori Matsui, Hiroshi Handa, IOP Publishing Ltd., Magnetic Nanoparticles for Medical Diagnostics, Chapter 5, Development of surface-modified magnetic nanoparticles for medical applications, 2018, 150.
- ② Masaaki Kawano, Masanori Matsui, Hiroshi Handa, Elsevier Inc., Design and Development of New Nanocarriers, Chapter 15, Technologies that generate and modify virus-like particles for medical diagnostic and therapy purposes, 2017, 555-594.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：活性化 T 細胞からの IL-8 産生を抑制するための組成物

発明者：松下 祥、川野 雅章、

権利者：埼玉医科大学、有限会社イムノ

種類：特許

番号：特願 2017-106234

出願年：2017 年 5 月 30 日

国内外の別： 国内

※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。