

平成 21 年 4 月 11 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19790063  
 研究課題名(和文)腸管関連リンパ組織をターゲットとした新規経口ワクチンデリバリーシステムの創製  
 研究課題名(英文)Development of Novel Oral Vaccine Delivery System for Mucosal Immunization in Gut-Associated Lymphoid Tissue  
 研究代表者  
 三隅 将吾(MISUMI SHOGO)  
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授  
 研究者番号：40264311

研究成果の概要：本研究では新規経口ワクチンデリバリーシステム(OWDS)を開発し、腸管関連リンパ組織へ粘膜ワクチンを的確に送達させることであった。実際本研究により、経口ワクチンを M 細胞に送達させるための新規デリバリー分子(MCTM)を開発することに成功し、その研究成果は、Journal of Immunology (2009) 182(10):6061-6070 となった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：M 細胞、デリバリーシステム、粘膜ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

歴史的にみて、世界レベルでの感染症制圧に最も重要な役割を果たしてきたのがワクチンであるが、HIV のワクチン開発をめぐる状況は決して容易ではない。これまでに 2 つの世界規模の HIV ワクチントライアルが綿密な計画をもとに実施されたが、いずれも失敗に終わった。HIV ワクチン開発においては、これまでの感染症に対するワクチン開発の常識から逸脱することが求められると考え、HIV 感染自然抵抗者から学ぶ次世代エイズワクチンの創製は、今後の HIV ワクチン開

発において重要な道標となると考えられる。

従来、感染症に対するワクチンは病原体を弱毒化するか、その一部を免疫することで調製され、感染症制圧に寄与してきたが、HIV の場合、感染者の個体内のその多様性は、変化しやすいとされるインフルエンザウイルスの株間の多様性よりはるかに大きい。つまり、ウイルス抗原を標的としたワクチンを開発し続ける限り、同じ失敗を繰り返す危険性が極めて高いといえる。そこで、我々は HIV 感染自然抵抗者(ESN)の免疫応答を良く理解し、ワクチンによって HIV 感染自然抵抗者

と同等の免疫応答を付与することができれば、HIV ワクチン開発のブレイクスルーになるのではないかと考えた。そこで、本研究で HIV ワクチン開発を目指す経口粘膜ワクチンは、初発感染防御機構である粘膜免疫システムと、万一、病原体が体内に侵入した際の防御機構である全身系免疫システムの両免疫システムに抗原特異的免疫応答が誘導できるため、生体内に二段構えの防御機構を構築できる。申請者は、カニクイザルを用いた AIDS モデル実験において HIV-1 が GALT において爆発的に増殖していることを経験した。全末梢リンパ球の 60% から 70% が腸管に集中しているということからしても、GALT を HIV-1 の感染から防御することは、急性感染における HIV-1 の爆発的な増殖を抑える意味で重要なことである。さらに、HIV-1 が宿主細胞に感染する際のコレセプター CCR5 に対する抗体をワクチンによりカニクイザルに誘導し、攻撃接種用のウイルスを接種すると、コントロール群と比較してウイルスの増殖を抑えることを明らかにした (*J. Immunol.* 2006 176:463-71.)。また、イタリアのコホート研究で、HIV-1 に曝露されておりながら感染抵抗性の女性には、CCR5 に対する抗体と HIV-1 の外被糖タンパク質 (ENV) に対する抗体が誘導されていることが明らかにされた (*J. Immunol.* 2000 164:3426-33.)。HIV-1 による感染は、多くが異性間の性的接触によることから、AIDS 経口粘膜ワクチンにより、腔内に CCR5 および ENV に対する抗体を誘導させる粘膜免疫応答を誘導させ、HIV-1 が万一体内に侵入し、GALT の CD4 陽性 CCR5 陽性 T 細胞に感染しようとする際には、全身系の免疫システムにより HIV-1 の感染増殖を阻止させようと考えている。そのため、粘膜アジュバンドとともにワクチン抗原を GALT へ戦略的に送達させるための DDS の技術である経口ワクチンデリバリーシステムを構築することが求められている。

## 2. 研究の目的

新規経口ワクチンデリバリーシステム (OWDS) を開発し、そのシステムにより粘膜免疫機構を構成している誘導組織の一つである腸管関連リンパ組織へ CCR5 をミミックした環状抗原、ENV および粘膜アジュバンドを送達させ、個体内で二段階の CCR5 および ENV 特異的免疫応答 (粘膜免疫応答と全身系免疫応答) が誘導されているかを見ることにより、経口ワクチンデリバリーシステムの評価を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) M 細胞標的分子 (MCTM) 化学合成とその誘導体の合成

M 細胞を標的とする分子は複合糖タンパク質、レクチン部分の最先端にある D-リジン 4 分子と gallic acid が酸アミド結合したものでありと考えられている。申請者はさらに、いろいろな抗原と容易に反応できる官能基を導入した MCTM 誘導体の化学合成を以下の実験材料を用いておこなった。3,4,5-Trimethoxy Benzoyl Chloride (TMBC), 2-[N-a, N-e-bis(N-a, N-e-difluorenylmethyloxycarbonyl)lysinyll]lysinyll]- aminoethylaminotriyl resin (4Fmoc-4DK-NH-Resin)、Disuccinimidyl suberate (DSS)、fluoroisothiocyanate (FITC)。

### (2) CCR5 をミミックした環状抗原、ENV 及び粘膜アジュバンドとのコンジュゲートワクチンの創製

環状抗原の作成方法は、*J. Immunol.* 2006 176:463-71. に記載されている方法を使用する。なお、今回はアカゲザル由来の CCR5 をミミックした環状抗原を調製する。また、ENV に関しては、攻撃接種用のウイルス (SIVmac239) の ENV を組換えタンパク質として調製する。粘膜アジュバンドは、ホスホロチオエート化と 5' 末端に C6 アミノリンカーを導入させることにより調製する。最終的に、これらと MCTM を結合させる際には、スペーサーの長さの異なるクロスリンカーを用いて結合させる。CCR5 に対する抗体を誘導することが最低限必要となると思われるが、HIV 感染自然抵抗者で CCR5 に対する抗体と同時に誘導されていた外被糖タンパク質に対する抗体の誘導に関して、経腔感染源が SIV の場合、SIV の gp140 を、さらに SHIV の場合、HIV の gp140 を用いて免疫することを考慮し、準備する。

### (3) コンジュゲートワクチンの効果の検討

(2) で調製法を示した MCTM のコンジュゲートワクチンを腸溶カプセルに封入して、アカゲザルに経口投与する。各経時、腔粘膜分泌液、糞便、末梢血を採取し、抗体価・サイトカイン量を測定する。これらの操作によって霊長類モデルに各免疫ルート (上記) からワクチンを接種し、腔粘膜分泌液、糞便、末梢血を採取し、抗体価・サイトカイン量を測定することを主たる目的としているが、ワクチンの安全性と免疫原性の両方を確認する。なお、CCR5 および外被糖タンパク質に対する抗体価の評価は、ELISA および BIAcore を用いて評価する。

## 4. 研究成果

従来、感染症に対するワクチンは病原体を弱毒化するか、その一部を免疫することで調製され、感染症制圧に寄与してきたが、HIVの場合、感染者の個体内のその多様性は、変化しやすいとされるインフルエンザウイルスの株間の多様性よりはるかに大きい。つまり、ウイルス抗原を標的としたワクチンを開発し続ける限り、容易にウイルスは宿主の免疫系を回避し、HIVワクチン開発において、同じ失敗を繰り返す危険性が極めて高いといえる。そこで、申請者はHIV感染自然抵抗者(ESN)の免疫応答を良く理解し、ワクチンによってHIV感染自然抵抗者と同等の免疫応答を付与することを目的としたHIV粘膜ワクチン開発を目指した。ESNは、配偶者からHIVを性交渉の度に曝露されながらもHIVに抵抗性を示し、腔内にHIV-1のレセプターであるCCR5に対する抗体を保有することが報告されている。そこで、我々は粘膜(特に膣)にCCR5に対する抗体を誘導させるために経口ワクチンデリバリーシステムの創製を試みた。

そもそもAIDSの原因ウイルスであるHIV-1は性交渉において膣や直腸を介して侵入し標的細胞の豊富な腸管のリンパ組織で爆発的に増殖する。HIV-1の侵入を完全に防ぐためにはHIV特異的な粘膜免疫を誘導することが必須であるが、そのような粘膜免疫を誘導するには、皮下への注射によるHIV-1の侵入・複製を阻止するワクチン抗原の免疫では誘導できず、腸管などの粘膜面での抗原感作、特にM細胞といわれる抗原取り込み細胞によって抗原が取り込まれることが必要である。これまでにM細胞標的能を持つ分子としてレクチンなどが知られているが、腸管におけるタンパク質分解や毒性を有しているといった欠点があり、ヒトにおいて粘膜ワクチンのデリバリー分子として使用するのは困難であった。申請者は、粘膜ワクチンのデリバリー分子としてM細胞標的分子 tetragalloyl-D-lysine dendrimer (TGDK)を新たに合成した。サルエイズモデルにて検討するため、アカゲザルを用いて *in vivo* でTGDKのM細胞標的能を検討したところ、TGDKが回腸のパイエル板のM細胞によって取り込まれ、さらに胚中心にまで達していることを確認することができた。また実際にTGDKをデリバリー分子として用いた経口エイズワクチンを開発するために、CCR5に対する抗体を誘導させるための環状抗原 Rh-cDDR5、SIVmac239のエンベロープ由来のgp140、アジュバンドとしてTLR9のリガンドであるCpG-ODNをコンジュゲートさせた新規経口粘膜ワクチンを調製した。この粘膜ワクチンを経口投与したところ、腸管内にCCR5特異的なIgA抗体が検出され、さらにSIVmac239の *in vitro* における感染を有意に抑制した。さ

らにヒトM細胞モデルを用いた実験においてもTGDKのM細胞標的能、さらにM細胞を介してTGDKが管腔側から基底面側へ取り込まれることも確認できた。これらの知見は、TGDKがヒトにおいてもワクチン抗原特異的な粘膜免疫応答を誘導できることが期待できる。つまりTGDKはヒトにおける粘膜ワクチンデリバリー分子として非常に魅力的であると考えられる。これらの研究成果はJournal of Immunology (2009)に in press となっている。

## 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2件)

Misumi S, Masuyama M, Takamune N, Nakayama D, Mitsumata R, Matsumoto H, Urata N, Takahashi Y, Muneoka A, Sukamoto T, Fukuzaki K, and Shoji S., Targeted delivery of immunogen to primate M-cells with tetragalloyl lysine dendrimer. *J. Immunol.* 査読有, in press (2009)

Takahashi Y, Misumi S, Muneoka A, Masuyama M, Tokado H, Fukuzaki K, Takamune N, Shoji S., Nonhuman primate intestinal villous M-like cells: an effective poliovirus entry site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, 363, 501-507 (2008)

### [学会発表](計5件)

野崎清輝他, HIV初発感染部位である粘膜を標的としたワクチンの創製, 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会, 12/12/2008, 神戸

松本浩和他, 宿主細胞及びサルエイズの原因ウイルス(SIVmac239)外被に存在するケモカインレセプターCCR5を標的としたHIVワクチン戦略, 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会, 12/12/2008, 神戸

浦田悟充他, SIVmac239 gp140の調製・精製およびワクチンとしての有用性の検討, BMB2007, 12/11/2007, パシフィコ横浜

衛藤あゆみ他, サルのケモカインレセプターCCR5に対する特異的抗体の誘導, BMB2007, 12/11/2007, パシフィコ横浜

浦田悟充他, HIV/AIDS の粘膜ワクチン  
開発のための基礎研究, 第 21 回日本エ  
イズ学会, 11/28/2007, 広島国際会議場

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三隅 将吾 (MISUMI SHOGO)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授  
研究者番号：40264311