

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21874

研究課題名(和文) 巨大蛋白質微粒子を細胞から出芽させ被膜させる方法の開発

研究課題名(英文) Development of method for membrane coating of large protein nano-particle by budding from the cells

研究代表者

森田 英嗣 (Eiji, Morita)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：70344653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質微粒子サブユニットのN末端にNミリスチル化シグナル配列(N-myr)、C末端にレイトドメインをそれぞれ付加し293T細胞に発現させたところ、N-myr及びレイトドメイン依存的に微粒子が膜小胞として細胞外に分泌された。この膜小胞EPN (Enveloped Protein Nanoparticle)を介してOVA抗原をマウス樹状細胞に送達させたところ、CTL活性化能があることがわかった。EPNはCTL活性化能を持つ新しい蛋白質ワクチンとして機能する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体成分あるいはそれと類似の機能を有するペプチドは、ワクチンのみならず医薬品として大きな注目を集めている。しかし、一般的に安定性に乏しく、また高分子であることから生体膜透過性も低い。本研究における被膜微粒子を用いる製剤化の試みは、ペプチド及び蛋白質性薬物の生体内での安定化をもたらすと同時に、膜透過に対しても促進効果が期待されている。本研究で開発された被膜微粒子は蛋白質抗原を樹状細胞の細胞質に効率よく送達させMHC-クラスI (MHC-I) に提示させる技術に応用可能あり、蛋白質抗原にてCTL (Cytotoxic T Lymphocyte) 活性化誘導可能なワクチンになると期待される。

研究成果の概要(英文)：As exogenous peptide antigens are generally presented on MHC class II but not class I, the development of a method for exogenous antigen delivery that facilitates MHC class I presentation is necessary for a potentially effective vaccine that is expected to provoke cell-mediated adaptive immune responses. Here, we developed extracellular vesicles that incorporate antigenic proteins by utilizing endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT)-mediated vesicle formation pathway. Furthermore, we proved that these vesicles could deliver their contents to the cytoplasm of dendritic cells and activate antigen-specific CTLs. These technologies could be applied to the development of novel CTL-inducing peptide vaccines.

研究分野：細胞生物学 ウイルス学

キーワード：被膜タンパク質微粒子 ESCRT レイトドメイン CTLワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、新規医薬品の開発難度が増すとともに、既存医薬品に付加価値を与えることができる DDS (ドラッグデリバリーシステム) 技術の革新に期待が高まっている。「必要なとき」「必要な場所で」「必要な量だけ」作用部位に送り込むという DDS の概念は、様々な微粒子キャリアを中心に研究が進められてきた。中でもリポソームは、細胞膜と同じ構成成分であるリン脂質から成る小胞であり、その膜中及び内水相にそれぞれ疎水性薬物や水溶性薬物を保持することができ、しかも生体適合性に優れているため、多様な薬物を運ぶことができる DDS 素材として特に優れた特性を有している。

リポソームによる高効率な薬物送達を実現するためには、現在多くの課題が残されている。特に、内包物を標的細胞に直接作用させるための内包物放出制御技術についてはこれまでに確立されていない。実際、高い血中滞留性の実現を目指し設計されたリポソーム製剤である Doxil (抗悪性腫瘍剤) は、薬物を放出することなく末梢系に蓄積してハンド・フット・シンドロームと呼ばれる新たな副作用を引き起こすことが問題視されている。このため、薬物の血中滞留性を高めるだけでなく、適したタイミングで内封した薬物を放出する放出制御技術がリポソーム製剤の有効性を高めるうえで重要となっている。これまでに、様々なポリマーでリポソームをコーティングする技術が開発されているが、この問題を解決するには至っておらず、根本的な技術革新が必要であると考えられている。

ポリマーコーティングリポソームに代わる方法として期待されているのが、蛋白質リガンドである。蛋白質相互作用は特異性が高く、標的細胞へのピンポイントへの送達に有用であると考えられている。しかしながら、リポソームへ組み込むための膜貫通ドメインを持つリガンドは可溶性に乏しく、*in vitro* で合成したリポソームに取り込ませることは難しい。

本研究では、これまでの *in vitro* でのリポソーム形成ではなく、エンベロープウイルスが利用しているシステムを応用させ、細胞から粒子を“出芽”させることで蛋白質微粒子を生体膜で被膜させる *in vivo* でのリポソーム形成方法の確立を目指し研究を進めた。また、これまで困難であった、膜貫通型の蛋白質リガンドをリポソーム表面に提示させ、適切な標的に内包物を送達させる方法の確立を目指した。

## 2. 研究の目的

エンベロープウイルス粒子形成に必要な ESCRT リクルート配列と、膜結合シグナルを付与し、数メガダルトンから成る巨大蛋白質粒子を、細胞外へ出芽させ被膜させる方法を確立することを目的とした。またその際、生体膜に膜透過型蛋白質リガンドを取り込ませ、適切な細胞に微粒子を送り込む方法の確立を目指した。本研究では、この方法を用いて鶏卵白アルブミン抗原を被膜粒子に取り込ませ、細胞性免疫誘導ワクチンとして機能するか検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 微粒子を効率よく細胞から出芽させる方法の確立

正二十面体を形成する微粒子 ferritin、lumazine synthase、HSP70、Encapslin、pyruvate dehydrogenase の N 末端側にミリストイル化配列などの膜アンカーシグナル配列、C 末端側にエンベロープウイルスの出芽に必要なレイトドメインなどを付加した発現ベクターを、哺乳動物培養細胞に発現させ、細胞外に分泌されるか調べた。それぞれのコンストラクトには、スプリット NanoLuc ルシフェラーゼのパーツである HiBiT タグが挿入されており、培養上清の HiBiT 依存的 NanoLuc ルシフェラーゼ (HiBiT 活性) を測定し、分泌率を算出した。また、ESCRT 経路依存性を調べるために ESCRT 経路を阻害するドミナントネガティブ変異体 VPS4A K173Q 発現による影響について調べた。

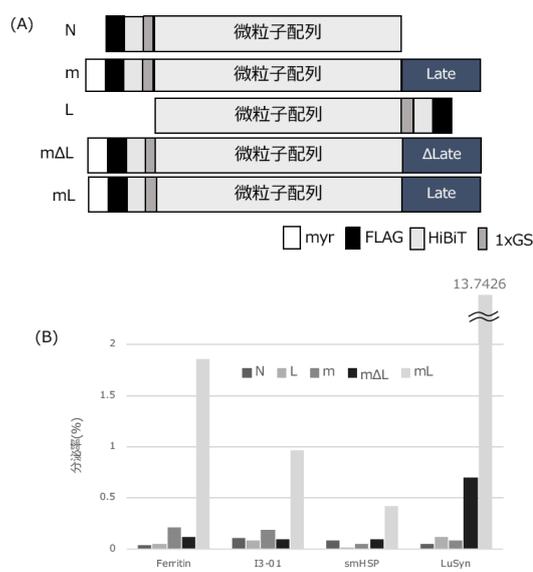
### (2) 被膜微粒子の細胞性免疫誘導ワクチンとしての可能性について検討

OVA ペプチド抗原を内包させた被膜微粒子を添加したマウス樹状細胞に、OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスである OT-1 由来 CTL を反応させ、細胞性免疫を誘導するワクチンとして作用するか検討した。OVA 抗原内包被膜微粒子を取り込ませたマウス樹上細胞に、carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) ラベルした OT-1 マウス由来 T 細胞に反応させ、CFSE の減衰を定量し、T 細胞の増殖を調べた。また、グランザイム B の発現について、CTL の活性化について調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 微粒子を効率よく細胞から出芽させる方法の確立

本研究では、エンベロープウイルスの出芽機構を模倣させることで、様々なタンパク質を生体膜にて被膜させ、細胞外へ放出させることが可能であるか、人工・天然・ウイルス粒子を用いて検討した。Ferritin、I3-01、smHSP、LuSyn 4種のタンパク質微粒子のN末端に脂質修飾を行うN-ミリスチル化配列 (myr) を付加し、微粒子を原形質膜にアンカーさせた。また、C末端にヒト免疫不全ウイルス (HIV-I) のGagタンパク質のC末端領域 p6ドメインを付加した微粒子を作成した。p6ドメインには、レイトドメインと呼ばれる出芽に必要なESRCTをリクルートする配列が含まれており、この領域の付加がタンパク質微粒子の出芽を可能にすることがわかっている。これらの発現コンストラクトを作製し、微粒子の細胞外への放出について検討した。コントロールとしてレイトドメインの一部配列に変異を入れたもの ( $\Delta$ Late)、myrのみ (myr)、レイトドメインのみ (Late) を挿入したコンストラクトも作製した(図1A)。これらを293T細胞にトランスフェクションし、6時間後に培地交換、さらに12時間後(トランスフェクションから18時間後)に上清を回収した。また、上清に対して低速の遠心を行い、細胞片などを取り除いた画分を「sup」とし、解析の対象とした。また細胞もPBSにて洗浄したのち回収し「cell」とした。Sup、cellの両画分のHiBiTの値を測定し、上清への粒子放出率を測定した。その結果、myr、レイトドメインの両方の配列を付加した場合にのみ、粒子が上清へ放出されていることがわかった(図1B)。さらに、myr-I3-01-Late、myr-LuSyn-Lateの上清へ放出された微粒子について、



シヨ糖密度勾配超遠心にて展開し、HiBiTルシフェラーゼ活性を測定したところ、粒子が形成されていることがわかった。また、HiBiTを検出する際に、界面活性剤の添加の有無で比較することにより、被膜されているかどうか判断することが可能である。この比較を行ったところ、I3-01、LuSynの2種類は界面活性剤を加えることによりHiBiTの値が増加するため、これらは膜に包まれた状態で上清に放出されている可能性が示された。VPS4のATPase活性変異体VPS4A-K173Qの発現はESCRT経路を阻害するドミナントネガティブとして作用することがわかっている。I3-01、LuSynの2種類の被膜微粒子の放出は、VPS4A-K173Q発現によって著しく阻害されることがわかった。以上の結果から、myr-I3-01-Late、myr-LuSyn-Lateの2種類の被膜微粒子は膜に包まれた状態でESCRT経路に依存的に分泌されていることが示唆された。

図1 巨大タンパク質微粒子の出芽

## (2) 被膜微粒子の細胞性免疫誘導ワクチンとしての可能性について検討

本研究では、myr-Ferritin微粒子-lateにニワトリの卵白アルブミン (Ovalbumin) の細胞傷害性T細胞: CTLエピトープ (OVA)を融合させたmyr-OVA-late蛋白質を作製した。また、ネガティブコントロールとして、OVAは融合させているが、N-ミリスチル化シグナル配列とGag p6配列を融合させていないOVA蛋白質も作製した。さらに、人工被膜微粒子の標的細胞への膜融合を促進させる為に、myr-OVA-late蛋白質と同時にラブドウイルス科に属する水泡口炎ウイルス:VSV (vesicular stomatitis virus) の外被蛋白質であるG蛋白質 (VSV-G)を発現させ、VSV-Gを取り込んだ被膜微粒子 (myr-OVA-late with VSV-G)も作製し解析を行った。

myr-OVA-late、myr-late (抗原なしネガティブコントロール)、myr-OVA-late with VSV-Gを発現させた細胞の培養上清から100k ppt画分を回収し、被膜OVA粒子とし、また、OVA蛋白質を発現させた細胞を溶解しシヨ糖密度勾配遠心分離法にて分離した画分をOVA微粒子とし、それぞれの微粒子をC57BL/6マウスから抽出し分化培養し調整した樹状細胞BMDCs (bone marrow derived dendritic cells)に添加した。24時間後に、同じC57BL/6系統のOVA抗原特異的TCRトランスジェニックマウスであるOT-Iマウスの脾臓単核球を反応させ、CD8陽性Tリンパ球(CTL)の増殖を調べた。CTL増殖は、脾臓単核球を事前に膜結合蛍光色素CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester)にてパルスラベルし、増殖による色素の拡散に伴う蛍光量減弱をフローサイトメーターで測定することにより行った。また、活性化CTLマーカーであるグランザイムB: GzmB (Granzyme B)を発現するCTLを、特異抗体を用いた細胞内免疫染色とフローサイトメーターにより検出した。その結果、OVA、myr-late、myr-late with VSV-G、myr-OVA-late、いずれの粒子を樹状細胞に反応させても、その後のCTL活性化起こらなかったが、myr-OVA-late with VSV-Gを反応させた場合に、著しいCTL増殖とGzmB陽性CTLの増加が確認された(図2)。以上の結果は、CTLの活性化には1)OVA抗原が必要であること、2)微粒子が生体膜にて被膜されていること、3)被膜微粒子に膜融合を促すVSV-Gリガンドを取り込んでいること、の3点が必要であることを示している。おそらく、myr-OVA-late with VSV-Gを用いたこ

とで、被膜微粒子内部に取り込まれた抗原が、樹状細胞の細胞質に直接送達され、プロテアソームにてプロセッシングを受け、MHC class I 分子によって細胞表面に抗原が提示されるという、CTL 活性化に必要な一連の反応が起こった結果であると考えられる。

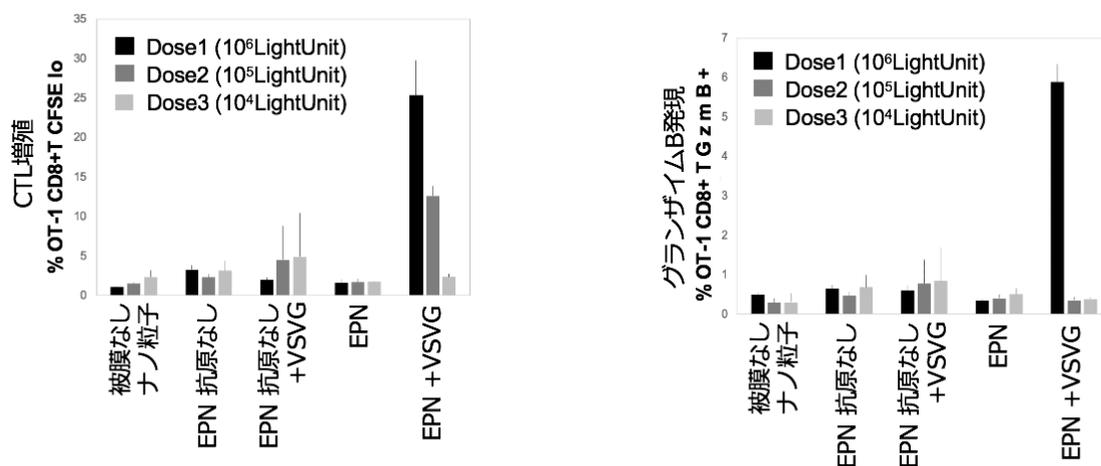


図2 被膜微粒子を介した抗原の樹状細胞への送達と抗原特異的 CTL の活性化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kimura S, Maeda K, Nagashima R, Miura K, Ebina H, Tanaka N, Morita E.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Efficient immunogenic peptide antigen delivery to dendritic cells using an ESCRT-mediated extracellular vesicle formation method.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arakawa M, Morita E.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Zika virus infection and replication organelle biogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Elsevier " Zika Virus Biology, Pathology and Control	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ozaki R, Ishida K, Morita E, Hanada Y	4. 巻 10(20)
2. 論文標題 Nanoparticle deposition of fluoropolymer CYTOP via holographic femtosecond laser processing and its biochip application.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 7243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app10207243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Goto S, Ishida K, Suzuki R, Morita E.	4. 巻 10:9
2. 論文標題 Split nano luciferase-based assay to measure assembly of Japanese encephalitis virus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioprotocol	6. 最初と最後の頁 e3606.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.3606	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tayone WC, Ishida K, Goto S, Tayone JC, Arakawa M, Morita E, and Hashimoto M.	4. 巻 149 (3)
2. 論文標題 Anti-Japanese Encephalitis Virus (JEV) Activity of Triterpenes and Flavonoids from Euphorbia hirta	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Philippine Journal of Science.	6. 最初と最後の頁 603-613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu Chun-chun, Liu Ya-yun, Zhou Jiang-fei, Chen Xi, Chen Huan, Hu Jia-huan, Chen Jing, Zhang Jin, Sun Rui-cong, Wei Jian-chao, Go Yun Young, Morita Eiji, Zhou Bin	4. 巻 18
2. 論文標題 Cellular ESCRT components are recruited to regulate the endocytic trafficking and RNA replication compartment assembly during classical swine fever virus infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1010294	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Arakawa Masashi, Tabata Keisuke, Ishida Kotaro, Kobayashi Makiko, Arai Arisa, Ishikawa Tomohiro, Suzuki Ryosuke, Takeuchi Hiroaki, Tripathi Lokesh P., Mizuguchi Kenji, Morita Eiji	4. 巻 298
2. 論文標題 Flavivirus recruits the valosin-containing protein?NPL4 complex to induce stress granule disassembly for efficient viral genome replication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101597 ~ 101597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101597	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okudera Mako, Odawara Minami, Arakawa Masashi, Kawaguchi Shogo, Seya Kazuhiko, Matsumiya Tomoh, Sato Riko, Ding Jiangli, Morita Eiji, Imaizumi Tadaatsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Expression of Zinc-Finger Antiviral Protein in hCMEC/D3 Human Cerebral Microvascular Endothelial Cells: Effect of a Toll-Like Receptor 3 Agonist	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroimmunomodulation	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000521012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Hidehiko, Noguchi Takafumi, Ogawa Keiji, Miyazato Paola, Hatakeyama Yu, Morita Eiji, Ebina Hirota	4. 巻 39
2. 論文標題 Fusion of parvovirus B19 receptor-binding domain and pneumococcal surface protein A induces protective immunity against parvovirus B19 and Streptococcus pneumoniae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 5146 ~ 5152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2021.07.046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morita Eiji, Suzuki Youichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Membrane-Associated Flavivirus Replication Complex? Its Organization and Regulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1060 ~ 1060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13061060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森田英嗣
2. 発表標題 細胞膜損傷を認識するオートファジーレセプターの同定とゼノファジーにおける役割.
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田昂樹、後藤史門、三浦滉矢、森田英嗣
2. 発表標題 リソソーム機能阻害による細胞外小胞の分泌促進機構の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦滉矢、後藤史門、前田昂樹、森田英嗣
2. 発表標題 HiBiTノックイン細胞を用いた細胞外微粒子の多様性と異質性の解析.
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田幸太郎、後藤史門、荒川将志、鈴木亮介、森田英嗣
2. 発表標題 日本脳炎ウイルスキャプシドタンパク質の細胞外への分泌
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 畠山悠、木村咲伽、王家慧、鈴木秀彦、蝦名博貴、森田英嗣
2. 発表標題 タンパク質ナノ粒子を用いたヒトパルボウイルスB19ワクチンの開発.
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田英嗣
2. 発表標題 細胞膜損傷を認識するオートファジーレセプターの同定とサルモネラに対するゼノファジーにおける役割
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田英嗣
2. 発表標題 Intracellular membrane remodeling in Flavivirus infected cells.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田幸太郎、荒川将志、田端桂介、加藤薫、奈良篤樹、甲賀大輔、西野美都子、森田英嗣
2. 発表標題 日本脳炎ウイルス複製オルガネラ形成に関与する小胞体膜変形因子の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒川将志、柏原秋穂、蝦名博貴、森田英嗣
2. 発表標題 コロナウイルス感染を検出するためのインジケーター細胞の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦滉矢、石田幸太郎、荒川将志、鈴木陽一、天野剛志、廣明秀一、森田英嗣
2. 発表標題 SARS-CoV-2 Virus-Like Particleの形成におけるEnvelopeタンパク質の重要性
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斎藤晃樹、荒川将志、前田昂樹、三浦滉矢、森田英嗣
2. 発表標題 HiBiTタグノックインによるLC3の高感度検出系の開発とLC3の細胞外への分泌の実態
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠山悠、石田幸太郎、鈴木英彦、蝦名博貴、森田英嗣
2. 発表標題 日本脳炎ウイルス・ナノ粒子を用いた多価ワクチンの開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 パルボウイルスB19抗体陽性者の保持する中和抗体の多様性解析
2. 発表標題 鈴木 英彦、野口 貴文、宮里 パオラ、高坂 光代、森田 英嗣
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koyama, T., Maeda, K., Ogama, N., Ishizawa, N., Kosai, H., Morita, E., Tanaka, N.
2. 発表標題 Targeting dendritic cells exosome uptake mechanism for future vaccine development
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 陽一、天野 剛志、高木 春樺、三浦 滉矢、石田 幸太郎、濱嶋 竜生、中野 隆史、森田 英嗣、廣明 秀一
2. 発表標題 SARS-CoV-2エンベロープタンパク質と宿主PDZタンパク質との相互作用を阻害する化合物の探索
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田幸太郎、荒川将志、田端桂介、甲賀大輔、西野美都子、森田英嗣
2. 発表標題 日本脳炎ウイルス複製オルガネラ形成に関与する小胞体膜変形因子の解析
3. 学会等名 第55 回日本脳炎ウイルス生態学研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------