

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32624	
研究種目：挑戦的萌芽研究	
研究期間：2011～2012	
課題番号：23659086	
研究課題名（和文）	新規自然免疫誘導因子を利用した経口投与型ワクチン開発の基礎検討
研究課題名（英文）	Basic Study of orally-delivered vaccine development using a new innate immunity inducer
研究代表者	
小泉 直也 (KOIZUMI NAOYA)	
昭和薬科大学・薬学部・助教	
研究者番号：80433845	

研究成果の概要（和文）：アデノウイルスカプシドタンパク質より同定した自然免疫誘導能と膜透過性促進能を併せ持つペプチドを用い、経口投与ワクチン製剤に利用可能なリードタンパク質としての有用性について検討した。その結果、膜透過性促進ペプチド（89 アミノ酸）は自然免疫誘導能を有していること、自己複合体を形成し酵素による分解を回避していることを見出した。さらにドメイン解析により 26 アミノ酸のペプチド配列のみでも高い細胞膜透過促進作用が得られることを見出し、経口投与型ワクチンの製剤化に利用可能なリード分子としての発展が期待された。

研究成果の概要（英文）：We have identified a peptide having both the membrane-penetrating ability to promote innate immunity from the adenoviral capsid proteins. Then, we examined the usefulness of the lead proteins available for oral administration the vaccine formulation. As a result, the membrane- penetrating peptide promotes (89 amino acids) found that they have an innate immunity-inducing activity and to avoid degradation by the enzyme to form a self-conjugate. Furthermore, we examined by the analysis of functional domains, the peptide sequence of 26 amino acids has high cell-penetrating ability. The 26 peptide has the available functions as a lead molecule for the oral vaccine formulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 薬学・医療系薬学

キーワード： 医療薬剤学，粘膜ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

現在、皮下および筋肉内へのワクチン投与では、経粘膜感染ウイルスの初期感染および初期増殖部位である粘膜組織での中和抗体産生はほとんど起こらないことが知られており、経粘膜感染ウイルスに対する予防ワクチンには粘膜免疫を誘導可能な投与方法である経鼻、経肺、経口投与が効果的であると考えられている。その中でも、特殊な装置や投与技術の要らない経口投与型ワクチンの開発は、発展途上国などの感染症リスクの高い地域に最も適していると考えられる。しかし、経口投与ワクチンを開発するためには、消化管酵素や胃酸等から抗原タンパク質を保護し、消化管粘膜組織に存在するM細胞を介して免疫細胞の集積するパイエル板へ抗原タンパク質を効率的に輸送する必要がある。これらのことから経鼻投与や経肺投与に比べ、クリアすべきハードルが高く、これまで動物実験等を用いた経口投与経路におけるワクチン製剤の研究報告は少ないのが現状である。しかしながら、投与の簡便性やコストの利点からも将来的には経口投与によるワクチン製剤の開発が期待され、そのためには経口投与ワクチン製剤に適した機能性分子の開発が必要であると考えられる。そこで、本研究では上気道粘膜面への感染力を有するアデノウイルスのプシドタンパク質を経口投与ワクチン製剤開発におけるリード分子として利用可能ではないかと考え、その有用性について検討した。

アデノウイルスはヒトおよびげっ歯類動物において、強い自然免疫反応を引き起こすことが知られているが、その誘導分子は長い間明らかとされていなかった。近年、申請者らの研究グループにより、アデノウイルスゲノムがTLR9に認識されサイトカインの産生を誘導すること。さらに、アデノウイルスゲノムから産生されるVA-RNAという小さなRNAがインターフェロンの誘導に関与していることが明らかとされた。しかしながら、これらアデノウイルスゲノムやVA-RNAのみではすべての免疫誘導メカニズムが説明できないことも示された。申請者はこれまでに、遺伝子治療およびワクチンベクターとして利用されているアデノウイルスベクターの機能解析および自然免疫誘導メカニズムの解明等の研究を行ってきており、その結果としてカプシドタンパク質の一部配列が強い自然免疫誘導を引き起こすことを発見した。また、同定したタンパク質配列は消化酵素の分解をほとんど受けず、酸・アルカリ条件下においても安定であり、さらに乾燥過程を経ることでその機能をほとんど失わないことを見出している。この強固な安定性から、経

口投与型ワクチン製剤の開発に最良な分子であると確信し、本研究では同定分子のワクチンアジュバンドとしての有用性の評価と、実験動物を用いた経口投与後の免疫誘導能について検討する。

## 2. 研究の目的

ワクチン開発には、投与する抗原だけでなく、生体内での中和抗体価の上昇を促すアジュバンドの開発が重要であり、DNAワクチンに代表される新世代型ワクチン開発は、自然免疫反応を効率的に引き起こすことで効果的な抗体産生を促している。これら新世代ワクチン開発はToll Like Receptors (TLR)等の受容体機能とリガンド分子の解明により発展していることから、新たな自然免疫誘導分子の同定は新規アジュバンドとしての応用が期待でき、新規のワクチン開発につながると考えられる。本研究は、アデノウイルスから新たな自然免疫誘導分子を同定し、本分子をワクチンアジュバンドとして用いることで、新規性の高い経口粘膜投与型ワクチン開発の基礎検討を行うことを目的としている。現在、皮下および筋肉内へのワクチン投与では、経粘膜感染ウイルスの初期感染および初期増殖部位である粘膜組織での中和抗体産生はほとんど起こらないことが知られており、経粘膜感染ウイルスに対する予防ワクチンには粘膜免疫を誘導可能な投与方法である経鼻、経肺、経口投与が効果的であると考えられる。その中でも、特殊な装置や投与技術の要らない経口投与型ワクチンの開発は、発展途上国などの感染症リスクの高い地域に最も適していると考えられる。そこで研究代表者はウイルス疾患の予防と治療を目的とした安価で投与も簡便な新規経口投与型ワクチン開発を行うことを目的とし、新規自然免疫誘導因子の同定とそのワクチンへの応用に対する基礎検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) シャフトタンパク質の自然免疫誘導能の評価

アデノウイルスカプシドタンパク質由来の自然免疫誘導分子として、ファイバー分子中のシャフト領域を同定した。本シャフトタンパク質を用いて自然免疫誘導メカニズムについて検討をおこなった。

まず、マウス腹腔内マクロファージ細胞を用いて、シャフトタンパク質作用時におけるIL-6産生について検討をおこなった。C3H/HeN およびLPS低反応性のC3H/HeJマウスより $1 \times 10^5$ 個のマウス腹腔内マクロファ

ージ細胞を 24well プレートに播種し、大腸菌により作製した組み換えシャフトタンパク質を 5 $\mu$ g/ml の濃度にて 24 時間作用させた際のメディウム中への IL-6 分泌量を ELISA 法にて測定した。

#### (2) シャフトタンパク質と FITC デキストランの共投与による経口投与後の血中移行量

C3H/HeN のマウス実験動物を用いて、高分子薬物モデルとして用いられる分子量 4 万の FITC デキストラン (FD-40) とシャフトタンパク質をそれぞれ 50 $\mu$ g/200 $\mu$ L として、経口投与用ゾンデを用いて胃直接投与をおこなった。投与後 3 時間での血液中 FITC デキストラン濃度を蛍光プレートリーダーにて測定し、シャフトタンパク質による粘膜上皮細胞を介した吸収率の向上について検討した。

#### (3) シャフトタンパク質の機能ドメインの解析

FD-40 の膜透過性の向上が得られなかったことから、シャフトタンパク質の機能性向上を目的に、機能ドメインの解析に着手した。ペプチド合成により 89 アミノ酸からなるシャフトタンパク質の一部の配列を有する 44 アミノ酸 (ペプチド B) または 26 アミノ酸 (ペプチド C) のペプチドを作製し、HepG2 細胞における FD-40 の取り込み促進機能について検討した。

#### (4) ペプチド C の立体構造解析

シャフトタンパク質中の 26 アミノ酸配列を持つペプチド C が高い FD-40 の取り込み促進機能を持つことが明らかとなったことから、次に立体構造の簡易的な検討を行い、プロテアーゼによる分解を回避する自己複合体の形成能について検討を行った。合成したペプチド C の立体構造に関与すると考えられる 68 番目および 83 番目のシステインをアラニンに改変した変異型ペプチド C に関しても同様に解析に用いた。また、CD スペクトルによるタンパク質の二次構造を測定し、立体構造の解明もおこなった。

#### (5) ペプチド C における自然免疫誘導能及び抗体産生能

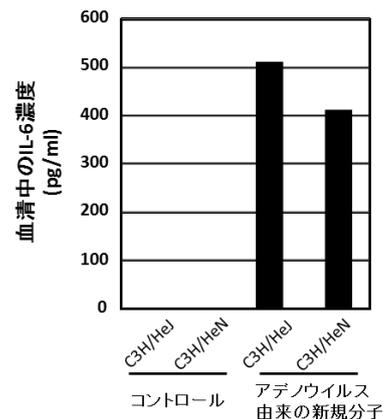
シャフトタンパク質よりも高い細胞膜透過性促進機能を持つペプチド C を同定する

ことができたことから、次に実験動物を用いた免疫誘導能および抗体産生能について検討をおこなった。今回用いた Shaft タンパク質は自然免疫誘導能を有するアデノウイルス由来のタンパク質であることから、マウス腹腔内投与後の IL-6 の産生について検討を行った。また、生体投与後にペプチド C が抗原として認識される場合、アレルギー反応などによる副作用の危険性やアジュバンド効果としての機能低下が引き起こされることから、マウスへの複数回投与によるペプチド C に対する抗体産生をスロットブロット法にて検討した。

## 4. 研究成果

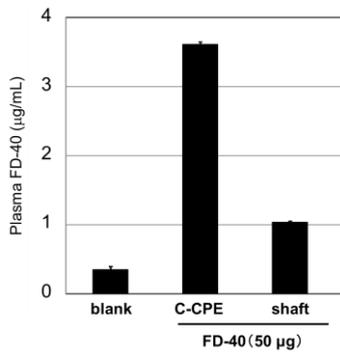
### (1) シャフトタンパク質の自然免疫誘導能の評価

C3H/HeN および LPS 低反応性の C3H/HeJ 由来腹腔内マクロファージ細胞において、シャフトタンパク質による IL-6 の産生が確認され、TLR4 以外の自然免疫誘導シグナルを介して、シャフトタンパク質がサイトカイン産生を誘導することを明らかとした。



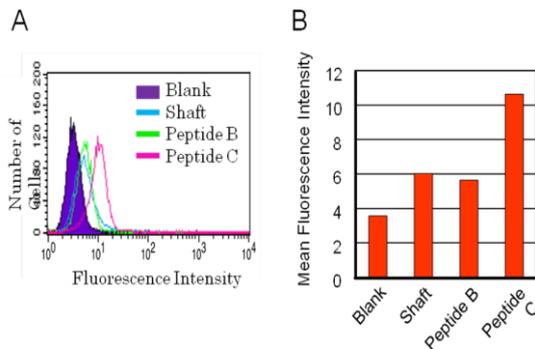
### (2) シャフトタンパク質と FITC デキストランの共投与による経口投与後の血中移行量

FD-40 とシャフトタンパク質による共投与により、FD-40 の吸収性の向上が得られなかったことから、*in vivo* 実験においてはシャフトタンパク質による膜透過能が低いのではないかと考えられた。よって、シャフトタンパク質の機能増強に関して検討が必要であると判断した。



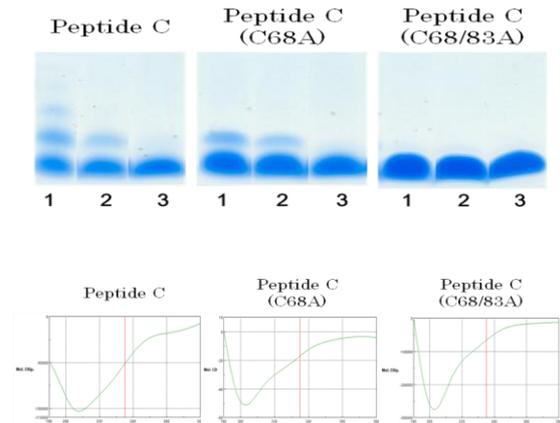
### (3) シャフトタンパク質の機能ドメインの解析

*in vivo* における FD-40 の粘膜透過性促進効果が低かったことから、機能増強を目的としてシャフトタンパク質の機能ドメインの解析を行った。合成ペプチドによる解析を行ったところ、89 アミノ酸より絞り込みを行い、最終的に 26 アミノ酸のペプチド C が シャフトタンパク質よりも高い FD-40 の細胞膜透過性促進作用があることを見出した。



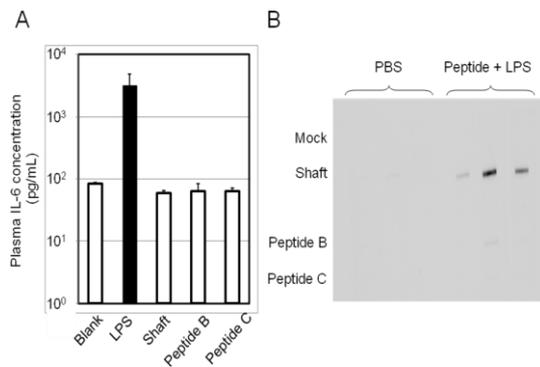
### (4) ペプチド C の立体構造解析

Native-Page の結果、ペプチド C は自己複合体を形成し、熱変性 (レーン 2) および高濃度の還元剤存在下 (レーン 3) において、その複合体形成は阻害された。また、ジスルフィド結合に関与する 2 つのシステインをアラニンに置換した変異型ペプチド C は、複合体の形成能が低下していることが明らかとなった。CD スペクトル解析においては、各変異型ペプチド C においても特徴的なピークは示さず、ランダムコイル構造を形成していることが明らかとなった。これらの構造的な検討結果は、シャフトタンパク質と類似した結果であり、ペプチド C が機能的および構造的にシャフトタンパク質と類似していることが示された。



### (5) ペプチド C における自然免疫誘導能及び抗体産生能

C3H/HeN マウスを用いて、ペプチド C の腹腔内投与による IL-6 産生能を検討したところ、自然免疫反応は誘導されず自然免疫誘導能は低いことが明らかとなった。また、免疫誘導物質であるリポポリサッカライド (LPS) とシャフトタンパク質の複数回の共投与においては、シャフトタンパク質に対する抗体は産生されるが、ペプチド B および C に対する抗体は産生されないことが明らかとなった。つまり、ペプチド C の配列は抗原として認識されないことから、生体投与による安全性が比較的高いことが推察された。しかしながら、ペプチド C はアジュバンド効果が低いことが考えられることから、経口投与ワクチン製剤の作製には、他のアジュバンド物質の利用が必要であると考えられる。



次世代経口投与ワクチン製剤の簡便な投与方法確立のため、アデノウイルス由来の膜透過性促進タンパク質を利用した粘膜面からの高分子モデル薬物の吸収性改善を試みた。その結果、マウスを用いた検討より、有意な吸収性の改善は認められなかったことから、膜透過性促進タンパク質の最適化とその機能評価を行った。その結果、26 アミノ

酸まで機能性領域の絞込みが可能となり、また細胞膜透過性促進機能の向上を確認した。さらに、生体投与後の免疫誘導能の評価を目的に、マウス腹腔内投与後のサイトカイン産生を検討したところ、自然免疫誘導は誘導されないことを確認した。また投与したアミノ酸配列の抗原性について検討したところ、26アミノ酸に対する抗体は産生されず、抗原性が低いことが明らかとなった。本検討は、同定したペプチド配列の基礎的な機能評価を行い、次世代経口投与ワクチン製剤への応用における基礎検討を行った。今後、実験動物を用いた投与経路の最適化と吸収性評価を行うことで、本細胞膜透過性促進ペプチドを利用した非侵襲的ワクチン製剤開発の発展が期待される。

#### 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)

[学会発表] (計5件)

- (1) 小泉直也、平井孝昌、藤井まき子、水口裕之、渡辺善照、アデノウイルスベクターの遺伝子導入に及ぼす fiber-shaft の役割、第27回日本DDS学会学術集会、2-D-18、東京都(東京大学本郷キャンパス)、2011年6月10日
- (2) 野中美和、小泉直也、平間奈苗、平井孝昌、持田理菜、藤井まき子、水口裕之、渡辺善照、細胞膜透過促進能を持つアデノウイルス由来 shaft タンパク質の機能解析(1): 機能ドメインの評価、第28回日本DDS学会学術集会、1-G-17、北海道(札幌コンベンションセンター)、2012年7月5日
- (3) 平井孝昌、小泉直也、酒井宏、野中美和、持田理菜、藤井まき子、水口裕之、渡辺善照、細胞膜透過促進能を持つアデノウイルス由来 shaft タンパク質の機能解析(2): 免疫誘導能の評価、第28回日本DDS学会学術集会、1-G-18、北海道(札幌コンベンションセンター)、2012年7月5日
- (4) 持田理菜、小泉直也、平井孝昌、野中美和、藤井まき子、水口裕之、渡辺善照、細胞膜透過促進能を持つアデノウイルス由来 shaft タンパク質の機能解析(3): 細胞結合因子の評価、第28回日本DDS学会学術集会、1-G-19、北海道(札幌コンベンションセンター)、2012年7月5日
- (5) 平井孝昌、小泉直也、藤井まき子、櫻井文教、水口裕之、渡辺善照、35型アデノウイルスベクターの感染に及ぼす shaft 領域の関与、日本薬学会 第133年会、

28pm F-151S、神奈川県(パシフィコ横浜)、2013年3月28日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小泉 直也 (KOIZUMI NAOYA)

昭和薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 80433845