

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32659

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890255

研究課題名(和文) 真菌症克服に向けた多糖抗原搭載型リポソームワクチン開発への基盤構築

研究課題名(英文) The development of polysaccharide-encapsulated liposomes as vaccines against fungal infections

研究代表者

多田 塁 (TADA, RUI)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70635888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：近年申請者は、正電荷脂質であるDOTAPとDC-cholesterolを構成成分とするリポソーム(DOTAP/DC-choリポソーム)が種々の蛋白質抗原に対し、経鼻粘膜投与型の粘膜アジュバントとして機能することを発見した。本研究では、DOTAP/DC-choリポソームの粘膜アジュバントとしての作用を多糖抗原に応用すべく検討を行った。まず多糖抗原搭載型DOTAP/DC-choリポソームを作製した。本リポソームをDBA/2マウスまたはBALB/cマウスに対し経鼻投与したところ、DBA/2マウスにおいてのみであるが多糖抗原特異的抗体産生を誘導することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Our laboratory has long been working on the liposomes with respect to immunological approaches. In the course of our study, we have already found that a nasal administration of the cationic liposomes with protein antigens dramatically enhanced both antigen-specific mucosal and systemic immune responses, namely the cationic liposome acts as a potent mucosal adjuvant in mice. In this study, we examined mucosal adjuvant activity of the cationic liposome against fungal polysaccharide antigens in order to overcome fungal infections. We first prepared polysaccharide antigens-encapsulated cationic liposomes, and then DBA/2 or BALB/c mice were immunized intranasally once a week with polysaccharide antigen-encapsulated cationic liposomes. Our study shows that intranasal vaccination with the polysaccharide antigen-encapsulated cationic liposomes significantly exerted polysaccharide antigen-specific antibody productions in DBA/2 mice, but not in BALB/c mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学(含真菌学)

キーワード：リポソーム 多糖 粘膜免疫 全身免疫 真菌症 粘膜ワクチン 粘膜アジュバント

## 1. 研究開始当初の背景

高度に医療が発達した現代においても、真菌症をはじめとする病原微生物による疾患のコントロールは難しい。その証拠に、エイズの増加、免疫抑制療法の発達などによる易感染性患者の増加により、深在性真菌症を含む真菌感染症は増加の一途を辿っている。さらに、薬剤耐性真菌も増加していることから、新しい視点からの真菌症克服法が切望されている。その1つとして、真菌症ワクチンがあり、世界中で盛んに研究が行われている。しかしながら、臨床応用されている真菌症ワクチンは未だにない。

真菌症など感染症の多くは、粘膜面に感染あるいは粘膜を介し感染が成立するため、粘膜ワクチンが有効であるが、実用化例は無い。通常粘膜免疫は抗原認識力が弱いため、これを補うアジュバントを必要とする。しかしながら、現在知られている粘膜アジュバントの多くは病原微生物由来の毒素であり、その毒性と抗原性から臨床応用は困難である。

これまで申請者は、ある種の正電荷リポソームをモデル蛋白抗原であるオボアルブミン(OVA)と経鼻投与することにより抗原特異的な抗体産生など、粘膜免疫さらには全身免疫を賦活化する粘膜アジュバントとして機能することを見いだしており、本システムが真菌症ワクチンとして応用可能であると期待される。

## 2. 研究の目的

真菌症ワクチンの抗原候補として多くの真菌蛋白質抗原が報告されているが、広範なスペクトラムを示す真菌由来蛋白質抗原は知られていない。そこで、申請者は真菌細胞壁多糖抗原に着目した。真菌多糖であるβグルカン は全ての真菌に共通の構造モチーフであり、広範囲の真菌に対して有効なワクチンになる可能性が高いが、抗原性の低さゆえ、特異的な免疫応答を誘導することは困難な現状である。最近、真菌多糖抗原をキャリア蛋白質と結合させ、アジュバントとして結核菌成分と共にマウスへ皮下注射することにより、多糖抗原特異的抗体を誘導出来、真菌に対し防御的に機能することが報告された。しかしながら、感染部位である粘膜に於いて、粘膜免疫は誘導出来ない点や、結核菌由来の成分をアジュバントとして用いることなど、問題点が多い。

そこで本研究では、申請者により開発した粘膜アジュバントである正電荷リポソームを多糖抗原に応用すべく検討を行った。具体的には、多糖抗原搭載型正電荷リポソームを作製し、マウスに経鼻的に免疫することにより多糖抗原特異的抗体産生を誘導可能かどうか評価することにより、安全かつ効果的な多糖抗原搭載型リポソームワクチン開発への基盤構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 正電荷リポソームの作製

正電荷脂質である DOTAP および DC-cholesterol を組成比が 1:1 (molar ratio) としたリポソーム (DOTAP/DC-chol liposome) を vortexing 法により調製し、100 nm のメンブランを用い extruder により整粒した。粒子径および電位は、NICOMP 380ZLS を用いて測定した。

### (2) 多糖抗原内封正電荷リポソームの作製

DOTAP/DC-chol liposome の水和時に、多糖抗原を溶解した溶媒を用いて水和する事により、多糖抗原内封 DOTAP/DC-chol liposome を作製し、100 nm のメンブランを用い extruder により整粒した。粒子径および電位は、NICOMP 380ZLS を用いて測定した。

### (3) CpG 搭載型正電荷リポソームの作製

DOTAP/DC-chol liposome を上記の方法にて作製後、CpG-ODN を種々の NP 比にて混合し、5 分静置した。それぞれの粒子径および電位は、NICOMP 380ZLS を用いて測定した。

### (4) Laminarin-BSA conjugate (LAM-BSA) の作製

Laminarin の 6 位側鎖を過ヨウ素酸にて開裂し、生じた還元末端と BSA 中のアミノ基を還元的アミノ化により結合させた。作製した LAM-BSA はゲルろ過法 (HW-55F) により単離した。

### (5) 真菌多糖抗原の調製

液体培養した *Candida albicans* 菌体を SDS/2-mercaptoethanol により除蛋白後、得られた細胞壁からアルカリ分画により細胞壁多糖を調製した。

### (6) 免疫スケジュール

BALB/c または DBA/2 雌性マウスに、多糖抗原搭載型 DOTAP/DC-chol liposome を週 1 回経鼻投与した。最終投与日の 1 週間後に血清あるいは鼻腔洗浄液を採取した。

### (7) ELISA 法による多糖抗原特異的抗体価の測定

多糖抗原を ELISA プレートに固相化後、BSA-PBST にてブロッキングした。洗浄後、サンプルを入れ、インキュベート後洗浄し、HRP 標識抗体で処理し、TMB を用いて発色させ吸光度を測定した。

## 4. 研究成果

モデル多糖として β-glucan である laminarin を用い、粘膜アジュバントとして期待される正電荷リポソームに内封した多糖抗原搭載型正電荷リポソームを作製し、マウスに対し経鼻投与し、多糖抗原特異的抗体産生について検討を加え、以下の結果を得た。

- (1) 多糖抗原として laminarin を内封した DOTAP/DC-chol liposome を作製し、粒子径と電位を測定したところ、両者共に粒子径が 120 nm 前後、電位は+11 mV 程度であった。
- (2) BALB/c マウスに対し、モデル蛋白質抗原 OVA と DOTAP/DC-chol liposome の経鼻投与により OVA 特異的抗体を誘導可能である day 0 および 7 投与、day 14 のスケジュールにて抗 laminarin 抗体価を検討したところ、抗 laminarin 抗体の産生は観察されなかった (data not shown)。
- (3) 次に、laminarin 内封 DOTAP/DC-chol liposome を BALB/c マウスに週 1 回経鼻投与後、経時的に血清を採取し、抗 laminarin 抗体価を検討したところ、day 70 においても産生は観察されなかった (Fig. 1)。
- (4) そこで、 $\beta$ -glucan 高感受性であることが知られている DBA/2 マウスを用いて、laminarin 内封 DOTAP/DC-chol liposome を週 1 回経鼻投与し、経時的に血清を採取し、抗 laminarin 抗体価を検討したところ、day 28 付近から顕著な抗 laminarin 抗体の産生が見られた (Fig. 1)。さらに、鼻腔洗浄液中の IgA 産生に関しても、DBA/2 では観察されたが、BALB/c では見られなかった (Fig. 2)。

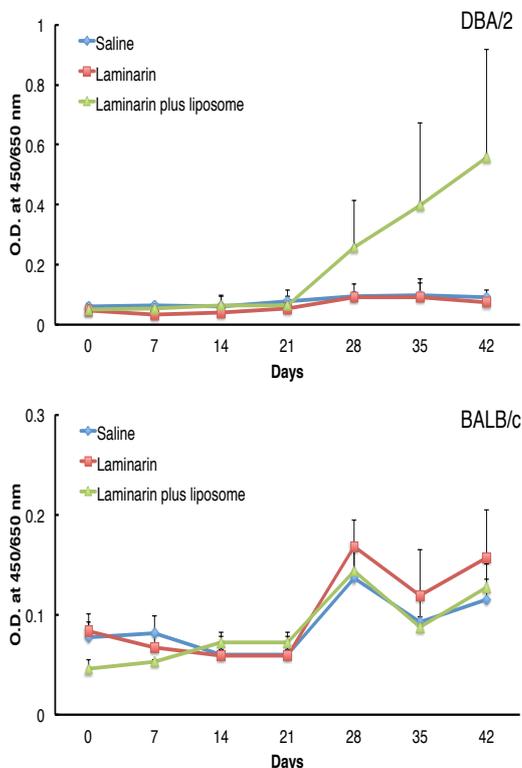


Fig.1. Induction of laminarin-specific serum IgG responses in mice intranasally immunized with laminarin plus DOTAP/DC-chol liposomes

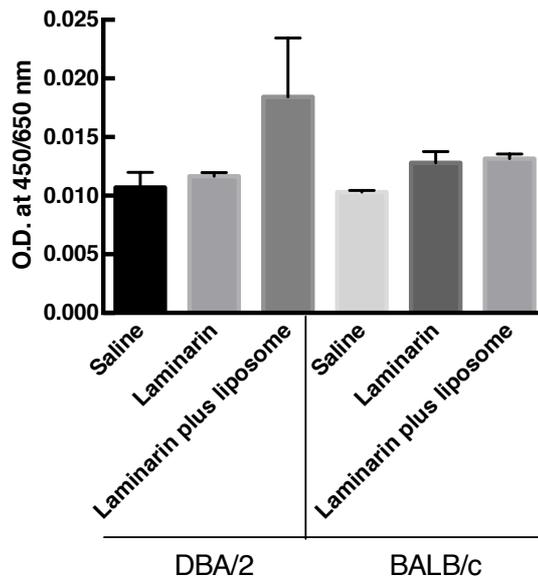


Fig.2. Induction of laminarin-specific nasal IgA responses in mice intranasally immunized with laminarin plus DOTAP/DC-chol liposomes

- (5) 多糖に対する免疫応答を増強する方法として、多糖をキャリア蛋白質と結合させる方法が知られている。そこで、BALB/c マウスにおいても抗 laminarin 抗体産生を誘導させる目的で、LAM-BSA conjugate を作製し、DOTAP/DC-chol liposome と共に経鼻的に投与し、抗 laminarin 産生を検討したが、産生はみられなかった (data not shown)。
- (6) Laminarin は  $\beta$  グルカンの中でも抗原性が低いことが知られている。そこで、病原性真菌 *Candida albicans* より細胞壁多糖ライブラリーを作製した。
- (7) 多糖に対する抗体を誘導するためには、効果的な自然免疫応答が必要である。そこで、TLR9 リガンドである CpG ODN を静電的に DOTAP/DC-chol liposome に搭載させた正電荷リポソームを作製した。種々の NP 比にて検討し、比較的安定な CpG ODN 搭載 DOTAP/DC-chol liposome (CpG-liposome) を得ることに成功した。
- (8) CpG-liposome のアジュバント活性における最適な NP 比あるいは投与量の検討を目的とし、モデル蛋白質抗原である OVA を用い、検討した。その結果、CpG ODN あるいは DOTAP/DC-chol liposome 単独よりも強力に免疫応答を誘導する CpG-liposome の作製に成功した (Fig. 3)。

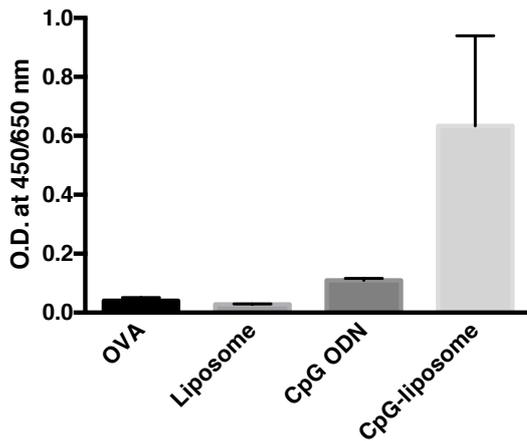


Fig. 3. Induction of OVA-specific nasal IgA responses in mice intranasally immunized with OVA plus CpG ODN-loaded DOTAP/DC-chol liposomes

以上の本研究により、真菌細胞壁多糖であるβグルカンを正電荷脂質であるDOTAPとDC-cholesterolを構成脂質とするリポソーム(DOTAP/DC-chol liposome)へ搭載し、マウスへ経鼻投与すると、βグルカン高感受性マウスであるDBA/2マウスにおいて、βグルカン特異的抗体応答を誘導することに成功した。すなわち、抗原性の低いとされる真菌多糖抗原に対して正電荷リポソームを用いて、多糖抗原特異的抗体を誘導する新規方法論を見いだした。しかしながら、1) BALB/cマウスにおいて抗体産生を誘導できない点、2) 長期の投与を必要とする点が課題となった。この課題克服のため、1)、多糖-キャリア蛋白質搭載型正電荷リポソームの経鼻投与による抗体産生誘導、2)、TLRリガンド搭載型正電荷リポソームの開発と活性評価、ならびに3)、作製した真菌細胞壁多糖搭載型正電荷リポソームの調製と経鼻投与による抗体産生誘導を現在検討中である。

本研究の成果を基に、さらに短期間かつ強力にマウスの系統を選ばずに真菌細胞壁多糖に対する免疫応答を誘導可能なリポソームアジュバントの開発を行うことにより、広範な真菌に対し有効な新規経鼻投与型リポソームワクチンを創成が期待される。

##### 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)

[雑誌論文] (計 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 武藤祥子、多田 壘、日高晃、山北悠希、國澤純、清野宏、新槇幸彦、CpG ODN 搭載カチオニックリポソームによる粘膜アジュバント作用、第30回日本DDS学会学術集会(2014年7月30-31日、東京)
- ② 多田 壘、日高晃、山北悠希、武藤祥子、國澤純、清野宏、新槇幸彦、正電荷リポ

ソームの経鼻投与による粘膜アジュバント活性、第30回日本DDS学会学術集会(2014年7月30-31日、東京)

- ③ 日高晃、多田 壘、山北悠希、武藤祥子、國澤純、清野宏、新槇幸彦、感染症克服に向けた経鼻投与型リポソームワクチンの開発、第91回東京医科大学・東京薬科大学・免疫アレルギー研究会(2014年6月3日、東京)
- ④ Akira Hidaka, Rui Tada, Yuki Yamakita, Shoko Muto, Noriko Takayama, Emi Honjo, Naoko Iwase, Jun Kunisawa, Hiroshi Kiyono, Aramaki Yukihiko, A cationic liposome composed of DOTAP in combination with DC-chol acts as a potent mucosal adjuvant, 第87回日本細菌学会総会(2014年3月26-28日、東京)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

##### 6. 研究組織

###### (1) 研究代表者

多田 壘 (TADA RUI)  
東京薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：70635888

###### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

###### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：