

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650042

研究課題名(和文)抗体産生キャリアとして機能する金ナノ微粒子の抗原提示機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the antigen-presenting mechanism of gold nanoparticles functioning as antibody-producing carriers

研究代表者

石井 則行 (ISHII, NORIYUKI)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：10261174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体内では、金ナノ粒子を起点として抗ハプテン抗体の産生が確認された。本研究から総合的に判断すると、低分子化合物は、金ナノ粒子とともに免疫原としてマクロファージや樹状細胞によって貪食され、還元状態にある細胞質において細胞内消化を経て、初期のエンドソーム、マルチベシクルポディーを経由して、エキソソームに内包される形で細胞外へと放出され、B細胞を活性化すると考えられる。樹状細胞から放出されるエキソソームにMHC分子は確認されているが、マクロファージからのエキソソームには、これまでのところ、MHC分子は検出されていない。免疫原情報を送達するエキソソームのB細胞に対する生理的役割と機能の解明が待たれる。

研究成果の概要(英文)：In vivo production of anti-hapten antibody has been confirmed previously by the use of gold nanoparticles capped with small chemical substances as a starting point. The present molecular and cellular level study concludes that the gold nanoparticles bound to the chemical substances as an immunogen are at first, engulfed by macrophages and dendritic cells, and then intracellularly digested in the cytoplasm due to its reduced condition. The immunogen is then transported from early endosome through multivesicular body, and is released into the extracellular in the form that is contained in exosomes. It is proper to consider such exosomes activate B-cells. The MHC molecules are known to exist in the exosomes released from dendritic cells, but not detected thus far in the exosomes from macrophages. Very little is currently known about whether the information of the immunogen is delivered from macrophages or dendritic cells, so it is hoped that future research will clarify this point.

研究分野：生物物理学

キーワード：免疫生化学 抗ハプテン抗体 金ナノ微粒子担体

1. 研究開始当初の背景

一般に、アゾベンゼン等の低分子色素化合物は免疫原性が低く、単独では抗体産生能をもたない(ハプテンと呼ばれる)。しかし、タンパク質等の大きな分子をキャリアとして結合させることにより免疫感作能を誘起させ、抗体産生が可能となる。ところが、タンパク質をキャリアとした場合、同時にキャリアタンパク質に対する抗体も産生されるため、たとえ抗体が得られても、当該ハプテンへの特異性(結合力)は低く、また、抗体分子としての生化学的性質は共通するため、更なる精製が極めて困難である等、課題があった。

我々は、機能生物化学、ナノ材料の機能創発とバイオ応用の観点から、金ナノ粒子(～5 nm)をキャリアとして用いることを検討した。ハプテンとして知られるアゾベンゼン化合物で金ナノ粒子の表面を稠密に被覆するように配位させ、その状態でウサギ皮下に注射すると、アゾベンゼンのシストランス光学異性体を識別できる程、高性能な抗ハプテン抗体(抗アゾベンゼンIgG)が産生可能となることを見出した(特許第4735954号(2011)、*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 124-131(2008))。

それでは何故、金ナノ粒子をキャリアとして使うことにより抗ハプテン抗体の産生に成功したのだろうか?

その解を、国内外の免疫学の教科書、専門書、学術論文等に求めたが、抗原提示、抗体産生の分子機構については、概ね共通して、次のような解説に要約されていた。

T細胞はタンパク質性の短いアミノ酸に対して応答する。T細胞が抗原を認識する際、主要組織適合性複合体(MHC)分子は極めて重要な役割を担っている。MHCは、クラスI、II、IIIに分類され、ヒトでは、第6染色体上にあり、ヒト白血球抗原HLAと呼ばれる。ヒトHLA-A2(MHCクラスI)のX線結晶構造解析(1987年 Bjorkman et al.)によると、MHCクラスI分子には溝があり、この溝に抗原ペプチド(アミノ酸9～11残基からなる)が結合し、生体の免疫システムに提示される。MHCクラスII分子にも同様な溝構造があり、抗原ペプチド(アミノ酸10～30残基、あるいはそれ以上のペプチド)が結合する。

一方、B細胞は、表面に免疫グロブリンを発現している。その分化成熟とともに、免疫グロブリンを自ら産生して表面に発現し、抗原を認識する能力と結合能を獲得する。成熟B細胞の抗原レセプターに抗原が結合し、T細胞からの適切なシグナル、各種液性因子の作用によってIgMの産生から、IgG、IgA、IgE等のアイソタイプの免疫グロブリンを産生するようになる。

そのような中であって、Janewayらによる免疫生物学の教科書に「一部の微生物抗原は

T細胞の補助なしで直接B細胞を活性化する。」という記述があった。そこから類推すると、金ナノ粒子が直接B細胞を活性化する可能性が示唆された。

金属ナノ粒子を用いたことが、生物的ノイズに埋没されずに有利な結果へと帰結されたと考えられるが、金ナノ粒子が抗体産生キャリアとして機能することに関して、より正確を期すれば、T細胞を介さずにB細胞に免疫原を提示し、B細胞に抗体産生を誘発する分子機構が存在するか否か、そこまで言及した腑に落ちる解説は何処にも見当たらなかった。そこで、金ナノ粒子が介在する免疫原提示のメカニズムについて、分子・細胞レベルで検証することは可能か、また、どのような実験からその謎に迫れるのか、この課題解決に挑戦する研究に着手した。

研究を遂行する途上で、ある現象に気づくことができ、本研究課題の解決の糸口をつかめたことは幸いであった。それは、正しく「エキソソーム」の存在である。エキソソームについて簡単に言及しておく。

エキソソームは、その存在は古くから知られていた。しかし、細胞から活発に放出され、単に老廃物の排出を担っているだけのシステムと考えられてきた。最初の報告は、1983年のPan & Johnstoneによる。生体では、血液中や、尿、唾液、脳脊髄液、羊水、悪性腹水等の体液中に存在しており、直径30～200 nmの膜小胞である。エキソソームは、多様性に富み、内腔にタンパク質、mRNA、microRNA(miRNA)、ゲノムDNA等を内包し、これらは、体液中に存在するRNase等の分解酵素から保護されている。近年、大きな発見として報じられたが、遠く離れた細胞間での情報伝達機能を併せもつことが明らかになり、国内外でエキソソームの生理的な重要性が認識され始めている(2013年ノーベル医学・生理学賞(細胞内の小胞輸送の発見))。多様性に富む複雑系であることから、エキソソームの定義に関しては未だコンセンサスが得られていない。2013年に開催された国際細胞外小胞学会(ISEV)では、エキソソーム以外の膜小胞も含めて細胞外膜小胞(extracellular vesicles)と呼ぶことが推奨されている。

2. 研究の目的

ハプテンを結合した金ナノ粒子が、生体(ウサギ)の免疫システムに対して免疫原として働き、付随させたハプテンを抗原として提示し、抗ハプテン抗体産生キャリアとして機能したことから、金ナノ粒子が介在する抗体産生の分子機構について、株化培養細胞を用いて、我々の仮説を、分子・細胞レベルで検証できるか、さらには、引き続き、今後、新たな関連テーマを選定し推進する上で探究する

に値するかどうか、その見極めを挑戦的萌芽研究として集中的に実施する。本研究を通して機能性ナノ材料（取り分け、金属ナノ粒子）のバイオ応用の有用性について、判断材料として供することも目的とする。

3. 研究の方法

新規に培養細胞実験室を整備し（所属の人事異動に伴い）、株化培養細胞（B細胞、マクロファージ、濾胞星状細胞等）を安定的に継代培養可能な実験環境を構築し、種々の実験に適した培養条件、実験手法等について最適化する。

先導的にウサギに対して行った免疫感作実験では、アジュバントに混合して用いることができたため、疎水性のアゾベンゼン化合物であっても問題にならなかったが、培養細胞に対する系で同様の実験を行うためには、最表層を親水基の層で覆うように結合するアゾベンゼン化合物を新たに設計し、化学合成する必要がある。

株化培養細胞（B細胞等）の生育状況、ハプテン修飾金ナノ粒子の調製等の準備が整い次第、落射（蛍光）顕微鏡や電子顕微鏡法による観察を行い、B細胞と金ナノ粒子との相互作用を可視化する条件等について検討を進める。適宜、培養細胞（B細胞）を回収して細胞質画分、あるいは、培地上清をサンプリングし、目的の抗体産生が認められるか、免疫生化学的に分析する。併行して、新規に免疫原となり得る金属ナノ粒子キャリアの探索を行い、種々の実験条件からその適性について検討する。

培養細胞から分泌される膜小胞について、効率よく培地から回収する方法、単離・分画精製する手法、生物機能活性の分析・評価方法等を開発し、検討を行う。

4. 研究成果

実験動物（ウサギ）に対する免疫感作実験から、金ナノ粒子にハプテン（単独では抗原性のない比較的低分子量の物質）を共役させると、生体内で免疫応答が増進すること、すなわち、金ナノ粒子が抗ハプテン抗体産生キャリアとして機能することを見出している。用いた粒子サイズがナノスケールであったことが、生体内で適度な時間、滞留を可能とし、ハプテン分子の局所的濃度を適度に高められたことが抗体産生へとつながったと考察【仮説 I】している。しかし、その分子・細胞レベルでのメカニズムは不明であった。

本研究では、上述の【仮説 I】を分子・細胞レベルで検証することを目的に、金ナノ粒子が媒介する抗原提示の分子メカニズムを

解明することを可能とする実験手法の開発を行った。

（1）免疫系株化培養細胞を用いた免疫感作実験

免疫原性を高めるように表面修飾したナノスケールの金属粒子に抗原提示能が創発されるか、すなわち、B細胞がこのナノ粒子によって直接、免疫刺激を受け、抗体を産生するに至るか、分子・細胞レベルで観察・測定を行った。

①先の実験動物による実験で、ハプテンとして用いたアゾベンゼン誘導体を、従前通りに金ナノ粒子表面に配位させ、培養細胞を生育している培養液中に添加したところ、殆ど分散することはなかった。疎水性が比較的高かったことが原因と考察した。培養液中で凝集せずに均等に分散し、細胞との相互作用を可能とするためには、ナノ粒子表面に配位した際に、最表面が親水性を示すようにデザインしたアゾベンゼン（ハプテン）化合物を調製する必要があった。

同僚研究者の協力を得て、タイプの異なる数種類のアゾベンゼン誘導体を設計し、順次、有機化学合成した後、精製を行った。ところが、培養細胞が存在する培地中に添加すると、依然として一様には分散せず、細かな集団に凝集する傾向がみられた。最表面が親水性になるように調製したはずのアゾベンゼンモチーフで被覆された金ナノ粒子であったが、状況を改善するためには、試行錯誤を繰り返す必要があった。最外殻を、ほぼ完全に親水基で覆うように設計したアゾベンゼンモチーフで、金ナノ粒子を被覆するように調製しなければならないことがわかった。最終的に最外殻が親水性となるアゾベンゼン化合物：2-hydroxyethyl 4-[4-[12-(12-hydroxydodecyl)disulfanyl]dodecyloxy]phenylazo]benzoate を新規に化学合成し、高純度で精製することができた。

②この親水性を付与されたアゾベンゼン化合物によって被覆された金ナノ粒子の調製は、思いの外、難航を極めたため、ナノ粒子表面に稠密になるように固定化されたハプテン様低分子と培養免疫系細胞との直接の相互作用の観察、免疫生化学的測定・分析が主題であり、優先すべき実験であると捉え、免疫原性を兼ね備えた他の低分子化合物、ならびに、キャリアとして活用可能な粒径の異なるナノ粒子を探索し、調製法、滅菌操作手法等の改良を併行して進め、満たすべき種々の条件を見出すことができた。一例として、磁性ナノ粒子をキャリアとして利用することが可能であり、免疫原調製プロトコルを確立することができた。これにより、市販の抗体を用いて免疫生化学的検出が可能な実験系を構築することができた。

③新たに細胞培養実験室用途にスペース配分があったので、細胞生物学、免疫生化学実験環境を整備し、細胞バンクから分譲・購入したニワトリ由来培養B細胞 (DT-40) を使って、培養条件、生化学実験の条件検討ならびに条件の最適化を進めた。培地に放出された分泌物 (膜小胞を含む) を培養上清として効率よく回収し、免疫・生化学的に検定する手法について検討を行った。引き続き、マウス由来のB細胞 (BCL1 Clone CW13.20)、単球、マクロファージ (J774A.1)、濾胞星状細胞 (pit/F1) を使って同様の実験を行い、それぞれに適した種々の実験条件を見出すことができた。

(2) 細胞外膜小胞を視野に入れた免疫感作実験

研究途上で、マクロファージやB細胞等の培養細胞から、培地中に生体膜小胞が盛んに放出されることに気づいた (図1)。

免疫系培養細胞に対して、細胞密度が80~90%程度に達したところで、免疫原となるナノ粒子を添加し、細胞との相互作用を顕微鏡下で詳細に観察することを繰り返していたところ、ある時間域から急激に細胞からの分泌 (放出) 物が増える現象に気づくことができ、思いがけない発見へとつながった。文献等に当たったところ、株化培養細胞からもエクソソームが分泌されること、その粒径は一般に30~200 nmであり、多様なタンパク質、核酸 (mRNA、microRNA、Non-coding RNA、DNA) を内包しており、近年、興味深いことに、細胞間での情報伝達の一翼を担っている可能性が指摘されていた。そこでエクソソームも視野に入れ、研究対象を拡張することにした。

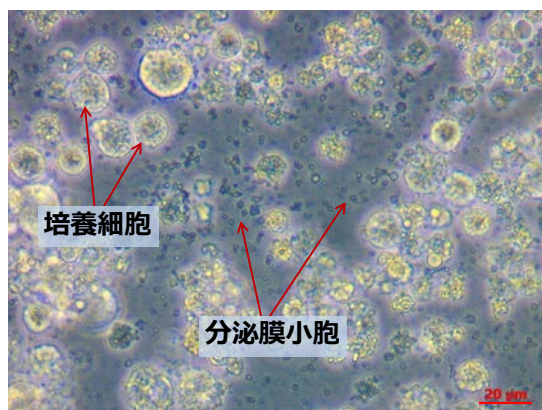


図1 細胞から分泌される膜小胞

①培養細胞から培地中に放出されたエクソソーム等の細胞外膜小胞を分離精製し、予めナノ粒子を介して提示しておいた抗原情報を追跡、検出する手法を開発した。培地上清を回収し、限外濾過とシヨ糖密度勾配超遠心分離法により分離精製した膜小胞の画分に、目的の抗原 (情報) を提示している MHC 分子

を発現しているエクソソームが存在するか、検出を試みたが、低濃度 (MHC 分子数が少ない) のためか、優位な差として確認するには至らなかった。そこで、エクソソーム・バイオマーカーとして知られている CD63 に対する抗体と金コロイド粒子を用いて二重に標識する免疫電子顕微鏡法を適用した。併行して免疫電顕を迅速かつ簡便に実施するための手法と条件を確立した。さらに透過型電子顕微鏡解析としてエクソソームの形態観察と粒径計測を行うための最適な分画精製、検出法を考案した。

②国内外の大手試薬メーカーから市販されているエクソソーム単離キットは、基本的に付属する試薬 (沈殿剤) と培養上清または体液を混合して静置し、低速遠心分離によってペレットとしてエクソソームを回収する。しかし、電子顕微鏡法等により、直接可視化し、形態評価や、粒径計測を目的とした場合、これらのキットを用いて調製されたエクソソームと称されるサンプルには、キット付属の沈殿剤に由来するさまざまな粒径 (サイズ) のベシクルが混在してしまうことから、イメージングには全く適さないことがわかった。

③そこで、外来の未確認成分の混入を完全に回避できる分離・精製方法を検討した。その結果、シヨ糖密度勾配超遠心分離法により、培地中に分泌された細胞外膜小胞 (主成分はエクソソーム) を単離・精製する方法が最適であることがわかった。

④由来の異なるエクソソームに共通にみられるテトラスパニン類に対する抗体 (抗 CD63 抗体等) を使ったイムノドットプロット法を用いて、シヨ糖密度勾配超遠心法により分画したエクソソーム含有 (陽性) 画分を迅速かつ簡便に検出可能な方法を確立することができた。

⑤次に、エクソソーム陽性画分に対して基質特異的に結合する1次抗体と、その1次抗体を認識する、金コロイド粒子で標識された2次抗体でラベルする従来型の免疫電顕法に改良を加え、少量かつ短時間で簡便に免疫染色固定可能な手法を考案した。

⑥エクソソーム陽性画分について、ブラウン運動軌跡解析に基づく粒径分布計測と、動的小および静的光散乱法による分布計測を行った結果、100 nm 近傍に特徴的なピーク分布を示すことがわかった。

⑦細胞が分泌する膜小胞は、エクソソームだけではなく、マイクロベシクル、アポトーシス小体等も存在する。最近、国際細胞外小胞学会 (ISEV) のアナウンスによると、細胞外膜小胞として、総合的に捉えることが重要

とされてきている。従って、本研究で得られた、インタクトな状態で分離精製されるエキソソームを対象とした透過型電顕や免疫電顕法の要素技術に関する有益な知見は、広く膜小胞全般の解析に応用することができる。

総合的に考察したところ、次のような【仮説 II】を構築するに至った。まず、免疫原として低分子化学物質を結合した金ナノ粒子はマクロファージや樹状細胞等により貪食される。細胞質は還元状態にあると想定されるため、金ナノ粒子表面に結合したハプテン等は、細胞内消化を経て、初期のエンドソーム、マルチベシクルボディー (MVB) を経由して、エキソソームに内包されるかたちで細胞外へと放出される。樹状細胞や、T細胞から放出されるエキソソーム表面に MHC クラス I、II が存在していることは報告されている。

しかし、貪食性の強いマクロファージから放出されるエキソソームには、これまでのところ、MHC 分子は報告されていない。マクロファージから樹状細胞へ免疫原の情報が送達されるか否かは不明であり、そのような経路の存在は確認されていない (私見であるが、ここでもエキソソームが介在すると予測している)。送達先の B 細胞から放出されるエキソソームにも MHC は確認されていない。従って、B 細胞間で直接的に免疫原情報を増幅するような回路は存在しないのかも知れない。ただし、他のエキソソームを介して間接的に免疫原情報が交換される可能性は捨てきれない。今後の研究に期待したい。

実際に、生体内 (ウサギ) では、ハプテンを表面に結合した金ナノ粒子を起点として、抗ハプテン抗体の産生が確認されている。それでは、分子・細胞レベルでの免疫感作、抗体産生プロセスでは、どのようなことが起きているのか、機序が解明され、「免疫学」の教科書に解説が収載されることが待たれる。エキソソームには明らかに生理的な役割分担があるようであり、対応する機能の解明は重要である。

ナノ粒子表面に稠密に配位するように固定化された抗原が、マクロファージ等の貪食細胞を経て、その抗原情報がエキソソームを介して免疫 B 細胞に送達され、当該抗原に対する抗体産生につながる。人工物であるナノ粒子を出発点とする免疫原情報伝達スキーム【仮説 II】を構築することができた。局所的には、確証を捉えることができたが、全体を通して、また、任意の免疫原 (抗原となり得るアレルゲン等の特定化合物とナノ構造体との組み合わせ) に対してこのスキームを一般化することができるか、今後、さらなる研究に期待したい。

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石井 則行、池本 光志、広瀬 恵子、小田原 孝行、エキソソームって何? 十万倍で見る生体の謎、2015 年 産総研 (つくばセンター) サイエンスコーナー出展、平成 27 年 7 月 18 日、産業技術総合研究所つくばセンター (茨城県・つくば市)

②小田原 孝行、池本 光志、広瀬 恵子、石井 則行、タンパク質会合における混み合った分子環境の役割、第 14 回 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、平成 27 年 2 月 3 日、産業技術総合研究所つくばセンター共用講堂 (茨城県・つくば市)

③石井 則行、池本 光志、広瀬 恵子、小田原 孝行、疾患診断マーカーとしてのエキソソーム利用技術開発を支援する新電子顕微鏡技術の創製、第 14 回 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、平成 27 年 2 月 3 日、産業技術総合研究所つくばセンター共用講堂 (茨城県・つくば市)

④石井 則行、玉田 薫、秋山 陽久、金ナノ粒子キャリアー表面に提示されたハプテンとしてのアゾベンゼン色素の免疫応答、第 13 回 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、平成 26 年 2 月 18 日、産業技術総合研究所つくばセンター共用講堂 (茨城県・つくば市)

⑤石井 則行、玉田 薫、秋山 陽久、金ナノ粒子キャリアー表面に提示されたハプテンとしてのアゾベンゼン色素の免疫応答、第 51 回日本生物物理学会年会、平成 25 年 10 月 30 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

[図書] (計 1 件)

①Noriyuki Ishii、Nova Science Publishers, Inc.、Image Analyses of Two-Dimensional Crystalline Arrays of Membrane Proteins and Protein Supramolecular Complexes、(2014) 189-216

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：生物物理学的解析に適した膜小胞の分離精製法

発明者：石井 則行、池本 光志

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特許願 2016-075498 号

出願年月日：平成 28 年 4 月 4 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 則行 (ISHII NORIYUKI)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：10261174