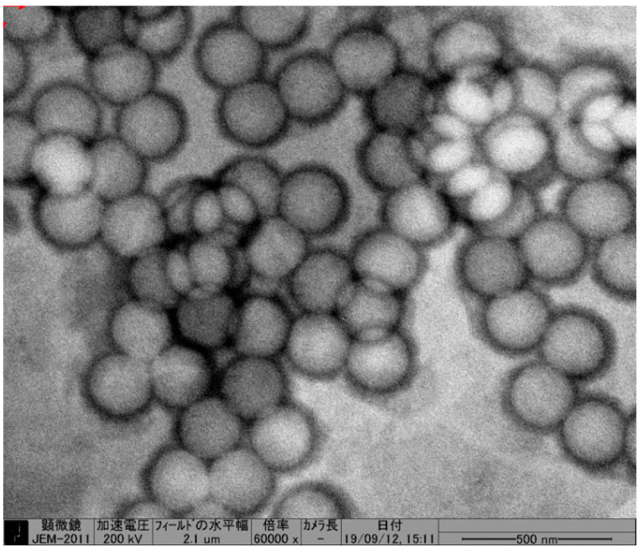
77　バイオと微粒子合成技術の融合によるアジュバント開発	黒田　章夫

【目的】アジュバントとは、免疫反応を促進する物質である。アルミニウム塩の無機粒子（アラム）からなるアラムアジュバントは約 100 年前に開発され、多くの命を救ってきた。最近では感染症の枠を超え、ガンなどの治療に広がってきている。しかし、アラムアジュバントの欠点は、1. 抗原によってはアラム粒子に結合せず、免疫細胞に届ける前に抗原が分解される場合があること、2. 溶け出したアルミニウムの毒性の負の側面が存在することである。効率的で安全なアジュバント技術は今後の免疫療法の「鍵」とされている。本研究では、その欠点を克服するために、1.「アラム粒子に結合するペプチド」によって任意の抗原をアラム粒子に結合させる技術（アラムタグ法）を開発すること、2.「微粒子のナノ構造化技術」によって中空構造を持つアラム粒子を合成し、アルミニウムの含量を低下させてその毒性を低減することである。これまでになかった無機とバイオの融合により、アラムアジュバントの効率性と安全性を高め、人類の健康に資することを目的とする。

【方法】0.2 μm のポリスチレン粒子をテンプレートとして水酸化アルミニウムを粒子表面で析出させた。その後ポリスチレンをトルエンで除去することで中空の水酸化アルミニウム粒子を作製した。また、ヒト単球白血病細胞株 THP-1 の細胞破砕液とアラム粒子を混合して、結合するタンパク質の同定を行った。さらに結合するタンパク質をフラグメント化し、結合部位を同定した。アラム粒子に結合するアラムタグと B 群連鎖球菌のタイプⅢの莢膜多糖体の保護エピトープの構造を模倣するペプチドの融合したペプチドを作製し、マウス（BALB/c、各 5 個体）に免疫した。

【結果】塩化アルミニウム水溶液にポリスチレン粒子を分散させ、ローテーターで混合しながら徐々にアンモニア水を添加することで、ポリスチレン粒子テンプレートの周囲に水酸化アルミニウムが合成された。トルエンでポリスチレン粒子を取り除いた結果、内径 200 nm の中空の水酸化アルミニウム粒子が合成できた。ヒト単球白血病細胞株 THP-1 の細胞破砕液から、アラム粒子に結合するタンパク質のスクリーニングを行った。その結果、Myosin-9,10、actin、Histone H2B の 4 つのアラム粒子結合タンパク質を同定することができた。次に、最も分子量の小さい Histone H2B タンパク質を用いてアラム粒子結合部位の同定を行った。その結果、KKAVTKAQKKDGKKRK の中にアラム粒子と強く結合する配列が存在すると考えられ、これをアラムタグとした。アラムタグを融合した抗体ペプチド（S9p-AlumTag）とアラム粒子を混合し、マウスに免疫して、抗 S9p 抗体（IgG）の産生量を評価した。比較として、抗原ペプチド（S9p）のみとアラム粒子の混合体を用いることで、アラムタグの効果を検討した。しかしながら、抗 S9p 抗体の産生は認められず、現状ではアラムタグの効果が確認できていない。今後、抗原の分子量を大きくしたタンパク質を用いてタグの効果を確認したい。

合成した中空アラム粒子



77. バイオと微粒子合成技術の融合によるアジュバント開発

黒田　章夫

*広島大学 大学院先端物質科学研究科 分子生命機能科学専攻 細胞工学研究室

Key words：アジュバント，アラム，水酸化アルミニウム，中空粒子，結合ペプチド

緒　言

ワクチンは病原体の感染を防ぐために世界中で使われ、毎年 200～300 万人もの人々の命を救っている。アジュバントとは、ワクチン抗原と共に注射して、その抗原に対する免疫原性を増強することで予防的に多くの人命を救う貴重な製剤の呼称である。特に精製された抗原のみでは免疫原性が不十分であり、アジュバントを添加することが必須になっている。最近では、アジュバントは感染症ワクチンに使われているだけでなく、ガン、神経疾患、循環器疾患などの非感染症疾患にも使われる様になってきており、効率的なアジュバントは今後の免疫療法における「鍵」とされている。

現在、ヒトへの使用に対して許可されている唯一のアジュバントは水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムなどアルミ含有粒子（アラム）である（例外としてスクワレン含有アジュバントが認可)。アラム粒子は、以下の 2 つの効果により、効率的な免疫反応が起こるとされている。1. 自然免疫賦活化：アラム粒子は異物と認識され、免疫細胞である樹状細胞などを誘引する。アラム粒子と樹状細胞の接触により、樹状細胞表面での免疫レセプターの集合を促進する。免疫レセプターの集合は、樹状細胞を活性化し、T 細胞を活性化するサイトカイン等を放出する。2. 徐放効果：アラム粒子上に結合した抗原をゆっくり放出すること（徐放効果）で、集まった樹状細胞に取り込ませる。取り込まれた抗原は断片化されて、樹状細胞上の MHC レセプターに提示される。提示されたペプチドを認識できる T 細胞のみがシグナルを受け取ることによって、抗原特異的な T 細胞が効率的に活性化され、抗体の生産へとつながる。

一方、アラムアジュバントにはいくつかの問題が指摘されている。例えば、テスト用抗原として使われる卵白アルブミン（OVA）は、アラム粒子と結合できる。アラム粒子と結合することによる徐放効果で効率的に樹状細胞が抗原を取り込むことが証明されている（アラム粒子が存在しない場合の約 4 倍)。しかし、すべての抗原タンパク質がアラム粒子と結合する訳ではない。我々の実験結果では、細胞質の主要なタンパク質のうち約 20%の種類しかアラム粒子と結合しない。逆に言えば、約 80%の抗原は徐放効果が得られていない可能性が高い。もし抗原タンパク質がアラム粒子と結合しなければ、免疫細胞に取り込まれる前に体内で希釈される。このことは、ワクチンの成否が抗原によって異なる原因の一つかもしれないと考えられる。さらにアルミニウムの負の効果（毒性）の問題が指摘されている。アラム粒子のアジュバントはB型肝炎、ジフテリア、ポリオ、狂犬病、インフルエンザを初めとする様々なワクチンに長年利用されてきたため一定以上の安全性は確保されている。しかし、昨今報道されているような子宮頸癌予防ワクチンやパンデミック用のインフルエンザワクチンによる副作用が、アジュバントのアラム粒子が原因ではないか、といった議論があるのも事実である。厚生労働省によると、ラットにおけるアルミニウムの毒性として、少なくとも腎臓や膀胱への影響、神経毒性（握力の低下）を認めている（人に対しては食品からのアルミニウム摂取の許容量として 1 週間あたり 2 mg/Kg 体重)。役目を終えたアラム粒子から溶出するアルミニウムを低減することは安全性の担保の面から重要になるが、負の効果（懸念）を減らすためにどうすればいいか分かっていない。

そこで、本研究では、アラム粒子アジュバントにおいて、今までにない工夫を入れ込むことで、より効果的で安全な免疫促進能を有するアジュバントの開発を行う（図 1)。工夫 1：すべての抗原に徐放効果が得られる様にするためのアラム粒子結合ペプチドを開発する（アラム粒子に抗原を結合させるためのタグ、アラムタグと仮称)。組換え技術により、抗原タンパク質にアラムタグを付与することで、アラム粒子による樹状細胞への抗原を取り込ませる機能を

*現在の所属：広島大学 大学院統合生命科学研究科 統合生命科学専攻 細胞工学研究室

最大限発揮させる。工夫 2：樹状細胞の活性化には、アラム粒子の表面が必要である。しかし、アラム粒子の中身は必要ない。そこで中空のアラム粒子を作れば、アルミニウムの含量を減らしつつ、アジュバントとしての効果は保たれるのではないかと考えた。すなわち、中空のアラム粒子を使うことで副作用の懸念があるアルミニウムの含量を低減する。

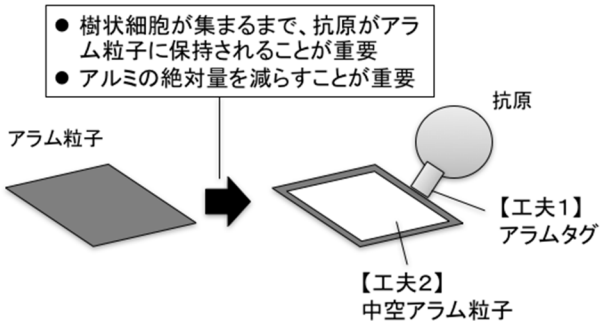


図 1. 本研究のポイント

方　法

1.　中空水酸化アルミニウム粒子の合成

粒径 0.20 μm のポリスチレン粒子（Polysciences 社 Polybead Microspheres 0.20 μm）をテンプレートとして水酸化アルミニウムを液相で合成し、その後にテンプレートをトルエンに溶解させて除去することで中空水酸化アルミニウム粒子の作製を試みた。まず、1 μL のポリスチレン粒子懸濁液（粒子濃度 5.7×10^{10} /μL）を 50 μL の MilliQ 水で希釈した後、100 μL の 16 mM $AlCl_3$ 水溶液を添加した。さらに、10 μL の 96 mM NH_3 水溶液を添加し、ローテーターを用いて 4℃で穏やかに混合した。以降 3 日間に渡り、10 μL の 96 mM NH_3 水溶液を数時間おきに計 14 回添加することで、水酸化アルミニウムを合成した。

反応液を遠心分離（10,000×g、3 分）に供し、合成された水酸化アルミニウムを沈殿させた。沈殿を 100 μL のトルエンに懸濁し、70℃で 30 分間インキュベートした後、再度遠心分離を行い、上清を除いた。沈殿を 100 μL のトルエンに再度懸濁し、同様の操作を計 4 回繰り返した。遠心分離後の沈殿を 100 μL の MilliQ 水で 3 回洗浄した。得られた試料の一部を透過型電子顕微鏡（TEM）観察用のマイクログリッドに滴下し、デシケーター中で一晩乾燥させた後に日本電子 JEM-2010 を用いて TEM 観察を行った。

2. アラム粒子結合タンパク質の探索とアラムタグの同定

アラム粒子結合タンパク質のスクリーニングを行った。ヒト単球白血病細胞株 THP-1 の細胞（4.1×10^2 cells）を 4.0 ml のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に懸濁して、細胞破砕後、遠心分離（10,000×g、10 min）して上清を回収、PBS で希釈して 1 mg /ml に調製した。この 1 ml の細胞破砕液と 1 mg のアラム粒子（水酸化アルミニウムゲル、富士フィルム和光純薬）と混合して、洗浄後、SDS sample buffer でアラム粒子に結合したタンパク質を溶出し、SDS-PAGE で電気泳動し、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）（LTQ Orbitrap XL；Thermo Fisher Scientific 社）にてタンパク質の同定を行った。

アラム粒子に結合する Histone H2B タンパク質、Histone H2B タンパク質を分割したフラグメントの作製を行い、アラム粒子との結合評価を行った。まず、Histone H2B タンパク質をコードする遺伝子断片を合成して、pET47b に導入した。このプラスミドを大腸菌に形質転換し、Histone H2B タンパク質の発現誘導を行った。タンパク質の精製は、HisTag のアフィニティーカラム（HisTrap、GE Healthcare 社）で行った。次に、Histone H2B タンパク質を 6 つのフラグメントに分割し、GFP と融合させて発現プラスミドを作製した。この作製したプラスミドを上記と同様に、大腸菌に形質転換させた後、H2B フラグメント GFP 融合タンパク質の発現誘導及び精製を行った。精製した Histone H2B タンパク質、各フラグメント GFP 融合タンパク質をアラム粒子に結合させて、洗浄後、SDS sample buffer でアラム粒子に結合したタンパク質を溶出し、SDS-PAGE で電気泳動することで評価を行った。

3. アラムタグのアジュバンドとしての効果の評価ーマウスを用いた IgG 生産性の比較

アラム粒子に結合するアラムタグ（AlumTag、KKAVTKAQKKDGKKRK）と抗原ペプチドを融合し、アラム粒子と混合してマウスに免疫することで、抗原ペプチド対する IgG 産生量が増加するか評価を行った。抗原ペプチドとしては、S9p を使用した。S9p（FDTGAFDPDWPA）は、B 群連鎖球菌のタイプⅢの莢膜多糖体の保護エピトープの構造を模倣するペプチドであり、B 群連鎖球菌のワクチンとして作用することが報告されている［1］。この S9p にアラムタグを融合したペプチド（S9p-AlumTag: FDTGAFDPDWPAFRGGGSKKAVTKAQKKDGKKRK、S9p とアラムタグの間に CathepsinB プロテアーゼ認識配列 FR とリンカーGGGS を付加）を作製した。100 μL のアラム粒子（19.8mg/ml, 富士フィルム和光純薬）と 100 μL の抗原ペプチド（S9p、20 μM）またはアラムタグ抗原ペプチド（S9p-AlumTag、20 μM）を混合して、マウス（BALB/c、各 5 個体）に免疫した。免疫スケジュールを図 2 に示す。免疫して 28 日（中間）及び 49 日（最終）経過した後に、血清を取得して血清中に含まれる抗 S9p 抗体（IgG）産生量について ELISA（S9p を固相）を用いて評価を行った。

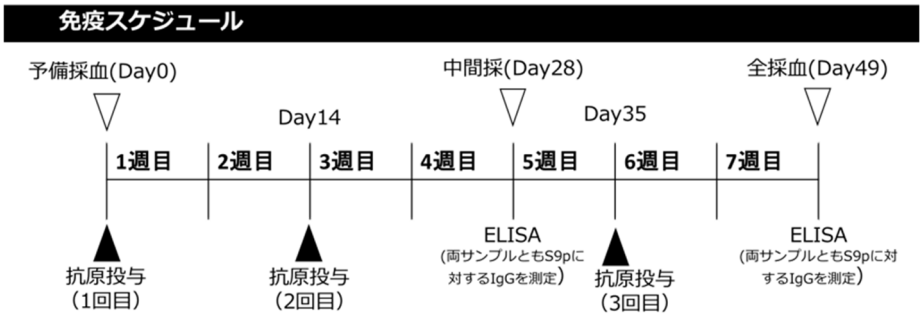


図 2. 免疫スケジュール

結果および考察

1. 中空水酸化アルミニウム粒子の合成

中空粒子は、低密度、高表面積、あるいは物質を内包できるなど、通常の中実粒子と異なる性質をもつ。近年ナノからミクロンサイズの中空粒子の合成とその応用に強い関心が集まっている。本研究では、アルミニウムの含量を減らしつつ、アジュバントとしての効果を保った中空水酸化アルミニウム粒子の開発を目指した。有機ビーズテンプレート法は、表面電荷を用いたコア粒子表面への選択的な析出により、有機ビーズの周りにシェルとなる素材をコーティングすることでコア／シェルを得る方法である［2］。ここでは、ポリスチレン粒子をテンプレートとして水酸化アルミニウムを液相で合成し、その後にテンプレートをトルエンに溶解させて除去することで中空水酸化アルミニウム粒子の作製を試みた。塩化アルミニウム水溶液にポリスチレン粒子を分散させ、ローテーターで混合しながら徐々にアンモニア水を添加することで、ポリスチレン粒子テンプレートの周囲に水酸化アルミニウムが合成された。トルエンでポリスチレン粒子を取り除いた結果、内径 200 nm の中空の水酸化アルミニウム粒子が合成できた。TEM 観察の図 3 に示す。後方が透けて見えることから、中空球状構造であると考えられる。狙い通りテンプレートとしたポリスチレン粒子の周囲に水酸化アルミニウムが合成されたと判断した。

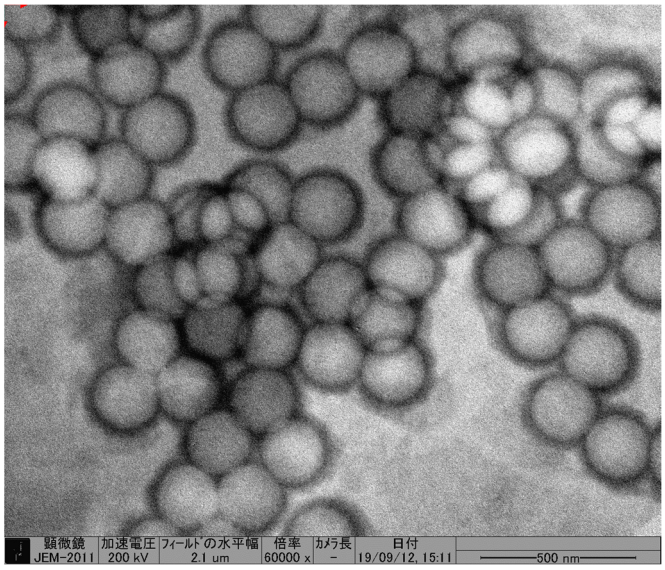


図 3. 合成した中空水酸化アルミニウムの TEM 像

2. アラム粒子結合タンパク質の探索とアラムタグの同定

ヒト単球白血病細胞株 THP-1 の細胞破砕液から、アラム粒子に結合するタンパク質のスクリーニングを行った。その結果、Myosin-9,10、actin、Histone H2B の 4 つのアラム粒子結合タンパク質を同定することができた。次に、最も分子量の小さい Histone H2B タンパク質を用いてアラム粒子結合部位の同定を行った。まずは、Histone H2B タンパク質がアラム粒子へ結合するか評価を行った。大腸菌にて Histone H2B タンパク質を発現後、HisTag アフィニティーカラムで精製を行った。精製した Histone H2B タンパク質のアラム粒子への結合について SDS-PAGE で解析したところ、Histone H2B タンパク質が結合画分（Bound）において濃縮されたことから、アラム粒子へ結合することがわかった（図 4a)。次に、Histone H2B タンパク質のどの領域がアラム粒子への結合に関与しているか解析を行った。Histone H2B タンパク質は、N 末端に構造をとらない領域と、4 つのαヘリックス構造を持ったタンパク質である（図 4a)。その構造を基に、6 つの領域に分割（フラグメント化）し、GFP との融合タンパク質を作製した（図 4b)。作製した 6 つフラグメント GFP 融合タンパク質のうち、精製が成功したフラグメント 1、2、5、6（フラグメント 3、4 については大腸菌でのタンパク質発現が認められなかった）の GFP 融合タンパク質とアラム粒子への結合を検討した。その結果、フラグメント 2 がアラム粒子と最も強く結合することがわかった（ほとんどが Bound 画分に濃縮された）（図 4c)。フラグメント 2 の配列 KKAVTKAQKKDGKKRK の中にアラム粒子と強く結合する配列が存在すると考えられ、これをアラムタグとした。

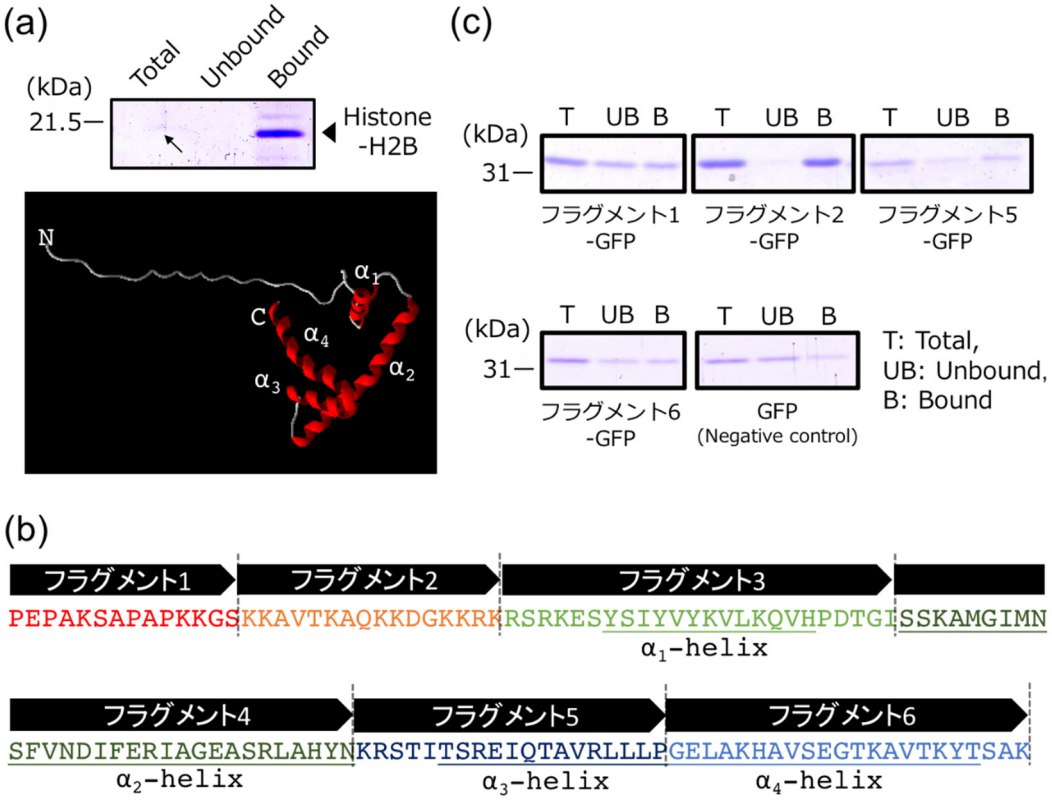


図 4. アラムタグの同定

a) Histone H2B タンパク質のアラム粒子への結合評価と構造。

b) Histone H2B タンパク質の各部位の一次構造。

c) Histone H2B タンパク質のフラグメントと GFP 融合タンパク質のアラム粒子への結合評価
フラグメント 2-GFP 融合タンパク質は、未結合画分（Unbound）にほとんどバンドが検出されず、結合画分（Bound）のみに検出されたことから、アラム粒子へ強く結合することが分かった。

3. アラムタグのアジュバンドとしての効果の評価ーマウスを用いた IgG 生産性の比較

アラムタグを融合した抗体ペプチド（S9p-AlumTag）とアラム粒子を混合し、マウスに免疫して、抗 S9p 抗体（IgG）の産生量を評価した。比較として、抗原ペプチド（S9p）のみとアラム粒子の混合体を用いることで、アラムタグの効果を検討した。しかしながら、抗原ペプチド（S9p）のみ、アラムタグ融合抗原ペプチド（S9p-AlumTag）のどちらにおいても、抗 S9p 抗体の産生は認められなかった（免疫して 28 日［中間］および 49 日［最終］に取得した両血清で抗 S9p 抗体は検出できなかった）。本実験では、残念ながら抗原ペプチドが機能せず、現状ではアラムタグの効果が確認できていない。今後、抗原の分子量を大きくしたタンパク質を用いてタグの効果を確認したい。さらに作製した中空アラム粒子（水酸化アルミニウム粒子）と組み合わせて免疫実験を行いたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、広島大学大学院工学研究科の荻崇博士、広島大学大学院統合生命科学研究科の池田丈博士および石田丈典博士である。この場を借りて感謝の意を表したい。

文　献

1) Pomwised R, Intamaso U, Teintze M, Young M, Pincus SH. Coupling Peptide Antigens to Virus-Like Particles or to Protein Carriers Influences the Th1/Th2 Polarity of the Resulting Immune Response. Vaccines (Basel). 2016 May 5;4(2):15. DOI: 10.3390/vaccines4020015.

2) Gero Decher, Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites, Science. 1997 Aug 29; 277(5330): 1232-1237. DOI: 10.1126/science.277.5330.1232.