

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」
平成14年度採択研究代表者

明石 満

(大阪大学大学院工学研究科 教授)

「ナノ粒子を応用した抗レトロウイルスワクチンの開発」

1. 研究実施の概要

本プロジェクトではナノ粒子とレトロウイルス抗原をハイブリッドさせた新規なバイオマテリアルを創製することで、安全性・有効性の高い抗レトロウイルスワクチンを開発することを目的としている。これまでにレクチンを固定化した高分子ナノ粒子がHIV-1ウイルスを効率よく捕捉し、この捕捉能がウイルスの熱不活化やウイルス種に影響を受けないことを明らかにしてきた。このウイルス捕捉システムを利用してHIV-1捕捉ナノ粒子を作製し、抗ウイルスワクチンとしての応用展開を試みた。

HIV-1ウイルスを捕捉したコア-コロナ型ポリスチレンナノ粒子をマウスの粘膜面に投与することで、腔粘膜に抗HIV-1抗体を誘導することができた。投与経路としては、経鼻免疫が最も効率的な抗体産生誘導が認められ、ウイルスに対する中和活性も検出された。また、ポリ(γ-グルタミン酸)(γPGA)などのポリペプチド系生分解性高分子を疎水修飾することで両親媒構造を制御することにより、生分解性ナノ粒子を効率よく良く作成する方法を見いだした。

2. 研究実施内容

研究目的) レトロウイルス(逆転写酵素というRNAからDNAをコピーする特殊な酵素を持つ一連のウイルス)であるHIV-1(ヒト免疫不全ウイルス)とHTLV-1(成人T細胞白血病ウイルス)は双方ともに深刻な病状をもたらすウイルスであるにも関わらず、有効なワクチンは未だ開発されていない。しかし、研究代表者らはHIV-1を固定化したコア-コロナ型ポリスチレンナノ粒子を用いて、マウスにHIV-1特異的抗体を誘導することに成功した。本プロジェクトでは、この成果を基盤にし、生体適合性・生分解性ナノ粒子-抗原ハイブリッドと抗原封入膜融合リポソームを用いて、ヒトレトロウイルスに抗する免疫誘導を行うこと目的として研究を進めている。

研究方法および結果)

1) コア-コロナ型ポリスチレンナノ粒子を用いた抗エイズウイルス免疫誘導:

現在、HIV-1の感染経路の大部分は性的接触によるものであるため、HIV-1侵入の第一関

門である臍粘膜において、抗HIV-1抗体が誘導できれば、有効な防御方法となりうる。HIV-1捕捉高分子ナノ粒子の免疫応答性について調べるため、熱処理により不活化したHIV-1を捕捉した高分子ナノ粒子を免疫原として用い、マウスでの免疫実験を行った。経臍免疫後、マウス臍洗浄液中のHIV-1特異的IgAおよびIgG抗体をELISAを用いて検出したところ、レクチン固定化ナノ粒子に捕捉されたHIV-1を投与した群のみに、高いIgAの誘導が確認された。これはHIV-1をレクチン固定化ナノ粒子に捕捉させることにより、HIV-1の免疫原性が高められ、一般的に免疫応答性が低いと言われている臍粘膜にIgAを誘導できたものと推測できる。

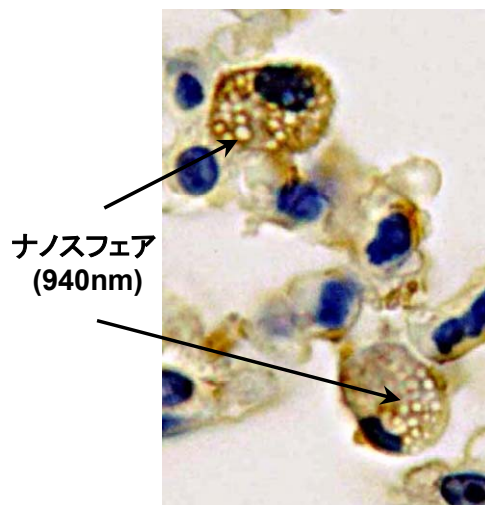


図1 経鼻免疫後の肺組織でのナノスフェアの取込み像

実際に臍粘膜でのHIV-1捕捉高分子ナノ粒子の分布を免疫染色で確認したところ、ナノ粒子が臍粘膜に長時間、密に滞留していた。このようなナノ粒子特異的な抗原分布がHIV-1の免疫原性を高める1つの要因であると考えられる。

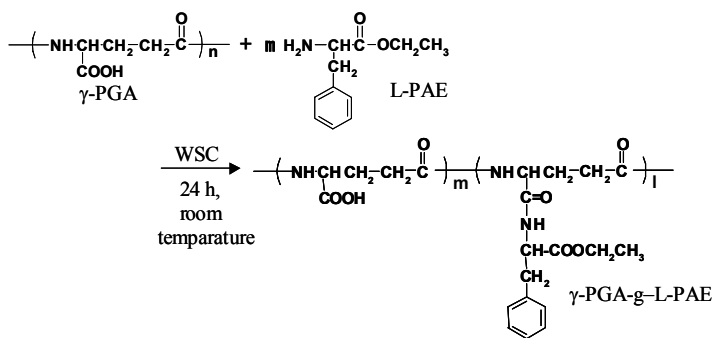


図2 L-フェニルアラニンエチルエステルによる γ -PGAの修飾

経臍免疫ではマウスの性周期によって免疫誘導に違いが

認められたため、ワクチン投与をより普遍的に行うことを目的に、経鼻投与を行った結果、この方法によっても臍粘膜へのIgA抗体産生が認められた。さらに免疫したマウスの臍洗浄液ではHIV-1に対する中和活性を有していることが明らかとなった。実際ヒトへの応用を考えると、経鼻投与は投与方法が簡便であり、抗原量も微量で効果を発揮するため、高分子ナノ粒子の特徴を生かしたより優れた粘膜免疫の普遍性の高い投与経路であると考えている。これらのマウス免疫実験の結果をもとに、サルを用いた免疫実験およびウイルス感染防御実験を行った。その結果、SHIV捕捉高分子ナノ粒子を経鼻免疫した

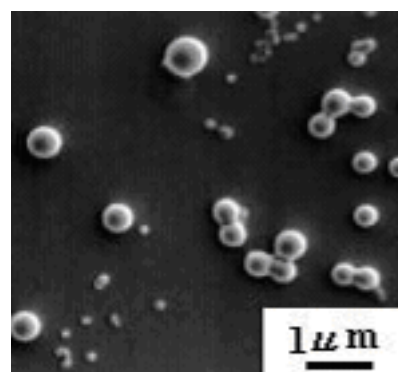


図3 両親媒化 γ -PGAナノ粒子のSEM写真

サルでは、マウス同様に臍洗浄液中にHIV-1特異的IgAおよびIgGが検出された。SHIV捕捉高分子ナノ粒子によって誘導された免疫応答が実際に感染防御に有効であるかどうかを評価するために、これらのサルに感染性を有するSHIVを経臍攻撃接種し感染防御能について

検討した。攻撃接種後、非免疫サルでは血中に持続的にウイルスが検出されたのに対して、SHIV高分子ナノ粒子を免疫したサルでは、攻撃接種6週目以降に血中のウイルス量が検出感度以下にまで低下していた。このことより、ある一定の大きさを有する高分子微粒子に抗原を固定化し、その免疫原を経粘膜投与することで、未だに達成されていないHIV-1感染予防ワクチンの開発が期待された。

2) 生分解性ナノ粒子の開発：

両親媒性高分子の親・疎水性のバランスを制御する方法^{1,2)}を用いて、生分解性ナノ粒子の作製を試みた。我々はこれまで、納豆菌が生産するポリ(γ-グルタミン酸)(γ-PGA)の修飾方法を確立してきた。本研究では、γ-PGAを無毒な疎水アミノ酸であるL-フェニルアラニンエチルエステル(L-PAE)で部分疎水修飾し両親媒化した(図2)。¹H-NMRによる解析の結果、L-PAEの導入率は10~78mol%の範囲で制御できることが解った。また、導入率の変化により共重合体の溶解性が大きく変化し、γ-PGA-g-L-PAEの自己組織化により、粒径が200~300 nmのナノ粒子の形成を確認した(図3)。このナノスフェアは、水中において非常に安定な分散性を示した。またナノ粒子の導入率を変化させることで、粒子状やロッド状、ファイバー状など様々な形態のナノ構造体が形成できることも確認できた。得られたナノ粒子の生分解性の評価として、トリス緩衝液中(37℃)におけるγ-グルタルトランスフェラーゼによる酵素分解性を確認した。以上により生分解性のナノ粒子を作製できた。現在、αキモトリプシンなど人体内酵素による分解挙動を調べており、実用化に向けてさらに研究を進めている。

3) ナノ粒子を用いた免疫機構の解明：免疫抗原提示細胞である樹状細胞とナノ粒子との相互作用を解析するとともに、膜融合型バイオナノキャリアーのHTLV-Iワクチンキャリアーとしての有用性を評価した。

(参考文献)

- 1) Eisenberg A. et al. *Science*, **28**, 6055 (1995)
- 2) Eisenberg A et al. *Macromolecules*, **29**, 6359 (1996)

3. 研究実施体制

明石グループ

① 研究分担グループ長：

明石 満 (大阪大学大学院工学研究科分子化学専攻, 教授)

② 研究項目：研究総括

抗原-生分解性ナノ粒子ハイブリッドの作成

馬場グループ

① 究分担グループ長：

馬場 昌範 (鹿児島大学医学部附属難治性ウイルス疾患研究センター, 教授)

- ② 研究項目：樹状細胞とナノ粒子との相互作用の検討
抗原固定化ナノ粒子を用いた免疫実験

中川グループ

- ① 研究分担グループ長：

中川 晋作（大阪大学大学院薬学研究科、助教授）

- ② 研究項目：膜融合型バイオナノキャリアー（Fusogenic Liposome ; FL）を用いた
抗
レトロウイルスワクチンの開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- 金子達雄・馬場昌範・明石 満 高分子ナノスフェアを用いるエイズワクチンの開発 生物学 (総説論文) 81, 182-186, 2003.
- 馬場昌範、明石満 エイズ経鼻ワクチンの開発 - ナノ粒子を用いたアプローチ - 「化学療法の領域」特集「粘膜ワクチン開発の現状と将来」 (総説論文) 19, 49-55, 2003
- T. Akagi, M. Kawamura, M. Ueno, K. Hiraishi, M. Adachi, T. Serizawa, M. Akashi, M. Baba. Mucosal Immunization with Inactivated HIV-1-Capturing Nanospheres Induced a Significant HIV-1-Specific Vaginal Antibody Response in Mice. *J Med. Virol.*, 69, 163-172, 2003.
- S. Nakagawa, T. Mayumi, Development of Novel Technology of DDS for Gene Therapy *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 18, 223-229, 2003
- T. Kaneko, K. Hamada, M. Q. Chen, M. Akashi One-step Formation of Morphologically Controlled Nanoparticles with Projection Coronas *Macromolecules* 37, 501-506, 2004.
- M. Matsusaki, K. Hiwatari, M. Higashi, T. Kaneko, and M. Akashi Stably-Dispersed and Surface-Functional Bionanoparticles Prepared by Self-Assembling Amphipathic Polymers of Hydrophilic Poly(γ -glutamic acid) Bearing Hydrophobic Amino Acids *Chem. Lett.* 33, 398-399, 2004
- T. Shimokuri, T. Kaneko, T. Serizawa, M. Akashi. *Macromol. Biosci.* 4, 407-411, 2004.