

「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

本研究では新規な生分解性高分子ナノ粒子を用いて、安全性・有効性の高い抗レトロウイルスワクチンの開発を目的としている。これまでにポリアミノ酸や天然多糖である生分解性高分子の両親媒構造を制御する方法を用いて、生分解性ナノ粒子が調製可能であることを見出した。さらに本ナノ粒子に高効率かつ安定に蛋白質を固定化する方法を開発して、蛋白質キャリアーとしての機能を評価し、ナノ粒子のワクチン担体としての最適化を試みた。

また、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ことを目的に、蛍光標識ナノ粒子を用いた細胞内への取り込みや、抗原固定化ナノ粒子による抗原提示能について検討した結果、ナノ粒子による優れた免疫誘導効果が明らかとなった。さらに膜融合リポソーム (Fusogenic liposome; FL) を用いて、HTLV-Iに対するペプチドワクチンおよびDNAワクチンの開発を目的として、抗原エピトープペプチドの選定、抗原発現プラスミドDNAの設計、製剤としてのFLの特性評価を行った。またマウスモデルを用いてFLのペプチド・DNAワクチンの有用性を評価した結果、顕著な細胞傷害性T細胞 (CTL) 活性および高い抗腫瘍活性が認められた。

ワクチン開発の最重要課題である生分解性ナノ粒子の作製とナノ粒子への抗原固定化方法を確立することができ、今後の展開をスムーズに行える基盤を作り上げることが出来たと言える。以後は、抗原固定化生分解性ナノ粒子を用いた免疫実験により、細胞性および液性免疫の免疫誘導効果について検討する。これまでのポリスチレンナノ粒子を用いたワクチン開発での技術を応用することで、安全で有効性の高いワクチン開発に向けて着実な成果が得られると考えられる。

2. 研究実施内容

1. 新規性分解性ナノ粒子の調製

本プロジェクトでは、レトロウイルスであるHIV-1やHTLV-1関連抗原（蛋白質・ペプチド・DNA）を固定化した生分解性ナノ粒子を調製し、細胞性免疫および液性免疫の誘導に起因した抗レトロウイルスワクチンの開発を試みる。免疫原をナノ粒子とコンジュゲートさせることで、免疫原のみでは得られない特異的な免疫誘導効果が期待される。そこで、新規生分解性ナノ粒子として、納豆菌由来のポリ（ γ -グルタミン酸）（ γ -PGA）に疎水性アミノ酸であるL-フェニルアラニン（Phe）を導入し、 γ -PGAの親-疎水バランスを制御することで、ナノメートルオーダーの粒子を調製した。 γ -PGA-Pheナノ粒子はPheの導入率を制御することで、粒子径を150–300 nmの間で制御可能であった。得られたナノ粒子は、リン酸緩衝液中（37°C）で γ -グルタルトランスフェラーゼ（基質：グリシルグリシン）により6時間処理すると、 γ -PGAの分解および粒子の崩壊が認められ、*in vitro*での生分解性が確認できた（図1）。

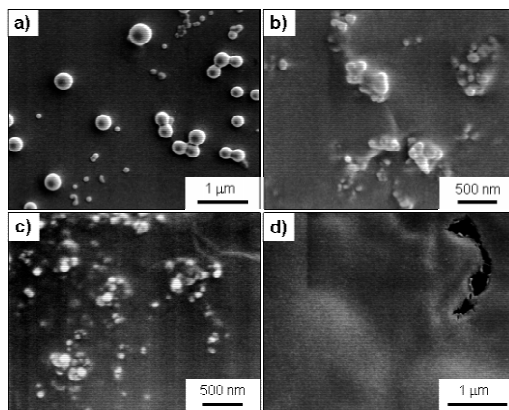


図1. 両親媒化ポリ（ γ -グルタミン酸）ナノ粒子の酵素（ γ -グルタルトランスフェラーゼ）分解における形態変化（走査型電子顕微鏡写真）。a) 0 hr, b) 2 hr, c) 4 hr, d) 6 hr.

2. 樹状細胞とナノ粒子との相互作用の解析

ワクチン開発において重要な事は効果的な免疫反応の誘導である。そのためナノ粒子に結合している抗原を効率よく抗原提示細胞（APC）によって提示させる必要が有る。生体内において最も優れた抗原提示細胞として樹状細胞が存在しており、この樹状細胞とナノ粒子との相互作用を詳細に検討した。

2-1) マウスより分離した骨髄細胞から未熟樹状細胞およびT細胞活性化能を持つ成熟樹状細胞を得た。未熟および成熟樹状細胞、B細胞、腹腔マクロファージを用いて、各種抗原（蛍光標識dextran、蛍光標識ovalbumin、lucifer yellow）および蛍光標識ナノ粒子の取込み能を比較した結果、樹状細胞はB細胞や腹腔マクロファージに比べ高い貪食を示した。また、成熟樹状細胞より未熟樹状細胞の方が各種抗原の取込み能が高かった。しかし、蛍光標識ナノ粒子の取込みに関しては、未熟および成熟樹状細胞において差は見られな

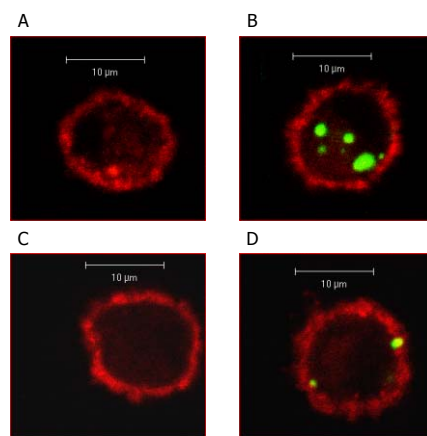


図2. 樹状細胞へのナノ粒子の取り込み（共焦点顕微鏡写真）A: ナノ粒子（-），37°C処理，B: ナノ粒子（+），37°C処理 C: ナノ粒子（-），4°C処理，D: ナノ粒子（+），4°C処理

った。両樹状細胞ともに、非常に短時間（5分間）でナノ粒子を取り込み、それ以後は取り込み量がゆっくりと増加した。

2-2) 成熟樹状細胞を表面マーカーであるCD11cで蛍光染色し（赤色）、緑色蛍光標識ナノ粒子を4° Cおよび37° Cで2時間作用させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、4° Cで反応させた場合、緑色蛍光は細胞表面のみで観察されたが、37° Cで反応させた場合、緑色蛍光が細胞内で観察され、樹状細胞がナノ粒子を積極的に取込んでいることが分かった（図2）。また、食害阻害剤（cytochalasin B、cytochalasin D、nocodazole）を用いて樹状細胞のナノ粒子に対する取込みの阻害実験を行った結果、各阻害剤によって、取り込みが抑制された。

2-3) Ovalbumin (OVA) を混合させたフロイントコンプリートアジュバントをマウスに免疫し、そこから得られたOVA特異的T細胞に対する樹状細胞の抗原提示能を検討した。その結果、OVAのみを10 µg/mlで反応させた樹状細胞の抗原提示能と、OVA固定化ナノ粒子をOVA量として0.1 µg/mlで反応させた樹状細胞の抗原提示能が同程度であった。この結果は、ナノ粒子を用いることにより、樹状細胞に効率よく抗原を提示させることを示唆している。

3. 膜融合リポソームによる免疫誘導能の評価

HTLV-I に対する膜融合リポソーム (FL) のペプチドワクチンキャリアーとしての有用性を検討した。HTLV-1に対する細胞障害性T細胞 (CTL) 誘導能を評価するにあたり、標的分子としてはTaxを選択した。またFLのDNAワクチンへの応用を試みた。DNAワクチンは、蛋白質やペプチドを用いるサブユニットワクチンと比して大量精製や改変が容易な事から注目を集めている。しかし、プラスミドは生体内分解酵素やエンドソーム内で分解されるため、プラスミド単独で投与した場合の遺伝子発現効率は極めて低い。そこで、DNAワクチンのこれら問題点を克服するために、膜融合を介して細胞質内に内封物質を直接導入可能なFLを用いて、その遺伝子発現効率、抗原特異的免疫誘導能を検討した。

3-1) 膜融合リポソームを用いた細胞障害性T細胞誘導

マウスH-2K^k 拘束性TaxエピトープペプチドのN末端を蛍光標識 (Fluorescein Isothiocyanate ; FITC) し、FLへの封入量について検討した。その結果、FL懸濁液1 OD₅₄₀あたり、29.8 µg/mlのTaxエピトープペプチドが封入されていた。更に、ペプチドを封入したFLが膜融合能を保持しており、細胞内にTaxエピトープペプチドを効率よく導入できることをFACS解析、及び共焦点レーザー顕微鏡により確認した。そこで次に未標識Taxエピトープペプチドを封入したFLを用いて、C3Hマウスに免疫することでTax特異的CTL誘導能について検討した。その結果、Taxエピトープペプチド単独、あるいはフロイント完全アジュバントで免疫した群ではTax特異的CTLの誘導が全く見られなかったのに対し、FLを用いて免疫した群では、顕著なCTL活性が得られた（図3）。これらのことから、FLは、一般的に抗原性が低い事が知られているTaxエピトープペプチドに対しても効果的に抗原特異的CTLを誘導可能であることが示された。現在、さらに効率よくCTLを

誘導するため、細胞質内での抗原ペプチドの動態制御による最適化を行っている。

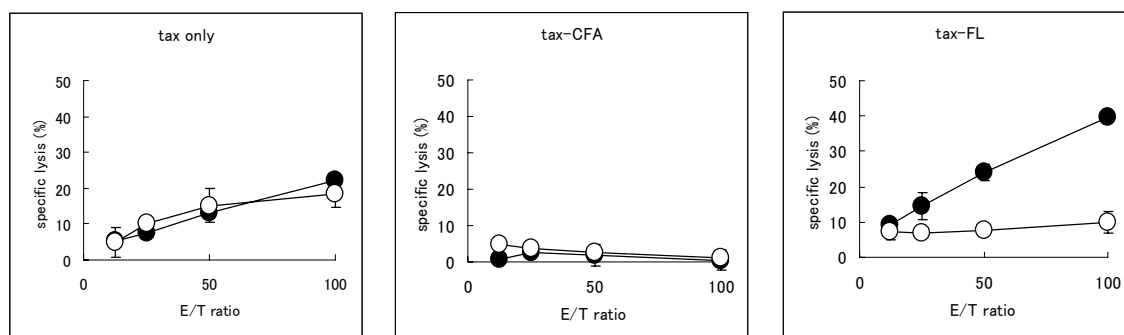


図3. Tax特異的CTL誘導能の評価 (○：コントロール細胞、●：標的細胞)

3-2) OVA発現プラスミド内包膜融合リポソームを用いた免疫誘導能評価

モデル抗原としてニワトリ卵白アルブミン (OVA) を選択した。まずそのOVA遺伝子を単独、あるいはリポソーム、陽電荷リポソーム、膜融合リポソームを用いて、抗原提示細胞であるマクロファージの樹立細胞株 (IC21) へ導入した結果、FLを用いた場合に最も高いOVA遺伝子の発現が観察された。さらに導入したOVA遺伝子の発現によるMHC class I分子を介した抗原提示を、OVA (257-264)-Kbとの複合体を特異的に認識してIL-2を産生するCD8OVA細胞を用いたBio-assayにより評価した。その結果、OVA遺伝子の発現結果を反映して、FLを用いて抗原遺伝子を導入したIC-21細胞において最も高い抗原提示が観察された。これに対し、OVA遺伝子単独、あるいはリポソーム、陽電荷リポソームを用いて遺伝子導入しても抗原提示は殆ど見られなかった。

そこで次にC57BL/6雄性マウス (7週齢) の背部皮内に50 μ gのOVA遺伝子単独、またはその1/10量である5 μ gのOVA遺伝子を各々含有するリポソーム、陽電荷リポソーム、膜融合リポソームを隔週で2回免疫し、最終免疫4週間後に、抗原特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) の誘導能並びに腫瘍移植による抗腫瘍ワクチン効果を検討した。その結果、OVA遺伝子単独およびリポソームを用いて免疫した場合には、CTL誘導は殆ど見られず、また陽電荷リポソームを用いた場合でもわずかに細胞傷害活性が認められたにすぎなかった。一方、FLを用いて免疫した場合には、強いCTL誘導が観察された。また、このCTL誘導の結果を反映して、FLを用いて免疫した群では移植したEG7腫瘍の増殖が顕著に抑制された (図4)。また30日後における生存率は、他の群では25%以下であったのに対して、FL群では100%であり、8例中2例の完全拒絶が観察された。現在、さらに効率の良いDNAワクチン療法を開発すべく、アジュバント作用を有するプラスミドDNAを用いた検討を行っている。

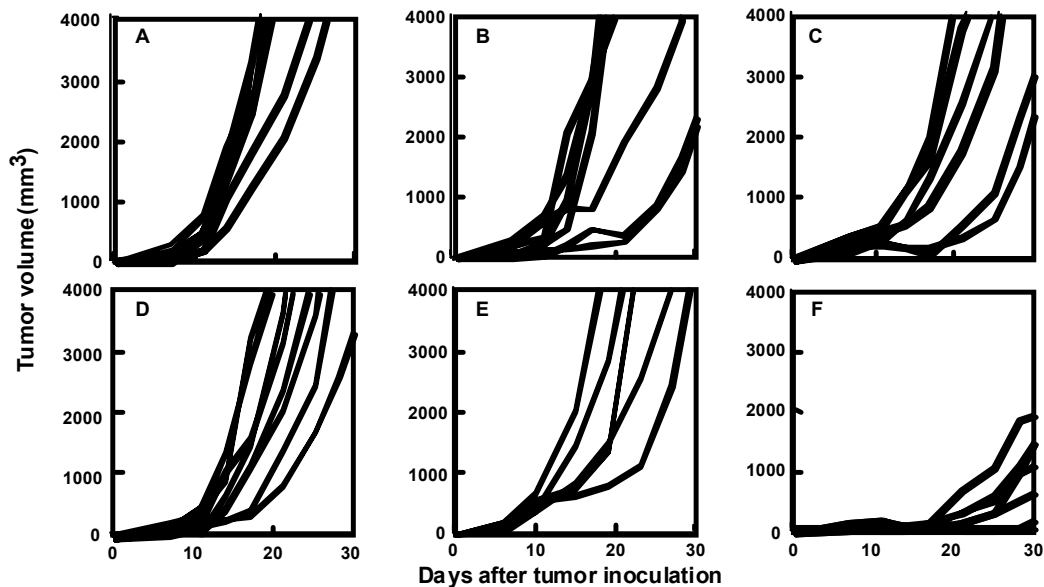


図4. OVA特異的抗がんワクチン効果の評価 (A; Saline, B; OVA発現プラスミド単独, C; 陽電荷リポソーム, D; リポソーム, E; FL(β -Gal), F; FL(OVA))

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：研究統括、生分解性ナノ粒子の調製と抗原固定化

馬場グループ

- ① 研究分担グループ長：馬場昌範（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科附属 難治性ウイルス病態制御研究センター、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
マウスを用いた抗原固定化生分解性ナノ粒子による免疫実験

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 薬剤学分野、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

- Ariko Miyake, Takami Akagi, Yoshimi Enose, Masamichi Ueno, Masaki Kawamura, Reii Horiuchi, Katsuya Hiraishi, Masakazu Adachi, Takeshi Serizawa, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, Masanori Hayami, “Induction of HIV-specific Antibody Response and Protection against Vaginal SHIV Transmission by Intranasal Immunization with Inactivated SHIV-capturing Nanospheres in Macaques”, *J. Med. Virol.*, **73**, 368-377 (2004).
- Taiki Shimokuri, Tatsuo Kaneko, Mitsuru Akashi, “Specific Thermosensitive Volume Change of Biopolymer Gels Derived from Propylated Poly(γ -glutamate)s”, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, **42**, 4492-4501 (2004).
- Yuki Itoh, Michiya Matsusaki, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, “Preparation of Biodegradable Hollow Nanocapsules by Silica Template Method”, *Chem. Lett.*, **33**, 1552-1553 (2004).
- Tomoaki Yoshikawa, Susumu Imazu, Jian-Qing Gao, Kazuyuki Hayashi, Yasuhiro Tsuda, Mariko Shimokawa, Toshiki Sugita, Atushi Oda, Takako Niwa, Mitsuru Akashi, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi and Shinsaku Nakagawa, “Augmentation of antigen specific immune responses using DNA-fusogenic liposome vaccine”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 500-505, (2004).
- Toshiki Sugita, Tomoaki Yoshikawa, Jian-Qing Gao, Mariko Shimokawa, Atushi Oda, Takako Niwa, Mitsuru Akashi, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, “Fusogenic liposome can be used as an effective vaccine carrier for peptide vaccination to induce CTL response”, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 192-193 (2005).
- Xin Wang, Tomofumi Uto, Katsuaki Sato, Keiko Ide, Takami Akagi, Mika Okamoto, Tatsuo Kaneko, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, “Potent activation of antigen-specific T cells by antigen-loaded nanospheres”, *Immunol. Lett.*, **98**, 123-130 (2005).
- Masaki Kawamura, Xin Wang, Tomofumi Uto, Katsuaki Sato, Masamichi Ueno, Takami Akagi, Katsuya Hiraishi, Takami Matsuyama, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, “Induction of dendritic cell-mediated immune responses against HIV-1 by antigen-capturing nanospheres in mice”, *J. Med. Virol.*, **76**, 7-15 (2005).
- 明石 満, 赤木隆美, “コア-コロナ型高分子ナノスフェアの合成とドラッグデリバリーシステム (DDS) 分野への応用”, *有機合成化学協会誌*, **62**, 520-528 (2004).
- 馬場昌範, 明石 満, “ナノ粒子を応用した抗エイズワクチンの開発研究”, *Bioベ*

ンチャー, **4**, 72-74 (2004).

- 馬場昌範, 明石 満, “エイズワクチン開発の現状とナノ粒子の応用”, *バイオマテリアル—生体材料*, **22**, 394-399 (2004).
- 明石 満, “高分子材料表面のナノ構造制御による新規なバイオマテリアルの設計と創製”, *バイオマテリアル—生体材料*, **23**, 9-20 (2005).
- 赤木隆美, 明石 満, “高分子ナノ粒子”, *BIOINDUSTRY*, **22**, 40-47 (2005).

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：4件 (CREST研究期間累積件数：4件)