

明石 満

大阪大学大学院工学研究科・教授  
免疫制御能を有する高分子ナノ粒子ワクチンの製造

## §1. 研究実施の概要

本研究はナノテクノロジーに立脚した安全かつ効果的な高分子ナノ粒子ワクチンの製造技術の開発と臨床応用を目的としている。そのために、生分解ナノ粒子合成技術の確立、安全性試験、ナノ粒子による免疫応答制御能の評価とメカニズム解明、およびその解析結果に基づく最適なナノ粒子アジュバントの分子設計指針を明確にし、ナノ粒子製造とワクチン製剤化の基盤技術を構築する。最終的には、肝臓・大腸癌患者に対するナノ粒子ワクチンのトランスレーショナルリサーチを実施し、産学・医工連携による革新的ナノ医療の具現化を目指す。

これまでに、疎水化ポリ( $\gamma$ -グルタミン酸) ( $\gamma$ -PGA) ナノ粒子の粒径制御技術を開発し、ナノ粒子ワクチンの臨床応用に向けて、GMP (Good Manufacturing Practice) に準拠したナノ粒子製造プロセスを確立した。ナノ粒子ワクチンのメカニズム解析においては、ナノ粒子のアジュバント活性に関連する樹状細胞のシグナルレセプターおよび細胞内シグナル伝達経路を明らかにし、ナノ粒子の体内動態についても解析をおこなってきた。また、マウス免疫実験において、がん抗原ペプチドを用いたナノ粒子ワクチンが、既存のアジュバントよりも高い抗腫瘍効果・安全性を示すことを明らかにしてきた。そこで本年度は、1) GMP 準拠ナノ粒子の試験サンプルの作成、2) 蛋白質内包ナノ粒子の細胞内挙動の解析、3) ノックアウトマウスを用いた自然免疫細胞活性化メカニズムの解析、4) ナノ粒子の体内動態(所属リンパ節への移行性)の解析、5) ナノ粒子+抗癌剤併用による癌免疫治療法の検討、6) 疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子のアレルギーワクチンおよび低分子薬剤デリバリーへの応用研究を実施した。

阪大病院薬剤部の協力のもと、GMP 準拠ナノ粒子の試験サンプルを製造した。得られたナノ粒子は品質・規格ともに問題なく、がんワクチントランスレーショナルリサーチに向けたナノ製造工程を構築することができた。今後、GMP 準拠ナノ粒子+がん抗原ペプチドを用いたラット反復投与試験および抗原性試験を実施する予定である。ナノ粒子と細胞間の相互作用解析に関しては、ナノ粒子の粒径が細胞の活性化、内包蛋白質の分解挙動に影響し、ナノ粒子が TLR4/MyD88

シグナル伝達経路を介して抗原提示細胞であるマクロファージや樹状細胞を活性化させていることが明らかとなった。また、抗癌剤併用によるナノ粒子がんワクチンにおいては、ナノ粒子単独では抗腫瘍効果が認められず、ナノ粒子ワクチンにおいてはがん抗原ペプチドとの併用が必須であることがわかった。疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の応用研究においては、アレルギーワクチンおよび網膜疾患に対する低分子薬剤の選択的デリバリーとしての有用性を明らかにした。今後は、がん抗原ペプチド-疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンの安全性評価を実施し、トランスレーショナルリサーチ (TR) のための承認申請を行い、がんワクチン TR 実施に向けた体制の整備を進める。

## §2. 研究実施体制

### (1) 「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、教授)

#### ② 研究項目

高分子ナノ粒子ワクチンの製造

- ・疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の製造と安全性試験
- ・抗原-疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の製剤化
- ・新規高分子ナノ粒子・ナノカプセルの合成と抗原固定化

### (2) 「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、教授)

#### ② 研究項目

ナノ粒子ワクチンによる免疫応答と制御機構の解析

- ・疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の免疫誘導効果の解析
- ・新規ナノ粒子と樹状細胞との相互作用解析
- ・ナノ粒子による普遍的な免疫応答制御への展開

### (3) 「巽」グループ

① 研究分担グループ長: 巽 智秀 (大阪大学大学院医学系研究科、助教)

#### ② 研究項目

ナノ粒子-癌抗原ペプチドを用いた肝臓・消化器癌免疫治療法の開発

- ・マウス腫瘍モデルにおけるナノ粒子ワクチンの有用性の検討
- ・トランスレーショナルリサーチ

### §3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

#### 明石グループ

##### 1) GMP に準拠したナノ粒子の製造(明石 G 担当)

これまでの疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の合成技術を基盤に、GMP(Good Manufacturing Practice) 準拠に適した簡便かつ高効率・高再現性のナノ粒子の大量製造技術を確立することができた。そこで、本年度は大阪大学医学部附属病院薬剤部に設置されているアイソレーターを用いて、ナノ粒子製造のパイロット試験を実施し、GMP 準拠ナノ粒子を製造した。最終的に製造されたナノ粒子の物性を評価したところ、これまでラボレベルで合成されたものと同等のものが得られ、GMP 準拠のナノ粒子製造プロセスが確立できた。



図 1. GMP(準拠)製造した疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子サンプル

##### 2) 疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の樹状細胞活性化に対する粒径効果<sup>1)</sup>

疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子を樹状細胞に作用させることで、樹状細胞が活性化(成熟化)されることが明らかとなっている。そこで、組成は同じで粒径のみ異なる疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子(30~200 nm)を調製し、樹状細胞の活性化能に対する粒径の影響を検討した。未成熟のマウス樹状細胞にナノ粒子を作用させることで、樹状細胞の成熟化(活性化)マーカーである、CD40, 80, 86 および MHC class I の発現増加が認められた(図 2)。この発現増加は粒径に依存しており、粒径が小さくなる程、樹状細胞に対する活性化能が増強した。TNF- $\alpha$  および IL-6 の産生においても同様の傾向を示した。これは、粒径減少に伴うナノ粒子表面積の増加により、樹状細胞-ナノ粒子間の相互作用が増加したためだと考えられる。

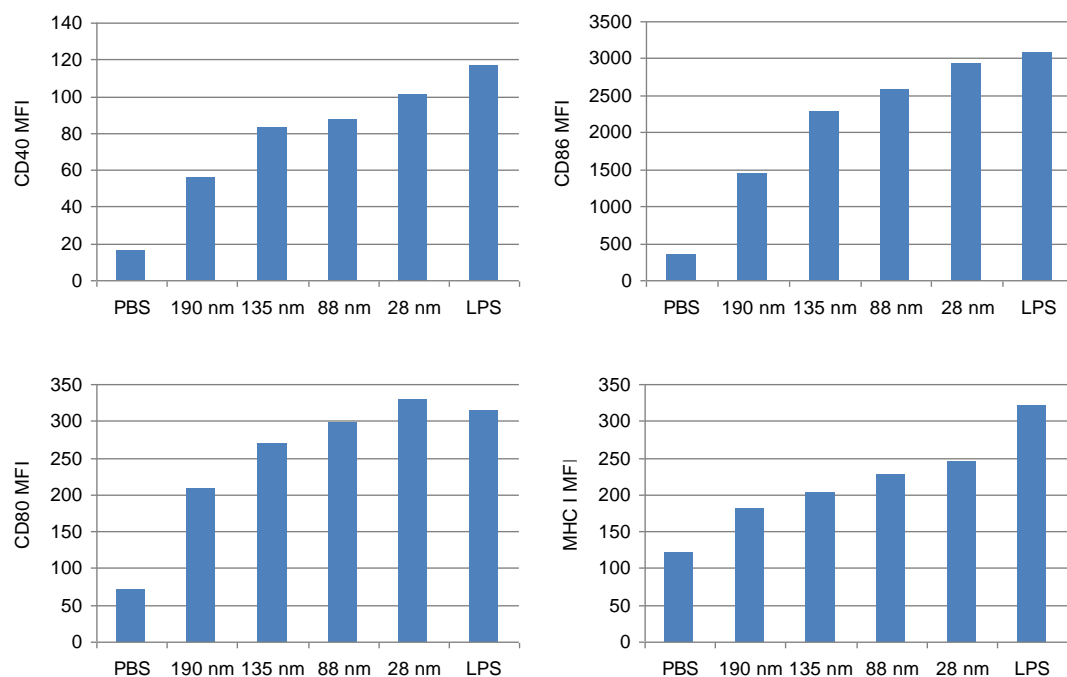


図 2. 粒径の違いによる樹状細胞に対する活性化能への影響(ナノ粒子による樹状細胞の活性化マーカー(CD40, 80, 86, MHC class I)の発現評価)。

PBS (phosphate buffered saline): リン酸緩衝生理食塩水(未刺激)、LPS (Lipopolysaccharide): リポ多糖 (positive control)、MFI (mean fluorescence intensity): 平均蛍光強度

### 3) タンパク質を内包した疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の細胞内動態の解析

疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子は、粒子化を行う際の条件を変えることで粒径制御が可能であり、また効率よく抗原蛋白を内包することができる。この抗原を内包した疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子は、樹状細胞に効率よく取込まれることで、抗原特異的な液性および細胞性免疫を誘導できることが明らかとなっている。しかしながら、抗原内包ナノ粒子の細胞内での分解挙動や動態および、それらの粒子径の影響については詳細なことがわかっていない。そこで本年度では、粒径制御された抗原内包ナノ粒子を抗原提示細胞へ取り込ませ、内包抗原の細胞内での分解性や局在・分布を共焦点顕微鏡にて観察を行い、抗原内包ナノ粒子の細胞内での挙動を検討した。蛋白質が分解することで蛍光を発する DQ-OVA (卵白アルブミン) を内包したナノ粒子を調製し、マクロファージに対する取込み量、取込まれた後の蛋白質の分解性を評価した。その結果、タンパク質内包ナノ粒子の取込み量は粒径依存的で、200 nmの方が40 nmより多く取り込まれた。次に、細胞内に取込まれた蛋白質内包ナノ粒子の分解性を評価した結果、フリーの蛋白質は細胞内に取込まれた後、数十分後には分解が見られたのに対して、ナノ粒子に内包された蛋白質は、細胞内での分解抑制が認められた。また粒径の違いによって内包蛋白質の分解挙動に違いが観察され、より粒径の小さ

い 40 nm のナノ粒子の方が細胞内での蛋白質分解が遅い傾向が認められた。これら蛋白質の分解挙動がナノ粒子の細胞内動態の違いに起因していると考えられるため、粒径の異なる蛍光ラベル化粒子を調製し、細胞内局在の評価を計画している。

#### 4) 疎水化 $\gamma$ -PGA からなるユニマーナノ粒子の構造解析

これまでに、 $\gamma$ -PGA に疎水性アミノ酸であるフェニルアラニン (Phe) の導入率を精密に制御することで、高分子鎖内での疎水性相互作用により、1本の高分子鎖からなるユニマーナノ粒子が形成可能であることを明らかにしてきた(図 3)。本年度は得られたユニマーナノ粒子を蛍光プローブ法および小角中性子散乱 (SANS) により詳細な構造解析を行った(京都大学大学院工学研究科 高分子化学専攻・松岡秀樹先生との共同研究、平成 22 年度中性子散乱共同利用 課題番号: 10618 「疎水化ポリアミノ酸からなるユニマーナノ粒子の構造解析」)。蛍光プローブ法を用いて

得られたユニマーナノ粒子の構造解析を行った結果、Phe 導入率 42% の  $\gamma$ -PGA-Phe-42 から調製されたユニマー粒子は、粒子径が 8 nm で、粒子内部に 100 個の Phe から形成される疎水性ドメインが約 5 個存在することが明らかとなった。SANS 測定においてユニマーナノ粒子の形成が確認され、また疎水化  $\gamma$ -PGA は、ポリマー会合数の増加に伴い、明確なコア-シェル構造を形成していることが明らかとなった。

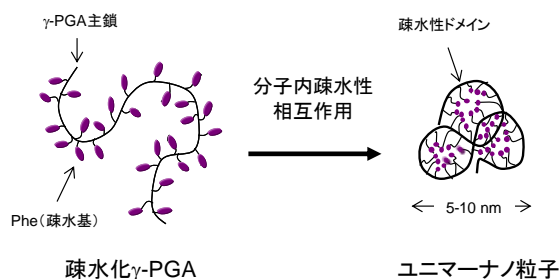


図 3. 疎水化  $\gamma$ -PGA からなるユニマーナノ粒子

#### 5) 疎水化 $\gamma$ -PGA からなるポリイオンコンプレックスナノ粒子の機能評価

水溶性の疎水化  $\gamma$ -PGA とカチオン性高分子であるポリ( $\epsilon$ -リジン) ( $\epsilon$ -PL) との組み合わせにより、静電的相互作用と疎水性相互作用の 2 つの駆動力を利用したポリイオンコンプレックス (PIC) ナノ粒子の調製に成功している。この PIC ナノ粒子は、疎水性相互作用により粒子内部に疎水性ドメインが形成され、生理環境下での高い安定性を示した。本年度では、得られた PIC ナノ粒子の DDS キャリアとしての機能評価をするために、蛋白質、ペプチド、核酸とのコンジュゲーションを行い、薬物の担持能、放出挙動、細胞取込みを検討した。PIC ナノ粒子は、蛋白質、ペプチド、核酸を内包することが可能であり、担持された薬物は緩衝液中で 1 週間は放出されることなく安定に担持されていた。また、免疫担当細胞である樹状細胞において効率的な取込みが認められた。疎水化  $\gamma$ -PGA からなる PIC ナノ粒は生体内において高い安定性を示し、抗原提示細胞に効率よく抗原をデリバリーできることから、新規なワクチンキャリアとして有用であると考えられる。

#### 6) ナノ粒子を用いたアレルギー性疾患に対する免疫療法の開発 (スウェーデンルンド大学 Prof. Borrebaeck との共同研究)<sup>2)</sup>

花粉症患者の血液より樹状細胞および T 細胞を単離し、Phl p5 アレルゲン担持ナノ粒子で刺

激した樹状細胞(DC)とT細胞を共培養し、T細胞増殖活性およびサイトカイン産生を検討した。花粉症患者の樹状細胞に対してもナノ粒子によるDC活性化(CD80, 86, HLA-DR発現増加)が確認された。一方、Phl p5刺激ではDC活性化は認められなかった。ナノ粒子刺激DCとT細胞の共培養の結果、ナノ粒子のみの刺激ではT細胞の増殖は確認されず、Phl p5コンジュゲートナノ粒子群で高いT細胞増殖活性を示した(図4)。細胞内サイトカイン検出においては、Phl p5コンジュゲートナノ粒子群でIL-4, 10, 13などのTh2タイプのサイトカイン産生の増加が認められ、ナノ粒子がアレルゲンデリバリーシステムとして機能し、アレルゲン特異的T細胞の活性化を誘導できることが明らかとなった。

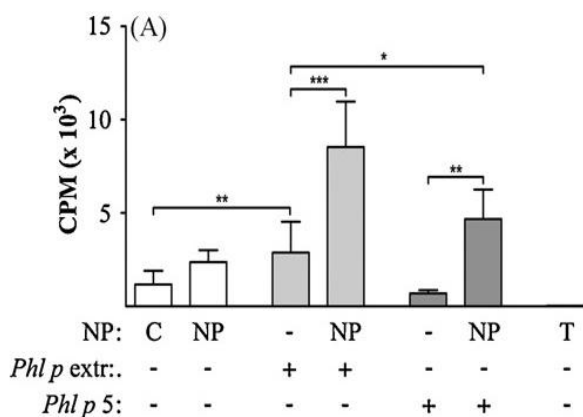


図4. Phl p5 (grass pollen allergen)内包ナノ粒子によるアレルゲン特異的T細胞の増殖活性。[横軸] C: 未刺激DC, NP: ナノ粒子パルスDC, T: T細胞のみ, Phlp (+)(-): アレルゲン有無。[縦軸] T細胞増殖活性, [3H]チミジンの取り込み(counts per minutes: cpm)

7)ステロイド含有ナノ粒子を用いた網膜疾患に対する薬剤投与法の開発(東北大学大学院医学系研究科 中澤先生との共同研究)<sup>3)</sup>

抗炎症作用を持つデキサメタゾン(DEX)を含有した疎水化γ-PGAナノ粒子を調製し、炎症性眼疾患に対する眼内DDSの検討を行った。疎水化γ-PGAナノ粒子にDEXを添加することで、粒子内部の疎水性ドメインとの相互作用により、DEX吸着ナノ粒子(DEX-NPs)を調製することができた(DEX 50 μg/ NP 1 mg)。ナノ粒子(粒径 200 nm)は、初代培養したマイクログリアやマクロファージに効率よく取込まれ(図5)、DEX-NPsを作用させることでin vitroにおいて、炎症性サイトカイン(TNF-α, MCP1)の産生が抑制された。また、マウスNMDAモデル(網膜神経興奮毒性モデル)および網膜剥離モデルにおいて、DEX-NPs投与による神経保護効果および視細胞保護効果を認め、網膜神経細胞の細胞死を効果的に抑制することができた。DEX-NPsがマクロファージ、マイクログリアへ選択的に取り込まれる特性を利用することで、薬剤をターゲットとする細胞のみに運搬し、副作用を抑えた新しい眼内薬剤投与法の開発が期待される。

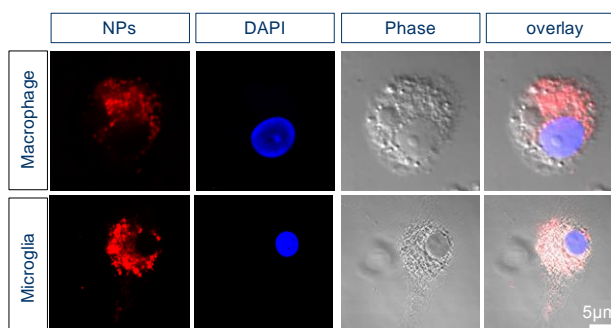


図5. マクロファージ、マイクログリア細胞によるナノ粒子の取込み。赤が粒子、青が細胞核を示す。

#### 8) 新規高分子ナノ粒子の開発<sup>4-6)</sup>

N-無水カルボン酸(NCA)重合を利用した高密度ポリマーブラシを有するペプチドナノスフェアを調製し、アルカリ加水分解性を評価した。ポリ Phe コア-PEG コロナからなるナノ粒子は、コア部のポリ Phe のβ-シート構造により高い加水分解耐性を示した<sup>4)</sup>。また、ポリ Phe コア-PEG コロナ間にジスルフィド結合を有するナノ粒子は、酸化・還元処理により、表面の PEG 密度を精密に制御することが可能であった<sup>5)</sup>。

γ-PGAをシスタミンで架橋し、γ-PGAの貧溶媒であるエタノールに添加することで、ジスルフィド結合を有する生分解性ナノゲルを調製した。調製したナノ粒子に還元剤であるジチオスレイトール(DTT)を添加することで、48時間後にはナノゲルの崩壊が認められ、刺激応答性を示した<sup>6)</sup>。

#### 馬場グループ

#### 9) γ-PGA ナノ粒子のアジュバント効果の比較検討

これまでに、抗原内包型 γ-PGA ナノ粒子は抗原単独の投与、もしくは実験用アジュバントである IFA (Incomplete Freund's adjuvant) や結核死菌を含ませた CFA (Complete Freund's adjuvant) と抗原の混合投与よりも優れた細胞性免疫を誘導することを明らかにして来た。一方、現在臨床で使用されているアジュバントとして、水酸化アルミニウムや水酸化アルミニウムに MPL (3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A) を混合させたアジュバント等が使用されている。そこで、γ-PGA ナノ粒子のアジュバント効果をさらに詳しく比較検討するために、抗原内包型 γ-PGA ナノ粒子、水酸化アルミニウムと抗原の混合、水酸化アルミニウムとMPLと抗原との混合、MPLと抗原の混合について、免疫誘導能に関する比較実験を行った。その結果、抗原内包型 γ-PGA ナノ粒子では、他のアジュバント群と比較して優位に高い抗原特異的な細胞性免疫を誘導した(図6)。この結果から、γ-PGA ナノ粒子はMPLや水酸化アルミニウムを用いたアジュバントよりも優れた細胞性免疫誘導能があることが明らかとなった。

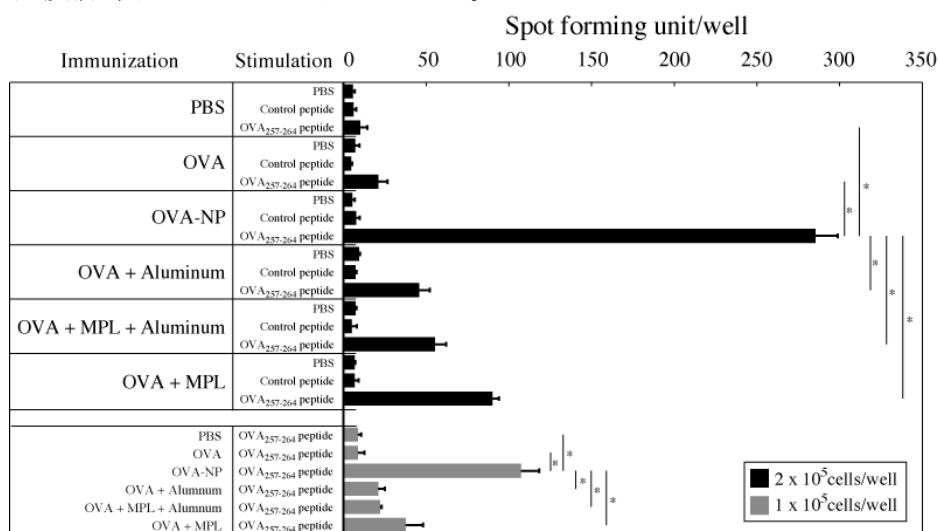


図 6. 抗原(OVA)内包型 γ-PGA ナノ粒子による細胞性免疫誘導の解析。マウスを、PBS, OVA, OVA-NP, OVA+水酸化アルミニウム, OVA+MPL+水酸化アルミニウム, もしくは OVA+MPL で1

回皮下免疫し、10日目に脾細胞を回収し、IFN- $\gamma$  ELISPOT assayを用いて抗原特異的細胞性免疫を解析した。

#### 10) $\gamma$ -PGA ナノ粒子による自然免疫細胞活性化メカニズムの解析

これまでに、MyD88 野生型マウス由来のマクロファージに比べ、MyD88 ノックアウト(KO)マウス由来のマクロファージでは、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子による炎症性サイトカインの産生誘導が優位に減少しており、また、樹状細胞の解析においてもMyD88 野生型に比べMyD88 KO マウスではサイトカインの産生や補助刺激分子の発現が減少していた。さらに、TLR4 野生型である C3H/HeN マウスと、TLR4 のシグナル伝達機構に変異を有する(TLR4-deficient) C3H/HeJ マウス由来のマクロファージ及び樹状細胞を用いて同様の実験を行った結果、TLR4 野生型マウスにおけるサイトカイン産生量や補助刺激分子の発現増加に比べ、TLR4-deficient マウスではそれらのレスポンスは低下することを証明した。また、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の細胞内シグナル伝達の解析では、MAPK を介して NF- $\kappa$ B を活性化させることにより、各種炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導し、さらに樹状細胞表面の補助刺激分子やMHC の発現増強を引き起こし、樹状細胞を活性化させていることも明らかにしてきた。本年度は、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子による自然免疫細胞活性化におけるシグナル伝達経路をさらに詳しく解析するため、TLR4 が欠損している TLR4 KO マウス由来のマクロファージもしくは樹状細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の TLR4 野生型マウス由来のマクロファージや樹状細胞に対する活性化作用に対し、TLR4 KO マウス由来のマクロファージや樹状細胞では、その刺激作用は有意に減少していた(図7)。これらの結果から、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子はTLR4/MyD88シグナル伝達経路を介して抗原提示細胞であるマクロファージや樹状細胞を活性化させていると考えられる。

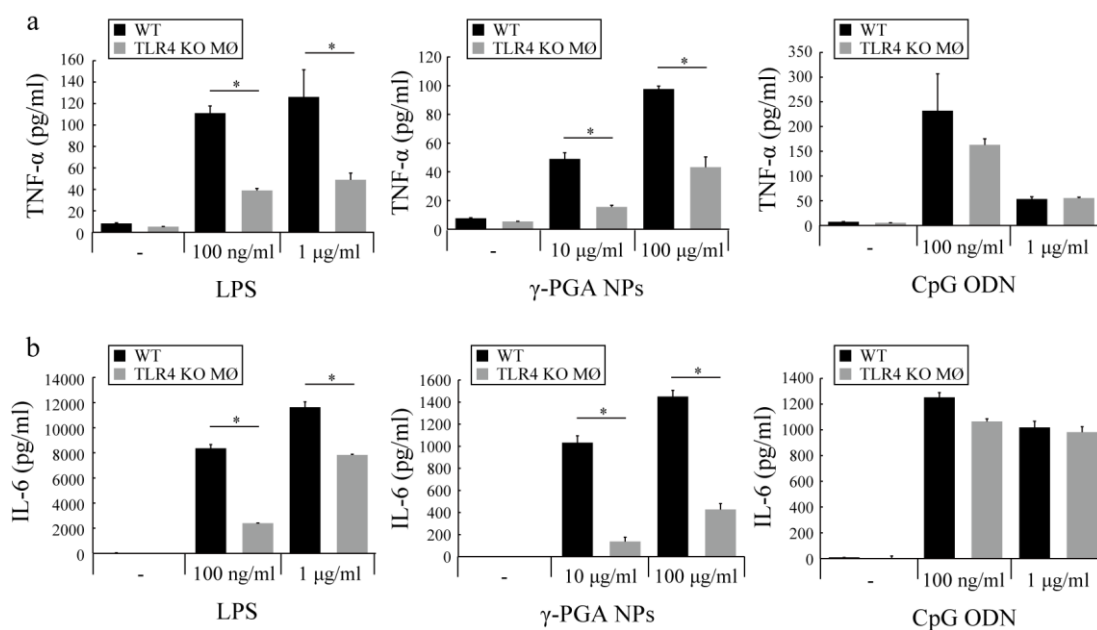




図 7.  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の TLR4 野生型もしくは TLR4 KO マウス由来のマクロファージに対するサイトカイン産生の誘導。マクロファージに LPS,  $\gamma$ -PGA ナノ粒子, もしくは CpG ODN を作用させ, 産生されたサイトカインを ELISA により検出。

#### 11) 体内での免疫細胞による $\gamma$ -PGA ナノ粒子の取込みとその動態

抗原を内包している  $\gamma$ -PGA ナノ粒子をマウスに投与すると, 抗原に対する優れた獲得免疫を誘導することが明らかになっているが, 投与後の動態は明らかになっていない。そこで  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の動態を解析するために, 蛍光ラベルされたナノ粒子を用い, 投与後の免疫細胞による取込みや体内での動態を解析した。フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識された  $\gamma$ -PGA ナノ粒子 (FITC-NP) を皮下に投与し, 3 日後に所属リンパ節と脾臓における FITC 陽性細胞をフローサイトメトリー (FCM) で解析した結果, FITC 陽性細胞は所属リンパ節でのみ観察され, 脾臓では観察されなかった。一方, FITC のみの投与では所属リンパ節や脾臓での蛍光は観察されなかった。このことは皮下で抗原を取込んだ細胞が所属リンパ節へ移行していること, 粒子を形成していることで免疫細胞に取込まれ易くなることを示している。経日的にマウスから所属リンパ節と脾臓を採取し, FITC 陽性細胞を検出した結果, 投与後 3 日目をピークに抗原提示細胞が所属リンパ節に移行していることが明らかになり, 30 日後にはほとんど消失していた。ナノ粒子を取込んでいる細胞の特徴を調べた結果, 樹状細胞のマーカーである CD11c 陽性細胞に効率良く取込まれていることが明らかになった。さらに, ナノ粒子を取込んでいる樹状細胞の細胞表面の補助刺激分子やケモカインレセプターが高発現していたことから (図 8), これらの細胞が成熟化していることも明らかになった。以上の結果より, 投与された  $\gamma$ -PGA ナノ粒子は高い効率で樹状細胞に取込まれ, 樹状細胞は所属リンパ節に移行するとともに成熟化し, ナノ粒子に付随している抗原を分解・提示することで獲得免疫を誘導していると考えられる。

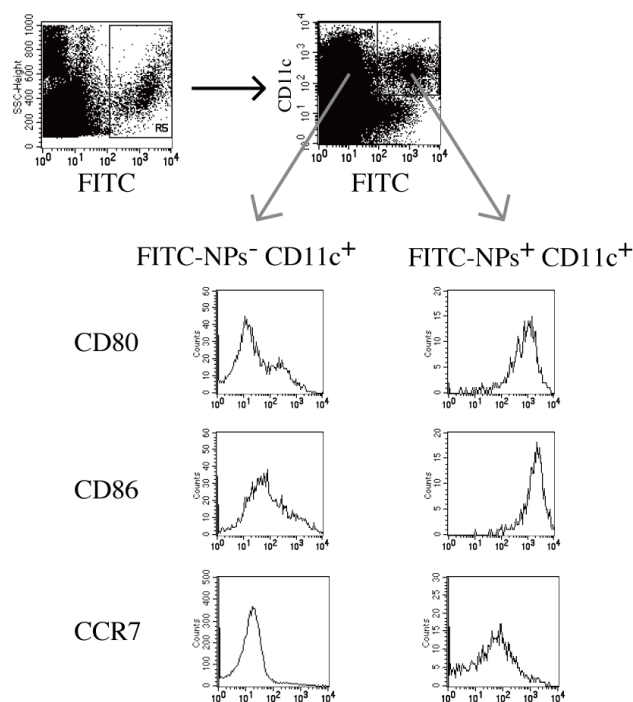


図 8. FITC-NP を取込んだ樹状細胞のリンパ節への移行。マウス皮下に FITC-NP を投与し、所属リンパ節中の FITC 陽性細胞、樹状細胞マーカー (CD11c)、補助刺激分子 (CD80, CD86)、およびケモカインレセプター (CCR7) の発現を FCM により解析した。

### 異グループ

#### 12) 腫瘍免疫誘導を目指した、抗がん剤治療後疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチン治療のマウス腫瘍モデルにおける検討

ペプチドワクチンではヒト白血球型抗原 (HLA) の拘束性を考慮した上でのワクチン療法を開発する必要があるが、このことは本治療法の臨床応用が限定的になる一因である。本検討では疎水化  $\gamma$ -PGA による樹状細胞活性化アジュバント機能に期待し、ペプチドを用いず、化学療法による抗がん剤治療後に退縮過程にある腫瘍内に疎水化  $\gamma$ -PGA ワクチンをおこなうことにより腫瘍免疫を活性化する癌治療の基礎的検討を行った。マウス大腸癌 (CT26) 皮下腫瘍を抗がん剤 (5-FU) にて治療し、退縮過程にある腫瘍内に疎水化  $\gamma$ -PGA を直接投与した。大腸癌皮下腫瘍に対して 5-FU 単独にて抗腫瘍効果を認めたが、 $\gamma$ -PGA のみを腫瘍内に投与しても抗腫瘍効果はなかった (図 9)。また 5-FU 抗腫瘍効果は、 $\gamma$ -PGA の追加投与 3 回にても優位な増強は認めず、追加投与を 6 回にしても有意ではなかった (図 9)。OK432 (ピシバニール) は、既に癌性腹膜炎や頭頸部癌の治療薬として承認されているが、強い免疫賦活作用がある。上記大腸癌皮下腫瘍モデルを用いて、5-FU+ $\gamma$ -PGA に加えて、OK432 の腫瘍局所投与をすることで、抗腫瘍効果の上乗せ作用を検討したが、これも 5-FU 単独の抗腫瘍効果に対して、有意な増強を認めなかった。以上の結果は、 $\gamma$ -PGA を用いたワクチン治療を構築する上で、癌抗原由来ペプチドや蛋白との併用投与でないと抗腫瘍効果が期待しにくいことが明らかとなった。

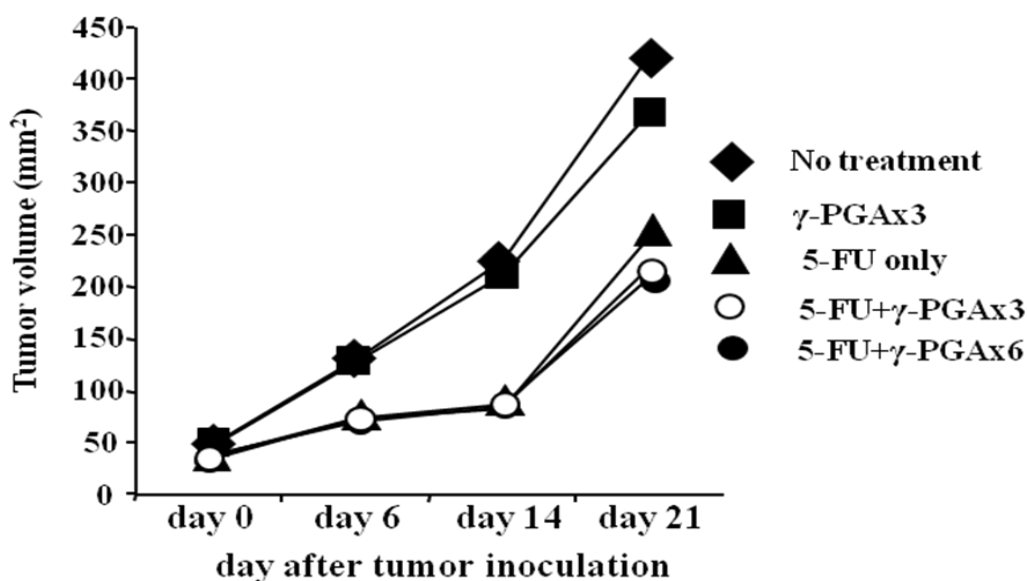


図 9. BALB/c マウスに CT26 マウス大腸癌細胞を肝内に投与後、5-FU 抗癌剤 10 日間投与後、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子を腫瘍内に 3 回あるいは 6 回投与し、その皮下腫瘍系を経時観察した。  
 ◆無治療群、■ $\gamma$ -PGA のみ 3 回投与群、▲5-FU のみ投与群、○5-FU+ $\gamma$ -PGA3 回投与群、●5-FU+ $\gamma$ -PGA6 回投与群

#### 13) ナノ粒子ー癌抗原ペプチドワクチンによる癌免疫治療の臨床応用

大阪大学医学部附属病院薬剤部の癌抗原ペプチドー疎水化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子ワクチンの製造を同部および医学部附属病院未来医療センターの協力にてほぼ確立し、薬剤部で GMP 準拠した製造が可能となった。また現在  $\gamma$ -PGA ナノ粒子-WT1 ペプチドあるいは EphA2 ペプチドの体内動態及び毒性試験が進行中である。この結果をもとに肝癌・消化器癌患者を対象とした臨床試験を準備中である。

### §4. 成果発表等

#### (4-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Hyungjin Kim, Tomofumi Uto, Takami Akagi, Masanori Baba, Mitsuru Akashi, "Amphiphilic Poly(amino acid) Nanoparticles Induce Size-dependent Dendritic Cell Maturation", *Adv. Funct. Mater.*, 20, 3925-3931 (2010). DOI:10.1002/adfm.201000021
2. Sissela Broos, Kristina Lundberg, Takami Akagi, Koji Kadowaki, Mitsuru Akashi, Lennart Greiff, Carl A.K. Borrebaeck, Malin Lindstedt, "Immunomodulatory

- Nanoparticles as Adjuvants and Allergen-delivery System to Human Dendritic Cells: Implications for Specific Immunotherapy”, *Vaccine*, 28, 5075-5085 (2010). DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.05.004
3. Morin Ryu, Toru Nakazawa, Takami Akagi, Tatsuhide Tanaka, Ryou Watanabe, Masayuki Yasuda, Noriko Himori, Kazuichi Maruyama, Toshihide Yamashita, Toshiaki Abe, Mitsuru Akashi, Kohji Nishida, “Suppression of Phagocytic Cells in Retinal Disorders Using Amphiphilic Poly( $\gamma$ -glutamic acid) Nanoparticles Containing Dexamethasone”, *J. Controlled Release* (in press).
  4. Michiya Matsusaki, Masahiro Matsumoto, Tomonori Waku, Mitsuru Akashi, “Self-Assembled Structure of Peptide Nanospheres Induces High Stability against Hydrolysis and Sterilization”, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 22, 1035-1048 (2011). DOI: 10.1163/092050610X497890
  5. Tomonori Waku, Masahiro Matsumoto, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, “Complete Surface Control of Peptide Nanospheres with Detachable and Attachable Polymer Brush Layers”, *Chem. Commun.*, 46, 7025-7027 (2010). DOI: 10.1039/C0CC01051K
  6. Akihiro Nishiguchi, Hiroaki Yoshida, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, “Preparation of Reduction-Sensitive Nanogels with a Large Swelling Capacity by a Surfactant-Free Precipitation Method”, *Chem. Lett.*, 39, 1184-1185 (2010). DOI: 10.1246/cl.2010.1184
  7. Ai Himeno, Takami Akagi, Tomofumi Uto, Xin Wang, Masanori Baba, Kentaro Ibuki, Megumi Matsuyama, Mariko Horiike, Tatsuhiko Igarashi, Tomoyuki Miura, Mitsuru Akashi, “Evaluation of the Immune Response and Protective Effects of Rhesus Macaques Vaccinated with Biodegradable Nanoparticles Carrying gp120 of Human Immunodeficiency Virus”, *Vaccine*, 28, 5377-5385 (2010). DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.04.110
  8. Takayuki Hamasaki, Tomofumi Uto, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, “Modulation of Gene Expression Related to Toll-like Receptor Signaling in Dendritic Cells by Poly( $\gamma$ -glutamic acid) Nanoparticles”. *Clin. Vaccine Immunol.*, 17, 748-756 (2010). DOI: 10.1128/CVI.00505-09

#### (4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 4 件)