

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. 研究実施体制

(1)「明石」グループ

- ① 研究代表者: 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 γ -PGA ナノ粒子の製造と安全性試験
 - ・抗原-疎水化 γ -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 主たる共同研究者: 馬場 昌範 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科附属難治ウイルス病態制御研究センター、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 γ -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 主たる共同研究者: 巽 智秀 (大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学、助教)
- ② 研究項目
 - ・ナノ粒子-癌抗原ペプチドを用いた肝癌・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

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)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と安全性試験

これまでに疎水化 γ -PGA ナノ粒子の GMP に準拠した大量製造プロセスを確立することができた。本年度は、GMP 準拠ナノ粒子の大量製造、ナノ粒子+がん抗原ペプチドを用いた安全性試験を実施し、トランスレショナルリサーチの承認申請に必要なデータを取得した。「疎水化 γ -PGA ナノ粒子ワクチンの雄ラットを用いた 14 日間反復投与毒性試験」および「疎水化 γ -PGA ナノ粒子ワクチンのモルモットを用いた抗原性試験」において、がん抗原ペプチドをナノ粒子表面に化学固定化したワクチンは顕著な毒性を示さず、ナノ粒子そのものの抗原性もなく高い安全性が確認された。

2) タンパク質を内包した疎水化 γ -PGA ナノ粒子の細胞内動態の解析⁶⁾

抗原を内包した疎水化 γ -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、内包抗原およびナノ粒子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調べた。卵白アルブミン(OVA)を内包したナノ粒子(40, 200 nm)を調製し、マクロファージによる取り込み後の OVA 分解挙動を評価した結果、粒子サイズにより内包蛋白質の分解性に違いが観察され、より粒径の小さい 40 nm のナノ粒子の方が細胞内での内包蛋白質の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、エンドソーム(蛋白質を分解する細胞小器官)染色により Texas Red (TR)-OVA-NPs の細胞内局在を評価した結果、粒径により内包 OVA の細胞内局在に大きな違いは観察されなかった(図 1)。40, 200nm のナノ粒子に内包された OVA は、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれて、エンドソームへと移行する。その後、時間経過と共に OVA がエンドソームから細胞質への移行が認められたが、粒径の違いによるエンドソームエスケープ能に大きな差は認められなかった。粒径による内包蛋白質の局在の違いが認められなかったことにより、内包蛋白質の分子挙動の違いは、細胞内でのナノ粒子からの蛋白質放出挙動の違いが原因だと考えられる。今後、内包蛋白質に加え、ナノ粒子自身の細胞内分解挙動・局在を評価することで、より詳細な解析が可能であると考えられる。

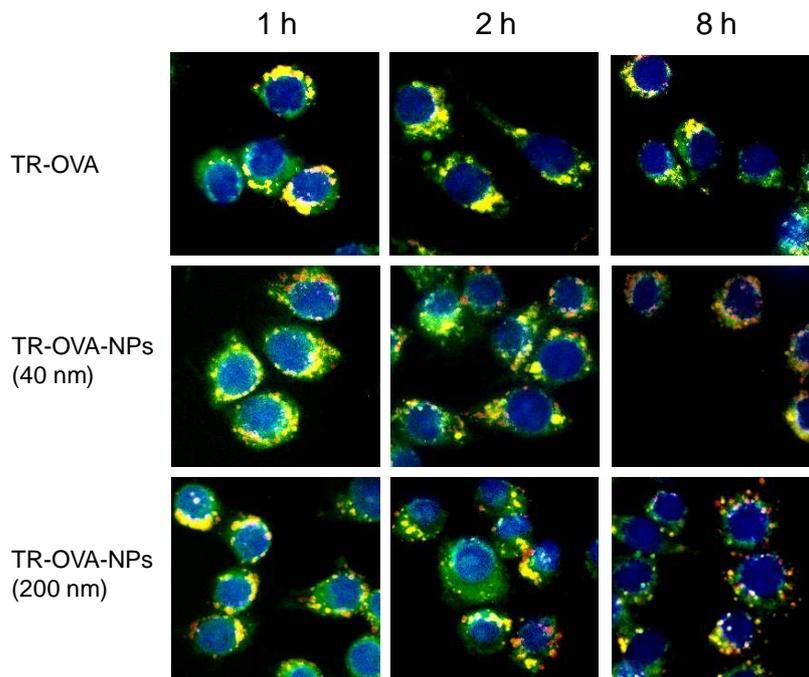


図 1. OVA 内包ナノ粒子の細胞内局在。RAW264 細胞に TR-OVA alone, TR-OVA-NPs (40, 200 nm)を取り込ませ、共焦点顕微鏡により観察。赤:TR-OVA、緑:エンドソーム、黄:エンドソーム内に局在する TR-OVA、青:核を示している。TR-OVA alone はエンドソームに局在(黄色)しているが、TR-OVA-NPs (40, 200 nm)は細胞質に TR-OVA がエスケープ(赤色)している像が観察されたが、粒径による大きな違いは見られなかった。

3) 疎水化 γ -PGA からなるユニマーナノ粒子の機能評価²⁾

これまでに疎水化 γ -PGA の会合挙動を制御することで、1 本の疎水化 γ -PGA からなるユニマーナノ粒子の調製と構造解析を実施してきた(図 2)。本年度は得られたユニマーナノ粒子の物性および薬物キャリアとして機能評価するために、難溶性低分子薬剤(イリノテカン、シスプラチン)とのコンジュゲーションを行い、薬物の担持能、放出挙動を調べた。その結果、ユニマーナノ粒子は難溶性低分子薬剤を吸着することが可能であり、また従来用いているナノ粒子(200 nm)と比較して、高い薬剤吸着能を示した。疎水性薬剤(イリノテカン)は、粒子内部に存在するフェニルアラニンが会合して形成される疎水性ドメインに吸着していると考えられるため、粒子内部構造の差異により、薬剤吸着能に違いが見られたと考察される。

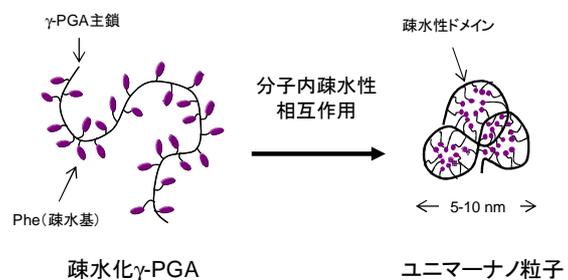


図 2. 疎水化 γ -PGA からなるユニマーナノ粒子

4) ナノ粒子と既存アジュバントとの併用による免疫増強効果の検討

疎水化 γ -PGA ナノ粒子は、担持抗原を効率よく抗原提示細胞にデリバリーすると共に、粒子自身に細胞を活性化させるアジュバント作用があることが分かっている。そこで、既存アジュバントとナノ粒子の併用によるアジュバント活性の増強効果を検討した。既存アジュバントとして CpG オリゴヌクレオチド(ODN)を選択し、疎水化 γ -PGA ナノ粒子へのコンジュゲーション方法を検討した結果、カチオン性蛋白質であるプロタミンと CpG ODN より polyplex を作成し、その polyplex を粒子に内包させることで、安定に CpG を粒子に担持させることができた。次に、CpG ODN 内包ナノ粒子(CpG ODN-NPs)のアジュバント活性をマクロファージから産生されるサイトカイン(TNF- α)を指標に調べた結果、CpG ODN-NPs において顕著な TNF- α 産生が認められた。今後、*in vivo* での免疫誘導効果を評価し、アジュバント併用の有用性および最適な組み合わせを検討する。

5) 疎水化 γ -PGA からなるナノマイクロ構造体の形状制御

近年、様々な形状を有する有機および無機ナノマイクロ構造体において、その形状が細胞への吸着・取り込み量、毒性、薬物放出挙動、体内動態等に影響を与えることが明らかになっている。そこで、ワクチンキャリアとしての形態と機能との相関性を検討することを目的に、疎水化 γ -PGA を用いて様々な形態を有するナノおよびマイクロ構造体を調製した。疎水化 γ -PGA は疎水基の導入率(親疎水バランス)や会合体調製時の条件(ポリマー濃度、溶媒、温度等)を制御することで、ロッド状の形態や中空カプセル、多孔質粒子などを調製することが可能であった(図 3)。今後、これら会合体の薬物担持能、アジュバント機能について評価する。

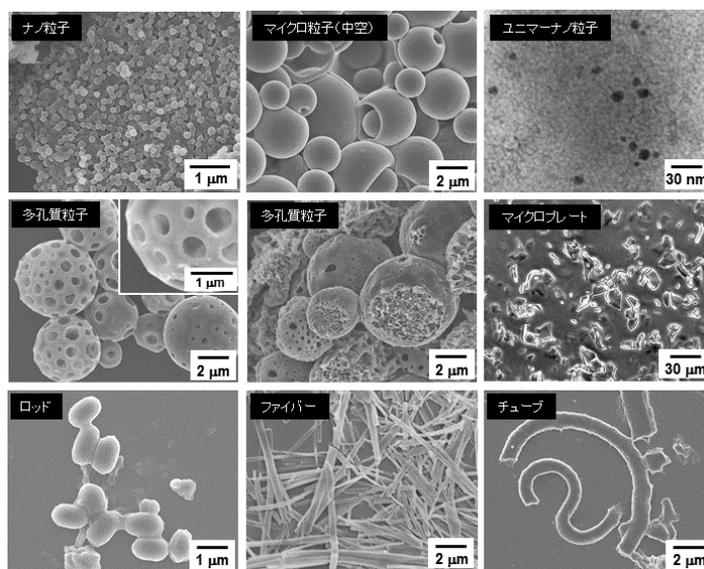


図 3. 疎水化 γ -PGA からなる様々な形状を有するナノマイクロ構造体

6) イオン液体を用いたナノ粒子の細胞内取込み挙動の観察(阪大院工 桑畑教授との共同研究)

イオン液体(常温溶融塩)は、蒸気圧 0、高導電性の性質から、電子顕微鏡を用いた液中での生体試料観察に利用されている。そこで、細胞によるナノ粒子の取込み過程をイオン液体を用いて観察した。シリカ粒子(900 nm)をマクロファージに取り込ませ、細胞をホルマリンで固定化した。その後、0.5 vol%に希釈したイオン液体(EMI-BF₄)に浸漬し、走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。イオン液体法では、従来のアルコール置換と比較して、細胞の変形が少なく、粒子の取込み過程を直接かつ詳細に観察することができた。また、SEM 観察時の加速電圧を上げることで細胞の透過性が上がり、細胞内部に取り込まれた粒子を観察することができた(図 4)。これにより、細胞内での粒子の分解性や細胞内局在の観察に応用できると期待される。

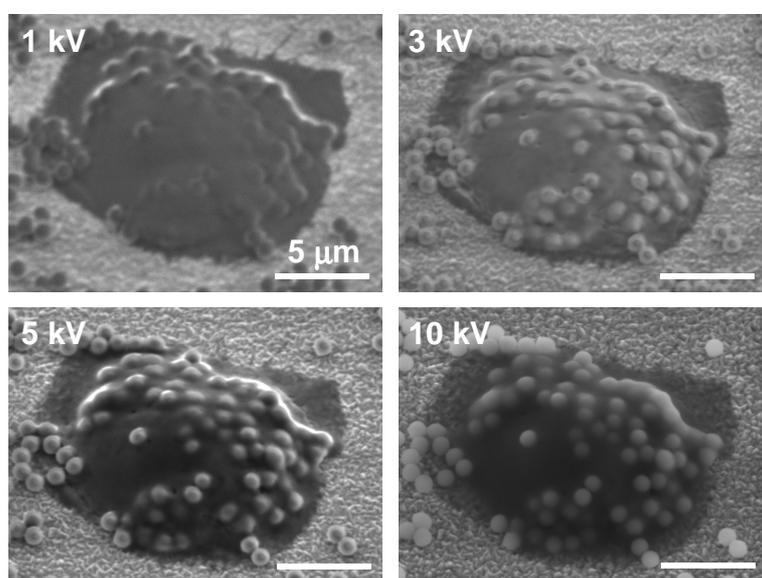


図 4. イオン液体を用いたシリカ粒子取込み挙動の SEM 観察。イオン液体法を用いることで、脱水に伴う細胞変形を抑制することができ、粒子の取込み過程を詳細に観察することができた。また、SEM 観察時の加速電圧(1~10 kV)の違いにより、細胞の透過性の違いが観察された。

7) ナノ粒子アジュバントを用いた日本脳炎ワクチンの開発(医薬基盤研との共同研究)³⁾

現行の日本脳炎(JE)ワクチン(JEV)の問題点は、複数回の基礎免疫、さらに追加免疫を要することは不便かつ不快であり、JE の突然の大流行や JE 感染のリスクが高い地域への急な旅行のような緊急の状況で短期間で JE 予防を殆ど与えないことである。それゆえ、JE に対する有効な1回接種用ワクチンの開発が非常に必要とされている。そこで、既存の JEV、或いは日本脳炎ウイルスを使用せずに製造可能でワクチン効果を有する日本脳炎中空粒子(JE-VPL)を用いて、ナノ粒子アジュバント併用による1回接種用ワクチンの評価を行った。JEV および JE-VPL にアジュバントとしてナノ粒子を加えることにより、1回接種で十分な感染防御免疫を誘導することが可能であり、ナノ粒子アジュバントの日本脳炎ワクチンに対する有用性を明らかにした。

馬場グループ

8) ナノ粒子を用いた獲得免疫誘導の解析

ナノ粒子は抗原のキャリアとして優れた機能を有しており、ウイルス由来の抗原や卵白アルブミン(OVA)をナノ粒子に付加(内包/固定/吸着)した状態でマウス生体に投与すると、抗原特異的な獲得免疫の誘導が認められる。また、一般的に用いられている水酸化アルミニウムや水酸化アルミニウムとモノホスホリルリピッド A(MPL)を混合したアジュバントと比較して、ナノ粒子をアジュバントとして用いると、これら既存のアジュバントよりも高い抗原特異的な獲得免疫を誘導することが明らかになっている。さらに、ナノ粒子は抗原の付加方法の選択性の高さに加え、投与ルートを選択も可能なことから、これまでに市販されているワクチンにアジュバントとして追加するという用途も期待できる。

ナノ粒子はマウス生体に皮下投与すると、抗原提示細胞の一つである樹状細胞がナノ粒子を取り込み、所属のリンパ節に移行する事が明らかになっている。また、抗原のみの投与に比べ、抗原をナノ粒子に内包させることで、樹状細胞による抗原の取り込み効率が飛躍的に向上し、リンパ節に移行する抗原の量も増加するという結果も得られている。ナノ粒子を取り込み、リンパ節に移行した樹状細胞のフェノタイプを詳細に解析した結果、これらの樹状細胞は補助刺激分子やケモカインレセプターを高発現しており、成熟化していることが分かった。さらに、投与したナノ粒子とともに抗原を取り込んだ樹状細胞は、リンパ節において抗原の断片を細胞表面に提示している事も明らかになった。

これらの結果により、ナノ粒子を貪食した樹状細胞はリンパ節に移行し、抗原特異的な免疫を誘導していると考えられるため、本年度はナノ粒子投与後の抗原特異的な免疫の誘導時間を測定した。その結果、抗原内包ナノ粒子を投与後 7 日目より抗原特異的 CD8⁺T 細胞が観察され、10 日目にピークを示した(図 5)。この結果は、ナノ粒子を投与する事で短期間に抗原特異的細胞性免疫を誘導することが出来ることを示している。他のアジュバントを用いると、抗原特異的な細胞性免疫はほとんど誘導されない事、一方で、ナノ粒子は強い細胞性免疫を誘導し、さらに 1 回の投与のみで短期間に免疫を誘導するという結果から、ナノ粒子は実用的なワクチンとして非常に優れていると考えられる。また、15 日目では抗原特異的 CD8⁺T 細胞は減少したが、一部の抗原特異的 CD8⁺T 細胞はメモリー細胞として生体内で長期に生存する事が分かっており、ナノ粒子によるメモリー細胞の誘導が明らかになっている。

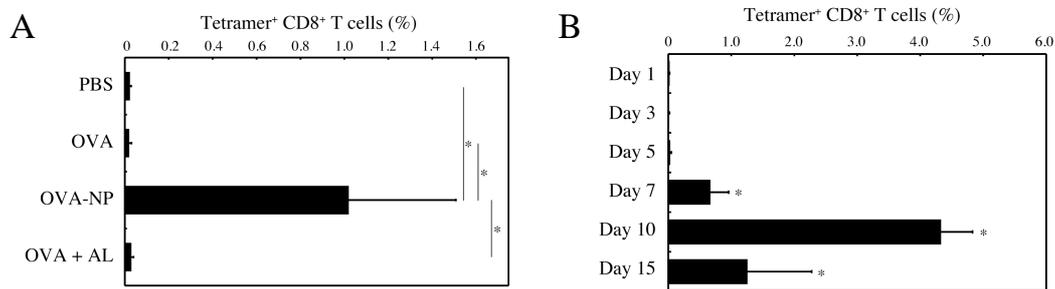


図 5. OVA 内包ナノ粒子による細胞性免疫の誘導。A) マウスに, PBS, OVA, OVA-NP, OVA + 水酸化アルミニウムを皮下経路で 1 回免疫し, 10 日後に脾細胞を回収した。脾細胞中の抗原特異的 CD8⁺ T 細胞はテトラマーを用いて解析した。B) マウスに OVA 内包ナノ粒子を皮下投与し, 経日的に脾細胞を回収した。脾細胞中の抗原特異的 CD8⁺ T 細胞はテトラマーを用いて解析した。

9) ナノ粒子の免疫誘導メカニズムの解析⁵⁾

γ -PGA ナノ粒子は樹状細胞に対し, 細胞内シグナル伝達経路である mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介して NF- κ B を活性化させ各種遺伝子を発現し, 炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導する。また, 細胞表面の補助刺激分子や MHC Class I および MHC Class II の発現増加も誘導しており, ナノ粒子の刺激により樹状細胞は成熟化する事が明らかになっている。さらに, 野生型の自然免疫担当細胞である樹状細胞やマクロファージに対し, MyD88 knockout (KO), TLR4 deficient もしくは TLR4 KO の樹状細胞やマクロファージでは, 炎症性サイトカインの産生や補助刺激分子の発現が優位に減少しており, MAPK の活性化も減少していた。これらの結果から, γ -PGA ナノ粒子は TLR4-MyD88-MAPK のシグナル伝達経路を用いて自然免疫細胞を活性化させていると考えられる。そこで本年度は MyD88 KO マウスもしくは, TLR4 が欠損しているマウスを用いて, ナノ粒子投与による生体内での抗原特異的な免疫の誘導を測定した。その結果, 野生型のマウスに比べ, MyD88 KO マウスもしくは TLR4 deficient マウスでは, 優位に抗原特異的な獲得免疫の誘導が低下していた(図 6)。これらの結果より, 生体内でのナノ粒子による抗原特異的な免疫応答の誘導においても TLR4-MyD88 を介したシグナル伝達が重要であることが明らかになった。

10) 樹状細胞によるナノ粒子貪食の解析⁴⁾

これまでの研究において, γ -PGA ナノ粒子は in vitro と in vivo の両方において, 抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージに効率よく取り込まれることが分かっている。さらに, 抗原を内包している γ -PGA ナノ粒子は抗原単独での取り込みに比べ, 効率的に樹状細胞に貪食される事も明らかになっている。そこで本研究では, アジュバントによる貪食の比較を目的として, 水酸化アルミニウムと抗原を混合している状態, 水酸化アルミニウムと MPL と抗原を混合している状態, もし

くは抗原をナノ粒子に内包している状態における樹状細胞による取り込みを調べた。その結果、抗原と水酸化アルミニウムを混合した状態と比べて、ナノ粒子に抗原を内包している状態の方が、多くの抗原が樹状細胞の細胞内に取り込まれることが、共焦点レーザー顕微鏡により観察された。また、抗原単独では樹状細胞による抗原の取り込みはほとんど観察されなかった。さらに、抗原と水酸化アルミニウムに MPL を加えて貪食の比較実験を行ったところ、抗原と水酸化アルミニウムの混合の状態に比べ、樹状細胞による抗原の貪食は高くなったものの、ナノ粒子を用いた方がそれよりもさらに高い値を示した(図 7)。これらの結果より、樹状細胞による抗原の貪食は、既存のアジュバントよりもナノ粒子を用いた方が有効である事が示された。

次に、各種貪食阻害剤を用いて、ナノ粒子の樹状細胞による取り込みの抑制を調べた。その結果、Cytochalasin D および 5-(N,N-dimethyl)amiloride (DMA) が抑制効果を示したことから、樹状細胞によるナノ粒子の貪食には、ファゴサイトーシスとマクロピノサイトーシスの両方が関与していると思われる。

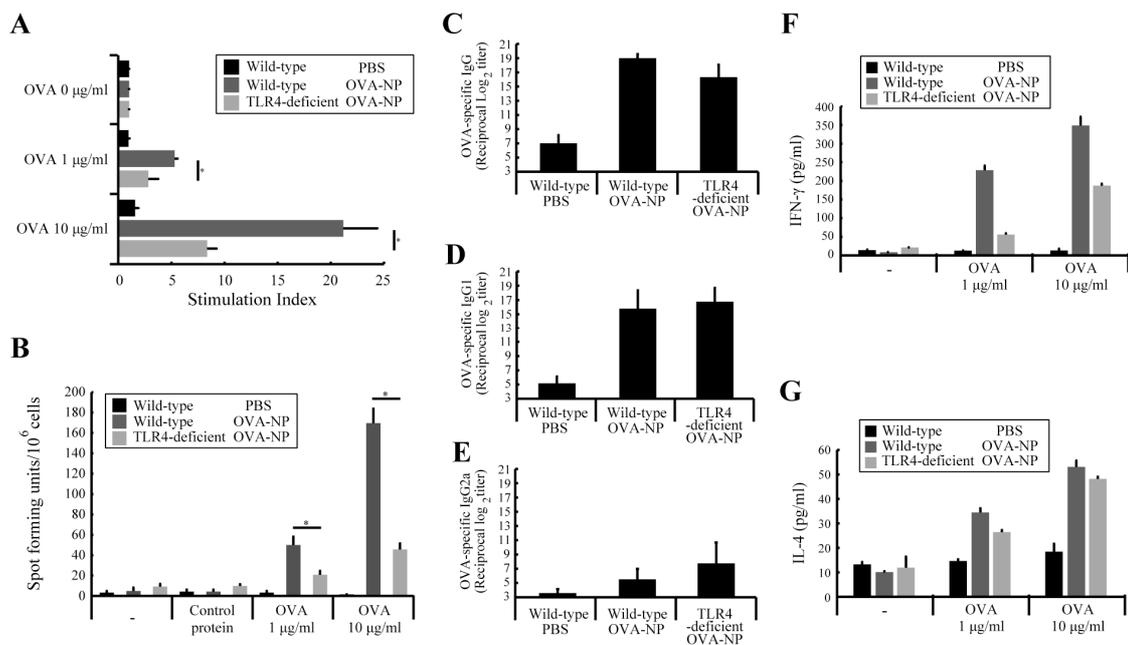


図 6. OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子の野生型もしくは TLR4 欠損マウスに対する獲得免疫の誘導。野生型マウス(WT)もしくはTLR4 欠損マウス(TLR4-deficient)にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)もしくはOVA-NPを皮下に1回免疫し、10日後に脾細胞と血漿を回収した。A)脾細胞中の抗原特異的 CD8⁺ T 細胞はテトラマーを用いて解析した。B)脾細胞を用いて抗原特異的 IFN- γ 産生細胞を ELISPOT assay にて解析した。C-E) マウス血漿中の抗原特異的抗体を測定した。F-G)脾細胞を抗原で再刺激し上清中のサイトカインを測定した。

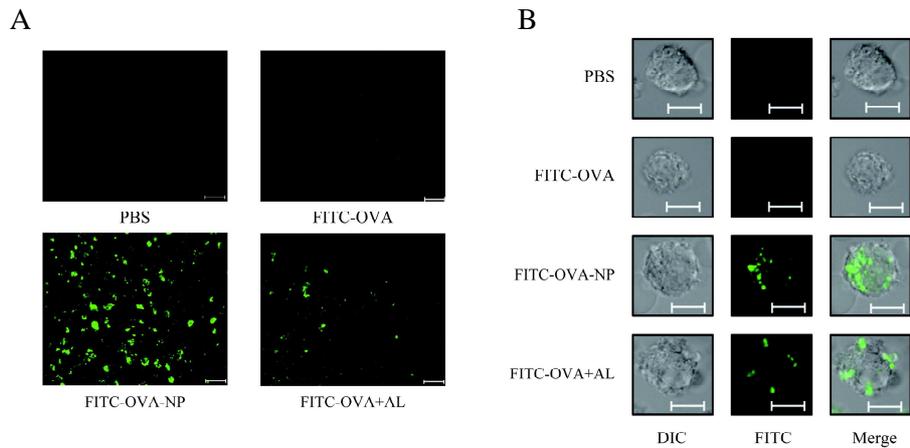


図 7. 抗原の状態による樹状細胞の取り込み比較。骨髄由来の樹状細胞に PBS, Fluorescein isothiocyanate (FITC)-OVA, FITC-OVA 内包ナノ粒子, FITC-OVA と水酸化アルミニウムの混合の状態 で 1 時間取り込ませ、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。A) 蛍光の全体像観察, B) 各細胞の観察像。

異グループ

11) マウス肝腫瘍モデルにおけるナノ粒子-癌抗原ペプチドワクチンの有用性の検討

現在癌患者に対するペプチドワクチンにおいて用いられているアジュバントは、IFA (モンタナイド) を用いた臨床試験がほとんどである。本研究においては、 γ -PGA ナノ粒子によるペプチドワクチンのワクチンとしての有用性を、マウス大腸癌肝腫瘍モデルにおいて、既存の IFA と比較して、その治療効果を検討した。C57BL/6 マウスに MC38 大腸癌細胞による肝腫瘍を作成し、Eph-NP (Eph ペプチドを表面固定したナノ粒子)、Eph+IFA (Eph ペプチドを IFA を用いてワクチンを行う)、pep (Eph ペプチドのみ)、NP (ナノ粒子のみ) および無治療群 (PBS) を設定し、その治療効果を検討した (図 8)。

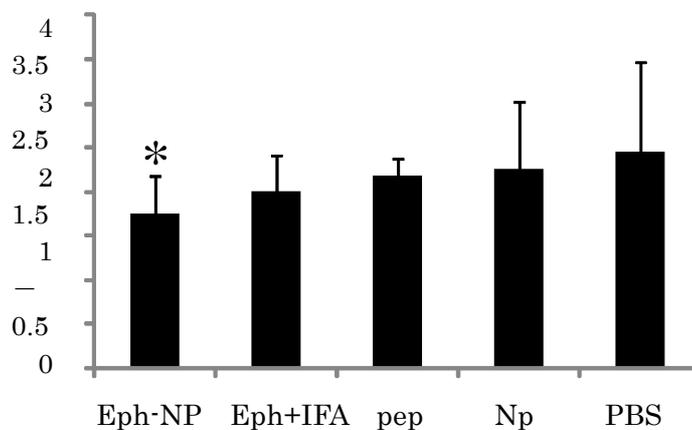


図 8. Eph 固定化ナノ粒子ワクチンによる肝腫瘍抑制効果

Eph-NP が Eph+IFA より強い抗腫瘍効果を示し、MC38 肝腫瘍を有意に抑制した。また副作用を検討したが、Eph-NP 治療を受けた群は、特に有意な肝障害や腎障害を認めなかった。他の治療群も同様に、本腫瘍系では有意な肝障害及び腎障害を認めなかった。本検討の結果は Eph-NP の癌ペプチドワクチンとしての有用性を示す結果であった。

12) 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 γ -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確立し、薬剤部で GMP 準拠した製造が可能となったため、 γ -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を行った。 γ -PGA ナノ粒子-WT1 ペプチドあるいは EphA2 ペプチドの 14 日間の反復投与にて微小な変化が、投与部位及び腎で認められたが、毒性学的には問題ないことが確認された。また能動的全身アナフィラキシー及び受動的皮膚アナフィラキシーを検討したが、 γ -PGA ナノ粒子-WT1 ペプチドあるいは EphA2 ペプチドワクチンによる陽性反応は認めず、安全であることが確認された。この結果をもとに現在肝癌・消化器癌患者を対象とした臨床試験を準備中である。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. T. Akagi, T. Fujiwara, M. Akashi, Rapid fabrication of polylactide stereocomplex using layer-by-layer deposition by inkjet printing. *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press. (DOI: 10.1002/ange.201201586).
2. T. Akagi, P. Piyapakorn, M. Akashi, Formation of unimer nanoparticles by controlling the self-association of hydrophobically modified poly(amino acid)s. *Langmuir* 28, 5249-5256 (2012). (DOI: 10.1021/la205093j).
3. S. Okamoto, H. Yoshii, M. Matsuura, A. Kojima, T. Ishikawa, T. Akagi, M. Akashi, M. Takahashi, K. Yamanishi, Y. Mori, Poly- γ -glutamic acid nanoparticles and aluminum adjuvant used as an adjuvant with a single dose of Japanese encephalitis virus-like particles provides effective protection from Japanese encephalitis virus. *Clin.Vaccine Immunol.* 19, 17-22 (2012). (DOI: 10.1128/ CVI.05412-11)
4. T. Uto, T. Akagi, M Toyama. Y. Nishi, F. Shima, M. Akashi, M. Baba, Comparative activity of biodegradable nanoparticles with aluminum adjuvants: Antigen uptake by dendritic cells and induction of immune response in mice. *Immunol. Lett.* 140, 36-43 (2011). (DOI: 10.1016/j.imlet.2011.06.002).
5. T. Uto, T. Akagi, K. Yoshinaga, M. Toyama, M. Akashi, M. Baba, The induction of innate and adaptive immunity by biodegradable poly(γ -glutamic acid) nanoparticles via a TLR4 and MyD88 signaling pathway. *Biomaterials* 32, 5206-5212 (2011). (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.052)
6. T. Akagi, F. Shima, M. Akashi, Intracellular degradation and distribution of protein-encapsulated amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles. *Biomaterials* 32, 4959-4967 (2011). (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.049).
7. Yohei Mukai, Tomoyo Yoshinaga, Mai Yoshikawa, Kazuhiko Matsuo, Tomoaki Yoshikawa, Keisuke Matsuo, Kazuyuki Niki, Yasuo Yoshioka, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, Poly (γ -glutamic acid) nanoparticles fusion for antigen cross-presentation induced induction of endoplasmic reticulum-endosome. *J. Immunol.* 187, 6249-6255 (2011). (DOI: 10.4049/jimmunol.1001093).
8. Keisuke Matsuo, Hayato Koizumi, Mitsuru Akashi, Shinsaku Nakagawa, Takuya Fujita, Akira Yamamoto, Naoki Okada, "Intranasal immunization with poly (γ -glutamic acid) nanoparticles entrapping antigenic proteins can induce potent tumor immunity" *J. Control. Release*, 152, 310-316 (2011). (DOI: 10.1016/j.jconrel.

2011.03.009).

9. Tomofumi Uto, Yosuke Nishi, Masaaki Toyama, Keisuke Yoshinaga, Masanori Baba, "Inhibitory effect of cepharanthine on dendritic cell activation and function", *International Immunopharmacology*, 11, 1932-1938 (2011). (DOI: 10.1016/j.intimp.2011.08.003).
10. Donjian Shi, Michiya Matsusaki and Mitsuru Akashi, Photo-tunable Protein Release from Biodegradable nanoparticles Composed of Cinnamic Acid Derivatives, *J. Control. Release* 149, 182-189 (2011). (DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.08.009).

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 5 件)