

戦略的創造研究推進事業
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域「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」

研究課題「ナノ粒子を応用した抗レトロウイルス
ワクチンの開発」

研究終了報告書

研究期間 平成 14年 11月～平成 20年 3月

研究代表者: 明石 満
(大阪大学大学院工学研究科、教授)

1 研究実施の概要

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は RNA を鋳型に DNA を合成する逆転写酵素(RT)をもつウイルスで、RTをもつウイルスはレトロウイルスと総称されている。その他に、成人 T 細胞白血病(ATL)の原因であるヒト T リンパ球向性ウイルス - I 型(HTLV-I)もレトロウイルスに属し、鹿児島などの南九州を中心として、約 20 万人もの感染者が存在する。1983 年に HIV が後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因ウイルスであると解明されて以来、全世界での感染者数は増加の一途を示している。2006 年現在では、全世界で 4000 万人が HIV に感染しており、さらに毎年 450 万人の新たな感染が主に途上国で起きている。HIV-1 感染症に対するアプローチとしては、薬物治療、ワクチン、教育の 3 つが挙げられる。ウイルスに対する RT およびプロテアーゼ阻害剤を用いた多剤併用療法(HAART)の確立により、HIV-1 感染者の劇的な死亡率低下をもたらしたが、薬剤耐性・副作用・費用などの解決すべき問題が多数残されている。そのため、HIV-1 感染予防および根絶につながるワクチン開発には大きな期待が寄せられている。これまでに HIV-1 ワクチン開発では、弱毒生ワクチンの有効性が指摘されてきたが、その安全性に問題があり、現時点では臨床応用の可能性は考えられていない。また、HIV-1 の gp120 抗原とアルミニウムアジュバントを使用したワクチンの臨床試験(Phase III)が行われたが、有効な感染防御効果は認められなかった。現在の HIV-1 ワクチン開発では世界各国において、約 10 のプロジェクトが Phase II/III の臨床試験が行われおり、その他 30 種類以上のワクチンが Phase I に入っている。これら臨床試験のほとんどは、プラスミド DNA やウイルスベクターを用いた prime/boost ワクチンであるが、そのワクチン効果について全く目処がつかず、新規ワクチンの開発が期待されている。

我々はこれまでに、不活化した HIV-1 粒子を捕捉したコア - コロナ型ポリスチレンナノ粒子をマウスに粘膜免疫することで、効率的に免疫誘導できることを明らかにしてきた。さらに、これらの結果を基盤として平成 13 - 14 年度にかけて、サルを用いた免疫・感染防御実験を実施してきた(JST 独創的研究成果共同育成事業「高分子超微粒子を用いたエイズ感染予防ワクチンの開発」)。その結果、高分子ナノ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、HIV-1 に対するウイルス増殖抑制効果、感染防御効果が認められた。サルを用いた感染防御実験の結果より、高分子ナノ粒子を巧みに利用することで、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。しかしながらワクチンでは薬剤等と異なり、効果と共に高い安全性が求められている。そのため、これまでの使用してきた非分解性のポリスチレンナノ粒子のコンセプトを生かしつつ、生分解性ナノ粒子への応用展開が求められる。我々は、ポリスチレンナノ粒子の一連の研究をパイロット study と位置づけ、本研究では生分解性ナノ粒子を用いた抗レトロウイルスワクチン開発に着手し、ナノ粒子を用いた新しいシステムで普遍性のある革新的なワクチンを創製することを目的に研究を開始した。

近年のバイオテクノロジーの発展により、様々なペプチド、蛋白質、DNA が自在に設計できるようになり、従来の低分子薬物のみならず、生体高分子も薬物として応用できるようになってきた。これら物質が目的の生理活性を示すには、組織内の特定の細胞への導入に加え、細胞内の特定のオルガネラへの送達が必要とされる。しかしながら、薬物の体内動態はその化学構造や分子量によって大きく左右されるため、高い薬効と最適な動態を実現できる薬剤は限られており、この問題を解決するためにはドラッグデリバリーシステム(DDS)の応用が必要不可欠となってくる。この生体分子のデリバリーシステムの構築は、感染症などの予防と治療効果を目指したワクチン開発においても重要な課題となっている。ワクチン開発における DDS 技術は、組織および細胞内における抗原の空間的・時間的制御を目的としており、マイクロおよびナノ粒子を用いたアプローチが試みられている。なかでも、高分子ナノ粒子は、その調製方法や高分子鎖の分子設計により、粒子の物理化学構造を精密に制御できる利点を有しており、ワクチン担体として応用が期待されている。そこで本プロジェクトでは、両親媒性高分子からなる生分解性ナノ粒子とワクチン抗原をコンジュゲートした免疫原を作成し、未然にウイルス感染を防ぐ中和抗体(液性免疫)とウイルスが感染した細胞を殺傷する細胞傷害性 T 細胞(CTL)(細胞性免疫)の両方を誘導できるナノ粒子ワクチンの開発を行い、抗レトロウイルスワクチンとしての有用性の評価を行った。HIV-1 感染では、ウイルスに暴露されながらも感染しない感染抵抗者や感染後も長期間発症しない症例が報告されており、その

感染抵抗性獲得者においては、粘膜面に存在する HIV-1 特異的分泌型 IgA の重要性が指摘されている。また、双方に共通して認められた抑制因子が、HIV-1 特異的 CTL の誘導であることが明らかとなっている。そのため、ウイルスの感染ルートである粘膜面への IgA 抗体および CTL の誘導ができれば、HIV-1 感染予防および治療ワクチンとしての有用性が期待される。

本プロジェクトの達成のためには、工学的観点からのナノ粒子の設計、薬学的観点からの DDS 研究、医学的観点からの有効性評価が必要であり、工、医、薬学連携のもと研究の推進を図った。

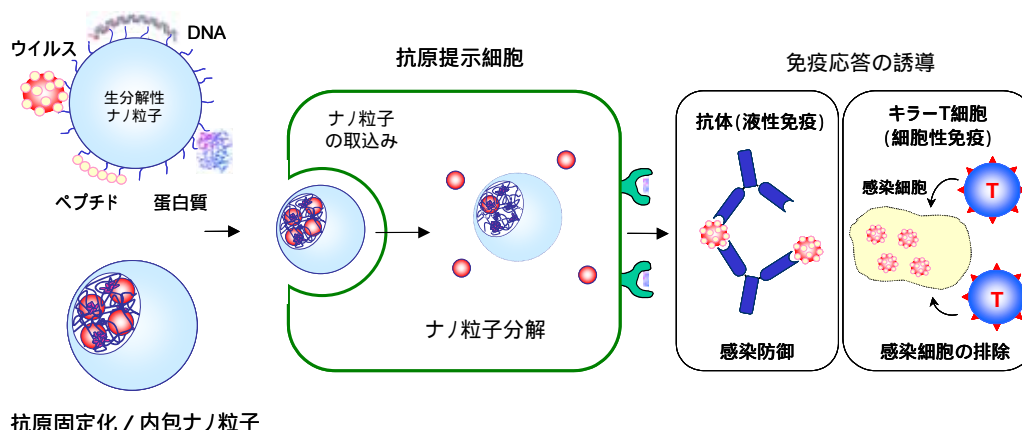


図 抗原固定化ナノ粒子を用いたワクチン開発

1) 抗原固定化生分解性ナノ粒子の調製と機能評価(大阪大学大学院工学研究科・明石グループ)

感染症に対する予防と治療には、免疫系の人為的な制御に基づくワクチン療法が有用である。効果的なワクチンを開発するためには、抗原物質を免疫担当細胞に効率よく送達し、抗原の体内動態を制御する必要がある。そのため、DDS の応用が不可欠であり、サイエンスとテクノロジーの融合による新たな治療戦略が求められている。高分子の自己組織化によるボトムアップ型ナノテクノロジーを基盤としたナノ粒子は、精密な分子設計による多機能性高分子材料の構築が可能であり、ワクチン担体として応用が期待される。そのため、本研究では既存の水溶性生分解性高分子を部分的に疎水修飾することで、ワクチン担体として機能するナノ粒子の創製を試みた。生分解性高分子としては、機能性および安全性を考慮し、ポリアミノ酸および天然多糖を用いた。両親媒性高分子を用いたナノ粒子の調製では、納豆菌由来のポリアミノ酸であるポリ(γ -グルタミン酸) (γ -PGA)、天然多糖であるペクチンにフェニルアラニン(Phe)を任意の割合で導入することで、水分散性に優れたナノ粒子の合成に成功した。またポリ(ϵ -リジン)にコレステロール基を導入することで、同様にナノ粒子の調製が可能であり、本合成方法を応用することで、種々の物性を有する生分解性ナノ粒子を調製することができた。

平成 15 年度までにワクチン担体として応用可能な疎水化 γ -PGA ナノ粒子が調製できたことで、次に、これらナノ粒子への抗原固定化方法について検討した。研究当初の予定では、ナノ粒子表面への抗原蛋白、ペプチドの固定化を考慮していたが、両親媒性高分子から調製されるナノ粒子では、粒子内部への抗原の担持が可能であり、ワクチン担体の応用性が格段に飛躍した。実際に HIV-1 関連抗原や分子量・等電点の異なるモデル蛋白質を高効率かつ安定にナノ粒子に担持(内包および表面固定)させることが可能であった。調製した粒子の中では、疎水化 γ -PGA ナノ粒子が抗原とのコンジュゲーションが最も容易であり、ナノ粒子の合成に関しても再現よく調製することができた。そのため各グループでのマウス免疫実験等には主に疎水化 γ -PGA ナノ粒子を用い、その免疫誘導効果を評価した。

疎水化 γ -PGA ナノ粒子の機能評価としては、蛋白質・ペプチドのナノ粒子への担持方法、蛋白質担持ナノ粒子の安定性、*in vitro* での加水分解・酵素分解性等を評価した。疎水化 γ -PGA ナノ粒子は蛋白質やペプチドを内部および表面に安定に担持させることが可能であり、また凍結乾燥

による保存が可能であることを明らかにした。ナノ粒子の分解性評価では、ナノ粒子分解挙動、分解部位、分解に伴う形状・粒径変化を観察し、ナノ粒子の生体内でも分解挙動を予測できるデータを蓄積した。

2) ナノ粒子と樹状細胞との相互作用の解析およびマウスを用いた免疫実験(鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科・馬場グループ)

近年、樹状細胞が自然免疫や獲得免疫などの免疫応答の始動および増幅を含め、免疫監視機構を多方面から制御する抗原提示細胞であることが明らかとなり、感染症やがんを対象とした免疫療法開発における標的細胞として注目を集めている。未熟な樹状細胞は貪食能が高く、細菌・ウイルス等を取込み、抗原ペプチドを主要組織適合複合体(MHC)クラス I および II 分子の両方に提示し、抗原特異的な T 細胞を活性化する。そのため、ナノ粒子ワクチンにおいては、この樹状細胞への抗原デリバリーと活性化が重要となってくる。そのため馬場グループにおいては、ナノ粒子とマウス樹状細胞との相互作用とレトロウイルスワクチンのうち、抗エイズワクチンの開発に焦点を絞り、HIV-1 抗原固定化ナノ粒子を用いた免疫誘導能の評価を行った。研究当初はポリスチレンナノ粒子を用いた実験が主であったが、明石グループにより、疎水化 γ -PGA ナノ粒子の合成法が確立されるに伴い、平成 16 年度から実験を全てこの生分解性ナノ粒子を用いたものへと転換した。

疎水化 γ -PGA ナノ粒子と樹状細胞との相互作用解析においては、ナノ粒子が *in vitro* および *in vivo* で樹状細胞に効率よく取込まれることを明らかにした。また、興味深いことに樹状細胞にナノ粒子を作用させることで、未熟な樹状細胞を成熟化させる働きがあることを見出した。これは当初の計画では予想されなかった結果であり、この結果は本研究課題を進める上で大きなブレイクスルーとなった。また、ナノ粒子が樹状細胞に与える影響について、蛋白質および遺伝子レベルでの解析を行い、その活性化メカニズムの一端を明らかにした。

HIV-1 抗原(gp120, p24)内包および固定化ナノ粒子を用いた HIV-1 ワクチン開発においては、HIV-1 抗原内包ナノ粒子をマウスに経鼻投与することで強力な細胞性免疫が誘導可能であることを明らかにした。さらに誘導された細胞性免疫について詳しく解析した結果、8 ヶ月以上にわたり、抗原特異的 CD8⁺ memory T 細胞が存在し続けることを明らかにし、抗原刺激に対する炎症性サイトカインの産生も検出することが出来た。これらの結果から、HIV-1 関連抗原を疎水化 γ -PGA ナノ粒子とコンジュゲーションすることで、抗原特異的な免疫誘導が可能であり、HIV-1 ワクチンとしての有用性が示唆された。

3) 「膜融合リポソームによる CTL 誘導能評価とその最適化」と「生分解性ナノ粒子を用いた免疫誘導とがんワクチン効果の検討」(大阪大学大学院薬学研究科・中川グループ)

生体内に広く分布する抗原提示細胞(APC)は、末梢組織で抗原を捕捉すると所属リンパ節へと移行し、抗原特異的な T 細胞依存性の免疫応答を強力に活性化する。また、腫瘍免疫応答の中心的なエフェクター細胞である CTL を効率よく増幅・活性化するためには、APC による MHC クラス I 分子を介した抗原ペプチドの提示が不可欠である。そこで中川グループでは、DDS の観点から抗原の細胞内動態および体内動態を制御・解析するための技術を構築し、抗原固定化ナノ粒子を用いた高機能化ワクチン担体による、がんワクチンの開発・研究を行った。

膜融合リポソーム(FL)は、細胞膜との膜融合活性を有しており、優れた細胞質内物質導入キャリアである。中川グループでは、この FL とナノ粒子の特性を活かしたナノ粒子内封膜融合リポソームの調製方法の確立と、レトロウイルスワクチンの中でも、特に鹿児島を代表とする九州地方に感染者の多い HTLV-I に対するワクチン開発に焦点をしばり研究をスタートさせた。これらに関しては、膜融合リポソーム内へのポリスチレンナノ粒子の封入方法を構築と、その細胞質内へのナノ粒子導入特性と細胞内動態を明らかにし、新規免疫方法の開発に成功した。また、FL を用いたペプチド、蛋白質、DNA ワクチンとしての効果を証明し、Tax ペプチドを用いた抗 HTLV-I ワクチンとしての有用性も明らかにした。一方、平成 16 年度に入り、明石グループによって疎水化 γ -PGA ナノ粒子の合成法が確立され、全グループ挙げて生分解性ナノ粒子を用いた研究へと移行した。そのような中、疎水化 γ -PGA ナノ粒子を単独で皮下投与する事で、現存する世界最強のワクチンアジュバントであるフロイント完全アジュバント(CFA)よりも数倍優れた CTL 誘導能を発揮する事をいち早く

見出した。臨床応用を鑑みると、免疫原として投与するワクチン担体はよりシンプルである方が適しているため、当初予定していた、FLの併用については一次保留にし、ナノ粒子単独での免疫誘導能を突き詰める事に全精力を注いだ。

そこで、平成17年度からは、疎水化 γ -PGAナノ粒子の優れたCTL誘導能を利用したがんワクチンの開発とそのメカニズム解明を目的に研究を推進した。抗腫瘍ワクチンとしては、抗原内包ナノ粒子をマウスに免疫することで、腫瘍に対する予防および治療効果が確認され、その効果が、抗原のAPCによる効率的な捕捉、APC内でのナノ粒子からの抗原徐放、APC内におけるMHCクラスI提示経路への効率的な抗原送達、抗原を貪食したAPCの所属リンパ節への効率的な移行、強力な抗原特異的なCTL誘導に起因することを明らかにした。また、ナノ粒子ワクチンの効果のみならず、その安全性に関する基礎的知見を得た。

4) HIV-1 抗原含有生分解性ナノ粒子のアカゲザルにおける免疫誘導能および攻撃接種に対する感染防御能の評価(京都大学ウイルス研究所・三浦グループ)

HIV-1ワクチン開発においては、ワクチンによる免疫応答の解析に加え、実際に誘導された免疫応答が感染防御に効果的に働くかを検討する必要がある。しかしながら、理想的なHIV-1感染エイズ発症動物モデルは存在せず、近縁のサル免疫不全ウイルス(SIV)もしくはSIVとHIVのキメラウイルスであるSHIVを用いたサルモデルが最適な動物エイズモデルと考えられている。そこで三浦グループではSHIV-KU2のサル感染モデルを用いた、HIV-1抗原含有した疎水化 γ -PGAナノ粒子の免疫誘導効果および感染防御効果について検討した。

平成17年度までに、マウス免疫実験により、HIV-1 gp120内包した疎水化 γ -PGAナノ粒子(gp120-NP)が優れた免疫誘導効果を示すことが明らかとなった。そこで平成18年度より、よりヒトに近い実験動物であるアカゲザルにおいて、マウスと同様にgp120-NPによって免疫誘導されるかどうかをサル免疫実験により証明し、その感染防御効果の評価を最終目的に研究を開始した。群構成として未処置群、gp120単独投与群、gp120-NP投与群で免疫実験を行った。免疫誘導能を解析した結果、gp120-NP投与群ではgp120単独投与群と比較して、高い抗原特異的な液性および細胞性免疫の誘導効果が確認された。引き続き、免疫したサルに感染性を有するSHIV-KU2を経静脈より攻撃することで、その感染防御効果を比較した。その結果、予想に反し、gp120-NPを免疫した群で高い血中ウイルス量が検出され、ナノ粒子ワクチンが逆にウイルス増殖を増強する結果が得られた。本実験の結果から、サルにおいてもマウス免疫実験と同様にgp120-NPは優れた免疫誘導効果を示すことが明らかとなったが、内包したgp120抗原に対する免疫は感染防御には有効でないことが示唆された。

gp120-NPによる感染防御効果が認められなかったため、平成19年度では抗原をSIV gag-p27に変更し、SHIV-KU2に感染したサルへのgag-NP投与による治療ワクチンの可能性を検討した。gag-NP投与による血中ウイルス量の減少、CD4⁺T細胞数の増加を指標に治療ワクチンの効果を評価したが、gag-NP投与によって、若干の治療効果が認められたものの、統計学的な有意差は検出されなかった。今回の結果では、免疫誘導能と感染防御能は必ずしも一致しないという、HIV-1ワクチン開発における厳しい現実を実証することとなった。HIV-1ワクチン開発を困難にしているものとしては、HIV-1の宿主免疫系からの逃避機序が明らかになっていないことや、絶対的なHIV-1感染動物モデルが存在しないことが原因として挙げられる。また、現在のワクチン開発においては、HIV-1の複製制御、エイズの発症阻止が目的となっており、ワクチンの最終目的である感染防御を達成し得るワクチン開発には大きなグレイクスルーが必要であると考えられる。今後、HIV-1の病態・防御免疫機構の解明が進み、新たなワクチン戦略が打ち立てられるなかで、ナノ粒子の果たす役割はさらに高まるものと確信している。

本研究では生分解性ナノ粒子を用いた抗レトロウイルスワクチンの開発を軸に、様々な免疫疾患へのナノ粒子ワクチンの応用を試みた。HIV-1ワクチン開発には標的抗原の選定等、更なる研究が必要であるが、本研究より派生したがんワクチンやインフルエンザワクチンはナノ粒子の製造や安全性の問題をクリアすることで、実用化に向けての展開ができると確信している。ナノ粒子ワクチンの基礎から応用展開までを体系的に研究できたことで、これからの臨床応用を含めた研究展開が期待される。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本研究ではナノ粒子と HIV-1 および HTLV-1 のウイルス抗原をコンジュゲーションさせた新しいナノバイオマテリアルを創製することで、ウイルス特異的免疫を誘導し、有効性の高い抗レトロウイルスワクチンの開発を目的に研究を開始した。HIV-1 はその遺伝子が非常に変異し易いため、すぐに抗体をすり抜けるウイルスが出現する。従って、中和抗体のみならず細胞性免疫の誘導も必要である。しかしながら、不活化したウイルスや蛋白質のみを抗原として用いた一般的なワクチンの方法では、CTL を中心とした細胞性免疫が誘導できず、治療につながる感染細胞の排除はできない。一方、HIV-1 の生ワクチンはあまりにも危険性が高く、その臨床応用は不可能に近い。HTLV-1 の場合には、感染から ATL 発症までの期間が非常に長く、また発症は細胞の癌化と増殖というプロセスが関連するため、抗 HTLV-1 ワクチンに関しても持続的に細胞性免疫を誘導し、癌化した細胞を破壊する機能が要求される。本研究では、抗レトロウイルス抗体と細胞性免疫の誘導を行うために、ナノ粒子に着目した。ナノ粒子は 1) 表面にあらゆる分子を固定できる、2) 粒径制御が可能 (100 nm ~ 数 μ m)、3) 生体界面に集積が可能、4) ハンドリングが容易などの特徴を持ち、免疫誘導のための担体として最適である。そこで、抗原となる蛋白質あるいはペプチドを固定化したナノ粒子を用いて、これまで非常に困難とされたレトロウイルスに対する細胞性免疫を誘導するワクチン開発を目指した。以下に各グループの研究開始時の計画目標を記す。

1) 明石グループ: 「体内分解性ナノ粒子の作成と抗原の固定化および研究総括」

ワクチンに応用すべきナノ粒子は、抗原提示後は体内で速やかに分解され無害な物質となり代謝されることが必須である。そこで、体内分解性の高分子として知られている γ -PGA、ポリ(ϵ -リジン)(ϵ -PL)を疎水性アミノ酸など無毒な疎水基で修飾し、生分解性のナノ粒子を作成する。通常、生分解性高分子を体内で用いる場合にはその高分子自身の安全性とともに分解生成物にも安全性が要求されるが、これらは分解生成物であるアミノ酸には安全性に関して何の問題も無い。タンパク質の表面には通常、カルボン酸かアミノ基の 2 種類の官能基が多数存在するので、上記の 2 種類の生分解性ナノ粒子を作成すれば、あらゆる抗原に対応できる。続いて、作成したナノ粒子の表面のカルボン酸またはアミノ基に免疫誘導に有効な抗原のアミノ基またはカルボン酸と反応させ、その時の縮合剤の種類などの反応条件を検討し、固定化法を構築する。ここで作成した抗原固定化ナノ粒子は馬場らや中川らの担当する免疫誘導の研究に必要となる。以後は、これらナノ粒子の免疫誘導能の解析結果をフィードバックし、どのようなサイズ・形状・分子構造のナノ粒子が有効であるかを検討し、免疫誘導に最適なナノ粒子を作成する。その他に調製したナノ粒子のアルカリや酵素(ペプシンやリパーゼなど)存在下における加水分解性を調べる。続いて、実際に粘膜表面および消化管内や血管内での分解性も評価する。

2) 馬場グループ: 「免疫抗原の決定および作成、マウスを用いた免疫実験、ナノ粒子の免疫系に対する作用機序の解明」

HIV-1 に対する有効な液性免疫および細胞性免疫、HTLV-1 に対する有効な細胞性免疫を誘導できるような、抗原エпитープを決定し作成する。これにはナノ粒子の性状を考慮し、表面に固定化しやすく、かつ安定な蛋白を選択する。また、抗 ATL ワクチンに関しては、特に細胞性免疫誘導が要求されることから、蛋白抗原の代わりに HTLV-1 の抗原遺伝子をコードした DNA を固定化する方法も検討する。次に、決定された抗原を固定化されたナノ粒子を、マウスを用いて経粘膜的に投与し、それぞれの抗原に対する免疫応答(抗体の産生と細胞性免疫の誘導)が得られるかどうかを検証する。さらに、免疫実験と並行して、ナノ粒子が用いた抗原に対する免疫誘導に関して、どのような働きをしているか(作用機序)について、特に抗原提示細胞である樹状細胞を用いて詳細に検討する。

3) 中川グループ:「抗原ナノ粒子封入膜融合リポソームのレトロウイルスワクチンキャリアとしての有用性評価とその最適化」

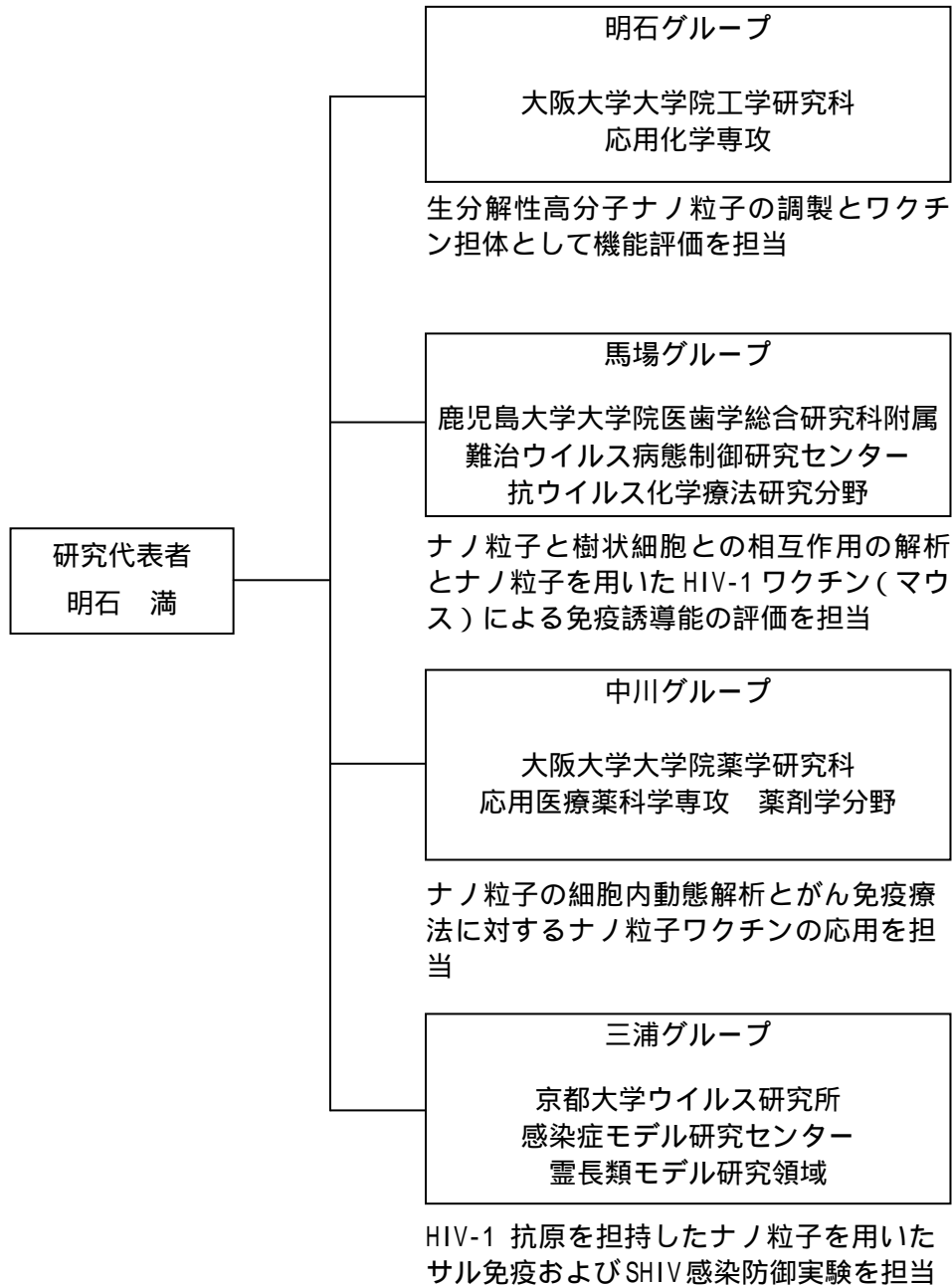
粘膜面の細胞内への抗原送達法を開発し、さらには細胞内での抗原の動態制御法の確立を行い、抗レトロウイルスワクチン療法の最適化に関する基盤研究を行うことを目的とする。本研究計画においては、明石グループと馬場グループが作製した抗原ナノ粒子を用い、1)抗原提示細胞の細胞質内へ抗原分子や抗原ナノ粒子を直接導入するための技術開発、2)細胞内に導入された抗原分子の細胞内動態制御評価系の確立ならびに細胞内動態制御技術の開発、3)膜融合リポソームの免疫賦活化能の評価、さらに 4)これらを統合し、安全性・有効性(液性免疫誘導能や細胞性免疫誘導能等)を評価し、感染防御と治療の両面を満足させる抗レトロウイルスワクチン療法の確立に向けての技術開発を目指す。

4) 三浦グループ:「抗原固定化生分解性ナノ粒子を用いたサル免疫実験およびSHIV 攻撃接種による感染防御能の評価」

HIV-1 ワクチン開発においては、ワクチンによる免疫誘導効果に加え、実際の感染防御効果が重要となってくる。しかしながら、マウスでは HIV-1 感染モデルがないために、サルを使った免疫・感染防御効果の評価が必要である。HIV-1 関連抗原を固定化した生分解性ナノ粒子を用いて、サル免疫実験を行い、液性および細胞性免疫応答を解析する。さらに、免疫誘導が確認されたサルに感染性を有する SHIV を攻撃接種し、感染防御能、ウイルス増殖抑制能等を評価し、ナノ粒子の HIV-1 ワクチンとしての効果を検討する。また、ナノ粒子の安全性についても解析を行う。三浦グループは当初の計画通り、サルを用いた HIV-1 ワクチン評価が可能となった平成 18 年度から本プロジェクトに参画した。

中川グループでは、抗原ナノ粒子封入膜融合リポソームを用いて細胞内に導入された抗原ナノ粒子の細胞内動態解析および、これらの研究を通じて、抗原ナノ粒子封入膜融合リポソームの有用性(液性免疫及び細胞性免疫の誘導)と安全性評価を行い、抗レトロウイルスワクチンキャリアとしての最適化を図ることを目標に設定していた。しかしながら、抗原内包疎水化 γ -PGA ナノ粒子を皮下免疫することで、強力な CTL 誘導能が可能であることが見出されたことから、平成 16 年度後半からは、膜融合リポソームの研究に加え、疎水化 γ -PGA ナノ粒子単独での皮下免疫によるワクチン開発も開始した。この時点で膜融合リポソームを用いた成人 T 細胞白血病(ATL)ワクチンの有用性が示されていたため、ATL という癌の原因ウイルスである HTLV-I 感染症を、癌という病態として大きく捉え、標的を癌ワクチンの開発へと拡大するに至った。悪性度の高い皮膚がんの一種で、臨床的需要が極めて高いメラノーマを始め、さまざまな癌を標的としたワクチン開発を目標に設定した。また、研究当初は全グループで抗レトロウイルスワクチン開発を中心に研究を推進していたが、がんワクチンの有効性が示され、さらにインフルエンザワクチンや自己免疫疾患に対する免疫療法剤としてもナノ粒子ワクチンが機能することが明らかになってきたことより、レトロウイルスワクチンのみならず普遍性の高いナノ粒子ワクチンの創製を目的に研究を遂行した。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 生分解性ナノ粒子の調製と機能評価(大阪大学大学院工学研究科 明石グループ)

(1)研究実施内容及び成果

我々はこれまでに、不活化した HIV-1 を捕捉したコア - コロナ型ポリスチレンナノ粒子が、HIV-1 ワクチンとして機能し、ナノ粒子ワクチンの有用性を明らかにしてきた。しかしながら、これら非分解性の高分子ナノ粒子では、実際の医療に向けた応用が困難であるため、生分解性ナノ粒子への応用展開が必要不可欠である。そこで、明石グループでは、生分解性高分子の両親媒性構造を制御することにより、ワクチン担体として機能するナノ粒子の開発とその特性評価を行った。親水性セグメントと疎水性セグメントからなる両親媒性高分子は、水溶液中で自己集合し多様なナノ構造体を形成することが報告されている。我々は、水溶性の生分解性高分子鎖としてポリアミノ酸および天然多糖に着目し、これら高分子鎖に疎水性アミノ酸を任意の割合で導入することで、ナノ粒子の調製を行った。また、得られたナノ粒子はワクチン担体の機能評価として、蛋白質・ペプチドの固定化、分解性等について詳細に検討した。

1) 生分解性ナノ粒子の調製

ナノ粒子の原料には、納豆菌(*Bacillus subtilis*)から産生させるポリ(γ -グルタミン酸) (γ -PGA)を用いた。 γ -PGA は納豆に含まれる粘質物に多く含まれており、食用されていることから高い安全性が示されている。明石グループでは、これまでに γ -PGAを機能修飾することで、DDS担体、刺激応答性材料、再生医療用材料としての応用展開を行っている。その他、生分解性高分子として、柑橘系の果物に多く含まれている天然多糖のペクチンを用いた。ペクチンは、植物の細胞壁構成成分として含まれており、食品のゲル化剤に利用され、安全性がすでに確認されている。 γ -PGAはグルタミン酸の α -アミノ基と γ -カルボキシル基がアミド結合をしており、ペクチンはD-ガラクトuron酸とそのメチルエステル体が α -1, 4結合した多糖であり、どちらも容易に化学修飾可能なカルボキシル基を持つ。このカルボキシル基を利用した疎水修飾により、ナノ粒子の調製を行った。

1-1) 疎水化 γ -PGA ナノ粒子の調製

γ -PGA(分子量 38, 200, 500 万のものを使用)に疎水性アミノ酸(HAA)である L-phenylalanine ethylester (Phe)、L-tryptophan methylester (Trp)、L-tyrosine ethylester (Tyr)をカルボジイミド(WSC)存在下で反応させ、疎水化 γ -PGA誘導体を合成した(図1)。 γ -PGAに対するHAAの導入率は、 $^1\text{H-NMR}$ から算出した。また、疎水化 γ -PGA誘導体をDMSOに溶解させ、この溶液を等量の水に添加することでナノ粒子の調製を行った。

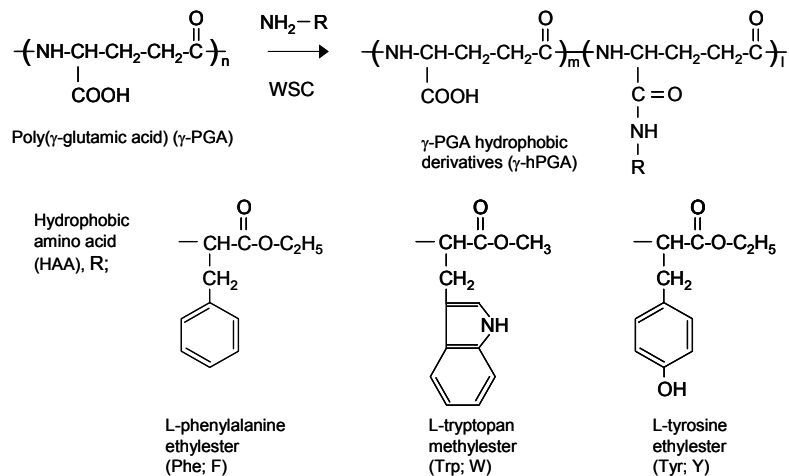


図1 疎水化 γ -PGA誘導体の合成

γ -PGA は側鎖に化学修飾可能なカルボキシル基を有しており、その官能基に HAA をアミド結合にて導入することで、容易に疎水化 γ -PGA 誘導体を合成することができた。HAA の導入率は、縮合剤 (WSC) の量により制御可能であった。ナノ粒子調製後の粒径測定の結果、Phe の導入率が 40 - 60% および Trp の導入率が 50 - 60% の共重合体において、単分散なナノ粒子の形成が認められ、HAA の導入率により粒径が制御可能であった (図 2a, b)。Phe の導入率が 50% 前後で粒径 200 nm 程度のナノ粒子が調製できた (図 2c)。Tyr 導入 γ -PGA ではナノ粒子の形成は確認されなかった。各 pH における疎水化 γ -PGA ナノ粒子 (Phe 導入率 53% のものを使用、 γ -PGA-Phe53) のゼータ電位を測定した結果、中性付近では負電荷を示し、pH の低下に伴い、ゼータ電位が 0 の値に近づく傾向が認められた (図 3a)。また、非極性環境下で最大吸収波長がシフトすることが知られている、Coomassie Brilliant Blue (CBB) を用いてナノ粒子の疎水性ドメイン検出を行った結果、粒子濃度依存的な CBB のピークシフトが認められた (図 3b)。これらの結果より、 γ -PGA-Phe53 ナノ粒子は、Phe の疎水性相互作用により粒子内部にコアを形成し、表面には γ -PGA 由来の COOH 基が存在していることが示唆された。また、粒子表面の COOH 基に起因する負電荷が、粒子の分散安定性に寄与していると考えられる。

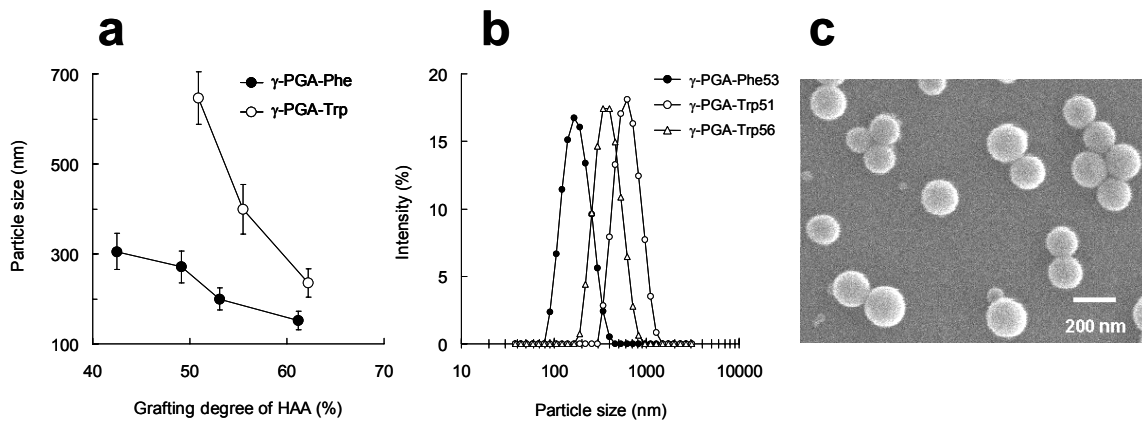


図 2 疎水化 γ -PGA ナノ粒子の調製. (a) 疎水性アミノ酸の導入率の違いによる粒径変化. (b) DLS 測定結果. (c) γ -PGA-Phe53 ナノ粒子の SEM 像.

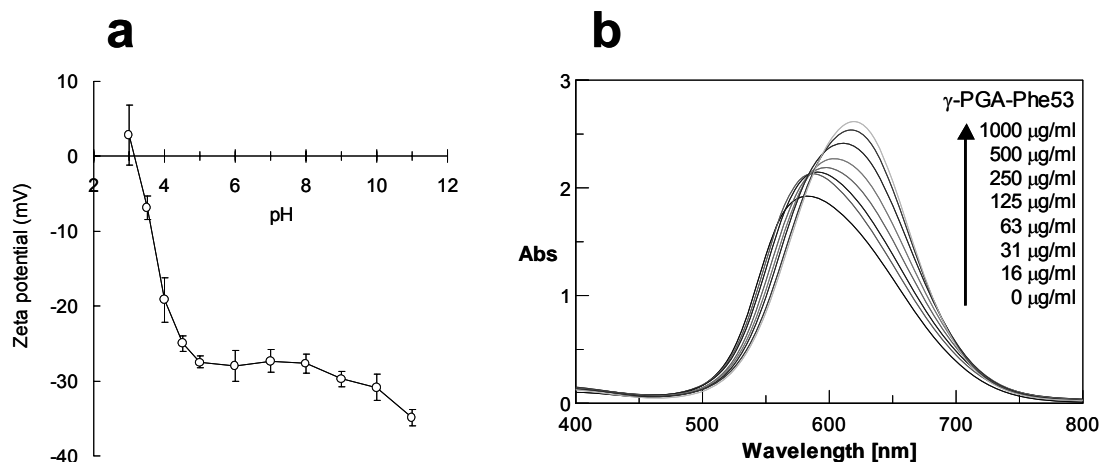


図 3 (a) 疎水化 γ -PGA ナノ粒子 (γ -PGA-Phe53) の各 pH でのゼータ電位の変化. (b) ナノ粒子存在下での CBB の吸収スペクトル.

1-2) 疎水化ペクチンナノ粒子の調製

天然多糖としてメチルエステル化度 25%(P-25)、65%(P-65)、94%(P-94)の3種のペクチンを用いた(分子量はそれぞれ、8, 18, 9万のものを使用)。 γ -PGA 同様にペクチンのカルボキシル基に Phe を導入することで、ナノ粒子の形成が確認できた(図4)。動的光散乱(DLS)による粒径測定では、P-25 = 250 nm、P-65 = 400 nm、P-94 = 230 nm を示した。ペクチンの場合は、Phe の導入率によって粒径を制御することは困難であったが、カルボキシル基のメチルエステル化度を変えることによって、粒径を制御することができた。同じ手法で、主鎖にカルボキシル基を有する天然多糖であるアルギン酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸を用いたが、ナノ粒子の形成は認められなかった。これら天然多糖では、主鎖の親水性が高く、Phe による疎水修飾によっても、ナノ粒子形成に十分な両親媒構造を付与することができなかつたと考えられる。そのため、ペクチンではメチルエステル化度により、ある程度、主鎖に新 - 疎水バランスを持たせることが可能であり、疎水性相互作用を粒子形成の駆動力とする生分解性高分子として適した材料だと言える。

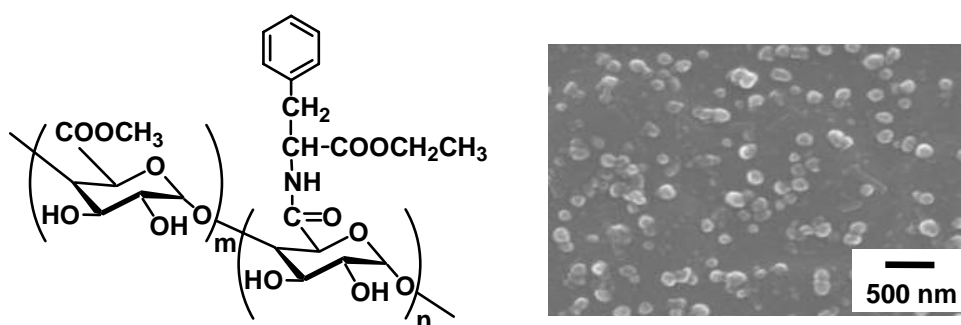


図4 疎水化ペクチンの構造とナノ粒子(P-94)のSEM像.

2) 疎水化 γ -PGA ナノ粒子の生分解性評価

両親媒構造を制御した疎水化 γ -PGA 誘導体により、粒径約 200 nm のナノ粒子が調製できた。ナノ粒子をワクチン担体として生体内に投与するにあたり、粒子の分解性が安全性および効果に大きな影響を与えらる。また、両親媒性の生分解性高分子から調製されたナノ粒子の分解性に関する研究例は少なく、この分解挙動を明らかにすることは、DDS 研究においても重要な知見となる。そこで、疎水化 γ -PGA ナノ粒子の分解挙動を加水分解、酵素分解の両面より検討した。

2-1) 加水分解性試験

サンプルとして γ -PGA、Phe 導入率 10%の疎水化 γ -PGA (γ -PGA-Phe10)、Phe 導入率 53%のナノ粒子 (γ -hPGA-NP-53)を用い、各サンプルの緩衝液中(pH7.4 or pH12)での加水分解率をGPCにより算出した。その結果、未修飾の γ -PGA および疎水化 γ -PGA 誘導体において、加水分解による分子量の低下が認められ、分解はアルカリ条件下(pH12)で促進された(図5)。また、ナノ粒子では γ -PGA と比較して分解性が低下していた。これは疎水修飾によって、高分子鎖および粒子内部への水分子の浸透および拡散が抑制されたことに起因していると考えられる。

2-2) 酵素分解性試験

γ -PGA、 γ -hPGA-NP-53、 γ -hPGA-NP-74、poly-L-glutamic acid(α -PGA)を各酵素(10 unit/ml)存在下、37°C でインキュベートした。酵素は γ -glutamyl transpeptidase(γ -GTP)、pronase E (PE)、protease、cathepsin B (CB)、lipaseを用いた。PEは細菌由来のプロテアーゼ混合物で、基質特異性の低い強力な蛋白質分解酵素である。CBは細胞内のリソソームに存在しており、細胞内の蛋白質分解に関与している。所定時間後、サンプリングを行いGPCにより分子量測定を行った。また酵素分解に伴う形状・粒径変化、分解部位の確認をSEM、DLS、¹H-NMRにより確認した。

γ -GTP は生体内に多く存在する酵素で、グルタチオン等の γ -グルタミル化合物の加水分解反応と、その γ -グルタミル基をアミノ酸やペプチドに転移する反応を触媒する酵素である。また、 γ -PGA が γ -GTP に分解されることも報告されている。そこで、 γ -GTP によるナノ粒子の分解性について評価を行った。その結果、 γ -PGA と疎水化 γ -PGA ナノ粒子は γ -GTP により分子量の低下が認められ、Phe を導入した γ -PGA からなるナノ粒子においても、 γ -GTP により分解されることが明らかとなった (図 6)。SEM 観察により、分解に伴うナノ粒子の形状変化を観察した結果、分解時間の増加に伴い粒子の形状が不規則になり、6 時間後には粒子の崩壊が確認された (図 7)。

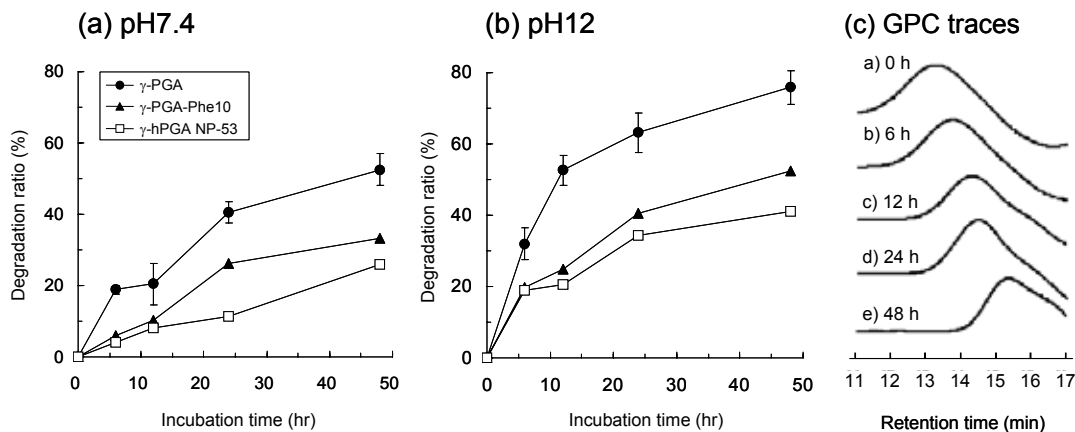


図 5 疎水化 γ -PGA ナノ粒子の加水分解試験. (a)pH7.4, (b)pH12、80 で処理し、GPC により分解率を算出. (c)pH7.4 での GPC チャート.

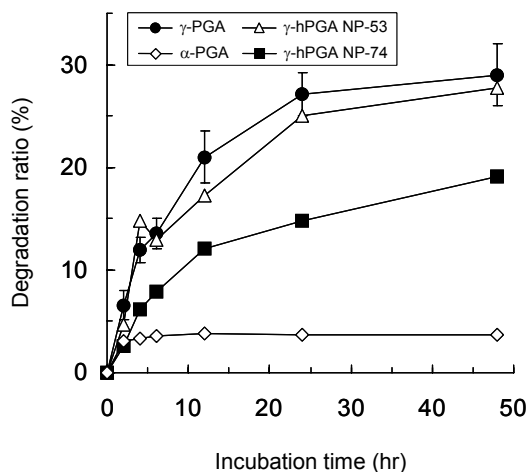


図 6 γ -GTP を用いた疎水化 γ -PGA ナノ粒子の酵素分解.

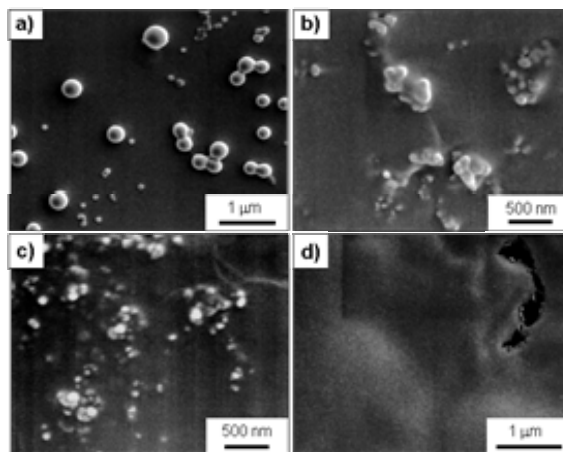


図 7 γ -GTP によるナノ粒子の分解に伴う形状変化 (SEM 像). γ -GTP 添加後、(a) 0 h, (b) 2 h, (c) 4 h, (d) 6 h.

次に各種プロテアーゼによる分解性について検討を行った。 γ -hPGA-NP-53、 α -PGA は用いたすべての酵素で、分解に伴う分子量の低下が確認されたが、未修飾の γ -PGA はナノ粒子および α -PGA と比べて低い分解性を示した。 γ -PGA は一般的なプロテアーゼ (パパイン、ペプシン、プロメルン) では分解されないことが報告されており、PE, protease, CB でも同様に、 γ -PGA の γ 結合部位を認識できなかったと考えられる。ナノ粒子の酵素分解サンプルを $^1\text{H-NMR}$ により解析した結果、分解後は Phe 導入の減少が認められた。PE 分解後では導入された Phe の約半分が分解されてい

た。この結果より、ナノ粒子の各酵素による分子量の低下は、 γ -PGA と Phe 間のアミド結合が切断されていることが明らかとなった (図 8a)。また、DLS により、PE 分解に伴うナノ粒子の粒径を測定した結果、PE 分解初期には粒径が増加し、その後時間の経過と共に、粒径が減少する傾向を示した (図 8b)。これは、PE により Phe 側鎖が分解され、分解初期は Phe によって形成されているコアが膨潤することで、粒径が増加したと考えられる。その後、分解の進行に伴い、疎水性相互作用が低下した γ -PGA-Phe の粒子からの解離および溶解により、粒径の減少および崩壊が起きたと考えられる。この結果より、疎水化 γ -PGA ナノ粒子は主鎖の γ -PGA および側鎖の Phe の切断により、粒子が分解・崩壊することが明らかとなった。

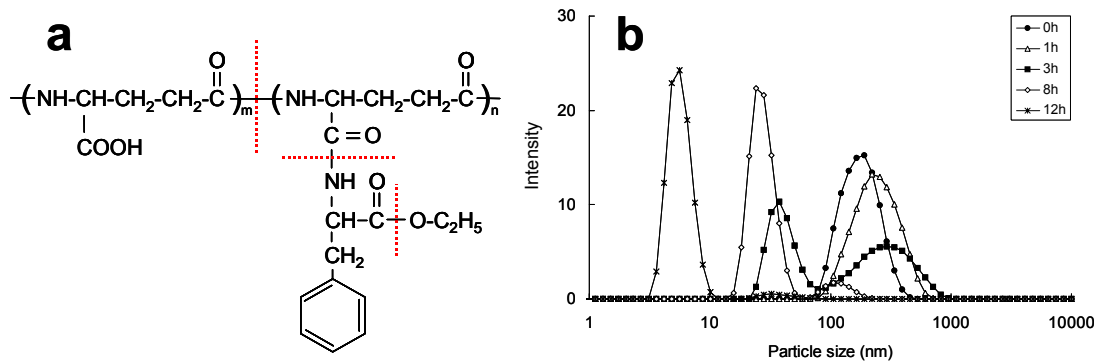


図 8 (a)疎水化 γ -PGA の酵素分解部位. (b)ナノ粒子の Pronase E 分解に伴う粒径変化.

3) 疎水化 γ -PGA ナノ粒子の抗原キャリアとしての機能評価

生分解性高分子であるポリ乳酸やポリ乳酸 - グリコール酸共重合体は、エマルション法により水溶性物質を内包させた微粒子が調製可能である。しかしながら、oil - water 界面での蛋白質変性や内包効率の低さなどが問題視されている。そのため、生分解性を有する疎水化 γ -PGA ナノ粒子 (γ -PGA-Phe53) のワクチン担体の機能評価として、分子量・等電点の異なる蛋白質やペプチドの内包効率、表面固定化効率、ナノ粒子に内包された蛋白質の酵素活性および蛋白内包ナノ粒子の安定性等について評価した (図 9)。

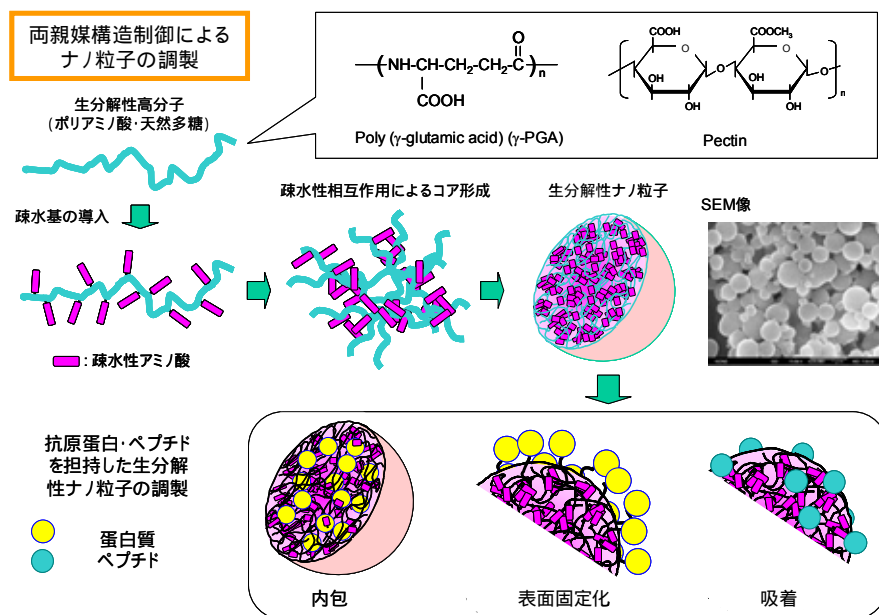


図 9 抗原固定化ナノ粒子の調製

3-1) 蛋白質内包ナノ粒子の調製

疎水化 γ -PGA 誘導体 (γ -PGA-Phe53) を DMSO に溶解させ、等量の蛋白質水溶液 (in 生理食塩水) に添加し、蛋白質を内包した疎水化 γ -PGA ナノ粒子を作製した。ナノ粒子の蛋白質担持量は Lowry 法により求め、粒子 1 mg あたりの内包量および内包効率を算出した。様々な分子量および等電点を有する蛋白質を用いて、疎水化 γ -PGA ナノ粒子の蛋白質内包効率を調べた結果、分子量・等電点に関係なく、仕込みの蛋白質濃度依存的に内包量の増加が認められ、すべての蛋白質がナノ粒子に内包可能であった (図 10a)。内包効率は 30 ~ 50 %程度で、蛋白質内包後には粒経の増加が確認された。ナノ粒子内への蛋白質内包は、蛋白質の疎水部と Phe コアの疎水部との疎水性相互作用に起因していると考えられる。その他にも、実際のウイルス抗原である HIV-1 gp120、HIV-1 p24、SIV p27、influenza hemagglutinin (HA) を内包することが可能であった。疎水化 γ -PGA ナノ粒子は抗原蛋白を高効率に内包することが可能であり、蛋白質キャリアとしての有用性が示された。 γ -PGA-Trp62 ナノ粒子でも同様に蛋白質内包ナノ粒子を調製することが可能であったが、内包効率は γ -PGA-Phe53 ナノ粒子の半分以下であり、導入する疎水性アミノ酸の種類や γ -PGA の親 - 疎水バランスが蛋白質内包量に影響することがわかった。

3-2) 蛋白質表面固定化ナノ粒子の調製

疎水化 γ -PGA ナノ粒子はゼータ電位が負の値を示すことより、表面には γ -PGA の α -カルボキシル基が存在していると考えられる。そこで、この表面官能基を利用した、蛋白質の表面固定化について評価を行った。縮合剤を用いた表面固定と物理吸着について検討した結果、内包型と異なり表面固定では、蛋白種による大きな違いがみられ、分子量の大きい蛋白質が固定化量の多い傾向が認められた (図 10b)。表面固定化はナノ粒子表面のカルボキシル基と蛋白質のアミノ基との共有結合であるため、蛋白質表面に存在するアミノ基の数が、固定化量に影響していると思われる。また、等電点の高い lysozyme, cytochrome c では表面固定および物理吸着に関わらず、高い担持量を示した。これは、正電荷を有する蛋白質と負電荷を有するナノ粒子との静電的相互作用によるものと考えられる。

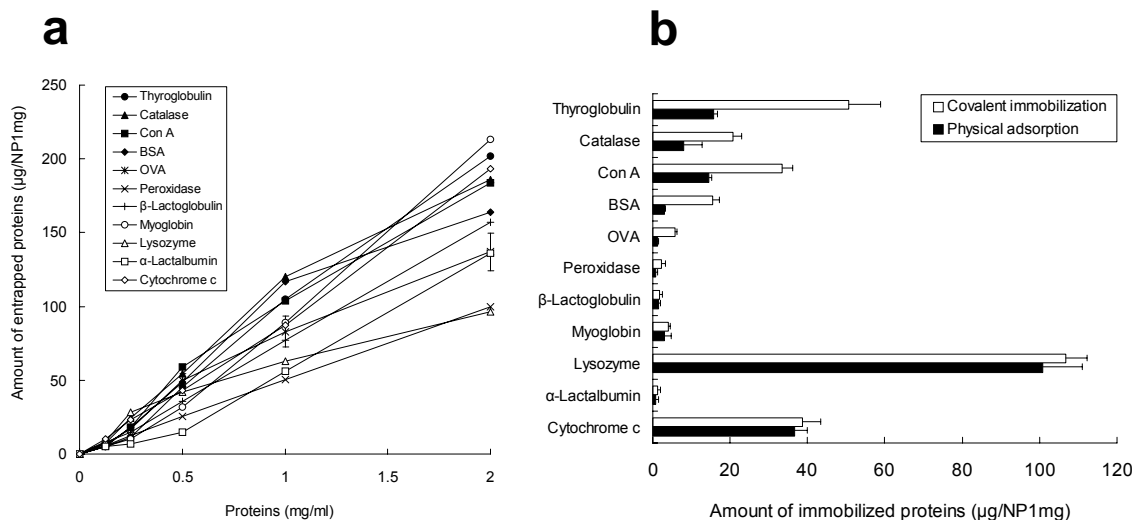


図 10 疎水化 γ -PGA ナノ粒子への蛋白質固定化方法の検討. (a) 蛋白質内包ナノ粒子の調製. (b) 蛋白質表面固定化ナノ粒子の調製.

3-3) 酵素担持ナノ粒子の活性評価

疎水化 γ -PGA ナノ粒子に担持された蛋白質の安定性評価として、酵素 (カタラーゼ) 固定化方法の違いによる酵素活性への影響について比較検討した。内包型 (Encapsulation)、物理吸着型 (Adsorption) では高い酵素活性を維持していたのに対して、共有結合による化学固定 (Immobilization) では、40%程度まで酵素活性が低下していた (図 11)。これは、共有結合による蛋

白質の変性、または活性部位がブロックされていることに起因していると考えられる。また、内包型と物理吸着型の比較では、内包型の方が高い酵素活性を示した。これは、内包されているカタラーゼが物理吸着のような強い相互作用によって粒子内に担持されているのではなく、蛋白分子が粒子内を拡散できるような形で内包されていることを示唆している。このことより、疎水化 γ -PGA ナノ粒子に内包された蛋白質は変性・分解を伴わず、ネイティブな立体構造を保持した状態で、ナノ粒子に担持されていると考えられる。さらに、この結果より、過酸化水素程度の低分子量のものは、容易に粒子内へ移行できることが確認された。

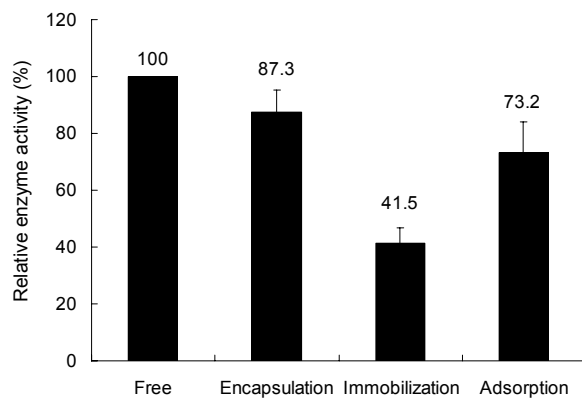


図 11 ナノ粒子へのカタラーゼ固定化方法の違いによる酵素活性への影響

3-4) 蛋白質内包ナノ粒子の保存安定性

ナノ粒子ワクチンとして医療に用いるためには、その保存安定性が重要となってくる。特に凍結乾燥によって粉末化できれば、これからの応用展開に非常に有利となる。そこで、ワクチン担体としての保存安定性を検討するために、凍結乾燥処理後の蛋白質(OVA)内包ナノ粒子の再分散性と蛋白担持量について検討した。疎水化 γ -PGA ナノ粒子は凍結乾燥前後で粒経に変化は認められなかった。一方、OVA 内包ナノ粒子は凍結乾燥後に凝集が確認されたが、凍結乾燥前にグルコースを添加することで凝集を抑えることができた。また OVA 内包ナノ粒子は 4 保存および凍結乾燥後も蛋白質の放出は確認されず、長期間安定に蛋白質を担持できることが明らかとなった。また培養細胞を用いた安全性試験では、顕著な細胞毒性は認められず、ワクチン担体として条件を十分に兼ね備えていると考えられた。

3-5) ペプチド担持ナノ粒子の調製

疎水化 γ -PGA ナノ粒子へのペプチド固定化について検討した。方法としては、表面への共有結合による固定化、物理吸着、粒子形成の際に内包させる 3 種類を用いて、ナノ粒子へのペプチド担持効率について比較検討した。その結果、p24 以外のすべてのペプチドで固定、吸着、内包が可能であった(図 12b)。蛋白質の場合は、内包法が最も担持量が多い結果であったが、ペプチドの場合は固定化方法の違いによって担持量に大きな違いは認められなかった。これは表面固定化の際に、粒子内にもペプチドが浸透し、粒子表面と内部で固定化が起っていることが予想される。ペプチド担持量に対するペプチドの等電点、疎水度との相関性について調べた結果、表面への共有結合による固定化では、ペプチドの等電点が高いほど固定化効率が増加した(図 12c)。一方、内包ではペプチドの疎水度が高いほど内包効率が増加した(図 12d)。この結果より、ペプチドの表面固定では、負電荷を有するナノ粒子表面とペプチドとの静電的相互作用が、ペプチド内包では粒子内部の Phe とペプチドとの疎水性相互作用が担持量に影響していることが示唆された。

3-6) カチオン化疎水化 γ -PGA ナノ粒子の調製

疎水化 γ -PGA 誘導体により調製されたナノ粒子はゼータ電位が負の値を示すことより、粒子表面に γ -PGA 由来の COOH 基が存在し、Phe をコアとしたコア - シェル型の構造をしていると予想される。これらの表面官能基および電荷を利用することで様々な応用が期待できる。そこで、疎水化 γ -PGA ナノ粒子のカチオン化について検討を行った。カチオン性高分子には分子量 20 万と 65 万のキトサンを用いて、ナノ粒子への表面コートを行った。分子量 20 万のキトサンを表面コートすることで、単分散性を維持した状態で表面をカチオン化することが可能であった。分子量の高いキトサンを用いた場合は、多数の凝集が検出された。これは、キトサンがナノ粒子表面にコートされる際

に、複数個の粒子を同時に取込むために大きな凝集体が形成されたと考えられる。ナノ粒子表面をカチオン化することで、核酸医薬を含む DNA ワクチン等への応用が期待される。

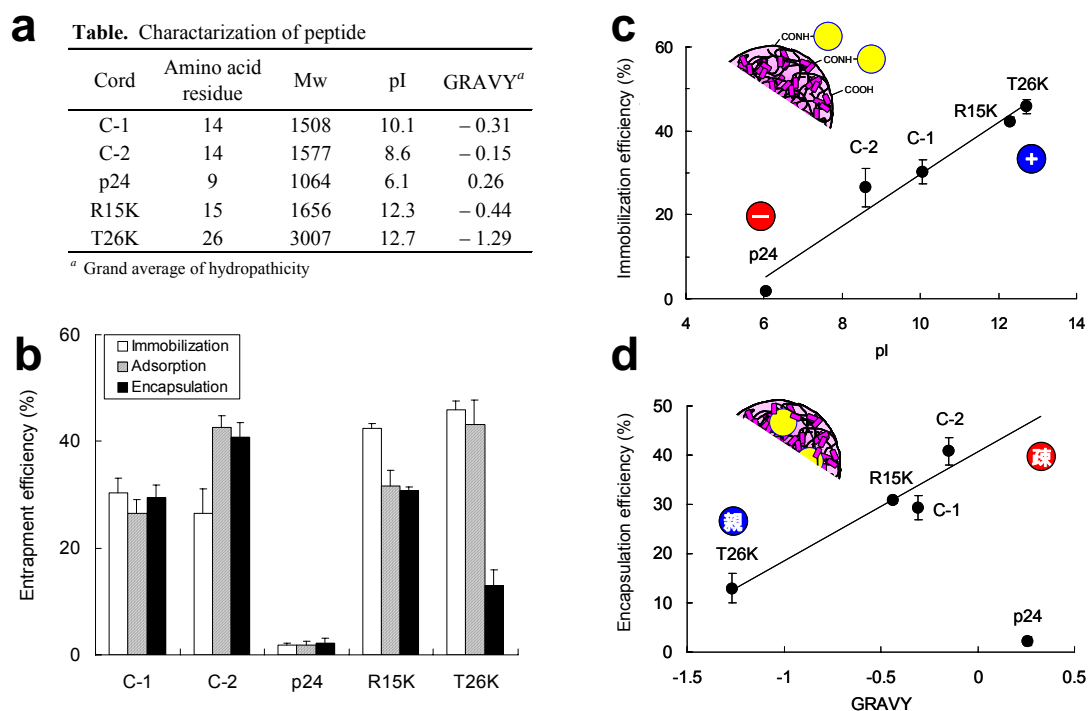


図 12 ペプチド担持ナノ粒子の調製。(a)用いたペプチドの特性。(b)ペプチド表面固定、吸着、内包ナノ粒子におけるペプチドの担持効率。(c)ペプチドの電荷と表面固定化効率の関係。(d)ペプチドの疎水度と内包効率の関係。

4) 疎水化 γ -PGA ナノ粒子の細胞膜破壊活性

平成 17 年度までに、抗原を内包した疎水化 γ -PGA ナノ粒子 (γ -PGA-Phe53) をマウスに免疫することで、強力な抗原特異的細胞性免疫を誘導できることを明らかになった。外来性抗原による細胞性免疫の誘導には、エンドサイトーシスで取込まれた抗原がエンドソームから脱出し、細胞質に移行する必要がある。そのため、疎水化 γ -PGA ナノ粒子が細胞内の pH 変化に応じて、抗原の細胞内動態を制御していることが予想された。そこで、疎水化 γ -PGA ナノ粒子の免疫誘導メカニズム解明のため、ナノ粒子の pH 変化に伴う細胞膜破壊活性への影響について検討した。評価は赤血球をエンドソーム膜モデルとして、赤血球からヘモグロビン遊離量 (溶血活性) を測定することでおこなった。

4-1) ナノ粒子の赤血球溶血活性

ヒツジ赤血球と疎水化 γ -PGA ナノ粒子を pH5 ~ 7 (pH5 はエンドソーム内、pH7 は細胞質内) の緩衝液に分散させ、赤血球の溶血率を評価した。各 pH、濃度におけるナノ粒子の赤血球溶血活性を測定した結果、pH の低下および粒子濃度増加に伴う、溶血活性の増加が認められた (図 13)。また、疎水化度の異なる γ -PGA による溶血作用を調べたところ、疎水度が高い γ -PGA で溶血活性が検出された。これは、疎水性が高いほど赤血球膜との疎水性相互作用が強くなるためだと考えられる。表面にメタクリル酸 (COOH 基) を有するコア - コロナ型ポリスチレンナノ粒子 (360 nm, -32 mV) では、pH 低下による溶血作用は認められなかった。この結果は、ナノ粒子による溶血作用は、粒子を構成しているグラフト共重合体の構造およびその疎水度が重要な因子であることを示唆している。直鎖状の親水性高分子側鎖に短い疎水性基が導入された両親媒構造が、細胞膜とナノ粒子間の相互作用に重要であると考えられる。

4-2) ナノ粒子の構造解析

各 pH における γ -PGA、 γ -PGA-Phe36、 γ -PGA-Phe53 (疎水化 γ -PGA ナノ粒子) のゼータ電位を測定した結果、いずれのサンプルにおいても pH の低下に伴い、ゼータ電位の増加が認められた (図 14a)。これは、 γ -PGA 側鎖のカルボキシル基のプロトン化に起因していると考えられる。また、pH の低下に伴い疎水化 γ -PGA ナノ粒子の粒径が減少した (図 14b)。この結果は、粒子コア内に存在するカルボキシル基の静電反発の抑制、または粒子を構成しているグラフト共重合体の 2 次構造変化に起因していると考えられる。

そこで、pH の違いによる疎水化 γ -PGA ナノ粒子の 2 次構造変化を確認するために、FT-IR および CD スペクトル測定を行った。ナノ粒子は pH 7 で 1654 cm^{-1} (amide I) と 1535 cm^{-1} (amide II) にバンドが確認され、random 構造をとっていることが示唆された。pH 5 では、 1639 cm^{-1} (amide I) と 1542 cm^{-1} (amide II) へのピークシフトが認められ、ランダム構造から β -sheet 構造への変化が確認された。これは、pH 低下により γ -PGA 側鎖の COO^- の一部が COOH になり、アミド結合間の水素結合が強くなることで、2 次構造変化が誘起されたものと考えられる。一方、CD スペクトル変化からは、2 次構造を同定することはできなかった。これらの結果より、疎水化 γ -PGA ナノ粒子では、pH の低下に伴い β -sheet 構造が増加することで、粒子表面近傍に側鎖の Phe が集積していると予想される。これにより、粒子表面の疎水性が増加し、細胞膜と相互作用が強くなることで、溶血活性が増加したと考えられる。

これらの結果より、疎水化 γ -PGA ナノ粒子は、pH の低下により粒子を構成している高分子鎖の 2 次構造変化が起ることで、赤血球膜の透過性を高める働きをすることが明らかとなった。この溶血活性を示す pH は、エンドソーム内と同程度の pH であり、疎水化 γ -PGA の endosome-disruptive nanoparticles としての機能が、細胞性免疫誘導メカニズムの一因であると考えられる。

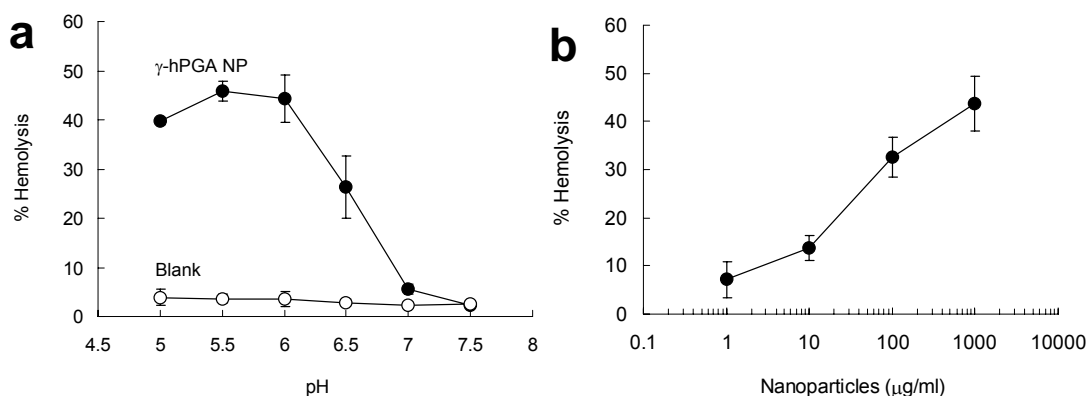


図 13 疎水化 γ -PGA ナノ粒子の赤血球溶血活性に対する (a) pH, (b) 粒子濃度の依存性。

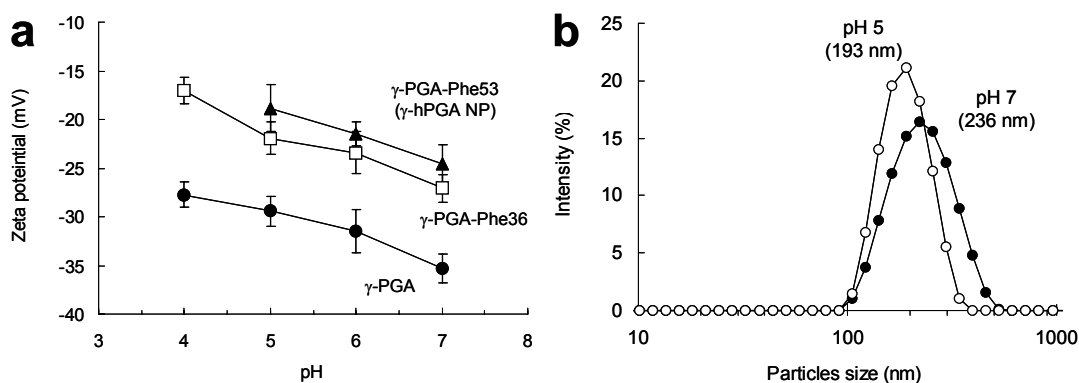


図 14 疎水化 γ -PGA ナノ粒子の pH 変化による (a) ゼータ電位, (b) 粒子径の変化。

5) 疎水化 γ -PGA 粒子の抗原性

抗原を内包した疎水化 γ -PGA ナノ粒子を用いたワクチンにより、抗原に対する抗体産生を誘導できることが明らかとなった。しかしながら疎水化 γ -PGA ナノ粒子はポリアミノ酸より構成されているため、粒子に対する抗体が産生される可能性が考えられた。そこで、ナノ粒子の免疫原性について、粒子を構成している高分子鎖に対する抗体産生の有無について検討を行った。

OVA 内包ナノ粒子を2回 footpad 免疫したマウス血清を用いて抗 γ -PGA 抗体量を ELISA により測定した。検出抗原には γ -PGA に Phe が 53% 導入されたものを用いた。OVA 内包ナノ粒子を免疫したマウスでは、内包抗原である OVA に対して、CFA と同程度の抗体産生が認められた。一方、今回の測定条件においては、粒子の構成成分である γ -PGA-Phe に対する IgG および IgM 抗体は検出されなかった。IgG 抗体産生が起るには、抗原を取込んだ抗原提示細胞(樹状細胞、マクロファージ、B 細胞)が抗原を分解して、その分解産物の一部であるペプチドを MHC クラス II 分子に提示することで誘導される。 γ -PGA は細胞内のプロテアーゼに対して分解させにくいことが知られており、この γ -PGA のプロテアーゼ耐性がナノ粒子の免疫原性の低さに起因していると考えられる。

(2)研究成果の今後期待される効果

抗原内包微粒子を用いたワクチン開発は、これまでにいくつか報告があり、世界的に研究が行われている競争の激しい分野である。これまでポリ乳酸や脂質を用いたアプローチに代表されるように種々の微粒子担体が開発されているが、微粒子調製の煩雑さ、微粒子の安定性、抗原内包効率の低さ、内包抗原の変性、炎症の惹起といった欠点を有している。さらに、これまでの研究では、ナノ粒子による蛋白質や DNA の細胞内デリバリーに関するものがほとんどであり、ナノ粒子による樹状細胞の活性化までを統括的に研究した例は皆無であり、ナノ粒子を用いた新たな DDS 研究の応用展開が見込まれる。

protein-based vaccine の欠点を補う手段としてアジュバントの応用研究が活発に行われている。アジュバント活性を有する物質としては、流動パラフィンと界面活性剤に結核死菌を加えた CFA、コレステロール、リン脂質などからなる immuno-stimulatory complexes (ISCOM)、精製サポニンの主成分である QS-21、O/W エマルジョンの MF59、細菌由来の毒素であるコレラ毒素 (CT) と易熱性毒素 (LT) などが知られている。しかしながら、これらのアジュバントは効果が高い反面、投与経路の制限、投与部位における強い炎症や組織の壊死、アレルギー反応の誘発などの副作用が問題となっている。2000 年にヨーロッパにおいては LT を用いた経鼻粘膜ワクチンの臨床試験が実施されたが、顔面神経麻痺の副作用により毒素系アジュバントの臨床応用は難しいものとなっている。また、アルミ製剤等の臨床使用可能なアジュバントでは、期待するほどの免疫増強効果は得られない。そのため、アルミ製剤に代わる、高い安全性と効果を示す日本発のアジュバントが期待されており、疎水化 γ -PGA ナノ粒子がこれらの代替としての利用が期待される。

本研究の高分子ナノ粒子合成技術では、汎用されているリポソームなどと比較して、高分子鎖の精密な分子設計による粒子の安定性向上、刺激応答性の付与、構造の多様化に伴う多機能性材料の構築が可能となる。また、凍結乾燥による保存と再分散、遠心分離による精製ができるといった製剤化に有利な特長を持つ。さらに、生体内で分解可能な高分子を基盤としたナノ粒子であるため、高い安全性が期待できる。これに高分子鎖の分子設計によりアジュバント活性を付与することで、これまでに達成されていない免疫応答制御能を有する抗原デリバリー型アジュバントの創製が可能となり、普遍的なワクチン担体としての利用が期待できる。通常のワクチンでは目的の免疫を誘導するために複数回の投与を必要とする。しかしながら、疎水化 γ -PGA ナノ粒子に抗原蛋白を固定化したナノ粒子ワクチンでは、単回投与によって強力かつ長期間の細胞性免疫の誘導が可能であり、免疫学的にも非常に有用かつ興味深い特性を有している。このような高い安全性と有効性の両方を兼ね備えたワクチン担体は世界に類が無い。また本研究により、疎水化 γ -PGA ナノ粒子が細胞内の抗原動態制御に関与する基礎的データを取得しており、この結果は、体内動態を制御可能とするナノ粒子の分子デザインに対して新しいアプローチを提供するものである。

ナノ粒子を用いたワクチン開発は、感染症やがんに対する効果的な免疫療法につながるである

う。また、今後出現すると考えられる新興感染症に対するワクチン開発にも応用が可能となる。複雑かつ巧妙な免疫系の人為的な制御に基づく疾患治療は、予防と治療効果を兼ね備えた究極の医療である。ナノテクノロジーを応用した DDS の市場は世界規模で 40 兆円といわれるほどの巨大規模になると予想されており、本研究を応用展開していくことは、日本国内をはじめ、様々な DDS 産業の活性化に繋がると思われる。また、現在の医療用材料ではポリ乳酸などの限られた材料しか臨床応用されておらず、本研究により、ナノ粒子製造技術の確立と臨床応用を達成することで、医療デバイスとして使用可能な新たな生分解性材料の提供が可能となる。

3.2 ナノ粒子と樹状細胞の相互作用およびマウスを用いた免疫実験(鹿児島大学 馬場グループ)

(1)研究実施内容及び成果

ワクチン開発においては、抗原特異的かつ効率的な免疫反応の誘導が必須である。そのため、ワクチンの担体に結合もしくは内包されている抗原を抗原提示細胞 (APC) によって効率良く取込ませることが重要なポイントの1つとなる。現在、実験レベルにおける効果的なアジュバントとして、結核死菌とミネラルオイルをエマルジョン化したコンプリートフロイントアジュバント (CFA) があるが、局所に強い炎症反応を誘導するため、ヒトには用いる事ができない。また、ヒトにおいてはアルミニウムをベースにしたアジュバント(水酸化アルミニウムゲル)があり、主に液性免疫の誘導が期待されるが、全体としての効果は弱い。

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 (DC) が存在しており、この樹状細胞はマクロファージや B 細胞よりも、非常にすぐれた抗原提示能を示すとともに、唯一ナイーブ T 細胞を活性化させることが出来る。また、未成熟な樹状細胞は、種々のサイトカインや病原体由来の物質などによって活性化し成熟化した後、二次リンパ器官に移動し、抗原を T 細胞に提示する事で、エフェクター T 細胞を誘導する。これらのことから、樹状細胞をターゲットとした効率的な抗原のデリバリーを行うことにより、効果的な抗原特異的免疫反応の誘導を期待することが出来ると考えられる。

本実験は、ナノ粒子の drug delivery system (DDS) としての性質を生かして、 γ -PGA ナノ粒子の樹状細胞への取込みとその効果や、human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) などの各種抗原を内包しているナノ粒子を用いたマウスの免疫実験により、ナノ粒子ワクチンの抗原特異的な免疫の誘導を試みた。

1-1) ポリスチレンナノ粒子の DC への取込み

マウスの骨髄より骨髄細胞を分離・採取し、これを 20 ng/ml の recombinant murine granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) で 6 日間、引き続き 1 μ g/ml の lipopolysaccharide (LPS) 存在下で培養し、その表面マーカーをフローサイトメーターで確認することにより、未成熟および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抗原の取り込みを示した。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かった。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。

成熟樹状細胞をその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、この結果から、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1)。また、貪食阻害剤(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、ナノ粒子の樹状細胞への取り込みが抑制された。

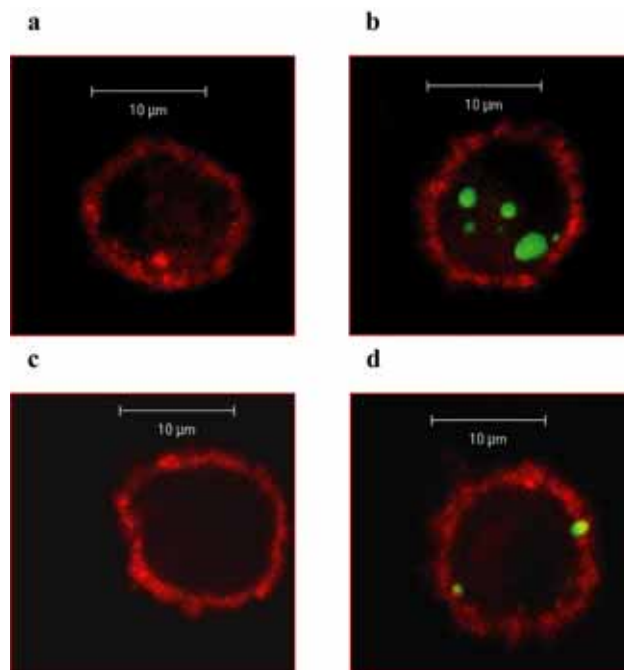


図1. 樹状細胞へのポリスチレンナノ粒子の取込み(共焦点顕微鏡写真). a: 樹状細胞のみ, 37°C 処理, b: 樹状細胞 + ナノ粒子, 37°C 処理, c: 樹状細胞のみ, 4°C 処理, d: 樹状細胞 + ナノ粒子, 4°C 処理.

1-2) HIV-1 捕捉ポリスチレンナノ粒子の樹状細胞への取込み

蛍光色素(緑色)でラベルされた HIV-1 gp120 抗原をコンカナバリン A 固定化ポリスチレンナノ粒子(直径約 350 nm)に捕捉させ(gp120-NS), これを培養樹状細胞に加え, 37°C で 1 時間インキュベーションすることにより, gp120-NS の樹状細胞への取り込みについて検討した。その結果, 図2 に示すように, ナノ粒子に細くされた gp120 と等量(1 μg/ml)の gp120 を単独で樹状細胞に加えた場合と比較すると, ナノ粒子に捕捉させた場合には, 非常に多くの gp120 が樹状細胞に取り込まれることが分かった。

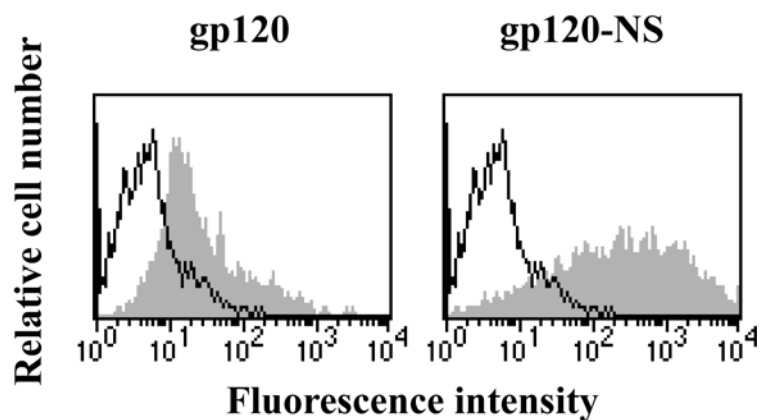


図2. gp120 捕捉ナノ粒子による抗原の樹状細胞への取込み. 蛍光標識(緑色)された gp120 単独(左)もしくは等量の gp120 を捕捉したナノ粒子(右)を樹状細胞に取込ませ(37°C で 1 時間), その後, フローサイトメーターで取込み量を解析した。

1-3) 卵白アルブミン (OVA) 固定化ポリスチレンナノ粒子によるマウスの免疫

フロイントのコンプリートアジュバント (CFA) と混合した OVA 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、10 $\mu\text{g/ml}$ の OVA を単独でパルスした樹状細胞の T 細胞活性化能と、OVA 量として 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の OVA 固定化ナノ粒子をパルスした樹状細胞の T 細胞活性化能がほぼ同程度であった。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、少量の抗原量で T 細胞を強く活性化できることを示唆している (図3)。

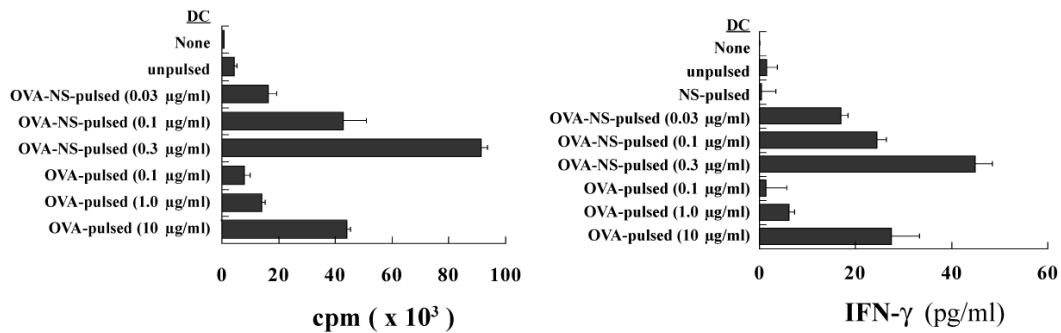


図3. OVA ナノ粒子をパルスした樹状細胞による抗原特異的 T 細胞の活性化. OVA + CFA で免疫したマウスより得られた OVA 特異的 T 細胞を、OVA 単独もしくは OVA ナノ粒子をパルスした樹状細胞と混合培養し、T 細胞の増殖 (左) と IFN- γ 産生能 (右) を測定した。

1-4) HIV-1 捕捉ポリスチレンナノ粒子によるマウスの免疫

HIV-1 を捕捉しているポリスチレンナノ粒子をマウスに経鼻投与を 4 回行い、その後、マウスより得られた脾細胞を用いて、抗原に対する細胞障害性試験を行った。その結果、HIV-1 を捕捉したナノ粒子を用いて免疫したマウスでは、対照と比較して、HIV-1 抗原特異的な細胞障害性 T リンパ球 (CTL) が有意に誘導されているのが観察された (図4)。

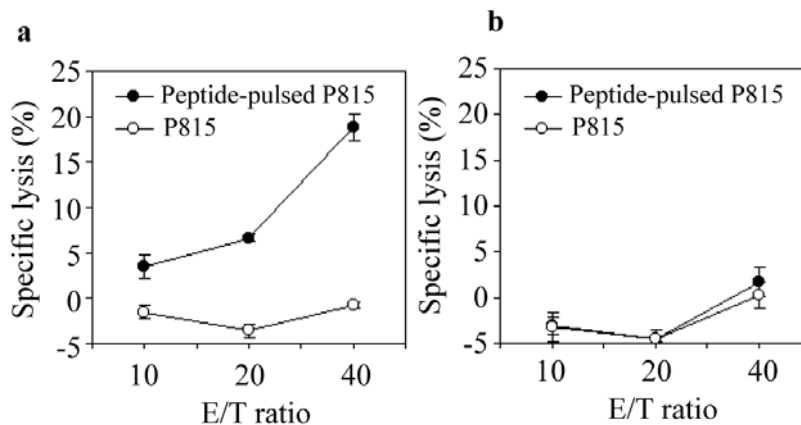


図4. HIV-1 捕捉ナノ粒子を免疫したマウスより得られた脾細胞による細胞障害性試験. HIV-1 捕捉ナノ粒子 (a) もしくはナノ粒子のみ (b) をマウスに 4 回経鼻免疫し、その後に免疫マウスの脾細胞を用いて HIV-1 抗原をパルスした細胞 (P815 cell) に対する CTL 活性を測定した。

2-1) 生分解性 γ -PGA ナノ粒子の樹状細胞への取込み

樹状細胞と他の抗原提示細胞 (B 細胞およびマクロファージ) を用い γ -PGA ナノ粒子の取込みの比較を行ったところ、樹状細胞へのナノ粒子の取込みは他の抗原提示細胞より優れていることが明らかとなった (図5 a)。さらに、 γ -PGA ナノ粒子の樹状細胞への取込みは時間および濃度依存的

であった。また、抗原をナノ粒子に内包することにより、より効率良く取込まれることが明らかになった。また、蛍光(緑色)標識した γ -PGA ナノ粒子を樹状細胞とインキュベーションしたところ、ナノ粒子が樹状細胞内に効率良く取り込まれている様子が共焦点レーザー顕微鏡により観察された(図 5b)。

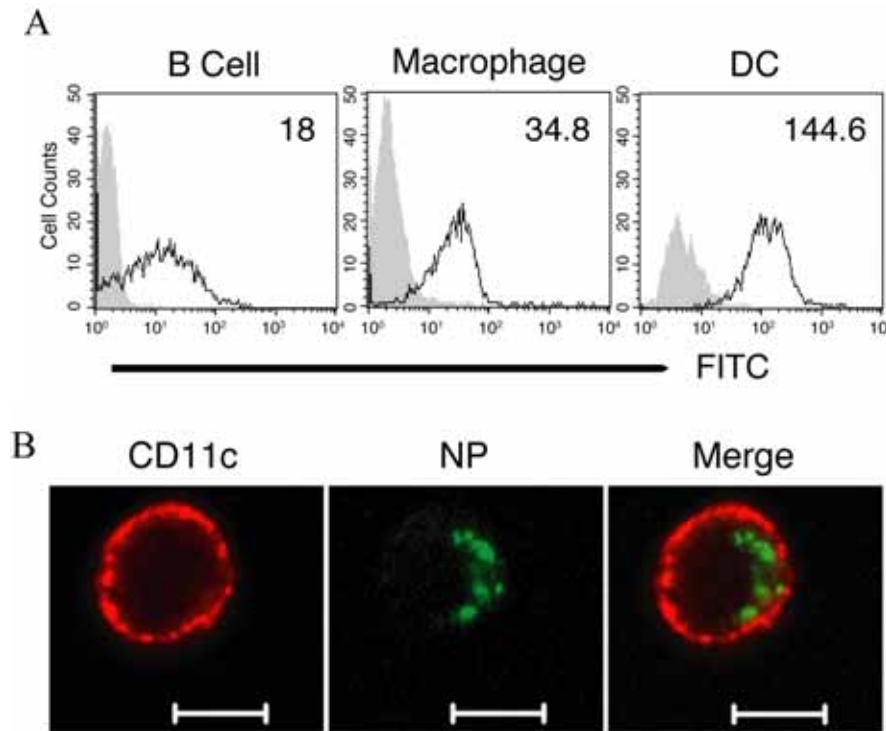


図5. 樹状細胞による γ -PGA ナノ粒子の取込み。(a) 蛍光標識されたナノ粒子の B 細胞, マクロファージ, 樹状細胞による取込み能を比較した。(b) 樹状細胞(細胞膜: 赤色)がナノ粒子(緑色)を取込んでいる像を共焦点レーザー顕微鏡で観察した様子。

さらに, *in vivo* における γ -PGA ナノ粒子の取込みに関しても, 樹状細胞に最もよく取り込まれることが明らかとなった。また, 生体内で直接 CD8 陽性 T 細胞を刺激することができるとされている CD8a 陽性 CD11c 陽性の樹状細胞が粒子を取込んでいることも分かった(図 6)。

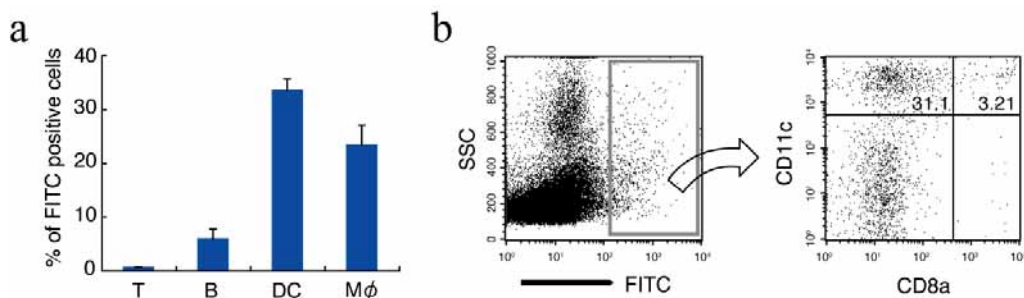


図6. *in vivo* における γ -PGA ナノ粒子の取込み. 蛍光標識されたナノ粒子をマウスに静脈注射し, 脾細胞に取り込まれたナノ粒子をフローサイトメーターで解析した。

2-2) γ -PGA ナノ粒子の樹状細胞に対する成熟化誘導作用

未熟樹状細胞に γ -PGA ナノ粒子を作用させると, 何らかの活性化シグナルが細胞内に伝達され,

成熟樹状細胞に分化することが分かった。これに伴い、細胞表面の補助刺激分子である CD40 や CD86 などの発現増強や tumor necrosis factor- α (TNF- α) や interleukin-12 (IL-12) などの炎症性サイトカインの産生がみられた(図7)。さらに、ナノ粒子で刺激した樹状細胞は LPS や CpG で刺激誘導した成熟樹状細胞と同程度のアロジェニック T 細胞への刺激能力を有していた。また、 γ -PGA ナノ粒子が *in vivo* においても、樹状細胞を活性化するかどうかについて調べたところ、 γ -PGA ナノ粒子を投与したマウスの脾臓では、樹状細胞に発現している補助刺激分子の発現増強が認められた。

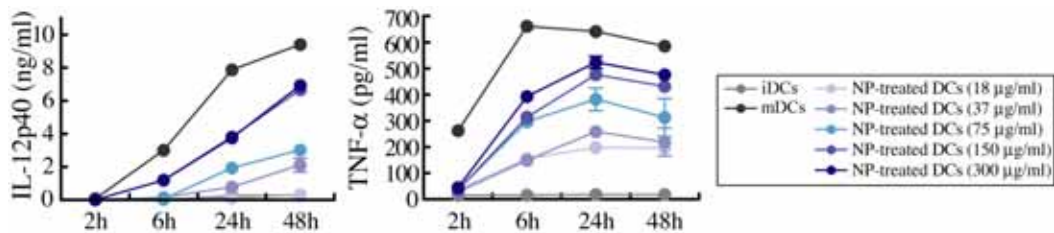


図7. γ -PGA ナノ粒子による樹状細胞の活性化. 未成熟樹状細胞に LPS もしくは γ -PGA ナノ粒子を作用させ、その培養上清を経時的に回収し、その中に含まれるサイトカインのレベルを測定した。

2-3) γ -PGA ナノ粒子による MyD88 を介した NF- κ B の活性化

樹状細胞の成熟化に関するメカニズムを調べる目的で、それに関わるシグナル伝達系の解析を、種々のシグナル伝達物質に対する特異的阻害薬を用いて検討した。その結果、 γ -PGA ナノ粒子は樹状細胞と相互作用した結果、樹状細胞内のシグナル伝達分子である MyD88 を介して NF- κ B の活性化を誘導することにより、樹状細胞の成熟(活性化)を起こさせることが明らかとなった(図8)。

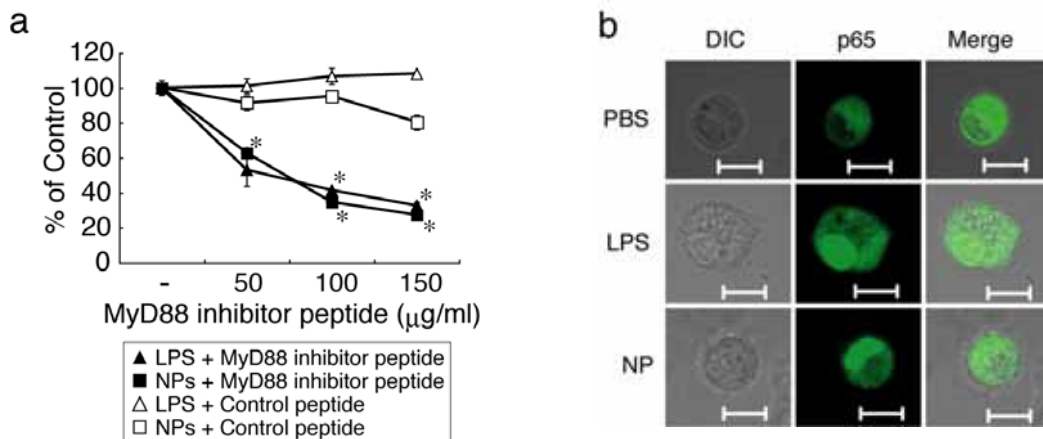


図8. γ -PGA ナノ粒子による樹状細胞における MyD88 を介した NF- κ B の活性化. (a) MyD88 阻害剤を樹状細胞へ作用させた後、LPS もしくは γ -PGA ナノ粒子で刺激し、樹状細胞より産生される TNF- α 量を測定した。(b) 樹状細胞にリン酸バッファー (PBS)、LPS、もしくは γ -PGA ナノ粒子を添加し、NF- κ B (緑) の核内移行を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

3-1) OVA 固定化ナノ粒子によるマウスの免疫

OVA を内包させたナノ粒子 (OVA-NPs) をマウスの footpad へ 2 回免疫し、回収した脾細胞を用いて抗原特異的細胞障害活性試験を行ったところ、アジュバントとして CFA を用いて免疫したマウ

ス(CFA + OVA)と比較して、高い細胞障害活性と(図9 a), 抗原特異的な IFN- γ 産生細胞の存在が確認された。さらに、血清中の抗体価においては、高いレベルの抗原特異的 IgG(IgG1, IgG2a) が認められた(図9 bおよびc)。

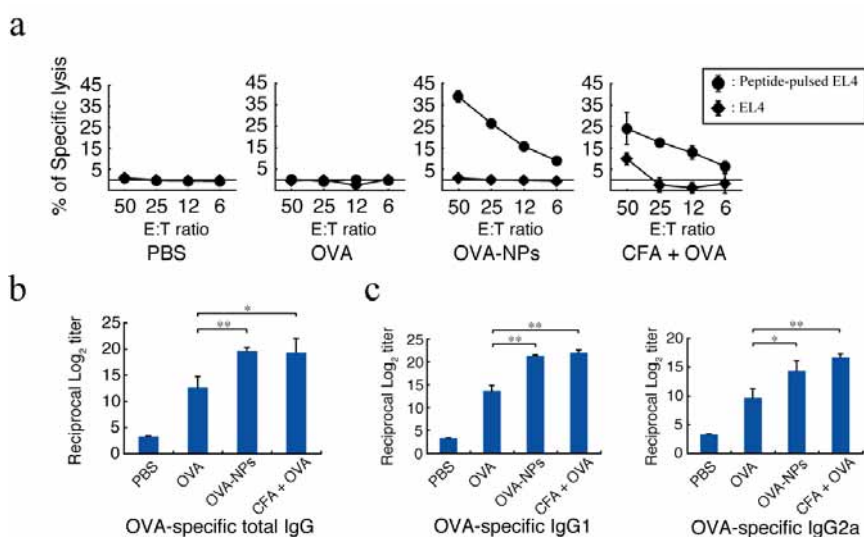


図9 . OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子による抗原特異的細胞性免疫と液性免疫の誘導 . (a) マウスを PBS, OVA, OVA-NPs, もしくは OVA + CFA を footpad 経由で 2 回(0 日目および 7 日目)免疫し, 21 日目に脾細胞を回収した。得られた脾細胞を用いて抗原特異的細胞障害活性試験を行った。(bおよびc) 免疫後に得られたマウス血清中の OVA 特異的抗体 (b: OVA 特異的 IgG, c: OVA 特異的 IgG1 と IgG2a) を定量した。

3-2) HIV-1 p24 内包 γ -PGA ナノ粒子によるマウスの免疫

HIV-1 Gag 蛋白 (p24) のみを用いて免疫したマウスに比べて, p24 内包 γ -PGA ナノ粒子 (p24-NPs) を用いて免疫したマウスの方が, より強い抗原特異的な細胞性および液性免疫が誘導することが明らかになった(図10)。さらに, p24 と γ -PGA ナノ粒子を単に混合したもの (p24 + NPs) を用いてマウスに免疫しても, p24 抗原単独で免疫した場合と比較すると, より強い免疫誘導が得られるという結果も得られた(図10)。

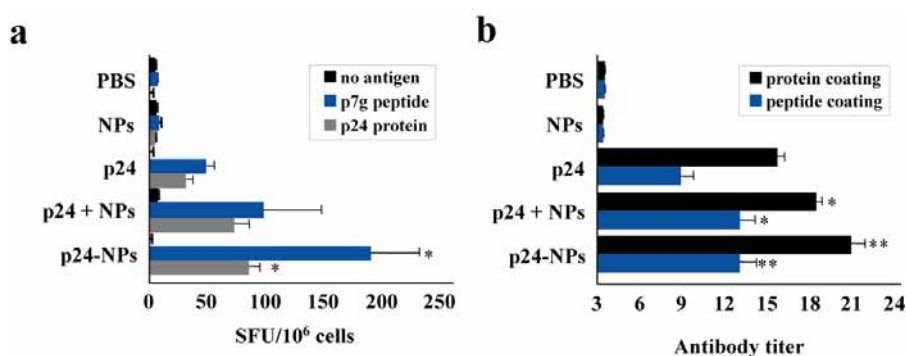


図10 . p24 内包 γ -PGA ナノ粒子による抗原特異的な細胞性および液性免疫の誘導 . マウスを PBS, NPs, p24, p24 + NPs もしくは p24-NPs を皮下に 3 回(0 日目, 7 日目, 14 日目)免疫し, 24 日目に脾細胞を回収した。得られた脾細胞を用いて (a) p24 特異的な IFN- γ 産生試験, および (b) 免疫後に得られたマウス血清中の p24 特異的抗体の検出を行った。

3-3) HIV-1 gp120 内包 / 固定化 γ -PGA ナノ粒子によるマウスの免疫

HIV-1 の Env 抗原 (gp120) を表面固定化, もしくは内包した γ -PGA ナノ粒子をマウスに 1 回だけ

経鼻投与することによって、非常に強い抗原特異的細胞性免疫を誘導することを見いだした(図11)。さらに、抗原刺激に対する炎症性サイトカインの産生も検出した。さらに誘導された細胞性免疫について詳しく解析した結果、8ヶ月以上にわたり、抗原特異的 CD8 陽性の memory T 細胞が自足して存在することを明らかにした(図12)。

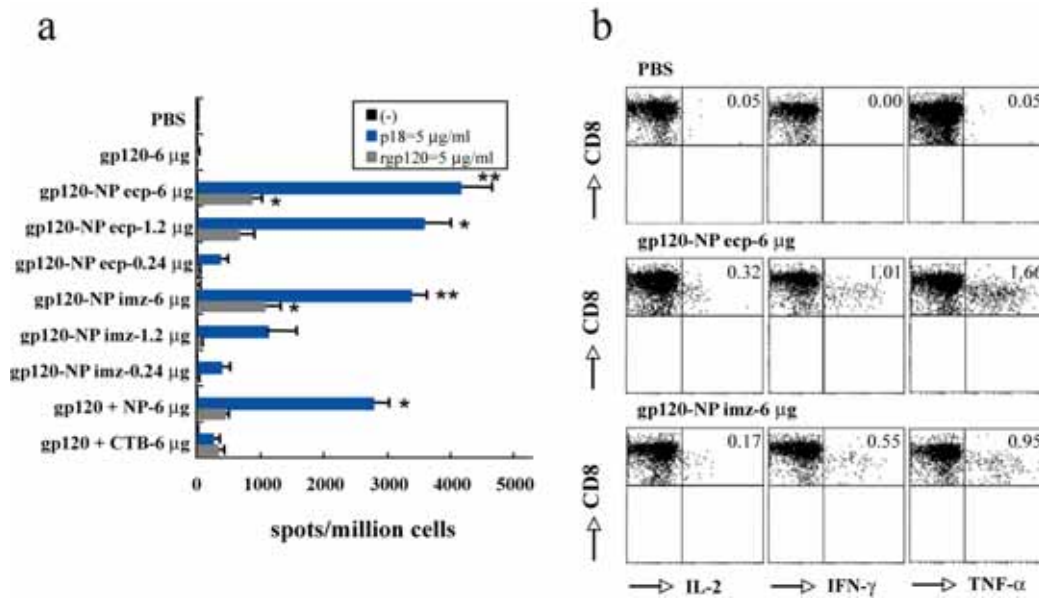


図11. gp120 固定化もしくは内包 γ -PGA ナノ粒子により誘導された抗原特異的細胞障害性 T 細胞. マウスを gp120, gp120 内包ナノ粒子(gp120-NP ecp), gp120 表面固定化ナノ粒子(gp120-NPs imz), gp120 抗原とナノ粒子の混合物(gp120 + NPs), もしくは抗原と粘膜アジュバントであるコレラトキシン B サブユニット混合物(gp120 + CTB)で1回だけ経鼻免疫し, 免疫後得られた(a)脾細胞の抗原特異的な IFN- γ の産生, および(b)抗原特異的なサイトカイン産生について解析した。

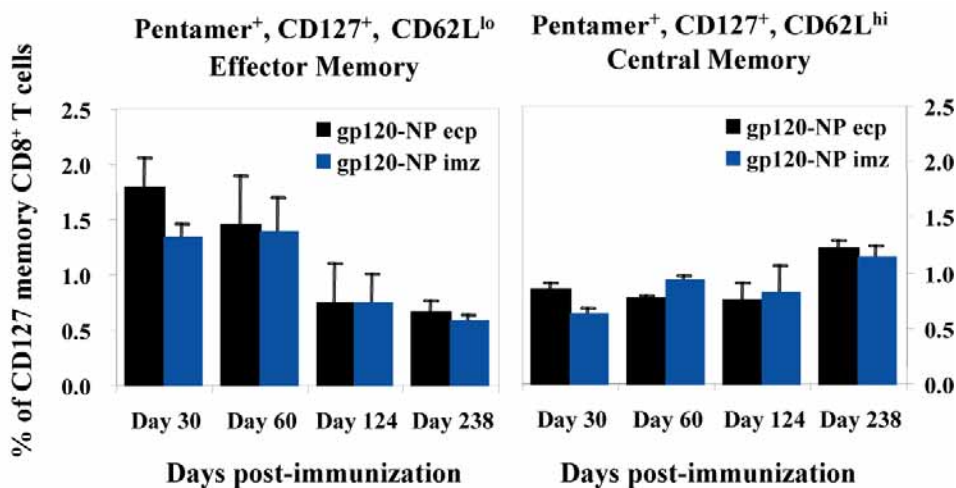


図12. gp120 固定化もしくは内包 γ -PGA ナノ粒子により誘導された抗原特異的 CD8 陽性 memory T 細胞の解析. マウスを gp120-NP ecp もしくは gp120-NP imz で経鼻免疫し, その後経時的に脾臓より CD8 陽性 T 細胞を分離し, 各種表面マーカーを調べた。パネル左は抗原特異的 effector memory cells(pentamer⁺ CD127⁺ CD62L^{low}), パネル右は central memory cells(pentamer⁺ CD127⁺ CD62L^{high})の頻度を示す。

4) リステリア感染に対する効果

Listeria monocytogenes は細胞内寄生細菌の1つであり、細胞性免疫によってのみ生体内から排除することが可能である。そこで、マウスにリステリアに対する CD8 陽性 T 細胞の CTL エピトープペプチド (LLO ペプチド) を固定化した γ -PGA ナノ粒子の免疫し、リステリアに対する細胞性免疫を誘導することによって、リステリア感染による個体死を回避できるかどうかについて検討した。その結果、CD8 陽性 T 細胞の CTL エピトープペプチドを表面固定化した γ -PGA ナノ粒子免疫群においては、コントロール群と比較して有意にマウスの生体死を回避することができた (図13)。

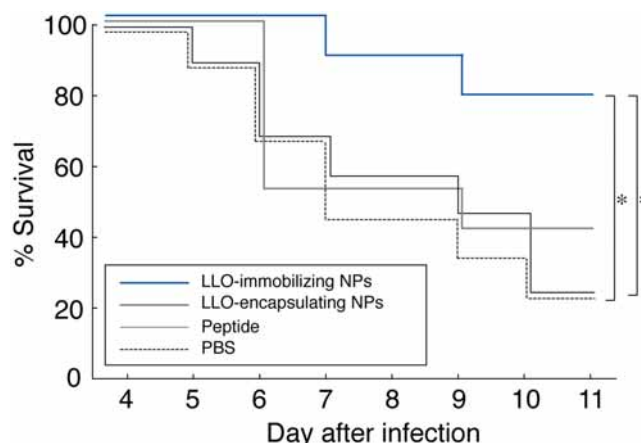


図13. リステリア感染からの生体防御効果. マウスを PBS, LLO ペプチド単独, LLO ペプチド表面固定化ナノ粒子 (LLO-immobilizing NPs), もしくは LLO ペプチド内包ナノ粒子 (LLO-encapsulation NPs) で2回 footpad 免疫 (0日目および7日目) し, 2週間後 (21日目) にリステリアを感染させてマウスの生存の有無を観察した。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究において、生分解性の γ -PGA ナノ粒子は、樹状細胞に効率良く取込まれると共に、樹状細胞の活性化能力も持ち合わせていることが分かり、 γ -PGA ナノ粒子自体が強いアジュバント効果を持っていることが明らかになった。抗原を固定化もしくは内包する γ -PGA ナノ粒子をマウスに投与すると、非常に強い抗原特異的免疫反応が誘導された。通常はタンパクやペプチドを用いてアジュバントとともに免疫した場合、液性免疫が誘導され、細胞性免疫がほとんどされないのであるが、 γ -PGA ナノ粒子を用いた場合には、むしろ強力な細胞性免疫が誘導されることが、これまでの研究を通じて明らかとなった。もちろん、抗原の種類や投与経路・方法などを工夫すれば、強い液性免疫も得られることから、タンパク抗原担体としての γ -PGA ナノ粒子の応用範囲は非常に広いと考えられる。つまり、液性免疫の誘導を主として必要とする感染症に対するワクチンから、細胞性免疫が主たる働きをしているとされている抗エイズワクチン、そして細胞性免疫の誘導によってのみ効果が期待される癌ワクチンなど、いかなる用途に対しても応用可能であると思われる。一方、 γ -PGA ナノ粒子は生分解性であり、その主成分は食品として大量に生体内に摂取されていることから、安全性も他のアジュバントと比較して、非常に高いものと予想される。以上のことから、今後さらに研究を継続し、 γ -PGA ナノ粒子の安全性、体内動態、大量合成法、抗原の固定化法などを確立するとともに、さらに詳しい免疫系に対する作用メカニズムを明らかにすることが出来れば、革新的なワクチンとして、医療と人類の福祉に対して大きな貢献をもたらすに違いないと確信している。

3.3 「膜融合リポソームによる CTL 誘導能評価とその最適化」と「生分解性ナノ粒子を用いた免疫誘導とがんワクチン効果の検討」(大阪大学大学院薬学研究科 中川グループ)

(1)研究実施内容及び成果

「膜融合リポソームによる細胞障害性 T 細胞誘導能評価とその最適化」

1)融合リポソームのペプチドワクチンキャリアーとしての有用性評価

膜融合リポソーム (Fusogenic liposome; FL) は、如何なる物質をもリポソーム内に封入することさえできれば、細胞膜との融合活性によって内包物を細胞質内へ直接導入できるキャリアーである。本項では、FL のペプチドワクチンキャリアーとしての有用性を検証した。

まず、Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) のエピトープペプチドである Tax (マウス H-2K^k 拘束性) の N 末端を FITC で蛍光標識し、FL への封入量について検討したところ、FL 懸濁液 1 OD₅₄₀あたり 29.8 μg/ml の Tax ペプチドを封入できることが明らかとなった。また、調製した FL が Tax ペプチドを細胞質内に効率よく導入できることを、flow cytometry 解析および共焦点レーザー顕微鏡観察により確認した。次に、Tax ペプチドを封入した FL を C3H マウス (H-2^k) に免疫し、Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導効果について検討した。その結果、Tax ペプチド単独免疫群、あるいはフロイント完全アジュバント (CFA) を併用して免疫した群では、Tax 特異的 CTL 活性は全く認め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 活性の上昇が検出された (図 1)。したがって、抗原性が低いとされている Tax ペプチドに対しても、FL は効果的に抗原特異的 CTL を誘導可能なペプチドワクチンキャリアーであることが示唆された。

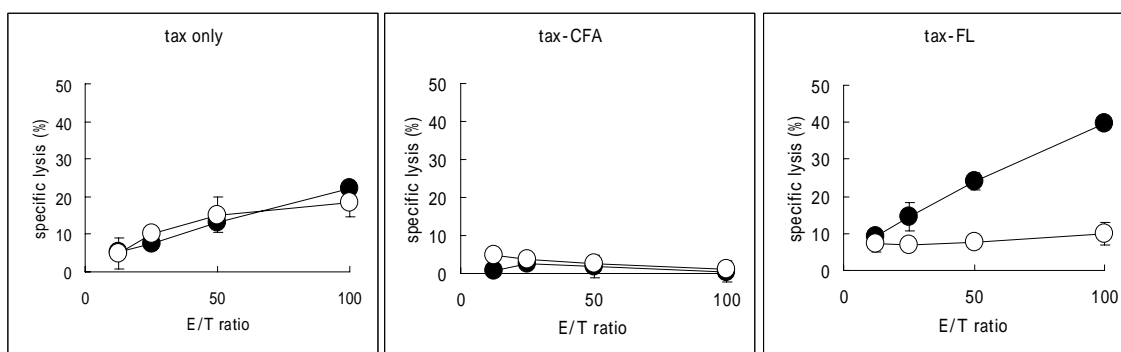


図1 Tax 特異的 CTL 誘導能の評価(○:コントロール細胞、●:標的細胞)

現在、臨床研究の場で盛んに実施されている癌ワクチン療法は、個々の癌患者の主要組織適合抗原複合体 (MHC) のハプロタイプに適合する腫瘍関連抗原 (TAA) ペプチドを抗原として用いるペプチドワクチン療法である。ペプチドワクチン療法における腫瘍免疫誘導効果は、体内に投与された TAA ペプチドが抗原提示細胞 (APC) 表面上の“空”の MHC class I 分子にはまり込み、続いてこの MHC class I/TAA ペプチド複合体を介して CTL が活性化されるというメカニズムに基づいている。しかしながら、MHC class I 分子は比較的短期間でその役目を終えて細胞外に shedding され、さらに小胞体からは次々と新たな MHC 分子が補充される。すなわち、このような MHC class I/TAA ペプチド複合体の短命性が、ペプチドワクチン療法の有効性を著しく制限している可能性があり、この点を克服する新たなワクチン戦略が望まれている。そこで我々は、TAA ペプチドを APC 内の小胞体 (MHC class I 分子との複合体形成の場) へと効率よく送達できるシステムの構築と、本アプローチのペプチドワクチン療法における有用性の評価を試みた。

TAA ペプチドの小胞体送達システムを構築するためには、まず TAA ペプチドを細胞質内に導入し、その後小胞体へと移行させるという二段階のステップを効率よく行える技術が求められる。我々は、アデノウイルス由来の小胞体移行シグナル配列 (ER insertion signal sequence; Eriss) を付加した TAA ペプチドを合成し、これを封入した FL を創製した。すなわち、FL の膜融合活性を利

用した TAA ペプチドの効率のよい APC 細胞質内導入と、Eriss による TAA ペプチドの効率のよい小胞体移行を一挙に達成できる戦略を考案した。ニワトリ卵白アルブミン (OVA) 由来エピトープペプチド (SL8) の N 末端に Eriss を付加したペプチド (ML26) を封入した FL (FL-ML26) を作用させた APC においては、細胞表面の MHC class I 分子上に SL8 を極めて効率よく提示し、SL8 作用群、ML26 作用群、SL8 封入 FL (FL-SL8) 作用群と比較すると、高い抗原提示レベルをより長期間にわたって維持することができた (図 2)。また、FL-SL8 を免疫したマウスに OVA 発現腫瘍を攻撃接種したところ 10 例中 4 例において明らかな腫瘍増殖が観察されたのに対して、FL-ML26 免疫群では全例で腫瘍の完全拒絶が達成されるという強力なワクチン効果が発揮された (図 3)。以上のことから、FL および Eriss を併用した TAA ペプチドの小胞体ターゲティングシステムが、APC における抗原提示レベルの増強および抗原提示期間の延長に基づいてペプチドワクチン療法の有効性を大幅に増強できることが明らかとなった。

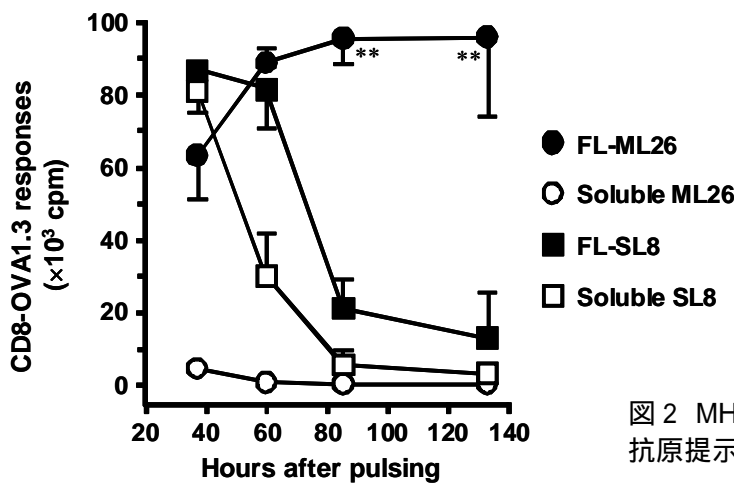


図 2 MHC class I 分子を介した抗原提示レベルおよび期間

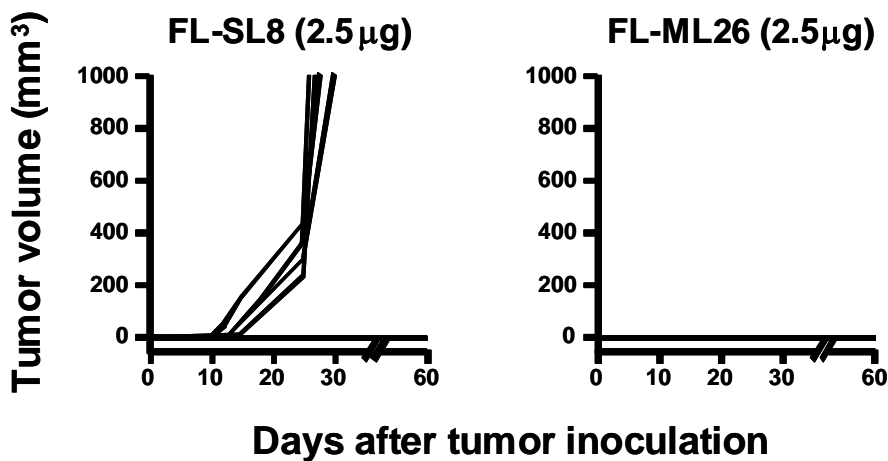


図 3 OVA 発現腫瘍に対する抗腫瘍効果

2) 膜融合リボソームの DNA ワクチンキャリアーとしての有用性評価

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こと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。そこで我々は、DNA ワクチンのこれら問題点を克服するために FL の応用を試み、FL を DNA ワクチンキャリアーとして用いた際の遺伝子発現効率および抗原特異的免疫誘導能を検討した。

まず、APCであるマクロファージ細胞株 (IC21) に OVA 発現プラスミドを単独、あるいはリポソーム、陽電荷リポソーム、FL に封入して導入したところ、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。また、導入した OVA 遺伝子の発現に伴う MHC class I 分子を介した抗原提示は、FL を用いて OVA 発現プラスミドを導入した IC-21 細胞においてのみ検出された。そこで次に、C57BL/6 マウス (H-2^b) の背部皮内に 50 μ g の OVA 発現プラスミド単独、またはその 1/10 量である 5 μ g の OVA 発現プラスミドを封入したリポソーム、陽電荷リポソーム、FL を隔週で 2 回免疫し、最終免疫 4 週間後に OVA 特異的 CTL の誘導効率ならびに移植した OVA 発現腫瘍に対する増殖抑制効果を検討した。その結果、OVA 発現プラスミド単独およびリポソームを用いて免疫した場合には、CTL 誘導は認められず、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検出されたにすぎなかった。一方、FL を用いて免疫した場合には、著しい CTL 活性の上昇が認められ、移植した OVA 発現腫瘍の増殖を顕著に抑制することができた (図 4)。

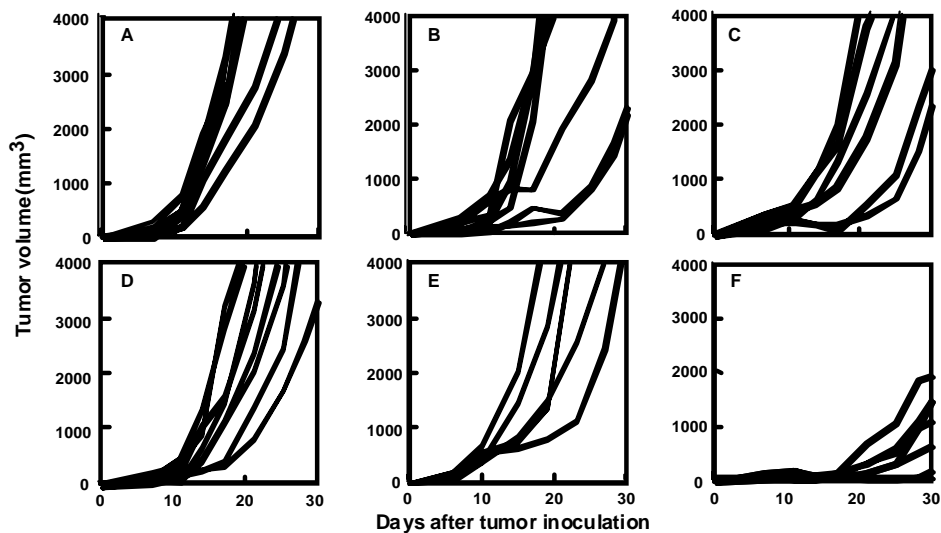


図 4 OVA 発現腫瘍に対する抗腫瘍効果

A; Saline, B; OVA 発現プラスミド単独, C; OVA 発現プラスミド封入陽電荷リポソーム, D; OVA 発現プラスミド封入リポソーム, E; β -galactosidase 発現プラスミド封入 FL, F; OVA 発現プラスミド封入 FL

CTL を主体とする腫瘍免疫応答の活性化には、APC への効率のよい抗原送達のみならず、APC 上に発現する共刺激分子を介した T 細胞への副刺激や IFN- γ や IL-12 などの Th1 型サイトカイン刺激が重要である。したがって、これらの APC 機能やサイトカイン産生の増強に繋がるアジュバント活性をワクチンに付与する戦略は、癌免疫療法の有効性向上に極めて有望である。そこで、FL を用いた DNA ワクチンのシステムアップを目的に、APC の Toll-like receptor 9 (TLR 9) を刺激することで APC の成熟、活性化を誘導する DNA 配列である CpG motif を 16 個有する OVA 発現プラスミド (pOVA-CpG16) を構築し、これを内封した FL (FL/pOVA-CpG16) のワクチン効果について検討した。

CpG motif を 13 個有するプラスミド (pOVA-CpG13) を内封した FL (FL/pOVA-CpG13) を免疫したマウスと比較して、FL/pOVA-CpG16 免疫群においては、OVA 特異的 T 細胞がより効率よく活性化されており、プラスミド中への CpG motif の追加がマウス生体内においてアジュバント活性を発揮しうることが明らかとなった。さらに OVA 発現腫瘍に対する増殖抑制効果を検討したところ、FL/pOVA-CpG16 免疫マウスにおける抗腫瘍効果は、FL/pOVA-CpG13、pOVA-CpG13、あるいは pOVA-CpG16 を免疫した群よりも優れていた (図 5)。これらの結果は、FL を用いた DNA ワクチンの効果増強に、封入する抗原発現プラスミドの CpG 配列数を増加させるアプローチが有効であることを示しており、今後、モデル抗原ではなく本来的に腫瘍細胞に発現する腫瘍関連抗原を発現するプラスミドを用いて、本システムの有効性を精査する予定である。

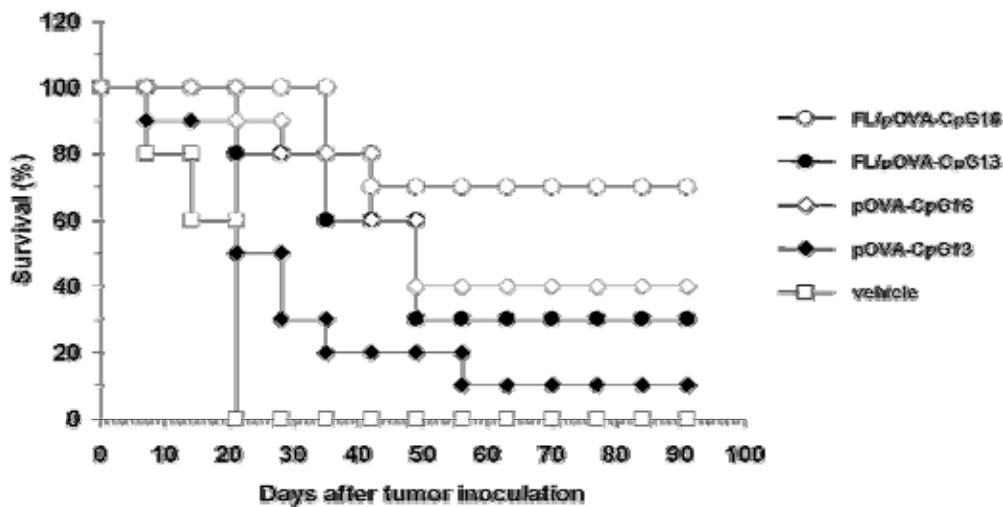


図5 OVA 発現腫瘍に対する抗腫瘍効果

3) 融合リボソームの蛋白ワクチンキャリアーとしての有用性評価

ウイルス感染細胞や腫瘍細胞における抗原の発現量は、遺伝的な安定性を有しているものではなく、外的因子によって絶えず変化するものである。また、ウイルス抗原が変異を起こすことにより、単一抗原の投与では十分な免疫応答を誘導できない可能性があり、これらがワクチン開発において克服すべき大きな課題であると考えられる。そこで、これらの問題点を打開しうる新たなワクチン戦略として、モデル腫瘍である B16BL6 メラノーマ細胞から凍結融解により得られた溶解物 (TCL) を内封した FL (FL/TCL) を調製・免疫することで、理論上全てのメラノーマ関連抗原を免疫原として投与することが可能な方法を考案し、本システムの有効性を評価した。

FL/TCL を *in vivo* に直接ワクチン投与する腫瘍拒絶実験では、単回免疫プロトコールにおいて顕著な抗腫瘍効果は認められなかったものの、三回免疫プロトコールにおいては FL/TCL 投与群で CFA/TCL 投与群よりも極めて強力な腫瘍生着抑制効果が認められた (図6)。さらに、*in vitro* にて FL/TCL を作用させることで TCL を導入した樹状細胞 (DC) をワクチン担体として投与する *ex vivo* 免疫プロトコールを用いて評価したところ、TCL で処理した DC を免疫した群と比較して、FL/TCL 処理 DC のワクチン投与ではわずか一回の免疫で劇的な抗腫瘍効果を誘導することが出来た。以上の結果より、FL によって TCL を免疫原として投与する方法論は、*in vivo* への直接投与のみならず、*ex vivo* プロトコールにおいても B16BL6 メラノーマ特異的な抗腫瘍免疫応答を強力に誘導できるアプローチであることが明らかとなった。本手法は、将来的に腫瘍ワクチンのみならず、ウイルス粒子そのものを封入した FL を調製することが出来れば、ウイルスワクチンとしても応用可能な優れた方法になり得ることが期待される。

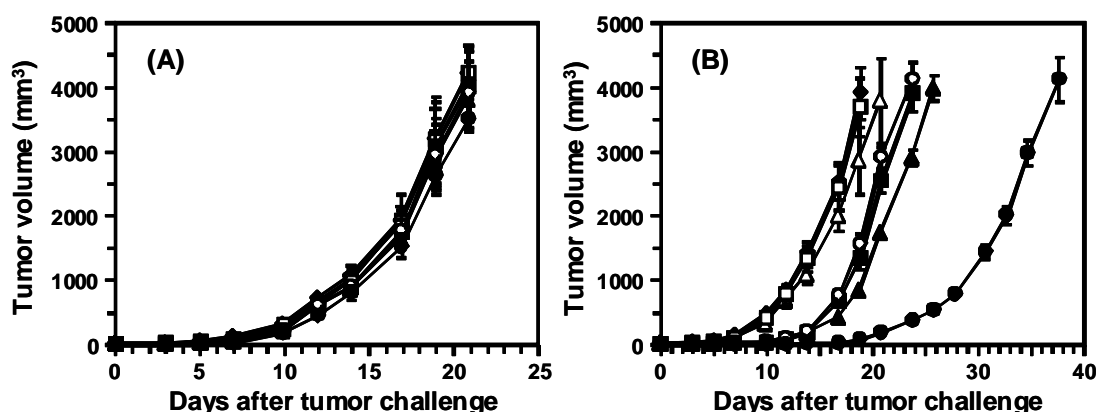


図 6 B16BL6 腫瘍に対する抗腫瘍効果

(A); 単回免疫プロトコール, (B); 3 回免疫プロトコール

●; FL/TCL 免疫群, ○; Lipo/TCL 免疫群, ■; empty FL + TCL 免疫群, □; empty FL 免疫群, ▲; CFA/TCL 免疫群, △; TCL 免疫群, ◆; PBS 投与群

4) 融合リポソームへのナノ粒子封入法の確立とその応用

抗原を内包したナノ粒子を APC の細胞質内に直接導入することができれば、持続的な抗原徐放によって細胞性免疫を効率よく誘導できる可能性がある。そこで本項では、FL へのナノ粒子封入法の確立を図るとともに細胞質へのナノ粒子送達を試みた。

“凍結乾燥空リポソーム法”を用いて粒子径 500 nm のモデルナノ粒子をリポソーム内に封入した。作製したリポソームの粒子径・表面電荷を測定した結果、粒子径がサイジングに用いたフィルターの孔径 (800 nm) より若干小さい 749 nm、表面電荷が空のリポソームとほぼ同じ -26.5 mV であったことから、リポソーム内にナノ粒子が封入されていることが示唆された (表 1)。事実、このリポソームを透過型電子顕微鏡により観察したところ、直径約 800 nm のリポソームの内水相に粒子径 500 nm のナノ粒子が封入されていることが確認された。そこで次に、このナノ粒子封入リポソームをセンダイウイルスと反応させて FL を作製したところ、FL の内水相にナノ粒子が封入されていることが透過型電子顕微鏡により確認され、さらに FL の表面にはセンダイウイルスの膜融合タンパク質由来するスパイク状の構造が認められた。さらにこの膜融合リポソームの粒子径・表面電荷を測定した結果、ナノ粒子封入リポソームよりも粒子径が 130 nm 増加し、表面電荷はセンダイウイルスとほぼ同じ -14.7 mV に変化していた (表 1)。以上、ナノ粒子封入 FL の作製方法を確立した。

表 1 ナノ粒子封入リポソーム及び膜融合リポソームの粒子径と表面電荷

Sample	Diameter (nm)	Z-potential (mV)
NP-Lipo	749.3 ± 8.6	-26.5 ± 1.1
NP-FL	880.1 ± 9.5	-14.7 ± 2.2
Sendai Virus	301.7 ± 2.0	-13.6 ± 1.3

さらに、緑色蛍光を発する直径 500 nm のナノ粒子を封入した FL を用いて、細胞質内へのナノ粒子導入を共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、1 細胞あたり 10 個前後のナノ粒子が細胞質に存在していることが確認された。また、FL によるナノ粒子の細胞内導入がエンドサイトーシスを介さないことを阻害実験ならびに透過型電子顕微鏡観察にて証明した。

「生分解性ナノ粒子を用いた免疫誘導とワクチン効果の検討」

5) 抗原を内包した γ -PGA ナノ粒子の特性評価

ワクチンキャリアーの設計においては汎用性や均一性が求められ、さらに将来的に実用化を考えた場合には保存性に優れていることが望ましい。そこで本項においては、蛋白質内包 γ -PGA ナノ粒子の徐放性や凍結乾燥による長期保存性を検討すると共に、内包蛋白質の活性変化に関する検討を試みた。

まず、生体内における蛋白質内包 γ -PGA ナノ粒子の安定性ならびに徐放性を予測するために、 γ -PGA NP/FITC-OVA 懸濁液を 37°C で攪拌した際の内包 FITC-OVA 放出量を経時的に測定した(図 7)。PBS 中においては、 γ -PGA ナノ粒子から内包 FITC-OVA が極めてゆっくりと放出され、10% FBS 存在下においても内包 FITC-OVA が完全に放出されるまでには約一ヶ月を要した。この結果から、 γ -PGA ナノ粒子が生体内で粒子として安定に存在し、内包蛋白質の徐放化粒子として機能しうる可能性が示唆された。

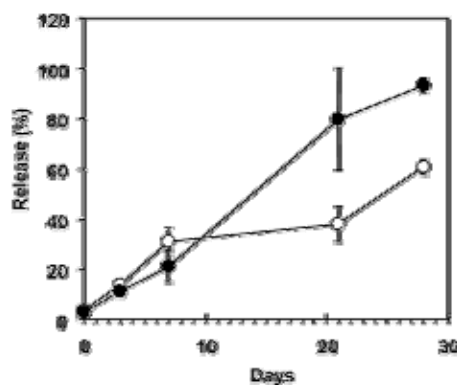


図 7 FITC-OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子からの FITC-OVA 放出プロファイル
○; 37°C PBS 中で攪拌, ●; 37°C 10% FBS 中で攪拌

次に、 γ -PGA ナノ粒子に内包されたカタラーゼの酵素活性をフリーのカタラーゼと比較することにより、内包蛋白質活性に及ぼす γ -PGA ナノ粒子調製法の影響について検討した。その結果、フリーのカタラーゼと比較して、 γ -PGA ナノ粒子に内包されたカタラーゼは 90%以上の酵素活性を保持しており、さらに凍結乾燥処理を行ったカタラーゼ内包 γ -PGA ナノ粒子においても 80%以上のカタラーゼ活性が検出された。この結果は、疎水性相互作用を駆動力として形成される γ -PGA ナノ粒子が内包物質に物理的・化学的なダメージをほとんど与えないことを示唆している。

6) 抗原蛋白質内包 γ -PGA ナノ粒子の癌ワクチン療法への応用

現在、臨床試験が進められている癌ワクチン療法プロトコールにおいては、フロイント不完全アジュバント (Freund's incomplete adjuvant; IFA) を用いて TAA をエマルジョン化し、TAA の生体内安定化と徐放化を達成するアプローチが広く用いられているが、本手法は抗原特異的な CTL の誘導効果に乏しく、また投与局所に硬結や紅斑などの副作用を招くという問題点を抱えている。一方、APC は直径 50 nm ~ 3 μ m の粒子状物質を効率よく取り込む性質を有していることが知られており、APC への抗原送達効率の促進という観点からは TAA を微粒子キャリアーに内包して投与する DDS 戦略が有望である。そこで本項では、マウス腫瘍モデルを用いて γ -PGA ナノ粒子の癌ワクチンキャリアーとしての有効性ならびに安全性を評価した。

まず、モデル抗原として OVA を内包した γ -PGA ナノ粒子をマウスに免疫し、その後 OVA 発現腫瘍 (E.G7-OVA 腫瘍) を攻撃接種したところ、現存する最強の CTL 誘導アジュバントである CFA を適用した群を遥かに上回る腫瘍生着抑制効果ならびに延命効果を認めた(図 8)。さらに、CFA を適用して 100 μ g OVA を免疫した群と比較して 10 μ g の OVA を γ -PGA ナノ粒子にて免疫した群において優れた有効性が認められたことから、 γ -PGA ナノ粒子は癌ワクチン療法における投与抗原量を劇的に低減できる優れたワクチンキャリアーになり得る可能性が示唆された。続いて、高い肺転移能を有する B16-OVA 細胞を用いて、治療的投与プロトコールによる OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子の有効性を評価したところ、CFA 適用群よりも強力な肺転移抑制効果が確認された(図 9)。

以上の結果から、 γ -PGA ナノ粒子は予防・治療の両プロトコルにおいて有効性を発揮する優れたワクチンキャリアーであることが明らかとなった。

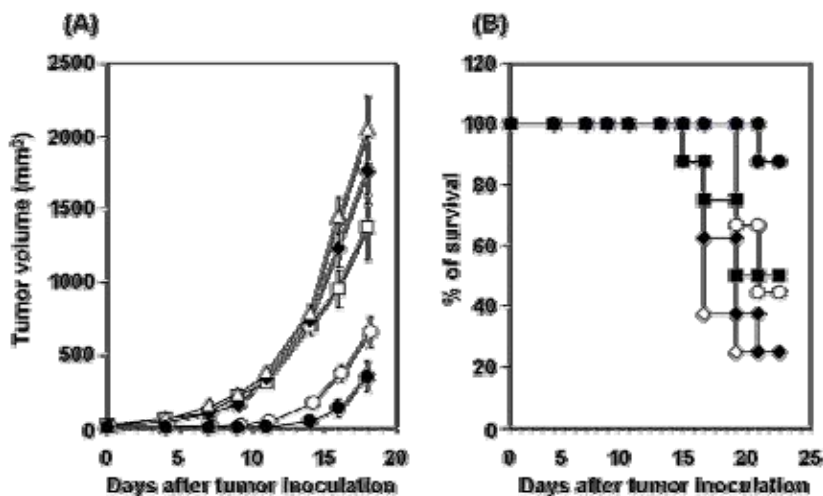


図 8 E.G7-OVA 腫瘍に対する抗腫瘍効果

(A); 腫瘍体積変化, (B); 生存率

●; OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子免疫群 (100 μ g OVA), ○; OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子免疫群 (10 μ g OVA), □; OVA/CFA 免疫群 (100 μ g OVA), ◆; OVA 溶液免疫群 (100 μ g OVA), △; PBS 投与群

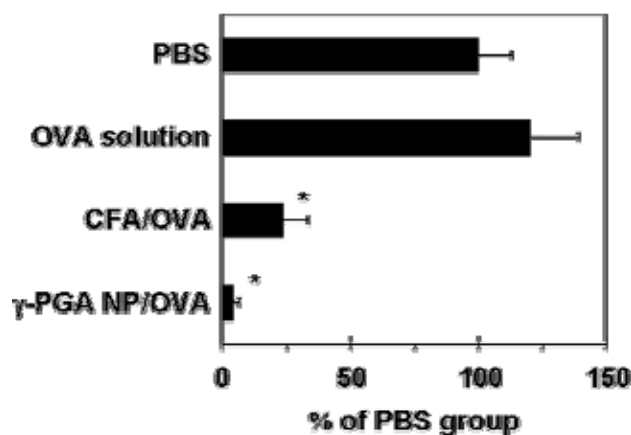


図 9 B16-OVA 腫瘍に対する転移抑制効果

そこで次に、OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子を免疫したマウスにおける OVA 特異的 CTL 活性を ^{51}Cr -release assay により評価した。その結果、OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子を免疫したマウスの脾細胞中には、CFA/OVA 免疫群をも凌ぐ非常に強力な OVA 特異的 CTL 活性が検出された (図 10)。さらに、25 μ g OVA を γ -PGA ナノ粒子にて免疫した群において、その 4 倍量の OVA を免疫した CFA 適用群よりも強い細胞傷害活性が検出され、 γ -PGA ナノ粒子が優れた CTL 誘導能を有する抗原送達キャリアーであることが明らかとなった。また、OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子を免疫したマウスの抗 E.G7-OVA 腫瘍効果が、抗 CD8 抗体の投与による CD8 陽性細胞の枯渇によって減弱したことから、図 8 および図 9 で示した強力な抗腫瘍活性が OVA 特異的 CTL の誘導促進に基づくことも確認された。

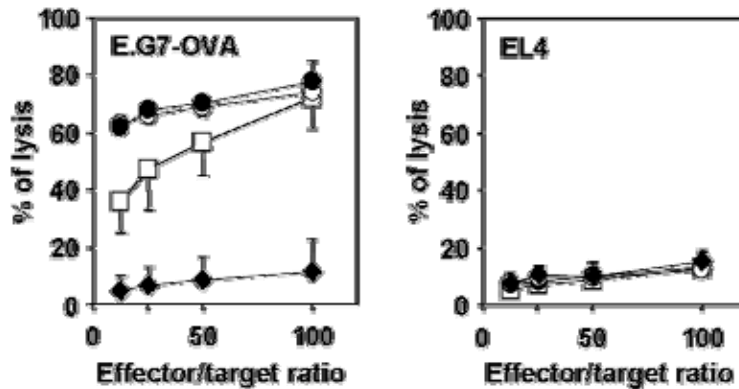


図 10 OVA 特異的 CTL 活性の評価

●; OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子免疫群 (100 μ g OVA), ○; OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子免疫群 (25 μ g OVA), □; OVA/CFA 免疫群 (100 μ g OVA), ◆; OVA 溶液免疫群 (100 μ g OVA)

さて、CFA は現存する最強の CTL 誘導アジュバントとして知られるものの、投与局所において極度の炎症反応を誘導してしまうために人体への適用は不可能である。一方、 γ -PGA は天然物由来の食用高分子であることから、安全性に優れたワクチンキャリアーになり得るものと期待される。そこで次に、 γ -PGA NP の起炎性ならびに組織傷害性を評価するために、投与部位を病理組織学的に観察したところ、CFA や IFA を投与したマウスの皮下組織では激しい炎症反応が誘導されていたのに対して、 γ -PGA ナノ粒子は投与局所にほとんど傷害を与えることなく、炎症性細胞の浸潤もほとんど認められなかった (図 11)。

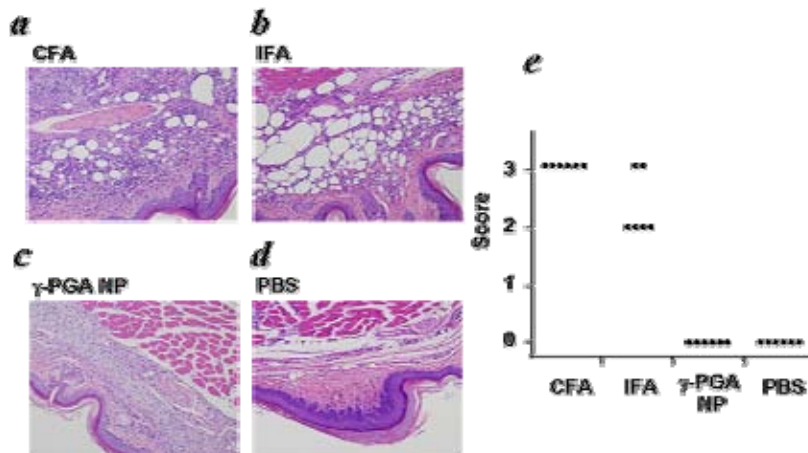


図 11 皮下投与における局所炎症反応の評価

(a) ~ (d); 投与 1 週間後の皮膚病理組織像

(e); 病理組織学的スコア (0, no; 1, weak; 2, moderate; 3, severe)

また、 γ -PGA ナノ粒子をマウスに尾静脈内投与する急性毒性試験を行ったところ、PBS を投与したコントロール群と比較して、 γ -PGA ナノ粒子を 1 mg/mouse で投与した群では、投与 24 時間後まで GOT 値・GPT 値 (肝障害マーカー) およびクレアチニン値 (腎障害マーカー) の上昇は全く認められなかった。また、 γ -PGA ナノ粒子を 10 mg/mouse という高用量で投与したマウスでは、投与 6 時間後においてクレアチニン値に一過性の上昇が認められたが、24 時間後には PBS 投与マウスと同レベルにまで回復していた。さらに、これらのマウスから投与 24 時間後に回収した肝臓・腎臓・脾

臓・肺の病理組織学的所見では、 γ -PGA ナノ粒子を取り込んだ貪食系細胞の腫脹が認められたものの、いずれの臓器においても明らかな組織傷害は観察されなかった。

以上の結果は、 γ -PGA ナノ粒子が有効性のみならず安全性にも優れた抗原送達キャリアーであることを示しており、将来的に粒子を構成する両親媒性 γ -PGA の分子量や親疎水バランスを最適化することによって単位粒子あたりの蛋白質内包量を向上させることが出来れば、キャリアーの投与量の削減に基づいたさらに有用な抗原送達システムが構築可能であると考えている。

7) 抗原蛋白質内包 γ -PGA ナノ粒子の抗原特異的免疫誘導機序の解明

一般に、TAA 蛋白質をコンポーネントワクチンとして投与する癌免疫療法においては、APC が、
 □ 投与部位において TAA 蛋白質を捕捉し、
 □ その TAA 蛋白質からプロセッシングしたエピトープペプチドを MHC 分子を介して細胞表面に提示し、
 □ 近傍の所属リンパ組織へと移行して T 細胞を TAA 特異的に感作・活性化する、
 □ ことによって腫瘍免疫の誘導・増強が達成される。そこで本項では、これら□～□の免疫イベントに対する γ -PGA ナノ粒子の効果を解析することによって、癌ワクチンキャリアーとしての γ -PGA ナノ粒子の作用機序の解明を試みた。

まず、生体内で最も強力な APC である DC による γ -PGA ナノ粒子の捕捉性を *in vitro* において検討した。その結果、FITC-OVA 溶液の適用では細胞内への取り込みが認められない低用量の条件においてさえ、FITC-OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子をパルスした DC の細胞内にはスポット状に多数の蛍光が観察された (図 12)。また、 γ -PGA NP/FITC-OVA の DC による捕食は低温条件下において阻害されたことから、エンドサイトーシス経路を介した取り込み機構であることが示唆された。

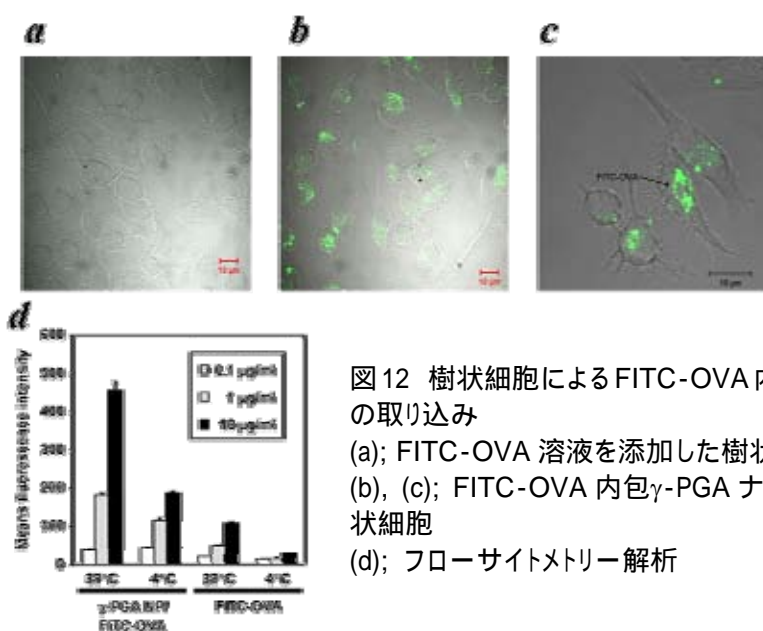


図 12 樹状細胞による FITC-OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子の取り込み
 (a); FITC-OVA 溶液を添加した樹状細胞
 (b), (c); FITC-OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子を添加した樹状細胞
 (d); フローサイトメトリー解析

これらの結果は、TAA 蛋白質を内包した γ -PGA ナノ粒子の *in vivo* 投与は、投与組織部位における TAA 蛋白質の拡散を抑制するのみならず、そこに常在する APC への TAA 送達量を飛躍的に改善できることを示唆するものである。

抗原特異的な免疫応答が誘導されるためには、単に抗原が APC によって取り込まれるのみではなく、APC によって細胞内で適切にプロセッシングされ、MHC 分子を介して抗原提示される必要がある。そこで次に、OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子を取り込ませた DC において、OVA のエピトープペプチドへのプロセッシングならびに MHC 分子を介した T 細胞への抗原提示の効率を評価した。OVA 溶液、あるいはフェニルアラニンを導入していない直鎖状の γ -PGA と OVA の混合溶液をパルスした DC では、50 μ g/ml の OVA 用量においてもほとんど抗原提示が認められなかったのに対して、OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子適用 DC では上述の顕著な抗原取り込みを反映して、OVA 用量依存的に MHC class I および class II 分子を介した OVA ペプチド提示レベルの増大が観察された

(図 13)。また、これらの DC の細胞生存率を MTT 法により評価したところ、いずれの群においても細胞傷害性は殆ど認められなかった。これらのことから、抗原分子を γ -PGA ナノ粒子に内包することで、細胞傷害性を示すことなく DC の MHC class I/II 両抗原提示経路へと送達可能であることが明らかとなった。

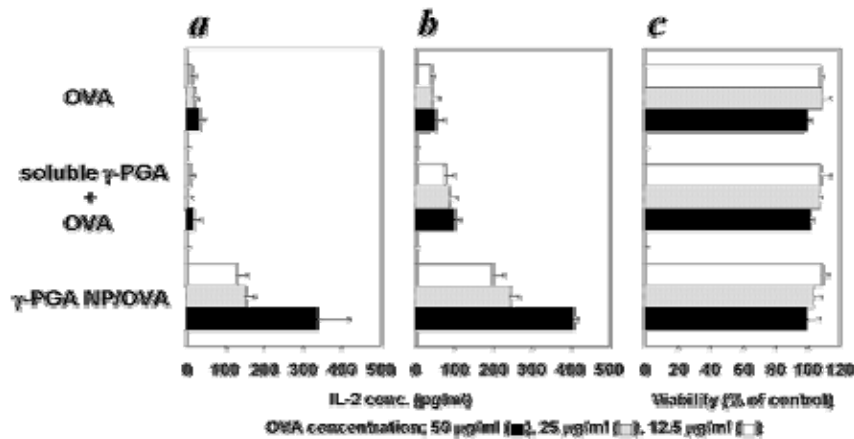


図 13 OVA パルスした樹状細胞における抗原提示レベル

- (a); MHC class I 分子を介した抗原提示レベル
- (b); MHC class II 分子を介した抗原提示レベル
- (c); 細胞傷害性

さて、腫瘍免疫で中心的なエフェクター細胞として機能する CD8 陽性 CTL を活性化するためには、APC による MHC class I 分子を介した抗原提示が必須であり、一般的に MHC class I 経路に送達される抗原は細胞質内で発現する内在性蛋白質とされている。一方、エンドサイトーシスによって取り込まれた外来性抗原は、主に MHC class II 分子を介して細胞表面に提示され、CD4 陽性ヘルパー T 細胞の活性化を誘導する。すなわち、図 12 と図 13 の結果から判断すると、エンドサイトーシスを介して取り込まれた γ -PGA ナノ粒子が何らかの機序によって細胞質へと移行し、 γ -PGA ナノ粒子に内包された抗原があたかも内在性抗原としてプロセッシングされていることが推測される。

そこでこれらを視覚的に検証するために、FITC-OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子をパルスした DC を用いて、初期・後期末それぞれマーカーである SNX-1 あるいは STX-7 に対する免疫染色を行うことで、 γ -PGA ナノ粒子の細胞内動態を経時的に観察した。その結果、DC に取り込まれた FITC-OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子は、パルス 25 分後では初期エンドソーム内に局在していたが、120 分後には大部分が初期エンドソームおよび後期末エンドソームとは異なる部位に存在していた (図 14)。以上のことにより、 γ -PGA ナノ粒子は、DC によってエンドサイトーシスを介して取り込まれ、初期エンドソームから後期末エンドソームへと移行する過程で、何らかの機序によって細胞質に移行することにより、内包抗原をあたかも内在性抗原として MHC class I 抗原提示経路へ送達することが示唆された。さらに、実際に細胞質へ移行した γ -PGA ナノ粒子から抗原が放出されることを確認するために、TexasRed 標識 OVA を内包した FITC 標識 γ -PGA ナノ粒子 (二重蛍光標識ナノ粒子) を用いて細胞内での抗原と粒子の局在を解析した。その結果、作用 2 時間後では抗原と γ -PGA ナノ粒子の局在が一致した部分が殆どであったのに対し、粒子作用 16 時間後では TexasRed 標識 OVA 由来の赤色の蛍光が細胞質全体に拡散した像が得られた (図 15)。したがって、 γ -PGA ナノ粒子は内包抗原を細胞質にて徐々に放出し、内在性抗原として MHC class I 抗原提示経路へと抗原を送達可能であることが明らかとなった。

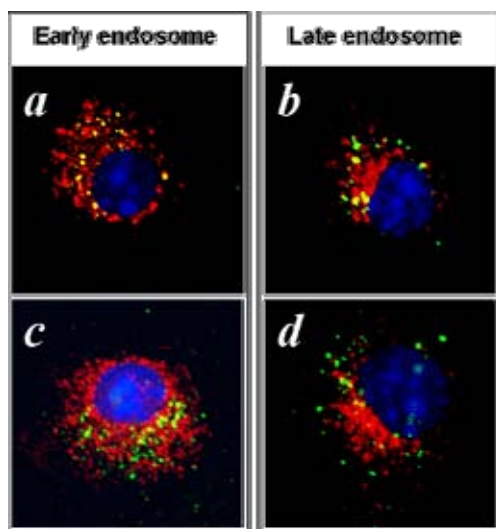


図 14 樹状細胞に取り込まれた FITC-OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子の挙動

- (a); 粒子添加 25 分後の初期エンドソーム染色像
- (b); 粒子添加 120 分後の初期エンドソーム染色像
- (c); 粒子添加 25 分後の後期エンドソーム染色像
- (d); 粒子添加 120 分後の後期エンドソーム染色像

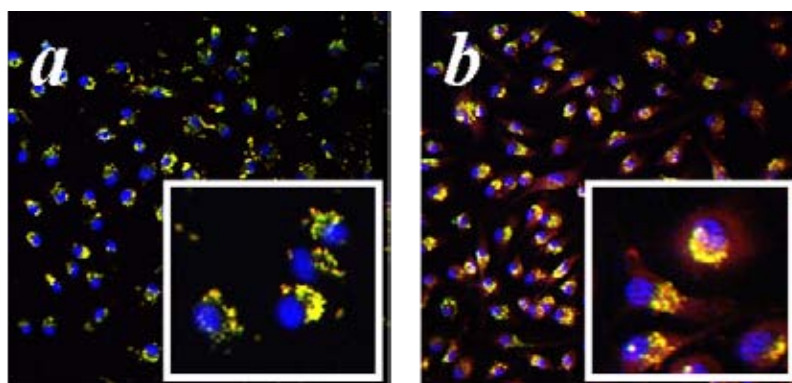


図 15 樹状細胞に取り込まれた二重蛍光標識ナノ粒子の挙動

- (a); 粒子添加 2 時間後
- (b); 粒子添加 16 時間後

次に、マウスに投与された γ -PGA NP の APC による取り込みと、その後の所属リンパ組織への遊走について検討した。その結果、FITC-OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子を皮下投与したマウスの所属リンパ節には、数日間にわたって多数の蛍光スポットが観察されたのに対して、同量の FITC-OVA を CFA によって免疫した群では FITC-OVA 由来の蛍光は全く観察されなかった (図 16)。さらに、APC マーカーである MHC class II を特異的に認識する抗-I-A^b 抗体を用いて所属リンパ節における FITC-OVA 陽性細胞の同定を試みたところ、それらの分布は MHC class II 陽性 APC のリンパ節内局在と一致した (図 17)。以上の結果より、抗原蛋白質を内包した γ -PGA ナノ粒子は、*in vivo* においても投与局所の APC に効率よく貪食され、その抗原捕食 APC が所属リンパ節へと遊走することが強く示唆された。

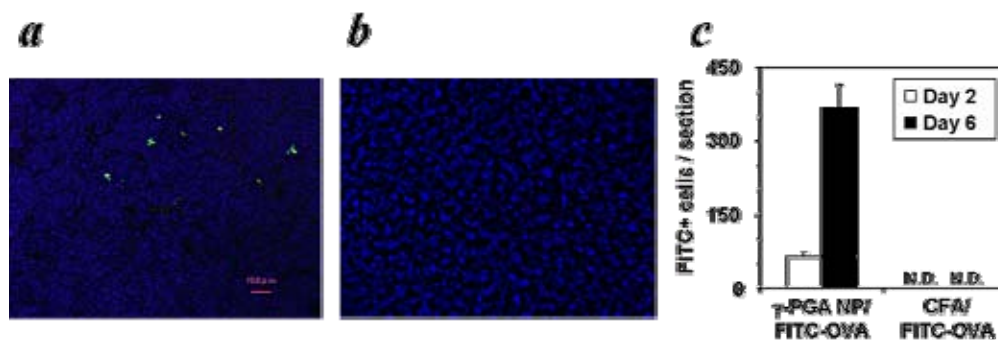


図 16 FITC-OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子の投与部位から所属リンパ節への移行
 (a); FITC-OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子投与群の所属リンパ節像
 (b); FITC-OVA/CFA 投与群の所属リンパ節像
 (c); 所属リンパ節における FITC 陽性細胞数

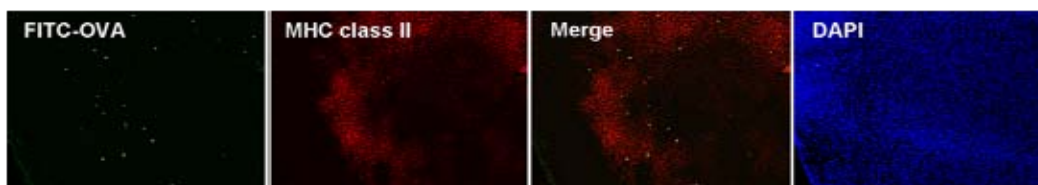


図 17 所属リンパ節における FITC-OVA 内包 γ -PGA ナノ粒子と APC の局在

以上の結果を総合すると、 γ -PGA ナノ粒子は内包抗原蛋白質を免疫系の司令塔である APC の MHC class I および class II 提示経路へ極めて効率よく送達できる DDS キャリアーであり、これらの効果を反映して、免疫誘導の場であるリンパ組織へと遊走する抗原蛋白質内包 γ -PGA ナノ粒子を取り込んだ APC の数が増大することによって、CTL を主体とする強力な抗原特異的免疫応答を誘導することが明らかとなった。

(2)研究成果の今後期待される効果

DDS 研究は、バイオテクノロジーや材料工学などの研究成果を医薬品創製に合致する基盤技術へと展開させることによって、より効果的で安全な薬物療法の実現を目指す学問として進化し続けてきた。現代ではゲノム、プロテオーム解析などのライフサイエンス研究の進展によって低分子有機化合物のみならず核酸や蛋白質など生体高分子の医薬品化が注目されており、これまで以上に高度な DDS 技術の開発が要求されている。この点を踏まえると様々な技術的進歩を取り入れることによって発展してきた DDS 研究に、ナノテクノロジーという超微小加工技術を導入することは必然的な流れであると考えられる。このような流れに呼応するかのように、DDS は既に医・薬・工学分野が連携して推進するナノテクノロジーの共通目標として、近年では世界的に注目されており、DDS 分野におけるナノテクノロジーの用途探索と産業化を目指した研究が盛んに行われている。

本研究では、DDS に立脚したワクチンキャリアーの開発におけるナノテクノロジーの有用性について検証し、「膜融合リポソームによる細胞障害性 T 細胞誘導能評価とその最適化」においては、膜融合型ナノキャリアーである FL に内包する抗原として CpG 付加プラスミド、あるいは TCL を用いることで、抗原特異的 T 細胞の効率的な活性化とそれに伴う強力な抗腫瘍効果を誘導可能であることを示した。本知見は、腫瘍免疫誘導メカニズムをベースに T 細胞活性化を促進するような工夫を加えた抗原分子、あるいは抗原発現遺伝子をキャリアーに組み込むことで癌ワクチン療法の有効性増強や適用拡大に貢献できることを示すものである。今回は、癌ワクチン療法を一例に示したが、

様々な疾患に対して発症メカニズムをベースにしたキャリアー設計が進展し、より有効な薬物治療法が開発されることを期待する。さらに、FLを応用した細胞質内へのナノ粒子送達法は、今後続々と開発されるであろう種々の機能性粒子に適用可能な方法論であり、その用途はますます拡大していくものと考えられる。

また、「生分解性ナノ粒子を用いた免疫誘導とワクチン効果の検討」においては、自己組織化 γ -PGA ナノ粒子が癌ワクチン療法における抗原蛋白質送達キャリアーとして非常に優れた特性を有することを見出した。MHC class I 抗原提示機序を解析する過程において、 γ -PGA ナノ粒子が両親媒化 γ -PGA の性質に由来すると推測される細胞質移行能を発揮することを示した。この両親媒化高分子の細胞質移行機序の解析は、今後微粒子ワクチンキャリアー設計の重要な指針になるものであり、今回示した癌ワクチンキャリアーとして応用した際の動物モデルでの知見を基に、現在臨床治験への展開を立案しているところである。

近年の分子生物学やバイオテクノロジーの進歩は目覚しく、生体高分子を有効な医薬品として応用しようとする試みは重要性を増していくことが予想される。本研究で示した知見を基に、より多くの情報を集積することで、ナノテクノロジーを用いた革新的な DDS 製剤が考案され、さらには実用化へと繋がることを期待する。

3.4 HIV-1 抗原含有生分解性ナノ粒子のアカゲザルにおける免疫誘導能および攻撃接種に対する感染防御能の評価(京都大学ウイルス研究所 三浦グループ)

(1)研究実施内容及び成果

マウスの免疫実験によって、エイズウイルスの標的抗原を表面に固定化もしくは内部に包含した生分解性ナノ粒子の優れた免疫誘導能が確認された。我々は平成 18 年度より本研究チームに参加し、simian immunodeficiency virus(SIV)と HIV-1 のキメラウイルス(SHIV)のサルへの感染動物モデルを用いて、生分解性ナノ粒子のワクチン効果の評価を行った。また、平成 19 年度にはウイルス抗原含有生分解性ナノ粒子の治療用ワクチンとしての可能性について、SHIV 感染ザルを用いた実験により検討した。

1) HIV-1 gp120 内包生分解性ナノ粒子(gp120-NP)のサルにおける免疫誘導能の解析

平成 17 年度までに、マウス免疫実験により、gp120 内包ナノ粒子(gp120-NP)が優れた免疫誘導効果を示すことが明らかとなった。そこでまず我々は、よりヒトに近い実験動物であるアカゲザルにおいて、マウスと同様に gp120-NP によって免疫誘導されるかどうかをサル免疫実験により明らかにすることを目的とした。

マウスの免疫実験では、gp120-NP の 1 回経鼻免疫において最も強い細胞性免疫の誘導が得られていることから、サルにおいても少ない回数での免疫誘導効果を期待した。具体的には gp120-NP を経鼻免疫で 1 回免疫し、その後 3 週間での免疫反応を検討し、その間に特異免疫の誘導が認められない場合には、4 週目に同様の経鼻免疫を行うというものである。

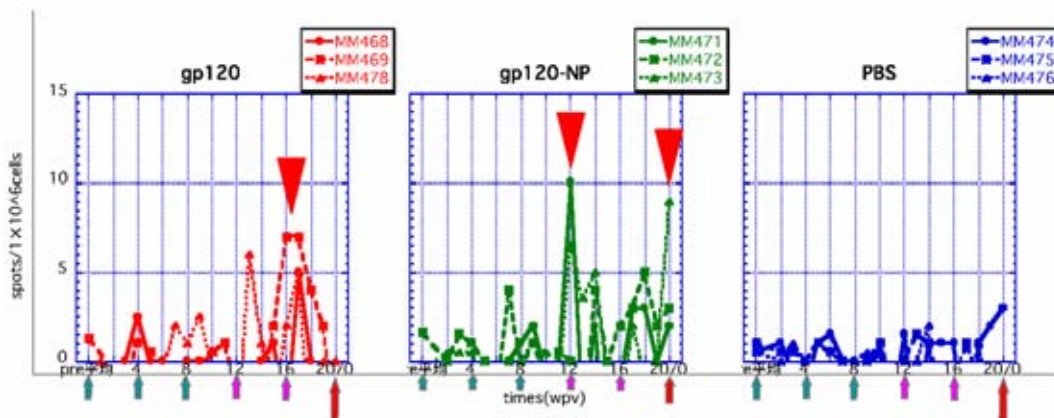
特異免疫の誘導の判断基準としては、ELISPOT による抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の検出、抗原特異的細胞増殖活性(Th レスポンス)の測定(細胞性免疫)および ELISA による血漿中の特異抗体の検出(体液性免疫)の内、少なくとも 2 種で特異免疫反応が認められることとした。サル群としては、gp120 単独接種群 3 頭(MM468、MM469、MM478)、gp120-NP 接種群 3 頭(MM471、MM472、MM473)、コントロール(PBS のみ)群 3 頭(MM474、MM475、MM476)の計 3 群 9 頭を用いた。接種する抗原量としては、1 回につき 100 μ g とした。

経鼻接種で 3 回(4 週間隔;初回免疫から 12 週目まで)免疫を行ったが、12 週目で gp120-NP 接種群 2 頭(MM471、MM473)で ELISPOT による gp120 特異的 IFN- γ 産生細胞の増加が認められたのみであった(図 1 上)。そこで、さらに皮下接種による追加免疫を 2 回(初回免疫から 12 週目と 16 週目)行うこととした。追加免疫に用いる抗原量は 1 回につき 300 μ g とした。追加免疫 1 回後の 2 週(初回免疫から 14 週目)以内に gp120-NP 接種群 3 頭中 2 頭で ELISPOT による抗原特異的

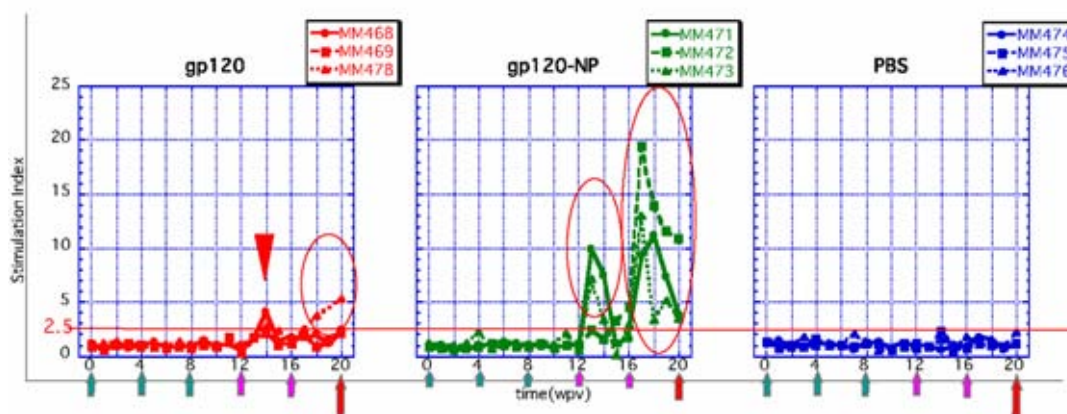
IFN- 産生細胞が検出され、Th レスポンスの上昇が認められた(図 1 下)。追加免疫 2 回目の後では、gp120-NP 接種群全頭で Th レスポンスの有意な上昇が認められた。

gp120 単独接種群では、追加免疫 1 回目の後、1 週目(初回免疫から 13 週目)で 1 頭(MM478)で ELISPOT による抗原特異的 IFN- 産生細胞が検出され、追加免疫 2 回目の後(初回免疫から 17 週目)全頭で ELISPOT による抗原特異的 IFN- 産生細胞数の増加が認められた(図 1 上)。また、マウスでは gp120 に対する抗体産生は全く認められなかったのに対して、サルでは追加免疫後、gp120 に対する IgG および IgA が血漿中に検出され、gp120 単独接種群よりも gp120-NP 接種群の方が有意に抗体産生量が多かった。以上のことから、マウスとサルでは NP 免疫に対する反応性が異なること、gp120-NP 接種および gp120 単独接種のいずれにおいても、経鼻での 3 回接種では特異免疫の誘導は不十分であり、その後の皮下接種でのブースターが必要であることがわかった。誘導された免疫は、gp120 単独接種では、gp120 特異的 IFN- 産生細胞の増加が顕著であったが、gp120-NP 接種群では、さらに Th レスポンスや抗体応答もより高く認められたことから、誘導された免疫能に差異があり、gp120-NP 接種群では、gp120 単独接種群に比較してより多数の免疫機構が誘導されることが示唆された。

ELISPOTによるgp120特異的IFN- γ 産生細胞数の変動



Thレスポンスによるgp-120特異的細胞増殖活性の変動



$$SI \text{ 値} = \frac{\text{抗原刺激(env gp120) - negative (medium only)}}{\text{抗原刺激なし(PBMC only) - negative (medium only)}} \text{ (stimulation index)}$$

図 1. 免疫期間中の gp120 特異的 IFN- 産生細胞数(上)と Th レスポンス(下)

2) SHIV 攻撃接種に対する感染防御能の評価

gp120-NP を 4 週間隔でサルに経鼻で 3 回、皮下で 2 回投与すると、免疫されたサルにおいて抗原特異的な細胞性および体液性免疫が誘導されることが明らかとなったので、次にこれらの免疫ザルに SHIV を攻撃接種することにより、その感染防御能の評価を行った。具体的には、初回免疫から 20 週後に SHIV-KU2 株 1×10^5 TCID₅₀ を経静脈接種した。接種後、血漿中ウイルス量の測定、ELISPOT による抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の検出(env-gp120、gag-p27)、抗原特異的細胞増殖活性(Th レスポンス)の測定(細胞性免疫)(env-gp120、gag-p27)、PA 法による血漿中の特異抗体の検出(抗体産生能)および血液中免疫細胞群(CD3、4、8、20、95、28)の解析を行った。

血漿中のウイルス量は、コントロール群では SHIV-KU2 接種後 1 週でピーク(10^6 - 10^7 copies/ml)を示したが、gp120-NP 接種群および gp120 単独接種群ではピークは攻撃接種後 2 週目でいずれも 10^8 copies/ml 以上であった(図 2)。その後の血漿中ウイルス量も、gp120-NP 接種群では他の群に比して 100 倍程度高値を持続的に維持した。血液中の CD4 陽性 T 細胞数の割合は、gp120-NP 接種群と gp120 単独接種群では、いずれも攻撃接種後 1~3 週目にかけて大幅に減少(攻撃接種前の 20%以下)した(図 3)。gp120-NP 接種群の 3 頭中 1 頭(MM471)ではその後徐々に回復したが、残りの 2 頭と gp120 単独接種群では全頭で攻撃接種後 12 週目においてもコントロール群に比較して低値を示した。その他の免疫細胞マーカーの解析から、特にウイルス量が高く、CD4 陽性 T 細胞数が減少していた MM472 と MM473 ではセントラルメモリー CD4 細胞(CD4+/95+/28+)が有意に減少していることが示された。抗体応答についても、gp120 単独接種群および gp120-NP 接種群では、コントロール群に比較して立ち上がりが遅れる傾向を示し、特にウイルス量が高く、CD4 陽性 T 細胞数が減少していた MM472 と MM473 では抗体産生量も低かった。以上の結果から、gp120-NP 接種群および gp120 単独接種群の両群ともに SHIV 感染に対する感染防御効果は認められず、逆にウイルス増殖を増強することが示唆された。

抗原特異的 IFN- γ 産生細胞は、env-gp120 に特異的なものが gp120-NP 接種群および gp120 単独接種群の攻撃接種後 1-3 週目で増加を示し、コントロール群では攻撃接種後 4 週目以降で増加した(図 4)。gag-p27 に特異的なものは、攻撃接種後早期(1~2 週目)に gp120-NP 接種群および gp120 単独接種群で増加し、3 週以降にコントロール群で増加した。Th レスポンスについては、抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数の変動とほぼ同様の動きを示した。

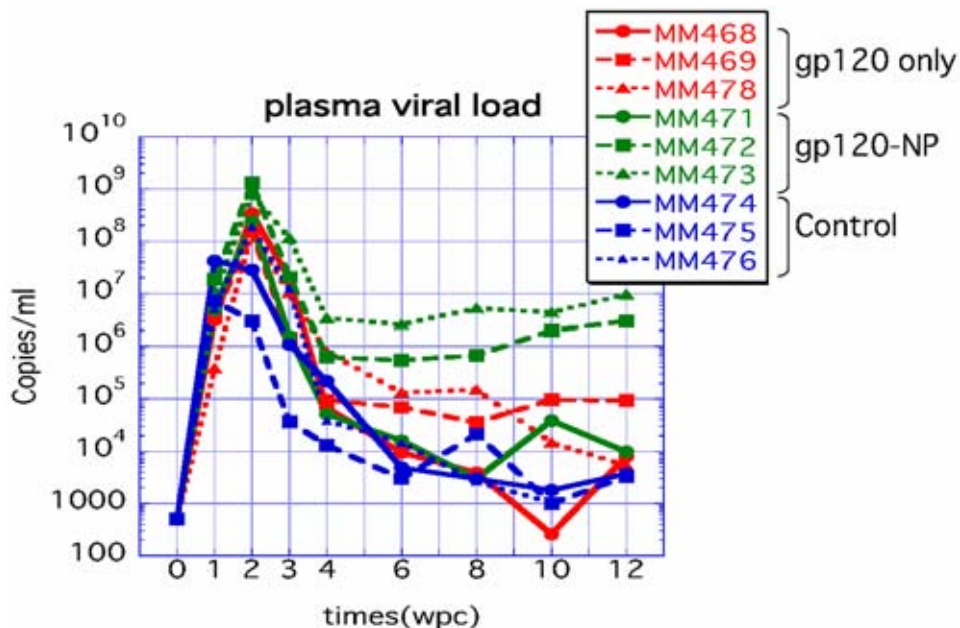


図 2. SHIV 攻撃接種後の血漿中ウイルス量

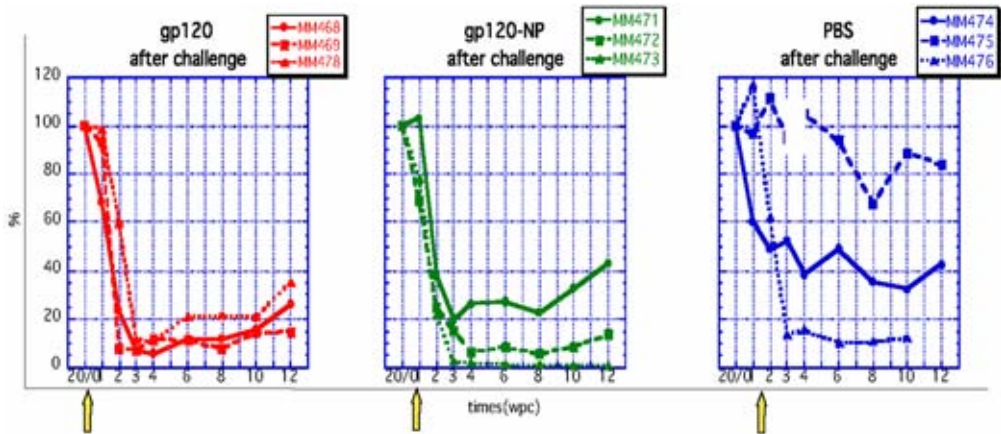


図 3. SHIV 攻撃接種後の CD4 陽性 T 細胞数

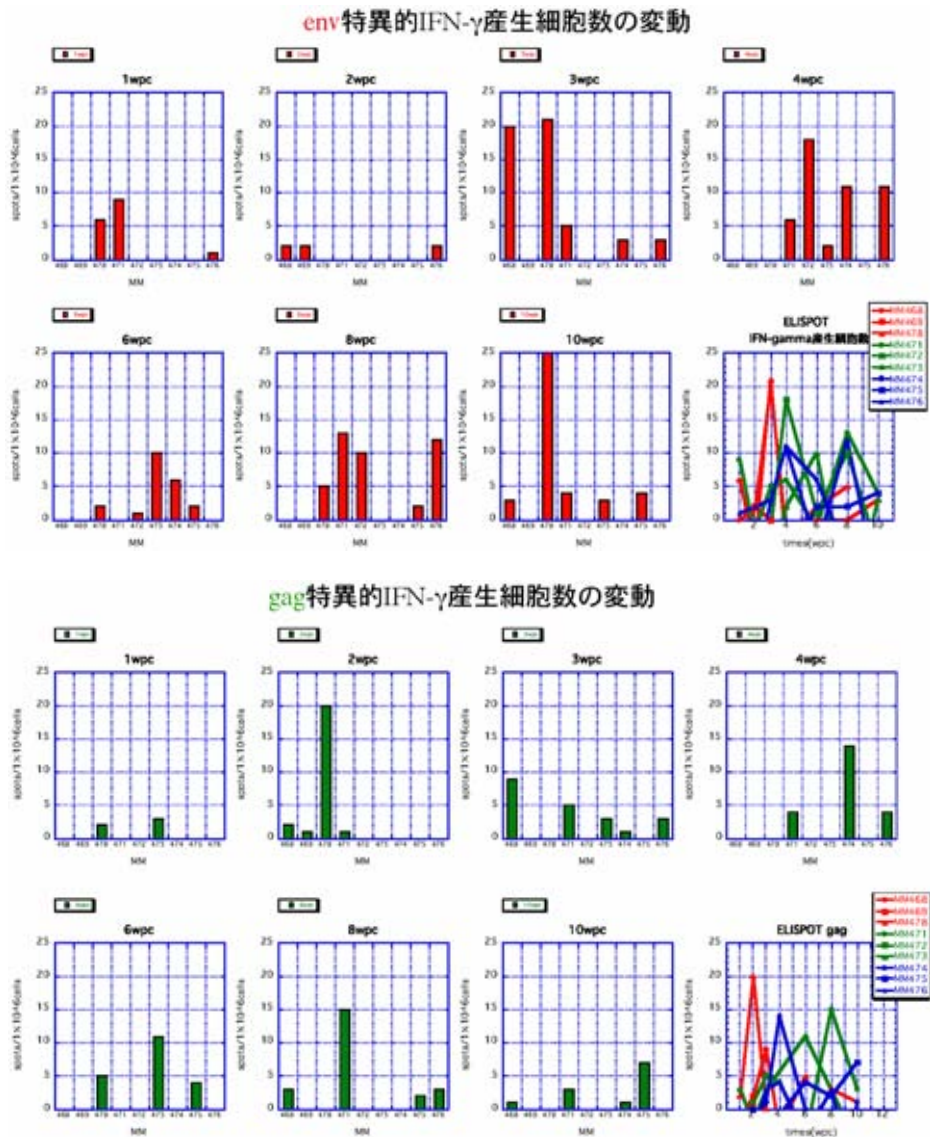


図 4. SHIV 攻撃接種後の抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数の変動 (上:env、下:gag)

このことから、gp120-NP 接種群と gp120 単独接種群では、誘導された免疫により env 特異的な反応が攻撃接種後初期に起こったと考えられた。しかしながら、この反応では攻撃接種ウイルスの感染を防御できず、コントロール群に比較して血漿中のウイルス量が増加していることから、ウイルス増殖を増強させてしまった可能性が示唆された。コントロール群では、gag 特異的な免疫反応が攻撃接種後早期に認められていることより、ウイルス感染の防御あるいは増殖の抑制には gag 特異的な免疫反応を誘導することが必要なのかもしれない。

本実験の結果から、サルにおいても gp120-NP は優れた免疫誘導効果を示すことが明らかとなった。しかしながら、内包した gp120 抗原に対する免疫は感染防御には有効でないことが示唆された。

3) ウイルス抗原含有生分解性ナノ粒子の SHIV 感染ザルに対する治療用ワクチンとしての効果の検討

平成 18 年度の gp120-NP 免疫によるサルでの感染防御実験により、env 特異的な免疫応答は感染防御には有効でないことが示唆された。また、ごく最近の報告でエイズウイルスの抑制には env ではなく gag 特異的な免疫応答が重要である可能性が指摘された。そこで、平成 19 年度は SHIV 感染ザルに gag-p27 抗原含有生分解性ナノ粒子を接種することにより、感染後の体内ウイルス量を抑制することができるかどうか、抗原含有生分解性ナノ粒子の治療用ワクチンとしての利用効果について検討を行った。

gag-p27 抗原含有生分解性ナノ粒子は、p27 抗原の固定化率が良いとの理由から p27 表面固定型 NP 粒子 (gag-NP) を用いた。抗原量としては、1 回の接種に 300 μ g を用い、2 回 (0, 2 週) 皮下接種により免疫することとした。また、抗原を固定化していない NP 粒子単独 (NP only) 接種群を陰性対照群とした。SHIV 感染サル群としては、昨年度感染防御実験に用いたサルを、処置履歴、血漿中のウイルス量および末梢血 CD4 陽性細胞数を考慮して、gag-NP 接種群と NP only 接種群に分配した。サル群としては次の通りである。gag-NP 接種群は gp120 単独接種に用いた MM468 と MM478、gp120-NP 接種に用いた MM472、コントロール (PBS のみ) に用いた MM475 の 4 頭とし、NP only 接種群は、gp120 単独接種に用いた MM469、gp120-NP 接種に用いた MM471、コントロール (PBS のみ) に用いた MM474 の 3 頭とした。

接種後、血漿中ウイルス量の測定、ELISPOT による gag-p27 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の検出、gag-p27 抗原特異的細胞増殖活性 (Th レスポンス) の測定および血液中免疫細胞群 (CD3、4、8、20、95、28) の解析を行った。

抗原含有生分解性ナノ粒子接種後の血漿中のウイルス量は、gag-NP 接種群と NP only 接種群の両群共に大きな変動を認めることはなかった。(図 5 上)。gag-NP 接種群の内の 1 頭 MM472 は gag-NP 接種以前に他のサルに比較して血漿中ウイルス量が著しく高く (10^7 copies/ml 以上)、gag-NP 接種後も血漿中ウイルス量は増加していたが、MM472 を除く gag-NP 接種群の 3 頭は 1 回目の接種から 8 週目以降にわずかであるが減少傾向がみられた。しかし、統計学的有意差は得られなかった。

血液中の CD4 陽性 T 細胞数および CD8 陽性 T 細胞数の割合は、gag-NP 接種群の方が NP only 接種群に比べて若干増加傾向が伺えるが、これについても統計学的有意差が得られる程ではなかった (図 5 下)。また、抗原含有生分解性ナノ粒子接種によって特異的に反応するような免疫細胞群のサブポピュレーションは gag-NP 接種群と NP only 接種群の両群共に認められなかった。

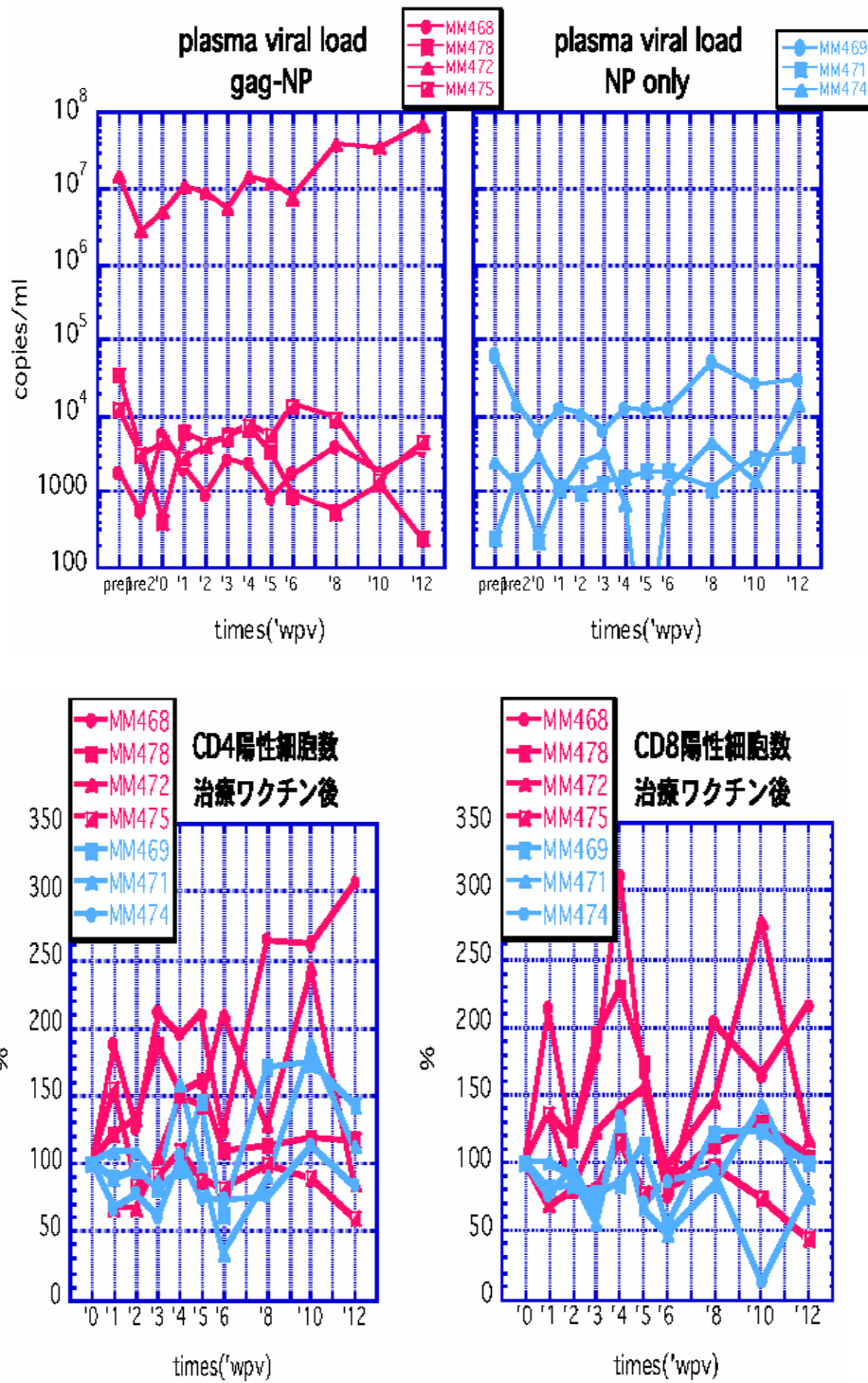


図5. 抗原含有生分解性ナノ粒子接種後の血漿中ウイルス量(上)と末梢血中のCD4、CD8陽性T細胞数(%) (下)

gag 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞は、gag-NP 接種群および NP only 接種群の両群共に 1 回目の接種後 2 週目に一部のサルで一過性の増加が認められた。しかしながら、2 回目の接種以後は増加は認められなかった(図 6 左)。一方、gag 抗原特異的な Th レスポンスについては、接種後 1 週目以降に gag-NP 接種群の 1 頭(MM472)と NP only 接種群の 1 頭(MM471)以外のサルで反応の上昇傾向が認められた。(図 6 右)。

すなわち、ウイルス感染サルに gag-NP あるいは NP のみを接種することにより一過性の gag 特異的 IFN- γ 産生細胞数の増加や gag 抗原特異的な Th レスポンスの上昇などの gag 特異的な細胞性免疫が誘導されることが示唆された。しかし、gag-NP 群と NP only 群の間では、有意な違いはなく、これら誘導された免疫では血漿中のウイルス量を有意に減少させることはできなかったことから、ウイルス抗原含有生分解性ナノ粒子の治療用ワクチンとしての効果は示されなかった。

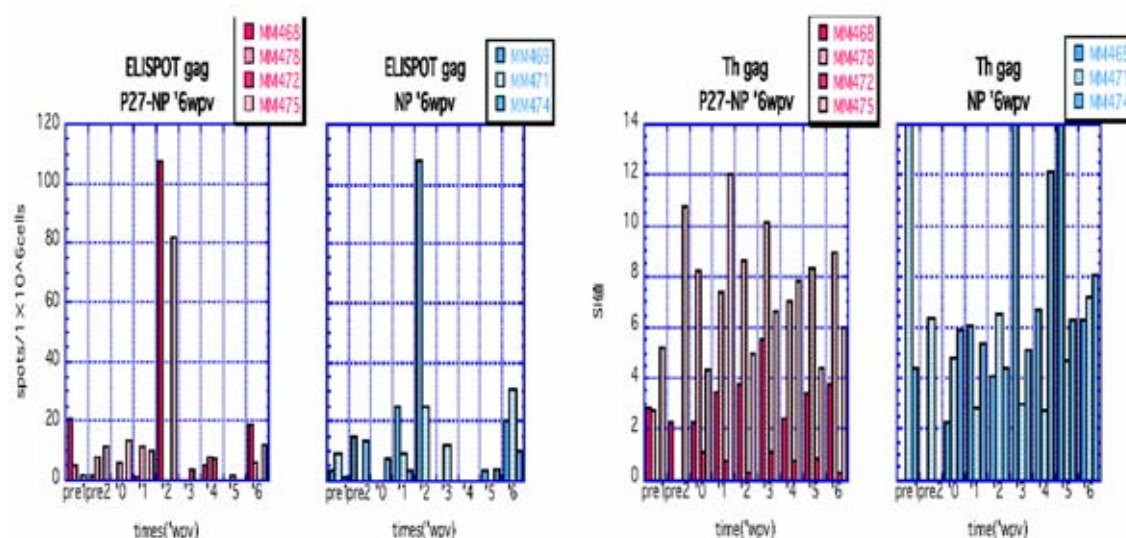


図 6. 抗原含有生分解性ナノ粒子接種後の gag 特異的 IFN- γ 産生細胞数の変動(左)と gag 抗原特異的な Th レスポンス(右)

(2)研究成果の今後期待される効果

サルにおける免疫誘導実験の結果から、gp120 内包生分解性ナノ粒子はサルにおいても優れた免疫誘導効果を示すことが明らかとなった。しかし、サル感染防御実験により、残念ながら内包した gp120 抗原に対する免疫応答は感染防御には有効でないことが示唆された。このように、サル感染実験による評価を行ったことにより、免疫誘導能と感染防御能は必ずしも一致しないという、ワクチン開発における厳しい現実を実証することとなった。特に、エイズウイルスの場合は免疫細胞そのものを感染増殖の標的細胞としているので、真にウイルス増殖抑制に有効な免疫応答をピンポイントで誘導する必要があることを、今回の結果は示している。すなわち、余分な免疫応答を誘導した場合、逆にウイルスの増殖を増強してしまう場合があることを実際の感染個体で示したことの意義は大きい。エイズウイルスの感染個体内における感染制御に真に有効な免疫機構については、未だその全貌は明らかにされておらず、今後も基礎情報の蓄積が重要であり、HIV 感染者やサル実験モデルにおける研究から得られる基礎情報を取り入れて、さらなるワクチン開発研究を行う必要がある。

今後考えなければならない最も重要な課題の一つは、この生分解性ナノ粒子に固定化する抗原の種類である。今回の感染防御実験でウイルス増殖を抑制することが出来なかったが、これには env を標的抗原に用いたことが問題であった可能性がある。gag よりも env に対する免疫の誘導効率が良いというマウスでの免疫誘導実験の結果に基づいて、env を抗原として選んだが、他の研究グループにより、HIV 感染者の血液中のウイルス量を抑制するのに重要な細胞性免疫は env では

なく、gag に対するものであるという重要な報告がごく最近なされている(Kiepiela, P. et al. Nat Med, 2007)。今回標的抗原に用いた env 蛋白に対する免疫応答が、ウイルス増殖抑制には働かず、むしろウイルス増殖を増強してしまったことは、この報告に一致する結果である。しかし、以前の我々のプロジェクトで、精製蛋白ではなくウイルス粒子を結合させたナノ粒子を用いることによって一定のウイルス増殖抑制効果が得られていることから、今後、含有する抗原を詳細に検討することにより、生分解性ナノ粒子ワクチンにより感染抑制に働く免疫応答を誘導できる可能性は高い。現在、ウイルス構成蛋白質に対する細胞性免疫を中心にワクチン開発を行うことが主流となっているが、ウイルス構成蛋白のペプチドエピトープ以外の標的抗原、すなわち、糖脂質抗原、立体構造パターン抗原、核酸抗原等の未だ十分に検討されていない標的抗原についても検討する必要がある。特に、ウイルス感染後早期に感染細胞により提示される抗原が重要と考えられる。そのような抗原を認識する免疫細胞は、感染細胞がウイルスを産生する前にいち早く感染細胞を検出し、破壊することができるからである。今回のプロジェクトで開発されたポリ(-PGA)生分解性ナノ粒子は、樹状細胞への抗原デリバリー能力に優れていることが示され、期待に反しているとはいえ、実際に感染個体内においてウイルス感染増殖に直接関与する重要な免疫細胞群に多大な影響を与えたことは明らかである。今後は標的とする抗原の検討や、樹状細胞における抗原取り込みや細胞内における抗原処理の動態を明らかにし、感染防御に重要な抗原の種類、抗原提示細胞(樹状細胞)の種類、細胞内プロセスのあり方を詳細に解析して情報を蓄積する必要がある。そして、その中で、どのような組み合わせが、エイズウイルスの感染防御やウイルス増殖抑制に真に有効に働くかを、霊長類モデルを用いた感染実験により評価する必要がある。今回開発されたポリ(-PGA)生分解性ナノ粒子は、このようなエイズワクチン開発において有用なデリバリーシステムとして役立つものと期待される。

マウスモデルでは、免疫誘導能の観点から多くの条件を検討することが可能であるが、誘導された免疫が実際の感染防御に働くかどうかを確かめられないという欠点がある。今回のプロジェクトでも示されたように、免疫誘導能が感染防御能に必ずしも一致しないことが多いということと、感染防御能の評価をマウスモデルではできないということが、特にエイズワクチンを開発する上で重要な障害となっている。一方、サル感染実験による評価では使用できる頭数の制約が大きいことが問題となる。また、誘導される免疫がマウスとサルで異なる事も明らかとなり、マウスで既に解析が進んでいる抗原提示細胞内での生分解性ナノ粒子の動態が、サルの抗原提示細胞において同様に行われているのか、詳細に調べる必要性が示された。このような研究は、サル感染実験をある程度反映できるような、サルの抗原提示細胞を用いた *ex vivo* でのスクリーニング評価系の確立に繋がるものと期待される。

4 研究参加者

明石グループ(生分解性ナノ粒子の調製と機能評価に関する研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
明石 満	大阪大学大学院 工学研究科	教授	研究の発案・総括	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
芹澤 武	鹿児島大学大学 院理工学研究科	准教授	分子設計	平成 14 年 11 月 ~ 平成 15 年 12 月
金子達雄	大阪大学大学院 工学研究科	助教	分子設計・構造解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 18 年 4 月
松崎典弥	大阪大学大学院 工学研究科	助教	粒子作成・高分子合成	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
内野るみ	鹿児島大学大学 院理工学研究科	チーム 事務員	経理と庶務	平成 14 年 11 月 ~ 平成 16 年 3 月
濱田謙一	鹿児島大学大学 院理工学研究科	大学院生	物性評価	平成 14 年 11 月 ~ 平成 15 年 3 月
中辻洋司	大阪大学大学院 工学研究科	准教授	有機合成	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月
木田敏之	大阪大学大学院 工学研究科	准教授	抗原認識・有機合成	平成 15 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
岡村浩和	大阪大学大学院 工学研究科	研究員	反応・合成	平成 15 年 4 月 ~ 平成 15 年 10 月
尾込大介	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	抗原固定化	平成 15 年 4 月 ~ 平成 17 年 3 月
坂口博一	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	抗原固定化	平成 15 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
有川雄也	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	ナノ粒子作成	平成 15 年 4 月 ~ 平成 19 年 3 月
下栗大器	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	高分子合成	平成 15 年 4 月 ~ 平成 19 年 3 月
濱田和博	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	抗原固定化	平成 15 年 4 月 ~ 平成 19 年 3 月
麻生隆彬	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	物性評価	平成 15 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
チャンティハン	鹿児島大学大学 院理工学研究科	大学院生	抗原固定化	平成 15 年 4 月 ~ 平成 17 年 3 月
東麻理子	鹿児島大学大学 院理工学研究科	大学院生	構造解析	平成 15 年 4 月 ~ 平成 17 年 3 月
山下宏央	鹿児島大学大学 院理工学研究科	大学院生	物性評価	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月
福重慶次	鹿児島大学大学 院理工学研究科	大学院生	ナノ粒子作成	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月

山下恵子	鹿児島大学大学院理工学研究科	大学院生	物性評価	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月
西村和也	鹿児島大学大学院理工学研究科	大学院生	ナノ粒子作成	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月
野口克洋	鹿児島大学大学院理工学研究科	大学院生	物性評価	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月
淵田岳仁	鹿児島大学大学院理工学研究科	大学院生	抗原固定化	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月
松隈大輔	鹿児島大学大学院理工学研究科	大学院生	物性評価	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月
窪島由美	鹿児島大学大学院理工学研究科	大学院生	ナノ粒子作成	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月
津久田智子	大阪大学大学院工学研究科	チーフ事務員	経理・庶務の業務	平成 15 年 5 月 ~ 平成 20 年 3 月
赤木隆美	大阪大学大学院工学研究科	CREST 研究員	分子設計・粒子作成	平成 15 年 10 月 ~ 平成 20 年 3 月
中原佳夫	大阪大学大学院工学研究科	研究員	有機合成	平成 16 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
菊澤 明	大阪大学大学院工学研究科	研究員	物性評価	平成 16 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
伊藤祐貴	大阪大学大学院工学研究科	大学院生	ナノ粒子作成	平成 16 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
石田裕香	大阪大学大学院工学研究科	大学院生	ナノ粒子作成	平成 16 年 4 月 ~ 平成 17 年 3 月
田中利樹	大阪大学大学院工学研究科	大学院生	ナノ粒子作成	平成 16 年 4 月 ~ 平成 17 年 3 月
和久友則	大阪大学大学院工学研究科	大学院生	ナノ粒子作成	平成 16 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
上杉健太郎	大阪大学大学院工学研究科	大学院生	高分子合成	平成 16 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
杉原文香	大阪大学大学院工学研究科	大学院生	構造解析	平成 16 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
毛利匡貴	大阪大学大学院工学研究科	大学院生	高分子合成	平成 16 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
井上佳一郎	大阪大学大学院工学研究科	大学院生	ナノ粒子作成	平成 16 年 4 月 ~ 平成 19 年 3 月
橋本雄一	大阪大学大学院工学研究科	大学院生	ナノ粒子作成	平成 16 年 4 月 ~ 平成 19 年 3 月
美辺 翔	大阪大学大学院工学研究科	大学院生	物性評価	平成 16 年 4 月 ~ 平成 19 年 3 月
岩本雅子	大阪大学大学院工学研究科	大学院生	物性評価	平成 16 年 4 月 ~ 平成 19 年 3 月
渡邊順司	大阪大学大学院工学研究科	特任准教授	生体活性評価	平成 17 年 5 月 ~ 平成 20 年 3 月

十河三千紀	大鵬薬品工業 (株)開発研究所	主任 研究員	生体活性評価	平成 17 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
網代広治	大阪大学大学院 工学研究科	特任講師	高分子合成	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
施 冬健	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	ナノ粒子作成	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
井汲祐介	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	高分子合成	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
大道正明	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	抗原固定化	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
小川雄史	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	ナノ粒子作成	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
吉田裕安材	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	物性評価	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
申 鶴雲	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	抗原固定化	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
木庭 守	大鵬薬品工業 (株)開発研究所	所長	生体活性評価	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
三好奈央	大鵬薬品工業 (株)開発研究所	研究員	生体活性評価	平成 18 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
門脇 功治	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	生体活性評価	平成 19 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
亀井 大輔	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	高分子合成	平成 19 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
藤野 能宜	大阪大学大学院 工学研究科	大学院生	有機合成	平成 19 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
山口修司	大鵬薬品工業 安全性研究所	所長	ナノ粒子安全性評価	平成 19 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月

馬場グループ(ナノ粒子と樹状細胞の相互作用およびマウス免疫実験に関する研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
馬場昌範	鹿児島大学大 学院医歯学総 合研究科	教授	研究の発案・総括	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
岡本実佳	鹿児島大学大 学院医歯学総 合研究科	講師	研究の発案・助言	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
佐藤克明	鹿児島大学大 学院医歯学総 合研究科	講師	免疫実験の指導	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月
王 欣	鹿児島大学大 学院医歯学総	CREST 研究員	樹状細胞の分離・培養 と免疫実験	平成 14 年 11 月 ~ 平成 19 年 5 月

	合研究科			
宇都倫史	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科	CREST 研究員	ナノ粒子の機能解析と 免疫実験	平成 15 年 5 月 ~ 平成 20 年 3 月
清原万紀子	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科	大学院生	抗原作成の補助	平成 16 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
善久理加	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科	大学院生	免疫実験の補助	平成 19 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月

中川グループ(FLと生分解性ナノ粒子を用いたがんワクチン開発に関する研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
中川晋作	大阪大学大学院薬学研究科	教授	リポソームへの粒子封入 条件の確立とCTL及び アジュバント効果の検討	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
堤 康央	大阪大学大学院薬学研究科	助教	ナノ粒子封入リポソーム の分離精製条件の検討	平成 14 年 11 月 ~ 平成 16 年 3 月
吉川友章	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	細胞内へのナノ粒子導 入特性の評価	平成 14 年 11 月 ~ 平成 18 年 3 月
下川摩里子	大阪大学大学院薬学研究科	研究 補助員	CTL 誘導評価とリポソ ーム及び膜融合リポソ ームへの粒子導入	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 12 月
山本記裕	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	リポソーム及び膜融合 リポソームへの粒子導入	平成 15 年 4 月 ~ 平成 16 年 3 月
杉田敏樹	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	CTL 誘導評価	平成 15 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
大和友子	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	膜融合リポソームの体内 動態評価	平成 15 年 4 月 ~ 平成 17 年 3 月
丹羽貴子	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子の体内動態 評価	平成 16 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
小田淳史	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子の体内動態 評価	平成 16 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
飯田恵介	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子ワクチンの評価	平成 17 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
本村吉章	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子ワクチンの評価	平成 17 年 4 月 ~ 平成 19 年 3 月
森重智弘	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子ワクチンの評価	平成 17 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月
柴田寛子	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	機能性ナノ粒子の作製	平成 17 年 4 月 ~ 平成 19 年 3 月

倉知慎之輔	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	機能性ナノ粒子の作製	平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月
桜井晴奈	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子の安全性評価	平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月
阿部康弘	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子の安全性評価	平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月
松尾一彦	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子の安全性評価	平成 17 年 4 月～平成 20 年 3 月
岡田直貴	大阪大学大学院薬学研究科	講師	腫瘍免疫誘導評価	平成 17 年 11 月～平成 20 年 3 月
金川尚子	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子ワクチンの評価	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
松尾圭祐	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子ワクチンの評価	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
後藤美千代	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	樹状細胞ワクチンの評価	平成 18 年 4 月～平成 19 年 3 月
萱室裕之	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子ワクチンの評価	平成 18 年 4 月～平成 19 年 3 月
小檜山 雄	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	樹状細胞ワクチンの評価	平成 18 年 4 月～平成 19 年 3 月
亀井数正	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子ワクチンの評価	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
柳川達也	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子ワクチンの評価	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
今井 直	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	機能性ナノ粒子の作製	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
石井裕美子	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子ワクチンの評価	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
高橋正也	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子ワクチンの評価	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
田辺 綾	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子ワクチンの評価	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
林 香織	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子ワクチンの評価	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
吉永知世	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	ナノ粒子ワクチンの評価	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
向 洋平	大阪大学大学院薬学研究科	特任助教	細胞内ナノ粒子導入特性の評価	平成 18 年 9 月～平成 20 年 3 月
吉川 舞	大阪大学大学院薬学研究科	大学院生	細胞内ナノ粒子導入特性の評価	平成 19 年 4 月～平成 20 年 3 月

三浦グループ(サルを用いたナノ粒子ワクチン評価の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
三浦智行	京都大学ウイルス研究所	准教授	サル感染実験による感染防御効果の評価	平成18年4月～平成20年3月
伊吹謙太郎	京都大学ウイルス研究所	助教	感染サルの免疫応答解析	平成18年4月～平成20年3月
斎藤尚紀	京都大学ウイルス研究所	研究員	感染サルの免疫応答解析	平成18年4月～平成20年3月
松山めぐみ	京都大学ウイルス研究所	教務補佐員	ウイルスの遺伝子解析	平成18年4月～平成20年3月
稲葉一寿	京都大学ウイルス研究所	大学院生	感染サルの病理解析	平成18年4月～平成20年3月
深澤嘉伯	京都大学ウイルス研究所	大学院生	感染サルのウイルス動態解析	平成18年4月～平成20年3月
松田健太	京都大学ウイルス研究所	大学院生	ウイルスの遺伝子解析	平成18年4月～平成20年3月
姫野 愛	京都大学ウイルス研究所	大学院生	感染サルの免疫応答解析	平成18年4月～平成20年3月
堀池麻里子	京都大学ウイルス研究所	大学院生	感染サルの免疫応答解析	平成18年4月～平成20年3月
石松美沙	京都大学ウイルス研究所	大学院生	ウイルスの遺伝子解析	平成18年4月～平成19年3月
元原麻貴子	京都大学ウイルス研究所	大学院生	感染サルのウイルス動態解析	平成18年4月～平成19年3月
堀内励生	京都大学ウイルス研究所	研究員	感染サルの免疫応答解析	平成18年4月～平成18年8月

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
該当なし			

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 46 件)

1. Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi, “Development of novel technology of DDS for gene therapy”, *Drug Metabol. Pharmacokin.*, **18**, 223-229, (2003).
2. Tatsuo Kaneko, Kazuhiro Hamada, Ming-Qing Chen, Mitsuru Akashi, “One-Step Formation of Morphologically Controlled Nanospheres with Projection Coronas”, *Macromolecules*, **37**, 501-506 (2004).

3. Tatsuo Kaneko, Shogo Shimomai, Masumi Miyazaki, Masanori Baba, Mitsuru Akashi, "IgG Responses to Intranasal Immunization with Cholera Toxin-Immobilized Polymeric Nanospheres in Mice", *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **15**, 661-669 (2004).
4. Taiki Shimokuri, Tatsuo Kaneko, Takeshi Serizawa, Mitsuru Akashi, "Preparation and Thermosensitivity of Naturally Occurring Polypeptide Poly(γ -glutamic acid) Derivatives Modified by Alkyl Groups", *Macromol. Biosci.*, **4**, 407-411 (2004).
5. Michiya Matsusaki, Ken-ichiro Hiwatari, Mariko Higashi, Tatsuo Kaneko and Mitsuru 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).
6. 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).
7. 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).
8. Yuki Itoh, Michiya Matsusaki, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, "Preparation of Biodegradable Hollow Nanocapsules by Silica Template Method", *Chem.Lett.*, **33**, 1552-1553 (2004).
9. 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).
10. 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).
11. 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).
12. 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).
13. 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).
14. 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).
15. Tatsuo Kaneko, Mariko Higashi, Michiya Matsusaki, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, "Self-Assembled Soft Nanofibrils of Amphipathic Polypeptides and their Morphological Transformation", *Chem. Mater.*, **17**, 2484-2486 (2005).
16. Michiya Matsusaki, Takehito Fuchida, Tatsuo Kaneko, Mitsuru Akashi, "Self-Assembling Bio-Nanoparticles of Poly(ϵ -lysine) Bearing Cholesterol as a Biomesogen with a Thermotropic Liquid-Crystalline Nature", *Biomacromolecules*, **6**, 2374-2379 (2005).
17. Jun Kunisawa, Takashi Masuda, Kazufumi Katayama, Tomoaki Yoshikawa, Yasuo Tsutsumi, Mitsuru Akashi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, "Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release", *J. Control. Release*, **105**, 344-353 (2005).

18. Tatsuo Kaneko, Kazuhiro Hamada, Ming Qing Chen, Mitsuru Akashi, "Freeze-Drying of Soft Nanoparticles with Projection Coronas Forms Three-Dimensional Microconstructs", *Adv. Mater.*, **17**, 1638-1643 (2005).
19. Takami Akagi, Mariko Higashi, Tatsuo Kaneko, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, "In Vitro Enzymatic Degradation of Nanoparticles Prepared from Hydrophobically-Modified Poly (γ -glutamic acid)", *Macromol. Biosci.*, **5**, 598-602 (2005).
20. Michiya Matsusaki, Kristina Larsson, Takami Akagi, Malin Lindstedt, Mitsuru Akashi, Carl A. K. Borrebaeck, "Nanosphere induce gene expression in human dendritic cells", *Nano Lett.*, **5**, 2168-2173 (2005).
21. Tatsuo Kaneko, Kazuhiro Hamada, Yumi Kuboshima, Mitsuru Akashi, "Reversible Thermoresponsive Aggregation/Deaggregation of Water-Dispersed Polymeric Nanospheres Exhibiting Structural Transformation", *Langmuir*, **21**, 9698-9703, (2005).
22. Takami Akagi, Tatsuo Kaneko, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, "Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on poly (γ -glutamic acid) with L-phenylalanine as a protein carrier", *J. Control. Release*, **108**, 226-236 (2005).
23. Takami Akagi, Masamichi Ueno, Katsuya Hiraishi, Masanori Baba, Mitsuru Akashi, "AIDS vaccine: intranasal immunization using inactivated HIV-1-capturing core-corona type polymeric nanospheres", *J. Control. Release*, **109**, 49-61 (2005).
24. Takami Akagi, Mariko Higashi, Tatsuo Kaneko, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, "Hydrolytic and Enzymatic Degradation of Nanoparticles Based on Amphiphilic Poly(γ -glutamic acid)-graft-L-phenylalanine Copolymers", *Biomacromolecules*, **7**, 297 (2006).
25. Tomoaki Yoshikawa, Naoki Okada, Masaki Tsujino, Jian-Qing Gao, Akira Hayashi, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Akira Yamamoto, Shinsaku Nakagawa, "Vaccine efficacy of fusogenic liposomes containing tumor cell-lysate against murine B16BL6 melanoma" *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 100-104 (2006).
26. Tomoaki Yoshikawa, Susumu Imazu, Jian-Qing Gao, Kazuyuki Hayashi, Yasuhiro Tsuda, Naoki Okada, Yasuo Tsutsumi, Mitsuru Akashi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa, "Non-methylated CpG motifs packaged into fusogenic liposomes enhance antigen-specific immunity in mice", *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 105-109 (2006).
27. Michiya Matsusaki, Tomonori Waku, Tatsuo Kaneko, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, "One-Step Advanced Preparation of Surface-Functional Peptide Nanospheres by the Polymerization of L-Phenylalanine *N*-Carboxyanhydride with Dual Initiators", *Langmuir*, **22**, 1396-1399 (2006).
28. Takami Akagi, Tatsuo Kaneko, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, "Multifunctional Conjugation of Proteins on/into Bio-nanoparticles Prepared by Amphiphilic Poly(γ -glutamic acid)", *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **17**, 875-892 (2006).
29. Yuki Itoh, Michiya Matsusaki, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, "Enzyme-Responsive Release of Encapsulated Proteins from Biodegradable Hollow Capsules", *Biomacromolecules*, **7**, 2715-2718 (2006).
30. Taiki Shimokuri, Tatsuo Kaneko, Mitsuru Akashi, "Effects of Thermoresponsive Coacervation on Hydrolytic Degradation of Amphiphilic Poly(γ -glutamate)s", *Macromol. Biosci.*, **6**, 942-951 (2006).
31. Tomoaki Yoshikawa, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, "Fusogenic liposomes and their suitability for gene delivery", *Future Lipidol.*, **1**, 735-742 (2006).
32. Toshiyuki Kida, Masataka Mouri, Mitsuru Akashi, "Fabrication of Novel Hollow Capsules Composed of Poly(methyl methacrylate) Stereocomplex Films", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 7534-7536 (2006).
33. Akira Hayashi, Hisashi Wakita, Tomoaki Yoshikawa, Tsuyoshi Nakanishi, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Yohei Mukai, Yasuo Yoshioka, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, "A strategy for efficient cross-presentation of CTL-epitope peptides leading to enhanced induction of in vivo tumor immunity", *J. Control. Release*, **117**, 11-19 (2007).
34. Kazuhiro Hamada, Tatsuo Kaneko, Ming Qing Chen, Mitsuru Akashi, "Size-Selective Material Adsorption Property of Polymeric Nanoparticles with Projection Coronas", *Chem. Mater.*, **19**, 1044-1052 (2007).

35. Dongjian Shi, Tatsuo Kaneko, Mitsuru Akashi, "Preparation of Hyperbranch Aromatic Biopolyesters Self-organized by Solvent Transformation into Ionic Liquids", *Langmuir*, **23**, 3485-3488 (2007).
36. Tomofumi Uto, Xin Wang, Katsuaki Sato, Masami Haraguchi, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, "Targeting of antigen to dendritic cells with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles induce antigen-specific humoral and cellular immunity", *J. Immunol.*, **178**, 1979-2986 (2007).
37. Toshiyuki Kida, Keiichiro Inoue, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, "Preparation of Novel Polysaccharide Nanoparticles by the Self-assembly of Amphiphilic Pectins and Their Protein-encapsulation Ability", *Chem. Lett.*, **36**, 940-941 (2007).
38. Tomonori Waku, Michiya Matsusaki, Tatsuo Kaneko, Mitsuru Akashi, "PEG Brush Peptide Nanospheres with Stealth Properties and Chemical Functionality", *Macromolecules*, **40**, 6385-6392 (2007).
39. Takami Akagi, Xin. Wang, Tomofumi. Uto, Masanori. Baba, Mitsuru. Akashi, "Protein direct delivery to dendritic cells using nanoparticles based on amphiphilic poly(amino acid) derivatives", *Biomaterials*, **28**, 3427-3436 (2007).
40. Xin Wang, Tomofumi Uto, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, "Induction of potent CD8+ T-cell responses by novel biodegradable nanoparticles carrying human immunodeficiency virus type 1 gp120.", *J. Virol.*, **81**, 10009-10016 (2007).
41. Keisuke Matsuo, Tomoaki Yoshikawa, Atsushi Oda, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa, "Efficient generation of antigen-specific cellular immunity by vaccination with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles entrapping endoplasmic reticulum-targeted peptides", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **362**, 1069-1072 (2007).
42. Shigefumi Okamoto, Hironori Yoshii, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Toyokazu Ishikawa, Yoshinobu Okano, Michiaki Takahashi, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori, "Influenza hemagglutinin vaccine with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles enhances the protection against influenza virus infection through both humoral and cell-mediated immunity", *Vaccine*, **25**, 8270-8278 (2007).
43. Xin Wang, Tomofumi Uto, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, "Poly(γ -glutamic Acid) nanoparticles as an efficient antigen delivery and adjuvant system: potential for an anti-AIDS vaccine", *J. Med. Virol.*, **80**, 11-19 (2008).
44. Tomoaki Yoshikawa, Naoki Okadam Atsushi Oda, Kazuhiko Matsuo, Keisuke Matsuo, Yohei Mukai, Yasuo Yoshioka, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Shinsaku Nakagawa, "Development of amphiphilic γ -PGA-nanoparticulate cytosolic protein delivery carrier", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **366**, 408-413 (2008).
45. Shigefumi Okamoto, Hironori Yoshii, Toyokazu Ishikawa, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Michiaki Takahashi, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori, "Single dose of inactivated Japanese encephalitis vaccine with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles provides effective protection from Japanese encephalitis virus", *Vaccine*, **26**, 589-594 (2008).
46. Yuki Itoh, Michiya Matsusaki, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, "Time-modulated release of multiple proteins from enzyme-responsive multilayered capsules", *Chem. Lett.*, in press.

(2)その他の著作物（総説、書籍など、21件）

1. 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" *生物工学*, Vol. 81, No. 5, 182-186 (2003).
2. 馬場昌範, 明石 満, "エイズ経鼻ワクチンのアプローチ - ナノ粒子を用いたアプローチ - ", *化学療法の領域*, Vol.19, No.11, 49-55 (2003).
3. 明石 満, "ナノ粒子を応用した抗レトロウイルスワクチンの開発", *大阪大学先導的研究オープンセンター平成15年度年報*, 110-113 (2004).
4. 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).
5. 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).

6. 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).
7. 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).
8. 赤木隆美, 明石 満, “高分子ナノ粒子”, *BIOINDUSTRY*, **22**, 40-47 (2005).
9. 赤木隆美, 明石 満, “高分子ナノ微粒子を用いるワクチン開発”, *日本臨床*, **64**, 279-285 (2006).
10. 吉川友章, 堤 康央, 中川晋作, “薬物動態を制御によるナノ治療”, *日本臨床*, **64**, 247-252 (2006).
11. 明石 満, “高分子を細胞に送り込む”, *高分子*, **55**, 321 (2006).
12. 明石 満, 赤木隆美, “高分子ナノ粒子ワクチン”, *現代化学*, **428**, 37-42 (2006).
13. 赤木隆美, 馬場昌範, 明石 満, “高分子ナノ粒子を利用したアジュバント開発と抗HIV療法における有効性”, *薬学雑誌*, **127**, 307-317 (2007).
14. 吉川友章, 岡田直貴, 中川晋作, “膜融合リポソームによる細胞内薬物動態制御法の確立とその応用”, *薬学雑誌*, **127**, 789-796 (2007).
15. 赤木隆美, 明石 満, 「自己組織化ナノマテリアル - フロントランナー85人が語るナノテクノロジーの新潮流 - 」, 第2章 0次元ナノマテリアル(点), 2. コアシェル型高分子ナノ粒子 (監修: 国武豊喜), フロンティア出版, 48-53 (2007).
16. Xin Wang, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Masaori Baba, “Development of core-corona type polymeric nanoparticles as an anti-HIV-1 vaccine”, *Mini-Rev. Org. Chem.*, **4**, 281-290 (2007).
17. Takami Akagi, Masanori Baba, Mitsuru Akashi, “Preparation of nanoparticles by the self-organization of polymers consisting of hydrophobic and hydrophilic segments: potential applications”, *Polymer*, **24**, 77-85 (2007).
18. Takami Akagi, Masanori Baba, Mitsuru Akashi, “Biodegradable nanoparticles for vaccine adjuvants and delivery systems”, *Controlled Release Society Newsletter*, **24**, 18-20 (2007).
19. 赤木隆美, 明石 満, “第1章 高分子, 1. 水溶性高分子 1) 合成高分子”, 遺伝子医学MOOK 別冊「絵で見てわかるナノDDS マテリアルから見た治療・診断・予後・予防、ヘルスケア技術の最先端」, メディカル ドゥ, 28-33 (2007).
20. 赤木隆美, 明石 満, “ナノテクノロジーを利用したナノワクチン”, *分子細胞治療*, **7**, 10-17 (2008).
21. 赤木隆美, 明石 満, “ナノ粒子の創製と応用展開” “第5章 ナノ粒子のバイオ・医療材料への応用”, 3. 抗レトロウイルスワクチン (編集: 米澤 徹), フロンティア出版, in press.

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

招待講演 (国内会議 45 件、国際会議 19 件)

1. 中川晋作¹ (¹ 阪大院薬), “細胞内薬物動態制御によるナノ治療システムの開発”, 第 19 回日本 DDS 学会, 2003 年 6 月 19 日, 国立京都国際会館(京都府).
2. Mitsuru Akashi^{1,2,4}, Masanori Baba^{3,4} (¹ 鹿大院理工, ² 阪大院工, ³ 鹿大院医, ⁴CREST), “A Trial of HIV-1 Vaccine Using Core-corona Type Polymeric Nanospheres”, 第 76 回日本生化学大会, 2003 年 10 月 18 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
3. Shinsaku Nakagawa¹, Tadanori Mayumi¹ (¹ 阪大院薬), “DDS technology to control the intracellular pharmacokinetics”, 第 76 回日本生化学大会, 2003 年 10 月 18 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
4. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “ナノ粒子を応用した抗レトロウイルスワクチンの開発”, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ 全体発表会, 2004 年 2 月 18 日, 日本科学未来館(東京都).
5. 馬場昌範¹ (¹ 鹿大院医歯), “ナノ粒子を用いた抗レトロウイルスワクチンの開発研究”, 第 2 回南九州地区合同皮膚科地会会・第 16 回鹿児島地区皮膚病態治療研究会, 2004 年 7 月 10 日, ホテル・レクストン鹿児島(鹿児島県).

6. *Mitsuru Akashi^{1,3}, Takami Akagi^{1,3}, Tatsuo Kaneko^{1,3}, Masanori Baba^{2,3}, Masanori Hayami² (¹ 阪大院工, ² 鹿大院医歯, ³CREST), “Anti-retroviral Vaccine Using Polymeric Nanoparticles”, The 2004 International Conference on MEME, NANO, and Smart Systems, 2004年8月27日, Banff (Alberta, Canada).
7. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), ”高分子ナノ粒子を用いたエイズワクチンの開発”, 第24回表面科学講演大会, 2004年11月9日, 早稲田大学総合学術情報センター(東京都).
8. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), ”高分子ナノ微粒子を用いるワクチンの開発”, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ(ナノメディスン) 第2回公開シンポジウム, 2004年11月10日, 国際連合大学(東京都).
9. *Mitsuru Akashi^{1,2,4}, Takami Akagi^{2,4}, Tatsuo Kaneko^{1,4}, Masanori Baba^{3,4} (¹ 鹿大院理工, ² 阪大院工, ³ 鹿大院医, ⁴CREST), “AIDS Vaccine: Intranasal immunization with Inactivated HIV-1 Capturing Core-Corona Type Polymeric Nanospheres”, Sweden-Japan Workshop on Bionanotechnology, 2004年11月9日, Kyoto Kokusai Hotel (Kyoto).
10. *Mitsuru Akashi^{1,4}, Takami Akagi^{1,4}, Masanori Baba^{2,4}, Masanori Hayami³ (¹ 阪大院工, ² 鹿大院理工, ³ 京大ウイルス研究所, ⁴CREST), “AIDS Vaccine: Intranasal immunization Using Inactivated HIV-1 Capturing Core-Corona Type Polymeric Nanospheres”, The 12th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, 2005年2月21日, Salt Lake City (Utah, America).
11. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), ”膜融合リポソームを応用したDNAワクチン療法の開発 DNAインスパイアード材料とテンプレート重合”, DNAワークショップ, 2005年3月10日, ホテル熱海(静岡県).
12. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “融合技術とビジネス”, 第10回阪大融合技術懇談会, 2005年4月22日, 大阪大学中之島センター(大阪府).
13. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “医薬品分野への応用: 表面ナノ構造を制御した高分子材料の創製”, 日本化粧品学会第30回学術大会, 2005年6月3日, ヤクルトホール(東京都).
14. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “バイオインスパイアード材料の創製”, 大阪大学社会人教育講座バイオセミナー2005, 2005年6月29日, 大阪大学中之島センター(大阪府).
15. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “ナノ微粒子の最新医療への応用 - 抗HIV戦略を中心に - ”, 日本薬学会第30回薬剤セミナー, 2005年7月12日, 浜名湖ロイヤルホテル(静岡県).
16. *明石 満¹ (¹ 阪大院工), “Polymer in Bionanotechnology”, The 8th SPSJ International Polymer Conference (IPC2005), 2005年7月29日, 福岡国際会議場(福岡県).
17. *馬場昌範^{1,3}, 明石 満^{2,3} (¹ 鹿大院医歯学, ² 阪大院工, ³ CREST), “An approach to protein-based anti-AIDS vaccines using nanospheres.”, International Symposium of Advanced Therapies, 2005年8月30日, Rio de Janeiro (Brazil).
18. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “バイオシステムを分子レベルで理解し、機能材料を創製しよう!”, 第3回マイクロ・ナノ粒子研究交流会, 2005年10月25日, 和歌山大学地域共同研究センター(和歌山県).
19. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “大阪大学医工連携の取り組み”, 未来医療シンポジウム, 2005年11月2日, 大阪大学銀杏会館(大阪府).
20. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “材料表面のナノ構造制御によるバイオマテリアル創製”, バイオテクノロジー医工連携講座, 2005年11月19日, TRI臨床研究情報センター(兵庫県).
21. *Mitsuru Akashi^{1,4}, Takami Akagi^{1,4}, Shinsaku Nakagawa^{2,4}, Masanori Baba^{3,4} (¹ Graduate School of Engineering, Osaka University, ² Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ³ Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ⁴CREST-JST), “Preparation of Biodegradable Poly(γ -glutamic acid) Nanospheres and Their Applications for Vaccines”, Pacific Polymer Federation IX Conference (PPF9), 2005年12月13日, Maui Westin (USA).
22. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “高分子合成研究からバイオマテリアル研究へ”, ヘテロ原子部会第3回談話会, 2006年1月24日, 三洋化成工業株式会社(京都府).
23. 中川晋作¹, 岡田直貴¹, 明石 満² (¹ 阪大院薬, ² 阪大院工), “タンパク質デリバリー ナノ

- テクノロジーを基盤とした新規 DDS キャリアーの創製 “, 第 56 回医用高分子研究会, 2006 年 3 月 8 日, 東京工業大学百年記念館フェライト会議室(東京都).
24. 中川晋作¹ (¹ 阪大院薬), “生分解性ナノ粒子を用いた新規がんワクチンキャリアーの開発”, 日本薬学会第 126 年会, 2006 年 3 月 28 日, 仙台国際センター(宮城県).
 25. 赤木隆美^{1,4}, 中川晋作^{2,4}, 馬場昌範^{3,4}, 明石 満^{1,4} (¹ 阪大院工, ² 阪大院薬, ³ 鹿大院医歯学, ⁴CREST-JST), “高分子ナノ粒子を利用したアジュバント開発と抗 HIV 療法における有効性”, 2006 年 3 月 30 日, 日本薬学会第 126 年会, 仙台市民会館(宮城県).
 26. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “生分解性ナノ粒子を用いた新しいワクチン開発”, 第 2 回「ナノキ シンロジーと微粒子・ナノチューブのバイオ応用」研究会, 2006 年 6 月 23 日, 北海道大学(北海道).
 27. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “機能性ナノ粒子”, 第 22 回日本 DDS 学会学術集会, 2006 年 7 月 7 日, 東京国際会館(東京都).
 28. 馬場昌範¹ (¹ 鹿大院医歯), “エイズワクチン研究の現況とナノ粒子を用いたアプローチ”, 第 22 回日本 DDS 学会学術集会, 2006 年 7 月 7 日, 東京国際会館(東京都).
 29. *Mitsuru Akashi^{1,4}, Takami Akagi^{1,4}, Shinsaku Nakagawa^{2,4}, Masanori Baba^{3,4} (¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ³Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ⁴CREST-JST), “Preparation of antigen-immobilized biodegradable nanoparticles based on poly(γ -glutamic acid) hydrophobic derivatives and their potential applications for vaccine carrier and adjuvant”, 第 7 回アジアバイオマテリアルシンポジウム, 2006 年 8 月 21 日, Cheju (Korea).
 30. *明石 満¹ (¹ 阪大院工), “Protein direct delivery to dendritic cells using polymeric nanoparticles consisting of poly(γ -glutamic acid) derivatives for vaccination”, 232nd ACS National Meeting, 2006 年 9 月 12 日, San-Francisco (USA).
 31. *Mitsuru Akashi¹ (¹Graduate School of Engineering, Osaka University), “Preparation of biodegradable poly (γ -glutamic acid) nanospheres and their applications for vaccines”, 第 7 回 日仏 DDS シンポジウム, 2006 年 9 月 25 日, 琵琶湖ホテル(滋賀県).
 32. 馬場昌範¹ (¹ 鹿大医歯学), “ナノ粒子を用いたエイズワクチンの研究:最近の知見”, 第 9 回 白馬シンポジウム「エイズ研究最前線」, 2006 年 10 月 12 日, 芝蘭会館(京都府).
 33. *Mitsuru Akashi^{1,4}, Takami Akagi^{1,4}, Shinsaku Nakagawa^{2,4}, Masanori Baba^{3,4} (¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ³Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ⁴CREST-JST), “Preparation of Biodegradable Poly(γ -glutamic acid) Nanospheres and Their Applications for Vaccines”, 2006 年 10 月 26 日, 浙江大学(中国).
 34. 馬場昌範¹ (¹ 鹿大医歯学), “ナノ粒子を用いた抗エイズワクチンの研究”, 沖縄感染免疫シンポジウム - 感染症に対する免疫応答研究とワクチン開発の最前線 2006 -, 2006 年 11 月 10 日, 琉球大学(沖縄県).
 35. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “バイオメディカル分野で用いる機能性ナノ粒子”, 第 15 回ポリマー材料フォーラム, 2006 年 11 月 16 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府).
 36. *Masanori Baba^{1,3}, Xin Wang^{1,3}, Tomofumi Uto^{1,3}, Takami Akagi^{2,3}, Mitsuru Akashi^{2,3} (¹ Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ²Graduate School of Engineering, Osaka University, ³CREST-JST), “An approach to protein-based anti-AIDS vaccines using biodegradable nanoparticles”, 2nd Japanese-Germany HIV/AIDS Symposium, 2006 年 11 月 24 日, Bochum (Germany).
 37. *Masanori Baba^{1,3}, Xin Wang^{1,3}, Tomofumi Uto^{1,3}, Takami Akagi^{2,3}, Mitsuru Akashi^{2,3} (¹ Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ²Graduate School of Engineering, Osaka University, ³CREST-JST), “Nanoparticle AIDS vaccine” 19th Joint Meeting of AIDS Panel, Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program, 2006 年 12 月 7 日, Kagoshima (Japan).
 38. 中川晋作¹ (¹ 阪大院薬), “ナノテクノロジーを基盤とした新規ワクチンキャリアーの創製”, 第 21 回長崎 DDS 研究会, 2006 年 12 月 8 日, 長崎大学(長崎県).

39. 明石 満^{1,5}, 赤木 隆美^{1,5}, 馬場 昌範^{2,5}, 中川 晋作^{3,5}, 三浦 智行^{4,5} (¹阪大院工, ²鹿大院医歯学, ³阪大院薬, ⁴京大ウイルス研, ⁵CREST), “疎水化ポリγ-グルタミン酸ナノ粒子を用いるワクチン”, 日本薬学会 第127年会シンポジウム, 2007年3月28日, ボルファート富山(富山県).
40. 明石 満¹ (¹阪大院工), “大学発ベンチャーによる医療機器・医薬品の研究開発と認可から製造へ”, フクオカベンチャーマーケット, 2007年5月23日, アクロス福岡(福岡県).
41. 明石 満¹ (¹阪大院工), “バイオ高分子の設計・合成と産学連携”, 研究最前線講演会, 2007年5月25日, 大阪大学コンベンションセンター(大阪府).
42. 明石 満¹ (¹阪大院工), “自己集合を駆動力にしたナノバイオマテリアル”, 第一回 バイオフォトンクス技術研究会, 2007年6月1日, 濱野生命科学研究所(兵庫県).
43. 明石 満¹ (¹阪大院工), “ナノバイオマテリアルの創製”, ナノテクキャラバン大阪-ナノバイオ研究の最前線-, 2007年6月5日, 大阪大学産業科学研究所(大阪府).
44. 明石 満^{1,3}, 馬場昌範^{1,3}, 馬場昌範^{2,3} (¹阪大院工, ²鹿大院医歯学, ³CREST-JST), “ナノ粒子ワクチン:生分解性高分子による抗原タンパク質のDDS”, 第23回日本DDS学会学術集会, 2007年6月15日, ホテル日航熊本(熊本県).
45. *Mitsuru Akashi^{1,4}, Takami Akagi^{1,4}, Shinsaku Nakagawa^{2,4}, Masanori Baba^{3,4} (¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ³Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ⁴CREST-JST), “Directed protein delivery to dendritic cells using nanoparticles composed of amphiphilic poly(amino acid) and their potential applications for vaccine adjuvants”, 7th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, 2007年6月25日, Het Pand (Gent, Belgium).
46. *Mitsuru Akashi^{1,2,3}, Takami Akagi^{1,3}, Michiya Matsusaki^{1,2} (¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²21st Century COE Program “Center for Integrated Cell and Tissue Regulation”, Graduate School of Engineering, Osaka University, ³CREST-JST), “Self-Organizing Nanobiomaterials”, 2nd International Conference on Advances in Petrochemicals and Polymers, 2007年6月28日, Imperial Queen’s Park Hotel (Bangkok, Thailand).
47. 明石 満¹ (¹阪大院工), “新規バイオマテリアルの創製”, 第25回科学技術講演会, 2007年7月20日, 大阪市立工業研究所(大阪府).
48. 明石 満¹ (¹阪大院工), “生分解性ナノ粒子を用いた免疫療法剤～革新的なタンパク質DDS:疎水化ポリ(γ-グルタミン酸)ナノ粒子を用いるワクチン～”, 第18回技術シーズ公開会, 2007年8月2日, 大阪科学技術センター(大阪府).
49. *Masanori Baba^{1,3}, Xin Wang^{1,3}, Tomofumi Uto^{1,3}, Takami Akagi^{2,3}, Mitsuru Akashi^{2,3} (¹Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ²Graduate School of Engineering, Osaka University, ³CREST-JST), “Poly(γ-glutamic acid) nanoparticles as an efficient antigen delivery and adjuvant system to dendritic cells: potential application to anti-AIDS vaccine”, 20th Joint Meeting of AIDS Panel, Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program, 2007年9月13日, Monterey (CA, USA).
50. 明石 満¹ (¹阪大院工), “交互積層法による新しいシステムと材料の創製”, 鹿児島大学産学官連携推進機構特別講演会, 2007年9月25日, 鹿児島大学産学官連携推進機構棟(鹿児島県).
51. *Mitsuru Akashi^{1,4}, Takami Akagi^{1,4}, Shinsaku Nakagawa^{2,4}, Masanori Baba^{3,4} (¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ³Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ⁴CREST-JST), “Biodegradable Nanoparticles for Vaccine Delivery and Adjuvant”, Swiss-Japan Symposium on Nanobio 2007, 2007年10月10日, 東京大学 武田先端知ホール(東京都).
52. 中川晋作^{1,2} (¹阪大院薬, ²CREST), “生分解性高分子を用いた新規ワクチンキャリアーの開発”, 生物資源開発センターセミナー, 2007年10月12日, 大阪府立大学(大阪府).
53. *Mitsuru Akashi^{1,4}, Takami Akagi^{1,4}, Shinsaku Nakagawa^{2,4}, Masanori Baba^{3,4} (¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences,

Osaka University, ³Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ⁴CREST-JST), “Polymeric nanoparticles as vaccine delivery devices”, Hamano-Kobe International Symposium on “Laser and Nano/Bio Sciences”, 2007年10月19日, Crowne Plaza Kobe (兵庫県).

54. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “高分子ナノ粒子を用いるワクチンの開発”, 近畿バイオインダストリー振興会議, フォローアップ勉強会, 2007年10月25日, 大阪科学技術センター (大阪府).
55. *Mitsuru Akashi^{1,4}, Takami Akagi^{1,4}, Shinsaku Nakagawa^{2,4}, Masanori Baba^{3,4} (¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ³Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ⁴CREST-JST), “Biodegradable Nanoparticles as Potential Vaccine Delivery and Adjuvant Systems”, Green Sustainable Biological and Chemical Processes, 2007年11月16日, 大阪大学銀杏会館 (大阪府).
56. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “塗料の研究からバイオマテリアルへ”, 第29回日本バイオマテリアル学会大会, 2007年11月27日, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府).
57. 明石 満^{1,3}, 赤木隆美^{1,3}, 馬場昌範^{2,3} (¹ 阪大院工, ² 鹿大院医歯学, ³ CREST-JST), “高分子ナノ粒子ワクチン”, 第51回材料工学連合講演会, 2007年11月29日, 京大会館 (京都府).
58. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “高分子ナノ粒子ワクチン ワクチン開発:工学からのアプローチ”, 新規事業研究会月例研究会, 2007年12月8日, 東工大 百年記念館 (東京都).
59. *Mitsuru Akashi¹ (¹Graduate School of Engineering, Osaka University), “Self-organizing nano-biomaterials: Nano-particles and nano-films”, The 9th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, 2007年12月19日, The Westin Maui (Hawaii, USA).
60. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “ナノ粒子を用いるワクチンの開発”, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ成果報告会, 2008年1月22日, ベルサール九段 (東京都).
61. 明石 満¹ (¹ 阪大院工), “鹿児島大学が生んだ高分子ナノ粒子ワクチン”, 鹿児島大学産学官連携推進機構 特別講演会, 2008年1月30日, 鹿児島大学 (鹿児島県).
62. 明石 満^{1,3}, 赤木隆美^{1,3}, 馬場昌範^{2,3} (¹ 阪大院工, ² 鹿大院医歯学, ³ CREST-JST), “高分子ナノ粒子ワクチン”, 第6回遺伝子治療シンポジウム, 2008年2月1日, 千里阪急ホテル (大阪府).
63. 明石 満^{1,3}, 赤木隆美^{1,3}, 馬場昌範^{2,3} (¹ 阪大院工, ² 鹿大院医歯学, ³ CREST-JST), “高分子ナノ粒子ワクチン”, 第3回 DDS 熊本シンポジウム, 2008年2月7日, 熊本大学 (熊本県).
64. 明石 満^{1,3}, 赤木隆美^{1,3}, 馬場昌範^{2,3} (¹ 阪大院工, ² 鹿大院医歯学, ³ CREST-JST), “高分子ナノ粒子ワクチン”, 高度医療都市を創出する未来技術シンポジウム, 2008年3月18日, 岡山国際交流センター (岡山県).

口頭発表 (国内会議 44 件、国際会議 2 件)

1. 濱田和博¹, 金子達雄^{1,3}, 明石 満^{1,2,3}, 陳明清⁴ (¹ 鹿大院理工, ² 阪大院工, ³CREST, ⁴ 江南大学), “ウイルス型ナノ粒子の作製とその形状制御”, 第52回高分子年次大会, 2003年5月30日, 名古屋国際会議場 (愛知県).
2. 下栗大器¹, 金子達雄^{1,3}, 芹澤 武^{1,3}, 明石 満^{1,2,3} (¹ 鹿大院理工, ² 阪大院工, ³CREST), “疎水化ポリ(γ-グルタミン酸)ハイドロゲルの環境応答”, 第52回高分子討論会, 2003年9月25日, 山口大学 (山口県).
3. 金子達雄^{1,2}, 濱田和博¹, 明石 満^{1,2}, 陳明清³ (¹ 阪大院工, ²CREST, ³ 江南大学), “ウイルス型ナノ粒子の self-assembly”, 第52回高分子討論会, 2003年9月25日, 山口大学 (山口県).
4. 赤木隆美¹, 金子達雄^{1,2}, 木田敏之^{1,3}, 明石 満^{1,3} (¹ 阪大院工, ² 鹿大院理工医, ³CREST), “新規生分解性高分子ナノ粒子の創製と評価”, 第53回高分子学会年次大会, 2004年5月26日, 神戸国際会議場 (兵庫県).
5. 赤木隆美^{1,4}, 金子達雄^{1,4}, 木田敏之^{1,4}, 馬場昌範^{2,4}, 速水正憲³, 明石 満^{1,4} (¹ 阪大院工, ² 鹿大院医, ³ 京大ウイルス研, ⁴CREST), “不活化 SHIV 捕捉ナノ粒子の経鼻免疫サルにお

- ける HIV 特異的抗体産生と経粘膜感染防御”, 第 33 回医用高分子シンポジウム, 2004 年 7 月 26 日, 上智大学(東京都).
6. 赤木隆美¹, 金子達雄^{1,3}, 木田敏之^{1,3}, 馬場昌範^{2,3}, 明石 満^{1,3} (¹ 阪大院工, ² 鹿大院医, ³CREST), “生分解性ポリ(γ-グルタミン酸)ナノ粒子のワクチン担体としての機能評価”, 第 53 回高分子討論会, 2004 年 9 月 15 日, 北海道大学(北海道).
 7. 瀧田和博¹, 金子達雄^{1,2}, 陳明清³, 明石 満^{1,2} (¹ 阪大院工, ²CREST, ³ 江南大学), “ウイルス型ナノ粒子の物質吸着特性”, 第 53 回高分子討論会, 2004 年 9 月 15 日, 北海道大学(北海道).
 8. Hang Thi Tran², 松崎典弥¹, 金子達雄^{1,3}, 明石 満^{1,3} (¹ 阪大院工, ² 鹿大院理工, ³CREST), “天然物の重合によるバイオ液晶ポリマーの合成”, 第 53 回高分子討論会, 2004 年 9 月 16 日, 北海道大学(北海道).
 9. 吉川友章¹, 中川晋作¹ (¹ 阪大院薬), “変異型 Bc1-X_L(FNK)遺伝子導入樹状細胞を用いた腫瘍ワクチン療法の最適化 - 2”, 日本薬学会第 125 回年会, 2005 年 3 月 29 日, 東京ビックサイト(東京都).
 10. 伊藤祐貴¹, 松崎典弥¹, 木田敏之¹, 明石 満^{1,2} (¹ 阪大院工, ²CREST), “タマネギ型生分解性中空ナノカプセルを応用したマルチドラッグデリバリーシステム”, 日本化学会第 85 回春季年会, 2005 年 3 月 26 日, 神奈川大学横浜キャンパス(神奈川県).
 11. 和久友則¹, 松崎典弥¹, 金子達雄^{1,2}, 木田敏之^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹ 阪大院工, ²CREST), “NCA 重合法を利用したコア - コロナ型ペプチドナノスフェアの一段階合成と物性評価”, 第 54 回高分子学会年次大会, 2005 年 5 月 26 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
 12. 瀧田和博¹, 金子達雄^{1,2}, 陳明清³, 明石 満^{1,2} (¹ 阪大院工, ²CREST, ³ 江南大学), “ウイルス型ナノ粒子の表面ヘテロ化とタンパク質吸着特性”, 第 54 回高分子学会年次大会, 2005 年 5 月 26 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
 13. Xin Wang^{1,2}, Tomofumi Uto^{1,2}, Masanori Baba^{1,2} (¹ 鹿大院医, ²CREST), “Biodegradable nanospheres increase the immunogenicity of HIV-1 antigens” 第 42 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2005 年 7 月 8 日, 沖縄県女性総合センター「ていりる」(沖縄県).
 14. 伊藤祐貴¹, 松崎典弥¹, 木田敏之¹, 明石 満^{1,2} (¹ 阪大院工, ²CREST), “薬物除放能を有する生分解性中空カプセルの酵素分解挙動”, 第 51 回高分子研究発表会, 2005 年 7 月 22 日, 兵庫県中央労働センター(兵庫県).
 15. 瀧田和博¹, 金子達雄^{1,2}, 陳明清³, 明石 満^{1,2} (¹ 阪大院工, ²CREST, ³ 江南大学), “ウイルス型ナノ粒子の自己組織化による強固な新規 3D 構造体の作製”, 第 51 回高分子研究発表会, 2005 年 7 月 22 日, 兵庫県中央労働センター(兵庫県).
 16. 赤木隆美^{1,4}, 金子達雄^{1,4}, 木田敏之^{1,4}, 中川晋作^{2,4}, 馬場昌範^{3,4}, 明石 満^{1,4} (¹ 阪大院工, ² 阪大院薬, ³ 鹿大院医歯学, ⁴CREST), “アミノ酸由来生分解性ナノ粒子の免疫誘導効果”, 第 34 回医用高分子シンポジウム, 2005 年 8 月 1 日, 上智大学(東京都).
 17. 和久友則¹, 松崎典弥¹, 金子達雄^{1,2}, 木田敏之^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹ 阪大院工, ²CREST), “2 元 NCA 重合によるコア - コロナ型ペプチドナノスフェアの一段階精密合成と機能評価”, 第 54 回高分子討論会, 2005 年 9 月 20 日, 山形大学(山形県).
 18. 井上佳一郎¹, 赤木隆美^{1,2}, 金子達雄^{1,2}, 木田敏之^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹ 阪大院工, ²CREST), “天然多糖ペクチンからの生分解性ナノ粒子の調製とタンパク質保持能”, 第 54 回高分子討論会, 2005 年 9 月 20 日, 山形大学(山形県).
 19. 赤木隆美^{1,3}, 金子達雄^{1,3}, 木田敏之^{1,3}, 馬場昌範^{2,3}, 明石 満^{1,3} (¹ 阪大院工, ² 鹿大院医歯学, ³ CREST), “両親媒化ポリアミノ酸から成る生分解性ナノ粒子の調製と粒経制御”, 第 54 回高分子討論会, 2005 年 9 月 20 日, 山形大学(山形県).
 20. 吉川友章^{1,4}, 飯田恵介^{1,4}, 小田淳史^{1,4}, 丹羽貴子^{1,4}, 松尾一彦^{1,4}, 下川摩里子⁴, 堤 康央^{1,2}, 赤木隆美^{3,4}, 明石 満^{3,4}, 中川晋作^{1,4} (¹ 阪大院薬, ² 基盤研, ³ 阪大院工, ⁴CREST), “ポリγ-グルタミン酸を用いたガンワクチンキャリアの開発”, 第 9 回日本ワクチン学会, 2005 年 10 月 16 日, 大阪国際交流センター(大阪府).
 21. 伊藤祐貴¹, 松崎典弥¹, 木田敏之^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹ 阪大院工, ²CREST-JST), “マルチドラッ

- グデリバリーを可能とするタマネギ型生分解性中空ナノカプセルの開発”, 第27回日本バイオマテリアル学会大会, 2005年11月29日, 京都テルサ(京都府).
22. 王 欣^{1,2}, 宇都倫史^{1,2}, 馬場昌範^{1,2} (¹ 鹿大院医歯学, ²CREST), “Induction of HIV-1 specific immunoresponses by HIV-1 antigen-loaded biodegradable nanoparticles and its mechanism”, 第19回日本エイズ学会総会・学術集会, 2005年12月2日, 熊本市市民会館・熊本市国際交流会館(熊本県).
 23. 吉川友章^{1,3}, 小田淳史^{1,3}, 飯田恵介^{1,3}, 松尾一彦^{1,3}, 萱室裕之¹, 丹羽貴子^{1,3}, 後藤美千代¹, 赤木隆美^{2,3}, 明石満^{2,3}, 岡田直貴¹, 中川晋作^{1,3} (¹ 阪大院薬, ² 阪大院工, ³ CREST), “ポリγ-グルタミン酸ナノ粒子を用いた生分解性抗腫瘍ワクチンキャリアの開発”, ファーマバイオフォーラム2005, 2005年12月11日, 武庫川女子大学(兵庫県).
 24. 吉川友章^{1,4}, 小田淳史^{1,4}, 丹羽貴子^{1,4}, 飯田恵介^{1,4}, 松尾一彦^{1,4}, 萱室裕之^{1,4}, 堤康央², 赤木隆美^{3,4}, 明石満^{3,4}, 中川晋作^{1,4} (¹ 阪大院薬, ² 基盤研, ³ 阪大院工, ⁴ CREST), “両親媒化ポリγ-グルタミン酸を用いた新規生分解性ワクチンキャリアの開発と抗腫瘍ワクチンへの応用-1”, 第35回日本免疫学会総会学術集会, 2005年12月13日, パシフィコ横浜(神奈川県).
 25. 萱室裕之^{1,3}, 吉川友章^{1,3}, 小田淳史^{1,3}, 松尾一彦^{1,3}, 赤木隆美^{2,3}, 明石満^{2,3}, 岡田直貴^{1,3}, 中川晋作^{1,3} (¹ 阪大院薬, ² 阪大院工, ³ CREST), “腫瘍ワクチンキャリアとしての両親媒化ポリγ-グルタミン酸ナノ粒子の機能評価”, 日本薬剤学会第21年会, 2006年3月18日, 金沢市観光会館(石川県).
 26. 伊藤祐貴¹, 松崎典弥¹, 木田敏之¹, 明石満^{1,2} (¹ 阪大院工, ²CREST-JST), “刺激応答型生分解性中空カプセルのマルチドラッグリリースへの応用”, 日本化学会第86春季年会, 2006年3月27日, 日本大学(千葉県).
 27. 赤木隆美^{1,2}, 金子達雄^{1,2}, 木田敏之^{1,2}, 明石満^{1,2} (¹ 阪大院工, ²JST-CREST), “疎水修飾ポリ(γ-グルタミン酸)ナノ粒子の酵素分解性”, 第55回高分子学会年次大会, 2006年5月24日, 名古屋国際会議場(愛知県).
 28. 井上佳一郎¹, 赤木隆美^{1,2}, 木田敏之^{1,2}, 明石満^{1,2} (¹ 阪大院工, ²JST-CREST), “pH応答性ペクチンナノ粒子の調整とそのタンパク質放出挙動”, 第55回高分子学会年次大会, 2006年5月25日, 名古屋国際会議場(愛知県).
 29. 伊藤祐貴^{1,2}, 松崎典弥^{1,2}, 木田敏之¹, 明石満^{1,2,3} (¹ 阪大院工, ²21COE, ³JST-CREST), “生分解性中空ナノ粒子を用いたマルチドラッグリリース”, 第55回高分子学会年次大会, 2006年5月25日, 名古屋国際会議場(愛知県).
 30. 後藤美千代^{1,3}, 丹羽貴子^{1,3}, 吉川友章^{1,3}, 水口裕之^{1,2}, 岡田直貴^{1,3}, 中川晋作^{1,3} (¹ 阪大院薬, ² 基盤研, ³CREST), “アポトーシス抵抗性を付与した樹状細胞の生体内生存期間延長と免疫誘導との関連評価”, 第22回日本DDS学会, 2006年7月7日, 東京国際交流館(東京都).
 31. 赤木隆美^{1,4}, 木田敏之^{1,4}, 中川晋作^{2,4}, 馬場昌範^{3,4}, 明石満^{1,4} (¹ 阪大院工, ² 阪大院薬, ³ 鹿大院医歯, ⁴JST-CREST), “両親媒化ポリアミノ酸ナノ粒子を用いた樹状細胞への抗原送達と細胞性免疫誘導効果”, 第35回医用高分子シンポジウム, 2006年8月1日, 上智大学(東京都).
 32. 松尾一彦^{1,3}, 吉川友章¹, 赤木隆美^{2,3}, 明石満^{2,3}, 岡田直貴^{1,3}, 中川晋作^{1,3} (¹ 阪大院薬, ² 阪大院工, ³CREST), “癌免疫療法における抗原送達キャリアーとしてのγ-PGA ナノ粒子の有用性”, 第65回日本癌学会総会, 2006年9月28日, パシフィコ横浜(神奈川県).
 33. 松尾圭祐^{1,3}, 吉川友章¹, 萱室裕之^{1,3}, 松尾一彦^{1,3}, 石井裕美子^{1,3}, 吉永知世^{1,3}, 赤木隆美^{2,3}, 明石満^{2,3}, 岡田直貴^{1,3}, 中川晋作^{1,3} (¹ 阪大院薬, ² 阪大院工, ³CREST), “ナノテクノロジーを基盤とした抗原送達キャリアーの創製と癌免疫療法への応用”, 第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会, 2006年10月14日, 京都薬科大学(京都府).
 34. 赤木隆美^{1,3}, 木田敏之^{1,3}, 吉川友章^{2,3}, 中川晋作^{2,3}, 明石満^{1,3} (¹ 阪大院工, ² 阪大院薬, ³ JST-CREST), “両親媒化ポリアミノ酸ナノ粒子の免疫誘導メカニズム”, 第28回日本バイオマテリアル学会大会, 2006年11月27日, アルカディア市ヶ谷(東京都).

35. 萱室裕之^{1,3}, 松尾圭祐^{1,3}, 松尾一彦^{1,3}, 吉川友章¹, 明石 満^{2,3}, 岡田直貴^{1,3}, 中川晋作^{1,3} (¹ 阪大院薬, ²CREST, ³ 阪大院工), “抗原内包 γ -PGA ナノ粒子を用いた癌免疫療法におけるエフェクター細胞機能および安全性の評価”, 第 36 回日本免疫学会総会学術集会, 2006 年 12 月 11 日, 大阪国際会議場(大阪府).
36. 松尾圭祐^{1,2}, 吉川友章¹, 萱室裕之^{1,2}, 松尾一彦^{1,2}, 赤木隆美^{2,3}, 明石 満^{2,3}, 向 洋平^{1,2}, 吉岡靖雄^{1,4}, 岡田直貴^{1,2}, 中川晋作^{1,2,4} (¹ 阪大院薬, ²CREST, ³ 阪大院工, ⁴ 阪大 MEI センター), “抗原内包 γ -PGA ナノ粒子の免疫誘導機構と安全性に関する検討”, 日本薬学会第 127 年会, 2007 年 3 月 28 日, 富山大学(富山県).
37. 小泉勇人¹, 松尾一彦^{2,3}, 坂本史子¹, 溝内亜希子¹, 松尾圭祐^{2,3}, 吉川友章², 赤木隆美^{3,4}, 明石 満^{3,4}, 藤田卓也¹, 山本 昌¹, 中川晋作^{2,3}, 岡田直貴^{1,2,3} (¹ 京都薬大, ² 阪大院薬, ³CREST, ⁴ 阪大院工), “抗原内包 γ -PGA ナノ粒子の経鼻投与による腫瘍免疫誘導”, 日本薬学会第 127 年会, 2007 年 3 月 28 日, 富山大学(富山県).
38. 松尾一彦^{1,2}, 小泉勇人³, 松尾圭祐^{1,2}, 赤木隆美^{2,4}, 明石 満^{2,4,5}, 藤田卓也³, 山本 昌³, 向 洋平^{1,2}, 吉岡靖雄^{1,5}, 岡田直貴^{1,2}, 中川晋作^{1,2,5} (¹ 阪大院薬, ²CREST, ³ 京都薬大, ⁴ 阪大院工, ⁵ 阪大 MEI センター), “抗原内包 γ -PGA ナノ粒子を用いた経鼻投与型癌ワクチンの開発”, 日本薬剤学会第 22 年会, 2007 年 5 月 23 日, 大宮ソニックシティ(埼玉県).
39. *Tomonori Waku¹, Michiya Matsusaki¹, Mitsuru Akashi^{1,2} (¹ Graduate School of Engineering, Osaka University, ²CREST-JST), “Bio-inert PEG Brush Peptide Nanospheres with the Chemical Functionality”, 2nd International Conference on Advances in Petrochemicals and Polymers, 2007 年 6 月 28 日, Imperial Queen's Park Hotel (Bangkok, Thailand).
40. 松尾圭祐^{1,2}, 吉川友章¹, 明石 満^{2,3}, 向 洋平^{1,2}, 吉岡靖雄^{1,4}, 岡田直貴^{1,2}, 中川晋作^{1,2,4} (¹ 阪大院薬, ²CREST, ³ 阪大院工, ⁴ 阪大 MEI センター), “ γ -PGA ナノ粒子を抗原送達キャリアーとして用いた癌免疫療法の転移抑制効果”, 第 16 回日本がん転移学会総会, 2007 年 7 月 9 日, 富山国際会議場(富山県).
41. 赤木隆美^{1,4}, 中川晋作^{2,4}, 馬場昌範^{3,4}, 明石 満^{1,4} (¹ 阪大院工, ² 阪大院薬, ³ 鹿大院医歯学, ⁴CREST-JST), “疎水化ポリアミノ酸ナノ粒子を用いた抗ウイルスワクチン療法の有用性”, 第 36 回医用高分子シンポジウム, 2007 年 7 月 31 日, 上智大学(東京都).
42. *Yuki Itoh¹, Michiya Matsusaki^{1,2}, Toshiyuki Kida^{1,3}, Mitsuru Akashi^{1,2,3} (¹Osaka University, ²21COE, ³ JST-CREST), “Locally Controlled Release of Basic Fibroblast Growth Factor from Biodegradable Hollow Capsules”, 234th American Chemical Society National Meeting, 2007 年 8 月 19 日, Westin Boston Waterfront (MA, USA).
43. 赤木隆美^{1,4}, 中川晋作^{2,4}, 馬場昌範^{3,4}, 明石 満^{1,4} (¹ 阪大院工, ² 阪大院薬, ³ 鹿大院医歯学, ⁴CREST-JST), “高分子ナノ粒子ワクチンによる免疫応答制御”, 第 56 回高分子討論会, 2007 年 9 月 19 日, 名古屋工業大学(愛知県).
44. 和久友則¹, 松崎典弥¹, 明石 満^{1,2} (¹ 阪大院工, ²CREST), “高密度 PEG ブラシと反応性官能基を表面に有する生分解性ペプチドナノスフェアのバイオ機能”, 第 56 回高分子討論会, 2007 年 9 月 20 日, 名古屋工業大学(愛知県).
45. Kazuhiko Matsuo^{1,2}, Keisuke Matsuo^{1,2}, Takami Akagi^{2,3}, Mitsuru Akashi^{2,3,4}, Yohei Mukai¹, Yasuo Yoshioka^{1,4}, Naoki Okada^{1,2}, Shinsaku Nakagawa^{1,2,4} (¹Dept. Biotech. Ther. Grad. Sch. Pharm. Sci. Osaka Univ., ²CREST, ³Dept. Appl. Chem. Grad. Sch. Eng. Osaka Univ., ⁴MEI center Osaka Univ.), “Development of nasal administration-type cancer vaccine using γ -PGA nanoparticle as an antigen delivery carrier”, 第 66 回日本癌学会, 2007 年 10 月 3 日, パシフィコ横浜(神奈川県).
46. 姫野 愛¹, 赤木隆美^{2,4}, 伊吹謙太郎¹, 松山めぐみ¹, 平井 郁¹, 堀池麻里子¹, 宇都都史^{3,4}, 王 欣^{3,4}, 馬場昌範^{3,4}, 明石 満^{2,4}, 三浦智行¹ (¹ 京大ウイルス研, ² 阪大院工, ³ 鹿大院医歯学, ⁴CREST-JST), “抗原固定化生分解性ナノ粒子ワクチンのサル免疫実験および SHIV 攻撃接種による感染防御能の評価”, 第 6 回感染症沖縄フォーラム, 2008 年 2 月 14 日, 沖縄国民年金健康センター(沖縄県).

ポスター発表 (国内会議 79 件、国際会議 20 件)

1. 下栗大器¹, 尾込大介¹, 金子達雄^{1,3}, 芹澤 武^{1,3}, 明石 満^{1,2,3} (¹鹿大院理工, ²阪大院工, ³CREST), “疎水化処理した生分解性ポリ(γ-グルタミン酸)架橋体の合成”, 第52回高分子年次大会, 2003年5月29日, 名古屋国際会議場(愛知県).
2. 東麻里子¹, 松崎典弥¹, 金子達雄^{1,3}, 明石 満^{1,2,3} (¹鹿大院理工, ²阪大院工, ³CREST), “親 - 疎水性のバランスを制御したポリペプチドナノ構造体の作成”, 第52回高分子年次大会, 2005年5月30日, 名古屋国際会議場(愛知県).
3. 淵田岳仁¹, 松崎典弥¹, 金子達雄^{1,3}, 明石 満^{1,2,3} (¹鹿大院理工, ²阪大院工, ³CREST), “バイオメソゲンを有した新規な生分解性ポリペプチドの合成”, 第52回高分子年次大会, 2003年5月30日, 名古屋国際会議場(愛知県).
4. TRAN Hang Thi¹, 松崎典弥¹, 金子達雄^{1,3}, 明石 満^{1,2,3} (¹鹿大院理工, ²阪大院工, ³CREST), “液晶性ポリヒドロキシ桂皮酸誘導体の構造制御とバイオ機能”, 第52回高分子年次大会, 2005年5月30日, 名古屋国際会議場(愛知県).
5. 濱田和博¹, 金子達雄^{1,3}, 明石 満^{1,2,3}, 陳明清⁴ (¹鹿大院理工, ²阪大院工, ³CREST, ⁴江南大学), “ウイルス型ナノ粒子の一段階合成における溶媒親和性 形状相関”, 第52回高分子討論会, 2003年9月25日, 山口大学(山口県).
6. 金子達雄^{1,3}, 東麻里子¹, 松崎典弥¹, 明石 満^{1,2,3} (¹鹿大院理工, ²阪大院工, ³CREST), “両親媒性制御によるバイオナノ構造の作成”, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ 第1回公開シンポジウム, 2003年10月2日, 日本科学未来館(東京都).
7. 王 欣^{1,2}, 宇都倫史^{1,2}, 岡本美佳¹, 佐藤克明¹, 馬場昌範^{1,2} (¹鹿大院医歯学, ²CREST), “ナノ粒子の樹状細胞への取込み”, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ 第1回公開シンポジウム, 2003年10月2日, 日本科学未来館(東京都).
8. 吉川友章^{1,2}, 山本記裕¹, 下川摩里子^{1,2}, 堤 康央¹, 中川晋作^{1,2} (¹阪大院薬, ²CREST), “膜融合リポソームを用いた細胞質内への粒子導入”, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ 第1回公開シンポジウム, 2003年10月2日, 日本科学未来館(東京都).
9. *Takami Akagi^{1,3}, Tatsuo Kaneko^{1,3}, Masanori Baba^{2,3}, Mitsuru Akashi^{1,3} (¹阪大院工, ²鹿大院医歯, ³CREST), “Application of Nanosphere-Based Vaccine for of HIV Infection”, 7th World Biomaterials Congress, 2004年5月18日, Sydney (Australia).
10. *金子達雄^{1,3}, 東 麻理子^{1,3}, 松崎典弥^{1,3}, 明石 満^{1,2,3} (¹鹿大院理工, ²阪大院工, ³CREST), “Bio-Nanoconstructs Of Amphipathic Poypeptides Bearing Hydrophobic Amino Acid Side Group”, 7th World Biomaterials Congress, 2004年5月21日, Sydney (Australia).
11. 和久友則¹, 松崎典弥^{1,2}, 金子達雄^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²鹿大院理工, ³CREST), “NCA重合プロセスを利用した生分解性コア - コロナ型ナノスフェアの精密合成および機能評価”, 第53回高分子学会年次大会, 2004年5月27日, 神戸国際会議場(兵庫県).
12. 濱田和博², 金子達雄², 陳明清⁴, 明石 満^{1,2,3} (¹阪大院工, ²鹿大院理工, ³CREST, ⁴江南大学), “ウイルス型ナノ粒子のhomo-aggregationによる3次元構造体のモルフォロジー制御”, 第53回高分子学会年次大会, 2004年5月27日, 神戸国際会議場(兵庫県).
13. 下栗大器², 金子達雄², 明石 満^{1,2,3} (¹阪大院工, ²鹿大院理工, ³CREST), “両親媒化ポリ(γ-グルタミン酸)ハイドロゲルの感熱応答性に与える水素結合の影響”, 第53回高分子学会年次大会, 2004年5月27日, 神戸国際会議場(兵庫県).
14. *Tomoaki Yoshikawa¹, Norihiro Yamamoto¹, Toshiki Sugita¹, Tomoko Yamato¹, Takako Niwa¹, Naoko Kanagawa¹, Mariko Shimokawa^{1,2}, Kazuyoshi Kubo¹, Yasuo Tsutsumi¹, Shinsaku Nakagawa^{1,2}, Tadanori Mayumi¹ (¹阪大院薬, ²CREST), “Efficient delivery of encapsulated molecule to antigen presenting cells by Fusogenic-Liposome”, Pharmaceutical Science World Congress, 2004年6月2日, 国立京都国際会館(京都府).
15. 東麻理子², 松崎典弥¹, 赤木隆美^{1,3}, 金子達雄^{1,3}, 木田敏之^{1,3}, 明石 満^{1,3} (¹阪大院工, ²鹿大院理工, ³CREST), “親媒化ポリ(γ-グルタミン酸)のナノ構造体形成とその分解性に対する形状効果”, 第53回高分子討論会, 2004年9月16日, 北海道大学(北海道).

16. 下栗大器¹, 金子達雄^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST), “両親媒化ポリ(γ-グルタミン酸)誘導体の複数刺激応答性評価”, 第53回高分子討論会, 2004年9月17日, 北海道大学(北海道).
17. 赤木隆美^{1,2}, 金子達雄^{1,2}, 木田敏之^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²JST-CREST), “ナノ粒子を応用した抗レトロウイルスワクチンの開発”, 大阪大学イノベーションセミナー2004, 2004年10月19日, 大阪大学(大阪府).
18. 赤木隆美^{1,2}, 金子達雄^{1,2}, 木田敏之^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²JST-CREST), “生分解性ポリ(γ-グルタミン酸)ナノ粒子の蛋白質キャリアーとしての機能評価”, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ(ナノメディスン) 第2回公開シンポジウム, 2004年11月10日, 国際連合大学(東京都).
19. 王 欣^{1,2}, 宇都倫史^{1,2}, 馬場昌範^{1,2} (¹鹿大院医歯学, ²CREST), “HIV-1捕捉ナノ粒子による樹状細胞を介した特異的免疫誘導とそのメカニズム”, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ(ナノメディスン) 第2回公開シンポジウム, 2004年11月10日, 国際連合大学(東京都).
20. 吉川友章^{1,2}, 中川晋作^{1,2} (¹阪大院薬, ²CREST), “ナノキャリアーを用いた抗レトロウイルスワクチンの開発”, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ(ナノメディスン) 第2回公開シンポジウム, 2004年11月10日, 国際連合大学(東京都).
21. 濱田和博¹, 金子達雄^{1,2}, 陳明清³, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST, ³江南大学), “ウイルス型ナノ粒子の機能化と物質吸着挙動”, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2004, 2004年11月15日, つくば国際会議場(エポカル)(茨城県).
22. * 濱田和博¹, 金子達雄^{1,2}, 陳明清³, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST, ³江南大学), “Material adsorption behavior of functional virally-shaped nanoparticles”, 4TH ASIAN INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOMATERIALS (AISB4) and 2ND INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FUSION OF NANO AND BIOTECHNOLOGIES (FNB2004), 2004年11月18日, つくば国際会議場(エポカル)(茨城県).
23. 宇都倫史^{1,2}, 王 欣^{1,2}, 馬場昌範^{1,2} (¹鹿大院医歯学, ²CREST), “マウス樹状細胞における抗原固定化ナノ粒子の効果的な取り込みによる抗原特異的T細胞の誘導”, 第34回日本免疫学会, 2004年12月2日, ホテルロイトン札幌(北海道).
24. 井上佳一郎¹, 赤木隆美^{1,2}, 金子達雄^{1,2}, 木田敏之^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST), “天然多糖の親-疎水性バランス制御による新規生分解性ナノ粒子の創製”, 日本化学会第85回春季年会, 2005年3月26日, 神奈川大学横浜キャンパス(神奈川県).
25. 宇都倫史^{1,2}, 王 欣^{1,2}, 馬場昌範^{1,2} (¹鹿大院医歯学, ²CREST), “抗原固定化ナノ粒子を取り込んだ樹状細胞による効果的な抗原特異的T細胞の活性化”, 日本薬学会第125回年会, 2005年3月30日, 東京ビックサイト(東京都).
26. 丹羽貴子¹, 中川晋作¹ (¹阪大院薬), “変異型Bc1-X_L(FNK)遺伝子導入樹状細胞を用いた腫瘍ワクチン療法の最適化 - 1”, 日本薬学会第125回年会, 2005年3月29日, 東京ビックサイト(東京都).
27. 下栗大器¹, 金子達雄¹, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST), “両親媒化ポリ(γ-グルタミン酸)誘導体の刺激応答性と分解性評価”, 第54回高分子学会年次大会, 2005年5月25日, パシフィコ横浜(神奈川県).
28. 赤木隆美^{1,3}, 金子達雄^{1,3}, 木田敏之^{1,3}, 馬場昌範^{2,3}, 明石 満^{1,3} (¹阪大院工, ²鹿大院医歯学, ³CREST), “両親媒化ポリ(γ-グルタミン酸)ナノ粒子のタンパク質キャリアーとしての機能評価”, 第54回高分子学会年次大会, 2005年5月25日, パシフィコ横浜(神奈川県).
29. 伊藤祐貴¹, 松崎典弥¹, 木田敏之¹, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST), “タマネギ型生分解性中空カプセルの酵素分解挙動と薬物除放能”, 第54回高分子学会年次大会, 2005年5月25日, パシフィコ横浜(神奈川県).
30. 井上佳一郎¹, 赤木隆美^{1,2}, 金子達雄^{1,2}, 木田敏之^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST), “天然多糖由来生分解性ナノ粒子の調製と機能評価”, 第54回高分子学会年次大会, 2005年5月25日, パシフィコ横浜(神奈川県).
31. 吉川友章^{1,4}, 小田淳史^{1,4}, 丹羽貴子^{1,4}, 飯田恵介^{1,4}, 松尾一彦^{1,4}, 下川摩里子⁴, 堤 康央^{1,2},

- 赤木隆美^{3,4}, 明石 満^{3,4}, 中川晋作^{1,4} (¹阪大院薬, ²基盤研, ³阪大院工, ⁴CREST), “ワクチンキャリアとしてのポリアミノ酸由来生分解性ナノ粒子の有用性評価-1”, 第21回日本DDS学会, 2005年7月22日, ハウステンボスJR全日空ホテル(長崎県).
32. 小田淳史^{1,4}, 吉川友章^{1,4}, 丹羽貴子^{1,4}, 飯田恵介^{1,4}, 松尾一彦^{1,4}, 下川摩里子⁴, 堤 康央^{1,2}, 赤木隆美^{3,4}, 明石 満^{3,4}, 中川晋作^{1,4} (¹阪大院薬, ²基盤研, ³阪大院工, ⁴CREST), “ワクチンキャリアとしてのポリアミノ酸由来生分解性ナノ粒子の有用性評価-2”, 第21回日本DDS学会, 2005年7月22日, ハウステンボスJR全日空ホテル(長崎県).
33. *Takami Akagi^{1,2}, Tatsuo Kaneko^{1,2}, Toshiyuki Kida^{1,2}, Mitsuru Akashi^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST), “Preparation and Characterization of Biodegradable Nanoparticles Based on Poly (γ -glutamic acid) with Aromatic Amino Acid as a Protein Carrier”, The 8th SPSJ International Polymer Conference (IPC2005), 2005年7月29日, 福岡国際会議場(福岡県).
34. 吉川友章^{1,4}, 飯田恵介^{1,4}, 堤 康央^{1,2}, 赤木隆美^{3,4}, 明石 満^{3,4}, 中川晋作^{1,4} (¹阪大院薬, ²基盤研, ³阪大院工, ⁴CREST), “両親媒化ポリ γ -グルタミン酸を用いた腫瘍ワクチンキャリアの開発”, 第64回日本癌学会学術総会, 2005年9月14日, ロイトン札幌(北海道).
35. 伊藤祐貴¹, 松崎典弥¹, 木田敏之¹, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST), “薬物の徐放制御能を有するタマネギ型生分解性中空ナノカプセルの開発”, 第54回高分子討論会, 2005年9月20日, 山形大学(山形県).
36. 濱田和博¹, 金子達雄^{1,2}, 陳明清³, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST, ³江南大学), “ウイルス型ナノ粒子の表面構造制御と選択的物質吸着特性”, 第54回高分子討論会, 2005年9月20日, 山形大学(山形県).
37. 赤木 隆美^{1,4}, 金子達雄^{1,4}, 木田 敏之^{1,4}, 中川晋作^{2,4}, 馬場昌範^{3,4}, 明石 満^{1,4} (¹阪大院工, ²阪大院薬, ³鹿大院医歯学, ⁴CREST-JST), “生分解性ナノ粒子を用いるワクチンの開発”, 大阪大学イノベーションセミナー, 2005年10月4日, 大阪大学(大阪府).
38. 王 欣^{1,3}, 宇都倫史^{1,3}, 赤木隆美^{2,3}, 明石 満^{2,3}, 馬場昌範^{1,3} (¹鹿大院医歯学, ²阪大院工, ³CREST). HIV-1抗原を内包した生分解性ナノ粒子によるウイルス特異的免疫誘導. 第8回白馬シンポジウム, 2005年11月 3日, かごしま県民交流センター(鹿児島県).
39. 宇都倫史^{1,3}, 王 欣^{1,3}, 赤木隆美^{2,3}, 明石満^{2,3}, 馬場昌範^{1,3} (¹鹿大院医歯学, ²阪大院工, ³CREST). γ -ポリグルタミン酸(γ -PGA)ナノ粒子のマウス樹状細胞に対するアジュバント効果, 第8回白馬シンポジウム, 2005年11月3日, かごしま県民交流センター(鹿児島県).
40. 濱田和博¹, 金子達雄¹, Ming-Qing Chen², 明石 満^{1,3} (¹阪大院工, ²江南大学, ³CREST), “ナノ粒子の表面形状制御による選択的ウイルス吸着”, 第27回日本バイオマテリアル学会大会, 2005年11月29日, 京都テルサ(京都府).
41. 和久友則¹, 松崎典弥¹, 金子達雄^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST), “ナノメディスンのための機能性ペプチドナノ粒子の開発”, 第27回日本バイオマテリアル学会大会, 2005年11月29日, 京都テルサ(京都府).
42. 小田淳史^{1,4}, 吉川友章^{1,4}, 丹羽貴子^{1,4}, 飯田恵介^{1,4}, 松尾一彦^{1,4}, 萱室裕之^{1,4}, 堤康央², 赤木隆美^{3,4}, 明石満^{3,4}, 中川晋作^{1,4} (¹ 阪大院薬, ²基盤研, ³阪大院工, ⁴ CREST), “両親媒化ポリ γ -グルタミン酸を用いた新規生分解性ワクチンキャリアの開発と抗腫瘍ワクチンへの応用-2”, 第35回日本免疫学会総会学術集会, 2005年12月13日, パシフィコ横浜(神奈川県).
43. 飯田恵介^{1,4}, 吉川友章^{1,4}, 小田淳史^{1,4}, 丹羽貴子^{1,4}, 松尾一彦^{1,4}, 萱室裕之^{1,4}, 堤康央², 赤木隆美^{3,4}, 明石満^{3,4}, 中川晋作^{1,4} (¹ 阪大院薬, ²基盤研, ³阪大院工, ⁴ CREST), “両親媒化ポリ γ -グルタミン酸を用いた新規生分解性ワクチンキャリアの開発と抗腫瘍ワクチンへの応用-3”, 第35回日本免疫学会総会学術集会, 2005年12月13日, パシフィコ横浜(神奈川県).
44. 宇都倫史^{1,3}, 王 欣^{1,3}, 佐藤克明², 馬場昌範^{1,3} (¹CREST, ²理研, ³鹿大院医歯学), “マウス樹状細胞に対する γ -ポリグルタミン酸(γ -PGA)ナノ粒子のアジュバント効果”, 第35回日本免疫学会総会学術集会, 2005年12月14日, パシフィコ横浜(神奈川県).
45. *Kazuhiro Hamada¹, Tatsuo Kaneko¹, Ming-Qing Chen², Mitsuru Akashi^{1,3} (¹Osaka University, ²Southern Yangtze University, ³CREST), “One-Step Formation and Surface Modification of Nanoparticles with projection Coronas as Coronavirus Model”, PACIFICHEM 2005, 2005年

- 12月18日, Sheraton Waikiki (USA).
46. *Yuki Itoh¹, Michiya Matsusaki¹, Toshiyuki Kida^{1,2}, Mitsuru Akashi^{1,2} (¹Osaka University, ²CREST), “Drug-release Behavior and Enzymatic Degradation of Biodegradable Hollow Nanocapsules”, PACIFICHEM 2005, 2005年12月19日, Sheraton Waikiki (USA).
 47. *Xin Wang^{1,3}, Tomofumi Uto^{1,3}, Takami Akagi^{2,3}, Mitsuru Akashi^{2,3}, Masanori Baba^{1,3} (¹鹿大院医歯学, ²阪大院工, ³CREST), “Novel Biodegradable Nanoparticles Induce Dendritic Cell Maturation and Potent Cellular Immunity to Particle-Associated HIV-1 Antigens in Mice”, 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI2006), 2006年2月6日, Colorado Convention Center, (USA).
 48. *Takami Akagi^{1,2}, Tatsuo Kaneko^{1,2}, Toshiyuki Kida^{1,2}, Mitsuru Akashi^{1,2} (¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²CREST-JST), “Preparation of Biodegradable Nanoparticles Based on Amphiphilic Polymer and Their Applications for Vaccine Carrier”, 第4回ナノテクノロジー総合シンポジウム (JAPAN NANO 2006), 2006年2月20日, 東京ビッグサイト(東京都).
 49. 小泉勇人¹, 岡田直貴^{1,2,4}, 坂本史子¹, 吉川友章^{2,4}, 赤木隆美^{3,4}, 明石 満^{3,4}, 中川晋作^{2,4}, 藤田卓也¹, 山本 昌¹ (¹京都薬大, ²阪大院薬, ³阪大院工, ⁴CREST), “経口粘膜ワクチンキャリアーの開発を目指した γ -PGAナノ粒子の特性評価”, 日本薬剤学会第21年会, 2006年3月16日, 金沢21世紀美術館(石川県).
 50. 和久友則¹, 松崎典弥¹, 金子達雄^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST), “コア - コロナ型ペプチドナノ粒子の蛋白質固定化担体としての機能評価”, 日本化学会 第86春季年会, 2006年3月27日, 日本大学(千葉県).
 51. 井上佳一郎¹, 赤木隆美^{1,2}, 木田敏之^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST), “pH応答性ペクチンナノ粒子からのタンパク質の放出挙動”, 日本化学会第86春季年会, 2006年3月28日, 日本大学船橋キャンパス(千葉県).
 52. 吉川友章^{1,4}, 小田淳史^{1,4}, 丹羽貴子^{1,4}, 松尾一彦^{1,4}, 萱室裕之¹, 堤 康央^{1,2}, 赤木隆美^{3,4}, 明石 満^{3,4}, 岡田直貴^{1,4}, 中川晋作^{1,4} (¹阪大院薬, ²基盤研, ³阪大院工, ⁴CREST), “抗原蛋白質を内包した γ -PGAナノ粒子の特性評価と抗腫瘍ワクチンキャリアーへの応用”, 日本薬学会第126年会, 2006年3月28日, 仙台国際センター(宮城県).
 53. 小泉勇人¹, 岡田直貴^{1,2,4}, 坂本史子¹, 吉川友章^{2,4}, 赤木隆美^{3,4}, 明石 満^{3,4}, 中川晋作^{2,4}, 藤田卓也¹, 山本 昌¹ (¹京都薬大, ²阪大院薬, ³阪大院工, ⁴CREST), “ γ -PGAナノ粒子の粘膜ワクチンキャリアーへの応用に関する基礎的検討”, 日本薬学会第126年会, 2006年3月28日, 仙台国際センター(宮城県).
 54. 小田淳史^{1,4}, 吉川友章^{1,4}, 丹羽貴子^{1,4}, 松尾一彦^{1,4}, 萱室裕之¹, 堤 康央^{1,2}, 赤木隆美^{3,4}, 明石 満^{3,4}, 岡田直貴^{1,4}, 中川晋作^{1,4} (¹阪大院薬, ²基盤研, ³阪大院工, ⁴CREST), “抗原提示細胞への抗原蛋白質デリバリーにおける γ -PGAナノ粒子の有用性”, 日本薬学会第126年会, 2006年3月28日, 仙台国際センター(宮城県).
 55. *Takami Akagi^{1,4}, Shinsaku Nakagawa^{2,4}, Masanori Baba^{3,4}, Mitsuru Akashi^{1,4} (¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ³Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ⁴CREST, Japan Science and Technology Agency (JST)), “Preparation of Protein-loaded Biodegradable Nanoparticles Based on Poly(γ -glutamic acid) Hydrophobic Derivatives and Their Potential Biomedical Applications”, 2006年4月27日, Society For Biomaterials (SFB), 2006 Annual Meeting, David Lawrence Convention Center (Pittsburgh, Pennsylvania, USA).
 56. 濱田和博¹, 金子達雄^{1,2}, 陳明清³, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST, ³江南大学), “金平糖ナノ粒子を用いた選択的ウイルス捕捉”, 第55回高分子学会年次大会, 2006年5月26日, 名古屋国際会議場(愛知県).
 57. 和久友則¹, 松崎典弥¹, 金子達雄^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST), “コア - コロナ型ペプチドナノスフェアの蛋白質キャリアーとしての特性”, 第55回高分子学会年次大会, 2006年5月26日, 名古屋国際会議場(愛知県).
 58. 赤木隆美¹, 中川晋作², 馬場昌範³, 明石 満¹ (¹阪大院工, ²阪大院薬, ³鹿大院医歯), “生分解性ナノ粒子を用いたワクチン開発”, JSTナノバーチャルラボ成果報告会, 2006年7月15日

- ，東京国際フォーラム(東京都).
59. 和久友則¹，松崎典弥¹，金子達雄^{1,2}，明石 満^{1,2} (¹阪大院工，²CREST)，“コア - コロナ型ペプチドナノスフェアの表面機能化”，第52回高分子研究発表会，2006年7月21日，兵庫県中央労働センター(兵庫県).
 60. 濱田和博¹，金子達雄^{1,2}，陳明清³，明石 満^{1,2} (¹阪大院工，²CREST，³江南大学)，“分離材料への応用を指向した機能性金平糖型ナノ粒子の作製”，第52回高分子研究発表会，2006年7月21日，兵庫県中央労働センター(兵庫県).
 61. 井上佳一郎¹，赤木隆美^{1,2}，木田敏之^{1,2}，明石 満^{1,2} (¹阪大院工，²CREST)，“種々のpHにおける生分解性ペクチンナノ粒子からのタンパク質放出挙動”，第52回高分子研究発表会，2006年7月21日，兵庫県中央労働センター(兵庫県).
 62. 濱田和博¹，金子達雄^{1,2}，陳明清³，明石 満^{1,2} (¹阪大院工，²CREST，³江南大学)，“分離材料への応用を指向した金平糖型ナノ粒子の作製とその表面構造解析”，第55回高分子討論会，2006年9月20日，富山大学(富山県).
 63. 井上佳一郎¹，赤木隆美^{1,2}，木田敏之^{1,2}，中川晋作^{2,3}，明石 満^{1,2} (¹阪大院工，²JST-CREST，³阪大院薬)，“ペクチンナノ粒子のタンパク質キャリアーとしての機能評価”，第55回高分子討論会，2006年9月21日，富山大学(富山県).
 64. 和久友則¹，松崎典弥¹，金子達雄^{1,2}，明石 満^{1,2} (¹阪大院工，²CREST)，“コア - コロナ型ペプチドナノスフェアの表面構造とタンパク質吸着挙動の解析”，第55回高分子討論会，第55回高分子討論会，2006年9月21日，富山大学(富山県).
 65. 伊藤祐貴^{1,2}，松崎典弥^{1,2}，木田敏之^{1,3}，明石 満^{1,2,3} (¹阪大院工，²21COE，³JST-CREST)，“複数刺激に応答可能な生分解性中空カプセルからのタンパク質の放出”，第55回高分子討論会，2006年9月21日，富山大学(富山県).
 66. 赤木隆美^{1,4}，木田敏之^{1,4}，中川晋作^{2,4}，馬場昌範^{3,4}，明石 満^{1,4} (¹阪大院工，²阪大院薬，³鹿大院医歯，⁴JST-CREST)，“疎水修飾ポリアミノ酸ナノ粒子を用いた細胞内への蛋白抗原デリバリー”，第55回高分子討論会，2006年9月22日，富山大学(富山県).
 67. 小泉勇人¹，岡田直貴^{2,4}，坂本史子¹，溝内亜季子¹，松尾圭祐^{2,4}，吉川友章²，赤木隆美^{3,4}，明石 満^{3,4}，中川晋作^{2,4}，藤田卓也¹，山本 昌¹ (¹京都薬大，²阪大院薬，³阪大院工，⁴CREST)，“経粘膜ワクチンキャリアーとしての両親媒化ポリγ-グルタミン酸ナノ粒子の有用性評価”，第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会，2006年10月13日，京都薬科大学(京都府).
 68. 赤木隆美^{1,4}，金子達雄^{1,4}，木田敏之^{1,4}，中川晋作^{2,4}，馬場昌範^{3,4}，明石 満^{1,4} (¹阪大院工，²阪大院薬，³鹿大院医歯学，⁴CREST)，“高分子ナノ粒子ワクチンの有用性”，大阪大学イノベーションセミナー2006，2006年10月23日，大阪大学(大阪府).
 69. *Xin Wang^{1,2}，Tomofumi Uto^{1,2}，Mitsuru Akashi^{2,3}，and Masanori Baba^{1,2} (¹鹿大院医歯学，²CREST，³阪大院工)，“Novel biodegradable nanoparticles induce potent antigen-specific CD8⁺ T-cell responses to particle-associated HIV-1 gp120 in mice”，第54回日本ウイルス学会総会，2006年11月19日，名古屋国際会議場(愛知県).
 70. *Tomofumi Uto^{1,2}，Xin Wang^{1,2}，Katsuaki Sato³，Misako Haraguchi²，Takami Akagi^{1,4}，Mitsuru Akashi^{1,4}，Masanori Baba^{1,2} (¹CREST-JST，²Kagoshima University，³RIKEN，⁴Osaka University)，“Targeting of antigen to dendritic cells with poly(γ-glutamic acid) nanoparticles induce antigen-specific humoral and cellular immunity”，2nd Japanese-Germany HIV/AIDS Symposium，2006年11月24日，Bochum (Germany).
 71. 和久友則¹，松崎典弥¹，金子達雄^{1,2}，明石 満^{1,2} (¹阪大院工，²CREST)，“コア - コロナ型ペプチドナノスフェアのDDSキャリアーとしてのタンパク質吸着評価”，第28回日本バイオマテリアル学会大会，2006年11月27日，アルカディア市ヶ谷(東京都).
 72. 伊藤祐貴^{1,2}，松崎典弥^{1,2}，木田敏之^{1,3}，明石 満^{1,2,3} (¹阪大院工，²21COE，³JST-CREST)，“生分解性高分子からなる中空カプセルのタンパク質のマルチドラッグリリースへの応用”，第28回日本バイオマテリアル学会大会，2006年11月27日，アルカディア市ヶ谷(東京都).
 73. *Takami Akagi^{1,4}，Shinsaku Nakagawa^{2,4}，Masanori Baba^{3,4}，Mitsuru Akashi^{1,4} (¹Graduate School of Engineering，Osaka University，²Graduate School of Pharmaceutical Sciences，Osaka

- University, ³Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ⁴CREST, Japan Science and Technology Agency (JST)), “Nanoparticles composed of amphiphilic poly(amino acid) derivatives as a carrier and adjuvant for protein-based vaccines”, UT Symposium on NanoBio Integration / NANOBIO-TOKYO 2006, 2006年12月5日, 東京大学 (東京都).
74. 萱室裕之^{1,3}, 松尾圭祐^{1,3}, 松尾一彦^{1,3}, 吉川友章¹, 明石 満^{2,3}, 岡田直貴^{1,3}, 中川晋作^{1,3} (¹阪大院薬, ²CREST, ³阪大院工), “抗原内包 γ -PGAナノ粒子を用いた癌免疫療法におけるエフェクター細胞機能および安全性の評価”, 第36回日本免疫学会総会学術集会, 2006年12月11日, 大阪国際会議場 (大阪府).
 75. *宇都倫史^{1,3}, 王 欣^{1,3}, 佐藤克明², 赤木隆美^{1,4}, 明石 満^{1,4}, 馬場昌範^{1,3} (¹CREST, ²理研, ³鹿大院医歯学, ⁴阪大院工), “A novel vaccine carrier, poly(γ -glutamic acid) nanoparticles, induces potent immune responses through effective dendritic cell maturation in mice”, 第36回日本免疫学会総会学術集会, 2006年12月12日, 大阪国際会議場 (大阪府).
 76. 井上佳一郎¹, 赤木隆美^{1,2}, 木田敏之^{1,2}, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST), “天然多糖由来の新規生分解性ナノ粒子のタンパク質放出制御”, 日本バイオマテリアル学会第1回関西若手研究発表会, 2007年2月27日, 京都大学再生医科学研究所 (京都府).
 77. 松尾圭祐^{1,2}, 吉川友章¹, 松尾一彦^{1,2}, 石井裕美子^{1,2}, 吉永知世^{1,2}, 赤木隆美^{2,3}, 明石 満^{2,3,4}, 向 洋平¹, 吉岡靖雄^{1,4}, 岡田直貴^{1,2}, 中川晋作^{1,2,4} (¹阪大院薬, ²CREST, ³京都薬大, ⁴阪大院工, ⁵阪大MEIセンター), “ γ -PGAナノ粒子の抗原送達キャリアー特性とその癌免疫療法への応用”, 遺伝子・デリバリー研究会第7回シンポジウム, 2007年5月18日, 東大鉄門講堂 (東京都).
 78. 和久友則¹, 松崎典弥¹, 金子達雄¹, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²CREST), “蛋白質の非特異的な吸着を抑制し、標的蛋白質の固定化を可能とするバイオイナート PEG プラシペプチドナノスフェア”, 第56回高分子学会年次大会, 2007年5月29日, 国立京都国際会館 (京都府).
 79. 伊藤祐貴^{1,2}, 松崎典弥^{1,2}, 木田敏之^{1,3}, 明石 満^{1,2,3} (¹阪大院工, ²ICOE, ³JST-CREST), “マルチドラッグリリースを可能とする生分解性中空カプセルによるbFGF の放出制御”, 第56回高分子学会年次大会, 2007年5月30日, 国立京都国際会館 (京都府).
 80. 吉永知世^{1,2}, 松尾圭祐^{1,2}, 吉川友章¹, 赤木隆美^{2,3}, 明石 満^{2,3,4}, 向 洋平^{1,2}, 吉岡靖雄^{1,4}, 岡田直貴^{1,2}, 中川晋作^{1,2,4} (¹阪大院薬, ²CREST, ³京都薬大, ⁴阪大院工, ⁵阪大MEIセンター), “各種両親媒化高分子を素材とするナノ粒子のワクチンキャリアー機能に関する比較検討”, 第23回日本DDS学会, 2007年6月14日, 熊本日航ホテル (熊本県).
 81. 石井裕美子^{1,2}, 松尾圭祐^{1,2}, 吉川友章¹, 赤木隆美^{2,3}, 明石 満^{2,3,4}, 向 洋平^{1,2}, 吉岡靖雄^{1,4}, 岡田直貴^{1,2}, 中川晋作^{1,2,4} (¹阪大院薬, ²CREST, ³阪大院工, ⁴阪大MEIセンター), “ γ -PGAナノ粒子を抗原送達キャリアーとして用いた樹状細胞免疫療法の有効性評価”, 第23回日本DDS学会, 2007年6月14日, 熊本日航ホテル (熊本県).
 82. *Kazuhiko Matsuo^{1,2}, Keisuke Matsuo^{1,2}, Takami Akagi^{2,3}, Mitsuru Akashi^{2,3,4}, Yohei Mukai¹, Yasuo Yoshioka^{1,4}, Naoki Okada^{1,2}, Shinsaku Nakagawa^{1,2,4} (¹Dept. Biotech. Ther. Grad. Sch. Pharm. Sci. Osaka Univ., ²CREST, ³Dept. Appl. Chem. Grad. Sch. Eng. Osaka Univ., ⁴MEI center Osaka Univ.), “Antigen delivery by nasal administration with γ -PGA nanoparticles can elicit potent antitumor responses”, 4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery, June 20, 2007, KANAZAWA EXCEL HOTEL TOKYU (Kanazawa, Japan).
 83. *Yuki Itoh¹, Michiya Matsusaki^{1,2}, Toshiyuki Kida^{1,3}, Mitsuru Akashi^{1,2,3} (¹Osaka University, ²ICOE, ³JST-CREST), “The Controlled Release of bFGF from Biodegradable Hollow Capsules”, The 2nd International Conference on Advances in Petrochemicals and Polymers (ICAPP2007), 2007年6月26日, The Imperial Queen's Park Hotel (Bangkok, Thailand).
 84. *Takami Akagi^{1,4}, Shinsaku Nakagawa^{2,4}, Masanori Baba^{3,4}, Mitsuru Akashi^{1,4} (¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ³Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ⁴CREST, Japan Science and Technology Agency (JST)), “Nanoparticles composed of amphiphilic poly(amino acid) for enhanced protein delivery to dendritic cells as vaccine adjuvants”, 2007年7月9日, 34th controlled release society annual meeting & exposition, Long Beach Convention

- Center (Long Beach, California, USA).
85. 伊藤祐貴^{1,2}, 松崎典弥^{1,2}, 木田敏之^{1,3}, 明石 満^{1,2,3} (¹阪大院工, ²21COE, ³JST-CREST), “膜透過性を制御した生分解性中空カプセルによるサイトカインの局所的デリバリー”, 第53回高分子研究発表会, 2007年7月20日, 兵庫県中央労働センター(兵庫県).
 86. 伊藤祐貴^{1,2}, 松崎典弥^{1,2}, 木田敏之^{1,3}, 明石 満^{1,2,3} (¹阪大院工, ²21COE, ³JST-CREST), “生分解性交互積層膜からなる中空カプセルの時空間制御型ドラッグキャリアへの展開”, 第56回高分子討論会, 2007年9月20日, 名古屋工業大学(愛知県).
 87. 姫野 愛¹, 赤木隆美^{2,3}, 伊吹謙太郎¹, 松山めぐみ¹, 平井郁¹, 堀池麻里子¹, 宇都倫史^{3,4}, 王 欣^{3,4}, 馬場昌範^{3,4}, 明石満^{2,3}, 三浦智行¹ (¹京大ウイルス研, ²阪大院工, ³CREST, ⁴鹿大院医), “抗原固定化生分解性ナノ粒子ワクチンのサル免疫実験およびSHIV攻撃接種による感染防御能の評価”, 第55回日本ウイルス学会学術集会, 2007年10月22日, 札幌コンベンションセンター(北海道).
 88. 宇都倫史^{1,3}, 王 欣^{1,3}, 赤木隆美^{2,3}, 善久理加¹, 明石 満^{2,3}, 馬場昌範^{1,3} (¹鹿大院医歯学, ²阪大院工, ³CREST), “マウスを用いたHIV抗原固定化ナノ粒子の経鼻投与による抗原特異的な細胞性免疫の解析”, 第55回日本ウイルス学会学術集会, 2007年10月22日, 札幌コンベンションセンター(北海道).
 89. 赤木隆美^{1,4}, 中川晋作^{2,4}, 馬場昌範^{3,4}, 明石 満^{1,4} (¹阪大院工, ²阪大院薬, ³鹿大院医歯学, ⁴CREST), “免疫応答制御を有する高分子ナノ粒子の開発”, 大阪大学イノベーションセミナー2007, 2007年10月22日, 大阪大学(大阪府).
 90. *Takami Akagi^{1,4}, Shinsaku Nakagawa^{2,4}, Masanori Baba^{3,4}, Mitsuru Akashi^{1,4} (¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ³Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, ⁴CREST-JST), “Immunostimulation of dendritic cells using amphiphilic polymeric nanoparticles for vaccine development”, Green Sustainable Biological and Chemical Processes, 2007年11月16日, 大阪大学銀杏会館(大阪府).
 91. 赤木隆美^{1,4}, 中川晋作^{2,4}, 馬場昌範^{3,4}, 明石 満^{1,4} (¹阪大院工, ²阪大院薬, ³鹿大院医歯, ⁴JST-CREST), “ポリアミノ酸ナノ粒子による蛋白抗原の細胞内動態制御”, 第29回日本バイオマテリアル学会大会, 2007年11月26日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府).
 92. 和久友則¹, 松崎典弥¹, 明石 満¹ (¹阪大院工), “反応性官能基を有するPEG ブラシペプチドナノスフェアへの蛋白質吸着特性”, 第29回日本バイオマテリアル学会大会, 2007年11月27日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府).
 93. 金 亨振¹, 赤木隆美^{1,2}, 松崎典弥¹, 明石 満^{1,2} (¹阪大院工, ²JST-CREST), “細胞質内での抗原徐放を目的とした機能性疎水化ポリ(γ-グルタミン酸)ナノ粒子の調製”, 第29回日本バイオマテリアル学会大会, 2007年11月27日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府).
 94. *Tomofumi Uto^{1,3}, Xin Wang^{1,3}, Rika Zenkyu¹, Takami Akagi^{2,3}, Mitsuru Akashi^{2,3}, Masanori Baba^{1,3} (¹Kagoshima University, ²Osaka University, ³CREST-JST), “Biodegradable nanoparticles induce antigen-specific T cell response through dendritic cell maturation”, Vaccine Congress, 2007年12月9日, Moevenpick Hotel Amsterdam City Center (Netherlands).
 95. *Takami Akagi^{1,3}, Xin Wang^{2,3}, Tomofumi Uto^{2,3}, Masanori Baba^{2,3}, Mitsuru Akashi^{1,3} (¹Osaka University, ²Kagoshima University, ³CREST-JST), “Amphiphilic poly(amino acid)nanoparticles as a carrier and adjuvant for protein-based vaccines”, Vaccine Congress, 2007年12月9日, Moevenpick Hotel Amsterdam City Center (Netherlands).
 96. 赤木隆美^{1,4}, 松崎典弥¹, 木田敏之¹, 明石 満^{1,4} (¹阪大院工, ⁴CREST), “両親媒性高分子を基盤としたナノ粒子ワクチンの創製”, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ成果報告会, 2008年1月22日, ベルサール九段(東京都).
 97. 宇都倫史^{1,3}, 王 欣^{1,3}, 赤木隆美^{2,3}, 善久理加¹, 明石 満^{2,3}, 馬場昌範^{1,3} (¹鹿大院医歯, ²阪大院工, ³CREST-JST), “HIV-1抗原固定化ナノ粒子のマウス経鼻投与による免疫誘導効果の検討”, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ成果報告会, 2008年1月22日, ベルサール九段(東京都).
 98. 松尾圭祐^{1,2}, 吉川友章^{1,2}, 松尾一彦^{1,2}, 石井裕美子^{1,2}, 吉永知世^{1,2}, 赤木隆美^{2,3}, 明石 満

- 2,3,4, 向 洋平¹, 吉岡靖雄^{1,4}, 岡田直貴^{1,2}, 中川晋作^{1,2,4} (1阪大院薬, 2CREST, 3阪大院工, 4阪大MEIセンター) “-PGAナノ粒子の抗原送達機能の解析と癌免疫療法への応用”, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ成果報告会, 2008年1月22日, ベルサール九段(東京都).
99. 姫野愛¹, 赤木隆美^{2,4}, 伊吹謙太郎¹, 松山めぐみ¹, 平井郁¹, 堀池麻里子¹, 宇都倫史^{3,4}, 王欣^{3,4}, 馬場昌範^{3,4}, 明石満^{2,4}, 三浦智行¹ (1京都大学ウイルス研究所, 2阪大院工, 3鹿大院医歯, 4CREST) “抗原固定化生分解性ナノ粒子ワクチンのサル免疫実験およびSHIV攻撃接種による感染防御能の評価”, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ成果報告会, 2008年1月22日, ベルサール九段(東京都).

(4)特許出願

国内出願 (7 件)

1. “抗原を固定化した生分解性ナノ粒子、およびそれを含むワクチン”, 明石 満, 中川晋作, 国立大学法人大阪大学, 2005 年 4 月 20 日, 特願 2005-122650.
2. “アジュバントとしてのポリアミノ酸”, 明石 満, 馬場昌範, 国立大学法人大阪大学, 国立大学法人鹿児島大学, 2005 年 8 月 2 日, 特願 2005-224519.
3. “T 細胞認識エピトープペプチドを固定化又は内包化した生分解性ナノ粒子”, 明石 満, 生澤公一, 国立大学法人大阪大学, 大鵬薬品工業株式会社, 2005 年 8 月 25 日, 特願 2005-243997.
4. “ウイルス抗原を固定化した生分解性ナノ粒子”, 明石 満, 馬場昌範, 国立大学法人大阪大学, 国立大学法人鹿児島大学, 2005 年 9 月 16 日, 特願 2005-270146.
5. “インフルエンザワクチン用アジュバントおよびインフルエンザワクチン”, 明石 満, 森 康子, 岡本成史, 山西弘一, 高橋理明, 赤木隆美, 国立大学法人大阪大学, 独立行政法人医薬基盤研究所, 財団法人阪大微生物研究会, 2006 年 10 月 2 日, 特願 2006-271273.
6. “疎水化ポリ(γ-グルタミン酸)からなるナノ粒子の製造方法”, 明石 満, 馬場昌範, 赤木隆美, 舩木隆文, 加藤真哉, 株式会社ビーエムティーハイブリッド, 国立大学法人鹿児島大学, 国立大学法人大阪大学, 2007 年 5 月 21 日, 特願 2007-134243.
7. “フラビウイルス感染症ワクチンおよびフラビウイルス感染症ワクチン用アジュバント”, 明石 満, 森 康子, 岡本成史, 吉井洋紀, 山西弘一, 小島朝人, 石川豊数, 高橋理明, 赤木隆美, 国立大学法人大阪大学, 独立行政法人医薬基盤研究所, 財団法人阪大微生物研究会, 2007 年 12 月 21 日出願, 特願 2007-330151.

海外出願 (3 件)

1. “アジュバントとしてのポリアミノ酸”, 明石 満, 馬場昌範, 国立大学法人大阪大学, 国立大学法人鹿児島大学, 2006 年 4 月 16 日, PCT/JP2006/308218
2. “抗原を固定化した生分解性ナノ粒子、およびそれを含むワクチン”, 明石 満・中川晋作, 国立大学法人大阪大学, 2006 年 4 月 19 日, PCT/JP2006/308217
3. “T 細胞認識エピトープペプチドを固定化又は内包化した生分解性ナノ粒子”, 明石 満, 生澤公一, 国立大学法人大阪大学, 大鵬薬品工業株式会社, 2006 年 8 月 25 日, PCT/JP2006/317288

(5)受賞等

受賞

1. 明石 満, 平成 16 年度バイオマテリアル学会賞, “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”.

2. ファーマバイオフォーラム 2005 最優秀発表賞, “ポリγ-グルタミン酸ナノ粒子を用いた生分解性抗腫瘍ワクチンキャリアの開発”, 吉川友章, 2005 年 12 月 11 日, 武庫川女子大学(兵庫県).
3. Young Investigator Award of the 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, “Novel Biodegradable Nanoparticles Induce Dendritic Cell Maturation and Potent Cellular Immunity to Particle-Associated HIV-1 Antigens in Mice”, Xin Wang, February 5, 2006, Colorado Convention Center (USA).
4. Tomofumi Uto^{1,2} (¹CREST-JST, ²Kagoshima University), Young Scientists Scholarships of the 2nd German-Japanese HIV Symposium, 2nd Japanese-Germany HIV/AIDS Symposium, 2006 年 11 月 24-25 日, Bochum (Germany).
5. 明石 満, 平成 18 年度大阪大学教育・研究功績賞, 2007 年 3 月 29 日, 大阪大学(大阪府).
6. 遺伝子・デリバリー研究会準奨励賞. 松尾圭祐^{1,2}, 吉川友章¹, 松尾一彦^{1,2}, 石井裕美子^{1,2}, 吉永知世^{1,2}, 赤木隆美^{2,3}, 明石 満^{2,3,4}, 向 洋平¹, 吉岡靖雄^{1,4}, 岡田直貴^{1,2}, 中川晋作^{1,2,4} (¹大阪大学・薬学研究科, ²CREST, ³大阪大学・工学研究科, ⁴大阪大学 MEI センター), “γ-PGA ナノ粒子の抗原送達キャリアー特性とその癌免疫療法への応用”, 遺伝子・デリバリー研究会 第 7 回シンポジウム, 2007 年 5 月 18 日, 東京大学鉄門講堂(東京都).
7. 日本がん転移学会優秀演題賞. 松尾圭祐^{1,2}, 吉川友章¹, 明石 満^{2,3}, 向 洋平^{1,2}, 吉岡靖雄^{1,4}, 岡田直貴^{1,2}, 中川晋作^{1,2,4} (¹大阪大学・薬学研究科, ²CREST, ³大阪大学・工学研究科, ⁴大阪大学 MEI センター), γ-PGA ナノ粒子を抗原送達キャリアーとして用いた癌免疫療法の転移抑制効果, 第 16 回日本がん転移学会, 2007 年 7 月 9-10 日, 富山国際会議場(富山県).
8. 伊藤祐貴, 第 53 回高分子研究発表会(神戸) エクセレントポスター賞, “膜透過性を制御した生分解性中空カプセルによるサイトカインの局所的デリバリー”, 2007 年 7 月 20 日, 兵庫県中央労働センター(兵庫県).

新聞報道

1. “ナノ粒子応用に 5 億円”, 南日本新聞(朝刊 35 面), 2002 年 11 月 2 日.
2. “タマネギ型のナノカプセル”, 日経産業新聞(朝刊 9 面), 2005 年 2 月 13 日.
3. “抗原物質つけた超微粒子 ヒトの免疫細胞を活性化”, 読売新聞(朝刊 24 面), 2005 年 12 月 14 日.
4. “かごしま知の最前線・エイズワクチン研究”, 南日本新聞(朝刊), 2006 年 11 月 20 日.
5. “インフルエンザ ワクチンにナノ粒子 医薬基盤研など免疫反応高める”, 日本経済新聞(朝刊 19 面), 2007 年 11 月 19 日.

その他

1. “Snorting nanospheres could bring protection”, Nanotechweb (<http://nanotechweb.org/articles/news/4/10/17/1>), 2005 年 10 月 25 日.
2. “大阪大学、副作用少なく強力に免疫を誘導するワクチンキャリアを発表”, 日経バイオテクノロジージャパン (<http://biotech.nikkeibp.co.jp/BIO.jsp>), 2005 年 12 月 15 日.

7 研究期間中の主な活動(ワークショップ・シンポジウム等)

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 14 年 12 月 12 日	第 1 回 CREST 明石チーム・合同研究発表会 (チームミーティング)	鹿児島大学工学部 応用化学工学科第 2 棟	7	研究を開始するにあたり、ナノ粒子を用いるウイルス固定化バイオ素子創製について レトロウイルスワクチン開発の現状について リポソームを用いるナノ粒子の

				DDS について、整理し、本プロジェクトの推進のための研究戦略「研究の分担と共同作業」について打ち合わせを行った。
平成 15 年 6 月 18 日	第 2 回 CREST 明石チ ーム・合同研究発表会 (チームミーティング)	大阪大学大学院工 学研究科分子化学 専攻 C4 棟	7	本プロジェクト研究が開始され半年が経過 した段階において、各研究グループの進 捗状況を互いに認識することを目的に打 ち合わせを行う。特にワクチンに用いるナ ノ粒子(高分子微粒子およびリポソーム) 開発の方向と現状を把握し、研究戦略を 精査した。
平成 15 年 11 月 26 日	第 3 回 CREST 明石チ ーム・合同研究発表会 (チームミーティング)	大阪大学大学院工 学研究科分子化学 専攻 C4 棟	12	研究開始後、1 年を経過した現段階にお ける各研究グループの進捗状況を互いに 認識することを目的に打ち合わせを行っ た。平成 15 年 10 月より新たに研究員を 1 名加えたこともあり、特にワクチンに用いる 生分解性ナノ粒子開発の方向性を確認 し、これからの研究戦略を討議した。
平成 16 年 4 月 12 日	第 4 回 CREST 明石チ ーム・合同研究発表会 (チームミーティング)	大阪大学大学院工 学研究科分子化学 専攻 C4 棟	16	研究開始後、2 年目を迎えるにあたり、現 段階における各研究チームの進捗状況に ついて互いに認識することを目的に打ち 合わせを行った。特にワクチンに用いるナ ノ粒子開発の現状を把握し、研究戦略を 精査した。
平成 16 年 11 月 4 日	第 5 回 CREST 明石チ ーム・合同研究発表会 (チームミーティング)	大阪大学先端科学 イノベーションセン ター・先導的研究 棟 2 階会議室	20	研究開始後、2 年目を迎えるにあたり、現 段階における各研究チームの進捗状況に ついて互いに認識することを目的に打ち 合わせを行った。特にナノ粒子ワクチンの 効果と今後の研究戦略について議論し た。
平成 17 年 4 月 8 日	第 6 回 CREST 明石チ ーム・合同研究発表会 (チームミーティング)	大阪大学先端科学 イノベーションセン ター・先導的研究 棟 2 階会議室	22	現段階における各研究グループの進捗状 況を互いに認識することを目的に打ち合 わせを行った。特に各グループでのナノ粒 子ワクチンの効果について議論を深め、グ ループ間での研究分担を再確認した。
平成 17 年 8 月 11 日	第 7 回 CREST 明石チ ーム・合同研究発表会 (チームミーティング)	大阪大学先端科学 イノベーションセン ター・先導的研究 棟 2 階会議室	22	10 月 4 日に開催される中間報告会に向 けて、各グループの研究進捗状況を報告し 合い、今後の研究戦略、研究分担など、 打ち合わせを行った。
平成 18 年 4 月 5 日	第 8 回 CREST 明石チ ーム・合同研究発表会 (チームミーティング)	大阪大学先端科学 イノベーションセン ター・先導的研究 棟 2 階会議室	33	研究開始後、4 年目を迎えるにあたり、現 段階における各研究グループの進捗状況 を互いに認識し、新たに研究グループと して加わった三浦グループとの今後の研 究展開について打ち合わせを行った。
平成 18 年 10 月 16 日	第 9 回 CREST 明石チ ーム・合同研究発表会 (チームミーティング)	大阪大学先端科学 イノベーションセン ター・先導的研究 棟 2 階会議室	27	これまでの研究経緯を振り返りながら、今 後の最終的な研究展開について討論し た。今回は医薬基盤研究所との共同研究 内容についても討議を行った。
平成 19 年 4 月 13 日	第 10 回 CREST 明石 チーム・合同研究発表 会(チームミーティ ング)	大阪大学先端科学 イノベーションセン ター・先導的研究 棟 2 階会議室	27	雀部研究総括参加のもと、これまでの各グ ループでの研究成果発表を行い、4 年間 の研究内容を再確認した。また、残り 1 年 間の研究計画について討議し、最終目標 を明確化させた。

8 研究成果の展開

(1)他の研究事業への展開

本研究により、高分子ナノ粒子が免疫担当細胞である樹状細胞に効率よく取込まれることが明らかとなった。そのため、ナノ粒子と樹状細胞との相互作用を詳細に解析し、ナノ粒子のもつ DDS としての機能に加え、樹状細胞の活性化を制御するナノ粒子の設計が可能となれば、免疫疾患に対する治療応用はもちろんのこと、免疫学的にも非常に興味深いものである。そこで、2004 年の文科省科学技術振興調整費「ナノテクノロジー研究者国際交流日瑞間の国際交流プログラム」により、明石グループとスウェーデンルンド大学とで、「DNA マイクロアレイを用いたナノ粒子とヒト樹状細胞の相互作用の解析」を目的に共同研究を開始した。ルンド大学の Prof. C.A.K. Borrebaeck は DNA マイクロアレイを用いた遺伝子解析センターを有しており、ヒト細胞を用いた遺伝子発現解析を専門としている。この研究では、コア - コロナ型ポリスチレンナノ粒子(NS)に破傷風毒素(TT)を表面固定化し、ナノ粒子(NS)および TT 固定化ナノ粒子(NS-TT)の樹状細胞に対する活性化能を解析した。NS-TT、TTのみ、NSのみを捕捉した樹状細胞の4および12時間後の遺伝子発現量を解析した結果、NS-TT を捕捉した樹状細胞では免疫応答に関連する遺伝子の発現量が増加しており、CTL の誘導に重要な CD80 の発現量の増加も確認された。さらに、NS のみを捕捉した樹状細胞においても免疫応答に関する遺伝子発現量が増加していた。この結果は、ナノ粒子が免疫賦活能を有することを遺伝子発現レベルで示した世界で初めての成果である。

これらの結果を基盤に、平成 19 年 6 月より、JST 戦略的国際科学技術協力推進事業(日本 - スウェーデン)「細胞内抗原徐放型ナノキャリアによる新たなワクチン療法の開発と免疫活性化機構の解明」の研究が開始されている(2年間)。このプロジェクトでは、CREST 研究で得られた種々の生分解性ナノ粒子を用いて、ヒト樹状細胞に対するナノ粒子の免疫賦活能の評価を目的としている。ナノ粒子を取込んだ樹状細胞に対して、その細胞表面活性化(成熟化)マーカー発現、サイトカイン産生を評価し、樹状細胞の活性化および Th1、Th2 レスポンスの解析を行う予定である。さらに、DNA マイクロアレイを用いた発現遺伝子の網羅的な解析により、遺伝子レベルおよび蛋白質レベルでの両面からのナノ粒子の機能を明確する。日本においては、ヒト細胞を用いた DNA 解析は倫理上問題があるため、本国際研究連携を通じて、より臨床に近い状態での解析が可能となる。これらの解析結果をもとに、ナノ粒子の物性と樹状細胞の活性化との相関性を明らかにできれば、免疫療法に有用なナノ粒子の設計に対して重要な知見が得られると考えられる。このような樹状細胞とナノ粒子の相互作用に対する包括的な解析研究はこれまでに例がなく、この国際共同研究と CREST 研究との間で大きな相乗効果が期待される。

(2)実用化に向けた展開

本研究では、レトロウイルスに対するナノ粒子ワクチンの開発を目的に研究を開始した。各グループの連携のもと、ナノ粒子の合成から免疫誘導効果の解析が進むにつれて、企業、大学、研究所からの共同研究の依頼が多数持ち込まれるようになり、様々な免疫疾患に対応できる普遍的なナノ粒子ワクチンとして研究の幅が飛躍的に増大した。大鵬薬品工業(株)と研究代表者の明石は、2003 年よりナノ粒子を用いたスギ花粉免疫療法剤の開発に関する共同研究を開始した。2005 年には、スギ花粉の T 細胞認識エピトープペプチドを固定化したナノ粒子が、花粉アレルゲンに対する Th1/Th2 バランスを制御でき、免疫療法剤として機能することを明らかにした(特許出願)。また、大鵬薬品ではナノ粒子の安全性試験を実施しており、実用化に向けた展開を図っている。(独)医薬基盤研究所とワクチンメーカーの(財)阪大微生物病研究会とは、2006 年より共同研究を開始し、インフルエンザワクチンの開発を実施している。アジュバントとしてナノ粒子を用いることで高い効果を実証しており、2006 年に特許出願に至っている。高病原性鳥インフルエンザをはじめ、インフルエンザワクチンの需要は高く、現行の HA ワクチンの改良も求められている。ナノ粒子の安全性が保証されれば、ナノ粒子のアジュバントとしての実用化が期待できる。

9 他チーム、他領域との活動とその効果

(1)領域内の活動とその効果

本研究の共同研究者の馬場は HIV-1 感染症の治療開発に関する研究を行っており、ワクチン開発に加え、新規抗エイズ薬の基礎研究から臨床開発まで手がけている。一方、同じ研究領域である、平成 13 年度採択「健康・福祉のためのナノバイオ材料およびバイオ素子としてのスーパー酵素抗体の創製」の宇田グループでは、HIV-1 gp120、gp41 および HIV の受容体として知られている CCR5 を破壊するスーパー酵素抗体を用いた抗 HIV 薬の開発を行っている。CCR5 を標的としたスーパー抗体酵素の抗 HIV 効果を検討するには、通常末梢リンパ球を用いてアッセイするしか方法がないが(細胞株は CCR を発現していないため)、馬場グループでは CCR5 発現 MOLT-4 細胞を所有しており、共同研究を始めることとなった。この共同研究により、より簡便なアッセイ系を組むことができるようになった。

(2)領域横断的活動とその効果

本プロジェクトにおいては、領域横断的活動により際立った研究上の展開・コラボレーションは実現されなかった。しかしながら、これらの会に参加することで、最先端の研究領域を理解することができ、研究のシーズを探索する良い機会となった。現在のバイオテクノロジー関連分野においては、1 つの科学技術のみで達成される研究開発は限られており、基礎から応用を含めた学術的・技術的発展のためには、複数の異なる領域での理解と連携が重要であると思われる。今後も、領域横断的活動に積極的に参加することで、知識・技術の共有、産学官を含めた共同研究を積極的に推進していきたい。

10 研究成果の今後の貢献について

(1)科学技術の進歩が期待される成果

ウイルスや細菌などの感染症を予防するためにはワクチンの接種が有効であり、現行のワクチンにより人類は多くの感染症の脅威から逃れている。現在使用されているワクチンは、弱毒生ワクチン、不活化ワクチン、コンポーネントワクチンの 3 種類に大別される。生ワクチンでは、体内で弱毒化した細菌やウイルスを増殖させ、それに対する免疫を誘導することで、強毒株に対する感染・発症予防効果が長期間得られる。しかし欠点として、弱毒の程度により臨床反応がみられ、また強毒株への変異といった危険性がある。一方、コンポーネントワクチンは、感染防御の標的となる蛋白成分のみを含むワクチンであり、非感染性であるが、免疫誘導効果が低いといった短所がある。現在 20 種類以上のウイルス・細菌に対するワクチンが開発されている一方で、HIV、C 型肝炎ウイルス(HCV)、呼吸器多核体ウイルス(RSV)、鳥インフルエンザウイルス、ロタウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトパピローマウイルス(HPV)、サイトメガロウイルス等のウイルス性疾患に対しては、有効かつ安全なワクチンは開発されておらず、その対策が求められている。日本国内においては、1995 年に A 型肝炎ワクチンが開発されて以降、新しいワクチンは市場されていない状況である。これは現在開発が求められているワクチンの多くは、従来ワクチン方法では十分な効果と安全性を得ることができず、新しい手法でのワクチン開発が求められている。

ワクチン開発の最も汎用的な手法としては、ウイルスの構成成分の一部である抗原蛋白、ペプチド、プラスミド DNA を用いたコンポーネントワクチンが挙げられる。しかしながら、抗原蛋白や DNA のみを免疫原として生体内に投与しても、目的とする組織や細胞に到達する前に分解されてしまい、有効なワクチン効果を得ることは困難である。そのため、高分子ナノ粒子による DDS 技術を応用したワクチン開発を展開することで、これらの問題を解決することが期待される。抗原を担持したナノ粒子を用いたワクチンでは、主に 2 つの効果期待できる。(1)ナノ粒子から抗原が徐々に放出され、少量ずつ持続的に免疫系を刺激し、強い免疫応答が得られる。(2)抗原固定化ナノ粒子

を用いることで、初期の免疫応に重要な働きをする樹状細胞やマクロファージに積極的に取込まれ、効率のよい免疫誘導が可能となる。本研究では(2)について詳細な解析を行い、ナノ粒子ワクチンによる免疫誘導メカニズムを明らかにした。特に、疎水化 γ -PGA ナノ粒子による樹状細胞の活性化、単回免疫による強力な CTL 誘導は、これまでのナノ粒子では実現されなかった効果である。両親媒性高分子からナノ粒子のワクチン担体としてのポテンシャルを見出せたことは、ワクチン開発における学術的・技術的・産業的発展に大きな影響を与えるものである。

未熟な樹状細胞は、微生物由来の細胞壁成分(LPS など)や TNF- α などの炎症性サイトカインにより成熟化する。樹状細胞はその成熟化過程において、貪食能を失うとともに MHC クラス I, II 分子や共刺激分子を高発現し、強い T 細胞活性化能を獲得する。この樹状細胞の成熟化は、免疫系の調節に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。そのため、ワクチンによって樹状細胞の成熟化を制御できれば、有効な免疫療法となり得る。疎水化 γ -PGA ナノ粒子は、この樹状細胞の成熟化の制御を可能とする抗原デリバリー型アジュバントとして機能することを見出した。今後、この樹状細胞の活性化に関連するナノ粒子の因子(粒経、形状、表面電荷、高分子組成、化学構造、分子量、分解性、新疎水性等)を明らかにすることができれば、免疫療法に有用なナノ粒子の設計に対して重要な知見が得られると考えられる。

ナノメートルオーダーで制御された微粒子には、 dendrimer、フラーレン、金属・無機超微粒子、高分子ナノ粒子などの様々な種類があり、現在のナノテクノロジーの中核技術に位置づけられている。なかでも、原子や分子から構造体を組み上げるボトムアップ型のナノテクノロジーは、精密かつ高機能性材料の創製に対する基盤技術として期待されている。近年では高分子鎖の分子間および分子内での相互作用による自発的な会合を利用したナノ粒子の調製が試みられており、ここで働く相互作用としては、疎水性相互作用、静電的相互作用、水素結合、ファンデルワース力などがあげられる。本研究では既存の生分解性高分子を部分的に疎水修飾することで、簡便かつ大量にナノ粒子を調製できる合成方法を開発した。この合成方法は応用範囲が広く、様々な水溶性高分子に対して応用が可能である。本合成方法を基盤に、分子設計された高分子鎖の自己組織化によるナノ構造体の調製により、目的志向的なナノ粒子の設計が可能になる考えられる。疎水化 γ -PGA ナノ粒子は凍結乾燥による保存、再分散が可能であり、マウスレベルでの顕著な毒性も認められていない。現行の疎水化 γ -PGA ナノ粒子は、機能化のための修飾部位を有しており、さらなる高性能・高機能ナノ粒子の開発が期待される。

(2)社会・経済の発展が期待される成果

感染症・がん・自己免疫疾患等の疾患にはワクチン療法が適用できる。現行のワクチンは感染症に対するものがほとんどであり、がんや花粉症などに対する有効なワクチンは存在しない。特にがんに対するワクチン開発の需要は高く、近年では樹状細胞を用いた細胞免疫療法が注目を集めている。がん治療には、外科療法、抗がん剤、放射線による治療が主に行われている。しかしながら、いずれの治療においても副作用、再発、転移の問題があり、免疫療法による治療と再発予防効果を兼ね備えたがんワクチンの開発が試みられている。免疫原としては、腫瘍関連抗原である蛋白質やペプチドが用いられているが、現在のワクチンではがん細胞排除の実質的な担い手である CTL 誘導効果が乏しく、高いワクチン効果は得られていない。本研究で開発した疎水化 γ -PGA ナノ粒子は、抗原蛋白・ペプチドに対して強力な CTL を誘導することができる。そのため、このナノ粒子と腫瘍関連抗原をコンジュゲートさせることで、有効性と安全性を兼ね備えたがんワクチンの開発が期待される。これにより、国民の 3 大疾患の 1 つである、がんに対する新たな治療戦略を確立することができる。がんは国内死亡原因の 30%を占めており、年間 2 兆 5000 億円と言われている医療費削減につながるものであり、がんワクチン開発による社会への貢献は計り知れない。

がんワクチン以外にも、現行のインフルエンザワクチンのアジュバントとして応用が期待される。現在用いられている不活化インフルエンザワクチン(HA ワクチン)は、流行予測により毎年選定されるワクチン株をもとに作製される。この HA ワクチンを皮下接種することにより、血中の IgG 中和抗体が誘導され、体内でのウイルス増殖が抑制されるため、インフルエンザの発病、発症の軽減・重

篤化の阻止に有効である。ワクチン株と流行株の抗原性が一致すれば、健康成人で 70%以上の発病防止効果を示す。しかし、ウイルスの侵入ルートである呼吸気道に抗体(特に IgA 抗体)がほとんど誘導されないため、感染そのものの予防効果には限界がある。さらに、HA ワクチンでは、免疫の持続効果が短く、毎年接種しなければ高い効果は望めず、幼児や高齢者においては複数回の接種が必要となっている。インフルエンザワクチンは国内ワクチン市場の 30%を占めており、幼児および高齢者を対象とした効果の高い感染予防ワクチンの開発が期待されている。ナノ粒子ワクチンにより強力な細胞性免疫を誘導することで、幅広いウイルス型に対応し、さらに長期間のワクチン効果の持続が可能となり、流行時の対応より確実なものとなると予想される。これにより、我々の QOL の向上が期待され、感染症やその合併症に伴う医療費の削減や疾病に罹患した際の経済損失の軽減効果にも繋がる。普遍的なワクチンアジュバントを開発することで、今後出現すると考えられる新興・再興感染症に対するワクチン開発にも応用が可能となる。

11 結び

本研究課題の目的は、高分子ナノ粒子とウイルス抗原をコンジュゲーションしたワクチンを創製し、レトロウイルスに対する免疫応答を誘導することで、疾患予防と治療を達成することであった。この 5 年間を通じて、各グループが技術・成果を共有することで計画当初の目標はほぼ達成することができた。明石グループでは、研究の根幹となる新規生分解性ナノ粒子の開発とナノ粒子への抗原固定化方法の構築に成功した。さらに疎水化 γ -PGA ナノ粒子のワクチン担体としての機能を明らかにすることができ、当初の目的を達成することができたと考えている。ナノ粒子の安全性評価にまで踏み込むことが出来たことは評価に値する。疎水化 γ -PGA ナノ粒子はワクチン開発のブレイクスルーとなるデバイスとして有用であると期待される。馬場グループでは、ナノ粒子と樹状細胞との相互作用解析において、ナノ粒子が樹状細胞に効率よく取込まれることに加え、ナノ粒子自身に樹状細胞を活性化させる作用があることを明らかにした。このナノ粒子のアジュバント活性は、当初の研究では予想されなかった結果であり、普遍的なナノ粒子ワクチンの開発に対して大きなインパクトを与えた。マウスを用いた HIV-1 ワクチン開発においても、ナノ粒子ワクチンの単回投与による免疫誘導効果を明らかにし、サルを用いた感染防御実験を行うために必要な情報を蓄積することができた。中川グループでは、膜融合リボソーム(FL)を用いたナノ粒子細胞質導入技術の開発に成功し、新たな DDS 技術としての有用性を示した。さらに、疎水化 γ -PGA ナノ粒子が癌ワクチン療法における抗原蛋白質送達キャリアとして非常に優れた特性を有することを見出した。がんワクチンとしての有効性が示されたことは、当初計画の予想を上回る成果であると言える。これにより、研究計画を大幅に見直し、レトロウイルスワクチンおよびがんワクチン開発に加え、「普遍性の高いナノ粒子ワクチンの開発」というものを研究課題の大きな目標に設定した。この目標設定が、本プロジェクトの飛躍的發展に大きな影響を与えたと考えている。三浦グループでは、平成 18 年度より、HIV-1 抗原固定化ナノ粒子を用いたサル免疫実験を行い、サルでの HIV-1 特異的液性および細胞性免疫効果を明らかにした。しかしながら、ナノ粒子ワクチンによる有効な予防および治療効果は確認されなかった。これは HIV-1 の場合、他の感染症やがんなどと異なり、免疫誘導の強弱(量)よりも、むしろ誘導される免疫の質的なものが重要であることを示唆している。今後は標的とする抗原や投与方法を検討し、真に HIV-1 排除に働く免疫の誘導方法を構築する必要がある。本研究課題において、サルを用いたナノ粒子ワクチンの評価まで実施し、今後のワクチン開発に関する多くの情報を集積することができたことで、研究目的の一部は達成したと考えている。当初の計画以外に、(独)医薬基盤研究所でのインフルエンザワクチン開発、大鵬薬品工業(株)でのスギ花粉免疫療法剤の開発に対して、ナノ粒子ワクチンの有効性が示されており、当初の計画を上回る成果であると言える。高分子ナノ粒子ワクチンの開発は、工学、薬学、医学の融合領域であり、これらの分野が横断的に研究展開できたことが、実りある多くの研究成果に結びついたと確信している。

これまでに様々なワクチンアジュバント候補となるシーズは研究開発されているが、これら候補物質が臨床開発、実用化まで進んだ例はほとんどない。これはワクチン開発が一般医薬品と異なり、開発後の市場予測、収益性の見通しの不確定要素が多いことに起因している。そのため、企業が

独力で臨床開発投資に踏切るにはリスクが高く、国民の安全性確保のためのワクチン開発は国が取り組むべき課題の1つである。また、新しいワクチン開発には、各研究機関との連携による臨床開発への応用基盤の構築が必要不可欠である。現在の日本のワクチン市場は約600億円程度であり、そのうちインフルエンザワクチンが30%、小児領域が35%、成人市場が20%を占める。ナノ粒子ワクチンを用いて、現行のワクチンより安全性・有効性の高い製品が開発されれば、ワクチン需要は拡大すると予想される。特に、インフルエンザワクチンについては、幅広い年齢層において高い効果が期待される改良製品の開発が望まれている。また、がんワクチンにより新たな市場の確保が期待される。

そこで今後の研究展開としては、本研究課題で得られた成果をもとに、工業化レベルでのナノ粒子ワクチンの製造技術を完成させ、様々な疾病に応用展開することで、従来のワクチン概念を超越した革新的ナノ医療を実現化させることである。これに関しては、本研究課題が評価され、平成19年10月より、CREST-JST「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創製」領域(研究統括:堀池靖浩)において「免疫制御能を有する高分子ナノ粒子ワクチンの製造」(研究代表者:明石 満)が採択された。次のCRESTでは、本プロジェクトの研究者である明石、馬場に加え、大阪大学医学部附属病院未来医療センター・消化器内科学の巽との3つのグループより構成されている。研究内容は、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。5年間の研究期間を通して、1)産学連携による高分子ナノテクノロジーを基盤としたナノ粒子製造技術の確立、2)抗原とナノ粒子とのコンジュゲーションによるワクチン製剤化プロセスの確立、3)ナノ粒子のワクチン効果と安全性評価、4)医工連携のもと実用化を目指したがんワクチンに対するトランスレーショナルリサーチへと展開を図る。ナノ粒子製造技術の確立、安全性試験、臨床展開においては、高度な技術と専門知識の集積された製薬・ワクチン製造企業の合成・製剤・生産技術が必要不可欠であり、産学連携のもと研究を推進する予定である。高分子ナノ粒子ワクチンを臨床応用するための製造技術および製剤化プロセスを構築により、近い将来、感染症・がん・自己免疫疾患の免疫療法に対して実用化されることを確信している。

本課題は、当初、コア-コロナ型ポリスチレンナノ粒子を基本的な材料として使い、研究展開させる予定であった。申請時のヒアリングにおいて、相澤総括から、「真に医療に貢献できるように、安心して用いることが可能な、基本的となるナノ粒子を生み出すよう。」との強い指示を頂いた。小手先の研究を目指さず、その時点で既に研究に着手していたもの、計画していたものを含め、まず基本物質となる生分解性ナノ粒子の合成から取り組んだ。素直に本領域総括の助言を受け入れたことが、研究が展開した最大の要因であろう。結局、ポリ(γ -グルタミン酸)をL-フェニルアラニンで疎水化したものが、まず生分解性あるナノ粒子となることが明確になってきた。その後の展開は、この報告書に示したとおりであるが、大きく展開させることができたと考えている。

CREST研究は単なる共同研究ではなく、研究代表者の考えを十分に受け入れた共同研究であることが必要である。私の意見を取り入れ研究を進めて頂いた馬場グループ、中川グループ、三浦グループ、そして大鵬薬品工業(株)には深く御礼申し上げたい。また、相澤前総括、雀部総括、アドバイザーの先生方、さらに、領域事務所の飯嶋事務参事、山本技術参事にも円滑に研究展開するように最大限の協力を頂いた。今後は、領域事務所のない状況でのCREST研究となるが、私の体験から、創造的な研究環境を見事に生み出し運営して頂いたことが明らかであり、新しいシステム(大学の事務局が領域事務所の機能を担う)とする必然性は疑問であるとの考えを明記しておきたい。納税者利益を優先してシステムを考えるべきである。

また、多くのCRESTから、若い研究者が育っているはずである。その研究者の受け皿については、全く考えられていないのは問題であろう。科学技術振興機構には、有能な、あるいはCRESTで才能が開いた若手研究者が、使い捨て研究者とならないように何がしかの知恵を出して頂きたい。科学技術と人材が生まれるプロジェクトを理想とすべきであろう。