

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： ナノ粒子を応用した抗レトロウイルスワクチンの開発
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

### 研究代表者

明石 満 (大阪大学大学院工学研究科 教授)

### 主たる共同研究者

馬場 昌範 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授)

中川 晋作 (大阪大学大学院薬学研究科 教授)

三浦 智行 (京都大学ウイルス研究所 准教授)

### 3. 研究内容及び成果

#### 3 - 1. 研究課題全体

研究代表者らは、この研究を開始する前に高分子の自己組織化を利用して調整したコア - コロナ型ポリスチレンナノ粒子に、不活化した「ヒト免疫不全ウイルス」(HIV)を補足したものを、マウスの粘膜に接種することによって、免疫誘導が出来ることを見出していた。この技術を発展させてHIV、HTLV-1(成人T細胞白血病ウイルス)などに対する抗レトロウイルスワクチンの開発を目指して開始された研究である。

研究開始時に、ポリスチレンを用いることによる臓器への蓄積などの安全性に対する懸念が指摘され、研究総括の強い要請によって、ナノ粒子の母体をなす高分子がポリスチレンから生分解性のあるものへと切り替えが行われた。この切り換えに多少の時間を要している。生分解性高分子として、ポリ(-グルタミン酸)を芳香族系のアミノ酸で疎水化してナノ粒子を調整することによって生分解性を確保しながら、抗原タンパクを表面に固定化できるのみならず、内包が可能になり、応用面での多様性が付与されている。結果的にはこの切り替えが非常に有効な変更となり、*in vitro*, *in vivo* において、液性免疫・細胞性免疫を誘導することに成功している。

このナノ粒子が、現時点では最強のアジュバンドといわれているフロイント完全アジュバンド (CFA) を凌駕するアジュバンド効果を示し、強いCTL誘導能を有することが報告されている。研究総括より、その機構の解明を要望されたが、その要望にかなりの部分で応えることが出来ている。

抗エイズウイルスワクチンについては、エイズウイルスの表面タンパクであるgp120 に対する免疫を効率的に発現させることに成功しているが、感染予防には成功していない。感染予防に有効な抗原タンパク又はその組み合わせの探索が必要であるが、今後の検討で成功する確率は高いものと思われる。また、このナノ粒子の応用として、インフルエンザやがんのワクチンの可能性を示すデータも得ている。

これらの成果を発表したことによって、企業、大学、その他の研究機関などから共同研究の提案が多く寄せられるようになり、研究の幅が広がって来ているところである。

工学(明石G)、医学(馬場G)、薬学(中川G)の研究者から編成されたチームであり、それぞれの特徴を生かした運営によって優れた成果を上げたものである。この成果をもって、平成19年度にCREST「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創製」研究領域に採択された。更なる研究の進展が期待される。

#### 3 - 2. 研究グループ別

##### 1) 明石グループ

抗原固定化生分解性ナノ粒子の調整と機能評価を担当。

このグループは、ほぼ1年という短期間で、抗原のキャリアとしてポリスチレンを中核としたコア-コロナ型

ナノ粒子から、納豆菌由来の高分子「ポリ(γ-グルタミン酸)」（γ-PGA）を L-Phenylalanine 等の疎水基を持つアミノ酸で疎水化したものに切り換えることに成功している。生物由来の高分子とL-アミノ酸との組み合わせによって生分解性を担保しようという、巧みな戦略である。このナノ粒子の開発が重要なポイントであり、次のような特徴がある。

このナノ粒子は、疎水基の相互作用によりコアを形成し、表面にカルボニル基が配位する構造を持っている。当初計画されていたポリスチレンナノ粒子では、粒子表面に抗原を固定化するだけであったが、新しいナノ粒子では、その構造故に抗原蛋白やペプチドを内包することも、表面に固定化することも、さらには表面に吸着することも可能となり、その後の応用の幅が大きく広がった。

このナノ粒子は、内包するタンパクの量を調節でき、凍結乾燥による保存・再分散も可能である。また、生分解性の面では、加水分解やプロテアーゼで分解されることも確認されている。毒性の面でも、比較的安全性が高いといわれている Alum アジュバンドより安全であるというデータが出ており、生分解性・毒性の面でも安全であることが予測出来るが、更なる確認を予定している。

このグループは、新規に合成したナノ粒子に、抗原タンパクやペプチドを内包・結合させて、ワクチンとしての評価に供したり、ナノ粒子の構造や諸特性を測定して、ワクチンとしての基礎データの採集に努めており、新しいタイプのDDSとして広範に利用可能な技術としての期待を抱かせるものである。

(独)医薬基盤研究所との共同研究によって、インフルエンザウイルスのHA(Hemagglutinin)を内包・結合させた γ-PGAナノ粒子を用いて、マウスでの液性・細胞性免疫の誘導に成功するという結果を得ており、応用面での幅が広がりつつある。

## 2) 馬場グループ

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を担当。

このグループは、ウイルス研究の第一人者がリーダーであり、当初より研究代表者と共同でHIV-1およびHTLV-1のワクチン研究に取り組んできた。生分解性ナノ粒子の開発中には、ポリスチレンナノ粒子を用いて、樹状細胞への取り込みの観測手段や免疫・細胞障害性試験などの手法を検討し、生分解性ナノ粒子完成後は、この粒子の評価を効率よく進めている。

生分解性の γ-PGAナノ粒子は、樹状細胞に効率よく取り込まれる現象をFITCラベル化OVA(卵白アルブミン)を用いて可視化することに成功している。樹状細胞はナノ粒子を取り込むことによって活性化すること、未成熟な樹状細胞を成熟させる効果を発揮すると同時に、細胞傷害性T細胞(CTL)を活性化し、細胞性免疫を発現させることを明らかにしている。マウスを用いて、抗原を固定化または内包したナノ粒子の皮下および経鼻免疫によって、HIV-1の表面タンパクgp120 およびコアタンパクp24に対する免疫誘導に成功している。このナノ粒子のように、細胞性免疫の誘導が起こることは希なケースであり、エイズワクチンやがんワクチンとしての応用ができる可能性を示すものとなった。

## 3) 中川グループ

ナノ粒子の細胞内動態解析とがん免疫療法に対するナノ粒子ワクチンの応用を担当。

OVAを内包したナノ粒子による実験で、γ-PGAナノ粒子が強力なCTL誘導アジュバンドであることを見出し、現存する最強のCTL誘導アジュバンドであるCFAを凌駕する誘導能を示すことを明らかにした。CFAは投与部位において強度の炎症を起こすため実験用にしか用いることが出来ないが、γ-PGAナノ粒子は毒性が低いため、安全性に優れたワクチンキャリアーになるものと期待される。このCTL誘導能力を発揮する機構について、幾つかの検討がなされており、ある程度解明が進んだと言える。

マウスに投与されたナノ粒子は、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、細胞内で徐々に抗原タンパクを放出している。その経過を二重蛍光標識ナノ粒子を用いて可視化することに成功している。

研究計画当初は膜融合リポソーム(FL)とナノ粒子との併用によるワクチン開発を予定していたが、開発したナノ粒子の早期臨床応用を考慮し、研究後期からは -PGAナノ粒子の優れたCTL誘導能を利用したワクチン開発とメカニズム解明を行った。

がんワクチン療法への応用も検討しており、マウスで顕著な効果があることを明らかにしている。今後の成果にも期待したい。

#### 4)三浦グループ

HIV-1抗原担持のナノ粒子を用いてサルにおける免疫誘導能およびSHIV感染防御実験を担当。マウスによる免疫実験により、 -PGAナノ粒子が優れたワクチンキャリアであり、HIV-1 の表面蛋白gp120の免疫を誘導できることが確認されたので、平成18年度よりサルによる確認実験を行うために参加したものである。アカゲザルを用いた実験では、HIV-1 gp120を内包した -PGAナノ粒子で免疫することによって、gp120単独より高い免疫誘導に成功しているが、感染予防には効果のないことが明らかとなった。このことは、感染予防に関与すると思われる抗原タンパクの選定に問題があった可能性を示唆している。別のプロジェクトに於いて、ウイルス粒子を固定化したポリスチレンナノ粒子を用いて、ある程度のワクチン効果が認められていることから、抗原タンパクの選定や組み合わせ等によって、感染予防に効果のあるものが発見される可能性が高いと言えるであろうが、今後の課題である。

### 4. 事後評価結果

#### 4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文 (原著)		口頭 (ポスター)		講演		その他 (著作など)		特許出願	
国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内
46	0	12	115	15	38	2	15	3	6

論文の投稿、口頭発表は積極的に行われており、著名な雑誌に比較的多く掲載されている。招待講演の多いことは、この研究への期待とインパクトの大きさが伺えるものといえる。当初の計画では、ワクチンキャリアとしてポリスチレンナノ粒子を用いる予定であったが、研究総括の強い要請によって、生分解性のポリマーへの切り替えが行われた。研究代表者の専門分野であるとはいえ、約1年間の短期間で生分解性のナノ粒子を開発したことは特筆に値するものである。

その結果、今までにない高いCTL誘導能やアジュバンド効果を発揮するナノ粒子を創製することに成功している。この切り替えが結果的に想定以上の効果をもたらしたことは、積み重ねられた研究の成果であり、あながち幸運とは言い切れないであろう。実用に到るまでには、動物実験での毒性や生分解性などナノ粒子そのものの安全性や、感染機構の解明による感染予防に効果的な抗原タンパクの選定など、今後の検討に待たなければならない事項も多いが、大きな方向性が見えてきており、更なる展開に大いに期待できるものとなった。

特許については、出願数は多くはないが基本的な部分は押さえられており、今後の展開に支障はないように見受けられる。

引き続き、平成19年度CREST「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創製」研究領域に採択されたので、実用化に向けた研究に拍車が掛かるものと期待している。

#### 4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

戦略目標によく合致した研究であり、研究成果のレベルも非常に高い。高分子を用いたワクチンの研究は国内外で競争の激しい分野であるが、この研究はその最先端をいくものといえる。抗原のキャリアであるナノ粒子は、抗原担持操作の容易さや担持量の調節の容易さ、ナノ粒子の安定性など、単なるキャリアとして有用であるのみならず、免疫増強効果を示す非常に優秀なキャリアの創製に成功している。

このナノ粒子を用いたレトロウイルスワクチンの検討では、HIV-1の gp120 による免疫の発現には成功しているが、感染予防効果のないことも確認出来てしまった。一方では、他のプロジェクトに於いて研究代表者らは、ウイルスを捕捉したポリマー粒子を用いた実験で、ある程度の感染予防効果が認められる結果を得ている。このことは、抗原の選定によって感染予防効果が得られる可能性が高いことを示唆している。

まだこの分野では、解明出来ていないことが多く、試行錯誤を繰り返さざるを得ない部分も多々あるため、ナノ粒子による感染予防効果の確認が出来なかったことは残念な結果ではある。しかし免疫機構の解明は順調に進んでいることから、感染予防効果のある免疫誘導の実現も可能になると思われる。今後の精力的な検討に期待したい。

また、-PGAナノ粒子が社会的なニーズの大きいインフルエンザワクチン、癌ワクチンのキャリアとしても有用であるという感触も得ており、この面で成果を上げていくことが出来れば、非常にインパクトの大きい研究になるものと思われる。

#### 4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

明石 満:平成 10 年 高分子学会賞

明石 満:経済産業省、平成 14-15 年度地域新生コンソ-シウム研究開発事業  
「アパタイト生分解性高分子ハイブリッドを用いる生医学材料の開発」  
(総括研究代表者)

明石 満:平成 16 年 日本バイオマテリアル学会賞

中川 晋作:平成 16 年 日本DDS学会永井賞

明石 満:平成 17-22 年度 JST さきがけ「構造制御と機能」領域アドバイザー

明石 満:平成18年度 大阪大学 教育・研究功績賞

明石 満:平成19年度 CREST「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創製」研究領域に採択。

明石 満:平成16年度から文部科学省の「ナノテクノロジー日瑞国際交流プログラム」によって、スエーデンの Lund 大学とヒト樹状細胞を用いた共同研究を開始し、興味深い成果を得ている。平成19年度より、JSTの戦略的国際科学技術協力推進事業に引き継がれている。

明石 満:第29回日本バイオマテリアル学会大会・大会長(平成19年11月)

若手研究者が多くの講演・ポスター賞を受賞している。