

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：免疫制御能を有する高分子ナノ粒子ワクチンの製造

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附属難治ウイルス病態制御研究センター 教授）

巽 智秀（大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 助教）

3. 研究実施概要

本研究は、ナノテクノロジーに立脚した安全かつ効果的な高分子ナノ粒子ワクチンの製造技術の開発と臨床応用を目的としている。そのために、両親媒性生分解高分子の自己組織化を基盤とした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。最終的には、肝臓・大腸癌患者に対するナノ粒子ワクチンのトランスレーショナルリサーチを実施し、産学・医工連携による革新的ナノ医療の具現化および新規アジュバントの創成を目指す。

ナノ粒子ワクチンの臨床応用に向けて、Good Manufacturing Practice (GMP)に準拠したナノ粒子製造を行うための粒子合成方法の最適化を行い、高効率・高再現性のナノ粒子の大量製造技術を構築した。また、大阪大学医学部附属病院薬剤部の協力のもと、GMP準拠のナノ粒子製造プロセスを確立し、臨床適応可能なナノ粒子を製造した。疎水化ポリ(γ-グルタミン酸)(γ-PGA)ナノ粒子の基礎的な物性については、粒子径制御技術の確立、抗原内包ナノ粒子の細胞内分解挙動と局在の評価、ナノ粒子のリンパ節移行性を解析し、臨床応用のための基礎的な知見を集積した。さらに疎水化γ-PGAの特徴を効果的に引き出し、ドラッグデリバリーシステム(DDS)としての多様化を図るために、疎水化γ-PGAの会合制御に基づく新たな材料設計と構造制御、得られたナノマイクロ構造体と細胞間との相互作用を評価してきた。この疎水化γ-PGAは、疎水性アミノ酸の種類・導入率(疎水化度)や会合体調製時の条件(溶媒、濃度、温度等)により、高分子鎖の会合数、粒子サイズ、形状を巧みに制御することが可能であり、さらには1本の高分子鎖からなるユニマーナノ粒子の調製にも成功している(明石G)。

ナノ粒子ワクチンの免疫誘導メカニズムに関しては、疎水化γ-PGAナノ粒子と樹状細胞との相互作用を中心に、ナノ粒子の細胞内への抗原デリバリーと活性化能およびそれら活性化に関するシグナル伝達系を解析し、ナノ粒子の優れたアジュバント活性を明らかにした。また、ノックアウトマウスを用いた免疫実験により、ナノ粒子のアジュバント活性に関するレセプターを解析し、抗原提示細胞上に発現しているToll様受容体(TLR)が重要な役割を果たしていることを見出した。実際の抗原特異的な免疫誘導効果については、ナノ粒子ワクチンの投与量、投与経路、他の既存アジュバントとの比較を実施し、疎水化γ-PGAナノ粒子の優れた細胞性免疫誘導効果およびナノ粒子ワクチンの作用機序を明らかにした(馬場G)。

がんワクチンとしてのトランスレーショナルリサーチ(医師主導型治験)への展開に向けては、マウス免疫実験において、がん抗原ペプチドを用いたナノ粒子ワクチンが、肝腫瘍に対する抗腫瘍活性を示し、既存のアジュバントより効果的かつ安全な治療法であることを証明した。また、がんペプチド固定化ナノ粒子の安全性評価として、「疎水化γ-PGAナノ粒子ワクチンの雄ラットを用いた14日間反復投与毒性試験」および「疎水化γ-PGAナノ粒子ワクチンのモルモットを用いた抗原性試験」において、ナノ粒子ワクチンは顕著な毒性を示さず、ナノ粒子そのものの抗原性も認められず、高い安全性が確認された。以上の結果を踏まえて、消化器癌に対するEphA2ペプチド-疎水化γ-PGAナノ粒子ワクチンの臨床試験計画の大阪大学医学部倫理委員会での承認及び実施を目指し、臨床試験計画書を大阪大学医学部附属病院未来医療センターへ提出し、現在審議中である(巽G)。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含

む)

疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子を応用したワクチンに関する CREST 研究「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創成（平成13年～平成18年）」での研究を、本 CREST では更に発展させ、代表者のリーダーシップの元に3つの研究チームが緊密に連携し、高分子の基礎化学、免疫誘導メカニズム、安全性の確認、トランスレーショナルリサーチとして臨床研究に移行可能にまで到達したことは高く評価される。即ち、疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子製造に関して、粒径、抗原タンパク質の内包または固定化など様々なパラメータに対して丁寧な基礎研究を行ったうえで実用化に具する製造法を開発し、阪大医学部附属病院薬剤部で GMP 準拠粒子製造法を確立した。並行して、従来のアルミニウム塩 (Alum) などと比べ免疫制御能即ちアジュバント活性が特段に優れていることを、TLR を介した活性化、エンドソーム脱出、樹状細胞の活性化などの免疫誘導機構により明確化した。更にマウスを用いてのナノ粒子の安全性を網羅的に調べ、毒性の無いことを証明した。放射同位体や蛍光イメージング法を用いての体内動態評価も行い、Alum と比べナノ粒子は樹状細胞に取り込まれ易く、臓器への特異的な蓄積が無いことも判明した。最終的に、抗腫瘍効果を有する EphA2 をナノ粒子の表面に固定化したナノ粒子ワクチンにおいてナノ粒子による細胞性免疫と抗腫瘍効果が確認された。更に付け加えるなら、CREST の同一研究領域の桑畑チームとの連携でイオン液体を用いて粒子の細胞内取り込み挙動を直接 SEM 下で観察したことは本研究領域の成果として位置づけできる。

以上の成果をもとに、平成24年2月より、大手製薬メーカーとの高分子ナノ粒子ワクチンの実用化を目指した共同研究が本格的に始まっており、高く評価される展開である。

成果の外部発表等については、30 有余編の原著論文が一流国際誌を中心に公表されており、非常に優れている。医学系、化学系、材料系それぞれについての的確に情報発信が行われた。

- ① 原著論文（国内 0 件、海外 35 件）、その他の著作物・総説、書籍 11 件
- ② 学会招待講演（国内会議 36 件、国際会議 21 件）
- ③ 学会口頭発表（国内会議 70 件、国際会議 10 件）、ポスター発表（国内会議 73 件、国際会議 22 件）
- ④ 国内特許出願（5 件）、海外特許出願（3 件）
- ⑤ 受賞 3 件、新聞報道等 6 件

#### 4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

納豆菌が生成するグルタミン酸から開発された疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子を開発し、これが免疫療法において毒性の無い優れたアジュバント性を有していること見出し、ナノ粒子が安全ながんワクチンとなり得ることを徹底的な動物実験に基づき実証し、ワクチン技術の開拓にとって大きなインパクトのある研究成果が得られている。特に、高分子化学の研究から得られたナノ粒子が臨床応用にまで至った「工学が医学に貢献した典型的成果」として高く評価でき、国際的にも研究をリードする研究発信力の強い研究である。企業との共同研究講座の開設も大きなインパクトと考えられ、事業サイドからも重要な研究成果との評価を受けた証拠である。また、新聞等にも報道されたことは、社会的にも着目されていることを示している。

学術的には、高分子化学での分子論的な理解、論理的な材料設計、ナノ粒子ワクチンの作用機構など、工学と医学の分野において貴重な知見を含む成果であり、インパクトファクターの高い一流誌に着実に論文を発表し、国内外に類例はない独創的なアプローチを示した研究としてその成果を発信している。今後、同様なコンセプトに基づく研究が後追いつける可能性は高いと思われる。特に、がんの免疫療法が世界的に注目され、臨床応用へ展開され始めている現在、経験にたよらない新しいワクチン研究として大きな波及効果が期待される。

#### 4-3. 総合的評価

高分子科学の基礎から臨床応用まで体系的な展開をしており、納豆菌由来の疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子を

ナノ粒子合成科学を基盤に創製し、がんの免疫療法において毒性の無い新規なアジュバント機能を発見すると共に、阪大医学部附属病院薬剤部で GMP 準拠疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子製造法を確立し、抗腫瘍効果を有する EphA2 をナノ粒子の表面に固定化したナノ粒子ワクチンにおいてナノ粒子による細胞性免疫と抗腫瘍効果が確認されたことを基に阪大医学部病院未来医療センターで臨床試験の準備に入ったことは高く評価される。ここに至る成果は、研究代表者のリーダーシップの元に 3 チームが密に連携した結果である。即ち、最適粒径の疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の開発とその抗体ペプチドの担持法、安全性確認のためのマウス実験を用いた網羅的な試験、TLR の重要な役割やナノ粒子の樹状細胞の活性化、及びナノ粒子のリンパ移行などの免疫誘導メカニズムの明確化や放射同位体や蛍光イメージングによる細胞・体内動態などの基礎を確立したことによる。この疎水化 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の優れたアジュバントに注目し、ワクチン製剤の構築を目指した製薬メーカーとの共同研究講座が設置され、引き続き研究を続ける環境を整えたことも特筆したい。

現在、臨床試験実施のための準備が着実に進められているが、当初の研究計画より少し遅れているものの、十分な安全性の確認、倫理委員会での慎重な検討などによるところもあり、やむを得ない面もある。承認後は、早急な実施を通して本研究ががん患者の回復への福音となることを心から期待する次第である。