

「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」
平成 14 年度採択研究代表者

明石 満

(大阪大学大学院工学研究科 教授)

「ナノ粒子を応用した抗レトロウイルスワクチンの開発」

1. 研究実施の概要

本研究ではコアコロナ型ポリスチレンナノ粒子によるワクチン開発の結果をもとに、新規な生分解性高分子ナノ粒子を用いて、安全性・有効性の高い抗レトロウイルスワクチンの開発を目的としている。これまでにポリアミノ酸や天然多糖である生分解性高分子の両親媒構造を制御する方法を用いて、生分解性ナノ粒子が調製可能であることを見出した。

納豆菌由来のポリ(γ -グルタミン酸)を疎水修飾した γ -PGA (hydrophobically-modified poly(γ -glutamic acid); γ -hPGA)より調製したナノ粒子(γ -hPGA ナノ粒子)は生分解性を有しており、また、免疫原となる蛋白質やペプチドを安定かつ効率的に内包・表面固定化することが可能であった。これらの結果より、 γ -hPGA ナノ粒子がワクチンキャリアーとして非常に優れた性能を有していることが明らかとなった。免疫応答に重要な働きをする抗原提示細胞である樹状細胞と γ -hPGA ナノ粒子との相互作用について検討した結果、ナノ粒子を樹状細胞に作用させることにより、未熟樹状細胞を成熟させることが、細胞表面分子の発現や、炎症性サイトカインの産生に対する解析から明らかとなり、 γ -hPGA ナノ粒子に免疫応答を増強させるアジュバント効果があることが見出された。また、マウスを用いた免疫実験により、HIV-1 Gag (p24) 抗原を内包した γ -hPGA ナノ粒子は、強力に抗原特異的な細胞性および液性免疫を誘導出来ることが明らかとなった。さらに γ -hPGA ナノ粒子による強力な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導効果に着目し、抗腫瘍ワクチンへの応用展開を試みた。モデル系による抗原内包 γ -hPGA ナノ粒子の腫瘍細胞の増殖抑制効果を検証したところ、現存する最強の CTL 誘導アジュバントである CFA よりもはるかに優れた抗腫瘍効果が認められ、がんワクチンとして有用性が示唆された。

HIV ワクチンに関しては、マウスでの免疫実験結果をもとに、今後はサルを用いた HIV 感染防御効果について検討する。がんワクチン開発では臨床も視野に入れ、メラノーマ腫瘍関連抗原を用いて抗腫瘍ワクチンキャリアーとしての有用性・安全性を評価する。これらのワクチン開発以外にも、インフルエンザワクチンやスギ花粉免疫療法剤などの普遍性の高いワクチン開発も念頭に入れ、革新的なワクチン開発に取り組む予定である。さらに、ナノ粒子の免疫誘導効果に対するメカニズムを詳細に解析することで、ナノ粒子の役割・優位性・有用性を明らかにできることが期待される。

2. 研究実施内容

1) 抗原固定化生分解性ナノ粒子の調製と機能評価(明石 G)

ナノ粒子ワクチン開発に向けて、生分解性ナノ粒子と免疫原となる蛋白質・ペプチドを安定かつ効率よく担持させる必要がある。この抗原固定化ナノ粒子の調製方法および機能性について詳細に検討した。また、ナノ粒子の加水分解、酵素分解性について評価を行い、粒子を構成している高分子鎖の分解に伴う形状、粒経変化について検討した。

1-1) 微生物由来のポリ(γ-グルタミン酸) (γ-PGA) の側鎖に疎水性アミノ酸である L-フェニルアラニンを導入し、ナノ粒子を調製した。得られたγ-hPGA ナノ粒子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および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について評価した(図 1)。γ-hPGA ナノ粒子は内部および表面に蛋白質・ペプチドを担持させることが可能であった(図 2)。また、酵素担持ナノ粒子においては、内包型では高い酵素活性を維持していたのに対して、粒子表面への共有結合による化学固定では、フリーの酵素と比較して 40%程度まで活性が低下していた(図 3)。この結果より、γ-hPGA ナノ粒子に内包された蛋白質は変性や分解を伴わず、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、蛋白質内包ナノ粒子は凍結乾燥による保存、再分散が可能であり、ワクチン担体として優れた機能を有していることが明らかとなった。

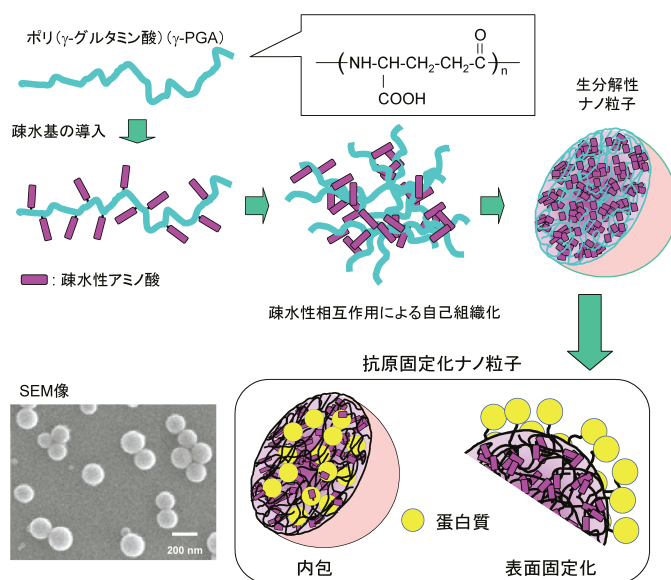


図 1 両親媒化(疎水修飾)γ-PGA(γ-hPGA)を用いたナノ粒子の調製

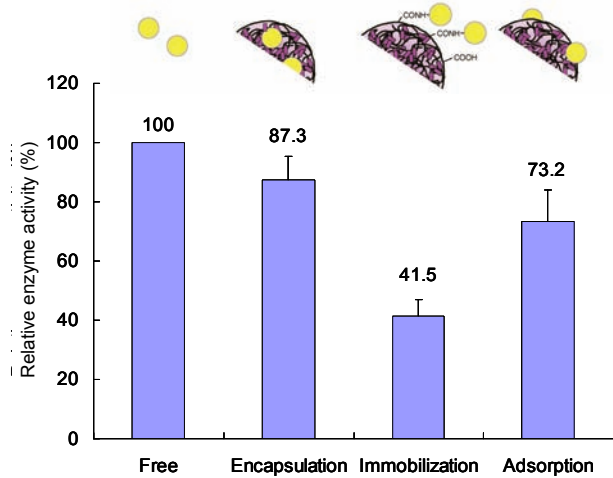
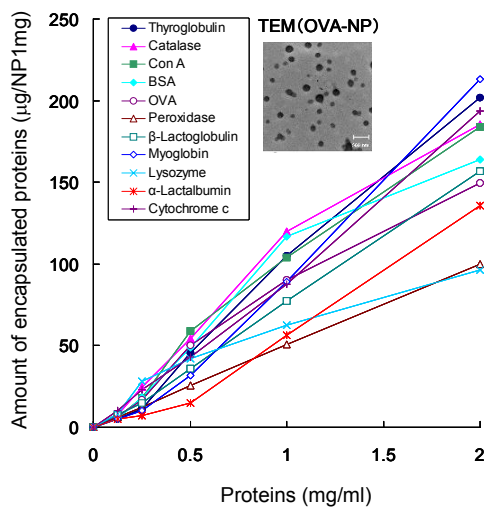


図2 蛋白質内包 γ -hPGA ナノ粒子の調製

図3 酵素担持法の違いによる酵素活性への影響

1-2) γ -hPGA ナノ粒子の加水分解および酵素分解性に検討を行った。 γ -hPGA ナノ粒子の加水分解試験では、粒子を構成している高分子鎖の分子量減少が確認された。また、各種プロテアーゼによる分解性について検討を行った結果、 γ -hPGA ナノ粒子は用いたすべての酵素で、分解に伴う分子量の減少が確認された(図4)。この分子量減少は、 γ -PGA の側鎖に導入されたフェニルアラニンとのアミド結合が切断されていることが明らかとなった。また、DLS により、酵素分解に伴うナノ粒子の粒径を測定した結果、反応時間の経過と共に、粒径が減少する傾向を示した(図5)。これらの結果より、 γ -hPGA ナノ粒子は主鎖の γ -PGA および側鎖のフェニルアラニンの切断により、粒子が分解・崩壊することが明らかとなった。

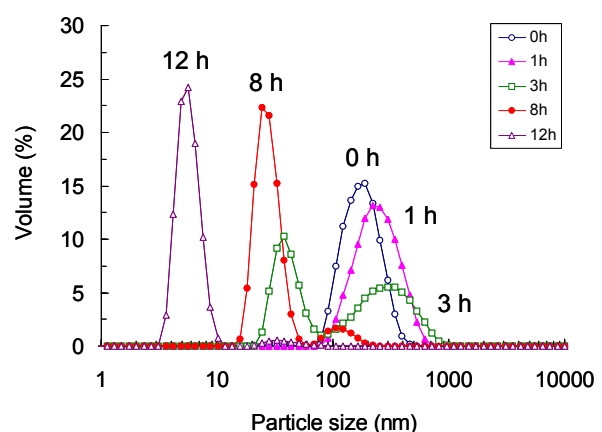
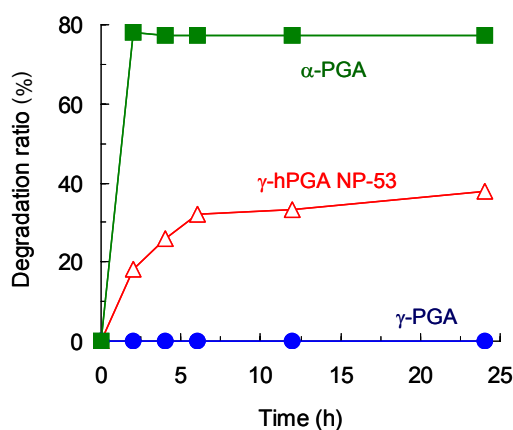


図4 γ -hPGA ナノ粒子の酵素分解(Pronase E)

図5 γ -hPGA ナノ粒子の酵素分解(Pronase E)に伴う粒径変化

2) HIV-1 抗原内包ナノ粒子の免疫誘導能評価(馬場 G)

γ -hPGA ナノ粒子と樹状細胞との相互作用の解明、および HIV-1 Gag 抗原内包 γ -hPGA ナノ粒子を用いたマウス免疫実験を行った。

2-1) マウスの骨髄細胞より未熟および成熟樹状細胞を得た。未熟樹状細胞に蛍光 (FITC) 標識された生分解性ナノ粒子を作用させたところ、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。

2-2) 未熟樹状細胞が γ -hPGA ナノ粒子を取り込むと、未熟樹状細胞が成熟樹状細胞に分化誘導する事が分かった。これに伴い、CD86 や CD40 などの細胞表面分子の upregulation (図 6) や、TNF- α や IL-12 などの炎症性サイトカインの産生がみられた。

2-3) マウスを用いた免疫実験では、Gag 蛋白 (p24) のみを用いて免疫したマウスに比べて、p24 内包ナノ粒子を用いて免疫したマウスの方に、より強い抗原特異的な細胞性および液性免疫が誘導されることが、IFN- γ ELISPOT 法や ELISA 法を用いて明らかになった (図 7)。さらに、p24 と γ -hPGA ナノ粒子を単に混合したもの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ことも分かった (図 7)。今後は、p24 を他の HIV-1 抗原 (例えば Env や Pol) に変えて、また γ -hPGA ナノ粒子への抗原の固定化方法や粒子径を変えて、抗エイズワクチンとしての最適化を行う予定である。

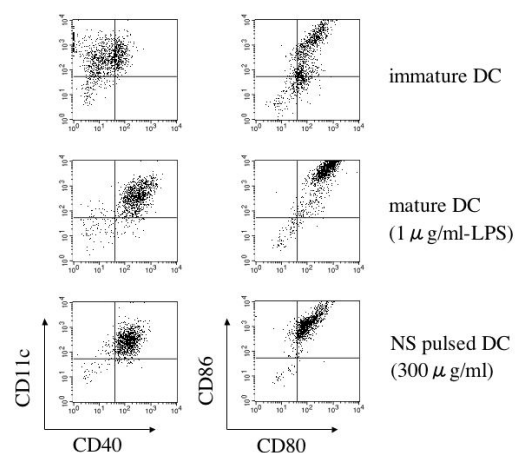


図 6. 生分解性ナノ粒子による樹状細胞の成熟化 (CD40 および CD86 発現増強)

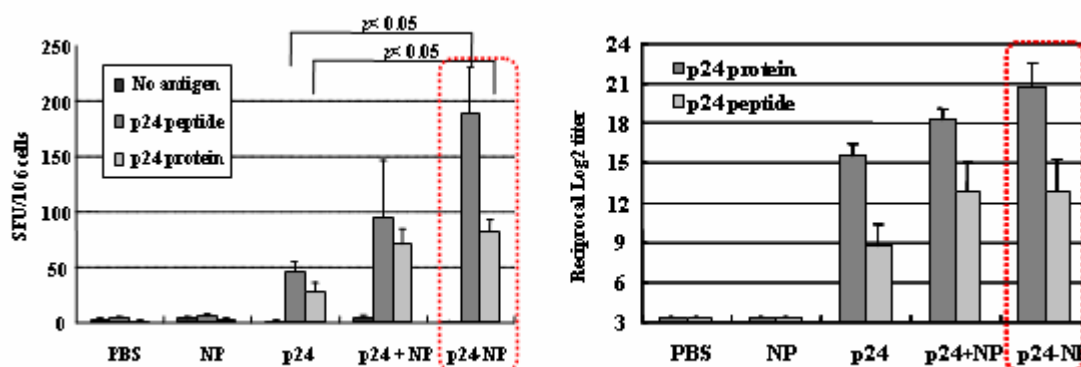


図 7. p24 内包生分解性ナノ粒子による抗原特異的な細胞性および液性免疫の誘導

3) 各種ナノキャリアーによるワクチン療法の開発(中川 G)

これまでに中川 G では、独自に開発した膜融合リポソーム (FL) が、現存する最強のワクチンアジュバントとされるフロイント完全アジュバント (CFA) を凌駕する免疫誘導能を有するワクチンキャリアーであることを、世界に先駆けて実証・報告してきた。この FL を含めた機能性ナノ構造体を将来的にワクチンキャリアーとして実用化するためには、それらの免疫誘導機序を詳細に解析し、そこから得られた知見・情報に基づくより優れたナノ構造体の設計・創製と最適なワクチン戦略の立案・確立が必須である。

そこで本年度、中川 G では FL に内包する抗原分子 (DNA や蛋白質) に種々のアイデアを盛り込むことで、FL をワクチンキャリアーとして応用する免疫療法のシステムアップを図った。さらに、明石 G により開発された生分解性 γ -hPGA ナノ粒子の抗原送達キャリアーとしての有用性を、マウス癌免疫療法モデルにおける有効性と安全性の両面から検討した。

3-1) CpG 配列付加 OVA 発現プラスミド封入 FL の DNA ワクチンへの応用

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を主体とする腫瘍免疫応答の活性化には、抗原提示細胞 (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キャリアーに付与する戦略は、癌免疫療法の有効性向上に極めて有望である。そこで、昨年度までに報告した FL を用いた DNA ワクチンのシステムアップを目的に、APC 表面上の 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 motifs を 16 個有するニワトリ卵白アルブミン (OVA) 発現プラスミド (pOVACpG16) を構築し、これを内封した FL (FL/pOVACpG16) のワクチンキャリアーとしての応用を試みた。CpG motifs を 13 個有する従来型プラスミド pOVACpG13 を内封した FL (FL/pOVACpG13) を免疫したマウスと比較して、FL/pOVACpG16 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 motifs 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 トランスフェクタントである E.G7-OVA 細胞に対する抗腫瘍効果を検討したところ、FL/pOVACpG16 免疫マウスにおける抗腫瘍効果は、FL/pOVACpG13、pOVACpG13、あるいは pOVACpG16 を免疫した群よりも優れていた (図 8)。これらの結果は、FL の DNA ワクチン効果の増強に、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。

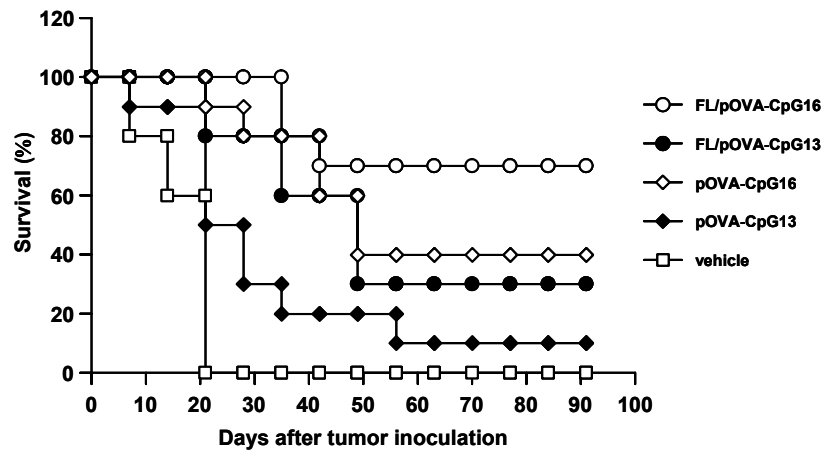


図8 FL/pOVACpG16免疫マウスにおける抗腫瘍効果 ○; FL/pOVACpG16免疫群, ●; FL/pOVACpG13免疫群, ◇; pOVACpG16免疫群, ◆; pOVACpG13免疫群, □; vehicle免疫群

3-2) 腫瘍溶解物 (Tumor cell lysate; TCL) 封入 FL を用いた新規癌免疫療法の開発

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 9)。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に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。

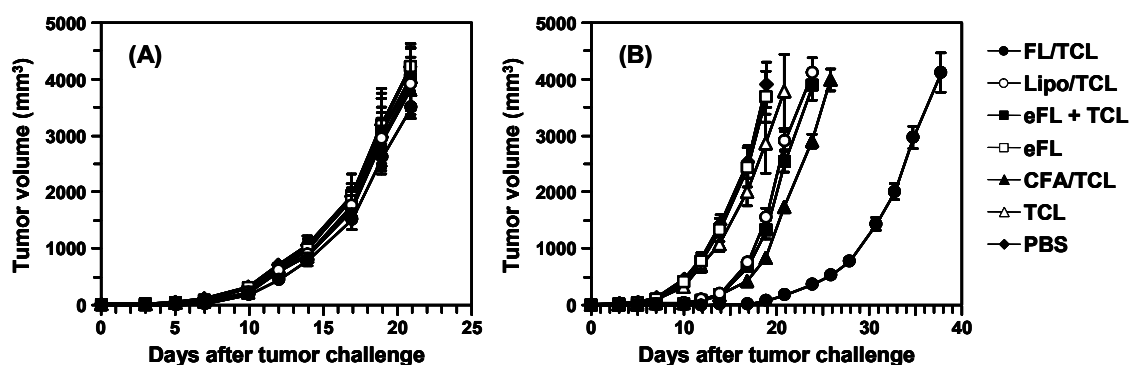


図9 FL/TCL免疫マウスにおける抗腫瘍効果 (A); 単回免疫プロトコル, (B); 3回免疫プロトコル (●; FL/TCL免疫群, ○; Lipo/TCL免疫群, ■; empty FL + TCL免疫群, □; empty FL免疫群, ▲; CFA/TCL免疫群, △; TCL免疫群, ◆; PBS投与群)

3-3) γ -hPGA ナノ粒子の抗腫瘍ワクチンキャリアーとしての有用性評価

臨床応用可能なワクチンキャリアーを設計するにあたっては、将来的に工業生産などを考慮に入れて抗原を固定化・内包した微粒子を簡便かつ高効率に調製でき、さらに長期保存が可能なキャリアーを設計する必要がある。その点、昨年度明石 G によって開発された生分解性 γ -hPGA ナノ粒子は既に簡便性や保存性を兼ね備えていることが明らかとなっており、微粒子ワクチンキャリアーとして有望であると考えられる。そこで、本年度中川 G では OVA を内包した γ -hPGA ナノ粒子 (γ -hPGA NP/OVA) を用いて γ -hPGA NP システムの抗腫瘍ワクチンキャリアーとしての有用性を精査した。まず、E.G7-OVA 腫瘍細胞の増殖抑制効果を検証したところ、 γ -hPGA NP/OVA 免疫マウスにおける抗腫瘍効果は、現存する最強の CTL 誘導アジュバントである CFA よりもはるかに優れていた (図 10)。さらに、 γ -hPGA NP のワクチンキャリアーとしての安全性を投与局所における炎症性細胞の浸潤を指標に検討したところ、 γ -hPGA NP 投与局所における炎症反応は PBS を投与したコントロール群と同程度であり、既に臨床試験に適用されているフロイント不完全アジュバントよりも軽度であった。以上のことより、 γ -hPGA NP システムは副作用を伴うことなく有効性のみを著しく増大可能な優れたワクチンキャリアーであることを明らかとした。現在、メラノーマ腫瘍関連抗原である gp100 蛋白質を用いて γ -hPGA NP システムの抗腫瘍ワクチンキャリアーとしての有用性をさらに評価している。

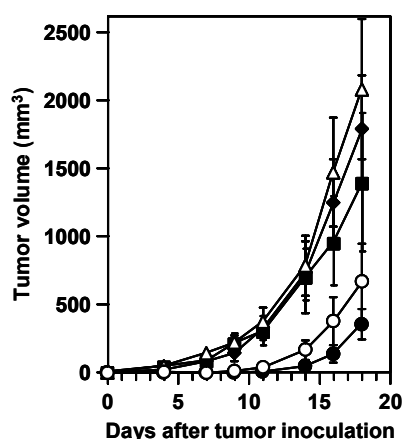


図10 γ -hPGA NP/OVA免疫マウスにおける抗腫瘍効果 ●; γ -hPGA NP/OVA免疫群 (100 μ g OVA), ○; γ -hPGA NP/OVA免疫群 (10 μ g OVA), ■; CFA/OVA免疫群 (100 μ g OVA), ◆; OVA免疫群 (100 μ g OVA), △; PBS投与群

3-4) γ -hPGA ナノ粒子の免疫誘導機序の解析

抗腫瘍ワクチン療法においては、がん細胞を直接的に排除する能力を持つ CTL を効率よく活性化させる必要がある。この CTL は抗原提示細胞 (APC) 表面上に提示された抗原由来エピトープと MHC 分子との複合体を認識して感作・活性化されることから、抗腫瘍効果を強力に誘導するためには抗原分子を APC へと送達・提示させ、CTL を効率よく活性化しなければならない。そこで、 γ -hPGA NP の免疫誘導機序を解析するために、まず免疫マウスにおける OVA 特異的 CTL 誘導能を解析したところ、 γ -hPGA NP/OVA 免疫においては CFA 免疫群よりも強力な CTL が誘導されていることが明らかとなった。このことから、 γ -hPGA NP 免疫による強力な抗腫瘍効果は内包抗原特異的な CTL の誘導増強に基づくものであることが明らかとなった。さらに、生体内で最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞による γ -hPGA NP/OVA の取り込みに伴う MHC class I/II 分子を介した抗原提示を *in vitro* において解析した。その結果、OVA 溶液あるいはフェニルアラニンを導入していない γ -PGA と OVA の混合溶液を作用させた DC においては抗原提示がほとんど認められなかったのに対して、 γ -hPGA NP/OVA を作用させた DC では OVA 用量依存的な効率のよい抗原提示が認められた (図 11)。以上の結果より、 γ -hPGA NP を免疫することによる抗腫瘍効果は、抗原提示細胞への抗原送達と MHC 分子を介した抗原提示効率の促進により、CTL を主体とする抗原特異的 T 細胞が強力に活性化されたことによるものであることが示唆された。現在、 γ -hPGA NP システムのワクチンキャリアーとしての有用性をさらに評価するために、 γ -hPGA NP の DC 内における細胞内動態、ならびに生体内動態に関する検討を推進している。

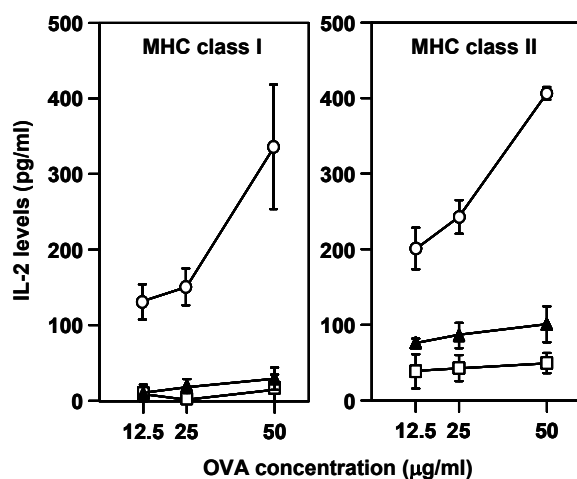


図11 γ -hPGA NP/OVA処理DCによる抗原提示能 ○; γ -hPGA NP/OVA作用群, ▲; γ -hPGA + OVA群, ◆; OVA作用群, △; PBS投与群

3. 研究実施体制

「明石」グループ

①研究分担グループ長：明石 満（大阪大学大学院工学研究科、教授）

②研究項目：

- ・研究統括
- ・生分解性ナノ粒子の調製
- ・ナノ粒子への免疫原固定化方法の検討と機能性評価

「馬場」グループ

①研究分担グループ長：馬場 昌範（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科、教授）

②研究項目：

- ・生分解（ γ -hPGA）粒子を用いたマウスの免疫実験
- ・ナノ粒子と免疫細胞（特に樹状細胞）との相互作用の解析
- ・ナノ粒子自体の免疫細胞（特に樹状細胞）に与える影響とそのメカニズムの解析

「中川」グループ

①研究分担グループ長：中川 晋作（大阪大学大学院薬学研究科、教授）

②研究項目：

- ・膜融合リポソーム (FL)を用いたワクチン開発
- ・生分解性ナノ粒子を用いた抗腫瘍ワクチンとしての有用性評価
- ・ナノ粒子による免疫誘導メカニズムの解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- 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).
- 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).
- 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).

- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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. Controlled Release*, **108**, 226-236 (2005).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
 - 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).

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 4 件 (CREST 研究期間累積件数 : 4 件)