

「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創成」
平成 19 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

免疫制御能を有する高分子ナノ粒子ワクチンの製造

1. 研究実施の概要

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、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。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を目指す。

初年度においては、これまでの CREST 研究(平成 14-19 年度)「ナノ粒子を応用した抗レトロウイルスワクチンの開発」で得られた疎水化 γ -PGA ナノ粒子の合成技術を基盤に、安全性の高いナノ粒子製造方法の検討およびそれらを用いた臨床応用のための安全性試験を実施した。また、ナノ粒子ワクチンのメカニズム解析とワクチン方法の最適化、癌抗原由来ペプチドを用いた抗腫瘍効果について検討を行った。粒子調製の際に、エタノール (EtOH) を用いて製造した疎水化 γ -PGA ナノ粒子は、ラット反復投与毒性試験において高い安全性が確認された。ナノ粒子の免疫誘導における作用メカニズムにおいては、ナノ粒子が樹状細胞に取り込まれる際に、細胞内の NF- κ B および MAPK シグナル伝達系を通して樹状細胞を強く活性化させることが分かった。また、ナノ粒子ワクチンの接種ルートにより、優勢的に誘導される免疫応答の種類が異なることを明らかとなり、がんワクチンとしての効果も確認された。

今後は、ナノ粒子ワクチン実用化のための高効率・高再現性の大量製造技術および製剤化プロセスを構築し、得られたナノ粒子ワクチンを用いて、実際の臨床投与を考慮したナノ粒子の安全性試験、がんワクチンとしての効果およびメカニズムを詳細に解析する。また、疎水化 γ -PGA ナノ粒子の製造と臨床応用を進めると共に、新規高分子ナノ粒子の合成とその機能解析を行い、普遍的なナノ粒子ワクチンの分子設計指針を明らかにする。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は4.(1)に対応する)

明石グループ

我々はこれまでに、分子量約 40 万のポリ(γ -グルタミン酸) (γ -PGA) に疎水性のアミノ酸でフェニルアラニン (Phe) を導入することで、水分散性に優れた生分解性ナノ粒子が調製可能であることを見出した。さらに、抗原を内包した疎水化 γ -PGA ナノ粒子の優れた免疫誘導効果も確認され、ナノ粒子ワクチンの有用性を明らかにしている。そこで本年度は、疎水化 γ -PGA ナノ粒子の臨床応用を目指し、ナノ粒子の安全性および粒子調製方法の最適化を図った。

1) ナノ粒子調製方法の検討

現在のところ、疎水化 γ -PGA ナノ粒子の調製およびナノ粒子への抗原担持の際には DMSO を用いる必要がある。しかしながら、ナノ粒子を医薬品として用いる場合には、調製の際に使用した DMSO の残存が懸念させる。そのため、より安全性の高いナノ粒子の調製方法の開発が望まれる。そこで、有機溶媒として EtOH を用いたナノ粒子の調製方法を検討した。 γ -PGA に Phe を導入した疎水化 γ -PGA は EtOH に溶解しないが、あらかじめ 100 mM sodium citrate 水溶液に分散させたものに、等量の EtOH を添加することで溶解させることが可能であった。次に、この疎水化 γ -PGA 溶液を 100 mM NaCl を含む 100 mM citrate buffer (pH 3.5) に加え、乳白色の分散液を得た。得られた分散液を遠心洗浄し、凍結乾燥によりナノ粒子を得た。このナノ粒子を PBS に再分散させ、DLS により粒径を測定した結果、粒径が 200 ± 90 nm (図 1) で、表面電位は -26 ± 16 mV であり、DMSO 法で作成したものと同程度の値を示した。また、EtOH 法を用いて卵白アルブミン (OVA) 内包ナノ粒子の調製を行った場合でも、DMSO 法と同様に OVA 内包ナノ粒子調製することができた。DMSO 法および EtOH 法で調製した OVA 内包ナノ粒子の樹状細胞での取込み、マウス免疫実験による免疫誘導効果の比較においても、同様の効果が認められ、両調製方法で作成したナノ粒子の同等性が証明できた。

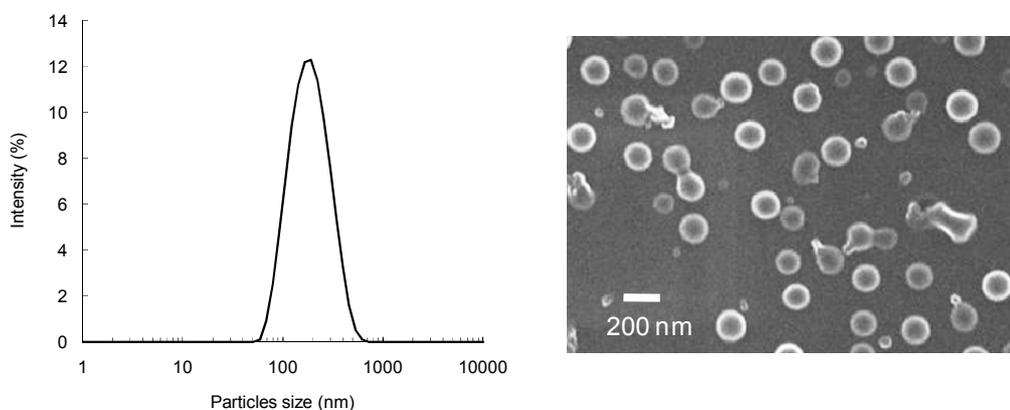


図 1. EtOH 法を用いて調製した疎水化 γ -PGA ナノ粒子の粒径分布 (左図) と走査型電子顕微鏡像 (右図)。

2) ナノ粒子の安全性

疎水化 γ -PGA ナノ粒子の臨床応用を目指し、ナノ粒子単体の安全性試験（非臨床試験）を実施した。安全性試験は大鵬薬品工業（株）安全性研究所の協力のもと、一般毒性試験としてラットを用いた皮下への14日間連続投与による反復投与毒性試験を行った。投与局所（皮下）と各臓器の病理組織像の観察および血液生化学的検査の結果より、ナノ粒子の顕著な毒性は認められなかった。また、ナノ粒子は、現在アジュバントとして臨床に用いられている水酸化アルミニウムゲル（Alum）よりも高い安全性が確認された。今後は、実際に使用する抗原を組み合わせ、予定臨床のレジメにそった毒性試験と許認可要件を埋めるための試験（局所刺激性試験等）を実施する予定である。

また、これまでに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、抗原に対する強力な抗体産生が誘導されることが明らかとなっている。しかしながら、この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。ナノ粒子を投与したマウス血清を用いて抗 γ -PGA 抗体量をELISAにより測定した結果、粒子の構成成分である γ -PGA に対する IgG, IgM および IgE 抗体は検出されなかった[1]。この結果は γ -PGA の免疫原性の低さに起因していると考えられる。

3) 新規高分子ナノ粒子・カプセルの開発

ナノメートルオーダーで薄膜が形成可能な Layer-by-Layer 法を用いて、正電荷を有する天然多糖のキトサンおよびポリアミノ酸のポリリシンと負電荷を有するデキストラン硫酸とのポリイオンコンプレックスからなる中空カプセルを調製した。このカプセルはカプセル内および膜内に異なる蛋白質を担持させることができ、その担持部位によってカプセルから蛋白質放出挙動を制御することが可能であった[2]。

馬場グループ

これまでの研究により、1) γ -PGA ナノ粒子は非常に効率良く抗原提示細胞である樹状細胞に取り込まれること、またその後樹状細胞を活性化（成熟化）させることが証明された。さらに、HIV-1 の各種抗原を内包もしくは表面固定化した γ -PGA ナノ粒子を用いてマウスを免疫したところ、非常に強い抗原特異的細胞性免疫を誘導できることを明らかにしている[3]。

4) ナノ粒子－樹状細胞間の相互作用解析

これまでに、疎水化 γ -PGA ナノ粒子自身がマウス骨髄由来の樹状細胞を活性化させる事を明らかにしているため、次に、より免疫応答に直接関与すると考えられる、脾臓由来の樹状細胞を単離し、疎水化 γ -PGA ナノ粒子の樹状細胞への作用について解析を行った。その結果 γ -PGA ナノ粒子は樹状細胞に取り込まれる際に、細胞内の NF- κ B および MAPK シグナル伝達系を通して樹

状細胞を強く活性化することが分かった。

5) ナノ粒子ワクチンの投与経路、投与量の検討

ナノ粒子の免疫系への関与をさらに詳しく解析することを目的として、抗原固定化疎水化 γ -PGA ナノ粒子の投与経路(経鼻, Footpad, 皮下)と投与量を調べる事で、最も効果的な投与を検討した。その結果, γ -PGA ナノ粒子は Freund の完全アジュバントのような接種部位に対する炎症反応をほとんど惹起しないこと, また, 抗原特異的な免疫を最も強く誘導できるような, 最適投与量が存在することが分かった(図 2)。さらに, γ -PGA ナノ粒子ワクチンの接種ルートにより, 優勢的に誘導される免疫応答の種類が異なることが明らかとなった。つまり, 抗原を保持している γ -PGA ナノ粒子を皮下免疫すると, 抗原特異的液性免疫および細胞性免疫の両方が誘導されるのに対して, 経鼻免疫すると強い細胞性免疫だけが誘導されることが分かった。これらの結果から, γ -PGA ナノ粒子は効果と安全性の点で, ワクチン抗原のキャリアとして優れた性質を有しており, 抗エイズワクチンを含む, 種々のワクチンへの応用が期待できると思われた。

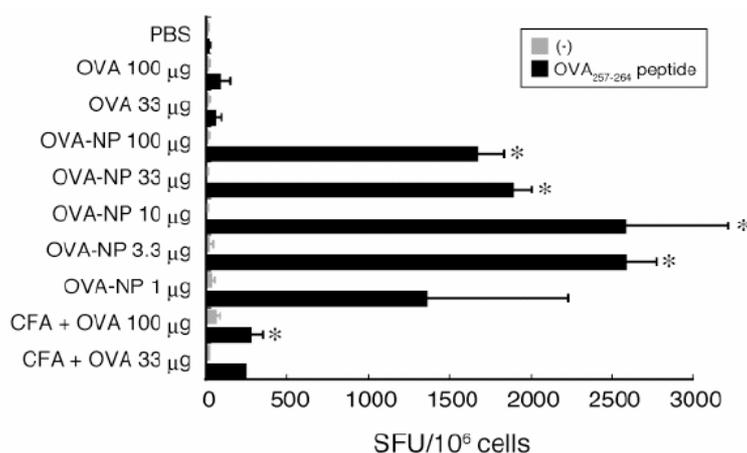


図 2. OVA 内包疎水化 γ -PGA ナノ粒子 (OVA-NP) による細胞性免疫の誘導。マウス footpad に OVA-NP を 2 回免疫し, 脾臓細胞中の抗原特異的 IFN- γ 産生細胞を ELISPOT で測定。OVA-NP 3.3 μ g or 10 μ g (OVA 量) で最も高い免疫誘導効果が得られている。

異グループ

6) マウス腫瘍モデルにおけるナノ粒子ワクチンの有用性の検討

癌抗原由来ペプチドを固定化した疎水化 γ -PGA ナノ粒子ワクチンのマウス肝腫瘍に対する抗腫瘍効果を評価した。癌抗原 EphA2 由来ペプチド-ナノ粒子ワクチンをマウスに行った後に、マウス脾細胞を採取し、IFN- γ ELISPOT 法を用いて EphA2 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導を検討した。EphA2 由来ペプチド-ナノ粒子ワクチンは、強力なアジュバントである CFA を用いたペプチドワクチンに比較して、同等のレベルで EphA2 特異的 CTL が誘導されることを明らかにした。EphA2 を強発現するマウス大腸癌 MC38 肝腫瘍に対する EphA2 由来ペプチド-ナノ粒子ワクチンの抗腫瘍効果は、コントロール治療群に比して有意に高かった(図 3)。現在同ワクチンによ

る抗腫瘍効果のメカニズムを解析中である。

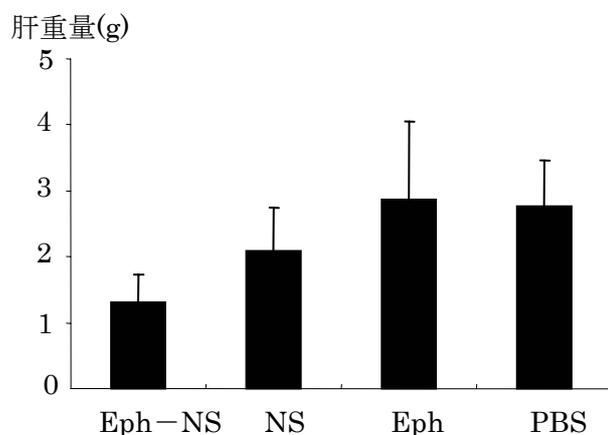


図3. MC38 マウス大腸癌による肝腫瘍に対する EphA2 由来ペプチドナノ粒子による抗腫瘍効果。マウス肝臓に MC38 細胞を接種し、EphA2 由来ペプチドナノ粒子による治療を行い、2 週間後の肝重量を比較した。Eph-NS 群 (EphA2 ペプチドナノ粒子ワクチン群) は他の治療群 (NS: ナノ粒子単独治療群、Eph: EphA2 ペプチド単独治療群、PBS: PBS 治療群) に比して有意に肝重量が低いことから、EphA2 由来ペプチドナノ粒子ワクチンによる抗腫瘍効果が確認された。(未発表データ)

7) ナノ粒子ー癌抗原ペプチドワクチンによる癌免疫治療の臨床応用

GMP 準拠した癌抗原ペプチドや疎水化 γ -PGA ナノ粒子を開発し、消化器癌患者での臨床試験を準備中である。

3. 研究実施体制

(1) 「明石」グループ (大阪大学大学院工学研究科)

① 研究分担グループ長: 明石 満 (大阪大学、教授)

② 研究項目

高分子ナノ粒子ワクチンの製造

- ・疎水化 γ -PGA ナノ粒子の製造と安全性試験
- ・抗原ー疎水化 γ -PGA ナノ粒子の製剤化
- ・新規高分子ナノ粒子・ナノカプセルの合成と抗原固定化

(2) 「馬場」グループ (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)

① 研究分担グループ長: 馬場 昌範 (鹿児島大学、教授)

② 研究項目

ナノ粒子ワクチンによる免疫応答と制御機構の解析

- ・疎水化 γ -PGA ナノ粒子の免疫誘導効果の解析
- ・新規ナノ粒子と樹状細胞との相互作用解析
- ・ナノ粒子による普遍的な免疫応答制御への展開

(3) 「巽」グループ(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)

① 研究分担グループ長: 巽 智秀(大阪大学、助教)

② 研究項目

ナノ粒子ー癌抗原ペプチドを用いた肝癌・消化器癌免疫治療法の開発

- ・マウス腫瘍モデルにおけるナノ粒子ワクチンの有用性の検討
- ・トランスレーショナルリサーチ

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- [1] 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).
- [2] Yuki Itoh, Michiya Matsusaki, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, “Time-modulated release of multiple proteins from enzyme-responsive multilayered capsules”, *Chem. Lett.*, **37**, 238-239 (2008).
- [3] 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).

(2) 特許出願

平成 19 年度国内特許出願件数: 1 件 (CREST 研究期間累積件数: 1 件)