

「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、肝癌・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。

昨年度(平成 19 年度)においては、これまでに確立されていた疎水化 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の合成条件を検討し、ナノ粒子ワクチンの臨床応用のための安全性試験を実施した。ナノ粒子ワクチンの免疫誘導効果については、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り、抗原の投与部位・量・回数により免疫応答が制御できることを明らかにしてきた。また、実際のがん抗原ペプチドを用いた系においても、高い抗腫瘍活性を示した。そこで本年度は、1) ナノ粒子ワクチンの臨床応用のための GMP 準拠ナノ粒子の製造技術の確立、2) ナノ粒子の樹状細胞活性化に対する粒子径の効果と詳細なメカニズム解析、3) がんワクチンにより誘導される免疫応答評価と抗腫瘍効果のメカニズム解析を実施した。ナノ粒子製造では、GMP 準拠に適した簡便かつ高効率・高再現性のナノ粒子の大量製造技術を確立することができた。従来の粒子製造工程では、合成に 1 週間以上を要していたが、今回新たに構築した製造工程では、約 2 日で従来法と同物性の粒子調製が可能であった。メカニズムの解析においては、疎水化 γ -PGA ナノ粒子による樹状細胞の活性化には、主に Toll like receptor 4 (TLR4) が関与していることが示唆された。また、樹状細胞活性化は、ナノ粒子の粒径に大きく依存し、粒径が小さいほど高い活性化能を示した。また、がんワクチンによる抗腫瘍効果は、抗原特異的な CD8 陽性の細胞障害性 T 細胞 (CTL) が強く関与していることが明らかとなり、現在臨床で用いられているアジュバント (IFA) よりもナノ粒子の方が高い活性を示した。

今後は、大阪大学医学部附属病院内での癌抗原ペプチド-疎水化 γ -PGA ナノ粒子ワクチンの製造・製剤化を目指して、GMP 準拠化を含めてその環境を整備すると共に、申請に必要なナノ粒子の体内分布を評価するための、生体内粒子検出システムを確立する。ナノ粒子ワクチンの作

用機序では、生体内でのナノ粒子およびナノ粒子を取込んだ樹状細胞の体内動態を追跡し、ナノ粒子の体内分布および分解性を解析する。がんワクチンでは、皮下腫瘍、肝腫瘍モデルに対する予防・治療効果を評価し、抗癌剤とナノ粒子ワクチンの併用をめざした癌免疫治療の基礎的検討を行う。また、疎水化 γ -PGA ナノ粒子の製造・臨床応用・メカニズム解析を進めると共に、粒径の異なるナノ粒子の合成、構造解析、蛋白質キャリアとしての機能評価を行い、免疫応答との関連性を解析する。

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

これまでに、ポリ(γ -グルタミン酸) (γ -PGA) にフェニルアラニン (Phe) を導入した疎水化 γ -PGA を用いて、粒径 200 nm 程度のナノ粒子を調製し、ナノ粒子ワクチンとしての機能を評価してきた。実験室レベルでのナノ粒子合成方法は既に確立しているが、ナノ粒子ワクチンの臨床応用に向けて、GMP に準拠したナノ粒子の開発が必要となる。そこで、本年度は、GMP 準拠に適した簡便かつ高効率・高再現性のナノ粒子の大量製造技術を構築するために、ナノ粒子の合成方法を再検討し、製造方法の最適化を図った。また、ナノ粒子ワクチンの重要なパラメーターである粒子径の制御方法についても検討した。

1) ナノ粒子製造方法の検討

これまでの疎水化 γ -PGA ナノ粒子の合成は、以下の 2 つのステップに分けられる。

- ① γ -PGA 水溶液に Phe と縮合剤を添加し、室温で一晩攪拌する。その後、透析により未反応の Phe と縮合剤を除去し、凍結乾燥する。得られた粉末をエタノールで洗浄し、遠心した後に沈殿物を減圧乾燥し、疎水化 γ -PGA を得る(収率約 60%)。反応、透析、凍乾、再精製、乾燥を含めて約 1 週間を要する。
- ② 疎水化 γ -PGA を DMSO もしくは EtOH に溶解し、所定濃度の NaCl 溶液に滴下し、ナノ粒子を調製する。白濁した混合溶液は、透析もしくは遠心洗浄により溶媒を除去する。最後に凍結乾燥して、ナノ粒子の粉末を得る(収率約 80%)。粒子調製、精製、凍乾燥を含めて 3~5 日を要する。

これまでの方法では、疎水化 γ -PGA の精製に透析と凍結乾燥機を使用しており、現在予定している未来医療センター内での GMP 準拠の製造に対して障害となる。そのため、これらのステップを省略もしくは別の合成ルートを検討した。

- ① 疎水化反応後、Phe と縮合剤の除去については、透析の代わりに、反応後の溶液に過剰の NaCl を添加し、疎水化 γ -PGA を完全に凝集・析出させ、遠心により回収後、EtOH で繰り返し洗浄することで、精製が可能であった。得られた沈殿精製物を、風乾により乾燥させて収率を求めると、従来法と同程度の約 60% であった。
- ② 遠心精製により得られた疎水化 γ -PGA を DMSO に溶解し、従来法と同じく NaCl 水溶液に滴下し、ナノ粒子を調製した。ナノ粒子の精製は、遠心洗浄(蒸留水)により行い、最終的に蒸留水もしくは PBS 中に分散した状態の精製ナノ粒子を得た。新規合成方法で調製したナノ粒子を解析した結果、粒径は約 200 nm、ゼータ電位は約 -25 mV、粒子の収率は約 70% と、

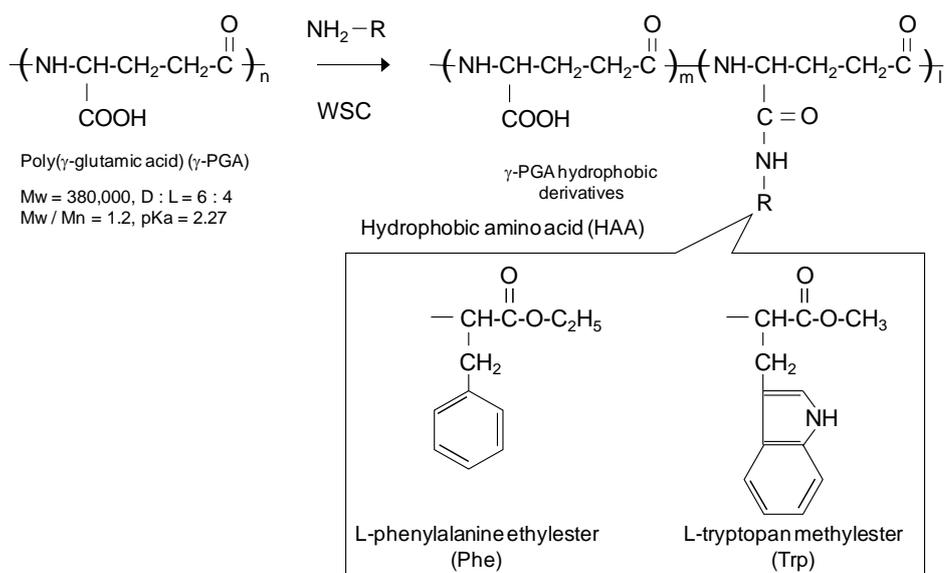


図 1. 疎水化 γ -PGA (γ -PGA-Phe および γ -PGA-Trp) の合成

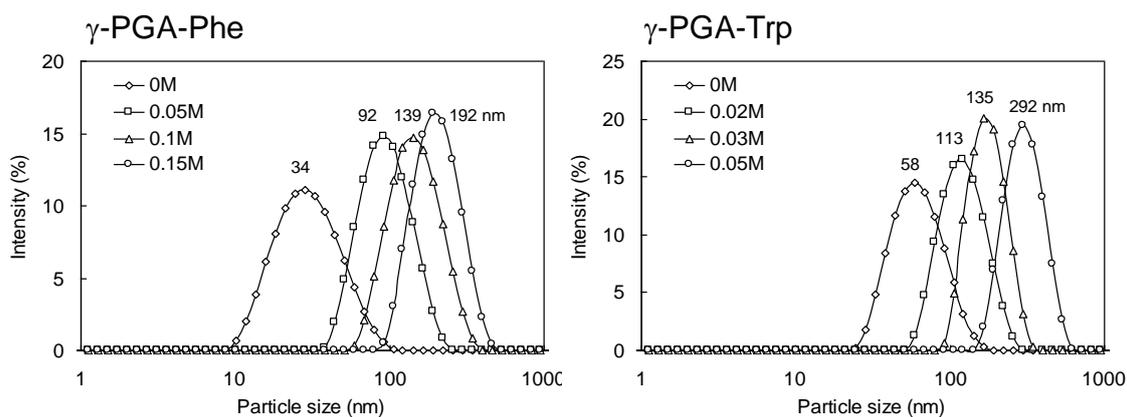


図 2. 調製時の塩濃度によるナノ粒子の粒径制御

従来法と同程度の値を示した。水分散状態のナノ粒子は少なくとも 3 ヶ月以上は 4°C 保存で安定であり、また冷凍保存後に再溶解しても、凝集・沈澱は認められず、冷凍前と同程度の粒径を維持していた。これらの結果より、透析や凍結乾燥機を使用しない、新規な合成法によるナノ粒子の製造が可能であることが明らかとなった。従来法では、ナノ粒子製造に 1 週間以上を要していたが、本製造過程では、2 日間で粒子の調製が可能となった。本製造方法では、遠心機のみでナノ粒子が調製できるため、GMP 準拠のナノ粒子製造に適した合成方法だと考えられる。

2) 疎水化 γ -PGA ナノ粒子の粒径制御 [4]

高分子ナノ粒子をワクチンキャリアとして利用する場合、粒子径、表面性状、粒子を構成する高分子鎖の組成がキャリアとしての性能を決定する重要な因子となる。そこで、疎水化 γ -PGA ナノ粒

子のワクチンキャリアとしての最適な粒径を検討することを目的に、疎水化 γ -PGA ナノ粒子の粒径制御と、それら粒径の異なるナノ粒子の蛋白質担持能について検討した。 γ -PGA (Mw =380,000) に疎水性アミノ酸である L-phenylalanine ethyl ester (Phe) および L-tryptophan methylester (Trp) を導入した、疎水化 γ -PGA (γ -PGA-Phe および γ -PGA-Trp) を合成した (図 1)。疎水化 γ -PGA を 10 mg/ml になるように DMSO に溶解し、当量の異なる NaCl 濃度の水溶液 (γ -PGA-Phe: 0, 0.05, 0.1, 0.15 M NaCl, γ -PGA-Trp: 0, 0.02, 0.03, 0.05M NaCl) に加えてナノ粒子を調製した。調製したナノ粒子を透析・凍結乾燥し、PBS に分散後、動的光散乱 (DLS) 法により粒径を測定した。各塩濃度の水溶液を用いて γ -PGA-Phe および γ -PGA-Trp ナノ粒子を調製した結果、NaCl 濃度の低下に伴い、ナノ粒子の粒径減少が認められ、NaCl 濃度を調節することで、ナノ粒子の粒径を制御することができた (図 2)。これは、塩濃度の低下に伴い、疎水化 γ -PGA の静電反発が増加し、高分子鎖の会合数および凝集力が低下することに起因していると考えられる。また、 γ -PGA-Phe ナノ粒子は、各粒径において凍結乾燥前後で粒径の変化は認められず、凍結乾燥による保存・再分散が可能であった。粒径の違いによる表面ゼータ電位の大きな変化はなく、いずれの粒径でも表面に γ -PGA 由来のカルボキシル基の存在が示唆された。次に、 γ -PGA-Phe を用いて蛋白質内包ナノ粒子の調製を行った。モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) を用い、OVA を溶解させている NaCl 濃度を調節することで、粒径の異なる蛋白質内包ナノ粒子を調製し、その内包効率を評価した。OVA 内包効率は粒径に依存せず、各塩濃度において同程度であり、粒径の異なる蛋白質内包ナノ粒子を調製することが可能であった。OVA 内包後の粒径は、塩濃度 0, 0.05, 0.1, 0.15M 調製で、それぞれ、38, 102, 212, 406 nm であった。今回の条件では、添加した OVA の約 50 % が粒子に内包され、粒子 1 mg あたり 100 μ g の OVA が担持できた。

3) 疎水化 γ -PGA ナノ粒子の細胞膜破壊活性 [5]

これまで、抗原を内包した疎水化 γ -PGA ナノ粒子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が明らかとなっている。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。ヒツジ赤血球と粒径 200 nm の疎水化 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。この pH 応答性は、 γ -PGA 側鎖のカルボキシル基のプロトン化により、粒子を構成しているポリアミノ酸の 2 次構造変化が変化する、粒子全体の疎水性増加に起因していることが明らかとなった。

4) 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 (CT) および負電荷を有するデキストラン硫酸 (Dex) 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、その薬物担持能および放出挙動について検討した。CT-Dex 中空カプセルは、pH を変化させることで、カプセル膜の薬物透過性を制御することが可能であり、pH をコン

トロールすることで、サイトカイン(bFGF)をカプセル内に担持させることができた。また、bFGF を内封したカプセルは、細胞表面に吸着し、そこから bFGF の変性や分解を伴わず、局所的に徐放させることで、高い細胞増殖活性を示した [1]。

N-カルボキシアミノ酸無水物 (NCA) 重合を利用した、ペプチド-多糖ナノスフェアの一段階合成法を確立した。L-フェニルアラニン (Phe) の NCA 重合の開始剤として水溶性キトサン (CT) を用いることで、pPhe がコアで CT がシェル層からなる粒径 290 nm のカチオン性 pPhe-CT ナノスフェアが合成できた。本手法では開始剤の種類を変えることにより、グラフト鎖長や表面電荷といった表面構造の異なる種々のナノスフェアを合成できることが明らかとなった [2]。

馬場グループ

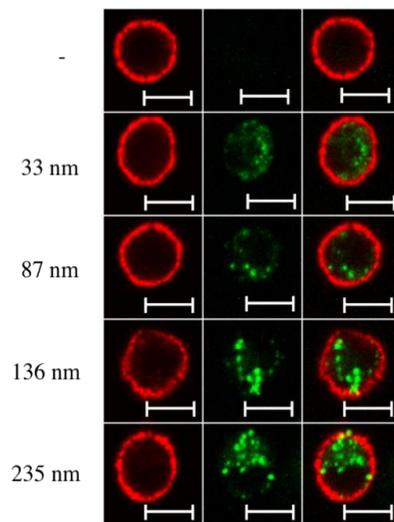
これまでの研究において、抗原を γ -PGA ナノ粒子に内包することにより、抗原が非常に効率良く抗原提示細胞である樹状細胞に取り込まれることを明らかにしている。また、 γ -PGA ナノ粒子自身が、マウスの骨髄由来および脾臓由来の樹状細胞を活性化(成熟化)させることを証明し、さらに、 γ -PGA ナノ粒子ワクチンの接種ルートにより、優勢的に誘導される免疫応答の種類が異なることを見出した [3]。

5) γ -PGA ナノ粒子による樹状細胞活性化のシグナル伝達

γ -PGA ナノ粒子の樹状細胞への活性化を詳しく解析する為に、Toll like receptor 4 (TLR4) の変異マウスである C3H/HeJ マウス由来の樹状細胞と、野生型の TLR4 を持つ C3H/HeN マウス由来の樹状細胞を用いることで、 γ -PGA ナノ粒子の樹状細胞への活性化能を検討した。その結果、 γ -PGA ナノ粒子は C3H/HeN (TLR4 WT) 由来の樹状細胞と比較すると、C3H/HeJ (TLR4 mutant) マウス由来の樹状細胞に対しては成熟化を引き起さなかった。この結果から、 γ -PGA ナノ粒子は主に TLR4 を介して樹状細胞を活性化させていると考えられた。また、lipopolysaccharide (LPS) の不活化試薬であるポリミキシン B を用いて γ -PGA ナノ粒子を処理し、樹状細胞への活性化を調べたところ、樹状細胞への活性化には何ら影響はなかった。このことは、以前の γ -PGA ナノ粒子中への LPS のコンタミネーションを否定した結果に加え、樹状細胞の活性化が γ -PGA ナノ粒子の独自の作用によるものであることを示している。

6) 粒子径の異なる新規 γ -PGA ナノ粒子の作用

γ -PGA ナノ粒子はその作製方法を調節する事により、粒径の異なる粒子を調整する事が出来る。この方法を



Green : FITC-NP, Red : anti CD11c-PE Ab

図 3. 粒子径の異なる γ -PGA ナノ粒子 (FITC-NP) の樹状細胞への取込み。マウス樹状細胞に FITC 標識された γ -PGA ナノ粒子を取込ませ共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

用いて調整した新規 γ -PGA ナノ粒子(約 30 nm から 200 nm)を用いて、樹状細胞への取込みや樹状細胞に対する刺激作用について検討した。フローサイトメトリーや共焦点レーザー顕微鏡による観察では、 γ -PGA ナノ粒子の樹状細胞への取込みは粒子径の大きさとともに増大し(図 3)、逆に樹状細胞の成熟化への作用は小さな粒子径の方が有利であることが明らかとなった。

異グループ

7) 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フロイント完全アジュバント(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。EphA2 由来ペプチド-ナノ粒子ワクチンの抗腫瘍効果は EphA2 を発現していない BL6 肝腫瘍には認められず、EphA2 特異的な CTL の誘導が示唆された。各種免疫細胞の depletion 実験においても、CD8 陽性 T 細胞の除去により、EphA2 由来ペプチド-ナノ粒子ワクチンの抗腫瘍効果が減弱したことから、CD8 陽性 CTL の関与が明らかとなった。しかしながら肝臓に比較的多く存在する NK 細胞は、本ワクチンの抗腫瘍効果においては、関与はないことが明らかとなった。本ワクチンの安全性を評価する目的でワクチン後の ALT、総ビリルビン、アルブミン、クレアチニンを

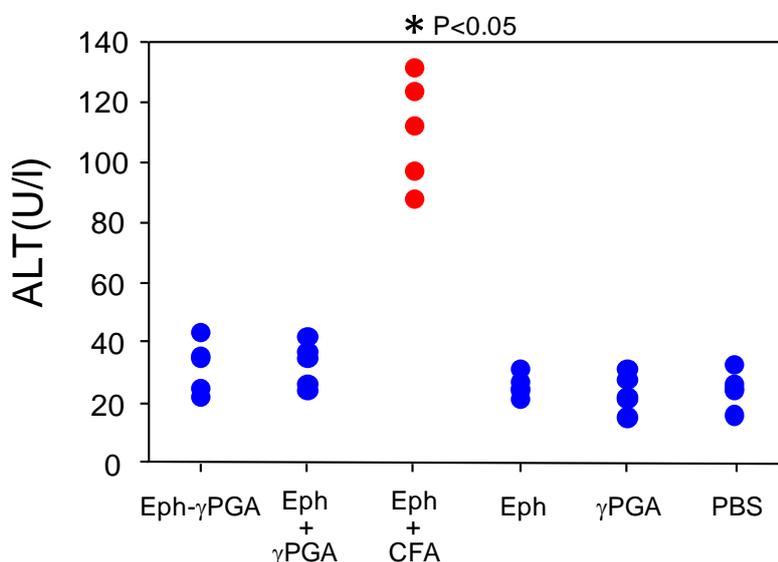


図 4. C57BL/6 マウスに各ワクチン[Eph- γ -PGA (EphA2 ペプチド表面固定 γ -PGA ナノ粒子ワクチン群)、Eph + γ -PGA (EphA2 ペプチドとナノ粒子混合ワクチン群)、Eph + CFA (EphA2 ペプチドとCFA 混合ワクチン群)、Eph (EphA2 ペプチド単独投与群)、 γ -PGA(ナノ粒子単独投与群)、PBS 群(未処置)]を施行後、マウス血清を採取し ALT 値を測定した。Eph + CFA 治療群で唯一有意な ALT 上昇をみると、肝障害が起こることが明らかとなった。一方ナノ粒子ワクチン治療群では肝障害は起こらないことが明らかとなった。

測定すると、CFA 治療を受けたマウスでは肝障害を認めたが、EphA2 由来ペプチド-ナノ粒子ワクチンを受けたマウスでは肝障害、腎障害いずれも認めなかった(図 4)ことから、 γ -PGA ナノ粒子ワクチンの安全性が示唆された。また Eph- γ -PGA ナノ粒子ワクチンは、現在臨床応用されているアジュバントである IFA よりもつよい抗腫瘍効果を示すことも明らかにした。以上の結果は、Eph- γ -PGA ナノ粒子ワクチンは肝腫瘍に対して腫瘍特異的な CTL を誘導することで抗腫瘍効果を示し、肝障害や腎障害を認めず、安全な治療法であることが示された。

8) ナノ粒子-癌抗原ペプチドワクチンによる癌免疫治療の臨床応用

現在大阪大学医学部附属病院内での癌抗原ペプチド-疎水化 γ -PGA ナノ粒子ワクチンの製造を目指して、GMP 準拠化を含めて環境整備中である。また肝癌・消化器癌患者を対象とした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

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-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

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

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-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. Tomonori Waku, Michiya Matsusaki, Suwabun Chirachanchai, Mitsuru Akashi, "One-step preparation of cationic sugar-peptide nanospheres using the water-soluble chitosan-initiated polymerization of L-phenylalanine N-carboxyanhydride", *Chem. Lett.*, **37**, 1262-1263 (2008).
2. Yuki Itoh, Michiya Matsusaki, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi, "Locally controlled release of basic fibroblast growth factor from multilayered capsules", *Biomacromolecules*, **9**, 2202-2206 (2008).
3. Tomofumi Uto, Xin Wang, Takami Akagi, Rika Zenkyu, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, "Improvement of adaptive immunity by antigen-carrying biodegradable nanoparticles", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 600-604 (2009).
4. Hyungjin Kim, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, "Preparation of size tunable amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles", *Macromol. Biosci.*, in press.
5. Takami Akagi, Hyungjin Kim, Mitsuru Akashi, "pH-dependent disruption of erythrocyte membrane by amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles", *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, in press.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 2 件 (CREST 研究期間累積件数 : 3 件)