

「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アジュバント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。

昨年度(平成 20 年度)においては、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確立した。また、疎水化ポリ(γ -グルタミン酸) (γ -PGA) ナノ粒子の粒径を簡便かつ精密に制御できる調製方法を開発した。ナノ粒子ワクチンのメカニズム解析においては、ナノ粒子のアジュバント活性に関連する樹状細胞のシグナルレセプターを明らかにした。さらに、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も安全な治療法であることを証明してきた。そこで本年度は、1) 粒径制御された疎水化 γ -PGA ナノ粒子の物性評価と構造解析、2) 疎水化 γ -PGA からなる新規ポリイオンコンプレックス(PIC)ナノ粒子の調製、3) ナノ粒子およびナノ粒子を取込んだ樹状細胞(DC)の体内分布の検討、4) ナノ粒子による樹状細胞活性化のシグナル伝達経路の解析、5) マウス腫瘍モデルを用いたナノ粒子ワクチンによるがん免疫療法の開発を実施した。

疎水化 γ -PGA ナノ粒子の粒径制御では、粒子調製時の塩濃度を調節することで、蛋白質内包ナノ粒子の粒径を精密に制御することが可能であり、粒径変化は粒子あたりのポリマー会合数の違いに起因していることが分かった。また、 γ -PGA の疎水化を制御することで、1 本の高分子鎖からなるユニマーナノ粒子の調製ができ、さらに疎水化 γ -PGA とカチオン性高分子との組み合わせに

より、静電的相互作用と疎水性相互作用の2つの駆動力を利用した生理環境下で安定なPIC ナノ粒子の開発に成功した。ナノ粒子のアジュバント活性のメカニズム解析においては、疎水化 γ -PGA ナノ粒子が細胞内シグナル伝達経路であるMAPKを介してNF- κ Bを活性化させ、各種炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導し、さらに樹状細胞の活性化を引き起こす事が明らかとなった。ナノ粒子の体内分布の検討では、マウス組織内でのナノ粒子検出方法を確立し、皮下投与後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明らかにした。がんワクチンに関しては、ナノ粒子ーペプチドワクチンが肝腫瘍に対して効果を示し、かつ肝障害や腎障害を認められないことから、安全な治療法であることが示された。今後は、大阪大学医学部附属病院内での癌抗原ペプチドー疎水化 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の整備を進める。

§ 2. 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

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

ナノ粒子ー癌抗原ペプチドを用いた肝臓・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

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

明石グループ

1) 疎水化 γ -PGA ナノ粒子の粒径制御と構造解析¹⁾

これまでに微生物由来のポリアミノ酸であるポリ(γ -グルタミン酸)をフェニルアラニンで修飾した疎水化 γ -PGA のナノ粒子形成挙動を評価してきた。疎水化 γ -PGA ナノ粒子は DMSO に溶解した疎水化 γ -PGA (Phe 導入率 53%) を水溶液中に添加する際の NaCl 濃度で制御(20~200 nm 程度)することが可能であった。各塩濃度の水溶液を用いて疎水化 γ -PGA ナノ粒子を調製した結果、NaCl 濃度の増加に伴い、ナノ粒子の粒径増加が認められた。これは、塩濃度の増加に伴い、疎水化 γ -PGA のカルボキシル基に由来する静電反発が減少することで、高分子鎖の会合数および凝集力が増大したためであると考えられる。そこで、得られた粒径の異なるナノ粒子を静的光散乱(SLS)にて分子量を算出し、粒子 1 個あたりの疎水化 γ -PGA の会合数を求めた結果、粒径の増加に伴い疎水化 γ -PGA の会合数が増加していた(表 1)。粒径 23 nm のナノ粒子では、約 10 本の高分子鎖が自己集合して粒子を形成しており、粒径変化は粒子 1 個あたりの疎水化 γ -PGA の会合数に起因していることが明らかとなった。

表 1. 粒径の異なる疎水化 γ -PGA ナノ粒子のポリマー会合数

NaCl (M)	Diameter (nm)	PDI	Molecular weight of NPs (kDa)	Number of NPs /1 mg ($\times 10^{12}$)	Surface area (cm ² /mg NPs)	Aggregated polymer number
0	23	0.14	1200	502	8300	8
0.05	56	0.07	17700	34	3300	120
0.10	84	0.06	49600	12	2700	330
0.15	128	0.11	119500	5	2600	800

次に、粒径の異なる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 を溶解した NaCl 水溶液の OVA (0~2 mg/ml) と NaCl (0~0.15 M) 濃度をそれぞれ変化させ、その溶液に疎水化 γ -PGA in DMSO (10 mg/ml) 溶液を添加し、得られた OVA 内包ナノ粒子中の OVA 量と粒径を測定した。その結果、単位粒子重量あたりの OVA 内包量は、NaCl 濃度に関わらず、仕込みの OVA 濃度依存的に増加した(図 1A)。また、粒径測定の結果、OVA 溶液中の NaCl 濃度を調節することで、蛋白質内包ナノ粒子の粒径も容易に制御可能であることが明らかとなった(図 1B)。さらに、粒子重量あたりの OVA 内包量は粒径に依存せず、いずれの粒径においても、OVA 内包効率は約 50%であった。

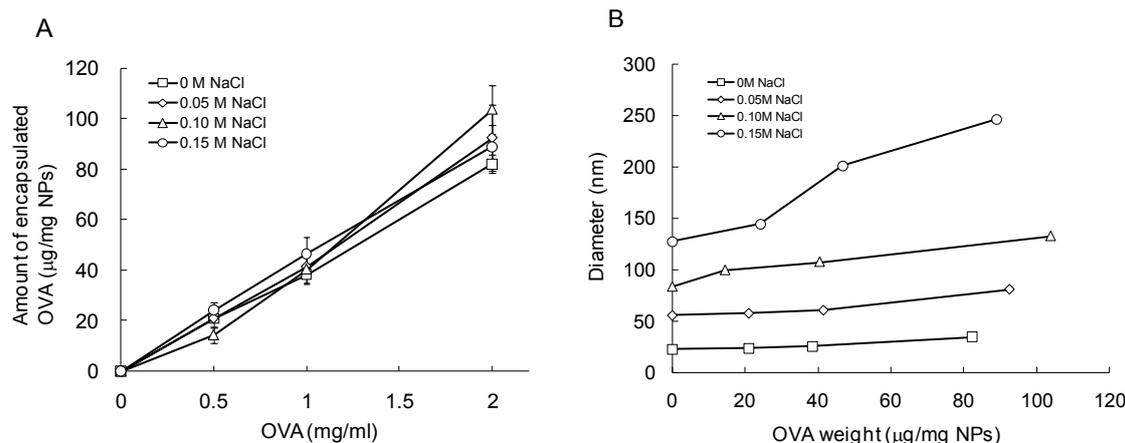


図 1. 粒径の異なる蛋白質内包ナノ粒子の調製。(A) 粒子 1 mg あたりの OVA 内包量に対する OVA および NaCl 濃度の効果。(B) OVA 内包ナノ粒子の粒径変化。

2) 疎水化 γ -PGA からなるユニマーナノ粒子の調製

両親媒性のランダム共重合体のユニークな特徴として、高分子鎖内での疎水性相互作用により、1 本の高分子鎖からなるユニマーミセルの形成が報告されている。しかしながら、生分解性高分子からなるユニマーミセルおよびナノ粒子の調製や DDS への応用に関する報告例はほとんどない。ユニマーナノ粒子はその構造やサイズ的特徴により以下のような利点が考えられる。1) 大きいナノ粒子と比較して、重量あたりの表面積が大きく、ターゲット分子を効率よく捕捉できる。2) 組織、細胞および細胞内オルガネラのターゲティングおよびデリバリーに有用。3) ナノ粒子の分解挙動および薬物の放出速度の制御が容易といったことが挙げられる。疎水化 γ -PGA はフェニルアラニン (Phe) が γ -PGA 側鎖の COOH 基にランダムに導入された両親媒性のグラフト共重合体であるため、Phe の導入率や調製条件によって高分子鎖の会合数を制御でき、生分解性のユニマーナノ粒子の調製が可能であると考えられる。そこで、疎水化 γ -PGA の会合数変化によるナノ粒子の粒径制御と 1 本の疎水化 γ -PGA からなる生分解性のユニマーナノ粒子の調製を試みた。

まず、Phe の導入率が 12~65%の疎水化 γ -PGA を合成した。ナノ粒子の調製は直接、疎水化 γ -PGA を水に溶解・分散させる方法(直接分散法)と DMSO に溶解した疎水化 γ -PGA を純水もしくは所定濃度の NaCl 水溶液と混合し、透析によってナノ粒子を調製する(透析法)2 つの方法を用いた。水に可溶である Phe 導入率が 40%以下のサンプルは直接分散法を用い、Phe 導入率が 40%以上のサンプルは透析法にてナノ粒子を調製した。得られたナノ粒子は、SLS により分子量測定し、蛍光プローブ法によって粒子内部の疎水性ドメインの検出を行い、ユニマーナノ粒子形成の確認を行った。その結果、Phe 導入率が 35~45%の疎水化 γ -PGA において粒子径が 7~9 nm で、ポリマー会合数 (N_{agg}) が 1.3~1.4 であった。これらのユニマーサンプルの疎水性ドメイン形成の有無を蛍光プローブであるピレンを用いて検討した結果、ポリマー濃度依存的な蛍光スペクトルの変化が認められた。この結果より、Phe 導入率が 40%前後の疎水化 γ -PGA では、ポリマー鎖

内での疎水性会合が起こっており、ユニマーナノ粒子の形成が示唆された。今後は、より詳細なユニマーナノ粒子の形成条件および得られたユニマーナノ粒子の物性・構造解析を行う。

3) 疎水化 γ -PGA からなるポリイオンコンプレックスナノ粒子の調製²⁾

反対電荷を有する2種類の水溶性ポリアミノ酸を混合することで、静電的相互作用によるポリイオンコンプレックス(PIC)が形成される。これら PIC は水中(純水)では安定な会合体を形成しているが、高塩濃度の緩衝液中や pH 変化、希釈により、ポリマー鎖間の相互作用が遮へいされることで、会合体の溶解や凝集が引き起こされる。そこで、静電相互作用に加え、疎水性相互作用を利用することで、生理的環境下で安定に機能する PIC ナノ粒子の調製を試みた。アニオンおよびカチオン性のポリアミノ酸として γ -PGA およびポリ(ϵ -リジン) (ϵ -PL)を用いた。 γ -PGA の側鎖の COOH 基に L-フェニルアラニンエチルエステル(Phe)を導入し、Phe 導入率が 16, 28, 49%の水に可溶性疎水化 γ -PGA (γ -PGA-Phe-16, 28, 49)を調製した。疎水化 γ -PGA (10 mg/ml)と ϵ -PL (2 mg/ml)を PBS (pH 7.4)に溶解し、等量混合後、動的光散乱(DLS)により粒径を測定した。その結果、未修飾 γ -PGA および γ -PGA-Phe と ϵ -PL とを混合し、その直後(day 0)の粒径を測定した場合、ナノ粒子の形成が認められた(図 2A)。その後、4°Cで静置し、経時的に粒径を測定すると、 γ -PGA および γ -PGA-Phe-16 では、粒子の崩壊および凝集が認められ、DLS 測定により単分散なピークは得られなかった。一方、Phe 導入率の高い γ -PGA-Phe-28 では、粒子の膨潤により粒径の増加がみられたが、単分散性を維持していた。また γ -PGA-Phe-49 は高い安定性を示し、長期保存により粒径の変化は認められなかった(図 2B)。この高い安定性は、粒子内部での Phe による疎水性ドメインの形成に起因していた。疎水化 PIC ナノ粒子は、静電的相互作用に加え、導入した疎水化基の疎水性相互作用により、安定なナノ粒子が形成可能であった。

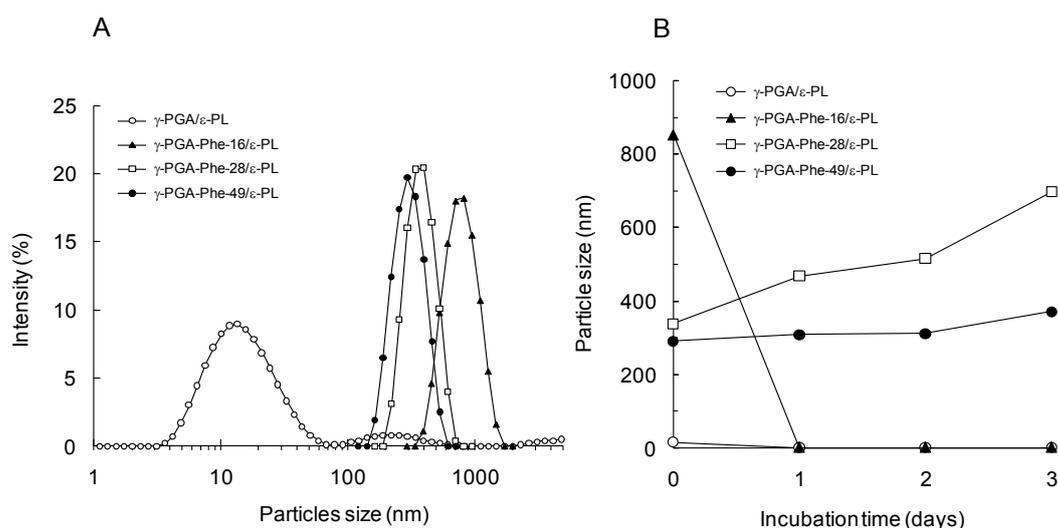


図 2. γ -PGA-Phe/ ϵ -PL ナノ粒子の形成と安定性。疎水化 γ -PGA において 100 nm 以上のナノ粒子の形成が認められた(図 2A)。また、得られた PIC ナノ粒子のは、Phe 導入率の増加に伴い、粒径変化に対する高い安定性を示した。

4) 新規高分子中空カプセルの開発³⁾

ナノメートルオーダーで薄膜が形成可能な Layer-by-Layer (LbL) 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ポリアミノ酸である γ -PGA とのポリイオンコンプレックス(PIC)からなる中空カプセルを調製し、その薬物担持能および pH 変化に対する粒径変化、薬物放出挙動について検討した。CTと γ -PGA の組み合わせでは、pH 4 の条件で逐次的な交互積層膜の形成が確認され、安定な中空カプセル(200~300 nm)が調製できた。得られた中空カプセルの pH に対する応答性を評価したところ、酸性条件下で粒径の増大が確認され、カプセル内に内包されたデキストランの放出も、酸性条件下(pH 1, 4)のみで認められた。また、CT- γ -PGA の PIC 膜を縮合剤で化学架橋することで、酸性条件下での薬物放出速度を制御することが可能であった。

5) 疎水化 γ -PGA ナノ粒子の体内分布

疎水化 γ -PGA ナノ粒子を用いたがんワクチンとしての臨床応用のためには、ナノ粒子の分布・動態を明らかにする必要がある。そこで、まずマウスでの各組織内でのナノ粒子の検出系の確立を目指し、FITCラベル化ナノ粒子を用いた蛍光検出法と抗グルタミン酸抗体を用いた ELISA 法の検討を行った。検出系として蛍光法の方が高い検出感度を示したため、蛍光法を採用した。マウスに FITC ラベル化した疎水化 γ -PGA ナノ粒子(200 nm)を皮下投与し、1 日および 3 日後に各臓器を回収し、ホモジナイズしたサンプルの蛍光を検出した。その結果、投与 3 日後の皮下組織には投与した粒子の約 40%が残存しており、肝臓と腎臓で約 0.7%、2.7%の粒子が検出された。今後は静注投与も含め、ナノ粒子の分布、代謝、排泄経路の解析を行う予定である。

6) 粘膜免疫によるナノ粒子インフルエンザワクチンの有効性(医薬基盤研との共同研究)⁴⁾

これまでに、疎水化 γ -PGA ナノ粒子とインフルエンザ HA 抗原を混合(HA + NPs)して皮下投与することで、ナノ粒子のアジュバント活性による高い免疫誘導効果と感染防御効果が示されている。しかしながら、免疫した HA 抗原と異なるサブタイプのインフルエンザウイルスに対する感染防御効果(交差性)は認められなかった。そこで、ナノ粒子ワクチンの粘膜(経鼻)免疫による免疫誘導および交差感染防御効果について検討した。その結果、HA + NPs を経鼻免疫した群では、皮下免疫ではみられなかった鼻腔および肺洗浄液中に HA 特異的な IgA 抗体が検出され、中和活性も認められた。また、サブタイプの異なるウイルスチャレンジに対しても感染防御効果が認められ、疎水化 γ -PGA ナノ粒子が優れた粘膜アジュバントとして機能することが明らかとなった。

馬場グループ

7) 疎水化 γ -PGA ナノ粒子による樹状細胞活性化のシグナルレセプターの同定

疎水化 γ -PGA ナノ粒子が樹状細胞を活性化させる事は明らかとなっているが、何の細胞表面分子を介して樹状細胞に活性化のシグナルを与えているかは明らかではない。樹状細胞は自然

免疫の要の細胞であり、微生物やバクテリア等の個体や産物を認識する機構が高次に備わっている。近年 Toll like receptor (TLR)-MyD88 を介したシグナル伝達の経路の研究が盛んに行われており、 γ -PGA もバクテリアである納豆菌由来の産物であるため、TLR に認識される可能性が高い。そこで疎水化 γ -PGA ナノ粒子 (200 nm) の自然免疫系への活性化誘導を詳しく解析するために、MyD88 がノックアウトされて完全に消失している MyD88 KO マウス由来のマクロファージと、MyD88 野生型のマウス由来のマクロファージを用い、 γ -PGA ナノ粒子の自然免疫細胞への活性化能を検討した。その結果、ナノ粒子は MyD88 野生型由来のマクロファージと比較すると、MyD88 KO マウス由来のマクロファージに対しては炎症性サイトカインの産生誘導が優位に減少していた。この結果から、疎水化 γ -PGA ナノ粒子は主に MyD88 を介して自然免疫細胞を活性化させていると考えられる。

8) 疎水化 γ -PGA ナノ粒子による樹状細胞活性化のシグナル伝達経路の解析⁵⁾

疎水化 γ -PGA ナノ粒子が樹状細胞を活性化する際のシグナル伝達経路を詳しく解析するために、C57BL/6 マウス脾臓より樹状細胞を単離し、ナノ粒子の樹状細胞への活性化時におけるシグナル経路の解析を行った。その結果、ナノ粒子は細胞内シグナル伝達経路である mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介して NF- κ B を活性化させ各種炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導し、さらに樹状細胞の表面に補助刺激分子や MHC Class I の発現増強を引き起こす事が明らかとなった (図 3)。また、lipopolysaccharide (LPS) の不活化試薬であるポリミキシン B を用いてナノ粒子を処理し、C57BL/6 マウス由来の骨髄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、ナノ粒子中のエンドトキシンの混入を否定した結果に加え、樹状細胞の活性化が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。また、粒子を形成していない γ -PGA では樹状細胞の成熟化は引き起こさなかったことから、 γ -PGA を粒子状にする事が樹状細胞の活性化に重要であると考えられる。

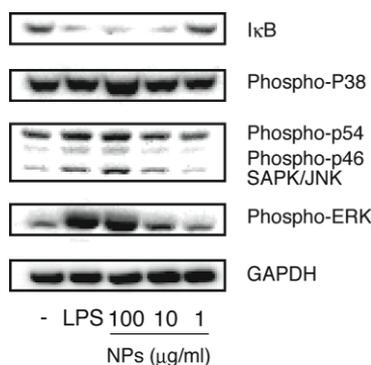


図 3. 疎水化 γ -PGA ナノ粒子によるシグナル伝達。マウス脾臓樹状細胞にナノ粒子を作用させ、MAPK 系のシグナル伝達経路をウエスタンブロットにより観察した。

9) 疎水化 γ -PGA ナノ粒子投与後の免疫細胞による取込み

抗原を内包している疎水化 γ -PGA ナノ粒子をマウス個体に投与すると、抗原に対する優れた獲得免疫を誘導する事が明らかになっている。そこでナノ粒子投与後の動態を解析する目的で、蛍光ラベル化したナノ粒子を用いて、投与後の免疫細胞による取込みや細胞動態を解析した。蛍光色素である FITC で標識した疎水化 γ -PGA ナノ粒子を皮下に投与し、3 日後に所属リンパ節と脾臓における FITC 陽性の細胞をフローサイトメリーで検出した結果、FITC 陽性の細胞は所属のリンパ節でのみ観察され、脾臓では観察されなかった(図4)。さらに、FITC のみの投与では、所属リンパ節や脾臓において蛍光が観察されなかった。これは、皮下で抗原を取込んだ細胞が所属のリンパ節へと移行していることを示唆しており、さらに粒子を形成することで、免疫細胞に取込まれ易くなることを示している。

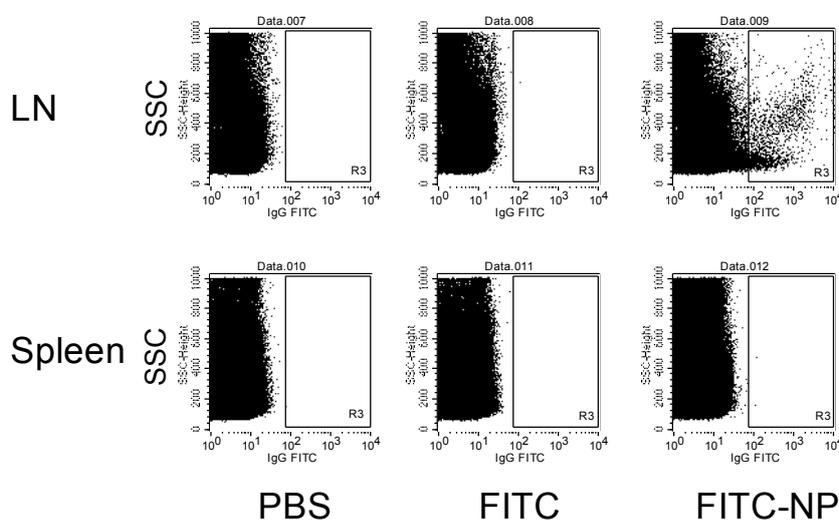


図 4. FITC ラベル疎水化 γ -PGA ナノ粒子(FITC-NP)のリンパ節への移行。マウス皮下に FITC 標識されたナノ粒子を投与し、3 日後にフローサイトメーターにて観察した。

異グループ

10) 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⁶⁾

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(Eph-NPs)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。Eph-NPs 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 Eph-NPs 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。Eph-NPs 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。CFA 治療を受けたマウスでは肝障害を認めたが、Eph-NPs 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ことから、疎水化 γ -PGA ナノ粒子ワクチンの安全性が示唆された。また Eph-NPs 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-NPs 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。本研究結果は *Cancer Immunology, Immunotherapy* 誌に原著論文として本年度 accept された。

次に、我々はこれまで α -galatotsylceramide (α -GalCer)を用いた肝先天免疫を標的とした癌免疫治療について多くの研究を行ってきたが (Tatsumi T, et al. *Hepatology* 2007, *J Hepatol* 2008, Sasakawa A, *J Hepatol* 2009)、本研究では α -GalCer+Eph-NPs をパルスした樹状細胞 (DC) ワクチンの有用性について検討した。MC38 マウス大腸癌細胞を肝内投与し肝腫瘍を作成した。 α -GalCer+Eph-NPs をパルスした DC、 α -GalCer のみパルスした DC、Eph-NPs のみパルスした DC、DC のみ、PBS のみの 5 治療群をつくり、MC38 肝腫瘍に対する抗腫瘍効果を検討した (図 5)。コントロール群に比して α -GalCer+Eph-NPs をパルスした DC 治療群、 α -GalCer のみパルスした DC 治療群で有意に肝重量が低かったが、Eph-NPs のみパルスした DC 治療群、DC のみ治療群では肝重量に有意な差を認めなかった。本検討では、疎水化 γ -PGA ナノ粒子の上乗せ効果は判然としなかったが、より大きな肝腫瘍を作成してナノ粒子の上乗せ効果を検討中である。

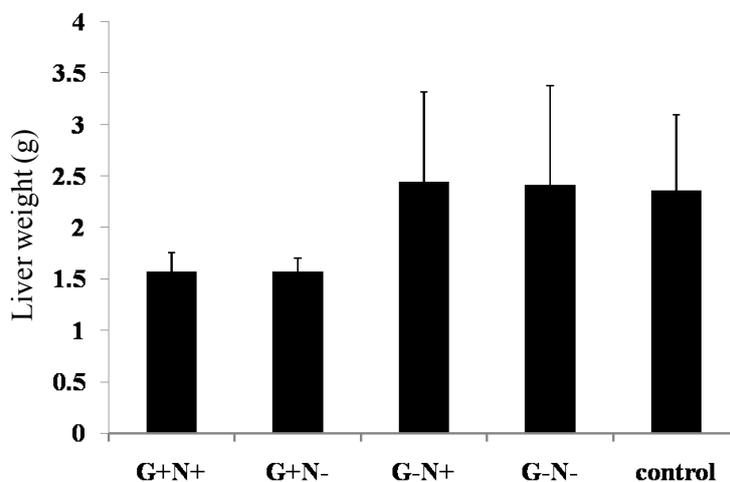


図 5. C57BL6 マウスに MC38 マウス大腸癌細胞を肝内に投与後、各ワクチン[G+N+ (α -GalCer+Eph-NPs パルスした DC 群)、G+N- (α -GalCer パルスした DC 群)、G-N+ (Eph-NPs パルスした DC 群)、G-N- (DC のみ群、control (PBS 投与群))]を施行し、2 週間後マウス肝を採取し重量を比較した。

11) 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。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Hyungjin Kim, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, “Preparation of size tunable amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles”, *Macromol. Biosci.* **9**, 825-932 (2009). DOI: 10.1002/mabi.200800367
2. Takami Akagi, Kazuki Watanabe, Hyungjin Kim, Mitsuru Akashi, “Stabilization of polyion complex nanoparticles composed of poly(amino acid) using hydrophobic interactions”, *Langmuir* **26**, 2406–2413 (2010). DOI: 10.1021/la902868g
3. Takayuki Imoto, Toshiyuki Kida, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, “Preparation and unique pH-responsive properties of novel biodegradable nanocapsules composed of poly(γ -glutamic acid) and chitosan as weak polyelectrolytes”, *Macromol. Biosci.* **10**, 271-277 (2010). DOI: 10.1002/mabi.200900272
4. Shigefumi Okamoto, Masaaki Matsuura, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Takeshi Tanimoto, Toyokazu Ishikawa, Michiaki Takahashi, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori, “Poly (γ -glutamic acid) nano-particles combined with mucosal influenza virus hemagglutinin vaccine protects against influenza virus infection in mice”, *Vaccine* **27**, 5896-5905 (2009). DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.07.037
5. Tomofumi Uto, Takami Akagi, Takayuki Hamasaki, Mitsuru Akashi, Masanori Baba, “Modulation of innate and adaptive immunity by biodegradable nanoparticles”, *Immunol. Lett.* **125**, 46-52 (2009). DOI: 10.1016/j.imlet.2009.05.008
6. Shinjiro Yamaguchi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara, Akira Sasakawa, Masashi Yamamoto, Keisuke Kohga, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Norio Hayashi, “EphA2 derived peptide vaccine with amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles elicits antitumor effect against mouse liver tumor”, *Cancer Immunol. Immunother.* **59**, 759-767 (2010). DOI: 10.1007/s00262-009-0796-2
7. Hyungjin Kim, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, “Preparation of CpG ODN-encapsulated anionic poly(amino acid) nanoparticles for gene delivery”, *Chem. Lett.* **39**, 278-279 (2010). DOI: 10.1246/cl.2010.278

(4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 4 件)