

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12539

研究課題名(和文) 両親媒性ポリアミノ酸の形状制御とアジュバント機能

研究課題名(英文) Morphological control of amphiphilic poly(amino acid) and their adjuvant function

研究代表者

赤木 隆美 (AKAGI, Takami)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授

研究者番号：00527236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、両親媒性ポリアミノ酸からナノ-マイクロ構造体を調製し、ワクチンアジュバントとしての機能を評価した。ポリ(-グルタミン酸)(-PGA)に疎水性アミノ酸を導入した疎水化-PGAは、その疎水化度や良溶媒から貧溶媒への置換の条件を制御することで、ナノ粒子、マイクロ粒子、中空粒子、多孔質粒子、ファイバー等の構造体が形成可能であった。また、疎水化-PGAから中空マイクロ粒子は、抗原ペプチドを効率よく担持することが可能であり、マウス免疫実験により既存のアジュバントよりも高い免疫誘導効果を示した。

研究成果の概要(英文)：Multi-morphological biodegradable nano-micro structures composed of amphiphilic poly(amino acid) were fabricated by using hydrophobic interactions of hydrophobic groups grafted onto poly(amino acid). By adjusting hydrophilic-hydrophobic balance of polymers and preparative conditions of particles, various morphological and nano/micro-scale sized structures could be formed. The obtained nano/microparticles were evaluated their potential application for drug delivery carriers. Hollow microparticles composed of hydrophobically-modified poly(-glutamic acid) were useful as a peptide carrier and vaccine adjuvant.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：両親媒性高分子 ワクチンアジュバント ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な形状を有する有機および無機ナノ・マイクロ構造体において、その形状が細胞への吸着・取り込み量、毒性、薬物放出挙動、細胞・体内動態等に影響を与えることが明らかとなっており、材料のサイズ・形状変化による機能制御に関する研究が数多く展開されている。なかでも、両親媒性高分子は親水・疎水バランスを制御することで種々の会合体を取ることが知られており、合成および生分解性高分子を用いた様々なナノ・マイクロ構造体が調製されている。

研究代表者はこれまでに、納豆菌由来のポリ(γ-グルタミン酸)(γ-PGA)に疎水性アミノ酸を導入し、その疎水化γ-PGAから形成される200 nmの生分解性ナノ粒子を用いて、ワクチンアジュバントとしての機能、有効性、安全性を評価してきた。ナノ粒子のアジュバント機能は粒径によって大きく異なることが明らかとなっており、粒子サイズ以外にも疎水化γ-PGAから会合体の形状を制御することで、アジュバントとしての新たな機能発現が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、γ-PGAの疎水化度や分子量の異なる疎水化γ-PGAを合成し、様々なサイズ・形状を有する構造体の調製方法を確認する。また、得られた構造体の形状とアジュバント機能との相関性を精査し、高活性・高安全性を持つワクチンアジュバントの創出を目指すと共に、工学的アプローチによる新しいアジュバント材料の分子設計指針を明らかにする(図1)。

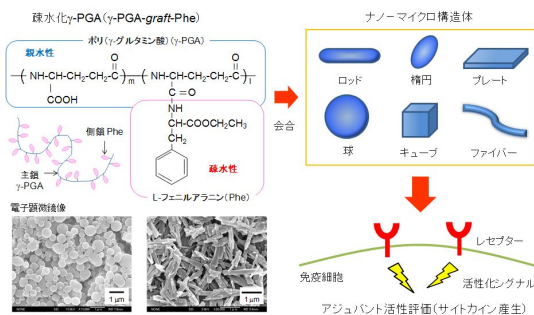


図1. 本研究の概略図(疎水化γ-PGA構造体の調製とアジュバント活性評価)

3. 研究の方法

(1) 疎水化γ-PGAの合成とナノ・マイクロ構造体の形状制御

様々な疎水化度を有するγ-PGAを合成し、疎水性相互作用を利用したナノおよびマイクロ構造体を調製した。γ-PGAの分子量、疎水化度、調製時の溶媒やポリマー濃度等の条件を変化させることで、疎水化γ-PGAから得られる構造体の形状制御を行った。

(2) 疎水化γ-PGA構造体の機能評価

上記で得られた疎水化γ-PGAからなるナノ・マイクロ構造体の基礎的な物性評価を行った。また、蛋白質、ペプチド、核酸等のキャリアおよび細胞賦活化剤としての機能を *in vitro* および *in vivo* 免疫実験により評価し、ワクチンアジュバントとして有効性を精査した。マウス免疫実験のためのペプチド内包中空粒子(OVA-I-hollow MPs)の調製には、モデルペプチドとして卵白アルブミン(OVA)のエピトープペプチド(SIINFEKL: 8aa, OVA-I)を用いた。疎水化γ-PGA(フェニルアラニン導入率70%)のクロロホルム溶液にDMSOに溶解したOVA-Iを50:1(v/v)で混合し、この溶液を100等量の超純水に滴下した。得られた粒子を遠心で回収し、OVA-I 50 μg/粒子 20 mg/mlのOVA-I-hollow MPsを得た。次に、C57BL/6マウスにOVA-Iのみ、フロイント不完全アジュバント(IFA)混合OVA-I(OVA-I + IFA)、OVA-I-hollow MPsを皮下に1週間間隔で2回免疫した(OVA-I 5 μg/MPs 2 mg/shot)。最終免疫から1週間後に脾臓を回収し、脾細胞中のペプチド特異的なIFN-γ産生細胞(細胞性免疫)をELISPOTにより解析した。

4. 研究成果

(1) 疎水化γ-PGAからなるナノ・マイクロ構造体の調製

分子量の異なるγ-PGA(分子量50, 200, 500万)に疎水性アミノ酸であるPheを縮合剤(カルボジイミド)を用いて導入し、Phe導入率が40~80%の疎水化γ-PGAを合成した。得られた疎水化γ-PGAを有機溶媒(DMSO、クロロホルム等)に溶解し、この溶液を水に置換することで構造体を調製した。その結果、Phe導入率、良溶媒の種類、ポリマー濃度、貧溶媒への置換速度によって、ナノ粒子、マイクロ粒子、中空粒子、多孔質粒子、ファイバー等の構造体が形成可能であることが明らかとなった(図2)。

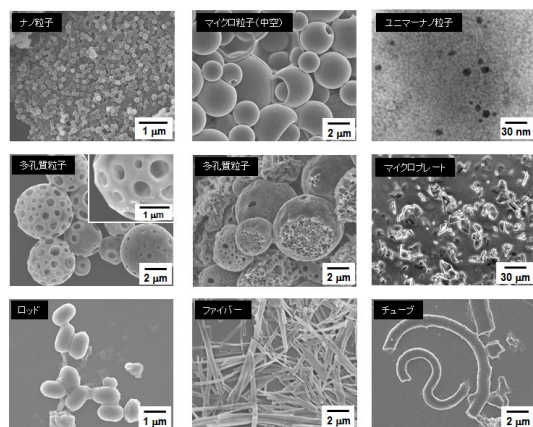


図2. 疎水化γ-PGAからなるナノ・マイクロ構造体の電子顕微鏡写真

(2) 疎水化γ-PGAナノ・マイクロ構造体の機能評価

疎水化 -PGA ナノ - マイクロ構造体のペプチドキャリアとしての機能を評価した。O/W エマルション法を用いた調製した疎水化 -PGA からなる中空粒子、多孔質粒子は粒子内部にペプチドを効率良く担持することができた(図 3)。次にモデルペプチドとして卵白アルブミン(OVA)のエピトープペプチドを担持した中空マイクロ粒子を調製し、マウス免疫実験により中空マイクロ粒子のワクチンアジュバントとしての機能を評価した。その結果、ペプチドのみを免疫した群においては、ほとんど細胞性免疫の誘導が認められなかったのに対して、中空マイクロ粒子を用いた免疫群で高い免疫誘導効果が確認された。この免疫応答は、ペプチドワクチンの臨床研究によく用いられている IFA より高い値を示した(図 3)。疎水化 -PGA からなる中空マイクロ粒子は、内包ペプチドを抗原提示細胞に効率よくデリバリーすることで、優れた免疫誘導効果を示したと考えられる。ナノ - マイクロ構造体の形状制御可能な疎水化 -PGA は、ワクチンアジュバントの素材として有望なツールになると期待される。

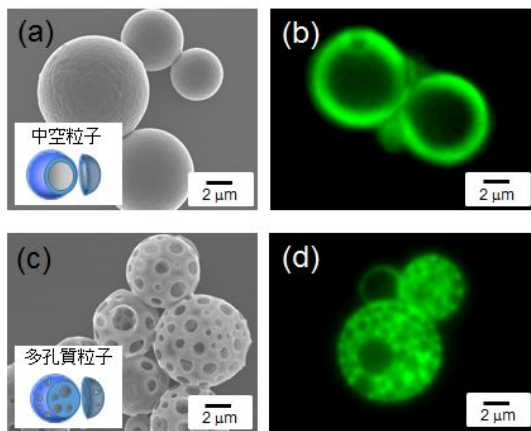


図 3. 疎水化 -PGA からなる中空マイクロ粒子(a, b)、多孔質粒子(c, d)。(a, c)走査型電子顕微鏡像、(b, d)共焦点蛍光顕微鏡像。

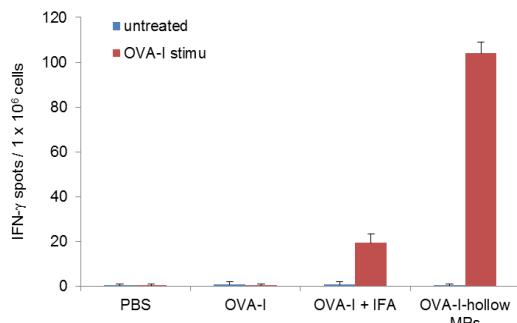


図 4. ペプチド内包中空粒子 (OVA-I-hollow MPs) の免疫誘導効果。OVA-I-hollow MPs を免疫後、OVA-I 特異的な細胞性免疫を検出した結果、IFA よりも高いワクチン効果が認められた。

これまでの疎水化 -PGA ナノ粒子の研究を基盤に、本研究では新たなナノ - マイクロ構造体の調製方法を確立し、アジュバントとしての機能を評価した。材料の形状とアジュバント機能との関連性を精査し、ワクチンアジュバントの新たな分子設計指針を提案するとともに、実際の応用展開も視野に入れた研究開発を展開した。近年、免疫学および細胞分子生物学の発展により、これまで経験則で用いられてきたワクチンアジュバントの作用機序、分子メカニズムが明らかになってきている。そのため、生物学的なアプローチからのアジュバント開発に加え、工学的観点からの高安全性、高活性なナノ粒子アジュバントの開発は、次世代ワクチンの有望な材料になると確信している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Heyun Shen, Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Nanofiber Formation by the Self-assembly of an Ampholyte Poly(amino acid), 査読有, 45, 220-222 (2016). DOI: <http://dx.doi.org/10.1246/cl.151011>

〔学会発表〕(計 2 件)

Mitsuru Akashi, Takami Akagi, Simona Mura, Patrick Couvreur, Development of Vascularized 3D Tissue Models using Layer-by-Layer Technique and Application for DDS Research, 12th France-Japan DDS Symposium, 2016 年 10 月 9 日, Paris, France

赤木隆美, 馬場昌範, 明石 満, 疎水化ポリ(γ-グルタミン酸)ナノ粒子を用いたワクチン開発・DDS 研究, 第 24 回ポリマー材料フォーラム, 2015 年 11 月 26 日, タワーホール船堀 (東京都, 江戸川区)

〔図書〕(計 1 件)

Takami Akagi, Mitsuru Akashi, Springer, Methods in Pharmacology and Toxicology (Volume editor: Z. R. Lu and S. Sakuma), Nanomedicine and Infection (Chapter 22), Nanomaterials in Pharmacology, (2016), 485 (439-456).

〔その他〕

大阪大学大学院生命機能研究科 明石研究室ホームページ

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/akashii/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤木 隆美 (AKAGI, Takami)

大阪大学・大学院生命機能研究科・特任准

教授（常勤）

研究者番号：00527236