

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08254

研究課題名(和文)次世代ワクチンの基盤開発研究～新規デポ型抗原送達システムからのアプローチ

研究課題名(英文)Development of molecular bases of next generation vaccine: Approach from antigen depot delivery system

研究代表者

浅井 大輔 (Asai, Daisuke)

昭和薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10423485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：経験的に用いられてきたワクチンをより洗練された医療技術に仕立て上げようと、その構成3要素「抗原・アジュバント・送達システム」の分子レベルでの統合的解釈に高い関心が寄せられている。研究代表者等は、遺伝子レベルで合理的に設計可能なデポ(depot)機能をもつ人工エラスチンを見出し、この新規分子ツールを抗原デポとして応用し、皮下局所で抗原を継続的徐放させて抗原提示細胞を刺激し続けた状況下で起こる免疫応答を解析した。その結果、抗原の徐放が高力価の抗体産生、高い抗原結合性、そして抗体価の長期間持続として、ワクチン効果に反映されることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルス感染症に対するワクチン開発競争において、わが国は世界に遅れをとったとの一般認識が定着しつつある。ワクチン接種対象者が健常者であるために、接種後の副反応に過敏になり、ワクチン開発に係る政策は遅れをとってきた。地球規模での人口増加や途上国開拓が進むにつれ、新型コロナウイルス感染症のような新興感染症は今後も発生する可能性が高い。新規材料を用いた基礎研究の展開により得られた当該研究事業の成果は、ワクチン開発に対して抗原送達システムからの貢献に資すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Vaccines typically contain an antigen, delivery system (vehicle) and adjuvant, all of which contribute to the induction of a potent immune response. Consequently, design of new vaccines is difficult, because the contributions and interactions of these components are not easy to identify. We selected recombinant elastin-like polypeptides with periodic cysteine residues (cELPs) as carriers and tetanus toxoid (Ttd) as an antigen. After subcutaneous injection of the mixture, cELP rapidly formed a disulfide cross-linked hydrogel in situ, within which Ttd is physically incorporated, affording a biodegradable antigen depot. A single injection induced high levels of tetanus antibody with high avidity for at least 20 weeks in mice. The ability of this system to separately identify the contribution of sustained antigen release to antibody induction should be helpful for rational design of next-generation vaccines.

研究分野：微生物学、生体材料学

キーワード：ワクチン 徐放 DDS 注射ゲル エラスチン 生体材料 生分解材料 アジュバント

1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス感染症に対するワクチン開発競争において、現在、わが国は世界に遅れをとっていると一般認識が定着しつつある。しかしながら、ワクチン技術は日本のお家芸とされ、世界をリードしてきた時代もあった。ワクチンの対象者が健常者であるが故に、接種後の副反応に過敏になり、その後のワクチン開発政策に遅れをとってきた事実は否めない。当該研究の申請当初に遡ると、微生物学・免疫学研究の進展に相まって、これまで経験的に理解され用いられてきたワクチンにより惹起される生体応答メカニズムに関する分子レベルでの議論が可能となりつつあった。すなわち、ワクチン開発研究は疾患制御に向けて新たなイノベーションの時代を迎えていた。臨床使用されているワクチンは、病原体そのものを原料として加工した材料であるが、次世代ワクチンを分子設計するにあたり、ワクチンは「抗原・アジュバント・送達システム」の3つの要素で構成される科学的・合理的な医療技術として捉え直され、現在ではそのコンセンサスを得るに至っている(図1)。各々の“抗原”が細胞内シグナル伝達を如何に活性化して生体応答が起こるかを解明する免疫学研究は驚くべき速さで発展を続けており、特に抗原特異的な獲得免疫応答に加え、病原体侵入直後のより早期に作動する自然免疫を活性化する受容体アゴニストである“アジュバント”分子との組み合わせにより、液性免疫の誘導のみならず、従来のワクチン療法では不可能であった細胞性免疫の活性化も可能となってきている。一方、接種回数を考慮して経皮・経鼻・経口等の投与ルートが選択され、適切な抗原提示細胞に、必要な量の抗原とアジュバント分子を、必要な時間だけ作用させるべく、様々な分子形態の“送達システム”が個々のワクチンに対して提案されている。すなわち、ワクチンの3つの構成要素から作用機序が明確でかつ対象疾患に適した分子素子を選択し、これを再構成して次世代ワクチンを創製しようと、世界的に激しい開発競争が繰り広げられている。

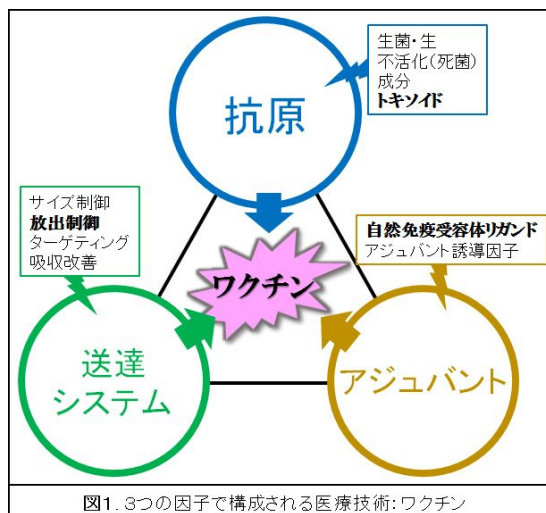


図1. 3つの因子で構成される医療技術: ワクチン

申請者は、これまでに注射後瞬時に投与部位に薬物デポを留置できる生体吸収性人工エラスチンを見出し、これの応用先として、デポの生分解に依存してワクチン抗原の徐放が可能なる“送達システム”を考案し、抗原を徐放することにより得られるワクチン効果の検証を行ってきた。研究開始当初の予備的な試験結果では、破傷風トキソイド抗原と組み合わせるデポ型ワクチンを構成してマウスに接種すると、抗原単独の投与と比較して、(1)その免疫原性は100倍程度高くなり、(2)単回投与にもかかわらず有効抗体価の維持に半年以上の長期延長が認められ、抗原を放出制御する“送達システム”の、長期持続かつ強い免疫応答への寄与が想定された(図2)。

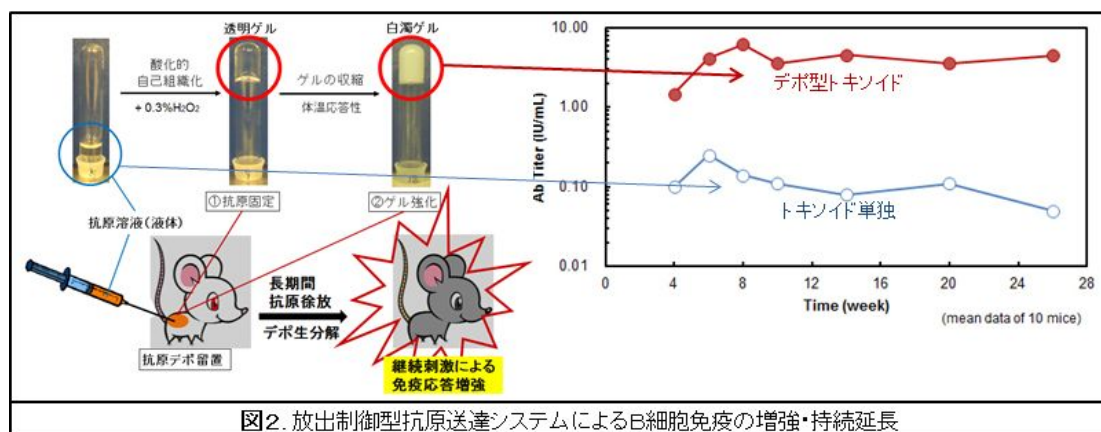


図2. 放出制御型抗原送達システムによるB細胞免疫の増強・持続延長

2. 研究の目的

本研究では、ワクチン効果を明確に判定できる試験系が確立している破傷風の評価系を用い、抗原をデポ化する“送達システム”に焦点を当て、ワクチンを構成する3要素「抗原・アジュバント・送達システム」の関連性を分子レベルでより詳細に解析することを目的とした。具体的には、ヒトのワクチン抗原である破傷風トキソイド抗原について、注射型バルクゲルを用いた徐放化送達システム、アジュバントとしては自然免疫リガンド、これらの各要素の関係性を検証する(図1)。破傷風菌に対するヒトの生体防御機構には、T細胞免疫の寄与はほとんどなく、抗体

によるB細胞免疫が主体であることが知られている。したがって、徐放化抗原による持続的な免疫系刺激によって誘導される抗体についての詳細な解析が、破傷風抗原の徐放がワクチン効果にどの程度の寄与があるのかという検証に直結する。破傷風トキソイド抗原を、デポ担体を用いてマウスに投与した時に誘導される抗体に焦点を当て、(1)抗体価、(2)防御抗体価持続期間、(3)抗体の avidity、(4) IgG 抗体のサブクラス解析の4つについて調べた。これらの解析により得られた結果を統合的に解釈し、抗原の送達コントロールが及ぼすワクチン効果について、科学的エビデンスの提供に繋がる基礎研究を実施することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子工学的手法によるデポ担体の設計・調製

当該研究で使用するデポ担体は、遺伝子レベルで合理的に分子設計できるエラスチタンパク質由来の人工リコンビナントポリペプチド： $(\text{Val-Pro-Gly-Xaa-Gly})_n$ である（以下、人工エラスチンと表記する）。鎖長 n 、Xaa 疎水性度、ゲル架橋点数（Xaa = Cys）を系統的に改変し、種々のデポ担体を調製した。

(2) デポ担体の物性解析

人工エラスチンは可逆的な温度応答性の高分子であり、加熱すると相転移してコアセルベートを形成する。申請者等は、Xaa に規則的に配置した Cys チオール基を架橋点とした化学ゲルにおいても、一般的な人工エラスチン同様に可逆的な温度応答性を示し、加熱・冷却により可逆的にゲルが収縮・膨張することを報告してきた（文献）。ここでは、3(1)で調製した人工エラスチンについて、相転移温度やゲル形成状態における温度応答性について解析した。加えて、最小ゲル形成濃度や動的粘弾性、ゲルの自然崩壊速度、およびエラストーゼおよびコラゲナーゼによる酵素消化耐性についての評価を実施した。

(3) デポ担体からの破傷風トキソイド放出解析

人工エラスチンに破傷風トキソイドを混合して、試験管内でゲル化した後、ゲル上部にリン酸緩衝液を加え、ゲルから放出される破傷風トキソイドを in house 競合 ELISA 法により定量し、デポ担体から破傷風トキソイド抗原の単純拡散プロファイルを解析した。

(4) 破傷風トキソイド免疫後に産生される特異的抗体の量的・質的評価

破傷風トキソイドタンパク質を人工エラスチンと混合してマウス（Slc: ddY, SPF, 4 週齢）に皮下投与して破傷風特異的抗体価の推移をモニターした。「防御抗体価獲得への到達時間・抗体価の高低・防御抗体価の維持期間」の3つのパラメータを解析して免疫応答増強効果を評価し、また、人工エラスチンの分子組成との相関を解析した。また、破傷風トキソイド抗原に加え、各種自然免疫リガンドを混合したデポ抗原を免疫した場合との比較検証を行った。

(5) デポ単体の生分解性および生体適合性の評価

人工エラスチンをマウスの皮下および腹腔内に投与して生体内にデポを留置し、肉眼所見としてデポ周辺組織に炎症反応が認められるか、および免疫細胞の遊走がどの程度認められるのかを免疫組織学的に解析した。また、留置した抗原デポがどのくらい長く生体内に残存するのか、デポの担体成分である人工エラスチン、およびデポの抗原成分である破傷風トキソイドのそれぞれに着目して解析を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子工学的手法によるデポ担体の設計・調製

人工エラスチンはペプチドユニットの繰り返し配列 $(\text{Val-Pro-Gly-Xaa-Gly})_n$ により構成され、温度に応じた可逆的な体積相転移活性をもつユニークな高分子材料である。その相転移温度は、ゲスト残基 Xaa の疎水性度、人工エラスチンの濃度、ペプチドの繰り返し数 n の3つのパラメータにより経験的に自由に設定可能である。化学ゲルの架橋点としては Xaa に導入した Cys 残基のチオール基を用い、分子間ジスルフィド結合が化学ゲル形成の駆動力となる。これらパラメータの組み合わせの異なる計 25 種類の人工エラスチンを遺伝子工学的に設計し、大腸菌発現系によりリコンビナントポリペプチドとして調製した。調製した人工エラスチンに関して、最小ゲル形成濃度および動的粘弾性を指標にして、系統的な架橋点配置によるトポロジー解析を実施し、化学ゲル設計に必要な架橋点配置の情報を得た。

(2) デポ担体の物性解析

調製した人工エラスチンについて温度応答性を調べたところ、調製した全てのポリペプチドは、体温未満・体温付近・体温より高い温度域における固有の温度において、それぞれ可逆的な体積相転移活性をもち、化学ゲル体においても、加熱・冷却による可逆的なゲル収縮・膨張機能を有していた。全 25 種の人工エラスチンについて最小ゲル形成濃度を測定し、そのうち一部については、Discovery HR-2 レオメーターを用いて動的粘弾性を測定した。その結果、動的粘弾性に最も影響を及ぼすパラメータは、人工エラスチン濃度およびペプチドの繰り返し数 n であることが判明し、ゲルの分子設計の観点からは鎖長コントロールが最重要であることが示

唆された。人工エラスチンがもつ分子“間”ジスルフィド結合により化学ゲルが形成されているが、この分子間架橋が時間依存的に分子“内”ジスルフィド結合に置き換わり、化学ゲルが自然崩壊することを報告してきた（文献 ）。試験管内で、調製した人工エラスチンをゲル化させ、その自然崩壊速度を調べたところ、Xaa に疎水性アミノ酸を導入した高疎水性の人工エラスチンが最も長くゲル状態を維持し、完全に溶液に戻るのに3ヶ月以上の長い時間を要するゲルもあった（文献 として成果発表）。すなわち、試験管内のゲルの安定性に最も寄与が大きいパラメータは、ゲスト残基 Xaa の疎水性度であることが明らかとなった。皮下に留置される抗原デポは、生体内酵素であるエラスターゼやコラゲナーゼにより生分解を受けることが想定される。そこで、試験管内でゲルを形成させ、そこにこれらの酵素を添加して、酵素消化によるゲル崩壊速度を調べた。その結果、ゲルの自然崩壊速度で得られた傾向と一致した結果、すなわち、高疎水性ゲルほど酵素消化耐性を示す傾向にあった。これらの結果から、ゲル崩壊の駆動力が、分子間分子内ジスルフィド結合変換であれ、酵素消化であれ、人工エラスチンゲルの安定性に最も寄与するパラメータはゲスト残基 Xaa の疎水性度であると結論付けられた。

(3) デポ担体からの破傷風トキソイド放出解析

当該人工エラスチンは注射投与型デポ剤であり、投与前はシリンジ内で液体、投与後に皮下でゲル化する基剤である。基剤濃度に対して、破傷風トキソイドは1/100以下のタンパク濃度であり、破傷風トキソイドを含有させることによる最小ゲル形成濃度に影響は無かった。試験管内で人工エラスチンによる破傷風トキソイドデポを調製し、デポ剤の上部にリン酸緩衝液を添加し、デポから自由拡散により放出される破傷風トキソイドを in house 競合 ELISA 法により定量した。その結果、破傷風トキソイドのリリースが最も早かったのは、短鎖-親水性の組み合わせの人工エラスチンによるデポであり、親水性ゲルであっても長鎖のゲルからのリリースは遅く、さらには、長鎖-疎水性の人工エラスチンデポが最もリリースが遅かった（文献 として成果発表）。

(4) 破傷風トキソイド免疫後に産生される特異的抗体の量的・質的評価

当該研究事業で調製した人工エラスチンのうち、長鎖 (n = 320)・短鎖 (n = 160)・疎水性 (相転移温度 < 24)・親水性 (相転移温度 > 37) のバリエーションを数種類選り、マウスに免疫して産生される破傷風抗体についての特性解析を実施した。その結果、破傷風単独免疫の場合と比較して、有意に高い抗体価が得られ、単回の接種で半年以上もの防御抗体価を維持した。高力価抗体を長期間維持できた人工エラスチンは、長鎖-親水性の組み合わせの人工エラスチンによるデポであった。産生された抗体の avidity を調べたところ、破傷風抗原単独免疫の場合と比べてデポ型抗原免疫群では有意に高い avidity を示した。一方、IgG2a/IgG1 比に有意な差は認められなかった。また、自然免疫リガンドの添加は、防御抗体価の獲得にかかる時間の短縮効果として現れた。

(5) デポ単体の生分解性および生体適合性の評価

抗原デポ製剤投与後、経時的にマウスを解剖して投与部位に残存する抗原デポの量、デポ内に含まれる抗原量を調べた。腹腔内投与では、投与1ヶ月後にはデポはほとんど認められなかったのに対し、皮下に留置したデポは投与後半年でも残存が確認された。特に、長鎖-疎水性の組み合わせの人工エラスチンの残存量および残存率が高かった。一方、投与半年後に残存するデポ内の破傷風抗原量は検出限界未満であった。興味深いことに、皮下に半年間留置した人工エラスチンゲルは、加熱・冷却による可逆的なゲル収縮・膨張機能を失っていた。これは、分子間分子内ジスルフィド交換反応の際に、皮下タンパク質が有するチオール基とも反応し、人工エラスチンだけではなく、複数のタンパク質複合体を形成したことにより、人工エラスチン固有の温度応答活性が消失したものと考えられる。

当該研究事業では、ワクチンを構成する3要素のうち、破傷風抗原に関して、送達システムとしての徐放化システム、アジュバントとしての自然免疫リガンドを取り上げ、デポ型破傷風ワクチンとして、抗体産生への影響、産生された抗体の特性の解析を行った。その結果、抗原の徐放は、高力価の抗体産生、高い抗原結合性、そして抗体価の長期間持続として、ワクチン効果に反映されることが明らかとなった（図3）。

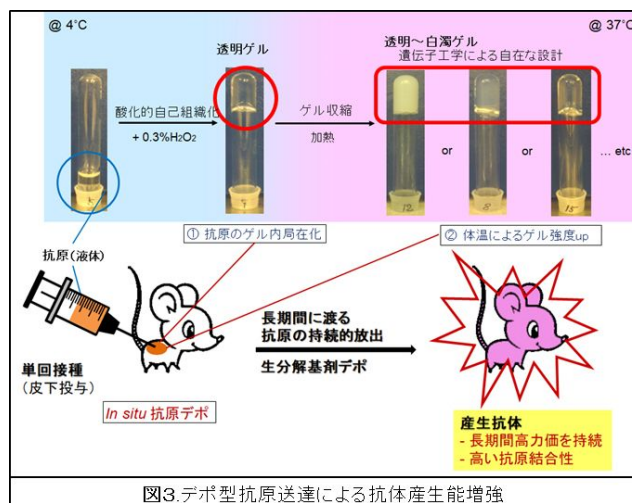


図3. デポ型抗原送達による抗体産生能増強

<引用文献>

- Asai, D., et al, *Biomaterials*, 33, 5451-5458 (2012)
Asai, D., et al, *Acta Biomater.*, 64, 116-125 (2017)
Asai, D., et al, *Macromol Biosci.*, 19, 1900167 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Asai, D, Murata, M, Toita, R, Kawano, T, Nakashima, H, Kang, J.H	4. 巻 51
2. 論文標題 A high-affinity peptide substrate for G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 973-976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-019-02735-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toita, R, Asai, D, Otani, K, Kawano, T, Murata, M, Kang, J.H	4. 巻 54
2. 論文標題 Suppression of lysophosphatidylcholine-induced human aortic smooth muscle cell calcification by protein kinase A inhibition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 465-470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lipd.12178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asai, D, Fukuda, T, Morokuma, K, Funamoto, D, Yamaguchi, Y, Mori, T, Katayama, Y, Shibayama, K, Nakashima, H	4. 巻 19
2. 論文標題 Injectable polypeptide hydrogel depot system for assessment of the immune-response-inducing efficacy of sustained antigen release alone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Macromol. Biosci.	6. 最初と最後の頁 e1900167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.201900167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mingxue, B, Chaolumen, B, Asai, D, Miyazaki, K, Yoshida, T	4. 巻 76
2. 論文標題 Synthesis and anti-HIV activity of sulfated oligosaccharide-branched -CD	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Fiber Sci. Technol.	6. 最初と最後の頁 63-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2115/fiberst.2020-0006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Asai, D, Kawano, T, Murata, M, Nakashima, H, Toita, R, Kang, J.H	4. 巻 63
2. 論文標題 Effect of fetal bovine serum concentration on lysophosphatidylcholine-mediated proliferation and apoptosis of human aortic smooth muscle cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Oleo Sci.	6. 最初と最後の頁 255-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess19268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki, K., Miyashita, Y., Asai, D.(Co-first author), Funamoto, D., Sato, K., Yamaguchi, Y., Mishima, Y., Iino, T., Takaishi, S., Nagano, J., Kishimura, A., Mori, T., and Katayama, Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 A peptide inhibitor of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against EGFR/folate receptor- double positive cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Med. Chem. Commun.	6. 最初と最後の頁 783-788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8md00010g	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asai, D. and Nakashima, H.	4. 巻 5
2. 論文標題 Pathogenic viruses commonly present in the oral cavity and relevant antiviral compounds derived from natural products.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicines(Basel)	6. 最初と最後の頁 pii: E120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicines5040120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Asai, D., Kanamoto, T., Takenaga, M., and Nakashima, H.	4. 巻 64
2. 論文標題 In situ depot formation of anti-HIV fusion-inhibitor peptide in recombinant protein polymer hydrogel	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Biomater.	6. 最初と最後の頁 116-125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2017.10.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asai, D., Nakashima, H., and Kang, J.-H.	4. 巻 Editors' Picks (in July 2017)
2. 論文標題 Role of amino acid residues surrounding the phosphorylation site in peptide substrates of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomed. Adv.	6. 最初と最後の頁 22-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 浅井大輔、福田靖、諸熊一則、船本大起、山口優子、森健、片山佳樹、柴山恵吾、中島秀喜
2. 発表標題 抗体産生および抗体特性に及ぼす抗原徐放単独寄与の解明
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 龍神亮昌、宮原涼、浅井大輔、岸村顕広、森健、片山佳樹
2. 発表標題 近接双性イオンポリマーの低抗原性の評価
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井大輔、福田靖、諸熊一則、船本大起、山口優子、森健、片山佳樹、柴山恵吾、中島秀喜
2. 発表標題 次世代ワクチンの基盤開発研究：インジェクタブルゲル抗原製剤を用いたアプローチ
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井大輔, 金本大成, 寺久保繁美, Ashutosh Chilkoti, 武永美津子, 中島秀喜
2. 発表標題 注射型抗HIVペプチドデボ製剤の開発
3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mori, T., Sasaki, K., Miyashita, Y., Asai, D., Harada, M., Kishimura, A. and Katayama, Y.
2. 発表標題 Protection from off-target ADCC by using peptide inhibitors
3. 学会等名 The 2nd international symposium on biofunctional chemistry (ISBC2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 浅井大輔, 中島秀喜	4. 発行年 2017年
2. 出版社 (株)技術情報協会	5. 総ページ数 587
3. 書名 ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術, 第7章 ペプチド医薬品の製剤化技術 第2節 抗HIVペプチドのデボ製剤化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	柴山 恵吾 (Shibayama Keigo)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	諸熊 一則 (Morokuma Kazunori)		
連携研究者	片山 佳樹 (Katayama Yoshiki) (70284528)	九州大学・工学研究院・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関