

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16097

研究課題名（和文）膜透過ペプチド修飾高分子による抗原と免疫刺激物質の共導入に基づく経鼻ワクチン創製

研究課題名（英文）Construction of nasal vaccination system based on co-delivery of antigens and immunostimulants by the polymers bearing cell-penetrating peptides.

研究代表者

鶴川 真実（Ukawa, Masami）

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：50735511

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、Toll-like Receptor (TLR) リガンドとオリゴアルギニン固定化高分子を併用することによってより効果の高い粘膜投与型ワクチンを作製することを目的とした。一方、TLRリガンドの併用による相乗的な機能向上は確認されず、原因検討を行った結果、TLRリガンドの共存がオリゴアルギニン固定化高分子による樹状細胞への抗原送達を妨げてしまうことが本研究のコンセプトの実現を困難にしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

経粘膜投与可能な薬剤は点鼻などによって投与が可能であり、患者の負担を減らすことができる。一方、注射型のものよりも活性が低いため、生ワクチン製剤を除き、臨床応用に至っていない。本研究では生ワクチンのような生きたウイルスを使用する必要がなく、人工的なポリマーを用いているため、効果が高い経粘膜ワクチンが作製できれば、安全性の面で優位性のあるワクチンとなると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Our research aimed to develop the mucosal vaccine which has superior therapeutic effect via the collaboration of ligands to Toll-like receptor (TLR) as immune stimulant and oligoarginine-linked polymer designed in our laboratory. The synergic improvement of adjuvancy was not observed by the collaboration of oligoarginine-linked polymer and TLR ligands. It was suggested to be the bottleneck for the concept that the addition of TLR ligands would inhibit the delivery of antigen into dendritic cells by oligoarginine-linked polymers.

研究分野：製剤学

キーワード：粘膜ワクチン

#### 1. 研究開始当初の背景

一般にアジュバントとして用いられる物質は、抗原の投与部位における保持やその部位における炎症の惹起、免疫細胞の刺激などを目的としている。皮下や筋肉内注射と異なり、投与部位の腫脹などは経鼻投与では深刻な問題となりえるため、経鼻投与では投与部位での抗原の保持のために炎症を伴うアジュバントはあまり用いられず、 $\beta$ シクロデキストリンやキトサンなど、比較的刺激性が少ないものが用いられることが多い。一方、粘膜内の免疫細胞を刺激することを目的に、先に述べた免疫刺激性物質等が用いられている。この代表的なものが Toll-like Receptor アゴニストであり、粘膜ワクチンとしては研究段階であるものの、子宮頸がんワクチンの筋肉内注射用のアジュバントとして臨床応用されている。

一方、申請者が所属する研究室が採用してきた戦略である抗原の膜透過促進は、抗原の保持と免疫刺激のどちらにも当てはまらない第三の戦略といえる。しかも、オリゴアルギニン固定化高分子の膜透過促進機構は、特定の分子のみを膜透過促進させるものではないため、抗原と免疫刺激性物質の混合物をオリゴアルギニン固定化高分子と共に投与した場合、抗原と免疫刺激性物質の両方が膜透過促進の恩恵にあずかることができ、非常に相性がよい一方、申請者が所属する研究室が採用してきた戦略である抗原の膜透過促進は、抗原の保持と免疫刺激のどちらにも当てはまらない第三の戦略といえる。しかも、オリゴアルギニン固定化高分子の膜透過促進機構は、特定の分子のみを膜透過促進させるものではないため、抗原と免疫刺激性物質の混合物をオリゴアルギニン固定化高分子と共に投与した場合、抗原と免疫刺激性物質の両方が膜透過促進の恩恵にあずかることができ、非常に相性がよいと考え、この戦略を採用した。

#### 2. 研究の目的

本研究では、アジュバントとしてよく用いられている免疫刺激性物質である Toll-like Receptor (TLR) リガンドと、本研究室で開発されたオリゴアルギニン固定化高分子の併用により、より高機能なワクチンの開発を目的としている。

#### 3. 研究の方法

本研究では、オリゴアルギニン固定化高分子の一種である VP-R8 を用いた。TLR リガンドは、Resiquimod (TLR7,8), CpG-ODN (TLR9), Imiquimod (TLR7), Zymosan A (TLR2), Poly I:C (TLR3)を用いた。カッコ内はそれぞれのリガンドが対応する TLR の種類

実験 1) オリゴアルギニン固定化高分子を用いたワクチン投与と同様に、Balb/c マウスに 4 週間おきに 2 回鼻粘膜投与を行い、最終投与から 2 週間後に採血および鼻粘膜洗浄液の回収を行った。投与液は、オリゴアルギニン固定化高分子とインフルエンザ HA ワクチン (市販のインフルエンザワクチン)を混合し、これに TLR リガンドを加えたものを用いた。

実験 2) 抗原としてインフルエンザ HA ワクチンの代わりに、FITC で蛍光修飾された卵白アルブミン(OVA)である FITC-OVA を用いた。FITC-OVA と VP-R8 を培地中で混合し、任意の量の Zymosan A を加えたものをマウス樹状細胞株である DC2.4 細胞の培地に加え、FITC-OVA の細胞内取り込み量をフローサイトメトリーを用いて評価した。

#### 4. 研究成果

インフルエンザ HA ワクチンと VP-R8 を混合したもの (VAC+VP-R8)に対して、血清中抗 HA-IgG (図 1)、鼻粘膜洗浄液中抗 HA-IgA (図 2)ともに TLR リガンド添加群において有意差はなかった。よって、単純に混合するのみでは相乗効果がみられないことが明らかとなった。物理化学的な相互作用による失活の可能性を想定し、表面プラズモン共鳴法を用いた相互作用測定や、HA 抗原よりも嵩高く絡まりにくい全粒子不活化ウイルスの利用などの対応を行ったが、成分を失活させるような成分間の強い相互作用はみられず、不活化ウイルスによる効果もみられなかった (Data not shown)。

TLR リガンドによる相乗効果がみられない原因を確かめるため、樹状細胞株に VP-R8 と FITC-OVA (モデル抗原)、TLR リガンドの代表として Zymosan A を加え、FITC-OVA の取り込み量を確認した。その結果、Zymosan A の濃度が高くなるほど、著しく樹状細胞株による抗原の取り込みが減少した(図 3)。この結果より、VP-R8 の機能である抗原の取り込み向上を TLR リガンドによる抗原取り込みの減少が打ち消してしまうため、相乗効果がみられない可能性が示唆された。樹状細胞は抗原を取り込むと成熟し、抗原提示能が高まる一方で抗原取り込み能は下がるため、TLR リガンドの添加によって成熟が早まり、結果的に抗原取り込み量が少なくなったために相乗効果が得られなかった可能性が考えられる。

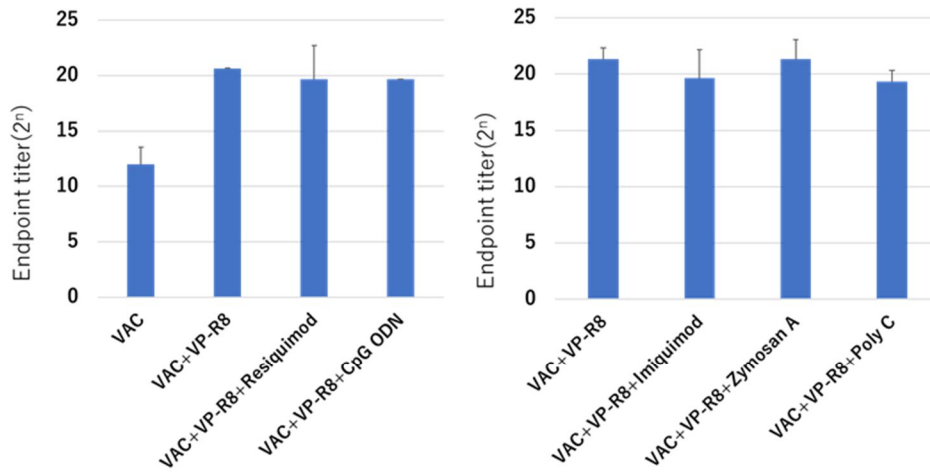


図1: TLRリガンドとオリゴアルギニン固定化高分子を併用した際の血清中IgG力価

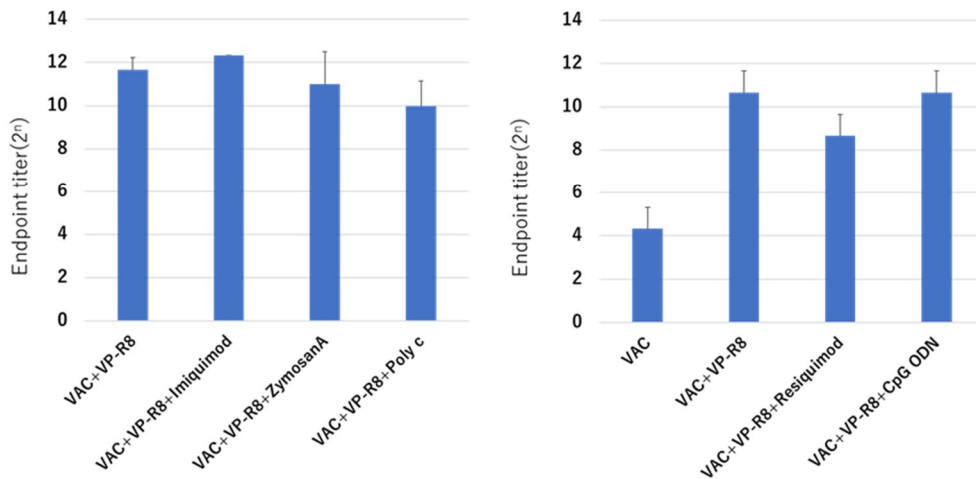


図2: TLRリガンドとオリゴアルギニン固定化高分子を併用した際の鼻粘膜上IgA力価

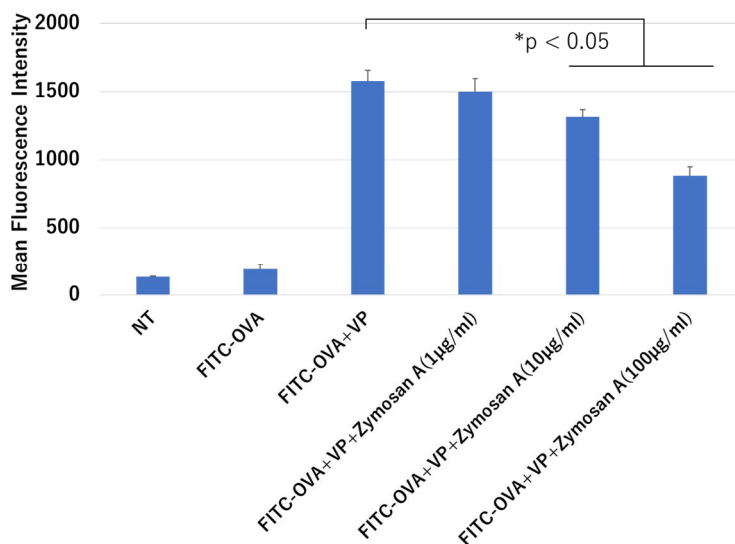


図3: Zymosan A添加時のVP-R8によるFITC-OVA取り込み促進効果の変化

以上、オリゴアルギニン固定化高分子と併用することにより、ワクチンアジュバントとしての効果が向上する TLR リガンドを見出すことはできなかった。また、併用による相乗効果が得られなかった原因は、オリゴアルギニン固定化高分子の機能が抗原の取り込み向上であるのに対し、TLR リガンドを加えたことで樹状細胞の抗原取り込みの抑制が起こり、高分子の機能を妨げてしまったためであると考えられる。本研究より、今後、VP-R8 を用いた製剤の改良においては、標的疾患の変更や抜本的な戦略転換が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------