

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2012
 課題番号：21390046
 研究課題名（和文） サイトカインアジュバントの DDS と経鼻粘膜ワクチンのリスクマネジメント
 研究課題名（英文） The creation and safety assessment of cytokine adjuvant and nano-carrier for mucosal vaccine
 研究代表者
 堤 康央（TSUTSUMI YASUO）
 大阪大学大学院・薬学研究科・教授
 研究者番号：50263306

研究成果の概要（和文）：本研究では、有効かつ安全な粘膜ワクチンシステムの開発を目的に、サイトカインアジュバントの最適化および、ナノキャリアによる抗原送達システムの構築を図った。その結果、粘膜ワクチンに最適なサイトカインアジュバントを探索し得る方法・基盤技術を確立すると共に、優れた粘膜ワクチン効果を発揮可能であること、ナノキャリアとの併用により、さらに効果が期待できることを先駆けて見出した。

研究成果の概要（英文）：The development of safe and effective mucosal adjuvants and antigen delivery carrier is a crucial problem for improving the efficacy of mucosal vaccine. In this study, we created novel cytokine adjuvant and antigen delivery carrier by nanomaterials for the development of mucosal vaccines against virus-infectious diseases such as AIDS and influenza.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：アジュバント、安全性、感染症、サイトカイン、ナノキャリア、粘膜ワクチン、リスク

1. 研究開始当初の背景

ワクチンは感染症に対する最も有効な手段であり、事実、これまでも多くの感染症の克服に寄与してきた。しかし、天然痘を根絶した 1970 年代以降、HIV やエボラウイルスを始めとする 30 種類以上の新たな新興ウイルスが出現し、人類の生命を脅かしている。

また、高病原性トリインフルエンザウイルス、新型インフルエンザウイルスのようにパンデミックを起こす再興ウイルスもが脅威となっているのは周知の通りである。このように、新興・再興ウイルス感染症に対する対策は世界的課題であり、これらに有効なワクチンの開発に対する期待は極めて大きい。中で

も近年、「粘膜ワクチン」は、初発感染部位となる粘膜面での防御網を構築できるワクチンであることから、注射による従来型ワクチンでは誘導できない「粘膜と全身の二段構えの感染防御」を達成できるうえ、非侵襲的で簡便性にも優れていることから、次世代のワクチンとして注目されている。しかし通常、鼻腔や腸管といった粘膜局所に抗原を単独で投与しても免疫誘導能に乏しく、ウイルス感染防御に十分な効果を期待することが出来ない。すなわち、粘膜ワクチンの実用化に向けた最大の課題は、安全かつ有効な粘膜ワクチン用アジュバント（粘膜アジュバント）と、経粘膜的に抗原を免疫担当細胞に送達可能な抗原送達キャリアの開発にある。

2. 研究の目的

本研究課題では、安全かつ安心に、しかも効率よく抗原特異的な体液性・細胞性免疫を誘導できる新規鼻粘膜ワクチンの開発を目的に、既に医薬品として臨床応用されている『腫瘍壊死因子（TNF）とそのスーパーファミリー』を粘膜免疫用のアジュバントとして開発することを目指した。さらに、ナノマテリアルを用いることで、経粘膜的に抗原を送達可能な抗原送達キャリアの開発も試みた。特に本研究では、有効性のみならず、安全性が確保された鼻粘膜免疫用のサイトカインアジュバントや抗原送達キャリアを開発するため、独自の生物学的 DDS とナノ安全科学を融合し、我が国発の画期的鼻粘膜ワクチンを創出し、鳥インフルエンザパンデミック等の蔓延を阻止できる予防・医療戦略を構築しようとするものである。

3. 研究の方法および4. 研究成果

申請者はこれまでに、サイトカインの中でも特に免疫活性化能に優れた TNF スーパーファミリー（TNFsf）に焦点を絞り、粘膜アジュバント効果に優れたサイトカインの網羅的探索と、独自の機能性人工蛋白質創出システムとの融合戦略により創製したサイトカイン粘膜アジュバントの有用性・安全性を検証することで、ウイルス感染症予防に叶う粘膜ワクチンアジュバントとしての可能性を追求してきた。その結果、TNFsf の中でも、

TNF- α が粘膜アジュバント効果に優れることを見出したうえで、独自のフェージ表面提示法を駆使した機能性人工タンパク質創製技術により、活性が野生型 TNF- α よりも飛躍的に向上し、かつ体内安定性にも優れた機能性 TNF 変異体を創成してきた。さらに、機能性 TNF 変異体が野生型 TNF- α よりも優れた粘膜ワクチンアジュバントになり得ることを明らかとしてきた。一方で、TNF- α が 2 つの受容体（TNFR1、TNFR2）を介してシグナルを伝えることや、TNFR2 を介したシグナルが副作用に繋がる可能性が示唆されていることを鑑みると、最適なサイトカインアジュバントを創成するうえでは、レセプター特異的 TNF 変異体を作成し、アジュバント活性や安全性を精査する必要がある。そこで、これまでに独自に開発してきたフェージ表面提示法によるアミノ酸改変技術のさらなる効率化を図り、遺伝子シャッフリング法を取り入れた機能性人工蛋白質創出技術の開発を試みた。まず TNF- α をモデル蛋白質として、「遺伝子シャッフリング法」とフェージ表面提示法を初めて融合したシャッフリングライブラリを作製した。さらに作製したライブラリの中から、既存のフェージライブラリと比較してレセプター指向性および生物活性に優れた構造変異 TNF の作製を試みた。具体的には、TNF とレセプターとの結合維持に重要な 2 つの領域、領域 1（29、31、32、145~147 番目のアミノ酸）と領域 2（84~89 番目）をドメイン構造と捉え、これらドメイン構造をコードする遺伝子をシャッフリングすることで、計 12 箇所のアミノ酸が置換された構造変異 TNF シャッフリングライブラリの構築を試みた。次に、結合力評価の結果、最も選択性に優れていることが明らかとなった TNFR1 指向性変異体候補クローン R1-20 と TNFR2 指向性変異体候補クローン R2-15 の *in vitro* における生物活性を評価した。まず TNFR1 を介した活性を、HEp-2 細胞（細胞表面に TNFR1 を高発現している細胞）に対する細胞傷害性を指標に評価したところ、R1-20 の TNFR1 を介した生物活性は、野生型 TNF- α と比較して、2.2 倍優れていた。次に hTNFR2/mFas-preadipocyte の細胞傷害性を指標に TNFR2 を介した生物活性を評価した。その結果、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ という高

濃度の蛋白質を作用させた場合にも、R1-20 はほとんど傷害性を示さなかった。また同様にして、TNFR2 指向性変異体候補クローンの生物活性評価を行った。まず、TNFR1 を介する生物活性については、R2-15 はほとんど活性を示さず、その活性は 1000 分の 1 以下にまで低下していた。一方で、TNFR2 を介した生物活性を評価したところ R2-15 は野生型 TNF- α の 2.5 倍も生物活性が増強していた。以上の結果から、本研究で新たに考案した機能性人工蛋白質創出法を用いて得られた 7 個以上のアミノ酸を置換した構造変異 TNF は、既存のフェージ表面提示法で作製してきた 6 個のアミノ酸を置換した構造変異 TNF に比べ、レセプター選択性および活性に優れていることを明らかとした。現在、本変異体について、粘膜アジュバントとしての有用性を評価しているところである。

上記の通り、粘膜免疫アジュバントとしてのサイトカインアジュバントを複数創成しているものの、これら知見を最大限に活用し、例えば防御免疫や安全性をさらに高めていくためには、言わずもがなではあるが、「如何に抗原を効率良く、確実に、免疫担当細胞にまで運び込むか。」が肝心であり、これなくしては『理想的なワクチン創成基盤技術』の開発はあり得ない。即ち、経粘膜的に抗原を効率良く免疫担当細胞へ送達可能な粘膜ワクチン用の薬物送達キャリア (DDS キャリア) の設計が第一義的に最重要と言える。本観点で研究代表者らは、種々ナノマテリアルの体内・細胞内動態の解析とそのハザード解析による安全性評価研究の過程で粒子径 100nm 以下で、最適に表面加工されたナノシリカが、高効率で経粘膜吸収されることを見出している。そこで、粘膜ワクチンにおける最適な抗原送達キャリアの創成を目的に、ナノシリカの抗原送達キャリアとしての可能性を検討した。本検討では、粒子径 30、70nm の非晶質ナノシリカ (nSP30、nSP70) と共に、粒子径 300、1000 nm のサブミクロンサイズの非晶質シリカ (nSP300、mSP1000) を用いた。また、モデル抗原としてニワトリ卵白アルブミン (OVA) を用いた。各粒子径のシリカと OVA を混合し、マウスに 1 週間おきに 4 回経鼻投与した後、OVA 特異的抗体価を測定

した。その結果、nSP30、nSP70 投与群においてのみ、抗原単独投与群に比べて、投与局所である鼻腔粘膜および遠隔の粘膜面における OVA 特異的 IgA、血液中 OVA 特異的 IgG の有意な産生上昇が認められた。さらに、これら抗体産生は、現存する最強の粘膜ワクチンアジュバントであるコレラトキシン投与群とほぼ同等の強さであることも明らかとなった。また、nSP30 や nSP70 が、本投与量において、粘膜面・全身面で副作用を誘発しないことを確認している。以上の結果から、ナノシリカが優れた粘膜ワクチンキャリアになり得ることが示された。さらに、ナノシリカ、OVA、TNF- α を混合し、同様のプロトコルで経鼻免疫することで、より強力な免疫応答を粘膜面、全身面で誘導可能であることを明らかとしている。以上の結果から、研究代表者が考案してきたサイトカインアジュバントと、ナノシリカによる抗原送達を組み合わせることで、有効かつ安全な粘膜ワクチンを構築できるものと考えられた。今後は、TNFR 指向性変異体をも組み合わせることで、より有効性・安全性に優れた粘膜ワクチンシステムを創成可能であると期待される。本研究成果は、ウイルス感染症に対する新たな粘膜ワクチンの開発・実用化に大きく貢献すると共に、グローバルな視点で、新興・再興感染症の克服に寄与し、我々の健康環境確保に資するものと考えられる。

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 12 件)

1. Hirai T., Yoshikawa T., Nabeshi H., Yoshida T., Tochigi S., Uji M., Ichihashi K., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Itoh N., Tsutsumi Y. : Dermal absorption of amorphous nanosilica particles after topical exposure for three days., *Pharmazie.*, 67(8):742-3, 2012.
2. Yoshida T., Matsuyama K., Yoshikawa T., Nabeshi H., Nakazato Y., Tochigi S., Hirai T., Uji M., Ichihashi K., Akase

- T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Itoh N., Tsutsumi Y. : Amorphous nanosilica particles induce ROS generation in Langerhans cells., *Pharmazie.*, 67(8):740-1, 2012.
3. Hirai T., Yoshioka Y., Takahashi H., Ichihashi K., Yoshida T., Tochigi S., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Amorphous silica nanoparticles enhance cross-presentation in murine dendritic cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 427(3):553-6, 2012.
 4. Abe Y., Yoshikawa T., Inoue M., Nomura T., Furuya T., Yamashita T., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive panning., *Biomaterials.*, 32(23):5498-504, 2011.
 5. Hirai T., Yoshikawa T., Nabeshi H., Yoshida T., Tochigi S., Uji M., Ichihashi K., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Itoh N., Tsutsumi Y. : Size-dependent immune-modulating effect of amorphous nanosilica particles., *Pharmazie.*, 66: 727-728, 2011.
 6. Shibata H., Abe Y., Yoshioka Y., Nomura T., Sato M., Kayamuro H., Kawara T., Arita S., Furuya T., Nagano K., Yoshikawa T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Generation of mouse macrophages expressing membrane-bound TNF variants with selectivity for TNFR1- or TNFR2, *Cytokine.*, 50(1):75-83, 2010.
 7. Kayamuro H., Abe Y., Yoshioka Y., Katayama K., Yoshida T., Yamashita K., Yoshikawa T., Kawai Y., Mayumi T., Hiroi T., Itoh N., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Mutant TNF-alpha, mTNF-K90R, is a novel mucosal vaccine adjuvant candidate against HIV., *Pharmazie.*, 65(4):254-6, 2010.
 8. Mukai Y., Nakamura T., Yoshikawa M., Yoshioka Y., Tsunoda S., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex., *Science Signaling (Sci. Signal.)*, 3(148), ra83:1-10, 2010.
 9. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Arita S., Katayama K., Nomura T., Yoshikawa T., Kubota-Koketsu R., Ikuta K., Okamoto S., Mori Y., Kunisawa J., Kiyono H., Itoh N., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : The IL-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvant for the induction of protective immunity against influenza virus., *J. Virol.*, 84(24):12703-12712, 2010.
 10. Nomura T., Abe Y., Kamada H., Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Minowa K., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology., *Pharmazie.*, 65(2):93-96, 2010.
 11. Kayamuro H., Abe Y., Yoshioka Y., Katayama K., Yoshida T., Yamashita K., Yoshikawa T., Hiroi T., Itoh N., Kawai Y., Kamada H., Nagano K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The use of a mutant TNF-alpha as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses., *Biomaterials.*, 30(29):5869-5876, 2009.
 12. Nomura T., Abe Y., Kamada H., Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Taniai M.,

Ohta T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30;388(4):667-71, 2009.

[学会発表] (計 16 件)

1. 宇高麻子, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 森 宣瑛, 平井敏郎, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: プロテインコロナの制御による新規ナノワクチンの安全設計., 第 39 回日本毒性学会学術年会., 仙台 (宮城), 2012 年 7 月.
2. 宇高麻子, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 森 宣瑛, 山口真奈美, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 東阪和馬, 堤 康央: 鼻粘膜ワクチンの創成に向けたナノ最適デザインに向けて~非晶質ナノシリカのワクチンキャリアーとしての有効性評価~, 日本薬学会第 133 年会., 横浜 (神奈川), 2013 年 3 月.
3. 宇高麻子, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 森 宣瑛, 山口真奈美, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: プロテインコロナの制御による新規ナノワクチンの安全設計., 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 西宮 (兵庫), 2012 年 10 月.
4. 高橋秀樹, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 市橋宏一, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 非晶質ナノシリカ介在性クロスプレゼンテーション誘導機構の解明に向けて., 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 西宮 (兵庫), 2012 年 10 月.
5. 宇高麻子, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 森 宣瑛, 平井敏郎, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: プロテインコロナの制御による新規ナノワクチンの安全設計., 第 39 回日本毒性学会学術年会., 仙台 (宮城), 2012 年 7 月.
6. 高橋秀樹, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 市橋宏一, 吉田徳幸, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 抗原プロセッシングに着目した非晶質ナノシリカのハザード同定., 第 39 回日本毒性学会学術年会., 仙台 (宮城), 2012 年 7 月.
7. 宇高麻子, 吉川友章, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 森 宣瑛, 平井敏郎, 市橋宏一, 高橋秀樹, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経鼻免疫毒性に関する基礎情報の収集., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.
8. 有田修平, 萱室裕之, 阿部康弘, 鎌田春彦, 古屋 剛, 井上雅己, 長野一也, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 國澤 純, 清野 宏, 額額律子, 生田和良, 堤 康央, 角田慎一: インフルエンザ経鼻ワクチンアジュバントとしての IL-1 ファミリーの有用性評価., 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪 (大阪), 2010 年 10 月.
9. 平井敏郎, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 栃木彩恵子, 近藤小百合, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて: 非晶質ナノシリカが抗原特異的免疫誘導に与える影響., 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇 (沖縄), 2010 年 6 月.
10. 平井敏郎, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 栃木彩恵子, 近藤小百合, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 樹状細胞を標的としたナノシリカの経皮安全性評価., 日本薬学会 第 130 年会, 岡山 (岡山), 2010 年 3 月.
11. 有田修平, 萱室裕之, 阿部康弘, 鎌田春彦, 野村鉄也, 河原倫之, 古屋 剛, 井上雅己, 吉川友章, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 國澤 純, 清野 宏, 角田慎一, 堤 康央: インフルエンザ経鼻ワクチン

アジュバントとしての IL-1 ファミリーの機能評価., 日本薬学会 第 130 年会, 岡山 (岡山), 2010 年 3 月.

12. Arita S., Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Kamada H., Nomura T., Itoh N., Nagano K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Mast cells are essential for inducing mucosal immune responses by interleukin-18., 第 39 回 日本免疫学会学術集会, 大阪 (大阪), 2009 年 12 月.
13. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Arita S., Katayama K., Kamada H., Nomura T., Itoh N., Nagano K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Characterization of mucosal and systemic immune responses elicited by interleukin cytokines as mucosal vaccine adjuvant against influenza virus., 第 39 回 日本免疫学会学術集会, 大阪 (大阪), 2009 年 12 月.
14. 有田修平, 萱室裕之, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 鎌田春彦, 吉川友章, 伊藤徳夫, 長野一也, 角田慎一, 堤 康央 : インフルエンザ経鼻ワクチンのためのサイトカインアジュバントの開発., ファーマバイオフォーラム 2009, 名古屋 (愛知), 2009 年 11 月.
15. 鎌田春彦, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 野村鉄也, 萱室裕之, 向 洋平, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央 : ファージ表面提示法を駆使した活性増強型 TNF 変異体の創出とその特性., 第 82 回日本生化学会大会, 神戸 (兵庫), 2009 年 10 月
16. 阿部康弘, 萱室裕之, 吉岡靖雄, 形山和史, 野村鉄也, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央 : 生物学的 DDS による活性増強型 TNF 変異体の創出とその粘膜ワクチンアジュバントとしての有用性評価., 第 25 回 DDS 学会, 文京区 (東京), 2009 年 7 月.

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b009/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堤 康央 (TSUTSUMI YASUO)

大阪大学大学院・薬学研究科・教授

研究者番号 : 50263306

(2) 研究分担者

角田 慎一 (TSUNODA SHIN-ICHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・グループリーダー

研究者番号 : 90357533