

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06715

研究課題名(和文) 筋肉を場とする超音波応答性ナノバブルによる革新的RNAワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of innovative RNA vaccine system using ultrasound-responsive nanobubbles

研究代表者

多田 塁 (Tada, Rui)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70635888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新型コロナウイルスパンデミックで注目された核酸ワクチンの新たなモダリティとして、超音波応答性ナノバブル技術を基盤とした新規RNAワクチンシステムの開発を目指した。mRNAを用いた初期の実験では期待した抗体価の亢進が見られなかったため、プラスミドDNAを用いる方針に転換した。その結果、ナノバブルと超音波照射を併用してマウス筋組織へプラスミドDNAを導入したところ、抗原特異的抗体産生の顕著な亢進が確認された。今後は、ナノバブルの最適化やアジュバントの併用によるRNAワクチン開発を継続するとともに、DNAワクチン開発も並行して進める予定である。

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のパンデミックは、ワクチン開発の重要性を再認識させた。生命は勿論、社会秩序および経済を守るためには効果的かつ安全な核酸ワクチンシステムの更なる開発が必要不可欠と考えられる。本研究により見いだされた超音波応答性ナノバブルを用いた核酸ワクチンシステムは、新たなワクチンモダリティとなり得ると思われる。さらなる研究開発によって多くのワクチンモダリティの一翼を担うことで社会に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a novel RNA vaccine system based on ultrasound-responsive nanobubble technology as a new modality for nucleic acid vaccines, which has gained attention during the COVID-19 pandemic. Initial experiments using mRNA did not yield the expected increase in antibody titers, leading us to shift our approach toward plasmid DNA. When we introduced plasmid DNA into mouse muscle tissue using nanobubbles combined with ultrasound irradiation, we observed a significant enhancement in antigen-specific antibody production. Moving forward, we plan to continue developing RNA vaccines by optimizing nanobubbles and incorporating adjuvants while simultaneously advancing DNA vaccine development using our nanobubble technology.

研究分野：免疫学、薬剤学、微生物学

キーワード：核酸ワクチン 超音波 リポソーム RNAワクチン 感染症 デリバリーシステム 遺伝子導入 DNAワクチン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルスのパンデミックによって、感染症が生活スタイルを根底から変えてしまうことを改めて痛感した。ゆえに、ワクチンの迅速な提供がポストコロナ時代に必須となることは容易に想像できる。しかしながら、従来の生ワクチン、不活化ワクチンおよびサブユニットワクチンでは開発と製造が煩雑で長期間を要するため、ワクチンを迅速に社会へと供給することが難しい。この観点から、煩雑な製造過程が無く短時間で大規模生産が可能なことから、RNA ワクチンが次世代ワクチンとして注目されているが実用化には至っていなかった。この要因として、RNA が分解されやすい親水性の高分子であるため細胞(組織)内導入能に乏しく免疫原性が低いことが挙げられる。したがって、RNA ワクチン開発においては RNA を細胞(組織)内へ導入する方法論の開発が課題となる。

これまで申請者らは、ナノマテリアル技術を基盤としたサブユニットワクチンの研究開発をおこなってきた。この一方で申請者らは、リポソームに超音波造影ガスを封入した“超音波応答性ナノバブル(ナノバブル)”を開発し、超音波照射の併用により高効率かつ安全に細胞(組織)内へ核酸を導入できることを示してきた(図1)。本研究では、これら研究基盤の融合により、独自のナノバブル技術を基盤とした新規 RNA ワクチンシステムの開発を目指した。

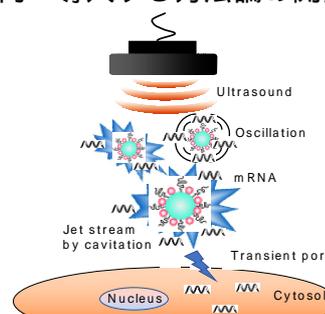


図1. ナノバブルによる遺伝子デリバリー

2. 研究の目的

申請者らは、ナノマテリアルを利用したサブユニットワクチンを開発し、これらを応用した種々の病原体に対し感染防御可能なワクチン開発してきた。この過程で、特に真菌やウイルスに対するサブユニットワクチン開発の際に必要な高純度かつ大量の抗原作製が困難で長期間を有する事例を経験してきた。これらのことから、抗原を用いる従来型ワクチンに換わる核酸ワクチンの開発を志向した。つまり、生体内を抗原生産の場とすることで、この問題を回避できると考えた。核酸ワクチン開発では核酸を分解から保護しながら、安全かつ効率的に細胞(組織)内へ送達し遺伝子導入を達成しなければならない。これまでに、エレクトロポレーション(EP)やカチオン性ポリマーなど、種々の核酸ワクチンのデリバリーシステムが報告されているが、臨床応用を考えた場合に安全上の懸念や導入効率に課題を残している。申請者は、この核酸ワクチン開発における最大の障壁が、独自のナノバブル技術により解決可能であると考え、ナノバブル技術を基盤とした新規 RNA ワクチンシステムの開発を目指した。

3. 研究の方法

1) ナノバブルの調製

基本脂質に DPPC および DSPE-PEG2000 を使用し、それぞれの組成比が 94: 6 (molar ratio) としたリポソームを REV 法により調製した。作成したリポソームに超音波造影ガス(パーフルオロプロパン)を封入することでナノバブルとした。

2) 抗原発現 mRNA とナノバブルの筋肉内投与と超音波照射併用による抗原特異的抗体価の産生

抗原(オボアルブミン; OVA)発現 mRNA あるいはポリプレックス複合体とナノバブルをマウス下肢筋肉へ投与し、超音波照射(Frequency: 2 MHz、Duty: 50%、Intensity: 2.0 W/cm²、Time: 1 min)を併用することによりマウス筋組織へ OVA 遺伝子の導入を Day 0 および Day 21 におこなった。Day 42 にマウスから血清および粘膜洗浄液(鼻腔

洗浄液、肺胞洗浄液および膈洗浄液)を回収し、サンプル中の OVA 特異的抗体価は抗原固相化 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法にて検討した。

3) 抗原発現プラスミド DNA とナノバブルの筋肉内投与と超音波照射併用による抗原特異的抗体価の産生

抗原(オボアルブミン; OVA)発現プラスミド DNA とナノバブルをマウス下肢筋肉へ投与し、超音波照射(Frequency: 2 MHz、Duty: 50%、Intensity: 2.0 W/cm²、Time: 1 min)を併用することによりマウス筋組織へ OVA 遺伝子の導入を Day 0 および Day 21 におこなった。Day 42 にマウスから血清および粘膜洗浄液(鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液および膈洗浄液)を回収し、サンプル中の OVA 特異的抗体価は抗原固相化 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法にて検討した。

4. 研究成果

1) 抗原発現 mRNA とナノバブルの筋肉内投与と超音波照射併用による抗原特異的抗体価の産生

まず、OVA 発現 mRNA とナノバブルを混合し、マウス脛骨筋に筋肉内投与し、超音波を照射することにより遺伝子導入した。これを day 0 とし、day 21 にブースト接種を同様におこない day 42 時点で血清等のサンプルを回収した。これらサンプル中の抗原特異的抗体の誘導が亢進しているか否かを検討した。その結果、ナノバブルと超音波照射を併用しても、抗原特異的な血中 IgG は全くみられなかった(図 2)。

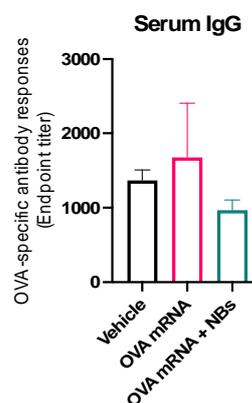


図2. mRNAとナノバブルの併用による抗体産生

2) 抗原発現 mRNA ポリプレックス複合体の筋肉内投与による抗原特異的抗体価の産生

そこで次に、筋細胞への遺伝子導入効率の向上を考えペプチド/mRNA ポリプレックス複合体を調製し、マウス脛骨筋に筋肉内投与し、超音波を照射することにより遺伝子導入した。これを day 0 とし、day 21 にブースト接種を同様におこない day 42 時点で血清等のサンプルを回収した。これらサンプル中の抗原特異的抗体の誘導が亢進しているか否かを検討した。その結果、ナノバブルと超音波照射を併用しても、抗原特異的な血中 IgG は全くみられなかった(図 3)。

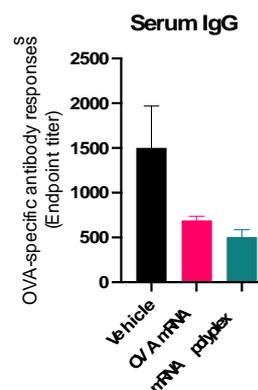


図3. mRNA/ポリプレックス複合体の筋肉内投与による抗体産生

3) 抗原発現プラスミド DNA とナノバブルの筋肉内投与と超音波照射併用による抗原特異的抗体価の産生

これまでの結果から、mRNA を用いた系で抗体価の亢進が見られなかったため、OVA 発現プラスミド DNA を作製し、同様に検討することとした。OVA 発現プラスミド DNA とナノバブルを混合し、マウス脛骨筋に筋肉内投与し、超音波を照射することにより遺伝子導入した。これを day 0 とし、day 21 にブースト接種を同様におこない day 42 時点で血清等のサンプルを回収した。これらサンプル中の抗原特異的抗体の誘導が亢進しているか否かを検討したところ、抗原特異的抗体価の顕著な亢進が見られた(図 4)。すなわち、超音波応答性ナノバブル応用することで新たな

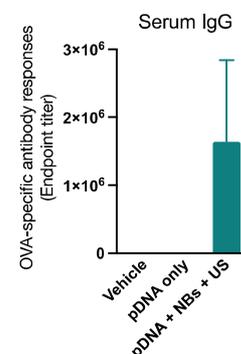


図4. pDNAとナノバブルの併用による抗体産生

DNA ワクチンモダリティとなり得る可能性が示唆された。

以上、本研究では超音波応答性ナノバブルを用いた RNA ワクチン開発への基盤は構築出来なかった。一方で、超音波応答性ナノバブルを用いた DNA ワクチン開発への道を見いだすことが出来た。今後は、ナノバブルの脂質成分の最適化やアジュバントの併用によって超音波応答性ナノバブルをベースとした RNA ワクチン開発を継続するとともに、DNA ワクチン開発も並行して進める予定である。さらなる研究により、超音波応答性ナノバブルによる核酸ワクチンシステムの開発に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tada Rui, Honjo Emi, Muto Shoko, Takayama Noriko, Kiyono Hiroshi, Kunisawa Jun, Negishi Yoichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Role of Interleukin-6 in the Antigen-Specific Mucosal Immunoglobulin A Responses Induced by CpG Oligodeoxynucleotide-Loaded Cationic Liposomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 635 ~ 635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes12060635	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 Tada Rui, Nagao Koichiro, Tanaka Riki, Yamada Sumire, Watanabe Ayano, Negishi Yoichi	4. 巻 112
2. 論文標題 Involvement of splenic marginal zone macrophages in the recognition of systemically administered phosphatidylserine-coated liposomes in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 109209 ~ 109209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2022.109209	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 Tada Rui, Hidaka Akira, Tanazawa Yuya, Ohmi Akari, Muto Shoko, Ogasawara Miki, Saito Momoko, Ohshima Akihiro, Iwase Naoko, Honjo Emi, Kiyono Hiroshi, Kunisawa Jun, Negishi Yoichi	4. 巻 101
2. 論文標題 Role of interleukin-6 in antigen-specific mucosal immunoglobulin A induction by cationic liposomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 108280 ~ 108280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2021.108280	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 Yano Yusuke, Hamano Nobuhito, Haruta Kenshin, Kobayashi Tomomi, Sato Masahiro, Kikkawa Yamato, Endo-Takahashi Yoko, Tada Rui, Suzuki Ryo, Maruyama Kazuo, Nomizu Motoyoshi, Negishi Yoichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Development of an Antibody Delivery Method for Cancer Treatment by Combining Ultrasound with Therapeutic Antibody-Modified Nanobubbles Using Fc-Binding Polypeptide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 130 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics15010130	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 Tada Rui, Yamazaki Haruka, Nagai Yuzuho, Takeda Yukino, Ohshima Akihiro, Kunisawa Jun, Negishi Yoichi	4. 巻 119
2. 論文標題 Intranasal administration of sodium nitroprusside augments antigen-specific mucosal and systemic antibody production in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 110262 ~ 110262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2023.110262	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 Sekine Shohko, Mayama Sayaka, Nishijima Nobuaki, Kojima Takuo, Endo-Takahashi Yoko, Ishii Yuko, Shiono Hitomi, Akiyama Saki, Sakurai Akane, Sashida Sanae, Hamano Nobuhito, Tada Rui, Suzuki Ryo, Maruyama Kazuo, Negishi Yoichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Development of a Gene and Nucleic Acid Delivery System for Skeletal Muscle Administration via Limb Perfusion Using Nanobubbles and Ultrasound	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1665 ~ 1665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics15061665	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 Yano Yusuke, Tada Rui, Hamano Nobuhito, Haruta Kenshin, Kobayashi Tomomi, Sato Masahiro, Kikkawa Yamato, Endo-Takahashi Yoko, Nomizu Motoyoshi, Negishi Yoichi	4. 巻 521
2. 論文標題 Development of a concise and reliable method for quantifying the antibody loaded onto lipid nanoparticles modified with Herceptin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Immunological Methods	6. 最初と最後の頁 113554 ~ 113554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jim.2023.113554	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 Tada Rui, Nagai Yuzuho, Ogasawara Miki, Saito Momoko, Ohshima Akihiro, Yamanaka Daisuke, Kunisawa Jun, Adachi Yoshiyuki, Negishi Yoichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Polymeric Caffeic Acid Acts as an Antigen Delivery Carrier for Mucosal Vaccine Formulation by Forming a Complex with an Antigenic Protein	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 449 ~ 449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines12050449	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 多田 壘, 本庄絵美, 武藤祥子, 高山典子, 清野宏, 國澤純, 根岸洋一
2. 発表標題 CpG ODN搭載正電荷リポソームが有する粘膜アジュバント活性に対するIL-6の寄与
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 多田 壘, 石原 聡子, 岩田 知子, 清野 宏, 國澤 純, 根岸 洋一
2. 発表標題 経鼻投与型リポソームワクチンを用いた真菌ワクチン開発に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第38回 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 碧, 多田 壘, 近江 珠怜, 棚澤 佑哉, 山田 董, 大島 亮洋, 清野 宏, 國澤 純, 根岸 洋一
2. 発表標題 正電荷リポソームの経鼻投与で惹起される鼻腔内への好中球遊走機構
3. 学会等名 第66回 日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 多田 壘, 日高 晃, 棚澤 佑哉, 近江 珠怜, 小笠原 樹, 斎藤 桃子, 大島 亮洋, 清野 宏, 國澤 純, 根岸 洋一
2. 発表標題 IL-6の正電荷リポソームが有する粘膜アジュバント活性に対する寄与
3. 学会等名 第65回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本多 優大, 多田 壘, 里中 由起子, 飯田 博子, 佐藤 恵美, 清野 宏, 安達 禎之, 國澤 純, 根岸 洋一
2. 発表標題 経鼻投与型がんリボソームワクチン開発に向けた基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 野村 瑛美梨, 多田 壘, 岩田 知子, 石原 聡子, 清野 宏, 安達 禎之, 國澤 純, 根岸 洋一
2. 発表標題 経鼻投与型リボソームワクチンを用いた深在性カンジダ症ワクチン開発に向けた基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京薬科大学・薬学部・薬物送達学教室 https://www.ps.toyaku.ac.jp/yakubutsusotatsu/ 東京薬科大学・薬学部・薬物送達学教室 https://www.ps.toyaku.ac.jp/yakubutsusotatsu/</p>

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
研究分担者	根岸 洋一 (Negishi Yoichi) (50286978)	東京薬科大学・薬学部・教授 (32659)	

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