

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659078
 研究課題名（和文）
 新興・再興感染症の克服に向けた安全かつ有効なナノ経皮ワクチン開発へのチャレンジ
 研究課題名（英文）
 Development of transcutaneous vaccine with efficacy and safety for the overcoming infectious diseases
 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、ナノ素材を抗原送達キャリアとして用いることで、経皮免疫を誘導可能なナノ経皮ワクチンの開発に挑戦した。その結果、粒子径 100nm 以下のナノシリカを抗原と混合するだけで、樹状細胞における抗原提示効率を増加させ得る共に、経皮投与・塗布することで免疫応答を改変可能であることを先駆けて示した。今後、本萌芽的知見を発展させることで、有効かつ安全なナノ経皮ワクチンの開発に繋がるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Nanomaterials have superior functions, so it is expected that they will play an active part in medicine, such as drug delivery system carrier, vaccine carrier, and so on. In the study, I have tried to develop transcutaneous vaccine with efficacy and safety by using amorphous nanosilica particles. I believe that the study will provide the basic information for the establishment of safer and effective nano-vaccine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：医療薬剤学、ナノメディシン、ドラッグデリバリーシステム、ワクチン、安全

1. 研究開始当初の背景

新型インフルエンザパンデミックでも明らかかなように、新興・再興感染症は、ヒトの健康維持における圧倒的脅威であり、世界保健機関（WHO）は現在、インフルエンザをはじめとする 19 疾病を要警戒感染症として位置づけている。また、WHO がワクチンによる感染予防が最重要課題であることを宣言し、種々の感染症に対するワクチンの新規開発やその増産が国際的に推進されている。

現在、注射型ワクチン、粘膜ワクチンなど、様々なワクチンが提唱されているが、近年、経皮ワクチンへの期待が高まっている。経皮

ワクチンは、所謂貼るだけで有効であり、非侵襲的かつ簡便で皮膚感染性病原体から粘膜感染性病原体まで、あらゆる病原体に対して有効であり、また注射による二次感染の危険性がないことなどから、先進国・新興国・発展途上国を問わず、理論的に、あらゆるニーズを満たす理想的なワクチンになり得るものと期待される。しかし経皮ワクチンは、抗原単独の投与では、抗原を安定に免疫担当細胞に送達できないことから、ワクチン効果に乏しく、感染症予防・治療に十分な抗原特異的免疫を全く誘導できない。この点、研究代表者は最近、『粒子径 30～70nm のナノシリ

カが、最も強固な生体バリアである皮膚を安全かつ高効率で突破し得ること』を初めて認めており、抗原を経皮的に送達し得る可能性が想起された。

2. 研究の目的

本研究では、申請者の過去のワクチン開発研究の経験（*Biomaterials*. 2009 Oct;30(29):5869-76.、*J Virol*. 2010 Dec;84(24):12703-12. など）やナノ研究の経験（*Nat Nanotechnol*. 2011 May;6(5):321-8.、*Biomaterials*. 2011 Apr;32(11):2713-24. など）を活かし、安全かつ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経皮ワクチンの開発を目的に、化粧品・食品基材として実用され、生体適合性にも優れた非晶質ナノシリカ粒子を抗原送達キャリアとして利用することを試みる。この非晶質ナノシリカは、粒子でありながら皮膚を容易に透過すること、皮膚ランゲルハンス細胞を刺激し、アジュバントとして必須とも言えるサイトカイン産生を惹起し得ることを我々は先駆けて見出しているなど、経皮ワクチン用の抗原キャリアとして、またアジュバントとしても有望である。そこで本検討では、ナノシリカの経皮毒性（安全性）を詳細に追求しつつ、ナノシリカを新規アジュバント・抗原キャリアとして適用し、抗原の経皮吸収性、体内安定性、免疫細胞への到達性などを改善することで、有効性と安全性を担保した次世代型ワクチンの開発を試みるものである。

3. 研究の方法

in vitro における抗原送達能の評価：マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞に、ニワトリ卵白アルブミン（OVA）溶液、あるいは種々の濃度で調製したシリカ-OVA 混合溶液を添加し、6 時間培養した。細胞を固定した後、CD8-OVA 1.3 細胞を播種し、24 時間共培養した後、上清中の IL-2 量を ELISA で測定した。非晶質ナノシリカの抗原キャリアとしての

4. 研究成果

全身面でのウイルス感染・伝播阻止効果を達成するためには、細胞性免疫を誘導する必要があるものの、ワクチンによる細胞性免

疫誘導には多くの障壁が存在する。細胞性免疫の誘導には、抗原提示細胞である樹状細胞が抗原を捕捉・分解し、8-16 アミノ酸のペプチド断片を MHC class I 分子を介して細胞表面に提示し、細胞傷害性 T 細胞を活性化する必要がある。しかし一般的に、ワクチン抗原などの外来性の異物は、樹状細胞が取り込んだ後、MHC class II を介して提示されるため、ヘルパー T 細胞の活性化による液性免疫しか誘導することができない。一方で、細胞内に取り込まれた抗原の一部は、非常に低頻度ではあるものの、クロスプレゼンテーションにより MHC class I 分子を介して提示され、細胞傷害性 T 細胞を活性化することが知られている。そこで、まず初めに、非晶質ナノシリカの抗原送達キャリアとしての有用性を、*in vitro* において評価した。本検討では、外来性抗原のモデルとしてニワトリ卵白アルブミン（OVA）を用い、OVA とシリカが共存した際のクロスプレゼンテーション効率を評価した。なお本検討では、100 nm 以下のナノシリカとして一次粒子径が 50、70、100 nm（それぞれ nSP50、nSP70、nSP100）の粒子を、対照として 300、1000 nm（それぞれ nSP300、mSP1000）のサブミクロンサイズの粒子を用いた。その結果、OVA 単独、または OVA とサブミクロンサイズの nSP300、mSP1000 を作用させた群では、クロスプレゼンテーションは全く誘導されなかった。一方で、直径 100 nm 以下のナノシリカ（nSP100、nSP70、nSP50）を作用させた群では、クロスプレゼンテーションの誘導が認められ、その効果は粒子径の減少に伴って増大した。以上の結果から、ナノシリカは、抗原を細胞質に送達することで、クロスプレゼンテーションを誘導し、細胞性免疫を惹起可能であることが示された。

次に、ナノシリカ介在性クロスプレゼンテーションの誘導機構を解析した。現在、国内外を問わず、クロスプレゼンテーションの誘導機構に関して、明確な結論は得られていない。現状では、以下の 3 つの経路が提唱されている。即ち、エンドサイトーシスによってエンドソーム内に取り込まれた抗原が、①細胞質へ漏出し、プロテアソーム分解系を経て MHC class I 抗原提示が生じる経路、②エンドソーム内でカテプシン S などのタンパク分

解酵素により部分分解された抗原ペプチドが、エンドソーム内にリクルートされた MHC class I と複合体を形成して細胞表面に提示される経路、③抗原由来のペプチド断片を含むエンドソームと、MHC class I 分子が常在する小胞体が膜融合し、融合小胞内で抗原由来のペプチド断片と MHC class I 分子が複合体化する経路、の 3 つが提唱されている。従って、クロスプレゼンテーションの成立には、①の経路ではプロテアソームによる抗原の分解が必須であり、②・③の経路ではエンドソーム内での抗原の分解が必須である。そこでまず、エンドサイトーシスを介したナノシリカの取り込みが、クロスプレゼンテーションに及ぼす影響を解析した。一般に結晶質シリカを始めとした微粒子の、エンドサイトーシスを介した取り込みには、スカベンジャーレセプターが関与していることが知られている。このことを考慮し、本検討ではスカベンジャーレセプターの阻害剤である polyinosinic acid (polyI) を用いて、非晶質シリカのエンドサイトーシスを介した取り込みを阻害した。その結果、polyI で処理することで、nSP70 によるクロスプレゼンテーションの誘導は強く阻害された。従って、ナノシリカによるクロスプレゼンテーションの誘導には、スカベンジャーレセプターを介したシリカの取り込みが必須であることが示唆された。次に、プロテアソーム阻害剤あるいはエンドソーム内酵素活性阻害剤が共存する条件下で、nSP70 介在性クロスプレゼンテーションの誘導効率を評価した。まず、エンドソーム内における抗原の分解の抑制は、エンドソーム内の酸性化を阻害し、リソソーム酵素群の働きを抑制する chloroquine を作用させることで行った。その結果、chloroquine 存在下での nSP70 介在性クロスプレゼンテーションの誘導効率は、chloroquine 非添加群とほぼ同程度であった。従って、nSP70 によるクロスプレゼンテーションの誘導にはエンドソーム内での抗原消化は必要ではないことが示唆された。次に、プロテアソーム阻害剤である lactacystin 存在下で同様の検討を実施した。その結果、nSP70 介在性クロスプレゼンテーションは、コントロール群と同程度にまで低下した。以

上の結果から、ナノシリカによるクロスプレゼンテーションは、エンドソームからの抗原の漏出を起点とする①の経路である可能性が考えられた。

次にナノシリカ介在性クロスプレゼンテーションが *in vivo* において反映されるかを検証するため、ナノシリカの細胞性免疫の誘導能を評価した。細胞性免疫の誘導能は、OVA と共に各粒子径のシリカを皮内投与し、IFN- γ ELISPOT 法を用いて評価した。その結果、OVA を単独で免疫した群では、ほとんど細胞性免疫の誘導は認められなかった。一方で、100 nm 以下のナノシリカを共投与した場合にのみ、OVA 特異的に IFN- γ を産生する細胞数が有意に増加した。これらの結果は、ナノシリカ介在性クロスプレゼンテーションが、*in vivo* においても誘導され、結果として OVA 由来の MHC class I ペプチドに特異的な CTL が活性化されたものと考えられる。

以上、粒子径 100 nm 以下のナノシリカが、共存する抗原の細胞内プロセッシングに影響を与え、結果として、クロスプレゼンテーションを誘導することが明らかとなった。また、*in vitro* の検討から予想された通り、*in vivo* においても、粒子径 100 nm 以下のナノシリカを適用した群においてのみ、抗原特異的な細胞性免疫が増強された。従って、粒子径 100 nm を閾値として、ナノシリカがサブミクロンサイズのシリカとは異なる免疫応答を誘導することが明らかとなった。この結果は、免疫系が、粒子のサイズを認識している可能性なども想起させるものである。本検討により見出された細胞性免疫の誘導は、ウイルス排除などに必須の免疫応答であり、感染症に対するワクチン開発において熱望される作用である。従って、本現象の詳細なメカニズムの解明により、ナノシリカによる細胞性免疫誘導能を制御することで、ナノマテリアルの安全性確保、さらにはその有効利用が可能となると考えられる。

次に、OVA とナノシリカを混合し、皮膚塗布後の全身面での免疫応答を、OVA 特異的 IgG 量と、脾細胞のサイトカイン産生を指標に評価した。その結果、OVA 塗布群と OVA/nSP30 塗布群において、コントロール群と比較して OVA 特異的 IgG 産生量は有意に増加していた

ものの、両群の間では有意な差は認められなかった。次に、細胞性免疫応答の指標として、抗原特異的に IFN- γ を産生するリンパ球数を、液性免疫応答の指標として抗原特異的に IL-4 を産生するリンパ球数を評価した。その結果、抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数は、シリカ共塗布群においても、抗原単独塗布群と変化は認められなかった。一方で、抗原特異的 IL-4 産生細胞数は、nSP300 や mSP1000 と共塗布した群では抗原単独塗布群と変化が認められないものの、nSP30 や nSP70 などナノシリカと共塗布した群で抗原単独塗布群よりも有意に増加することが観察された。以上の結果から、抗原とナノシリカの共塗布は、抗原特異的な液性免疫応答を誘導し得ることが明らかとなった。一方で、細胞性免疫誘導については、効率的な誘導は認められなかった。以上の結果から、ナノシリカを抗原送達キャリアとして適用した場合、皮内投与の場合、細胞性免疫の誘導を含むワクチン効果を発揮可能であるものの、経皮塗布では、より詳細な検討が必要不可欠と考えられた。今後は、経皮塗布後の、ナノシリカや抗原の動態を精査すると共に、より微小化されたナノシリカを用いた検討を進める必要があると考えられる。

以上、本研究では、今後の検討が必須であるものの、ナノシリカの抗原送達キャリアとしての有用性を示すと共に、経皮ワクチンキャリアとしての基盤情報を収集した。本成果を発展させることで将来的に、HIV、新型インフルエンザなど、未だ世界中で猛威をふるう新興・再興感染症や Neglected Disease など、致死的な感染症に対する新たな方法論・基盤技術などを提供し、国民の健康と福祉に貢献可能と考えられる。

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 3 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 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.

③ Hirai T., Yoshikawa T., Nabeshi H., Yoshida T., Tochigi S., Ichihashi K., Uji M., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Itoh N., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Amorphous silica nanoparticles size-dependently aggravate atopic dermatitis-like skin lesions following an intradermal injection., *Part. Fibre. Toxicol.*, 9(1): 3, 2012.

[学会発表] (計 2 件)

① 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.

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, 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.

[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