

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590198

研究課題名(和文) 脾臓・樹状細胞標的型ナノデバイスを用いた安全なワクチン技術開発と臨床応用への研究

研究課題名(英文) Development of safety vaccine using spleen- and dendritic cells-targeted nano device

研究代表者

北原 隆志 (KITAHARA, Takashi)

長崎大学・病院(医学系)・准教授

研究者番号：30380934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：脾臓・樹状細胞標的型ナノデバイスを利用して、メラノーマとマラリアのDNAワクチンを開発した。モデルメラノーマワクチンとしてpUb-Mを用い、ポリエチレンイミン(PEI)、およびγ-ポリグルタミン酸(γ-PGA)を混合し、安定なナノワクチン(pUb-M/PEI/γ-PGA複合体)を構築した。ナノワクチンはメラノーマの増殖および肺転移を抑制し、生存率も延長させた。また、モデルマラリアワクチンとしてpVR1020-TAM(pyTAM)を用い、同様にマラリアDNAナノワクチン(pyTAM/PEI/γ-PGA複合体)を構築した。マラリアDNAナノワクチンはマラリア感染を抑制し、死亡率を低下させた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed the novel melanoma vaccine and malaria vaccine using spleen-targeted nano-device. We used pUb-M which expresses melanoma-related antigen (gp100 and tyrosinase-related protein 2 (TRP2)) as melanoma DNA vaccine. We successfully prepared the stable nanoparticles (pUb-M/PEI/γ-PGA complexes) by optimization of the mix ratio. The pUb-M/PEI/γ-PGA complex significantly inhibited the growth and metastasis of a melanoma cell line, B16-F10 cells, and improved the survival time of metastasis model mice. For the development of malaria DNA nano-vaccine, PyGPI8p-transamidase-related protein (PyTAM) was selected as a possible candidate vaccine antigen. The pyTAM/PEI/γ-PGA complexes suppressed parasitemia and prolonged survival.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ワクチン ナノ材料 癌 感染症

1. 研究開始当初の背景

分子生物学と免疫学の著しい発展により、感染症、がん、アルツハイマーなどに対するワクチン開発が精力的におこなわれている。しかし、日本は世界と比べて、ワクチン開発が立ち遅れており、現在国を挙げて推進を図っている。

申請者はこれまでに、様々な電荷を持った化合物を静電的に自己組織化させることで、安全性が高く、様々な臓器への指向性を有する画期的なナノデバイスの構築に成功した(特開 2010-059064)。特に γ -polyglutamic acid (γ -PGA) を構築成分としたナノデバイスは、安全性が高く、脾臓の樹状細胞に選択的に取り込まれ、遺伝子発現も可能なことから、蛋白抗原ワクチンや DNA ワクチンへの応用が期待される。このナノデバイスは、アジュバンドとしてではなく、微粒子として自己組織化させることで、蛋白抗原や核酸を内包し、細胞内へ送り込むことにより、強い作用を発揮することを確認している。

予備実験において、OVA 蛋白を内包したナノワクチンは、マウスで非常に高い免疫誘導効果を示した。一方、メラノーマ抗原の pDNA を用いたナノワクチンは、担癌マウスにおいて、腫瘍増殖抑制および肺転移抑制に劇的な効果を示した。メラノーマは未だ有効な治療法がなく、治療成績が悪い癌としてよく知られている。また、ナノデバイスをマラリアワクチンに応用した結果、マウスのマラリア感染による死を完全に抑制することにも成功した。WHO の三大感染症のひとつであるマラリアは未だにワクチンのない感染症であり、マラリアワクチンの開発は世界的にも急務である。マラリア表面抗原に対するワクチンが第 Ⅲ 相臨床試験で 5 割程度の効果が得られているが、十分な感染抑制のためにさらに効果的なワクチン開発が望まれている。

以上の結果を受け、脾臓・樹状細胞標的型ナノデバイスを用いる安全なワクチン技術の開発研究と臨床応用を目的とした安全性や薬理効果の検証を行った。

2. 研究の目的

脾臓・樹状細胞標的型ナノデバイスを利用して、臨床応用可能なメラノーマ癌ワクチンとマラリアワクチンを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) モデル pDNA として、ヒトサイトメガロウイルス(CMV) プロモーターを有し、ホタルルシフェラーゼ(Luc) をコードした pCMV-Luc、マウスメラノーマ抗原である gp100 と TRP-2 のユビキチン化エピトープをコードした pUb-M、マウスマラリア原虫 *P. yoelii* GPI8p transamidase-related protein をコードした pVR1020-TAM (pyTAM) を用いた。pDNA と polyethylenimine (PEI) を結合させ、

カチオン性の複合体 (PEI 複合体) を作製した。さらに chondroitin sulfate (CS)、 γ -PGA などのアニオン性化合物を用いてカチオン性の複合体を静電的に被膜し、アニオン性の新規遺伝子ベクターを構築した。各複合体の粒子径および ζ -potential を Zetasizer Nano ZS を用いて測定した。また、アガロースゲル電気泳動により複合体の安定性を評価した。

(2) マウスメラノーマ細胞 B16-F10 細胞を用いて遺伝子導入を行い、各複合体の遺伝子発現効率を評価した。また、WST-1 assay により細胞障害性も検討した。さらに、各複合体と血液を混合し、血液凝集を評価した。

(3) pCMV-Luc を含んだ各複合体をマウス尾静脈内投与し、6 時間後の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺における遺伝子発現量を測定した。

(4) pUb-M を含んだ複合体を 2 週間おきに 3 回尾静脈内投与し免疫誘導を行った。最終免疫から 2 週間後にルシフェラーゼ恒常発現 B16-F10 細胞 (B16-F10-Luc) を皮内あるいは静脈内投与し、腫瘍増殖抑制、肺転移抑制効果および生存率を評価した。

(5) pyTAM を含んだ複合体を 2 週間おきに 3 回尾静脈内投与し免疫誘導を行った。最終免疫から 2 週間後に 1×10^6 の *P. yoelii* 17XL-parasitized red blood cells (pRBCs) を腹腔内投与し、寄生虫血および生存率を評価した。また、免疫誘導効果も測定した。

4. 研究成果

pDNA と様々なカチオン性化合物やアニオン性化合物を組み合わせたナノデバイスの構築を試みた。その結果、各成分の混合比と調製プロセスを最適化することで、ナノサイズの安定なアニオン性複合体の構築に成功した。

製剤学的検討により最適化した各複合体を B16-F10 に添加し、遺伝子発現効率および細胞障害性について検討した。その結果、カチオン性複合体は高い遺伝子発現効果を示したが、細胞障害性も認められた。一方、ほとんどのアニオン性複合体はカチオン性複合体と比較して細胞障害性は低下したが、遺伝子発現効果も著しく低下した。しかしながら、chondroitine sulfate (CS) および γ -polyglutamic acid (γ -PGA) を用いて構築したアニオン性複合体 (CS 複合体、 γ -PGA 複合体) はカチオン性複合体に匹敵する遺伝子発現効果を示しながら、細胞傷害性を示さなかった。

そこで、in vivo における CS および γ -PGA 複合体の遺伝子導入効率を検討するため、マウスに各複合体を尾静脈内投与後の肝臓、腎臓、脾臓、心臓および肺における遺伝子発現量について検討した。その結果、CS 複合体および γ -PGA 複体のいずれも脾臓におい

て高い遺伝子発現効果を示した。また、各複合体をマウスに大量投与後の毒性を検討した結果、急性、臓器、血液毒性のいずれも認めなかった。

γ -PGA 複合体を利用したメラノーマワクチンの開発を試みた。マウスメラノーマ抗原である gp100 と TRP-2 のコピキチン化エpitepをコードした pUb-M と polyethyleneimine (PEI)、および γ -polyglutamic acid (γ -PGA) を最適な混合比で静電的に自己組織化させ、安定なナノワクチン (pUb-M/PEI/ γ -PGA 複合体) を構築した。

まず、pUb-M/PEI/ γ -PGA 複合体によるメラノーマ細胞の増殖抑制効果について検討した。5%糖液 (control)、pUb-M のみ、ルシフェラーゼ発現 pDNA (pCMV-Luc) を用いた pCMV-Luc/PEI/ γ -PGA 複合体あるいは pUb-M/PEI/ γ -PGA 複合体でマウスに免疫誘導を行い、皮内移植したメラノーマ細胞の増殖を経日的に測定した結果、pUb-M のみ、pCMV-Luc/PEI/ γ -PGA 複合体を投与したマウスの腫瘍は control と同様に増殖し、差異は認められなかった。これに対し、pUb-M/PEI/ γ -PGA 複合体を投与したマウスの腫瘍増殖は control と比較して有意に抑制された (図 1)。さらに、メラノーマ細胞の肺転移に及ぼす pUb-M/PEI/ γ -PGA 複合体の効果について検討した。その結果、pUb-M/PEI/ γ -PGA 複合体を投与したマウスの肺に転移した B16-F10-Luc 細胞数は control と比較して有意に少なかった。また、pUb-M/PEI/ γ -PGA 複合体を投与したメラノーマ肺転移モデルマウスの生存期間は control と比較して有意に延長した。

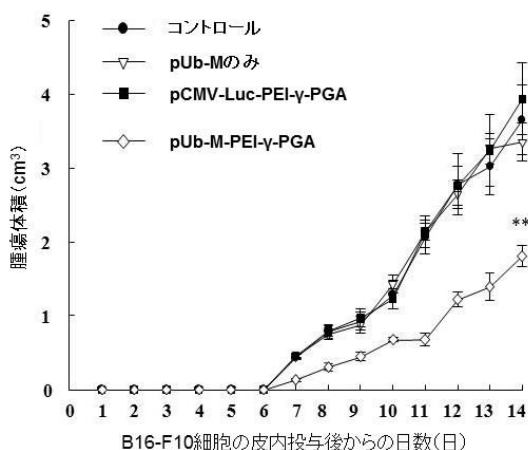


図1 pUb-M-PEI- γ -PGA複合体の腫瘍増殖抑制効果

γ -PGA 複合体を利用したマラリアナノワクチンの開発を試みた。マラリア DNA ワクチンとして、マウスマラリア原虫 *P. yoelii* GPI8p transamidase-related protein をコードした pVR1020-TAM (pyTAM) を用いた。pyTAM と polyethyleneimine (PEI)、および γ -polyglutamic acid (γ -PGA) を最適な混合比で静電的に自己組織化させ、安定なナノワクチン (pyTAM-PEI- γ -PGA 複合体) を構築した。pyTAM-PEI- γ -PGA 複合体によるマラリア感

染の抑制効果について検討した。C57BL/6 系マウスに PBS (control)、何もコードしていないプラスミド (pVR1020) を内包した複合体 (pVR1020-PEI- γ -PGA 複合体) あるいは pyTAM-PEI- γ -PGA 複合体を 2 週間おきに計 3 回腹腔内投与して免疫誘導を行った。最終免疫から 2 週間後に 1×10^6 の *P. yoelii* 17XL-parasitized red blood cells (pRBCs) を腹腔内投与し、寄生虫血および生存を経日的に観察した。その結果、pVR1020-PEI- γ -PGA 複合体を投与したマウスでは control と同様に寄生虫血が増加し、全てのマウスが死亡した。これに対し、pyTAM-PEI- γ -PGA 複合体を投与したマウスでは、寄生虫血の一時的な増加が見られたものの、すぐに消失し、全マウスが生存した (図 2)。また、免疫誘導効果を評価するために、最終免疫から 2 週間後の血清中抗原特異的 IgG および IgG サブタイプを測定した。その結果、pyTAM-PEI- γ -PGA 複合体では、総 IgG 値、IgG1 値、IgG2a 値、および IgG2b 値の有意な上昇が認められた。したがって、本ベクターを利用した新規マラリア DNA ナノワクチンは、マラリアに特異的な免疫誘導を惹起し、マラリア感染による死亡および寄生虫血の増加を著しく抑制できることが示唆された。

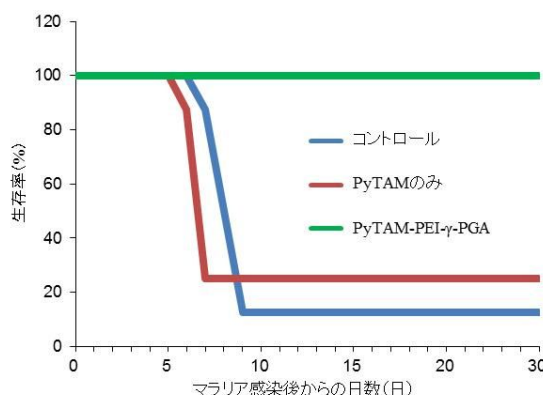


図2 PyTAM-PEI- γ -PGA複合体のマラリア感染予防効果

以上のように、我々は本研究によって、高い遺伝子導入効率と安全性を兼ね備えた画期的な脾臓・樹状細胞標的型ベクターを開発した。また本ベクターを利用することで、高い有効性および安全性を有するメラノーマナノワクチンおよびマラリアナノワクチンの開発に成功した。

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 10 件)

Kurosaki T, Nakasone C, Kodama Y, Egashira K, Harasawa H, Muro T, Nakagawa H, Kitahara T, Higuchi N, Nakamura T, Sasaki H: Splenic Gene Delivery System Using Self-assembling Nano-complex with Phosphatidylserine Analog. *Biol Pharm Bull.* 38(1): 23-9 (2015). 査読有

Kodama Y, Yatsugi Y, Kitahara T, Kurosaki T,

Egashira K, Nakashima M, Muro T, Nakagawa H, Higuchi N, Nakamura T, Sasaki H.: Quaternary Complexes Modified from pDNA and Poly-L-Lysine Complexes to Enhance pH-Buffering Effect and Suppress Cytotoxicity. *J Pharm Sci.* 104(4): 1470-7 (2015). 査読有

Kodama Y, Ohkubo C, Kurosaki T, Egashira K, Sato K, Fumoto S, Nishida K, Higuchi N, Kitahara T, Nakamura T, Sasaki H.: Secure and effective gene delivery system of plasmid DNA coated by polynucleotide. *J Drug Target.* 23(1): 43-51 (2015). 査読有

Kodama Y, Shiokawa Y, Nakamura T, Kurosaki T, Aki K, Nakagawa H, Muro T, Kitahara T, Higuchi N, Sasaki H.: Novel siRNA delivery system using a ternary polymer complex with strong silencing effect and no cytotoxicity. *Biol Pharm Bull.* 37(8): 1274-81 (2014). 査読有

Kodama Y, Nakamura T, Kurosaki T, Egashira K, Mine T, Nakagawa H, Muro T, Kitahara T, Higuchi N, Sasaki H.: Biodegradable nanoparticles composed of dendrigraft poly-L-lysine for gene delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 87(3): 472-9 (2014). 査読有

Imamura M, Kodama Y, Higuchi N, Kanda K, Nakagawa H, Muro T, Nakamura T, Kitahara T, Sasaki H.: Ternary complex of plasmid DNA electrostatically assembled with polyamidoamine dendrimer and chondroitin sulfate for effective and secure gene delivery. *Biol Pharm Bull.* 37(4): 552-9 (2014). 査読有

Kurosaki T, Kawanabe S, Kodama Y, Fumoto S, Nishida K, Nakagawa H, Higuchi N, Nakamura T, Kitahara T, Sasaki H.: Hepatic gene delivery system electrostatically assembled with glycyrrhizin. *Mol Pharm.* 11(5): 1369-77 (2014). 査読有

Kurosaki T, Kodama Y, Muro T, Higuchi N, Nakamura T, Kitahara T, Miyakoda M, Yui K, Sasaki H.: Secure splenic delivery of plasmid DNA and its application to DNA vaccine. *Biol Pharm Bull.* 36(11): 1800-6 (2013). 査読有

Kanda K, Kodama Y, Kurosaki T, Imamura M, Nakagawa H, Muro T, Higuchi N, Nakamura T, Kitahara T, Honda M, Sasaki H.: Ternary complex of plasmid DNA with protamine and γ -polyglutamic acid for biocompatible gene delivery system. *Biol Pharm Bull.* 36(11): 1794-9 (2013). 査読有

Kodama Y, Harauchi S, Kawanabe S, Ichikawa N, Nakagawa H, Muro T, Higuchi N, Nakamura T, Kitahara T, Sasaki H.: Safe and effective delivery of small interfering RNA with polymer- and liposomes-based complexes. *Biol Pharm Bull.* 36(6): 995-1001 (2013). 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

花村 啓紀、兒玉 幸修、西垣 和香、北原 隆志、中嶋 幹郎、佐々木 均：医療用医薬品で構築した臨床型遺伝子デリバリーシステム

の開発、第 31 回日本薬学会九州支部大会、第一薬科大学(福岡・福岡) 2014 年 12 月 6 日

蔵本 悠、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均：Dendrigraft poly-L-lysine を構成成分とした生分解型 siRNA ベクターの構築、日本薬剤学会第 29 年会、大宮ソニックシティビル(埼玉・大宮) 2014 年 5 月 22 日

西垣 和香、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均：医療用医薬品を用いた GMP 基準の新規遺伝子ベクターの開発、日本薬剤学会第 29 年会、大宮ソニックシティビル(埼玉・大宮) 2014 年 5 月 22 日

Yukinobu Kodama, Yumi Yamashita, Takashi Kitahara, Sasaki Hitoshi: Secure and effective gene vector of polyamidoamine dendrimer pharmaceutically modified with anionic polymer, 5th Pharmaceutical Sciences World Congress, Melbourne (Australia), April 13th – 16th, 2014.

Hitoshi Sasaki, Yukinobu Kodama, Tamami Morishita, Takashi Kitahara: Nanoparticles electrostatically coated with folic acid for effective and safe gene delivery, 5th Pharmaceutical Sciences World Congress, Melbourne (Australia), April 13th – 16th, 2014.

蔵本 悠、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均：Dendrigraft poly-L-lysine を基材とした生分解性ナノ粒子の開発、第 30 回日本薬学会九州支部大会、長崎国際大学(長崎・佐世保) 2013 年 12 月 8 日

西垣 和香、兒玉 幸修、北原 隆志、Shuaibu Mohammed Nasir, Cherif Mahamoud Sama, 平山 謙二、佐々木 均：樹状細胞標的型ナノデバイスを用いたマラリア DNA ナノワクチンの開発、第 30 回日本薬学会九州支部大会、長崎国際大学(長崎・佐世保) 2013 年 12 月 8 日

塩川 裕美、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均：Dendrigraft poly-L-lysine を用いた生体内分解型遺伝子ベクターの開発、日本薬剤学会第 29 年会、ウインク愛知(愛知・名古屋) 2013 年 5 月 25 日

矢次 結衣子、兒玉 幸修、大久保 智佳子、北原 隆志、佐々木 均：ポリヌクレオチド被膜型複合体による脾臓指向性新規遺伝子ベクターの開発、日本薬剤学会第 29 年会、ウインク愛知(愛知・名古屋) 2013 年 5 月 25 日

兒玉 幸修、北原 隆志、江頭 かの子、中嶋 幹郎、樋口 則英、中村 忠博、佐々木 均：Fetuin 被膜型複合体による新規遺伝子ベクターの構築、日本薬学会第 133 年会、パシフィコ横浜(神奈川・横浜) 2013 年 3 月 30 日

塩川 裕美、兒玉 幸修、原内 智慧、北原 隆志、佐々木 均：静電的自己組織化を基盤としたアニオン性 siRNA ベクターの開発、第 29 回日本薬学会九州支部大会、熊本大学(熊本・熊本) 2012 年 12 月 8 日

矢次 結衣子、兒玉 幸修、大久保 智佳子、北原 隆志、佐々木 均：ポリヌクレオチド被

膜型複合体による新規遺伝子ベクターの構築、第 29 回日本薬学会九州支部大会、熊本大学(熊本・熊本) 2012 年 12 月 8 日

佐々木 均、兒玉 幸修、黒崎 友亮、樋口 則英、北原 隆志、中村 忠博：安全かつ効果的な眼疾患用新規遺伝子ベクターの開発、第 32 回日本眼薬理学会、ピアザ淡海(滋賀・大津) 2012 年 9 月 15 日

佐々木 均、森下 圭美、兒玉 幸修、中村 忠博、北原 隆志：安全で高効率な葉酸被膜型遺伝子デリバリーの開発、第 28 回日本 DDS 学会学術集会、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌) 2012 年 7 月 4 日

大久保 智佳子、仲宗根 ちひろ、黒崎 友亮、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均：ホスファチジルセリンアナログを用いた脾臓指向性遺伝子導入ベクターの開発、日本薬剤学会第 28 年会、神戸国際会議場(兵庫・神戸) 2012 年 5 月 24 日

原内 智慧、川鍋 早紀、黒崎 友亮、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均：肝細胞選択的なグリチルリチン含有遺伝子ベクターの開発、日本薬剤学会第 28 年会、神戸国際会議場(兵庫・神戸) 2012 年 5 月 24 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北原 隆志 (KITAHARA, Takashi)
長崎大学・病院(医学系)・准教授
研究者番号：30380934

(2) 研究分担者

佐々木 均 (SASAKI, Hitoshi)

長崎大学・病院(医学系)・教授
研究者番号：00170689

(3) 連携研究者

なし