

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460050

研究課題名(和文) 免疫応答の増強・延長を実現する新規デポ型生体吸収性人工エラストマーの創成

研究課題名(英文) Development of novel depot-forming bioabsorbable recombinant elastomers for immunoresponse augmentation

研究代表者

浅井 大輔 (Asai, Daisuke)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：10423485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：デポ(depot)機能をもつ人工エラストチンが注射投与可能な生体吸収性エラストマーとして機能すること、この人工エラストマーは遺伝子レベルで合理的に分子組成・鎖長・化学架橋点を設計でき、薬物送達の基盤技術の1つである徐放化の担体としてプラットフォーム化できること、さらには抗原の免疫原性を増強・延長するアジュバントと成り得ることを見出した。試験管内～動物試験までの評価系が確立しているワクチン抗原：破傷風トキソイドに焦点を当て解析を進めた結果、抗原をデポ製剤化する意義が明らかとなった。当該研究で見出された人工エラストマーは、新規ワクチン開発の基盤構築に貢献できる生体材料として今後の展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：The frequency of administration of antigen must be done for enhanced immunoresponses to repeated exposures to the same antigens. In the context of vaccine compliance, versatile prolonged-release antigen delivery platforms with single injection are needed. We approached this issue by in situ formation of antigen-containing implants using recombinant protein polymer hydrogels, and demonstrate its utility as an injectable antigen depot capable of sustained release of tetanus toxoid. The novelty of this work stems from the genetically encoded design of these peptide polymers, which enables key molecular parameters that control the properties of the hydrogel to be precisely specified at the genetic level for antigens. Our hydrogel system may hold the promise of tailor-made long-lasting depot systems for a variety of antigens, aiming to design single-injection-type of vaccines.

研究分野：生物化学

キーワード：薬物デポ 生体材料 DDS 注射ゲル 徐放 エラストチン ワクチン抗原

1. 研究開始当初の背景

ワクチンによる免疫療法は生体防御機構を利用した感染の予防であるが、病原微生物に特異的に発現または産生される抗原分子をそのまま投与しても、分解や拡散により目的とする免疫担当細胞・組織への到達量が少なく、抗原提示細胞による十分な抗原認識と抗原特異的な免疫応答を得ることが困難である。そのため、抗原とともに投与することにより、抗原に対する免疫原性を増強・加速・延長するアジュバントが、経験則により臨床の場で用いられてきた。この10年間の自然免疫研究の進展により、多くのアジュバントの標的が自然免疫受容体であることが明らかとされ、過去数十年に渡って不明であったアジュバントの免疫応答増強の作用メカニズム解明に非常に大きな期待が寄せられている。最もよく用いられているアジュバントであるアラム(水酸化アルミニウム)について、そのメカニズムの解明に向けた論文が相次いで発表された。デポ効果、粒子サイズ、MyD88やNALP3インフラマソーム経路のシグナル伝達活性化、アラム自身によりダメージを受けた宿主細胞から遊離する核酸や尿酸の寄与など、その内容は多岐にわたり、世界的に激しい論争が繰り広げられている。

ワクチンによる免疫療法は致死率の高い感染症や悪性腫瘍に対する予防・治療戦略の1つとして長年に渡って研究されてきたが、その多くが未だ日の目を見ていない。その大きな理由の1つに、いつ、どのくらい、どういった形態で、どの種類のアジュバントと共に抗原を投与すれば抗原提示細胞を有効に活性化でき、著効するかというエビデンスが得られていないことが挙げられる。

2. 研究の目的

研究代表者が新規な生体機能材料として手掛けている人工エラストマーは、トロポエラスチンタンパク質の部分配列を鎖状化した人工ポリペプチドであり、(1) デポ(depot)機能をもち注射投与可能な生体吸収性エラストマーとして機能し、(2) この人工エラストマーは遺伝子レベルで合理的に分子の組成・鎖長・化学架橋点を設計でき、薬物送達の基盤技術の1つである徐放化の担体としてプラットフォーム化でき、さらには(3) 抗原の免疫原性を増強・延長する新型アジュバントと成り得る可能性を併せもっている。本研究は、優れた免疫増強活性をもつことが古くから経験的に知られているにもかかわらず、科学的根拠に基づく明確な分子設計法が確立していないために、各種疾患に特化した臨床研究が遅れているワクチンアジュバントに焦点を当てた。本研究では、上述の新規分子ツールを用い、「抗原を徐々に放出させることによる抗原提示細胞の持続刺激のみを純粋に解析してその免疫効果の増強の寄与を評価」し、現在臨床の場で用いられているアジュバントがもつ複合的な作用メカニ

ズムの解明に貢献できる生体機能材料を創成することを目的とした。

3. 研究の方法

生体吸収性の人工エラストマーによりデポ化した破傷風トキソイドの免疫応答を解析することを通して、有効なアジュバント開発における1つの新しい分子設計手法を提案する基礎研究を下記のように実施した。

(1) 人工エラストマーの組成・物性と破傷風に対する免疫原性の相関解析

破傷風トキソイドタンパク質を人工エラストマー溶液と混合してマウス(SIc:ddY, SPF, 4週齢)に免疫し、破傷風特異的抗体価の推移をモニターした。得られた結果と人工エラストマーの組成・分子量(高分子鎖長)・濃度および投与回数、抗原量との相関を解析した。

(2) 投与ルートおよび投与剤型の検討

我が国の現行の破傷風ワクチンは皮下投与である一方で、欧米では筋肉内投与が一般的に実施されている。より血管が豊富な筋肉内投与の方がデポ抗原による免疫応答増大の可能性があり、皮下/筋肉内投与の比較を実施した。また、注射器内で完全に液状の抗原溶液と注射投与可能な程度の柔らかいゲル状抗原とが惹起する免疫応答に違いが認められるかを検討した。

(3) 人工エラストマーバリエーションの調製と*in vitro*機能解析：破傷風トキソイド抗原への最適化

人工エラストマーはペントペプチドユニットの繰り返し配列VPGXG_nにより構成され、温度に応じた可逆的な体積相転移活性をもつユニークな高分子材料である。その相転移温度は、ゲスト残基：Xaaの疎水性度、ELPの濃度、ペントペプチドの繰り返し数：nの3つのパラメータにより経験的に自由に設定することができる。ゲルの架橋点数・疎水性度・相転移温度などの物理学的パラメータが異なる人工エラストマーバリエーションの成績を比較した。

4. 研究成果

(1) 人工エラストマーの組成・物性と破傷風に対する免疫原性の相関解析

人工エラストマーの組成・鎖長の検討

人工エラストマーでデポ化した破傷風トキソイドをマウスに単回免疫した後、4・6・8・10・14・20週間後に尾静脈より部分採血して血中抗体価を粒子凝集(PA)法により測定し、抗破傷風抗体価の推移を経時的にモニターした。特に、人工エラストマーの*in vitro*薬物放出プロファイル、レオロジー解析で得られる動的粘弾性パラメータとの関係、*in vitro*での浸食耐性およびエラストマーゼ抵抗性との関係に着目して解析し、免疫応答増強に必要な因子の最適な組合せを明らかとした。

至適なトキソイド抗原量の検討

上記の実験結果をふまえ、最も成績の良かった人工エラストマーについて抗原量を変化させてそれぞれマウスに単回投与で免疫し、経時的にマウスの抗体価を測定して、破傷風防御抗体価(0.1~1.0 IU/mL)を誘導できる最適なトキソイド抗原量を決定した。

単回および複数回投与後の特異的抗体価

上述の結果をフィードバックして決定できる最も優れた人工エラストマーと最適な抗原量を用いてマウスに免疫した。平行して同量のトキソイド抗原をアジュバント無、アルミニウムアジュバント沈降破傷風トキソイドの接種群をコントロールとして抗体価を比較・評価を実施した。また、初回免疫後4週間後に追加免疫し、複数回投与の免疫応答について、単回投与群の抗体価の推移をデポ型/非デポ型に着目して比較検討を行った。その結果、プラトーに達した血中抗体価がどのくらい長く維持されるかに関して、免疫後半年以上の長期間にわたり抗体価のモニターを継続し、デポ化効果の免疫応答持続に対する重要な知見を得た。

(2) 投与ルートおよび投与剤形の検討

皮下注と比較して筋注ではトキソイド単独群(プレーン群)の抗体価が上がったが、デポ群では同等かむしろ下がる傾向が認められ、結果としてデポ群とプレーン群との抗体価が小さくなった。この現象は少量体積の投与では抗原デポ形成の高率が下がるためであろうと推察された。人工エラストマーを用いた破傷風トキソイド抗原のデポ評価には筋注よりも皮下注の方が適すると判断された。

(3) 人工エラストマーバリエーションの調製と *in vitro* 機能解析：破傷風トキソイド抗原への最適化

当該助成事業前半に得られた解析結果をフィードバックすることにより、破傷風トキソイドの免疫応答に最適な物性を予測し、その仮説を基に遺伝子工学的手法により新たに人工エラストマーを新たに設計し、大腸菌発現系により調製した。その物性および薬物徐放性などの *in vitro* での機能を解析した。その結果、人工エラストマーの組成はより疎水性の方が、鎖長はより長い方が、投与部位を冷却してゲルを安定化させる方が、抗体の産生・抗体価の持続に有利であることが明らかとなった。一方で、高い力価を誘導する人工エラストマーデポに求められる分子要因を追い求め、「より疎水性・より長鎖」に改変した結果、投与5か月後にもかかわらず皮下に残存してしまうことも判明した。これは、この戦術が人工エラストマーの長所の1つである生分解特性を犠牲にしてしまうことを意味するとともに、デポ中のトキソイドが完全に放出されておらず、十分量のトキソイドにより免疫系が刺激されていない可能性も考えられた。人工エラストマーの「より疎水性・より長鎖」への改変により、相転移温度を下げ動的粘弾性を上げるといふ、こ

れまでの経験則どおりの物性変化が認められた。また、デポからの薬物放出を司るもう1つのパラメータであるゲルの網目サイズを規定する Cys 残基数についての影響を検討したところ、ゲル強度と Cys 残基の配置にトポロジーが厳密に関与していることが示唆された。すなわち、合理的設計とはいえ、単に架橋点を増やすだけでゲル強度、ひいては抗体産生能をコントロールすることはできないことが明らかとなった。今後、系統的な架橋点配置によるトポロジー的解析により、より精密な議論が可能になるであろうと期待される。さらには、投与局所における自然免疫リガンドとの同時刺激効果が特異的抗体産生にどのような影響を及ぼすのかを、抗体価の大小・維持期間に着目して解析した。その結果、投与後に自然免疫リガンドの初期バーストが免疫応答に有効に働く可能性を示唆するデータが得られた。この結果は今後の新たな展開が見込まれる重要な知見として位置付けられた。以上、上述したそれぞれの *in vitro/in vivo* での結果は、本研究課題におけるデポ高機能化のための新たな人工エラストマーの分子設計に役立つ、きわめて大きな発見として位置付けられた。

また一方で、本研究期間内に近赤外光により薬物デポを形成させる手法および、新規抗癌薬としての KSP 阻害剤の *in vitro/in vivo* 解析、疾患細胞ターゲティングのためのペプチド性ツールの開発にも成功した。当該人工エラストマーをデポ型薬物送達プラットフォーム技術として、これら薬物を適用した新規薬物送達システム開発へと繋げていく予定である。

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10件)

1. Asai, D., Murata, M., Toita, R., Kawano, T., Nakashima, H., and Kang, J.H.; Role of amino acid residues surrounding the phosphorylation site in peptide substrates of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2). *Amino Acids*, 48, 2875-2880 (2016)(査読有) DOI: 10.1007/s00726-016-2345-6
2. Mukerji, R., Schaal, J., Li, X., Bhattacharyya, J., Asai, D., Zalutsky, M.R., Chilkoti, A., and Liu, W.; Spatiotemporally photoradiation-controlled intratumoral depot for combination of brachytherapy and photodynamic therapy for solid tumor, *Biomaterials*, 79, 79-87 (2016) (査読有) DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.064.
3. Kim, C.W., Asai, D.(shared 1st. Author), Kang, J.H., Kishimura, A., Mori, T., and Katayama, Y.; Reversal of efflux of an anticancer drug in human drug-resistant breast cancer cells by inhibition of protein

- kinase Ca (PKCa) activity, *Tumor Biol.*, 37, 1901-1908 (2016) (査読有)
DOI: 10.1007/s13277-015-3963-4.
4. Takenaga, M., Yamamoto, Y., Takeuchi, T., Ohta, Y., Tokura, Y., Hamaguchi, A., Asai, D., Nakashima, H., Oishi, S., and Fujii, N.; Potential new chemotherapy strategy for human ovarian carcinoma with a novel KSP inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 463, 222-228 (2015) (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.029.
 5. Funamoto, D., Asai, D., Sato, K., Yamaguchi, Y., Kim, C.W., Sato, H., Nakhaei, E., Matsumoto, S., Yoshikawa, T., Sasaki, K., Yamamoto, T., Kishimura, A., Mori, T., and Katayama, Y.; Antibody internalization into living cell via crosslinker-mediated endocytosis, *Chem. Lett.*, 44, 468-470 (2015) (査読有)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1246/cl.141157>
 6. Funamoto, D., Asai, D., Kim, C.W., Nakamura, Y., Lee, E.K., Nobori, T., Niidome, T., Mori, T., and Katayama, Y.; Tandemly repeated peptide for cancer-specific gene carrier prepared by native chemical ligation, *Chem. Lett.*, 44, 474-476 (2015) (査読有)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1246/cl.141121>
 7. Murata, M., Piao, J.S., Narahara, S., Kawano, T., Hamano, N., Kang, J.H., Asai, D., Ugawa, R., and Hashizume, M.; Expression and characterization of myristoylated preS1-conjugated nanocages for targeted cell delivery, *Protein Expr. Purif.*, 110, 52-56 (2015) (査読有)
DOI: 10.1016/j.pep.2014.12.001.
 8. Kang, J.H., Asai, D., Toita, R., Kawano, T., and Murata, M.; Monitoring of phosphorylated peptides by radioactive assay and matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry., *Amino Acids*, 47, 2277-2383 (2015) (査読有)
DOI: 10.1007/s00726-015-2025-y.
 9. Asai, D., Toita, R., Murata, M., Katayama, Y., Nakashima, H., and Kang, J.H.; Peptide substrates for G protein-coupled receptor kinase 2, *FEBS Lett.*, 588, 2129-2133 (2014) (査読有)
DOI: 10.1016/j.febslet.2014.04.038.
 10. Kang, J.H., Toita, R., Asai, D., Yamaoka, T., and Murata, M.; Liver cell-specific peptides derived from the preS1 domain of human hepatitis B virus, *J. Virol. Methods*, 201, 20-23 (2014) (査読有)
DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.02.013.

[学会発表](計9件)

1. 武永美津子、竹内智起、山本有貴、都倉享恵、新美純、濱口明美、太田有紀、浅井大輔、大石真也、中島秀喜、藤井信孝; 新規

合成 KSP 阻害剤のヒト卵巣がんに対する抗腫瘍効果, 日本薬学会第 136 年会、横浜 (2016. 3.26-29)

2. 姜貞勲、戸井田力、浅井大輔、村田正治; マクロファージを選択的に認識する機能性ナノ分子の創製, 第 88 回日本生化学大会/第 38 回日本分子生物学会 合同大会 (BMB2015) 神戸 (2015. 12.1-4)
3. 福田靖、浅井大輔、山口優子、諸熊一則、Ashutosh Chilkoti, 中島秀喜、柴山恵吾; 破傷風トキソイドを用いた人工エラスチン蛋白のアジュバントとしての可能性, 第 19 回日本ワクチン学会学術集会、名古屋 (2015. 11.14,15)
4. 浅井大輔、金本大成、寺久保繁美、Ashutosh Chilkoti、武永美津子、中島秀喜; インジェクタブル人工エラスチンゲルによる抗 HIV ペプチドのデポ製剤化, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会、京都 (2015. 11.9,10)
5. 浅井大輔、福田靖、諸熊一則、Ashutosh Chilkoti、柴山恵吾、中島秀喜; インジェクタブル人工エラスチンによる抗原デポ剤: 破傷風トキソイドの徐放効果の解析, 第 31 回日本 DDS 学会学術集会、東京 (2015. 7.2,3)
6. 浅井大輔、戸井田力、土谷享、村田正治、片山佳樹、姜貞勲、中島秀喜; ケミカルバイオロジー分子ツールの開発: ROCK2 および GRK2 選択的ペプチド性基質, 第 87 回日本生化学大会、京都 (2014. 10.15-18)
7. 船本大起、パクサウン、森健、浅井大輔、岸村顕広、佐藤一紀、山口容子、片山佳樹; 内在性 IgG により細胞傷害を誘導できるペプチド性化合物の作製, 第 30 回日本 DDS 学会学術集会、東京 (2014. 7.30,31)
8. 武永美津子、竹内智紀、都倉享恵、濱口明美、山本有貴、太田有紀、浅井大輔、中島秀喜、大石真也、藤井信孝; 新規 KSP 阻害剤の抗腫瘍効果に関する研究(第 2 報), 第 30 回日本 DDS 学会学術集会、東京 (2014. 7.30,31)
9. 船本大起、パクサウン、森健、浅井大輔、岸村顕広、佐藤一紀、山口容子、片山佳樹; 内在性の IgG により細胞毒性を誘導できるペプチド性化合物の開発, 第 63 回高分子学会年次大会、名古屋 (2014. 5.28-30)

[図書](計0件)

・該当なし

[産業財産権]

・該当なし

[その他]

ホームページ等

教室ホームページ

(抗微生物薬の送達手法開発)

<http://www.marianna-u.ac.jp/microbiol>

ogy/office/003334.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 大輔 (ASAI, Daisuke)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号：10423485

(2) 研究分担者

福田 靖 (FUKUDA, Tadashi)
国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究
官
研究者番号：80270651

(3) 連携研究者

片山 佳樹 (KATAYAMA, Yoshiki)
九州大学・工学部・教授
研究者番号：70284528

(4) 研究協力者

諸熊 一則 (MOROKUMA, Kazunori)
柴山 恵吾 (SHIBAYAMA, Keigo)