

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06366

研究課題名（和文）ウイルス様ナノ粒子によるアジュバントの体内動態制御と感染症ワクチンへの展開

研究課題名（英文）Virus Like Nano-Particle as the delivery tool of vaccine adjuvant

研究代表者

高橋 秀樹 (Takahashi, Hideki)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員（常勤）

研究者番号：20754906

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ペプチド分子から構成されるウイルス様ナノ粒子（Virus Like Nano-Particle：VLNP）を免疫賦活化剤（アジュバント）の送達キャリアとして用いることで、新たなワクチン開発の基盤技術構築を図った。臨床でも期待されるCpGオリゴを用いて検討したところ、VLNPはCpGオリゴのアジュバント活性を、in vitro、in vivoにおいて増強可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Here we tried to examine the potential of Virus Like Nano-Particle (VLNP) as the delivery tool of vaccine adjuvant. We showed that CpG oligo-modified VLNP enhanced the adjuvant activity of CpG oligo in vitro and in vivo.

研究分野：医療系薬学

キーワード：ワクチン アジュバント

1. 研究開始当初の背景

昨今のエボラ出血熱やデング熱の猛威、近年の新型インフルエンザのパンデミックや結核等の再興からも明らかなように、病原性ウイルス・細菌による感染症は未だ、ヒトの健康維持における圧倒的脅威となっている。その点、最強で最善の予防・治療手段であるワクチンの開発が、感染症の克服に向けてのキーポイントとなっているものの、ワクチンの存在しない感染症や、ワクチンが存在しても効果が不十分なものも多数存在している。そのため、感染症に対するワクチン開発は、世界規模での、医療薬学における最重要課題といっても過言ではない。現在のワクチン開発においては、従来までの、弱毒株などを用いる生ワクチンから、安全性を重視し、病原体そのものではなく、病原体由来の蛋白質やペプチドを抗原として用いたワクチン開発に期待が寄せられている。しかし、蛋白質やペプチドを単独で投与しても、病原体に対する防御免疫を十分に誘導できないことから、適切な免疫賦活化剤（アジュバント）の開発が急務となっている。一方で、*in vitro* で強力な免疫賦活化作用を有するアジュバントは多数存在するものの、標的組織・細胞となるリンパ節（免疫細胞が多数存在）や樹状細胞（ワクチン効果に中心的役割を果たす）といった免疫担当細胞への移行性の乏しさから、十分なワクチン効果を誘導できていない現状にある。さらには、標的としない組織への移行により、予期しない炎症を惹起してしまう懸念も生じている。事実、子宮頸がんワクチン接種による副作用（疼痛症候群）の原因がアジュバントに起因するという仮説も相俟って、ワクチンの安全性（ワクチンリスク）への懸念が高まる今日、如何に、アジュバントの体内動態を制御し、有効性のみを担保しつつ、副作用を低減するかといった課題の克服が世界的急務となっている。

申請者はこれまでに、非生分解性であるために薬物送達キャリアには不適なもの、粒子径を厳密に制御できる点から、非晶質シリカなどをモデル粒子として使い、粒子径と体内動態の連関を精査してきた。その結果、粒子径 100 nm 以下のナノサイズのナノ粒子が、100 nm 以上の粒子と比較して、皮内投与後に、リンパ節への移行性が顕著に上昇すること、さらに、樹状細胞といった抗原提示細胞に効率良く取り込まれることを明らかとしてきた。本知見は、ナノ粒子を送達キャリアに用いることで、アジュバントをリンパ節さらには樹状細胞へ効率的に送達し得ることを先駆けて見出したことに他ならない。一方で、非生分解性の素材は、体内への蓄積といった安全性の観点から、アジュバント送達キャリアとしては適さない。また生分解性の素材に

ついては、一部の例外を除き、ナノサイズでの粒子径制御が困難な状況にある。そこで我々は、ウイルス粒子の多くが 100 nm 以下に制御されていることに着目し、ウイルスの外殻蛋白質をアジュバント送達キャリアとして適用するという着想に至った。

トマトブッシュスタントウイルスの外殻蛋白質由来ペプチド(24 残基から構成:以下、自己会合ペプチドと略す)は、水中で自己会合することで、直径 50nm のウイルス様ナノ粒子 (Virus Like Nano-Particle: VLNP) を形成することが、共同研究者である鳥取大学・松浦先生により見出されている (Angew Chem Int Ed Engl. 2010)。VLNP の内腔側は、正電荷を帯びているため、負電荷を有する化学物質・生体分子と混合するだけで、簡便に VLNP 内に封入可能であることが示されている (Polymer Journal. 2013) と共に、自己会合ペプチドに予め生体分子を結合させてから自己会合させることで、VLNP 表面にも生体分子を提示させることも可能であると考えられる。さらに、VLNP はペプチド由来であることから、目的分子を標的細胞に送達した後は、速やかに分解されるなど、安全性の観点からも優れており、アジュバント送達キャリアとして有用な特性を有していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、申請者のこれまでのナノ粒子の体内動態に関する独自知見に、共同研究者の開発した VLNP を融合し、ワクチン開発における致命的問題点である、アジュバントの体内動態（リンパ節や免疫細胞への送達効率の乏しさ）が改善されたアジュバント含有 VLNP を創製し、感染症に対するワクチン開発の基盤構築を図った。なお、アジュバントとしては主に、CpG オリゴ (TLR9 リガンド) を用いた。

3. 研究の方法

CpG オリゴ修飾 VLNP の作製

CpG オリゴを結合させた自己会合ペプチド (CpG-自己会合ペプチド) を滅菌蒸留水で溶解した後、超音波処理し、24 時間 25 °C で反応させることで、CpG オリゴ修飾 VLNP を作製した。

in vitro における活性評価

マウス骨髄由来樹状細胞 (FLT3-Ligand で 1 週間培養) を 96 穴プレートに播種し、CpG オリゴおよび CpG オリゴ修飾 VLNP を加え、24 時間培養した。その後、培養上清中のサイトカイン量を ELISA により測定した。

in vivo における活性評価

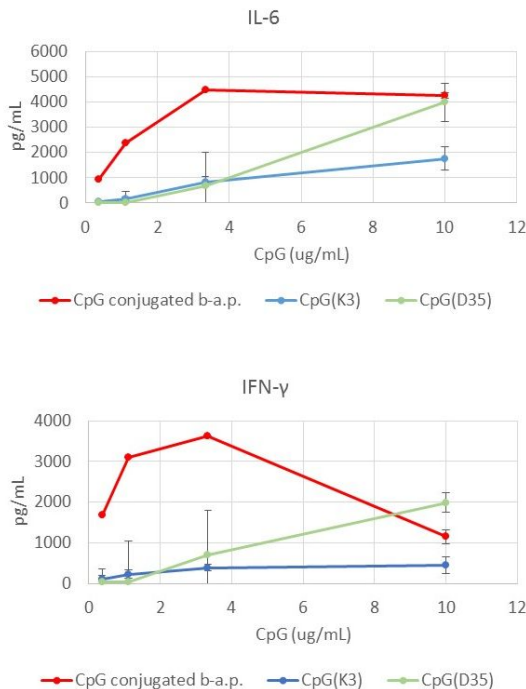
マウスに、ニワトリ卵白アルブミン (OVA) と共に、CpG オリゴもしくは CpG オリゴ修飾 VLNP を投与し、7日後にリンパ節を回収した。その後、FACS により OVA 特異的細胞傷害性 T 細胞をテトラマーアッセイで測定した。

4. 研究成果

CpG オリゴ修飾 VLNP の作製

CpG オリゴを結合させた自己会合ペプチド (CpG-自己会合ペプチド) は、鳥取大学工学部・松浦先生に化学合成頂いた。CpG-自己会合ペプチドを、種々濃度でリン酸バッファーやイオン交換水に懸濁することで、CpG オリゴ修飾 VLNP の創製を試みた。その結果、最適条件で懸濁することで、粒子径 20-100 nm のナノ粒子を形成することが透過型電子顕微鏡解析により判明した。一方で、2 次粒子径は数百ナノメートルとなることから、単分散ではなく、若干凝集した状態で存在する可能性が考えられた。今回用いた CpG は蛋白質などに結合しやすい特性を有していることから、そのような凝集が観察されたものと推察している。一方で、凝集が活性に影響しないものと考え、*in vitro* における活性を評価した。

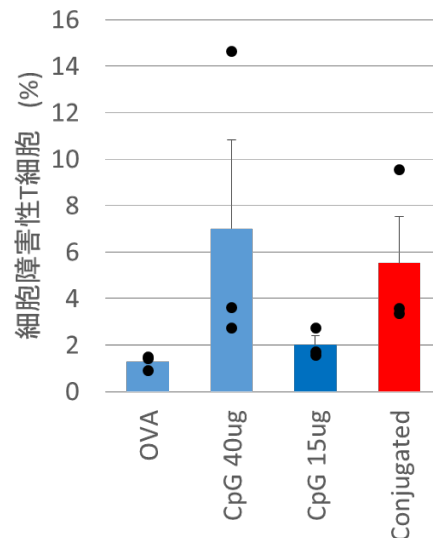
in vitro における活性評価



マウス骨髄より分化誘導した樹状細胞を用い、CpG オリゴ修飾 VLNP の活性を *in vitro* で評価した。CpG オリゴは形質細胞様樹状細胞に作用することが知られていることから、形質細胞様樹状細胞をも分化誘導可能な系

を用いた。樹状細胞に CpG オリゴ単独もしくは CpG オリゴ修飾 VLNP を添加した後、培養上清中のサイトカイン量を測定した。その結果、CpG オリゴ修飾 VLNP 添加群において、CpG オリゴ単独添加群と比較し、IL-6 や IFN- γ の産生増強が観察された。CpG オリゴ修飾 VLNP は、非常に低濃度において、これらサイトカインを産生可能であることが示された。一方で、IL-12 や IFN- α については産生増大は観察されなかった。以上の結果から、CpG オリゴ修飾 VLNP は、CpG オリゴのアジュバント活性を増強可能であることが示された。一方で、そのメカニズムについての詳細は不明である。細胞内への取り込みが増強した可能性、細胞内における動態が変化した可能性などが考えられ、今後、蛍光標識した CpG オリゴ修飾 VLNP を用いた解析が必要と考えられた。

in vivo における活性評価



次に、モデル抗原として OVA を用い、CpG オリゴ単独もしくは CpG オリゴ修飾 VLNP と共にマウスに投与し、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の誘導効率をテトラマーアッセイにより評価した。CpG オリゴは、40 μ g/マウスもしくは 15 μ g/マウスで投与し、CpG オリゴ修飾 VLNP は、15 μ g CpG/マウスで投与した。その結果、CpG オリゴ修飾 VLNP 投与群において、同量の CpG オリゴ投与群と比較して、高い CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の誘導が観察された。その強度は、約 3 倍量の CpG オリゴ投与群とほぼ同等であった。以上の結果から、CpG オリゴ修飾 VLNP は *in vivo* においても、CpG オリゴのアジュバント活性を増強可能であることが示された。

一方で、*in vitro* におけるサイトカイン産生増強効果を鑑みると、*in vivo* における効果は限定的と考えられた。その要因は、CpG

オリゴ修飾 VLNP の生体内における安定性に起因する可能性も考えられる。そのため、今後、安定性向上を目指した検討も必要と考えられる。我々も、CpG オリゴ修飾 VLNP の安定性を向上させようと幾つかの試みを検討したが、CpG オリゴ修飾 VLNP の活性を維持しつつ、安定性を向上可能な方法論の確立には至らなかった。また、細胞内・体内における動態解析も重要となろう。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Hideki Takahashi, Kazuki Misato, Taiki Aoshi, Yasuo Yoshioka. Development of a biodegradable nanoparticle as vaccine delivery system. 第45回日本免疫学会学術集会. 2016年10月11-13日. 沖縄コンベンションセンター(沖縄)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 秀樹(Hideki Takahashi)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号: 20754906

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

吉岡 靖雄(Yasuo Yoshioka)

三里一貴(Kazuki Misato)