

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12540

研究課題名(和文) 粘膜ワクチンに資する有効かつ安全なナノDDSキャリア開発への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to develop safety and effective nano-carriers for contributing to creation of mucosal vaccine

研究代表者

堤 康央 (Tsutsumi, Yasuo)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：50263306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ワクチン開発における、抗原送達法の欠如の克服に焦点を絞り、これまでにナノキャリアとしての可能性を見出してきた非晶質ナノシリカをリード素材として、粒子径などの物性-動態-有効性・安全性の関連情報の新規集積を図り、有効性・安全性に優れたナノキャリアの開発を試みてきた。その結果、各種シリカを抗原と経鼻曝露することで、全身面において、粒子径50 nmをピークとした、抗原特異的な免疫応答を誘導し得ることが示された。本研究結果に基づき、低侵襲的に鼻粘膜バリアをすり抜け、粘膜免疫担当細胞・組織に効率良く抗原送達可能な粘膜ワクチン用のナノキャリアを開発し得る基盤情報を提供し得るものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We have attempted to develop nano-carriers that are superior in effectiveness and safety by aiming at new accumulation of linkage information among the physical properties such as particle size, biokinetics, and their efficacy and safety. In this study, focusing on overcoming the lack of antigen delivery methods in vaccine development, we used amorphous silica nanoparticles, which has been found possibilities as nano-carriers so far, as a lead material. As a result, it was shown that antigen-specific immune response could be induced by exposing to antigen with various silica nanoparticles via intranasal treatment. And a peak was observed in the group treated with silica nanoparticle with diameter of 50 nm. Based on the results of this research, it is expected to be able to provide infrastructure information that can develop nano-carriers for mucosal vaccines.

研究分野：ナノ安全科学

キーワード：ナノ粘膜ワクチン ワクチンリスク

1. 研究開始当初の背景

昨今の新型インフルエンザパンデミックに加え、最近のエボラ出血熱、デング熱の流行でも明らかのように、先進国・途上国を問わず、未だに新興・再興感染症は、ヒト健康への圧倒的脅威である。そのため、世界保健機関 (WHO) も提唱しているように、有用な予防・治療手段であるワクチンの開発が、新興・再興感染症の克服に向けてのキーポイントとなっており、このことは、近年のメガファーマ等によるワクチン開発競争の激化からも明らかである。しかし、未だ対応するワクチンが無い感染性病原体 (ウイルス・細菌など) や、あったとしても有効性や安全性で決定的な問題を抱えたワクチンしかないものも数多く残されている。このワクチン開発が遅々として進まない最大の要因は、「病原体由来の抗原を如何に効率よく免疫担当細胞へと送達し、如何に安全かつ効果的に抗原特異的免疫応答 (体液性免疫・細胞性免疫) を惹起するか」というシンプルな課題を未だ解決できていないことにある。

そこで本研究では、「抗原送達法の欠如」の克服に焦点を絞り、簡便性や QOL に優れた経鼻粘膜ワクチンの創出を目指す。具体的には、これまでにナノ DDS キャリアとしての可能性を独自に示してきた非晶質ナノシリカをリード素材として、粒子径や表面電荷などの物性・動態・有効性・安全性の連関情報の新規集積を図り、有効性・安全性に優れたナノ DDS キャリアの開発を試みた。さらには、有効性 (ワクチン効果) のみならず、ほとんど検討がなされてこなかった安全性にも着眼し、ワクチンリスクの低減した経鼻粘膜ワクチンナノ DDS キャリアの創出を図ってきた。これまでのワクチン開発においては、治療効果に重点が置かれ、安全性評価・対策が十分でなかった。従って本研究は、国内外を問わず、殆ど手が付けられていないワクチンリスクの解析と安全確保にも重点を置き、有効なのは当然ながら、安全性が高度に確保されたナノ DDS キャリアを開発していく点で大きな特徴を持つものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、有効で、しかも安全な経鼻粘膜ワクチン用のナノ DDS キャリアの創出を目指し、日本薬局方収載で、医薬品・食品添加物・化粧品基材としても利用されている非晶質ナノシリカについて、様々な粒子径や表面物性の異なるナノシリカをキャリアとして適用し、物性・動態・ワクチン効果・安全性の連関情報を集積し、これら情報をもとに、抗原を安全かつ効果的に経鼻粘膜吸収させ、免疫担当細胞へと効率よく送達できるナノ DDS キャリアの探索を試みた。具体的には、最適なナノ DDS キャリアの開発に資する基盤情報の収集・追求を目的に、

種々の物性のナノシリカを用い、物性-有用性連関を検討しつつ、ナノ DDS キャリアの有用性 (抗原送達性や免疫活性化作用、免疫誘導特性等) を解析した。また、免疫活性化の点で有用なナノ DDS キャリアを粒子設計するための情報収集を目的に、モデル抗原 (OVA) と共にマウスへ経鼻投与し、全身性の抗原特異的 IgG 産生や抗原特異的ヘルパー T 細胞 (Th1/Th2/Th17 細胞バランス等)・細胞傷害性 T 細胞の誘導特性の評価を図った。その際、小児・妊婦など、あらゆる世代が安全に使用できるよう、粘膜免疫・自然免疫・抗原特異的な体液性/細胞性免疫を介した感染防御活性 (有効性) のみならず、ワクチンリスクをも精査し、ベネフィット-リスク連関に優れた『ナノ DDS キャリア』の開発を試みた。

3. 研究の方法

非晶質シリカ

各粒子は、Micromod Partikeltechnologie (Rostock/Warnemünde, Germany) より購入した。粒子径 30 nm、50 nm、70 nm、100 nm、300 nm、1000 nm の非晶質シリカをそれぞれ nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000 と表記した。また、FITC 標識を施した各粒子をそれぞれ FITC-nSP30、FITC-nSP50、FITC-nSP70、FITC-nSP100、FITC-nSP300、FITC-mSP1000 と表記した。これらは 5 分間のソニケーションと 1 分間のボルテックスをした後、実験に供した。

実験細胞

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞には、56、30 分間の非働化処理を行った 10% ウシ胎児血清 (FBS; GIBCO, Japan)、1% 抗生物質 (Anti-Anti; Gibco; CA, USA) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; Osaka, Japan) を用い、37、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で培養した。

Flow cytometry

RAW264.7 細胞を 1×10^5 cells/mL となるように播種した。1 μ g/mL に調製した各種 FITC 修飾非晶質シリカ粒子を 6 時間、もしくは、OVA あるいは BSA と非晶質シリカを混和した溶液 (各々の終濃度 1 μ g/mL) を 24 時間作用させた後、Trypsin/EDTA を 400 μ L/well、培地を 800 μ L/well 加えて、400g、5 分間遠心した。上清を捨て、300 μ L の FACS buffer (2% FBS/PBS) で細胞を再懸濁して、解析に供した。

実験動物

BALB/c マウス (雌性、6 週齢) は日本清水実験材料から購入した。本研究における動物の飼育および実験は大阪大学の実験動物施設にて実施し、大阪大学動物実験規定に準じて行った。

血液サンプルの回収

BALB/c マウスに、PBS で 25 mg/mL に調製した非晶質シリカ分散液 (nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000) を、2 mg/mL OVA と同じ量混合して、それぞれ 20 μ L ずつ (20 μ g/mouse) 三日連続経鼻投与し、投与 21 日後に心臓採血により血液を回収した。

血清中 OVA 特異的抗体能の評価

50 mM Bicarbonate Buffer に溶解させた OVA を ELISA プレートに加え、4 度で一晩静置し固相した。PBS で 1/2 希釈したブロックエースを 200 μ L/well 添加して 37 度で 2 時間ブロッキングした。PBS で 1/2 希釈したブロックエースを用いて回収した血清を 10 段階希釈し、50 μ L/well で添加し、室温で 2 時間反応させた。これらのプレートを 0.05% Tween 含有 PBS あるいは、0.05% Tween 含有 TBS (Tris-buffered saline) で洗浄後、PBS で 1/2 希釈したブロックエースを用いて各濃度に調製した horseradish peroxidase (HRP) 標識 goat anti-mouse IgG Ab (Southern Biotech, Birmingham, Alabama) を希釈し、50 μ L/well で添加し (IgG: 1/5000) 室温で 2 時間反応させた。その後、TMBZ 基質液を各ウェルに添加し、2N H₂SO₄ を添加したことにより発色反応を停止させ、測定波長 450 nm、参考波長 690 nm における吸光度を測定した。OVA 特異的 IgE 量を DS Mouse IgE ELISA kit (DS Pharma Biomedical) のプロトコールに準じて測定した。

4. 研究成果

体内・細胞内動態制御の観点での、最適な抗原送達キャリアとしてのナノシリカの探索

最適なナノ DDS キャリアの開発に資する基盤情報の収集・追求を目的に、粒子径の異なる 4 種類の非晶質ナノシリカ、および 2 種類のサブミクロンサイズの非晶質シリカを用い、免疫担当細胞へのモデル抗原の取り込み量を指標に、体内・細胞内動態制御の観点で、最適な抗原送達キャリアとしてのナノシリカの探索を試みた。粒子径 30 nm、50 nm、70 nm、100 nm のナノサイズの非晶質シリカである nSP30、nSP50、nSP70、nSP100 と、300 nm、1000 nm のサブミクロンサイズの従来型シリカである nSP300、mSP1000 を用い、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞に対し、各シリカを単独で作用させた際の取り込み量を評価した。なお、データには示していないが、本検討で用いた各シリカは、本作用条件下において、細胞に対し障害性は示さないことを確認している。Flow cytometry の結果、いずれの粒子も細胞内に取り込まれることが明らかになると共に、

作用 6、24 時間後いずれにおいても、粒子径の増加に伴い、細胞内への取り込み量が多くなることが示された (Fig. 1)。

次に、FITC 修飾を施した各シリカ粒子とモデル抗原である鶏卵白アルブミン (OVA) あるいはウシ血清アルブミン (BSA) と予め等量混和した後、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞に 24 時間作用した際の細胞内への OVA (Fig. 2a) あるいは BSA (Fig. 2b) の移行量を Flow cytometry により解析した。その結果、いずれの粒子と共処置した群においても、各蛋白質を単独で処置した際と同等の細胞内への移行が認められた。今後、表面性状の異なる種々のナノシリカも用いることで、物性-細胞内取り込みの連関を検討しつつ、ナノ DDS キャリアとしての有用性について解析を進めていく必要がある。

粘膜ワクチン用の新規ナノ DDS キャリアの探索

次に、免疫活性化の点で有用なナノ DDS キャリアを粒子設計するための情報収集を目的に、各非晶質シリカをモデル抗原である OVA と共に経鼻投与した際の抗原特異的免疫応答を in vivo で評価した。各シリカ (nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000) を OVA と共に 3 日間経鼻投与した後、最終投与から 3 週間後に血清を回収し、各抗原特異的抗体価を測定した。まず、血清中の OVA 特異的 IgG の抗体価を測定したところ、OVA 単独投与群ではほとんど認められなかった。一方で、OVA とシリカの共投与群では、nSP50 投与群における抗体価の上昇をピークに、粒子径の微小化に伴う IgG の顕著な産生量増大が観察された。しかし、nSP30 投与群では、OVA 特異的 IgG の産生増大は認められなかった (Fig. 3a)。また、花粉症や喘息などの型アレルギー発症の起点となる、血清中の OVA 特異的 IgE の産生量を測定した。その結果、OVA 単独投与では、OVA 特異的 IgE の産生は認められなかった。さらに、OVA とシリカの共投与群においても、その産生は殆ど認められなかった (Fig. 3b)。以上の結果から、シリカは抗原と経鼻曝露することで、全身面において、粒子径 50 nm をピークとした、抗原特異的免疫応答を誘導し得ることが示された。今後、本研究結果を踏まえ、「ナノシリカの物性」-「体内・細胞内動態」-「ワクチン効果」の連関解析を図ることで、最適な抗原送達キャリアとしてのナノシリカの探索を進めていく。

本研究成果は、経鼻投与後の、ナノシリカの物性-動態-ワクチン効果・安全性との連関情報を集積することで、低侵襲的に鼻粘膜バリアをすり抜け、粘膜免疫担当細胞・組織に効率良く抗原送達可能な粘膜ワクチン用のナノ DDS キャリアを開発し得る基盤情報を提供し得ることが期待される。

即ち、本研究は、我が国発の理想的なワクチン創成基盤技術の開発につながるなど、社会ニーズの観点でも、国民の健康確保への貢献、産業界への波及効果は計り知れず、生体医工学・生体材料学領域の基礎～臨床を発展させると共に、他の追随を許さない創薬シーズ(ワクチン)を提供し、産業界に競争力を与え、新興・再興感染症の脅威とワクチンリスクに対する社会懸念の払拭に資するものと期待される。

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. Yoshida T., Yoshioka Y., Morishita Y., Aoyama M., Tochigi S., Hirai T., Tanaka K., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Protein corona changes mediated by surface modification of amorphous silica nanoparticles suppress acute toxicity and activation of intrinsic coagulation cascade in mice., *Nanotechnology.*, 26(24):245101, 2015.
2. Handa T., Hirai T., Izumi N., Eto S., Tsunoda S., Nagano K., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Identifying a size specific hazard of silica nanoparticles after intravenous administration and its relationship to the other hazards that have negative correlations with the particle size in mice., *Nanotechnology.* 28(13):135101, 2017.
3. Nishijim N., Hirai T., Misato K., Aoyama M., Kuroda E., Ishii K., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Human scavenger receptor A1-mediated inflammatory response to silica particle exposure is size-specific., *Front. Immunol.*, 8:379, 2017.

〔学会発表〕(計5件)

1. 堤 康央: ナノマテリアルの安全性研究の現状と今後., 大阪府立公衆衛生研究所創立記念講演会., 大阪府立公衆衛生研究所(大阪府大阪市)., 2015年11月26日.
2. 青山道彦, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 石本里緒, 平井はるな, 新井由之, 永井健治, 堤 康央: ナノマテリアルの細胞内運動とエンドソームによる輸送の連関解析., 日本薬学会第136年会., パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016年3月27-29日.

3. 青山道彦, 石本里緒, 平井はるな, 長野一也, 斎藤 滋, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 堤 康央: オートファジーの阻害がナノマテリアルの細胞内移行に与える影響評価., 第43回日本毒性学会学術年会., ウィンクあいち(愛知県名古屋市), 2016年6月29日-7月1日.
4. 平井はるな, 東阪和馬, 青山道彦, 新井由之, 石本里緒, 長野一也, 永井健治, 吉岡靖雄, 堤 康央: 細胞内におけるナノ粒子の運動性解析., 第43回日本毒性学会学術年会., ウィンクあいち(愛知県名古屋市), 2016年6月29日-7月1日.
5. 衛藤舜一, 東阪和馬, 半田貴之, 和泉夏実, 桑形麻樹子, 齋藤 滋, 長野一也, 堤 康央: 非晶質ナノシリカは、獲得免疫系を介してその急性毒性を増悪する., 日本薬学会第137年会., 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2017年3月25-27日.

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

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

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

長野一也(Nagano Kazuya)、東阪和馬(Higashisaka Kazuma)、橋野修代(Hashino Nobuyo)

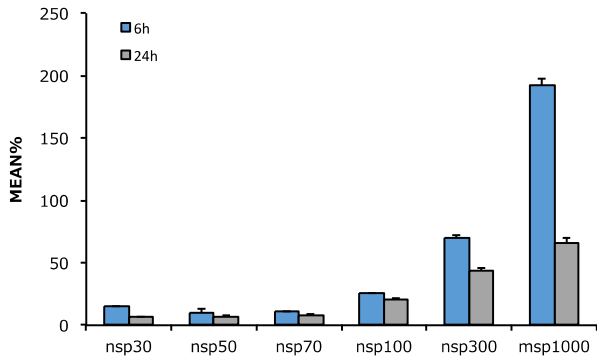


Fig. 1. Raw264.7 細胞に対する非晶質シリカの取り込み量の評価

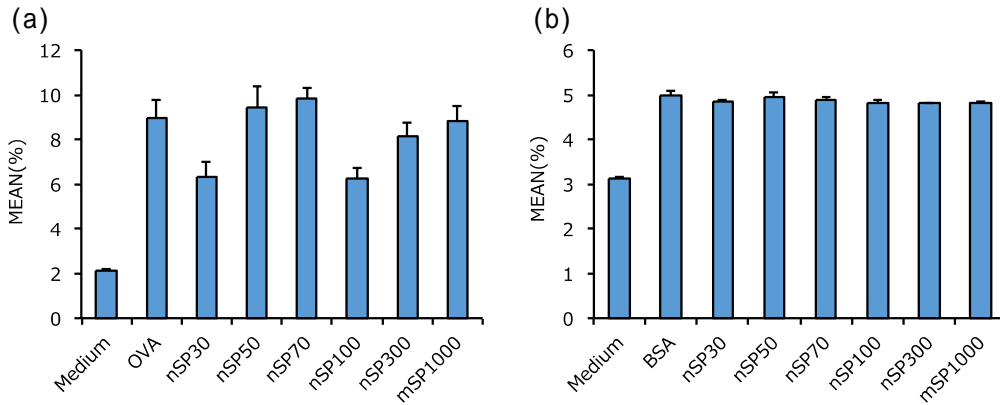


Fig. 2. Raw264.7 細胞へのモデル抗原 (a; OVA、b; BSA) の取り込み量を指標とした、非晶質シリカのナノ DDS キャリアとしての有用性評価

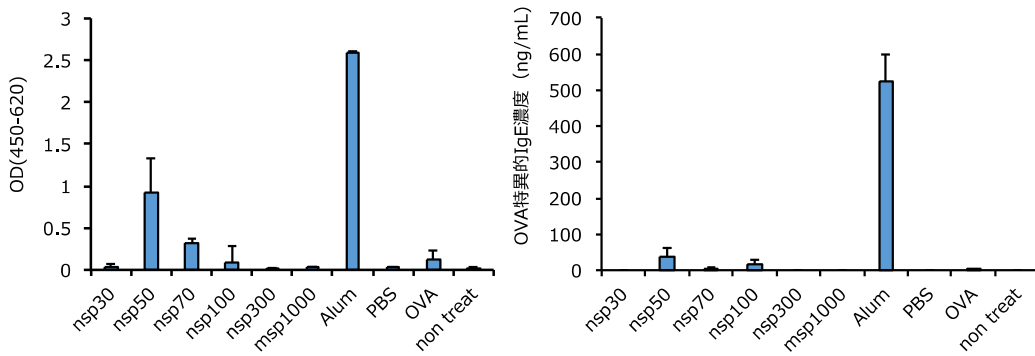


Fig. 3. 非晶質シリカとモデル抗原 OVA を経鼻に共投与した際の抗原特異的免疫応答の解析 (a; 抗原特異的 IgG、b; 抗原特異的 IgE)