

令和元年6月4日現在

機関番号：32407

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03822

研究課題名(和文) B細胞表面での分子認識制御によるユニバーサルナノワクチンの創製

研究課題名(英文) Development of universal nanovaccines based on controlled molecular recognition on the surface of B cells

研究代表者

新倉 謙一 (Niikura, Kenichi)

日本工業大学・基幹工学部・教授

研究者番号：40360896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ材料を使うことで免疫応答を制御した新しいワクチンの開発を目指した。そのためにナノ粒子と細胞との相互作用を調べ、ワクチンとしての展開まで行った。プレート状と球状金ナノ粒子を比較すると、粒子の大きさに対する細胞取り込み効果が逆転することを見つけた。さらに、インフルエンザウイルス経鼻ワクチンにおける免疫賦活剤として、ロッド状と球状粒子を比較すると、ロッド状の方が優れていた。ナノ粒子でワクチンを設計する際には、粒子サイズや形状の要因が重要であることがわかった。新たなワクチン設計として、抗原の粒子表面への配向制御固定化のための表面分子合成も進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々なウイルスへの接触機会が増えている現在、ワクチンの重要性がより大きくなっている。ナノ材料と抗原を組み合わせることで、安全で効果の高いワクチンの設計に加え、遺伝子の変異したウイルスにも有効な新しいワクチン設計を生み出す可能性がある。このために重要になるのが、ナノ粒子の大きさ・形・抗原の配向固定化であると考えている。本研究により、それら要因の重要性を実証することで、新たなワクチン開発につなげることを狙っている。

研究成果の概要(英文)：Our aim is creating new nanoparticle-based vaccines by controlling the immune responses. For this purpose, we investigated the interaction between nanoparticles and cells, and applied nanoparticles as vaccines. Comparison of plate and spherical gold nanoparticles showed a reverse size dependency in terms of cellular uptake. Gold nanorods showed the enhanced adjuvanticity as intranasal influenza vaccines compared to spherical nanoparticles. Our data indicates that a choice of the shape and size is the important factor to induce target immune-responses. As a new nanoparticle-based vaccine design, the surface ligands were synthesized for controlling the orientation of immobilized antigen proteins.

研究分野：コロイド化学

キーワード：ナノサイエンス ワクチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナノ材料により医療やバイオ研究に貢献するナノバイオの領域が広く認知され発展してきている。ただナノ材料といっても使う材料の素材・大きさ・形状といった要因が細胞や組織との相互作用に重要であることが報告されはじめてきた。私たちは2013年に金ナノ粒子に抗原を固定化し、それらの形状や大きさがワクチンとしての効果に影響を与えることを報告した (Niikura et al, *ACS Nano*, 2013, 7, 3926-3938)。しかしナノ粒子を使ったワクチン応用を目指すには、粒子のサイズ・形状のより一般的な効果を明らかにするだけでなく、固定化する抗原の配向性効果についても明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ナノ粒子をワクチンとして応用するにあたりナノ粒子に固定化する抗原の配向性効果について明らかにすることが大きな目的である。さらにワクチンの効果に及ぼす粒子のサイズ・形状効果の一般性についても明らかにしていく。具体的には次の2つの目的に従って研究を進めた。

(1) 細胞取り込みにおけるサイズ・形状の効果の評価 (一般化) :

ワクチンへの応用を見据えて、ナノ粒子の形状・サイズが細胞との相互作用に及ぼす効果を明らかにする。

(2) ナノ粒子のワクチンへの展開 :

- a: ナノ粒子の形状・サイズがインフルエンザワクチンの効果に及ぼす効果を、核酸(アジュバント)と粒子の複合体を使って明らかにする。
- b: 金ナノ粒子への抗原タンパク質の配向制御固定化法を開発し、それらのワクチンの効果を明らかにする。

3. 研究の方法

研究目的 (1) の方法 : 我々は三角形プレート金ナノ粒子と球状金ナノ粒子の細胞への取り込み量を比較した。平面部分を有する三角形プレートは同じ体積の球状粒子よりも多くの抗原タンパク質を細胞内に送り込むことができる可能性がある。また光吸収波長が、球状のものとは異なるためセンシングなど粒子の機能を利用した応用も広がる。金からなる三角形プレートの合成方法は Liz-Marzán らによって報告されており (Liz-Marzán ら, *ACS Nano* 2014, 8, 5833) それらに従って調整した。粒子表面はカルボン酸を有するリガンド (図1) で被覆し、細胞への粒子取り込み数は細胞に取り込まれた金原子数を ICP-ES で見積もることで算出した。

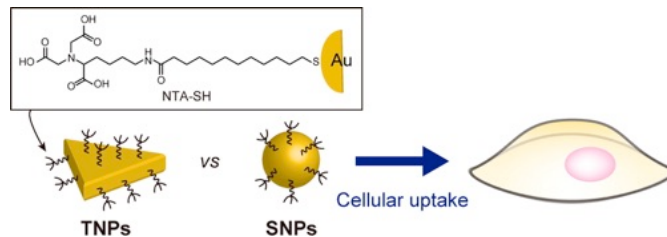


図1. 三角形金ナノプレート (TNPs)と球状粒子(SNPs) の細胞取り込み実験

研究目的 (2)-a の方法 : 球状金ナノ粒子とロッド状金ナノ粒子をワクチンアジュバント (免疫賦活剤) として知られている poly (I:C) で被覆し、インフルエンザウイルスの抗原であるヘマグルチニン(HA)とともにマウスに接種した (図2)。粒子の形状や大きさによって抗体価がどのように影響されるのかを調べた。球状金ナノ粒子および金ナノロッド表面を4級のアンモニウムカチオンで被覆し、その後、poly (I:C)で被覆した。この実験で用いた poly(I:C)は (株) 協和発酵バイオより提供して頂いたもので、約400merの polyC に対して40merの polyI が複数本結合した構造になっている。この略称を uPIC(40:400) と記した。接種経路として経鼻および皮下を比較した。また細胞実験によりサイトカインの産出についても調べた。

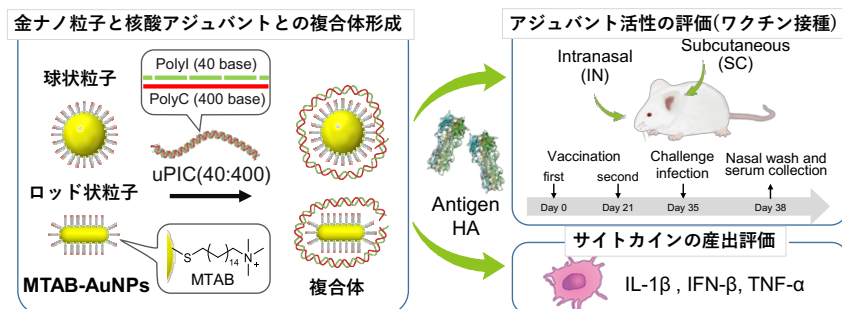


図2. 球状粒子とロッド状粒子を用いたインフルエンザウイルスワクチンの評価

研究目的 (2)-b の方法：

金ナノ粒子に固定化する抗原タンパク質 (図3のHA) の配向性を制御するため2つの方法を試みた。一つ目の (A) では、発現タンパク質の精製用のタグである His-Tag を使い、ニッケルイオンを介して HA を固定化する。この時、HA のシアル酸結合サイトは表面に露出する。本研究ではニッケルイオンをキレートする分子 (図3) の合成から始めた。別の方法(B) では、既報の HA 結合ペプチド(佐藤ら, *J. Med. Chem.* 2014, 57, 8332-8339) を金ナノ粒子の表面に固定化した。このペプチドは HA のシアル酸結合部位周辺に結合することが予想されているため、結合方向を (A) とは逆向きにできる可能性がある。一方、ペプチドだけであっても自己組織化膜を作ることが Nowinski らによって報告されている(Nowinski, A. K. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 6000)。これらの論文を基に自己組織化能を有するペプチドの末端に HA 結合ペプチドをもつ ARLPRGGGEKEKEKEPPPPC を設計し、粒子への固定化を試した。ペプチドは GenScript 社から購入した。

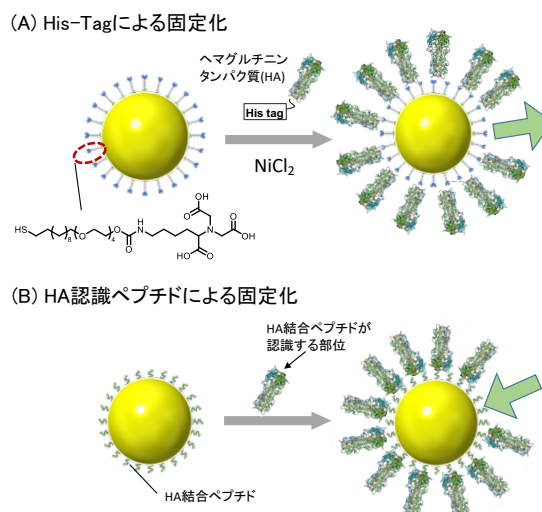


図3. HA を配向固定化するための2つの方法

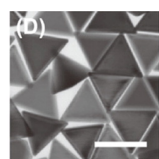
4. 研究成果

(1) 細胞取り込みにおけるサイズ・形状の効果の評価 (一般化)

合成した粒子をそれぞれ図1に示した3つのカルボン酸を有する表面リガンド分子で被覆した。三角形の一辺の長さは、46, 55, 72, 94 nm の4種類の三角形プレートを合成した。比較対象としてこれら三角形プレートと近い表面積あるいは体積となる球状粒子 (直径 22, 39, 66 nm) も合成した。一例として一辺の長さが 94nm の三角形プレートの電子顕微鏡像を図4に示した。

細胞は HeLa 細胞および RAW264.7 細胞を用いた。とくに RAW264.7 細胞はマウスのマクロファージ由来のため、免疫関連の細胞との相互作用を知る一つの指標となると考えた。各粒子を最終濃度 5 pM となるように細胞培養液(10%FBS が入った DMEM)に添加し、24 時間インキュベーション後に細胞を PBS で洗浄、王水による金の溶解、そして最後に細胞に取り込まれた金粒子数を見積もった (図4)。非常に興味深いのは三角形プレートの場合、一辺の長さが長くなると取り込み量が増えたが、球の場合はその取り込み量が減少した。この傾向は2つの細胞で同様であった。これは恐らく、細胞膜上レセプターあるいは細胞膜との相互作用、そしてそれに引き続き起こるエンドサイトーシスのプロセスなどに形状と大きさの効果が存在することを示唆している。

この研究は三角形プレートの細胞取り込みを系統だって明らかにした初めての報告になる。取り込みのメカニズムはまだ明らかに出来ていないが、ナノ粒子の形状・サイズが細胞との相互作用に与える重要性を三角形プレートも含め明らかに出来た。これらの成果は米国化学会誌の *Langmuir* にて発表した。



合成した三角形プレートの一例 (TNP94)

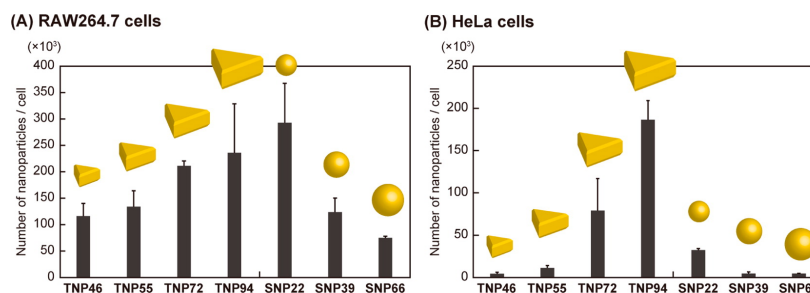


図4. 三角形プレート(スケールバーは 100nm)の電子顕微鏡像および、RAW264.7 細胞および HeLa 細胞への粒子取り込み数。縦軸は細胞一つあたりに取り込まれた粒子数。TNP:三角形プレート, SNP:球状粒子。横軸数字は直径あるいは一辺の平均長 (nm)。

(2) ナノ粒子の形状・サイズがインフルエンザワクチンの効果に及ぼす効果

細胞取り込みでは、今までほとんど知見が得られていない三角形プレートについて調べたが、ワクチン効果では、これまでに細胞取り込みに違いがでることが知られている球状とロッドを選択し、それらの違いを調べた。球状金ナノ粒子とロッド状ナノ粒子を合成し、4級アンモニウムを末端に有するチオール分子で修飾した後、uPIC(40:400)を添加することで粒子表面にそれらを吸着させた。

まずはインフルエンザウイルスのワクチンとして、経鼻および皮下の2つの接種経路でどのように粒子の形状や大きさが影響するのかを調べた。この実験では抗原タンパク質であるヘマグルチニン (HA) を 100 ng 接種した。皮下接種の場合、粒子の形状・サイズによって IgG 産生量に大きな差が見られなかった。経鼻接種では、興味深いことに 40nm の球状粒子の場合、IgA の産生量が低下する傾向があった。しかし IgG を調べると、粒子の形状やサイズに大きく依存すること無く抗体が産出されていることがわかった。

次に抗原の接種量を 10ng に落として、経鼻接種の効果を調べた。抗原量を減らすことで、よりアジュバントの効果が明確にできると考えた。図 5 は種々の濃度の粒子アジュバントと抗原タンパク質を接種したときのウイルス価を示したものである。この値が小さいほど効果が高いことを意味している。ロッド状粒子に uPIC(40:400)を固定化した方が、球状粒子に固定化するよりも効果が高いことを支持する結果が得られた。この形状依存性を細胞レベルあるいは組織レベルで明らかにする必要があるが、細胞実験でのサイトカイン産生では 40nm の球状粒子が高い傾向にあるが、ロッド状粒子ではサイトカインの産生が見られなかった。組織への輸送能などに優れている可能性もあり、メカニズム解明は課題として残った。アジュバント分子の固定化にも形状の影響があること支持しており、ナノ粒子のワクチン応用には形状・サイズをデザインすることの重要性を示している。本成果はイギリス化学会のオープンアクセス誌である *RSC Advances* にて発表した。

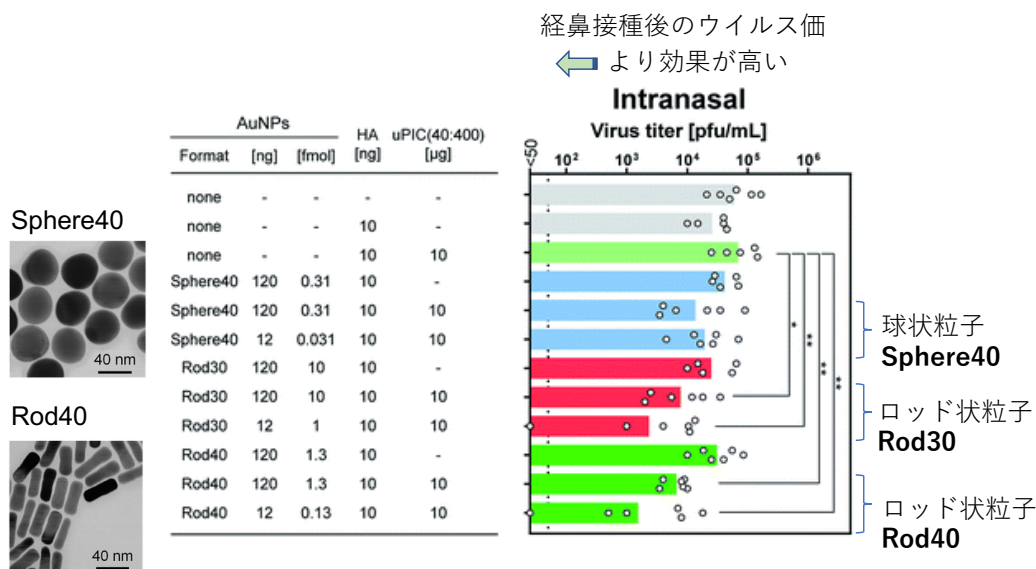


図 5. 経鼻投与したインフルエンザワクチンの効果。抗原タンパク質(HA)の添加量は 10ng である。球状粒子およびロッド状金ナノ粒子に uPIC(40:400)を固定化してアジュバントとして使った。長軸が約 30 および 40nm のロッドを複合体材料に使うと、直径 40nm の球状粒子よりもウイルス価が抑えられていることが分かる。

(3) 抗原タンパク質を配向制御固定化するため金ナノ粒子表面修飾

タンパク質を粒子に固定化する上で課題となるのが、粒子分散性の維持である。これをクリアするためにはリガンド分子も分散性向上に寄与しなくてはならない。本研究では 2 種の表面分子を用意した。発現することで得られたヘマグルチニンは His-Tag を有しているため、タグを使って金ナノ粒子に固定化するために、図 3 にあるようにオリゴエチレングリコールのスペーサーを有する分子を Whitesides らの文献 (Sigal *et al. Anal. Chem.* 1996, 68, 490) を参考に合成した。

一方、ヘマグルチニンタンパク質は、特異的なペプチド(ARLPR)への結合が知られているため、これらのペプチドを末端に有するヘリックスペプチド (図 3) で金ナノ粒子を修飾することができた。抗原の固定化は進行中であり、アッセイなどは今後引き続き進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

1. “Shape-dependent adjuvanticity of nanoparticle-conjugated RNA adjuvants for intranasal inactivated influenza vaccines”, Tazaki Taiyu, Tabata Koshiro, Ainai Akira, Ohara Yuki, Kobayashi Shintaro, Ninomiya Takafumi, Orba Yasuko, Mitomo Hideyuki, Nakano Tetsuo, Hasegawa Hideki, Ijro Kuniharu, Sawa Hirofumi, Suzuki Tadaki, Niikura Kenichi, *RSC Advances* **2018**, 4, 16527-16536. (オープンアクセス雑誌) 査読有り
2. “Reverse Size Dependences of the Cellular Uptake of Triangular and Spherical Gold Nanoparticles”, K. Nambara, K. Niikura, H. Mitomo, T. Ninomiya, C. Takeuchi, J. Wei, Y. Matsuo, K. Ijro, *Langmuir* **2016**, 32, 2559-12567. 査読有り

〔学会発表〕 (計 12 件)

2017 年度

1. 「金ナノ粒子による poly(I:C)のアジュバント活性の増強とその形状依存性」
田崎太悠、田畑耕史郎、相内章、大原有樹、小林進太郎、大場靖子、三友秀之、澤洋文、鈴木忠樹、新倉謙一、居城邦治、日本化学会第 98 回春季年会
2. 「経鼻粘膜投与型ワクチンにおけるインフルエンザウイルスに対する抗原形状依存的抗体応答」
田畑耕史郎、南原克行、佐野芳、相内章、鈴木忠樹、原田陽介、新倉謙一、長谷川秀樹
第 65 回日本ウイルス学会
3. 「インフルエンザウイルスの交叉防御に向けたナノ粒子ワクチンの開発」
田崎太悠、大原有樹、田畑耕史郎、新倉謙一、小林進太郎、大場靖子、三友秀之、澤洋文、松原輝彦、佐藤智典、相内章、鈴木忠樹、居城邦治、第 66 回高分子討論会
4. 「金ナノ粒子を用いた経鼻インフルエンザワクチンの開発」
田崎太悠、大原有樹、新倉謙一、三友秀之、小林進太郎、大場靖子、澤洋文、相内章、鈴木忠樹、居城邦治、第 27 回バイオ・高分子シンポジウム
5. 「金ナノロッドによる経鼻不活化インフルエンザワクチンにおけるアジュバントの活性増強」
田崎太悠、大原有樹、新倉謙一、小林進太郎、大場靖子、三友秀之、澤洋文、相内章、鈴木忠樹、居城邦治、第 66 回高分子学会年次大会
6. 「三角形金ナノプレートの細胞取り込み及びワクチン活性」
南原克行、新倉謙一、三友秀之、相内章、二宮孝文、居城邦治、ナノ学会 15 回大会

2016 年度

7. “Cellular Uptakes of Antigen-coated Triangular Gold Nanoparticles and the Vaccine Activity”
Katsuyuki Nambara, Kenichi Niikura, Hideyuki Mitomo, Tadaki Suzuki, Akira Ainai, Yuki Ohara, and Kuniharu Ijro, *AsiaNANO* 2016
8. “Gold nanorods are effective as template for dsRNA adjuvant of nasal influenza vaccine”
Taiyu Tazaki, Kenichi Niikura, Tadaki Suzuki, Akira Ainai, Yuki Ohara, Shintaro Kobayashi, Yasuko Orba, Hideyuki Mitomo, Hirofumi Sawa and Kuniharu Ijro, *AsiaNANO* 2016
9. 「金ナノ粒子による経鼻インフルエンザワクチンの活性増強に対する形状の効果」
田崎太悠、南原克行、新倉謙一、鈴木忠樹、相内章、大原有樹、小林進太郎、大場靖子、三友秀之、澤洋文、居城邦治、第 65 回高分子討論会
10. 「細胞取り込みにおける三角形金ナノプレートの特徴」
南原克行、新倉謙一、三友秀之、大原有樹、相内章、鈴木忠樹、二宮孝文、居城邦治
第 10 回バイオ関連化学シンポジウム
11. 「ナノ粒子を使ったインフルエンザ経鼻ワクチンの開発」
新倉謙一、田崎太悠、南原克行、大原有樹、鈴木忠樹、相内章、長谷川秀樹、澤洋文、大場靖子、小林進太郎、三友秀之、居城邦治、第 26 回バイオ・高分子シンポジウム
12. 「金ナノロッドによる核酸アジュバントの活性増強」
田崎太悠、新倉謙一、鈴木忠樹、相内章、大原有樹、小林進太郎、大場靖子、三友秀之、澤洋文、

居城邦治, 第 65 回高分子学会年次大会

〔図書〕 (計 1 件)

ナノテクノロジーが拓く未来の医療 (片岡一則 編著) 2017 年 12 月 25 日 (株) 丸善出版発行
執筆分担箇所: 「ナノ粒子で作るワクチン」 新倉謙一, 171-185 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 三友 秀之

ローマ字氏名: (Mitomo, Hideyuki)

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 電子科学研究所

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 50564952

(2) 研究協力者

1. 研究協力者氏名: 南原 克行

ローマ字氏名: (Nambara, Katsuyuki)

2. 研究協力者氏名: 田崎 太悠

ローマ字氏名: (Tazaki, Taiyu)

3. 研究協力者氏名: 居城 邦治

ローマ字氏名: (Ijiro, Kuniharu)

4. 研究協力者氏名: 鈴木 忠樹

ローマ字氏名: (Suzuki, Tadaki)

5. 研究協力者氏名: 相内 章

ローマ字氏名: (Ainai, Akira)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。