

令和元年6月5日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08210

研究課題名(和文) ウイルスの遺伝子多様性を克服するオリゴアルギニン固定化高分子を用いた粘膜免疫誘導

研究課題名(英文) Mucosal vaccines using oligoarginine-linked polymers that overcome gene diversities of viruses

研究代表者

佐久間 信至 (SAKUMA, SHINJI)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：80388644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、膜透過ペプチドのテトラグリシン-L-オクタアルギニンを生体成分のヒアルロン酸に固定化した新規の生分解性高分子を創製し、粘膜投与型ワクチンのアジュバントとしての当該ヒアルロン酸誘導体の有用性を検討した。テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の共経鼻投与下、不活化インフルエンザウイルス抗原で免疫されたマウスの鼻粘膜上に分泌型イムノグロブリンAが誘導され、同マウスを投与株以外のウイルス株に曝露させたとき、ウイルス抗原のみで免疫されたマウスで観察された重篤な体重減少はまったく見られず、交差防御能を獲得していることが実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルスは遺伝的に多様であり、そのワクチンに含まれるウイルス株は、世界保健機構の流行予測により決定される。しかし、予測が外れたり遺伝子変異が起きると、パンデミックを引き起こす可能性がある。鼻腔内投与等、ウイルス抗原を経粘膜投与すると、粘膜上に分泌型イムノグロブリンA(IgA)が誘導され、同IgAは投与株以外のウイルス株に対して交差反応性を示すことが知られている。今回の研究成果は、誘導された分泌型IgAによる交差防御が機能したことを示しており、インフルエンザウイルスの遺伝子多様性を克服するテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を用いた粘膜ワクチンの開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel biodegradable polymer, hyaluronic acid modified with tetraglycine-L-octaarginine which is one of cell-penetrating peptides, and evaluated a potential of the hyaluronic acid derivative as an adjuvant for mucosal vaccination. Immunoglobulin A was secreted on the nasal mucosa in mice immunized with inactivated influenza viruses under nasal coadministration with tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid. When the mice were exposed to viruses that differed from ones used for immunization, serious weight loss observed for mice immunized with inactivated viruses alone did not occur at all. Results demonstrated that mice acquired abilities of cross-protection through nasal vaccination using the mixture of virus antigens and tetraglycine-L-octaarginine-linked hyaluronic acid as a mucosal adjuvant.

研究分野：薬物送達学

キーワード：ワクチン 粘膜免疫 インフルエンザウイルス 膜透過ペプチド オリゴアルギニン固定化高分子 膜透過ペプチド固定化ヒアルロン酸 感染実験

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ワクチンは、ウイルスや細菌などの病原体に起因する感染症に対する最も効果的な予防法である。一般的なワクチン接種法は皮下注射であり、多くのワクチンは侵襲的に体内に投与される。例えば、気道粘膜を含む呼吸器系を介して感染するインフルエンザウイルスの場合、流行予測などにに基づきウイルス株が選定され、同株から精製されたウイルスエンベロープの一部のヘマグルチニンタンパク質がウイルス抗原(インフルエンザ HA ワクチン)として皮下投与される。血液中に誘導された抗原特異的な免疫グロブリン G (IgG) は、ワクチンに含まれるウイルス株の感染に伴う重症化を予防する。しかし、感染自体はブロックできず、また、予測が外れたときのインフルエンザの流行に対処できない。

粘膜投与型ワクチンは、血液中に抗原特異的な IgG を誘導するだけでなく、粘膜上に免疫グロブリン A も分泌誘導する。多くの病原体が侵入する粘膜上で最初に作用する分泌型 IgA は、「病原体の生体内への侵入を未然に防ぎ、感染自体をブロックする」ことが期待される。さらに分泌型 IgA は、IgG にはない「亜型の違いを含めて投与株と異なる病原体株に交差反応する」質的特性を持つことも期待される。粘膜免疫は、流行株の予測の難しさを含め、遺伝子改変を繰り返して流行する遺伝的に多様なインフルエンザウイルスなどの感染に対する予防に適した免疫手法である。しかし、病原体の抗原のみを粘膜上に投与しても免疫反応は効果的に惹起されず、感染予防効果は乏しい。粘膜投与型ワクチンの開発を実現するためには、経粘膜的に投与された抗原に対する免疫反応を効果的に誘導するワクチンアジュバント/抗原キャリアの開発が必須である。これまでにコレラトキシン B サブユニットなどの細菌毒素系アジュバント、近年では2本鎖 RNA の poly(I:C) や疎水化ポリ - グルタミン酸ナノ粒子などがワクチンアジュバント/抗原キャリアとして研究されている。しかし、安全性などの問題で臨床応用に至っていない。

膜透過ペプチドは、HIV ウイルスの感染機構の研究に見出された細胞膜透過性の高いタンパク質の一次構造をベースに開発されたペプチド群の総称である。アルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸に富む 10 残基程度のカチオン性オリゴペプチドであり、マクロピノサイトーシスにより細胞内へ取り込まれる。タンパク質や核酸などの低膜透過性の生理活性分子の細胞内取り込みや膜透過性を促進して同分子を作用部位へ効率的に送達させる DDS キャリアとして、膜透過ペプチドは精力的に研究されている。

研究代表者らは、膜透過ペプチドのオリゴアルギニンを側鎖に化学結合させた新規高分子を創製し、粘膜投与型ワクチンのアジュバントとしての同オリゴアルギニン固定化高分子の臨床応用を目指している。非分解性の生体適合性高分子である N-ビニルアセタミドとアクリル酸の共重合体 (PNVA-co-AA) を高分子プラットフォームとする D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA を用いたこれまでの研究を通して、インフルエンザウイルス抗原をオリゴアルギニン固定化高分子とともにマウス鼻腔内に毎週 4 回投与すると、血液中及び鼻粘膜上に抗原特異的な IgG 及び分泌型 IgA がそれぞれ誘導されること、同 IgA は投与株以外のウイルス株に交差反応すること、不活化ウイルス株を用いて免疫誘導されたマウスは投与株に感染しないこと、などが既に実証されている。このような中、研究代表者らは、本技術の臨床応用の視点から生分解性材料への展開を試み、生体成分のヒアルロン酸を高分子プラットフォームとするテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸 (図 1) の創製に成功した。

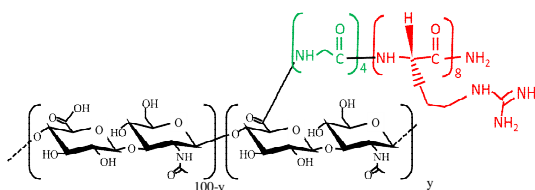


図 1. テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の化学構造式

2. 研究の目的

本研究の目的は、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の免疫誘導効果、免疫誘導機構及び安全性を明らかにするとともに、感染実験を通して投与株と異なるウイルス株に対する感染予防効果を検証することである。目的達成を通して、ウイルスの遺伝子多様性を克服する世界初の粘膜投与型ワクチンのアジュバントとしての同ヒアルロン酸誘導体の有用性を実証する。

3. 研究の方法

(1) テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の免疫誘導効果及び免疫誘導機構
PNVA-co-AA 及びヒアルロン酸の側鎖のカルボキシル基にテトラグリシン-オクタアルギニン (ヒアルロン酸のカルボキシル基と反応するアミノ基末端にテトラグリシンを導入) を固定化した (オクタアルギニンについては、PNVA-co-AA には D 体、ヒアルロン酸には L 体を使用)。異なる投与条件 (毎週 4 回投与、毎週 2 回投与、4 週間隔 2 回投与) にて、臨床で使用されているインフルエンザウイルス HA ワクチン (ウイルス抗原) と各オリゴアルギニン固定化高分子

の混合物をマウスに経鼻投与し、抗原特異的な血中の IgG 及び鼻粘膜上の分泌型 IgA を測定した。

蛍光標識したオブアルブミン (FITC-OVA) と各種オリゴアルギニン固定化高分子をマウスに経鼻投与した後、経時的に鼻腔内切片を作成し、FITC-OVA の鼻腔内滞留性を評価した。各種オリゴアルギニン固定化高分子共存下、樹状細胞株等による FITC-OVA の取り込みを評価した。

(2)テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の安全性

各種オリゴアルギニン固定化高分子をマウスに経鼻投与した後、乳酸脱水素酵素の鼻腔内漏出量を測定し、鼻粘膜障害性を評価した。その他、医薬品の前臨床試験で行われている一連の毒性試験を委託検討した。

(3)投与株と異なるウイルス株に対する感染予防効果

不活化 A/New Caledonia/20/99 IVR116 (H1N1) (NCL) を投与株に、Mouse-adapted A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (PR8) を感染株に用いた。マウスを 3 群 (溶媒投与群 (コントロール群)、NCL 投与群、NCL 及びテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸投与群) に分け、4 週間隔で 2 回経鼻投与した。2 回目投与から 2 週間後、各群の一部のマウスから血液及び鼻粘膜洗浄液を採取し、残りのマウスを PR8 に曝露した。曝露後 3 週間、生死と体重の観測後、生存マウスから同様にサンプル採取し、抗体産生量を ELISA で測定した。

4. 研究成果

(1)テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の免疫誘導効果及び免疫誘導機構

本技術 (膜透過ペプチド固定化高分子をアジュバントとして用いた粘膜投与型ワクチン) の臨床応用に向けた障害は、PNVA-co-AA の非分解性と免疫誘導に係る投与回数 (4 回) である。前者については、生分解性のテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の創製に成功した。後者について 2 回投与を検討したところ、投与間隔を適切に設定してブースティング効果を最大化することにより、同ヒアルロン酸誘導体とウイルス抗原との 2 回投与 (4 週間隔) 後に得られる抗体価は、テトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA と同抗原の毎週 4 回投与後に得られる抗体価と同じレベルであることが確認された (図 2)。また、誘導された分泌型 IgA は、ウイルス株の亜型を超えた交差反応性を示した。

次に、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸による免疫誘導機構の解明を試みた。別の検討を通して、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA は、FITC-OVA の鼻粘膜滞留性を高め、樹状細胞や粘膜上皮細胞による同タンパク抗原の取り込みを促進することで免疫活性を増強することが示唆されている。一方、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸には、FITC-OVA の鼻粘膜滞留の延長作用は見られず、樹状細胞等への同タンパク抗原の取り込み促進作用も相対的に弱かった。In vivo における免疫誘導効果に高分子間で差は見られなかったものの、免疫誘導機構は必ずしも一致していないことが示唆された。

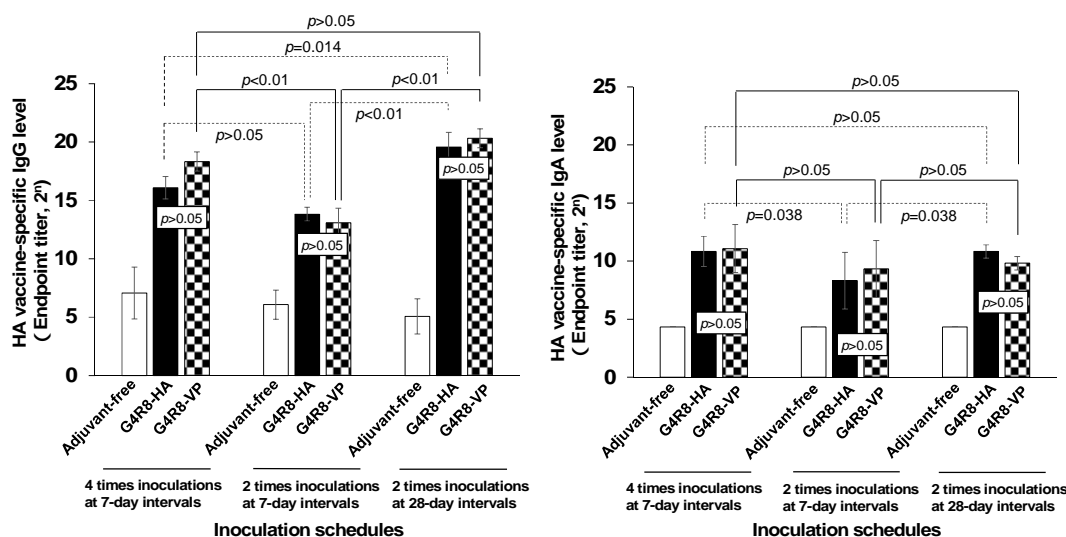


図 2. ウイルス抗原とテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸 (G4R8-HA) あるいはテトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA (G4R8-VP) とを共投与した後の抗体価 (左側: IgG、右側: IgA)

(2)テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の安全性

非分解性の D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA で軽度に見られた鼻粘膜障害性は、同じ投与量のテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸では見られず、生分解性高分子の優れた安全性が示された。さらに、医薬品の前臨床試験で行われている一連の毒性試験を

行った結果、コロニー形成試験でのテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の IC₅₀ は D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の 10 倍など、同ヒアルロン酸誘導体の優れた安全性が確認された。また、両高分子、その分解物ともに、遺伝毒性を示さないことが確認された。

(3) 投与株と異なるウイルス株に対する感染予防効果

インフルエンザウイルス抗原(不活化 NCL 株)とテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の経鼻投与により免疫誘導されたマウスを用いて、投与株と異なる同じ亜型内のウイルス株(マウス適応した感染性を有する PR8 株)に対する感染防御能を検証した。抗原のみを経鼻投与されたマウスにおいては、血中に IgG が産生されたが鼻粘膜上に分泌型 IgA は産生されず、ウイルス曝露後の感染に伴う重篤な体重減少が見られた(図 3)。一方、抗原と同ヒアルロン酸誘導体の混合物を経鼻投与されたマウスにおいては、血中 IgG とともに鼻粘膜上に分泌型 IgA が多く産生され、ウイルス曝露後の体重減少はほとんど見られなかった(図 3)。期待通りに、分泌型 IgA が投与抗原と異なるウイルス株に交差反応したためと考えられた。

以上の結果から、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は、同一亜型内のインフルエンザウイルスの感染対策に有効な免疫を誘導する粘膜アジュバントであることが示された。

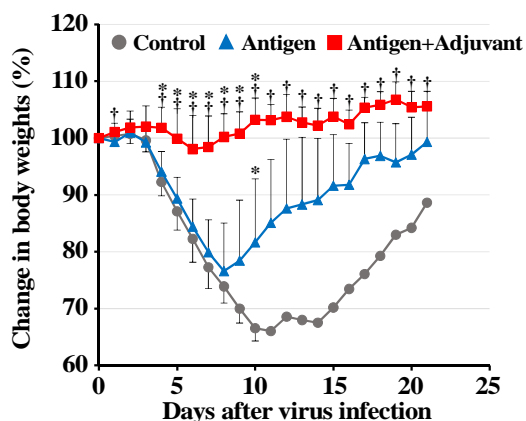


図 3. PR8 株曝露後のマウスの体重変動 (●: コントロール群、▲: 抗原(不活化 NCL 株)のみ投与群、■: 抗原及びアジュバント(テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸)投与群)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Masami Ukawa, Sohei Tanishita, Haruya Yagi, Yuki Yoshida, Takumi Tomono, Koichi Shigeno, Etsuo Tobita, Tomofumi Uto, Masanori Baba, Shinji Sakuma, Biodegradable hyaluronic acid modified with tetraglycine-L-octaarginine as a safe adjuvant for mucosal vaccination. *Mol. Pharmaceutics* 16 (2019) 1105-1118. 査読あり
DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.8b01110

[学会発表](計 4 件)

谷下宗平, 吉田祐樹, 辻岡拓実, 鶴川真実, 伴野拓巳, 宮田康平, 飛田悦男, 宇都倫史, 馬場昌範, 佐久間信至, 膜透過ペプチド固定化ヒアルロン酸を粘膜アジュバントとして含有する経鼻粘膜ワクチンの交差反応性のマウス感染実験による実証, 日本薬剤学会第 34 年会, 富山, 2019 年 5 月 16 日.

谷下宗平, 八木晴也, 吉田祐樹, 鶴川真実, 伴野拓巳, 飛田悦男, 宇都倫史, 馬場昌範, 佐久間信至, 新規粘膜投与型ワクチンのアジュバントとしての L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の開発, 創剤フォーラム第 24 回若手研究会, 神戸, 2018 年 9 月 22 日.

Sohei Tanishita, Haruya Yagi, Kohta Mohri, Hironori Kumagai, Kohei Miyata, Kyohei Ochiai, Ken-ichiro Hiwatari, Koichi Shigeno, Etsuo Tobita, Tomofumi Uto, Masanori Baba, Shinji Sakuma, A potential of L-octaarginine-linked hyaluronic acid as an adjuvant for mucosal vaccination, 44th Annual Meeting & Exposition of the Controlled release Society, Boston, MA, July 18, 2017.

谷下宗平, 八木晴也, 毛利浩太, 熊谷光倫, 宮田康平, 落合恭平, 日渡謙一郎, 滋野浩一, 飛田悦男, 宇都倫史, 馬場昌範, 佐久間信至, ヒアルロン酸を支持体とするオクタアルギニン固定化高分子の粘膜投与型ワクチンの抗原キャリアとしての有用性評価, 日本薬学会第 137 年会, 仙台, 2017 年 3 月 25 日.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：馬場 昌範

ローマ字氏名：BABA masanori

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：70181039

研究分担者氏名：毛利 浩太

ローマ字氏名：MOHRI kohta

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：研究員

研究者番号（8桁）：30723697

研究分担者氏名：鵜川 真実

ローマ字氏名：UKAWA masami

所属研究機関名：摂南大学

部局名：薬学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：50735511

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宮田 康平

ローマ字氏名：MIYATA kohei

研究協力者氏名：落合 恭平

ローマ字氏名：OCHIAI kyohei

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。