

令和 3 年 5 月 2 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04968

研究課題名(和文) ナノゲルと油状ナノ分散化技術を融合した革新的エマルジョンアジュバントの開発

研究課題名(英文) A solid-in-oil-in-water emulsion adjuvant for efficient vaccine delivery

研究代表者

田原 義朗 (Tahara, Yoshiro)

同志社大学・理工学部・准教授

研究者番号：30638383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：ワクチンとは感染症対策において最も重要であり、本研究の目的であるアジュバントとはワクチンにおいて免疫を活性化するために添加されるものである。本研究ではナノゲル、エマルジョン、油中ナノ分散化技術を融合した新しいエマルジョンアジュバントを創出することを目的として研究を行なった。作成された新規エマルジョンアジュバントは、既存の方法よりも高い抗体産生、担がんマウスの治療効果などのワクチン活性をもつことが明らかとなり、これは新規エマルジョンアジュバントが、抗原をエマルジョン内に封入した状態で、アジュバントと抗原を同一の抗原提示細胞に同時に送達することが可能であることによって達成されたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COVID-19のような新興感染症の台頭は大きな社会的インパクトがあり、ワクチンは最も重要な感染症対策である。本研究で得られた効率の良いワクチン効果を得るための知見は今後のより高度なワクチン開発を進める上で重要な役割を果たすと考えられる。またその背景には、材料科学的な構造解析により、solid-in-oil-in-water エマルジョンという学術的意義のある新しい材料が作成できたという成果が存在する。さらに本研究は、この工学分野で開発された新しい材料をワクチンという医学分野へ応用した異分野融合研究によって得られた研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Vaccine is one of the most important strategy to prevent infectious diseases. In this study, a solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion adjuvant was prepared. In the traditional emulsion adjuvant, antigens were added in the outer water phase and were separately delivered to antigen presenting cells. On the other hand, in the S/O/W emulsion adjuvant, antigens were encapsulated in the inner oil phase by solid-in-oil nanodispersion technology. From the vaccine study, the S/O/W emulsion produced the antigen-specific antibody and prevented tumor growth by antigen-specific immune responses compared to the traditional emulsion. This performance was resulted from the property of the S/O/W emulsion that deliver antigens to the antigen presenting cells together with adjuvant. These results suggested that the S/O/W emulsion is the promising vaccine delivery carrier.

研究分野：生物化学工学

キーワード：ワクチン エマルジョン solid-in-oil-in-water アジュバント ドラッグデリバリーシステム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ワクチンとは感染症予防において最も重要な戦略であり、近年では予防だけでなく治療を目的としたワクチンの開発も盛んに行われている。ここでワクチンとは対象となる病原体の抗原を体内に投与し、抗原に対する免疫を作り出すというものである。本研究で対象としているアジュバントとはワクチンにおいて免疫を活性化するために添加されるものであり、効果的なワクチンを創出するためには、免疫を作り出す場所（主にリンパ節、さらにはリンパ節に存在する抗原提示細胞）に、抗原とアジュバントを適切に送達する技術がもとめられる。このように薬を体内の目的の場所に、適切な時間と量で送達するための技術をドラッグデリバリーシステム (DDS) といい、1990年代よりワクチンの分野においても DDS を利用する試みが盛んに行われてきた。中でも本研究にて利用したプルランにコレステロールを修飾した疎水化多糖ナノゲル（ナノサイズのゲル）は、この分野の先駆けとして効率のよい抗原の封入とワクチン活性の向上を達成している。さらに本研究にて利用したスクワレンを主成分としたエマルションは、既に実用化されているワクチンアジュバントであり、高い安全性をもったマテリアルとして注目されている。さらに 2010 年以降において主に塗り薬型ワクチンのための基本技術として油中ナノ分散化技術が注目されていた。これは塗り薬において高い皮膚浸透性が知られている油状基剤に抗原をナノサイズで封入する技術であり、効率の良い塗り薬型ワクチンが達成されている。その他にもワクチン分野への DDS には、2010 年以降にリポソームや高分子ミセル、金ナノ粒子などの DDS キャリアがトップジャーナルに数多く報告されるようになり、本研究開始当初にはこの分野を総合した“**Immunoengineering**”という研究分野は、最も注目される研究分野の一つとして認識されるようになった。

### 2. 研究の目的

本研究ではこれらのナノゲル、エマルション、油中ナノ分散化技術を融合した新しいエマルションアジュバントを創出することを目的として研究を行なった。これまで実用化されているエマルションアジュバントは、抗原はアジュバントに添加する形で投与されていた。そこで本研究では油中ナノ分散化技術によってエマルションの内部に抗原を封入することを試み、抗原とアジュバントが同時に抗原提示細胞に取り込まれるシステムの開発に挑戦した。さらに油中ナノ分散化技術の適用が困難な抗原にも対応できるようにナノゲルによる抗原の封入も試み、より汎用性の高いシステムの開発も目的としている。このような方法で開発された新しいエマルションアジュバントを、本研究ではそのエマルションの形状をもとに **solid-in-oil-in-water (S/O/W)** エマルションと表記する。この S/O/W エマルションはワクチン分野へ利用された他の DDS キャリアと比較すると構成成分の全てが既に実用化されているものであり、早期の実用化が期待できるという特徴を持っている。

### 3. 研究の方法

ここでは研究の方法とともに個々の実験結果についても述べる。

本研究では最初に S/O/W エマルションの構造について評価を行なった。高解像度の共焦点顕微鏡によってエマルションの内部に抗原が封入されていることを確認し、遠心分離によっても従来のエマルションアジュバントよりも多くの抗原がエマルションに封入されていることが確認された。また小角 X 線散乱測定を行い、油中ナノ分散化技術によってエマルションに封入さ

れた抗原は特有の回折ピークが存在することを確認し、S/O/W エマルションにおいてもこの回折ピークは維持されていた。したがって既存のワクチンアジュバントの成分を用いて S/O/W エマルションという新しい形のエマルションアジュバントを作成することに成功した。

次に S/O/W エマルションのワクチン効果を確認する実験を行なった。その結果、S/O/W エマルションは既存のエマルションよりも高い抗体産生能をしめすことが確認された。特に I 型ヘルパー T 細胞に由来する IgG2a の産生が多く見られたことから、S/O/W エマルションはインターフェロンの産生を背景とする体液性免疫の誘導が可能であることが示唆された。また担がんマウスの治療効果についても検討を行なったところ、S/O/W エマルションは既存のエマルションよりも腫瘍の縮小効果が高いということが明らかとなった。この際のがん抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞の産生や、腫瘍中の CD8 陽性細胞数などを評価したところ、S/O/W エマルションにおいて増加していたことから、S/O/W エマルションによるワクチンは細胞性免疫の誘導にも大きく寄与するということが明らかとなった。

次に S/O/W エマルションによってリンパ節やリンパ節中の抗原提示細胞に送達された抗原量を評価した。上記のように S/O/W エマルションは既存のエマルションよりも高いワクチン活性を示すにも関わらず、リンパ節やリンパ節中の抗原提示細胞への抗原送達能力については既存のエマルションと同等であるということがわかった。一方で抗原提示細胞における抗原提示量については S/O/W エマルションが高いという結果も得られたことから、S/O/W エマルションによってワクチン活性が向上する理由は、リンパ節やリンパ節中の抗原提示細胞への抗原送達量が向上したのではなく、抗原が抗原提示細胞に取り込まれた後の挙動が異なるためであるということが示唆された。

次に培養状態の抗原提示細胞への抗原の送達量について調べたところ、S/O/W エマルションは既存のエマルションと比較して、4 時間以降の長時間における抗原取り込みが高いという結果となった。さらにタイムラプス観察による抗原提示細胞内での抗原の動きについて評価したところ、既存のエマルションによって送達された抗原は、エマルションを使用しない抗原のみの場合とほとんど同じ挙動であり、短時間でエンドソームへ取り込まれるということがわかった。一方で S/O/W エマルションは長時間においてもエンドソームへの取り込みは比較的少なく、抗原がエマルションに封入された状態で抗原提示細胞内に送達されているということが示唆された。このように S/O/W エマルションは抗原をエマルション内に封入した状態、つまりエマルションアジュバントと抗原を同一の抗原提示細胞に同時に送達することが可能であることが意味しており、結果として高いワクチン活性を示したと考えられる。

最後に現在の油中ナノ分散化技術では油中に封入不可能なペプチドについて疎水化多糖ナノゲルへの封入に成功したことから、本手法は多くの種類の抗原についても適用することが可能であることが示唆された。

#### 4. 研究成果

本研究では将来的な実用化を目指し、研究開始 2 年目において特許出願を行なった。また日本 DDS 学会、化学工学会、バイオマテリアル学会、日本化学会において学会発表を行い、特に 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress の国際学会において Excellent Poster Award を受賞した。2021 年 5 月現在、本研究の内容を網羅した論文を投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田原義朗、水野梨瑚、若林里衣、神谷典穂、後藤雅宏
2. 発表標題 S/O/Wエマルションアジュバントによるがんワクチン活性
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田原義朗、水野梨瑚、西村智貴、向井貞篤、若林里衣、神谷典穂、秋吉一成、後藤雅宏
2. 発表標題 ワクチンデリバリーのための抗原封入S/O/W型エマルションの設計
3. 学会等名 第35回日本DDS学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野梨瑚、田原義朗、若林里衣、神谷典穂、後藤雅宏
2. 発表標題 S/O/W 型アジュバントによる細胞デリバリー能および免疫誘導能の向上
3. 学会等名 第35回日本DDS学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Riko MIZUNO, Yoshiro TAHARA, Rie WAKABAYASHI, Noriho KAMIYA, Masahiro GOTO
2. 発表標題 Development and immunological evaluation using solid-in-oil-in-water adjuvant
3. 学会等名 APCCHE2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野梨瑚, 田原義朗, 若林里衣, 後藤雅宏
2. 発表標題 油状ナノ分散化技術を利用した新規エマルジョンアジュバントの開発
3. 学会等名 平成30年度化学工学会九州支部 第23回学生賞審査会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野梨瑚, 田原義朗, 若林里衣, 後藤雅宏
2. 発表標題 S/O/W型アジュバントの開発と細胞毒性評価
3. 学会等名 第29回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野梨瑚, 田原義朗, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏
2. 発表標題 S/O/W型アジュバントによる免疫誘導能の向上
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野梨瑚, 田原義朗, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏
2. 発表標題 S/O/W型アジュバントによる抗原提示細胞の活性化と抗原送達能の向上
3. 学会等名 第40回バイオマテリアル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野梨瑚、田原義朗、若林里衣、神谷典穂、後藤雅宏
2. 発表標題 S/O/W型アジュバントの開発と免疫学的評価
3. 学会等名 化学工学会第84年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田原義朗、水野梨瑚、若林里衣、神谷典穂、後藤雅宏
2. 発表標題 免疫DDSキャリアを志向したS/O/W型エマルジョンの設計
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 免疫組成物	発明者 後藤雅宏、田原義朗、 水野梨瑚	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-99129	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

受賞歴： 2018年6月 平成30年度化学工学会九州支部 第23回学生賞審査会 学生賞（修士課程の部） 2018年7月 第29回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会 最優秀賞 2019年3月 化学工学会第84年会 優秀学生賞 2019年9月 The 18th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress Excellent Poster Award
---

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------