

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：34416

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19945

研究課題名(和文) ヒアルロン酸被覆高分子ミセルを用いたコロナウイルス用経鼻ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development nasal vaccine for corona virus using hyaluronic acid-coated polymer micelles

研究代表者

大矢 裕一 (Ohya, Yuichi)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：10213886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：表面に正電荷を有する生分解性ポリマーミセルを、樹状細胞に親和性を有するヒアルロン酸(HA)で被覆した極めて高い安定性を有するHA被覆ミセルを用いて、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に対する経鼻投与型ワクチンを開発した。SARS-CoV-2スパイクタンパク質を抗原として担持したHA被覆ミセルを作成し、骨髄由来樹状細胞に作用させたところ、高い取り込みとサイトカイン産生能、MHCクラスII抗原の発現など、免疫系で中心的役割を担う樹状細胞の活性化が確認された。さらに、マウスへの経鼻投与により、血中の特異的IgG、および唾液や鼻腔浸出液中の特異的IgAの分泌を誘導できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、著しく高い安定性を持つHA被覆ミセルを用いることで経鼻投与による免疫付与が可能であることを示した点に学術的意義がある。COVID-19パンデミックの際には、mRNAワクチンが使用され、mRNAワクチンは短期間で開発可能という点で画期的であったが、筋肉注射を必要とし、医療関係者が接種を行う必要があり、大規模接種時には本来治療にあたるべき医療従事者の負担を増加させるという問題があった。開発したワクチンは経鼻投与が可能であり、侵襲度も低く、自己接種も可能であり、今後新たなパンデミックが起こった際には、医療従事者の負担を大きく軽減することが見込まれるという点で大きな社会的意義を有している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a nasal vaccine system against a new type of coronavirus(SARS-CoV-2) using highly stable biodegradable polymer micelles with a positive charge on the surface and coated with hyaluronic acid (HA), which has an affinity for dendritic cells. We prepared HA-coated micelles carrying the SARS-CoV-2 spike protein (CoV-SP) as an antigen and applied them to bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). Then, we observed high uptake into BMDCs and activation such as cytokine production ability and MHC class II antigen expression. In addition, nasal administration of the HA-micelles to mice successfully induced the secretion of CoV-SP-specific IgG in the blood and CoV-SP-specific IgA in saliva and nasal exudate.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ナノ粒子 ワクチン コロナウイルス ヒアルロン酸 ポリマーミセル 経鼻投与 ポリイオンコンプレックス 免疫療法

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

ワクチンとは、生体の免疫システムを利用して感染症を予防する製剤である。新型コロナウイルス感染症に対しては、mRNA ワクチンが主に使用されているが、従来型のワクチンの主流は、不活化ワクチンである。不活化ワクチンは、抗原と免疫効果を高めるためのアジュバントから構成されており、注射針を用いて皮下や筋肉に投与される。一方、経鼻投与型のワクチンも開発されており、患者にとって低侵襲かつ自己接種も可能なことから、医療従事者への負担を大きく低減することが期待できる。また経鼻ワクチンでは、血中への IgG 抗体に加えて、分泌型 IgA 抗体が鼻や喉などの粘膜部位に産生できることから、コロナウイルスなどの上気道を主な感染経路とするウイルスに対する感染阻止が期待できる。しかし、鼻粘膜には、粘膜クリアランスなどの物理的なバリアが存在している。そこで、ナノ粒子キャリアを用いることで、免疫細胞に効率的にデリバリーすることが期待できる。我々はこれまでに、ポリリシンとポリ乳酸の AB ジブロック共重合体 (PLys<sup>+</sup>-b-PLLA) からなる正電荷を帯びたポリマーミセルに、負電荷を有するヒアルロン酸 (HA) を静電相互作用で被覆した HA 被覆ミセルについて報告している<sup>1,2)</sup>。このミセルは、通常の高分子ミセルよりも遥かに高い希釈安定性・コロイド安定性を持つ。さらに、HA レセプター (CD44) を持つ肝類洞内皮細胞に特異的に結合する<sup>2)</sup>ことから、同じく CD44 を有する樹状細胞および粘膜上皮細胞にも特異的に取り込まれることが期待される。こうした観点から我々は、モデル抗原としてオボアルブミン(OVA)、核酸タイプのアジュバントとして CpG-DNA を担持した HA 被覆ミセルを作製し、マウスへの経鼻投与すると、血中に OVA 特異的 IgG 抗体および粘膜液中に OVA 特異的 IgA 抗体の産生が誘導できることを見出している<sup>3)</sup>。

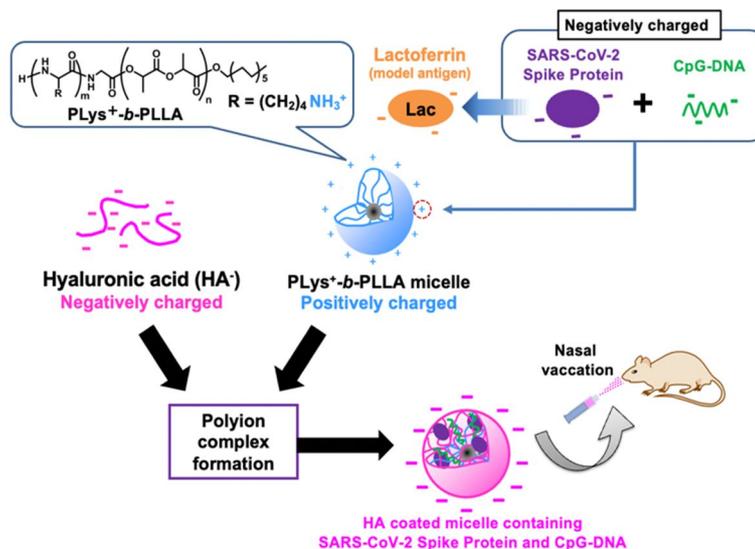


図 1. Schematic illustration of the concept for this study.

### 2. 研究の目的

本研究では、次の段階として、同手法による SARS-CoV-2 に対する経鼻ワクチンの開発を、同ウイルススパイクタンパク質 (S-protein) を抗原として試みた (図 1)。OVA は、生理的条件下で負に帯電しており、静電相互作用により容易に正電荷を持つ PLys<sup>+</sup>-b-PLLA に担持可能であるが、S-protein は等電点が 8.9 であり、生理的 pH では静電相互作用による担持は期待できない。そこで本研究では、S-protein 担持ミセルを調製時の溶液の pH を等電点より高くすることで、S-protein を負に帯電させ、CpG-DNA とともに静電相互作用により PLys<sup>+</sup>-b-PLLA micelle へ担持させ HA で被覆したナノ粒子型ワクチンを調製することとした。本研究では、初めにモデル抗原として、S-protein と近い等電点を持つ Lactoferrin (Lac) を選択して HA 被覆ミセルに担持できることを確認した後、S-protein を用いて HA 被覆ミセルを作成し、そのマウス鼻腔投与による免疫細胞へのデリバリー機能と免疫誘導能を調査し、新型コロナウイルスの経鼻ワクチンとしての有用性を評価した。

### 3. 研究の方法

既報<sup>1)</sup>に従って PLys<sup>+</sup>-b-PLLA を合成し、ソルベントエバポレーション法を用いて、PLys<sup>+</sup>-b-PLLA ミセルを調製した。次に、PLys<sup>+</sup>-b-PLLA ミセル分散水溶液を S-protein、CpG-DNA、HA 水溶液に順次添加し、HA 被覆ミセルを調製した。S-protein と CpG-DNA は、それぞれ蛍光ラベル化したものを使用し、蛍光測定・UV 測定により HA 被覆ミセルに担持された S-protein 及び CpG-DNA を定量した。In vitro での樹状細胞への取り込み効率は、C57BL/6 マウスの大腿骨髄細胞から分化したマウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) の培養液中に、調製した HA 被覆ミセルを添加し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 及びフローサイトメトリー (FCM) により調査した。In vivo

での免疫誘導能については、C57BL6/N マウスに 1 週間間隔で、HA 被覆ミセル、対照として S-protein と CpG-DNA の混合水溶液を経鼻投与し、投与開始から 1 週間間隔で唾液と血清を、21 日後に鼻腔洗浄液を回収し、その後 S-protein 特異的 IgG 及び IgA 抗体価を ELISA 法により評価した。また、先行して行った Lac を用いたモデル実験でも、同様の手法により、Lac と CpG-DNA を担持した HA 被覆ミセルを調製し、評価を行なった。

#### 4. 研究成果

<sup>1</sup>H-NMR 測定及び GPC 測定より、分子量が 7,600 程度の PLys<sup>+</sup>-b-PLLA が合成できたことを確認した。次に DLS 測定より、粒径 56 nm、ゼータ電位が +52.1 mV の表面に正電荷を有する PLys<sup>+</sup>-b-PLLA ミセルの作成を確認した。S-protein と CpG-DNA を担持した HA 被覆ミセルの DLS 測定の結果より、粒径が 143nm へと変化したこと、ゼータ電位が -24.8 mV へと負の値に変化したことから、最外殻への HA の被覆を確認した。また、蛍光測定・UV 測定の結果、S-protein と CpG-DNA のそれぞれの担持効率は、57%、73% であると算出された。In vitro での CLSM 観察および FCM の結果より、HA 被覆ミセルに担持することによって BMDC 内に S-protein と CpG-DNA が効率的にデリバリーできることが分かった(図 2)。これらの結果は、BMDC に HA レセプターである CD44 が発現していることにより取り込みが促進されたためであると考えられる。マウスに鼻腔投与後の血清中の S-protein 特異的 IgG 抗体価、唾液中及び鼻腔洗浄液中に含まれる S-protein 特異的 IgA 抗体価を測定した結果、HA 被覆ミセル投与群は、S-protein と CpG-DNA の混合水溶液投与群と比べて、血清中の S-protein 特異的 IgG 抗体価が 5 倍、唾液中の S-protein 特異的 IgG 抗体価が 1.5 倍上昇し、S-protein 特異的 IgA 抗体が産生されたことが確認できた(図 3)。これは S-protein、CpG-DNA が粒子化されていることに加えて、HA の粘膜附着性及び粘膜上皮細胞、免疫細胞上に HA レセプターが発現していることに起因していると考えられる。これらの結果から S-protein と CpG-DNA を担持した HA 被覆ミセルは、鼻腔洗浄液中に IgA 抗体を誘導するだけでなく、投与部位以外にも S-protein 特異的な抗体を産生し、全身性免疫が効率的に誘導できることが示唆され、新型コロナウイルス感染症を予防する経鼻ワクチンとして有用である可能性が示唆された。

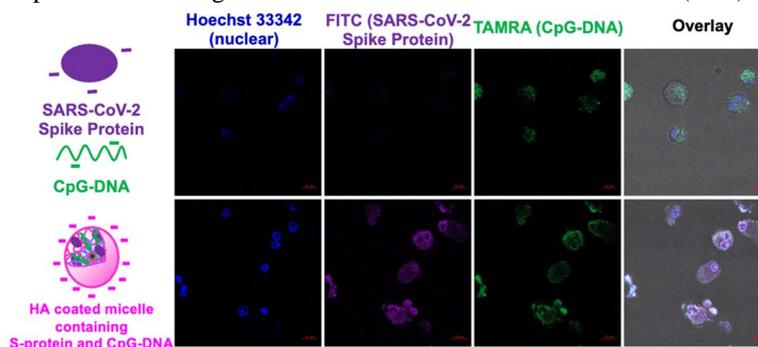


図 2. Observation of BMDCs using confocal laser microscopy.

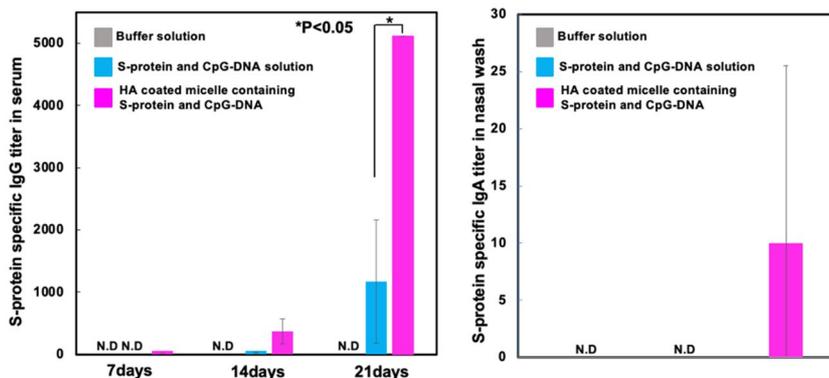


図 3. S-protein specific IgG antibody titers in serum (left) and IgA antibody titers nasal wash (right) of intranasally-immunized mice.

#### 参考文献

- 1) Y. Ohya et al., *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 1750-1756.
- 2) Y. Ohya et al., *J. Contr. Rel.* **2011**, *155*, 104-110.
- 3) K. Suzuki, Y. Ohya et al., *Biomater. Sci.* **2022**, *10*, 1920-1928.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshizaki Yuta, Yamasaki Manami, Nagata Takuya, Suzuki Kengo, Yamada Rio, Kato Takuma, Murase Nobuo, Kuzuya Akinori, Asai Akira, Higuchi Kazuhide, Kaji Kosuke, Yoshiji Hitoshi, Ohya Yuichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Drug Delivery with Hyaluronic Acid-Coated Polymeric Micelles in Liver Fibrosis Therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 3414 ~ 3424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.3c00327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Kengo, Yoshizaki Yuta, Horii Kenta, Murase Nobuo, Kuzuya Akinori, Ohya Yuichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Preparation of hyaluronic acid-coated polymeric micelles for nasal vaccine delivery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 1920 ~ 1928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1BM01985F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Y. Ohya, Y. Yoshizaki, M. Yamasaki, T. Nagata, A. Asai, K. Higuchi
2. 発表標題 Anti-fibrosis drug delivery to the liver using a hyaluronic acid-coated biodegradable polymeric micelle
3. 学会等名 9th Asian Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T. Kato, K. Suzuki, K. Horii, Y. Yoshizaki, N. Murase, Y. Ohya
2. 発表標題 Development of an intranasal vaccine against coronavirus infection using hyaluronic acid-coated polymeric micelles
3. 学会等名 9th Asian Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤匠真, 鈴木健吾, 堀井健太, 能崎優太, 村瀬敦郎, 大矢裕一
2. 発表標題 経鼻投与が可能な対コロナウイルスワクチンとしてのヒアルロン酸被覆高分子ミセルの開発
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大矢裕一, 能崎優太, 山咲菜名美, 永田拓也, 鈴木健吾, 山田莉央, 加藤匠真, 村瀬敦郎, 鍛治孝祐, 吉治仁志, 朝井章, 樋口和秀, 葛谷明紀
2. 発表標題 ヒアルロン酸で被覆した高分子ミセルを使用した抗肝繊維化薬の肝デリバリー
3. 学会等名 第72回高分子討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤匠真, 鈴木健吾, 堀井健太, 能崎優太, 村瀬敦郎, 大矢裕一
2. 発表標題 経鼻投与による免疫誘導が可能な対コロナウイルスワクチンとしてのヒアルロン酸被覆高分子ミセルの開発
3. 学会等名 第72回高分子討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Y. Ohya, Y. Yoshizaki, M. Yamasaki, T. Nagata, K. Suzuki, R. Yamada, T. Kato, A. Asai, K. Higuchi, K. Kaji, H. Yoshiji, N. Murase, A. Kuzuya
2. 発表標題 Treatment of liver fibrosis using a hyaluronic acid-coated biodegradable polymeric micelle as a drug delivery vehicle
3. 学会等名 The 13th SPSJ International Polymer Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T. Kato, K. Suzuki, K. Horii, Y. Yoshizaki, N. Murase, A. Kuzuya, Y. Ohya
2. 発表標題 Development of hyaluronic acid-coated biodegradable polymeric micelles for intranasal vaccine against SARS-CoV-2
3. 学会等名 The 13th SPSJ International Polymer Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大矢裕一, 能崎優太, 山咲菜名美, 永田拓也, 加藤匠真, 村瀬敦郎, 鍛治孝祐, 吉治仁志, 朝井章, 樋口和秀
2. 発表標題 ヒアルロン酸被覆高分子ミセルを用いたドラッグデリバリーによる肝障害抑制
3. 学会等名 第39回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大矢裕一, 能崎優太, 山咲菜名美, 永田拓也, 鈴木健吾, 山田莉央, 加藤匠真, 村瀬敦郎, 鍛治孝祐, 吉治仁志, 朝井章, 樋口和秀
2. 発表標題 ヒアルロン酸被覆高分子ミセルによる肝繊維化抑制薬剤のデリバリー
3. 学会等名 第 52回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Y. Ohya, K. Suzuki, Y. Yoshizaki, N. Murase, K. Horii, T. Kato, A. Kuzuya,
2. 発表標題 Development of intranasal vaccine system using hyaluronic acid-coated polymeric micelles
3. 学会等名 SFB 2023 Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大矢裕一
2. 発表標題 医療に貢献する生分解性スマートバイオマテリアル
3. 学会等名 第13回CSJ化学フェスタ（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大矢裕一
2. 発表標題 未来医療への貢献を目指したメディカルポリマー開発
3. 学会等名 第72回高分子学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Y. Ohya, K. Suzuki, Y. Yoshizaki, K. Horii, T. Kato, N. Murase, A. Kuzuya
2. 発表標題 Development of hyaluronic acid-coated polymeric micelles for nasal vaccine delivery
3. 学会等名 The 17th Pacific Polymer Conference (PPC-17)（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大矢裕一
2. 発表標題 生分解性スマートバイオマテリアルの設計と医療応用
3. 学会等名 第31回ポリマー材料フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大矢裕一, 鈴木健吾, 加藤匠真, 能崎優太, 村瀬敦郎, 葛谷明紀
2. 発表標題 経鼻投与で免疫誘導可能なナノ粒子型ワクチンの開発
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大矢裕一, 鈴木健吾, 堀井健大, 村瀬敦郎, 能崎優太, 葛谷明紀
2. 発表標題 ヒアルロン酸被覆ナノ粒子を用いた経鼻投与型ワクチンの開発
3. 学会等名 第51回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤匠真, 鈴木健吾, 能崎優太, 村瀬敦郎, 大矢裕一
2. 発表標題 抗原とアジュバントを搭載したヒアルロン酸被覆生分解性高分子ミセルの経鼻ワクチンとしての評価
3. 学会等名 第71回高分子学会年次大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大矢裕一他(分担執筆)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 580
3. 書名 新規モダリティ医薬品のための新しいDDS技術と製剤化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分 担 者	能崎 優太  (Yoshizaki Yuta)  (90805889)	東北大学・薬学研究科・助教    (11301)	

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