

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670076

研究課題名(和文) 経皮ワクチンの最適化を目指したアジュバントの探索

研究課題名(英文) Exploration of adjuvant for optimization of transcutaneous vaccine

研究代表者

中川 晋作 (Nakagawa, Shinsaku)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70207728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、経皮ワクチンデバイスとして皮膚内溶解型マイクロニードルを開発し、ニードル内に封入した抗原に対して注射による投与と同等の免疫応答を誘導出来る事を報告した。この研究においては、皮膚内溶解型マイクロニードルを用いた経皮ワクチンの最適化を図る為にアジュバントの探索を行った。その結果、Monophosphoryl Lipid A Lipid A (MPLA)とODN1826が経皮ワクチンにおいてモデル抗原の鶏卵白アルブミンに対する抗体産生を増強することを明らかにした。以上の結果からODN1826とMPLAは、経皮ワクチンアジュバントとして有用であろうと思われる。

研究成果の概要(英文)：We have developed a dissolving microneedle array for use as a transcutaneous vaccination (TCV) device, and reported that TCV with the dissolving microneedle array induced an immune response against antigens as well as systemic injection. In this study, I searched for the adjuvant which aimed at optimization of TCV. As a result, Monophosphoryl Lipid A (MPLA) and ODN1826 enhanced antibody production against ovalbumin as a model antigen on TCV used dissolving microneedle. ODN1826 and MPLA will be useful as TCV adjuvant.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：ワクチン アジュバント マイクロニードル

1. 研究開始当初の背景

現在の発達した産業は世界のボーダレス化を推進し、国家間での人、動物、植物などの交流が盛んに行われている。これは各種疾病を引き起こす病原体についても同様で、様々な物流に伴う国境を越えた病原体の移動は、新興・再興感染症を世界的規模で流行させる脅威となっている。このような社会背景のもと、感染症対策において抗生物質などの陰に隠れていたワクチンが、根本的予防における唯一の手段として再認識されるようになってきた。しかし現在実用化されているワクチンの大半は注射による免疫法である。注射は、痛みを伴う、接種に医療技術者を必要とする、輸送や保管に一貫した冷蔵管理を必要とする、などの技術的・経済的な問題点を有しており、これらの点がワクチンを最も必要としている開発途上国にワクチンを浸透させにくい原因となっている。また注射型ワクチンではパンデミック発生時に大規模なワクチン接種を迅速に行えないことも欠点として挙げられる。したがって、注射投与に代わる効果的かつ簡便、安価、低侵襲な新規ワクチン手法の開発ならびに実用化が開発途上国をはじめとする世界各国で待望されている。本観点から、我々は独自の皮膚内溶解型マイクロニードル(MN)を応用した経皮ワクチン製剤(貼るワクチン)の開発を推進している。これまでに本ワクチンシステムは、抗原特異的抗体産生を中心とした免疫応答を誘導することを見出し、インフルエンザ、破傷風/ジフテリア、マラリアなどの感染症モデルにおいて非常に優れたワクチン効果を発揮することを明らかとした。

一方で、現行のワクチン抗原はウイルスや菌の培養・精製により製造されるために、生産開始から供給まで多大な時間を要し、パンデミックに対応した緊急な抗原の製造は困難である。そのため、より少ない抗原、より少ない接種回数で優れたワクチン効果を発揮することが求められる。また、ウイルス性感染症においては、抗体産生を中心とした液性免疫だけでなく、細胞傷害性T細胞を主導とする細胞性免疫の重要性が報告されている。これらを達成するためには、アジュバントの併用が重要になる。アジュバントとは、ワクチン抗原とともに投与して、その抗原に対する免疫原性を増強する目的で使用される添加剤の呼称である。しかし、現在注射ワクチンに汎用されているアジュバントはアルミニウム塩である。アルミニウム塩はゲル形態であるため、経皮ワクチン製剤への添加が困難であり、また適用できたとしても皮膚組織への十分な送達は見込めない。つまり、現状では経皮ワクチンに使用できるアジュバントが存在しない。従って経皮ワクチンにおいて、安全かつ有効なアジュバントを見出すことが出来れば、抗原量や接種回数の削減が達成され、医療経済的效果だけでなく、開発途上国へのワクチンの普及やパンデミッ

クに迅速に対応できる経皮ワクチンシステムの確立に大きく貢献するものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、経皮ワクチンに適応出来るアジュバントを探索する事を目的とし、Toll様受容体(Toll-like receptor; TLR)に着目した。TLRは、宿主には存在せず微生物に共通して存在する病原体分子パターンを認識するパターン認識受容体である。TLRは自然免疫と獲得免疫のクロストークに関わる報告が多数なされており、現在ワクチンアジュバントの標的として非常に注目を集めている。そこでTLRアゴニストであるTLR-ligand(TLR-L)の中から経皮ワクチン用アジュバント候補物質を探索することとした。具体的には、MNを用いて各種TLR-Lのアジュバント活性を評価し、安全性と有効性を兼ね備えた経皮ワクチン用のアジュバント候補物質を選択する。選び出された経皮ワクチン用アジュバント候補物質については、ランゲルハンス細胞(LC)、ケラチノサイト(KC)および表皮樹状細胞(dDC)に対する機能解析を行うと共にin vivoでの免疫増強作用および免疫誘導特性を検討し、アジュバントを用いた経皮ワクチンシステムの基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) マウスへの免疫

除毛したマウスの背部皮膚を平らに伸ばし、その上に針長が300 μ mのMNを置きアプリケーターを用いて圧着させた。5秒後にMNを剥離し、各TLR-Lを含んだOvalbumin(OVA; 50 μ g)溶液を5 μ L滴下した後、親水性ゲルパッチを貼付(6時間)する事で免疫を行った。初回免疫2週間後にOVA単独溶液(50 μ g)を同様に経皮投与し、経日的に血清を回収した。尚、用いたTLR-Lは、Pam3CSK4(10 μ g/mouse)、Poly(I:C)(10 μ g/mouse)、ODN1826(10 μ g/mouse)、Monophosphoryl lipid A(MPLA; 5 μ g/mouse)を用いた。

(2) 抗体価の測定

OVA(10 μ g/mL in 50 mM Bicarbonate buffer: pH 9.6)を50 μ L/wellで96 well ELISA plateに分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置することで固相化した。固相化したplateにTris-buffered saline(TBS)で希釈した8%スキムミルクを200 μ L/wellで加えブロッキングした後、各希釈倍率に調製したサンプルを加え、室温で2時間インキュベーションした。その後0.05% Tween-20/TBS(TBST)で5回洗浄し、TBSTで希釈した0.2%スキムミルクを用い、5000倍希釈したHRP-conjugated goat anti-mouse IgG並びにIgG1、IgG2b、IgG2cを検出抗体として各50 μ L/wellで添加した。室温で2時間インキュベーションした後、TBSTで5回洗浄し、TMB溶液を100 μ L/wellで添加した。15分後、2N H₂SO₄を100 μ L/wellで加えることにより反応を停止させ、吸光度

長 450 nm、副波長 655 nm にて吸光度を測定した。抗体価は免疫前の血清よりも吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率を Reciprocal log₂ titer として表した。

(3) 脾臓におけるサイトカイン産生細胞数の解析 (ELISPOT 法)

最終免疫 2 週間後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製した。OVA を終濃度 1 mg/mL で添加し、24 時間培養することにより、*in vitro* 抗原再刺激を行った。その後、IFN-ELISPOT assay kit、IL-4 ELISPOT assay kit により、脾臓における IFN- γ ならびに IL-4 産生細胞数を計数した。

(4) Draize 法による皮膚刺激性試験

親水性ゲルパッチの剥離直後ならびに剥離 24 時間後の皮膚の状態を肉眼的に観察し、Draize 評価基準に基づいて皮膚刺激性をスコア化した。

(5) LC、KC および dDC のフローサイトメトリ解析

除毛したマウスの胸部皮膚ならびに耳介皮膚を採取し、耳介皮膚はピンセットを用いて軟骨の層を境に二層に分離した後、それぞれを 0.5% Dispase/RPMI1640 に角質層が上になるように浮かべた。37 °C で 3 時間インキュベーションした後に、角質層と生きた表皮をピンセットを用いてはぎ取り、表皮シートと真皮シートを単離した。採取した表皮シートをピペティングし、セルストレイナーを通して表皮細胞懸濁液とした。表皮細胞懸濁液を氷冷した Staining buffer にて 1×10^7 cells/mL に調製し、Rat anti-mouse CD16/CD32 blocks-Fc binding を添加後、氷上で 20 分間インキュベーションした後、FITC-conjugated anti-mouse MHC class II mAb を添加し、さらに氷上で 20 分間インキュベーションすることで、MHC class II 陽性細胞の蛍光染色処理を行った。

真皮シートを 10 mL の 1% コラゲナーゼ/PBS 中で細かく切り刻み、スターラーで 37 °C、30 分間攪拌した。その後、ピペティングにより組織を破碎し、40 mL の PBS を加え、セルストレイナーを通して真皮細胞懸濁液とした。これらの細胞懸濁液を Staining buffer にて 1×10^7 cells/mL に調製し、 1×10^6 cells/tube で分注した。Rat anti-mouse CD16/CD32 blocks-Fc binding (clone; 2.4G2) を添加した後に、氷上で 20 分間静置した。その後、APC-conjugated anti-mouse CD11c (clone; N418) を添加し、さらに氷上で 20 分間静置することで、CD11c に対する蛍光抗体染色を行った。

細胞表面に発現している TLR4 の染色については、PE-conjugated anti-mouse TLR4 (clone; 6C2) をさらに添加し、氷上で 20 分間静置することにより行った。

また、エンドソーム内に発現している TLR9

の染色については、anti-mouse CD11c を用いた蛍光染色処理後、Staining buffer で細胞を洗浄した。Cytotfix/Cytoperm に懸濁し、氷上で 20 分間放置することによって細胞膜透過処理を行った後に、Perm/Wash buffer で細胞を洗浄し、PE-conjugated anti-mouse TLR9 (26C593.2) を加えた。氷上で 20 分間インキュベーションした。

染色後の細胞は 500 μ L の Staining buffer に懸濁し、Gallios™ Flow Cytometer (Beckman Coulter) によって解析した。なお、Gallios™ Flow Cytometer によるフローサイトメトリ解析の前に 7-AAD を添加することで死細胞を染色した。

(6) LC、KC および dDC の調製

先に示した方法にて表皮細胞懸濁液ならびに真皮細胞懸濁液を調製した。氷冷した Staining buffer にて 1×10^7 cells/ml に調製し、Rat anti-mouse CD16/CD32 blocks-Fc binding を添加後、氷上で 20 分間インキュベーションした。

表皮細胞懸濁液に FITC-conjugated anti-mouse MHC Class II を加え、氷上で 20 分間静置することで LC を蛍光標識した。その後、FACS Aria II cell sorter (BD Bioscience) を用いて MHC Class II 分子の発現を指標に LC と KC を分取し、以降の実験に供した。

真皮細胞懸濁液に APC-conjugated anti-mouse CD11c (N418) を加え、氷上で 20 分間静置することで dDC を蛍光標識し、7-AAD を添加することで死細胞を染色した。その後、FACS Aria II cell sorter (BD Bioscience) を用いて CD11c 分子の発現を指標に dDC を分取し、以降の実験に供した。

(7) ODN1826 および MPLA の刺激における LC、KC および dDC の表現型と分泌されるサイトカインの解析

RPMI1640 で懸濁した LC、KC および dDC を 5×10^5 cells/500 μ L/well で 24 well plate に播種し、ODN1826 および MPLA を終濃度が 10 μ g/mL になるように添加した。24 時間培養した後に、細胞を回収し、Staining buffer で 1×10^7 cells/mL に調製した。Rat anti-mouse CD16/CD32 blocks-Fc binding を添加した後に、氷上で 20 分間静置した。細胞表面に発現している各マーカーを染色するために、Anti-mouse MHC class II (I-Ab) eFluor 780 (clone; M5/114)、PE-conjugated anti-mouse MHC class II (I-Ak) (clone; 11-5.2)、PE-conjugated anti-mouse MHC class I (H-2Kb) (clone; AF6-88.5)、PE-conjugated anti-mouse MHC class I (H-2Kk) (clone; 36-7-5)、PE-conjugated anti-mouse CD40 (clone; 12-0401)、PE-conjugated anti-mouse CD197 (CCR7) (clone; 12-1971)、APC-conjugated anti-mouse CD86 (clone; GL-1)、あるいは

APC anti-mouse CD80 (clone; 16-10A1) を添加し、氷上で 20 分間静置した。染色後の細胞は 500 μ L の Staining buffer に懸濁し、Gallios™ Flow Cytometer (Beckman Coulter) によって解析した。

また、24 時間後の培養した細胞の上清を回収し、各サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12) の濃度を ELISA 法により測定した。

4. 研究成果

(1) 経皮免疫における各種 TLR-L のアジュバント活性評価

各種 TLR-L の経皮免疫におけるアジュバント活性を Poring 法により評価した。各種 TLR-L と OVA を混合してマウスに経皮免疫したところ、ODN1826 以外の群では各群において 1 回免疫後 (Day 13) に OVA 特異的な抗体価が検出できなかったマウスが数匹いるのに対し、ODN1826 を併用した群では高い抗体産生が認められ、ODN1826 の強力な免疫増強効果が明らかとなった。また、二回免疫後 (Day 27) の時点においては、Pam3CSK4 および Poly(I:C)併用群では OVA 単独投与群と比較して抗体産生の増加が認められなかったが、MPLA 併用群の抗体価は OVA 単独投与群より有意に上昇していた。以上のことから、ODN1826 ならびに MPLA が経皮ワクチン用アジュバントの候補として有望であることが示された。

続いて、IgG 抗体のサブクラスを 2 回免疫後 (Day 27) の血清を用いて測定し、アジュバントの併用による免疫応答特性を解析した。その結果、ODN1826 あるいは MPLA を併用した群において Th1 型抗体である IgG2b ならびに IgG2c の抗体産生の増強が認められた。したがって、ODN1826 あるいは MPLA を併用することで、免疫応答を増強できるとともに、Th1 型の免疫応答を効率よく誘導できるものと推察される。

さらに、ODN1826 および MPLA 併用群について最終免疫 2 週間後の脾臓細胞における IFN- γ ならびに IL-4 産生細胞数を解析した。ODN1826 を併用した群では、OVA 単独免疫群と比較して IFN- γ 産生細胞数は 2 倍以上増加していたのに対し、IL-4 産生細胞数は減少していた。一方で、MPLA を併用した群では、OVA 単独免疫群と比較して IFN- γ 、IL-4 両方ともに増加していた。この結果を踏まえると、ODN1826 および MPLA は共に Th1 型免疫応答を強く誘導し、また MPLA は Th2 型免疫応答をも活性化できるアジュバントであることが示された。

また ODN1826 あるいは MPLA の安全性評価として皮膚刺激性を検討した結果、両者を併用した群における紅班は、軽度且つ OVA 単独群と同等であり、問題ないと判断した。

(2) TLR-L 刺激した時の LC、KC および dDC の機能解析

C57BL/6 マウスならびに C3H マウス由来の LC、KC、dDC における TLR4 ならびに TLR9 の

発現をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、両マウス由来の何れの細胞も TLR4 および TLR9 を共に発現していることを確認した。従って、ODN1826 (TLR9-L) と MPLA (TLR4-L) のアジュバント活性発現メカニズムにはこれらの細胞が関与している可能性が考えられた。そこで ODN1826 および MPLA が T 細胞への抗原提示に必要な分子の発現に及ぼす影響を解析した。C57BL/6 マウス由来の LC と dDC に ODN1826 および MPLA を作用させると、MHC class I 分子の発現に関してはわずかな上昇であったが、CD40、CD80、CD86、CCR7、MHC class II 分子の発現は大きく増加した。これらの共刺激分子は樹状細胞の活性化や成熟化に関わる分子であることから、この結果は ODN1826 および MPLA は LC や dDC の活性化ならびに成熟化を促進していることを示唆している。また、TLR4 の細胞内ドメインに変異を有するために TLR4 を介したシグナルに低応答性の C3H マウス由来の LC や dDC を用いて同様の検討を行った結果、TLR9-L である ODN1826 を作用させた場合は、C57BL/6 マウス由来 LC や dDC と同様に CD40、CD80、CD86、CCR7、MHC class II 分子の発現は大きく増加していた。しかし、TLR4-L である MPLA を作用させた場合に、CD40、CD80、CD86、CCR7、MHC class I、MHC class II 全ての分子において、その発現レベルは何も作用させていない vehicle 群と同程度であった。このことから、MPLA による LC や dDC の活性化は TLR4 を介したシグナルによって引き起こされたものであると推察できる。尚、今回検討した 10 μ g/mL の濃度においては、顕著な細胞傷害性を示さないことを確認している。

続いて、ODN1826 あるいは MPLA を作用させた LC あるいは dDC におけるサイトカインの産生量を測定した。TLR に対するリガンドを作用させない場合にはほとんどサイトカインの産生は認められなかった。それに対して、ODN1826 および MPLA を作用させた場合には、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12 のサイトカインの産生増強が認められ、TNF- α 、IL-1 β に関しては MPLA を作用させた場合の方が産生量は多く、IL-12 は ODN1826 を作用させた場合の方が産生量は多かった。

C57BL/6 マウスと C3H マウス由来の KC に対しては、ODN1826 を作用させることにより、TNF- α 、IL-1 β 、ならびに IL-6 の産生増強が見られた。一方で、MPLA を作用させた場合、C57BL/6 マウス由来 KC においては TNF- α 、IL-1 β および IL-6 の産生増加が見られたのに対して、TLR4 低応答性の C3H マウス由来 KC においては、どのサイトカインについても産生増強は認められなかった。

以上、本研究において経皮ワクチンアジュバント候補物質として ODN1826 および MPLA を見出し、その免疫誘導特性について評価した。現在、これらアジュバント候補物質を用いた経皮ワクチン製剤の開発を目指し、更なる有効性、安全性評価を行っているところで

ある。これらの研究成果は、経皮ワクチンシステムを確立するにあたり、大きく貢献するものと考えらる。

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 6 件)

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、予防接種を簡便にする「貼るワクチン」の開発、臨床と微生物、査読無、41、2014、711-717

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、ワクチン開発における DDS、医薬ジャーナル、査読無、50、2014、1797-1803

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、経皮ワクチン、BIOINDUSTRY、査読無、31、2014、18-26

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、貼るワクチン製剤の開発、PHARM TECH JAPAN、査読無、30、2014、717-723

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、マイクロニードルワクチンの可能性、最新醫學、査読無、69、2014、872-879

Matsuo K, Hirobe S, Okada N, Nakagawa S, Frontiers of transcutaneous vaccination systems: novel technologies and devices for vaccine delivery. Vaccine, 査読有, 31, 2013, 2403-2415

[学会発表](計 6 件)

中川晋作、貼るワクチンについて、日本薬学会第 135 年会 市民公開講座(招待講演) 2015 年 3 月 29 日、大阪(大阪大学中之島センター)

中川晋作、貼るワクチンの開発で、感染症の克服を目指す、Handai-Asahi 中之島塾(招待講演) 2015 年 2 月 7 日、大阪(大阪大学中之島センター)

中川晋作、「貼るワクチン」の開発を目指して、新塾特別版 山村雄一記念ライフホール開設講演会(招待講演) 2014 年 4 月 23 日、大阪(千里ライフサイエンスセンター)

須佐井 亮、経皮投与した CpG オリゴヌクレオチドのアジュバント活性に関する基礎的検討、第 17 回日本ワクチン学会学術集会、2013 年 11 月 30 日~2013 年 12 月 1 日、三重県総合文化センター

中川晋作、マイクロニードルを用いた経皮ワクチン製剤の開発を目指して、第 45 回日本小児感染症学会(招待講演) 2013 年 10 月 26 日~2013 年 10 月 27 日、札幌コンベンションセンター

須佐井 亮、CpG オリゴヌクレオチドの経皮アジュバント活性に関する基礎的検討、日本薬学会第 28 年会、2013 年 5 月 23 日~2013 年 5 月 25 日、ウイング愛知

[図書](計 6 件)

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、技術情報協会、注射剤・経口製剤に代わる新しい薬剤投与デバイスの開発、2014 年、363

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、メディカルドゥ、遺伝子医学 MOOK 別冊 ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線 古くて新しいドラッグデリバリーシステム (DDS) 、2013 年、376

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、技術情報協会、DDS 製剤の開発・評価と実用化手法、2013 年、680

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、シーエムシー出版、非経口投与製剤の開発と応用 ~次世代型医薬品の新規投与形態の開拓を目指して~、2013 年、257

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、エヌ・ティー・エス、応用が広がる DDS 人体環境から農業・家電まで、2013 年、578

廣部祥子、岡田直貴、中川晋作、情報機構、ワクチン開発における最新動向、2013 年、220

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b011/work.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 晋作 (NAKAGAWA Shinsaku)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：70207728