

オクタアルギニン修飾ナノ粒子を基盤とした 新規ワクチンデリバリーシステムの創製

学位論文内容の要旨

【背景】

近年、免疫学の進歩により病原体に対する免疫反応やワクチン接種による免疫誘導のメカニズムの詳細が明らかになったことで、より戦略的なワクチン開発が可能になってきた。戦略的なワクチン開発には、様々な免疫反応過程を考慮に入れたワクチン設計が求められているが、そのためには抗原とアジュバントの体内及び細胞内動態を時空間的に制御可能なデリバリーシステムの開発が必要とされる。

当研究室では、複数の機能性素子を戦略的に搭載することができる独自のデリバリーシステムとして、多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND) の開発を進めている。MEND はコアシェル構造を有しており、脂質膜表面に様々な機能性素子をトポロジーを考慮して配置することが可能である。特に、膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン (R8) を修飾した R8-MEND は、高い細胞親和性を有していることが明らかとなっており、核酸やタンパク質のデリバリーに用いられている。

本研究では、様々な免疫反応過程を考慮した戦略的なワクチン開発を実現するため、R8 修飾ナノ粒子 (R8-NP) を基盤とし、抗原やアジュバントの細胞内動態、体内動態の制御に加え、静脈内投与や経口投与といった従来型のワクチンでは困難であった投与方法によるワクチン開発を可能とする新規ワクチンデリバリーシステムの構築を行った。

【結果及び考察】

1. R8 修飾ナノ粒子を用いた抗原の細胞内動態制御と細胞性免疫誘導

外来性抗原を用いた従来のワクチンは、細胞性免疫誘導効率の低さが問題となっていた。細胞性免疫を誘導するためには、MHC クラス I 分子上に抗原を提示させる必要があり、細胞質への抗原送達が必要となる。当研究室では、培養細胞を用いた実験から R8-NP が細胞質へ効率的に脱出できることが明らかになっていることから、R8-NP に抗原を封入することで効率的な MHC クラス I 抗原提示と細胞性免疫の誘導が可能になると考えた。

抗原提示細胞として樹状細胞を用いて、R8-NP の取り込み及び細胞内動態を解析した。その結果、R8-NP はマクロピノサイトーシスを介して樹状細胞に取り込まれ、効率的に内封物を細胞質に送達できることが明らかとなった。また樹状細胞における抗原提示効率を測定したところ、フリーの抗原や従来用いられているカチオン性ナノ粒子と比較して、非常に効率的な MHC クラス I 抗原提示が認められた。加えて、MHC クラス II への抗原提示が低かったことから、R8-NP は MHC クラス I に特異的に抗原提示可能であることが示された。さらに *in vivo* において顕著な腫瘍増殖抑制効果を示した。R8-NP は抗原の細胞内動

態を制御可能であり、特異的な MHC クラス I 抗原提示能と高い抗腫瘍活性を有することから、ワクチンキャリアーとして有用であることが示唆された。

2. アジュバントを搭載した R8 修飾ナノ粒子の静脈内投与型ワクチンとしての有用性評価

ワクチンの静脈内投与は、最大のリンパ器官である脾臓に直接抗原を送達できるという大きな利点があるが、アジュバントや病原体を静脈内に投与することになるため、安全面の問題があり、実現不可能と考えられてきた。本研究では、アジュバントのトポロジーを考慮し、R8-NP に搭載することで、アジュバントの非特異的な反応を軽減し、静脈内投与型ワクチンとしての有用性を評価した。

アジュバントとして polyI:C を内封した R8-NP を尾静脈内投与したマウスの CTL 活性及び抗腫瘍活性を測定した結果、非常に高い CTL 活性誘導と腫瘍増殖抑制効果が認められた。また静脈内投与後の肝毒性及び炎症性サイトカイン産生量を測定した結果、肝毒性は殆ど認められず、polyI:C と抗原を混合して投与した場合と比較して polyI:C 内封 R8-NP を投与した場合、炎症性サイトカイン産生が抑制された。以上のことから、polyI:C 内封 R8-NP は、静脈内投与型ワクチンとして有用であることが示唆された。

3. R8 修飾ナノ粒子を基盤とした経口投与型ワクチンの開発

近年、粘膜面での免疫防御を誘導できる粘膜ワクチンの開発が盛んに行われており、特に経口投与型ワクチンに注目が集まっている。しかしながら、消化管をはじめとした多くの障壁があるため、それらを突破するためのデリバリーシステムの開発が必要とされている。そこで本研究では R8-NP を基盤とし、消化管条件下で安定なデリバリーシステムの構築と経口粘膜ワクチンとしての機能評価を行った。

消化管環境を模した条件下で、ナノ粒子の粒子径変化及び内封物の漏出を指標に脂質組成や機能性素子の検討を行った結果、消化管環境で安定な R8/PEG-NP の構築に成功した。また蛍光ラベルした R8/PEG-NP を経口投与し、腸管の組織切片を観察した結果、R8/PEG-NP は免疫組織であるパイエル板に抗原を送達可能であった。加えて、経口免疫後の腸内 IgA 産生量を測定したところ、未処理のマウス群と比較して、有意な抗体産生が認められた。以上の結果より、R8-NP を基盤としたデリバリーシステムが経口投与型ワクチンとして応用可能であることが示唆された。

【まとめ】

1. R8-NP に抗原を封入することで効率的な抗原の細胞質送達を可能にし、特異的な MHC クラス I 抗原提示及び抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。
2. polyI:C のトポロジーを考慮し R8-NP に内封することで、静脈投与においても高い CTL 活性及び抗腫瘍活性を誘導し、さらに副作用の原因となる炎症性サイトカインの産生を抑制することに成功した。
3. 消化管環境で安定な R8/PEG-NP を構築し、経口投与した R8/PEG-NP は抗原をパイエル板まで送達させることが可能であった。さらに R8/PEG-NP を用いて経口免疫を行うことにより、抗原特異的腸内 IgA の産生量が増加した。

以上の結果より、抗原、アジュバント、機能性素子のトポロジーを制御して構築した R8-NP を基盤としたデリバリーシステムが、ワクチンの接種方法から送達部位、抗原提示、免疫活性化といった一連の免疫反応を考慮した戦略的ワクチン開発のためのデリバリーシステムとして有用であることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 島 秀 吉

副 査 教 授 菅 原 満

副 査 准教授 紙 谷 浩 之

副 査 教 授 小 暮 健太朗 (京都薬科大学

大学院薬学研究科)

学 位 論 文 題 名

オクタアルギニン修飾ナノ粒子を基盤とした 新規ワクチンデリバリーシステムの創製

近年、様々な感染症に対するワクチン製剤の開発が盛んに行われており、特に最近では新型インフルエンザのパンデミックによってその重要性和必要性が改めて認識され、より安全で効果の高い革新的なワクチンが渴望されている。しかし、現在使用されているワクチンは、不活化ワクチンや生ワクチンであり、効果や安全性に問題が残されている。そのため、安全性が高く免疫誘導能力の高いワクチンは未だに開発されていない。この2つの課題を解決するためには、安全性の高い材料を用い、さらにはウイルスのように効率的に免疫担当細胞内の細胞質に抗原タンパク質を送達可能な、人工のワクチンが必要となる。

筆者は、これを可能にするシステムとして、リボソームベースの人工デリバリーシステムである多機能性エンベロープ型ナノ構造体 MEND と細胞膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン R8 に着目し、安全で機能性の高い人工ワクチンの開発に取り組み、R8 修飾ナノ粒子を構築した。筆者は、R8 修飾ナノ粒子の免疫誘導能を評価したところ、従来のリボソームワクチンでは困難であった細胞性免疫 (MHC クラス I 分子依存型) の特異的な誘導に成功している。さらには、著しく高い抗腫瘍効果の誘導にも成功している。常識的に、リボソームワクチンでは細胞性免疫と液性免疫両方が同時に誘導されるものであったが、筆者らの成果はこれまでの常識を超えるものであり、実際筆者らの行ったマイクロアレイ解析によって何らかの遺伝子発現の誘導が高く特異的な細胞性免疫誘導に関与していることが見出されており、特筆すべきものである。

さらに、筆者は R8 修飾ナノ粒子を静脈内投与型ワクチンとしての有用性の検討を行っている。常識的に、ワクチンの静脈内投与は、露出されているアジュバントや抗原による炎症などの危険性が高いため、ほとんど試みられていない。ところが、著者の開発した R8 修

飾ナノ粒子ワクチンは、アジュバントの立体的な配置を制御することができるため、これらの危険性を回避可能であると同時に、適所（免疫細胞内）で機能させることが可能であるという画期的なものである。筆者は、実際に R8 修飾ナノ粒子をガン移植マウスに静脈内投与することで、毒性の指標（ALT）や炎症性サイトカイン（IL-6）の産生を誘起することなく、ほとんど完全に腫瘍成長を抑制しており、R8 修飾ナノ粒子の高い安全性と効果の立証に成功している。本投与方法は、現在、膀胱がん治療において世界的にゴールドスタンダードと言われている BCG 注入療法にも適用され、BCG の細胞骨格成分を R8-MEND に搭載した BCG-MEND を静脈内に投与することで膀胱がんに対する抗腫瘍効果を見るに至っており、日本 BCG 製造と共同で実用化へ展開している。

加えて、多くの感染症（エイズなど）には粘膜免疫の誘導が不可欠であると考えた筆者は、R8 修飾ナノ粒子ワクチンの経口投与にも挑戦している。常識的に考えて、経口投与されたものは消化管において容易に分解されてしまう。さらに、その消化プロセスは、強酸性から強アルカリ性へと極端な環境変化を伴う。経口投与によって粘膜免疫を誘導するためには、このような過酷なプロセスを経由して小腸の免疫組織にまで抗原を送達しなければならず、かなりの困難が予想される。実際筆者は、多くの試行錯誤を繰り返すことで、この課題を克服し、小腸免疫組織にまで抗原送達可能な R8 修飾ナノ粒子の開発のみならず粘膜免疫の誘導に成功している。

これを要するに、著者は、従来の常識を覆し、特異的に細胞性免疫が誘導可能で、静脈内投与が可能な安全性の高い、さらには経口投与による粘膜免疫も誘導可能な革新的人工ワクチンの開発に成功したものであり、ワクチン研究および感染症予防・治療医学領域に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格を有すると思われる。