

経鼻ワクチンの挙動と安全性評価技術の開発

研究代表者： 幸 義和（東京大学医科学研究所 炎症免疫分野）

協力研究者： 原田典弘（浜松ホトニクス株式会社 中央研究所 PET センター）

片貝祐子（予防衛生協会 研究支援企画部）

福山賀子（東京大学医科学研究所 炎症免疫分野）

研究要旨： 経鼻ワクチンは上気道感染症病原体であるウイルス、細菌の防御免疫を誘導するもっとも有効な方法の一つであるが、スイスでの不活化インフルエンザワクチンとアジュバントである大腸菌易熱性毒素(LT)の同時経鼻投与で、一部の被験者に現れた顔面麻痺による中枢神経系への影響が問題になった。加えて、毒素系アジュバントの嗅覚神経系への影響、嗅球への沈着がマウスで知られており、経鼻ワクチンの開発にはワクチン効果のほかに、ヒトに近い霊長類での安全性評価の試験方法の確立が急務となっている。本研究課題では、ナノゲル P s p A 肺炎球菌経鼻ワクチンのサルでのワクチン投与において誘導された免疫応答と防御効果と並びに安全性を評価するために PET を用いてワクチンの動態を明らかにすることを目標とする。今年度は ^{18}F 標識を行った経鼻肺炎球菌ワクチンを使用して、アカゲザルを用いたモデル実験を実施した。

A. 研究目的

我々は人工分子シャペロン機能を持つナノサイズゲルを経鼻ワクチンの DDS キャリアとして使う試みを行っている。水溶性多糖特にプルランにコレステリル基を部分的に導入したコレステロール置換プルラン (CHP) ナノゲルは、疎水的な会合力により、そのゲルは球状構造をとり、その内部空間に容易に蛋白質をトラップすることができ、さらに、ナノゲル内の疎水基をシクロデキストリンで包接、可溶化することでナノゲル構造を破壊させる手法や過剰な他の蛋白質との交換反応により、

内部にトラップされた蛋白質を遊離して機能を再生できる。実際に、CHP にアミノ基を 100 単糖あたり 10-20 個程度導入したカチオン性 CHP (cCHP) を調製し、この cCHP ナノゲルと大腸菌で作成した組換えボツリヌス A 型毒素ワクチン BoHc を、45 1 時間の温度処理することにより、効果的にナノゲルに取り込まれることを確認した (Nat. Mater. 9: 572-578, 2010)。このナノゲル型経鼻ワクチンデリバリーシステムを肺炎球菌の P s P A 抗原を用いた経鼻ワクチンに応用することで、マウスのみならず、サルでも防御免疫を誘導できるこ

とを昨年までに報告した。

さてこのようなワクチン効果の以外に、経鼻ワクチンの場合には特に開発において候補ワクチン及びアジュバント又はデリバリーシステムにおいてワクチンまたはアジュバント自身が中枢神経系へ移行するかどうかは重要な課題である。ここで、経鼻投与されたワクチン等の挙動を研究する上でマウスとヒトの鼻腔粘膜上皮細胞における解剖学的差異には注意を払う必要がある。鼻腔粘膜上皮細胞は呼吸器上皮細胞と嗅覚上皮細胞からなっているが、嗅覚上皮細胞は嗅覚受容体を発現している嗅覚神経細胞であり、マウスや犬は嗅覚上皮細胞がよく発達し鼻腔粘膜上皮細胞の70-80%を覆っているのにたいして、ヒトを含む霊長類のそれは10%未満である。そのため、経鼻ワクチンの安全性を評価する上での吸収、分布、代謝、排泄（ADME）試験にはサルを含む2種類以上の動物種で実施する必要がある。従来、タンパク医薬のADMEには ^{125}I や ^{111}In 標識放射性物質を用いたオートラジオグラフィや摘出臓器の放射能測定法が用いられてきた。しかし最近の分子イメージング技術は生きたままの動物での可視化とリアルタイムでの定量を可能にしている。特にPET(Positron-Emission Tomography)のような放射能ベースの分子イメージングはヒトで非侵襲的に中枢神経の活動や癌の体内検出を可能にしている。従来からのCT(Computerized Tomography)やMRI(Magnetic Resonance Imaging)のような構造イメージング技術を組み合わせることでPETの特異性と感度を高めることができる。今まで、PETイメージングに

はブドウ糖誘導体のような低分子トレーサーが用いられてきたが、タンパクをトレーサーにしたPETはほとんど報告されていない。我々は最近、経鼻ワクチンとして、マウス及びサルで有効性が証明されているボツリヌス毒素に対するワクチン(BoHc)を用いて、 ^{18}F -BoHcの合成、経鼻投与されたマウスで全身PET解析、及び ^{18}F -BoHcを用いたサルでのBoHc経鼻ワクチンの脳内移行否定試験法を開発した(J. Immunol. 185: 5436-5443, 2010)。

そこで、昨年までにワクチン抗原であるPspAを ^{18}F 標識したPETを開発しマウスを用いてADME試験を行ったので、今年サルを用いてPspA PET試験を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 材料

肺炎球菌ワクチンは東大医科研で、肺炎球菌の表面抗原の大腸菌発現組換えPspAを高純度に精製して用いた。

CHPにアミノ基を100単糖あたり20個程度導入したカチオン性CHP(cCHP)は京大工学部秋吉研究室で合成された。

2) 物性

ナノゲル化PspAの物性は、2重蛍光標識して、FRET解析、大きさ(DH解析)、荷電(Zeta-potential)で評価した。

3) PspA ワクチンの ^{18}F 標識

浜松ホトニクス社の協力を得て、昨年度報告した方法で肺炎球菌の組換えのアミノ基(^{18}F -Lys)を介して ^{18}F -PspAを合成した。

4) PET を用いたサルにおける ^{18}F 標識ワクチンの動態解析

上述 2)の手順で回収された ^{18}F 標識 PspA を cCHP (20mg/ml) で、PspA:cCHP = 1:5 モル比で、ナノゲル化 (45C、30分) したものの、及び ^{18}F -PspA をアカゲザルの鼻腔領域内に投与 (片鼻 250 μl 、両鼻で計 500 μl)、接種直後より PET を用いてその動態を解析した。ナノゲル用いたアカゲザル 3 頭は浜松ホトニクス株式会社により飼育されているサルを用いた。動物への処置は国立感染症研究所および浜松ホトニクス株式会社の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように考慮した。

C. 研究結果

1. ナノゲル PspA 物性

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) は二重蛍光標識したナノゲル PspA にのみ観測され、FITC 標識した PspA またはローダミン標識したナノゲル自身には観測されなかった (図 1)。

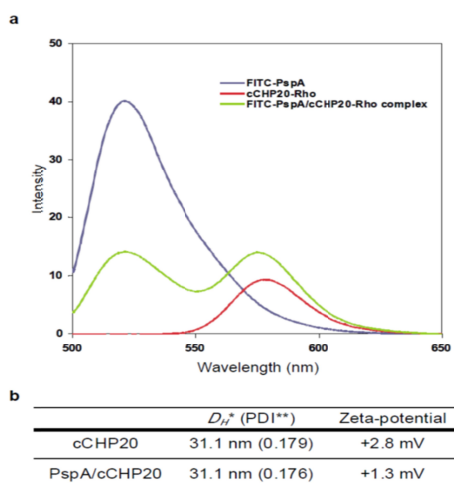


図 1. ナノゲル PspA の FRET (a) と大きさ と荷電

Dynamic light scattering 解析は PspA を被覆した後も、していないものもナノゲルは単一の形態の直径 31.1 nm の大きさを維持していた (図 1 表)。zeta-potential で測定したナノゲル及びナノゲル PspA の荷電は +2.8mV 及び +1.3 mV で陽電荷をもち大きな変化はなかった。

2. ナノゲル PspA PET 解析

3 頭のアカゲザルを用いて、同一のアカゲザルに 1 週間以上空けて交互に ^{18}F -PspA または ^{18}F -PspA を経鼻投与して頭部 PET 解析を実施した。3 頭ともほぼ同一の結果が得られたので、ここでは代表的な 1 頭の頭部 PET 及び MRI データを示す (図 2)。

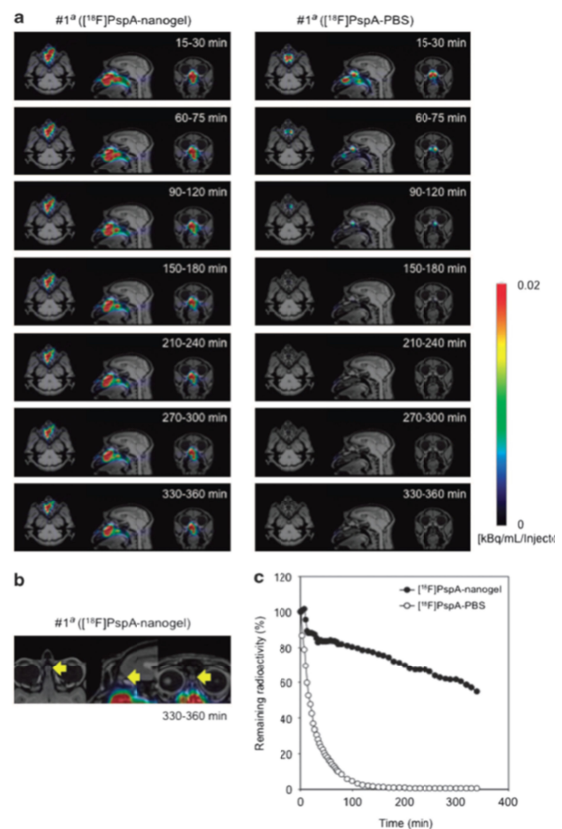


図 2. ナノゲル PspA の PET 解析 頭部(a,c)と嗅球(b)

サルはPET スキャナーの中に置かれ、6時間 real-time で測定された。脳の正確な位置を確認するため MRI イメージングを重ねた。real-timePET は経鼻投与されたナノゲル PspA は効果的に鼻腔上皮にデリバリーされ、6時間以上にわたって、鼻腔上皮に滞留した。一方、ナノゲル化されていない PspA は経鼻投与後3時間以内に鼻腔内から消失された。その上、ナノゲル PspA 経鼻投与において、脳及び嗅球への PspA の沈着は6時間後でも認められなかった。これらの結果は、ナノゲル PspA はサルに於いても脳神経系への安全性の評価に問題は見つからなかった。

D. 考察

ナノゲルそれ自身は抗原性のない物質で、中性のナノゲルは注射用ガンワクチン(例: Her2)として GMP レベルで製造可能である。ここで我々は経鼻ワクチンとして、カチオン性ナノゲルを用いて、肺炎球菌ワクチン抗原 PspA をナノゲル化して、その物性を FRET (fluorescence resonance energy transfer) や DSL (dynamic light scattering) を用いて解析し、その品質的均一性を証明した。またナノゲル PspA のもつ positive zeta-potential は、PET/MRI により、PspA 単独に比して、効果的に鼻腔上皮に吸着し、長時間保持できることを in vivo 試験において証明することができた。この結果は、カチオン化ナノゲルの経鼻ワクチンデリバリーとして有効であることを示した。実際、経鼻ナノゲル化ワクチンはマウスの実験において、鼻腔上皮細胞に保持され、endocytosis により、上

皮細胞から取り込まれて、細胞内で、ナノゲルのもつシャペロン活性によりナノゲルからワクチンが native な形で放出され、exocytosis にて上皮細胞から基底膜下に達して、樹状細胞に取り込まれることが証明されている。

経鼻ワクチンの最近の研究では、ワクチン抗原または同時に投与されたアジュバントが嗅球を経由して嗅覚上皮から脳へ移行する可能性が議論されている。この研究では経鼻投与されたナノゲル ^{18}F -PspA は、投与6時間では嗅球、脳への移行がないことがサルにおいて証明された。我々は以前の研究でサルにおいて CTB/CT は投与6時間で嗅球へ移行することを PET 研究で証明しており、PET での ^{18}F の感度限界は 0.05 SUV 以下であることを確認している (J. Immunol. 185: 5436 2010)。それ故、今回の我々の結果は PspA 経鼻ワクチンに用いられるナノゲルデリバリーシステムはマウスのみならず、サルのような高等動物においても、中枢神経系への移行、沈着はなく、安全な経鼻デリバリーシステムであることを示している。

E. 結論

サルに於いて、我々は、昨年経鼻投与されたナノゲル PspA は全身系のみならず、粘膜免疫系においても効果的に肺炎球菌の防御免疫を誘導できることを証明したが、本年度は脳神経系への PspA の輸送・沈着もないことを証明した。この結果は、経鼻 PspA ワクチンの効果と安全性をサルで確認した最初の報告であり、ナノゲル PspA ワクチンのヒトへの試

験を期待できる結果である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) D. Tokuhara, T. Nochi, A. matsumura, M. mejima, Y. Takahashi, S. Kurokawa, H. Kiyono, Y. Yuki*: Specific Expression of Apolipoprotein A-IV in the Follicle-Associated Epithelium of the Small Intestine *Dig. Dis. Sci.* 59: 2682-2692 (2014).
- 2) T. Azegami, Y. Yuki, H. Kiyono: Challenges in Mucosal Vaccines for the Control of Infectious Diseases. *Int. Immunol* 26:517-526 (2014)
- 3) M. Mejima, K. Kashima, M. Kuroda, N. Takeyama, S. Kurokawa, Y. Fukuyama, H. Kiyono, K. Itoh, T. Mitsui, Y. Yuki*: Development of selection marker-free rice-based oral cholera toxin B-subunit vaccine and characterization of location and structure of transgene by using whole genome resequencing analysis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 120: 35-48 (2015)
- 4) K. Kashima, M. Mejima, S. Kurokawa, M. Kuroda, H. Kiyono, Y. Yuki*. Comparative whole-genome analyses of selection marker-free rice-based cholera toxin B-subunit vaccine lines

with wild-type lines. *BMC Genomics* 16:48 (2015)

- 5) Y. Fukuyama, Y. Yuki*, Y. Katakai, N. Harada, H. Takahashi, S. Takeda, M. Mejima, S. Joo, S. Kurokawa, S. Sawada, H. Shibata, EJ. Park, K. Fujihashi, D. Briles, Y. Yasutomi, H. Tsukada, K. Akiyoshi, H. Kiyono: Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal Immunol.* 63: 87-99 (2015)
 - 6) T. Azegami, H. Itoh, H. Kiyono, Y. Yuki*: A Novel Transgenic Rice-based Vaccine: *Arch. Immunol. Ther. Ex.* in press doi: 10.1007/s00005-014-0303-0 (2015)
 - 7) 鹿島光司、幸 義和、清野 宏 : 次世代ワクチン開発への課題と挑戦 経口ワクチンー Bio Industry 31:4-10 (2014)
 - 8) 幸 義和 : 注射剤・経口製剤に代る新しい薬剤投与デバイスの開発 「経鼻ワクチンのマウス・サルにおける分子イメージング」(技術情報協会) 145-149 (2014)
 - 9) 福山賀子、幸 義和 : 粘膜ワクチンの現状 経鼻ワクチンを中心に 医学のあゆみ 253:15033-15038 (2015)
- ### 2. 学会発表
- 1) Yoshikazu Yuki, Mio Mejima, Koji Kashima, Masaharu Kuroda, Toshiaki

- Mitsui, Hiroshi Kiyono: Establishment of selection marker-free rice-based oral cholera toxin B-subunit vaccine and characterization of location and structure of transgene by using whole genome resequencing analysis. International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Australia)
- 2) Koji Kashima, Mio Mejima, Masaharu Kuroda, Hiroshi Kiyono and Yoshikazu Yuki: Whole genome analysis of selection marker-free MucoRice-CTB, a rice-based oral cholera vaccine. International Association for Plant Biotechnology Congress 2014 (Melbourne, Australia)
 - 3) 鹿島光司、目島未央、黒田昌治、竹山夏実、黒河志保、福山賀子、清野 宏、幸 義和: 次世代シーケンサーを用いたマーカーフリーコメ型経口ワクチン MucoRice-CTB の複数系統及び野生型の変異解析及び比較 日本農芸化学会 東京 (2014)
 - 4) 目島未央、鹿島光司、黒田昌治、竹山夏実、黒河志保、福山賀子、清野 宏、三ツ井敏明、幸 義和 コメ型経口ワクチン Marker Free MucoRice-CTB のイネゲノム導入部位と導入配列について 日本農芸化学会 東京 (2014)
 - 5) 幸 義和、清野宏: アジュバントフリーナノゲル型肺炎球菌経鼻ワクチンのサルでの免疫効果と安全性 日本ワクチン学会 福岡 (2014)
 - 6) J. Sunyi, Y. Fukuyama, Y. Yuki, Y. Kurashima, SF. Ziegler, EJ. Park, H. Kiyono: Critical role of TSLP-TSLPR interaction in inducing secretory IgA responses after mucosal immunization 日本免疫学会 京都 (2014)

H. 知的財産権の出願、登録状況

- 1) K. Akiyoshi, H. Kiyono, Y. Yuki, T. Nochi: Mucosal vaccine using cationic nanogel 2015年2月24日登録 米国特許 # 8961983