HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Design and Preparation of Influenza Vaccines Using Gold Nanoparticles [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	田崎, 太悠
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13675号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74164
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Taiyu_Tazaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（理学）　氏名　田崎　太悠

学 位 論 文 題 名

Design and preparation of influenza vaccines using gold nanoparticle
（金ナノ粒子を用いたインフルエンザワクチンの設計と作製）

感染症はウイルスや微生物の感染によって引き起こされる疾病の一つであり、ワクチン接種による予防が最も効果的な対策である。インフルエンザウイルスは呼吸器感染症の原因となる代表的なウイルスであり、多様な亜型と変異によって我々の免疫から逃れ、季節性インフルエンザやパンデミックを引き起こしてきた。インフルエンザウイルスワクチンとして、膜タンパク質であるヘマグルチニンを抗原として利用した不活化インフルエンザワクチンが一般的に利用されている。この不活化インフルエンザワクチンは通常注射によって筋肉や皮下へ投与するが、感染部位である上気道に抗体が産生されないため感染防御効果が低く、また、抗原の系統が異なるウイルス株に対する効果が低いという問題を抱えている。インフルエンザウイルスの感染部位である上気道に抗体を産生させ感染を防ぐために、鼻腔に投与する経鼻インフルエンザワクチンの開発が進められている。不活化ワクチンのみを経鼻投与した場合は十分な効果が得られないため、アジュバントと呼ばれる免疫賦活剤の利用が必要である。しかしながら、効果の強いアジュバントは同時に毒性が強いという特徴があるため、効果と安全性の両立に課題を抱えている。また、インフルエンザウイルスは多様な亜型を有しておりこれらに対する中和抗体の誘導が求められる。抗原たんぱく質として利用されるヘマグルチニンはウイルス殻外側に位置するHeadドメインと膜側に位置するStalkドメインから構成されている。Headドメインはウイルスの亜型間において変異が多く存在しているため、異なる亜型に対してワクチンの効果を引き出すためにはStalkドメインに対する抗体の産生を誘導する必要がある。

近年、ナノ粒子はドラッグデリバリーをはじめとした医療応用において特定の薬効を引き出す際に利用されている。特に金ナノ粒子はサイズや形状、表面の特性を制御することが容易であり、これらの性質によって免疫応答が変化することからワクチンへの利用が期待されている。本研究ではインフルエンザワクチンのアジュバントと抗原たんぱく質のふたつに着目し、金ナノ粒子を用いることで効果的なインフルエンザワクチンを作り出すことを目的とした。

第一章では、医療分野における金ナノ粒子の利用・特徴とインフルエンザワクチンの開発に関する現在の状況を整理し、インフルエンザワクチンの課題を挙げた。また、現行のインフルエンザワクチンの課題を解決するために、サイズや形状、表面の性質を制御した金ナノ粒子を用い、望みの免疫応答を誘導するインフルエンザワクチンの作製を提案した。具体的には、(1) 金ナノ粒子と低分子量poly(I:C) (uPIC(40:400))の複合体のアジュバント活性における金ナノ粒子の形状依存性と(2) 向きを制御して固定したヘマグルチニンと金ナノ粒子複合体によるStalkドメインに対する抗体の誘導である。

第二章では、毒性・活性の低いuPIC(40:400)のアジュバント活性を、形状の異なる金ナノ粒子との複合化によって増強することを目的とした。球状およびロッド状の金ナノ粒子と低分子量 poly(I:C)複合体を作製し、アジュバントとして用いて活性を評価した。ワクチンを経鼻投与した際、アジュバントの活性は金ナノ粒子の形状に依存

し、ロッド状金ナノ粒子を用いた場合に高い活性を示した。また、アジュバント活性の傾向は投与方法によって異なり、皮下投与時には金ナノ粒子のサイズや形状の依存性は見受けられなかった。また、骨髄由来樹状細胞を用いて副反応に繋がる炎症性サイトカインの産生量を調べたところ、活性の高いロッド状金ナノ粒子による産生量の増強は見受けられなかった。これらの結果から、インフルエンザワクチンの投与方法に応じて適切な形状のナノ粒子をアジュバントのキャリアとして用いる必要があることと、経鼻投与時はロッド状ナノ粒子が低分子量 poly(I:C)のキャリアとして適していること、また、このロッド状金ナノ粒子と低分子量 poly(I:C)は炎症性サイトカインの産生量が低く、副反応を引き起こしにくいことが示唆された。この知見はナノ粒子を利用した安全かつ効果の高いアジュバントの開発に寄与すると期待できる（図 1)。

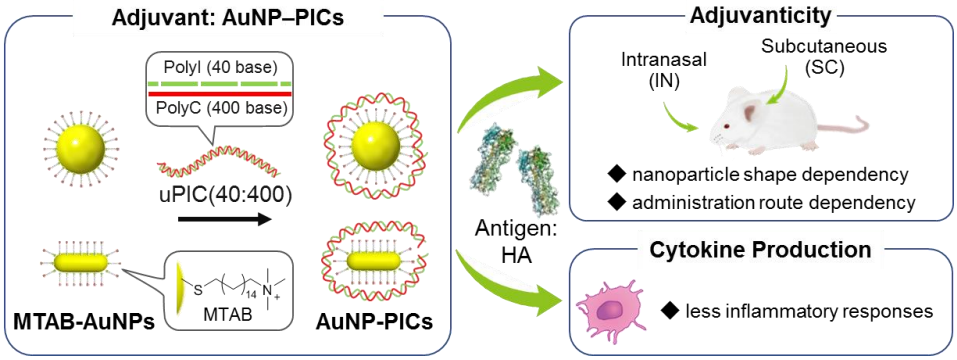

図 1. 金ナノ粒子による核酸アジュバントの活性増強効果の形状依存性評価.

第三章では、異なる亜型への感染防御（交叉防御）効果を引き出すための抗原デザインを提案した。ヘマグルチニン Stalk ドメインを外側に向けて金ナノ粒子に固定化し、抗体産生細胞である B 細胞の細胞膜上に存在する B 細胞受容体に Stalk ドメインを認識させ、Stalk ドメインに対する抗体を誘導する交叉防御ワクチンを開発することを目指した。金ナノ粒子表面を、シアル酸模倣配列（ARLPR）を有するシアル酸模倣ペプチド（ARLPRGGGEKEKEKEPPPPC）で修飾し、ヘマグルチニンの固定化に利用した（図 2)。シアル酸模倣ペプチド修飾金ナノ粒子へのヘマグルチニンの固定化数は参照配列（ARLPGGGGEKEKEKEPPPPC）修飾金ナノ粒子と比較して高い値を示した。これよりペプチド配列依存的、すなわちヘマグルチニンの配向を制御し、Stalk ドメインを外側に向けて金ナノ粒子へ固定化できたことが示唆された。今後、この複合体をワクチンとして用い、Stalk ドメインに対する抗体産生を誘導できるかを明らかにする予定である。

第四章では、インフルエンザワクチンの設計における金ナノ粒子の有用性についてまとめるとともに、今後の展望について言及した。金ナノ粒子を用いてインフルエンザワクチンの効果的なワクチン設計に関する知見を供することで将来的にユニバーサルインフルエンザワクチンの実現に寄与することが期待できる。

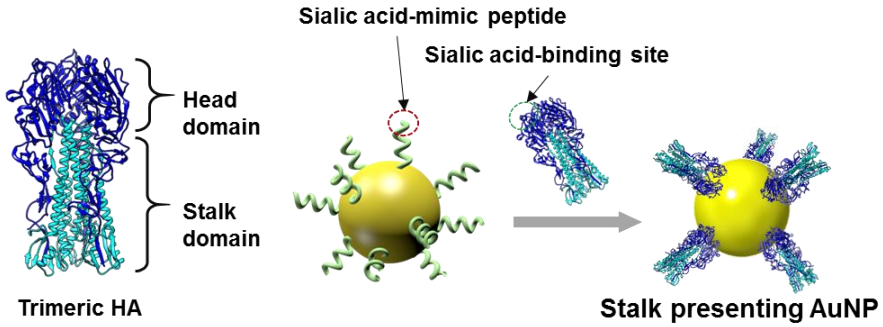

図 2. 交叉防御を誘導する抗原デザイン：金ナノ粒子へのヘマグルチニンの向きを制御した固定化.