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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（理学）　氏名　田崎　太悠

審査担当者	主　査　教　授	石森　浩一郎（理学研究院）
	副　査　教　授	居城　邦治（電子科学研究所）
	副　査　教　授	坂口　和靖（理学研究院）
	副　査　教　授	渡慶次　学（工学研究院）
	副　査　准教授	三友　秀之（電子科学研究所）

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）

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る感染症を防ぐには，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。本論文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，アジュバント活性の増強を目指した金ナノ粒子とアジュバントの複合体の作製，ならびに異なる亜型への感染防御（交叉防御）効果を目指した金ナノ粒子表面への抗原タンパク質の固定化法の開発ついて言及している。

本論文は全 4 章から構成されている。

第 1 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述べている。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新たに提案している。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を提案している。

第 2 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ている。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すことを明らかにした。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していると結論している。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貢献すると期待される。

第 3 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ている。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 。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すことを明らかにした。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と結論づけた。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ことを予定している。

第 4 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，今後の展望に関する議論がなされている。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されると総括している。

これを要するに，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ワクチンを経鼻投与したところ，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すことを見出し，また，金ナノ粒子を用いて，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として，ヘマグルチニン Stalk ドメインを外側に向けた固定化に成功した。これらはコロイド化学，ナノメディスンの分野において価値の高い業績である。

よって著者は，北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。