

別紙 1

## 博士論文要旨

論文題目 : ヒアルロン酸を支持体とする膜透過ペプチド  
固定化高分子の経鼻インフルエンザワクチンの粘  
膜アジュバントとしての開発

申請者 谷下 宗平 印

専攻分野 医療薬学専攻

研究指導分野 医薬品開発学

指導教員 佐久間 信至

インフルエンザウイルスは上気道粘膜から感染して季節性の感染症を引き起こすウイルスであり、ウイルス粒子のタンパク質の違いにより A～C 型に大別される。A 型ウイルスは、膜タンパク質の 16 種類のヘマグルチニン (HA) と 9 種類のノイラミニダーゼ (NA) の組み合わせにより、H1N1 などの亜型に分類され、同じ亜型でも遺伝子レベルの異なる多くの株が存在する。臨床で用いられている注射型インフルエンザウイルス HA ワクチンには、WHO の流行予測に基づき選定されたウイルス 4 株 (A/H1N1、A/H3N2 および B 型 2 株) から精製された HA が抗原として含まれている。同ワクチンを皮下投与すると、血液中に抗原特異的な IgG が誘導され、感染に伴う重症化を予防する。しかし、IgG は投与株と異なる株に対する交叉反応性が低いため、2009 年の新型ウイルス株 H1N1 A/California/07/2009 (CA 株) によるパンデミックのように、ウイルスの遺伝子変異や WHO の予測違いに対処できない。また、粘膜上に抗体が誘導されないため、感染自体を防御できない。

この問題を解決するため、粘膜投与型ワクチンが研究されている。本ワクチンは、血液中の IgG だけでなく、粘膜上に分泌型 IgA を誘導する。同 IgA は、ウイルスの侵入を防ぎ、感染を防御するだけでなく、投与株と異なるウイルス株に交叉反応する質的特性を持つ。粘膜免疫は、遺伝的に多様なインフルエンザウイルスの感染に対する予防に適した免疫手法である。しかし、抗原のみを粘膜上に投与しても免疫は効果的に惹起されず、感染防御や重症化予防効果は乏しい。有効な粘膜投与型ワクチンの開発には、免疫反応を効果的に誘導する

粘膜アジュバントが必要となる。

著者が所属する研究室ではこれまで、代表的な膜透過ペプチドである D-オクタアルギニン（非分解性の生体適合性高分子である N-ビニルアセトアミドとアクリル酸の共重合体（PNVA-co-AA）に側鎖として導入した膜透過ペプチド固定化高分子）を創製し、経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとしての同高分子の有用性を明らかにしてきた。同時に、本技術を臨床応用するためには、2つの課題：非分解性高分子の生体内蓄積による毒性の潜在的リスクの回避および臨床応用可能な投与スケジュールでのアジュバント活性の実証、が必要であることも明らかにした。他方、粘膜投与型ワクチンに期待される最大の利点である異種ウイルス株に対する感染防御や重症化予防効果は未検討であり、本効果の実証なくして粘膜アジュバントとしての臨床応用は想定できない。著者は、これらの3課題を解決・実証すべく研究を行った。

### 1. 粘膜投与型ワクチンの安全なアジュバントとしてのテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の設計

膜透過ペプチド固定化高分子を生分解性にするため、膜透過ペプチドを構成するアミノ酸はL体とし、同ペプチドを固定化する高分子をPNVA-co-AAからヒアルロン酸に変更した。ヒアルロン酸を構成するD-グルクロン酸のカルボキシル基とL-オクタアルギニンの末端アミノ基との間の酸アミド結合を介した固定化反応において、両者の立体障害による反応性の低下を軽減するため、テトラグリシンをスペーサーとして導入した。その結果、カルボキシル基の約60%にテトラグリシン-L-オクタアルギニンが固定化されたヒアルロン酸誘導体が得られた。

次に、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸のアジュバント活性を検証した。非分解性の膜透過ペプチド固定化高分子を用いた先行研究と同様に、インフルエンザウイルスHAワクチンと同ヒアルロン酸誘導体の混合物を7日間隔で4回、マウスに経鼻投与した結果、抗原特異的な血中IgGおよび鼻腔内IgAが誘導された。両抗体価は、アジュバントとしてテトラグリシン-D-オクタアルギニン固定化PNVA-co-AAを用いた場合と統計学的に同等であった。注射型インフルエンザウイルスHAワクチンの複数回投与時のスケジュールである1ヵ月間隔2回投与を参考に、28日間隔2回経鼻投与により免疫誘導した結果、アジュバントの生分解性、非分解性に関わらず、両抗体価は毎週4回投与と統計学的に同等であった。両膜透過ペプチド固定化高分子の量的なアジュバント活性は同等であることが実証されるとともに、2回の投与間隔を28日に延長してブースティング効果を最適化することにより、臨床応用可能な投与スケジュールの見込みが得られた。引き続き、不活化H1N1 A/New Caledonia/20/99（NCL株）を投与抗原として、テトラグリシン-L-オクタアル

ギニン固定化ヒアルロン酸あるいは D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の共存下、28 日間隔 2 回投与で誘導された鼻腔内 IgA の交叉反応性を精査した。同 IgA は、NCL 株と同じ亜型の H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8 株) や CA 株の組み換え HA (rHA) だけでなく、異なる亜型の H3N2 A/Brisbane/10/2007 (BNE 株) や H5N1 A/Viet Nam/1194/2004 (VNM 株) の rHA にも反応した。そのプロファイルに膜透過ペプチド固定化高分子間の違いは認められず、質的なアジュバント活性も同等であることが実証された。

新薬や新医薬品添加剤の開発時に必須の毒性試験であるコロニー形成阻害試験、小核試験および変異原性試験を外部専門機関に試験を委託し、専門的かつ客観的に膜透過ペプチド固定化高分子の安全性を検証した。コロニー形成阻害試験の結果、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の IC<sub>50</sub> は 99.21 µg/mL、D-オクタアルギニン固定化 PNVA-co-AA の IC<sub>50</sub> は 6.93 µg/mL と見積もられ、生体成分からなる生分解性の前者の毒性は非分解性の後者の約 1/10 であることが確認された。小核試験および Ames 試験を通して、両膜透過ペプチド固定化高分子は、それらの代謝物ともに、染色体異常および遺伝子突然変異を誘発しないことがそれぞれ証明された。他の毒性試験による評価の必要性はあるものの、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は医薬品添加剤として開発可能な安全性を有していると考えられた。

## 2. 異種インフルエンザウイルスの感染に対するテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の粘膜アジュバントとしての感染防御および重症化予防効果の実証

北里大学北里生命科学研究所の支援下、異種インフルエンザウイルスに対する感染実験を実施した。インフルエンザウイルス HA ワクチンには、型や亜型の異なる 4 株のウイルス抗原が含まれていることから、同一亜型内の異なる株に対する感染防御や重症化予防が可能となれば、季節性インフルエンザの臨床的課題は実質的に解決できる。本感染実験では、免疫誘導するための投与抗原として不活化 H1N1 NCL 株、感染株としてマウス馴化された H1N1 PR8 株を用いた。マウスは、PBS を接種する陰性対照の A 群 (8 匹)、抗原を接種する B 群 (12 匹)、抗原とアジュバント (テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸) を接種する C 群 (12 匹) に分類された。28 日間隔で 2 回、経鼻接種し、最終接種から 2 週間後、各群 8 匹のマウスに PR8 株を経鼻的に曝露した。ウイルス曝露後 21 日間、生死と体重をモニターした。別に、曝露当日、B および C 群のウイルス曝露しないマウス 4 匹ずつの抗体価を測定した。最後まで生存したマウスの抗体価も同様に測定した。A 群では、曝露後 3 日目以降、感染に伴う著しい体重減少が全例で観察され、11 日以内に 7 例が死亡した。B 群では、死亡例は確認されなかったものの、7 匹のマウスで A 群と同様

の重篤な体重減少が観察された。曝露後 8 日間の平均体重の推移が両群でほぼ一致していたこと、曝露後 21 日目の IgG および IgA レベルが曝露当日の抗体価に比べて有意に上昇していたことから、B 群のマウス全例がウイルス感染したと推測された。しかし、あらかじめ抗原投与により免疫系が刺激されていたため、抗原と異なる PR8 株であっても免疫が相対的に早く誘導され、死に至ることなく全例が回復に向かった。ただ、ウイルス感染に伴うダメージは大きく、モニター最終日まで、半数のマウスの体重は初期値まで回復しなかった。C 群では、死亡例が確認されなかっただけでなく、ウイルス感染に伴う深刻な体重減少はまったく観察されなかった。体重減少がなく、曝露後 21 日目の抗体価が曝露当日とほとんど変わらなかった半数のマウスは、感染すらしなかったことが強く示唆された。残りの 4 匹のマウスにおいても、曝露後 8~13 日以内に体重は初期値に回復しており、ウイルス感染したとしても重症化は完全に回避された。

抗原のみを経鼻投与する免疫法の場合、免疫誘導株と異なるウイルス株の感染は防御できず、多くは重症化した。その要因は、粘膜上の低い IgA レベルと低い交叉反応性および異なるウイルス株に対する IgG の不十分な反応性と推測された。一方、抗原とテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を経鼻投与する免疫法の場合、投与株と異なるウイルス株の感染に伴う重症化は完全に予防された。半数の個体では感染自体も防御されたことが強く示唆され、たとえウイルス感染しても、あらかじめ体内に誘導された免疫によりウイルスの増殖は抑制され、重症化することなく、早期に回復すると考えられた。この感染防御並びに重症化予防効果は、免疫誘導株と異なるウイルス株に対する IgA および IgG の高い反応性に起因していると考えられた。

今回の我々の研究成果は、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸をアジュバントとして用いた経鼻インフルエンザワクチンは、季節性インフルエンザの流行株の予測違いや遺伝子変異に広く適応するだけでなく、亜型を超えたウイルス株の感染防御や重症化予防にも対応できる可能性を示している。今後、本技術の臨床応用が実現し、新型ウイルス株を含めて、ワクチンとして投与された株と異なるウイルス株が流行しても、その感染や感染に伴う重症化が予防され、インフルエンザのパンデミックから解放された社会が来ることを期待したい。