

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：革新的な粘膜免疫誘導型アジュバントの実用化研究

Research for the practical application of innovative mucosal immunity-inducing adjuvants

研究開発実施期間：平成 29 年 5 月 1 日から令和 4 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：植松 智

Satoshi Uematsu

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

公立大学法人大阪 大阪市立大学大学院医学研究科ゲノム免疫学 教授

Department of Immunology and Genomics, Osaka City University Graduate School of Medicine

II 研究開発の概要

全身性の強力な病原体特異的 Immunoglobulin G(IgG)と Th1 応答を、感染門戸の粘膜で高力価の病原体特異的分泌型 IgA を誘導する次世代ワクチンの開発が求められている。私たちは腸管で IgA を誘導する責任樹状細胞(dendritic cell; DC)を同定し、そのレチノイン酸合成酵素 Raldh2 の発現が IgA 誘導に必須である知見を得た。スクリーニングの結果 $\beta 1,3$ -グルカンであるカードランが DC において Raldh2 を誘導することを見出した。DC の活性化のために Toll-like receptor 9 (TLR9)のリガンドである CpG DNA を、粘膜型 DC に変換(Raldh2 を発現)するためにカードランを用い、抗原と不完全フロイントアジュバント(IFA)と共に筋注すると、抗原特異的な IgG (血中)と分泌型 IgA (糞中)を誘導した。初期免疫後、経口、経気道、経膈に抗原のみを追加免疫することで非常に高力価の抗原特異的 sIgA を長期間誘導した。この免疫法を新規ワクチン接種法として特許出願した (PCT/JP2016/67403)。IFA は効果の高いアジュバントだが、安全性の面から人への応用が難しい。本研究課題では、田辺三菱製薬と共同研究を行い、当該免疫法の人への実用化に向けて IFA に代わる基剤を導入してワクチンの効果を齧歯類と霊長類において検証した。まず、安全性の面から人への応用が難しい IFA に代わる滞留性に優れた安全性の高い製剤への変更を試みた。田辺三菱製薬との共同研究において、IFA の粒子性という点で類似のリポソーム、または IFA の滞留性という点で類似のエマルジョンを基剤として OVA、CpG DNA、 $\beta 1,3$ -グルカンを包埋する製剤を調製した。リポソームは、ヒトへの生態適合性が高いと期待される赤血球膜の脂質膜組成を模倣している。一方、ヒトへの使用実績のあるスクアランをベースとして、W/O/W エマルジョンも良い候補であった。滞留性を検証したところ、エマルジョンの滞留性がリポソームよりも優れていることを確認した。次に、リポソームまたはエマルジョンを基剤にしたワクチン製剤によって誘導される免疫応答の解析を行なった。リポソームを基剤に OVA、CpG DNA、 $\beta 1,3$ -グルカンを包埋した製剤をマウスに筋注し、Ag 特異的 IgG (血中)と Ag 特異的 IgA (糞中)の誘導を検討した。リポソームの場合は、IFA と比較して抗原特異的な IgA は弱かった。そのため、プライム後、粘膜面に抗原を付加しても IFA ほどの IgA 誘導効果が認められなかった。そのため、0 週と 3 週にプライムを行い、7 週目に抗原の経口負荷をおこなったところ、IFA と同程度の IgA 誘導能

となった。この様に、リポソームの免疫誘導能は IFA に比較してかなり弱いことが明らかになった。一方、エマルジョンによる免疫は、プライム後 3 週後に IFA と同様に一過性の抗原特異的な IgA の誘導が認められた。さらにプライム後 6 週後に抗原を経口負荷すると、高力価の抗原特異的な IgA を腸管で誘導することに成功した。この様に、IgA に代表される粘膜免疫応答の誘導に関して、エマルジョンによる免疫法が IFA の免疫誘導に近いことが分かった。以上のことから、IFA に代わる基剤としては、W/O/W 型のエマルジョンが優れていることが考えられた。次に、W/O/W を基剤として用いた際の粘膜免疫応答の誘導を、カニクイザイルで検討した。予備検討において、OVA 50 μ g、CpG-ODN 5 μ g、Curdlan 5 mg をエマルジョン(W/O/W)で調整し 500 μ l の溶液にした。W/O/W エマルジョンのみ (n=1)、W/O/W エマルジョン+OVA+Curdlan (n=2)、W/O/W エマルジョン+OVA+Curdlan+CpG-ODN (n=2) を用意した。0 週と 4 週にワクチンを筋注し、毎週抗原特異的血清 IgG と抗原特異的糞中 sIgA を測定する。8 週以降に経口で OVA のブーストを行った。プライム後 8 週までに、Curdlan +CpG-ODN の群で 2 頭とも糞中に一過性の抗原特異的 sIgA の誘導がサルでも見られており、W/O/W 型エマルジョンが霊長類でも有効なことが確認された。R 2 年度は、予備検討のためにワクチン接種をしたカニクイザイルにおいて、経口ブーストの効果調べた。Curdlan+CpG-ODN の群の内 1 頭において糞中に抗原特異的 sIgA の recall が認められた。次に経鼻ブーストを行なったところ、Curdlan+CpG-ODN の群の内 2 頭とも抗原特異的な sIgA の誘導気道において有意に認められた。カニクイザイルにおいて、肺炎球菌のユニバーサル抗原である PspA の融合タンパク(PspAF)を用いて、W/O/W エマルジョンの効果を検討した。W/O/W エマルジョンのみ (n=2)、W/O/W エマルジョン+PspAF+Curdlan (n=3) W/O/W エマルジョン+PspAF+Curdlan+CpG-ODN (n=3) を用いた。0 週と 4 週に 2 度のワクチン接種を行った。本年度は、ワクチン接種したカニクイザイルにおいて経時的に血中抗原特異的 IgG と気道における抗原特異的 sIgA の抗体価を調べた。2 回のプライミングで血中抗原特異的 IgG と気道における抗原特異的 sIgA は有意に上昇した。また、筋注による 2 回のプライミングによって、気道の抗原特異的 sIgA の抗体価は、CpG+Curdlan の群でも、Curdlan のみの群でも 16 週以上陽性が続いた。齧歯類と異なり、霊長類では W/O/W の免疫が樹状細胞で Raldh2 の誘導が報告されている。人において、Curdlan だけでも sIgA を誘導出来る可能性があることが示唆された。CpG 併用の方が抗体価はより高いが、CpG の用量を減量させられる可能性もあることが分かった。さらに、経鼻でブーストによって、粘膜面において抗原特異的 sIgA を長期間リコールすることができた。以上のことから、当初の計画通り粘膜ワクチンの基剤を変更し齧歯類、霊長類でその効果を確認することができた。

It is necessary to develop next-generation vaccines that induce potent systemic pathogen-specific Immunoglobulin G (IgG) and Th1 responses as well as high-titer pathogen-specific secretory(s) IgA in the mucosa at the portal of infection. We have identified dendritic cells (DCs) responsible for IgA induction in the intestinal tract and found that their expression of retinoic acid synthase Raldh2 is essential for IgA induction. We found that the β 1,3-glucan, curdlan, induces Raldh2 in DCs. When we stimulated conventional DCs with CpG DNA, a ligand for Toll-like receptor 9 (TLR9) together with curdlan, we found that conventional DCs converted to activated mucosal-type Raldh2⁺ DCs. Intramuscular injection with antigen, CpG DNA, Curdlan and incomplete Freund's adjuvant (IFA) induced antigen (Ag)-specific IgG in blood and secretory IgA in feces in mice. After initial immunization, Ag administration orally, nasally, or vaginally induced very high titer of Ag-specific sIgA on the target mucosa for several months. This immunization method was applied for patent as a novel vaccination method (PCT/JP2016/67403). Though IFA is a highly effective adjuvant, its application to humans is difficult due to safety concerns. In this research project, we conducted joint research with Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation (MTPC) to introduce an alternative substrate to IFA for the practical use of this immunization method in humans, and to verify the efficacy of the vaccine in rodents and primates. First, we attempted to replace IFA with a safer formulation, which has excellent retention properties. In collaboration with MTPC, we prepared a formulation encapsulating OVA, CpG DNA, and β 1,3-glucan using liposomes, which are similar to IFA in terms of particle size, or emulsions, which are similar to IFA in terms of retention, as base agents. The liposomes mimic the lipid membrane composition of erythrocyte membranes, which are expected to be highly ecocompatible with humans. On the other hand, W/O/W emulsions based on squalane, which has a proven track record in human use, were also good candidates. The retention of the emulsions was verified to be superior to that of the liposomes. Next, we analyzed the immune responses induced by vaccine using liposomes or emulsions as the base formulation. Liposome-based formulations containing OVA, CpG DNA, and β 1,3-glucan were injected intramuscularly into mice to examine the induction of Ag-specific IgG in blood and Ag-specific sIgA in feces. In the case of liposomes, Ag-specific sIgA induction was weak compared to IFA. Therefore, after priming, the Ag administration to the intestine did not induce Ag-specific sIgA as effectively as IFA. Therefore, priming at 0 and 3 weeks, followed by oral antigen loading at 7 weeks, resulted in IgA induction comparable to that of IFA. Thus, the immunogenic potential of liposomes was considerably weaker than that of IFAs. On the other hand, emulsion immunization induced transient Ag-specific sIgA induction 3 weeks after priming, similar to IFA. Furthermore, oral administration of Ag 6 weeks after priming successfully induced high titer Ag-specific sIgA in the intestinal tract. Thus, it was found that the emulsion immunization method was similar to IFA in terms of induction of mucosal immune responses. Thus, it was considered that W/O/W type emulsions are superior as a substrate to emulsion. Next, the induction of mucosal immune responses when W/O/W was used as the base formulation was examined in Cynomolgus monkeys. In a preliminary study, 50 μ g of OVA, 5 μ g of CpG-ODN, and 5 mg of Curdlan were adjusted in emulsion (W/O/W) to make a 500 μ l solution. W/O/W emulsion only (n=1), W/O/W emulsion + OVA + Curdlan (n=2), W/O/W emulsion + OVA + Curdlan + CpG-ODN (n=2) were prepared. Vaccines were intramuscularly injected at 0 and 4 weeks and Ag-specific serum IgG and Ag-specific fecal sIgA were measured weekly. After 8 weeks, OVA was orally boosted. By 8 weeks post-priming, transient induction of Ag-specific sIgA in feces was observed in monkeys in both Curdlan + CpG-ODN groups, confirming that W/O/W emulsions are effective in primates. In the next year, the effect of oral boosting was examined in vaccinated macaques for preliminary studies, and one of the groups of Curdlan + CpG-ODN showed Ag-specific sIgA recall in the feces. Next, nasal boosting significantly induced Ag-specific sIgA in the airways of two of the Curdlan + CpG-ODN groups. In the macaques, the effect of W/O/W emulsion using the universal antigen of *Streptococcus pneumoniae*, PspA fusion protein (PspAF), was investigated. W/O/W emulsion only (n=2), W/O/W emulsion + PspAF + Curdlan (n=3) W/O/W emulsion + PspAF + Curdlan + CpG-ODN (n=3). The vaccinations were given at 0 and 4 weeks. This year, the titers of Ag-specific IgG in blood and Ag-specific sIgA in airways were examined over time in vaccinated macaques. 2 primings significantly increased Ag-specific IgG in blood and Ag-specific sIgA in airways. In addition, the titers of Ag-specific sIgA in the airways remained positive for more than 16 weeks in both the CpG+Curdlan group and the Curdlan-only group after by two times intramuscular injection. Unlike in rodents, in primates, W/O/W immunity has been reported to induce Raldh2 in dendritic cells. In humans, it was suggested that Curdlan alone may be able to induce sIgA, and although antibody titers were higher with CpG, the CpG dose could be reduced. In addition, nasal boosting was able to recall high titer of Ag-specific sIgA at mucosal surfaces for a long period. In summary, we were able to change the substrate of the mucosal vaccine as originally planned and confirm its efficacy in rodents and primates.