

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：ヒアルロン酸ナノゲルによるポリペプチドの可溶化・生体内輸送機能解析とワクチンへの応用
Polypeptide encapsulation and in vivo transportation analysis of hyaluronic acid nanogel and its vaccine application

研究開発実施期間：令和3年11月30日～令和8年3月31日

研究開発代表者 氏名：勝又 徹
Toru Katsumata

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
旭化成株式会社 ヘルスケアマテリアル事業部 新製品開発推進室 技術開発グループ長
Asahi Kasei Corporation, New Product Development Office Healthcare Materials Division, R&D Group Head

II 研究開発の概要

(目的) 本研究では小児にも接種可能な、より安全性の高い送達基材として、ヒアルロン酸（HA）ナノゲルの検討を行う。新型コロナウイルス感染症ワクチン（以下、ワクチン）への応用をモデルケースとして、組換えタンパク質及びペプチドとの複合化技術の確立・製剤としての最適化を行い、HA ナノゲルの技術的優位性を明らかにする。新興感染症に対して国内で速やかに対応し、かつコールドチェーンを必要とせず国内外へ室温で届けられるワクチン製剤化技術を完成させることを目的とする。

(研究内容) モデルケースとして新型コロナウイルス感染症ワクチンをモデルケースとして組換えタンパク質及びペプチドとの複合化技術の確立・製剤としての最適化を行った。また、複合化率の高い条件の検討、分子量や化学修飾率の異なるHAナノゲルを用いた製剤化、およびアジュバントを含めた製剤化検討、それらの凍結乾燥製剤の可否検討、および保存安定性の評価を実施した。さらに、ヒアルロン酸ナノゲルワクチンとしての機能メカニズム解析のため、液性免疫に加え、細胞性免疫活性評価と、各組織への移行性評価および細胞取り込み評価を実施した。

1) HA ナノゲル／ポリペプチド／アジュバント製剤としての最適化

・製剤化プロセスの確立

モデル抗原としてデルタ株 S1 タンパク質（His タグ付き）を用いた。HA ナノゲルと S1 タンパク質の複合化条件の検討を実施した。HA ナノゲル水溶液と S1 タンパク質水溶液を混合し、一定時間、一定温度で静置することで自発的に複合化することができる。複合化は、GPC-SEC を用いて評価した。S1 タンパク質（溶出時間 9.5 分程度）は HA ナノゲル（溶出時間 6 分程度）と複合化すると、S1 タンパク単独のピークが減少し、HA ナノゲルのピークが増大することで確認できる。デルタ株 S1 タンパク（His-Tag）室温では 4 時間後も一部の S1 タンパク質

のピークが確認される一方、37℃では4時間でS1タンパク質に由来するピークは見えなくなった。この複合化結果は、デルタ型S1タンパク（Hisタグ付き）だけでなく、従来株（Hisタグ付き）、オミクロン株（Hisタグ付き）、デルタ株（Hisタグ無）でも同様であった。

また、後述する抗体産生の結果にばらつきが見られたため、使用したデルタ型S1タンパク質（His-Tag）の3ロットをTSA（Thermal Shift Assay）にて変性温度（T_m）の確認を行った。リン酸緩衝液およびリン酸緩衝生理食塩水の2種類のバッファーで評価を実施し、バッファー間でT_mに変化がないこと、また、ロット間でも差がないことが確認された。通常、ワクチン溶液調整後、一定期間内に投与しており、この結果から、抗体産生結果ばらつきは動物の個体差に由来する可能性が高いことが分かった。また、バッファーによってT_mが変化しないこと、5mMとわずかに緩衝剤が入っているだけで、S1タンパク質は安定構造をとることが確認された。T_mが50℃程度と比較的低いことから、複合化時に溶液を37℃にすることで、S1タンパク質の構造がやや緩み、室温と比べ複合化が早く進んでいると推測する。

アジュバントを用いるワクチン系では、核酸であるCpG1826を用いた製剤も作成した。HAナノゲル/S1タンパク複合体溶液に添加し、1液とした。その場合でも、S1タンパク質は複合化されていたが、フリーCpGの面積に変化なく、CpGはHAナノゲルと複合体を形成していないことが分かった。CpGはリン酸アニオン構造をとっており、ナノゲルのカルボキシアニオン構造と電気的反発が強く、複合化が困難であることがわかった。

以降の実験ではデルタ型S1タンパク（Hisタグ付き）を用いて検討した。

・保存安定性評価

HAナノゲルとデルタ株S1タンパク質を、5mMリン酸バッファーおよびスクロースにて等張した溶液の凍結乾燥を実施した。凍結乾燥後の再溶解液は、凍結乾燥前の粒子径（およそ50nm）と変化は見られなかった。また、-20℃、25℃、40℃の温度3条件で1か月保存した後、注射用水で再溶解して再度粒子径を測定した。-20℃および25℃保存ではほとんど粒径が変化しなかったのに対し、40℃では、一部凝集体の存在が確認された。25℃1か月は5℃1年以上に相当する。（一般的なアレニウスプロットでの計算）

・製剤の最適化

2の項で述べるが、HAナノゲルは、アジュバントなく抗体価を一定程度高められるだけでなく、リブースト接種により高い抗体産生を実現できることがわかった。一方、アジュバントは一般的に副作用を生じる可能性高いことから、できる限り避けるべき成分である。今回の検討の中では、副反応の可能性の低さと、抗体価の向上のバランスを考慮し、アジュバントなしのHAナノゲル/S1タンパク質ワクチン組成物が最適であると考えた。

・安全性データの取得、サイトカイン産生評価

安全性試験系については、コミナティ（ファイザー社製）やヌバキソビッド（武田薬品工業社製）などのCOVID19ワクチンに関する申請書類や論文を参考に決定した。今回はまず、DDS基剤としての毒性を確認するため、複数濃度のHAナノゲルを一週間おき3回の間欠投与にて、投与部位および各臓器の毒性を確認した。皮下投与にて、投与量4mL/kg、3濃度（3ドーズ）での試験を実施したところ、いずれも重篤な全身毒性は確認されなかったが、異物反応に起因する症状は観察された。また、体温変化も確認されず、高い安全性が期待できる結果となった。

また、同時に6種類のサイトカイン産生評価も実施したが、いずれも優位な高値は確認されず、刺激やアジュバントとしての機能は示されなかった。また、低HAナノゲルドーズの条件で23種類のサイトカイン産生評価も別途実施したが、いずれもコントロールと比較し優位な差は見られなかった。

・TLRへの刺激評価

TLRを発現させた細胞を用いて、TLRに関与するかHAナノゲル単独溶液での試験を行った。TLR2, 3, 4, 5, 7, 8, 9について確認したところ、全てのTLRにおいて反応は見られなかった。この結果から、TLRに関与するアジュバントではない可能性が高いことが示唆された。

・感染チャレンジ試験

感染モデルの理由から、従来株のS1タンパク質を用いて、検討を行った。抗体価の上昇を確認しながら感染させるタイミングを検討し、感染チャレンジ試験では、3回投与後にウイルスに暴露することにした。HA ナノゲルワクチンでは、mRNA ワクチンと同様に、感染を予防できる結果が得られ、HA ナノゲルワクチンも有用であることが明らかとなった。一方で、タンパク質のみを接種した系では予防が出来なかった個体もいたことから、安定的に効果を発するワクチンになることが期待される結果となった。

2) HA ナノゲル／ポリペプチド複合体の液性・細胞性免疫応答解析及び免疫局所への詳細な送達解析

・液性免疫応答解析

(長期免疫)

1, 2 回目接種にS1タンパク質／HA ナノゲルワクチンに加えアジュバント (CpG1826 または K3) を用いた場合、12 か月から 18 か月程度 (固体差あり、以下は一部のデータ抜粋) 高い抗体価を維持できることがわかった。また、三回目接種としてアジュバントなく、S1タンパク質／HA ナノゲルワクチンを投与すると、2 回目接種後と同等の抗体価か、それ以上の抗体産生が確認された。

また、1, 2 回目接種でS1タンパク質／HA ナノゲルワクチンのみ投与 (アジュバントなし) した場合、12 か月程度で抗体価低下が確認されるが、抗体価低下後のリブースト3回目接種にて、アジュバントを用いた場合の初期抗体価と同程度まで抗体産生を高められることがわかった。

また、1, 2 回目、リブースト3回目の接種すべてをS1タンパク質のみにした場合には、抗体価の増加はわずかであり、リブースト後の抗体価は、S1タンパク質／HA ナノゲルワクチンを用いるとS1タンパクの10倍程度高い抗体価を実現できた。このことから、HA ナノゲルを用いることでメモリB細胞を効率的に産生できている可能性が示唆された。

(保存安定)

HA ナノゲルとデルタ型S1タンパク質を複合化し、スクロースおよび5mMリン酸緩衝液を用いて等張にした溶液を、凍結乾燥することで粉末化した。そのワクチン粉末を-20℃、25℃、40℃でおよそ1か月間保管し、注射用水で再溶解した後に、マウスに投与することで保存後の免疫評価を実施した。25℃及び40℃保存でも高い抗体産生を実現できており、凍結乾燥することで高い保存安定性を付与できることが明らかとなった。これにより、室温流通や室温保管など、コールドチェーンによらないワクチン流通に寄与できる可能性が示唆された。

(HA ナノゲル構造比較評価)

使用した3グレードは、主鎖分子量／コレステロール修飾率が異なる三種類のHA ナノゲル (グレード①、グレード②、グレード③) を用いて抗体産生評価を実施した。グレード間および使用するHA ナノゲル濃度で機能に差があることがわかった。

・細胞性免疫応答解析

S1タンパク質のエピトープを解析するために、まず構成するアミノ酸配列を、15アミノ酸ずつ分割したペプチドを準備した (それぞれ4アミノ酸ずつずらした配列を準備)。未処置、HA ナノゲルのみ、S1タンパク質／HA ナノゲルワクチンの3つの群 (全てアジュバントなし) にて2回投与後10日後に脾臓を回収し、それぞれのペプチドとのT細胞反応性 (CD8) を解析した。特定のペプチドに対し強い反応が見られ、エピトープを同定することができた。

また、2回接種7か月後のマウスを用いて同様の評価を実施した。7か月後も、当初の評価よりも反応性は低いものの、抗原特異的T細胞活性が見られ、長期メモリー特性につながっているものと考えられる。

複数のグレードで同様に投与後の脾臓での細胞性免疫活性評価を行った。まず、タンパク質のみでは抗原特異的T細胞活性は全く観察されなかったのに対し、HA ナノゲルを用いたものでは、全てのグレードで観察された。

・免疫細胞への分布解析

HA ナノゲルに Cy5 蛍光色素を化学的に結合しラベル化した Cy5-HA ナノゲル、および FITC または Alex488 をラベル化した A488-デルタ株 S1 タンパク質を作製した。「A-488-S1 タンパク質溶液」と「Cy5-HA ナノゲル/A488-S1 タンパク質複合体溶液」を用いて、送達解析を行った。試験は全てアジュバントを使用せず実施した。

それぞれの溶液をマウスに皮下単回投与し、2 週間までの滞留性を確認した。A488-S1 タンパク質は 2 週間程度皮下にとどまっている（皮下から徐々に放出している）可能性があることが確認された。

また、リンパ節の蛍光強度評価では、6 時間後よりも 24 時間後のほうが蛍光強度が高く、ある程度時間をかけて抗原を送達している可能性、また、A488-S1 タンパク質は 2 週間程度リンパ節内に滞留している可能性があることがわかった。Cy5-HA ナノゲルの蛍光強度も 2 週間後も高く、（1）皮下から徐々に抗原がリンパ節に送達されている、または（2）リンパ節に長期で抗原を滞留させる効果がある可能性が示唆された。

次に、6 時間および 24 時間後のリンパ節を採取し、FACS 解析を実施した。各細胞の S1 タンパク質を取り込んでいる細胞の割合を評価した（S1 タンパク質のみ、HA ナノゲルは取り込まれていない細胞）。樹状細胞（DC）およびマクロファージ（MΦ）では高い割合で S1 タンパク質が取り込まれていることがわかった。一方、B 細胞中の S1 タンパク質取り込み細胞の割合はそれほど高くない結果に見えた。

HA ナノゲルが S1 タンパク質と共存している割合も加えた、トータルの S1 タンパク質取り込み細胞の割合では、Cy5-HA ナノゲル/A488-S1 タンパク質複合体溶液のほうが大幅に取り込まれていることが明確になった。

これらの結果から、S1 タンパク質は、HA ナノゲルに複合化された状態でリンパ節の細胞まで届いている可能性が示唆された。

上記結果を、各細胞中の割合ではなく、細胞数にて再評価を実施した。リンパ節内には多くの B 細胞が存在するため、細胞数評価では、多くの B 細胞および CD4+細胞へ送達できていることがわかった。これらの結果が、高い抗体産生、長期抗体維持につながっていると推測する。

・Zr-PET による動態解析

HA ナノゲルにはデフェロキサミン配位子を化学的に結合した分子（DF0-HA ナノゲル=CHHA-DF0）を設計し合成した。DF0-HA ナノゲルおよび S1 タンパク質にそれぞれ Zr を配位させ、タンパク質単独や、HA ナノゲル複合体での動態データ取得をした。HA ナノゲルを用いなかった場合、リンパ節への移行性はわずか 0.1%程度であったが、HA ナノゲルを用いることで 1%程度の抗原を送達できていることが分かった。また、送達された抗原は長期でリンパ節に滞留していた。それにより抗体価が長期で高く維持できている可能性が示唆された。また、HA ナノゲル自体は抗原よりも高い割合でリンパ節に届いていることから、皮下で抗原を放出した後、空になったナノゲルだけがリンパ節に送達されていることも示唆された。さらに、HA ナノゲルは分子量が高いため腎臓には蓄積せず、血中に乗った後、肝臓に集まっていることが分かった。今後、毒性試験を実施していく際には、肝臓に移行することから肝毒性などを注視していく必要がある。

・CD44 受容体経由での取り込み実証

HA ナノゲルがどのような経路で細胞に取り込まれているのかを検証するため、DC 細胞およびマクロファージ細胞を用い、ヒアルロン酸または CD44 抗体を添加した場合との取り込み速度を比較検討した。アルロン酸を添加した系や CD44 抗体を添加した系で取り込み速度が低下する結果が得られた。この結果から、少なくとも HA ナノゲルは CD44 経由で取り込まれている可能性が示唆された。動態でも明らかになっているように、肝臓にはヒアルロン酸受容体が多く存在していることから、肝臓に集積していると考えられる。

・シングルセル解析

接種後抗体価が上がらなかった群、上がった群、1 年 3 か月後にリブーストした群について、同じタイミングで剖検し、リンパ節のシングルセル解析を実施した。すでに高齢となっており、生きている細胞数が少なく解析が難しい状況であった。解析により、メモリー B 細胞群が多く観察された。HA ナノゲルワクチンでは、1 年ある

いは1年半の抗体価維持機能が確認されており、HA ナノゲルを用いることで効率的なメモリーB細胞産生の可能性を示唆した。

3) シーズ対応

特定の構造を持つ核酸と ASO とのヘテロ核酸についての HA ナノゲルへの複合化評価を実施した。まず、それぞれ単独の成分またはヘテロ核酸が、HA ナノゲルと被らない評価系を、SEC カラムの種類、溶離液などの検討により決定した。ヘテロ核酸と HA ナノゲルとの混合後、HA ナノゲルへの複合化検討を実施した。複合化時の温度や時間を検討したが、本ヘテロ核酸では、残念ながら HA ナノゲルのピークの増大は確認されなかった。一方で、保管後の核酸製剤にて、物性を制御できる可能性が見いだせたため今後検証を行いたい。

(意義)

これらの結果から、「液性免疫の活性化、長期維持」、「細胞性免疫の活性化、長期維持」という HA ナノゲル機能と、それらが「リンパ節への抗原送達と長期滞留」「リンパ節内の B 細胞への送達」「皮下での抗原滞留性向上」「CD44 経由での細胞取り込み」「メモリーB細胞の産生亢進」によるものであることを明らかにした。

また、最適なワクチン組成としては、抗体産生、細胞性免疫活性、安全性の観点から、「特定のグレード」「HA ナノゲル濃度は比較的low濃度」「アジュバントは使用しない」と考えている。

特に、アジュバント無に免疫活性を亢進できることは今後の安全なワクチン実現に大きく貢献できる技術であると考えている。

また、液性免疫および細胞性免疫の両方を活性化できる抗原送達材料として、抗原ポリペプチドを用いた場合には今回明らかにした機能と特徴は発現されると推測でき、HA ナノゲルを用いた感染症ワクチンの社会実装と、抗原ポリペプチドを用いたワクチンの発展への寄与が大いに期待される。

Objective

Hyaluronic acid (HA) nanogels were investigated as a safer delivery platform, for example, for pediatric vaccination. Using a COVID-19 subunit protein as a model antigen, we evaluated antigen encapsulation with HA nanogels, formulation optimization, and mechanistic characterization to demonstrate the potential advantages of HA nanogels as an infectious-disease vaccine delivery platform and to support ambient-temperature distribution without reliance on a cold-chain logistics.

Key Work and Results

Formulation and encapsulation: Mixing aqueous HA nanogels with S1 protein enabled spontaneous complexation upon incubation; GPC-SEC showed decreased free S1 and increased HA nanogel signal. Protein encapsulation was faster at 37°C (TSA (Thermal Shift Assay) indicated a T_m of ~50°C). CpG1826 could be co-formulated but remained largely uncomplexed, consistent with phosphate–carboxylate repulsion.

Lyophilization and stability: An isotonic formulation (5 mM phosphate with sucrose) was lyophilized and reconstituted, with particle size maintained (~50 nm). After ~1 month, particle size was stable at –20°C and 25°C and showed partial aggregation at 40°C; nevertheless, lyophilized powders stored at 25–40°C retained strong immunogenicity.

Safety and innate activation: A repeat-dose (three-dose) subcutaneous toxicology study showed no severe systemic toxicity or body-temperature changes; local findings were consistent with a foreign-body response. Cytokine levels showed no significant increases, and TLR2/3/4/5/7/8/9 receptor assays were negative, indicating that HA nanogels do not act as a TLR-driven adjuvant.

Immunogenicity and protection: Prime–boost with an adjuvant maintained high antibody titers for approximately 12–18 months. In contrast, an adjuvant-free HA nanogel/S1 booster increased antibody titers to levels comparable to or exceeding those achieved after the second adjuvanted dose. Post-booster titers were approximately 10-fold higher than those with protein alone, suggesting that enhanced memory B-cell formation is a key feature of this technology. Antigen-specific CD8 responses were detected after two adjuvant-free doses and persisted at 7 months; in a challenge study, protection was comparable to an mRNA vaccine, whereas protein alone was inconsistent.

Delivery mechanism and biodistribution: Fluorescence imaging and flow cytometry indicated prolonged retention at the injection site and draining lymph nodes, as well as enhanced uptake by key antigen-presenting cells when the antigen co-localized with HA nanogels. In ^{89}Zr -PET studies, lymph-node delivery increased from ~0.1% (antigen alone) to ~1% with HA nanogels, and retention was prolonged. HA nanogels showed minimal renal and preferential hepatic accumulation; competition with excess HA or an anti-CD44 antibody in *in vitro* studies altered uptake, supporting a CD44-mediated contribution to uptake.

Exploratory seed studies: A heteronucleic acid (nucleic acid with ASO) was evaluated for complexation under SEC-resolved conditions; clear complexation was not observed, but post-storage samples suggested potential physicochemical tunability for future study.

Significance and Current Recommended Composition

Overall, HA nanogels activated and sustained both humoral and cellular immunity. Mechanistic work suggests contributions from lymph-node antigen delivery and prolonged residence time, delivery to B cells within lymph nodes, improved subcutaneous antigen retention, CD44-mediated cellular uptake. The optimal vaccine composition, considering antibody responses, cellular immunity, and safety, is considered to involve a specific grade, a relatively low HA nanogel concentration, and no adjuvant. Notably, enhancing immune responses without an adjuvant may enable safer vaccines. The platform is expected to be applicable to vaccines using polypeptide antigens, supporting real-world deployment of HA nanogel-based infectious-disease vaccines.