

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 乳幼児に適用可能な安全性と有効性の高いSF-10 アジュバントによるインフルエンザ・RSV 感染防御免疫誘導
(英語) Induction of protective immunity against influenza virus and RSV infection by efficacy and safety mucosal adjuvant SF-10 for infants and children
- 研究開発担当者 (日本語) 徳島大学先端酵素学研究所、特任教授、木戸 博
所属 役職 氏名： (英語) Institute for Enzyme Research, Tokushima University, Specially-appointed professor, Hiroshi Kido
- 実施期間： 平成26年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) SF-10 アジュバントの適正化、製造工程の検証、粉末化
開発課題名： (英語) Optimization of pharmaceutical process of SF-10 adjuvant and development of dried SF-10 powder
- 研究開発分担者 (日本語) 徳島大学先端酵素学研究所、特任助教、高橋 悦久
所属 役職 氏名： (英語) Institute for Enzyme Research, Tokushima University, Specially-appointed assistant professor, Etsuhisa Takahashi
- 分担研究 (日本語) SF-10 アジュバントの作用機序の解析
開発課題名： (英語) Mechanisms of action of SF-10 adjuvant
- 研究開発分担者 (日本語) 徳島大学先端酵素学研究所、特別研究員、金 恵珍
所属 役職 氏名： (英語) Institute for Enzyme Research, Tokushima University, Specially-appointed researcher, Hyejin Kim
- 分担研究 (日本語) SF-10 アジュバントの作用機序の解析

開 発 課 題 名 : (英 語) Mechanisms of action of SF-10 adjuvant

研究開発分担者 (日本語) 徳島大学先端酵素学研究所、特別研究員、木本 貴士

所属 役職 氏名 : (英 語) Institute for Enzyme Research, Tokushima University, Specially-appointed researcher, Takashi Kimoto

分 担 研 究 (日本語) SF-10 アジュバントの安全性検討と、インフルエンザウイルス抗原とSF-10 アジュバント複合体形成最適化の検討

開 発 課 題 名 : (英 語) Studies on the stability test of mucosal adjuvant SF-10, and optimization of influenza virus antigen-SF-10 complex formation

研究開発分担者 (日本語) 北里第一三共ワクチン株式会社、主任研究員、遠藤 淳

所属 役職 氏名 : (英 語) Kitasato Daiichi Sankyo Vaccine Co., LTD, Associate Director, Atsushi Endo

分 担 研 究 (日本語) SF-10 アジュバントの安全性検討と、インフルエンザウイルス抗原とSF-10 アジュバント複合体形成最適化の検討

開 発 課 題 名 : (英 語) Studies on the stability test of mucosal adjuvant SF-10, and optimization of influenza virus antigen-SF-10 complex formation

研究開発分担者 (日本語) 北里第一三共ワクチン株式会社、専門研究員、篠田 香織

所属 役職 氏名 : (英 語) Kitasato Daiichi Sankyo Vaccine Co., LTD, Researcher, Kaori Shinoda

分 担 研 究 (日本語) RS ウイルス抗原とSF-10 アジュバント複合体の最適化の検証

開 発 課 題 名 : (英 語) Studies on optimization of RSV-SF-10 complex formation

研究開発分担者 (日本語) 北里第一三共ワクチン株式会社、副主任研究員、井上 和恵

所属 役職 氏名 : (英 語) Kitasato Daiichi Sankyo Vaccine Co., LTD, Associate Senior Researcher, kazue Inoue

分 担 研 究 (日本語) HA-SF-10アジュバントの安全性検討

開 発 課 題 名 : (英 語) Studies on the safety of SF-10 adjuvant

研究開発分担者 (日本語) 北里第一三共ワクチン株式会社、主幹研究員、下村 和裕

所属 役職 氏名 : (英 語) Kitasato Daiichi Sankyo Vaccine Co., LTD, Chief Researcher, Kazuhiro Shimomura

II. 成果の概要（総括研究報告）

木戸博教授、高橋悦久助教、金恵珍、木本貴士研究員（徳島大学先端酵素学研究所）と遠藤淳、篠田香織、井上和恵、下村和裕、研究員（北里第一三共ワクチン株式会社）等はプロジェクトチームを作り、徳島大学が開発した肺サーファクタントを基盤とした生体成分粘膜アジュバント SF-10 の有効性、安全性、作用機序に関する研究を実施した。生体成分の生理活性に基づく強力な粘膜アジュバントの発見は世界初で、体内分解が早く副作用の見られないことを特色とする。

2歳以下の乳幼児はインフルエンザ感染の死亡率が高く、安全で予防効果の強い経鼻ワクチン開発が世界市場から強く求められているが未だない。徳島大学では、未熟児呼吸窮迫症候群の特効薬として長く使用されてきた肺サーファクタント生物製剤に、新たな生理活性として粘膜免疫誘導活性を見出し、これを基盤に安全性の高い人工合成肺サーファクタント SF-10 アジュバントの開発に成功した。本プロジェクトでの具体的な研究成果として、以下の5項目を示す。

1) SF-10 添加経鼻接種インフルエンザワクチンは、血液 IgG、粘膜 IgA 抗体を誘導し、長期免疫メモリが確認された： インフルエンザスプリット HA ワクチン抗原に、人工合成肺サーファクタント (SSF) と増粘剤の carboxyvinyl polymer (CVP) を添加した SF-10 アジュバントを添加して、経鼻接種（3回）することで、文献的にはトップレベルの鼻汁の抗インフルエンザ IgA 抗体と血液の IgG 抗体、それぞれのウイルス中和活性を確認した。カニクイサルへの HA+SF-10 の経鼻接種実験では、血液 IgG、粘膜 IgA 抗体と中和活性誘導において、9ヶ月後に1回経鼻接種するだけで、初回の3回接種とほぼ同等のウイルス中和活性誘導を確認して、長期免疫メモリが確認された。

2) SF-10 は抗原提示細胞で効果的なクロスプレゼンテーションを誘導し、液性免疫増強と共に、細胞性免疫を増強した： SF-10 と SSF は抗原特異的・細胞障害性 T 細胞 (CTL) 産生を増幅し、グランザイムアポトーシスシグナルを増強させ、ターゲット細胞の傷害性を増強した。誘導効果は、脾臓の CTL 誘導以外に鼻腔粘膜と肺リンパ節の CTL 誘導を確認した。さらに、最終免疫から6ヶ月後においても effector memory と central memory の長期 CTL メモリが確認できた。

3) 乳幼児モデルマウスで、SF-10 添加経鼻接種インフルエンザワクチンの感染防御能を確認した： 乳児期のマウスに HA-SF-10 を経鼻/経口投与したところ、HA 抗原は選択的に大量に気道粘膜上皮細胞と上部消化管粘膜細胞に取り込まれ、極めて効果的な粘膜免疫誘導を引き起こすことを確認した。抗体誘導臓器の検討では、経鼻接種の SF-10 添加インフルエンザ HA ワクチンにより、鼻腔粘膜のみならず全身の粘膜（気管支肺胞、膈、消化管）で HA 特異的 IgA が多量に分泌されていることが判明した。

4) SF-10 アジュバントの安全性の確認（臭神経、臭脳移行）： 強力な粘膜アジュバントとして知られているコレラ毒素 B サブユニットが経鼻接種によって臭脳へ移行し、臭脳機能障害を引き起こすことが報告されている。蛍光標識インフルエンザ抗原と SF-10 アジュバントの経鼻接種の場合、両者の臭脳移行は認められず、臭脳機能障害を引き起こすことの無いことが確認された。

5) 抗原の適用拡大： 増粘剤添加の液剤型 SF-10 経鼻接種インフルエンザワクチンの代わりに、SSF に粉末化剤を添加した SF-11 の開発に成功した。また、全粒子高病原性鳥インフルエンザワクチンに対しても SF-10 が極めて有効であることが確認された。今後腸管感染症のノロウイルス、ロタウイルス、ポリオウイルスワクチンへの応用や、食物アレルギーワクチンへの応用が強く期待される。また、気道感染症では、RS ウイルス F 蛋白質でも SF-10 のアジュバント効果を確認している。

Prof. Hiroshi Kido, assistant Prof. Etsuhisa Takahashi, researchers Hyejin Kim and Takashi Kimoto at The Institute for Enzyme Research, Tokushima University and researchers, Atsushi Endo, Kaori Shinoda, Kazue Inoue, and Kazuhiro Shimomura at Kitasato Daiichi Sankyo Vaccine Co., LTD made a project team and aimed to study on induction of protective immunity against influenza virus and RSV infection by using an efficacy and safety mucosal adjuvant SF-10 for infants and children.

The currently available influenza vaccines administered subcutaneously induce a serum IgG-mediated protection. However, this neither results in adequate induction of anti-viral IgA, which provides a wide cross-protection, nor cell-mediated responses. In addition, no vaccine is available at present for individuals aged <2 years old who show high frequency of morbidity and mortality. To overcome these issues, we recently found that pulmonary surfactant and its commercially-available product, Surfacten[®], which has been used as a natural replacement medicine in premature babies for a long time without significant adverse effects, show safety and efficacy mucosal adjuvant activities by promoting antigen delivery to antigen presenting cells. The surfactant is rapidly metabolized *in vivo* with a short half-life. We recently succeeded to produce a synthetic adjuvant mimicking surfacten[®] (SSF) with a carboxy vinyl polymer as a viscosity improver, named SF-10 for clinical use. In the project from April, 2014 to March 2017, we found following 5 major results.

1) Nasal vaccination of influenza virus hemagglutinin (HA)-SF-10 induces both HA-specific IgG in serum and IgA in nasal fluids with the long-term femoral immunity. Intra nasal vaccination of HA-SF-10 three times in mice every two weeks induced HA-specific IgG in serum and IgA in nasal fluids and their neutralizing activities. The efficacy was in the top levels known to date. In the experiments of young cynomolgus monkeys, we found that one revaccination after 9 months of the initial three-time's vaccination achieved almost maximal immunity, suggesting long-term femoral immunity by SF-10 and the results suggest its potential clinical use for intranasal flu vaccine.

2) Nasal vaccination of HA-SF-10 induces cytotoxic T lymphocytes (CTLs)-mediated cytotoxicity in the lungs and cervical lymph nodes. Nasal instillation of HA-SF-10 efficiently delivered HA antigen to mucosal dendritic and epithelial cells, resulting in differentiation into effector cells via cross-presentation, yielding a high percentage of antigen-specific CTLs in the nasal mucosa, lungs and cervical lymph nodes. HA-SF-10 also induced HA-specific lung-resident CD8⁺ memory T cells, and effector and central CD8⁺ memory T cells in the spleen with sustainability for at least 6 months, the results suggesting a long-term cell-mediated immune memory.

3) SF-10 induces protective immunity in infant of mice during suckling period. Intranasal and intraoral administration of HA-SF-10 in mice during suckling period induced efficient HA antigen delivery into airway mucosal epithelial cells and gastric mucosal epithelial cells, respectively, resulting in the potent systemic femoral immunity. HA-specific IgA was detected in mucus fluids in the airway, gastro-intestinal fluids and cervical fluids.

4) Safety of SF-10 in the central nervous system. Since HA-SF-10 is administered nasal cavity, we tested local adverse effects in nasal cavity and olfactory tissues. Although the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues, no effects on olfactory tissues was detected in nasal administration of HA-SF-10.

5) Screening of antigens for application of SF-10 adjuvant. Although data were accumulated in influenza HA and RSV vaccines for application of SF-10, we have tested other antigens. Intranasal and oral administration of heat-inactivated avian influenza virus H5N1 complexed with SF-10 induced efficient systemic and local immunity. We have developed dried SSF-HA powder for intranasal administration and will apply to use as a next generation adjuvant. Since oral administration of antigen-SF-10 complex induces potent systemic immunity, we will try to apply SF-10 for enteric virus vaccination, such as norovirus, rotavirus and poliovirus vaccines.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2 件、国際誌 1 件）

1. Induction of protective immunity and maintenance of its memory against influenza A virus by nasal vaccination using a new mucosal adjuvant SF-10 derived from pulmonary surfactant in young cynomolgus monkeys. Mizuno D, Kimoto T, Sakai S, Takahashi E, Kim H, Kido H. Vaccine 2016, 34, 1881-8.
2. 粘膜ワクチン療法. 木戸博. メディカル・サイエンス・ダイジェスト. 2016, 42, 13.
3. 高い安全性と有効性を示す生体成分粘膜アジュバント SF-10 の開発. 木本貴士, 木戸博. 次世代アジュバント開発のためのメカニズム解明と安全性評価. シーエムシ出版 p.144-150.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ヒト肺サーファクタント類似人工合成粘膜アジュバント SF-10 の細胞性免疫誘導効果、ポスター、金恵珍, 木本貴士, 高橋悦久, 堺聡子, 木戸博、第 89 回日本生化学会大会、2016/9/25-27、国内
2. ヒト肺サーファクタント由来アジュバント SF-10 混合経鼻投与ワクチンは臭神経を介して中枢神経系へ移行しない：コレラ毒素との比較、口頭、木本貴士, 金恵珍, 堺聡子, 高橋悦久, 木戸博、第 89 回日本生化学会大会、2016/9/25-27、国内
3. Mucosal adjuvant SF-10 mimicking human pulmonary surfactant induces CD8+ T cell response with formation of potent effector and central memory, Poster, Kim H, Kimoto T, Takahashi E, Sakai S, Kido H, 2016 International Society for Vaccines Annual Congress, 2016/10/ 2-4, 国外
4. ヒト肺サーファクタント類似人工合成粘膜アジュバント SF-10 の細胞性免疫誘導効果、口頭、金恵珍, 木本貴士, 高橋悦久, 堺聡子, 木戸博、第 20 回日本ワクチン学会学術集会、2016/ 10/ 22-23、国内
5. ヒト肺サーファクタント由来経鼻粘膜アジュバント SF-10 は成熟マウスだけではなく乳幼児マウスにおいても中枢神経系へ影響を与えない安全で有効なアジュバントである、口頭、木本貴士, 金恵珍, 堺聡子, 高橋悦久, 木戸博、第 20 回日本ワクチン学会学術集会、2016/ 10/ 22-23、国内
6. 乳幼児期マウスにも効果的なヒト肺サーファクタント由来経鼻粘膜アジュバント SF-10 の有効性と安全性の評価、口頭、木本貴士, 金恵珍, 堺聡子, 高橋悦久, 木戸博、日本肺サーファクタント・界面医学界第 52 回学術研究会、2016/10/29、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 生体成分粘膜アジュバント SF-10 添加経鼻接種インフルエンザワクチンの臨床試験、木戸博、革新的医療技術創出拠点プロジェクト、平成 28 年度成果報告会 2017/3/2-3、国内
2. Mucosal adjuvant SF-10 derived from human pulmonary surfactant, Kido H, BIO-Europe 2016/11/7-9, 国外

(4) 特許出願 なし

特許登録

米国：US 9,463,236 B2、(国際出願：PCT/JP2012/071831) 2016-10-11

欧州：EP 2 543 387 B1、(国際出願：(PCT/JP2011/054586) 2016-10-26

韓国：KR 10-161434、(国際出願：PCT/JP2009/056508) 2016-04-15