



| | |
|--------------|--|
| Title | Regulation of Lipid A Immune Function by Amphipathic Compounds for the Development of Vaccine Adjuvant Materials |
| Author(s) | Tran, Duc Khiem |
| Citation | 大阪大学, 2025, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/101920 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

| | |
|--|--|
| Name (Tran Duc Khiem) | |
| Title | Regulation of Lipid A Immune Function by Amphipathic Compounds for the Development of Vaccine Adjuvant Materials (ワクチンアジュvantマテリアル開発を目指した両親媒性化合物によるリピドA免疫機能の制御) |
| <p>Lipopolysaccharides (LPS) and its active center glycolipid lipid A are derived from the outer membrane of Gram-negative bacteria and recognized by host TLR4/MD-2 receptor complex. Lipid A tends to form aggregate in an aqueous environment due to its amphipathic nature. Our previous studies have highlighted that compositions and state of mixed aggregates between <i>E. coli</i> lipid A 1 (Fig. 1) and other TLR4 ligands can affect their innate immune function¹. In this study, I investigated the effects of fatty acids, which are simple amphipathic compounds, on canonical <i>E. coli</i> lipid A 1 innate immune activity.</p> <p>To prepare mixed aggregate of lipid A 1 and fatty acids, two different methods were employed: simple mixing method (SMM) and homogenous mixing method (HMM). SMM samples should tend to form aggregates composed of single components, whereas HMM samples should predominantly form aggregates composed of both fatty acids and lipid A 1. Immunological assays for SMM samples between <i>E. coli</i> lipid A 1 and all fatty acids showed no effect on lipid A immune function (Fig. 1). In contrast, HMM samples containing saturated fatty acids showed a concentration-dependent attenuation effect on lipid A immune function. Meanwhile, HMM samples prepared using unsaturated fatty acids showed a concentration-dependent attenuation effect at higher fatty acid concentrations, but a boosting effect on immune activation was observed at lower fatty acid concentrations. The attenuation effect observed in HMM samples could not be explained by competitive inhibition, but aggregate structural evaluations revealed that the morphology of mixed aggregates changed depending on preparation method and type of fatty acid, which could affect the lipid packing of aggregates and thus the function of lipid A.</p> <p>Based on these findings, I wanted to develop lipid nanoparticles (LNPs) vaccine containing lipid A and regulate the immune function of LNPs by using different amphipathic compounds. To improve upon the homogeneity of LNPs formed, the iLiNP² microfluidic device was used. However, <i>E. coli</i> lipid A 1 overstimulates the immune system which leads to lethal toxicity³. In contrast, our group focused on symbiotic bacterial LPS that promotes host homeostasis without excessive inflammation. We had reported that synthetic <i>Alcaligenes faecalis</i> lipid A 2 (AfLA 2, Fig. 2) showed effective mucosal vaccine adjuvant function⁴, so I prepared LNPs containing AfLA 2 and modified lipid composition to evaluate their adjuvanticity. LNPs containing AfLA 2 and a combination of either DOPC 3/DOTAP 4 or DOPC 3/ss-OP 5, which are canonical LNP constituents, showed weaker immunostimulatory activity in vitro compared to AfLA 2 without LNPs formulation. However, the activity of LNPs containing AfLA 2 showed different tendency in vivo, as mice immunized intranasally with LNPs containing AfLA 2 showed an enhancement of ovalbumin-specific IgG and IgA antibody responses higher than AfLA 2 without LNPs formulation.</p> <p>1) Mueller, M., Kusumoto, S., Fukase, K., et al., 2004, 279, 26307-26313. 2) Kimura, N.; Tokeshi, M.; et al. <i>ACS Omega</i>, 2018, 3) Molinaro, A. et al., <i>Chemistry – A European Journal</i> 2014, 21(2), 500–519. 4) Yoshii, K., Shimoyama, A., Fukase, K., Kunisawa J., et al., <i>Microorganisms</i> 2020, 8, 1102. 3(5), 5044-5051. 5) Akita, H. <i>Biological and Pharmaceutical Bulletin</i>, 2020, 43(11), 1617–1625.</p> | |

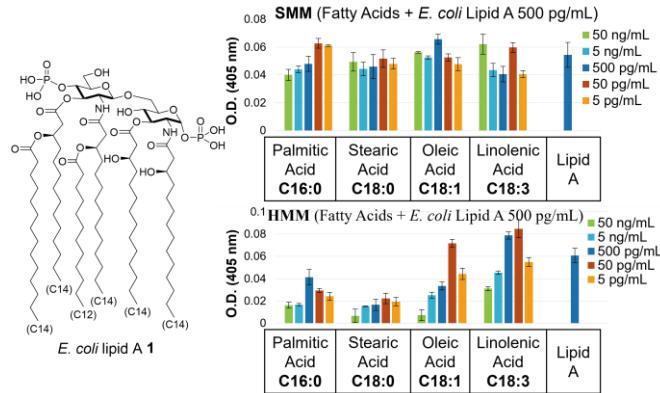


Fig. 1: Evaluation of SMM and HMM samples containing *E. coli* lipid A **1** and fatty acids

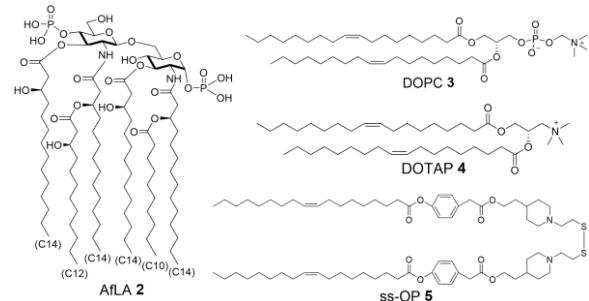


Fig. 2: Structures of compounds for LNPs synthesis

論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏名 (Tran Duc Khiem) | | |
|-----------------------|----------|--------|
| 論文審査担当者 | (職) | 氏名 |
| | 主査 教授 | 深瀬 浩一 |
| | 副査 教授 | 西村 多喜 |
| | 副査 特任教授 | 井ノ口 仁一 |
| | 副査 招へい教授 | 國澤 純 |

論文審査の結果の要旨

Tran Duc Khiem 氏の博士論文研究「Regulation of Lipid A Immune Function by Amphiphatic Compounds for the Development of Vaccine Adjuvant Materials (ワクチンアジュvantマテリアル開発を目指した両親媒性化合物によるリピド A 免疫機能の制御)」について審査を実施した。

リポ多糖 (LPS) は、グラム陰性細菌の外膜を構成する複合糖質であり、代表的な自然免疫活性化因子として知られている。LPS およびその活性成分であるリピド A は、ワクチンの効果を高めるアジュvantとして機能する。大腸菌 LPS は強い炎症性を示し、毒性が高いためアジュvantには適さない。一方で当該研究室では、ヒト腸管バイエル板共生菌 *Alcaligenes faecalis* 由来のリピド A が、低炎症性ながら高い IgA・IgG 産生を誘導し、有望な粘膜ワクチンアジュvant候補であることが見出された。Kheim 氏は、脂質ナノ粒子 (LNP) をプラットホームとして、*A. faecalis* リピド A アジュvantを用いたワクチンマテリアルの創製を目指し、様々な両親媒性化合物の添加によりリピド A 含有 LNP の性状・機能が制御できることを明らかにし、*A. faecalis* リピド A の IgA・IgG 産生能向上できる LNP 化手法を開発した。

リピド A は両親媒性の性質を持つため、水性環境中で凝集体を形成しやすい。Kheim 氏は、リピド A に脂肪酸を中心とした様々な両親媒性化合物を混合し、その凝集体の性状・免疫機能を評価した。その結果、混合法や脂肪酸の鎖長や不飽和度により、凝集体のサイズや形だけでなく、凝集体に含まれるリピド A の免疫機能も調節できることを見出した。

次に、ワクチンマテリアルへの展開を指向し、LNP を用いることでより均一なマテリアルの調製を目指した。北大の渡慶次らが開発したフロー型ナノ粒子製造デバイス iLNP を用いて、リピド A 含有 LNP を製造し、その免疫機能を評価した。In vitro 試験においては、LNP 化によりリピド A の免疫活性化能が低下する傾向がみられたが、マウスを用いた in vivo 試験では、傾向が変化し、リピド A 含有 LNP の方が、リピド A そのものよりも高い IgA・IgG 産生能を示した。また、カチオン性脂質の DOTAP や自己分解性脂質の SS-OP などの脂質添加が有効であることが示され、リピド A 含有 LNP が、優れたワクチンアジュvantマテリアルであることが明らかとなった。

以上のように Khiem 氏は、リピド A の生物活性発現機構に新たな知見を見出し、さらに LNP を基盤とするワクチンマテリアルの開発に貢献した。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。