



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | ウイルス感染症予防に叶う経粘膜ワクチン開発に関する基盤的研究  |
| Author(s)    | 萱室, 裕之  |
| Citation     | 大阪大学, 2010, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/57966">https://hdl.handle.net/11094/57966</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

[9]

|               |   |
|---------------|---|
| 氏 名           | かやむろひろゆき<br>萱室裕之  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士（薬 学）  |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 3 7 5 2 号   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 22 年 3 月 23 日   |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当<br>薬学研究科応用医療薬科学専攻                            |
| 学 位 論 文 名     | ウイルス感染症予防に叶う経粘膜ワクチン開発に関する基盤的研究                            |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 堤 康央<br>(副査)<br>教 授 高木 達也 教 授 小比賀 聡 教 授 中川 晋作 |

## 論文内容の要旨

ワクチンは感染症に対する最も有効な手段であり、事実、これまでに多くの感染症の克服に寄与してきた。しかし、天然痘を根絶した1970年代以降、HIV（Human Immunodeficiency Virus）やエボラウイルスを始めとする30種類以上の新たな新興ウイルスが出現し、人類の生命を脅かしている。また、高病原性トリインフルエンザウイルス、新型インフルエンザウイルスのようにパンデミックを起こす再興ウイルスもが脅威となっているのは周知の通りである。このように、新興・再興ウイルス感染症に対する対策は世界的課題であり、これらに有効なワクチンの開発に対する期待は極めて大きい。中でも近年、「粘膜ワクチン」は、初発感染部位となる粘膜面での防御網を構築できる唯一のワクチンであることから、注射による従来型ワクチンでは誘導できない「粘膜と全身の二段構えの感染防御」を達成できるうえ、非侵襲的で簡便性にも優れていることから、次世代のワクチンとして注目されている。しかし、通常、鼻腔や腸管といった粘膜局所に抗原を単独で投与しても免疫誘導能に乏しく、ウイルス感染防御に十分な効果を期待することが出来ない。すなわち、粘膜ワクチンの実用化に向けた最大の課題は、安全かつ有効な粘膜ワクチン用アジュバント（粘膜アジュバント）が存在しないことにある。そこで現在、ワクチン接種した抗原に対して特異的な免疫を効果的に誘導するための免疫活性化剤、すなわち、粘膜アジュバントの開発研究が精力的に試みられている。これまでに、優れた効果を示す粘膜アジュバントとして、コレラトキシン（CT）などの細菌毒素がアジュバントの素材として期待されてきた。しかし、これら病原体由来アジュバントを用い、インフルエンザ粘膜ワクチンの経鼻接種が行われた臨床試験において、顔面神経麻痺（ペル麻痺）などの重篤な副作用を呈することが明らかになり、細菌毒素を素材とした粘膜アジュバントの臨床応用は、多くの場合、断念せざるを得ない。従って今、我々は、このような過去の事例を教訓として、従来の細菌毒素を用いる研究開発戦略を見直し、新たな素材による粘膜アジュバントを開発することが求められている。本観点から私は、粘膜アジュバントとしてサイトカインの応用を考案した。サイトカインは免疫活性化能に優れるうえ、生体分子であって、既にタンパク性医薬品として臨床に応用されるなど、有効性・安全性の点で魅力的な性質を兼ね備えているものと考えられる。しかし、サイトカインの粘膜アジュバントとしての応用が試みられてはいるものの、どのサイトカインが粘膜アジュバント効果に優れるかに関しては殆ど明らかとされておらず、さらに、生理活性タンパク質であるサイトカインを経粘膜投与した場合、タンパク分解酵素やpH変化により速やかに失活、分解されてしまうことが原因となり、未だ有効かつ安全なサイトカイン粘膜アジュバントは開発されていない。

以上の観点から本研究では、サイトカインの中でも特に免疫活性化能に優れたTNFスーパーファミリー（TNFsf）に焦点を絞り、粘膜アジュバント効果に優れたサイトカインの網羅的探索と、独自の機能性人工タンパク質創出システムとの融合戦略により創製したサイトカイン粘膜アジュバントの有用性・安全性を検証することにより、ウイルス感染症予防に叶う粘膜ワクチンアジュバントとしての可能性を追求した。

第一に、TNFsfの粘膜アジュバントとしてのポテンシャルについて網羅的な解析を試み、TL1AおよびTNF- $\alpha$ が粘膜アジュバント効果に優れることを見出した。また、TL1A、TNF- $\alpha$ を経鼻ワクチンアジュバントとして適用することで、ヘルパーT細胞依存的な免疫が活性化され、全身と粘膜面にワクチン抗原特異的抗体を高効率で誘導可能であることを初めて明らかとした。これまでに、TNFsfの粘膜アジュバントとしての可能性について検討した例は全く存在せず、今回の結果は、TL1A、TNF- $\alpha$ が優れた粘膜アジュバント候補になり得ることを示す最初

の知見であると言える。

第二に、強力な粘膜ワクチン効果が期待できるTNF- $\alpha$ を候補サイトカインとして用い、独自のファージ表面提示法を駆使した機能性人工タンパク質創製技術により、活性が野生型TNF- $\alpha$ （wTNF）よりも飛躍的に向上し、且つ体内安定性にも優れた機能性TNF変異体（mTNF-K90R）を創製し、粘膜ワクチンアジュバントとしての応用を試みた。その結果、mTNF-K90Rは、wTNFと比べて全身および粘膜免疫を効率よく誘導できることが初めて明らかとなり、血清中におけるIgGのみならず、全身の粘膜面においても抗原特異的IgA抗体を高効率に誘導可能であることが判明した。またmTNF-K90Rは、ワクチン効果を発揮できる投与量の実に5倍もの過剰量をさらに複数回投与した場合においても、投与局所の粘膜面において重度な炎症反応や組織傷害性を示さなかったことから、安全性にも優れた粘膜ワクチンアジュバントであることを突き止めた。さらに実際のウイルス抗原として、インフルエンザ抗原（HA: hemagglutinin）やHIV抗原（gp120: glycoprotein120）を用いた場合においても、mTNF-K90Rは抗HA抗体および抗gp120抗体を全身ならびに、感染防御に必須となる粘膜面の双方に効率良く誘導できることが明らかとなり、ウイルスワクチンアジュバントとしての適用が非常に有望であると考えられた。

以上、本博士論文では、我々独自の創薬基盤技術が、粘膜ワクチンのためのサイトカイン粘膜アジュバント開発における有用な方法論であることを示し、本方法論により創出したmTNF-K90Rを用いたサイトカインアジュバントが、ウイルス感染症に対する粘膜ワクチン開発・実用化に大きく貢献しうることを明らかとした。本研究成果が、グローバルな視点で、新興・再興感染症の克服に大きく貢献し、我々の健康環境確保に資することを強く願っている。

## 論文審査の結果の要旨

近年の地球規模での新興・再興感染症の蔓延も相俟って、薬学的視点でのこれら病原性感染症に対する安全かつ効果的な予防・治療法の開発が希求されている。以上の背景から、本研究は、免疫活性化能と安全性に優れた生体高分子であるサイトカインをアジュバントとして開発することを先駆けて試みたものである。そのうえで、得られた情報をもとに、さらに安全かつ有効な改変型サイトカイン粘膜アジュバントを独自に設計するなど、有用な粘膜ワクチン療法の開発に向けた基盤研究を実施し、以下の非常に興味深い、有益かつ新たな知見・結論を得た。

1. TNFスーパーファミリーの中でもAPRIL、TL1A、TNF- $\alpha$ は、粘膜面投与により、全身レベルでの抗原特異的IgGを強力に誘導し、TL1A、TNF- $\alpha$ においては、粘膜面でのIgA誘導能にも優れることを先駆けて見出した。
2. 粘膜免疫活性化能に特に優れたTNF- $\alpha$ に対して、独自の機能性人工タンパク質創出技術を駆使して創製したmTNF-K90Rは、野生型TNFの抗原特異的IgGならびにIgA誘導能を著しく増強できることを最初に明らかとした。
3. mTNF-K90Rは投与局所である鼻粘膜組織に傷害性を示さず、安全性に優れたサイトカイン粘膜アジュバントであることを初めて明らかとした。
4. mTNF-K90Rは、インフルエンザやHIVといった広範なウイルス種に対しても粘膜ワクチン効果を増強可能な、ウイルス感染症予防に叶う優れたサイトカイン粘膜アジュバントであることを先駆けて明らかとした。

以上、本研究では、ファージ表面提示法を用いた独自の機能性人工タンパク質創出技術を駆使して創製した改変型TNF- $\alpha$ の粘膜ワクチンへの応用を試み、その有用性を実証するなど、グローバルな視点で、新興・再興感染症の克服に大きく貢献するものと期待され、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものと考えられる。