

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18921

研究課題名(和文) 補体活性化ポリマー修飾リポソームを用いた新規がんワクチン開発に関する研究

研究課題名(英文) Development of a novel cancer vaccine utilizing liposomes modified with complement activation polymer

研究代表者

清水 太郎 (SHIMIZU, Taro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・特任助教

研究者番号：30749388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では抗原送達システムを開発することを試みた。我々は脾臓辺縁帯B細胞に抗原を送達するために、補体系を活性化できるポリマー修飾リポソームに注目した。汎用されている修飾ポリマーはメトキシ末端のポリエチレングリコール(PEG)であるが、ヒドロキシ末端PEG修飾リポソームが自発的に補体系を活性化し、辺縁帯B細胞に選択的に送達されることを我々は発見した。さらに抗原とアジュバントをヒドロキシ末端PEG修飾リポソームに封入することで、抗原特異的免疫反応を増強できることを明らかにした。以上より、抗原を辺縁帯B細胞へと送達できるヒドロキシ末端PEG修飾リポソームが新規抗原送達システムとなることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop a novel type antigen delivery system. We focused on polymer-conjugated liposome that can activate complement system in order to deliver antigen to splenic marginal zone B cells. Widely-used conjugation polymer is polyethylene glycol (PEG) with methoxy terminal group (methoxy PEG). We found that hydroxyl PEG-conjugated liposomes spontaneously activated complement system and were selectively delivered to marginal zone B cells. Encapsulation of antigen and adjuvant into hydroxyl PEG-conjugated liposomes enhanced antigen-specific immune response. These results indicate that hydroxyl PEG-conjugated liposomes, which enable antigen delivery to marginal zone B cells, are novel antigen delivery system.

研究分野：薬剤学

キーワード：ワクチン 抗原送達 補体 リポソーム 辺縁帯B細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ワクチン開発においては、免疫反応の開始に關与する抗原提示細胞に抗原やアジュバントを効率的に送達することが重要である。抗原提示細胞の代表格は樹状細胞であるが、近年 B 細胞も抗原提示細胞として機能することが報告されている。さらに B 細胞の中でも脾臓の辺縁帯に局在する辺縁帯 B 細胞は、他の B 細胞サブセットと比較して抗原提示能が高いとされている。しかし、これまで辺縁帯 B 細胞を標的としたワクチン開発は行われていなかった。

以前我々は、PEG (ポリエチレングリコール) 修飾リポソームの初回投与 2~5 日後に再び PEG 修飾リポソームを静脈内投与することにより、同リポソームが脾臓辺縁帯 B 細胞に選択的に送達され、その後免疫反応の成熟領域である濾胞に輸送されることを明らかにした。さらに、2 回目投与 PEG 修飾リポソーム中に抗原とアジュバントを封入して辺縁帯 B 細胞に送達することにより、細胞傷害性 T 細胞を誘導でき、がんを治療できることを明らかにした。このように辺縁帯 B 細胞への抗原送達はワクチン効果を向上させることが期待される。

その一方で、この免疫法では、2 回のリポソーム投与が必要であり、煩雑である。1 回のリポソーム投与によって免疫を誘導するために、我々は補体の活性化に注目した。2 回目投与リポソームに結合した補体が、辺縁帯 B 細胞の補体受容体に認識されることを明らかにしていたため、補体活性の高いリポソームを用いれば、1 回の投与だけで辺縁帯 B 細胞にリポソームを送達できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、自然免疫系の 1 つである補体の活性化を利用して抗原を脾臓辺縁帯 B 細胞に送達し、抗原特異的免疫反応の誘導を試みた。我々は既に辺縁帯 B 細胞へのリポソームの送達に補体が關与することを明らかにしており、補体活性化能を持つポリマー修飾リポソームを用いることにより、1 回の投与で辺縁帯 B 細胞に抗原を送達可能なワクチンキャリアになると考えた。本研究では、補体活性化能を持つポリマー修飾リポソームの探索を行い、本リポソームが辺縁帯 B 細胞標的化能を持ち、ワクチンキャリアとして有用であるかどうか検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ポリマー修飾リポソームの調製

ポリマー脂質として、メトキシ末端 PEG 脂質、ヒドロキシ末端 PEG 脂質、ポリグリセロール誘導体脂質を用いた。これらのポリマー脂質を各種割合で添加し、粒子径が約 100 nm のリポソームを作製した。体内動態評価の際は、蛍光色素で標識した。免疫誘導評価の際は、抗原とアジュバントを封入して、

検討に用いた。

#### (2) 補体活性化の評価

各ポリマー脂質をコーティングしたプレートに、補体源である無処置マウス血清を加えてインキュベーションした。ポリマー脂質に結合した補体は、二次抗体を用いて検出した。

#### (3) 辺縁帯 B 細胞による取り込みの評価

In vitro 評価においては、無処置マウスから得られた脾臓細胞懸濁液に、血清および蛍光標識リポソームを添加してインキュベーションした。蛍光標識抗体を用いて辺縁帯 B 細胞の染色を行った後、フローサイトメトリーによって辺縁帯 B 細胞によるリポソームの取り込み量を測定した。

In vivo 評価においては、マウスに蛍光標識リポソームを静脈内投与し、24 時間後に脾臓を回収し、免疫染色後、フローサイトメトリー解析を行った。

#### (4) 抗体誘導および細胞傷害性 T 細胞誘導の評価

マウスに抗原およびアジュバントを封入したリポソームを静脈内投与した後、血清を回収し、血清中の抗原特異的抗体量を ELISA によって評価した。また、脾臓細胞を回収し、抗原特異的細胞傷害性 T 細胞をテトラマー試薬で染色し、フローサイトメトリー解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 各種ポリマー脂質の補体活性化能の評価

補体系中心タンパクの C3 の各種ポリマー脂質に対する結合量を測定した。従来から用いられているメトキシ末端の PEG 脂質と比較して、ヒドロキシ末端 PEG 脂質への C3 の有意な結合増加が確認された。ポリグリセロール誘導体に対する結合はみられたが、有意ではなかった。以降の検討では、メトキシ末端 PEG 修飾リポソームとヒドロキシ末端 PEG 修飾リポソームを用いて比較検討した。

#### (2) 各種ポリマー修飾リポソームの in vitro における辺縁帯 B 細胞標的化能の評価

辺縁帯 B 細胞および濾胞 B 細胞による各種ポリマー修飾リポソームの取り込み量を in vitro において評価した。メトキシ末端 PEG 修飾リポソームと比較して、ヒドロキシ末端 PEG 修飾リポソームは辺縁帯 B 細胞に多量に取り込まれた。濾胞 B 細胞による各リポソームの取り込みも確認されたが、辺縁帯 B 細胞に比べて少量であった。さらに、補体を不活性化した条件下においては辺縁帯 B 細胞によるリポソームの取り込みは全く観察されなかった。これらの結果より、補体活性化能の高いヒドロキシ末端 PEG 修飾リポソームは、補体の活性化を介して辺縁帯 B 細胞に

選択的に取り込まれることが明らかになった。濾胞 B 細胞ではなく、辺縁帯 B 細胞に選択的に取り込まれたのは、辺縁帯 B 細胞が補体 C3 の受容体である CD21 をより高発現しているためであると考えられる。

辺縁帯 B 細胞によるリポソームの取り込み量をさらに増加させるために、PEG 脂質の密度に着目した。PEG 脂質はリポソーム表面の密度に応じて立体構造を変化させ、低密度ではマッシュルーム構造を、高密度ではブラシ構造をとることが知られている。また、マッシュルーム構造の PEG の方が補体活性化能は高いことが報告されている。これまでの検討においては、5%の密度の PEG 脂質を用いていたが、新たに2%および10%の密度の PEG 修飾リポソームを作製し、検討に用いた。その結果、これまでの結果と同様に、いずれの密度においても、メトキシ末端 PEG 修飾リポソームよりもヒドロキシ末端 PEG 修飾リポソームが辺縁帯 B 細胞に多量に取り込まれた。さらに、PEG 脂質の密度が5%や10%のものと比較して、2%のものが最も効率的に辺縁帯 B 細胞に取り込まれた。

以上の結果より、PEG 脂質の密度が2%のヒドロキシ末端 PEG 修飾リポソームが辺縁帯 B 細胞標的化に優れたリポソームであることが *in vitro* において明らかになった。

(3) 各種ポリマー修飾リポソームの *in vitro* における辺縁帯 B 細胞標的化能の評価

続いて各種リポソームをマウスに静脈内投与した際の辺縁帯 B 細胞標的化能を評価した。従来用いられてきた PEG 脂質の密度が5%のメトキシ末端 PEG 修飾リポソームは辺縁帯 B 細胞に全く取り込まれなかった。しかし、PEG の末端構造をヒドロキシ基にすることにより、取り込み量が約3倍に増加した。また、PEG 脂質の密度を2%に変更することにより、取り込み量はさらに6倍増加した。*in vitro* での結果と同様に、PEG 脂質の密度が2%のヒドロキシ末端 PEG 修飾リポソームが辺縁帯 B 細胞標的化に優れていた。

さらにリポソームの生体内分布を明らかにするため、リポソームの主な蓄積部位である脾臓と肝臓の組織切片を作製し、分布を観察した。辺縁帯 B 細胞による取り込み量と比例して、PEG 脂質の密度が2%のヒドロキシ末端 PEG 修飾リポソームが最も脾臓に蓄積していた。さらに興味深いことに、リポソームの蓄積部位は辺縁帯 B 細胞が存在する辺縁帯ではなく、濾胞であった。このことから、辺縁帯 B 細胞に取り込まれたリポソームが辺縁帯から濾胞へと輸送されることが示唆された。一方で、肝臓への蓄積はほとんど観察されなかった。以上の結果より、PEG 脂質の密度が2%のヒドロキシ末端 PEG 修飾リポソームは脾臓辺縁帯 B 細胞への標的化能が高いことが示唆された。

(4) 抗原を封入した各種ポリマー修飾リポ

ソームによる免疫誘導の評価

最後に、これらのリポソームに抗原とアジュバントを封入して免疫を行った際の、抗原特異的免疫誘導効果について評価した。これまでの結果と相関して、辺縁帯 B 細胞標的化能の高かった2%の PEG 密度のヒドロキシ末端 PEG 修飾リポソームを用いた際に、抗原特異的 IgG (体液性免疫反応) および細胞傷害性 T 細胞 (細胞性免疫反応) 誘導能が最も高かった。このことから、PEG 脂質の密度が2%のヒドロキシ末端 PEG 修飾リポソームは、抗原特異的免疫反応を効率的に誘導できる優れた抗原送達システムであることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計0件)

(学会発表)(計10件)

Taro Shimizu, Tatsuhiro Ishida, Liposomal oxaliplatin has superior immunomodulation effect to free oxaliplatin on tumor immune microenvironment, 第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月7日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

清水 太郎、渡辺 優希、美馬 優、際田 弘志、石田 竜弘、脾臓辺縁帯 B 細胞を標的としたリポソームワクチンの開発、第25回 DDSカンファランス、2016年9月2日、グランシップ(静岡県静岡市)

清水 太郎、脾臓辺縁帯 B 細胞を標的としたワクチンによる新規がん治療法の開発、第41回製剤・創剤セミナー、2016年8月26日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

栗田 瑞月、吉岡 千尋、渡辺 優希、清水 太郎、石田 竜弘、脾臓辺縁帯 B 細胞標的化能をもつポリマー修飾リポソームの探索、第32回日本 DDS 学会学術集会、2016年6月30日、グランシップ(静岡県静岡市)

Taro Shimizu, Development of a unique vaccine by using immune response against intravenously injected PEGylated liposomes, Seminars in Nanomedicine, 2016年6月21日、ブダペスト(ハンガリー)

吉岡 千尋、栗田 瑞月、渡辺 優希、清水 太郎、石田 竜弘、PEG 修飾リポソームの PEG 末端構造ががんワクチン効果に与える影響、ナノライフサイエンス・オープンセミナー2015、2016年2月20日、サンライズ淡路(兵庫県南あわじ市)

Mizuki Awata, Risako Fujita, Yu Mima, Munehira Kawanishi, Taro Shimizu, Tatsuhiro Ishida, Altering PEGylated liposomes modification from DSPE-PEG-OCH<sub>3</sub> to DSPE-PEG-OH suppresses secretion of anti-PEG IgM and proliferation of PEG-specific B cell, Liposome Advances 2015, 2015年12月19日、ロンドン(イギリス)

清水 太郎、渡辺 優希、美馬 優、際田 弘志、石田 竜弘、脾臓辺縁帯 B 細胞を標的とした新規がんワクチンの開発、第 4 回若手研究者シーズ発表会、2015 年 11 月 30 日、県立広島大学サテライトキャンパスひろしま(広島県広島市)

清水 太郎、高橋 孝典、石田 竜弘、第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2015 年 11 月 20 日、熊本大学薬学部(熊本県熊本市)

吉岡 千尋、粟田 瑞月、渡辺 優希、清水 太郎、石田 竜弘、第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2015 年 10 月 31 日、高知市文化プラザかるぼーと(高知県高知市)

〔その他〕  
特になし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

清水 太郎 (SHIMIZU, Taro)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・特任助教  
研究者番号：30749388