

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号：24403
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23700563
研究課題名（和文）蛋白質・遺伝子の同時送達により免疫反応を精密制御できるナノワクチンキャリアの開発
研究課題名（英文）Preparation of nano-vaccine carrier for precise control of immune Responses by co-delivery of protein and gene
研究代表者 弓場 英司（YUBA EIJI） 大阪府立大学・大学院工学研究科・助教 研究者番号：80582296

研究成果の概要（和文）：本研究では、カチオン性脂質-遺伝子複合体と、タンパク質を内包した膜融合性ポリマー修飾リポソームを複合化したナノワクチンキャリアを開発した。このようなナノキャリアを用いると、タンパク質と遺伝子を同時に免疫担当細胞にデリバリーすることができ、両者の相乗効果で、がんを縮退させる高い免疫誘導機能を実現できた。このような多重デリバリーナノワクチンキャリアはがん免疫治療用の抗原キャリアとして有用である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed novel nano-vaccine carrier by complexation of cationic lipid-pDNA complex with antigenic protein-loaded liposome modified with fusogenic polymers. This nano-carrier achieved co-delivery of antigenic protein and gene into immune cells and high levels of immune responses which can regress tumor burden of mice. Therefore, such a multi delivery nano-vaccine carrier is promising as an antigen carrier for cancer immunotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：薬物伝達システム ワクチン がん免疫治療

1. 研究開始当初の背景

がん免疫治療の実現のために、免疫反応を統御する樹状細胞(DC)にがん抗原(タンパク質や遺伝子)を認識させ、がん特異的な免疫を活性化することが必要である。特に、直接がん細胞の排除を担う細胞障害性 T 細胞(CTL)の活性化がキーであり、そのためには①抗原タンパク質の細胞質へのデリバリー、もしくは②抗原をコードした遺伝子を細胞に導入し、高発現させることが必要である。

申請者はこれまで、酸性 pH に応答して膜融合を引き起こす高分子を修飾したリポソームによる DC への遺伝子及びタンパク質デリバリーについて研究を行ってきた。カルボキシル基を導入したポリグリシドール誘導

体の側鎖疎水性を向上させることで、強力な膜融合高分子を合成した。このうち高い膜融合性を示す MGLuPG を修飾したリポソームをマウスに投与することで、脾臓において非常に強力な CTL が誘導できることを明らかにした。これは MGLuPG リポソームが膜融合によって DC の細胞内に抗原タンパク質を効率良く導入した結果である。さらに、このような膜融合活性リポソームを、遺伝子-カチオン性脂質複合体(リポプレックス)と複合化させた膜融合性ハイブリッド複合体を作製し、DC への遺伝子導入を行ったところ、市販試薬に比べて極めて高い遺伝子発現を導くことに成功した。

2. 研究の目的

本申請ではこれらの研究成果を踏まえ、膜融合性ハイブリッド複合体のコンポーネントである、リポプレックスに抗原をコードした遺伝子を包含し、膜融合性リポソーム内に抗原タンパク質を封入した膜融合性ハイブリッド複合体を構築する。このようなハイブリッド複合体はエンドソーム内での膜融合によって、抗原タンパク質と抗原遺伝子を細胞内に同時デリバリーできる。したがって本研究では、抗原タンパク質と遺伝子の同時デリバリーによって、CTL を強力に誘導できる膜融合性多重デリバリーナノワクチンキャリアを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

- ①抗原遺伝子とカチオン性脂質の複合体を作製し、抗原タンパク質を封入した膜融合性リポソームとハイブリッド化させる。リポプレックスの電荷比(N/P比)と、膜融合性リポソームとの混合比を検討し、膜融合性ハイブリッド複合体の調製条件を最適化する。
- ②膜融合性ハイブリッド複合体を用いて、*in vitro* で DC へのタンパク質及び遺伝子デリバリーを行う。蛍光ラベルしたタンパク質及び遺伝子を封入したハイブリッド複合体の細胞内動態を観察し、また遺伝子発現効率を調べることで、デリバリー効率に及ぼす、ハイブリッド複合体の調製条件、膜融合性リポソームの性能の影響を調べる。
- ③多重デリバリーナノワクチンキャリアを用いて、*in vitro* 及び *in vivo* 免疫誘導とワクチンとしての有用性を評価する。

4. 研究成果

①得られた研究成果
まず、多重デリバリーナノワクチンの各コンポーネントの最適化を行い、ハイブリッド複合体構築のための基礎検討を中心に行った。側鎖疎水性の高い pH 応答性ポリグリンドール誘導体を合成し、これを修飾したリポソームによって、より低修飾量で強い膜融合性を発現する新規 pH 応答性ポリマーの開発に成功した(図1)。このポリマー修飾リポソームを用いることで、樹状細胞によるリポソームの取り込みが上昇し、さらにサイトゾルへの高効率なデリバリーを行うことができた。これをマウスに投与すると、腫瘍が著しく縮退し、強力ながん免疫を誘導できることが示された。また、多糖を主鎖骨格に持つ膜融合性ポリマー(図1)を修飾したリポソームについてもマウス腫瘍を縮退させることのできるほど強力ながん免疫の誘導を達成した。

一方、ハイブリッド複合体のコア部に用いるカチオン性脂質が免疫誘導機能に及ぼす影響についても検討を行った。カチオン性脂

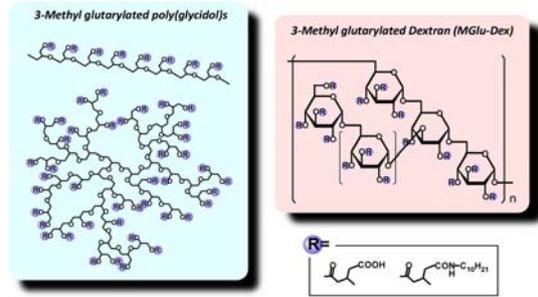


図1 pH 応答性ポリマーの構造。

質の導入によって、細胞による取り込みが劇的に向上し、加えて従来とは異なる経路の免疫反応を誘導できることが示唆された。ハイブリッド複合体に用いる、抗原をコードした遺伝子(pCMV-OVA)については、OVA の cDNA を発現ベクターに組み込んでサブクローニングを行うことで調製し、シーケンス解析によって、完全に OVA 遺伝子をコードしたプラスミド DNA を得ることができた。

続いて、カチオン性脂質-遺伝子複合体と、タンパク質を内包した膜融合性ポリマー修飾リポソームを複合化することで、タンパク質と遺伝子を同時にデリバリーし、高い免疫誘導を実現できる多重デリバリーナノワクチンキャリアの構築とその機能評価を行った(図2)。

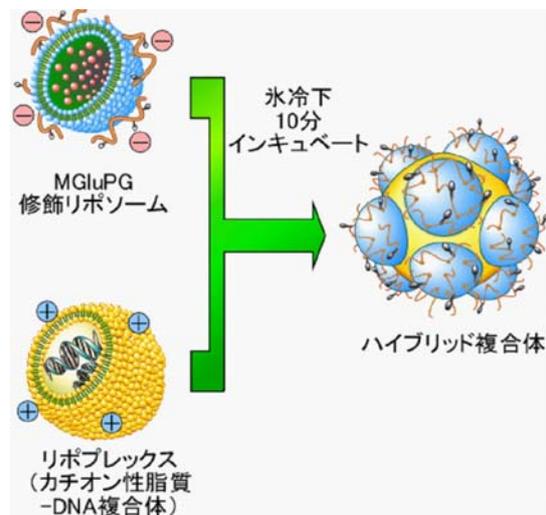


図2 多重デリバリーナノワクチンキャリアの設計。

カチオン性脂質-遺伝子複合体の混合比(電荷比)と、これに複合化させる膜融合性リポソームの混合比を調整することで、免疫細胞にタンパク質・遺伝子を同時デリバリーするためのハイブリッド複合体を作製した。実際、蛍光ラベルした遺伝子・タンパク質を包埋した複合体を樹状細胞に取り込ませると、遺伝子・タンパク質両方の蛍光が細胞内に観察され、両者を細胞内に同時デリバリーすることができた(図3)。

複合体を取り込んだ樹状細胞の蛍光写真

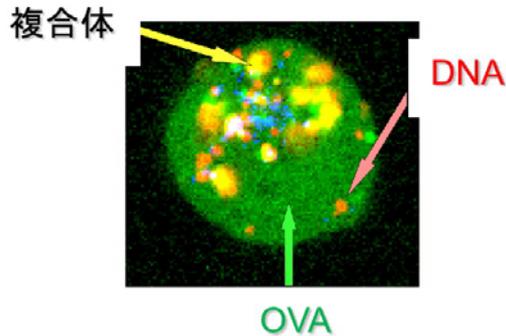


図3 多重デリバリーナノワクチンキャリアによる遺伝子(赤)と蛋白質(緑)の細胞内同時デリバリー。黄色は遺伝子と蛋白質が複合体のまま同じ場所に存在していることを示す。

これらの複合体を、抗原を発現したがん細胞であるE. G7-OVA細胞を接種し腫瘍を形成させたC57BL/6マウスの背部皮下に投与したところ、カチオン性脂質-遺伝子複合体のみ、膜融合性リポソームのみを投与したマウスに比べて、両者を複合化したハイブリッド複合体の方が強い抗腫瘍効果を示した。これは、膜融合性リポソームが、皮下の免疫担当細胞に取り込まれた後、細胞内の酸性小胞において不安定化し、内封した抗原タンパク質と遺伝子を細胞質に導入した結果、両者の相乗効果で抗腫瘍免疫を強力に誘導したためであると考えられる。

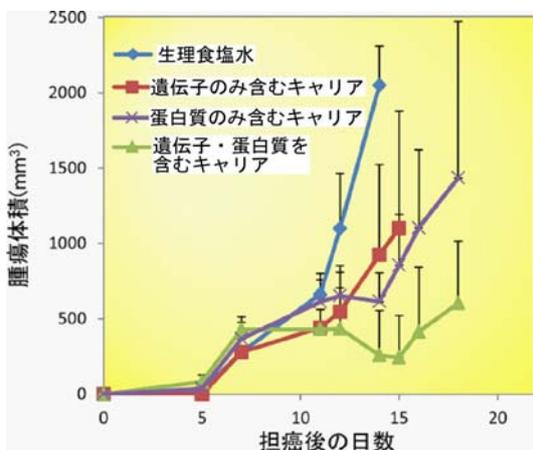


図4 多重デリバリーナノワクチンキャリアによる抗腫瘍免疫の誘導。遺伝子・蛋白質を同時にデリバリーできるナノキャリアは、いずれか一方のみをデリバリーするキャリアに比べて高い抗腫瘍効果を示した。

以上のように、タンパク質と遺伝子を同時にデリバリーすることによって高い免疫を誘導できるナノワクチンキャリアに成功し、同時デリバリーの重要性を明らかにすることができた。

②国内外における位置づけとインパクト

本研究は、申請者によって既に高い免疫誘導機能が実現されている pH 応答膜融合性リポソームと、高い遺伝子発現機能が実現されている膜融合性ハイブリッド複合体で得た知見を踏まえ、抗原タンパク質と遺伝子を一つのキャリア内に搭載し、膜融合によって両者を DC へ同時デリバリーできる新規ナノキャリアシステムを構築した。このような新規ナノキャリアによって、細胞質に抗原タンパク質を導入すると同時に遺伝子が導入され、その遺伝子が発現することで、相乗的に CTL を誘導できる。このように一つのキャリア内に抗原タンパク質と抗原遺伝子を搭載し、その同時デリバリーによって免疫誘導能を向上する、というアプローチは世界的にも類例を見ない非常にユニークな発想であり、抗原デリバリーシステムに新しい概念を提案するものである。

③今後の展望

このような高性能キャリアにより、非常に高い免疫誘導機能を持つナノワクチンが実現でき、がんや難治性疾患に対する免疫治療の確立に大きく寄与できる。免疫治療は、患者本人の免疫細胞を治療に用いるため、副作用のない治療が達成できる。したがって、本研究の完成によって安全性が高く、しかも有効な先進医療の確立に貢献できる。

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 8 件)

- ① S. Watarai, T. Iwase, T. Tajima, E. Yuba, K. Kono, Efficiency of pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a vaccine carrier, Scientific World J., 査読有, 2013, Article ID 903234, 7 pages.
- ② E. Yuba, A. Harada, Y. Sakanishi, S. Watarai, K. Kono, A liposome-based antigen delivery system using pH-sensitive fusogenic polymers for cancer immunotherapy, Biomaterials, 査読有, 34, 3042-3052 (2013).
- ③ S. Iwashita, Y. Hiramatsu, T. Otani, C. Amano, M. Hirai, H. Minematsu, H. Kitagawa, K. Oie, E. Yuba, K. Kono, M. Miyamoto, K. Igarashi, Assemblies of polyamidoamine dendron-bearing lipids with various generations: their morphologies and abilities of gene transfection, J. Biomater. Appl., 査読有, 27, 445-456 (2012).
- ④ T. Hebishima, E. Yuba, K. Kono, S. Takeshima, Y. Ito, Y. Aida, pH-sensit

ive fusogenic 3-methylglutarylated hyperbranched poly(glycidol) (MGLu-HPG)-conjugated liposome induces antigen-specific cellular and humoral immunity, Clin. Vac. Immunol., 査読有, 19, 1492-1498 (2012).

- ⑤ E. Yuba, Y. Nakajima, K. Tsukamoto, S. Iwashita, C. Kojima, A. Harada, K. Kono, Effect of unsaturated alkyl chains on transfection activity of poly(amido amine)dendron-bearing lipids, J. Control. Release, 査読有, 160, 552-560 (2012).
- ⑥ K. Kono, R. Ikeda, K. Tsukamoto, E. Yuba, C. Kojima, A. Harada, Polyamido amine dendron-bearing lipids as a non-viral vector: influence of dendron generation, Bioconjugate Chem., 査読有, 23, 871-879 (2012).
- ⑦ Dual signal-responsive liposomes for temperature-controlled cytoplasmic delivery, T. Kaiden, E. Yuba, A. Harada, Y. Sakanishi, K. Kono, Bioconjugate Chem., 査読有, 22, 1909-1915 (2011).
- ⑧ 高分子の表面修飾による機能性リポソームの設計 河野健司, 弓場英司, 膜, 査読無, 36, 183-190 (2011).

[学会発表] (計 31 件)

- ① 坂野貴宣, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司 腫瘍抗原を包埋した pH 応答性高分子修飾リポソームワクチンによる抗腫瘍免疫誘導 日本薬学会第 133 年会(2013 年 3 月 30 日、横浜)
- ② 能崎優太, 弓場英司, 坂口奈央樹, 小岩井一倫, 原田敦史, 河野健司 pH 応答性高分子修飾リポソームの免疫誘導能に及ぼすカチオン性脂質導入の効果 日本薬学会第 133 年会(2013 年 3 月 30 日、横浜)
- ③ Eiji Yuba, Atsushi Harada, Yuichi Sakanishi, Shinobu Watarai, Kenji Kono, Highly pH-sensitive liposomes as an efficient antigen delivery system for cancer immunotherapy, ICBS2013(2013 年 3 月 19 日、筑波)
- ④ 坂野 貴宣, 弓場 英司, 原田 敦史, 河野健司 腫瘍抗原を包埋した pH 応答性高分子修飾リポソームの作製と癌免疫治療への応用 バイオインターフェース先端マテリアルの創生第 3 回シンポジウム(2013 年 2 月 8 日、大阪)
- ⑤ 能崎優太, 弓場英司, 坂口奈央樹, 小岩井一倫, 原田敦史, 河野健司 pH 応答性高分子修飾リポソームの免疫誘導能に及ぼすカチオン性脂質の効果 バイオインターフェース先端マテリアルの創生第 3 回シンポジウム(2013 年 2 月 8 日、大阪)

- ⑥ 弓場英司 がん免疫治療のための pH 応答性ナノワクチンキャリア イノベーション関西(2012 年 12 月 6 日、大阪)
- ⑦ 坂野貴宣, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司 腫瘍抗原を包埋した pH 応答性高分子修飾リポソームワクチンの免疫誘導効果 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム 2012(2012 年 11 月 26 日、仙台)
- ⑧ 田島 直樹, 弓場 英司, 原田 敦史, 河野 健司 抗原タンパク内包 pH 応答性デキストラン修飾リポソームの構築とがん免疫治療への応用 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム 2012(2012 年 11 月 26 日、仙台)
- ⑨ 田島 直樹・弓場 英司・原田 敦史・河野健司 pH 応答性デキストラン修飾リポソームの調製と樹状細胞への抗原デリバリー 第 61 回高分子討論会(2012 年 9 月 20 日、名古屋)
- ⑩ 弓場 英司・田島 直樹・坂野 貴宣・原田敦史・坂西 裕一・渡来 仁・河野 健司 高効率な抗腫瘍免疫誘導のための pH 感受性ポリマー修飾リポソームの設計 第 61 回高分子討論会(2012 年 9 月 20 日、名古屋)
- ⑪ 弓場英司・蛇島武久・河野健司 伊藤嘉浩, 竹嶋伸之輔, 間陽子 pH 応答性ポリマー修飾リポソームによる抗原特異的細胞性・液性免疫の誘導 第 21 回日本組織適合性学会大会(2012 年 9 月 15 日、東京)
- ⑫ 弓場英司, 原田敦史, 坂西裕一, 渡来 仁, 河野健司 pH 応答性ポリマー修飾リポソームを用いた抗原デリバリーとがん免疫治療への応用 第 21 回日本組織適合性学会大会(2012 年 9 月 15 日、東京)
- ⑬ 能崎優太, 弓場英司, 坂口奈央樹, 小岩井一倫 原田敦史, 河野健司 pH 応答性高分子修飾リポソームワクチンへのカチオン性脂質導入の効果 第 21 回 DDSカンファランス (2012 年 9 月 1 日、静岡)
- ⑭ 能崎 優太, 弓場 英司, 坂口 奈央樹, 小岩井 一倫, 原田 敦史, 河野 健司 カチオン性脂質を導入した新規 pH 応答性高分子修飾リポソームワクチンの構築 第 28 回日本 DDS 学会学術集会(2012 年 7 月 4 日、札幌)
- ⑮ 坂野 貴宣, 弓場 英司, 原田 敦史, 河野 健司 腫瘍抗原を包埋した pH 応答性高分子修飾リポソームワクチンの構築 第 28 回日本 DDS 学会学術集会(2012 年 7 月 4 日、札幌)
- ⑯ 田島 直樹, 弓場 英司, 原田 敦史, 河野 健司 がん免疫治療のための pH 応答性多糖誘導体修飾リポソームの作製と機能評価 第 28 回日本 DDS 学会学術集会(2012 年 7 月 4 日、札幌)

- ⑰ 弓場英司, 原田敦史, 坂西裕一, 渡来仁, 河野健司 抗腫瘍免疫誘導のための pH 応答性ポリマー修飾リポソーム 第 28 回日本 DDS 学会学術集会 (2012 年 7 月 4 日, 札幌)
- ⑱ Eiji Yuba, Atsushi Harada, Yuichi Sakanishi, Shinobu Watarai, Kenji Kono pH-Sensitive polymer-modified liposomes as an antigen delivery system for cancer immunotherapy MACRO2012 (2012, 28th June, Blacksburg Virginia USA)
- ⑲ 弓場英司, 原田敦史, 坂西裕一, 渡来仁, 河野健司 pH 応答性ポリグリシドール修飾リポソームによる抗腫瘍免疫の誘導 第 61 回高分子学会年次大会 (2012 年 5 月 30 日, 横浜)
- ⑳ 田島直樹, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司 多糖誘導体を用いた新規な pH 応答性リポソームの構築とがん免疫治療への応用. 日本薬学会第 132 年会 (2012 年 3 月 30 日, 札幌)
- 21 弓場英司 新しい pH 応答性リポソームを用いた高活性がんワクチン開発. A-STEP 新技術説明会 (2012 年 2 月 10 日, 東京)
- 22 弓場英司, 原田敦史, 坂西裕一, 渡来仁, 河野健司 抗腫瘍免疫誘導のための pH 応答性多分岐ポリグリシドール修飾リポソーム. 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 (2011 年 11 月 21 日, 京都)
- 23 田島直樹, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司 がん免疫治療のための pH 応答性多糖修飾リポソームの作製とその免疫誘導効果. 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 (2011 年 11 月 21 日, 京都)
- 24 弓場英司, 原田敦史, 坂西裕一, 渡来仁, 河野健司 pH 応答性多分岐ポリグリシドール修飾リポソームによる抗原デリバリーと抗腫瘍免疫誘導. 第 60 回高分子討論会 (2011 年 9 月 28 日, 岡山)
- 25 弓場英司, 原田敦史, 坂西裕一, 渡来仁, 河野健司 高性能 pH 応答性リポソームを用いた抗原デリバリーとがん免疫治療への応用. 第 20 回 DDS カンファレンス (2011 年 9 月 16 日, 静岡)
- 26 田島直樹, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司 多糖誘導体を用いた pH 応答性リポソームの作製とがん免疫治療への応用. 日本バイオマテリアル学会第 6 回関西若手研究発表会 (2011 年 8 月 12 日, 大阪)
- 27 弓場英司, 河野 祥和, 原田 敦史, 横山 晶一, 新井 将也, 久保 和弘, 河野健司 pH 応答性ポリマー脂質を用いた高感度 pH 応答性リポソームの作製と癌免疫治療への応用. 第 27 回日本 DDS 学会学術集会 (2011 年 6 月 10 日, 東京)
- 28 弓場英司, 原田 敦史, 坂西 裕一, 渡来仁, 河野 健司 多分岐型 pH 応答性ポリマー修飾リポソームの抗原デリバリー機能と抗腫瘍免疫誘導. 第 27 回日本 DDS 学会学術集会 (2011 年 6 月 10 日, 東京)
- 29 田島直樹, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司 pH 応答性多糖で修飾した pH 応答性リポソームの調製とその樹状細胞内へのデリバリーシステムとしての機能. 第 60 回高分子学会年次大会 (2011 年 5 月 25 日, 大阪)
- 30 弓場英司, 河野祥和, 原田敦史, 横山晶一, 新井将也, 久保和弘, 河野健司 pH 応答性ポリグリシドール脂質を含有するリポソームの pH 応答機能と抗原デリバリーへの応用. 第 60 回高分子学会年次大会 (2011 年 5 月 25 日, 大阪)
- 31 弓場英司, 原田敦史, 坂西裕一, 渡来仁, 河野健司 pH 感受性ハイパーブランチポリグリシドール修飾リポソームによる抗原デリバリーと in vivo 免疫誘導. 第 60 回高分子学会年次大会 (2011 年 5 月 25 日, 大阪)

〔図書〕 (計 1 件)

高感度 pH 応答性リポソームのワクチンへの応用 弓場英司, 河野健司 ドラッグデリバリーシステムの新展開 II-核酸医薬・抗体医薬・ワクチン医療を支える DDS 技術-, 189-197 (2012) シーエムシー.

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.chem.osakafu-u.ac.jp/ohka/ohka9/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

弓場 英司 (YUBA EIJI)

大阪府立大学・大学院工学研究科応用化学分野・助教

研究者番号: 80582296

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし