

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0310

研究課題名（和文）核酸医薬デリバリーにおける自然免疫活性化機構の解明とその制御に関する研究（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Manipulating innate immunity for new vaccine against cancer(Fostering Joint International Research)

研究代表者

石田 竜弘 (ISHIDA, Tatsuhiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・教授

研究者番号：50325271

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,000,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、基課題の研究成果を基に、核酸・ナノキャリア複合体の自然免疫活性化機構を利用した静脈内投与型ワクチン開発に係る基礎的検討を進めた。我々は、微粒子表面に提示されたポリエチレングリコール(PEG)が T細胞非依存性抗原として脾臓辺縁帯のB細胞受容体に認識され、濾胞領域へと送達される極めてユニークな現象を明らかにしている。本検討では、抗PEG抗体分泌がPEGと核酸（TLRリガンド）の共局在・共刺激によって増強された事から、TLRリガンド含有PEG修飾リポソームが脾臓濾胞への抗原送達体として優れているだけでなく、細胞選択的なアジュバントとしても機能し、静脈内投与型ワクチンとなることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の遂行により、静脈投与型の新たなワクチンの開発に繋がる新規な免疫方法が見出された。本免疫方法は脾臓を標的免疫組織としていることから、独自性が高く、皮下投与が主流のこれまでのワクチンとは異なる免疫反応が期待できるため、有用なワクチンの開発に繋がる事が期待される。また、本課題の進捗に伴い、新たに課題も見出され、新たな枠組みでの国際共同研究が開始された。学部間交流や大学院生や研究生の交換にもつながっており、意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we showed a novel antigen (Ab) delivery platform for cancer vaccines that delivers an encapsulated Ag to splenic marginal zone B cells via the aid of a PEGylated liposome (PEG-Lip) system. In mice, preimmunization with empty PEG-Lips triggered the efficient delivery of a subsequent dose of Ag-containing PEG-Lips, injected 3 day later, to the spleen. This immunization induced a cytotoxic T cells (CTL) response against OVA-expressing murine thymoma (EG7-OVA) cells and resulted in in vivo growth inhibition of subsequently inoculated EG7-OVA cells. However, this immunization required repeated immunizations to achieve their antitumor effect. Therefore, to improve their antitumor effect, an adjuvant, aGC, was incorporated into the OVA-PEG-Lips (aGC/OVA-PEG-Lips). As expected, a single immunization treatment efficiently triggered a potent CTL induction, resulting in a rejection of the development and a suppression of the growth of tumors that had already developed s.c.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：リポソーム PEG TI抗原 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

Fire と Mello によって発見された RNA 干渉(RNAi)は、遺伝子発現抑制の有用なツールとしてだけでなく、新しい医薬品開発のアプローチとして大いに期待された。事実、これまでに 40 を越える RNAi 関連の核酸医薬品が臨床試験にあがってきている。しかし、現実には臨床開発中止に追い込まれたものも少なくなく、また 2011 年に大手製薬企業が siRNA 創薬からの撤退を表明したり、またその後回帰するなど、目論見どおりに開発が進んでいるわけではない。この理由の一つとして、極性高分子の核酸を作用部位である病態組織の細胞内に的確に送達するデリバリー技術が未完成であることがあげられている。しかし、この指摘は必ずしも正しくない。Alynlam 社の patisiran が認可されたように、炎症部位や固形がん、肝臓へのデリバリー技術は既に確立されており、製剤の供給も可能なレベルに達している。むしろ最も大きな理由は、核酸医薬品開発が治療効果を獲得することのみに注力され、核酸・キャリア複合体が生体に与える基本的な反応（拒絶反応や発熱、長期使用による毒性発現など）を蔑にしたことにある。外来からの核酸の侵入は、生体にとって最大の脅威であり、Toll-like receptor (TLR)を介した強力なシグナルの伝達は炎症性サイトカインの誘導や非特異的なインターフェロン応答などを惹起する。これらは、動物を用いた前臨床試験や比較的投与量が少ない第一相試験レベルでは問題にはならないが、臨床効果獲得のために高用量で繰り返し投与を行う第二相試験レベルでは極めて大きな問題となる。

2. 研究の目的

核酸は抗体医薬に次ぐ新規医薬品として期待されているが、その効果獲得には送達システムの開発が重要である。多くのキャリアが報告されているが、臨床試験の初期段階でドロップアウトしている。これは、薬理効果の優劣によってのみ評価が進められ、生体にとって外来異物である核酸・キャリア複合体と生体との相互作用に関する基礎的な検討が行われていないためである。本研究は、単に効果を追求するのではなく、真に重要な核酸・キャリア複合体の生体適合性に着目し、全身投与後の自然免疫システムによる認識、即ち Toll-like receptor (TLR)による認識機構、炎症性サイトカインの誘導、これに伴う副反応を詳細に検討することを特色とする。このような検討を通じ、安全で機能的な核酸キャリアの開発に寄与しうる情報を収集し、実際に応用することを最終目的とする。

本国際共同研究では、基課題の研究成果を基に、核酸・ナノキャリア複合体の自然免疫活性化機構を利用した静脈内投与型ワクチン開発に係る基礎的検討を進めた。研究代表者らは、微粒子表面に提示されたポリエチレングリコール(PEG)が T 細胞非依存性抗原として脾臓辺縁帯の B 細胞受容体に認識され、濾胞領域へと送達される極めてユニークな現象を明らかにしている。さらに、抗 PEG 抗体分泌が PEG と核酸 (TLR リガンド) の共同在・共刺激によって増強されたことから、核酸含有 PEG 修飾リポソームが脾臓濾胞への抗原送達体として優れているだけでなく、細胞選択的なアジュバントとしても機能し、静脈内投与型ワクチンという仮説を立て、検討を進めた。

3. 研究の方法

製剤的に均一な PEG-TLR リガンド (核酸) -T 細胞依存的抗原から成るナノ粒子をナノアセンブラーによって作製した。

作製した種々の製剤を用いて、動物モデルを用いて細胞性免疫の誘導による抗腫瘍効果、および細胞性免疫の誘導による有用性を評価した。

OVA 発現がん細胞を皮下接種し、マウス腫瘍モデルを調製した。空の PEG 修飾リポソームの静脈内投与、次いで 3 日後にオポアルブミン(OVA) / 核酸含有 PEG 修飾リポソームの静脈内投与、を 1 セットとして、細胞移植後、7 日目と 14 日目に静脈内投与免疫を行った。対照として、無処置担がんマウスを用いた。腫瘍体積は、腫瘍体積(mm³)=0.5 × (長さ) × (幅)² の式を用いて算出した。

静脈内投与免疫後 7 日目、14 日目、21 日目に血清を採取し、OVA に対する特異抗体を ELISA 法で評価した。

空の PEG 修飾リポソームの静脈内投与、次いで数日後に種々の抗原を封入した PEG 修飾リポソームの静脈内投与、を 1 セットとして、体液性免疫の活性化について検討した。空の PEG 修飾リポソームの投与量を変化させたり、リポソームの投与間隔を変化させたり、抗原封入量やリポソームの投与量を変化させることで、最適な投与量や投与間隔を検討した。また、誘導される抗体のサブクラスやサブタイプについても検討を行った。

PEG 含有化粧品を塗布する前に毎回ガムテープを用いてヘアレスラット腹部に 10 回程度テープストリッピングを行った。テープストリッピング後、コットンに適量の PEG 含有化粧品を染み込ませ、腹部に塗布した。この操作を 1 日 1 回行った。

塗布開始後 14 日、28 日、60 日目に尾静脈より血清を採取し、血清中の抗 PEG 抗体を ELISA 法で評価した。

4. 研究成果

OVA を T 細胞依存的抗原とし、これを PEG 修飾リポソームに封入し、TLR 刺激剤として a-galactosylceramide を共封入した製剤を開発し、これを EG7-OVA(OVA 発現がん細胞) 移植モデルマウスに投与して腫瘍増殖抑制効果を評価した。その結果、良好な腫瘍抑制効果を得ることができた。また、治療期間を通じて、被験動物に顕著な体重減少が見られなかったことから、懸念していた強い毒性は生じない事が示唆された。同時に体液性免疫についても評価したところ、通常の皮下免疫法に比べて少ない抗原量でかつ少ない免疫回数で同等以上の特異抗体が誘導されることを確認した。本抗原封入ナノ粒子は、細胞性免疫も体液性免疫も同時に誘導できる有用なワクチンとなる可能性が示唆された。

また、一部のシアル酸を含む糖鎖をリポソーム表面に修飾すると、上記の免疫反応は寧ろ抑制されることが示された。この結果は、同一の免疫活性化経路にこれを抑制する経路が共存していることを示唆しており、大変興味深い。

脾臓辺縁帯 B 細胞は PEG を認識する IgM を提示しており、PEG 修飾リポソームを前投与することで活性化され、その 3 日後にタンパク抗原(OVA)を封入した PEG 修飾リポソームを投与すると、脾臓辺縁帯 B 細胞がこれを取り込んで T 細胞領域と近接する濾胞領域に移動し、OVA に対する特異抗体を速やかに分泌することを明らかにした。フロイントのアジュバントなどと抗原をエマルジョン化し、皮下に免疫する従来法と比較して、本免疫法は免疫期間を 1/2~1/3 に短縮し、かつ 25 倍高い抗原特異的 IgG 抗体の抗体価を誘導することが可能であり、従来法と比較して 1/10~1/100 程度の低抗原量で十分に抗原特異的 IgG 抗体を誘導することができた。また、従来法では高分子のキャリアタンパクなどに修飾しないと抗体の誘導が困難なペプチド抗原に対しても、本免疫法ではペプチド抗原に対する特異的 IgG 抗体の誘導が可能であることも確認できた。さらに、誘導される IgG 抗体のサブクラスとして、従来法では IgG1 が主として誘導されるのに対して、本新規免疫法では IgG1 に加えて IgG2a、IgG2b、IgG3 も誘導できることを見出した。この空の PEG 修飾リポソームと抗原を封入した PEG 修飾リポソームを 3 日間隔で静脈内投与する新規免疫法は、皮下の免疫やリンパ節ではなく、脾臓というこれまで人為的に免疫する器官として使われていない組織を使っていることから、これまでの常識では説明できない免疫反応が生じている可能性が非常に高く、興味深い。

PEG 含有化粧品をラットに塗布した際の抗体産生評価ならびに化粧品によって誘導される抗 PEG 抗体による PEG 修飾医薬品の動態変化について検討を行った。本検討の結果から、皮膚に浸透しやすい化粧水によって anti-PEG IgM の分泌が生じ、このピークは塗布開始 35 日前後となることが分かった。PEG 含有化粧水による anti-PEG IgM 分泌量はラットの個体差が大きい結果となったが、最も anti-PEG IgM 分泌量の多かったラットの抗体価は PEG 修飾リポソームの 0.0001 μmol phospholipids/kg 投与によって誘導される anti-PEG IgM と同程度の抗体力価を持つことが確認され、これは Doxil 投与 4 時間後の血中濃度を 50% 程度低下させる力価を保持していた。また、PEG 含有化粧水誘導の anti-PEG IgM は PEG 修飾リポソームに対して高い親和性を持っていた。しかしながらこの anti-PEG IgM は、補体活性化能はなく、Doxil の動態変化を引き起こす可能性は低いと考えられる。実際に PEG 含有化粧水塗付によって anti-PEG IgM が誘導された状態のラットに Doxil を投与しても、血中濃度の低下は確認されなかった。以上の結果より、PEG 含有化粧水によって anti-PEG IgM が誘導されるが、補体活性化は生じないため、他の PEG 修飾製剤の体内動態変化を発現させる可能性は低いことが示唆された。そのため、Doxil のような血中濃度と薬効が相関する薬剤に対しては治療効果に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。その一方で、PEG 化タンパク製剤のような中和抗体の存在を考慮しなければならない薬剤に対してはその薬効を減弱させる可能性も考えられるため、注意が必要であると思われる。

本課題の遂行により、静脈投与型の新たなワクチンの開発に繋がる新規な免疫方法が見出された。本免疫方法は脾臓を標的免疫組織としていることから、独自性が高く、皮下投与が主流のこれまでのワクチンとは異なる免疫反応が期待できるため、有用なワクチンの開発に繋がるものと期待している。一方で、静脈内への投与による過剰な免疫活性化に起因する安全性の懸念は残念ながら払拭できていない。今後、大動物を用いての安全性試験を行う予定である。

国際交流の観点からの成果としては、研究代表者がコーディネーターとなり、渡航先のブリティッシュ・コロンビア大学(UBC)薬学部(カナダ)と徳島大学薬学部の学部間協定を締結し、研究者・大学院生の交流を開始することができるとともに、現在も継続されている事があげられる。共同研究者の Shy-Dar Li 博士も徳島大学を来訪し、特別講演を行い、学部内の教員と交流を行った。また、UBC から大学院生が一名来学し、研究室に 3 週間滞在して研究を行った(JSPS サマープログラムを利用)。また、セメルヴァス大学ナノ医薬品研究センターの Janos Szebeni 教授も来学し、特別講演を行い、学部内の教員と交流を行った。また、Szebeni 博士の研究室が

ら研究員一名が2回来学し、それぞれ3週間滞在し、研究を行った。さらに、Janos Szabenyi 教授との研究交流を通じ、新たなヨーロッパを中心とした国際研究体制が構築され、新規に国際共同研究加速基金(国際共同研究強化(B))に採択され、さらなる国際共同研究を展開するに至った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Meszaros, T., Kozma, G., Shimizu, T., Miyahara, K., Turjeman, K., Ishida, T., Barenholz, Y., Urbanics, R., Szebeni, J.	4. 巻 13
2. 論文標題 Involvement of complement activation in the pulmonary vasoactivity of polystyrene nanoparticles in pigs: Unique surface properties underlying alternative pathway activation and instant opsonization.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int. J. Nanomed.	6. 最初と最後の頁 6345-6357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/IJN.S161369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ishida, T.
2. 発表標題 Anti-polyethylene-glycol Antibody Response to PEGylated Nanoparticles.
3. 学会等名 CLINAM summit 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	リ シダー (LI Shy-Dar)	ブリティッシュコロンビア大学・薬学部・教授	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	スゼベニ ヤノス (SZEKENI Janos)	セメルヴェアス大学・ナノ医薬品研究センター・教授	