

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15108

研究課題名(和文)TI抗原としてのPEG化ナノキャリアを用いた静注型ネオワクチンアジュバントの開発

研究課題名(英文)Development of novel antigen delivery system for tumor therapy

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(薬学系)・教授

研究者番号：50325271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、2回目投与PEG修飾リポソーム(TI抗原)中に封入した抗原のMZ-Bへの送達
が抗腫瘍免疫反応を増強できるか検討した。空のPEG修飾リポソームによる前刺激とOVA封入PEG修飾リポソーム
による免疫を各3回行うと、腫瘍成長が著しく抑制された。EG7-OVAを移植した後、空のPEG修飾リポソームで前
刺激とOVA/GC封入PEG修飾リポソームによる免疫を1回行うと、既存の腫瘍の成長を有意に抑制した。新規な静注
型ワクチンを開発できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Antigen delivery to antigen presenting cells (APC) is important for
development of cancer vaccine. We have found that second dose PEGylated liposomes were selectively
taken up by splenic marginal zone B cell (MZ-B), when they were injected with certain interval. This
suggests that if antigen is encapsulated into second dose PEGylated liposome, antigen could be
delivered to MZ-B, resulting in enhanced anti-tumor immune responses. In this study, we confirmed
that delivery of antigen encapsulated in second dose PEGylated liposomes to MZ-B can enhance
antitumor immune responses against primary tumor or transplanted tumor.

研究分野：薬剤学

キーワード：ワクチン アジュバント ナノキャリア

1. 研究開始当初の背景

PEGはそれ自体に免疫原性はなく、タンパク質医薬やナノキャリアではPEG化することで血中滞留性や生体内安定性が向上するとともに免疫原性が抑制されることが知られている。

我々はこれまで、Doxilの有用性やPEG修飾リポソーム自体の体内動態を支配する因子の探索に関する研究を行い、PEG修飾リポソームをある条件下で投与した場合、2度目に投与したPEG修飾リポソームが極めて速やかに血中から消失すること(ABC現象)を発見した。さらにこの原因としてPEG修飾リポソームがT細胞非依存的に直接脾臓辺縁帯(Marginal zone, MZ)のB細胞(MZ-B細胞)を刺激して抗PEG IgMを分泌することを明らかにしている。さらに興味深い事に、PEG修飾リポソーム初回投与後、抗PEG IgMが血中に多量に分泌される以前(初回投与後~3日後まで)にPEG修飾リポソームを再度投与すると、MZ-B細胞がそのPEG修飾リポソームを捕捉し、速やかに胚中心に移動し、樹状細胞に受け渡している事が分かった。さらに、MZ-B細胞によるPEG修飾リポソームの捕捉、および胚中心への送達に体液性免疫成分である補体系が重要な役割を果たしている事を明らかにした。

本現象を利用すれば、多量の抗原を脾臓樹状細胞に送達することが可能であり、アジュバントとして応用できるのではないかと考え、本研究課題を提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では免疫細胞への新たな抗原送達法としてT細胞非依存的(TI)抗原であるPEG修飾リポソームの特性を利用した方法を提案することとした。本提案は、PEG修飾リポソーム投与によって脾臓辺縁帯のB細胞(MZ-B細胞)が感作され、数日後に投与したPEG修飾リポソームを補体受容体を介して捕捉し、速やかに胚中心の樹状細胞に運ぶようになる、という申請者らによる極めてユニークな発見に基づくものである。この現象を利用すれば、多量の抗原を効率よく抗原提示細胞に受け渡すことができ、非常に強いアジュバントを開発できる可能性が高いと考えた。また、PEG修飾リポソームは既に臨床で使用されており、さらにはPEG修飾リポソームがMZ-B細胞のみを感作して非特異的な炎症反応を誘導しないことから、ヒトに投与可能で安全なアジュバントになる事を期待した。

3. 研究の方法

【実験動物・細胞】

抗体誘導の実験においてはWistarラット(オス、8週齢)を用い、抗腫瘍免疫誘導の

実験においてはC57BL/6Nマウス(オス、5週齢)を用いた。がん細胞として、OVA発現Tリンパ腫細胞であるEG7-OVAを用いた。

【リポソームの調製】

PEG修飾リポソーム(PL)の脂質組成は、HEPC:mPEG2000-DSPE:Chol (1.85:0.15:1)とし、粒子径は約100nmに調整した。アジュバントを用いる際は、リン脂質量に対して0.5%の α -ガラクトシルセラミド(GC)を添加した。抗原である卵白アルブミン(OVA)は、凍結乾燥法もしくは凍結融解法によりPL内に封入した。

【免疫】

MZ-BへとOVAを送達するために、まず空のPLをラットもしくはマウスに静脈内投与した。3日後、OVA封入PLを静脈内投与することで免疫を行った。繰り返し免疫時は、空のPLとOVA封入PLによる免疫を、2週間おきに繰り返した。血清中の抗OVA抗体量はELISA法により測定した。細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導は、*in vitro* CTL assayにより評価した。またがん細胞を移植する際は、106細胞を皮下移植した。

【ELISA】

OVAでコーティングした96ウェルプレートに、希釈血清を加えて1時間インキュベーションした。二次抗体として、HRP標識した抗ラットIgM抗体もしくは抗ラットIgG抗体を用い抗OVA IgMおよび抗OVA IgGを検出した。

【*In vitro* CTL assay】

エフェクター細胞としては免疫したマウス由来の脾臓細胞を用い、OVAで再刺激した。ターゲット細胞としてはEG7-OVAを用い、マイトマイシンCによる不活性化・CFSEによる蛍光標識を行った。両細胞を共培養した後、7-AADを用いてアポトーシス細胞を染色し、ターゲット細胞のアポトーシスをフローサイトメトリーで測定した。

4. 研究成果

まず、MZ-Bへの抗原送達による抗体誘導増強効果について検討を行った。抗原をMZ-Bへと送達するために、空のPLを静脈内投与した3日後に、OVA封入PLを静脈内投与して免疫を行った。OVA封入PLによる単独免疫は、抗OVA IgMおよび抗OVA IgGをわずかにしか誘導しなかった。しかし、空のPLの前投与を行うことにより、抗OVA IgMおよび抗OVA IgGの分泌量が有意に増加した。このことから、空のPLの前投与は続いて投与されるOVA封入PLに対する抗体誘導を増強できることが明らかになった。

MZ-Bへの抗原送達およびそれに続く濾胞への抗原輸送が抗体誘導増強に寄与するかどうか、FTY720を用いてさらなる検証を行った。FTY720は、リンパ球の遊走を制御することが知られており、脾臓内においてはMZ-Bを辺縁帯から濾胞へと遊走させる。そ

のため、2 回目投与 PL を静脈内投与する前に FTY720 で処置することにより、MZ-B が辺縁帯から濾胞へと予め遊走し、2 回目投与 PL を辺縁帯から濾胞へと輸送できなくなった。また、空の PL 投与 3 日後に OVA 封入 PL による免疫を行うと抗 OVA IgG が誘導されたが、OVA 封入 PL による免疫前に FTY720 で処置すると抗体誘導が阻害された。このことから、空の PL 前投与による抗体誘導増強に、MZ-B による抗原輸送が関与することが示唆された。

OVA 封入 PL の MZ-B への送達は、OVA に対する抗体誘導を増強し、ワクチンとして有用であると考えられるが、キャリアとして用いた PL に対する抗体誘導も増強してしまう恐れがある。そこで、空の PL の前投与と OVA 封入 PL による免疫後に血清を回収し、PL の構成脂質に対する抗体誘導を評価した。その結果、抗 PEG IgM の若干の分泌は確認されたが、他の構成脂質である HEPC、Chol に対する IgM および IgG の分泌は検出されなかった。このことから、本免疫法は PL 内に封入された抗原に対する抗体分泌のみ増強できることが示唆された。

続いて、MZ-B への抗原送達による抗腫瘍免疫誘導増強効果について検討を行った。まずアジュバントを用いずに、抗腫瘍免疫の誘導を試みた。OVA 封入 PL による 1 回の免疫では、CTL は誘導されなかった。OVA 封入 PL による免疫を 3 回繰り返した場合、CTL のわずかな誘導が確認された。OVA 封入 PL による免疫前に空の PL を投与することにより、CTL 誘導の有意な増強がみられた。また、免疫したマウスにがん細胞を移植した場合、OVA 封入 PL 単独では腫瘍成長抑制効果がみられなかったが、空の PL の前投与を行うことで、腫瘍定着がほぼ抑制された。このことから、MZ-B への抗原送達を誘導する空の PL の前投与を行うことにより、抗原に対する抗腫瘍免疫誘導を増強できることが明らかになった。

免疫回数の低減を目指してアジュバントの GC を併用した際の抗腫瘍免疫誘導能を評価した。OVA/GC 封入 PL を用いて免疫すると、1 回の免疫で CTL が誘導された。

空の PL の前投与を行うことで CTL 誘導が増強された。また、これらの免疫を施したマウスにがん細胞を移植した際、空の PL の前投与と OVA/GC 封入 PL による免疫を行った群において、有意な腫瘍成長抑制効果を示した。GC はナチュラルキラー T 細胞や CTL を速やかに活性化することが報告されているため、GC の添加は速やかな CTL の誘導に有用であったと考えられる。

これまでの検討においては、予め免疫を行った後にがん細胞を移植し、腫瘍成長抑制効果を観察した。これはつまり、がんの予防効果を検討したものである。しかしながら、現在のがんワクチン開発においては、既のがんが存在する状態で、がんを治療できるワクチ

ンが求められている。そこで、がん細胞を移植したマウスに免疫を施した際のがん治療効果を検討した。OVA/GC 封入 PL 単独で免疫を行うと、腫瘍移植 19 日目以降に腫瘍成長抑制効果が観察された。一方で、空の PL の前投与を加えることにより、腫瘍移植 13 日目の早い時期に腫瘍成長抑制効果がみられ、OVA/GC 封入 PL 単独免疫群と比較して、有意な腫瘍サイズの減少が確認された。以上のことから、本免疫法はがんの予防だけでなく、治療にも有効であることが示唆された。

空の PEG 修飾リポソームを用いて前刺激を行い、抗原を封入した PEG 修飾リポソームを MZ-B へと送達することにより、抗原特異的抗体誘導、CTL 誘導および腫瘍成長抑制効果を増強できることが明らかになった。また GC の添加により、より速やかに抗腫瘍免疫反応を誘導できた。さらに本免疫法はがんの予防だけでなく、治療にも有効であることが示唆された。以上の結果より、MZ-B への抗原送達は、免疫反応を増強できる新規戦略となることが示された。

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 1 件)

Ando, H., Abu Lila, A.S., Kawanishi, M., Shimizu, T., Okuhira, K., Ishima, Y., Ishida, T., Reactivity of IgM antibodies elicited by PEGylated liposomes or PEGylated lipoplexes against auto and foreign antigens. J. Control. Release, 査読有, 270, 2018, 114-119
DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.12.002

[学会発表](計 5 件)

Ishida, T., Immunological responses against PEGylated materials: the accelerated blood clearance (ABC) issue. International Symposium on Nanomedicine 2017, Sendai, Japan, Dec. 14 (2017)

吉岡千尋、栗田瑞月、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を用いた静注型ワクチン開発に関する検討、第 33 回日本 DDS 学会学術集会、みやこメッセ(京都府、京都市)、2017 年 7 月 6 日

中見祥一、清水太郎、中村教泰、石田竜弘、PEG 修飾有機シリカ粒子に対する免疫応答に関する検討、第 55 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、就実大学(岡山県・岡山市)、2016 年 11 月 6 日

山崎仁王、異島優、清水太郎、石田竜弘、PEG リポソームへのアルブミン修飾は、抗 PEG 抗体の産生を抑制する、第 55 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、就実大学（岡山県・岡山市）2016年11月6日
竹瀬俊輔、高山拓磨、西尾美穂、清水太郎、石田竜弘、抗がん剤封入リポソームとの併用によるがんワクチン効果の増強に関する検討、55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、就実大学（岡山県・岡山市）2016年11月6日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 竜弘 (ISHIDA, Tatsuhiro)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：50325271

(2) 研究分担者

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