

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 3日現在

機関番号：16101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659082
 研究課題名（和文）PEG修飾ナノキャリアによる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 vaccine system with nanocarrier

研究代表者

石田 竜弘 (ISHIDA TATSUHIRO)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
 研究者番号：50325271

研究成果の概要（和文）：

本研究では免疫細胞への新たな抗原送達法として PEG 修飾リポソームによる免疫系の活性化（ABC 現象）を利用した方法を提案した。本提案は、PEG 修飾リポソーム投与によって脾臓辺縁体の B 細胞が感作され、数日後に投与した PEG 修飾リポソームを捕捉し、速やかに胚中心の樹状細胞に運ぶ、という我々の極めてユニークな発見に基づいている。当初の目論見通り、あらかじめ少量の PEG 修飾リポソームで刺激することで、少量の抗原(OVA)を含む PEG 修飾リポソームを投与するだけで高い抗 OVA IgG、抗 OVA IgM を誘導することができた。PEG 修飾リポソームは TI 抗原であり、これに TD 抗原を封入して投与する事で TI 経路の活性化を利用して TD 抗原に対する免疫反応が亢進される事を確認した。通常のアジュバントは皮下の抗原提示細胞を利用して免疫増強活性を示すが、本方法は脾臓の免疫系を活性化して免疫増強作用を得るものであり、新規なメカニズムに基づくアジュバントとなるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：

We showed that second dose PEGylated liposome is aggressively transported from marginal zone (MZ) into follicle in spleen when they are injected twice into the same rat with short interval. We revealed that splenic MZ B cells capture and transport second dose liposomes into follicle in a time after second dose injection-dependent manner. The captured and then transported liposomes were finally taken up by follicular dendritic cell. We tried to apply this unique immune response to be a novel adjuvant system which enhances a specific antibody response against antigen encapsulated in second dose liposomes. Pre-immunization with low dose empty liposome, which triggers the transport of antigen-containing second dose liposomes into follicle, induced both anti-OVA IgM and anti-OVA IgG productions as OVA-containing liposomes, not free OVA, was intravenously injected as a second dose. The produced anti-OVA IgG contained IgG1, IgG2a and IgG2b subclasses. In addition, the high level of anti-OVA IgG lasted over 12 weeks after the immunization. These suggest that pre-stimulation with empty PEGylated liposomes could enhance the specific antibody response against antigen encapsulated in second dose liposomes. We conclude that our active transport methodology can be useful for a novel and alternative vaccine strategy to potentiate specific antibody response.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態・代謝学

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。事実、ペガシス(PEG化インターフェロン)やDoxil(ドキソルビシン含有PEG化リポソーム)などのPEG化製剤が上市されるに至っている。

申請者らはこれまで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ってきたが、その過程でPEG修飾リポソームをある条件下(際めて少ない投与量)で投与した場合に、2度目に投与したPEG修飾リポソーム(臨床投与量)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修飾リポソームを投与すると、MZ-B細胞が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。

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。インフルエンザワクチンやがんワクチンの開発を目指した研究が盛んに行われているが、臨床応用時に必要となるヒトに投与可能なアジュバントの開発は遅れている。本提案を遂行する事により、まったく新しい概念に基づく安全なアジュバントが生まれるものと考えた。

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PEG修飾リポソームによる免疫系の活性化(ABC現象)を利用した方法を提案した。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、という我々による極めてユニークな発見に基づいたものであった。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。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、ヒトに投与可能で極めて安全なアジュバントになる事を期待した。

3. 研究の方法

(1) PEG修飾リポソームの調製

HEPC/Cholesterol/mPEG2000-DSPE=1.85/1/0.15(モル比)から構成される、粒子径約100nmの空のPEG修飾リポソームをBangham法により調製した。OVA(卵白アルブミン)封入PEG修飾リポソームは、凍結乾燥法によりリポソーム内にOVAを封入して調製した。遊離のOVAはゲル濾過により除去した。OVA封入PEG修飾リポソームの粒子径は約370nm、封入量は130µg OVA/µmol phospholipidであった。

(2) 濾胞樹状細胞によるPEG修飾リポソームの取り込み評価

空のPEG修飾リポソームをラットに静脈内投与した3日後に、蛍光色素のDiOで標識したPEG修飾リポソーム、もしくは蛍光色素のDyLight488で標識したOVA封入PEG修飾リポソームを静脈内投与した。1日後に脾臓を回収し、脾臓懸濁液を調製した。抗濾胞樹状細胞抗体を用いて染色を行った後、フローサイトメーターによって濾胞樹状細胞によるPEG修飾リポソーム・OVAの取り込み量を測定した。

(3) OVA封入PEG修飾リポソームを用いた免疫

空のPEG修飾リポソームをラットに静脈内投与した3日後に、OVA封入PEG修飾リポソーム(100µg OVA/kg体重)を静脈内投与して一次免疫を行った。比較試験として、遊離のOVA、OVA封入PEG修飾リポソームの静脈内投与、もしくはフロイト完全アジュバントとOVAのエマルジョンの皮下投与により一次免疫を行った。また一次免疫の14日後にOVA封入PEG修飾リポソームの静脈内投与により二次免疫を行った。免疫後経時的に採血を行い、血清中の抗OVA IgMおよび抗OVA IgG分泌量をELISAにより測定した。

4. 研究成果

(1) 濾胞樹状細胞によるOVA封入PEG修飾リポソームの取り込みに与える空のPEG修飾リポソーム前投与の影響

これまでの検討から、PEG修飾リポソームを初回投与して2日-5日後に、再びPEG修飾リポソームを投与すると、二回目投与PEG修飾リポソームは脾臓辺縁帯B細胞に捕捉され、濾胞に活発に輸送されることを明らかにしている。また辺縁帯B細胞は、抗PEG IgMと補体の存在下でPEG修飾リポソームを取り込むことを明らかにしており、補体受容体を介して二回目投与PEG修飾リポソームを

取り込むと考えられる。濾胞樹状細胞は辺縁帯 B 細胞と同様に補体受容体タイプ 2 を高発現しており、濾胞に輸送された二回目投与 PEG 修飾リポソームは濾胞樹状細胞によって取り込まれていると考えた。

そこでまず、蛍光色素で標識した PEG 修飾リポソームを用いてリポソーム自身の濾胞樹状細胞による取り込みをフローサイトメーターによって評価した。初回投与 PEG 修飾リポソームは濾胞へほとんど輸送されないため、濾胞樹状細胞によるリポソームの取り込みはほとんど観察されなかった。しかし、初回 PEG 修飾リポソームの投与 3 日後に再び PEG 修飾リポソームを投与すると、二回目投与 PEG 修飾リポソームは濾胞に活発に輸送され、濾胞樹状細胞に多量に取り込まれていた。このことから、二回目投与 PEG 修飾リポソームは、濾胞に輸送された後、濾胞樹状細胞によって取り込まれることが明らかになった。

続いて、PEG 修飾リポソーム内に封入した抗原も濾胞樹状細胞に送達されるかについて検討した。PEG 修飾リポソーム内には、蛍光色素で標識した OVA を封入した。上記の結果と同様に、二回目投与 PEG 修飾リポソーム中の OVA は、濾胞樹状細胞により多く取り込まれていた。このことから、二回目投与 PEG 修飾リポソームは、内封した抗原も濾胞樹状細胞に効率的に送達できることが示唆された。

濾胞樹状細胞の役割は、抗原提示、胚中心形成の補助による免疫記憶への関与、ケモカイン分泌による B 細胞・T 細胞の濾胞への遊走誘導、B 細胞への生存シグナル伝達など様々である。現在ワクチン開発において、様々なタイプの樹状細胞を標的とした抗原送達システムの開発が行われているが、濾胞樹状細胞を標的とした抗原送達システムはほとんどない。そのため、PEG 修飾リポソームの二回目投与によって、濾胞樹状細胞に抗原を効率的に送達する本システムは新規のワクチン開発戦略になりうると考えられる。

(2) OVA 封入 PEG 修飾リポソーム投与による抗 OVA 抗体誘導に与える空の PEG 修飾リポソーム前投与の影響

抗原封入 PEG 修飾リポソームを濾胞樹状細胞に効率的に送達する本システムを用いることにより、抗原特異的抗体分泌が増強するか検討した。濾胞樹状細胞への PEG 修飾リポソームの送達を誘導するために、空の PEG 修飾リポソームを前投与した 3 日後に、OVA 封入 PEG 修飾リポソームを用いて一次免疫を行った。

遊離の OVA や OVA 封入 PEG 修飾リポソーム単独で免疫した場合、抗 OVA IgM (免疫 3 日後) および抗 OVA IgG (免疫 10 日後) はほとんど誘導されなかった。一方で、OVA 封

入 PEG 修飾リポソームによる免疫前に、空の PEG 修飾リポソームを前投与する事により、抗 OVA IgM および抗 OVA IgG が多量に誘導された。また強力なアジュバント活性を持つ事が知られているフロイント完全アジュバントと OVA を混合して皮下免疫した場合と抗 OVA IgG 誘導能を比較した。免疫 7 日後において、フロイント完全アジュバントを用いた場合では抗 OVA IgG が誘導されなかったが、本システムを用いた場合では抗 OVA IgG が誘導された。免疫 14 日後においては、本システムによる抗 OVA IgG 誘導能は、フロイント完全アジュバントを用いたものと同等であった。以上のことから、空の PEG 修飾リポソームを前投与し、OVA 封入 PEG 修飾リポソームの濾胞樹状細胞への送達を誘導することにより、OVA 封入 PEG 修飾リポソームによる抗体分泌を増強および早期化できることが明らかになった。

続いて一次免疫の 14 日後に OVA 封入 PEG 修飾リポソーム単独で二次免疫を行い、抗 OVA IgG 誘導の持続効果・誘導される IgG のサブクラスについて検討した。二次免疫を行うと抗 OVA IgG 分泌量はさらに増加し、一次免疫約 6 か月後まで IgG 分泌の持続が観察された。また抗 OVA IgG1・IgG2a・IgG2b の分泌量を測定したところ、いずれのサブクラスの IgG も誘導されていた。一般に IgG1 は体液性免疫誘導の指標に、IgG2a・IgG2b は細胞性免疫の指標に用いられている。このことから、空の PEG 修飾リポソームを前投与する本システムは、体液性免疫と細胞性免疫のいずれも誘導可能である可能性が高い事が示唆された。また用いる OVA 封入 PEG 修飾リポソームの粒子径の大きくすることにより、IgG2a・IgG2b の分泌量の増加が観察された。PEG 修飾リポソームの物性をさらに変化させることにより、細胞性免疫のさらなる増強も可能で、がんワクチンへの応用も期待できる。

(3) 空の PEG 修飾リポソームと OVA 封入 PEG 修飾リポソームによる免疫が他の免疫応答に与える影響

ワクチン開発においては、抗原特異的免疫反応を強力に誘導すること同時に、非特異的免疫反応を最小限にすることが重要と考えられる。フロイント完全アジュバントは様々な炎症性サイトカインを誘導して、投与部位の硬結、潰瘍形成などの副作用を引き起こすため、実験動物でしかアジュバントとして利用されていない。本システムにおいて、空の PEG 修飾リポソームの前投与により免疫刺激を行うが、その投与量は極めて微量であり、PEG 修飾リポソーム投与によって血中炎症性サイトカイン濃度が上昇しないことが既に報告されている。

また非特異的な免疫反応誘導の指標とし

て今回、OVA のキャリアであるリポソームに対する抗体誘導について検討した。抗 OVA 抗体の誘導とともに、リポソームの構成成分であるリン脂質 (HEPC) やコレステロールに対する抗体も誘導されたならば、自己免疫疾患につながる可能性が考えられる。しかしながら、本システムにおいて、空の PEG 修飾リポソーム前投与と OVA 封入 PEG 修飾リポソームによる免疫を行っても、HEPC やコレステロールに対する IgM、IgG は誘導されなかった。このことから、本システムはリポソーム内に封入した抗原特異的に免疫反応を誘導できる安全なキャリアである可能性が高いことが示唆された。

(4)OVA 封入 PEG 修飾リポソームの濾胞への送達阻害による抗 OVA IgG 誘導の変化

本システムにおいて、OVA 封入 PEG 修飾リポソームが濾胞に輸送されることが抗 OVA IgG 誘導に重要であることを確認するために、濾胞への輸送阻害実験を行った。輸送阻害には FTY720 を用いた。FTY720 は辺縁帯 B 細胞を辺縁帯から濾胞に強制的に遊走させ、濾胞に局在化させることが報告されている。そのため、予め FTY720 を投与することで、辺縁帯 B 細胞による OVA 封入 PEG 修飾リポソームの輸送を阻害すると考えられた。実際に、FTY720 の前処置により、PEG 修飾リポソームの濾胞への輸送阻害が確認された。そこで、空の PEG 修飾リポソームの投与 3 日後に、FTY720 を前処置し、OVA 封入 PEG 修飾リポソームを用いて免疫し、抗 OVA IgG 誘導能を評価した。その結果、FTY720 前処置をすることにより、抗 OVA IgG 誘導は有意に抑制された。このことから、本システムにおいて OVA 封入 PEG 修飾リポソームの濾胞への輸送誘導が抗体分泌増強に重要であることが示唆された。

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)

- ① Shimizu, T., Ishida, T., Kiwada, H., Transport of PEGylated liposomes from the splenic marginal zone to the follicle in the induction phase of the accelerated blood clearance phenomenon. Immunobiol., 218, 725-732 (2013) doi: 10.1016/j.imbio.2012.08.274. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 石田竜弘、PEG 修飾リポソームを用いた濾胞への高原送達による抗体誘導効果、

2013.3.30、日本薬学会第 133 年会、パシフィコ横浜 (横浜市)

- ② Ishida, T., Activation of splenic marginal zone B cell by PEGylated liposome with lower dose: triggering transport of antigen-containing second dose PEGylated liposome from marginal zone to follicle, 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2012.7.16, Centre des Congress de Quebec (カナダケベック)
- ③ 石田 竜弘、PEG 修飾リポソームと脾臓辺縁帯 B 細胞との相互作用に関する検討、2012.3.29、日本薬学会第 132 年会、北海道大学 (札幌市)
- ④ 石田 竜弘、腫瘍内微小環境の能動的制御に基づく siRNA デリバリー技術の開発とがん治療への展開、2012.3.30、日本薬学会第 132 年会、北海道大学 (札幌市)
- ⑤ 石田 竜弘、Anti-PEG IgM 分泌誘導において PEG 修飾剤末端構造が与える影響に関する検討、2011.11.13、第 50 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、サンポートホール高松 (高松市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 竜弘 (ISHIDA TATSUHIRO)
徳島大学・大学院ヘルスバイサイエンス研究部・准教授
研究者番号：50325271

(2) 研究分担者

際田 弘志 (KIWADA HIROSHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイサイエンス研究部・教授
研究者番号：50120184

(3) 連携研究者

なし