

称号及び氏名 博士（獣医学） 岡崎 誠治

学位授与の日付 平成30年3月31日

論文名 pH感受性リポソームを応用した腫瘍ワクチンの開発

論文審査委員 主査 渡来 仁
副査 杉浦 喜久弥
副査 笹井 和美

論文要旨

緒言

伴侶動物の医療では寿命の長期化に伴い腫瘍疾患が死亡原因の多くを占めるようになり問題となっている。現在、腫瘍疾患の治療法としては、主に外科療法、化学療法、放射線療法の3つを選択することができるが、治療効果に着目すると、局所のみで発症した場合など外科療法で完全に摘出可能である一部の症例を除いてその効果は十分ではなく、転移には十分に対応できていないのが現状である。さらに、局所の発症であっても外科的侵襲により身体の機能が欠如しやすい頭頸部腫瘍などの場合では外科療法も姑息的に留まることが多い。また、腫瘍の多くは化学療法や放射線療法などの他2つの治療法に感受性が低く、副作用も用量依存的に現れる。よって、これら治療法の大きな穴を埋めるべく、新たな選択肢として腫瘍免疫療法に大きな注目が集まっている。しかしながら、腫瘍免疫療法が顕著な効果を上げた例は少ない。その要因として腫瘍排除に働く免疫応答、特に細胞傷害性T細胞（CTL）を効率的に活性化できないことが考えられる。またさらに、抗原刺激を繰り返し受けることで疲弊したT細胞は、免疫抑制性の腫瘍微小環境内においてアポトーシス誘導され、このことが腫瘍免疫療法の効果を減弱する要因となっていることも示されている。

脂質二重層から成るリポソームは、その膜上に腫瘍や病原体などの種々な抗原決定基をもつ物質を再構成できるだけでなく、その内部には抗原物質を封入

することができる。このような抗原物質再構成リポソームや抗原封入リポソームは免疫担当細胞への抗原の提示をより有効なものとするように働く。さらに、種々の免疫賦活物質を加えることにより免疫効果をより高めることができ、最適なワクチンアジュバントとしての機能を示すことも明らかにされている。そういった中、近年、pH 感受性膜融合脂質であるサクシニル化ポリグリシドール (SucPG) を再構成させたリポソームが樹状細胞に対して指向性を持ち、樹状細胞のエンドソームに取り込まれた後、その内部の酸性環境に反応してエンドソーム膜と融合し、封入抗原を効率よく樹状細胞の細胞質内に導入できることが示された。さらにその結果として、Th1/Th2 免疫応答を誘導できることが明らかとなり、ワクチン抗原キャリアーとして pH 感受性膜融合脂質修飾リポソーム (pH 感受性リポソーム) が注目されている。

また近年、2 型糖尿病治療薬であるメトホルミンが、本来の治療効果に加えて、T 細胞の疲弊を低減させ、腫瘍浸潤後も T 細胞の機能を維持させる効果を持つことが示されている。

本研究では、小動物医療における腫瘍の予防・治療に効果的な新規のリポソーム腫瘍ワクチンの開発を目的として、樹状細胞への抗原運搬能に優れる pH 感受性リポソームに、抗腫瘍免疫応答を増強できる機能を持たせ、腫瘍ワクチン効果の強いワクチン用リポソームキャリアーを構築し、マウスにおいて誘導された免疫応答による腫瘍生着抑制効果について解析するとともに、モデル抗原および自家腫瘍抗原を用いて腫瘍生着マウスに対する治療効果について調べ、腫瘍ワクチンとしての評価を試みた。また、免疫抑制状態を解除しさらに腫瘍ワクチンによる治療効果を高めるべく、自家腫瘍ワクチンとメトホルミンとの併用療法を行い、その相乗効果とメカニズムを解析した。

第 1 章 pH 感受性リポソームを応用したワクチン用リポソームキャリアーへの α -ガラクトシルセラミド (α -Gal) 修飾量の検討

腫瘍細胞を排除するには、特定の抗原を対象としない NK 細胞や NKT 細胞を中心とした自然免疫と、特定の抗原を標的にした CTL を中心とした獲得免疫 (Th1 免疫応答) の両方を活性化することが重要である。特に α -ガラクトシルセラミド (α -Gal) は、NKT 細胞を活性化できることから、Th1 免疫応答を誘導できる pH 感受性リポソームに腫瘍抗原と同時に α -Gal を再構成させることにより効果的に抗腫瘍免疫応答を増強できることが期待できる。本章では、ワクチン用リポソームキャリアーの最適化を図るために、モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) を、アジュバントとして α -Gal を使用し、 α -Gal をマウス 1 匹当たり 2.5 μ g あるいは 5.0 μ g に成るように修飾した OVA 封入 pH 感受性リポソームワクチンをマウスに対して皮下投与し、誘導される免疫応答について解析した。リポソームワクチン 1 回投与後 2 週目のマウス血清抗 OVA-IgG 抗体価を比較した結果、 α -Gal 5.0 μ g 修飾 OVA 封入 pH 感受性リポソームワクチン投与群 (α -Gal 5.0 群) は、 α -Gal 2.5 μ g 修飾 OVA 封入 pH 感受性リポソームワクチン投与群 (α -Gal 2.5 群) および α -Gal 非修飾 OVA 封入 pH 感受性リポソームワク

チン投与群 (α -Gal 0 群) に対して有意に高い抗体価を示した。ワクチン 2 回投与後 2 週目においては全ての群において抗体価の上昇が認められたが、ワクチン 3 回投与後 2 週目においては、いずれの群も抗体価のさらなる上昇は認められなかった。また、ワクチン 3 回投与後 2 週目の血清を用いて抗 OVA-IgG サブクラスの解析を行った結果、全ての群で Th2 タイプのサブクラスである IgG1 抗体のみならず、Th1 タイプのサブクラスである IgG2a 抗体の誘導が確認された。特に α -Gal 5.0 群においては、血清抗 OVA-IgG2a 抗体価の高い傾向が示された。さらに、免疫マウス由来の脾臓細胞を用いて、サイトカイン (IFN- γ および IL-4) 産生について解析を行った結果、 α -Gal 0 群、 α -Gal 2.5 群に比較して、 α -Gal 5.0 群において高い IFN- γ および IL-4 の産生が確認された。以上の結果から、 α -Gal 5.0 μ g 修飾 pH 感受性リポソームは、1 回の皮下投与で速やかかつ強力な免疫応答の誘導が可能であり、また、抗腫瘍免疫において特に重要である Th1 タイプの免疫応答を強く誘導できることから、ワクチン用リポソームキャリアーとして有望であることが示された。

第 2 章 腫瘍抗原を封入した α -Gal 修飾 pH 感受性リポソームワクチン (腫瘍ワクチン) による抗腫瘍効果の解析

第 1 章でワクチン用リポソームキャリアーとして α -Gal 5.0 μ g 修飾 pH 感受性リポソーム (以下、 α -Gal 修飾 pH 感受性リポソーム) が有望であることが示されたことから、本章においては、腫瘍関連抗原のモデルとして OVA、標的細胞として OVA を腫瘍抗原として発現している C57BL/6 マウス由来胸腺リンパ腫細胞株である E.G.7-OVA 細胞を用い、 α -Gal 修飾 OVA 封入 pH 感受性リポソームワクチン (腫瘍ワクチン) の抗腫瘍効果について解析した。まず、抗腫瘍免疫応答の誘導を明らかにするために、腫瘍ワクチンを 2 回皮下投与した C57BL/6 マウスの脾臓細胞を用いて腫瘍排除に働く CTL 活性について E.G7-OVA 細胞を標的に調べた。その結果、 α -Gal 非修飾 OVA 封入 pH 感受性リポソーム投与群 (Liposome 群) 由来脾臓細胞では、OVA 単独投与群 (OVA 群) 由来の脾臓細胞に比べ、E.G7-OVA 細胞に対して高い CTL 活性を示したが、腫瘍ワクチン投与群 (α -Gal Liposome 群) 由来の脾臓細胞では、OVA 群ならびに Liposome 群由来の脾臓細胞よりも E.G7-OVA 細胞に対して有意に高い CTL 活性の誘導を認めた。次に、腫瘍ワクチン投与による腫瘍細胞 (E.G7-OVA 細胞) の生着・増殖抑制効果 (予防効果) について解析した。腫瘍細胞の生着・増殖抑制効果は、OVA 群、Liposome 群ならびに α -Gal Liposome 群の 3 群の C57BL/6 マウス皮下に E.G7-OVA 細胞を移植し、その後の腫瘍細胞の生着・増殖を観察した。その結果、OVA 群と比較して Liposome 群および α -Gal Liposome 群において強い腫瘍細胞の生着・増殖抑制効果が認められた。さらに、生着腫瘍細胞に対する腫瘍ワクチン投与による増殖抑制効果 (治療効果) について解析した。C57BL/6 マウスに E.G7-OVA 細胞を移植し、肉眼的に腫瘍の生着が認められた時点で腫瘍ワクチンの投与を開始し、その後の生着腫瘍細胞の増殖を観察した。OVA 群では腫瘍細胞の増殖抑制効果が全く認められなかったものの、Liposome 群では弱いな

がらも OVA 群に比べ有意な腫瘍の増殖抑制効果が認められた。一方、腫瘍ワクチン投与群 (α -Gal Liposome 群) では全ての個体において腫瘍細胞の著しい増殖抑制と退縮が認められ、他群に比べ有意な生存延長効果も確認された。これらの結果から、 α -Gal 修飾 pH 感受性リポソームを応用した腫瘍ワクチンは、腫瘍の再発予防・治療に対する効果を示す可能性が明らかにされた。

第 3 章 腫瘍細胞破碎抗原を封入した α -Gal 修飾 pH 感受性リポソームワクチン (自家腫瘍ワクチン) による抗腫瘍効果の解析

第 2 章において、 α -Gal 修飾 pH 感受性リポソームを応用した腫瘍ワクチンが、腫瘍の再発予防・治療に対して有効性を示す可能性が明らかにされたことから、本章では小動物医療における腫瘍ワクチンへの α -Gal 修飾 pH 感受性リポソームの応用を図るために、腫瘍細胞破碎抗原封入した α -Gal 修飾 pH 感受性リポソームワクチン (自家腫瘍ワクチン) 開発の可能性を検討した。腫瘍細胞破碎抗原の調整は、培養した E.G7-OVA 細胞を超音波破碎し、腫瘍細胞破碎抗原とした。腫瘍細胞破碎抗原を α -Gal 修飾 pH 感受性リポソームに封入したものを自家腫瘍ワクチンとして、その抗腫瘍効果について解析した。まず、自家腫瘍ワクチンを C57BL/6 マウスに 3 回皮下投与した後、腫瘍細胞に対する免疫応答 (血清抗腫瘍抗体) の誘導について蛍光抗体法と凝集反応で解析した。その結果、腫瘍細胞破碎抗原を封入した自家腫瘍ワクチン投与マウス由来血清は、E.G7-OVA 細胞に対して蛍光抗体法ならびに凝集反応のいずれにおいても陽性反応を示し、腫瘍細胞破碎抗原封入自家腫瘍ワクチン投与により腫瘍細胞に対する免疫応答の誘導が確認された。次に、自家腫瘍ワクチン投与による腫瘍細胞の生着・増殖抑制効果 (予防効果) について解析した。腫瘍の生着・増殖抑制効果は、PBS 投与群 (PBS 群)、腫瘍細胞破碎抗原単独投与群 (Lysate 群) ならびに自家腫瘍ワクチン投与群 (α -Gal Lysate Liposome 群) の 3 群の C57BL/6 マウス皮下に E.G7-OVA 細胞を移植し、その後の腫瘍細胞の生着・増殖を観察した。その結果、Lysate 群および α -Gal Lysate Liposome 群は、PBS 群と比較して腫瘍細胞の生着およびその後の増殖を有意に抑制した。また、 α -Gal Lysate Liposome 群においては、Lysate 群と比べても強い腫瘍の生着・増殖抑制効果を認め、顕著な腫瘍の増大は確認されなかった。さらに、生着腫瘍細胞に対する自家腫瘍ワクチン投与による増殖抑制効果 (治療効果) について解析した。C57BL/6 マウスに E.G7-OVA 細胞を移植し、腫瘍塊が十分に増大した時点で摘出し、摘出した腫瘍塊から自家腫瘍ワクチン用腫瘍細胞破碎抗原と移植用腫瘍細胞を得た。PBS 群、Lysate 群ならびに α -Gal Lysate Liposome 群の 3 群に分けた C57BL/6 マウスの皮下に移植用腫瘍細胞を移植し、腫瘍の生着が認められた時点で腫瘍塊から調整された腫瘍細胞破碎抗原を封入した自家腫瘍ワクチンの投与を開始し、その後の生着腫瘍の増殖を観察した。その結果、 α -Gal Liposome 群では PBS 群、Lysate 群と比較して、腫瘍の増殖に対する強い抑制効果を認めるとともに有意な生存延長効果が確認された。これらの結果から、腫瘍細胞破碎抗原封入した α -Gal

修飾 pH 感受性リポソームワクチンは、腫瘍の再発予防・治療に対する効果を示すことが明らかとなり、自家腫瘍ワクチン開発の可能性が示された。

第 4 章 メトホルミン併用による自家腫瘍ワクチンの抗腫瘍効果の解析

第 3 章において、 α -Gal 修飾 pH 感受性リポソームを応用した自家腫瘍ワクチンが、腫瘍の再発予防・治療に対して有効性を示す可能性が明らかにされた。しかしながら、腫瘍特異的な免疫を誘導できているにも関わらず、十分な治療効果を上げることはできなかった。この結果は、腫瘍微小環境における免疫抑制状態が関わっている可能性があるものと考えられたことから、本章では、自家腫瘍ワクチンに腫瘍微小環境における免疫抑制状態の改善効果が報告されているメトホルミンを併用投与することで、生着腫瘍細胞に対するさらなる相乗的腫瘍増殖抑制効果（治療効果）について解析し、自家腫瘍ワクチンの併用療法としてのメトホルミンの可能性について検討した。第 3 章と同様に、C57BL/6 マウスに E.G7-OVA 細胞を移植し、腫瘍塊が十分に増大した時点で摘出し、摘出した腫瘍塊から自家腫瘍ワクチン用腫瘍細胞破碎抗原と自家腫瘍細胞を得た。まず、メトホルミン投与による腫瘍浸潤細胞の免疫チェックポイント分子 (PD-1 分子) 発現への影響を調べるために、C57BL/6 マウスを PBS 投与群 (PBS 群)、メトホルミン単独投与群 (PBS-Met 群)、自家腫瘍ワクチンとメトホルミン併用投与群 (α -Gal Lysate Liposome-Met 群) の 3 群に分け、各群のマウスの皮下に自家腫瘍細胞を移植した。その後、自家腫瘍ワクチンの投与と同時にメトホルミンの投与も開始し、腫瘍浸潤 CD8 陽性細胞の PD-1 分子発現への影響をフローサイトメトリー法によって解析した。その結果、PBS-Met 群および α -Gal Lysate Liposome-Met 群では、生着した腫瘍塊に浸潤している CD8 陽性細胞の PD-1 分子の発現が低下していることが示された。そこでさらに、PBS 投与群 (PBS 群)、メトホルミン単独投与群 (PBS-Met 群)、自家腫瘍ワクチン単独投与群 (α -Gal Lysate Liposome 群)、自家腫瘍ワクチンとメトホルミン併用投与群 (α -Gal Lysate Liposome-Met 群) の 4 群に分けた C57BL/6 マウスの皮下に自家腫瘍を移植し、メトホルミンとの併用による自家腫瘍ワクチンの腫瘍治療効果について解析した。その結果、メトホルミンと併用した α -Gal Lysate Liposome-Met 群では PBS 群、PBS-Met 群、 α -Gal Lysate Liposome 群と比較して、腫瘍の増殖が強く抑制されるとともに、有意な生存延長効果が確認された。これらの結果から、メトホルミンは腫瘍微小環境における免疫抑制状態を解除でき、腫瘍細胞破碎抗原封入した α -Gal 修飾 pH 感受性リポソームワクチンとの併用により、ワクチンの腫瘍治療効果を高められることが示された。

総括

本研究では、pH 感受性リポソームを応用した小動物医療における腫瘍の予防・治療に効果的な新規の腫瘍ワクチン開発を目指す上で重要と考えられる以下の結果を得た。

1. アジュバントとして α -Gal をマウス 1 匹当たり 5.0 μ g を修飾した pH 感受性リポソームワクチンは、速やかな免疫応答の誘導が可能であるとともに、抗腫瘍免疫において特に重要である Th1 タイプの免疫応答を強く誘導できることが示された。
2. 腫瘍モデル抗原 (OVA) を封入した α -Gal 修飾 pH 感受性リポソームワクチンの投与により、OVA 発現腫瘍細胞 (E. G7-OVA 細胞) に対して高い CTL 活性を誘導できることが確認された。
3. 腫瘍モデル抗原 (OVA) を封入した α -Gal 修飾 pH 感受性リポソームワクチン (腫瘍ワクチン) は、腫瘍の再発予防・治療に対する効果を示した。
4. 腫瘍細胞破碎抗原を封入した α -Gal 修飾 pH 感受性リポソームワクチン (自家腫瘍ワクチン) 投与により、腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導できることが確認された。
5. 腫瘍細胞破碎抗原を封入した α -Gal 修飾 pH 感受性リポソームワクチン (自家腫瘍ワクチン) は、腫瘍の再発予防・治療に対する効果を示した。
6. 自家腫瘍ワクチンとメトホルミンの併用により、腫瘍微小環境における免疫抑制状態を解除できる可能性が示され、自家腫瘍ワクチンの治療効果が増強されることが示された。

審査結果の要旨

小動物医療では寿命の長期化に伴い腫瘍疾患が死亡原因の多くを占めるようになり問題となっている。現在その治療法として、主に外科療法、化学療法、放射線療法の3つが有るが、治療効果に着目すると、いずれの治療法においてもその効果は十分ではない。そのため、新たな治療法として腫瘍ワクチンを含めた腫瘍免疫療法が注目されている。しかしながら、腫瘍免疫療法が顕著な効果を上げた例は少ない。その要因として腫瘍排除に働く免疫応答、特に細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を効率的に活性化できないことや、腫瘍微小環境内における免疫抑制状態が上げられている。そのため、これら要因の克服が求められている。

腫瘍免疫応答を誘導するためには、投与した腫瘍ワクチン抗原を樹状細胞に効率よく送達させる必要がある。近年、樹状細胞へのワクチン抗原送達システムとして pH 感受性膜融合脂質 (サクシニル化ポリグリシドール (SucPG)) を修飾したリポソームが注目されているが、小動物領域への応用研究はない。本研究では、小動物医療における腫瘍の予防・治療に効果的な新規のリポソーム腫瘍ワクチンの開発を目的として、pH 感受性リポソームに、抗腫瘍免疫応答を増強できる機能を持たせ、モデル腫瘍抗原および自家腫瘍抗原を用いて腫瘍

生着マウスに対する腫瘍ワクチンとしての予防・治療効果について調べるとともに、免疫抑制状態の緩和効果が報告されているメトホルミンとの併用による自家腫瘍ワクチンの治療効果増強の可能性について評価を行い、以下の結果を得た。

第1章では、pH感受性リポソームを応用したワクチン用リポソームキャリアーへのアジュバントとしての α -ガラクトシルセラミド(α -Gal)修飾量を検討するために、モデル抗原として卵白アルブミン(OVA)を使用し、 α -Galの修飾量を変えたOVA封入pH感受性リポソームワクチンをマウスに皮下投与し、誘導される免疫応答について解析した。その結果、 α -Gal 5.0 μ g修飾pH感受性リポソームが、他の α -Gal修飾pH感受性リポソームに比べ、1回の皮下投与で速やかかつ強力な免疫応答の誘導が可能であること、また、抗腫瘍免疫において特に重要であるTh1タイプの免疫応答を強く誘導できることが明らかにされ、腫瘍ワクチン用リポソームキャリアーとして有望であることが示された。

第2章では、第1章の結果を受け、腫瘍モデル抗原としてOVA、標的腫瘍細胞としてOVAを腫瘍抗原として発現しているE.G.7-OVA細胞を用い、OVAを封入した α -Gal修飾pH感受性リポソーム腫瘍ワクチンの抗腫瘍効果について解析した。まず、抗腫瘍免疫応答の誘導を明らかにするために、腫瘍ワクチンを2回皮下投与したC57BL/6マウスの脾臓細胞を用いて腫瘍排除に働くCTL活性についてE.G7-OVA細胞を標的に調べた。その結果、腫瘍ワクチン投与群由来マウスの脾臓細胞は、E.G7-OVA細胞に対して有意に高いCTL活性の誘導を認めた。次に、腫瘍ワクチン投与による腫瘍細胞の生着・増殖抑制効果(予防効果)ならびに生着腫瘍細胞に対する腫瘍ワクチン投与による腫瘍の増殖抑制効果(治療効果)について解析した。その結果、腫瘍ワクチン投与により腫瘍細胞の生着・増殖が強く抑制されること、さらに、生着腫瘍細胞に対しても、腫瘍ワクチン投与により生着腫瘍細胞の著しい増殖抑制と退縮、腫瘍ワクチン投与マウスの有意な生存延長効果が確認され、 α -Gal修飾pH感受性リポソームを応用した腫瘍ワクチンは、腫瘍の再発予防・治療に対する効果を示す可能性が明らかにされた。

第3章では、第2章において、腫瘍モデル抗原を封入した α -Gal修飾pH感受性リポソーム腫瘍ワクチンが、腫瘍の再発予防・治療に対して有効性を示す可能性が明らかにされたことから、小動物医療における腫瘍ワクチンへの本リポソームの応用を図るために、E.G7-OVA腫瘍細胞破碎抗原封入した α -Gal修飾pH感受性リポソームワクチン(自家腫瘍ワクチン)の抗腫瘍効果について解析した。まず、自家腫瘍ワクチン投与による腫瘍細胞の生着・増殖抑制効果(予防効果)について解析した結果、自家腫瘍ワクチン投与により腫瘍細胞の生着とその後の腫瘍の増殖が有意に抑制され、顕著な腫瘍の増大は確認されなかった。また、生着した腫瘍細胞に対する自家腫瘍ワクチン投与による腫瘍の増殖抑制効果(治療効果)について解析した結果、自家腫瘍ワクチン投与マウスにおいては、腫瘍の増殖が強く抑制され、有意な生存延長効果が確認された。これらの結果から、腫瘍細胞破碎抗原を封入した α -Gal修飾pH感受性リポソームワク

チンは、腫瘍の再発予防・治療に対する効果を示すことが明らかとなり、自家腫瘍ワクチン開発の可能性が示された。

第4章では、腫瘍微小環境における免疫抑制状態の改善効果が報告されているメトホルミンを自家腫瘍ワクチンとともに併用投与することで、自家腫瘍ワクチンによる生着腫瘍細胞に対する治療効果が高められるのかについて解析し、自家腫瘍ワクチンの併用療法としてのメトホルミンの可能性について検討した。まず、メトホルミン投与による腫瘍浸潤細胞の免疫チェックポイント分子 (PD-1 分子) 発現への影響を調べた結果、生着した腫瘍塊に浸潤している CD8 陽性細胞の PD-1 分子の発現が低下していることが示された。そこでさらに、メトホルミンとの併用による自家腫瘍ワクチンの腫瘍治療効果について解析した結果、自家腫瘍ワクチンとメトホルミン併用投与されたマウスにおいては、生着腫瘍の増殖が強く抑制され、有意な生存延長効果が確認された。これらの結果から、メトホルミンは腫瘍微小環境における免疫抑制状態を緩和でき、腫瘍細胞破碎抗原封入した自家腫瘍ワクチンとの併用により、自家腫瘍ワクチンの腫瘍治療効果を高められることが示された。

本研究では、SucPG 修飾リポソーム (pH 感受性リポソーム) にアジュバントとして α -Gal を修飾することで、抗腫瘍免疫応答を増強できる腫瘍ワクチン用キャリアーとして機能すること、また、本腫瘍ワクチン用キャリアーにモデル腫瘍抗原あるいは自家腫瘍抗原を封入した腫瘍ワクチンが、腫瘍の予防・治療効果を示すこと、さらに、免疫抑制状態の緩和効果が報告されているメトホルミンとの併用により腫瘍ワクチンの治療効果を増強できることが示され、小動物医療における腫瘍の予防・治療に効果的な pH 感受性リポソームを応用した新規のリポソーム腫瘍ワクチン開発の可能性を明らかにした。これらの研究成果は、臨床獣医学、免疫学の研究分野に大きく貢献し、新たな展開に資するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。