

称号及び氏名 博士（工学） 柳原 慎

学位授与の日付 2024年3月31日

論文名 「pH 応答性  $\beta$  グルカン誘導体修飾リポソームを用いる  
免疫誘導のための抗原運搬体の設計」

論文審査委員 主査 原田 敦史  
副査 椎木 弘  
副査 八木 繁幸  
副査 弓場 英司

## 論文要旨

2019年から流行した新型コロナウイルス感染症においては、mRNA ワクチンが緊急使用許可を承認され、ワクチン接種によりウイルスに対する免疫反応を高めることで感染・重症化の予防が図られてきた。mRNA ワクチン以外にも、組み換えタンパク質ワクチンは、高い安全性と有効性、比較的安価に製造可能なため、従来からワクチン開発の中心として研究が進められてきた。mRNA は内因性酵素により分解され、タンパク質はそれ自体では免疫原性に乏しいため、効果的なワクチン開発には、運搬体（キャリア）に mRNA や抗原タンパク質を安定に担持させ、免疫担当細胞への効果的な送達や、免疫担当細胞を活性化させる免疫賦活作用（アジュバント作用）といった、多様な機能を組み込むことが求められる。

脂質二分子膜からなる閉鎖小胞体であるリポソームは、内水相に水溶性分子を封入可能で、脂質膜内部に疎水性化合物を包埋できるため、タンパク質やアジュバントを組み込んだ抗原キャリアとして利用されてきた。リポソーム膜表面には、分子間相互作用や化学結合を介して機能性分子の修飾が可能であるため、リポソームは抗原キャリアに求められる多様な機能を組み込むためのプラットフォームとして有用である。

樹状細胞（DC）などの抗原提示細胞に取り込まれた抗原は、リポソーム内で分解・抗原提示され、抗体などの液性因子の分泌を促進する液性免疫が誘導される。一方で抗原が細胞質へ送達され、分解・抗原提示されると、細胞傷害性 T 細胞（CTL）が抗原特異的に異常細胞を攻撃する細

胞性免疫が誘導される。細胞性免疫の誘導を目的として、エンドソーム内の弱酸性 pH に応答して脂質膜を不安定化する作用をもつ機能性高分子をリポソームに表面修飾したリポソーム型抗原キャリアが開発されている。機能性高分子の主鎖にはポリグリシドール、多糖など様々な高分子を用いることが可能である。特に、抗原提示細胞の表面受容体 Dectin-1 に認識される  $\beta$  グルカンの一種であるカードランを主鎖とした場合、高いアジュバント作用が確認され、モデル抗原タンパク質（卵白アルブミン、OVA）を特異的に認識する CTL が誘導されることによって腫瘍成長抑制効果が示されている。このように、機能性高分子として多糖主鎖の利用が重要であることが明らかとなったが、より効果的な免疫誘導を実現するために、 $\beta$  グルカン構造のさらなる最適化が課題として残されている。

従来の pH 応答性高分子修飾リポソームには、100-200 nm 程度のサイズをもつリポソームが用いられてきた。しかし、抗原キャリアのサイズは、免疫細胞との相互作用、細胞活性化、体内動態に大きく影響するため、適切なリポソームサイズを選択することは、リポソーム型抗原キャリアの免疫治療効果を最大化させるために重要である。

本論文では、pH 応答性  $\beta$  グルカン誘導体修飾リポソームの構成成分や粒子サイズを変化させ、それらの免疫応答を調べることで、より効果的な免疫誘導を実現できる抗原キャリア作製のための知見を得ることを目的とした。まず、リポソームに表面修飾する pH 応答性  $\beta$  グルカン誘導体の主鎖構造の違いによる免疫反応への影響を調査し、免疫誘導に有効な  $\beta$  グルカン主鎖構造を明らかにすることを目指した。さらに、pH 応答性  $\beta$  グルカン誘導体修飾リポソームのサイズが、その pH 応答性や免疫誘導に及ぼす影響を検討することで、液性免疫や細胞性免疫を誘導するために効果的なリポソームのサイズを明らかにすることを目指した。

本論文は以下の 4 章から構成される。

第 1 章は本論文の序論として、研究背景と目的および本論文の概要について述べた。

第 2 章では、分岐型  $\beta$  グルカンであるアクア  $\beta$  ((1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -グルカン) と、従来使用されてきた直鎖型  $\beta$  グルカンのカードラン ((1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -グルカン) に pH 応答性官能基とリポソームへのアンカー基を導入した  $\beta$  グルカン誘導体を合成し、これらを修飾したリポソームの抗原キャリアとしての機能を検討した。アンカー基を結合した 3-メチルグルタル化アクア  $\beta$  (M $\beta$ l $\beta$ -Aqua  $\beta$ -A) と 3-メチルグルタル化カードラン (M $\beta$ l $\beta$ -Curd-A) を合成し、これらを表面修飾したリポソームを、エクストルージョンによって 100-200 nm の粒子サイズに調節した。各リポソームは、生理的 pH では内包物を安定に保持したが、弱酸性環境下で速やかに内包物を放出した。これはリポソーム上の  $\beta$  グルカン誘導体のカルボキシ基がプロトン化されることで疎水化し、リポソーム膜を不安定化したことを示している。リポソームへの  $\beta$  グルカン誘導体の修飾量をフェノーラー硫酸法を用いて測定すると、M $\beta$ l $\beta$ -Aqua  $\beta$ -A は、M $\beta$ l $\beta$ -Curd-A よりもリポソーム表面へ効率よく修飾されることがわかった。また、リポソームへの  $\beta$  グルカン誘導体の修飾量を揃えた条件で、リポソーム処理したマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞からのサイトカイン産生量を比較すると、M $\beta$ l $\beta$ -Aqua  $\beta$ -A 修飾リポソームは M $\beta$ l $\beta$ -Curd-A 修飾リポソームに比べて細胞からのサイトカイン産生量を増加させ、より強いアジュバント作用を有することがわかった。OVA を封入したそれぞれのリポソームを、OVA を抗原として発現する T リンパ腫、E.G7-OVA 細胞を播種して作製した担がんマウスに皮下投与すると、M $\beta$ l $\beta$ -Aqua  $\beta$ -A 修飾リポソームは、M $\beta$ l $\beta$ -Curd-A 修飾リポソームよりも腫瘍成長を抑制し、マウス生存期間を延長させた。腫瘍内の免疫細胞を解析したところ、M $\beta$ l $\beta$ -Aqua  $\beta$ -A 修飾リポソームを投与した場合に、腫瘍内の CTL、炎症誘導型マクロファージの顕著な増加が認められ、これらの細胞を中心として誘導された細胞性免疫によって、高い抗腫瘍効果が得られたと考えられた。以上のことから、分岐構造をもつ  $\beta$  グルカンを pH 応答性  $\beta$  グルカン誘導体の主鎖として利用することが、がん免疫を活性化させて治療効果を高めるために有用であることが示された。

第 3 章では、pH 応答性  $\beta$  グルカン誘導体修飾リポソームの粒子サイズが免疫反応に及ぼす影響を検討した。第 2 章で高い抗腫瘍効果を示した M $\beta$ l $\beta$ -Aqua  $\beta$ -A を pH 応答性  $\beta$  グルカン誘導体として使用し、200, 400, 1000 nm の孔径をもつポリカーボネート膜を用いてエクストルージ

ョンすることで、それぞれ 100-200, 300-400, 590-760 nm の異なるサイズのリポソームを調製した。高い安定性の抗原キャリアを得るために、リポソーム膜の安定性を高めることが知られているコレステロール (Chol) を卵黄ホスファチジルコリン (EYPC) リポソームに、20%もしくは50%のモル比率で組み込んだところ、Chol 導入によって、リポソームのサイズが長期間安定に維持されることがわかった。より安定なリポソーム抗原キャリアを得るために、EYPC を飽和リン脂質のジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) に置き換えてリポソームを作製したところ、生理的 pH におけるリポソームからの内包物漏出がほぼ完全に抑制され、リポソームの安定性が高まった。しかし、50%のモル比で Chol を導入した EYPC リポソーム、DPPC リポソームは、20%のモル比で Chol を導入した EYPC リポソームと比較して、弱酸性環境におけるリポソームからの内包物放出が抑制された。20%のモル比で Chol を導入した EYPC リポソームを用いて、pH 応答性に及ぼすリポソームサイズの影響を確認したところ、リポソームサイズが小さいほど放出率が増大したことから、 $\beta$  グルカン誘導体が酸性 pH で疎水化した際、リポソームサイズが小さい方がより効果的に脂質膜の不安定化をもたらすことがわかった。DC やマクロファージは数  $\mu$  m の死細胞を貪食して免疫応答を誘導することが知られている。そこで、より大きなサイズのリポソームを免疫誘導機能の比較に用いるため、エクストルージョンによるサイズ制御を行わずにリポソームを調製することで、1000 nm 以上のサイズをもつリポソームを得た。1000 nm 以上もしくは 590-760 nm の比較的大きいサイズをもつリポソームは、300-400 nm もしくは 100-200 nm の小さいサイズのリポソームに比べ、マウス樹状細胞株により効果的に取り込まれるとともに、細胞からの炎症性サイトカイン産生を促進した。OVA を封入した各サイズのリポソームを E.G7-OVA 細胞を接種した担がんマウスに皮下投与すると、いずれのリポソームも腫瘍成長を抑制した。中でも、100-200 nm のリポソームを投与したマウスのうち 60%は腫瘍が完全に消失し、生存期間が延長された。これは第 2 章において 100-200 nm の MGLu-Aqua  $\beta$ -A 修飾 EYPC リポソームが高い抗腫瘍効果を示したことと同様であり、このサイズ範囲のリポソームを用いることで細胞性免疫を強力に誘導できることがわかった。1000 nm 以上のリポソームと 100-200 nm のリポソームを皮下投与したマウスの血中における OVA 特異的な抗体価を測定したところ、1000 nm 以上のリポソームは 100-200 nm のリポソームに比べて高い量の抗体産生を誘導し、2 ヶ月にわたり抗体価が増加し続けたことから、大きなサイズをもつリポソームは液性免疫を長期間誘導するのに適していることがわかった。以上のように、リポソームの長期安定性を確保しつつ、 $\beta$  グルカン誘導体による pH 応答特性を与えるには、EYPC のような不飽和リン脂質とコレステロールを適切な混合比で用いることが有効であることがわかった。さらに、同じ pH 応答性  $\beta$  グルカン誘導体を修飾したリポソームでも、その粒子サイズによって、pH 応答によるリポソームの不安定化能、誘導される液性免疫・細胞性免疫の程度・期間が異なることがわかった。免疫誘導のための抗原キャリアとして、がん細胞やウイルス感染細胞の除去のために細胞性免疫の誘導が求められる治療ワクチンには小さなサイズのリポソームを使用し、細菌やウイルス感染に対抗するために長期間にわたって抗体産生が求められる予防ワクチンには大きなサイズのリポソームを使用するなど、対象疾患に応じて適切なリポソームサイズを選択することで、必要な免疫反応を誘導可能であることが示唆された。

第 4 章では、第 2 章と第 3 章で得られた知見を総括した。

## 審査結果の要旨

本論文は、免疫治療において効果的な免疫誘導を実現できる抗原キャリア作製のための知見を得ることを目的として、pH 応答性 $\beta$  グルカン誘導体修飾リポソームの pH 応答性 $\beta$  グルカン誘導体の主鎖構造及びリポソームのサイズが免疫誘導及ぼす影響に関する研究成果をまとめたものであり、次のような成果を得ている。

(1) 分岐型 $\beta$  グルカンであるアクア $\beta$  と、従来使用されてきた直鎖型 $\beta$  グルカンであるカードランに pH 応答性官能基とリポソームへのアンカー基を導入した $\beta$  グルカン誘導体(MGlu-Aqua $\beta$ -A 及び MGlu-Curd-A) を合成し、これらを修飾したリポソームの抗原キャリアとしての機能を検討した結果、MGlu-Aqua $\beta$ -A は、MGlu-Curd-A よりもリポソーム表面へ効率よく修飾され、リポソーム処理したマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞からのより多くのサイトカインを産生することが確認された。抗原たんぱく質 (OVA) を封入したリポソームを担がんマウスに皮下投与すると、MGlu-Aqua $\beta$ -A 修飾リポソームは、MGlu-Curd-A 修飾リポソームよりも腫瘍成長を抑制し、マウス生存期間を延長させることが確認された。さらに、腫瘍内の免疫細胞を解析した結果、MGlu-Aqua $\beta$ -A 修飾リポソームを投与した場合、細胞性免疫による高い抗腫瘍効果を示すことを明らかとした。

(2) pH 応答性 $\beta$  グルカン誘導体修飾リポソームの粒子サイズが免疫反応に及ぼす影響を検討するために 100-200, 300-400, 590-760 nm の異なるサイズのリポソームが調製された。これらサイズの異なるリポソームは細胞取込に違いがあり、比較的大きいサイズのリポソームは、小さいサイズのリポソームに比べ、マウス樹状細胞株により効果的に取り込まれるとともに、細胞からの炎症性サイトカイン産生を促進することを確認した。また、担がんマウスに皮下投与した場合、いずれのリポソームも腫瘍成長を抑制したが、中でも、100-200 nm のリポソームを投与したマウスのうち 60%は腫瘍が完全に消失し生存期間が延長されることを確認した。

以上の諸成果は、効果的な免疫誘導を誘導するためのキャリア設計における重要な知見を与えるものであり、医療科学分野における学術的・技術的な発展に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と知識を有することを証したものである。学位論文審査委員会は、本論文の審査および最終試験の結果から、博士(工学)の学位を授与することを適当と認める。