

称号及び氏名 博士（工学） 能崎 優太

学位授与の日付 平成 29 年 3 月 31 日

論 文 名 「Rational Design of Liposome-Based Immunity-Inducing System  
for Cancer Immunotherapy  
(がん免疫治療のためのリポソームを基礎とした免疫誘導システムの  
合理的デザイン)」

論文審査委員 主査 八木 繁幸  
副査 松本 章一  
副査 久本 秀明  
副査 原田 敦史

## 論文要旨

がん免疫療法とは、免疫系にがん細胞を異物として認識させ、排除する治療法である。一般に、がん細胞は遺伝子変異が細胞に蓄積することで発生し、正常な細胞には存在しないタンパク質(がん抗原)を発現していることが知られている。一方免疫は、異物を排除するために生体が本来有している防御機構である。免疫の持つ重要な特徴として、抗原-抗体反応に代表される高い特異性が挙げられる。したがって、がん免疫療法は、正常細胞にはダメージを与えることなく、がん細胞のみを排除することが可能であり、副作用を低減して患者の生活の質を維持しながら高いがん治療効果を実現できると期待されている。

近年、最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞 (Dendritic cell, DC) を用いた免疫療法が注目されている。DCは、次に示す2種類の免疫の開始・誘導に重要な役割を果たしている。がん細胞やウイルス感染細胞などの異常細胞を排除する細胞性免疫では、DCの細胞質に存在する抗原がDCの主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I に提示された結果、細胞傷害性 T 細胞(CTL)が誘導される。一方、抗体産生により異物を排除する機構である液性免疫では、外来性抗原が DC の食作用によって取り込まれた後、エンドソーム系で分解され、DC の MHC クラスIIに提示された結果、ヘルパーT 細胞が誘導される。がん細胞のような異常細胞を認識して直接排除できるのは細胞性免疫であるため、がん免疫療法を成功させるためには、DC の細胞質に抗原を送達し、CTL を中心とした細胞性免疫を誘導することが重要である。すなわち、細胞性免疫を誘導するために、外来性抗原を細胞質に運搬するためのキャリア開発が必要不可欠である。

リポソームはリン脂質二重層で構成される閉鎖小胞体であり、様々な機能性リポソームが抗原キャリアとして研究されている。がん免疫療法において重要な、抗原の細胞質送達機能をリポソームに付与するため、カルボキシ基を有する両親媒性分子や、ペプチド、ポリカルボン酸などの高分子が用いられている。特に、高分子を基盤とした膜融合性分子は、その化学構造を制御することで膜融合活性を調節できることから、膜融合機能分子として有用である。典型的な膜融合性高分子として、ポリアクリル酸誘

導体が研究されている。ポリアクリル酸誘導体は、生理的な pH 環境では側鎖のカルボキシ基が荷電を持ち、脂質膜と相互作用しないが、酸性になるとカルボキシ基のプロトン化により高分子が疎水的になり、脂質膜を構成する脂質と混合ミセルを形成することで、脂質膜を溶解する。Kono らは、脂質膜とよりマイルドに相互作用する膜融合性高分子として、主鎖にエーテル酸素を持ち、側鎖に反応性のヒドロキシ基を持つポリグリシドールに着目した。ポリグリシドールのヒドロキシ基にサクニル基などのカルボキシ基ユニットを導入したところ、酸性において膜融合活性を示す機能性高分子が得られた。さらに、その膜融合活性は側鎖官能基の疎水性や、主鎖の分岐度によって制御できることが明らかになっている。特に、3-メチルグルタリル酸エステル構造を持つポリグリシドール誘導体、MGluPG を修飾したリポソームは、エンドソームの弱酸性 pH に応答して膜融合性となり、内包した物質を極めて効率良く細胞質に導入した。Yuba らは高い細胞質デリバリー機能を有する MGluPG 修飾リポソームに、モデル抗原タンパク質オボアルブミン(OVA)を封入してその免疫誘導機能を調べた。MGluPG 修飾リポソームをマウスに皮下注射したところ、OVA に特異的な細胞性免疫が誘導され、担がんマウスにおける腫瘍成長抑制効果を示した。しかし、これらのリポソームを用いたがん免疫治療実験では腫瘍の完全な治癒には至らなかったため、抗原キャリアのさらなる改善が求められている。

DC による免疫誘導プロセスでは、抗原が送達されるだけでなく、DC が成熟化して抗原提示に関連する分子が高発現し、サイトカインと呼ばれる免疫関連タンパク質の産生が高まる必要がある。一般的なワクチン製剤には、DC の成熟化・活性化を促進するために、「アジュバント」と呼ばれる免疫活性化分子が組み込まれている。そこで本論文では、pH 応答性高分子修飾リポソームに、アジュバント作用を持つ機能性分子を導入することで、抗原をデリバリーすると同時に DC を成熟化させ、細胞性免疫を強力に誘導できる免疫誘導システムの開発を試みた。具体的には、ポリグリシドールや多糖を主鎖とするポリカルボン酸誘導体を合成して、その膜融合活性を高めるとともに、カチオン性脂質、核酸、生理活性多糖などの様々なアジュバント分子をリポソームに導入した。これらのリポソームの細胞内抗原デリバリー機能、免疫誘導機能に及ぼす、膜融合性高分子の構造やアジュバント分子導入の効果について検討を行い、強力ながん免疫治療効果を実現できる免疫誘導システムの設計指針を明らかにすることを目指した。

本論文は以下の 8 章から構成される。

第 1 章は本論文の緒言であり、研究背景、目的、本論文の概要について述べた。

第 2 章では抗原ペプチドを内包した pH 応答性高分子修飾リポソームを作製し、がんペプチドワクチン用のペプチドキャリアとしての有用性を調べた。3-メチルグルタリル化多分岐状ポリグリシドール (MGlu-HPG) を修飾したリポソームに、OVA 由来ペプチドをモデル抗原、モノホスホリルリピド A をアジュバント分子として導入した。ペプチド内包リポソームは、マウス樹状細胞由来 DC2.4 細胞によって効果的に取り込まれ、細胞質にペプチドを送達した。OVA を発現する T リンパ腫、E.G7-OVA 細胞を担がんしたマウスにペプチド内包リポソームを皮下投与すると、ペプチドのみを投与した場合よりもはるかに効率よく OVA 特異的な CTL が誘導され、腫瘍成長が抑制された。アジュバント分子を導入した pH 応答性高分子修飾リポソームは、ペプチドワクチンの治療効果を高めるための抗原キャリアとして有用であることが示された。

第 3 章では MGlu-HPG 修飾リポソームへアジュバント分子としてカチオン性脂質 3,5-ジドデシルオキシベンズアミジンを導入し、その抗原キャリアとしての機能を検討した。モノホスホリルリピド A などの生物由来分子に比べて、化学合成が可能なカチオン性脂質は、より安価なアジュバント分子として利点がある。カチオン性脂質の導入によって、リポソームの DC2.4 細胞による取り込みが上昇し、DC2.4 細胞の成熟化が促進された。E.G7-OVA 細胞を担がんしたマウスにカチオン性脂質導入 MGlu-HPG 修飾

リポソームを投与すると、カチオン性脂質を含まないリポソームよりも腫瘍成長が顕著に抑制された。したがって、pH 応答性高分子修飾リポソームへのカチオン性脂質導入は、抗原キャリア高活性化のための有効なアプローチであることが明らかとなった。

第4章では第三章で得られたカチオン性脂質導入 pH 応答性高分子修飾リポソームのアジュバント機能の増強を検討した。具体的には、DC 内のトル様受容体 9 に認識されて DC を強力に活性化する作用を持つ CpG-DNA をリポソームに複合化させ、その複合化方法が免疫誘導機能に与える影響について検討した。ここでは、リポソーム作製時に CpG-DNA と混合する Pre-mix 複合体と、リポソームを予め作製してから CpG-DNA と混合する Post-mix 複合体を作製した。CpG-DNA の複合化方法の違いによって CpG-DNA の細胞内分布と DC の活性化状態が変化し、結果として DC の活性化マーカーである CD80 の発現を促進した Post-mix の方が高い腫瘍成長抑制効果を示した。これらの結果は、アジュバント分子の複合化方法と細胞内動態の制御が、高活性な免疫誘導システムをデザインする上で極めて重要であることを示している。

第5章では pH 応答性高分子修飾リポソームと細胞性免疫誘導性のサイトカイン、IFN- $\gamma$  遺伝子のカチオン性リポソーム複合体(リポプレックス)を用いた免疫誘導システムの構築を行った。ここでは OVA を内包した pH 応答性高分子修飾リポソームと IFN- $\gamma$  をコードするプラスミド DNA のリポプレックスを用いた。これらを組み合わせて用いる場合を“コンビネーション”、静電相互作用を介して一つの複合体とした場合を“ハイブリッド”として、二つの免疫誘導システムを比較した。リポソーム-リポプレックスのコンビネーションによる免疫は、リポソームと比較して投与後、早期に腫瘍への CTL の浸潤を促進し、強い治療効果をもたらすことを明らかにした。

第6章ではより安全な膜融合性分子の創出を目指して、生分解性を持つ多糖デキストランに化学修飾を施した pH 応答性デキストラン(MGlu-Dex)を合成し、リポソームに修飾してその免疫誘導機能を調べた。MGlu-Dex 修飾リポソームは DC2.4 細胞の細胞質に抗原タンパク質を送達し、マウスに投与することで細胞性免疫を誘導した。主鎖に用いたデキストランは、血漿増量剤としてヒトへの投与実績があるため、MGlu-Dex は機能性と安全性を併せ持つ高分子材料として、実用性が高い。

第7章では生理活性多糖を主鎖とする pH 応答性高分子を用いて、抗原の細胞質送達機能とアジュバント作用を併せ持つ多機能性多糖を設計した。カードランは、DC の細胞膜表面に発現する受容体 Dectin-1 と相互作用して DC を成熟化させるアジュバント作用を持つことが知られている。そこで、カードランに pH 応答性基として 3-メチルグルタル基を導入したところ、カードラン単体よりも DC2.4 細胞を強力に活性化した。このように、pH 応答性官能基の導入は、pH 応答性を与えるだけでなく、そのアジュバント作用を促進できることが明らかとなった。したがって、抗原の細胞質送達および DC 成熟化の両方を実現できる生理活性多糖修飾リポソームは、がん免疫療法用の抗原キャリアとして有用である。

第8章では第2章から第7章で得られた結果について総括した。

## 審査結果の要旨

本論文は、がん免疫治療のための免疫誘導システムの開発に関する研究を行ったものである。リン脂質分子から構成される閉鎖小胞であるリポソームに機能性分子を導入して、抗原の細胞質内デリバリー機能と免疫賦活機能(アジュバント機能)を集積させた免疫誘導システムを構築し、培養細胞及び実験動物(マウス)を用いた機能評価についての研究成果をまとめ、以下の成果を得ている。

(1) pH 応答性高分子を修飾したリポソームにペプチドを内包した抗原キャリアを構築した。このリポソームはペプチドを樹状細胞の細胞質に運搬して、ペプチド単独よりも優れた細胞性免疫誘導能を示し、ペプチドワクチンに抗原キャリアを用いることの有用性を示した。

(2) pH 応答性高分子修飾リポソームにカチオン性脂質を導入することで抗原の細胞質内デリバリー機能とアジュバント機能と併せ持つ抗原キャリアを構築した。カチオン性脂質の導入によってリポソームの樹状細胞による取り込みとサイトカイン産生が向上し、抗原キャリアにアジュバント機能を付与できることを見出した。

(3) トル様受容体 9 のリガンドである CpG-DNA をアジュバント分子として導入したカチオン性脂質導入 pH 応答性高分子修飾リポソームを構築し、これが強いアジュバント機能と抗腫瘍免疫誘導能を持つことを示した。

(4) 細胞性免疫誘導性のサイトカイン IFN- $\gamma$  のカチオン性脂質複合体(リポプレックス)と pH 応答性高分子修飾リポソームを用いた免疫誘導システムを構築し、これをマウスに皮下投与すると早期に細胞性免疫を誘導することを見出した。

(5) 生体適合性の高いデキストランに 3-メチルグルタル基を導入し、pH 応答性多糖誘導体(MGlu-Dex)を合成した。MGlu-Dex 修飾リポソームは樹状細胞の細胞質に抗原をデリバリーし、細胞性免疫を誘導できることを示した。

(6) アジュバント機能を持つ多糖、カードランを用いた pH 多糖誘導体を修飾したリポソームは抗原の細胞質内デリバリー機能とアジュバント機能を併せ持ち、がん免疫治療のための抗原キャリアとして有用であることを示した。

以上の諸成果は、がん免疫治療のための免疫誘導システムに関する設計指針を提供するものであり、がんワクチン分野の学術的・技術的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学識を有することを証したものである。