リポソーム技術を駆使した樹状細胞への抗原デリバリー法の構築とそのがん免疫療法への応用

特集 ワクチンとDDS

鈴木 亮・小田雄介・宇都口直樹^{*1)},
門脇則光^{*2)}, 丸山一雄^{*1)}

Development of novel antigen delivery system to dendritic cells using liposome technology in cancer immunotherapy

In cancer immunotherapy with dendritic cells (DCs), which are the most potent antigen-presenting cells, it is important that DCs present peptides derived from tumor-associated antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and activate tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. However, exogenous antigens are generally presented on MHC class II but not class I molecules. To induce the effective immunotherapy for cancer, it is necessary that the antigen delivery carrier which can induce MHC class I presentation of exogenous antigens is developed.

Several strategies to induce DCs to present exogenous antigens on MHC class I have been reported. First, DCs that phagocytosed a particulate form of antigens present peptides derived from the antigens on MHC class I. Second, DCs that incorporated antigens via certain endocytic receptors such as Fcγ receptors efficiently present peptides on MHC class I. Thus, we combined these two strategies and prepared the antigen-containing IgG-conjugated liposomes (IgG liposomes). In this review, we introduced about the feasibility of IgG liposomes as the antigen delivery carrier in cancer immunotherapy with DCs.

近年、樹状細胞 (DCs) の強力な抗原提示能を利用したがん免疫療法が注目されている。この療法の中核をなす細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を活性化するためには、DC 上の MHC クラス I を介してがん関連抗原を提示させる必要がある。そこで筆者らは、DCs への抗原送達キャリアとして IgG 表面修飾した抗原封入リポソームを開発した。この IgG リポソームは DCs 上の Fcγ レセプターを介して取り込まれ、内封した抗原の MHC クラス I への抗原提示を誘導することで抗原特異的な CTL 誘導を可能とした。

本稿では、がん免疫療法における抗原デリバリーキャリアとしての IgG リポソームの可能性について紹介する。

Ryo Suzuki · Yusuke Oda · Naoki Utoguchi^{*1)},
Norimitsu Kadowaki^{*2)}, Kazuo Maruyama^{*1)}

key words : liposomes, dendritic cells (DCs), Fcγ receptor,
antigen delivery carrier, cancer immunotherapy

脂質二分子膜からなるリポソームは、1965 年にケンブリッジ大学の Bangham らによって発見されて以来、膜モデルや DDS キャリアとして幅広い分野で注目されている。特に DDS キャリアとしての医療への応用に関しては、リポソームの大量生産法、無菌化法、安定化や薬物の封入方法などの製剤

的な問題や、体内での安定性、全身投与後の肝臓や脾臓などへの細網内皮系への取り込まれやすさなどの生物化学的な問題が大きな障壁となっていた。しかし、世界中の多くの研究者によりこれらの問題点が克服され、現在ではリポソーム製剤として 5 品目が上市されるまでになった。本邦においても、Vissudyne を皮切りに Ambisome や Doxil が上市され、臨床におけるリポソームの有効性や安全性が認められつつある。

リポソームに関する研究開発は現在でも盛んに行

^{*1)} Department of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University 帝京大学薬学部生物薬剤学教室

^{*2)} Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, Kyoto University 京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学

図1 DCsにおける抗原提示経路およびIgG リポソームによる抗原デリバリー

われており、リポソームへのさまざまな機能付与によるリポソーム製剤の最適化が進められている。実際にリポソームの構成脂質を任意にコントロールすることで、リポソーム膜電荷の変更、温度感受性、pH感受性や膜融合能の付与、さらにはリポソーム表面に抗体を結合させたイムノリポソームの開発などが行われている。

このように、リポソーム技術を駆使した機能性付与により、治療目的に応じたインテリジェントリポソームともいえるべき新たなリポソームが創製されつつある¹⁻⁵⁾。特にイムノリポソームは、リポソーム表面の抗体による標的指向性を有するアクティブターゲティング可能な薬物キャリアとして有望である。また、抗体以外に特定レセプターに対するリガンドなどを修飾したリポソームの開発も進められており、アクティブターゲティング型リポソームは次世代型DDS製剤として注目されている。さらに現在では、抗がん剤などの低分子量薬物に対するキャリアとしてだけでなく、ペプチドや蛋白質などの高分子量物質に対するキャリアへのリポソームの応用が期待されている。

このような背景のもと、筆者らは、がん免疫療法において中心的役割を担っている抗原提示細胞である樹状細胞(DCs)に効率よく抗原を送達するためのリポソームを開発した⁶⁾。そこで本稿では、筆者

らが研究を進めているDCsを標的としたリポソームによるがん抗原デリバリー法の確立およびそのがん免疫療法への応用について紹介する。

がん免疫療法におけるDCsの重要性

現在のがん治療において、外科療法、化学療法、放射線療法が三大療法として行われている。しかし、これらの療法は再発の可能性、治療対象者の制限、重篤な副作用などの欠点がある。これらの欠点を改善できる治療法としてがん免疫療法が登場した。この療法はがん細胞に対する免疫系を活性化し、がん細胞特異的な免疫反応によりがん細胞を拒絶できるため、副作用の少ない治療法として期待されている。また、この療法は上述のがん三大療法後の再発・転移を予防するための併用療法としても利用可能であり、安全で有効ながん治療の確立に向けた新たな治療法として注目されている。

近年の腫瘍免疫学の発展に伴い、生体内における抗原特異的な免疫誘導機構が徐々に解明され、免疫担当細胞のなかでも抗原提示細胞であるDCsが重要な役割を果たしていることが明らかとなっていった。このDCsはMHCクラスIおよびクラスII分子を有しており、抗原由来ペプチドをこれらの分子上に提示することで細胞傷害性T細胞(CTL)やヘ

図2 リボソームのDCs への取込み

a : Bare リボソーム, b : IgG リボソーム

樹状細胞株である DC2.4 細胞に Alexa488 ラベルしたニワトリ卵白アルブミン(OVA)を封入したリボソーム(Bare リボソームまたは IgG リボソーム)を 37℃で 30 分作用後, 共焦点レーザー顕微鏡にて DC2.4 細胞を観察した。

ルパーT 細胞を活性化している。

このように, DCs は抗原特異的な免疫反応を制御する司令塔の役割を果たす非常に重要な細胞である。すなわち, 腫瘍免疫を構築するためには, この DCs にがん関連抗原由来ペプチドを提示させ, がん細胞特異的な細胞性免疫を活性化することが必要である。そのなかでも, がん細胞特異的 CTL の活性化は, 強力な抗腫瘍効果を得るために特に重要である。そのため現在では, DCs を患者の末梢血球から分化・単離し, 得られた DCs に *in vitro* でがん関連抗原を取り込ませ, その DCs を患者体内に戻す *ex vivo* 法によるがん免疫療法が行われている。

DCs への外来性抗原のクロスプレゼンテーション

前項で述べたように DCs における抗原提示には MHC クラス I とクラス II の 2 種類が存在する。がん細胞特異的 CTL を活性化するためには MHC クラス I 分子への抗原提示が必要となるが, 通常 MHC クラス I 分子には内在性抗原が提示される。そして, DCs に対して外来性抗原にあたるがん関連抗原は MHC クラス II に優先的に提示されることが知られている⁷⁾(図 1)。

一方, これまでの研究において, DCs には外来性抗原であっても MHC クラス I に抗原提示を誘導できるクロスプレゼンテーション経路の存在が知られている。このメカニズムは完全に解明されていないが, DCs 表面上に存在する Fcγ レセプターを介して抗原が取り込まれた場合, 外来性抗原のクロスプレゼンテーションが報告されている^{8,9)}。この現象を利用すれば, DCs にとって外来性抗原となるがん関連抗原を効率よく MHC クラス I に抗原提示できるようになり, がん細胞特異的 CTL の活性化が期待できる。そのため, このクロスプレゼンテーションが, がん免疫療法の成功の鍵を握る現象であると考えられている。

そこで, 抗原抗体複合体によるクロスプレゼンテーション誘導のがん免疫療法への応用が考えられた。しかし, この方法では抗原に対して抗体をそれぞれ用意する必要があるため, DCs を用いたがん免疫療法における抗原送達法としての利用を考慮すると, 汎用性の点で問題があると考えられている。

IgG 修飾リボソームを利用した DCs への抗原デリバリー

Boon らによりがん関連抗原が同定されて以来, これまでにさまざまながん関連抗原が報告されてい

図3 Fc γ レセプターを介した IgG リポソームの DCs への取込みの確認

Fc γ レセプターに対する抗体により Fc γ レセプターを介したエンドサイトーシス経路を阻害したマウス骨髄由来 DCs にカルセインを封入した IgG リポソームを 37℃ で 1 時間作用後、DCs に取り込まれた IgG リポソーム量をフローサイトメトリーにて解析した。

る^{10~12)}。当然のことながら、がん種によりがん関連抗原が異なっており、患者に対する最適ながん抗原による治療を考慮するとがん免疫療法がオーダーメイド医療として患者に提供される可能性もある。したがって、さまざまながん関連抗原に対応できるような抗原送達キャリアこそが、がん免疫療法に求められる汎用性の高い抗原送達キャリアであると考えられる。

この課題を克服できるキャリアとして筆者らは、さまざまな物質を封入可能なリポソームに着目した。また、このリポソームは抗原を封入可能であるとともに、その表面に DCs を標的するための IgG を容易に修飾可能である。したがって、抗原封入 IgG 修飾リポソーム (IgG リポソーム) は、DCs 上の Fc γ レセプター認識能を持つ抗原送達キャリアとして、MHC クラス I へのクロスプレゼンテーションを効率よく誘導できるすぐれた抗原デリバリーキャリアになると期待される (図 1)。そこで今回は、リポソーム表面に IgG を簡便かつ速やかに修飾可能な SMPB(succinimidy1-4-(p-maleimidophe-

nyl) butyrate) 法¹³⁾を用い IgG リポソームを調製した⁶⁾。

まずはじめに、今回調製した IgG リポソームの DCs への積極的な取込みを評価するため、蛍光物質を封入したリポソームを用い DCs への取込みを共焦点レーザー顕微鏡にて評価した (図 2)。その結果、IgG 未修飾リポソーム (Bare リポソーム) にくらべ IgG リポソームにおいて DCs への取込みが亢進していた。これは、IgG リポソームが DCs 表面上の Fc γ レセプターを介して積極的に取り込まれたためと考えられた。そこで、この IgG リポソームの Fc γ レセプターを介した経路での取込みを確認するため、Fc γ レセプターに対する抗体を用いた取込み阻害実験を行った (図 3)。その結果、IgG リポソームの取込みが、DCs の Fc γ レセプター抗体処理により阻害された。

以上より、IgG リポソームは、Fc γ レセプターを介したエンドサイトーシス経路により DCs に取り込まれることが示唆された。なおデータには示していないが、平均粒子径が 150~200 nm 程度の IgG リポソームにおいて、DCs への取込み効率が最も高かったため、今回の検討ではリポソームサイズを 150~200 nm 程度に調整して検討を行っている。また、このときリポソーム表面上に平均 20~40 分子/リポソームの IgG 分子が修飾されていることを確認している。

IgG 修飾リポソームを利用した抗原特異的免疫誘導

IgG リポソームは、Fc γ レセプターを介して内封抗原を DCs に導入することで、効率よく DCs の MHC クラス I にその抗原をクロスプレゼンテーション誘導できるものと考えられる。さらに、その DCs を免疫することでがん免疫療法において重要なエフェクター細胞となる CTL を活性化できるものと期待される。

そこで、IgG リポソームにより抗原導入した DCs をマウスに免疫した際の抗原特異的 CTL 誘導について検討した。今回の検討では、モデル抗原としてニワトリ卵白アルブミン (OVA) を封入した IgG リポソームを調製し、この OVA 封入 IgG リポソームを

図4 IgG リポソームを用いて抗原導入した DCs をマウスに免疫したときの抗原特異的 CTL 応答

OVA のみ, OVA 封入 Bare または IgG リポソームを DCs にパルスし, C57BL/6 マウスに1週間おきに2回免疫した. 最終免疫から1週間後にマウスから回収した脾細胞を抗原再刺激することでエフェクター細胞とした. 一方, ターゲット細胞には EL-4 細胞または EL-4 細胞に OVA 発現遺伝子を導入した E.G7-OVA 細胞を用い, OVA 特異的 CTL 活性を ^{51}Cr リリースアッセイにより評価した.

図5 OVA 封入 IgG リポソームをパルスした DCs 免疫による固形がんモデルにおける抗腫瘍効果

OVA のみ, OVA 封入 Bare または IgG リポソームを DCs にパルスし, C57BL/6 マウスに1週間おきに2回免疫した. 最終免疫から1週間後にモデル腫瘍として E.G7-OVA 細胞をマウス皮内に移植し, その腫瘍サイズを指標に抗腫瘍効果を検討した.

作用させた DCs をマウスに免疫したときの OVA 特異的 CTL 応答を評価した. DCs を1週間おきに2回免疫し, その1週間後にマウスから回収した脾細胞を *in vitro* 抗原再刺激することでエフェクター細胞を調製した. 一方, ターゲット細胞には EL-4 細胞または EL-4 細胞に OVA 発現遺伝子を導入した E.G7-OVA 細胞を用い, OVA 特異的 CTL 活性を ^{51}Cr リリースアッセイにより評価した(図4).

その結果, E.G7-OVA 細胞をターゲットとした際には, OVA 封入 Bare リポソーム作用群と比較して, OVA 封入 IgG リポソーム作用 DCs 免疫群

において強力なターゲット細胞の傷害が認められた. 一方, OVA をそのまま作用させた DCs や DCs のみを免疫した群では E.G7-OVA 細胞の傷害性は認められなかった. また, OVA ペプチドを MHC クラス I 分子上に提示していない EL-4 細胞をターゲット細胞にした際には, どの群にも細胞傷害性は認められなかった.

以上の結果から, IgG リポソームは内封抗原を Fc γ レセプター経由で効率よく DCs 内に導入し, MHC クラス I にクロスプレゼンテーション誘導することで, 抗原特異的 CTL をより効率的に誘導で

図6 マウスメラノーマ細胞由来膜抗原封入 IgG リポソームをパルスした DCs 免疫による実験的肺転移モデルにおける肺転移抑制効果

ブタノール抽出法により B16BL6 細胞から膜抗原を抽出し、Bare または IgG リポソームに封入した。抗原のみ、抗原封入 Bare または IgG リポソームを DCs にパルスし、C57BL/6 マウスに1週間おきに2回免疫した。最終免疫から1週間後に B16BL6 細胞をマウス尾静脈から投与し、肺転移抑制効果を検討した。

きることが示唆された。

IgG リポソームのがん免疫療法への応用

がん免疫療法においてがん関連抗原の免疫方法として抗原を生体にそのまま免疫する方法と、体外に取り出した DCs に抗原を作用させ生体に DCs を免疫する *ex vivo* 法が考えられる。最近、この2種類の方法について、Fcγ レセプターを介して抗原送達する場合の抗腫瘍免疫誘導能に関するデータが報告された。これによると、*ex vivo* 法のほうが抗腫瘍免疫誘導には有効であるとのことであった¹⁴⁾。

そこで筆者らは、*ex vivo* 法を利用した IgG リポソームのがん免疫療法における有用性について評価

することとした。今回の検討では、がん免疫療法開発のモデル系としてよく知られる OVA と E.G7-OVA 細胞の系を用い検討した。すなわち OVA 封入 IgG リポソームを作用させた DCs をマウスに免疫後、E.G7-OVA 細胞を皮内移植し、その腫瘍体積を指標に抗腫瘍効果を検討した(図5)。

その結果、DCs のみを免疫した群、OVA のみを作用させた DCs を免疫した群では、顕著な抗腫瘍効果は認められなかった。一方、OVA 封入 Bare リポソームを作用させた DCs を免疫した群において若干の抗腫瘍効果が認められた。さらに、OVA 封入 IgG リポソームを作用させた DCs を免疫した群では、全例において腫瘍の生着が完全に阻害された。なお、抗原未封入 IgG リポソームを作用させ

た DCs を免疫しても抗腫瘍効果がほとんど認められなかったことより、OVA 封入 IgG リポソームを用いた際の抗腫瘍効果は内封した OVA に対する抗原特異的 CTL 誘導に起因するものと考えられた。

さらに、この完全生着抑制が認められた OVA 封入 IgG リポソーム作用 DCs 免疫群に E.G7-OVA 細胞を再移植したところ、すべてのマウスにおいて腫瘍の生着は認められなかった。これは、これらのマウスにおいて E.G7-OVA 細胞に対する免疫記憶が成立していることに起因すると考えられた。それゆえ、IgG リポソームを用いたがん免疫療法により、がんの再発予防も可能になると期待される。

IgG リポソームを抗原デリバリーキャリアとして利用する最大の利点は、さまざまな種類の抗原や未知抗原にも適用できる点である。筆者らはその利点を証明するため、マウスメラノーマ細胞からブタノール抽出法¹⁵⁾により膜抗原を回収し、この膜抗原を封入した IgG リポソームを用い DCs に抗原を導入した。そして、この DCs を免疫したマウスを用い、メラノーマ細胞の実験的肺転移モデルにおける肺転移抑制効果を評価した(図 6)。その結果、Bare リポソームにくらべ IgG リポソームで抗原導入した DCs を免疫することにより顕著な肺転移抑制効果が認められた。このことより、IgG リポソームはさまざまな種類の抗原に対しても利用可能なすぐれた抗原デリバリーキャリアであることが示唆された。

おわりに

近年の腫瘍免疫学の進展は目覚ましく、がん細胞特異的な免疫力の賦活化により治療するがん免疫療法の有用性が見いだされつつある。実際に、さまざまな病院において患者の自己負担ではあるものの、がん免疫療法を受診できるような時代に突入している。このような時代の幕開けにより、DCs を用いたがん免疫療法における抗原デリバリーツールの開発が必要になると考えられる。

そこで筆者らは、DCs への抗原デリバリーキャリアとして IgG リポソームを開発し、そのがん免疫療法における有用性を示した。さらに、この IgG リポソームがさまざまながん関連抗原への応用の可

能性を有していることも明らかとした。そのため、外科的治療により摘出されたがん組織から抗原を抽出し、その抗原を IgG リポソームに封入してがん免疫療法に適用することで、がんの再発や転移を予防することも可能になると期待される。

このような各種の抗原に対応可能なキャリアは、今後のがん免疫療法におけるオーダーメイド医療にも対応可能であると考えられる。いずれにしても、抗原送達キャリアとしての IgG リポソームのがん免疫療法への応用が、今後のがん治療に貢献することを期待したい。

本稿で紹介したリポソームに関する筆者らの研究は、帝京大学薬学部生物薬剤学教室で行われた研究であり、研究遂行にご協力いただいた学生諸子に深謝する。また、本研究遂行においてご協力いただいた京都大学大学院医学研究科の川村和子先生、内山卓先生、大阪大学大学院薬学研究科の岡田直貴先生に深謝する。

文 献

- 1) Harata M, Soda Y, Tani K, Ooi J, Takizawa T et al. : Blood 104 : 1442-1449, 2004.
- 2) Maruyama K, Kennel SJ, Huang L : Proc Natl Acad Sci U S A 87 : 5744-5748, 1990.
- 3) Mizoue T, Horibe T, Maruyama K, Takizawa T, Iwatsuru M et al. : Int J Pharm 237 : 129-137, 2002.
- 4) Suzuki R, Takizawa T, Kuwata Y, Mutoh M, Ishiguro N et al. : Int J Pharm 346 : 143-150, 2008.
- 5) Maruyama K, Ishida O, Kasaoka S, Takizawa T, Utoguchi N et al. : J Control Release 98 : 195-207, 2004.
- 6) Kawamura K, Kadowaki N, Suzuki R, Udagawa S, Kasaoka S et al. : J Immunother 29 : 165-174, 2006.
- 7) Germain RN : Cell 76 : 287-299, 1994.
- 8) Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C et al. : J Exp Med 189 : 371-380, 1999.
- 9) Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S : Nat Cell Biol 1 : 362-368, 1999.
- 10) Wolfel T, Van Pel A, Brichard V, Schneider J, Seliger B et al. : Eur J Immunol 24 : 759-764, 1994.
- 11) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E et al. : Science 254 : 1643-1647, 1991.
- 12) van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S et al. : J Exp Med 182 : 689-698, 1995.
- 13) Allen TM, Brandeis E, Hansen CB, Kao GY, Zalipsky S : Biochim Biophys Acta 1237 : 99-108, 1995.
- 14) Schuurhuis DH, van Montfoort N, Ioan-Facsinay A, Jiawan R, Camps M et al. : J Immunol 176 : 4573-4580, 2006.
- 15) Labateya N, Thomson DM, Durko M, Shenouda G, Robb L, Scanzano R : Cancer Res 47 : 1058-1064, 1987.