〔総 合 論 文〕

pH 応答性多糖とリポソームを基盤とした
免疫誘導システムの開発

弓場 英司

(受付 2018 年 4 月 2 日・審査終了 2018 年 6 月 13 日)

(早期公開 2018 年 8 月 1 日・DOI:10.1295/koron.2018-0013)

要 旨 がん免疫療法の実現のために重要な細胞性免疫の誘導には、樹状細胞などの免疫担当細胞に抗原を運搬すると同時に、免疫誘導に適した状態に活性化する必要がある。筆者らは、酸性 pH に応答して膜融合性となる高分子を抗原封入リポソームに修飾することで、細胞内への抗原運搬システムを開発した。さらに、主鎖として生理活性多糖を用い、そのヒドロキシ基にカルボン酸ユニットを導入することで、細胞内デリバリー機能と免疫細胞活性化機能を併せもつ多機能性多糖を合成した。多糖誘導体を修飾したリポソームは、樹状細胞に効果的に取り込まれ、エンドソームの弱酸性 pH に応答して膜融合性となりサイトゾルに抗原を運搬することで、抗原特異的な細胞性免疫を誘導した。さらに、多糖誘導体修飾リポソームと TGF- β シグナル阻害剤を包埋した PEG 修飾リポソームを担がんマウスに投与すると、細胞性免疫誘導と免疫抑制解除の相乗効果で強力な抗腫瘍効果が誘導された。

1 緒 言

近年、患者本人の免疫を利用して治療効果を得る免疫療法が、外科手術・化学療法・放射線療法に次がん治療法として注目を集めている。とくに、イビリムマブやオプジーボに代表される免疫チェックポイント阻害剤の成功は、免疫療法に対する認識を大きく変えた。がん組織では CTLA-4 や PD-1 などの免疫抑制分子が高発現し、腫瘍細胞はこの免疫抑制機構を巧みに利用して、細胞傷害性 T リンパ球 (Cytotoxic T lymphocyte, CTL) などのキラー細胞からの攻撃から逃避している。免疫チェックポイント阻害剤は免疫抑制分子をブロックして免疫抑制状態を解除し、腫瘍細胞を攻撃する免疫を持続活性化させることにより、劇的な治療効果を得ることに成功した¹⁾。これらの結果は、免疫系が確かにがん細胞を認識して排除できることを明確に示したもので、これ以後、免疫療法に対する研究開発が活発化している。しかしながら、免疫チェックポイント阻害剤の効果が見られるのは 10~30% の患者とされており、それ以外のがん患者には治療効果がないことが問題となっている²⁾。この原因として、CTLA-4 や PD-1 以外の免疫チェックポイ

ントの関与が挙げられる。たとえば、Bertozzi らはシアル酸結合免疫グロブリン用レクチン (Siglec) が、糖を介した免疫チェックポイントとしてはたっていると報告している³⁾。Siglec の細胞内ドメインには、CLTA-4・PD-1 と同様に免疫抑制性のシグナル伝達モチーフ (ITIM, ITSM) が存在するため、がん細胞表面に高発現しているシアル酸が認識されることで、免疫抑制が引き起こされているものと考えられる。また、既存の免疫チェックポイント阻害剤の効果が見られない患者では、がん細胞を直接攻撃するキラー細胞、とくにがん変異抗原 (ネオアンチゲン) を認識する CTL の数が乏しいことが報告されている^{2), 4), 5)}。これを補完する治療法として、患者から取り出したリンパ球からがん抗原特異的な T 細胞を選別・活性化して再投与する T 細胞移入療法が研究されて

弓場英司 (YUBA Eiji) 大阪府立大学大学院工学研究科応用化学分野 (〒599-8531 堺市中区学園町 1-1)

2006 年 3 月大阪府立大学工学部機能物質科学科卒業, 2009 年 4 月~2010 年 3 月日本学術振興会特別研究員 (DC2), 2010 年 3 月大阪府立大学大学院工学研究科修了, 博士 (工学), 2010 年 4 月~2017 年 9 月大阪府立大学大学院工学研究科応用化学分野助教, 2017 年 10 月より大阪府立大学大学院工学研究科応用化学分野准教授, 現在に至る。

Figure 1. (Color online) Antigen presentation pathways by antigen presenting cells.

いる⁶⁾。2017年8月には、がん抗原への特異性とT細胞の増殖活性を併せもつキメラ抗原受容体(CAR)T細胞療法が米国食品医薬品局に承認されている。

このように、がん免疫療法を実現するためには、がん組織が作り出す免疫抑制環境を深く理解してその解除方法を模索するとともに、がん特異的なT細胞を体外、または体内で誘導・活性化することが鍵となる。体内におけるT細胞の誘導には、樹状細胞などの抗原提示細胞が中心的な役割を果たしている⁷⁾。最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞はがん抗原を取り込み、ペプチド断片に分解して、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子に結合して、細胞表面に提示する。これを認識したナイーブT細胞がCTLやヘルパーT(Th)細胞に分化してがん特異的な免疫が誘導される(Figure 1)。樹状細胞にエンドサイトーシスによって取り込まれた抗原はエンドソーム・リソソームで分解を受け、MHCクラスII分子上に提示されてTh細胞を誘導する。一方、サイトゾルに存在する抗原はプロテアソームによる分解を経て、MHCクラスI分子上に提示されCTLを誘導する。また、Th細胞は樹状細胞から産生されるサイトカインの種類に応じて、B細胞を活性化するTh2細胞、またはCTLを活性化するTh1細胞に分化するため、効果的な免疫を誘導するためには、樹状細胞を活性化して、適切なサイトカイン産生を促すことも重要である。したがって、がん抗原を体内の樹状細胞に効率良く、しかも細胞内オルガネラレベルで精密に運搬し、かつ樹状細胞を活性化できる免疫誘導システムの開発が求められている。

2 pH 応答性高分子修飾リポソームによる抗原デリバリー

これまでに、高分子粒子、高分子ミセル、ナノゲル、リポソーム、金属ナノ粒子などさまざまな材料・ナノ粒子をベースにした免疫誘導システムの開発が試みられて

きた^{8)~12)}。中でも、脂質二分子膜からなる閉鎖小胞であるリポソームは、機能性分子の複合化により、免疫誘導に必要な機能を容易に導入することができるため、抗原デリバリーシステムのプラットフォームとして有用である。たとえば、ウイルスの膜融合タンパク質を導入した膜融合リポソームやVirosomeは、原形質膜、またはエンドソーム膜との融合によってリポソーム内に封入した抗原タンパク質をサイトゾルに導入してMHC class I 優位な免疫応答を誘導することができる^{13),14)}。このようなウイルスのもつ細胞への感染機構を人工材料で模倣するために、膜透過性ペプチドや機能性高分子を表面修飾したリポソームが開発されている^{15),16)}。

筆者らはこれまで、ポリエチレングリコール(PEG)類似の主鎖骨格と、側鎖にヒドロキシ基をもつポリグリシドールを利用して、弱酸性pHで膜融合性を示すpH 応答性高分子を開発した^{17)~20)}。たとえば、サクシニル化ポリグリシドール(SucPG, Figure 2)は、弱酸性pHにおいて側鎖のカルボキシ基がプロトン化して脂質膜と水素結合を形成するとともに、疎水化した高分子鎖がコイル状からグロビュール状に転移して脂質膜を不安定化する^{17),18)}。長鎖アルキル鎖を介してSucPGをリポソーム膜に固定化すると、弱酸性pHで膜融合活性を示した¹⁸⁾。ポリグリシドール誘導体のpH 応答性は、主鎖とカルボキシ基間のスペーサー構造によってコントロールできる(Figure 2)。SucPGよりもスペーサーのメチレン基の多いグルタル化ポリグリシドール(GluPG)、メチル基をもつ3-メチルグルタル化ポリグリシドール(MGluPG)、シクロヘキサン環をもつ2-カルボキシシクロヘキサン-1-カルボキシ化ポリグリシドール(ChexPG)は、この順番でカルボキシ基のpKaが上昇し、脂質膜を破壊するpH領域も高pH側にシフトする(Figure 2)¹⁹⁾。これは、スペーサー構造によって膜融合をひき起こすpHをコントロールできることを意味している。とくに、MGluPGはエンド

Figure 2. (Color online) Structures of polyglycidol derivatives having various spacer structures and fluorescence dye release from egg yolk phosphatidylcholine liposomes induced by polyglycidol derivatives at a given pH.

ソームの pH に相当する pH 6.5~5.5 にかけて強い膜破壊活性を示した。さらに、MGluPG の主鎖骨格を多分岐ポリグリシドールとした場合、ポリグリシドールの重合度が高まるにつれ膜破壊活性が上昇した²⁰⁾。より大きな重合度をもつポリグリシドール誘導体ほど、脂質膜に大きな欠陥を誘起できたものと考えられる。

マウス樹状細胞由来株 DC2.4 細胞によるリポソームの取り込み量をフローサイトメトリーにより評価したところ、ポリグリシドール誘導体の表面修飾によって、リポソームの取り込み量が上昇することがわかった (Figure 3)²⁰⁾。樹状細胞上にはアニオン性分子を認識するスカベンジャー受容体が発現しており、カルボキシレートを多数もつポリグリシドール誘導体が認識されることで、樹状細胞による取り込みが高まったものと考えられる。また、多分岐状ポリグリシドールを主鎖に用いた場合、その重合度の上昇とともにリポソームの取り込み量が増加した (Figure 3)。大きな重合度をもつ多分岐状ポリグリシドール誘導体は、スカベンジャー受容体と多価で相互作用することで、高い取り込みを示したと考えられる。

Figure 3. (Color online) (Top) Fluorescence intensity of DC2.4 cells treated with liposomes modified with polyglycidol derivatives having hyperbranched backbone or linear backbone and various degrees of polymerization (10–60). (Bottom) Schematic illustration for interaction of hyperbranched polyglycidol derivative-modified liposomes with dendritic cell that has scavenger receptors.

Figure 4. (Color online) OVA-specific immunotherapeutic effect on tumor-bearing mice. Both E.G7-OVA cells and EL4 cells were injected into mice. OVA-loaded pH-sensitive liposomes subcutaneously administered on Day 5 and tumor volume changes were monitored.

リポソームの膜融合性はN-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル) (NBD)結合脂質とローダミン脂質間の蛍光共鳴エネルギー移動を利用して評価することができる²¹⁾。リポソーム膜にローダミン脂質・NBD脂質を等量加えて蛍光ラベルしたリポソームをDC2.4細胞に取り込ませ、NBDの励起下における、細胞内のNBD、ローダミンそれぞれの蛍光を観察した。ポリグリシドール誘導体を修飾していないリポソームでは、NBDの蛍光はまったく観察されず、ローダミンの蛍光のみが見られた²⁰⁾。これは、リポソームは細胞内でインタクトの状態で存在し、NBDの励起エネルギーがローダミンに移動することでローダミンの蛍光のみが観察されたことを示している。一方、ポリグリシドール誘導体修飾リポソームでは、ローダミンの蛍光だけでなく、NBDの蛍光の回復が観察された²⁰⁾。これはリポソームがエンドソームと膜融合し、NBDとローダミンの脂質膜上での希釈が起こることでエネルギー移動の効率が低下したことを意味している。ポリグリシドール誘導体修飾リポソームは、エンドソームに取り込まれた後、エンドソームの弱酸性pHに反応してエンドソームと膜融合したと考えられる。本リポソームにモデル抗原タンパク質としてFITCラベルしたオボアルブミン (FITC-OVA)を封入して樹状細胞に取り込ませたところ、FITC-OVA由来蛍光が細胞全体から観察された。このように、ポリグリシドール誘導体修飾リポソームによって、モデル抗原タンパク質をサイトゾルに運搬できることがわかった²⁰⁾。

次に、ポリグリシドール誘導体修飾リポソームによる *in vivo* 免疫誘導について検討を行った。蛍光ラベルした

リポソームをマウス皮下に投与し、皮膚組織・リンパ節を免疫染色したところ、一部のリポソームがCD11c 発現細胞と共局在しており、さらにリポソーム由来蛍光がリンパ節から観察された (unpublished data) ことから、リポソームが皮膚組織の樹状細胞に取り込まれ、リンパ節へと運搬されていることがわかった。したがって、リンパ節へ移行した樹状細胞サイトゾルへの抗原デリバリーによって、CTLを中心とした細胞性免疫の誘導が期待される。そこでOVAを封入したリポソームをマウスに皮下投与し、脾臓におけるCTL活性を測定した。ここでは、樹状細胞を活性化する免疫賦活物質 (アジュバント) として、モノホスホリリピド A (MPLA) をリポソーム膜に組み込んだ。マウスから取り出した脾細胞を *in vitro* で再刺激した後、OVA抗原を発現しているE.G7-OVA細胞、または発現していないEL4細胞と共培養して細胞傷害活性を測定すると、ポリグリシドール誘導体修飾リポソームで免疫したマウス由来の脾細胞はE.G7-OVA細胞に対してのみ高い細胞殺傷効果を示した²²⁾。これは、脾臓においてOVA特異的なCTLが誘導されたことを示している。さらに、E.G7-OVA細胞とEL4細胞を担がんしたマウスにポリグリシドール誘導体修飾リポソームを皮下投与すると、E.G7-OVA腫瘍のみが縮退したことから、OVA特異的なCTLによって、抗原を発現した腫瘍を選択的に殺傷できることがわかった (Figure 4)²³⁾。このように、ポリグリシドール誘導体修飾リポソームによる抗原のサイトゾルデリバリー機能を利用して、腫瘍を縮退させるほど強力ながん免疫を誘導することに成功した。

3 pH 応答性多糖を用いる免疫誘導システム

これまで pH 応答性高分子の主鎖として用いてきたポリグリシドールよりも安全性の高い pH 応答性高分子の開発を目指して、生分解性をもつ多糖を主鎖に利用した。多糖を用いる場合、pH 応答性に加えて、多糖に由来するさまざまな生理活性、受容体との相互作用を利用することで、多機能性高分子の開発が期待できる。

血漿増粘剤としてヒトへの利用実績がある多糖デキストランに、pH 応答性基である 3-メチルグルタル基を導入すると、ポリグリシドール誘導体の場合と同様に弱酸性 pH で膜融合性を示す機能性多糖 (MGlu-Dex) が得られる²⁴⁾。MGlu-Dex 修飾リポソームは樹状細胞のサイトゾルに OVA をデリバリーし、E.G7-OVA 腫瘍をもつマウスに対して抗腫瘍免疫を誘導したが、その治療効果は腫瘍の完治には不十分であった。より強力ながん免疫を誘導するためには、樹状細胞への抗原デリバリー機能を高める、または、樹状細胞を活性化するアジュバント作用を導入することが必要と考えた。

樹状細胞は特定の糖を認識するレクチンを多数有している。たとえば、Dectin-1、Dectin-2 はそれぞれ β -1,3 グルカン、 α -マンナンを認識するレクチンである。樹状細胞は真菌の細胞壁に存在する β -グルカン、 α -マンナンを認識することで活性化し、サイトカインを産生する^{25)~27)}。そこで、 β -グルカンとして *alcaligenes faecalis* 由来カードラン、 α -マンナンとして酵母由来マンナンに 3-メチルグルタル基を導入することにより MGlu-Curd、MGlu-Man を合成し、アジュバント作用と抗原デリバリー機能を併せもつ機能性分子を設計した²⁸⁾。興味深い

ことに、カードランおよびマンナンに MGlu 基を導入すればするほど、樹状細胞による TNF- α 、IL-12 などの Th1 サイトカインの産生が増加した (Figure 5)²⁸⁾。MGlu-Dex でも MGlu 基の増加にともないサイトカイン産生が増加したが、CTL の活性化に重要な IL-12 の産生については、真菌由来の多糖であるカードラン、マンナンを主鎖とする多糖誘導体の方が高い産生を示した (Figure 5)。このことは、MGlu 基だけでなく、多糖構造も樹状細胞の活性化に重要であることを示している。

これらの多糖誘導体を修飾したりリポソームを作製し、樹状細胞によるリポソームの取り込みを評価したところ、MGlu 基の導入率や、多糖の構造によってリポソームの取り込み量が変化した。とくに、中程度の MGlu 基導入率の MGlu-Curd 修飾リポソームは、MGlu-Dex 修飾リポソームや MGlu-Man 修飾リポソームよりも 2~7 倍高い取り込みを示した²⁸⁾。取り込み経路を調べるために、カードラン、およびデキストラン硫酸存在下におけるリポソームの取り込み量を評価した (Figure 6)。MGlu-Curd 修飾リポソームの取り込みは、フリーのカードラン存在下で減少したことから、このリポソームが樹状細胞上の Dectin-1 に認識されていることが示唆された。しかしながら、カードランによる取り込み阻害の程度は、MGlu 基を導入するほど減少した。一方、スカベンジャー受容体の阻害剤として利用されるデキストラン硫酸の存在下では、MGlu-Curd 修飾リポソームの取り込みは ng/mL オーダーで阻害された。MGlu-Dex 修飾リポソームでは μ g/mL オーダーで取り込み阻害が見られたことから、MGlu-Curd は MGlu-Dex よりもスカベンジャー受容体へのアフィニティが高いことがわかった。

Figure 5. (Color online) Structures of polysaccharide derivatives having pH-sensitive moieties and cytokine production from DC2.4 cells treated with various polysaccharide derivatives for 24 h.

Figure 6. (Color online) Effect of curdlan or dextran sulfate on cellular association of liposomes modified with curdlan derivatives or dextran derivatives.

したがって、MGlu-Curdによる樹状細胞の活性化にはレクチンとの相互作用に加えて、スカベンジャー受容体との相互作用が寄与している可能性が示唆された。一方、MGlu-Man修飾リポソームの場合、フリーのマナンによる阻害がまったく確認されなかった²⁸⁾。したがって、Dectin-1、スカベンジャー受容体の両方に認識されるMGlu-Curd修飾リポソームは、MGlu-Dex修飾リポソーム、MGlu-Man修飾リポソームに比べて高い取り込みを示したものと考えられる。

MGlu-Curd, MGlu-Man, MGlu-Dex修飾リポソームは弱酸性領域で内包物の放出を促進し、いずれも樹状細胞のサイトゾルにOVAをデリバリーしたことから、pH応答機能を有していることがわかった²⁸⁾。とくにMGlu-Curd修飾リポソームは最も効果的にOVAのサイトゾルデリバリーを達成した。これらの多糖誘導体修飾リポソームをマウスに皮下投与し、脾細胞における細胞性免疫応答を調べた。OVA刺激に応答したインターフェロンの産生能、CTL活性とともに、すべての多糖誘導体修飾リポソームで確認されたことから、サイトゾルへの抗原デリバリーによって、マウス体内で細胞性免疫応答が誘導されたことがわかった²⁸⁾。とくに、MGlu-Curd修飾リポソームが細胞性免疫応答を最も強力に誘導した。これはこのリポソームの高い取り込み、抗原のサイトゾルデリバリー機能、樹状細胞の活性化能を反映しているものと考えられる。担がんマウスを用いた免疫治療実験を行ったところ、脂質系アジュバントであるMPLAを脂質膜に含むリポソームを免疫に用いた場合、すべての

多糖誘導体修飾リポソームで強力な抗腫瘍効果が確認された (Figure 7)。MPLAを含まないリポソームの場合、MGlu-Dex修飾リポソーム、MGlu-Man修飾リポソームではその抗腫瘍活性が減少したのに対し、MGlu-Curd修飾リポソームはMPLA非存在下にも関わらずほとんどのマウスで腫瘍が消滅するほど強力な免疫を誘導した (Figure 7)。したがって、抗原デリバリー機能に加えてそれ自体が強いアジュバント作用をもつMGlu-Curd修飾リポソームは、既存の脂質アジュバントが不要な免疫誘導システムへの利用が期待される。

多糖誘導体のアジュバント作用は、多糖の主鎖だけでなく、pH応答性官能基によってもコントロールできる。MGlu-Dexよりも疎水性の高い2-カルボキシシクロヘキサン-1-カルボキシ基を導入したCHex-Dexを合成し、樹状細胞に作用させたところ、MGlu-Dexに比べてIL-12の産生量が100倍以上となり、樹状細胞を劇的に活性化させるアジュバント作用をもつことが明らかとなった (Figure 8)²⁹⁾。CHex-Dexを修飾したリポソームの樹状細胞による取り込み量は、MGlu-Dex修飾リポソームに比べて20倍以上であり、疎水的なスパー構造の導入によって、樹状細胞へのアフィニティを劇的に高められることがわかった (Figure 8)。

CHex-Dex修飾リポソームはpH 7以下で内包物を放出し、樹状細胞のサイトゾルにOVAを導入した²⁹⁾。しかしながら、CHex-Dex修飾リポソームを担がんマウスに皮下投与しても、抗腫瘍効果がまったく確認されなかった (unpublished data)。CHex-Dex修飾リポソームは

Figure 7. (Color online) Immunotherapeutic effect by polysaccharide derivative-modified liposomes with or without monophosphoryl lipid A (MPLA). OVA-loaded liposomes were subcutaneously administered to E.G7-OVA tumor-bearing mice on Days 5 and 12.

Figure 8. (Color online) (Left) IL-12 production from DC2.4 cells treated with dextran derivatives for 24 h. (Right) Fluorescence intensity for DC2.4 cells treated with dextran derivative-modified liposomes.

その高い疎水性のため、投与部位で非特異的に取り込まれ、ターゲット細胞である樹状細胞への取り込み効率が低かったものと考えられる。CHex-Dex 修飾リポソームは *in vitro* では高い取り込み、サイトゾルデリバリー機能、樹状細胞活性化作用を有しているため、*ex vivo* で樹状細胞を活性化し、これを投与する樹状細胞ワクチンとして利用できる。

4 免疫抑制解除システムとの併用

近年の免疫チェックポイント阻害剤の臨床成果が示すように、がん患者の体内においてがん免疫が抑制されていることが明らかになり、がん特異的な T 細胞応答

の誘導に加えて、がん免疫の抑制を解除することの重要性が指摘されている。腫瘍細胞や制御性 T 細胞 (Treg) から産生されるサイトカイン TGF- β は、CTL を不活性化し、Treg を活性化することで、抗腫瘍免疫を抑制する。そこで、TGF- β 受容体の作用を阻害する低分子薬物 (SB505124) を、MGLu-Dex 修飾リポソームと併用することによって、腫瘍微小環境の免疫抑制解除と、CTL 誘導の相乗効果によって高いがん治療効果を実現する免疫誘導システムの開発を目指した³⁰⁾。ここでは、すでに抗原特異的な CTL を誘導できることがわかっている MGLu-Dex 修飾リポソームを用いた、以下 OVA lip と記載する。疎水性薬物である SB505124 は PEG 修飾リポ

Figure 9. (Color online) Individual tumor volumes of C57BL/6 mice treated with OVA lip or OVA lip/SB lip. E.G7-OVA cells (1×10^6 cells/site) were transplanted subcutaneously to the left and right backs of mice. OVA lip was injected subcutaneously into the back of each mouse, as shown in the illustration. Then SB lip was administered into the left tumor at days 7 and 14 after tumor inoculation. Each line indicates the tumor volume change for each mice ($n = 4$).

ソームの脂質膜内に包埋した。以下SB lipと記載する。まず、マウスの背部左右二か所にE.G7-OVA細胞を接種して二つの腫瘍をもつマウスを作製した。OVA lipは背部皮下に投与し、SB lipは左の腫瘍に局注し、その後の腫瘍成長を調べた (Figure 9)。OVA lipのみを投与したマウスの場合、左右両方の腫瘍体積が一旦縮小するものの、4匹中3匹のマウスで腫瘍が再成長した。この結果は、OVA lipによって誘導されたOVA特異的CTLはE.G7-OVA細胞を特異的に殺傷するが、同時に誘導されたTregなどの免疫抑制細胞のはたらきによって、腫瘍が免疫から逃れたことを示唆している。そこで、TGF- β シグナルの阻害剤をリポソームに包埋して腫瘍に局所投与したところ、投与した側の腫瘍のみ、ほぼすべてのマウスで完全に縮退した。一方で投与していない反対側の

腫瘍は、OVA lipのみの投与の場合と同様に、一旦縮小するものの再成長した。TGF- β シグナルの阻害によって、腫瘍内の免疫抑制環境が解除され、CTLの活性が維持された結果、腫瘍をほぼ完全に縮退させることができたものと考えられる。

次に、SB lipの投与経路の検証を行った。ここでは、SB lipの併用による効果を明確化するために、OVA lipの投与量を10分の1とした。投与量が10分の1でも、OVA lipの皮下投与によって腫瘍は縮退し、生理食塩水を投与した群に比べて、マウスの生存期間の延長が確認された (Figure 10)³⁰。次に、OVA lipを皮下投与し、SB lipを腫瘍に局注した場合、マウスの腫瘍体積変化には大きな影響がなかったが、マウスの生存率については、OVA lipのみの投与に比べ改善が見られ、8匹中2匹の

Figure 10. (Color online) Antitumor effects induced by combination of OVA lip and SB lip. E.G7-OVA cells (1×10^6 cells/mouse) were transplanted subcutaneously into the left back of C57BL/6 mice. Then the tumor volume was monitored. OVA lip was injected subcutaneously to the back of mice at day 7. Then SB lip was injected intratumorally or intravenously on days 7, 10, and 13 after tumor inoculation, as shown in the top illustration. Tumor volumes (A) and survival (%) (B) of tumor-bearing mice were followed from tumor cell inoculation.

マウスで腫瘍が完全に縮退した。一方、OVA lip を皮下投与したマウスに SB lip を尾静脈投与した場合、投与後3日目から腫瘍体積が著しく減少し、マウスの生存率が大幅に向上した (Figure 10)。このように、抗原投与量を減らしても、SB lip との併用によって、強力な抗腫瘍効果が得られることがわかった。

SB lip の併用による抗腫瘍効果の増強メカニズムを調べるため、腫瘍における Treg, CTL の浸潤を調べた。がん免疫の抑制に大きく寄与する Treg の割合は、OVA lip および SB lip の併用によってほとんど変化しなかった。OVA lip と SB lip の尾静脈投与を併用した場合、Treg の割合に減少傾向が見られたが、有意差は確認されなかった。次に、腫瘍内における CTL の浸潤を組織切片の免疫染色により評価した (Figure 11)。OVA lip を皮下投与すると、腫瘍中の CTL の割合が増加し、OVA lip による抗原のサイトゾルデリバリーによって、確かに CTL が誘導され、腫瘍に浸潤して治療効果をもたらしていることがわかった。OVA lip と SB lip の局所投与を併用した場合、CTL の割合に上昇傾向が見られた。一方、OVA lip と SB lip の尾静脈投与を併用した場合、OVA lip 単独投与に比べて腫瘍内の CTL の割合が2倍以上増加し、これが高い治療効果の要因であることが示唆された³⁰⁾。

以上の結果を踏まえて、SB lip の併用による抗腫瘍効果の増強メカニズムについて考察する。まず、OVA を封入した MGlu-Dex 修飾リポソームの皮下投与によ

て、皮膚組織の樹状細胞のサイトゾルに抗原がデリバリーされ、この樹状細胞がリンパ節や脾臓へと移行して抗原提示し、OVA 特異的な CTL が誘導される。この CTL が腫瘍組織に移動して、抗腫瘍効果を示すことになる。SB lip を腫瘍内へ投与した場合、SB lip は腫瘍内では TGF- β による CTL の不活性化を抑制するが、CTL が腫瘍に移動する過程の血中・脾臓において、腫瘍組織から産生され全身に分布した TGF- β により不活性化またはアポトーシスに陥り、腫瘍組織への CTL 浸潤の増加と抗腫瘍効果の大幅な向上は見られなかったと考えられる。一方、SB505124 を包埋した PEG 修飾リポソームを尾静脈投与した場合、腫瘍以外の血中、脾臓などに SB lip が分布することになる。全身に分布した SB lip から SB505124 が徐放され、抗原提示の過程、誘導された CTL が移動する過程、および腫瘍内において CTL の不活性化とアポトーシスを阻害したことで、大量の CTL が活性化したまま腫瘍内に移動し、強い抗腫瘍効果を示したと考えられる。

5 今後の展望

本報では、pH 応答性高分子を修飾したリポソームによる抗原の細胞内デリバリーと免疫誘導システムへの展開について、筆者らのこれまでの成果を概説した。ここではモデル抗原である OVA に関するデータのみを示したが、本システムはヒト腫瘍由来がん抗原ペプチドのデリバリーにも適用可能である。これらのがん抗原ペプチ

Figure 11. Infiltration of CD8-positive T cells in tumor. E.G7-OVA cells were transplanted subcutaneously into the left back of each mouse. On day 7, OVA lip was injected subcutaneously into the back of each mouse. Then SB lip was administered intratumorally or intravenously. On days 10 and 14, tumors were dissected from mice. CD8-positive cells in tumor sections were stained with anti-mouse CD8 antibody labeled with Alexa Fluor488 and were observed using CLSM (Left). CD8-positive cells in tumor-derived cells were detected using flow cytometry after staining with phycoerythrin-labeled CD8 antibody (Right).

ドと pH 応答性高分子修飾リポソームを組合せることで、抗原特異的な免疫応答の誘導が確認されていることから^{31),32)}、がん免疫療法実現のための抗原ペプチドキャリアとして有用性が高い。本報で示したポリカルボン酸誘導体は、側鎖構造・主鎖によって膜融合をひき起こす pH をコントロールすることができる。ここでは樹状細胞サイトゾルへの抗原デリバリーについて述べたが、高分子構造の調節によって、初期エンドソームや後期エンドソーム内で選択的に抗原を放出させ、異なる免疫応答をひき起こすことも可能である。さらに、多糖の生理活性を利用し、多糖の構造や側鎖構造およびその導入率によって、免疫細胞の活性化状態をコントロールできることが示唆された。今後、多糖誘導体の化学構造と免疫細胞上の受容体との相互作用についてより詳細に検証することで、高活性なアジュバント開発のための新たな設計指針が創出できるものと期待される。最後に、免疫抑制シグナルの解除が抗原封入りポソームによる抗腫瘍免疫の誘導・持続に重要であることが示された。今後は、高分子構造のさらなる最適化によって抗原デリバリー機能、免疫細胞活性化機能をさらに高めるとともに、免疫抑制解除システムとの併用を行うことで、免疫応答を自在に操る多機能型免疫誘導システムの構築に取り組んでいきたい。

謝 辞 本報における研究成果は、大阪府立大学大学院工学研究科応用化学分野の故・河野健司教授および原田敦史教授のご指導のもと、得られたものです。研究に携わってくれた田島直樹氏、能崎優太博士(関西大学)、山口彩加氏、上杉慎也氏をはじめとする研究室の皆さまに深く感謝の意を表します。ま

た、本研究を遂行するにあたり、科学研究費補助金研究活動スタート支援(22800055)、若手研究(B)(25750177)、基盤研究(B)(15H03024)より助成をいただきました。関係各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) F. S. Hodi, S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, W. Akerley, A. J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J. M. Vaubel, G. P. Linette, D. Hogg, C. H. Ottensmeier, C. Lebbé, C. Peschel, I. Quirt, J. I. Clark, J. D. Wolchok, J. S. Weber, J. Tian, M. J. Yellin, G. M. Nichol, A. Hoos, and W. J. Urbani, *N. Engl. J. Med.*, **363**, 711 (2010).
- 2) P. C. Tumeh, C. L. Harview, J. H. Yearley, I. P. Shintaku, E. J. M. Taylor, L. Robert, B. Chmielowski, M. Spasic, G. Henry, V. Ciobanu, A. N. West, M. Carmona, C. Kivork, E. Seja, G. Cherry, A. Gutierrez, T. R. Grogan, C. Mateus, G. Tomasic, J. A. Glaspy, R. O. Emerson, H. Robins, R. H. Pierce, D. A. Elashoff, C. Robert, and A. Ribas, *Nature*, **515**, 568 (2014).
- 3) J. E. Hudak, S. M. Canham, and C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 69 (2014).
- 4) W. Hugo, J. M. Zaretsky, L. Sun, C. Song, B. H. Moreno, S. Hu-Lieskovan, B. Berent-Maoz, J. Pang, B. Chmielowski, G. Cherry, E. Seja, S. Lomeli, X. Kong, M. C. Kelley, J. A. Sosman, D. B. Johnson, A. Ribas, and R. S. Lo, *Cell*, **165**, 35 (2016).
- 5) N. A. Rizvi, M. D. Hellmann, A. Snyder, P. Kvistborg, V. Makarov, J. J. Havel, W. Lee, J. Yuan, P. Wong, T. S. Ho, M. L. Miller, N. Rekhtman, A. L. Moreira, F. Ibrahim, C. Bruggeman, B. Gasmir, R. Zappasodi, Y. Maeda, C. Sander, E. B. Garon, T. Merghoub, J. D. Wolchok, T. N. Shumacher, and T. A. Chan, *Science*, **348**, 124 (2015).

- 6) N. P. Restifo, M. E. Dudley, and S. A. Rosenberg, *Nat. Rev. Immunol.*, **12**, 269 (2012).
- 7) J. Banchereau and R. M. Steinman, *Nature*, **392**, 245 (1998).
- 8) J. Panyam, W. Z. Zhou, S. Prabha, S. K. Sahoo, and V. Labhasetwar, *FASEB J.*, **16**, 1217 (2002).
- 9) T. Akagi, M. Baba, and M. Akashi, *Adv. Polym. Sci.*, **247**, 31 (2012).
- 10) E. M. Bachelder, T. T. Beaudette, K. E. Broaders, J. M. J. Fréchet, M. T. Albrecht, A. J. Mateczun, K. M. Ainslie, J. T. Pesce, and A. M. Keane-Myers, *Mol. Pharmaceutics*, **7**, 826 (2010).
- 11) A. Boudier, A. Aubert-Pouëssel, N. Mebarek, A. Chavanieu, J. Quentin, D. Martire, H. Boukhaddaoui, C. Gérardin, C. Jorgensen, J. M. Devoisselle, P. Louis-Plence, and S. Bégu, *J. Controlled Release*, **154**, 156 (2011).
- 12) T. Nochi, Y. Yuki, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, T. Kohda, N. Harada, I. G. Kong, A. Sato, N. Kataoka, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, H. Tsukada, S. Kozaki, K. Akiyoshi, and H. Kiyono, *Nat. Mater.*, **9**, 572 (2010).
- 13) J. Kunisawa, T. Nakanishi, I. Takahashi, A. Okudaira, Y. Tsutsumi, K. Katayama, S. Nakagawa, H. Kiyono, and T. Mayumi, *J. Immunol.*, **167**, 1406 (2001).
- 14) L. Bungener, K. Serre, L. Bijl, L. Leserman, J. Wilschut, T. Daemen, and P. Machy, *Vaccine*, **20**, 2287 (2002).
- 15) T. Nakamura, R. Moriguchi, K. Kogure, N. Shastri, and H. Harashima, *Mol. Ther.*, **16**, 1507 (2008).
- 16) N. Murthy, J. R. Robichaud, D. A. Tirrell, P. S. Stayton, and A. S. Hoffman, *J. Controlled Release*, **61**, 137 (1999).
- 17) K. Kono, K. Zenitani, and T. Takagishi, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1193**, 1 (1994).
- 18) K. Kono, T. Igawa, and T. Takagishi, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1325**, 143 (1997).
- 19) N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, and K. Kono, *Bioconjugate Chem.*, **19**, 1040 (2008).
- 20) E. Yuba, A. Harada, Y. Sakanishi, and K. Kono, *J. Controlled Release*, **149**, 72 (2011).
- 21) D. K. Struck, D. Hoekstra, and R. E. Pagano, *Biochemistry*, **20**, 4093 (1981).
- 22) E. Yuba, A. Harada, Y. Sakanishi, S. Watarai, and K. Kono, *Biomaterials*, **34**, 3042 (2013).
- 23) E. Yuba, *Major Histocompatibility Complex*, **20**, 181 (2013).
- 24) E. Yuba, N. Tajima, Y. Yoshizaki, A. Harada, H. Hayashi, and K. Kono, *Biomaterials*, **35**, 3091 (2014).
- 25) K. Kataoka, T. Muta, S. Yamazaki, and K. Takeshige, *J. Biol. Chem.*, **277**, 36825 (2002).
- 26) E. P. McGreal, M. Rosas, G. D. Brown, S. Zamze, S. Y. Wong, S. Gordon, L. Martinez-Pomares, and P. R. Taylor, *Glycobiology*, **16**, 422 (2006).
- 27) V. Sukhithasri, N. Nisha, L. Biswas, V. Anil Kumar, and R. Biswas, *Microbiol. Res.*, **168**, 396 (2013).
- 28) E. Yuba, A. Yamaguchi, Y. Yoshizaki, A. Harada, and K. Kono, *Biomaterials*, **120**, 32 (2017).
- 29) E. Yuba, S. Uesugi, M. Miyazaki, Y. Kado, A. Harada, and K. Kono, *Membranes*, **7**, 41 (2017).
- 30) E. Yuba, S. Uesugi, Y. Yoshizaki, A. Harada, and K. Kono, *Med. Res. Arch.*, **5**, 1243 (2017).
- 31) M. A. Sayem, Y. Tomita, A. Yuno, M. Hirayama, A. Irie, H. Tsukamoto, S. Senju, E. Yuba, T. Yoshikawa, K. Kono, T. Nakatsura, and Y. Nishimura, *OncolImmunology*, **5**, e1062209 (2016).
- 32) M. Hirayama, Y. Tomita, A. Yuno, H. Tsukamoto, S. Senju, Y. Imamura, M. A. Sayem, A. Irie, Y. Yoshitake, D. Fukuma, M. Shinohara, A. Hamada, H. Jono, E. Yuba, K. Kono, K. Yoshida, T. Tsunoda, H. Nakayama, and Y. Nishimura, *OncolImmunology*, **5**, e1123368 (2016).

[Comprehensive Papers]

Development of Immunity-Inducing Systems Using pH-Responsive Polysaccharides and Liposomes

Eiji YUBA*¹

*¹Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University (1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai 599-8531, Japan)

Induction of cancer-specific cellular immunity is necessary for establishment of cancer immunotherapy. For induction of cellular immunity, antigen delivery to immunocompetent cells such as dendritic cells and activation of these cells into a suitable state for immunity-induction are required. Here, intracellular antigen delivery systems have been developed using antigen-loaded liposomes modified with pH-responsive fusogenic polymers. Furthermore, polysaccharide-based pH-responsive polymers have been synthesized by introduction of carboxylated moieties to utilize polysaccharide-derived immunity-activation functions. Polysaccharide derivative-modified liposomes were taken up by dendritic cells efficiently and achieved cytoplasmic delivery of antigenic proteins via membrane fusion with endosomal membranes responding to weakly acidic pH in endosomes. After subcutaneous administration of these liposomes to mice, antigen-specific cellular immunity was induced by cytoplasmic delivery of antigen and activation property of immune cells derived from the polysaccharide backbone. In addition, combination of polysaccharide derivative-modified liposomes and TGF- β signaling inhibitor-embedded PEG-modified liposomes induced strong antitumor effects in tumor-bearing mice through induction of cellular immunity and cancelling of immunosuppression by the tumor.

KEY WORDS pH-Sensitivity / Liposome / Polysaccharide / Dendritic Cell / Cancer Immunotherapy / Cellular Immunity / Curdlan / TGF- β /

(Received April 2, 2018; Accepted June 13, 2018; Advance Publication August 1, 2018)

[Kobunshi Ronbunshu, **75**, 433—443 (2018)]

©2018, The Society of Polymer Science, Japan