

# 論 文 要 旨

## Targeting of Antigen to Dendritic Cells with Poly( $\gamma$ -Glutamic Acid) Nanoparticles Induces Antigen-Specific Humoral and Cellular Immunity

〔 樹状細胞をターゲットとした抗原固定化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子  
による抗原特異的な液性免疫と細胞性免疫の誘導 〕

宇都 倫史

### 【序論および目的】

感染病原体に対する特異的な免疫反応の誘導はワクチンにとって重要である。細胞内の病原体（結核やマラリア）対しては細胞性免疫，細胞外の病原体に対しては液性免疫の誘導が重要である。現在，効果的なアジュバントとして結核死菌とミネラルオイルをエマルジョン化した Complete Freund's Adjuvant (CFA) があるが，強い炎症反応を惹起するため，ヒトに用いる事はできない。また，ヒトに使用できるものとして，アルミニウムをベースにしたアジュバントがあるが，免疫誘導効果は弱い。

樹状細胞はすぐれた抗原提示細胞であり，ナイーブ T 細胞を活性化させる事ができる。未成熟な樹状細胞は，種々のサイトカインや病原体由来の物質などにより成熟し，二次リンパ器官に移動した後，抗原を T 細胞に提示する事でエフェクター T 細胞を誘導する。これらのことから，樹状細胞をターゲットとした抗原のデリバリーを行うことにより，効果的な抗原特異的免疫反応の誘導を期待する事が出来る。

ポリ  $\gamma$  グルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) ナノ粒子は，納豆菌の菌体成分由来のペプチドからできており，高い安全性が期待されるとともに，ヒトの体に存在している  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase により分解される（生分解性）。また，このナノ粒子はさまざまな分子（タンパクやペプチド）を表面に固定化あるいは粒子の内部に包含することが可能で，抗原の担体としても優れていると考えられる。

そこで本研究では， $\gamma$ -PGA ナノ粒子の樹状細胞に対する効果と，抗原内包ナノ粒子を用いたマウス免疫による抗原特異的免疫誘導について検討した。

### 【材料および方法】

樹状細胞はマウスの骨髄細胞に Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) を加えて培養し，未成熟樹状細胞を誘導すると共に，さらに Lipopolysaccharide (LPS) を加え培養を続けることにより，成熟樹状細胞へと分化させた。 $\gamma$ -PGA ナノ粒子，蛍光色素内包ナノ粒子，および抗原内包ナノ粒子は大阪大学の明石研究室において合成された。ナノ粒子の樹状細胞への取り込みはフローサイトメーター，および共焦点レーザー顕微鏡を用いて測定した。樹状細胞の成熟化は細胞表面分子の発現と培養上清中のサイトカイン濃度，そしてアロ T 細胞

への刺激能力により測定した。マウスを用いた ovalbumin (OVA) 内包ナノ粒子 (OVA-NPs) の免疫実験では、抗原を 0 日目, 7 日目に footpad 経路にて投与し, 21 日目に脾細胞と血清を回収した。脾細胞に対しては細胞障害試験 (CTL assay), 抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞の定量 (ELISPOT assay) を行うと共に, 血清中の抗原特異的抗体を測定した。

## 【結果】

$\gamma$ -PGA ナノ粒子の樹状細胞への取込みは, 他の抗原提示細胞であるマクロファージや B 細胞より優れていることが分かり, それは主に細胞内のリソソームに取込まれ, 取込みは時間および濃度依存的であった。また, 色素ラベル抗原 (OVA-FITC) をナノ粒子に内包する事により, 抗原が単独のときと比較して, より効率良く取込まれることが明らかになった。ナノ粒子を樹状細胞に作用させると, IL-12p40, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 などの炎症性サイトカインの産生や, CD40, CD86 などの補助刺激分子の発現増強が認められ, さらに, アロの T 細胞への刺激能力も高まった。さらに, ナノ粒子の樹状細胞に対する活性化のメカニズムを調べた結果, その作用は MyD88 依存的であり, NF- $\kappa$ B の活性化 (p65 の核内への移行) が認められた。

$\gamma$ -PGA ナノ粒子をマウスに投与すると, 樹状細胞がナノ粒子を主に取込んでいることが明らかとなり, さらに CD8 陽性の樹状細胞もナノ粒子を取込んでいることが分かった。また, 脾臓中の樹状細胞の成熟化も認められ, マウス血清中の炎症性サイトカインの上昇も認められた。マウスへ OVA-NPs を投与し, 21 日目に回収した脾細胞を用いて CTL アッセイを行った結果, CFA を用いて免疫したマウスに比べより, 高い細胞障害性を示し, また, ELISPOT assay においても, 抗原に対し高い IFN- $\gamma$  の産生を示した。また, 血清中の抗体価の測定においては, 抗原特異的 IgG (IgG1, IgG2a) が認められた。

## 【結論及び考察】

ナノ粒子は樹状細胞に効率良く取込まれると共に, 樹状細胞の活性化能力も持ち合わせていることが分かり,  $\gamma$ -PGA ナノ粒子自体が強いアジュバント効果を持っていることが明らかになった。また, CD40 と IL-12 は自然免疫から獲得免疫への誘導に重要であるが, 樹状細胞に対するナノ粒子の刺激においては, どちらも誘導されるところから, 樹状細胞が T 細胞を直接刺激し獲得免疫系を誘導していると考えられる。CD8 陽性樹状細胞は CTL を誘導する細胞として知られているが, In vitro の実験において CD8 陽性樹状細胞がナノ粒子を取込んでいる事が明らかになった事より, ナノ粒子を取込んだ樹状細胞がダイレクトに CD8 陽性 T 細胞を刺激していると考えられる。さらに, 抗原内包ナノ粒子を用いた免疫実験により, 抗原特異的 T 細胞の活性化と抗体産生が見られた事より, 抗原担体としてナノ粒子を用いると, 強い細胞性免疫と, 液性免疫が誘導されることが明らかになった。以上のことから, ナノ粒子は高い抗原運搬能と強いアジュバント活性を持っており, ワクチン担体として非常に優れていると思われる。

(The Journal of Immunology, in press)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 18 号	学位申請者	宇都 倫史
審査委員	主査	榮鶴 義人	学位 博士 (医学)
	副査	杉村 和久	副査 黒野 祐一
	副査	松山 隆美	副査 松口 徹也

### Targeting of Antigen to Dendritic Cells with Poly( $\gamma$ -Glutamic Acid) Nanoparticles Induce Antigen-Specific Humoral and Cellular Immunity

〔 樹状細胞をターゲットとした抗原固定化  $\gamma$ -PGA ナノ粒子による抗原特異的な液性免疫と細胞性免疫の誘導 〕

ワクチンによる感染防御には、細胞内病原体には細胞性免疫、細胞外病原体には液性免疫を誘導することが重要である。その際、樹状細胞は、ナイーブ T 細胞に抗原提示を行い、エフェクター T 細胞を誘導する。従って、樹状細胞をターゲットとした抗原のデリバリーを行うことにより、効果的な抗原特異的免疫反応の誘導を期待できる。ポリ  $\gamma$  グルタミン酸 ( $\gamma$ -PGA) ナノ粒子は、納豆菌の菌体成分由来のペプチドよりできており、ヒトに存在する  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase により分解される (生分解) ため、高い安全性が期待できる。このナノ粒子は様々な分子を表面に固定化あるいは粒子内に内包することが可能であり、抗原の担体としても優れていると考えられる。そこで本研究では、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子の樹状細胞に対する効果と、抗原内包ナノ粒子を用いたマウスにおける抗原特異的免疫誘導について検討し、以下の結果を得た。

- (1)  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の樹状細胞への取り込みは、他の抗原提示細胞より優れており、時間及び濃度依存的に、樹状細胞のライソソームに取り込まれた。蛍光色素標識 ovalbumin (OVA-FITC) は、抗原単独よりも、ナノ粒子に内包することにより効率よく取り込まれた。
- (2) ナノ粒子が樹状細胞に作用すると、IL-12p40、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生、CD40、CD86 などの補助刺激分子の発現増強が認められ、アロの T 細胞の刺激能力も高まった。さらに、樹状細胞の活性化は、MyD88 依存的であり、NF- $\kappa$ B の活性化 (p65 の核内移行) が認められた。
- (3)  $\gamma$ -PGA ナノ粒子をマウスに投与すると、主に樹状細胞と CD8 陽性樹状細胞がナノ粒子を取り込み、脾臓の樹状細胞の成熟、マウス血清中の炎症性サイトカインの上昇が認められた。
- (4) マウスへ OVA ナノ粒子を投与すると、脾細胞に高い細胞傷害性を示す CTL 活性が認められ、ELISPOT アッセイでも抗原に対し高い IFN- $\gamma$  の産生を示した。また、血清中の抗原特異的 IgG (IgG1、IgG2a) が OVA 単独投与群に比して著明に上昇した。
- (5) リステリア特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞エピトープペプチドを固定化した  $\gamma$ -PGA ナノ粒子で免疫したマウスは、致死量のリステリア接種後 11 日で約 80% が生き残ったが、ペプチドのみ、あるいは、ペプチド内包  $\gamma$ -PGA ナノ粒子の投与では感染防御効果を認めなかった。

以上の結果より、 $\gamma$ -PGA ナノ粒子が高い抗原運搬能力と強いアジュバント活性を持っており、ワクチン担体として優れていると結論付けている。

従来良く使用されてきたフロイント完全アジュバント (FCA) は強い炎症を引き起こしヒトには使用できない、ヒトに使用できるアルミニウムをベースとしたアジュバントは免疫誘導能が弱いという弱点があった。本研究は、納豆菌由来の  $\gamma$ -PGA ナノ粒子を用いることにより、これらの弱点を克服し、液性のみならず強い細胞性免疫をも誘導し、実際にリステリア感染症モデルで感染防御能を誘導できる事を実証した。今後、ヒトのワクチン接種においても安全に応用しうる可能性を示した、非常に興味深い研究である。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 18 号		学位申請者	宇都 倫史
審査委員	主査	柴鶴 義人	学位	博士 (医学)
	副査	杉村 和久	副査	黒野 祐一
	副査	松山 隆美	副査	松口 徹也

主査および副査の 5 名は、平成 19 年 4 月 3 日、学位申請者 宇都倫史 に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) ナノ粒子はどれくらいの時間が経つと分解されるのか？

回答)  $\gamma$ -PGA は生体内に存在している  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase により分解される。In vitro の実験においてこの酵素を用い反応させると約 96 時間後には完全に分解する。

質問 2) ナノ粒子に側鎖を導入しているが、側鎖の有無により樹状細胞の活性化が違うのか？また、刺激作用においてポリ  $\gamma$ -PGA が重要なのか？

回答) 主鎖であるポリ  $\gamma$ -PGA の側鎖をフェニルアラニンで修飾することで粒子を形成させる事が出来る。また、原料である  $\gamma$ -PGA では樹状細胞を完全に活性化させる事は出来ず、ナノ粒子を形成する事が重要である。

質問 3) 抗原のナノ粒子への固定化と内包の方法はどう行っているのか？また、内包量はどのように測定しているのか？

回答) DMSO 中に溶解している  $\gamma$ -PGA を水溶液中に添加すると粒子を形成するが、水溶液にあらかじめ定量した抗原を溶解させておき、そこで  $\gamma$ -PGA を粒子化させると、抗原を内包した粒子が作製される。粒子作成後、溶液中の残量抗原量を測定する事によって内包率及び、内包量を算出している。また、表面固定は粒子を作製した後、共有結合で抗原を固定する。

質問 4) ナノ粒子の樹状細胞への刺激作用について TLR の関与を示唆しているが、どのように考えているか？また、LPS で刺激した場合とレスポンスが違うのに、なぜ TLR4 が関与しているのか？その他の分子が関与していないのか？

回答) 注目しているのは TLR2 や TLR4 であり、これらは細胞膜表面に発現しており、細菌や、ウイルスを認識することが知られている。最近では TLR4 のリガンドは LPS だけでなく種々の外来抗原を認識する事が示されている。ナノ粒子は 200 nm 程度のウイルス様をしているため、これらに認識されるのではないかと考えている。また、MyD88 を介したシグナル伝達であるため、TLR を用いてシグナルが入っているのではないかと思われる。今後、細胞内レセプターの関与や、他のサイトカイン産生の違い、細胞内シグナル伝達について解析する必要があると考えている。

質問 5) アロ T 細胞への MLR において LPS、CpG と比べナノ粒子の刺激抗原量が違うが、同一レベルで比較してよいのか？また、粒子による刺激が急激に上がっている様に見えるが閾値があるのか？

回答) ナノ粒子による樹状細胞の活性化には、その程度の量で処理しないと成熟化の検出はできない。LPS や CpG は著しく樹状細胞を活性化させるが、ナノ粒子は効果的に樹状細胞を活性化させると考えている。また、同様の実験を数回行っており、それらでは濃度依存性が認められている。

質問 6) 樹状細胞への刺激能を見ているが、ナノ粒子による樹状細胞の増殖を見ているのではないのか？

回答) 樹状細胞は最終分化段階の細胞なので、それ自身はほとんど増殖しない。また、MLR の実験においては、樹状細胞を放射線で処理し増殖能を止めているため、純粋にアロ T 細胞への刺激能力を見ている。

質問 7) シグナル伝達系で各種阻害薬を用いた実験をしているが、MAP キナーゼ系がリン酸化されているかどうか検討しているのか？

回答) 細胞の活性化後に最終的に産生されてくるタンパクであるサイトカインを測定している。リン酸化は測定していない。

質問 8) CTL 誘導のクロスプレゼンテーションを考えているが、ライソゾームは Class II 経路であり、Class I に提示するにはエンドソームからプロテアソームの経路が考えられる。これに関して解析していないのか？

回答) 樹状細胞はクロスプレゼンテーションを行う細胞として知られているため、その機構を狙いターゲット細胞として考えている。Class I 経路については今後解析する必要があると考えている。

質問 9) ナノ粒子の取込みは i.v. 補助刺激の発現レベルの測定は i.p. で行っており、免疫実験では footpad、intranasal で行っているが、投与経路を変えた理由は？

回答) ナノ粒子の取込みの実験には FITC 標識ナノ粒子を用い、樹状細胞の活性化の実験では粒子自身を用いており、用いた粒子が異なる。また、それぞれ検出可能なレベルでの投与を行っているため、粒子の量が違う。検出時間については 4 時間程度で検出レベルに達すると考えられる。gp120 ナノ粒子の投与では、経鼻で 1 回のみの方が高細胞性免疫を誘導できるという結果が得られており、数回に渡り投与すると、かえって効果が落ちる結果が得られている。また、投与経路の違いによる免疫レスポンスの差の解析は今後の課題である。

質問 10) In vivo の実験において大体 2-3 日で成熟樹状細胞が消失しているが、より効果的な免疫誘導を試みるならば数回投与した方が良いのではないのか？

回答) Footpad 経由の免疫では細胞性免疫を誘導するなら 1 回、液性免疫を誘導するなら 2 回の投与が最適であり、免疫誘導の差があるデータが得られている。投与回数の違いによる免疫応答の解析が必要であると考えている。

質問 11) マウス個体を用いた実験で、樹状細胞を活性化させると自己免疫疾患に陥りやすくなるのでは？

回答) gp120 を内包したナノ粒子の投与では、半年以上に渡って解析しているが特に目立った症状は現れていない。

質問 12) 抗原内包ナノ粒子の投与により IgG2a が出ており、IgG1 も出ているが、Th2 系についてはサイトカイン等検討していないのか？また、経鼻投与による分泌型 IgA の産生はないのか？

回答) Footpad の 2 回投与によって抗原特異的抗体産生はするが、1 回投与では抗体は産生しない。また、1 回の経鼻投与では分泌型 IgA の産生は起こらない。投与経路、投与回数により細胞性免疫と液性免疫のバランスを制御出来ると考えられる。

質問 13) ナノ粒子は免疫系全体を動かしており、さらに炎症性サイトカインの IL-6 が産生されていたが、過剰な免疫応答は起こらないのか？

回答) 血清中のサイトカインを測定するときは過剰量のナノ粒子の投与を行っているが、footpad 投与の免疫では足の腫れはほとんど検出できず、高い安全性が示されている。

質問 14) TLR による細胞性免疫、抗体産生を示しているが、最近では TLR をノックアウトしたマウスでも抗体産生が起こるとの報告がある。今後、ノックアウト系のマウスを用いて行った方が良いのではないのか？

回答) 詳細な免疫応答のメカニズムを解明する上でも、今後ノックアウト系の樹状細胞や個体を用いて検討する必要があると考えている。

質問 15) リステリアの感染実験で、ペプチドを内包したナノ粒子の免疫で効果が無いのはなぜか？

回答) 表面固定の粒子は化学結合で強固に結合されており、細胞に取込まれてから分解される。これに対し内包は混合の方法で作製しており、ペプチドが粒子の中から漏れ易く、分解され易いと考えられる。ペプチドを用いる場合は表面に固定させなければならない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。