

## 主論文の要旨

Development of highly immunogenic vaccine by using dendritic cell-targeting bio-nanocapsule

論文題目 (樹状細胞標的化バイオナノカプセルを用いた高免疫原性ワクチンの創製)

氏名 松尾 英典

## 論文内容の要旨

19世紀以降、感染症予防には病原体を原料とする生ワクチン、不活化ワクチン、トキソイドワクチンが使用されてきた。これらは高い免疫原性を示す一方で、病原体の感染性及び毒性による副作用が常に問題となっていた。20世紀後半に発展した遺伝子工学により、病原体の構成成分の一部を大量生産させて抗原とした、安全性の高いサブユニットワクチンが開発された。しかし、病原体の断片化により免疫原性が低くなり、宿主に十分な免疫応答を惹起できないケースが頻発した。そこで、ナイーブT細胞に抗原提示する樹状細胞の成熟化を促す自然免疫を惹起するアジュバント（免疫賦活剤）との併用投与が用いられているが、作用機序の全容が明らかでなく、宿主に過剰な免疫応答を惹起する危険性の高いアジュバントも少なくない。以上の状況は、樹状細胞からナイーブT細胞への抗原提示を促進する「樹状細胞標的化能」と、安全に自然免疫を惹起する「樹状細胞成熟化能」を併せ持つナノキャリアが開発できれば、アジュバントを使用せずに自然免疫と獲得免疫を同時に効率よく誘導できることを示唆していた。

### 1. 樹状細胞標的化ナノキャリアの開発

本研究で使用する、生体内ピンポイント薬剤送達用ナノキャリア・バイオナノカプセル (BNC, bio-nanocapsule) は、B型肝炎ウイルス (HBV, hepatitis B virus) 表面抗原Lタンパク質を出芽酵母で過剰発現させて得た、平均直径約 50 nm の中空ナノ粒子であり、外周に存在する pre-S 領域に含まれるヒト肝臓特異的センサーと細胞膜透過ドメインにより、HBV と同様にヒト肝臓特異的に感染しエンドサイトーシスにより肝細胞内に侵入することができる。その際、電気穿孔法により BNC 内部、化学修飾法により BNC 外周、またはリポソーム融合法により BNC-リポソーム複合体内に薬剤を搭載すると、BNC はヒト肝臓特異的ナノキャリアになる。そこで、ヒト肝臓特異的セ

ンサーを Protein A 由来のイムノグロブリン G (IgG) Fc 結合ドメイン (Z ドメイン) の 2 量体 (ZZ タグ) に置換して、提示した抗体の特異性依存的に薬剤送達できる ZZ タグ提示型 BNC (ZZ-BNC) を作製した。

次に、樹状細胞特異的抗原であるインテグリン、Fc 受容体、レクチン、Ig 様受容体等に対する抗体を ZZ-BNC 表層に提示させ、マウス脾臓由来樹状細胞への接着能を *in vitro* で検討し、尾静脈内投与したマウスの脾臓内樹状細胞への集積能を *in vivo* で検討した。その結果、抗 CD11c-IgG (clone N418) を提示した ZZ-BNC は脾臓内樹状細胞の約 62% を感作できることが判明した。これは既報のナノキャリアと比べて極めて高い樹状細胞標的化能であった。また、本抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC を一般的なワクチン投与経路である皮下投与及び筋肉内投与に供したところ、接種部位近傍の所属リンパ節内樹状細胞に高度に取り込まれることも判明した。さらに、カチオン性リポソームに日本脳炎ウイルス (JEV, Japanese encephalitis virus) エンベロープタンパク質由来 D3 抗原を封入して、本抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC と複合体化し、マウス尾静脈内に投与したところ、他の対照ワクチンと比較して効率的な D3 特異的抗体の産生が観察された。一方、皮下投与した本複合体は抗体を産生しなかったことから、リポソームは投与経路により不安定化すると考えられた。そこで、抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC の表層にオボアルブミン (OVA, ovalbumin) を化学修飾して、マウス脾臓由来樹状細胞への集積を *in vitro* で検討したところ、約 67% の樹状細胞に OVA が集積し、これは ZZ-BNC 単独の 4.5 倍、アイソタイプ IgG 提示 ZZ-BNC の 5.9 倍の集積量であった。以上から、抗原を化学修飾した抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC は樹状細胞標的化ナノキャリアとして非常に有望であることが証明された。

## 2. 抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC の樹状細胞成熟化能

OVA を化学修飾した抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC 複合体を、マウス脾臓由来樹状細胞に *in vitro* で作用させ、樹状細胞活性化マーカーである T 細胞副刺激因子 (CD80/CD86) および腫瘍壊死因子受容体 (CD40) の発現をフローサイトメーターで解析したところ、OVA 単独では活性化マーカーに影響を与えなかったが、同複合体は同マーカーの発現を誘導した。これは、ZZ-BNC に含まれる高マンノース型糖鎖、Z ドメイン、抗 CD11c-IgG が、樹状細胞表層のパターン認識受容体、Ig 様受容体、CD11c/CD18 (補体レセプター 4 型) とそれぞれ相互作用した結果と考えられ、抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC 複合体が自然免疫活性化能 (アジュバント活性) を有することを示していた。

## 3. OVA 表層提示抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC の獲得免疫誘導能

OVA を化学修飾した抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC 複合体をマウスに皮下投与して、脾臓細胞を取り出し、OVA 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による細胞性免疫をフローサイトメーターで、OVA 特異的なヘルパー T 細胞 (Th 細胞) による液性免疫をサイトカイン ELISA で評価した。その結果、同複合体投与群の OVA 特異的 CTL の割合及び Th1 細胞による OVA 応答性インターフェロン  $\gamma$  分泌量は、OVA 単独及び OVA 表層提示 ZZ-BNC

よりも有意に高かったことから、抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC 複合体は細胞性免疫及び液性免疫の誘導において有効であることが示された。次に、同複合体を皮下投与したマウスの血清に含まれる抗 OVA-IgG1 価と抗 OVA-IgG2a 価を ELISA により解析したところ、前者は陽性対照であるアラム併用投与群に匹敵するほど対象ワクチンよりも高く、後者も同様に対照ワクチンよりも高かった。IgG1 及び IgG2a は、Th2 由来のインターロイキン 4 及び Th1 由来のインターフェロン  $\gamma$  によりそれぞれ誘導される T 細胞性免疫応答の指標であることから、抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC 複合体は抗原特異的抗体産生、Th1 性免疫応答、及び Th2 性免疫応答を強力に誘導することが判明した。

#### 4. D3 表層提示抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC による感染防御誘導能

前述の JEV 由来 D3 抗原を化学修飾した抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC 複合体を調製し、マウスに皮下投与し、血清中の抗 JEV-IgG 価を ELISA により解析したところ、同複合体だけでなく、抗体提示のない D3 表層提示 ZZ-BNC 複合体、D3 結合抗 CD11c-IgG の対照ワクチン群も十分な抗 JEV-IgG 価を示した。その後、半数致死量の 50 倍量の JEV をチャレンジしたところ、D3 表層提示抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC 複合体投与群は 80% の個体が生存し、D3 表層提示 ZZ-BNC 複合体は 50%、D3 結合 CD11c-IgG は 33% であった。この結果は、D3 表層提示抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC 複合体が、抗 JEV-IgG の効率的な産生に加え、樹状細胞成熟化及び各種 T 細胞性の効率的な免疫応答を対照ワクチンよりも強力に誘導し、JEV 感染防御に寄与したと考えられた。以上の結果は、抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC 複合体を用いるワクチン基盤技術は、従来型ワクチンに対して感染防御ワクチンとしての高い優位性を示した。

本研究で開発した抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC 複合体(樹状細胞標的化バイオナノカプセル)は、①ZZ-BNC に含まれる高マンノース糖鎖、ZZ ドメイン、抗 CD11c-IgG による高度な樹状細胞標的化能、②BNC の多様な抗原搭載能力、③BNC の HBV 由来の細胞質内侵入能、④ZZ-BNC に含まれる高マンノース糖鎖、ZZ ドメイン、抗 CD11c-IgG による樹状細胞成熟化能、を併せ持つ高度なワクチン用ナノキャリアである。その結果、アジュバントを使用することなく、樹状細胞成熟化を通して自然免疫を効率的に惹起可能で、その後の抗原特異的 CTL および Th 細胞の分化誘導、抗原特異的 IgG の産生に代表される獲得免疫も効率的に誘導可能であった。また、JEV 感染防御において、樹状細胞標的化バイオナノカプセルは従来型ワクチンよりも細胞性免疫誘導に効果的であったことから、今後は細胞性免疫誘導が重要なガン免疫療法、液性免疫誘導だけでは治療が望めない各種感染性疾患などへの応用展開が期待される。