

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 松尾 英典

論文 題目

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

(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)

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	黒田	俊一
委員	名古屋大学教授	中野	秀雄
委員	名古屋大学教授	松田	幹
委員	名古屋大学准教授	アンドレス・マツラナ	
委員	名古屋大学准教授	柴田	秀樹

病原体の構成成分の一部を遺伝子工学により大量生産させて抗原としたサブユニットワクチンの使用が拡大している。しかし、病原体の断片化による低免疫原性が頻発するため、抗原を取り込んでナイーブT細胞に提示する樹状細胞（DC）の成熟化を促し、自然免疫を惹起するアジュバント（免疫賦活剤）との併用が必須となっている。しかし、多くのアジュバントは作用機序が明らかでなく、宿主に過剰な免疫応答を惹起する危険性も懸念されている。そこで、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するために、DCの抗原提示を促す「DC標的化能」と安全に自然免疫を惹起する「DC成熟化能」を併せ持つナノキャリアの開発が期待されている。

### 1. DC標的化ナノキャリアの開発

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）は、B型肝炎ウイルス（HBV）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る。これまでにBNC外周に存在するヒト肝臓特異的センサーをProtein A由来イムノグロブリンG（IgG）Fc結合ドメイン2量体（ZZタグ）と置換して、提示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）が開発されてきた。松尾英典は、種々のDC特異的抗原に対する抗体をZZ-BNC表層に提示させ、マウス脾臓由来DCへの*in vitro*接着能を検討し、*in vivo*でマウス脾臓内DCの約62%にZZ-BNCを送達できる抗CD11c-IgG（clone N418）を得た。これは既報ナノキャリアと比べて極めて高いDC標的化能であった。また、本抗CD11c-IgG提示ZZ-BNCをマウス皮下及び筋肉内に投与したところ、所属リンパ節内DCに高度に取り込まれた。さらに、カチオン性リポソームに日本脳炎ウイルス（JEV）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特異的抗体が産生されたことから、抗CD11c-IgG提示ZZ-BNCはDC標的化ナノキャリアとして有望であることが示された。

### 2. 抗CD11c-IgG提示ZZ-BNCのDC成熟化能

モデル抗原オボアルブミン（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DCに*in vitro*で作用させ、DC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、対照分子群は活性化マーカーに影響を与えなかったが、同複合体が活性化マーカーの発現を最も誘導した。これは、ZZ-BNCの有するマンノース型糖鎖、Zドメイン、抗CD11c-IgGが、DC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、同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、脾臓細胞内の OVA 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導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 IFN- $\gamma$ 分泌量は、対照分子群よりも高かったことから、同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、いずれも対照ワクチンよりも高かった。IgG1 及び IgG2a は、Th2 性の IL-4 及び Th1 性の IFN- $\gamma$ によりそれぞれ誘導され T 細胞性免疫応答の指標であることから、同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、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、同複合体投与群は 80%の個体が生存し、D3 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、同複合体が、抗 JEV-IgG の効率的な産生に加え、DC 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。

本研究で開発した抗 CD11c-IgG 提示 ZZ-BNC 複合体 (DC 標的化 BNC) は、①ZZ-BNC が有するマンノース糖鎖、ZZ ドメイン、抗 CD11c-IgG による高度な DC 標的化能、② BNC 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 が有するマンノース糖鎖、ZZ ドメイン、抗 CD11c-IgG による DC 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ことが判明した。その結果、アジュバントを使用することなく、DC に対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、DC 標的化 BNC 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。したがって、本審査委員会は、これらの研究業績は博士 (農学) の学位を授与するに充分価値あるものと認め、論文審査に合格と判定した。