

PEG 修飾リポソームに対する免疫反応を利用した  
新規静脈内投与型ワクチンの開発に関する研究

2014

清水 太郎



## 目次

第一章 序論	1
引用文献	9
第二章 2回目投与 PEG 修飾リポソームの脾臓辺縁帯 B 細胞への結合と 濾胞への輸送メカニズムの解明	
第一節 緒言	10
第二節 実験方法	11
第三節 結果	14
第四節 考察	21
引用文献	23
第三章 抗原封入 PEG 修飾リポソームの脾臓濾胞への輸送現象を利用し た体液性免疫反応の増強に関する検討	
第一節 緒言	28
第二節 実験方法	29
第三節 結果	31
第四節 考察	38
引用文献	40

第四章 抗原封入 PEG 修飾リポソームの脾臓濾胞への輸送現象を利用した細胞性免疫反応の増強に関する検討

第一節 緒言	45
第二節 実験方法	46
第三節 結果	48
第四節 考察	55
引用文献	57

第五章 総括

謝辞	63
----	----

## 略語

ABC	Accelerated blood clearance
APC	Antigen presenting cell
BCR	B cell receptor
CFA	Freund's complete adjuvant
CR	Complement receptor
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DDS	Drug delivery system
FDC	Follicular dendritic cell
FO	Follicle
GC	$\alpha$ -galactosyl ceramide
MDSC	Myeloid derived suppressor cell
MHC	Major histocompatibility complex
MPS	Mononuclear phagocyte system
MZ	Marginal zone
NKT	Natural killer T cell
OVA	Ovalbumin
PEG	Polyethylene glycol
PL	PEGylated liposome
TD	T cell dependent
TI	T cell independent
TLR	Toll like receptor
Treg	Regulatory T cell



## 第一章 序論

ワクチンには、弱毒化ワクチン、不活性化ワクチン、サブユニットワクチンが存在する。弱毒化ワクチンや不活性化ワクチンは、強力かつ長期に及ぶ免疫誘導能を持つため、古くから使用されてきたが、病原体そのものを用いることに対して安全性の懸念が存在する。それに対して最近では、病原体の一部であるタンパクやペプチドを用いるサブユニットワクチンについて盛んに研究されている。こちらは安全性が高く、毒性は少ないと考えられるが、免疫誘導能が低く、短期間しか免疫を誘導できないことが多い。そのためサブユニットワクチン開発においては、①有効で適切な抗原分子の選定のみならず、②抗原に対する免疫反応を効率的に誘導できるアジュバントの開発(1, 2)、③抗原およびアジュバントを適切な免疫細胞に送達させる DDS(Drug delivery system)の開発(3, 4)、が重要となってくる(Fig. 1-1)。

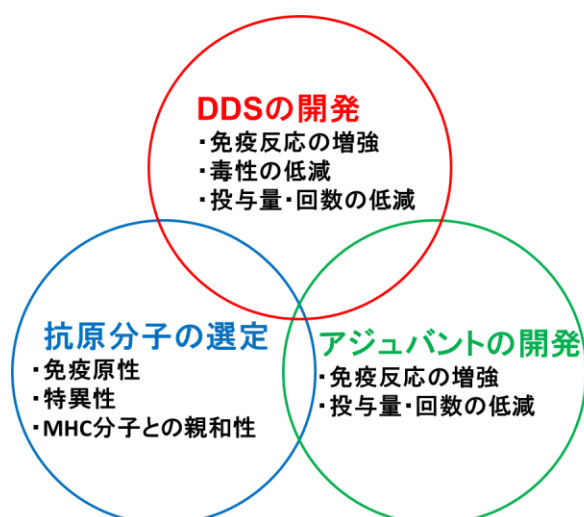


Fig. 1-1 Requirement for vaccine development

アジュバントには、免疫に必要な抗原量を減少させる、免疫回数を減らす、速やかな免疫反応を誘導する、などの役割がある。現在承認されているアジュバントの中で最も多く使用されているアルミニウム塩(alum)は、安全性が高く、抗体産生の誘導(Th2 反応)には有効である(5)。一方で、HIV やがん治療においては細胞傷害性 T 細胞の誘導(Th1 反応)が重要となるが、alum は Th1 反応誘導性が低い(6)。Th1 反応誘導性が高いとされているアジュバントとして、MPL(Monophosphoryl lipid A)がある。MPL は LPS の誘導體であり、TLR(toll like receptor)のアゴニストとして唯一認可されているアジュバントであり、共刺激分子の発現やサイトカイン産生を促進する(7)。現在、その他の TLR アゴニ

ストをはじめとした数多くのアジュバントが開発されている(8)。

一方 DDS は、抗原提示細胞(APC)に抗原を標的化する、抗原の放出を制御するなどの作用を介して、免疫反応をより効率的に誘導し、副作用を軽減する役割がある。既に承認されている alum や MF59(スクアレン/水のエマルション)なども、抗原を徐放する効果があるとされている。最近の DDS 開発においては、イスコム、リポソーム、ウイルス様粒子、生分解性ナノ粒子、ナノエマルジョンなどが開発されている(9)。これらのキャリアは抗原をその表面・内部に保持し、その粒子サイズ (20 nm~数 1000 nm) から APC に効率よく取り込まれる性質を持つ(10)。しかしこれらの取り込みは受動的であり、少量の抗原・アジュバントで有効かつ安全に免疫するには、能動的な標的化が必要である。この観点から、APC への標的指向性を持つ抗体などで修飾した DDS について研究されている(Fig. 1-2)。その多くは樹状細胞を標的としたものであり、免疫グロブリンの受容体である Fc 受容体、C 型レクチン受容体である DEC-205、DC-SIGN、Clec9A など標的とした DDS の開発が進められている(11)。

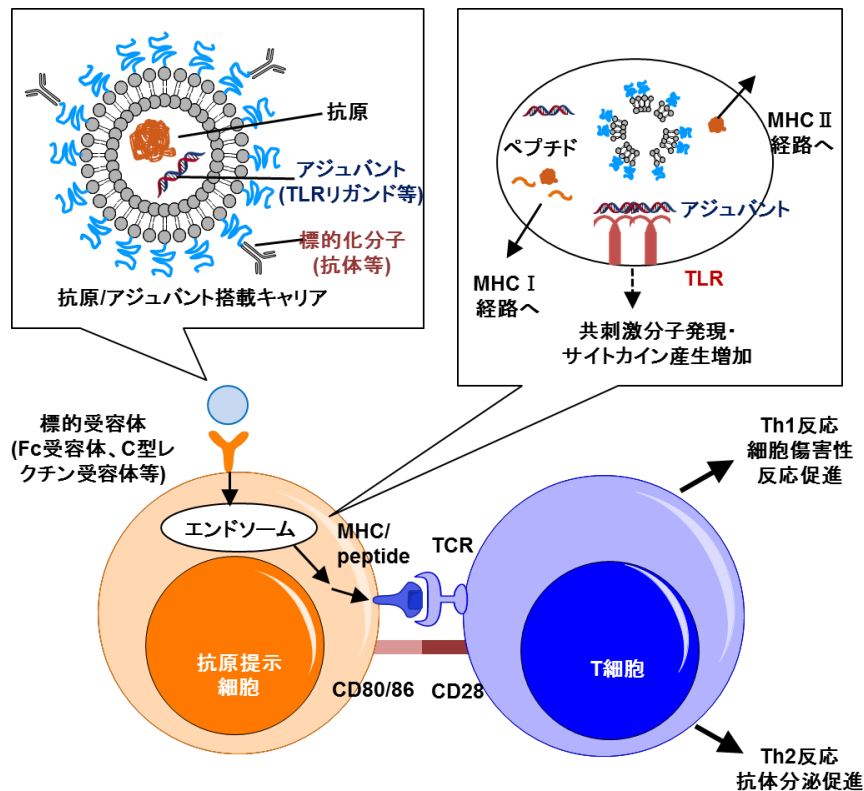


Fig. 1-2 Delivery of antigen and adjuvant for immune-potential

これらの中でもリポソームワクチンは最も有効なワクチンの一つである(12)。リポソームは、①生体脂質を構成成分とするため生体適合性に優れている(13)(14)、②水溶性、疎水性に関わらず様々な抗原・アジュバントを内封できる(15)、



③脂質組成や粒子径などを変えることにより体内分布や滞留時間を制御することが容易である(12) (16)、④抗体やリガンドで表面を修飾することにより APC への標的化が可能である(17) (18)、などの利点を持つ。実際にリポソームワクチンの臨床試験は既に行われており、非小細胞肺癌の治療を目的とした **Stimuvax**(抗原:がん細胞に発現する糖タンパクの MUC1、アジュバント:MPL)、マラリアの感染予防を目的とした **RTS, S/AS01**(抗原:マラリアのスポロゾイトタンパクと HBV の表面抗原の融合タンパク、アジュバント:MPL、サポニン)などが開発されている。**Stimuvax** は第 2 相試験において全生存期間を延長させる傾向がみられたが、残念ながら第 3 相試験において全患者群における全生存期間の有意な延長を示さなかった(19, 20)。しかし化学放射線療法を受けた後に、**Stimuvax** を用いた場合、全生存期間の有意な延長がみられ、現在さらなる臨床試験を行っている。**RTS, S/AS01** も現在臨床試験中であるが、有効性が確認されている(21) (22)。

またワクチンに使用するリポソームは、ポリエチレングリコール(PEG)で修飾する場合がある。PEG でリポソーム表面を修飾したリポソーム(PL)は、PEG 鎖が形成する水和層と PEG 鎖自体による立体障害によって、血中タンパクの結合やそれに伴う単核食細胞系(MPS)による取り込みを回避することができるため、血中滞留性が極めて高い(23) (24)。また皮下投与時において、リポソームの PEG 修飾によりリンパ節への移行性が増加することが報告されている(25)。このような効果から、静脈内投与・皮下投与された抗原封入 PL は、抗原を徐放したり、リンパ組織への抗原の移行性を増加させたりすることで、免疫誘導を増強するのに有用であると考えられている(26)(27)。さらに、PEG の先端に標的化分子を結合することで、APC への標的化効率が良くなることも報告されている。一方で、ワクチンは複数回投与するのが一般的であるが、PL 自体は長らく生体適合性が高いと考えられていたため、繰り返し投与時の動態変化や免疫原性についてはほとんど検討されていなかった。

当研究室や他のグループの以前の研究から、空の PL を 3-14 日の投与間隔で 2 回繰り返し静脈内投与すると、2 回目に投与された PL が予想された血中滞留性を示さずに速やかに消失し、多くが肝臓に蓄積することが明らかになった(28) (29) (30)。我々はこのような現象を ABC(accelerated blood clearance)現象と名づけ、そのメカニズム解明のための研究を行ってきた(31) (32) (33)。これまでの検討から我々は、初回投与 PL 投与により PEG に特異的に結合する IgM(抗 PEG IgM)が誘導され、この抗 PEG IgM が 2 回目投与 PL に結合して補体系を活性化した後に、肝臓のマクロファージによる貪食を促進することを明らかにしている(Fig. 1-3)。PEG は本来免疫原性がないと考えられていたため、抗 PEG IgM が誘導されたのは非常に興味深い結果であった。また PL 以外の PEG 化ナノ粒

子においても ABC 現象が生じることが報告されていることから(34-36)、昨今盛んに応用研究されているナノ粒子全般に生じる可能性が高い。もし PL を用いた静脈内投与型ワクチンにおいてこのような著しい PL の動態変化が生じた場合、目的とするリンパ組織や APC への移行性が変化し、ワクチン効果が大きく変化する可能性がある。そのため PL の繰り返し投与時の体内動態変化の詳細なメカニズム解明を行う必要がある。

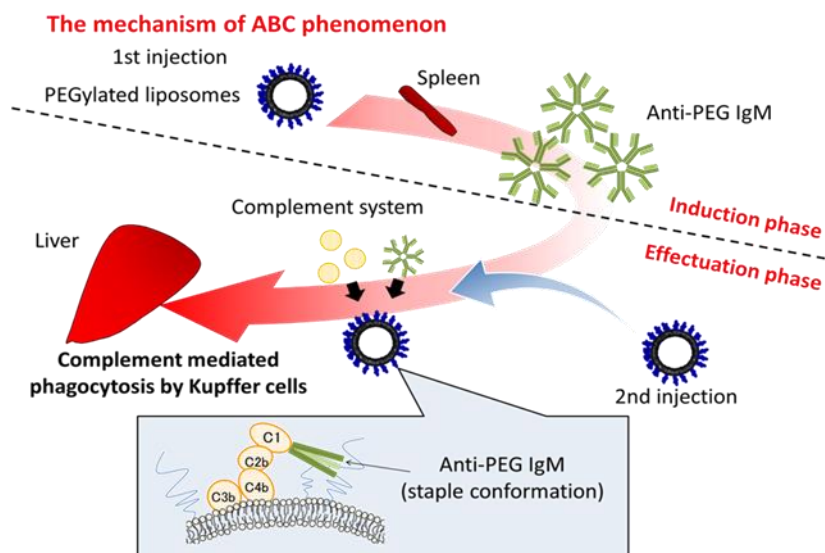
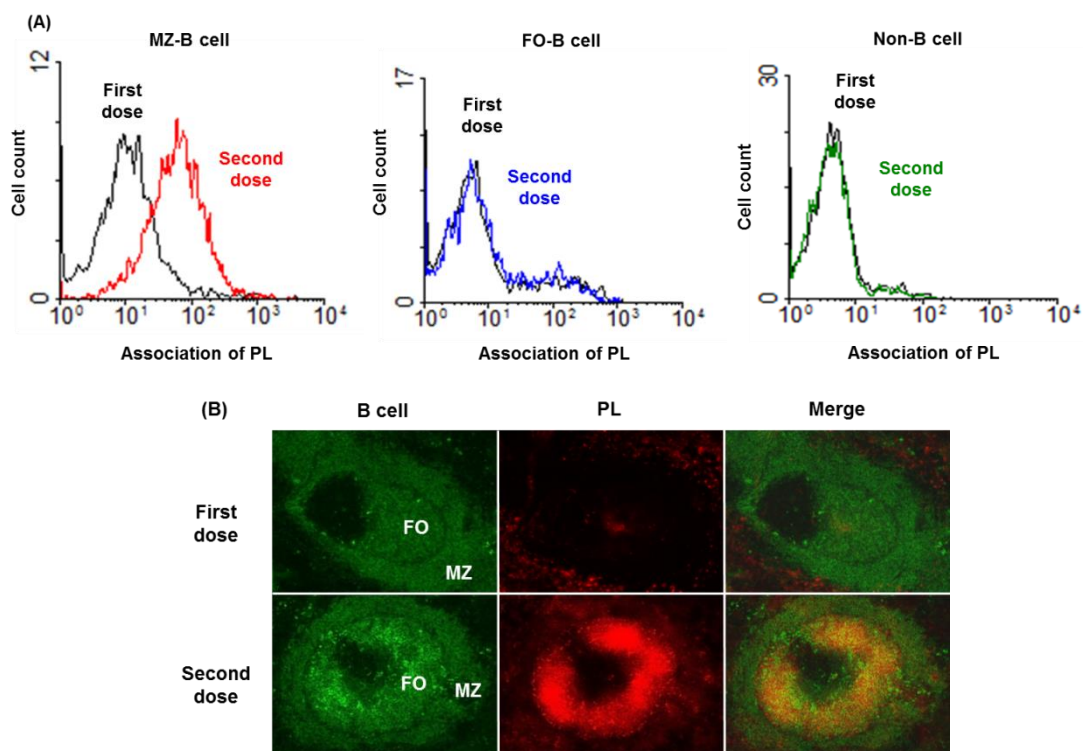


Fig. 1-3 Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon

一般に、静脈内投与された血行性抗原に対する免疫反応には脾臓が重要な役割を果たすことが知られている(37)。そこで我々はさらに PL の脾臓内挙動に着目した研究を行ってきた。非常に興味深いことに、PL を静脈内投与した 2 日-7 日後に再び PL を投与すると、脾臓内において 2 回目投与 PL が、濾胞 B(FO-B) 細胞や非 B 細胞ではなく、辺縁帯 B(MZ-B) 細胞に選択的に結合し、濾胞に多量に蓄積することを我々は明らかにした(Fig. 1-4) (38)。さらに、MZ-B 細胞に結合した 2 回目投与 PL の脾臓内分布の経時的な変化を検察したところ、投与 30 分後には辺縁帯に蓄積していたが、時間経過に伴い、濾胞に輸送されていた。PL を 1 回静脈内投与した場合においては、脾臓の赤脾髄や辺縁帯のマクロファージに捕捉されるだけであることが以前に報告されている(39)。我々の検討においても、1 回目投与 PL の MZ-B 細胞への結合や濾胞への輸送はみられなかった。そのため、PL の繰り返し投与により、何かしらの免疫活性化が生じていると考えられる。しかしながら、このような PL の繰り返し投与時に生じる PL の脾臓内動態変化の詳細なメカニズムは明らかになっていない。

一方で、2 回目投与 PL に抗原を封入して静脈内投与することにより、抗原を MZ-B 細胞や濾胞に標的化できる新規の静脈内投与型ワクチンになるかもしれ

ない。静脈内投与型ワクチンは、侵襲性が高いものの脾臓をはじめとした全身のリンパ組織に効率的に抗原を送達して、速やかかつ長期的な免疫反応を誘導することができる（40, 41）。本現象を利用することにより、免疫反応の成熟領域である濾胞への抗原送達が可能となり、さらに有用なワクチンとなると考えられる。また通常、APC への標的化には抗体による修飾が必要となるが、本現象を利用すればより簡便かつ効率的に MZ-B 細胞や濾胞に抗原を送達できる可能性もある。



**Fig. 1-4 Second dose PL was associated with splenic MZ-B cells and accumulated in follicle.** Following intravenous injection of PL 2 days before, fluorescence-labeled PL was injected. As a control, fluorescence-labeled PL was injected without pre-dose with PL. Twenty four hours later, spleen was collected. (A) Association of PL with spleen cell was analyzed by flow cytometry. (B) Distribution of PL in spleen was observed under fluorescence microscope. MZ: marginal zone, FO: follicle.

このような背景を基に本研究では、まず PL の繰り返し投与時に生じる MZ-B 細胞による PL の濾胞への輸送メカニズムの解明を行った（第二章）。続いて本現象を利用して、抗原封入 PL を MZ-B 細胞や濾胞へ送達することにより、抗体分泌をはじめとする体液性免疫(第三章)や細胞傷害性 T 細胞の活性化をはじめとする細胞性免疫(第四章)を増強できるかどうか検討した。

## 引用文献

1. Coffman RL, Sher A, & Seder RA (2010) Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. (Translated from eng) *Immunity* 33(4):492-503 (in eng).
2. Reed SG, Orr MT, & Fox CB (2013) Key roles of adjuvants in modern vaccines. (Translated from eng) *Nat Med* 19(12):1597-1608 (in eng).
3. Amorij JP, *et al.* (2012) Towards tailored vaccine delivery: needs, challenges and perspectives. (Translated from eng) *J Control Release* 161(2):363-376 (in eng).
4. Bachmann MF & Jennings GT (2010) Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. (Translated from eng) *Nat Rev Immunol* 10(11):787-796 (in eng).
5. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, & Hammad H (2009) Mechanism of action of clinically approved adjuvants. (Translated from eng) *Curr Opin Immunol* 21(1):23-29 (in eng).
6. Mori A, *et al.* (2012) The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses. (Translated from eng) *Eur J Immunol* 42(10):2709-2719 (in eng).
7. Vandepapeliere P, *et al.* (2008) Vaccine adjuvant systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers. (Translated from eng) *Vaccine* 26(10):1375-1386 (in eng).
8. Vacchelli E, *et al.* (2013) Trial Watch: Toll-like receptor agonists for cancer therapy. (Translated from Eng) *Oncoimmunology* 2(8):e25238 (in Eng).
9. Krishnamachari Y, Geary SM, Lemke CD, & Salem AK (2011) Nanoparticle delivery systems in cancer vaccines. (Translated from eng) *Pharm Res* 28(2):215-236 (in eng).
10. Xiang SD, *et al.* (2006) Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? (Translated from eng) *Methods* 40(1):1-9 (in eng).
11. Tacken PJ & Figdor CG (2011) Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: steps towards cost effective vaccines. (Translated from eng) *Semin Immunol* 23(1):12-20 (in eng).
12. Watson DS, Endsley AN, & Huang L (2012) Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. (Translated from eng) *Vaccine* 30(13):2256-2272 (in eng).

13. Butts C, *et al.* (2010) A multicenter open-label study to assess the safety of a new formulation of BLP25 liposome vaccine in patients with unresectable stage III non-small-cell lung cancer. (Translated from eng) *Clin Lung Cancer* 11(6):391-395 (in eng).
14. Fries LF, *et al.* (1992) Liposomal malaria vaccine in humans: a safe and potent adjuvant strategy. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(1):358-362 (in eng).
15. Verma I, Pandey R, & Khuller GK (2004) Liposomes as adjuvant for anti-mycobacterial vaccine development. (Translated from eng) *Indian J Exp Biol* 42(10):949-954 (in eng).
16. Kaur R, Bramwell VW, Kirby DJ, & Perrie Y (2012) Manipulation of the surface pegylation in combination with reduced vesicle size of cationic liposomal adjuvants modifies their clearance kinetics from the injection site, and the rate and type of T cell response. (Translated from eng) *J Control Release* 164(3):331-337 (in eng).
17. van Broekhoven CL, Parish CR, Demangel C, Britton WJ, & Altin JG (2004) Targeting dendritic cells with antigen-containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy. (Translated from eng) *Cancer Res* 64(12):4357-4365 (in eng).
18. Kojima N, Ishii M, Kawauchi Y, & Takagi H (2013) Oligomannose-coated liposome as a novel adjuvant for the induction of cellular immune responses to control disease status. (Translated from eng) *Biomed Res Int* 2013:562924 (in eng).
19. Sangha R & Butts C (2007) L-BLP25: a peptide vaccine strategy in non small cell lung cancer. (Translated from eng) *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 2):s4652-4654 (in eng).
20. Butts C, *et al.* (2014) Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer (START): a randomised, double-blind, phase 3 trial. (Translated from eng) *Lancet Oncol* 15(1):59-68 (in eng).
21. Agnandji ST, *et al.* (2012) A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. (Translated from eng) *N Engl J Med* 367(24):2284-2295 (in eng).
22. Leroux-Roels G, *et al.* (2014) Evaluation of the immune response to RTS,S/AS01 and RTS,S/AS02 adjuvanted vaccines: Randomized, double-blind study in malaria-naive adults. (Translated from Eng) *Hum Vaccin Immunother* 10(8) (in Eng).
23. Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, & Yau-Young A (1991) Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1066(1):29-36.
24. Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C, & Gregoriadis G (1991) Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance

- from the circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1062(1):77-82.
25. Zhuang Y, *et al.* (2012) PEGylated cationic liposomes robustly augment vaccine-induced immune responses: Role of lymphatic trafficking and biodistribution. (Translated from eng) *J Control Release* 159(1):135-142 (in eng).
  26. Attarbaschi A, *et al.* (2002) Treatment results of childhood acute lymphoblastic leukemia in Austria--a report of 20 years' experience. (Translated from eng) *Wien Klin Wochenschr* 114(4):148-157 (in eng).
  27. Carstens MG, *et al.* (2011) Effect of vesicle size on tissue localization and immunogenicity of liposomal DNA vaccines. (Translated from eng) *Vaccine* 29(29-30):4761-4770 (in eng).
  28. Dams ET, *et al.* (2000) Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. *J Pharmacol Exp Ther* 292(3):1071-1079.
  29. Laverman P, *et al.* (2000) Preclinical and clinical evidence for disappearance of long-circulating characteristics of polyethylene glycol liposomes at low lipid dose. (Translated from eng) *J Pharmacol Exp Ther* 293(3):996-1001 (in eng).
  30. Ishida T, Maeda R, Ichihara M, Irimura K, & Kiwada H (2003) Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections. *J Control Release* 88(1):35-42.
  31. Ishida T, Ichihara M, Wang X, & Kiwada H (2006) Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. (Translated from eng) *J Control Release* 115(3):243-250 (in eng).
  32. Ishida T, Wang X, Shimizu T, Nawata K, & Kiwada H (2007) PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner. *J Control Release* 122(3):349-355.
  33. Wang X, Ishida T, & Kiwada H (2007) Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes. (Translated from eng) *J Control Release* 119(2):236-244 (in eng).
  34. Shimizu T, *et al.* (2012) Intravenous administration of polyethylene glycol-coated (PEGylated) proteins and PEGylated adenovirus elicits an anti-PEG immunoglobulin M response. (Translated from eng) *Biol Pharm Bull* 35(8):1336-1342 (in eng).
  35. Ishihara T, *et al.* (2009) Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles. (Translated from eng) *Pharm Res*

- 26(10):2270-2279 (in eng).
36. Kaminskas LM, McLeod VM, Porter CJ, & Boyd BJ (2011) Differences in colloidal structure of PEGylated nanomaterials dictate the likelihood of accelerated blood clearance. (Translated from eng) *J Pharm Sci* 100(11):5069-5077 (in eng).
  37. Cyster JG (2000) B cells on the front line. (Translated from eng) *Nat Immunol* 1(1):9-10 (in eng).
  38. Shimizu T, Ishida T, & Kiwada H (2013) Transport of PEGylated liposomes from the splenic marginal zone to the follicle in the induction phase of the accelerated blood clearance phenomenon. (Translated from eng) *Immunobiology* 218(5):725-732 (in eng).
  39. Litzinger DC, Buiting AM, van Rooijen N, & Huang L (1994) Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. (Translated from eng) *Biochim Biophys Acta* 1190(1):99-107 (in eng).
  40. Bhowmick S, Mazumdar T, & Ali N (2009) Vaccination route that induces transforming growth factor beta production fails to elicit protective immunity against *Leishmania donovani* infection. (Translated from eng) *Infect Immun* 77(4):1514-1523 (in eng).
  41. Hanke T, *et al.* (1998) Immunogenicities of intravenous and intramuscular administrations of modified vaccinia virus Ankara-based multi-CTL epitope vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in mice. (Translated from eng) *J Gen Virol* 79 ( Pt 1):83-90 (in eng).

## 第二章 2回目投与 PEG 修飾リポソームの脾臓辺縁帯 B 細胞への結合と濾胞への輸送メカニズムの解明

### 第一節 緒言

リポソーム表面へのオプソニンの吸着は、肝臓や脾臓のマクロファージによるリポソームの速やかな取り込みを引き起こす。ポリエチレングリコール(PEG)によるリポソームの表面修飾は、このようなオプソニンの吸着とマクロファージによる取り込みを阻害する有力な方法の一つであり、PEG 修飾リポソーム(PL)は *in vivo* において長期血中滞留性を示す(1-3)。そのため PL は、内封した薬物の半減期を延長できる薬物送達システムとしてこれまでに幅広く用いられてきた。しかしながら、我々や他の研究者らの報告により、PL を繰り返し投与した場合に PL の長期血中滞留性が失われ、肝臓に PL が多量に蓄積することが明らかになっている(accelerated blood clearance (ABC)現象)(4-6)。これまでの検討から(7, 8)、我々は次のようなメカニズムで ABC 現象が起こると推定している。まず、初回投与 PL により脾臓が刺激されて抗 PEG IgM が誘導される。続いて数日後に投与された 2 回目投与 PL に抗 PEG IgM が結合し、補体系を活性化する。その結果、2 回目投与 PL は肝臓のマクロファージに取り込まれてしまう。

一方で脾臓は、血行性抗原に対する免疫反応に関与する重要な二次リンパ組織である(9)。脾臓は主に、赤脾髄、辺縁帯、白脾髄から構成される(illustration-1)。

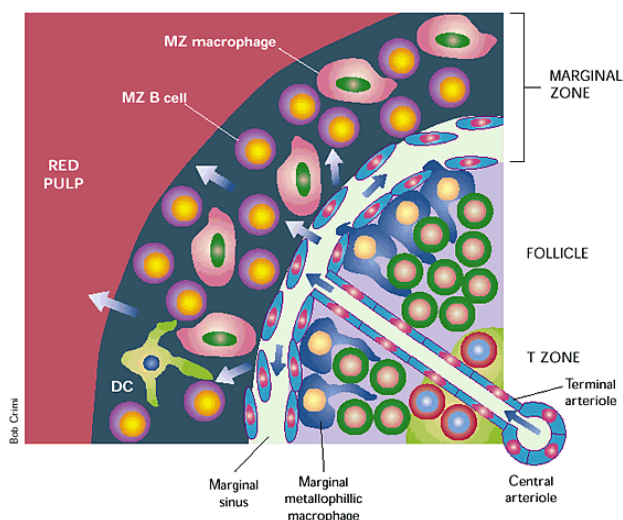


Illustration-1. Splenic white pulp structure of mouse. (9)



脾臓内に流入した抗原の多くは、辺縁洞を通り、辺縁帯を介して赤脾髄へと流れ込む。辺縁帯では血流速度が低下するため、血行性抗原は辺縁帯で捕捉されやすく、辺縁帯に局在する辺縁帯マクロファージや辺縁帯 B(MZ-B)細胞によって、初期の免疫反応が誘導される。血行性抗原と同様に、リポソームなどのナノ粒子も脾臓によって捕捉されることがよく知られている(10-12)。静脈内投与された PL は脾臓内において、主に辺縁帯や赤脾髄に蓄積することが報告されている(13)。加えて我々は、PL が MZ-B 細胞を刺激し、抗 PEG IgM の産生を引き起こすことを報告している(14)。これらのことから、脾臓細胞、特に MZ-B 細胞が PL に対する免疫反応において重要な役割を果たしていると考えられる。

興味深いことに、2 日-5 日の投与間隔で PL を繰り返し投与した際に、2 回目投与 PL は初回投与 PL よりも脾臓細胞に取り込まれやすくなることを最近我々は発見した(15)。加えて 2 回目投与 PL は、B 細胞の大部分を占める濾胞 B(FO-B)細胞ではなく MZ-B 細胞に選択的に結合し、続いて辺縁帯から濾胞へと輸送されることも明らかになった。また、2 回目投与 PL の MZ-B 細胞への結合は PEG 特異的に誘導されていた。このことから、抗 PEG IgM を介して PL は MZ-B 細胞と結合したと考えられる。その抗 PEG IgM には、B 細胞上に発現する膜型 IgM と血中に分泌される分泌型 IgM の 2 種類が存在すると考えられる。B 細胞上に発現する抗 PEG IgM は直接 PL と結合できるかもしれない。一方で肝臓においては、PL が分泌型の抗 PEG IgM や補体を含む血清因子の存在下で肝臓に取り込まれることが既に明らかになっている(16)。また MZ-B 細胞は、血行性抗原を抗原/抗体/補体の複合体の形の抗原と結合し、濾胞樹状細胞(FDC)へと輸送することが報告されている(17-19)。そのため、分泌型の抗 PEG IgM や補体を介して PL と MZ-B 細胞との結合が誘導されている可能性が高い。しかしながら、2 回目投与 PL が MZ-B 細胞とどのように結合し、濾胞へと輸送されるかについて詳細は明らかではない。

そこで本研究では、PL と MZ-B 細胞との結合の詳細なメカニズムを明らかにするために、無処置ラットと PL 処置ラット由来の脾臓と血清を用いて *in vitro* における PL と脾臓細胞との結合実験を行った。加えて、PL と MZ-B 細胞との *in vivo* における結合や、PL の辺縁帯から濾胞への輸送に及ぼす抗 PEG IgM の影響について検討した。

## 第二節 実験方法

### 第一項 試薬・動物

水素添加卵黄ホスファチジルコリン(HEPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセ

ロ-3-ホスホエタノールアミン-*n*-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (mPEG<sub>2000</sub>-DSPE)は日油(東京、日本)から提供されたものを使用した。コレステロール (Chol) は和光純薬工業(大阪、日本)から購入した。DiI(1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate、Ex=549 nm、Em=565 nm)は Life Technologies(CA、USA)より購入した。その他の試薬に関しては特級品を購入し、実験に用いた。Wistar 系ラット(雄、8-9 週齢、200-300 g)は日本 SLC(静岡、日本)より購入した。

## 第二項 リポソームの調製

PEG 修飾リポソーム(PL)の脂質組成は HEPC : mPEG<sub>2000</sub>-DSPE : Chol = 1.85 : 0.15 : 1(モル比)とした。また PL の体内動態を可視化する場合、脂質膜マーカーである DiI をリン脂質に対して 1%(モル比)となるように加えた DiI-PL を調製した。リポソームの調製は、Bangham 法に従って行った。まず上記の脂質組成になるように試験管に脂質溶液を量り取って攪拌した後、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下でクロロホルムを除去し、脂質薄膜を形成させた。次に、HEPES buffered saline(25 mM HEPES、140 mM NaCl、pH 7.4)を試験管に加えて、加熱振とう(65°C、2 時間)により脂質を水和させてリポソームを調製した。得られたリポソームはエクストリューダーを用いて、窒素加圧下、400,200,100,80 nm のポリカーボネートフィルター(Whatman Nucleopore、CA、USA)を通して、粒子径を約 100 nm に調整した。調整したリポソームの粒子径は動的光散乱法(NICOMP 380ZLS、CA、USA)により測定した。また、調製したリポソーム溶液のリン脂質濃度を Fisk & Subbarow 法により測定した(20)。

## 第三項 脾臓細胞懸濁液の調製・フローサイトメトリー解析

Gentle MACS Dissociator (Miltenyi Biotec GmbH、Bergisch Gladbach、Germany)のマニュアルに従って脾臓細胞懸濁液を調製した。細切した脾臓細胞を 0.5% EDTA/PBS 溶液が入った C チューブ(Miltenyi Biotec)に移してホモジナイズした。また赤血球は、溶血剤(0.83% 塩化アンモニウム溶液)を加えて 5 分間静置することにより溶血させた。残存した組織片・細胞凝集塊は、セルストレーナー(100 μm、Becton Dickinson、NJ、USA)により取り除いた。また細胞集団を分類するために、FITC 標識抗ラット IgM 抗体(American Qualex International、CA、USA)を用いて染色した(非 B 細胞 : IgM<sup>negative</sup>、濾胞 B 細胞 : IgM<sup>low</sup>、辺縁帯 B 細胞 : IgM<sup>high</sup>)。フローサイトメトリー測定には Guava EasyCyte Mini System (Millipore、MA、USA)を用い、解析には WinMDI version 2.9 (The Scripps Research Institute、CA、USA)を用いた。

#### 第四項 In vitro における PEG 修飾リポソームと脾臓細胞との相互作用測定

PL(0.001  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg) をラットに静脈内投与した 1-14 日後に、血清および脾臓を回収した。同様に無処置ラットから血清および脾臓を回収した。それぞれの血清は PBS を用いて 20% に希釈し、脾臓は上記の方法により細胞懸濁液を調製した。まず希釈したラット血清(0.25 ml)に DiI-PL(0.4 mM リン脂質、0.25 ml)を加えて、37°C で 15 分間インキュベーションした。続いて、脾臓細胞 ( $10^7$  cells/ml、0.5 ml)を加えて、さらに 37°C で 30 分間インキュベーションした。FITC 標識抗ラット IgM 抗体を用いて染色した後、フローサイトメトリーを用いて、DiI-PL と各細胞集団との相互作用を解析した。

DiI-PL と脾臓細胞との相互作用における補体の必要性を確認するために、血清を 56°C で 30 分間非働化して補体を不活性化した。また血清に EDTA 溶液を加えて補体活性化を阻害した(最終濃度 5 mM)。別の方法として、血清にフィコール溶液を加えて補体を消費させた(最終濃度 15 mg/ml)。一方で、DiI-PL と脾臓細胞との相互作用における抗 PEG IgM の必要性を確認するために、以前我々が作成したマウス抗 PEG IgM モノクローナル抗体(21)を血清に加えた(最終濃度 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。コントロールとしてマウスコントロールモノクローナル IgM(Sigma Aldrich、MO、USA)を用いた。全ての処理は DiI-PL との混合前に行った。

#### 第五項 脾臓組織切片の調製と免疫組織染色

回収した脾臓を OTC コンパウンド(Sakura Finetechnical、東京、日本)中に包埋し、-81°C で凍結させた。凍結させた脾臓から、クライオスタット(Leica microsystems、Solms、Germany)を用いて 7  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片を作製した。脾臓組織内における DiI-PL の分布を、蛍光顕微鏡 BZ-9000(Keyence、大阪、日本)を用いて観察した。DiI-PL の分布画像を取得した後、凍結切片を冷アセトンで固定し、FITC 標識抗ラット IgM 抗体を用いて染色した。染色後、蛍光顕微鏡を用いて組織画像を撮影した。

#### 第六項 In vitro における PEG 修飾リポソームと脾臓組織との相互作用測定

PL(0.001  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg) をラットに静脈内投与した 5 日後に、血清および脾臓を回収した。同様に無処置ラットから血清および脾臓を回収した。それぞれの血清は PBS を用いて 20% に希釈し、上記の方法により脾臓切片を調製した。まず希釈したラット血清(0.05 ml)に DiI-PL(0.4 mM リン脂質、0.05 ml)を加えて、37°C で 15 分間インキュベーションした。続いて、これらの混合溶液を脾臓切片に加えて、さらに室温で 120 分間インキュベーションした。FITC 標識抗ラット IgM 抗体を用いて染色した後、蛍光顕微鏡を用いて脾臓組織と DiI-PL

との相互作用を観察した。

#### 第七項 In vivo における PL と MZ-B 細胞との相互作用測定

PL(0.001  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg) をラットに静脈内投与した 0-7 日後に、DiI-PL(5  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg)を静脈内投与した。投与 24 時間後に脾臓を回収し、脾臓細胞懸濁液を調製した。DiI-PL と MZ-B 細胞との相互作用をフローサイトメトリーで測定した。

#### 第八項 In vivo における血清輸注の検討

PL(0.001  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg) をラットに静脈内投与した 5 日後に、血清を回収した。同様に無処置ラットから血清を回収した。まず、それぞれの血清(2.5 ml)を無処置ラットに静脈内投与した。5 分後に DiI-PL(5  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg)を静脈内投与した。24 時間後に脾臓を回収し、脾臓細胞懸濁液および脾臓組織切片を調製した。DiI-PL と脾臓細胞との相互作用をフローサイトメトリーで測定した。また DiI-PL の脾臓組織内分布を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

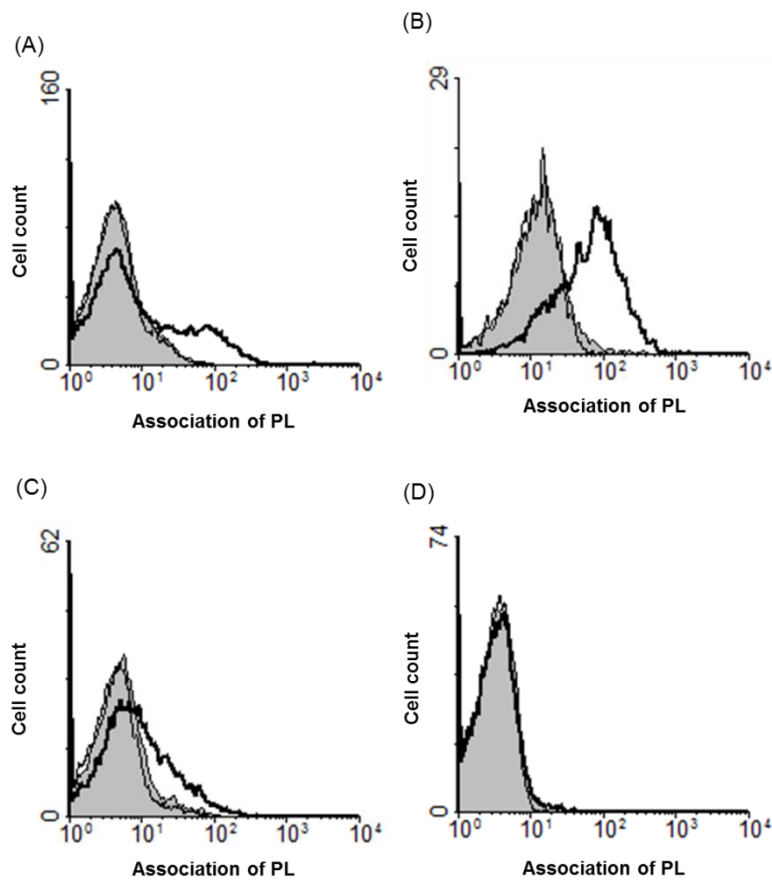
#### 第九項 統計学的解析

全ての値は平均値±標準偏差で表した。統計学的処理は GraphPad InStat software(GraphPad Software, CA, USA)を用いて、two-tailed unpaired t test を行い評価した。

### 第三節 結果

#### 第一項 PEG 修飾リポソームと脾臓細胞との in vitro における相互作用に及ぼす血清の影響

まず、in vivo と同様に in vitro においても PEG 修飾リポソーム(PL)が脾臓細胞に結合するかどうかについて、血清添加の有無の条件下で検討した。PL を投与した 5 日後、脾臓と血清を回収した。血清の存在下および非存在下において、脾臓細胞と蛍光色素で標識した PL とを混合してインキュベーションした(Fig. 2-1-A)。血清が存在しない場合もしくは無処置ラットの血清存在下では、PL の脾臓細胞への結合は観察されなかった。一方で、PL を投与したラットから得られた血清の存在下において、PL の脾臓細胞への結合が観察された。このことは、PL 投与によって誘導された何らかの血清因子が、脾臓細胞と PL との結合に影響を与えることを示唆している。



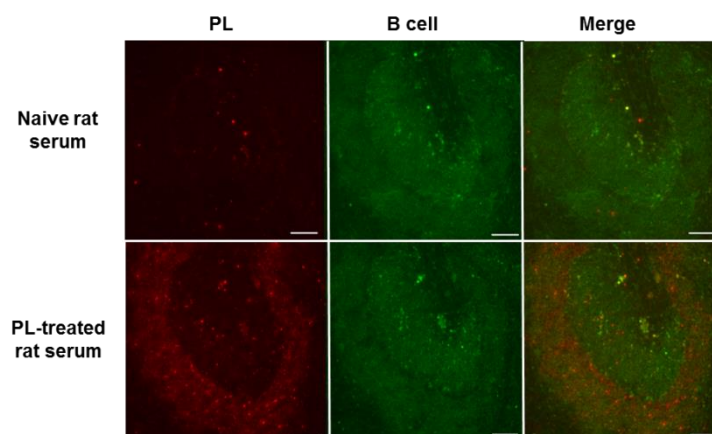
**Fig. 2-1 Effect of serum on association of PL with spleen cells.** Spleen cell suspension was incubated with fluorescence-labeled PL in the absence of serum (filled histogram) or in the presence of serum obtained from either PL-treated rat (thick line) or naive rat (thin line). The association of PL with (A) entire spleen cells, (B) MZ-B cells, (C) FO-B cells, and (D) non-B cells were analyzed by flow cytometry.

続いて PL が辺縁帯 B(MZ-B)細胞に結合しているかを確認するために、脾臓細胞を FITC 標識抗ラット IgM 抗体で染色して分類した。PL を投与したラットから得られた血清の存在下において、PL は MZ-B 細胞に多量に結合していた (Fig. 2-1-B)。しかしながら、同じ条件下において PL は濾胞 B(FO-B)細胞や非 B 細胞にほとんど結合しなかった (Fig. 2-1-C,D)。これらの結果から、PL 投与によって誘導された何らかの血清因子が PL と MZ-B 細胞との結合を誘導していることが示唆された。

## 第二項 PEG 修飾リポソームと脾臓切片との相互作用に及ぼす血清の影響

次に脾臓切片を用いて、in vitro における PL の脾臓細胞への結合を評価した。無処置ラット由来の脾臓切片を作製した後、血清の存在下で蛍光標識した PL と

ともにインキュベーションした(Fig. 2-2)。無処置ラット血清を添加した場合、脾臓切片への PL の結合は観察されなかった。しかしながら、PL 処置ラットから得られた血清の存在下において、PL の結合が観察された。さらに PL は辺縁帯領域に主に分布していた。以前明らかとなっていた *in vivo* における PL の MZ-B 細胞への選択的な結合の理由として、血流と接しやすいという辺縁帯の解剖学的性質の関与が考えられていた。しかし、今回の結果から、血流とは関係なく、PL が辺縁帯領域の細胞に結合することが示された。

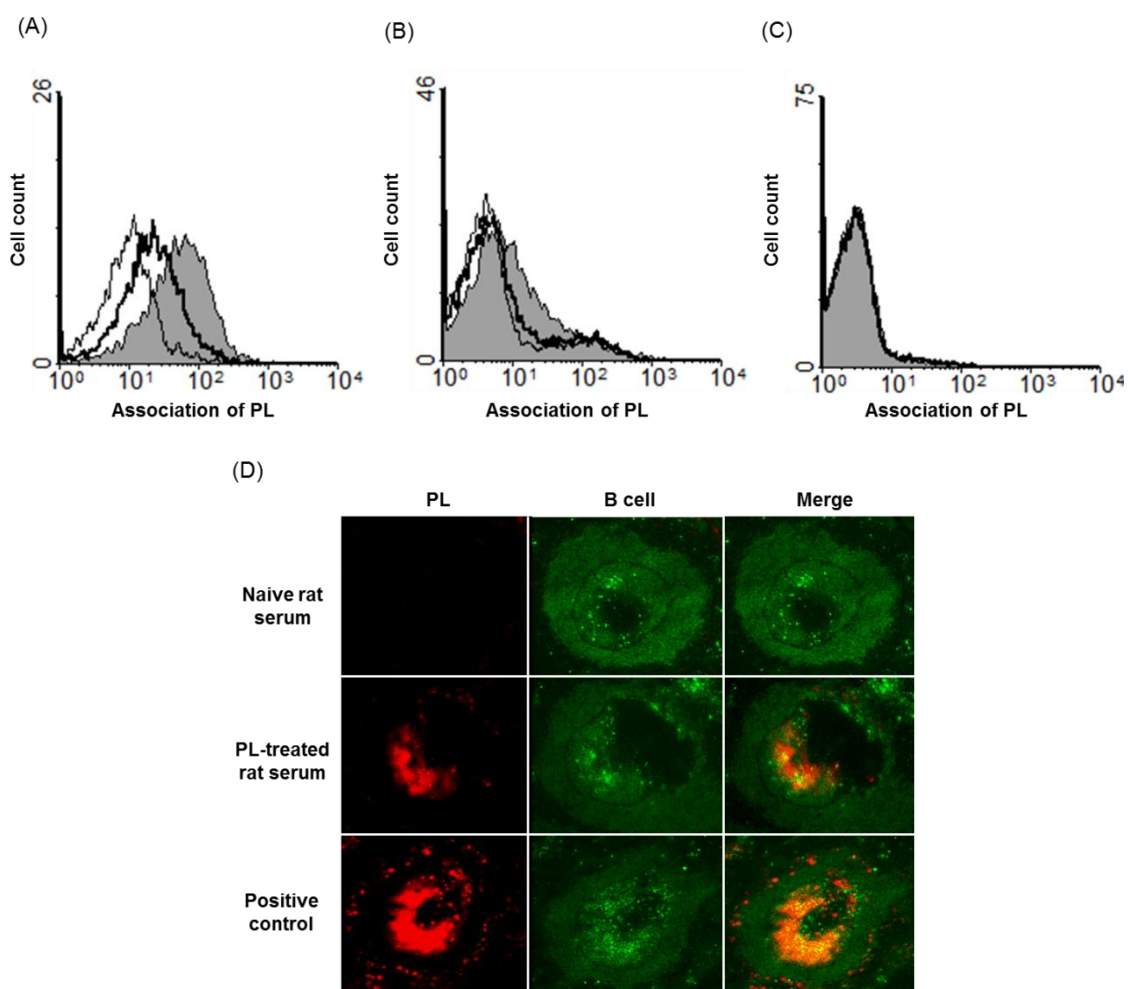


**Fig. 2-2 Effect of serum on association of PL with spleen section.** Naive rat spleen was collected and then spleen section was prepared. Then, the section was incubated with fluorescence-labeled PL in the presence of serum obtained from either PL-treated rat or naive rat. The association of PL with spleen section was observed under fluorescence microscope. Bar represents 100  $\mu\text{m}$ .

### 第三項 PEG 修飾リポソームと脾臓細胞との相互作用に及ぼす血清輸注の影響

上記の検討から、*in vitro* において血清因子が PL と MZ-B 細胞との結合に関与することが示された。続いて、PL 処置ラットから得られた血清を無処置ラットへ輸注することでも、PL と MZ-B 細胞との結合を誘導するかどうかについて検討した。無処置ラットに血清を輸注した後、蛍光標識した PL を静脈内投与した。PL 処置ラットの血清を輸注した場合、PL は MZ-B 細胞と結合したが、無処置ラット血清の輸注では結合を誘導しなかった(Fig. 2-3-A)。また PL 処置ラット血清や無処置ラット血清を輸注した場合においても、PL は非 B 細胞や FO-B 細胞にほとんど結合しなかった(Fig. 2-3-B,C)。

*In vivo* において PL を 3 日の投与間隔で 2 回投与した場合、2 回目投与 PL は脾臓辺縁帯から濾胞へ輸送されることが明らかになっている。そこで続いて、PL 処置ラットから得られた血清を無処置ラットへ輸注することで、PL の濾胞への輸送が誘導されるかどうかについて検討した。

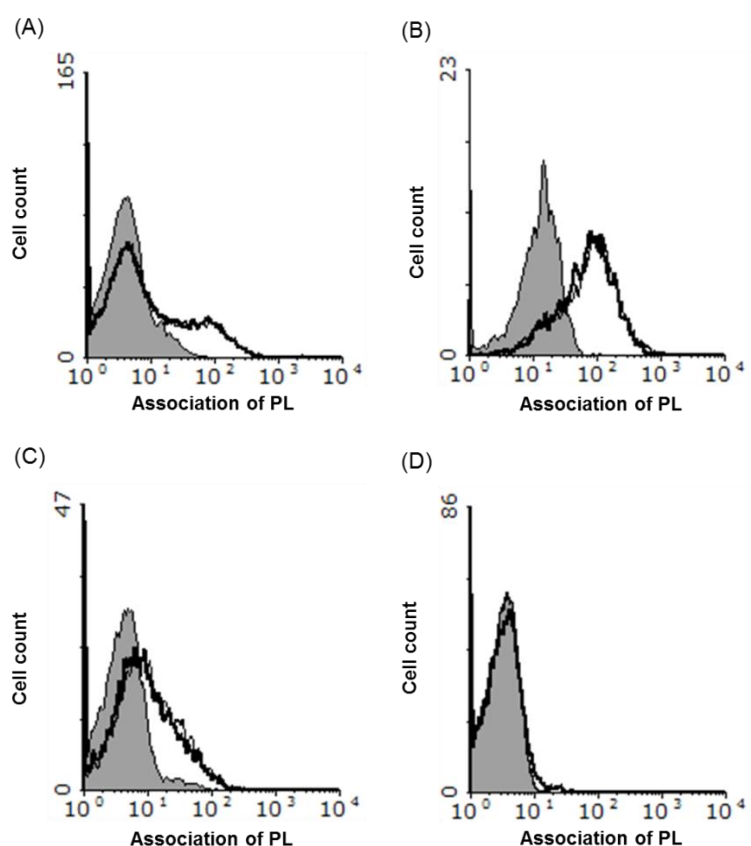


**Fig. 2-3 Effect of serum transfusion on the association of PL with MZ-B cells and the distribution of them in naive rat spleen.** Serum obtained from either PL-treated rat (thick line) or naive rat (thin line) was transfused into naive rat. Then, fluorescence-labeled PL was intravenously injected. As positive control, fluorescence-labeled PL was intravenously injected into rat treated with PL 5 days before (filled histogram). At 24 h post injection, spleen was collected. The association of PL with (A) MZ-B cells, (B) FO-B cells and (C) non-B cells were analyzed by flow cytometry and (D) the distribution of PL in the spleen was observed under fluorescence microscope.

興味深いことに、PL 処置ラット血清を無処置ラットに輸注し、蛍光標識 PL を投与した場合、PL の脾臓濾胞への蓄積が増加していた(Fig. 2-3-D)。一方で、無処置ラット血清の輸注はそのような蓄積の増加を引き起こさなかった。PL が MZ-B 細胞と結合していること、また PL が辺縁帯ではなく濾胞に蓄積していたことから、PL は血清因子の存在下で MZ-B 細胞と結合した後、濾胞に輸送されたと考えられる。

#### 第四項 PEG 修飾リポソームと脾臓細胞との相互作用に及ぼす初回投与 PL による脾臓細胞感作の影響

初回 PL 投与による脾臓の感作により、PL の取り込みに関わる可能性のある MZ-B 細胞上の膜型抗 PEG IgM や免疫複合体の受容体の発現が変化し、PL と MZ-B 細胞との結合に影響を与える可能性がある。そこで続いて、初回 PL で予め感作した脾臓を用いて PL との結合実験を行った。PL をラット静脈内投与に与して感作した後、脾臓細胞懸濁液を調製し、血清存在下で脾臓細胞と PL とをインキュベーションした。



**Fig. 2-4 Effect of spleen-sensitization by first dose PL on the association of subsequent dose PL with spleen cells.** Spleen cell suspension obtained from PL-treated rat was incubated with fluorescence-labeled PL in the presence of serum obtained from either PL-treated rat (thick line) or naive rat (filled histogram). Spleen cell suspension obtained from naive rat was incubated with fluorescence-labeled PL in the presence of serum obtained from PL-treated rat (thin line). The association of PL with (A) entire spleen cells, (B) MZ-B cells, (C) FO-B cells, and (D) non-B cells were analyzed by flow cytometry.

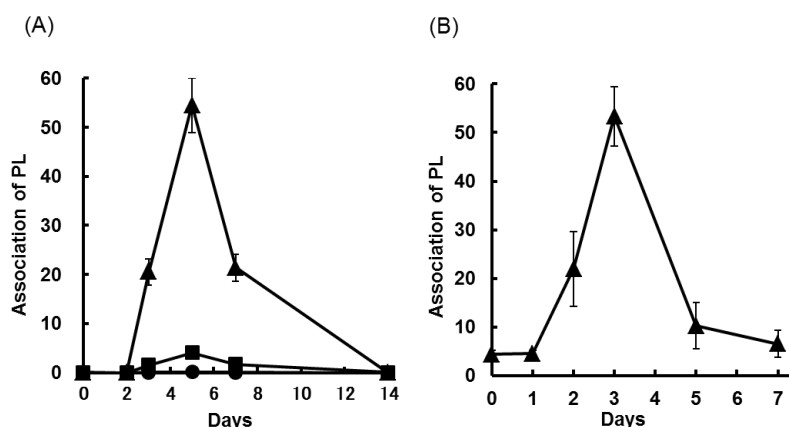
初回 PL 投与によって脾臓を感作した場合、無処置ラット血清存在下では PL と



脾臓細胞との結合は観察されなかった(Fig. 2-4-A)。また PL 処置ラット血清存在下で、無処置ラット脾臓細胞や PL 感作ラット脾臓細胞への PL の結合が観察された。しかし、脾臓の PL 感作の有無にかかわらず、PL の脾臓細胞への結合量に変化はなかった。加えて、PL 処置ラット血清存在下で、MZ-B 細胞の感作の有無に関わらず、PL と MZ-B 細胞の結合が観察された(Fig. 2-4-B)。一方で同条件下において、FO-B 細胞や非 B 細胞への PL の結合はみられなかった。このことから、脾臓の感作自体は PL と MZ-B 細胞との結合に影響を与えないことが明らかになった。

#### 第五項 PEG 修飾リポソームと脾臓細胞との相互作用に及ぼす初回 PL 投与後に分泌される血清因子の経時変化の影響

血清因子の経時的分泌パターンを観察するために、初回 PL 投与の 1-14 日後に脾臓および血清を回収した。脾臓細胞を血清存在下で蛍光標識 PL とインキュベーションした後、PL と各細胞との結合量を測定した(Fig. 2-5-A)。



**Fig. 2-5 Change of the association of PL with spleen cells in the presence of serum obtained from PL-treated rat at various time points.** (A) Following intravenous injection of PL 0-14 days before, spleen and serum were collected. Then, spleen cell suspension was incubated with fluorescence-labeled PL in the presence of serum obtained from the same rat. The association of MZ-B cells (triangle), FO-B cells (square) and non-B cells (circle) were analyzed by flow cytometry. (B) Following intravenous injection of PL 0-7 days before, fluorescence-labeled PL was intravenously injected. Twenty four hours later, spleen was collected and the association of PL with MZ-B cells was analyzed by flow cytometry.

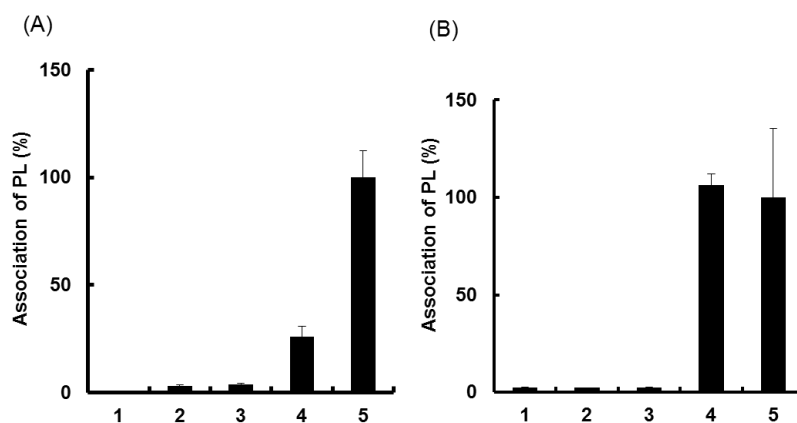
*In vitro* における PL と MZ-B 細胞との結合は、PL 投与 3 日後の血清の存在下で結合が観察され始め、5 日後のもので結合量がピークとなり、その後結合量は減少した。いずれの時点の血清を用いた場合でも、非 B 細胞や FO-B 細胞へ

の PL の結合はほとんど観察されなかった。この結合量の経時変化は、以前我々が報告している血清中の抗 PEG IgM 分泌変化と相関していた(14)。そのため、血清中の抗 PEG IgM が PL と MZ-B 細胞との結合に関与しているのかもしれない。

また *in vivo* においても同様の検討を行った。初回 PL 投与の 1-7 日後に、蛍光標識 PL を投与し、24 時間後における PL と MZ-B 細胞との結合量を測定した(Fig. 2-5-B)。その結果、*in vivo* においては初回 PL 投与の 2 日後に PL を投与した場合の時点から PL と MZ-B 細胞との結合が観察され始め、3 日目に結合量がピークとなり、その後結合量は減少した。*In vitro* と *in vivo* における PL の体内動態の違いがこのようなピークの違いを生じさせたのかもしれない。

#### 第六項 PEG 修飾リポソームと脾臓細胞との相互作用に及ぼす補体および抗 PEG IgM の影響

続いて、PL と MZ-B 細胞との結合における補体の必要性について検討した。PL の投与 5 日後に、脾臓と血清を回収した。補体の活性化を阻害するために、血清の非働化や血清への EDTA の添加を行い、補体の消費を引き起こすためにフィコールの添加を行った。これらの処理を行った血清の存在下において、脾臓細胞と蛍光標識 PL とをインキュベーションした。



**Fig. 2-6 Effect of anti-PEG IgM and complement on the association of PL with MZ-B cells.**

(A) Following intravenous injection of PL 5 days before, spleen and serum were collected. Then, spleen cell suspension was incubated with fluorescence-labeled PL in the presence of (1) HEPES or (2-5) serum. To inhibit complement activity or consume complement, serum was (2) inactivated, treated with (3) EDTA or (4) ficoll. As a control, serum was non-treated (5). The association of PL with MZ-B cells was analyzed by flow cytometry. (B) Naive rat spleen cell suspension was incubated with fluorescence-labeled PL in the presence of (1) naive rat serum, (2) anti-PEG IgM and inactivated naive rat serum, (3) control IgM and naive rat serum, (4) anti-PEG IgM and naive rat serum, or (5) PL-treated naive rat serum.

その結果、補体の活性化の阻害や補体の消費により、PL と MZ-B 細胞との結合が大きく阻害された(Fig. 2-6-A)。これは PL と MZ-B 細胞との結合に補体が必要であることを示している。

さらに最近我々が作製したマウスモノクローナル抗 PEG IgM (21)を用いて、抗 PEG IgM の必要性について検討した。この抗 PEG IgM もしくはコントロール IgM の存在下において、無処置ラット脾臓細胞と無処置ラット血清、蛍光標識 PL を混合してインキュベーションした。無処置ラット血清に、抗 PEG IgM を添加することにより、PL と MZ-B 細胞との結合が誘導されたが、コントロール IgM の添加では誘導されなかった(Fig. 2-6-B)。興味深いことに、補体の供給源である無処置ラット血清を非働化した場合、抗 PEG IgM を添加しても、PL と MZ-B 細胞との結合は観察されなかった。これらの結果から、PL と MZ-B 細胞との結合を誘導するためには、抗 PEG IgM と補体の両方が必要であることが明らかになった。

## 第 4 節 考察

これまでに脾臓辺縁帯に存在する細胞は、細菌などの病原体に暴露された後、病原体特有・病原体共通の抗原を直接認識、もしくは抗体や補体が結合したものを認識した後、抗原を速やかに濾胞や赤脾髄に輸送することが報告されている(22, 23)。本研究から、人工のナノキャリアである PEG 修飾リポソーム(PL)は、初回 PL 投与によって誘導された血清因子の存在下において、辺縁帯 B(MZ-B)細胞と結合し、濾胞に輸送されることが明らかになった(Fig. 2-1, 2-3)。また血清因子の中でも、抗 PEG IgM や補体が PL と MZ-B 細胞との結合に大きく関与することも明らかになった(Fig. 2-6)。このことから、PL を繰り返し投与した場合、2回目投与 PL に抗 PEG IgM や補体が結合して免疫複合体を形成し、その後 MZ-B 細胞に捕捉され、辺縁帯から濾胞に輸送されることが示唆された。

抗原が B 細胞に結合する様式についてはいくつか報告されている。抗原単独の場合、抗原特異的 B 細胞のみが B 細胞受容体(BCR)を介して抗原に直接結合することができる(24)。また、抗原・抗体免疫複合体の場合、抗原非特異的 B 細胞も、結合している抗体の Fc 部分に対する受容体を介して結合する(25)。さらに、抗原・抗体・補体の免疫複合体の場合、補体受容体を介して結合することもできる(26)。我々の研究においては、MZ-B 細胞への PL の直接的結合はほとんど見られず(Fig. 2-1)、抗 PEG IgM を添加するだけでも結合は観察されず、抗 PEG IgM と補体の両方が存在する場合において MZ-B 細胞への PL の多量な

結合が観察された(Fig. 2-6)。このことから、2回目投与 PL に抗 PEG IgM と補体が結合して免疫複合体が形成され、MZ-B 細胞と結合したと考えられる。また、PL と MZ-B 細胞との結合の増加には BCR や IgM 受容体である FcμR はほとんど寄与しておらず、補体受容体が関与している可能性が高い。BCR の関与がほとんどなかった原因としては、PEG に特異的な BCR を発現する MZ-B 細胞数が少なかったためと考えられる。FcμR は B 細胞のみに発現するが、その発現量は MZ-B 細胞よりも FO-B 細胞の方が多い(27)。抗 PEG IgM と補体の存在下においても、PL と FO-B 細胞との結合はあまり観察されなかったため、FcμR の関与は少ないと考えられる。一方で、MZ-B 細胞は、FO-B 細胞と比較して補体受容体タイプ 2(CR2)を高発現していることがよく知られている(28)。そのため、PL と抗 PEG IgM と補体の免疫複合体は、MZ-B 細胞に選択的に結合したと考えられる。抗原/IgM/補体の免疫複合体の形成は、IgM が誘導される細菌感染時の初期から中期に見られ、抗原の効率的な除去やさらなる抗体反応の増強に寄与するため(29)、MZ-B 細胞への PL の結合はこの現象と同様の反応を誘導するかもしれない。

細胞による抗原の輸送が起こらない脾臓切片においては、PL 処置ラット血清存在下で、PL のほとんどは辺縁帯に蓄積していた(Fig. 2-2)。また PL 処置ラット血清を輸注した無処置ラットに PL を投与した場合、PL は MZ-B 細胞と結合し、濾胞に蓄積していた(Fig. 2-3)。このことから、MZ-B 細胞は血清の存在下で PL と結合した後、PL を濾胞に輸送したと考えられる。これは、他の研究報告と一致している(17)。また、MZ-B 細胞は無処置ラット由来であるため、初回投与 PL による MZ-B 細胞の前感作は輸送に関係しないことが示唆された。一方で、MZ-B 細胞上の CR2 への PL/PEG IgM/補体からなる免疫複合体の結合が濾胞への遊走シグナルを誘導するのか、そもそも MZ-B 細胞が濾胞に移行性を示すのかは明らかでない。他の研究報告において、CR2 とその共受容体である CD19 の相互作用を阻害した場合でも、免疫複合体の濾胞への輸送が誘導されることが報告されている(30)。しかし、CR2 自体の細胞内シグナルを阻害した場合の輸送については報告されていない。一方で、Cinamon らの報告によると、CR2 を欠損したマウスにおいても、MZ-B 細胞の濾胞への遊走は観察された(18)。そのため、免疫複合体が MZ-B 細胞上の CR2 に結合することが遊走を引き起こすわけではないことが示唆されている。MZ-B 細胞は辺縁帯に局在すると考えられていたが、最近の研究において、MZ-B 細胞はケモカインの制御下、恒常的に辺縁帯と濾胞を往復することが報告されている(31-33)。それゆえ、PL は MZ-B 細胞と結合した後、MZ-B 細胞の恒常的な遊走機構に従って濾胞に輸送されたのかもしれない。

In vitro における PL と MZ-B 細胞との結合においては、初回 PL 投与 5 日後

の血清を添加した場合に、結合量が最大になった(Fig. 2-5-A)。一方で *in vivo* における 2 回目投与 PL と MZ-B 細胞との結合においては、初回 PL 投与 3 日後に PL を投与した場合に MZ-B 細胞への結合量が最大になった(Fig. 2-5-B)。初回 PL 投与 5 日後ではなく、3 日後に 2 回目投与 PL と MZ-B 細胞との結合がピークになったのは、*in vivo* における 2 回目投与 PL の体内動態が原因かもしれない。以前の検討から抗 PEG IgM の分泌がピークとなる初回 PL 投与 5 日後に PL を投与すると、70% 近くの PL が肝臓に蓄積することが明らかになっている(8)。肝臓への PL の蓄積が多くなったため、結果的に脾臓への PL の蓄積が減って MZ-B 細胞への結合量が減少したと考えられる。一方で初回 PL 投与 3 日後に PL を投与した場合、肝臓への PL の蓄積は 40% 程度であり、脾臓への蓄積がある程度保たれ、MZ-B 細胞への結合が多くみられたと考えられる。マクロファージによる免疫複合体の取り込みには、抗原表面における IgM や補体の密度に依存することが報告されている(34, 35)。そのため、抗 PEG IgM 量が少ない初回 PL 投与 3 日後において、PL に結合している IgM や補体が少なく、肝臓のマクロファージによる取り込みが少なかったと考えられる。一方、脾臓辺縁帯においては血流速度が非常に遅いため(36)、IgM や補体密度が低くても MZ-B 細胞は PL と結合できたのかもしれない。

現在、様々な PEG 修飾ナノ粒子を用いたワクチン研究が行われており、PEG 修飾ナノ粒子の 1 回投与後の体内動態については検討されている。PEG 修飾ナノ粒子を 1 回皮下投与した場合、ナノ粒子の PEG 化により投与部位からリンパ節への移行が促進され、リンパ節の樹状細胞によるナノ粒子の取り込みが増加することが報告されている(37, 38)。また PEG 修飾ナノ粒子を 1 回静脈内投与することにより、脾臓内においてナノ粒子のほとんどは、辺縁帯に蓄積してマクロファージに捕捉されることが報告されているが(12, 39)、濾胞に輸送される場合も報告されている(40)。一方で、ワクチン治療において PEG 修飾ナノ粒子の繰り返し投与は必須と考えられ、繰り返し投与時のナノ粒子のリンパ組織の移行性や分布を明らかにすることは重要と考えられるが、そのような研究はほとんどない。本検討から、PEG 修飾リポソームの静脈内繰り返し投与時のリポソームの脾臓移行性や分布の変化とその機序が明らかになった。これらの情報は、今後の PEG 修飾ナノ粒子によるワクチン研究に役立つかもしれない。

## 引用文献

1. Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, & Yau-Young A (1991) Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged

- circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1066(1):29-36.
2. Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C, & Gregoriadis G (1991) Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1062(1):77-82.
  3. Torchilin VP, *et al.* (1994) Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim Biophys Acta* 1195(1):11-20.
  4. Dams ET, *et al.* (2000) Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. *J Pharmacol Exp Ther* 292(3):1071-1079.
  5. Laverman P, *et al.* (2000) Preclinical and clinical evidence for disappearance of long-circulating characteristics of polyethylene glycol liposomes at low lipid dose. (Translated from eng) *J Pharmacol Exp Ther* 293(3):996-1001 (in eng).
  6. Ishida T, Maeda R, Ichihara M, Irimura K, & Kiwada H (2003) Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections. *J Control Release* 88(1):35-42.
  7. Ishida T, Ichihara M, Wang X, & Kiwada H (2006) Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. (Translated from eng) *J Control Release* 115(3):243-250 (in eng).
  8. Ishida T, *et al.* (2006) Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J Control Release* 112(1):15-25.
  9. Cyster JG (2000) B cells on the front line. *Nat Immunol* 1(1):9-10.
  10. Demoy M, *et al.* (1997) Splenic trapping of nanoparticles: complementary approaches for in situ studies. (Translated from eng) *Pharm Res* 14(4):463-468 (in eng).
  11. Cho M, *et al.* (2009) The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. (Translated from eng) *Toxicol Lett* 189(3):177-183 (in eng).
  12. Zhang M, Yamaguchi T, Iijima S, & Yudasaka M (2013) Size-dependent biodistribution of carbon nanohorns in vivo. (Translated from eng) *Nanomedicine* 9(5):657-664 (in eng).
  13. Litzinger DC, Buiting AM, van Rooijen N, & Huang L (1994) Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. (Translated from eng) *Biochim Biophys Acta*

- 1190(1):99-107 (in eng).
14. Ishida T, Wang X, Shimizu T, Nawata K, & Kiwada H (2007) PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner. *J Control Release* 122(3):349-355.
  15. Shimizu T, Ishida T, & Kiwada H (2013) Transport of PEGylated liposomes from the splenic marginal zone to the follicle in the induction phase of the accelerated blood clearance phenomenon. (Translated from eng) *Immunobiology* 218(5):725-732 (in eng).
  16. Ishida T, Kashima S, & Kiwada H (2008) The contribution of phagocytic activity of liver macrophages to the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon of PEGylated liposomes in rats. (Translated from eng) *J Control Release* 126(2):162-165 (in eng).
  17. Ferguson AR, Youd ME, & Corley RB (2004) Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int Immunol* 16(10):1411-1422.
  18. Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW, Jr., & Cyster JG (2008) Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* 9(1):54-62.
  19. El Shikh ME, El Sayed RM, Szakal AK, & Tew JG (2009) T-independent antibody responses to T-dependent antigens: a novel follicular dendritic cell-dependent activity. (Translated from eng) *J Immunol* 182(6):3482-3491 (in eng).
  20. Bartlett GR (1959) Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids. *J Biol Chem* 234(3):469-471.
  21. Hashimoto Y, *et al.* (2014) Generation, characterization and in vivo biological activity of two distinct monoclonal anti-PEG IgMs. (Translated from eng) *Toxicol Appl Pharmacol* 277(1):30-38 (in eng).
  22. Pozdnyakova O, Guttormsen HK, Lalani FN, Carroll MC, & Kasper DL (2003) Impaired antibody response to group B streptococcal type III capsular polysaccharide in C3- and complement receptor 2-deficient mice. (Translated from eng) *J Immunol* 170(1):84-90 (in eng).
  23. Karlsson MC, *et al.* (2003) Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. (Translated from eng) *J Exp Med* 198(2):333-340 (in eng).
  24. Souwer Y, *et al.* (2009) B cell receptor-mediated internalization of salmonella: a novel pathway for autonomous B cell activation and antibody production. (Translated from eng) *J Immunol* 182(12):7473-7481 (in eng).

25. Bheekha Escura R, *et al.* (1995) Regulation and targeting of T-cell immune responses by IgE and IgG antibodies. (Translated from eng) *Immunology* 86(3):343-350 (in eng).
26. Thornton BP, Vetvicka V, & Ross GD (1994) Natural antibody and complement-mediated antigen processing and presentation by B lymphocytes. (Translated from eng) *J Immunol* 152(4):1727-1737 (in eng).
27. Honjo K, *et al.* (2012) Altered Ig levels and antibody responses in mice deficient for the Fc receptor for IgM (FcmuR). (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(39):15882-15887 (in eng).
28. Zandvoort A & Timens W (2002) The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. (Translated from eng) *Clin Exp Immunol* 130(1):4-11 (in eng).
29. Boes M (2000) Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. (Translated from eng) *Mol Immunol* 37(18):1141-1149 (in eng).
30. Barrington RA, *et al.* (2009) Uncoupling CD21 and CD19 of the B-cell coreceptor. (Translated from eng) *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34):14490-14495 (in eng).
31. Cyster JG (2005) Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. (Translated from eng) *Annu Rev Immunol* 23:127-159 (in eng).
32. Kraal G (2008) Antigens take the shuttle. (Translated from eng) *Nat Immunol* 9(1):11-12 (in eng).
33. Arnon TI, Horton RM, Grigorova IL, & Cyster JG (2013) Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. (Translated from eng) *Nature* 493(7434):684-688 (in eng).
34. Atkinson JP & Frank MM (1974) Studies on the in vivo effects of antibody. Interaction of IgM antibody and complement in the immune clearance and destruction of erythrocytes in man. (Translated from eng) *J Clin Invest* 54(2):339-348 (in eng).
35. Litvack ML, Post M, & Palaniyar N (2011) IgM promotes the clearance of small particles and apoptotic microparticles by macrophages. (Translated from eng) *PLoS One* 6(3):e17223 (in eng).
36. Wennberg E & Weiss L (1969) The structure of the spleen and hemolysis. (Translated from eng) *Annu Rev Med* 20:29-40 (in eng).
37. Zhan X, Tran KK, & Shen H (2012) Effect of the poly(ethylene glycol) (PEG) density on the access and uptake of particles by antigen-presenting cells (APCs) after



- subcutaneous administration. (Translated from eng) *Mol Pharm* 9(12):3442-3451 (in eng).
38. Zhuang Y, *et al.* (2012) PEGylated cationic liposomes robustly augment vaccine-induced immune responses: Role of lymphatic trafficking and biodistribution. (Translated from eng) *J Control Release* 159(1):135-142 (in eng).
  39. Bruckman MA, *et al.* (2014) Biodistribution, pharmacokinetics, and blood compatibility of native and PEGylated tobacco mosaic virus nano-rods and -spheres in mice. (Translated from eng) *Virology* 449:163-173 (in eng).
  40. Almeida JP, *et al.* (2014) In vivo immune cell distribution of gold nanoparticles in naive and tumor bearing mice. (Translated from eng) *Small* 10(4):812-819 (in eng).

### 第三章 抗原封入 PEG 修飾リポソームの脾臓濾胞への輸送現象を利用した体液性免疫反応の増強に関する検討

#### 第一節 緒言

ワクチンの効果を最大限に発揮させるためには、抗原を免疫細胞が存在するリンパ節や脾臓に送達することが重要である。これまでのワクチンにおいて、投与が比較的簡単な皮下投与や筋肉内投与が主流であったが、これらの部位には免疫細胞が少なく、リンパ節まで抗原を移行させる必要があった。通常、低分子の抗原は **conduits** と呼ばれる導管を通して、抗体分泌反応の成熟領域である濾胞へと流入する(1, 2)。しかし細菌やウイルス、免疫複合体などの粒子状の大きな抗原は導管を通過することができない。そのため、生体内の細胞による抗原輸送機構が必要となってくる(3, 4)。一方、最近ではワクチンの皮内投与について数多く研究されている。皮内にはランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞などが豊富に存在し(5)、抗原を捕獲してリンパ節に遊走するため、皮下投与や筋肉内投与よりも免疫誘導能が高いことが報告されている(6-8)。また一方で、静脈内投与によるワクチンについては、侵襲性が高いものの、脾臓を含む全身のリンパ組織に多くの抗原を送達し、速やか且つ持続的な免疫応答を誘導できるとされている(9, 10)。一部の例であるが、マラリアワクチンの臨床試験において皮内投与より静脈内投与の方が免疫誘導に優れていたという報告もある(11, 12)。

我々の以前の検討において、PEG 修飾リポソーム(PL)を1回静脈内投与した場合、脾臓内においてPLは濾胞の外側にわずかに蓄積するのみであった。しかし、PLを2-5日の投与間隔で2回繰り返し投与すると、2回目投与PLは濾胞に多量に蓄積することが明らかになった(13)。また2回目投与PLの多くはMZ-B細胞に結合しており、時間経過に伴ってPLの分布が辺縁帯から濾胞へと変化していたことから、MZ-B細胞によってPLが濾胞へと輸送されることが示されている。さらに前章の検討から、抗PEG IgMおよび補体の存在下で、PLはMZ-B細胞に選択的に結合し、濾胞へ輸送されていた。そのため、2回目投与PLは免疫複合体として濾胞に輸送されることが示唆されている。

濾胞に常在する濾胞樹状細胞(FDC)は、補体受容体やFcγRIIB受容体などを発現しており、これらを介して免疫複合体と相互作用し、抗原を *intact* な状態で長期間保持することが報告されている(14)。またFDCは共刺激分子を発現し、様々なサイトカイン・ケモカインを分泌している(15)。そのような機構を介して

FDC は、胚中心の形成、B 細胞の生存、抗体反応の成熟・記憶など様々な体液性免疫反応の開始・増強に寄与している(16-18)。一方で FDC は濾胞に常在するため、FDC へと抗原を輸送する細胞が存在しており、脾臓においては MZ-B 細胞がその役割を担うことが報告されている(19, 20)。そのため、MZ-B 細胞によって輸送された PL の一部は、FDC に受け渡されている可能性がある。通常、PL を 1 回静脈内投与した場合には、抗原を封入した PL を FDC まで送達できないが、PEG に対する免疫反応を介した本現象を利用することにより、FDC に抗原を多量に送達することが可能となり、長期に持続する抗体分泌反応を誘導することが期待される。

そこで本検討では、PL の濾胞への輸送現象を利用することにより、体液性免疫反応を増強できるかどうか検討した。まず、PL の濾胞への輸送が誘導されることにより、FDC による PL の取り込みが増加するかどうか確認した。続いて、抗原を封入した PL の濾胞への輸送を誘導することにより、抗原特異的抗体反応が増強されるかどうか検討した。

## 第二節 実験方法

### 第一項 試薬・動物

リポソームの調製に必要な試薬については、第二章・第二節・第一項に記載したものを使用した。DiO(3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate、Ex=484 nm、Em=501 nm)は Life Technologies より購入した。Ovalbumin(OVA)は Sigma より購入した。FTY720 は Cayman Chemical(MI, USA)より購入した。その他の試薬に関しては特級品を購入し、実験に用いた。Wistar 系ラット(雄、8-9 週齢、200-300 g)は日本 SLC より購入した。

### 第二項 リポソーム・蛍光標識 OVA の調製

PEG 修飾リポソーム(PL)の脂質組成は HEPC : mPEG<sub>2000</sub>-DSPE : Chol = 1.85 : 0.15 : 1(モル比)とした。また PL の体内動態を可視化する場合、脂質膜マーカーである DiI もしくは DiO をリン脂質に対して 1%(モル比)となるように加えた。調製法は、第二章・第二節・第二項に記載のとおりである。OVA 封入 PL(OVA-PL)は凍結乾燥法により調製した。調製した PL にアルギニン塩酸塩および OVA を加えて溶解させた(最終濃度 ; リン脂質 15 mmol/ml、アルギニン塩酸塩 50 mg/ml、OVA 10 mg/ml)。予備凍結(-81℃、2 時間)した後、真空凍結乾燥機(FreeZone、Labconco、KS、USA)を用いて凍結乾燥した(-52℃、0.133 mBar 以下、24 時間)。凍結乾燥したサンプルを取り出して超純水で再水和した

後、激しく攪拌した。未封入の OVA は Sepharose CL4B(GE healthcare、Uppsala、Sweden)を用いたゲル濾過により取り除いた。調製した OVA-PL の粒子径およびリン脂質濃度は第二章・第二節・第二項に記載した方法により測定した。また OVA の濃度は、Dc プロテインアッセイキット(Bio-Rad laboratories、CA、USA)を用いて測定した。

### 第三項 濾胞樹状細胞による OVA-PL の取り込み測定

濾胞樹状細胞(FDC)による OVA-PL の取り込みを評価するために、蛍光標識 OVA を作製した。作製には DyLight 488 Amine-Reactive Dye and Kits (ThermoScientific、IL、USA)を用い、マニュアルに従って DyLight488 標識 OVA を調製した。調製した DyLight488 標識 OVA を上記の方法に従い、PL 内に封入した(Dy-OVA-PL)。抗原未封入の空の PL(0.001  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg)をラット静脈内に投与した 3 日後、Dy-OVA-PL(0.6 mg OVA/kg)をラットに静脈内投与した。またリポソーム自体の取り込みを評価するために、Dy-OVA-PL の代わりに DiO-PL(5  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg)を静脈内投与した。投与 24 時間後に脾臓を回収し、第二章・第二節・第三項に記載した方法に従って、脾臓細胞懸濁液の調製およびフローサイトメトリー解析を行った。なお、FDC の染色には mouse ant-rat FDC antibody (ED5、GeneTex、CA、USA)と PE 標識 goat anti-mouse IgG antibody (Rockland Immunochemicals、PA、USA)を用いた。

### 第四項 PL の濾胞への輸送の観察

抗原未封入の空の PL(0.001  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg)をラット静脈内に投与した 3 日後、DiI-PL(5  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg)を静脈内投与した。投与 24 時間後に脾臓を回収し、第二章・第二節・第五項の方法に従い、脾臓切片の作製・免疫染色・蛍光顕微鏡観察を行った。

また辺縁帯 B(MZ-B)細胞による DiI-PL の濾胞への輸送を阻害するために、FTY720 を用いた。FTY720 は MZ-B 細胞を濾胞に局在化させることが報告されている(21)。そこで、DiI-PL の投与の 8 時間前に FTY720(5 mg/kg)を腹腔内投与した。同様に DiI-PL の輸送を競合的に阻害させるために、DiI-PL の投与 30 分前に空の高投与量の PL(5  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg)を静脈内投与した。

### 第五項 免疫

抗原未封入の空の PL(0.001  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg)をラットの静脈内に投与することにより、前刺激を行った。前刺激の 3 日後に OVA-PL(100  $\mu\text{g}$  OVA/kg)を静脈内投与することにより免疫を行った。さらに 14 日後に、OVA-PL(100  $\mu\text{g}$  OVA/kg)を静脈内投与することにより 2 回目の免疫を行った。各時点において血

液を回収し、血清を得た。

MZ-B 細胞による OVA-PL の濾胞への輸送が免疫反応に及ぼす影響を検討するために、前項と同様に FTY720 と空の高投与量の PL を用いて OVA-PL の濾胞への輸送を阻害した。OVA-PL による免疫を行う 8 時間前もしくは 30 分前に、FTY720 もしくは空の高投与量の PL をそれぞれ投与した。OVA-PL による免疫の 7 日後に採血を行った。

空の PL 投与と OVA-PL 投与との投与間隔の検討においては、空の PL による前刺激の 1-7 日後に、OVA-PL を用いて免疫し、その 7 日後に採血を行った。

## 第六項 ELISA

OVA 特異的抗体の測定は、OVA でコーティングしたプレートを用いた ELISA により評価した。まず 100 µg/ml の OVA 溶液を 96 ウェルプレートに 100 µl 添加した。室温で 2 時間インキュベーションした後、0.05% Tween20 含有トリス緩衝液(Wash buffer)を用いて 3 回洗浄した。続いて 1% BSA 含有トリス緩衝液を 200 µl 添加して、1 時間ブロッキングを行った。3 回洗浄を行った後、希釈した血清を 100 µl 添加して 1 時間反応させた。5 回洗浄を行った後、希釈した HRP 標識抗ラット IgM/IgG/IgG1/IgG2a/IgG2b 抗体(BETHYL laboratories、TX、USA)を 100 µl 添加してさらに 1 時間インキュベーションした。5 回洗浄を行った後、o-phenylene diamine (Sigma)溶液を 100 µl 添加して発色させた。5-15 分後に 2 M 硫酸を 100 µl 添加して反応を停止させ、490 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー(Sunrise、TECAN Japan、神奈川、日本)を用いて測定した。

## 第七項 統計学的解析

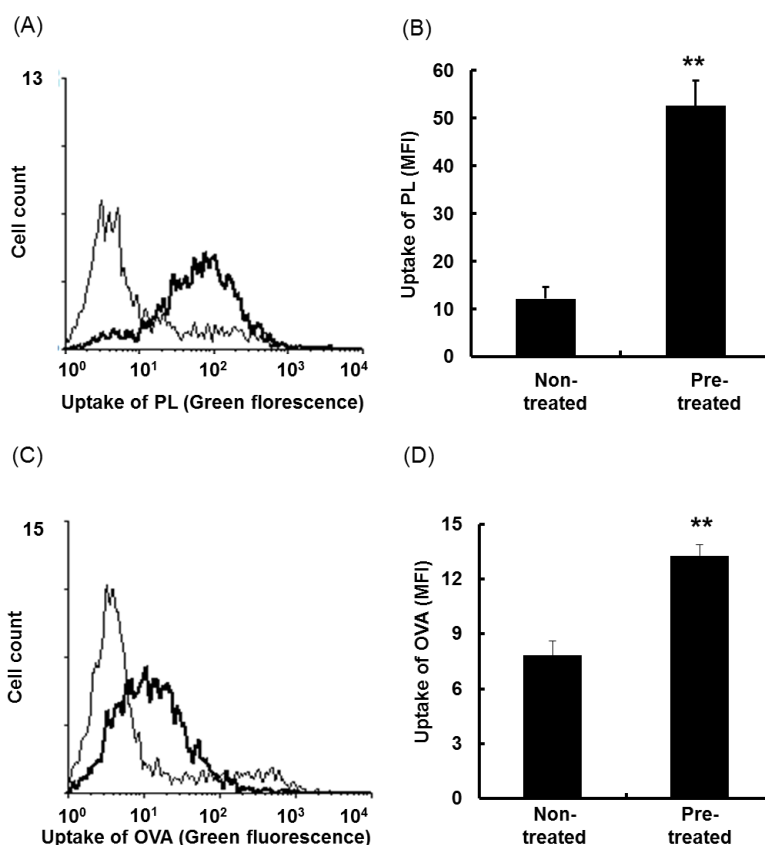
第二章・第二節・第八項と同様に、統計学的解析を行った。

## 第三節 結果

### 第二項 濾胞樹状細胞による OVA-PL の取り込みに空の PL の前刺激が与える影響

これまでの検討から、初回 PL 投与の 3 日後に再び PL を投与すると、2 回目投与 PL に抗 PEG IgM および補体が結合して、MZ-B 細胞によって捕捉され、濾胞に輸送されることが明らかになっている。B 細胞に結合した免疫複合体は、時間経過に伴いその一部を濾胞樹状細胞(FDC)に受け渡すことが報告されている(22)。そこでまず、空の PL の初回投与による前刺激によって OVA-PL の濾胞

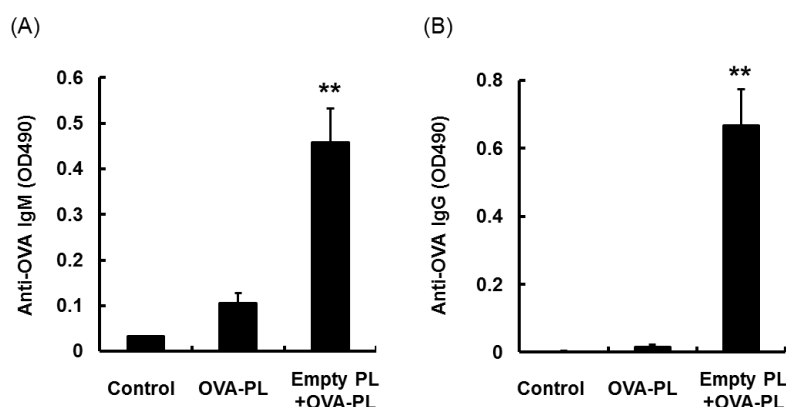
への輸送を誘導することにより、OVA-PL が FDC によって取り込まれるかどうか検討した。空の PL による前刺激の 3 日後に、蛍光標識した PL もしくは OVA-PL を静脈内投与し、FDC による PL の取り込み量(Fig. 3-1-A, B)及び OVA の取り込み量(Fig. 3-1-C, D)を測定した。前刺激がない場合、一部の FDC が PL および OVA を取り込んでいたが、ほとんどの FDC はこれらを取り込まなかった。一方で、前刺激を行った場合、多くの FDC が PL および OVA を取り込んだ。FDC による PL および OVA の取り込み量を数値化したところ、前刺激がない場合と比較して前刺激がある場合の方が、PL の取り込み量が約 4.3 倍に、OVA の取り込み量が約 1.7 倍に増加した。このことから、空の PL による前刺激を行うことで、FDC による OVA-PL の取り込み量が増加することが明らかになった。OVA の取り込み量増加が、PL の取り込み量増加と比較して少なかったのは、PL から OVA が一部放出されたことが原因と考えられる。



**Fig. 3-1 Effect of pre-stimulation with empty PL on the uptake of subsequently injected OVA-PL by FDC.** Following intravenous injection of PL 3 days before, fluorescence-labeled PL (A,B) or PL containing fluorescence-labeled OVA (C,D) was intravenously injected. One day later, the uptake of PL and OVA by splenic FDC was measured by flow cytometry. (A,C) Representative histogram (thin line: non-treated, thick line: pre-treated. (B,D) Mean fluorescence intensity (MFI). \*\* p < 0.01 vs. without pre-stimulation with PL

## 第二項 OVA-PL によって誘導される抗 OVA IgM および IgG 分泌に空の PL による前刺激が与える影響

次に、空の PL による前刺激を行って OVA-PL の濾胞への輸送を誘導することにより、抗 OVA 抗体分泌が増加するかどうか検討した。空の PL による前刺激の 3 日後、OVA-PL を静脈内投与することにより免疫した。免疫の 3 日後に抗 OVA IgM 分泌量(Fig. 3-2-A)を、10 日後に抗 OVA IgG 分泌量(Fig. 3-2-B)を測定した。前刺激がない場合、抗 OVA IgM、IgG とともにほとんど分泌されなかった。しかし、前刺激を加えることにより IgM・IgG 分泌量がそれぞれ約 4 倍、10 倍以上に増加した。このことから、空の PL による前刺激を行い、OVA-PL を濾胞に輸送して FDC に取り込ませることにより、抗体分泌を増強できることが示唆された。

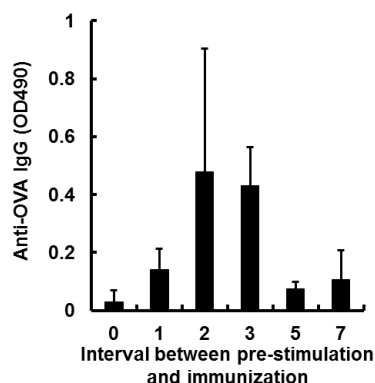


**Fig. 3-2 Effect of pre-stimulation with empty PL on the antibody response against OVA encapsulated in subsequently injected PL.** Following intravenous injection of empty PL 3 days before, OVA-PL was intravenously injected. Three days and ten days later, sera were collected. Anti-OVA IgM (3 day) and anti-OVA IgG (10 day) in the sera were measured by ELISA. \*\*  $p < 0.01$  vs. without pre-stimulation with PL

## 第三項 空の PL と OVA-PL との投与間隔が抗 OVA IgG 分泌に与える影響

前章の検討から、2 回目投与 PL と MZ-B 細胞との結合及び濾胞への輸送は、1 回目 PL 投与と 2 回目 PL 投与との投与間隔に依存することが明らかとなった。結果として、投与間隔が 2 日の場合に、MZ-B 細胞への二回目投与 PL の結合が観察され始め、3 日に結合量がピークとなり、その後減少していた。そこで続いて、空の PL 投与と OVA-PL 投与との投与間隔が抗体分泌に与える影響について検討した。空の PL の投与 1-7 日後、OVA-PL を投与し、その 7 日後における抗 OVA IgG 分泌量を測定した。Fig. 3-3 に示すように、投与間隔が 1 日の場合には抗 OVA IgG 分泌の増強はみられなかったが、2-3 日の場合に IgG 分泌の増

強が観察された。一方、投与間隔が 5 日・7 日の場合には IgG 分泌の増強効果が消失することが分かった。この結果は *in vivo* における MZ-B 細胞と 2 回目投与 PL との結合量変化と一致していた。



**Fig. 3-3 Effect of interval between pre-stimulation with empty PL and immunization with OVA-PL on the induction of anti-OVA IgG.** Following intravenous injection of empty PL 1-7 days before, OVA-PL was intravenously injected. Seven days later, serum was collected and anti-OVA IgG in the serum was measured by ELISA.

#### 第四項 MZ-B 細胞による PL の濾胞への輸送が抗 OVA IgG 分泌に与える影響

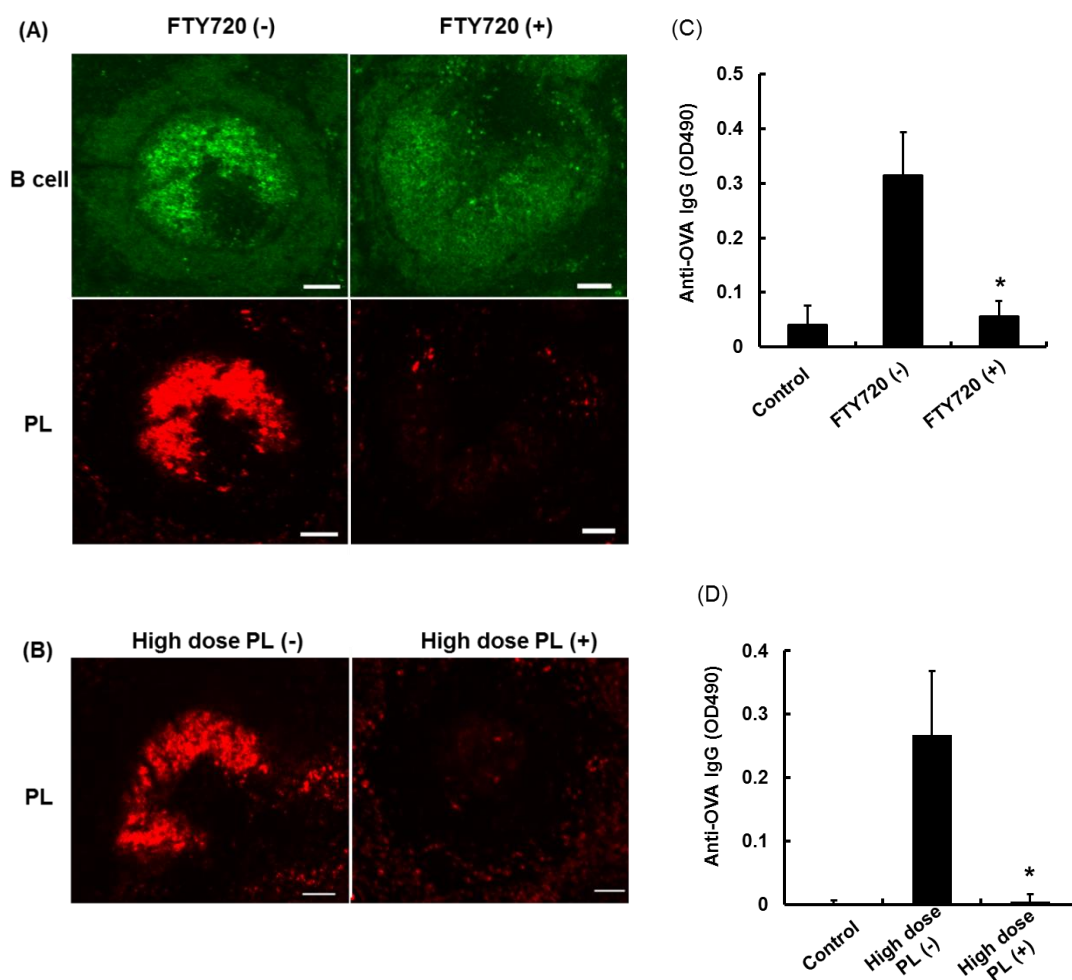
MZ-B 細胞による OVA-PL の濾胞への輸送が抗 OVA IgG 分泌増強に関与していることを明らかにするために、MZ-B 細胞による輸送の阻害実験を行った。阻害には、MZ-B 細胞を予め濾胞へと局在化させる FTY720 と、OVA-PL と競合的に阻害する高投与量の空の PL を用いた。まず、これらの処置により 2 回目投与 PL の濾胞への輸送が阻害されるかを確認した。

阻害を行わない群では、空の PL 投与の 3 日後に蛍光標識 PL を静脈内投与し、その 24 時間後の脾臓中における蛍光標識 PL の分布を観察した。阻害を行う群では、蛍光標識 PL の投与 8 時間前に FTY720 を、もしくは 30 分前に高投与量の PL を投与した。予期した通り、FTY720 を前投与することにより MZ-B 細胞の大部分は辺縁帯に存在していた(Fig. 3-4-A)。この MZ-B 細胞の大部分が濾胞に存在する条件下で蛍光標識 PL を投与した場合、PL の濾胞への輸送が阻害された。また同様に高投与量の PL を前投与することにより、PL の濾胞への輸送が阻害された(Fig. 3-4-B)。

続いて、これらの阻害処理が OVA-PL による抗 OVA IgG 分泌誘導を阻害するかどうかについて検討した。阻害を行わない群では、空の PL 投与の 3 日後に、OVA-PL を静脈内投与し、その 7 日後に血清中の抗 OVA IgG 分泌量を測定した。先程と同様に FTY720 は OVA-PL の投与 8 時間前に、高投与量の空の PL は 30 分前に投与した。その結果、FTY720 の前投与を行うことにより、抗 OVA IgG



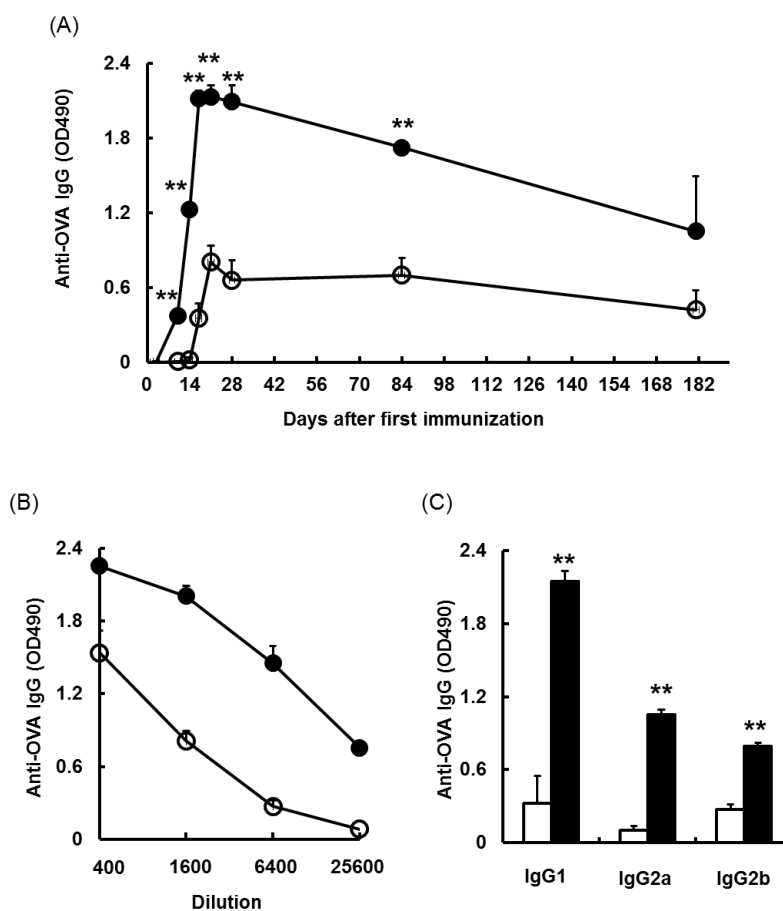
分泌誘導が有意に抑制された(Fig. 3-4-C)。同様に、高投与量の PL を多量に前投与することにより、抗 OVA-IgG 分泌が抑制された(Fig. 3-4-D)。これらの結果は、OVA-PL の濾胞への輸送の阻害が抗 OVA IgG 分泌誘導を阻害したことを示唆している。以上の結果より、MZ-B 細胞によって OVA-PL が濾胞に輸送されることにより、抗 OVA IgG 分泌が増強されることが明らかになった。



**Fig. 3-4 Effect of follicular transport of OVA-PL on the induction of anti-OVA IgG.** (A,B) Empty PL was intravenously injected 3 days before. Following pre-treatment with (A)FTY720 or (B)high dose empty PL, fluorescence-labeled PL was injected. Twenty four hours later, intrasplenic distribution of PL was observed under fluorescence microscope (Green: B cell, Red: PL). (C,D) Empty PL was intravenously injected 3 days before. Following pre-treatment with (C)FTY720 or (D)high dose empty PL, OVA-PL was injected. Seven days later, serum was collected and anti-OVA IgG in the serum was measured by ELISA. \*  $p < 0.05$  vs. without inhibitor

### 第五項 繰り返し免疫時における抗 OVA IgG 分泌誘導

ワクチンは通常複数回の投与を行う。そこで続いて、OVA-PL による 2 回免疫を行った場合に誘導される抗 OVA IgG 分泌特性について評価した。空の PL による前刺激を行った 3 日後、OVA-PL を用いて初回免疫を行った。初回免疫の 14 日後、OVA-PL を用いて 2 回目免疫を行った。



**Fig. 3-5 Anti-OVA IgG responses after twice immunizations with OVA-PL after pre-stimulation with empty PL.** Following pre-stimulation with empty PL 3 days before, OVA-PL was intravenously injected as first immunization. At 14 days after first immunization, OVA-PL was injected as second immunization. Sera were collected at indicated time points and anti-OVA IgG in the serum were measured by ELISA. (A) Time course of anti-OVA IgG. (B) Titer of anti-OVA IgG and (C) subclass of anti-OVA IgG at day 17 after first immunization. Open symbol and bar: without pre-stimulation. Closed symbol and bar: with pre-stimulation. \*\* p<0.01 vs. without pre-stimulation with PL

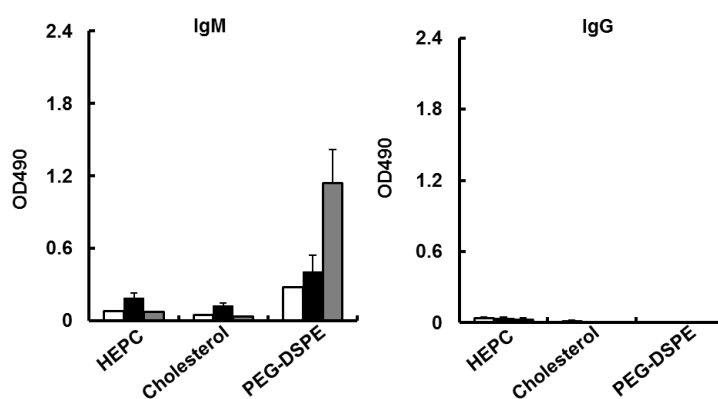
2 回免疫を行うことにより、抗 OVA IgG 分泌量は劇的に増加し、6 か月間にわたり高い水準を示した(Fig. 3-5-A)。空の PL による前刺激を行っていない場合

と比較して、前刺激を行った方が高い IgG 抗体価を示した(Fig. 3-5-B)。さらに誘導された抗 OVA IgG のサブクラスについて解析したところ、体液性免疫誘導の指標である IgG1、細胞性免疫誘導の指標である IgG2a/IgG2b とともに誘導されており、いずれにおいても前刺激を加えた方がより強く誘導されていた(Fig. 3-5-C)。

#### 第六項 空の PL による前刺激と OVA-PL による免疫が PL に対する免疫応答に与える影響

これまでの検討から、空の PL による前刺激を行うことにより、続いて投与された PL 内に封入された OVA に対する抗体反応が増強されることが示された。一方で、PL 自身に対する抗体反応に空の PL による前刺激が与える影響については明らかではなかった。そこで、空の PL による前刺激と OVA-PL の 2 回免疫により、PL 構成脂質に対する IgM・IgG の分泌誘導が増強されるかどうか検討した。

その結果、抗 PEG IgM 分泌が若干みられたが、その他の構成成分である HEPC や Cholesterol に対する IgM の分泌は観察されなかった(Fig. 3-6)。また PL の構成成分に対する IgG 分泌は全く観察されなかった。このことから、空の PL による前刺激は、PL の構成脂質に対する抗体応答には影響を与えず、PL 内に封入された抗原特異的に抗体分泌を増強できることが示唆された。



**Fig. 3-6 Effect of pre-stimulation with empty PL on the antibody response against each component of PL.** Following pre-stimulation with empty PL 3 days before, OVA-PL was intravenously injected as first immunization. At 14 days after first immunization, OVA-PL was injected as second immunization. Serum was collected at 17 days after first immunization (white bar: without pre-stimulation, black bar: with pre-stimulation). As a control, serum was collected at 5 days after intravenous injection of empty PL (gray bar). IgM and IgG against PL component were measured by ELISA.

## 第4節 考察

本研究から、空の PEG 修飾リポソーム(PL)の前刺激の後に、OVA-PL を投与することにより、濾胞樹状細胞(FDC)による OVA の取り込みが増加し(Fig. 3-1)、OVA に対する抗体分泌が増強されることが明らかになった(Fig. 3-2, 3-5)。空の PL による前刺激は、続いて投与された PL の濾胞への輸送を誘導するため、抗原封入 PL の濾胞への送達は抗原特異的な抗体反応の誘導に有用であることが示された。

ワクチン効果を増強するために、抗原特異的な抗体を予め抗原に結合させて様々な投与経路で免疫を行う免疫複合体ワクチン研究が数多く行われている(23-26)。我々の検討においても、空の PL による前刺激を行うことで抗 PEG IgM が誘導されており、続いて投与された OVA-PL と結合して補体を活性化して免疫複合体を形成し、免疫反応の増強につながっていると考えられる。抗原/IgM/補体の免疫複合体による免疫反応増強においては、補体受容体タイプ 2(CR2)が重要であることが明らかになっている(27, 28)。CR2 を介した抗体分泌増強のメカニズムの1つとして、B 細胞受容体(BCR)と CR2 の共刺激がある。BCR と CR2 が共刺激されると、BCR 刺激の閾値が低下してシグナルが増幅されて抗体分泌が増加するとされている(29)。しかし、我々の実験では PL/抗 PEG IgM/補体の複合体は PEG 特異的な BCR と CR2 に結合していると考えられるため、PL 内に封入している OVA に対する共刺激は起こりにくいと考えられる。そのため、CR2 を介した共刺激よりも、CR2 を介して OVA-PL の免疫複合体が濾胞に輸送されることが重要であるかもしれない。実際、MZ-B 細胞による OVA-PL の濾胞への輸送を阻害することで、抗 OVA IgG 分泌増強が抑制されており(Fig. 3-4)、これは濾胞への抗原輸送が抗体反応の増強に必要であることを示唆している。濾胞への抗原輸送は、IgM の免疫複合体だけでなく(19, 30)、IgE(31, 32)や IgG2a(33)の免疫複合体でも報告されており、その後の抗体反応を増強する。濾胞中の抗原濃度が増加することで、抗原特異的 B 細胞と抗原との遭遇確率の増大、T 細胞への抗原提示能の増大が起こり、抗体分泌が増強されたのかもしれない。

空の PL による前刺激を行い、OVA-PL の濾胞への輸送を促進することにより、FDC による PL および OVA の取り込みが増加した(Fig. 3-1)。FDC は MZ-B 細胞と同様に、CR2 を高発現しており、MZ-B 細胞から免疫複合体の一部を受け取ることが報告されている(22)。また OVA-PL 自身は高分子であるため、conduits を通って FDC に到達するのは難しい(2)。そのため、OVA-PL は MZ-B 細胞を介して FDC に受け渡されるものと考えられる。一方で、OVA-PL から放

出された OVA が conduits を通って FDC に取り込まれた可能性も否定できないが、FDC は免疫複合体の取り込みに特化しているため(34)、その可能性は低いと考えられる。加えて FDC は、抗原を intact なままで長期間保持することが報告されている唯一の細胞で、免疫記憶に重要な役割を果たしている。空の PL による前刺激によって OVA-PL の FDC への送達が増加するため、長期間の免疫記憶も誘導されるかもしれない。OVA-PL を捕捉した FDC がどのように抗体反応を増強しているかは明らかではないが、FDC は細胞表面に免疫複合体を周期的に提示するとされている(22)。FDC が抗原のリザーバーとして働き、FDC 上に提示された OVA-PL から徐々に OVA が放出されて、抗原特異的 B 細胞を刺激しているのかもしれない。

今回の検討において、空の PL による前刺激の 2-3 日後に OVA-PL を用いて免疫することにより OVA 特異的抗体分泌が増強されたが、その他の投与間隔では増強が観察されなかった(Fig. 3-3)。前章の検討から、2 回目投与 PL の MZ-B 細胞への結合は、1 回目の PL 投与と 2 回目の PL 投与との投与間隔が 2-3 日の場合に最大になることが明らかになっている。つまり抗 OVA IgG 分泌量増加は、2 回目投与 PL の MZ-B 細胞への結合量増加と概ね相関していた。一方で前章に示したように *in vitro* における PL と MZ-B 細胞の結合は抗 PEG IgM 量に依存していたが、*in vivo* において血中の抗 PEG IgM 量がピークとなる投与間隔が 5 日の場合、PL と MZ-B 細胞の結合や抗 OVA IgG 誘導量は少なかった。この原因として、前章でも述べたが、血中の多量の抗 PEG IgM は 2 回目投与 PL の肝臓への移行を大きく促進し、脾臓への移行を低下させたことが考えられる(35)。脾臓やリンパ節への抗原の送達量は、抗体分泌の程度や分泌パターン、抗体のサブクラスに影響を与えることが報告されており(36-38)、我々の検討でも同様の結果が得られたものと考えられる。また移行量とは別に、抗原・抗体免疫複合体の刺激による抗体分泌誘導において、抗原と抗体の比率が重要であることも報告されている(39)。投与間隔が 5 日の場合、抗原である OVA-PL に対して抗体である抗 PEG IgM の比率が大きく、免疫刺激性の抗原・抗体複合体を形成しないのかもしれない。

現在ワクチンとして汎用されているハプテン-キャリアタンパクシステムによる繰り返し免疫を行った場合、ハプテン抗原に対する抗体が誘導されるだけでなく、キャリアタンパクに対する抗体も誘導される。キャリアタンパクに対する抗体の産生は、続いて投与されたハプテン-キャリアタンパク複合体によって誘導される抗ハプテン抗体反応を増強できるのが一般的であるが(40, 41)、逆に抗ハプテン抗体反応が阻害されることも報告されている(42, 43)。そのため、抗キャリアタンパク抗体の過剰な産生は望ましくないと考えられる。我々の OVA-PL を用いた検討では、抗 OVA IgG 産生の増強はみられたが、OVA を封

入している PL に対する抗体反応の増強はみられなかった(Fig. 3-6)。キャリアタンパクと異なり、PL は生体適合性の高いリン脂質やコレステロールから構成されるため、抗体反応の増強がみられなかったと考えられる。また抗 PEG IgM の分泌は若干みられたが、PEG は T 細胞非依存性抗原として機能し、一過性に抗 PEG IgM を誘導するだけであることが明らかになっている(44)。PEG は T 細胞依存性抗原として機能する OVA と全く異なる経路で B 細胞を活性化するため、PEG に対する免疫反応は影響を受けなかったのかもしれない。以上のことから PL は、不要な免疫反応を誘導しない抗原送達システムとして働くことが期待される。

## 引用文献

1. Roozendaal R, *et al.* (2009) Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. (Translated from eng) *Immunity* 30(2):264-276 (in eng).
2. Nolte MA, *et al.* (2003) A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. (Translated from eng) *J Exp Med* 198(3):505-512 (in eng).
3. Batista FD & Harwood NE (2009) The who, how and where of antigen presentation to B cells. (Translated from eng) *Nat Rev Immunol* 9(1):15-27 (in eng).
4. Cyster JG (2010) B cell follicles and antigen encounters of the third kind. (Translated from eng) *Nat Immunol* 11(11):989-996 (in eng).
5. Lenz A, Heine M, Schuler G, & Romani N (1993) Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. (Translated from eng) *J Clin Invest* 92(6):2587-2596 (in eng).
6. Hickling JK, *et al.* (2011) Intradermal delivery of vaccines: potential benefits and current challenges. (Translated from eng) *Bull World Health Organ* 89(3):221-226 (in eng).
7. Wilck MB, *et al.* (2010) Safety and immunogenicity of modified vaccinia Ankara (ACAM3000): effect of dose and route of administration. (Translated from eng) *J Infect Dis* 201(9):1361-1370 (in eng).
8. Mohanan D, *et al.* (2010) Administration routes affect the quality of immune responses: A cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems. (Translated from eng) *J Control Release* 147(3):342-349 (in eng).

9. Bhowmick S, Mazumdar T, & Ali N (2009) Vaccination route that induces transforming growth factor beta production fails to elicit protective immunity against *Leishmania donovani* infection. (Translated from eng) *Infect Immun* 77(4):1514-1523 (in eng).
10. Hanke T, *et al.* (1998) Immunogenicities of intravenous and intramuscular administrations of modified vaccinia virus Ankara-based multi-CTL epitope vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in mice. (Translated from eng) *J Gen Virol* 79 ( Pt 1):83-90 (in eng).
11. Epstein JE, *et al.* (2011) Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic CD8(+) T cell immunity. (Translated from eng) *Science* 334(6055):475-480 (in eng).
12. Seder RA, *et al.* (2013) Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. (Translated from eng) *Science* 341(6152):1359-1365 (in eng).
13. Shimizu T, Ishida T, & Kiwada H (2013) Transport of PEGylated liposomes from the splenic marginal zone to the follicle in the induction phase of the accelerated blood clearance phenomenon. (Translated from eng) *Immunobiology* 218(5):725-732 (in eng).
14. Mandel TE, Phipps RP, Abbot A, & Tew JG (1980) The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. (Translated from eng) *Immunol Rev* 53:29-59 (in eng).
15. El Shikh ME & Pitzalis C (2012) Follicular dendritic cells in health and disease. (Translated from eng) *Front Immunol* 3:292 (in eng).
16. Wu Y, *et al.* (2008) Immune complex-bearing follicular dendritic cells deliver a late antigenic signal that promotes somatic hypermutation. (Translated from eng) *J Immunol* 180(1):281-290 (in eng).
17. El Shikh ME, El Sayed RM, Szakal AK, & Tew JG (2009) T-independent antibody responses to T-dependent antigens: a novel follicular dendritic cell-dependent activity. (Translated from eng) *J Immunol* 182(6):3482-3491 (in eng).
18. Wang X, *et al.* (2011) Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. (Translated from eng) *J Exp Med* 208(12):2497-2510 (in eng).
19. Ferguson AR, Youd ME, & Corley RB (2004) Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int Immunol* 16(10):1411-1422.
20. Cinamon G, Zachariah MA, Lam OM, Foss FW, Jr., & Cyster JG (2008) Follicular

- shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* 9(1):54-62.
21. Vora KA, *et al.* (2005) Sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720-phosphate causes marginal zone B cell displacement. (Translated from eng) *J Leukoc Biol* 78(2):471-480 (in eng).
  22. Heesters BA, *et al.* (2013) Endocytosis and recycling of immune complexes by follicular dendritic cells enhances B cell antigen binding and activation. (Translated from eng) *Immunity* 38(6):1164-1175 (in eng).
  23. Goins CL, Chappell CP, Shashidharamurthy R, Selvaraj P, & Jacob J (2010) Immune complex-mediated enhancement of secondary antibody responses. (Translated from eng) *J Immunol* 184(11):6293-6298 (in eng).
  24. Kumar R, Tuen M, Li H, Tse DB, & Hioe CE (2011) Improving immunogenicity of HIV-1 envelope gp120 by glycan removal and immune complex formation. (Translated from eng) *Vaccine* 29(48):9064-9074 (in eng).
  25. Ding Z, *et al.* (2013) Complement-activating IgM enhances the humoral but not the T cell immune response in mice. (Translated from eng) *PLoS One* 8(11):e81299 (in eng).
  26. Kruijzen D, *et al.* (2013) Intranasal administration of antibody-bound respiratory syncytial virus particles efficiently primes virus-specific immune responses in mice. (Translated from eng) *J Virol* 87(13):7550-7557 (in eng).
  27. Applequist SE, Dahlstrom J, Jiang N, Molina H, & Heyman B (2000) Antibody production in mice deficient for complement receptors 1 and 2 can be induced by IgG/Ag and IgE/Ag, but not IgM/Ag complexes. (Translated from eng) *J Immunol* 165(5):2398-2403 (in eng).
  28. Rutemark C, *et al.* (2012) Complement receptors 1 and 2 in murine antibody responses to IgM-complexed and uncomplexed sheep erythrocytes. (Translated from eng) *PLoS One* 7(7):e41968 (in eng).
  29. Lyubchenko T, dal Porto J, Cambier JC, & Holers VM (2005) Coligation of the B cell receptor with complement receptor type 2 (CR2/CD21) using its natural ligand C3dg: activation without engagement of an inhibitory signaling pathway. (Translated from eng) *J Immunol* 174(6):3264-3272 (in eng).
  30. Link A, *et al.* (2012) Innate immunity mediates follicular transport of particulate but not soluble protein antigen. (Translated from eng) *J Immunol* 188(8):3724-3733 (in eng).
  31. Hjelm F, Karlsson MC, & Heyman B (2008) A novel B cell-mediated transport of IgE-immune complexes to the follicle of the spleen. (Translated from eng) *J Immunol*



- 180(10):6604-6610 (in eng).
32. Henningsson F, *et al.* (2011) IgE-mediated enhancement of CD4+ T cell responses in mice requires antigen presentation by CD11c+ cells and not by B cells. (Translated from eng) *PLoS One* 6(7):e21760 (in eng).
  33. Getahun A, Dahlstrom J, Wernersson S, & Heyman B (2004) IgG2a-mediated enhancement of antibody and T cell responses and its relation to inhibitory and activating Fc gamma receptors. (Translated from eng) *J Immunol* 172(9):5269-5276 (in eng).
  34. Tew JG, Burton GF, Kupp LI, & Szakal A (1993) Follicular dendritic cells in germinal center reactions. (Translated from eng) *Adv Exp Med Biol* 329:461-465 (in eng).
  35. Ishida T, *et al.* (2006) Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J Control Release* 112(1):15-25.
  36. Ochsenbein AF, *et al.* (2000) Correlation of T cell independence of antibody responses with antigen dose reaching secondary lymphoid organs: implications for splenectomized patients and vaccine design. (Translated from eng) *J Immunol* 164(12):6296-6302 (in eng).
  37. Kaur R, Bramwell VW, Kirby DJ, & Perrie Y (2012) Pegylation of DDA:TDB liposomal adjuvants reduces the vaccine depot effect and alters the Th1/Th2 immune responses. (Translated from eng) *J Control Release* 158(1):72-77 (in eng).
  38. Getahun A & Heyman B (2009) Studies on the mechanism by which antigen-specific IgG suppresses primary antibody responses: evidence for epitope masking and decreased localization of antigen in the spleen. (Translated from eng) *Scand J Immunol* 70(3):277-287 (in eng).
  39. Siegrist CA (2003) Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. (Translated from eng) *Vaccine* 21(24):3406-3412 (in eng).
  40. Knuf M, Kowalzik F, & Kieninger D (2011) Comparative effects of carrier proteins on vaccine-induced immune response. (Translated from eng) *Vaccine* 29(31):4881-4890 (in eng).
  41. Pravetoni M, *et al.* (2014) Effect of Currently Approved Carriers and Adjuvants on the Pre-Clinical Efficacy of a Conjugate Vaccine against Oxycodone in Mice and Rats. (Translated from eng) *PLoS One* 9(5):e96547 (in eng).
  42. Pobre K, *et al.* (2014) Carrier priming or suppression: understanding carrier priming enhancement of anti-polysaccharide antibody response to conjugate vaccines.

- (Translated from eng) *Vaccine* 32(13):1423-1430 (in eng).
43. Kaliyaperumal A, Chauhan VS, Talwar GP, & Raghupathy R (1995) Carrier-induced epitope-specific regulation and its bypass in a protein-protein conjugate. (Translated from eng) *Eur J Immunol* 25(12):3375-3380 (in eng).
  44. Ishida T, Wang X, Shimizu T, Nawata K, & Kiwada H (2007) PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner. *J Control Release* 122(3):349-355.

## 第四章 抗原封入 PEG 修飾リポソームの脾臓濾胞への輸送現象を

### 利用した細胞性免疫反応の増強に関する検討

#### 第一節 緒言

細胞傷害性 T 細胞(CTL)は、癌細胞に発現する腫瘍関連抗原を認識して癌細胞を排除する腫瘍免疫機構の中心を担っている。CTL の活性化には腫瘍関連抗原を取り込んだ抗原提示細胞(APC)が関与し、APC は主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラス I を介して抗原を提示して CTL を誘導する。それゆえ、CTL を効率的に誘導するために、APC に腫瘍関連抗原を多量に送達できるキャリアの開発が望まれている(1)。がんワクチンにおけるキャリアとしては、イスコム、リポソーム、ウイルス様粒子、生分解性ナノ粒子などが開発されている(2, 3)。これらのキャリアは抗原をその表面・内部に保持し、その粒子サイズから APC に効率よく取り込まれる性質を持つ。一方で APC に取り込まれた抗原は、外来性物質であるため MHC クラス II を介して抗原提示されやすく、CTL は誘導されにくい。しかしながら一部の樹状細胞などは、外来性抗原を MHC クラス I 上に提示(クロスプレゼンテーション)して、CTL を誘導できることが報告されている(4)。この観点から、樹状細胞を標的としたがんワクチンの開発が数多く行われている(5)。

ところで最近、樹状細胞ではなく、B 細胞を標的としたがんワクチンの開発もいくつか行われている(6-8)。B 細胞は抗体分泌細胞であると同時に APC として機能するとされている。また B 細胞は樹状細胞と同様に MHC 分子や共刺激分子を高発現し、さらにクロスプレゼンテーションを介して CTL を誘導できることが報告されている(9, 10)。B 細胞にはいくつかのサブセットの B 細胞が存在するが、その中でも辺縁帯 B(MZ-B)細胞は共刺激分子である CD80/86 の発現が高く、T 細胞を効率的に活性化できることも報告されている(11)。一方で、B 細胞の APC の機能に関しては相反する報告も存在する。一般に B 細胞は樹状細胞よりも CTL 誘導能が低いとされており、B 細胞が抗原提示細胞として働いた場合、T 細胞がアナジーに陥ることもある(12, 13)。この理由として、樹状細胞と比較して、B 細胞による抗原の取り込み量が少なく、効率的に CTL を活性化できないことが考えられる。そのため、B 細胞に多量に抗原を送達することが可能ならば、有用な APC として機能するものと考えられる。

これまでに我々は PEG 修飾リポソーム(PL)の繰り返し投与時に誘導される免

疫活性化機構解明の研究を行ってきた(14, 15)。そのメカニズム解明の研究過程で我々は、PLの初回投与2-5日後に再びPLを投与すると、脾臓内においてPLがMZ-B細胞に多量に結合し、濾胞に輸送されるという非常に興味深い現象を見出した(16)。前章の検討から、ラットにおいてPLの初回投与3日後に、OVA封入PL(OVA-PL)を用いて免疫すると、抗OVA IgMおよびIgG分泌量が有意に増加しており、体液性免疫を活性化できることが明らかになった。また抗OVA IgGのサブクラスを解析したところ、体液性免疫の指標であるIgG1だけでなく細胞性免疫の指標であるIgG2aも誘導されていた。これは抗体産生の増強だけでなく、CTLの誘導も可能であることを示唆している。また上述のように、MZ-B細胞は通常のB細胞よりも抗原提示能力が高い。このことから、OVA-PLをMZ-B細胞へ標的化させる、空のPLによる前刺激は抗腫瘍免疫の誘導に有用である可能性が高い。

そこで本検討では、PLによる前刺激を加えてOVA-PLのMZ-B細胞への結合を増加させることにより、抗腫瘍免疫反応を増強できるかどうか検討した。まずアジュバントを用いない条件下で、PLによる前刺激が抗原封入PLによるCTLの誘導を増強し、腫瘍成長抑制効果を示すかどうか検討した。続いてアジュバントである $\alpha$ -ガラクトシルセラミドをOVA-PLの構成脂質に含有させて同様の検討を行った。また同時に、空のPLによる前刺激がCTL活性を抑制する抑制性免疫細胞に与える影響について検討した。

## 第二節 実験方法

### 第一項 試薬・細胞・動物

リポソームの調製に必要な試薬については、第二章・第二節・第一項に記載したものを使用した。5-(and-6)-Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester (CFSE)はLife Technologiesより購入した。7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)はBD Biosciences(NJ, USA)より購入した。 $\alpha$ -ガラクトシルセラミド(GC)は協和発酵キリン(東京、日本)より購入した。その他の試薬に関しては特級品を購入し、実験に用いた。OVA発現Tリンパ腫細胞(EG7-OVA)はAmerican Type Culture Collection(ATCC, VA, USA)より購入した。またC57BL/6Nマウス(雄、4-5週齢、20-25g)は日本SLCより購入した。

### 第二項 リポソームの調製

PEG修飾リポソーム(PL)の脂質組成はHEPC:mPEG<sub>2000</sub>-DSPE:Chol=1.85:0.15:1(モル比)とした。またアジュバントとして $\alpha$ -ガラクトシルセラミ

ド(GC)を添加する場合、総脂質に対して 0.5%(モル比)となるように GC を加えた GC-PL を調製した。調製法は、第二章・第二節・第二項に記載のとおりである。OVA 封入 PL(OVA-PL)および OVA 封入 GC-PL(OVA-GC-PL)は凍結融解法により調製した。調製した PL に OVA を加えて溶解させた(最終濃度;リン脂質 10 mmol/ml、OVA 10 mg/ml)。凍結(-81°C、2 時間)と融解(37°C、15 分間)を 3 回繰り返した。未封入の OVA は Sepharose CL4B(GE healthcare、Bio-Sciences)を用いたゲル濾過により取り除いた。調製した OVA-PL および OVA-GC-PL の粒子径およびリン脂質濃度は第二章・第二節・第二項に記載した方法により測定した。またタンパク質濃度は、Dc プロテインアッセイキット(Bio-Rad laboratories)を用いて測定した。

### 第三項 腫瘍移植前の免疫による腫瘍成長抑制効果

抗原未封入の空の PL(0.01  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg)をマウスの静脈内に投与することにより、前刺激を行った。前刺激の 3 日後に OVA-PL もしくは OVA-GC-PL(20  $\mu\text{g}$  OVA/マウス)を静脈内投与することにより免疫を行った。1 回のみ免疫の場合、免疫の 14 日後に、EG7-OVA( $10^6$  細胞)を皮下移植した。また 3 回の免疫を行う場合、前刺激と免疫の組み合わせを 2 週間おきに計 3 回行い、最終免疫の 7 日後に EG7-OVA を皮下移植した。ポジティブコントロールとして、OVA とフロイント完全アジュバントとのエマルジョンを皮下投与して免疫した。その後、腫瘍の大きさを経時的に測定した。

### 第四項 腫瘍移植後の免疫による腫瘍成長抑制効果

まず、EG7-OVA( $10^6$  細胞)を皮下移植した。腫瘍の大きさが約 100  $\text{mm}^3$  に到達したら(約 7 日後)、抗原未封入の空の PL(0.01  $\mu\text{mol}$  リン脂質/kg)をマウスの静脈内に投与することにより、前刺激を行った。前刺激の 3 日後に OVA-GC-PL(20  $\mu\text{g}$  OVA/マウス)を静脈内投与することにより免疫を行った。その後、腫瘍の大きさを経時的に測定した。

### 第五項 細胞傷害性 T 細胞(CTL)アッセイ

免疫したマウスから脾臓を取り出した後、セルストレーナー(Greiner Bio-One、Frickenhausen、Germany)を用いて RPMI1640 培地中(100 U/mL ペニシリン、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ストレプトマイシン、50 mM 2-メルカプトエタノール)に懸濁させた。また赤血球は、溶血剤(0.83% 塩化アンモニウム溶液)を加えて 5 分間静置することにより溶血させた。調製した脾臓細胞( $4 \times 10^6$  cells/mL)は、OVA(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )の存在下で 5 日間培養し、エフェクター細胞とした。ターゲット細胞である EG-7 OVA は、マイトマイシン C を用いて細胞分裂を止めた後(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、

37°C、1時間)、CFSEを用いて蛍光標識した(100 μM、37°C、10分)。エフェクター細胞とターゲット細胞を12.5/1~50/1の割合で混合して12時間共培養した後、7-AADを用いてアポトーシス細胞を染色した。ターゲット細胞のアポトーシスをGuava EasyCyte Mini Systemを用いて、フローサイトメトリーにより測定した。

#### 第六項 脾臓中各種免疫細胞のフローサイトメトリー解析

免疫したマウスから脾臓を取り出した後、第二章・第二節・第三項に示した方法により脾臓細胞懸濁液を調製し、同様の方法で各種脾臓細胞集団を染色して、フローサイトメトリー解析を行った。なお、制御性T細胞(Treg)の測定には、PE標識抗マウスCD4抗体およびAlexa488標識抗マウスCD25抗体(eBioscience、CA、USA)を、骨髄由来抑制性細胞(MDSC)の測定には、PE標識抗マウスLy-6G抗体およびFITC標識抗マウスCD11b抗体(eBioscience)を、ナチュラルキラーT細胞(NKT)の測定には、FITC標識抗マウスCD3抗体(eBioscience)およびPE標識T-Select Mouse CD1d Tetramer(MBL、名古屋、日本)を用いた。

#### 第七項 統計学的解析

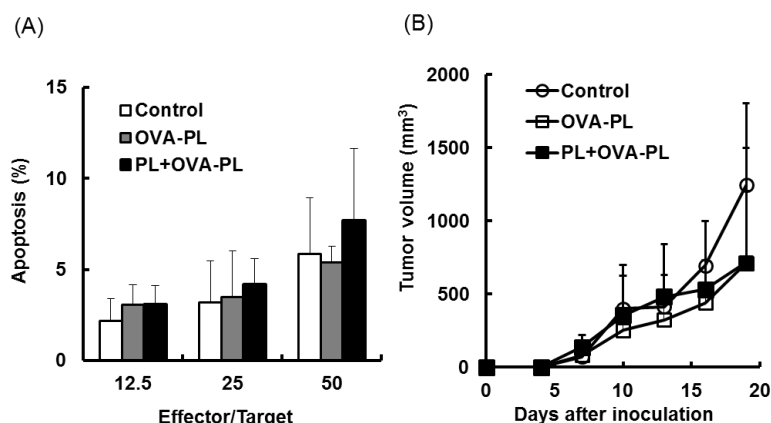
第二章・第二節・第八項と同様に、統計学的解析を行った。

### 第三節 結果

#### 第三項 腫瘍移植前における空のPLとOVA-PLによる1回免疫がCTLの誘導およびOVA発現腫瘍の成長に与える影響

まず空のPEG修飾リポソーム(PL)による前刺激とOVA封入PL(OVA-PL)による1回の免疫が細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導するかどうか検討した。空のPLによる前刺激の3日後に、OVA-PLを静脈内投与して免疫を行った。14日後に脾臓を回収し、OVA発現腫瘍であるEG7-OVAに対するCTLの誘導を評価した。無処置のコントロール群と比較して、OVA-PL単独免疫群ではCTLによるEG7-OVAのアポトーシスの増加は観察されなかった(Fig. 4-1-A)。また空のPLによる前刺激を加えた場合においても同様の結果となった。

続いて、免疫の14日後にEG7-OVAをマウスに皮下移植した場合の腫瘍成長抑制効果について検討した。OVA-PL単独免疫群、空のPLとOVA-PLによる免疫群において腫瘍成長の抑制傾向が観察されたが、有意な抑制効果はなかった。



**Fig. 4-1 Effect of single immunization with empty PL plus OVA-PL on CTL induction and tumor growth suppression.** Following intravenous injection of PL 3 days before, OVA-PL was intravenously injected. As a control, OVA-PL was intravenously injected without pre-stimulation with PL. (A) Fourteen days later, spleen was collected and re-stimulated with OVA. Following co-culture of spleen cell with EG7-OVA, apoptosis of EG7-OVA was assessed by flow cytometry. (B) Fourteen days later, EG7-OVA was subcutaneously inoculated into mice and the tumor size was measured.

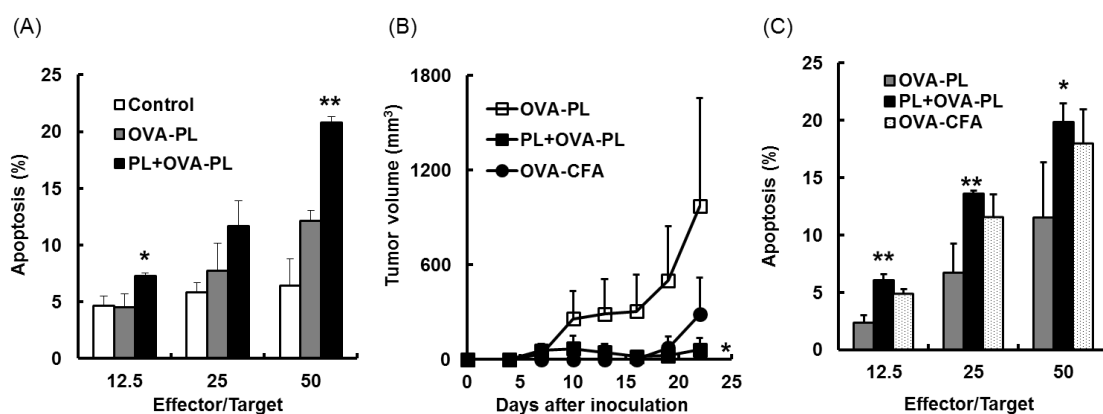
## 第二項 腫瘍移植前における空の PL と OVA-PL による 3 回免疫が CTL の誘導および OVA 発現腫瘍の成長に与える影響

1 回の免疫では CTL の誘導や腫瘍成長抑制効果を示さなかったため、3 回の免疫を行って検討した。空の PL による前刺激の 3 日後に、OVA-PL を静脈内投与して免疫を行った。これを 1 セットとし、2 週間おきに計 3 回行った。最終免疫の 7 日後に脾臓を回収し、EG7-OVA に対する CTL の誘導を評価した。OVA-PL 単独免疫群では、EG7-OVA のアポトーシスの増加はわずかだったが、空の PL による前刺激を加えることにより、EG7-OVA の有意なアポトーシスの増加が観察された(Fig. 4-2-A)。このことから、空の PL と OVA-PL を組み合わせることで 3 回免疫することにより、OVA 特異的 CTL が誘導されることが示された。

続いて最終免疫の 7 日後に EG7-OVA を皮下移植した場合の腫瘍成長抑制効果を検討した。また今回ポジティブコントロールとして、OVA とフロイント完全アジュバントとのエマルジョン(OVA-CFA)を用いて皮下免疫した。その結果、空の PL による前刺激を加えた場合、前刺激がない場合と比較して有意な腫瘍成長抑制効果を示した(Fig. 4-2-B)。また空の PL と OVA-PL の組み合わせによる免疫は、OVA-CFA と比較して同等以上の腫瘍成長抑制効果を示した。

空の PL と OVA-PL による免疫による腫瘍成長抑制効果が CTL に起因するのかが検証するために、腫瘍移植後に機能している CTL の活性を評価した。空の

PL と OVA-PL による 3 回の免疫の 7 日後に EG7-OVA を移植し、その 22 日後に脾臓を回収して、CTL 活性を評価した。Fig. 4-2-A での結果と同様に、空の PL による前刺激と OVA-PL による免疫を組み合わせることにより、EG7-OVA のアポトーシスが有意に増加していた (Fig. 4-2-C)。このことは、空の PL と OVA-PL による 3 回の免疫によって誘導された CTL が腫瘍移植後においても機能していることを示唆している。以上の結果から、OVA-PL による免疫前に行う空の PL による前刺激は、CTL の誘導を増強し、腫瘍成長を抑制することが示された。



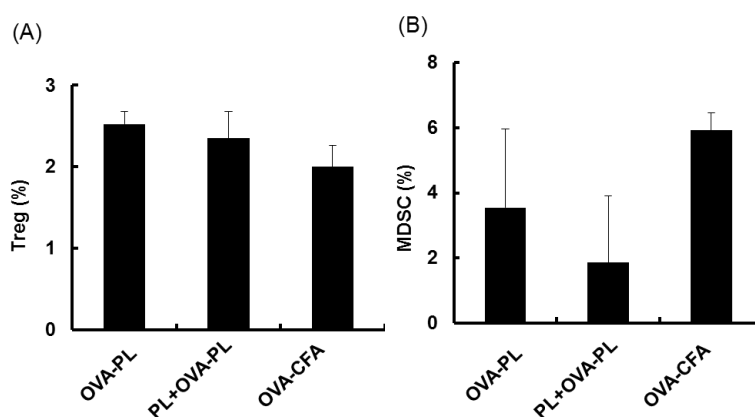
**Fig. 4-2 Effect of repeated immunizations with empty PL plus OVA-PL on CTL induction and tumor growth suppression.** Following intravenous injection of PL 3 days before, OVA-PL was intravenously injected. As controls, OVA-PL (intravenously) or OVA-CFA (subcutaneously) was injected without pre-stimulation with PL. These immunizations were repeated 3 times every 2 weeks. (A) At day 7 after last immunization, spleen was collected and re-stimulated with OVA. Following co-culture of spleen cell with EG7-OVA, apoptosis of EG7-OVA was assessed by flow cytometry. (B,C) At day 7 after last immunization, EG7-OVA was subcutaneously inoculated into mice and the tumor size was measured. (C) At day 22 after tumor inoculation, spleen was collected and re-stimulated with OVA. Following co-culture of spleen cell with EG7-OVA, apoptosis of EG7-OVA was assessed by flow cytometry. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. without pre-stimulation with PL

### 第三項 腫瘍移植前における空の PL と OVA-PL による 3 回免疫が抑制性免疫細胞に与える影響

免疫細胞の中には、CTL の働きを抑制し、腫瘍保護的に機能する抑制性免疫細胞の存在が報告されている(17)。空の PL による前刺激がこれらの細胞を抑制して腫瘍成長抑制効果に影響を与えた可能性がある。そこで、空の PL と OVA-PL による免疫がこれらの細胞に与える影響について検討した。上記のように、3 回免疫を行い、腫瘍を移植した後に脾臓を回収し、脾臓中の制御性 T



細胞(Treg)と骨髄由来抑制性細胞(MDSC)の割合の変化を測定した。Treg に関しては、空の PL による前刺激の有無に関わらず大きな変化はみられなかった(Fig. 4-3-A)。MDSC に関しては、空の PL による前刺激を加えることで、MDSC の割合が若干減少したが、有意な差はみられなかった。このことは、空の PL による前刺激は抑制性免疫細胞にほとんど影響を与えないことを示している。そのため空の PL と OVA-PL を組み合わせた免疫による腫瘍成長抑制効果は、抑制性免疫細胞に依存しないと考えられる。



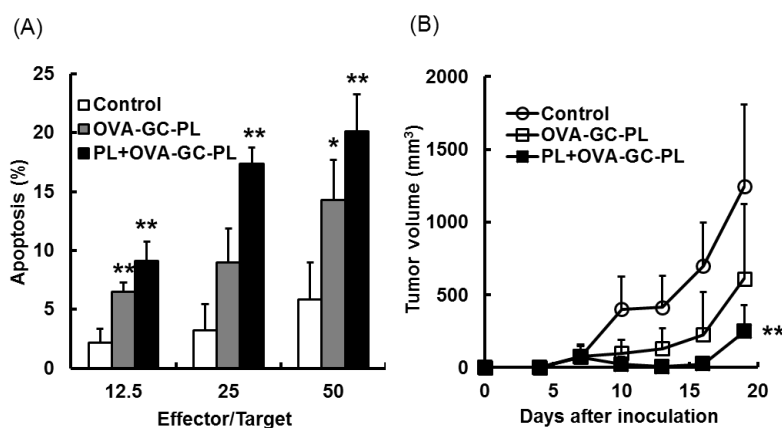
**Fig. 4-3 Effect of repeated immunizations with empty PL plus OVA-PL on immunosuppressive cell.** Following intravenous injection of PL 3 days before, OVA-PL was intravenously injected. As controls, OVA-PL (intravenously) or OVA-CFA (subcutaneously) was injected without pre-stimulation with PL. These immunizations were repeated 3 times every 2 weeks. At day 7 after last immunization, EG7-OVA was subcutaneously inoculated into mice. Twenty two days later, spleen was collected and stained with various antibodies before flow cytometry analysis. (A) A frequency of regulatory T cell (Treg) and (B) myeloid derived suppressor cell (MDSC).

#### 第四項 腫瘍移植前における空の PL と GC 含有 OVA-PL による 1 回免疫が CTL の誘導および OVA 発現腫瘍の成長に与える影響

これまで検討から、空の PL と OVA-PL による免疫により抗腫瘍免疫が誘導されることが示されたが、3 回の免疫が必要であり、より効率的な免疫誘導が望まれる。そこで我々はアジュバントである  $\alpha$  ガラクトシルセラミド(GC)を用いた。GC は、ナチュラルキラーT(NKT)細胞を活性化し、さらには CTL 活性を増強することで、直接的また間接的に抗腫瘍免疫を誘導することが知られている(18)。また GC は脂質部分を持つため、容易に PL に組み込むことができる。そこで GC を組み込んだ OVA-GC-PL を調製して免疫に用い、空の PL と OVA-GC-PL による 1 回免疫が CTL の誘導を亢進させるか検討した。空の PL

による前刺激の3日後、OVA-GC-PLを静脈内投与して免疫を行った。14日後に脾臓を回収し、CTLの誘導を評価した。OVA-GC-PL単独で1回免疫を行った場合、コントロール群と比較して有意なCTLの誘導が観察された(Fig. 4-4-A)。また空のPLによる前刺激を加えることにより、CTL誘導がさらに亢進された。

そこで続いて、免疫の14日後にEG7-OVAを皮下移植し、腫瘍成長抑制効果の検討を行った(Fig. 4-4-B)。先程の結果と一致して、OVA-GC-PLの単独免疫によって腫瘍成長が抑制された。さらに、空のPLによる前刺激を加えることにより、コントロール群と比較して有意な腫瘍成長抑制効果を示した。以上の結果から、GCをアジュバントとして用いることにより、1回の免疫で抗腫瘍免疫を誘導できることが明らかになった。

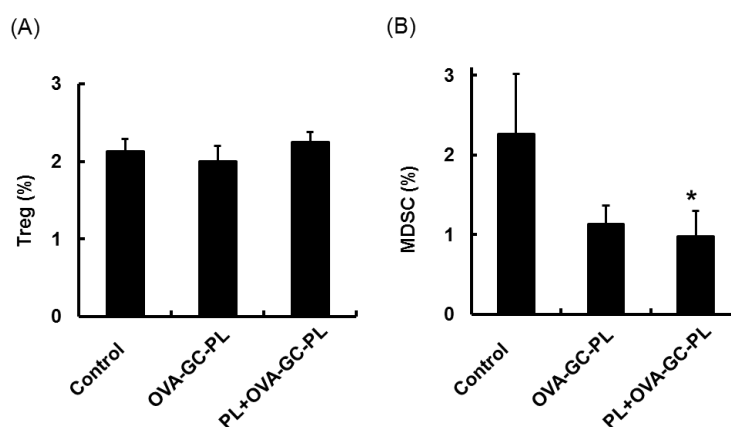


**Fig. 4-4 Effect of single immunization with empty PL plus OVA-GC-PL on CTL induction and tumor growth suppression.** Following intravenous injection of PL 3 days before, OVA-GC-PL was intravenously injected. As a control, OVA-GC-PL was intravenously injected without pre-stimulation with PL. (A) At day 14 after immunization, spleen was collected and re-stimulated with OVA. Following co-culture of spleen cell with EG7-OVA, apoptosis of EG7-OVA was assessed by flow cytometry. (B) At day 14 after immunization, EG7-OVA was subcutaneously inoculated into mice and the tumor size was measured. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. control

#### 第五項 腫瘍移植前における空のPLとGC含有OVA-PLによる1回免疫が抑制性免疫細胞に与える影響

続いて、空のPLとOVA-GC-PLの免疫による腫瘍成長抑制効果が抑制性免疫細胞に依存するかどうかを明らかにするために、腫瘍移植後の抑制性免疫細胞数を測定した。前項のように免疫を行い、腫瘍を移植した後に脾臓を回収し、脾臓中のTregとMDSCの割合の変化を測定した。Tregに関しては、OVA-GC-PLによる免疫や、空のPLとOVA-GC-PLによる免疫を行ってもその

割合は変化しなかった(Fig. 4-5-A)。一方 MDSC に関しては、OVA-GC-PL による免疫を行うことでその割合が減少した。また空の PL による前刺激を加えた場合、MDSC の割合の有意な減少が確認された。このことから、OVA-GC-PL の免疫による腫瘍成長抑制効果には、抑制性免疫細胞の減少が一部関与する可能性が示唆された。

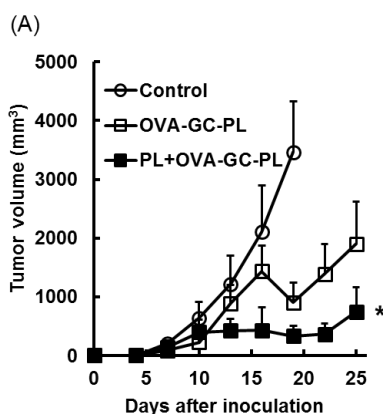


**Fig. 4-5 Effect of single immunization with empty PL plus OVA-GC-PL on immunosuppressive cell.** Following intravenous injection of PL 3 days before, OVA-GC-PL was intravenously injected. As a control, OVA-GC-PL was intravenously injected without pre-stimulation with PL. At day 14 after immunization, EG7-OVA was subcutaneously inoculated into mice. Nineteen days later, spleen was collected and stained with various antibodies before flow cytometry analysis. (A) A frequency of Treg and (B) MDSC. \*  $p < 0.05$  vs. control

#### 第六項 腫瘍移植後における空の PL と GC 含有 OVA-PL による 1 回免疫が腫瘍成長に与える影響

これまで、免疫を行った後に腫瘍を移植して、腫瘍成長抑制効果を検討してきた。しかし現在のがんワクチン開発においては、がんの予防だけでなく、様々ながんの進行のステージで治療が可能なワクチンが開発されている(19)。そこで次に、腫瘍移植後に免疫を行った場合の腫瘍成長抑制効果について検討を行った。EG7-OVA の移植 7 日後に、空の PL を用いて前刺激を行い、その 3 日後に OVA-GC-PL を用いて免疫した。コントロール群と比較して、OVA-GC-PL による免疫群では、腫瘍移植 19 日目以降に腫瘍成長の抑制効果が観察され始めた。一方で空の PL と OVA-GC-PL による免疫群では、腫瘍移植 13 日目以降から腫瘍成長の抑制効果が観察され始めた。また PL の前刺激がない場合と比較して、有意な腫瘍成長抑制効果を示した。このことから、PL と OVA-GC-PL による免疫は既存の腫瘍に対しても、腫瘍成長抑制効果を示すことが明らかになっ

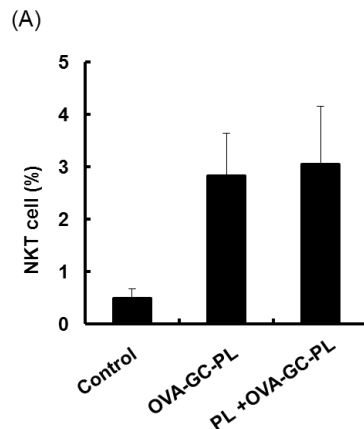
た。



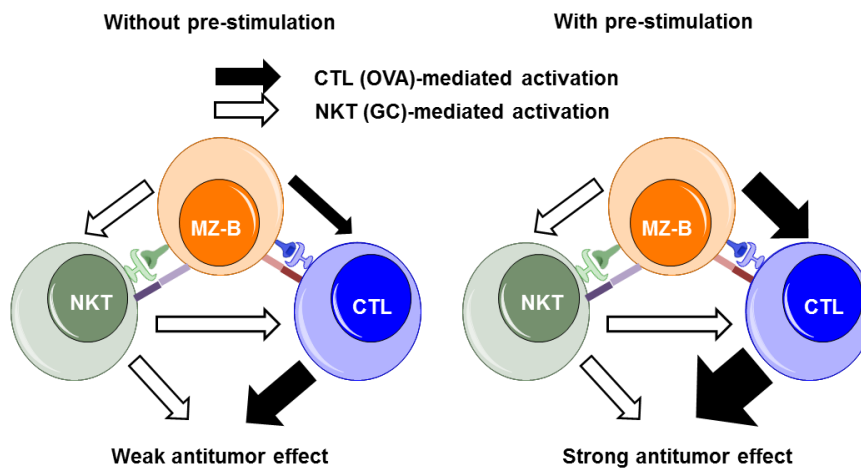
**Fig. 4-6 Effect of single immunization with empty PL plus OVA-GC-PL on growth suppression of pre-existing tumor.** EG7-OVA was subcutaneously inoculated into mice. At day 7 after tumor inoculation, PL was intravenously injected. Three days later, OVA-GC-PL was intravenously injected and the tumor size was measured. As a control, OVA-GC-PL was intravenously injected without pre-stimulation with PL. \*  $p < 0.05$  vs. without pre-stimulation with PL

#### 第七項 空の PL と GC 含有 OVA-PL による 1 回免疫が NKT 細胞に与える影響

アジュバントである GC は、抗腫瘍免疫に関与する NKT 細胞を活性化するとされており、OVA-GC-PL による免疫によって増加していると考えられる。そこで、空の PL と OVA-GC-PL の免疫が NKT 細胞に与える影響について検討した。EG7-OVA の移植 7 日後に、空の PL を用いて前刺激を行い、その 3 日後に OVA-GC-PL を用いて免疫した。免疫の 3 日後に脾臓を取り出し、脾臓中における NKT 細胞の割合を測定した。コントロール群と比較して、OVA-GC-PL の免疫や空の PL と OVA-GC-PL の免疫は、NKT 細胞を増加させた。NKT 細胞は CTL と同様に腫瘍殺傷に関与するため、OVA-GC-PL の免疫によって誘導された NKT 細胞は腫瘍成長抑制に一部寄与したものと考えられる。一方で、空の PL による前刺激の有無は NKT 細胞の割合に影響を与えなかった。このことから、空の PL による前刺激は NKT 細胞による直接的な腫瘍殺傷効果には影響を与えず、CTL による直接的な腫瘍殺傷効果のみに影響を与えることが示唆された(Fig. 4-8)。



**Fig. 4-7 Effect of single immunization with empty PL plus OVA-GC-PL on induction of NKT cells.** EG7-OVA was subcutaneously inoculated into mice. At day 7 after tumor inoculation, PL was intravenously injected. Three days later, OVA-GC-PL was intravenously injected. As a control, OVA-GC-PL was intravenously injected without pre-stimulation with PL. At day 3 after immunization, a frequency of NKT cell in spleen was measured by flow cytometry.



**Fig. 4-8 Estimated contribution of CTL and NKT cell to antitumor effect induced by OVA-GC-PL without or with pre-stimulation with PL.**

#### 第4節 考察

本検討から、空の PEG 修飾リポソーム(PL)の前刺激の後に、OVA-PL を用いて免疫することにより、細胞傷害性 T 細胞(CTL)の誘導が増強され、OVA 発現腫瘍である EG7-OVA の成長が抑制されることが明らかになった(Fig. 4-2)。また OVA-PL に  $\alpha$  ガラクトシルセラミド(GC)を添加することにより、少ない免

疫回数で抗腫瘍免疫が増強されることが明らかになった(Fig. 4-4)。

抗原提示細胞(APC)に抗原を標的化することにより、CTLの誘導は増強され、腫瘍成長は抑制されるとされている。この目的のために、APCを標的とするリガンドで修飾した抗原や抗原/抗体免疫複合体を用いて、APCによる抗原の取り込みを増加させる研究が行われている(6, 20)。本検討では、空のPLによる前刺激によって、抗PEG IgMが誘導され、3日後にOVA-PLを投与した際にOVA-PL/抗PEG IgM/補体の免疫複合体がin vivoにおいて形成され、MZ-B細胞に結合していると考えられる。MZ-B細胞は、通常のB細胞よりも抗原提示能に優れ(11)、また樹状細胞より抗原提示能は劣るものの細胞数が多いという特徴を持つ(21)。そのため、このOVA-PLのMZ-B細胞への結合増加が、MZ-B細胞による抗原提示を増加させ、OVA特異的CTLの誘導を増強している可能性が高い(Fig. 4-2)。一方でMZ-B細胞以外の他のAPCがCTLの誘導に関与している可能性も否定できない。抗TNP抗体が誘導されたマウスにTNP-OVAを静脈内投与すると、樹状細胞によって抗原が多く取り込まれ、CTLが誘導されることが報告されている(22)。また辺縁帯メタロフィリックマクロファージに抗原を送達することでCTLの誘導が増強されるという報告もある(23)。しかし予備検討では、樹状細胞や辺縁帯メタロフィリックマクロファージによるPLの取り込み増加はみられず、本検討においてはおそらくMZ-B細胞がAPCとして機能していると考えられる。MZ-B細胞を標的化したがんワクチンについてこれまでほとんど報告されていなかった。しかし最近、樹状細胞由来のエキソソーム(dexosome)によるがんワクチンにおいて、MZ-B細胞の関与が報告されており(24)、MZ-B細胞標的化ワクチンはがんワクチンの新規開発戦略となるかもしれない。

アジュバントを含まないOVA-PLによる免疫では腫瘍成長抑制効果を示すために3回の免疫が必要であったが、GCの添加により、1回の免疫で腫瘍成長抑制効果を示すことが明らかになった(Fig. 4-4, 4-6)。GCはナチュラルキラーT(NKT)細胞を活性化してナチュラルキラー細胞を活性化すると同時に(18)、NKT細胞から産生されたIFN- $\gamma$ を介してCTL誘導を増強することが報告されている(25)。我々の検討においても、GCの添加により1回の免疫でCTL誘導が増強されていた。またin vitroにおいて、GCの添加により脾臓細胞からのIFN- $\gamma$ 産生が増加していた(data not shown)。そのため、GCの添加によりNKT細胞が活性化され、CTL誘導が増強されたと考えられる。また、NKT細胞は速やかに活性化するものの、その活性化は一過性である(26)。そのため、NKT細胞の活性化に伴う抗腫瘍効果の増強については、NKT細胞が直接的に腫瘍を殺傷する直接的な効果よりも、CTLを介して腫瘍を殺傷する間接的な効果の方が大きかったのではないかと考えられる(27, 28)。

一方で、OVA-GC-PL による免疫で誘導される NKT 細胞の脾臓中の割合は、無処置群と比較して増加したが、空の PL による前刺激の有無によって変わらなかった (Fig. 4-7)。このことから 1 つの可能性として、NKT 細胞を介した CTL 誘導の増強効果は前刺激の有無にかかわらず、同程度であると考えられる。しかし NKT 細胞を介さない直接的な CTL の誘導 (Fig. 4-2) は、前刺激の存在下で増強されていた。そのため、空の PL による前刺激によって腫瘍成長抑制効果が増強したのは、MZ-B による直接的な CTL 誘導が増強されたためと推定される (Fig. 4-8)。また別の可能性として、NKT 細胞のサブセットが関係しているかもしれない (29, 30)。NKT 細胞の中でも、NKT タイプ I は抗腫瘍免疫に働くが、NKT タイプ II は腫瘍保護的に機能することが報告されている。全 NKT 細胞数は前刺激の有無に関わらず、同じであったが、サブセットの割合が変化しているかもしれない。そのため、今後サブセットごとの解析が必要であると考えられる。

腫瘍保護的に働く抑制性免疫細胞は CTL による腫瘍の殺傷を阻害し、腫瘍成長を促進するとされている。制御性 T 細胞 (Treg) や骨髄由来抑制性細胞 (MDSC) は様々ながん種において増加が確認されており、CTL 機能を阻害してがんワクチン効果を妨げる恐れがある (31, 32)。実際、あるワクチン投与によっては、MDSC が増加し、CTL 機能が阻害されることが報告されており (33)、これらの細胞を増加させないワクチンの開発が望まれる。特に用いるアジュバントによっては、Treg や MDSC の誘導が変化するため (34, 35)、ワクチン開発において留意しなければならない。我々の検討条件においては、空の PL と OVA-GC-PL による免疫により、脾臓中の Treg の割合は変化しなかったが、MDSC の割合は減少していた (Fig. 4-5)。これは MDSC の減少が腫瘍成長抑制効果に一部寄与する可能性が高いことを示唆している。興味深いことに、最近、がんの養子免疫療法において MDSC を用いた試みがなされている (36, 37)。通常では免疫抑制性の MDSC であるが、GC による NKT 細胞の活性化を介して、抗原提示可能な成熟状態に分化することが報告されている。そのため我々の検討においても、GC の免疫刺激によって未成熟な段階の MDSC が樹状細胞などに分化することにより、MDSC が減少したものと考えられる。このことから、我々が示したワクチンシステムは抑制性免疫細胞を増加させず、むしろ減少させることにより、効果的に腫瘍成長を抑制することが期待される。

## 引用文献

1. Banchereau J & Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity.

- (Translated from eng) *Nature* 392(6673):245-252 (in eng).
2. Joshi MD, Unger WJ, Storm G, van Kooyk Y, & Mastrobattista E (2012) Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers. (Translated from eng) *J Control Release* 161(1):25-37 (in eng).
  3. Bachmann MF & Jennings GT (2010) Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. (Translated from eng) *Nat Rev Immunol* 10(11):787-796 (in eng).
  4. Joffre OP, Segura E, Savina A, & Amigorena S (2012) Cross-presentation by dendritic cells. (Translated from eng) *Nat Rev Immunol* 12(8):557-569 (in eng).
  5. Kreutz M, Tacke PJ, & Figdor CG (2013) Targeting dendritic cells--why bother? (Translated from eng) *Blood* 121(15):2836-2844 (in eng).
  6. Ding C, Wang L, Marroquin J, & Yan J (2008) Targeting of antigens to B cells augments antigen-specific T-cell responses and breaks immune tolerance to tumor-associated antigen MUC1. (Translated from eng) *Blood* 112(7):2817-2825 (in eng).
  7. Ma Y, *et al.* (2013) Targeting of antigens to B lymphocytes via CD19 as a means for tumor vaccine development. (Translated from eng) *J Immunol* 190(11):5588-5599 (in eng).
  8. Zhang L, *et al.* (2013) Delivery of viral-vectored vaccines by B cells represents a novel strategy to accelerate CD8(+) T-cell recall responses. (Translated from eng) *Blood* 121(13):2432-2439 (in eng).
  9. Heit A, *et al.* (2004) CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. (Translated from eng) *J Immunol* 172(3):1501-1507 (in eng).
  10. Wu C, *et al.* (2010) Soluble CD40 ligand-activated human peripheral B cells as surrogate antigen presenting cells: A preliminary approach for anti-HBV immunotherapy. (Translated from eng) *Viral J* 7:370 (in eng).
  11. Attanavanich K & Kearney JF (2004) Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. (Translated from eng) *J Immunol* 172(2):803-811 (in eng).
  12. Raimondi G, Zanoni I, Citterio S, Ricciardi-Castagnoli P, & Granucci F (2006) Induction of peripheral T cell tolerance by antigen-presenting B cells. II. Chronic antigen presentation overrules antigen-presenting B cell activation. (Translated from eng) *J Immunol* 176(7):4021-4028 (in eng).
  13. Keller SA, *et al.* (2009) Follicular and marginal zone B cells fail to cross-present MHC class I-restricted epitopes derived from viral particles. (Translated from eng) *J Immunol* 182(10):6261-6266 (in eng).



14. Ishida T, Ichihara M, Wang X, & Kiwada H (2006) Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. (Translated from eng) *J Control Release* 115(3):243-250 (in eng).
15. Ishida T, Wang X, Shimizu T, Nawata K, & Kiwada H (2007) PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner. *J Control Release* 122(3):349-355.
16. Shimizu T, Ishida T, & Kiwada H (2013) Transport of PEGylated liposomes from the splenic marginal zone to the follicle in the induction phase of the accelerated blood clearance phenomenon. (Translated from eng) *Immunobiology* 218(5):725-732 (in eng).
17. Becker JC, Andersen MH, Schrama D, & Thor Straten P (2013) Immune-suppressive properties of the tumor microenvironment. (Translated from eng) *Cancer Immunol Immunother* 62(7):1137-1148 (in eng).
18. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, & Brossay L (2012) Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. (Translated from eng) *Nat Rev Immunol* 12(4):239-252 (in eng).
19. Ogi C & Aruga A (2013) Immunological monitoring of anticancer vaccines in clinical trials. (Translated from Eng) *Oncoimmunology* 2(8):e26012 (in Eng).
20. Caminschi I, *et al.* (2008) The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. (Translated from eng) *Blood* 112(8):3264-3273 (in eng).
21. Schultze JL, Grabbe S, & von Bergwelt-Baildon MS (2004) DCs and CD40-activated B cells: current and future avenues to cellular cancer immunotherapy. (Translated from eng) *Trends Immunol* 25(12):659-664 (in eng).
22. van Montfoort N, *et al.* (2012) Circulating specific antibodies enhance systemic cross-priming by delivery of complexed antigen to dendritic cells in vivo. (Translated from eng) *Eur J Immunol* 42(3):598-606 (in eng).
23. Aichele P, *et al.* (2003) Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. (Translated from eng) *J Immunol* 171(3):1148-1155 (in eng).
24. Naslund TI, Gehrman U, Qazi KR, Karlsson MC, & Gabrielsson S (2013) Dendritic cell-derived exosomes need to activate both T and B cells to induce antitumor immunity. (Translated from eng) *J Immunol* 190(6):2712-2719 (in eng).
25. Moreno M, *et al.* (2008) IFN-gamma-producing human invariant NKT cells promote tumor-associated antigen-specific cytotoxic T cell responses. (Translated from eng) *J Immunol* 181(4):2446-2454 (in eng).

26. Parekh VV, *et al.* (2005) Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. (Translated from eng) *J Clin Invest* 115(9):2572-2583 (in eng).
27. Gehrman U, *et al.* (2013) Synergistic induction of adaptive antitumor immunity by codelivery of antigen with alpha-galactosylceramide on exosomes. (Translated from eng) *Cancer Res* 73(13):3865-3876 (in eng).
28. Hong S, *et al.* (2013) Tumor cells loaded with alpha-galactosylceramide promote therapeutic NKT-dependent anti-tumor immunity in multiple myeloma. (Translated from eng) *Immunol Lett* 156(1-2):132-139 (in eng).
29. Izhak L, *et al.* (2013) Delicate balance among three types of T cells in concurrent regulation of tumor immunity. (Translated from eng) *Cancer Res* 73(5):1514-1523 (in eng).
30. Terabe M, *et al.* (2005) A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. (Translated from eng) *J Exp Med* 202(12):1627-1633 (in eng).
31. Facciabene A, Motz GT, & Coukos G (2012) T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. (Translated from eng) *Cancer Res* 72(9):2162-2171 (in eng).
32. Ostrand-Rosenberg S & Sinha P (2009) Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. (Translated from eng) *J Immunol* 182(8):4499-4506 (in eng).
33. Sui Y, *et al.* (2014) Vaccine-induced myeloid cell population dampens protective immunity to SIV. (Translated from eng) *J Clin Invest* 124(6):2538-2549 (in eng).
34. Perret R, *et al.* (2013) Adjuvants that improve the ratio of antigen-specific effector to regulatory T cells enhance tumor immunity. (Translated from eng) *Cancer Res* 73(22):6597-6608 (in eng).
35. Keijzer C, van der Zee R, van Eden W, & Broere F (2013) Treg inducing adjuvants for therapeutic vaccination against chronic inflammatory diseases. (Translated from eng) *Front Immunol* 4:245 (in eng).
36. Ko HJ, *et al.* (2009) Immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells can be converted into immunogenic APCs with the help of activated NKT cells: an alternative cell-based antitumor vaccine. (Translated from eng) *J Immunol* 182(4):1818-1828 (in eng).
37. Lee JM, *et al.* (2012) The restoration of myeloid-derived suppressor cells as functional antigen-presenting cells by NKT cell help and all-trans-retinoic acid treatment. (Translated from eng) *Int J Cancer* 131(3):741-751 (in eng).

## 第五章 総括

ワクチンの効果を最大限に発揮させるために、抗原を免疫細胞へ選択的に送達する抗原送達システムの開発が近年広く研究されている。これまでの我々の研究から、PEG 修飾リポソーム(PL)を2日-5日の投与間隔で繰り返し静脈内投与した場合、2回目投与 PL は脾臓内において辺縁帯 B(MZ-B)細胞に選択的に結合し、濾胞に輸送されることが明らかになっている。MZ-B 細胞が抗原提示細胞として機能すること、濾胞が免疫反応の成熟領域であることから、我々は本現象が免疫反応の誘導に有用であると考えた。そこで本研究では、本現象のメカニズムを明らかにするとともに(第二章)、本現象を利用して抗原を封入した PL を MZ-B 細胞や濾胞に送達することにより各種免疫反応を増強できるかどうかについて検討した(第三章、第四章)。

第二章では、2回目投与 PL の MZ-B 細胞への結合と濾胞への輸送メカニズムの解明を目指し、血清因子および脾臓細胞の感作の関与について検討した。その結果、PL は MZ-B 細胞に直接結合することができず、初回投与 PL によって誘導された血清因子の存在下でのみ、PL は MZ-B 細胞に結合することが明らかになった。また血清因子の中で、初回投与 PL によって誘導される抗 PEG IgM と補体の両方が PL と MZ-B 細胞との結合に必須であることが示された。このことから、2回目投与 PL に抗 PEG IgM や補体が結合して免疫複合体が形成され、MZ-B 細胞に結合することが示唆された。一方で PL を初回投与しない場合においても、血清因子の輸注により PL は MZ-B 細胞に結合し、濾胞へ輸送された。このことは、PL と MZ-B 細胞との結合や PL の濾胞への輸送に、初回 PL によって感作された MZ-B 細胞が必要でないことを示唆する。さらに本検討におけるいずれの条件においても、PL は MZ-B 細胞以外の濾胞 B 細胞や非 B 細胞集団にほとんど結合しなかった。そのため、空の PL による前刺激を行って血清因子を誘導することは、続いて投与された PL を MZ-B 細胞に標的化し、濾胞に輸送する有用な手段であることが示された。

第三章では、抗原封入 PL の濾胞への輸送現象を利用した体液性免疫反応の増強を目指し、OVA をモデル抗原として用いて効果の検証を行った。本検討では、OVA 封入 PL(OVA-PL)の静脈内投与による免疫の3日前に、空の PL の静脈内投与による前刺激を行い、OVA-PL の濾胞への輸送を誘導した。その結果、前刺激を行うことにより濾胞樹状細胞(FDC)による OVA-PL の取り込みが有意に増加し、OVA に対する抗体分泌が増強されることが明らかになった。また、MZ-B

細胞による OVA-PL の濾胞への輸送を阻害することにより、抗体分泌の増強が抑制された。このことは、OVA-PL の濾胞への輸送誘導が抗体分泌増強に寄与することを示唆しており、2 回目投与 PL の濾胞への輸送を誘導する空の PL による前刺激が有用であることを示している。一方で、OVA のキャリアとして用いた PL の構成脂質に対する抗体分泌の増強は引き起こされなかった。そのため、PL は不要な免疫反応を誘導しない抗原送達システムとして働くことが期待される。

第四章では、抗原封入 PL の濾胞への輸送現象を利用した細胞性免疫反応の増強を目指し、OVA をモデル抗原として、OVA 発現腫瘍をモデル腫瘍として用いて効果の検証を行った。アジュバントを用いない検討では、空の PL による前刺激と OVA-PL による免疫を組み合わせることで 3 回免疫することにより、OVA 特異的な細胞傷害性 T 細胞(CTL)が誘導され、前刺激がない場合と比較して有意な腫瘍成長抑制効果を示した。またアジュバントとして $\alpha$ ガラクトシルセラミド(GC)を用いた検討においては、OVA-GC-PL による 1 回の免疫で CTL が誘導され、腫瘍成長抑制効果を示した。また空の PL による前刺激を加えることにより、CTL の誘導および腫瘍成長抑制効果が向上した。以上のことから、空の PL による前刺激は続いて投与された OVA-PL および OVA-GC-PL による CTL 誘導を増強し、腫瘍成長を抑制できることが明らかになった。また空の PL による前刺激は、CTL の働きを阻害する抑制性免疫細胞を活性化することもなく、抗腫瘍免疫誘導に有用であることが示唆された。

以上のように本研究では、MZ-B 細胞による 2 回目投与 PL の濾胞への輸送機構を明らかにし、本現象が免疫反応の増強に有用であることを示した。これまでの研究では、ワクチン効果を増強させる抗原送達システムの単回投与時の抗原送達能のみに着目した研究がほとんどであった。しかし他の抗原送達システムにおいても繰り返し投与時には、PL のように脾臓内動態・抗原送達能が変化し、ワクチン効果が変化する可能性がある。本研究はワクチン研究において繰り返し投与時の動態変化を確認する重要性を示唆する知見となるかもしれない。また一方でこれまでの抗原送達システムの開発において、標的化分子を修飾したキャリアを用いて免疫細胞に標的化してきた。しかし本研究では、PL に対する免疫反応を利用することにより、MZ-B 細胞や濾胞へ抗原を送達し、免疫反応を増強することに成功した。このような PEG に対する免疫反応や生体内の抗原輸送機構を利用することは有用であり、新規のワクチン開発戦略となることが期待される。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 薬物動態制御学分野 際田弘志前教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始御指導いただき、有益なる御助言をいただきました、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 薬物動態制御学分野 石田竜弘現教授に深く感謝いたします。

本研究に際し、有益なる御助言をいただきました大阪大学大学院薬学研究科 中川晋作教授、吉岡靖雄准教授に心より感謝いたします。

また学部3年次の研究室配属以来、貴重な御助言と御指導を頂きました、王新宇博士、市原理子博士、Amr S. Abu Lila 博士、田上辰秋博士、名和田幸介修士に深く感謝いたします。

本研究は、徳島大学薬学部薬物動態制御学教室において行われたものであり、研究の遂行にあたり、御協力・御討論いただきました、橋本洋佑修士、美馬優学士、賀登浩章学士、渡辺優希さんに深く感謝します。

また、研究室の実験から日常生活までご協力いただいた徳島大学薬学部薬物動態制御学教室の諸氏に心からお礼申し上げます。

なお本研究の一部は、日本学術振興会特別研究員奨励費(課題番号:25・10060)の助成によるものであり、深く感謝いたします

最後になりましたが、深い理解をもって常に精神的に支えてくれた郷里の家族に深く感謝いたします。