

京都大学	博士（工学）	氏名	三浦 理紗子
論文題目	Self-assembled Nanogel-based Antigen Carrier Systems for Therapeutic Cancer Vaccine (がん治療ワクチンに向けた自己組織化ナノゲルを基盤とする抗原デリバリーシステムの開発)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、免疫療法への展開を目的とした、自己組織化ナノゲルによる抗原デリバリーシステムの構築とメカニズムについて報告したものである。免疫療法において、がん抗原タンパク質を用いたがんワクチン療法や免疫チェックポイント抗体療法等、タンパク質を利用した治療法が展開されている。しかしながら、十分な治療効果を得るためには体内でのタンパク質の安定性や分布を制御する必要があり、ドラッグデリバリーシステムとの融合による解決が望まれている。本論文では特にがん治療ワクチンに着目しており、従来のがん治療ワクチンでは実現不可能であった強い細胞性免疫の活性化に対して、高分子ナノマテリアルを用いた抗原デリバリーシステムの開発によりアプローチを試みた。疎水化多糖が疎水的相互作用を駆動力に形成するナノサイズのゲル（自己組織化ナノゲル）は、生体適合性が高く、タンパク質を安定に内包可能なタンパク質デリバリーキャリアとして機能することが報告されている。これまでに、この機能を抗原デリバリーへと応用し、リンパ節や抗原提示細胞へ抗原を送達することで細胞性・液性免疫の双方を活性化可能ながんワクチンとして機能することを見出してきた。本博士学位論文では、自己組織化ナノゲルを基盤とし、免疫活性へ多面的なアプローチを行う抗原デリバリーシステムの開発について報告した。</p> <p>本論文は緒論と本論 4 章から構成されている。緒論では、タンパク質医薬品のためのドラッグデリバリーシステム (DDS) や、DDS キャリアの設計、そして免疫療法への DDS の展開について概説されている。そして、研究背景について述べるとともに本論文の研究目的を明確にし、次いで本論文の構成及び概要について論じた。</p> <p>第 1 章では、多糖の主鎖骨格が異なる 2 種類の自己組織化多糖ナノゲルを用い、ナノゲルの構造変化による抗原デリバリー機能への影響を評価した。がん治療ワクチンでは免疫の活性化が行われるリンパ節が標的化されるが、ナノ微粒子のリンパ節への移行性は粒子径と相関があり、小粒子径なほど高効率であることが報告されている。そこで、直鎖状多糖を主鎖骨格に有するコレステリル基置換プルラン (cholesterol-bearing pullulan; CHP) と、分岐状多糖を主鎖骨格に有するコレステリル基置換クラスターデキストリン (cholesterol-bearing cluster dextrin; CH-CDex) を抗原キャリアとして選択し、物性評価を行った。CH-CDex ナノゲルは糖鎖密度が高いために小さなパッキングを実現するため、CHP ナノゲルより小さな粒子径を示した (CHP; 63 nm, CH-CDex; 23 nm)。マウスへ皮下投与したところ、小粒子径の CH-CDex ナノゲルはより短時間で高効率なリンパ節への抗原デリバリーを実現した。それに伴い、リンパ節内部での抗原提示細胞との相互作用も向上し、細胞性・液性免疫の双方を増強することを明らかにした。</p> <p>第 2 章では、アニオン性を付与した新規自己組織化ナノゲルを設計し、抗原提示細胞を標的化した抗原送達について評価した。抗原提示細胞には多糖やポリアニオンを</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	三浦 理紗子
<p>認識する様々なレセプターが発現しており、アニオン性ナノゲルは能動的に相互作用すると予想される。カルボキシル基の導入率が異なる 2 種類の CHPCOOH を合成し、自己組織的にナノゲルを形成し、表面電荷が異なる抗原キャリアとして機能しうることを確認した。アニオン性の付与により <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> 双方において抗原提示細胞との相互作用は向上され、レセプターを介した特異的な相互作用が示唆された。抗原提示細胞との相互作用に伴って免疫活性も向上し、特に細胞性免疫に関しては、カルボキシル基の導入率に従ってその活性化率も向上することを明らかにした。</p> <p>第 3 章では、ナノゲルワクチン療法へ免疫チェックポイント抗体を併用することにより、免疫活性化の相乗的な効果を評価した。ワクチンを含む免疫療法において、一度活性化したキラー T 細胞が活性を失った疲弊状態に陥り、抗腫瘍効果が減弱することが課題として挙げられている。ナノゲルワクチンにおいても T 細胞が疲弊していると考えられ、疲弊を抑制することでより良好な治療効果が得られると期待される。そこで、ナノゲルワクチンにより活性化キラー T 細胞を誘導後、免疫チェックポイント抗体である抗 PD-1 抗体を併用投与することで、顕著な抗腫瘍効果の向上と高い完全奏功率を実現した。抗 PD-1 抗体を併用することにより、腫瘍内部環境において活性化キラー T 細胞の浸潤が増加し、さらに疲弊マーカーの発現が抑制されたことが示された。強い免疫活性を誘導する一方で、ナノゲルワクチンと抗 PD-1 抗体の併用による重篤な副作用は確認されず、安全に高い治療効果を実現することを明らかにした。</p> <p>第 4 章では、ナノゲルワクチンを用い、従来のキラー T 細胞活性化に加えて抗原を腫瘍へ送達することで、相乗的な腫瘍内免疫環境の活性化について評価した。近年、がん免疫抵抗性の腫瘍において腫瘍の悪性を促進するマクロファージの存在が報告されている。ナノゲルワクチンを静脈投与することで EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果により腫瘍へ抗原が送達され、さらに皮下投与と併用することにより腫瘍環境が活性化され、腫瘍内部のマクロファージが減少すること、腫瘍の急速な成長を反映する細胞増殖マーカーの発現が抑制されることが示された。さらに、皮下投与のみと比較して、静脈投与の併用により強い抗腫瘍効果が得られた。同じナノゲルワクチンであっても、投与経路を変更することにより異なる免疫活性が誘導されることを明らかにした。</p> <p>以上のように、自己組織化ナノゲルの優れた抗原デリバリーシステムを基盤とし、ナノゲルの機能化や他の免疫療法の併用により、様々ながん治療ワクチン及び免疫活性化システムの開発について論じた。いずれも非常に実用的で治療効果が高い免疫活性化システムとして、臨床応用が期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、自己組織化ナノゲルを基盤とした新規な抗原デリバリーシステムの開発についてまとめたものであり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 第1章では、多糖骨格が異なる2種類の自己組織化ナノゲルを用い、ナノゲルの構造変化に伴うリンパ節への抗原送達性及び免疫活性への影響について報告を行った。分岐状多糖から構成される自己組織化ナノゲルは、直鎖状多糖から構成されるものと比較して小さな粒子径を示し、短時間で効率的なリンパ節への抗原送達を実現した。リンパ節への抗原送達性の向上に伴い、細胞性免疫や抗腫瘍効果が向上することを明らかにした。
2. 第2章では、アニオン性を示す自己組織化ナノゲルを用い、ナノゲルの表面電荷による抗原提示細胞の標的化について報告を行った。コレステリル基置換プルラン(CHP)を基に、アニオン性基であるカルボキシル基を導入したCHPCOOHを2種類合成し、新規なアニオン性ナノゲルを開発した。アニオン性の付与により *in vitro*, *in vivo* 双方で抗原提示細胞との相互作用が向上し、抗原提示細胞に発現するレセプターを介した特異的な相互作用が示された。また、アニオン性基の導入に応じて優れた細胞性免疫の活性化を誘導することが明らかとなった。
3. 第3章では、CHPナノゲルワクチンと抗PD-1抗体の併用療法について報告を行った。併用療法により、キラーT細胞の細胞浸潤性及びその活性の維持を実現し、優れた完全奏功率を示した。強い免疫活性を誘導する一方で重篤な副作用は無く、実用性が高い免疫活性化システムであることを明らかにした。
4. 第4章では、ナノゲルワクチンのみを用いてキラーT細胞と腫瘍環境の活性化を可能とする新規な免疫活性化システムについて報告を行った。従来通り皮下投与を行うことによりキラーT細胞の活性化を、そこへ静脈投与を併用することにより腫瘍へ抗原を送達し、腫瘍環境の活性化を誘導した。腫瘍へのナノゲルワクチンの送達により、腫瘍内部の腫瘍関連マクロファージが減少し、がん細胞の悪性を抑制することが示された。その結果、2種類の投与方法を併用することで、強い抗腫瘍効果が得られることを明らかにした。

以上、本論文は自己組織化ナノゲルの優れた抗原デリバリー機能を活かし、ナノゲルの機能化や他の免疫療法との併用によって優れた免疫活性化能を示す免疫活性化システムの開発について纏められており、学術的な新規性のみならず臨床への応用展開も見据えたものである。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年1月17日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。