

氏名	やま さき やす おみ 山 崎 泰 臣
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 527 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	化学修飾を利用したタンパク質の抗原提示細胞への選択的デリバリーと特異的免疫応答の誘導に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 高倉喜信 教授 橋田 充 教授 佐治英郎

論 文 内 容 の 要 旨

抗原タンパク質や抗原ペプチドを生体に投与して特異的な免疫応答を誘導する免疫療法は、癌や感染症の有効かつ安全な治療法として期待されている。本アプローチの成功のためには克服すべき課題が多いが、とりわけ一連の免疫応答において重要な役割を果たしているマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞 (APC) への抗原タンパク質の移行量が少ないことが挙げられる。従って、抗原タンパク質を効率よくデリバリーする技術の確立が不可欠と考えられる。これまで、種々の素材からなる微粒子性キャリアを利用して APC に抗原タンパク質を非特異的に貪食させる試みが行われてきたが、調製の簡便さ、製剤としての均一性、局所障害性などの観点から、可溶性抗原の形で免疫誘導可能な方法論の確立が望ましい。これを実現する方法として、レセプターを介して抗原タンパク質を選択的に送り込む手法が挙げられる。中でも、APC 表面に発現し、負電荷高分子を認識して効率的に取り込むことが報告されているスカベンジャーレセプターの利用が有望と考えられる。そこで著者は、抗原タンパク質に化学修飾を施し、負電荷を導入した種々の誘導体を合成し、APC への選択的デリバリーによる抗原特異的免疫応答誘導の可能性を検討した。

I. 速度論的解析に基づく負電荷導入タンパク質の細胞選択的デリバリーのための分子設計

スカベンジャーレセプターを介する細胞選択的デリバリー実現に必要な負電荷導入タンパク質の分子設計指針を確立するために、物理化学的性質の異なる種々の誘導体を合成し、体内動態を薬動的に解析することで *in vivo* におけるリガンド認識特性を評価した。即ち、分子量の異なる 3 種のタンパク質、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD; 分子量 32,000)、牛血清アルブミン (BSA; 67,000)、牛免疫グロブリン G (IgG; 150,000) をモデルタンパク質として選択し、アミノ基に対するスクシニル化の程度を制御することで負電荷の程度異なる誘導体を合成し、マウスにおける基本的な体内動態を解析するため静脈内投与後の臓器分布を評価した。その結果、いずれの未修飾タンパク質も全く肝臓へ移行しなかったのに対し、各誘導体は APC 同様スカベンジャーレセプターを発現している肝非実質細胞に選択的に移行することが確認された。速度論的解析の結果、BSA 誘導体および IgG 誘導体はいずれも修飾数の増加に伴い肝臓取り込みクリアランスが増加し、これはタンパク質分子表面の負電荷密度に対応していることが明らかになった。一方、SOD 誘導体は、十分な密度の負電荷を導入したにもかかわらず低い肝臓取り込みクリアランスしか示さず、分子サイズの重要性も示された。また、1 分子の修飾で 2 個の負電荷が導入できるアコニチル化修飾はより少ない修飾数で効率よく肝非実質細胞へデリバリーできる点で有利であることが示された。以上の結果より、スカベンジャーレセプターを介する細胞特異的なデリバリーを目的とした負電荷導入タンパク質の分子設計指針を得た。

II. 負電荷導入タンパク質の抗原提示細胞における取り込みおよび抗原提示の *in vitro* 評価

第 1 章で得られた情報に基づき、分子量 45,000 の卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) をモデル抗原タンパク質として選択し、スカベンジャーレセプターに認識されるのに十分な負電荷密度を賦与したスクシニル化、マレイル化、アコニチル化誘導体を合成した。APC として樹状細胞の細胞株である DC2.4 細胞を用い、放射標識体を用いた取り込み実験の結果、い

ずれの誘導体も未修飾 OVA より効率よく DC2.4 細胞に取り込まれ、負電荷を導入することによりスカベンジャーレセプターを介して効率よく OVA を APC に取り込ませることが可能であることが確認された。さらに、各誘導体を取り込まれた後の MHC class I への抗原提示を評価したところ、酸性条件下でその修飾基が解離し OVA に還元されるマレイル化およびアコニチル化誘導体が未修飾 OVA に比較して効率よく抗原提示されたのに対し、酸性条件下で解離しないスクシニル化誘導体は OVA よりも提示されにくいことが明らかになった。以上の結果より、抗原タンパク質に負電荷を導入することで APC に効率よくデリバリーすることが可能であるが、細胞内での未修飾 OVA への変換も MHC class I への提示には重要であることが示唆された。

Ⅲ. 負電荷導入タンパク質の局所投与時の体内動態および特異的免疫応答の評価

In vivo における負電荷導入 OVA 誘導体の有用性を評価した。まず、各誘導体の皮下投与後の体内動態について検討したところ、投与部位からの消失および主要臓器には修飾による影響は認められなかった。しかしながら、APC が豊富に存在し免疫応答に重要な部位である所属リンパ節への蓄積は、アコニチル化誘導体が未修飾 OVA とほぼ同程度の蓄積しか示さなかったのに対し、スクシニル化およびマレイル化誘導体では 2 倍以上の蓄積量が見られ、in vivo においても局所投与した負電荷導入 OVA 誘導体が APC にデリバリーできる可能性が示された。

皮下投与後の免疫応答について検討した結果、各誘導体で免疫したマウスより採取した脾臓細胞において、OVA 特異的な T 細胞の増殖と IFN- γ の産生が認められた。また、細胞障害性 T 細胞 (CTL) の活性を評価したところ、アコニチル化誘導体投与群では未修飾 OVA に比べ若干高い活性が見られた程度であったが、スクシニル化およびマレイル化誘導体投与群では有意に高い CTL の誘導が認められた。さらに、あらかじめ免疫したマウスに E.G7 細胞を移植した際の抗腫瘍効果について検討したところ、CTL assay の結果とほぼ同様の結果が得られた。以上の結果より、OVA に負電荷を導入することにより in vivo において効率よく抗原特異的な免疫応答を誘導できることが明らかとなった。

以上、本研究では、負電荷の導入によりタンパク質をスカベンジャーレセプターを介して細胞特異的にデリバリーするための設計指針を得ることができた。また、本手法を抗原タンパク質に応用し APC へ送り込むことにより効率よく抗原特異的な免疫応答を誘導することが可能であることを明らかにした。これらの知見は、抗原タンパク質や抗原ペプチドを利用したワクチンの開発に有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

抗原タンパク質や抗原ペプチドを生体に投与して特異的な免疫応答を誘導する免疫療法は、癌や感染症の有効かつ安全な治療法として期待されている。本アプローチの成功のためには克服すべき課題が多いが、とりわけ一連の免疫応答において重要な役割を果たしているマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞 (APC) への抗原タンパク質の移行量が少ないことが挙げられる。従って、抗原タンパク質を効率よくデリバリーする技術の確立が不可欠と考えられる。これまで、種々の素材からなる微粒子性キャリアを利用して APC に抗原タンパク質を非特異的に貪食させる試みが行われてきたが、調製の簡便さ、製剤としての均一性、局所障害性などの観点から、可溶性抗原の形で免疫誘導可能な方法論の確立が望ましい。これを実現する方法として、レセプターを介して抗原タンパク質を選択的に送り込む手法が挙げられる。中でも、APC 表面に発現し、負電荷高分子を認識して効率よく取り込むことが報告されているスカベンジャーレセプターの利用が有望と考えられる。そこで著者は、抗原タンパク質に化学修飾を施し、負電荷を導入した種々の誘導体を合成し、APC への選択的デリバリーによる抗原特異的免疫応答誘導の可能性を検討した。

スカベンジャーレセプターを介する細胞選択的デリバリー実現に必要な負電荷導入タンパク質の分子設計指針を確立するために、物理化学的性質の異なる種々の誘導体を合成し、体内動態を薬動的に解析することで in vivo におけるリガンド認識特性を評価した。即ち、分子量の異なる 3 種のタンパク質、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD; 分子量 32,000)、牛血清アルブミン (BSA; 67,000)、牛免疫グロブリン G (IgG; 150,000) をモデルタンパク質として選択し、アミノ基に対するスクシニル化の程度を制御することで負電荷の程度の異なる誘導体を合成し、マウスにおける基本的な体内動態を解析するため静脈内投与後の臓器分布を評価した。その結果、いずれの未修飾タンパク質も全く肝臓へ移行しなかったのに対し、各誘導体は APC 同様スカベンジャーレセプターを発現している肝非実質細胞に選択的に移行することが確認された。

速度論的解析の結果、BSA 誘導体および IgG 誘導体はいずれも修飾数の増加に伴い肝臓取り込みクリアランスが増加し、これはタンパク質分子表面の負電荷密度に対応していることが明らかになった。一方、SOD 誘導体は、十分な密度の負電荷を導入したにもかかわらず低い肝臓取り込みクリアランスしか示さず、分子サイズの重要性も示された。また、1分子の修飾で2個の負電荷が導入できるアコニチル化修飾はより少ない修飾数で効率よく肝非実質細胞へデリバリーできる点で有利であることが示された。以上の結果より、スカベンジャーレセプターを介する細胞特異的なデリバリーを目的とした負電荷導入タンパク質の分子設計指針を得た。

第1章で得られた情報に基づき、分子量45,000の卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) をモデル抗原タンパク質として選択し、スカベンジャーレセプターに認識されるのに十分な負電荷密度を賦与したスクシニル化、マレイル化、アコニチル化誘導体を合成した。APC として樹状細胞の細胞株である DC2.4 細胞を用い、放射標識体を用いた取り込み実験の結果、いずれの誘導体も未修飾 OVA より効率よく DC2.4 細胞に取り込まれ、負電荷を導入することによりスカベンジャーレセプターを介して効率よく OVA を APC に取り込ませることが可能であることが確認された。さらに、各誘導体を取り込まれた後の MHC class I への抗原提示を評価したところ、酸性条件下でその修飾基が解離し OVA に還元されるマレイル化およびアコニチル化誘導体が未修飾 OVA に比較して効率よく抗原提示されたのに対し、酸性条件下で解離しないスクシニル化誘導体は OVA よりも提示されにくいことが明らかになった。以上の結果より、抗原タンパク質に負電荷を導入することで APC に効率よくデリバリーすることが可能であるが、細胞内での未修飾 OVA への変換も MHC class I への提示には重要であることが示唆された。

In vivo における負電荷導入 OVA 誘導体の有用性を評価した。まず、各誘導体の皮下投与後の体内動態について検討したところ、投与部位からの消失および主要臓器には修飾による影響は認められなかった。しかしながら、APC が豊富に存在し免疫応答に重要な部位である所属リンパ節への蓄積は、アコニチル化誘導体が未修飾 OVA とほぼ同程度の蓄積しか示さなかったのに対し、スクシニル化およびマレイル化誘導体では2倍以上の蓄積量が見られ、in vivo においても局所投与した負電荷導入 OVA 誘導体が APC にデリバリーできる可能性が示された。

皮下投与後の免疫応答について検討した結果、各誘導体で免疫したマウスより採取した脾臓細胞において、OVA 特異的な T 細胞の増殖と IFN- γ の産生が認められた。また、細胞障害性 T 細胞 (CTL) の活性を評価したところ、アコニチル化誘導体投与群では未修飾 OVA に比べ若干高い活性が見られた程度であったが、スクシニル化およびマレイル化誘導体投与群では有意に高い CTL の誘導が認められた。さらに、あらかじめ免疫したマウスに E.G7 細胞を移植した際の抗腫瘍効果について検討したところ、CTL assay の結果とほぼ同様の結果が得られた。以上の結果より、OVA に負電荷を導入することにより in vivo において効率よく抗原特異的な免疫応答を誘導できることが明らかとなった。

以上、本研究では、負電荷の導入によりタンパク質をスカベンジャーレセプターを介して細胞特異的にデリバリーするための設計指針を得ることができた。また、本手法を抗原タンパク質に応用し APC へ送り込むことにより効率よく抗原特異的な免疫応答を誘導することが可能であることを明らかにした。これらの知見は、抗原タンパク質や抗原ペプチドを利用したワクチンの開発に有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成15年2月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。