

京都大学	博士（薬科学）	氏名	LIU WEN
論文題目	Development of immunotherapy using antigen-loaded multifunctional small extracellular vesicles (抗原搭載多機能性細胞外小胞を利用した免疫療法の開発に関する研究)		
<p>Small extracellular vesicles (sEVs) with a diameter of around 100 nm, are membrane vesicles released by a variety of cells and serve as intercellular transport carriers for proteins and nucleic acids. Because of their nature as endogenous delivery carriers, sEVs are expected to become an effective vaccine by delivering antigen proteins. For vaccine application of sEV, antigen loading, delivery to antigen-presenting cells (especially dendritic cells, DCs) and activation of the antigen-presenting cells are important factors. In this thesis, I investigated the effect of modifying endogenous antigen-containing sEVs with CD40L, a peptide ligand with DCs-directing and immunostimulatory properties. Moreover, to create more types of multifunctional sEVs, I explored the possibility of loading exogenous antigens onto the sEVs. Since the exogenous antigens can be loaded onto the outside or inside of the lipid bilayer of sEVs, I investigated the effects of antigen localization on the efficiency of antigen presentation by sEVs-engulfed immune cells. After optimizing the loading method of exogenous antigens, I attempted to construct multifunctional sEVs by modifying the adjuvant to the antigen-loaded sEVs and verified the possibility of using it to treat allergic rhinitis.</p> <p><b>Chapter 1 Development of endogenous antigen containing multifunctional sEVs for effective induction of anti-tumor immune response</b></p> <p>Tumor-derived small extracellular vesicles are considered for use in inducing tumor antigen-specific immune responses as they contain endogenous tumor antigens. The delivery of tumor antigens to the antigen presentation cells (especially DCs), and the activation of DCs are the main challenges of endogenous antigen containing sEV therapy. In this chapter, sEVs derived from B16BL6 cells were modified with CD40L, which can target CD40 expressed on the surface of DCs and can activate them via CD40L-CD40 interactions. It was found that CD40L-sEVs were efficiently taken up by DCs and activated them. Moreover, tumor antigens were efficiently presented to the T cells by DCs treated with CD40L-sEVs. These results indicate that CD40L-modified endogenous antigen containing multifunctional sEVs will be helpful for further development of sEV-based tumor vaccination.</p> <p><b>Chapter 2 Evaluation of effects of exogenous antigen localization in antigen-loaded sEVs on efficiency of antigen presentation</b></p> <p>To enable the development of new kinds of multifunctional sEVs, the incorporation of exogenous antigens into sEVs has become a critical component of multifunctional sEVs design. The localization of antigen proteins, i.e., whether they lie on the outer surface or inner surface of sEVs, might affect antigen presentation after sEVs are taken up by antigen-presenting cells. However, little is known about the effect of antigen localization on the efficiency of antigen presentation. In this chapter,</p>			

lactadherin (LA) and group-specific antigen (Gag), sEV-tropic proteins that had previously been shown to cause the localization of luciferase to the outer surface and inner surface of sEVs, respectively, were used to examine the importance of the localization of antigen proteins in antigen presentation. Human embryonic kidney cells 293 (HEK293) were selected as sEVs producing cells. First, green fluorescent protein (GFP) was used to trace intracellular behavior of antigen proteins after uptake by murine dendritic DC2.4 cells. GFP-derived fluorescence signals were detected in cells only when GFP-inner-loaded (Gag-GFP) sEVs were added to them. Then, ovalbumin (OVA) was used as a model antigen protein, and OVA-loaded sEVs were added to bone marrow-derived DCs. OVA-inner-loaded (Gag-OVA) sEVs showed enhanced class I antigen presentation capacity compared with OVA-outer-loaded (OVA-LA) sEVs. Using PKH-labeled sEVs, it was found that the localization of OVA had very little effect on the cellular uptake of sEVs. These results indicate that the loading of antigen proteins inside sEVs helps in efficient antigen presentation.

### **Chapter 3 Development of allergic rhinitis immunotherapy using exogenous allergen-loaded multifunctional sEVs**

Allergic rhinitis is caused by a breakdown of the Th1/Th2 balance, in which the allergen-induced Th2 immune response predominates over the Th1 immune response, culminating in IgE-mediated anaphylaxis. In this chapter, I used sEVs as simultaneous delivery carriers for allergens (OVA) and CpG DNA, an adjuvant that can induce a Th1 immune response, for the treatment of allergic rhinitis. sEVs loaded with CpG DNA and OVA (CpG-OVA-sEVs) were successfully prepared. CpG DNA modification did not influence the uptake of sEVs by DCs and CpG-OVA-sEVs activated DCs. The CpG-OVA-sEVs were delivered to the nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) of mice and were primarily taken up by the CD11c positive cells after intranasal administration. Intranasally administering CpG-OVA-sEVs significantly enhanced OVA-specific IgG antibody titers in mice models of allergic rhinitis, suggesting a transformed Th1/2 balance. Moreover, the CpG-OVA-sEVs administration alleviated allergic symptoms compared to the control group. Further, the amount of IgE secreted in mouse serum decreased. Thus, CpG DNA modified allergen-loaded multifunctional sEVs could be a useful therapeutic method for treating allergic rhinitis.

In conclusion, I successfully developed CD40L modified endogenous antigen-containing multifunctional sEVs, which can be efficiently delivered to DCs and can activate DCs to improve the antigen presentation efficacy of DCs. Moreover, when loading exogenous antigens onto sEVs to enable the possibility of new types of multifunctional sEVs, I found that the loading of antigen proteins inside sEVs resulted in efficient antigen presentation. Finally, I modified allergen-loaded sEVs with CpG DNA, which showed a significant therapeutic effect in allergic rhinitis model mice. The findings in this thesis contribute to the development of antigen-loaded multifunctional sEVs-based immunotherapies.

(論文審査の結果の要旨)

細胞から分泌される直径100nm程度の膜小胞である細胞外小胞(Small extracellular vesicles (sEVs))は細胞間の輸送担体であり、その特性から抗原タンパク質のデリバリーに基づくワクチン応用が期待される。sEVを利用したワクチンの開発のためには、sEVへの抗原搭載と、抗原提示細胞である樹状細胞(Dendritic cell(DC))へのデリバリーとそのDCの活性化が重要である。本学位論文では、DC指向性とともDC活性化能を有するCD40Lを、内因性抗原を含有するsEVへと修飾した。加えて、任意の抗原を搭載した多機能性のEVの開発のために、sEVへの抗原搭載様式、すなわちsEVの外側あるいは内側への抗原搭載のいずれかが免疫応答の誘導に有用であるかを検討した。最終的には、確立した抗原搭載法を基に、多機能性の抗原搭載sEVを調製し、アレルギー性鼻炎モデルにおける治療効果を検証した。

### 第1章 抗腫瘍免疫の誘導を目的とした内因性抗原を搭載した多機能性sEVの開発

がん細胞由来sEVはがん抗原を含有することからがんワクチンへの利用が期待される。そこで本章では、がん細胞由来sEVを利用した癌ワクチン療法を目的として、DC指向性とともDC活性化能を有するCD40LをsEVへと修飾した。調製したsEVを用いて検討した結果、CD40L修飾によりsEVのDCへの取込み能ならびにDCの活性化能が有意に上昇した。また、がん細胞由来sEVを添加したDCにおけるがん抗原の提示効率も上昇した。この結果はsEVへのCD40L修飾が、sEVを利用したワクチン療法の開発において多機能を賦与できる有用な手法となりえることを示すものである。

### 第2章 外因性抗原のsEVへの搭載部位が抗原提示に及ぼす影響の評価

sEVを利用したワクチン療法の適用の拡大には、sEVへの任意の抗原の搭載法の開発が必要であるが、その際にはsEVへの内側あるいは外側への抗原搭載が必要である。そこで本章ではsEVへの抗原搭載部位、すなわち内側あるいは外側への搭載のいずれが抗原提示に優位であるかを検討した。モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質GFPを内側あるいは外側に搭載したsEVをDCへと転化し蛍光観察を行った結果、内側搭載sEVを添加した細胞においてのみ緑色蛍光が観察された。そこで、モデル抗原として卵白アルブミンOVAを内側あるいは外側へと搭載したsEVとDCへ添加後の抗原提示について評価した結果、内側搭載したsEVの添加によって抗原提示効率が有意に上昇した。以上、sEVへの抗原搭載には内側への搭載が有用であることを明らかとした。

### 第3章 外因性抗原を搭載した多機能性sEVを利用したアレルギー性鼻炎治療法の開発

アレルギー性鼻炎は、体内における免疫のTh1/Th2のバランスが破綻し、Th2へと傾くことによって引き起こされる。そこで本章では、モデル抗原であるOVAを搭載するとともにTh1型の免疫応答を誘導可能なCpG DNAを搭載した多機能性sEVを開発し、アレルギー性鼻炎の治療効果について検討した。構築した多機能性sEVはマウス鼻腔内へと投与後、鼻腔内のリンパ組織であるNALTへと到達し、DCをはじめとした細胞であるCD11c陽性細胞へと取り込まれた。また、アレルギー性鼻炎モデルマウスへとこのsEVを鼻腔内投与した結果、抗OVAの抗体のTh1/Th2バランスをTh1へと回復させた。また、くしゃみ等のアレルギー症状も有意に抑制するとともに、血中における抗OVA IgE抗体の抗体価も減少させた。以上、抗原とともにCpG DNAを搭載した多機能性sEVはアレルギー性鼻炎の治療に有用であることを示した。

以上、本学位論文において得られたこれらの知見は、抗原を搭載した多機能性sEVを利用した免疫療法の開発に有用である。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年2月8日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、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、（令和6年3月24日までの間）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。

要旨公表可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降