

臓器指向性を有する自己組織化型薬物キャリアの開発とワクチンへの応用

黒崎 友亮†

Development of Vaccines with Self-assembled Carriers That Deliver Drugs to Target Organs

Tomoaki Kurosaki†

Department of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital; 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan.

(Received June 29, 2019)

I have developed novel ternary complexes of various vaccines with cationic materials and anionic polymers. Plasmid DNA (pDNA) encoding firefly luciferase was used as a model drug to form adequate ternary complexes. Cationic binary complexes were constructed using pDNA and polyethylenimine, and these binary complexes were coated with various anionic polymers to form ternary complexes. These ternary complexes significantly improved cytotoxicity and aggregation with erythrocytes in comparison to the binary complexes. On the other hand, most of those ternary complexes showed little *in vitro* transgene efficiency because of their anionic surface charge. γ -Polyglutamic acid (γ -PGA)-ternary complexes, however, demonstrated high *in vitro* transgene efficiency. After the intravenous administration of γ -PGA-ternary complexes to mice, extremely high gene expression was detected in the marginal zone of the spleen, which is rich in antigen-presenting cells. This spleen-specific phenomenon of γ -PGA-ternary complexes appeared to be suited to DNA vaccines against cancer. I therefore examined the preventive effect of γ -PGA-ternary complexes containing pUb-M, a pDNA encoding melanoma surface antigen, against melanoma-bearing mice. Vaccinations of γ -PGA-ternary complexes into mice significantly suppressed the tumor growth of B16-F10 melanoma cells subcutaneously injected into the mice. In the same manner, vaccinations of γ -PGA-ternary complexes containing ovalbumin (OVA) completely suppressed the growth of E.G7-OVA cells expressing OVA. These results strongly suggest that γ -PGA-ternary complexes are useful in the manufacture of specific tumor vaccines.

Key words—cancer vaccine; drug delivery system; nanoparticle; gene delivery vector

1. はじめに

がんは手術療法や化学療法、放射線療法など様々な治療法の開発が盛んに行われてきたにもかかわらず、いまだ日本における死亡原因の1位を占める予後不良の疾患である。近年、患者自身の免疫機構を利用してがんを治療するがんワクチンが安全な治療法として期待されている。これまでにメラノーマワクチンを始めとした様々ながんワクチンが研究されているものの、その奏効率は2.6%と低く、十分な治療効果を得られていない。¹⁾ がんワクチンの実用化のためには、がん抗原特異的な免疫を効率的に誘導する新規技術の開発が必要である。

近年、抗原提示細胞に抗原を効率的に取り込ませることで、高い免疫誘導効果を得る新たな技術の開発が試みられている。²⁾ これまでに、筆者は薬物に様々なカチオン性の化合物とアニオン性の化合物を静電的に自己組織化させた ternary complexes の微粒子開発を行ってきた。これらの ternary complexes は臓器指向性を有し、細胞障害性や血液毒性が極めて低い。特に、近年開発した ternary complexes は、DNA ワクチンやタンパク抗原を含有でき、抗原提示細胞への標的化が可能で、生体適合性が高い。

本稿では、ternary complexes の開発とがんワクチンへの応用について紹介する。

2. DNA を内包した ternary complexes の開発³⁾

DNA ワクチンは大腸菌による増幅や PCR 法による安価な大量生産が可能で、液性免疫だけでなく、がんワクチンに必要な細胞性免疫を惹起することが可能であり、次世代型のワクチンとして期待されている。^{4,5)} しかしながら、DNA ワクチンを用い

長崎大学病院薬剤部 (〒852-8501 長崎市坂本 1-7-1)
現所属：†長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療薬学講座実践薬学分野 (〒852-8501 長崎市坂本 1-7-1)
e-mail: mailkurosaki-nuh@yahoo.co.jp
本総説は、平成 30 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

て十分な免疫誘導効果を得るためには、抗原提示細胞に十分量の抗原タンパク質を発現させる必要がある。このため、DNA ワクチンの臨床応用のためには、DNA ワクチンを抗原提示細胞へ効率的に送達・発現させることが可能な遺伝子キャリアの開発が不可欠である。⁶⁾ これまでに、アデノウイルスやレンチウイルス等のウイルスを用いて遺伝子を導入する技術やカチオン性の高分子やリポソーム等の非ウイルス性のキャリアを用いて遺伝子を導入する技術が盛んに研究されている。^{7,8)} 特に非ウイルス性のキャリアは安全性が比較的高く、複数回の投与が可能で、DNA ワクチンの実用化には高い有用性が期待できる。

非ウイルス性遺伝子キャリアの中でも、polyethylenimine (PEI) と plasmid DNA (pDNA) から構成されるカチオン性の pDNA/PEI complexes (binary complexes) は高い遺伝子発現を示すことが知られている。これは、binary complexes が pDNA を内包し、DNase による分解を阻害し、静電的に細胞膜に接着し、エンドサイトーシス後に proton sponge 効果によって pDNA を効率的に細胞質内へ導入することに由来する。⁹⁾ Binary complexes は静脈内投与後に肺で高い遺伝子発現を示すことが知られており、¹⁰⁾ Polyplus-transfection 社から *in vivo* jet-PEI という試薬が市販されている。しかし、カチオン性の binary complexes は細胞障害性が高く、血中に投与すると血清アルブミンや赤血球などの血液成分と凝集し、血栓症などの重篤な副作用を引き起こす可能性がある。^{11,12)} また、binary complexes は細胞膜上のアニオン性の proteoglycans と非特異的に結合するため、特定の臓器や細胞へ選択的に遺伝子を導入することは困難である。¹³⁾

そこで筆者は、カチオン性の binary complexes の副作用や欠点を改善する目的で、pDNA と PEI、様々な生体適合性のアニオン性高分子を静電的に自己組織化した ternary complexes の開発を行った。生体適合性が高い様々なアニオン性高分子をスクリーニングした結果、polyadenylic acid (polyA)、polyinosinic-polycytidylic acid (polyIC)、 α -polyaspartic acid (α -PAA)、 α -polyglutamic acid (α -PGA)、 γ -polyglutamic acid (γ -PGA) によって ternary complexes を安定に作製することができた。Ternary complexes 作製の模式図を Fig. 1 に示す。

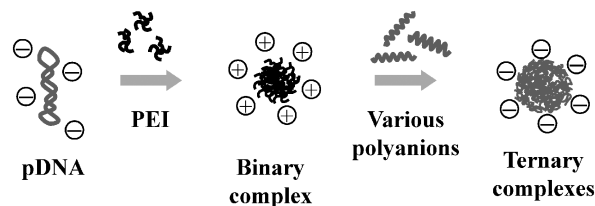


Fig. 1. Construction of Ternary Complexes

様々な電荷比で pDNA と PEI、アニオン性高分子を自己組織化し、表面がアニオン性に帯電し、粒子径が約 100 nm の ternary complexes を構築した。Binary complexes と heparin sulfate に代表される一部のアニオン性高分子を混合すると、binary complexes から pDNA が乖離することが報告されている。¹⁴⁾ そこで、polyA、polyIC、 α -PAA、 α -PGA、 γ -PGA が binary complexes から pDNA を乖離していないことをアガロースゲル電気泳動法を用いて確認した。その結果、すべての ternary complexes で pDNA の乖離は認められず、pDNA が安定に ternary complexes に内包されていることが確認できた。

次に、ternary complexes の細胞障害性について評価した。Binary complexes は細胞生存率が 25% を下回る極めて強い細胞障害性を示したが、ternary complexes は有意な細胞障害性を示さなかった。さらに、静脈内投与後の安全性について評価するために、赤血球凝集作用を調べた (Fig. 2)。Binary complexes を赤血球と混合すると、赤血球が凝集し、大きな凝集塊が形成された。しかしながら、作製した ternary complexes は赤血球凝集を示さず、静脈内投与製剤としての有用性が示唆された。この毒性の軽減は、微粒子表面のアニオン性高分子の被膜層によって赤血球や細胞膜の負電荷表面との相互作用が減弱したことに起因すると推察される。一方で、細胞膜との相互作用の減弱は ternary complexes の細胞内取り込みや遺伝子導入効果を大幅に低



黒崎友亮

2010年に長崎大学大学院医歯薬学総合研究科博士後期課程を修了後、長崎大学病院薬剤師・COE 研究員、日本学術振興会特別研究員 PD (京都大学大学院薬学研究科)、長崎大学病院薬剤師を経て、2018年に長崎大学生命医科学域(薬学系)助教に着任。現在は研究と薬剤師業務を行いつつ、実務実習生を指導している。

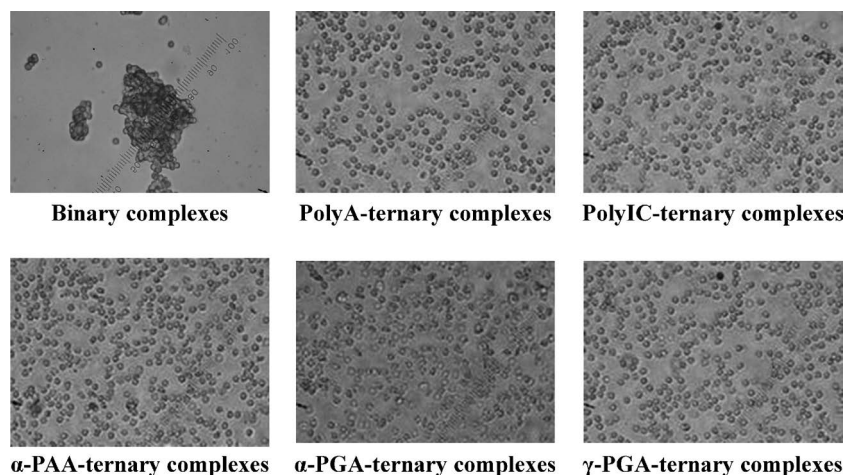


Fig. 2. Erythrocyte Aggregation by Various Complexes
Erythrocytes from mice were mixed with each complex and aggregations were observed by phase contrast microscopy (400 × magnification).

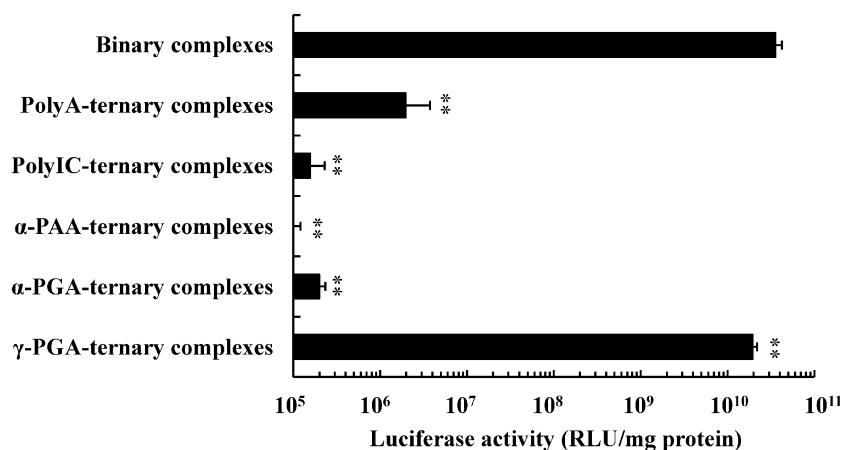


Fig. 3. *In Vitro* Transgene Efficiencies of Various Complexes

Various complexes containing pCMV-luciferase were added to B16-F10 cells. Twenty-four h after transfection, luciferase gene expression was evaluated. Each bar represents the mean ± S.E. ($n=6$). ** $p < 0.01$ vs. binary complexes.

下させる可能性がある。そこで、次に *in vitro* における遺伝子導入効果について検討を行った。カチオン性の binary complexes は高い遺伝子導入効果を示したが、ほとんどの ternary complexes は binary complexes と比較して、遺伝子発現が 1/1000 以下にまで低下した。しかし、 γ -PGA を用いて被膜した γ -PGA-ternary complexes は、微粒子表面がアニオン性に帯電しているにもかかわらず、極めて高い遺伝子発現を示した (Fig. 3)。この高い遺伝子発現を解析した結果、 γ -PGA-ternary complexes は γ -PGA に特異的な受容体を介したカベオラ介在性のエンドサイトーシスによって効率的に細胞内に取り込まれていることを見出した。現在、この γ -PGA に特異的な受容体の同定を行っている。

3. γ -PGA-ternary complexes の臓器指向性の評価¹⁵⁾

静脈内投与された微粒子製剤の臓器への蓄積は、粒子径や表面電荷、血液成分との相互作用によって大きく影響される。Binary complexes と γ -PGA-ternary complexes をマウスへ尾静脈内投与し、6, 12, 24 時間後に肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺における遺伝子発現量を測定した (Fig. 4)。微粒子製剤は主に、肝臓や脾臓などの細網内皮系組織と呼ばれる臓器に蓄積するが、カチオン性の微粒子は血液中赤血球や血清アルブミンと凝集し、肺に多量に蓄積することが知られている。¹⁶⁾ 実際に、binary complexes は脾臓と肺において 1×10^6 RLU/g tissue を超える高い遺伝子発現を示した。 γ -PGA-ter-

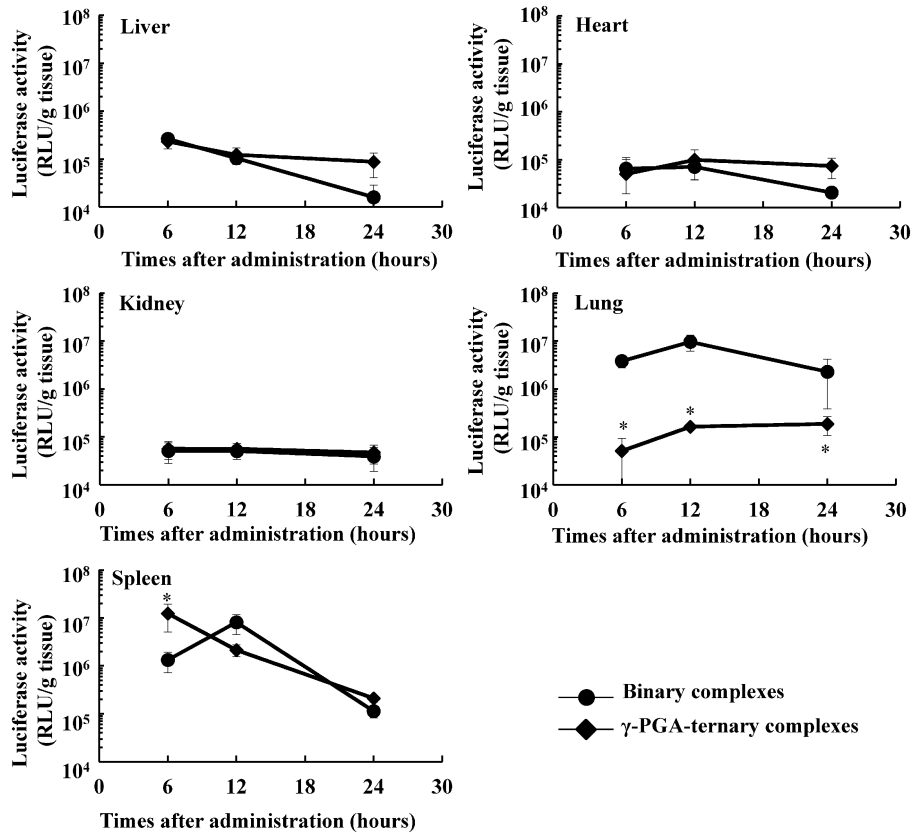


Fig. 4. Transgene Efficiencies of Binary Complexes and γ -PGA-ternary Complexes in Mice

Those complexes containing pCMV-luciferase were intravenously administered into mice. At 6, 12, and 24 h after administration, luciferase activities in various organs were quantified. Each value represents the mean \pm S.E. ($n = 3-5$). * $p < 0.05$ vs. binary complexes. \bullet : binary complexes, \blacklozenge : γ -PGA-ternary complexes.

nary complexes は binary complexes と比較して、肺における遺伝子発現量がすべての時点で有意に減少し、脾臓で特異的に高い遺伝子発現を示した。さらに、fluorescein isothiocyanate (FITC) を用いて蛍光標識した FITC-PEI と蛍光タンパク質 tdTomato を発現する pDNA を用いて作製した γ -PGA-ternary complexes をマウスへ投与し、脾臓局所における γ -PGA-ternary complexes の蓄積と遺伝子発現を評価した。この結果、FITC-PEI は脾臓の中でも特に抗原提示細胞に富んだ辺縁帯に蓄積し、tdTomato の発現も辺縁帯で観察された。この結果から、 γ -PGA-ternary complexes が脾臓辺縁帯に存在する抗原提示細胞に効率的に遺伝子を導入していることが示唆され、 γ -PGA-ternary complexes の DNA ワクチンキャリアとしての有用性が期待される。

4. γ -PGA-ternary complexes を用いたメラノーマ DNA ワクチンの開発

Glycoprotein 100 (gp100) と tyrosinase-related protein-2 (TRP-2) はメラノーマ抗原として知られ

ている。¹⁷⁾そこで、ユビキチン化された gp100 と TRP-2 のエピトープを発現する pDNA (pUb-M) を用いて γ -PGA-ternary complexes を作製した。

マウスに 5% 糖液 (control) 又は pUb-M 単独、pCMV-luciferase 含有 γ -PGA-ternary complexes (empty complexes), pUb-M 内包 γ -PGA-ternary complexes を投与し、免疫を誘導した。免疫を誘導したマウスの皮内へ B16-F10 メラノーマ細胞を移植し、腫瘍増殖を評価した (Fig. 5)。pUb-M 単独又は empty complexes を投与したマウスでは、腫瘍増殖に control 群との有意な差異は認められなかった。しかし、pUb-M 内包 γ -PGA-ternary complexes を投与したマウスでは腫瘍増殖の有意な抑制が確認された。次に、pUb-M 内包 γ -PGA-ternary complexes の転移抑制効果を評価した。pUb-M 内包 γ -PGA-ternary complexes を用いて免疫したマウスは control 群と比較して、B16-F10 メラノーマ細胞の肺転移が有意に低下し、生存期間が延長した。これらの結果は、 γ -PGA-ternary complexes が脾臓の抗原提

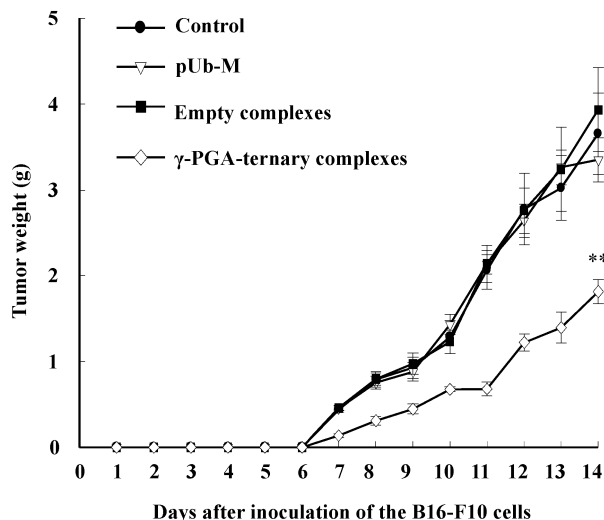


Fig. 5. Tumor Growth Inhibition by γ -PGA-ternary Complexes Containing Melanoma DNA Vaccines

Vaccines were administered into mice biweekly a total of four times. Two weeks after the last immunization, B16-F10 cells were administered to mice intradermally and tumor growth was monitored. Data are the mean \pm S.E. ** $p < 0.01$ vs. control.

示細胞に pUb-M を効率的に送達し、メラノーマ抗原を発現させたことに由来すると考えられる。

5. 抗原タンパク内包 γ -PGA-ternary complexes を用いたがんワクチンの開発¹⁸⁾

γ -PGA-ternary complexes が DNA ワクチンを脾

臓の抗原提示細胞に効率的に送達し、高い免疫誘導効果が認められた。この種の抗原提示細胞への標的化技術は DNA ワクチンだけでなく、抗原タンパク質にも応用が可能である。近年、組換え DNA 技術によって、大腸菌や細胞を用いて純度の高い抗原タンパク質を合成することが可能になり、免疫誘導効果を高めるための研究が盛んに行われている。¹⁹⁾そこで、抗原タンパク質のモデルとして卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) を内包した γ -PGA-ternary complexes を作製し、その免疫誘導効果について評価した。

マウスに 5% 糖液 (control) 又は OVA 単独、OVA 内包 γ -PGA-ternary complexes を投与し、血清中の OVA に対する immunoglobulin G (IgG) 産生を測定した。この結果、OVA 内包 γ -PGA-ternary complexes を投与したマウスでは OVA 単独を投与したマウスと比較して、有意に高い OVA 特異的な IgG 産生が認められた。IgG のサブタイプのうち、IgG2a と 3 は Th1 反応を介して、IgG1 と 2b は Th2 反応を介して誘導されることが知られている。²⁰⁾そこで、Th1 反応を介した細胞性免疫と Th2 反応を介した液性免疫の誘導を確認するために、OVA 特異的な IgG の各サブタイプを解析した

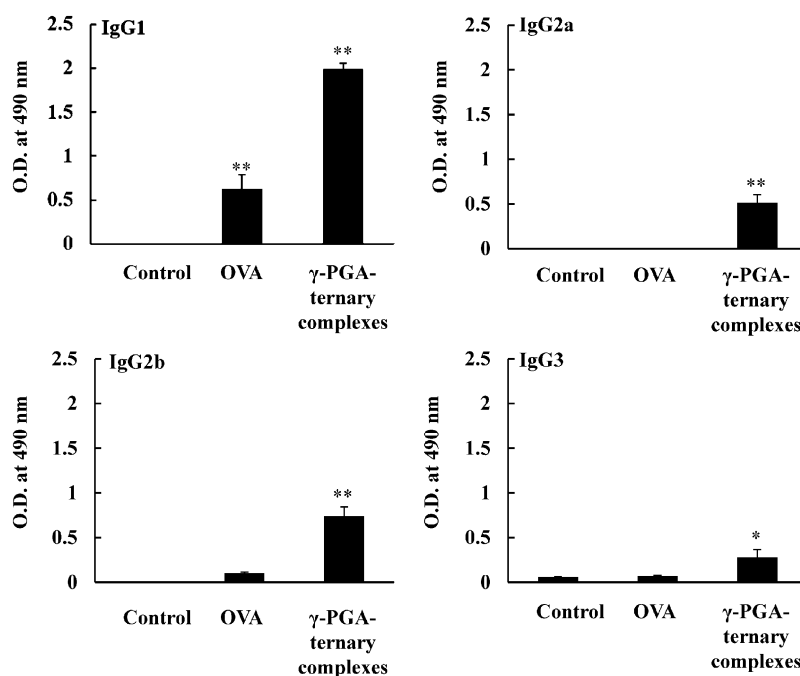


Fig. 6. Evaluation of OVA-specific IgG Subtypes

Mice were administered 5% glucose (control), OVA, and γ -PGA-ternary complexes containing OVA weekly a total of four times. Two weeks after the last immunization, serum was obtained from those mice and OVA-specific IgG subtypes such as IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Each bar represents the mean of 4-5 experiments. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. control.

(Fig. 6). OVA を単独投与したマウスはコントロールと比較して IgG1 の有意な上昇が認められたが、その他の IgG サブタイプの顕著な上昇は認められず、Th2 反応を介した液性免疫の惹起のみが確認された。一方で、OVA 内包 γ -PGA-ternary complexes を投与したマウスにおいてはすべての IgG サブタイプの有意な上昇が認められており、Th1 反応を介した細胞性免疫と Th2 反応を介した液性免疫の両方が誘導されていることが確認できた。そこで、同様に免疫したマウスに OVA を発現するがん細胞株である E.G7-OVA 細胞を皮下に移植した。OVA 単独を投与したマウスでは腫瘍増殖は抑制されなかったが、OVA 内包 γ -PGA-ternary complexes を投与したマウスにおいては E.G7-OVA 細胞の増殖が完全に抑制された。

6. おわりに

今回、筆者は臓器指向性を有する自己組織化型薬物キャリアを用いて脾臓の抗原提示細胞への標的化を実現した。この標的化技術を用いることで、DNA ワクチンや抗原タンパク質の免疫誘導効果を高め、腫瘍の増殖を有意に抑制することに成功した。この技術はがんワクチンだけでなく、感染ワクチンにも応用可能であり、ワクチン開発のプラットフォーム技術として高い有用性が期待できる。

今後は自己組織化型薬物キャリアを利用したがんワクチンの臨床開発を進めていきたい。

謝辞 本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました長崎大学病院薬剤部 佐々木均教授に謹んで深く感謝の意を表します。また、実験の一部に御協力頂きました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科治療薬剤学研究室員一同に感謝致します。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Rosenberg S. A., Yang J. C., Restifo N. P., *Nat. Med.*, **10**, 909–915 (2004).
- 2) Wang J., Hu X., Xiang D., *Drug Deliv.*, **25**, 1319–1327 (2018).
- 3) Kurosaki T., Kitahara T., Fumoto S., Nishida K., Nakamura J., Niidome T., Kodama Y.,

- Nakagawa H., To H., Sasaki H., *Biomaterials*, **30**, 2846–2853 (2009).
- 4) Lu B., Tao L., Wang T., Zheng Z., Li B., Chen Z., Huang Y., Hu Q., Wang H., *Clin. Vaccine Immunol.*, **16**, 73–77 (2009).
- 5) Zhao L. S., Qin S., Zhou T. Y., Tang H., Liu L., Lei B. J., *World J. Gastroenterol.*, **6**, 239–243 (2000).
- 6) Chapman R., Rybicki E. P., *Vaccines*, **7**, 50 (2019).
- 7) Seth P., *Cancer Biol. Ther.*, **4**, 512–517 (2005).
- 8) Chowdhury E. H., *Expert Opin. Drug Deliv.*, **6**, 697–703 (2009).
- 9) Kichler A., Leborgne C., Coeytaux E., Danos O., *J. Gene Med.*, **3**, 135–144 (2001).
- 10) Lemkine G. F., Demeneix B. A., *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **3**, 178–182 (2001).
- 11) de Wolf H. K., Luten J., Snel C. J., Oussoren C., Hennink W. E., Storm G., *J. Control. Release*, **109**, 275–287 (2005).
- 12) Jeon O., Yang H. S., Lee T. J., Kim B. S., *J. Control. Release*, **132**, 236–242 (2008).
- 13) Demeneix B., Behr J. P., *Adv. Genet.*, **53**, 217–230 (2005).
- 14) Moret I., Esteban Peris J., Guillem V. M., Benet M., Revert F., Dasí F., Crespo A., Aliño S. F., *J. Control. Release*, **76**, 169–181 (2001).
- 15) Kurosaki T., Kodama Y., Muro T., Higuchi N., Nakamura T., Kitahara T., Miyakoda M., Yui K., Sasaki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 1800–1806 (2013).
- 16) Sakurai F., Nishioka T., Yamashita F., Takakura Y., Hashida M., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **52**, 165–172 (2001).
- 17) Xiang R., Lode H. N., Chao T. H., Ruehlmann J. M., Dolman C. S., Rodriguez F., Whitton J. L., Overwijk W. W., Restifo N. P., Reisfeld R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5492–5497 (2000).
- 18) Kurosaki T., Kitahara T., Nakamura T., Nishida K., Fumoto S., Kodama Y., Nakagawa H., Higuchi N., Sasaki H., *Pharm. Res.*, **29**, 483–489 (2012).
- 19) Shi S., Zhu H., Xia X., Liang Z., Ma X., Sun B., *Vaccine*, **37**, 3167–3178 (2019).
- 20) Neyestani T. R., Woodward W. D., Hillyer L., *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, **3**, 1–6 (2004).