

長鎖ペプチド／疎水化多糖ナノゲル複合体ワクチンによる 新規がん免疫療法の開発

三重大学大学院医学系研究科 がんワクチン治療学
リサーチアソシエイト 原田 直純

(共同研究者)

三重大学大学院医学系研究科 がんワクチン治療学 教授 珠玖 洋
三重大学大学院医学系研究科 がんワクチン治療学 リサーチアソシエイト 村岡 大輔

はじめに

現在、国内で開発されているがんワクチンの大部分を占める短鎖ペプチドワクチンは、キラー T細胞認識エピトープに相当する9～10残基の短鎖合成ペプチドをワクチン抗原としており、ヘルパー T細胞は活性化しない。そのため短鎖ペプチドワクチンでは、誘導される抗がん免疫の量や質が不十分で治療効果が乏しいという不安がある^(文献1)。また、短鎖ペプチドワクチンでは非免疫細胞等による不適切な抗原提示が起こり得るために、がんに対する免疫寛容を誘導してしまう危険性も指摘されている^(文献2)。これに対して最近、「長鎖ペプチドワクチン法」が考案され注目されている^(文献2)。長鎖ペプチドワクチンは、キラー T細胞とヘルパー T細胞が認識するペプチド配列を含むようにデザインされた20～60残基の長い合成ペプチドであり、キラー T細胞とヘルパー T細胞を同時刺激して良質ながん免疫応答を誘導できる。また、この長さのペプチドがT細胞に提示されるためには、専門の抗原提示細胞(樹状細胞やマクロファージなど)の関与が必須で、非専門の抗原提示細胞(一般の体細胞等)による不適切な抗原提示と免疫寛容を回避できる。このように長鎖ペプチドワクチン法は短鎖ペプチドワクチンと大きく異なる長所を有し、高い臨床有効性を発揮すると期待される。

他方で我々は、ワクチンの有効性を高める抗原デリバリーシステムとして「疎水化多糖ナノゲル」の開発を独自に進めてきた^(文献3～5)。疎水化多糖ナノゲルは親水性多糖のプルランを疎水性のコレステロール基で部分修飾したもので、水溶液中でナノサイズのゲル(ナノゲル)を自己形成する。この疎水化多糖ナノゲルと長鎖ペプチドワクチンの複合体から成るがんワクチンを試作し、マウスモデルにおいて免疫アジュバントと同時投与したときの性能評価(特異的免疫誘導、腫瘍増殖抑制作用)を実施した。その結果、疎水化多糖ナノゲル使用時は長鎖ペプチドワクチンに対するアジュバントの効果が著しく増強することを新たに見出した(投稿準備中)。

本研究ではアジュバント存在時の長鎖ペプチド／疎水化多糖ナノゲル複合体ワクチンの作用機序解析を行うとともに、臨床応用を目指して、ヒトで動作する長鎖ペプチドワクチンの設計と性能確認を実施した。

結果

がんワクチン療法ではワクチンの効果を増強するために、Toll様受容体 (TLR) のアゴニストなどを免疫アジュバントとして併用する。皮下に投与されたワクチン抗原、リンパ管を通じて近傍のリンパ節へ移行し、樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれて抗原提示反応に供される。アジュバントも同様にリンパ節に移行し、抗原提示細胞を活性化する。この作用を通じてアジュバントは強力な免疫賦活活性を示すが、その存在下においても、ワクチンが誘導する免疫応答は依然として弱いことが多い。この問題の原因を探るために我々は、マウスへ皮下投与した後のアジュバントのリンパ節内免疫細胞への取込みと作用を解析した (Fig. 1)。その結果、ワクチンに対する免疫応答において抗原提示細胞として最も重要視されている樹状細胞 (F4/80-CD11c+) ではなく、マクロファージ (F4/80+CD11b+) にアジュバントが高率にとりこまれ、アジュバントによる活性化も樹状細胞よりもマクロファージで顕

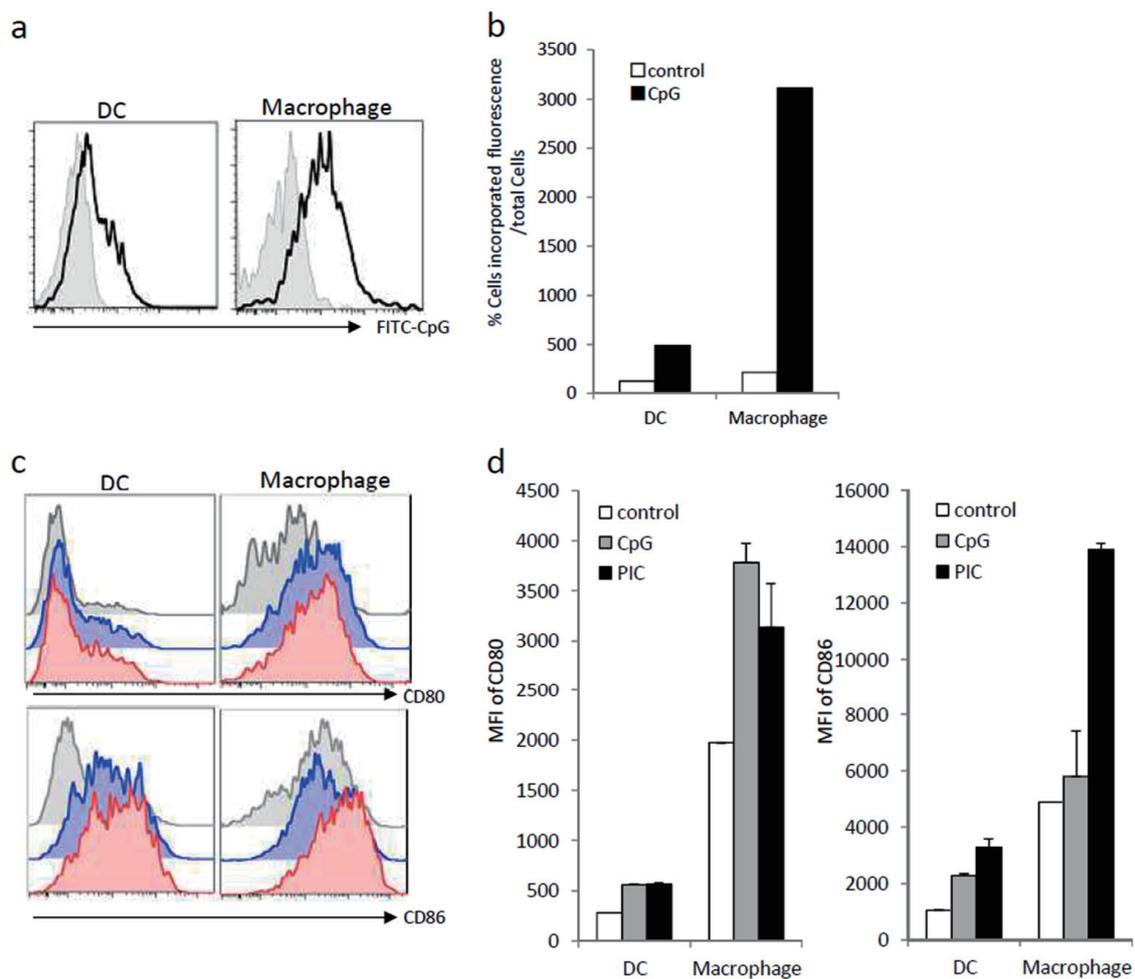


Fig.1. 皮下投与したアジュバントの近傍リンパ節内抗原提示細胞への取込みと活性化

a, b, アジュバントとしてCpGオリゴDNA (TLR9アゴニスト) (蛍光標識体) をマウスに皮下投与したときの近傍リンパ節内抗原提示細胞への取込みをフローサイトメトリーで測定した。c, d, アジュバントとしてCpGオリゴDNAまたはpoly IC RNA (PIC, TLR3アゴニスト) を投与したときの近傍リンパ節内抗原提示細胞の活性化をCD80およびCD86発現を指標にフローサイトメトリーで測定した。

著であることを見出した。この結果から、アジュバント併用時は、ワクチン抗原は樹状細胞ではなくマクロファージへ送達する方が、アジュバントの増強効果を得やすいと考えられた。

アジュバントの作用を受けやすいマクロファージへのワクチン抗原送達を目指すとして、それに適した抗原デリバリーシステムは前例がない。我々は、デリバリーシステムとして疎水化多糖ナノゲルを適用した蛋白は、皮下投与した後に近傍リンパ節に移行しやすいことを見出していた（非公開データ）。そこで、次世代のワクチン抗原として有望な長鎖ペプチド抗原を疎水化多糖ナノゲルと複合体化したワクチンを作製し、皮下投与後に近傍リンパ節内の種々の免疫細胞への長鎖ペプチド抗原の取込みを評価した (Fig. 2)。その結果、疎水化多糖ナノゲルを用いれば、長鎖ペプチド抗原をリンパ節内のマクロファージに選択的に送達できることを明らかにした。

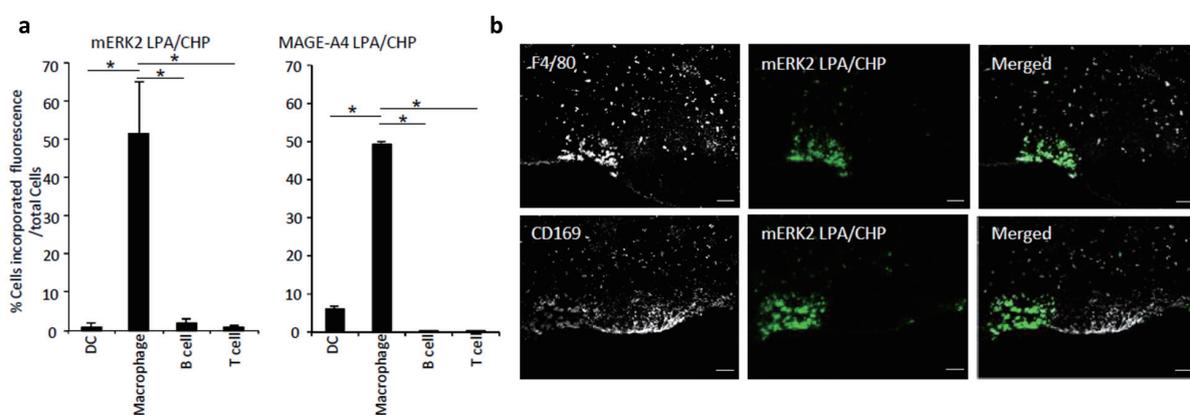


Fig.2. 皮下投与した長鎖ペプチド／疎水化多糖ナノゲルワクチンの近傍リンパ節内抗原提示細胞への取込み

a, 蛍光標識した長鎖ペプチド (mERK2 LPAまたはMAGE-A4 LPA) を疎水化多糖と複合体化し、マウスに皮下投与したときの近傍リンパ節内免疫細胞への取込みをフローサイトメトリーで測定した。p < 0.05。b, aと同様のマウスのリンパ節の免疫組織染色像。蛍光標識した長鎖ペプチドとマクロファージ抗原のF4.80の共局在が認められる。

以上の結果から、従来の樹状細胞指向型ワクチンに比べて、マクロファージ指向型ワクチンである長鎖ペプチド／疎水化多糖ナノゲル複合体ワクチンは、アジュバント存在下でより高い抗がん効果と免疫誘導能力を示すと考えた。この可能性をマウス担がんモデルで検証した (Fig. 3)。樹状細胞指向型ワクチンとして、不完全フロイントアジュバント (IFA) をデリバリーシステムに用いたワクチンを用意した。抗がん効果は、mERK2抗原を発現する繊維芽肉腫CMS5aと、MAGE-A4抗原を発現する大腸がんCT26の2種類で評価した。その結果、いずれの腫瘍においても長鎖ペプチド／疎水化多糖ナノゲル複合体ワクチンは、長鎖ペプチド／IFA複合体ワクチンよりも優れた抗がん活性を示した。また、ワクチン抗原特異的CD8陽性キラーT細胞の誘導を測定したところ、長鎖ペプチド／疎水化多糖ナノゲル複合体ワクチンは、長鎖ペプチド／IFA複合体ワクチンより優れた誘導能力を示した。また、長鎖ペプチド

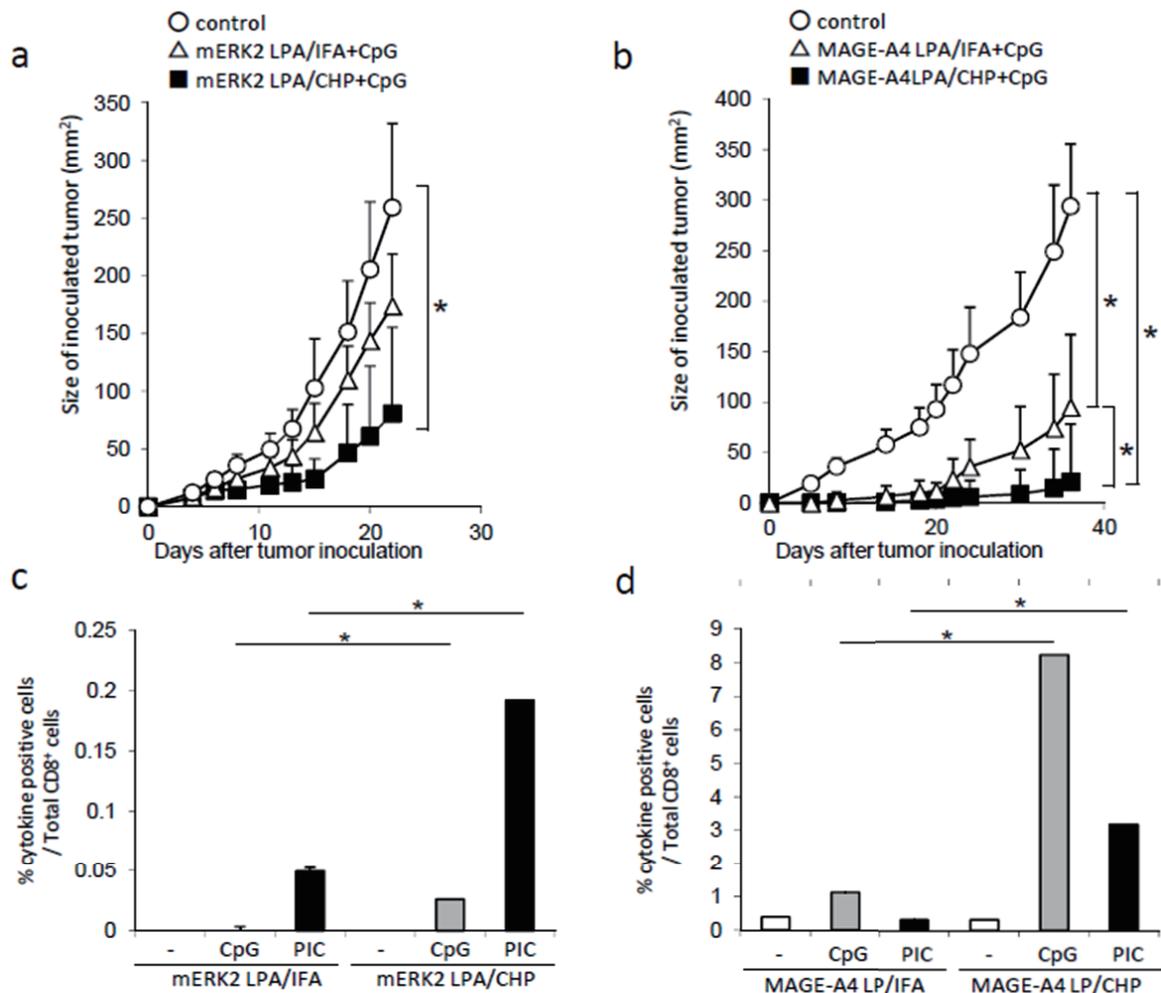


Fig.3. 長鎖ペプチド／疎水化多糖ナノゲルワクチンによる腫瘍増殖抑制と特異的CD8陽性キラーT細胞の誘導

a, 疎水化多糖ナノゲルまたはIFAと複合体化した長鎖ペプチドワクチン (mERK2 LPA) とアジュバント (CpGオリゴDNA) をマウスに免疫した後にCMS5a腫瘍を移植し、経時的にサイズを測定した。p < 0.05。b, 疎水化多糖ナノゲルまたはIFAと複合体化した長鎖ペプチドワクチン (MAGE-A4 LPA) とアジュバント (CpGオリゴDNA) をマウスに免疫した後にMAGE-A4遺伝子導入CT26腫瘍を移植し、経時的にサイズを測定した。p < 0.05。c, d, a, bと同様にワクチンとアジュバント (CpGオリゴDNAまたはpoly IC RNA) をを投与したときの脾臓内のワクチン抗原特異的CD8陽性キラーT細胞の頻度を細胞内IFN γ 染色法で測定した、p < 0.05。

／疎水化多糖ナノゲルワクチン投与マウスから取り出したマクロファージが特異的CD8陽性キラーT細胞を効率良く活性化できること、さらに阻害剤投与によりマクロファージを除去したマウスで、長鎖ペプチド／疎水化多糖ナノゲル複合体ワクチンによる抗原特異的CD8陽性キラーT細胞の誘導が消失することを確認している (データ省略)。

最後に、アジュバント存在時のマクロファージ指向型ワクチンの有用性についてヒトに外挿可能か否かについて、ヒトマクロファージを用いた培養細胞系で検討した (Fig.4)。がん抗原蛋白質NY-ESO-1およびMAGE-A4由来のCD8陽性T細胞エピトープを含む長鎖ペプチド抗

原を合成し、疎水化多糖ナノゲルとの複合体として、poly IC RNAとともにin vitroでヒトマクロファージに添加した。次いで、NY-ESO-1特異的またはMAGE-A4特異的CD8陽性T細胞クローンを添加し、各T細胞クローンに対するマクロファージの抗原刺激活性を測定した。その結果、ヒトマクロファージにおいても、長鎖ペプチド/疎水化多糖ナノゲルワクチンはアジュバント存在下で、高い特異的CD8陽性T細胞活性化を示した。

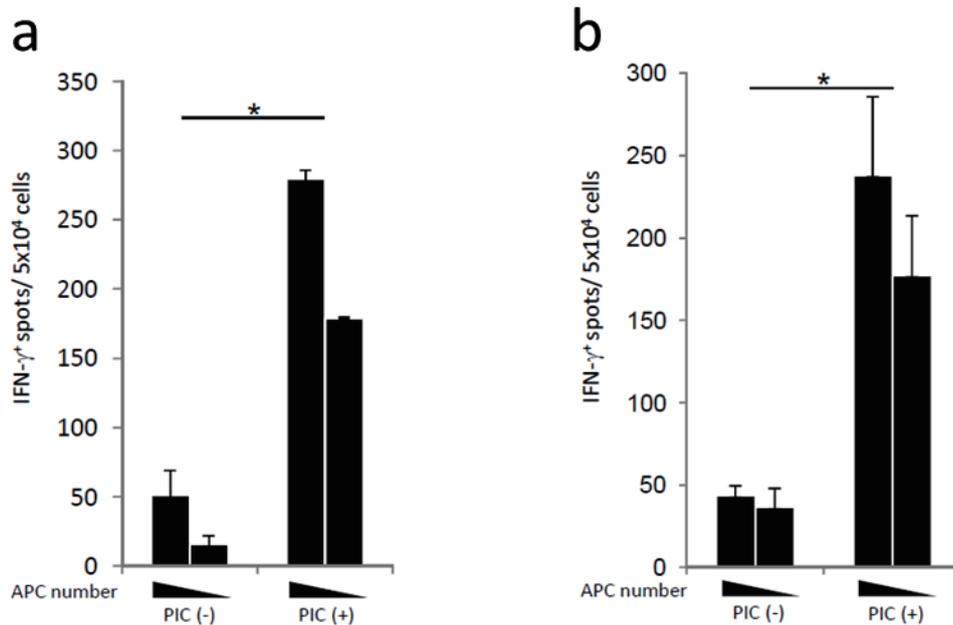


Fig.4. 長鎖ペプチド/疎水化多糖ナノゲルワクチンとアジュバントを投与したヒトマクロファージによる抗原特異的CD8陽性キラーT細胞の活性化

疎水化多糖ナノゲルまたはIFAと複合体化した長鎖ペプチドワクチン (NMW LPA) とアジュバント (poly IC RNA) をヒトマクロファージに添加し、一定時間後に抗原特異的CD8陽性キラーT細胞クローンを加え、その活性化をIFN γ ELISPOT法で測定した。a, NY-ESO-1抗原特異的CD8陽性T細胞クローン。b, MAGE-A4抗原特異的CD8陽性T細胞クローン。p < 0.05。

考 察

樹状細胞が外来性抗原のCD8陽性T細胞への提示(クロスプレゼンテーション)に優れることが示されて以来、がんワクチンの研究開発では、いかにして樹状細胞にワクチン抗原を効率良く送達するかが焦点となっている。同時に、樹状細胞の機能を高めるべく、樹状細胞を活性化するアジュバント物質の探索に多大な努力が払われてきた。しかしながら本研究は、マクロファージもクロスプレゼンテーション能力を十分に有すること、アジュバントへのin vivo感受性は樹状細胞よりもマクロファージの方が高いこと、そしてアジュバント使用時にはワクチン抗原をマクロファージに送達することが重要であることを初めて明確に示した。この発見は、今後のがんワクチンの研究開発の方向性を変える可能性がある。マクロファージは樹状細胞よりもより多様なToll様受容体を発現していることが知られており、そ

の点でもアジュバント使用を伴うワクチンの標的として好適である。

疎水化多糖ナノゲルがなぜリンパ節内のマクロファージへの選択的抗原輸送に優れているかはさらなる解析が必要であるが、ナノゲルがリンパ管への流入に適したサイズ (60nm前後) であること、電荷や種々の受容体への親和性がなく目的外の組織に取り込まれないといった性質から、受動的 (passive) な抗原デリバリーの機序を取っていると推察している。

要 約

近年、がんワクチンの有効性を向上させる技術が強く求められている。我々はアジュバントを併用した長鎖ペプチドワクチンを用い、ワクチン投与時の抗原提示の担い手として樹状細胞ではなく、マクロファージが重要であることを見出した。また、疎水化多糖ナノゲルをデリバリーシステムに用いることで、マクロファージへの選択的なワクチン抗原輸送を実現できることを明らかにした。これらの所見と技術を取り入れることで、がんワクチンの有効性を著しく改善できる可能性がある。

文 献

1. Arens, R. and Schoenberger, S. P., Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation., *Immunol Rev*, 235, 190-205, 2010.
2. Melief, C. J. M. and van der Burg, S. H., Immunotherapy of established (pre) malignant disease by synthetic long peptide vaccines., *Nat Rev Cancer*, 8, 351-360, 2008.
3. Gu, X. G., et al., A novel hydrophobized polysaccharide/oncoprotein complex vaccine induces in vitro and in vivo cellular and humoral immune responses against HER2-expressing murine sarcomas., *Cancer Res*, 58, 3385-3390, 1998.
4. Hasegawa, K., et al., In vitro stimulation of CD8 and CD4 T cells by dendritic cells loaded with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan and NY-ESO-1 protein: Identification of a new HLA-DR15-binding CD4 T-cell epitope. *Clin Cancer Res*, 12, 1921-1927, 2006.
5. Kageyama, S., et al., Dose-dependent effects of NY-ESO-1 protein vaccine complexed with cholesteryl pullulan (CHP-NY-ESO-1) on immune responses and survival benefits of esophageal cancer patients., *J Transl Med*, 11, 246, 2013.