

Fc レセプターを標的とした樹状細胞への抗原送達法の構築とその癌免疫療法における有用性

鈴木 亮,^{*,a} 宇都口直樹,^a 川村和子,^b 門脇則光,^b
岡田直貴,^c 滝澤知子,^a 内山 卓,^b 丸山一雄^a

**Development of Effective Antigen Delivery Carrier to Dendritic Cells
via Fc Receptor in Cancer Immunotherapy**

Ryo SUZUKI,^{*,a} Naoki UTOGUCHI,^a Kazuko KAWAMURA,^b Norimitsu KADOWAKI,^b
Naoki OKADA,^c Tomoko TAKIZAWA,^a Takashi UCHIYAMA,^b and Kazuo MARUYAMA^a

^aDepartment of Biopharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 1091-1 Suwarashi, Sagamiko-cho, Sagami-hara City 199-0195, Japan, ^bDepartment of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan, and ^cDepartment of Biotechnology and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan

(Received August 3, 2006)

In cancer immunotherapy with dendritic cells (DCs), which are the most potent antigen-presenting cells, it is important that DCs present peptides derived from tumor-associated antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and activate tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. However, exogenous antigens are generally presented on MHC class II but not class I molecules. To develop effective immunotherapy for cancer, an antigen delivery carrier that can induce MHC class I presentation of exogenous antigens is necessary. Several strategies to induce DCs to present exogenous antigens on MHC class I molecules have been reported. First, DCs that phagocytosed a particulate form of antigens present peptides derived from the antigens on MHC class I molecules. Second, DCs that incorporated antigens *via* certain endocytic receptors such as Fc receptors efficiently present peptides on MHC class I molecules. We combined these two strategies and prepared antigen-containing IgG-conjugated liposomes (IgG-liposomes). In this study, we investigated the feasibility of IgG-liposomes as antigen delivery carriers in cancer immunotherapy with DCs. Immunization of mice with DCs that endocytosed ovalbumin (OVA)-containing IgG-liposomes, but not OVA-containing bare liposomes or soluble OVA, completely prevented the growth of OVA-expressing lymphoma cells. These results suggest that IgG-liposomes represent an efficient antigen delivery carrier for DCs in cancer immunotherapy.

Key words—liposome; dendritic cells; tumor immunotherapy; cross presentation; IgG

1. はじめに

Boon らのグループによりヒトメラノーマの癌関連抗原が同定されて以来、今日までに様々な癌関連抗原が同定されている。¹⁻⁵⁾これに伴い、癌に対する免疫療法が現実的なものとなりつつある。この癌免疫療法を有効な治療法として確立していくためには、癌細胞に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を

活性化することが重要である。そのためには、T 細胞への強力な抗原提示細胞として知られている樹状細胞 (DC) の MHC クラス I 分子上に癌関連抗原を提示させる必要がある。しかし、通常外来性抗原は MHC クラス II にのみ提示されることが知られている。⁶⁾したがって、癌免疫療法の成功の鍵は、外来性抗原でも MHC クラス I に抗原提示を誘導可能な抗原送達キャリアー開発にある。これまでに、樹状細胞上の Fc レセプターを介して抗原を DC に取り込ませることで、外来性抗原であるにも係わらず MHC クラス I にクロスプレゼンテーションされることが確認されている。⁷⁻⁹⁾この原理を利用して抗原抗体複合体によるクロスプレゼンテーション誘導が試みられるようになった。しかし、この方法で

^a帝京大学薬学部生物薬剤学教室 (〒199-0195 相模原市相模湖町寸沢嵐 1091-1), ^b京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54), ^c大阪大学大学院薬学研究科薬学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6)

*e-mail: r-suzuki@pharm.teikyo-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S33 で発表したものを中心に記述したものである。

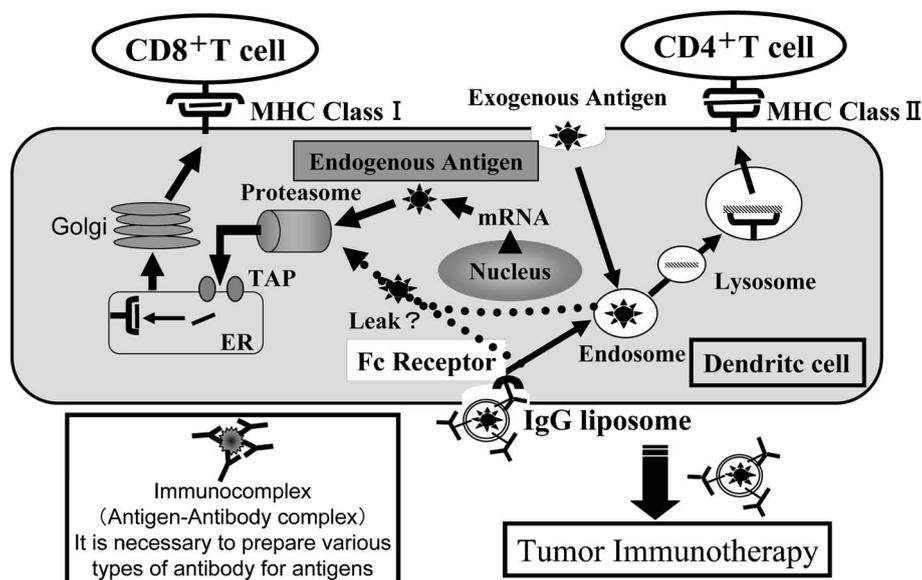


Fig. 1. Strategy of Antigen Delivery with IgG Liposomes

は抗原に対して抗体をそれぞれ用意する必要があるため、汎用性の点で問題がある。そこでわれわれは、低分子薬物のみならずたん白質をも封入可能なリポソームに着目した。¹⁰⁻¹³⁾ このリポソームは様々な抗原を封入可能である上、その表面に IgG を容易に修飾可能である。^{14,15)} したがって、抗原封入 IgG 修飾リポソーム (IgG リポソーム) は、樹状細胞上の Fc レセプター認識能を持つ抗原送達キャリアーとして、MHC クラス I へのクロスプレゼンテーションを効率よく誘導できるものと考えられる (Fig. 1)。そこで本稿では、IgG リポソームの抗原送達キャリアーとしての癌免疫療法における有用性について紹介するとともに、今後の展望について論ずる。

2. IgG リポソームの調製及び DC への取り込み

リポソーム調製方法として様々な方法が知られている。¹⁶⁻¹⁹⁾ しかし、本研究ではリポソーム内に抗原となるたん白質を封入する必要があるため、リポソーム調製段階で有機溶媒と抗原水溶液が接触する逆相蒸発法でのリポソーム調製は本研究目的に適していないと考えられた。そこで、今回は有機溶媒と内水相が直接接触しない Hydration 法によりリポソーム調製を行った。¹⁶⁾ また、リポソーム表面への IgG 修飾方法として、本研究では簡便で修飾反応も速やかである SMPB (Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl) butyrate) 法²⁰⁾ を用いた (Fig. 2)。な

お、データには示さないが、本方法により調製した IgG リポソームのサイズは約 200 nm であり、表面に約 20-40 分子の IgG が修飾されていることを確認している。この IgG リポソームの DC への取り込みを評価するため、カルセイン封入 IgG リポソームを用いフローサイトメトリーにより検討した (Fig. 3)。なお、本検討では、IgG 未修飾リポソーム (Bare リポソーム) についても検討した。その結果、IgG リポソームの DC への取り込みは、Bare リポソームより高いことが判明した。次に、この取り込みの亢進が Fc レセプターを介した取り込みであることを確認するため、Fc レセプターに対する抗体を用いた取り込み阻害実験を行った (Fig. 4)。その結果、IgG リポソームの取り込みが、Fc レセプターに対する抗体存在下で阻害された。このことより、IgG リポソームは Fc レセプターを介したエンドサイトーシス経路にて DC に取り込まれている



鈴木 亮

帝京大学薬学部助手。1973 年神奈川県生まれ。東京薬科大学薬学部卒業。大阪大学大学院薬学研究科博士前期・後期課程修了。2001 年薬学博士 (大阪大学) 取得。2001 年東レ株式会社入社 (医薬研究所・先端融合研究所)。2004 年東レ株式会社退社。2004 年帝京大学薬学部助手 (現職)。「リポソームテクノロジーを基盤とする DDS とがん免疫療法の構築」をテーマにリポソーム製剤によるがん治療の最適化を目指して研究を進めている。

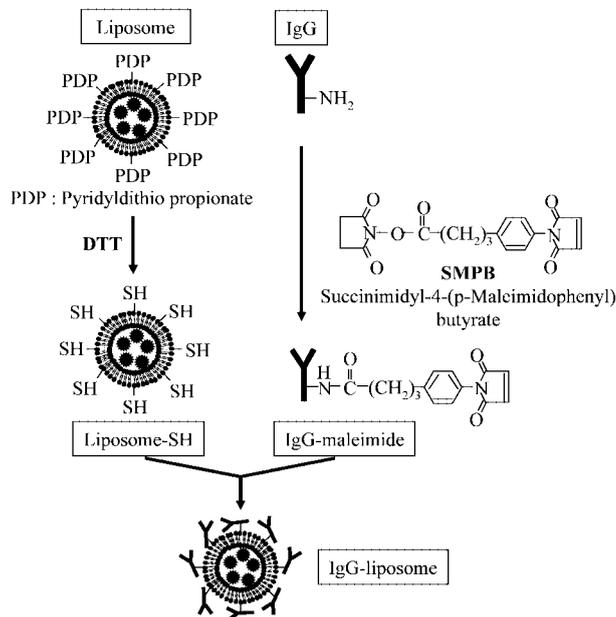


Fig. 2. Method of IgG Modification on Liposome Surface

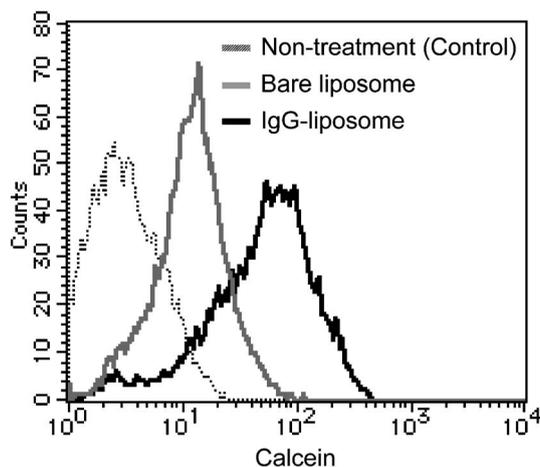


Fig. 3. Uptake of IgG Liposomes into DC
DCs were incubated with calcein encapsulating Bare liposomes or IgG liposomes (lipid conc. 2 mg/ml) for 1 hr at 37°C. After cell wash, the cells were analysed with flowcytometry.

ことが示唆された。

3. IgG リポソームにより抗原導入した DC による抗原特異的免疫誘導

IgG リポソームは Fc レセプターを介した取り込みにより、内封抗原を効率よく MHC クラス I に提示誘導できるものと考えられる。そこで、モデル抗原としてニワトリ卵白アルブミン (OVA) を封入した IgG リポソームを調製し、この OVA 封入 IgG リポソームを作用させた DC における MHC クラス I 抗原提示効率を評価した (Fig. 5)。なお、抗原

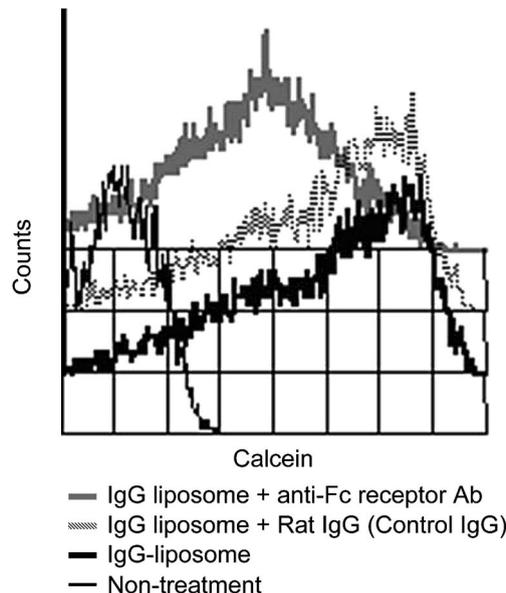


Fig. 4. Effect of Fc Receptor Blocking on Uptake of IgG Liposome into DC

DCs were incubated with PBS, rat anti-mouse Fc receptor antibody or normal rat IgG (10 μg/ml) for 4 hr at 4°C. Then, calcein encapsulating IgG liposomes (lipid conc. 0.2 mg/ml) were added, the cells were incubated for 1 hr at 37°C. After cell wash, the cells were analysed with flowcytometry.

提示の評価には DC 上の OVA ペプチド-MHC クラス I 複合体を認識して IL-2 を分泌することが知られている CD8-OVA1.3 細胞²¹⁾を用いた。OVA 封入 IgG リポソームを作用させた DC において、抗原濃度依存的な MHC クラス I 抗原提示が確認された。また、この抗原提示は Bare リポソームよりも高効率であった。データには示していないが、DC への OVA 封入 IgG リポソーム作用時に抗 Fc レセプター抗体にて取り込み阻害を掛けることで、MHC クラス I への抗原提示が減少することも確認している。この結果は、IgG リポソームが Fc レセプターを介して効率よく外来性抗原をクロスプレゼンテーション誘導していることを示している。現在、このクロスプレゼンテーションメカニズムについて解析を進めているところである。

次に、OVA 封入 IgG リポソームを作用させた DC をマウスに免疫したときに誘導される OVA 特異的 CTL 応答を検討した。最終免疫から 1 週間後のマウスから回収した脾細胞を *in vitro* 抗原再刺激することによりエフェクター細胞を調製し、⁵¹Cr リリースアッセイを行った (Fig. 6)。その結果、OVA トランスフェクタントである E.G7-OVA 細胞をターゲットとした際には、OVA 封入 Bare リポ

ソーム作用群と比較して、OVA 封入 IgG リポソーム作用 DC 免疫群において強力なターゲット細胞の傷害が認められた。一方、OVA をそのまま作用させた DC や intact DC を免疫した群では E.G7-OVA 細胞の傷害性は認められなかった。また、OVA ペプチドを MHC クラス I 分子上に提示していない EL4 細胞をターゲット細胞にした際には、どの群にも細胞傷害性は認められなかった。以上の結果から、IgG リポソームは内封抗原を Fc レセプターを

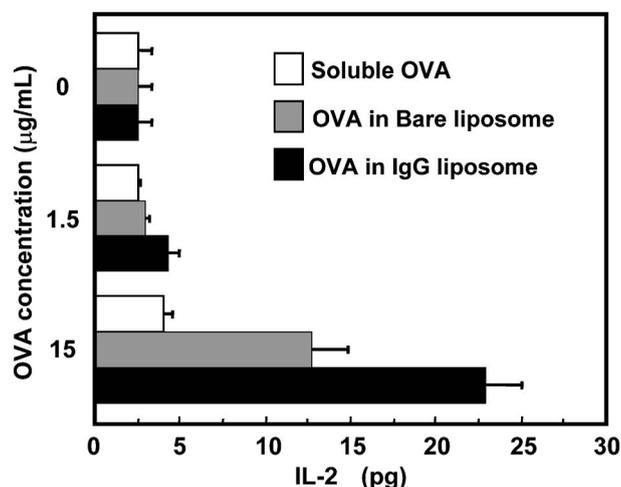


Fig. 5. Mouse Bone Marrow-derived DCs Efficiently Present OVA Antigens Encapsulated in IgG-liposomes on MHC Class I Molecules

Soluble OVA, OVA-bare liposomes, or OVA-IgG-liposomes were added to DCs derived from bone marrow of C57BL/6 mice. CD8OVA1.3 T cell hybridoma cells were stimulated with the DCs for 20 h, and IL-2 secreted to supernatants was measured by ELISA. Error bars indicate S.D. The data shown are representative of three experiments.

介して効率よく DC 内に導入し、MHC クラス I への抗原提示を誘導することで、*in vivo* において抗原特異的 CTL をより効率的に誘導できることが示された。

4. IgG リポソームにより抗原導入した DC の免疫による抗腫瘍免疫誘導

有効な癌免疫療法を確立する上で、癌関連抗原特異的な CTL を誘導することは極めて重要であるが、IgG リポソームを抗原送達キャリアーとして利用することで抗原特異的 CTL を誘導することが可能となった。そこで次に、癌免疫療法開発のモデル系としてよく用いられる OVA と E.G7-OVA 細胞を用いた系において IgG リポソームを用いた癌免疫療法における有用性を評価した (Fig. 7)。OVA 封入 IgG リポソームを作用させた DC をマウスに免疫後、E.G7-OVA 細胞を皮内移植し、その腫瘍体積を指標に抗腫瘍効果を検討した。その結果、DC のみを免疫した群、OVA のみを作用させた DC を免疫した群では、顕著な抗腫瘍効果は認められなかった。一方、OVA 封入 Bare リポソームを作用させた DC を免疫した群において若干の抗腫瘍効果が認められた。さらに、OVA 封入 IgG リポソームを作用させた DC を免疫した群では、全例において腫瘍の生着が完全に阻害された。なお、抗原未封入 IgG リポソームを作用させた DC を免疫しても抗腫瘍効果がほとんど認められなかったことより、OVA 封入 IgG リポソームを用いた際の抗腫瘍効果は内封した OVA に対する抗原特異的 CTL 誘導に起因するも

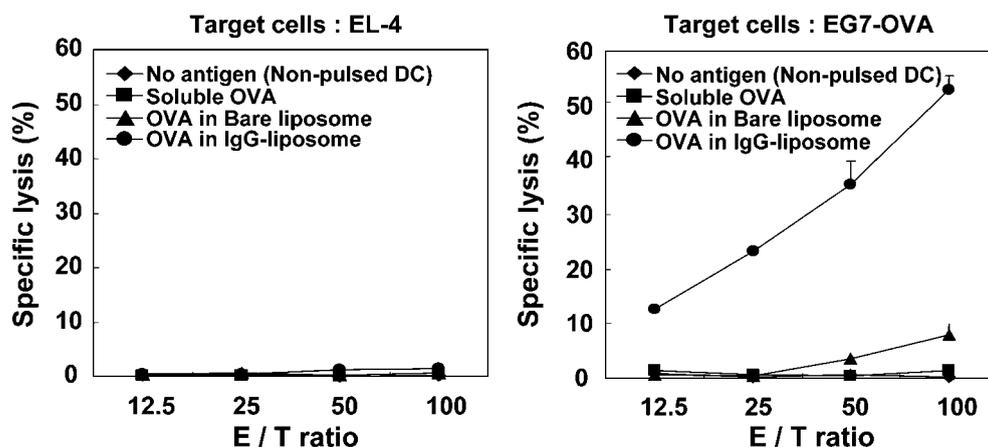


Fig. 6. Immunization with DCs That Endocytosed OVA-IgG-liposomes Efficiently Induces OVA-specific CTL Responses in Mice

C57BL/6 mice were immunized intradermally twice at a 7 day interval with 1×10^6 DCs pulsed with the different forms of OVA at a concentration of $15 \mu\text{g/ml}$ in media. Seven days after the second immunization, splenocytes were isolated and restimulated with E.G7-OVA cells for 5 days, and cytotoxic activity was examined using ^{51}Cr -labeled EL-4 or E.G7-OVA cells as targets. The data shown are representative of three experiments.

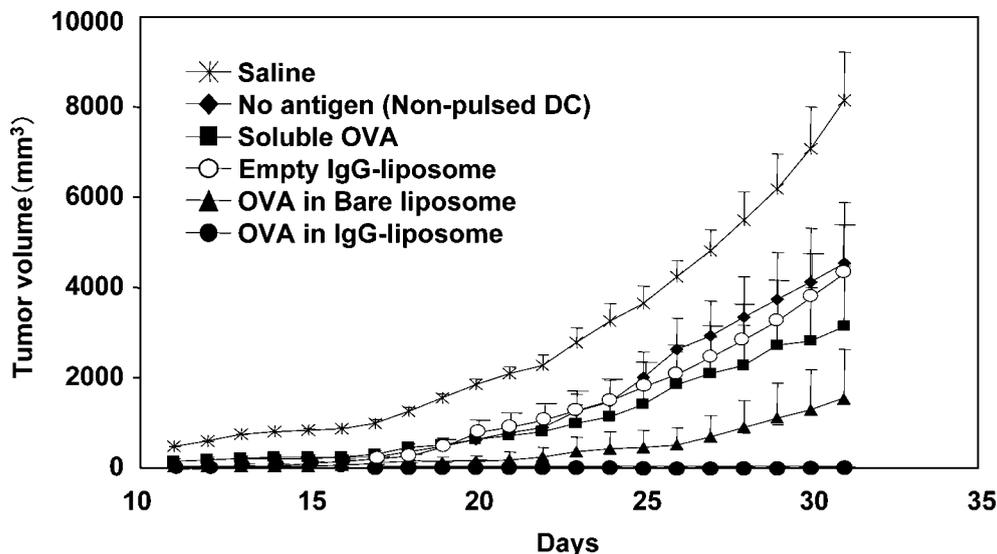


Fig. 7. Immunization with DCs That Endocytosed OVA-IgG-liposomes Efficiently Prevents Tumor Growth

C57BL/6 mice were immunized intradermally twice at a 7 day interval with 1×10^6 DCs pulsed with the different forms of OVA at a concentration of $15 \mu\text{g/ml}$ in media. Seven days after the second immunization, 1×10^6 E.G7-OVA cells were injected intradermally. The tumor volume was monitored thereafter. Error bars indicate S.D. The data shown are representative of three experiments.

のと考えられた。

癌免疫療法の最大の利点は、免疫記憶が誘導されて癌の再発・転移を抑制できる点にある。そこで上述の検討にて腫瘍の完全生着抑制が認められた OVA 封入 IgG リポソーム作用 DC 免疫群を用い、最初の E.G7-OVA 細胞移植から 4 ヶ月後に E.G7-OVA 細胞を再移植による腫瘍形成率を指標に免疫記憶について検討した。その結果、E.G7-OVA 細胞の再移植にも係わらず、すべてのマウスにおいて腫瘍の生着は完全に抑制された。これは、これらのマウスにおいて E.G7-OVA 細胞に対する免疫記憶が成立していることに起因すると考えられた。それゆえ、IgG リポソームを用いた癌免疫療法により、癌の再発予防も可能になると期待された。

5. おわりに

癌免疫療法において癌関連抗原の免疫方法として抗原を生体にそのまま免疫する方法と、体外に取り出した DC に抗原を作用させ生体に DC を免疫する *ex vivo* 法が考えられる。最近、この 2 種類の方法について、Fc レセプターを介して抗原送達する場合の抗腫瘍免疫誘導能に関するデータが報告された。²²⁾ これによると、*ex vivo* 法の方が抗腫瘍免疫誘導には有効であるとのことであった。この *ex vivo* 法による DC 免疫の場合、抗原をそのまま外来性抗原として DC にいくら作用させても効率よく

MHC クラス I へのクロスプレゼンテーションを誘導できない。当然、その DC を免疫しても抗原特異的な CTL が誘導されず、抗腫瘍効果は得られない。それゆえ、本稿で示したような抗原送達キャリアー開発が急務とされる。われわれは様々な癌種に対して利用可能なキャリアー開発を念頭に、抗原送達キャリアーとして種々の抗原を容易に封入可能な IgG リポソームを選択した。このリポソームは DC 上の Fc レセプターを介して取り込まれ、内封した抗原を効率よく MHC クラス I に抗原提示誘導し、抗原特異的な CTL を誘導可能であった。このように IgG リポソームは非常に効果的な抗原送達キャリアーであることが証明された。²³⁾ 今回は OVA を用いたモデル腫瘍の系のみを示したが、現在、IgG リポソームにマウスメラノーマに対する抗原を封入し、メラノーマに対する癌免疫療法について検討している。

これまでの IgG リポソームに関する研究において、われわれは抗原封入 IgG 修飾リポソームの DC を用いた癌免疫療法における有用性を示すことができた。²³⁾ しかしながら、IgG リポソームによる DC におけるクロスプレゼンテーション誘導メカニズムなどについては不明な点も多く、さらなる研究が必要であると考えられる。一方、詳細なメカニズム解明が残されてはいるものの、既存の抗癌剤治療や放

射線療法などと比べ、癌免疫療法は副作用が少なく転移や再発予防にも応用可能であるため、今後益々癌免疫療法への期待は高まっていくものと考えられる。いずれにしても、抗原送達キャリアーとしてのIgG リポソームの癌免疫療法への応用が、今後の癌治療に貢献することを期待したい。

謝辞 CD8OVA1.3 細胞をご供与いただいた Dr. C. V. Harding (Department of Pathology, Case Western Reserve University) に深謝いたします。

REFERENCES

- 1) Van der Bruggen P., Traversari C., Chomez P., Lurquin C., De Plaen E., Van den Eynde B., Knuth A., Boon T., *Science*, **254**, 1643–1647 (1991).
- 2) Boel P., Wildmann C., Sensi M. L., Brasseur R., Renauld J. C., Coulie P., Boon T., van der Bruggen P., *Immunity*, **2**, 167–175 (1995).
- 3) Van den Eynde B., Peeters O., De Backer O., Gaugler B., Lucas S., Boon T., *J. Exp. Med.*, **182**, 689–698 (1995).
- 4) Wolfel T., Van Pel A., Brichard V., Schneider J., Seliger B., Meyer zum Buschenfelde K. H., Boon T., *Eur. J. Immunol.*, **24**, 759–764 (1994).
- 5) Kawakami Y., Eliyahu S., Sakaguchi K., Robbins P. F., Rivoltini L., Yannelli J. R., Appella E., Rosenberg S. A., *J. Exp. Med.*, **180**, 347–352 (1994).
- 6) Germain R. N., *Cell*, **76**, 287–299 (1994).
- 7) Regnault A., Lankar D., Lacabanne V., Rodriguez A., Thery C., Rescigno M., Saito T., Verbeek S., Bonnerot C., Ricciardi-Castagnoli P., Amigorena S., *J. Exp. Med.*, **189**, 371–380 (1999).
- 8) Schuurhuis D. H., Ioan-Facsinay A., Nagelkerken B., van Schip J. J., Sedlik C., Melief C. J., Verbeek J. S., Ossendorp F., *J. Immunol.*, **168**, 2240–2246 (2002).
- 9) Rodriguez A., Regnault A., Kleijmeer M., Ricciardi-Castagnoli P., Amigorena S., *Nat. Cell Biol.*, **1**, 362–368 (1999).
- 10) Yanagie H., Ogura K., Takagi K., Maruyama K., Matsumoto T., Sakurai Y., Skvarc J., Illic R., Kuhne G., Hisa T., Yoshizaki I., Kono K., Furuya Y., Sugiyama H., Kobayashi H., Ono K., Nakagawa K., Eriguchi M., *Appl. Radiat. Isot.*, **61**, 639–646 (2004).
- 11) Inuma H., Maruyama K., Okinaga K., Sasaki K., Sekine T., Ishida O., Ogiwara N., Johkura K., Yonemura Y., *Int. J. Cancer*, **99**, 130–137 (2002).
- 12) Kakudo T., Chaki S., Futaki S., Nakase I., Akaji K., Kawakami T., Maruyama K., Kamiya H., Harashima H., *Biochemistry*, **43**, 5618–5628 (2004).
- 13) Ishida O., Maruyama K., Tanahashi H., Iwatsuru M., Sasaki K., Eriguchi M., Yanagie H., *Pharm. Res.*, **18**, 1042–1048 (2001).
- 14) Maruyama K., Ishida O., Takizawa T., Moribe K., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **40**, 89–102 (1999).
- 15) Harata M., Soda Y., Tani K., Ooi J., Takizawa T., Chen M., Bai Y., Izawa K., Kobayashi S., Tomonari A., Nagamura F., Takahashi S., Uchimarui K., Iseki T., Tsuji T., Takahashi T. A., Sugita K., Nakazawa S., Tojo A., Maruyama K., Asano S., *Blood*, **104**, 1442–1449 (2004).
- 16) Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C., *J. Mol. Biol.*, **13**, 238–252 (1965).
- 17) Szoka Jr. F., Papahadjopoulos D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4194–4198 (1978).
- 18) Brunner J., Skrabal P., Hauser H., *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 322–331 (1976).
- 19) Batzri S., Korn E. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 1015–1019 (1973).
- 20) Allen T. M., Brandeis E., Hansen C. B., Kao G. Y., Zalipsky S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1237**, 99–108 (1995).
- 21) Pfeifer J. D., Wick M. J., Roberts R. L., Findlay K., Normark S. J., Harding C. V., *Nature*, **361**, 359–362 (1993).
- 22) Schuurhuis D. H., van Montfoort N., Ioan-Facsinay A., Jiawan R., Camps M., Nouta J., Melief C. J., Verbeek J. S., Ossendorp F., *J. Immunol.*, **176**, 4573–4580 (2006).
- 23) Kawamura K., Kadowaki N., Suzuki R., Udagawa S., Kasaoka S., Utoguchi N., Kitawaki T., Sugimoto N., Okada N., Maruyama K., Uchiyama T., *J. Immunother.*, **29**, 165–174 (2006).