図1 γ PGA NPの合成法

- A: γ PGAとLフェニルアラニンエチルエステル(L-Phe)を混合し、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, hydrochloride (WSC)による縮合反応によって両親媒性の γ PGA-Pheを合成する。
- B: 合成した γ PGA-Pheをジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、抗原水溶液と混合することで双方が自己集合を起こし、最終的に直径250nm程度の均一な抗原内包 γ PGA NPが形成される。

さらには γ PGA NPに内包された抗原は、本来MHCクラスIIに提示されるべき外来抗原でありながら、小胞体---エンドソーム融合小胞(ER-endosome fusion)を介して、MHCクラスI経路へと効率よく提示される(クロスプレゼンテーションを受ける)という大変興味深い性質を有することがわかってきた¹⁴⁾。本総説では、この癌ワクチンキャリアとして有望な γ PGA NPに焦点を絞り、その特徴ならびに有用性を、最新の知見を交えながら概説させていただく。

γ PGA NP

γ PGAは納豆菌粘着物質由来の生分解性バイオポリマーであり、食品添加物や化粧品成分(保湿剤)として使用されるなど人体への安全性に優れた製剤素材である。Akagiらは、この γ PGAの α 位カルボキシル基にフェニルアラニンエチルエステル(L-Phe)を脱水縮合させた誘導体(γ PGA-Phe)が、その両親媒性により、蛋白質溶液に分散させるだけで自己集積型ナノ粒子(γ PGA NP)を形成し、

非常に高い封入効率(約50%)で蛋白質を内包可能であることを報告している¹⁵⁾(図1)。また、この γ PGA-Pheを用い同一の条件で粒子作製を行えば、簡便かつ再現よく直径約250nmの γ PGA NPを調製可能である。前述のとおり、著者らは、APCがサブミクロンサイズの微粒子を効率よく貪食するという性質に着目し、 γ PGA NPがin vivo, in vitroにおいて、APCに抗原を高効率に取り込ませるための優れた抗原送達キャリアであることを実証してきた¹⁶⁾。

γ PGA NPの癌ワクチンへの応用

前述のとおり、癌ワクチンの薬効には、①APCへのTAAの効率的な送達、②MHCクラスIへの効率的な提示、③腫瘍特異的なCTLの効率的な誘導、の3つのステップが重要となる。これまでの検討で著者らは、抗原内包 γ PGA NPが、①APCに積極的に取り込まれ、②CTLの感作・活性化に必須のMHCクラスI分子上に効率よく抗原を提示され、③現存する最強のアジュバントである

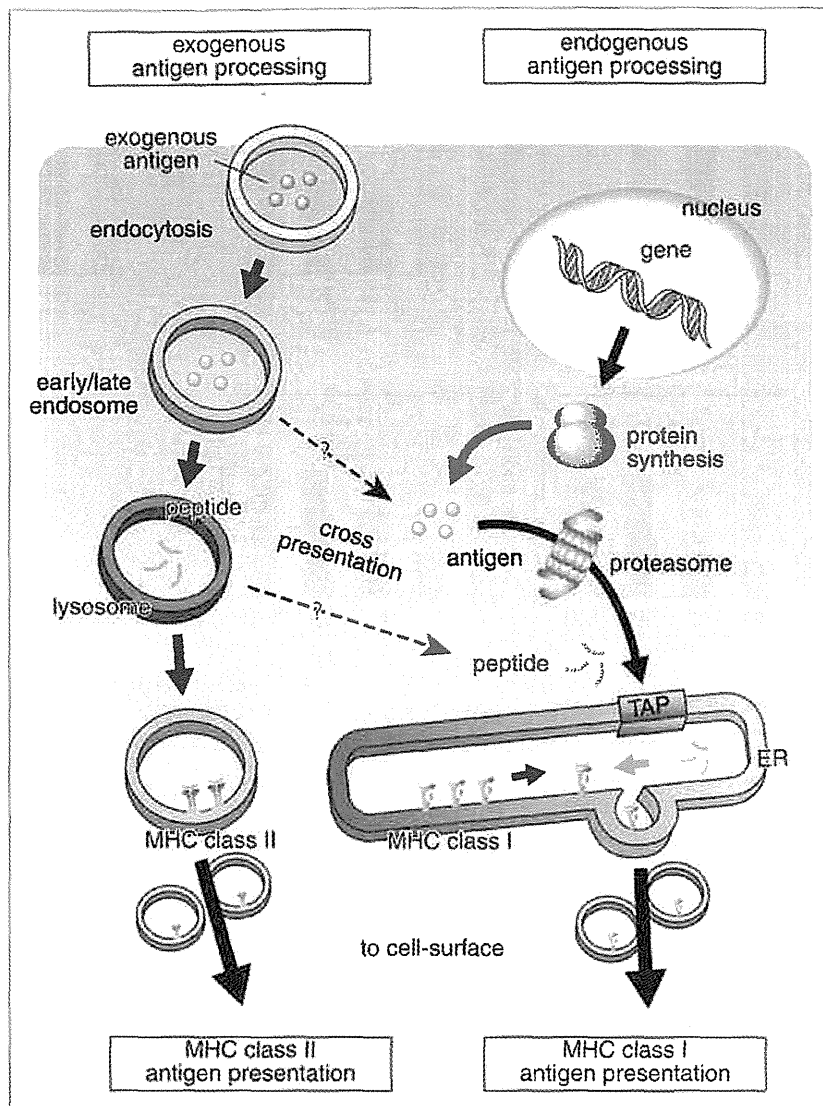


図2 古典的な抗原提示経路

通常、外来抗原はエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた後、リソソーム内の消化酵素で分解を受け、MHCクラスII上に提示される。一方、内在性抗原は細胞内で合成された後に細胞質中のプロテアソームによる分解を受け、分解されたペプチドは主にTAPを介して小胞体へと移行する。小胞体でMHCクラスIと出会った後に、MHCクラスI上に提示される。近年、外来性抗原にもかかわらず、MHCクラスIへと提示されるクロスプレゼンテーション経路が報告され、ワクチンキャリアの設計においても大きな注目を集めている。

フロイント完全アジュバント(CFA)に匹敵する高い抗腫瘍効果と、ヒトでの臨床試験にも用いられているフロイント不完全アジュバント(IFA)²⁰⁾にも勝る安全性を兼ね備えた、優れた抗原送達キャリアであることを見出している¹⁸⁾。

この γ PGA NPの特筆すべき点は、一般の抗原送達キャリアとは異なり、MHCクラスI抗原提示を強力に誘導可能な点にある¹⁸⁾。一般に、MHC

クラスI分子上へと提示されるのは細胞質内のプロテアソームで分解される内在性の抗原²¹⁾であり、細胞外からAPCへと感作された抗原は、一般的にエンドサイトーシスにより細胞内へと取り込まれ、細胞質を介すことなくリソソームでの分解を経てMHCクラスII分子上へと提示される²²⁾(図2)。したがって、ワクチンキャリアによって細胞外からAPCに抗原を送達する場合、強力

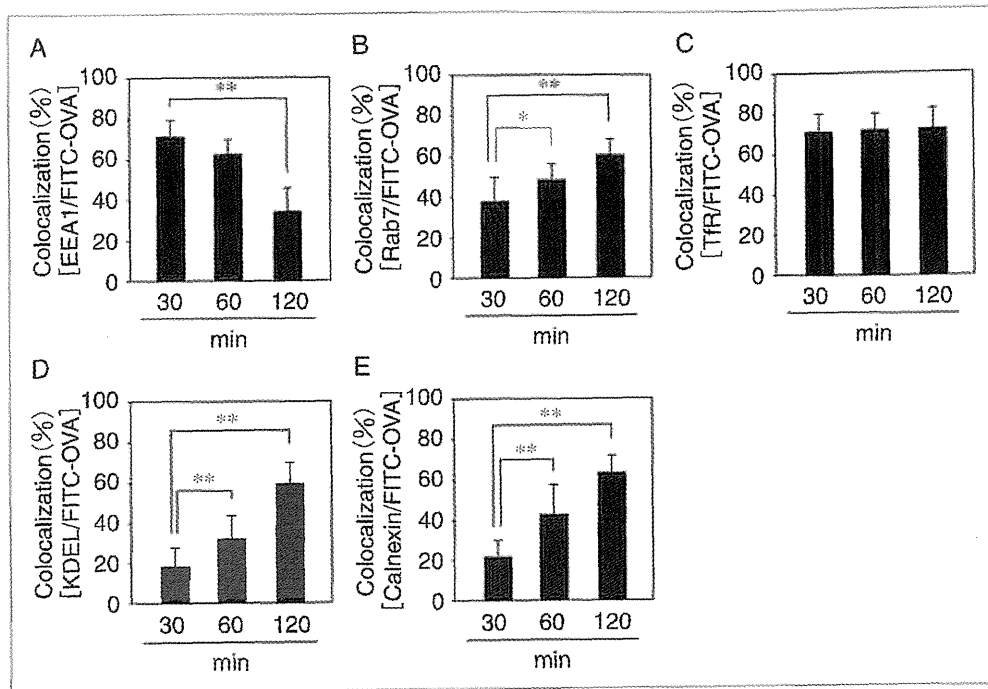


図3 免疫蛍光染色による蛍光標識抗原の細胞内動態解析

モデル抗原としてfluorescein isothiocyanateで標識したovalbumin (FITC-OVA)を用い、FITC-OVA内包 γ PGA NPを作製した。これをin vitroでDCに感作し、30分、60分、120分後に細胞を固定し、各種オルガネラマーカー特異抗体を1次抗体(A~E)に、Alexa595標識抗体を2次抗体にした免疫蛍光染色により、抗原の細胞内局在を評価した。各オルガネラへの局在は、少なくとも100細胞の画像データをBioImageXD image analysis software²⁷⁾により解析・定量した。Early Endosome Antigen 1 (EEA1: 初期エンドソームマーカー) (A), Rab7, member RAS oncogene family [Rab7: 後期(一部初期)エンドソームマーカー] (B), トランスフェリンレセプター (TIR: 初期およびリサイクリングエンドソームマーカー) (C), KDEL(小胞体マーカー) (D), Calnexin(小胞体マーカー) (E)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (文献¹⁴⁾より引用改変)

なMHCクラスI抗原提示を必要とするCTL誘導は困難であることが予想され、本問題は、抗原送達キャリア開発における克服すべき課題となっていた²⁰⁾。この点著者らは、 γ PGA NPに内包された抗原が、外来性抗原でありながらMHCクラスI分子上へと効率的に提示される(クロスプレゼンテーションされる)ことを見出した¹⁷⁾¹⁸⁾。そこで著者らは、この γ PGA NPが有するユニークな特性を今後の癌ワクチンキャリアの合理的設計に生かすべく、 γ PGA NPによるクロスプレゼンテーション誘導メカニズムの解析を試みた。

細胞内への侵入と抗原のプロセッシング

抗腫瘍ワクチンキャリアによる腫瘍免疫誘導の第一段階は、APC内への抗原到達である。キャリアによるAPC内への抗原移行効率が高いほど、より効率のよい腫瘍免疫誘導が期待できる。こ

れまでに著者らは、抗原内包 γ PGA NPは、アレルギー依存的なエンドサイトーシスでAPC内に高効率に取り込まれることを明らかとしている¹⁴⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。

γ PGA NPに内包された抗原は、エンドサイトーシスで取り込まれた後どのような経路で分解される(プロセッシングを受ける)のであろうか。前述のとおり、古典的な抗原提示経路では、内在性抗原はプロテアソームで、外来性抗原はリソソームで分解され、それぞれ、MHCクラスI、クラスIIと、異なる経路での抗原提示を受ける²¹⁾²²⁾。 γ PGA NPに内包した抗原がどの経路を介してMHCクラスIへとクロスプレゼンテーションされるのかを評価する目的で、抗原内包 γ PGA NPをAPCの一つである樹状細胞(DC)に感作し、プロテアソーム阻害剤(MG-132およびepoxomicin)あるいはリソソーム系酵素阻害剤(leupeptin)共

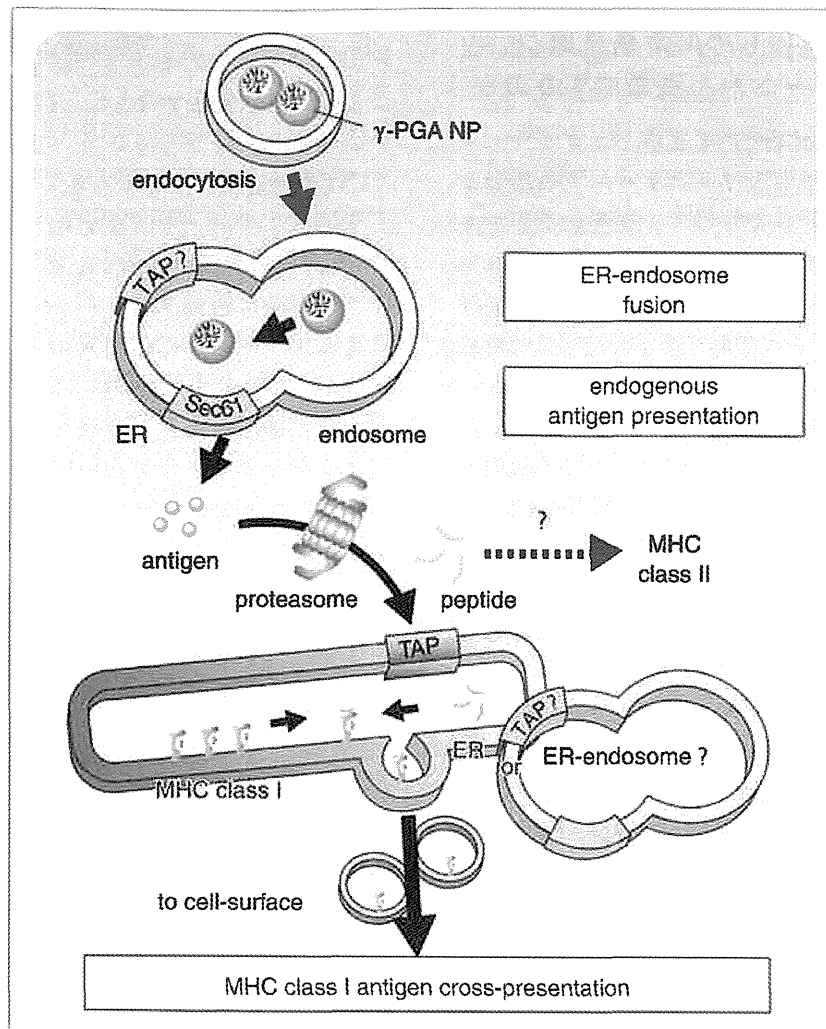


図4 γ PGA NPによるクロスプレゼンテーションの予想メカニズム
 γ PGA NPに内包された抗原は、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた後に、小胞体様性質を有するエンドソーム画分(ER-endosome fusion)に局在する。その後、抗原は小胞体のトランスロコンであるSec61を介して細胞質中へと放出され、古典的な内在性抗原の提示経路に従い、プロテアソームでの分解、TAP依存的な小胞体(あるいはER-endosome fusion)への移行を経て、MHCクラスI上に提示されるものと予想される。
 (文献¹⁴⁾より引用改変)

存化でのMHCクラスI抗原提示を評価した¹⁴⁾。その結果、興味深いことに γ PGA NPに内包された抗原のMHCクラスI提示は、リソソーム系酵素阻害剤では阻害されず、両プロテアソーム阻害剤で有意に阻害され、 γ PGA NPによるクロスプレゼンテーションにはプロテアソームが関与することが判明した。プロテアソームにより分解された抗原由来ペプチドは、小胞体に存在する transporter associated with antigen processing (TAP)によって小胞体内へと輸送される経路が一般的であるため、次にTAP^(-/-)マウスから回収

したTAP欠損DCを用いた同様の抗原提示アッセイを行った。その結果、TAP欠損DCでは γ PGA NPに内包された抗原のMHCクラスI提示は起こらず、抗原はプロテアソームで分解を受けた後にTAPを介して小胞体へと輸送される可能性が示唆された¹⁴⁾。以上の結果は、 γ PGA NPに内包された抗原がエンドサイトーシスで取り込まれた後、なんらかの形で細胞質内のプロテアソームに到達し、TAP依存的なMHCクラスI抗原提示経路に至ることを示している。

どのようにして外来抗原が プロテアソームへと到達するのか

γ PGA NPに内包された抗原が、エンドソームからどのようにしてプロテアソームへ到達するのかを明らかにする目的で、蛍光標識抗原を内包した γ PGA NPをDCに感作させ、30, 60, 120分後の抗原の細胞内動態を免疫蛍光染色法により評価した¹⁴⁾。その結果、蛍光標識抗原の細胞内での局在は、時間経過とともに初期エンドソームマーカーであるEEA1+のエンドソームから、後期(一部初期)エンドソームマーカーであるRab7+のエンドソームへと移行していた(図3-A, B)。また、蛍光標識抗原はすべての時間において、初期・リサイクリングエンドソームマーカーであるトランスフェリンレセプターと共局在していたことから、この抗原を内包するエンドソームは120分後においても初期エンドソーム用の性質を有していることが示唆された(図3-C)。一方、興味深いことに、蛍光標識抗原と小胞体マーカー(KDEL, Calnexin)の共局在の割合は、時間経過に伴って増大していることが判明した(図3-D, E)。これは、 γ PGA NP内包抗原がエンドソームに局在しながら、そのエンドソームが徐々に小胞体の性質を獲得する、ER-endosome fusionを形成していることを示唆している。次に、このER-endosome fusionからの抗原の脱出機構を調べる目的で、小胞体のトランスロコンであるSec61の阻害剤共存下で抗原内包 γ PGA NPをDCに感作したところ、そのMHCクラスI抗原提示は有意に阻害された。以上の結果は、 γ PGA NP内包抗原は、細胞内へとエンドサイトーシスで取り込まれた後にER-endosome fusionに局在し、そこに存在するSec61を介して細胞質中へと脱出し、古典的な内在性抗原の提示経路(MHCクラスI上へのクロスプレゼンテーション)を受けられる可能性を示唆している(図4)。

おわりに

ER-endosome fusionは、マイクロサイズの粒子を取り込んだエンドソームにおいて2002年にはじめて発見された現象であり²⁰⁾、以来、そのMHCクラスIへのクロスプレゼンテーション経

路の一つとして認知されている²⁵⁾²⁶⁾。今回、著者らは、ワクチンキャリアとしての γ PGA NPが、この興味深い経路を介して、高効率なMHCクラスIへのクロスプレゼンテーション、それに伴うCTLの活性化、高い抗腫瘍効果を達成しうることを示してきた。残念ながら現在のところ、なぜ γ PGA NPがER-endosome fusionを高効率に形成し得たかは解明されておらず、今後、さまざまな粒子径の γ PGA NPや異なる素材のナノ粒子でのより詳細な基礎的研究が必須となるだろう。それらの検討を通じて得られた知見は、今後のワクチンキャリアの合理的設計に有益な情報をもたらす、次世代の癌ワクチン療法の進展に大きく貢献することが期待できる。

文 献

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部. 平成23年人口動態統計. 2012.
- 2) Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* 2010 ; 28 : 917.
- 3) Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010 ; 363 : 411.
- 4) Nakamura Y. Cancer vaccines. *Clin Adv Hematol Oncol* 2011 ; 9 : 778.
- 5) Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy : moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004 ; 10 : 909.
- 6) Urban JL, Schreiber H. Tumor antigens. *Annu Rev Immunol* 1992 ; 10 : 617.
- 7) Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, et al. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 1993 ; 361 : 359.
- 8) O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 2003 ; 2 : 727.
- 9) Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm Res* 2002 ; 19 : 715.
- 10) Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol* 2003 ; 33 : 469.
- 11) Akagi T, Higashi M, Kaneko T, et al. Hydrolytic and enzymatic degradation of nanoparticles based on

- amphiphilic poly(γ -glutamic acid)-graft-L-phenylalanine copolymers. *Biomacromolecules* 2006 ; 7 : 297.
- 12) Akagi T, Kaneko T, Kida T, Akashi M. Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on poly(γ -glutamic acid) with L-phenylalanine as a protein carrier. *J Control Release* 2005 ; 108 : 226.
 - 13) Akagi T, Higashi M, Kaneko T, et al. In vitro enzymatic degradation of nanoparticles prepared from hydrophobically-modified poly(γ -glutamic acid). *Macromol Biosci* 2005 ; 5 : 598.
 - 14) Mukai Y, Yoshinaga T, Yoshikawa M, et al. Induction of endoplasmic reticulum-endosome fusion for antigen cross-presentation induced by poly (γ -glutamic acid) nanoparticles. *J Immunol* 2011 ; 187 : 6249.
 - 15) Matsuo K, Koizumi H, Akashi M, et al. Intranasal immunization with poly (γ -glutamic acid) nanoparticles entrapping antigenic proteins can induce potent tumor immunity. *J Control Release* 2011 ; 152 : 310.
 - 16) Matsuo K, Ishii Y, Yoshinaga T, et al. The utility of poly(γ -glutamic acid) nanoparticles as antigen delivery carriers in dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Biol Pharm Bull* 2010 ; 33 : 2003.
 - 17) Yoshikawa T, Okada N, Oda A, et al. Development of amphiphilic γ -PGA-nanoparticle based tumor vaccine : potential of the nanoparticulate cytosolic protein delivery carrier. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 ; 366 : 408.
 - 18) Yoshikawa T, Okada N, Oda A, et al. Nanoparticles built by self-assembly of amphiphilic γ -PGA can deliver antigens to antigen-presenting cells with high efficiency : a new tumor-vaccine carrier for eliciting effector T cells. *Vaccine* 2008 ; 26 : 1303.
 - 19) Matsuo K, Yoshikawa T, Oda A, et al. Efficient generation of antigen-specific cellular immunity by vaccination with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles entrapping endoplasmic reticulum-targeted peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 ; 362 : 1069.
 - 20) Wang F, Bade E, Kuniyoshi C, et al. Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 2756.
 - 21) Zhou F, Huang L. Delivery of protein antigen to the major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation pathway. *J Drug Target* 1995 ; 3 : 91.
 - 22) Watts C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 1997 ; 15 : 821.
 - 23) Lanzavecchia A. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol* 1996 ; 8 : 348.
 - 24) Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, et al. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 2002 ; 110 : 119.
 - 25) Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, et al. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 2003 ; 425 : 397.
 - 26) Houde M, Bertholet S, Gagnon E, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 2003 ; 425 : 402.
 - 27) Kankaanpaa P, Paavolainen L, Tiitta S, et al. BioImageXD : an open, general-purpose and high-throughput image-processing platform. *Nat Methods* 2012 ; 9 : 683.

* * *

