



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	樹状細胞への効率的なsiRNA導入を実現する新規ナノキャリアの開発及び樹状細胞療法への展開
Author(s)	藁科, 翔太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第11853号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11853
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59223
Type	doctoral thesis
File Information	Shota_Warashina.pdf



学位論文

樹状細胞への効率的な siRNA 導入を
実現する新規ナノキャリアの開発
及び樹状細胞療法への展開

藁科 翔太

北海道大学大学院生命科学院

2015 年 3 月

【目次】

略語	6
序章	9
第一章	15
R8/GALA-MEND _{SUV} を用いた免疫抑制性因子 A20 ノックダウン	
1-1	R8/GALA-MEND _{SUV} の調製
1-2	R8/GALA-MEND _{SUV} のトランスフェクションによる A20 のノックダウン
1-3	R8/GALA-MEND _{SUV} の毒性評価
1-4	A20 をノックダウンした BMDC の TNF- α 産生評価
1-5	A20 をノックダウンした BMDC の共刺激分子発現評価
1-6	A20 ノックダウン BMDC の投与による予防的な抗腫瘍活性の評価
第一章 小括	
第二章	27
新規非ウイルスキャリア YSK12-MEND の開発	
2-1	YSK12-MEND の調製
2-2	siRNA 導入活性の比較
2-3	YSK12-MEND の最適化
2-4	最適化した YSK12-MEND の siRNA 導入活性評価
2-5	YSK12-MEND の毒性評価
2-6	BMDC への取り込み過程の評価
2-7	エンドソーム脱出能の評価
2-8	siRNA 分離能の評価
2-9	Hemolysis assay による膜障害活性の評価
2-10	Cathepsin B 漏出の検出による膜障害活性評価
第二章 小括	
第三章	41
YSK12-MEND を用いた免疫抑制性因子ノックダウン及び DC 療法の効果増強	
3-1	SOCS1 ノックダウン評価
3-2	SOCS1 ノックダウン依存的な免疫機能活性化の評価

- 3-3 SOCS1 ノックダウン非依存的な免疫機能活性化の評価
- 3-4 SOCS1 ノックダウン BMDC の投与による予防的抗腫瘍活性の評価
- 3-5 SOCS1 ノックダウン BMDC の投与によるがん治療効果の評価
- 3-6 TGFβRII ノックダウン評価
- 3-7 TGFβRII ノックダウン BMDC の投与によるがん治療効果の評価

第三章 小括

総括・・・51

結語・・55

実験方法・・59

- 1 試薬・細胞・動物
- 2 機器
- 3 試薬調製
- 4 一般操作
- 5 第一章の実験
- 6 第二章の実験
- 7 第三章の実験
- 8 データ解析

参考文献・・73

謝辞・・81

【略語】

ATP:	adenosine triphosphate
BCA:	bicinchoninate
BMDC:	bone marrow- derived dendritic cell
BSA:	bovine serum albumin
CHEMS:	cholesteryl hemisuccinate
Chol:	cholesterol
Chol-GALA:	cholesteryl-GALA
CLR:	C-type lectin receptor
CLSM:	Confocal laser scanning microscopy
CPP:	cell penetrating peptide
CTL:	cytotoxic T lymphocyte
DC:	dendritic cell
DDS:	drug delivery system
DDW:	deionized distilled water
DEPC:	diethylpyrocarbonate
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO:	dimethylsulfoxide
DNA:	deoxyribonucleic acid
DODAP:	1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium-propane
DOPE:	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl ethanolamine
DOTAP:	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
EC ₅₀ :	half maximal effective concentration
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
EPC:	egg-phosphatidylcholine
FACS:	fluorescence activated cell sorting
FBS:	fetal bovine serum
g:	gravity
GAPDH:	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF:	granulocyte macrophage colony stimulating factor
HEPES:	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
h:	hour

IFN:	interferon
IKK:	I κ B kinase
IL:	interleukin
IRF:	interferon regulatory factor
JAK:	Janus kinase
LAK:	lymphokine activated killer
LFN:	Lipofectamine
LPS:	lipopolysaccharide
MDA5:	melanoma differentiation-associated gene 5
MEND:	multifunctional envelope-type nano devise
MHC:	major histocompatibility complex
min:	minute
mRNA:	messenger RNA
MW:	molecular weight
MyD88:	Myeloid differentiation primary response gene 88
NF- κ B:	nuclear factor kappa B
NK:	natural killer
NLR:	NOD-like receptor
NLRP3:	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
OVA:	ovalbumin
PA:	phosphatidic acid
PAMP:	pathogen-associated molecular pattern
PBS:	phosphate-buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PDI:	polydispersity index
PD-1:	Programmed cell death 1
PD-L1:	Programmed death-ligand 1
PEG:	polyethylene glycol
PEG2000-DMG:	1,2-dimyristoyl-sn-glycerol methoxy polyethylene glycol 2000
pH:	potential hydrogen
polyI:C:	polyinosinic:polycytidylic acid
POPE:	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
PRR:	pathogen-recognition receptor
QOL:	Quality of Life
qRT-PCR:	quantitative reverse transcription PCR
RISC:	RNA-induced silencing complex

RNA:	ribonucleic acid
RNAi:	RNA interfering
rpm:	round per minute
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
r.t.:	room temperature
R8:	octaarginine
RIG-I:	retinoic-acid-inducible protein 1
RLR:	RIG-I-like receptor
sec:	second
siRNA:	small interfering RNA
SR-B1:	Scavenger Receptor class B, type I
SOCS1:	Suppressor of Cytokine Signaling 1
STAT:	Signal Transducers and Activator of Transcription
STR:	stearylated
STR-R8:	stearyl-R8
SUV:	small unilamellar vesicle
TAA:	tumor associated antigen
TCR:	T cell receptor
TGF- β :	transforming growth factor beta
TGF β RII:	TGF beta receptor II
TIR:	Toll/Interleukin-1 receptor
TLR:	toll-like receptor
TNF- α :	tumor necrosis factor alpha
TRIF:	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TRAF6:	TNF receptor associated factor 6
ub:	Ubiquitin
WST-1:	Water Soluble Tetrazolium Salts 1

序章

【序章】

20 世紀から 21 世紀にかける医学の飛躍的な進歩によって、我が国における結核や肺炎等の感染症による死亡率は劇的に減少してきた。その一方、悪性新生物（がん）、脳卒中、心筋梗塞等の生活習慣病が死因の上位を占めるようになり、これらの疾患に対する対策を迫られている。特に、がんは我が国における死因のトップである状況が続いており（図 1）、2013 年（平成 25 年）においては約 36 万人が亡くなっている¹。このような状況を打開すべく、がんを治療するための様々な方法がこれまでに考案されてきた。抗がん剤等の分子医薬品を用いてがん細胞の分裂や転移を抑制する化学療法、外科的な手術により固形がんを除去する外科的治療、腫瘍が存在する箇所に放射線を照射しがんを治療する放射線療法の 3 つが、現在がん治療を行うために主に用いられている方法であり、三大療法と称されている²。しかしながら、三大療法を用いた場合でもがんの根絶が可能であるとは限らず、がん患者の体力により適用が不可能であることや、がん細胞以外の細胞を障害することによる副作用ががん患者の QOL（Quality of Life）を低下すること等が指摘されており、依然解決すべき問題が多い。

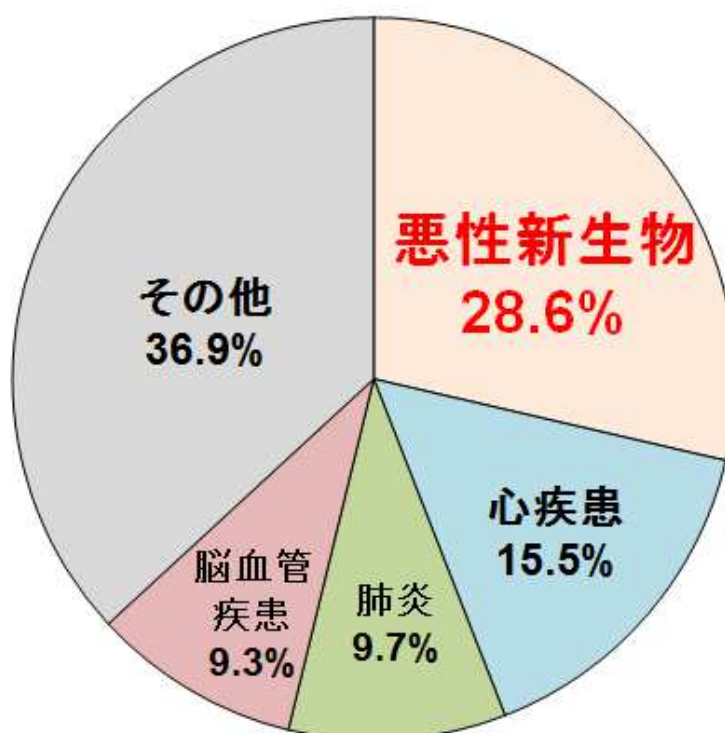


図 1 2013 年（平成 25 年）の我が国における死因
（厚生労働省の資料から作成）

近年、これらの三大療法に次ぐがん治療法として免疫療法が注目されている^{3, 4}。免疫療法は、免疫細胞を活性化させることでがん細胞に対する免疫応答を誘導する治療法である。がん患者自身の免疫細胞及び免疫系を利用するため、体外から薬物や外来刺激を加える従来のがん治療法と比較して生体に与える負の影響が少なく、新たながん治療法として期待されている。様々な免疫細胞を用いた免疫療法の研究が進められているが、細胞障害活性を有する CD8⁺ T 細胞、NK (natural killer) 細胞等の活性化を介しがん細胞を殺傷する方法が注目されている^{5, 6}。がん細胞は無限に増殖するように変異した過程で正常細胞には発現していない変異タンパク質を発現するようになるため、変異タンパク質由来の抗原 (TAA: tumor associated antigen) が MHC 分子上に提示されることで CD8⁺ T 細胞に非自己として認識され排除される⁷。また、あるがん細胞では MHC 分子を欠損しており CD8⁺ T 細胞への TAA の提示を回避しているが、そのような MHC 分子を欠損しているがん細胞は NK 細胞により排除される⁸。このように、正常細胞にはないがん細胞の特徴を目印として特異的に傷害する能力を有するため、これらの細胞を動員する免疫療法は副作用が少ない効果的ながん治療法であると考えられている。これらの細胞における細胞障害活性の機構はそれぞれ異なっており、実際にがん治療に用いるためには個々の細胞に合わせた活性化方法が必要である。例えば、CD8⁺ T 細胞の活性化には、抗原提示細胞による標的細胞に特異的な抗原及び共刺激分子の提示が必要であり、NK 細胞の活性化には、IFN (interferon) や IL (interleukin) による刺激が必要である^{9, 10}。先述した通り、個々の細胞障害活性の機構は異なっているため、同時に両者の細胞を活性化することにより相乗的な抗腫瘍活性を得ることができると期待される。

そのような強力な抗腫瘍活性を得るために、がん患者から樹状細胞 (dendritic cell: DC) を単離し、体外でアジュバントや TAA を用いて活性化させた後にがん患者に投与することでがんを治療する方法である樹状細胞療法 (DC 療法) が特に注目されている^{11, 12} (図 2)。DC は、1973 年に故 Ralph M. Steinman らによって名付けられ、DC を発見した功績から同氏は 2011 年のノーベル生理学・医学賞を受賞している。DC は数ある抗原提示細胞の中でも、最も強力に免疫反応を誘起する抗原提示細胞であり、ウイルスや細菌が保持している糖脂質や核酸等を認識するパターン認識受容体 (pathogen-recognition receptor: PRRs) を介した自然免疫系の活性化、取り込んだウイルス感染細胞やがん細胞、細菌等のペプチド断片の MHC 分子上への提示を介した獲得免疫系の活性化など、幅広い免疫反応を誘導することが可能である¹³。そのため、活性化した DC の投与により、自然免疫系を介した NK 細胞の活性化¹⁴、獲得免疫系を介した CD8⁺ T 細胞の活性化を誘導することが可能であると考えられ、複数の細胞障害機構の誘導による効果的ながん治療の実現が期待される。

DC 発見後に機能解析が進展することで、DC 内で伝達されるシグナル系や DC を取り囲む外部環境において、DC の免疫機能を抑制する因子が存在することが明らかとなった^{15, 16}。DC のような免疫細胞には、外来病原菌に対する免疫応答が過度に進行したり、自己組織・細胞に対する免疫応答が進行したりすることを防ぐために、免疫活性化シグナルを抑制的

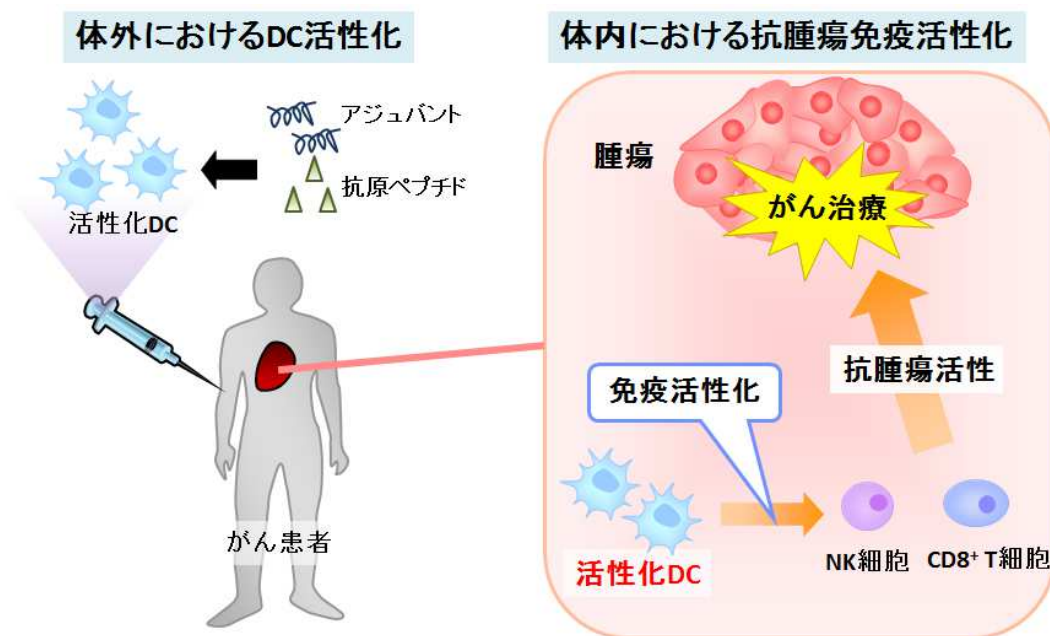


図2 樹状細胞療法の概念

に制御する因子が存在する^{17, 18}。また、腫瘍組織において、がん細胞が自らの増殖や転移に有利な環境を作り出していることが報告されており、腫瘍内に存在するがん細胞や線維芽細胞が産生する物質の作用により免疫細胞の免疫機能が抑制されていることも明らかとなった^{19, 20}。これらのDC内外の要因により、DC療法で用いられるDCの免疫機能が抑制され、期待通りの抗腫瘍活性が誘導されていない可能性が考えられた(図3)。

このような問題を解決するために、DCの免疫抑制性因子の機能を阻害することでDCの免疫機能の活性化や免疫抑制の解除を行うという戦略に基づいたがん免疫強化のための研究が盛んに行われている²¹。実際に、免疫細胞の細胞膜上に発現する免疫抑制性因子PD-1を標的とする抗体(Nivolumab)が、悪性黒色メラノーマに対して一定の治療効果を挙げている。免疫抑制的な因子やシグナルを阻害する手段としては、阻害剤を用いた免疫抑制性のシグナルを伝達する受容体の遮断、抗体を用いた免疫抑制性因子の中和等様々であるが²²、small interfering RNA (siRNA)を用いた免疫抑制因子のノックダウンが主要な方法の1つになっている。siRNAは20 bp前後の二本鎖RNAであり、細胞内においてRISC (RNA-induced silencing complex)に取り込まれることによって一本鎖となり、配列特異的に標的因子のmRNAを切断することでタンパク質への翻訳を阻害する^{23, 24}。siRNAは、細胞質に存在する限り半永久的にRNAi (RNA interference)を誘導し、標的遺伝子特異的なノックダウンであるため他の因子の発現に影響することは少なく、持続性や安全性の面で優れていると考えられており、研究・臨床等様々な場面で用いられている^{25, 26}。siRNAを発現するレンチウイルスを用いてDCの免疫抑制性因子をノックダウンすることにより、DCの免疫機能が活性化し抗腫瘍活性が増強したことから^{27, 28}、siRNAを用いたDCの免

免疫抑制性因子のノックダウンは、免疫抑制を解除することによる DC 療法の強化のための手法として期待されている。

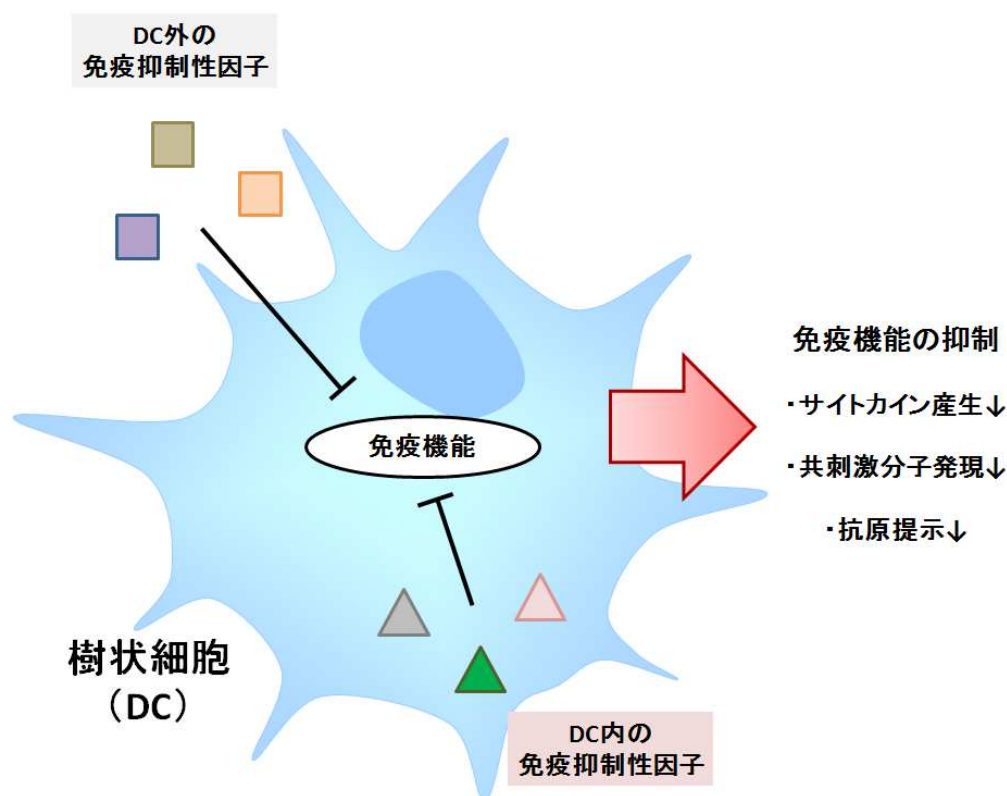


図3 免疫抑制性因子による DC の免疫機能低下

しかしながら、レンチウイルスのようなウイルスキャリアは安全性に問題があることが指摘されている^{29, 30}。1999 年、ペンシルバニア大学でのアデノウイルスキャリアを用いた遺伝子治療の第一相臨床試験において、遺伝子治療が原因と見られる初めての死亡例が報告された³¹。このため、ウイルスキャリアを用いる場合には、siRNA キャリアを医薬品として製剤化する際に安全性が問題となり、医薬品として認められない可能性が考えられる。そのため、DC へ siRNA を導入する手段として安全性の高い非ウイルスキャリアを選択する必要があるが、非ウイルスキャリアを用いた DC への siRNA 導入は非常に困難であることが知られており、siRNA を DC へ効率的に導入可能である非ウイルスキャリアの開発が、siRNA 医薬を DC 療法へ応用するために不可欠であると考えられている³²。

当研究室では、独自の非ウイルスキャリアである多機能性エンベロップ型ナノ構造体 (Multifunctional envelope-type nano device : MEND) の開発を進めている^{33, 34}。MEND は脂質膜で siRNA を被覆したエンベロップ型ウイルスを模倣した構造を有しており (図4)、脂質膜表面に様々な機能性素子を修飾することにより siRNA の体内・細胞内動態の制御が可能である。これまでに当研究室では、MEND を用いることで様々な組織・細胞への効率

的な siRNA 送達及び標的因子のノックダウンを達成しており^{35,36}、DC に対する siRNA 導入への応用も可能であると考えられた。

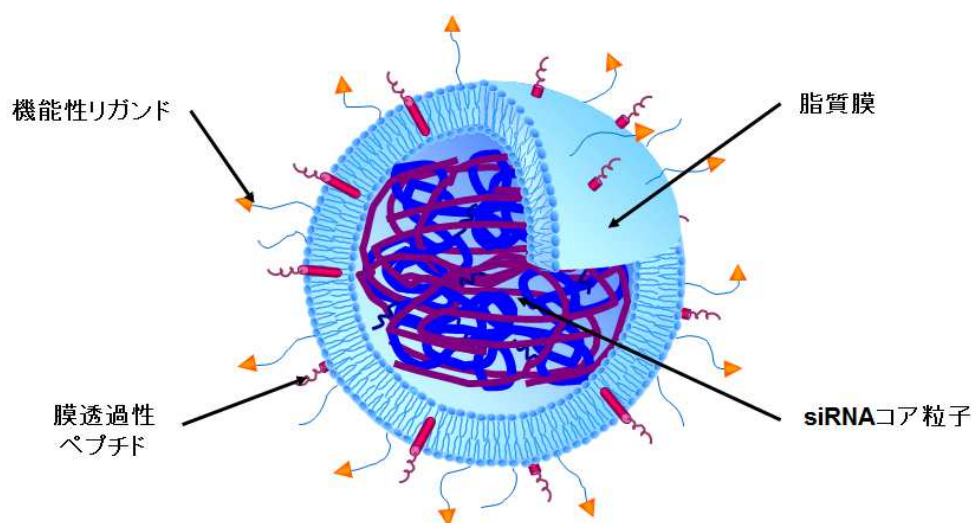


図4 多機能性エンベロープ型ナノ構造体（MEND）の模式図

MEND はエンベロープ型ウイルスを模倣した構造を有し、構造の最適化により siRNA の体内動態・細胞内動態を制御することで標的組織・細胞において効率的なノックダウンが可能である。

そのため本研究では、MEND を基盤技術として DC への効率的な siRNA 導入を可能とする新規非ウイルスキャリアを開発し、DC 療法の効果増強を目的とした免疫抑制性因子ノックダウン戦略の有用性を示すことを目指した。第一章では、siRNA 導入に特化した MEND である R8/GALA-MEND_{SUV} を用いて、免疫抑制性因子 A20 のノックダウンによる DC の免疫機能活性化及び活性化させた DC を用いた抗腫瘍活性の増強を試みた。第二章では、R8/GALA-MEND_{SUV} 以上の siRNA 導入活性を有する非ウイルスキャリアの開発を目指して新規合成脂質 YSK12 を含有する YSK12-MEND を構築し、DC における siRNA 導入活性及び細胞内動態の評価を試みた。第三章では、YSK12-MEND を用いて DC の免疫機能を制御する因子をノックダウンすることで、DC の免疫機能の増強による予防的な抗腫瘍活性及び生着したがんに対する治療効果を評価した。

第一章

**R8/GALA-MEND_{SUV} を用いた
免疫抑制性因子 A20 ノックダウン**

【第一章】

R8/GALA-MEND_{SUV} を用いた免疫抑制性因子 A20 ノックダウン

本章では、DC 療法の効果増強を目指して、R8/GALA-MEND_{SUV} を用いて DC 内に発現する免疫抑制性因子 A20 をノックダウンすることで、DC の免疫機能活性化及び抗腫瘍活性の増強を試みた。

当研究室では、目的別の様々な MEND の構築を試みてきた中で、siRNA 導入に特化したキャリアとして R8/GALA-MEND_{SUV} の開発に成功している (図 5)。R8/GALA-MEND_{SUV} は、siRNA コア粒子が脂質二重膜で被覆され、脂質膜にオクタアルギニン (R8) と、GALA を修飾した構造を有している。R8 は塩基性アミノ酸であるアルギニンが 8 つ連なった膜透過性ペプチド (cell penetrating peptide : CPP) であり、様々な物質に付加することにより効率的な細胞内導入を可能とする³⁸。Khalil らは、MEND のエンベロープ膜表面にステアリル化 R8 (STR-R8) を修飾した R8-MEND が、NIH3T3 細胞においてマクロピノサイトーシスを介して効率的に細胞内へ取り込まれることを明らかにしている^{39, 40}。GALA は、グルタミン酸-アラニン-ロイシン-アラニンの繰り返し配列からなるペプチドであり、生理的条件である中性 pH ではランダムコイル構造を有しているが、エンドソーム内環境の酸性 pH で疎水性の α -helix 構造を取ることで、膜への親和性が増大する^{41, 42}。この性質を利用することで、pH の低下に伴いリポソーム膜とエンドソーム膜の融合が誘起され、内封物質の細胞質への送達が促進される⁴³。さらに、従来型 MEND では多重膜であった脂質膜枚数を制御することで、細胞質において MEND から内封物の放出を促進する^{37, 44}。秋田らは、GALA 修飾と脂質膜枚数制御を施した R8/GALA-MEND_{SUV} が、HeLa-GL1 細胞において

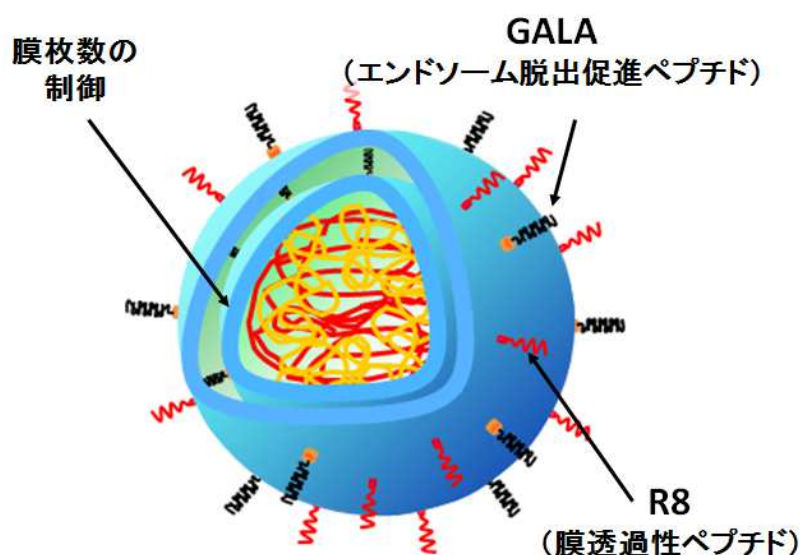


図 5 R8/GALA-MEND_{SUV} の模式図

R8/GALA-MEND_{SUV} は、エンドソーム膜からの脱出促進を目的として、脂質膜表面に R8 と GALA が修飾され、脂質膜枚数が制御された構造を有する。

優れたエンドソーム脱出能及び siRNA 放出能を示し、12 nM という低濃度で効率的な標的因子のノックダウンを誘起することを明らかとしている³⁷。これらのことから、R8/GALA-MEND_{SUV}を用いることにより DC への効率的な siRNA 導入が可能であると考えられた。

実際に秋田らは、siRNA 濃度を 80 nM まで増加させることで、DC においてサイトカインシグナル伝達のネガティブフィードバック因子として働く SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling 1) の約 70%のノックダウンを誘起した。さらに、SOCS1 ノックダウンにより DC の免疫機能を活性化し、SOCS1 をノックダウンした DC を投与することで予防的な抗腫瘍活性の増強に成功している^{37, 45}。しかしながら、生着したがんに対する治療効果は認められなかった。臨床における DC 療法は進行がんや外科手術後に残存したがん細胞を排除するために用いられる場合が多く⁴⁶、R8/GALA-MEND_{SUV}を用いた免疫抑制性因子ノックダウンによる DC 療法の増強戦略を実際に応用するためには、生着したがんに対する治療効果の発揮を可能とするさらなる検討が必要であることが示唆された。

そのため筆者は、R8/GALA-MEND_{SUV}を用いた標的因子ノックダウンによる DC のさらなる機能促進を目指し、新たな標的として toll-like receptor (TLR) 経路に着目した。DC には、外来病原菌やウイルスを認識して、これらの外敵に対する初期免疫応答である自然免疫を誘導する働きがある。ウイルスや微生物にはそれぞれに特徴的な分子構造である PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) が発現しており (図 6)、DC は PAMPs をパターン認識受容体 (PRRs) により認識し、DC 内にシグナルを伝達することで DC の

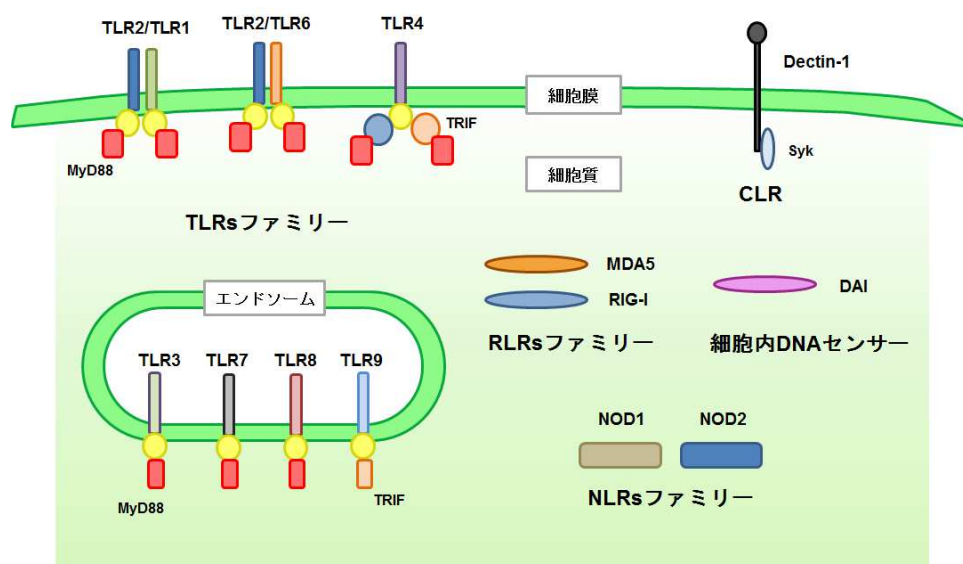


図 6 pathgen-associated molecular patterns (PRRs) の模式図

DC は、パターン認識受容体 (PRRs) を介して病原菌の構成分子のパターン (PAMPs) を認識し自然免疫系を活性化させる。PRRs は、細胞の様々な場所に存在し様々な PAMPs を認識する。TLR :toll-like receptor, CLR :C-type lectin receptor, RLR :RIG-I-like receptor, NLR :NOD-like receptor

免疫機能を活性化し、活性化した DC により炎症反応・補体系活性化・NK 細胞活性化といった自然免疫を誘導する⁴⁷⁻⁵⁰。近年、獲得免疫の誘導においても自然免疫の活性化が必要であるということが明らかになったことから、DC 療法において、広範囲の免疫応答を誘導するための手段として DC の PRRs を介した自然免疫の活性化が有効であると考えられており、盛んに研究が行われている^{51, 52}。PRRs の中でも、TLR に関する研究は特に進んでいる。TLR は、ヒトにおいて 10 種類のファミリーが存在しており、糖脂質成分や核酸、タンパク質などの多彩な PAMPs を認識し、免疫活性化シグナルを伝達する^{53, 54}。また、TLR の刺激により、自然免疫だけではなく細胞性免疫や体液性免疫といった獲得免疫等様々な免疫応答を誘導する⁵⁵。特に、序章で記述した通り、CD8⁺ T 細胞や NK 細胞を介した細胞性免疫はがん細胞に対して非常に有効であり、細胞性免疫の誘導ががん治療の成否に直結すると考えられている。これらのことから、DC 療法を増強する試みにおいて、TLR の PAMPs を用いた DC の免疫機能活性化が広く行われている⁵⁶。

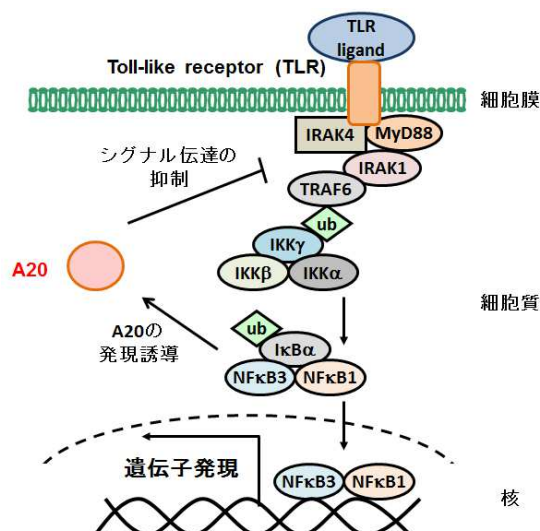


図7 TLR シグナル経路と A20 による負のフィードバック

TLR の下流にある TRAF6 はシグナル伝達の過程でユビキチン化され、ユビキチン化された TRAF6 は IKKβ のリン酸化と IKKγ のユビキチン化を誘導する。これらが NF-κB の活性化を促進し、標的遺伝子の発現を通して免疫応答を誘導する。A20 は、NF-κB の活性化により発現し、TRAF6 のユビキチン鎖を切断することで IKK、NF-κB の活性化を抑制し、TLR シグナル経路を負に制御する。

他の免疫調節シグナルと同様に、TLR シグナルにおいても伝達を制御する因子の存在が明らかとなっている。その中の 1 つである A20 は、1990 年に Vishva らによって TNF-α が誘導するタンパク質として発見され、その後の研究により NF-κB が活性化する経路において発現が誘導されることが明らかとなった (図 7)¹⁸。A20 は、脱ユビキチン化酵素活性を有する部位と 7 つの zinc-finger domain から構成されており、TLR シグナルにおいて TRAF6 の脱ユビキチン化により NF-κB の活性化を抑制することで TLR シグナル伝達を阻

害し、免疫細胞の免疫機能活性化を抑制する。レンチウイルスを用いて DC の A20 をノックダウンした報告において、TLR4 のリガンドである LPS により刺激した DC のサイトカイン産生や共刺激分子発現などの免疫機能活性化能が増強し、マウスへ A20 ノックダウン DC を投与することで生着したがんに対する顕著な治療効果が認められている²⁸。そのため、A20 ノックダウンに伴う TLR シグナルの増強は、TLR をアジュバントを用いて刺激・活性化を行う DC 療法において、さらなる効果増強を目指す上で有用な戦略であると考えられた。

本章では、非ウイルスキャリアである R8/GALA-MEND_{SUV} を用いて DC の A20 ノックダウンを行い、TLR4 のリガンドである LPS (Lipopolysaccharide) を用いて刺激した DC の免疫機能活性化及び DC 療法の効果増強を試みた。

1-1 R8/GALA-MEND_{SUV} の調製

まず、R8/GALA-MEND_{SUV} の調製を行った。R8/GALA-MEND_{SUV} は、siRNA とポリカチオン (STR-R8) の凝集体を SUV (small unilamellar vesicle) と混合し、最後に膜表面にステアリル化オクタアルギニン (STR-R8) を修飾することで調製した (図 8)。A20 に対する siRNA を搭載した R8/GALA-MEND_{SUV} の粒子径は 128 ± 10 nm、 ζ 電位は 31 ± 2 mV であった。一方、マウスの mRNA 配列を切断標的として認識しない Control siRNA を搭載した R8/GALA-MEND_{SUV} の粒子径は 147 ± 8 nm、 ζ 電位は 31 ± 4 mV であった。この結果から、これらの R8/GALA-MEND_{SUV} は、ほぼ同一の物性を持った粒子であると考えられる。

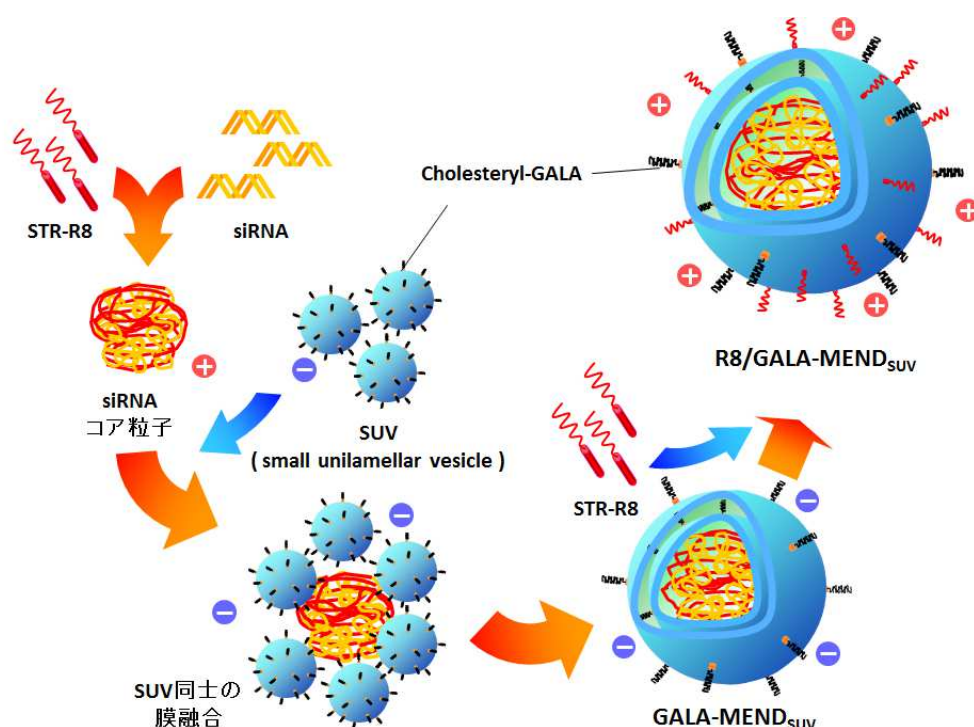


図 8 R8/GALA-MEND_{SUV} の調製

siRNA と STR-R8 を混合することで調製したコア粒子の周囲に SUV を用いて脂質膜を形成させ、最後に STR-R8 を膜表面に修飾することで R8/GALA-MEND_{SUV} を調製した。

1-2 R8/GALA-MEND_{SUV} のトランスフェクションによる A20 のノックダウン

続いて、R8/GALA-MEND_{SUV} のトランスフェクションによる A20 のノックダウンを試みた。本研究では、マウスの骨髄細胞から分化・誘導した樹状細胞である BMDC (bone marrow-derived dendritic cell) を用いた。A20 に対する siRNA、または Control siRNA を搭載した R8/GALA-MEND_{SUV} を BMDC へトランスフェクションし、6 時間後に TLR シグナルを活性化させるために LPS を添加した。その 24 時間後に BMDC を回収し、mRNA を定量的 RT-PCR により定量することで A20 のノックダウン効率を評価した。その結果、Control siRNA を搭載した R8/GALA-MEND_{SUV} をトランスフェクションした場合と比較

して、A20 に対する siRNA を搭載した R8/GALA-MEND_{SUV} をトランスフェクションすることで A20 の有意なノックダウンが認められた (図 9)。siRNA 濃度が 80 nM の場合において、約 40 % の A20 のノックダウンが確認された。このことから、R8/GALA-MEND_{SUV} は A20 もノックダウンすることが可能な非ウイルスキャリアであることが示唆された。

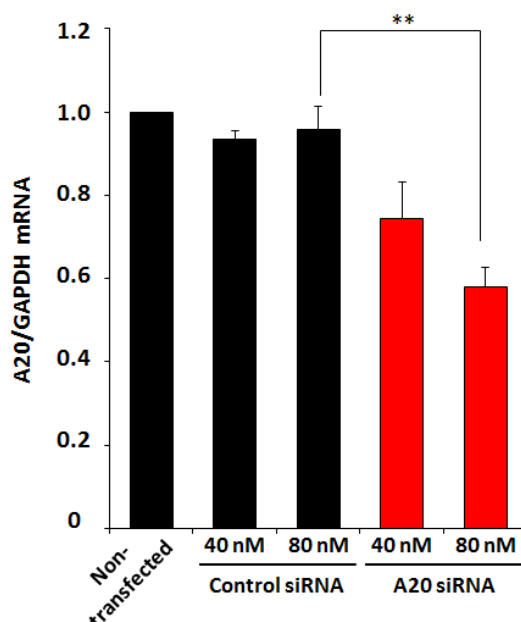


図 9 R8/GALA-MEND_{SUV} を用いた A20 のノックダウン

A20 に対する siRNA を R8/GALA-MEND_{SUV} を用いて BMDC に導入した。6 時間後に LPS (100 ng/mL) を添加し、30 時間後の mRNA 量を定量的 RT-PCR により評価した。縦軸は A20 の mRNA 量を GAPDH の mRNA 量で補正した値を示す。(n=3) **P<0.01 vs. Control siRNA

1-3 R8/GALA-MEND_{SUV} の毒性評価

正電荷リポソームのトランスフェクションは、細胞に対して毒性を与えることが報告されている。本研究では、特にトランスフェクションによる毒性を受けやすいプライマリー細胞である BMDC を用いており、トランスフェクションによる BMDC への毒性は、後の免疫反応を減弱する要因となるため、ノックダウン可能な濃度において毒性が認められないことを確認する必要がある。そこで、R8/GALA-MEND_{SUV} のトランスフェクションによる毒性を、WST-1 assay を用いて BMDC の生存率 (ミトコンドリア酵素活性) を調べることで評価した。トランスフェクション後、血清含有培地で長時間培養することで DC の機能が回復し毒性が検出できない可能性が考え、実際にトランスフェクション 24 時間後の生存率を評価したところ、未処理群との差は存在しなかった (データ未提示)。そのため、毒性が検出しやすいと考えられるトランスフェクション 2 時間後に評価した。その結果、A20 に対する siRNA、または Control siRNA を搭載した R8/GALA-MEND_{SUV} をトランス

フェクションした場合の両者で、siRNA 濃度が 80 nM の場合においても毒性は認められなかった (図 10)。このことから、R8/GALA-MEND_{SUV} は BMDC に毒性を与えることなく、標的遺伝子をノックダウン可能な非ウイルスキャリアであることが示唆された。

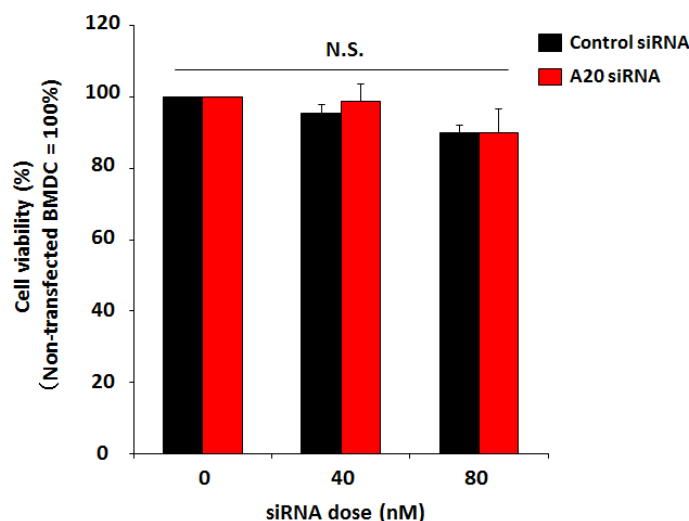


図 10 R8/GALA-MEND_{SUV} のトランスフェクションによる毒性評価

R8/GALA-MEND_{SUV} を BMDC にトランスフェクションした 2 時間後に WST-1 reagent を添加し、さらに 2.5 時間後に 450 nm における吸光度を測定した。R8/GALA-MEND_{SUV} をトランスフェクションしていない場合の生存率を 100 % として、それに対する割合を縦軸に示す。(n=3) N.S. : No significant difference

1-4 A20 をノックダウンした BMDC の TNF- α 産生評価

次に、R8/GALA-MEND_{SUV} を用いて BMDC の A20 をノックダウンすることによるサイトカイン産生の変化を調べた。本研究では、LPS による TLR4 を介したシグナル伝達の結果として産生されるサイトカインである TNF- α を、ELISA 法により定量した。その結果、コントロールと比較して、A20 をノックダウンした BMDC により TNF- α 産生の有意な上昇が認められた (図 11)。

1-5 A20 をノックダウンした BMDC の共刺激分子発現評価

さらに、R8/GALA-MEND_{SUV} を用いた BMDC の A20 のノックダウンによる共刺激分子発現の変化を調べた。DC の細胞膜表面に存在する共刺激分子 CD80、CD86 は、T 細胞の細胞膜表面に発現している CD28 と結合することで、DC の MHC 分子から T 細胞の TCR (T cell receptor) への抗原提示を補助する役割を担う。共刺激分子の発現上昇は、T 細胞への抗原提示量・頻度の上昇による抗腫瘍免疫応答の増強に繋がると考えられる。本研究では、CD80、CD86 を発現している BMDC の割合と BMDC 全体における発現量を、FACS を用いて評価した。両者の指標共に、コントロール群と A20 ノックダウン群の間に有意差は認められなかったが、BMDC 群全体における CD80、86 の発現量が上昇する傾向が存在

した (図 12B)。ウイルスキャリアを用いて DC の A20 をノックダウンした検討においても CD80、86 の発現量が上昇する傾向 (有意差検定なし) が報告されているため²⁸、R8/GALA-MEND_{SUV} による A20 ノックダウンを介して共刺激分子発現が上昇した可能性が示唆された。

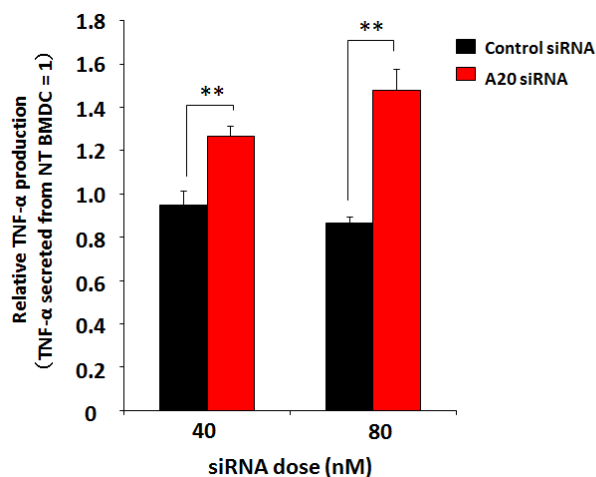


図 11 A20 をノックダウンした BMDC による TNF-α 産生評価

A20 に対する siRNA を R8/GALA-MEND_{SUV} を用いて BMDC に導入した。6 時間後に LPS を添加し、24 時間後の上清中の TNF-α 量を ELISA 法により定量した。R8/GALA-MEND_{SUV} をトランスフェクションしていない場合の TNF-α 産生量を 1 としたときの値を縦軸に示している。(n=3) **P<0.01 vs. control

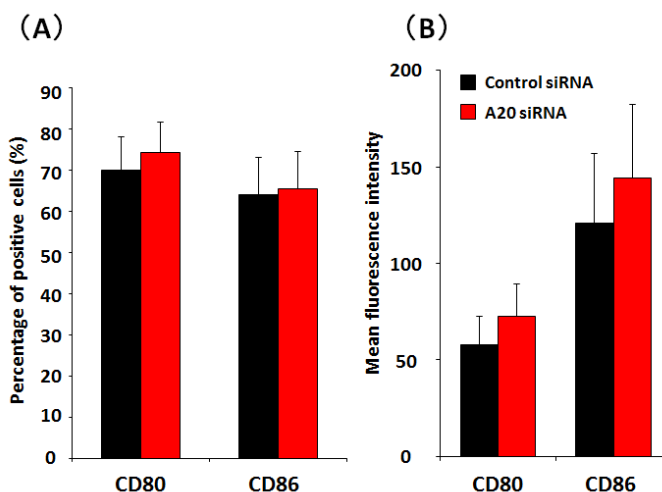


図 12 A20 をノックダウンした BMDC における共刺激分子発現評価

A20 に対する siRNA を R8/GALA-MEND_{SUV} を用いて BMDC に導入した。6 時間後に LPS を添加し、24 時間後に BMDC の細胞膜表面に発現している CD80、CD86 を FACS により測定した。(A) の縦軸は蛍光陽性細胞の割合、(B) の縦軸は平均蛍光強度を表している。(n=3)

1-6 A20 ノックダウン BMDC の投与による予防的な抗腫瘍活性の評価

R8/GALA-MEND_{SUV} を用いた A20 ノックダウンにより、BMDC の免疫機能を増強することに成功したので、A20 をノックダウンした BMDC をマウスに投与することによる DC 療法の増強効果を評価した。この検討では、免疫機能の増強効果をより検出し易くするため、がん細胞を移植する前に BMDC 投与による免疫を行う方法である予防的な抗腫瘍活性の評価を行った。*in vitro* において R8/GALA-MEND_{SUV} を用いた A20 ノックダウン及び OVA 抗原タンパク質・ペプチド・LPS 添加による免疫機能活性化を施した BMDC を footpad に投与した 7 日後に、OVA 抗原ペプチドを MHC 分子上に提示するがん細胞である E.G.7-OVA をマウスに移植し、その後の腫瘍体積を経時的に測定した。PBS を投与した群に対して、BMDC を投与した群では 20 日程度の腫瘍増殖抑制効果を示した。しかしながら、BMDC 投与群において、R8/GALA-MEND_{SUV} をトランスフェクションしていない群や Control siRNA を搭載した R8/GALA-MEND_{SUV} をトランスフェクションした群と比較して、A20 に対する siRNA を搭載した R8/GALA-MEND_{SUV} のトランスフェクションによる抗腫瘍活性に与える優位性は認められなかった (図 13)。

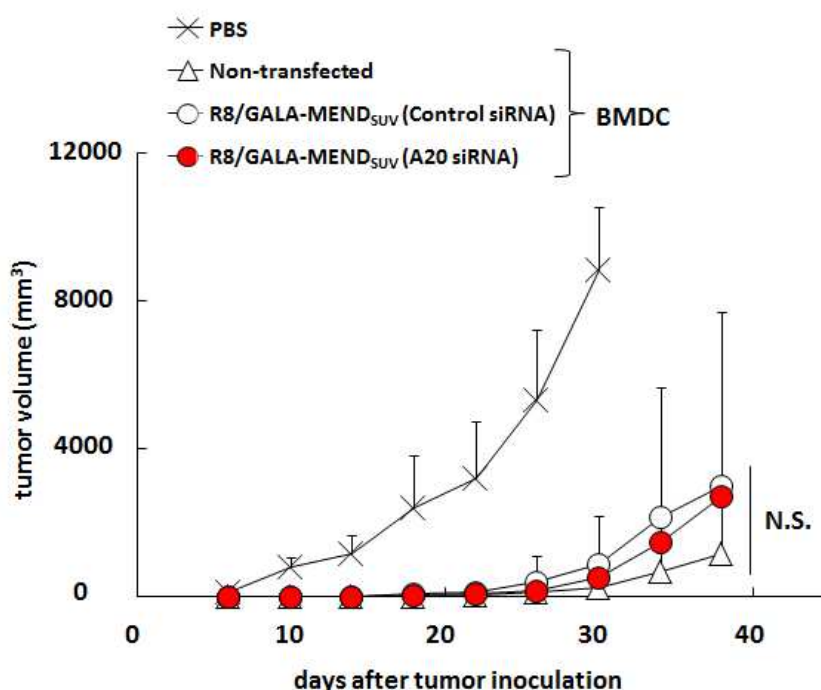


図 13 A20 ノックダウン BMDC の投与による予防的な抗腫瘍活性評価

A20 に対する siRNA を R8/GALA-MEND_{SUV} を用いて BMDC に導入した。6 時間後に OVA ペプチドと OVA タンパク質を添加し、LPS (500 ng/mL) で刺激後、マウスの footpad に投与した (4.0×10^5 cells)。7 日後に E.G.7-OVA (8.0×10^5 cells) を皮下に移植し、経時的に腫瘍の大きさを測定した。縦軸は腫瘍の長径と短径より算出した腫瘍体積を示す。(n=8) N.S. : No significant difference

第一章 小括

第一章では、非ウイルスキャリアを用いた免疫抑制性因子のノックダウンによる DC 療法増強戦略の実現を目指して、R8/GALA-MEND_{SUV}を用いた BMDC の A20 ノックダウンを試み、A20 ノックダウン及び免疫機能活性化に成功した⁵⁷。しかしながら、R8/GALA-MEND_{SUV}を用いて A20 をノックダウンした BMDC の投与による予防的な抗腫瘍活性は認められなかった。DC 投与によるがん治療において、生着したがんに対する抗腫瘍活性を得るためには、予防的な抗腫瘍効果を評価した場合に誘導された免疫応答以上の強さが必要であるため、R8/GALA-MEND_{SUV}を用いて A20 をノックダウンした BMDC を投与することでは生着したがんに対する治療効果は認められないと予想された。序章で記述した通り、DC 療法は生体内で確認されたがん細胞を殺傷するために適応される場合が多いため、非ウイルスキャリアを用いたノックダウン戦略を臨床へ応用するためには、治療効果を飛躍的に増強させる何らかの取り組みが必要不可欠であることが本章で示唆された。

第二章

新規非ウイルスキャリア
YSK12-MEND の開発

【第二章】 新規非ウイルスキャリア YSK12-MEND の開発

本章では、R8/GALA-MEND_{SUV}以上に DC へ効率的に siRNA を導入可能な非ウイルスキャリアの開発を目指した検討と、その機能評価について記述する。

第一章において、R8/GALA-MEND_{SUV}を用いた A20 ノックダウンでは DC 療法の効果の増強は認められなかった。抗腫瘍効果が認められなかった原因として、がん細胞 (E.G.7-OVA) や A20 をノックダウンした BMDC の投与数が A20 ノックダウンの効果を評価するために最適ではなかったこと等が挙げられるが、R8/GALA-MEND_{SUV}による A20 のノックダウン効率が低いこと、それに伴う免疫機能の増強効果が弱いことが最も考慮すべき可能性として考えられる。ウイルスキャリアを用いた報告では、DC において 80%以上の A20 ノックダウンが確認されている一方²⁸、R8/GALA-MEND_{SUV}を用いた場合では細胞毒性が現れる限界まで siRNA 濃度を増加させた (80 nM) のにも関わらず、最大ノックダウン効率は 40%程度であった。R8/GALA-MEND_{SUV}に限らず、非ウイルスキャリアを用いた DC への siRNA 導入は非常に困難であることが一般的に知られている。非ウイルスキャリアによる siRNA 送達・導入の領域で世界をリードする Alnylam 社が開発した lipid nanoparticles (LNPs) を用いて、ヒト DC に発現する免疫抑制性因子 PD-L1、PD-L2 の *in vitro* 系でのノックダウンを試みた報告においても、タンパク質レベルで 80%以上ノックダウンするために 125 nM 以上の高い siRNA 濃度を必要としていた⁵⁸。他の大半の報告では DC への siRNA 導入のために 100 nM から μ M オーダーの非常に高い濃度が用いられているが、ノックダウン活性はウイルスキャリアを用いることで得られる値には届いていない^{59, 60}。また、DC への siRNA 導入が困難である明確な原因も明らかではなく、非ウイルスキャリア開発の糸口が掴みづらい状況が続いている。このように、世界レベルでも DC への効率的な siRNA 導入を実現とする非ウイルスキャリアが存在しないため、免疫抑制性因子のノックダウンにより DC 療法の効果を増強する戦略の実用化には、R8/GALA-MEND_{SUV}以上の優れた siRNA 導入能を有する新規キャリアを開発する必要があった。

そのため筆者は、当研究室の佐藤らによって設計された脂質 YSK05 に着目した。YSK05 は親水基部分に 3 級アミンを、疎水基部分に 4 つの不飽和結合を含有する特徴的な構造を有する⁶¹。脂質の疎水基に存在する不飽和結合の数が多いほど脂質の相転移温度が低下する傾向が報告されており⁶²、キャリアが細胞に取り込まれた後に移行するエンドソームにおいて、エンドソーム膜の不安定化を誘起することによる siRNA のエンドソームからの脱出を促進する要因として考えられている。また、周囲の pH 変化により 3 級アミンの窒素原子に H⁺が結合・解離することで YSK05 の電荷が変化する pH 応答性脂質としての性質も有する。YSK05 を含有する MEND を構築した場合の見かけ上の pK_a は約 6.6 であるため、生理的条件である pH 7.4 では MEND はほとんど荷電しないが、エンドソーム内の酸性環境であ

る pH6.5 において正に荷電する。キャリアが荷電しないことは血中滞留性を向上させるが、細胞膜との親和性が減少することで siRNA の取り込みやエンドソーム脱出を悪化させる。それに対して、キャリアが正に荷電することは血中滞留性を悪化させる一方、細胞における siRNA 動態を向上させる。そのため、YSK05 を含有するキャリアは優れた血中滞留性とエンドソーム脱出能を併せ持つ siRNA キャリアとして考えられ、実際に DOTAP や DODAP のような既存の脂質で構成された MEND と比較して、効率的な OS-RC-2 腫瘍組織への siRNA 送達・導入を示している⁶¹。YSK05 の有する高いエンドソーム脱出能から、DC への効率的な siRNA 導入を可能とするキャリアを構築する場合においても有用であると考えられたが、細胞への取り込み過程の条件である pH7.4 において YSK05 を含有するキャリアが荷電しないことは、DC におけるキャリアの動態及び標的因子のノックダウンが非効率的になることが予想された⁶³。

そのため筆者は、DC 療法の効果増強を目的としたキャリアの使用を念頭に置いて、エンドソーム脱出促進に寄与していた YSK05 の疎水基を有し、親水基の変更により YSK05 と比較して高い pKa が付加された新規合成脂質 YSK12 に着目した (図 14)。YSK12 は見かけ上の pKa が 8 と高く、細胞への取り込み過程やエンドソーム内の中性 pH 環境においては正に荷電することから、負に荷電する細胞膜との親和性が上昇し、siRNA の細胞内動態が YSK05 と比較してさらに良好になることが期待された。

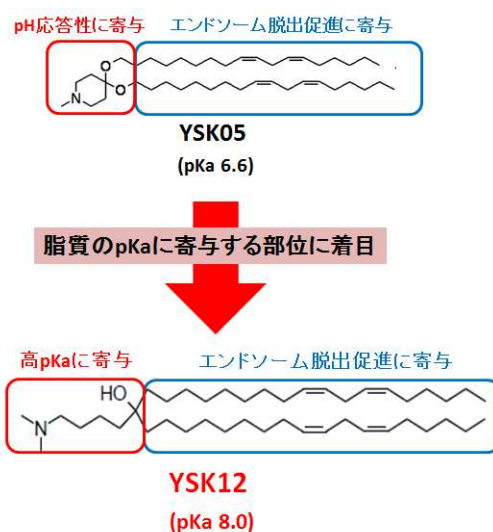


図 14 YSK12 への着目

YSK12 は、エンドソーム脱出促進に寄与していた YSK05 の疎水基と、高い pKa を与える親水基を有する。細胞膜との親和性の上昇により細胞内動態が良好になることで、効率的な siRNA 導入を可能とする YSK05 を用いた場合を上回るノックダウン効率が見られると期待さ

本章では、YSK12 を脂質膜に組み込んだ MEND (YSK12-MEND) を構築し、DC における siRNA 導入能および細胞内動態を他の非ウイルスキャリアと比較した。また、YSK12-MEND の特徴的な性質として見出された膜破壊作用について、詳細に検討した。

2-1 YSK12-MEND の調製

YSK12 は、リノール酸を出発原料として 6 段階の反応を経て合成することで、64%の収率で得られた。YSK12-MEND はブタノール希釈法により調製した (図 15)。ブタノール溶液中に溶解させた YSK12 等の脂質と siRNA を、クエン酸バッファーを用いて YSK12 を正に荷電させたままブタノール濃度を下げることで粒子を形成させた。形成した粒子が存在する溶液のブタノール濃度を PBS の添加によりさらに下げ、限外濾過を繰り返すことで YSK12-MEND を調製した。調製した YSK12-MEND の脂質組成は YSK12 / POPE / Cholesterol / PEG2000-DMG = 50 / 25 / 25 / 3、粒子径は 75 nm、 ζ 電位は 4 mV、siRNA 封入率は 85%であった。

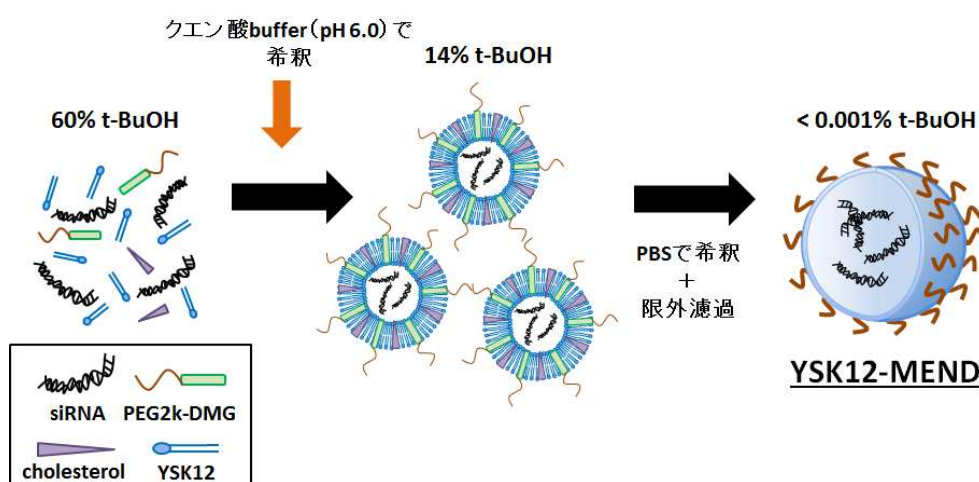


図 15 YSK12-MEND の調製

YSK12-MEND の調製には、ブタノール希釈法を用いた。siRNA や脂質を溶解させたブタノール溶液の濃度を下げる限外濾過を繰り返すことで、脂質膜内に siRNA が封入された構造を有する YSK12-MEND を調製した。

2-2 siRNA 導入活性の比較

初めに、市販のトランスフェクション試薬である Lipofectamine RNAi MAX (LFN) と比較することで、調製した YSK12-MEND の siRNA 導入活性を確認した。LFN は、様々な細胞種に対して siRNA を効率的に導入可能である世界最高水準の非ウイルスキャリアである。ノックダウン効率を比較するための標的因子として選択した SR-B1 に対する siRNA を各キャリアを用いて BMDC へトランスフェクションし、24 時間後に発現している mRNA を定量的 RT-PCR により定量することでノックダウン効率を算出した。その結果、YSK12-MEND は LFN とほぼ同等の効率で BMDC へ siRNA を導入可能であることが明らかとなった (図 16)。キャリアを構成する脂質膜組成や機能素子の最適化を行うことで MEND の siRNA 導入活性の向上が可能のため、YSK12-MEND は LFN を凌ぐ siRNA 導入活性を有する非ウイルスキャリアとなり得ると期待された。

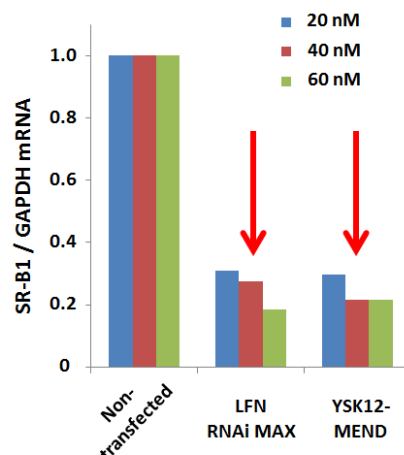


図 16 YSK12-MEND による siRNA 導入効率の評価

SR-B1 に対する siRNA を YSK12-MEND または LFN を用いて BMDC に導入し、24 時間後の mRNA 量を定量的 RT-PCR により評価した。縦軸は SR-B1 の mRNA 量を GAPDH の mRNA 量で補正した値を示す。(n=1)

2-3 YSK12-MEND の最適化

続いて、YSK12-MEND の最適化を行った。この検討では、脂質膜を構成する①YSK12、②PEG2000-DMG、③POPE の含有割合を変更することによる siRNA 導入活性の変化を、2-2 で記述した方法と同様の方法で評価した。まず、YSK12 含有割合を変更した結果、YSK12 含有割合を増加させることでノックダウン効率が上昇する傾向が認められ、含有割合が 85%の場合に最大を示した (図 17A)。この結果は、トランスフェクション条件である pH7.4 において正に荷電する構造とエンドソーム膜からの脱出を促進する構造を併せ持つ YSK12 量を増加させたことにより、BMDC における siRNA の動態が良好になったことに起因すると考えられる。この条件を固定して、次に PEG2000-DMG 含有割合を変更した結果、PEG2000-DMG 含有割合を減少させることでノックダウン効率が上昇する傾向が認められた (図 17B)。キャリアへの PEG 修飾は粒子形成の際の安定性を上昇させる効果がある一方、細胞におけるキャリアの動態 (取り込み、エンドソーム脱出) を悪化させることが報告されているため³⁵、PEG2000-DMG 含有割合を減少させたことによりキャリアの動態が改善されたと考えられる。含有割合を 1mol%未満にすると siRNA 回収率が著しく低下したため (データ未提示)、PEG2000-DMG 含有割合を 1 mol%に固定した。最後に、ヘルパー脂質である POPE 含有割合を変更した結果、POPE 含有割合を減少させることでノックダウン効率が上昇する傾向が認められ、POPE を含有しない脂質組成の条件で最大を示した (図 17C)。以上の検討から、YSK12 / Cholesterol / PEG2000-DMG = 85 / 15 / 1 という割合が BMDC への siRNA 導入のために最適な脂質組成であることが明らかとなった。最適化した YSK12-MEND の粒子径は 180 ± 6 nm、 ζ 電位は 5.8 ± 0.6 mV、siRNA 封入率は $94 \pm 1\%$ であった。

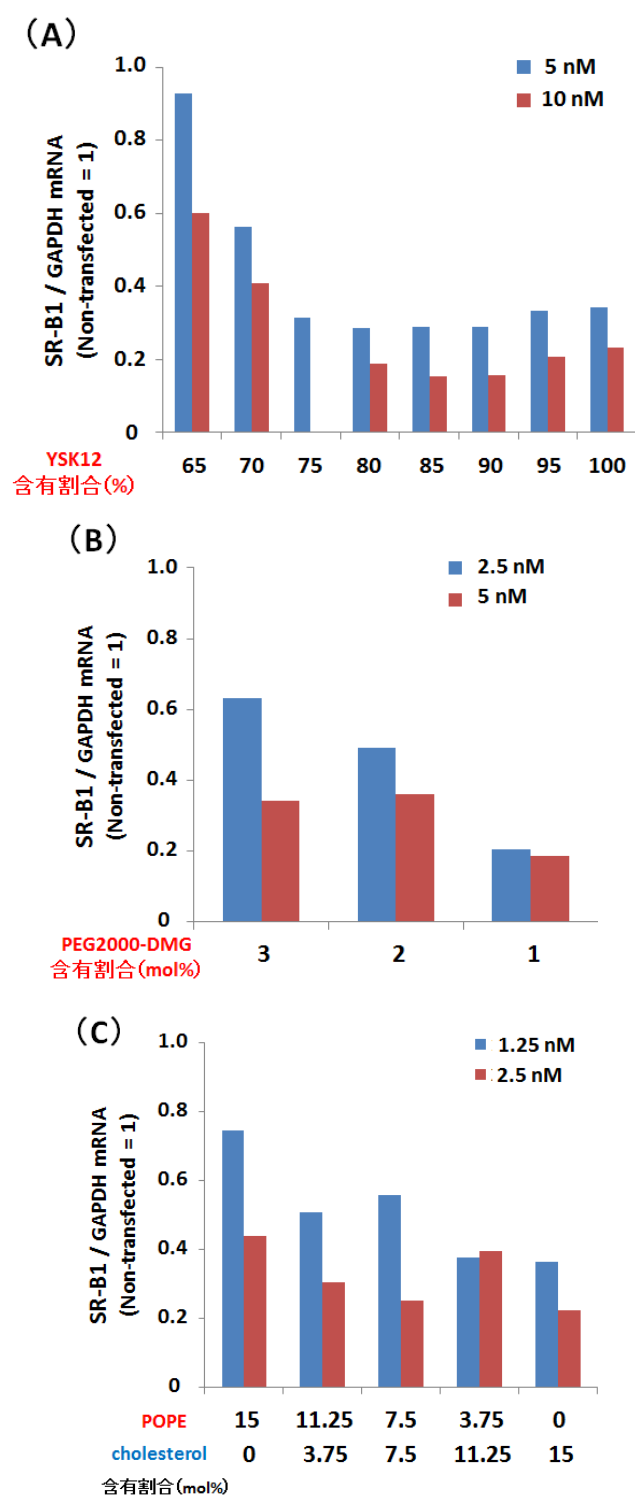


図 17 YSK12-MEND の最適化

(A)YSK12、(B)PEG2000-DMG、(C)POPE の含有割合を変化させた YSK12-MEND を用いて BMDC に SR-B1 に対する siRNA を導入し、24 時間後の mRNA 量を定量的 RT-PCR により評価した。縦軸は SR-B1 の mRNA 量を GAPDH の mRNA 量で補正した値を示す。(A)の一部は実験的な不手際によりデータが得られていない。(n=1)

2-4 最適化した YSK12-MEND の siRNA 導入活性評価

最適化した YSK12-MEND の siRNA 導入活性を LFN 及び R8/GALA-MEND_{SUV} と比較するために、ノックダウン効率を 2-2 で記述した方法と同様の方法で評価し dose response curve を作成した。LFN や R8/GALA-MEND_{SUV} を用いた場合における 50%ノックダウンに必要な siRNA 濃度 (EC₅₀) はそれぞれ 25 nM、70 nM であったのに対し、最適化した YSK12-MEND の EC₅₀ は 1.5 nM であり、LFN や R8/GALA-MEND_{SUV} と比較してそれぞれ約 1/17、1/47 にまで減少させることに成功した。また、LFN や R8/GALA-MEND_{SUV} を用いることでは 60%程度であった最大ノックダウン効率を、YSK12-MEND を用いることで 90%以上に上昇させることに成功した (図 18)。本章の初めで記述した通り、DC への非ウイルスキャリアを用いた siRNA 導入は非常に困難であり、90%以上のノックダウンを誘起するためにはウイルスキャリアが必要である状況が続いていた。効率的に siRNA を BMDC へ導入可能な YSK12-MEND は、上記の状況を打開する可能性を有した世界最高水準のキャリアであることが示唆された。

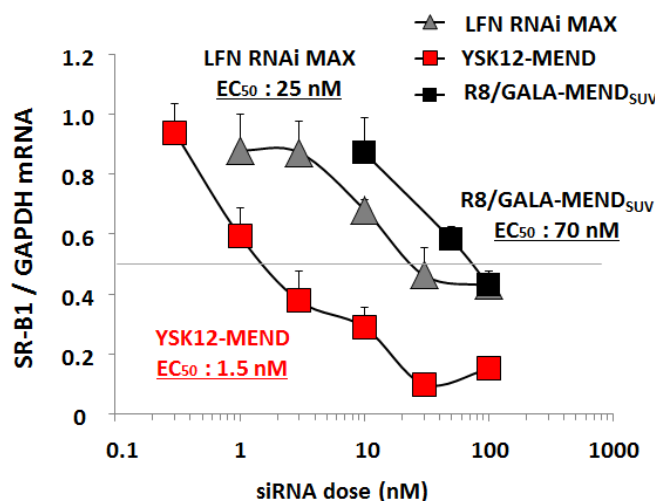


図 18 最適化 YSK12-MEND の siRNA 導入効率評価

最適化した YSK12-MEND、LFN 及び R8/GALA-MEND_{SUV} を用いて BMDC に SR-B1 に対する siRNA を導入し、24 時間後の mRNA 量を定量的 RT-PCR により評価した。縦軸は SR-B1 の mRNA 量を GAPDH の mRNA 量で補正した値を示す。(n=3-5)

2-5 YSK12-MEND の毒性評価

次に、YSK12-MEND のトランスフェクションが BMDC に与える毒性を評価した。各キャリアを用いて siRNA をトランスフェクションした 2 時間後、生細胞が有する還元作用を CytoTox 96® assay を用いて測定することで生存率を評価した。LFN や R8/GALA-MEND_{SUV} を用いた場合と同様に、YSK12-MEND のトランスフェクションによる BMDC の生存率の低下は認められなかった (図 19)。この結果から、YSK12-MEND は

高い siRNA 導入活性と低毒性を両立する優れた非ウイルスキャリアであることが示唆された。

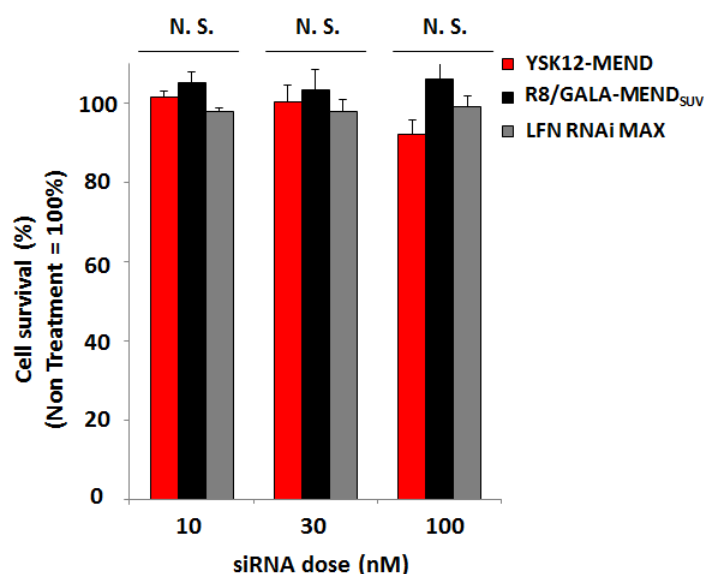


図 19 トランスフェクションによる毒性評価

各キャリアをトランスフェクションした BMDC に Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent を添加し、2 時間後に 490 nm における吸光度を測定した。トランスフェクションしていない場合の BMDC 生存率を 100 % として、それに対する割合を縦軸に示す。(n=3) N.S.: No significant difference

2-6 BMDC への取り込み過程の評価

これまでの結果から、YSK12-MEND には BMDC へ効率的に siRNA を導入しノックダウンを誘起する能力があることが明らかとなった。YSK12-MEND を用いることでノックダウン効率が上昇した要因を同定するため、BMDC における siRNA 動態を各キャリア間で比較した。初めに、BMDC への siRNA 取り込み量を評価した。脂質膜に DiI ラベルした各キャリアをトランスフェクションした 30 分後、①上清を除去した BMDC の蛍光強度と、②上清と BMDC の両者を含有する画分の蛍光強度をそれぞれ測定した。siRNA 取り込み量は、①を②で除し siRNA 添加量を掛けることで算出した。いずれのキャリアの場合においても、siRNA 濃度の増加に比例して取り込み量が増加する様子が認められた。LFN 及び R8/GALA-MEND_{SUV} はいずれの濃度においても同等の取り込み量を示した一方、YSK12-MEND を用いた場合の取り込み量はそれらと比較して低い傾向があった(図 20A)。これまでの当研究室における検証から、正電荷を有する MEND はエンドサイトーシスを介して細胞に取り込まれ、エンドソームに移行することが明らかとなっている^{39, 40}。今回設計した YSK12-MEND には、高い膜不安定化作用を有すると考えられる YSK12 が組み込まれているため、エンドサイトーシスではなく細胞膜との直接的な融合により BMDC 内へ取り込まれる可能性が考えられた。細胞膜との直接的な融合による siRNA の細胞質への導

入は、多くの非ウイルスキャリアを用いた場合において障壁となるエンドソーム・ライソソームにおける分解を回避することが可能なため、YSK12-MEND の高い siRNA 導入活性を説明し得る有力な仮説として考えられた。実際に、YSK12-MEND の BMDC への取り込み機構を明らかとするため、エンドサイトーシスを阻害した場合における siRNA 取り込みを評価した。エンドサイトーシスは ATP 依存的な取り込み経路であるため、実験温度を低下させることで阻害が可能である。37 °C 及び 4 °C の 2 種類の温度条件で、Cy5 ラベル化 siRNA を搭載した各キャリアを BMDC へトランスフェクションした 3 時間後、細胞内に存在する siRNA を CLSM を用いて観察した。YSK12-MEND、R8/GALA-MEND_{SUV}、エンドサイトーシスにより取り込まれるポジティブコントロールとして用いた STR-R8 修飾 EPC/Chol/CHEMS liposome のいずれを用いた場合でも観察されていた 37 °C の温度条件における細胞内への siRNA 取り込みは、温度条件を 4 °C にすることで阻害された(図 20B)。

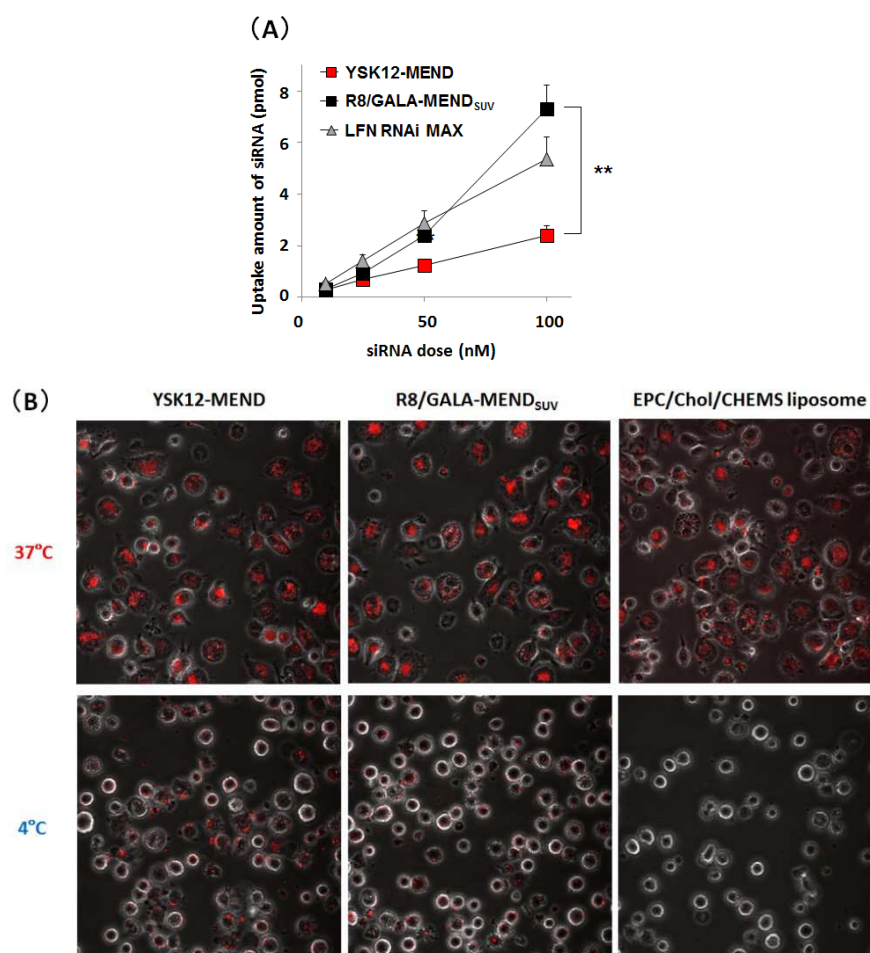


図 20 siRNA 取り込み過程の解析

(A) Dil ラベルした各キャリアを BMDC へトランスフェクションした 30 分後に蛍光強度を測定し、細胞画分で検出された蛍光強度の割合に siRNA 濃度を掛けることで siRNA 取り込み量を算出した。(n=3) ** $P < 0.01$ (B) Cy5 ラベル化 siRNA を各キャリアを用いて BMDC へトランスフェクションした 3 時間後に CLSM 観察を行った。赤色蛍光は Cy5 (siRNA) を示す。

このことから、YSK12-MEND はエンドサイトーシスにより BMDC へ取り込まれていることが示唆された。しかしながら、YSK12-MEND を用いた場合にはエンドサイトーシスを介して BMDC の細胞内へ移行する siRNA 量が少ないことから、ノックダウン効率が上昇した要因は取り込み過程ではなく、それ以降の過程にあることが推測された。

2-7 エンドソーム脱出能の評価

次に、BMDC に取り込まれた後に移行するエンドソームからの脱出を各キャリア間で比較した。Cy5 ラベル化した siRNA (赤色) を搭載した各キャリアを BMDC へトランスフェクションした 1 時間後、酸性コンパートメント (緑色) と核 (水色) を Lyso Tracker 及び Hoechst33342 により染色し、CLSM によりエンドソーム脱出を観察した。YSK12-MEND をトランスフェクションした場合には、siRNA とエンドソームの共局在を示す黄色のドットがほとんど観察されないことから、効率的にエンドソームから脱出していることが示唆された (図 21A)。実際に、画像解析により各色の占有面積を算出し、赤色

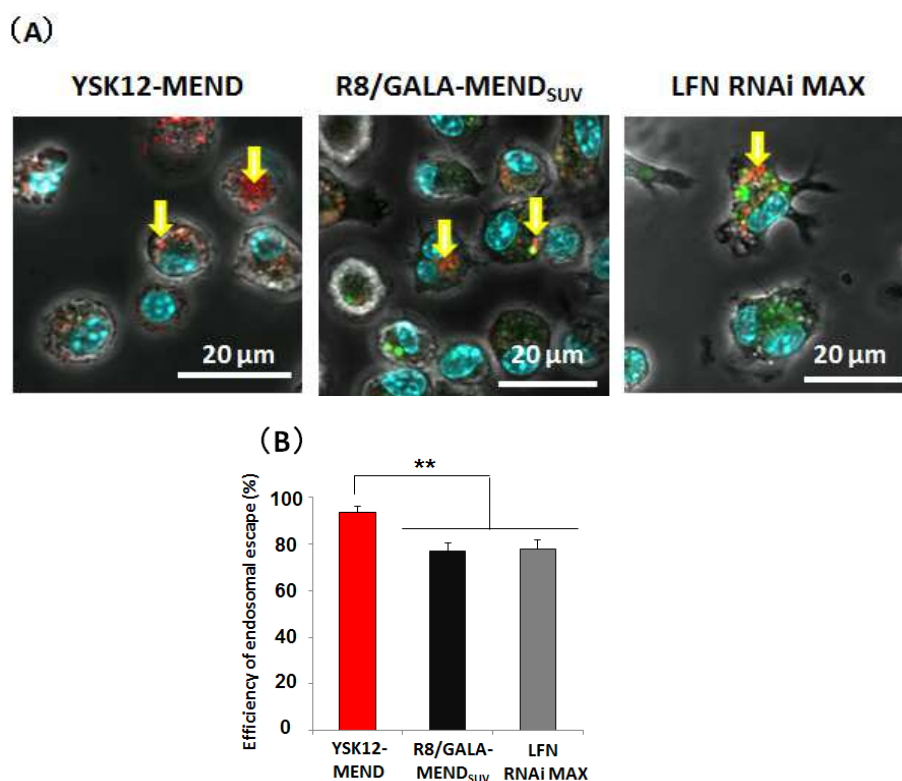


図 21 エンドソーム脱出過程の解析

(A) Cy5 ラベル化 siRNA を各キャリアを用いて BMDC へトランスフェクションした 1 時間後に、核及び酸性コンパートメントを Hoechst33342 と LysoTracker Red を用いてそれぞれ染色し CLSM 観察を行った。赤色蛍光は Cy5 (siRNA)、緑色蛍光は LysoTracker Red (酸性コンパートメント)、水色蛍光は Hoechst33342 (核)、矢印は赤色単独のドットを示す。(B) CLSM 画像の解析により得られた各色ドットの占有面積を用いて、エンドソーム脱出効率を算出した。(n=49-53) ** $P < 0.01$

ドットの面積を赤色ドットと黄色ドットの和の面積で除することでエンドソーム脱出効率を算出した結果、YSK12-MEND のエンドソーム脱出効率は他キャリアと比較して有意に高いことが明らかとなった (図 21B)。これらの結果から、エンドソーム脱出過程の上昇が、YSK12-MEND によるノックダウン効率の上昇に寄与している可能性が示唆された。また、YSK12-MEND をトランスフェクションした場合において、エンドソームを示す緑色ドットがほとんど観察されないことから、siRNA のエンドソーム脱出機構が膜破壊であることが示唆された。

2-8 YSK12-MEND からの siRNA の解離能の評価

最後に、BMDC 内における各キャリアからの siRNA の解離を比較した。脂質膜 (緑色) と siRNA (赤色) をラベル化した各キャリアを BMDC へトランスフェクションした 30 分後に medium change をすることで取り込まれていないキャリアを除去した。トランスフェクション 3 または 5 時間後、酸性コンパートメント (青色) を Lyso Tracker により染色し、CLSM を用いることで脂質膜及び siRNA の様子を観察した。2-7 と同様の方法で画像を解析し、エンドソーム内を含むすべてのキャリアとエンドソームから脱出したキャリアの siRNA 解離をそれぞれ算出した。その結果、どちらの指標を用いた場合においても各キャリアの siRNA 解離能の傾向はほぼ同じであった (図 22)。また、YSK12-MEND の siRNA

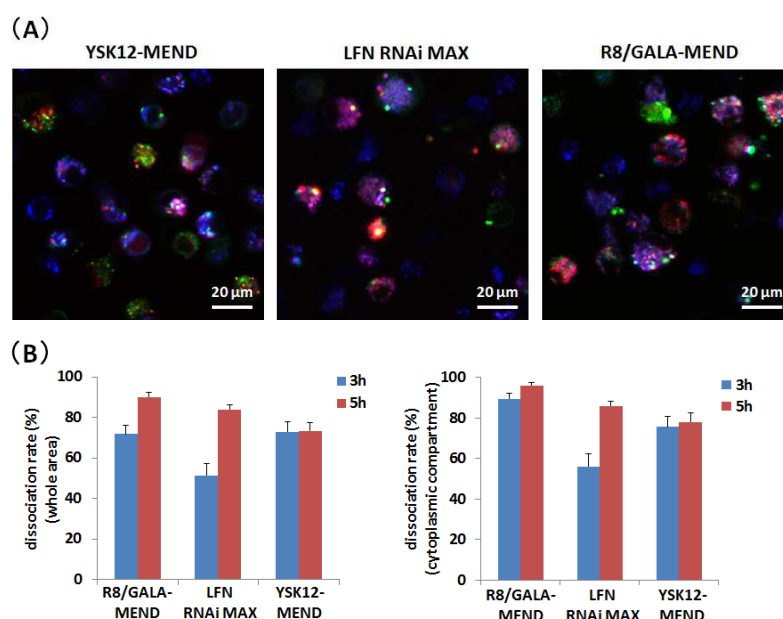


図 22 キャリアからの siRNA 分離過程の解析

(A) siRNA を Cy5、脂質膜を DiO でラベル化した各キャリアを用いて BMDC へトランスフェクションした 3 時間後に、酸性コンパートメントを Lysotracker Red を用いてそれぞれ染色し CLSM 観察を行った。赤色蛍光は Cy5 (siRNA)、緑色蛍光は DiO (脂質膜)、青色蛍光は Lysotracker Red (酸性コンパートメント) を示す。(B) CLSM 画像の解析により得られた各色ドットの占有面積を用いて、siRNA 分離率を算出した。(n=24-39)

解離能は R8/GALA-MEND_{SUV} のものと比較して同等かそれ以下であった。これらの結果から、エンドソーム脱出後の細胞質においてキャリアから siRNA が解離する過程は、YSK12-MEND の高い siRNA 導入効率に寄与していないことが示唆された。

2-9 Hemolysis assay による膜障害活性の評価

ここまでの検討から、YSK12-MEND を用いることで BMDC への効率的な siRNA 導入が可能となった大きな要因は、膜破壊作用によるエンドソーム脱出過程の向上であることが示唆された。続いて、YSK12-MEND のエンドソーム脱出機構の同定を試みた。キャリアと赤血球の混合により漏出するヘモグロビンを定量することでキャリアの膜破壊作用を検出する Hemolysis assay を行った結果、pH 7.4、6.5、5.5 のいずれの pH 条件においても他キャリアと比較して Hemolysis 活性が高い傾向が認められた (図 23)。

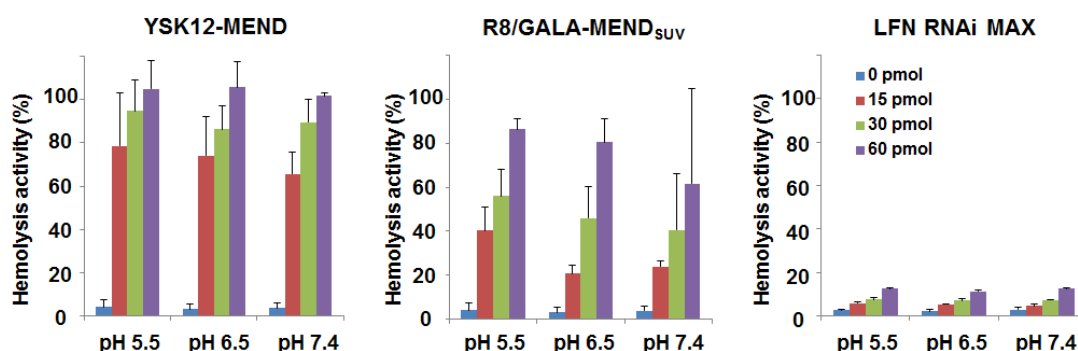


図 23 Hemolysis assay による膜障害活性の評価

マウスから単離した赤血球に各キャリアを添加してインキュベートした 30 分後、遠心分離により回収した上清の 540 nm における吸光度を測定することで Hemolysis activity を算出した。triton 溶液の添加により赤血球を完全に溶解させたサンプルから得られた吸光度を 100%として、それに対する割合を縦軸に示す。(n=3)

2-10 Cathepsin B 漏出の検出による膜障害活性評価

Hemolysis assay に加えて、YSK12-MEND をトランスフェクションすることで BMDC 内で実際に起きているエンドソーム膜破壊の検出を試みた。Cathepsin B はシステインプロテアーゼの一種であり、通常の状態ではエンドソーム及びライソソーム画分にのみ存在するため⁶⁴、細胞質画分において Cathepsin B が検出されることはエンドソーム膜が破壊されたことを示す⁶⁵⁻⁶⁷。初めに、キャリアが有する膜破壊活性により細胞質に漏出した Cathepsin B のみを検出するため、細胞膜のみを透過する条件を探索した。膜透過作用を有する物質を細胞に処理し細胞膜とエンドソーム膜を共に透過した場合では、細胞質由来タンパク質及び Cathepsin B 活性の両者が検出されと考えられる。それに対して、細胞膜は透過しているがエンドソーム膜は透過していない場合では、細胞質由来のタンパク質が

検出される一方、エンドソームに内封された構造を有する Cathepsin B の活性は検出されないことが予想される。実際に、膜透過作用を有する digitonin の処理濃度を最適化することで、細胞膜は透過するがエンドソーム膜は透過しない条件を見出した。そこで、各キャリアをトランスフェクションした 2 時間後の BMDC に最適化した濃度で digitonin 処理を行うことで細胞膜のみを透過し、遠心分離により回収した細胞質成分中に含まれる Cathepsin B の活性を測定した (図 24A)。LFN をトランスフェクションすることでは細胞質成分由来の CathepsinB 活性はほとんど検出されなかった一方、YSK12-MEND をトランスフェクションすることでキャリア添加量依存的な CathepsinB 活性の上昇が認められた (図 24B)。

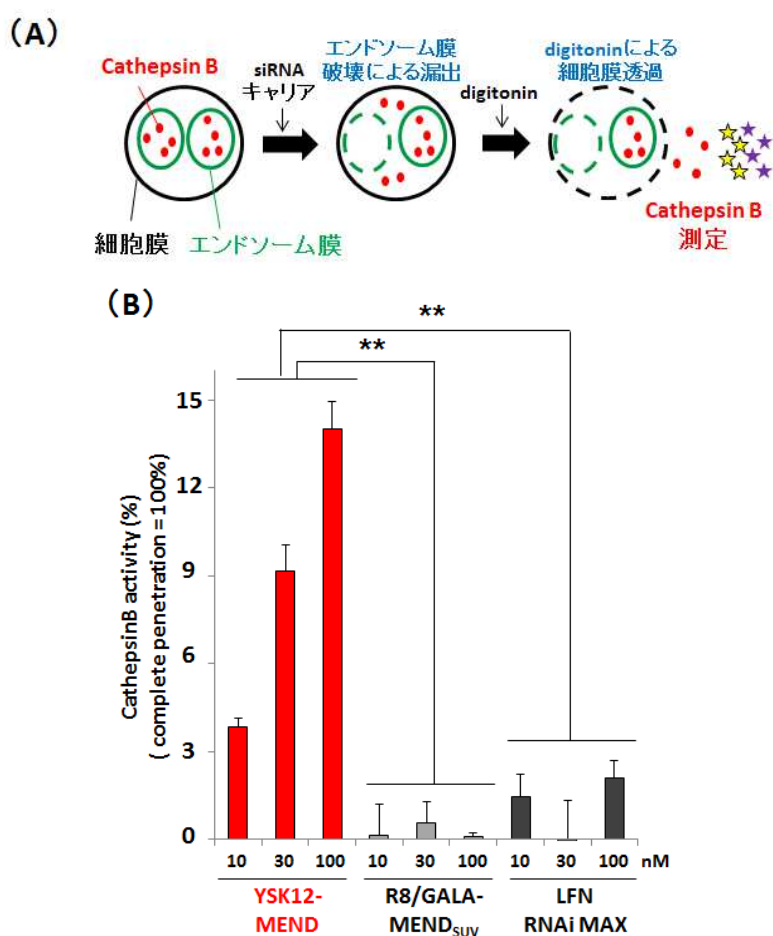


図 24 Cathepsin B 漏出の検出による膜障害活性の評価

(A) エンドソーム膜の破壊により Cathepsin B が細胞質に漏出する。キャリアのトランスフェクションにより漏出した Cathepsin B を digitonin 処理による細胞膜透過を行うことで検出することができる。(B) BMDC へ各キャリアをトランスフェクションした 2 時間後ジグトニン処理により細胞膜を透過した。遠心分離により回収した BMDC の細胞質成分に基質反応液を添加し、蛍光強度を測定した。過剰量の digitonin 添加により細胞膜及びエンドソーム膜を透過させたサンプルから得られた蛍光強度を 100% として、それに対する割合を縦軸に示す。(n=3) ** $P < 0.01$

R8/GALA-MEND_{SUV}を用いた場合では、ある程度の Hemolysis 活性が認められた一方、細胞質由来の Cathepsin B 活性は検出されなかった。これは、Hemolysis assay の実験条件は BMDC のエンドソーム内を模倣した環境ではなく、実際のエンドソーム内環境との差による影響を受けたためと考えられる。第一章で記述した通り、R8/GALA-MEND_{SUV}にはエンドソーム膜との膜融合を促進する GALA が修飾されているため、エンドソームを膜融合により突破していると推察され、Cathepsin B 活性が検出されないという結果と一致する。以上の Hemolysis assay 及び Cathepsin B 活性評価の結果から、YSK12-MEND はエンドソーム膜を破壊することで脱出していることが示された。

第二章 小括

第二章では、R8/GALA-MEND_{SUV}以上に BMDC へ効率的に siRNA を導入可能な非ウイルスキャリアの開発を目指して、優れた細胞内動態を有する YSK05-MEND を参考にし、新規合成脂質 YSK12 を含有する YSK12-MEND を新たに設計することで、既存の非ウイルスキャリアと比較して BMDC への siRNA 導入効率を飛躍的に高めることに成功した。また、YSK12-MEND を用いることで BMDC における siRNA 導入効率が上昇した要因の探索を試み、膜破壊作用によるエンドソーム脱出過程の亢進が一つの要素であることを見出した。ただし、YSK12-MEND による siRNA の取り込みは他キャリアと比較して低く、エンドソーム脱出過程の上昇を考慮しても、細胞質へ移行した siRNA 量は他キャリアとほぼ同等と推察される。そのため、エンドソーム脱出後における RISC 移行の評価等さらなる検討が必要である。本章で開発に成功した YSK12-MEND は、低い siRNA 濃度で高いノックダウン活性を誘起することが可能であるため、免疫抑制性因子の効率的なノックダウンによる DC 療法の効果増強を、非ウイルスキャリアとして達成することが期待される。また、YSK12-MEND は高い siRNA 導入効率を有するものの、他キャリアと比較して siRNA 動態が良好ではない過程 (siRNA 取り込み) も存在するため、その過程における siRNA 動態を改善する改良をキャリアに施すことで、さらなる siRNA 導入効率の上昇が可能と考えられる。

第三章

YSK12-MEND を用いた
免疫抑制性因子ノックダウン
及び DC 療法の効果増強

【第三章】

YSK12-MEND を用いた免疫抑制性因子ノックダウン及び DC 療法の効果増強

新規開発した YSK12-MEND を用いることでウイルスキャリアに匹敵する DC への効率的な siRNA 導入が可能となったので、本章では DC における免疫活性化シグナルの増強や免疫抑制性シグナルの遮断による DC 療法の効果増強を目的とした検討を試みた。

SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling 1) は、サイトカインシグナル伝達におけるネガティブフィードバック因子として Naka らを含む 3 つのグループにより 1997 年に初めて報告され⁶⁸⁻⁷⁰、その後の構造解析により SH 領域と SOCS1 box を有することが明らかとなった。サイトカインや TLR アゴニストにより SOCS1 の発現が誘導され、サイトカインシグナルを伝達する役割を担う JAK/STAT 経路における JAK (Janus) に結合しその機能を阻害することで、細胞の免疫機能活性化シグナルの過度な亢進を抑制する (図 25)。ウイルスキャリアを用いた SOCS1 ノックダウンにより DC の免疫機能活性化及びがん治療効果の増強が報告されていることから^{27, 71}、ノックダウンする標的因子としての有用性は示されていたが、第一章で記述したように R8/GALA-MEND_{SUV}を用いた SOCS1 ノックダウンでは生着したがんに対する治療効果は認められないという状況であった。がん治療効果が現れない原因として、A20 ノックダウンの場合と同様にノックダウン効率が低いことが考えられるため、YSK12-MEND を用いることにより効率的な SOCS1 ノックダウンを実現し、非ウイルスキャリアを用いた戦略の有用性を示すことが可能であると考えられた。

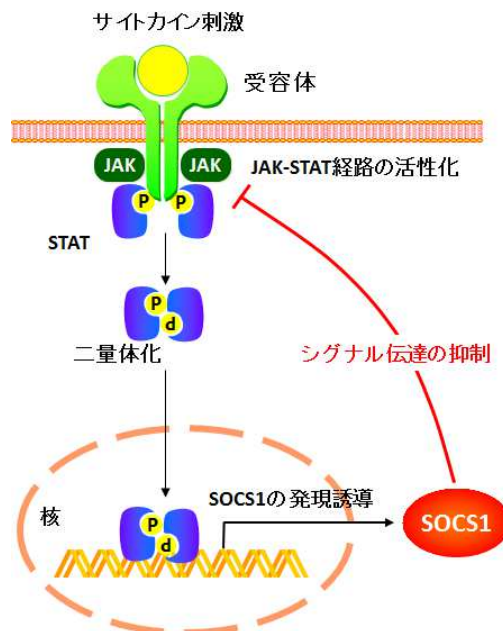


図 25 SOCS1 によるサイトカインシグナル伝達の抑制

SOCS1 は JAK/STAT シグナル経路における JAK に直接結合し、キナーゼ活性の阻害、ユビキチン化誘導による分解などを介して JAK のはたらきを阻害する。その結果、JAK、STAT リン酸化とそれに続くリン酸化 STAT の核移行による標的遺伝子の発現が抑制される。

また、SOCS1 ノックダウンによる免疫機能の増強という DC にがんを攻撃する‘剣’を持たせる戦略と異なる観点から DC 療法の効果増強を目指し、腫瘍内において免疫細胞が受けている免疫抑制作用を回避可能な DC の調製を YSK12-MEND を用いた標的因子ノックダウンにより試みた。腫瘍は、がん細胞だけではなく血管・リンパ管の構成細胞、免疫細胞、線維芽細胞や線維組織などをはじめとした様々な細胞・組織から構成されていることが報告されており、その複雑かつ特徴的な環境から腫瘍内微小環境と呼ばれている⁷² (図 26A)。微小環境を形成することにより、血管新生、増殖因子分泌、細胞外マトリックス分解などを介してがん細胞の成長・転移に適した条件を作り出している。その形成に極めて重要な役割を果たしている TGF- β (Transforming Growth Factor β) は、腫瘍内においてがん細胞をはじめとした様々な細胞から分泌されており、腫瘍内に浸潤する免疫細胞に作用することで、免疫機能の抑制によるがん細胞に対する免疫応答を減弱するはたらきを有することが報告されている⁷³⁻⁷⁵。また、DC の腫瘍への局所投与によりがん細胞に対する免疫応答を誘導しがん治療を行う方法は、footpad に投与する方法と比較して強力であることが実験データから示唆されており (データ未提示)、他のグループにおける採用例も存在することから^{76, 77}、DC 療法における有力な投与経路として候補に挙げられる。しかしながら、TGF- β が DC に作用することでサイトカイン産生や共刺激分子の発現を低下させることが報告されているため⁷⁸ (図 26B)、局所投与した DC の免疫機能が腫瘍内で抑制され、期待される免疫応答が効率的に誘起されていない可能性が考えられた。そのため、投与する DC の TGF- β シグナル伝達を遮断する処理をあらかじめ加えることで TGF- β による免疫抑制から身を守る‘盾’を持たせ、局所投与型 DC 療法の効果をさらに増強することが可能であると考えられた。

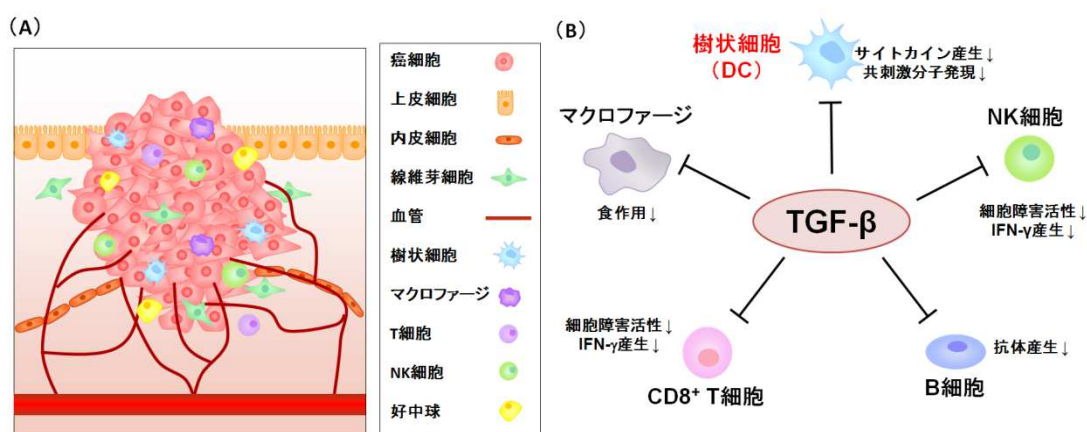


図 26 腫瘍内微小環境の模式図及び免疫細胞に対する TGF- β の作用

(A) 腫瘍内微小環境は、がん細胞だけではなく、線維芽細胞、血管内皮細胞、免疫細胞といった様々な細胞により構成されている。(B) TGF- β は様々な免疫細胞に作用し、その免疫機能を抑制する。DC では、サイトカイン産生や共刺激分子発現等が抑制され、他の免疫細胞を活性化するための免疫機能が減弱する。

本章では、YSK12-MEND を用いて、DC の SOCS1 ノックダウンによる免疫機能活性化及び DC 療法によるがん治療効果の増強を試みた。また、局所投与型 DC 療法の効果増強を目指して、TGF- β 受容体構成因子である TGF β RII ノックダウンによる TGF- β 免疫抑制作用の解除を介したがん治療戦略についても評価した。

3-1 SOCS1 ノックダウン評価

初めに、SOCS1 に対する siRNA を搭載した YSK12-MEND を用いることで、BMDC の SOCS1 ノックダウンが可能であることを確認した。BMDC へ各キャリアをトランスフェクションした 6 時間後、サイトカインシグナルを活性化させ SOCS1 発現量を増加させるために IFN- γ を添加し、その 24 時間後の mRNA を定量的 RT-PCR を用いて定量することでノックダウン効率を算出した。第二章で記述した結果と同様に、LFN や R8/GALA-MEND_{SUV} と比較して YSK12-MEND によるノックダウン効率は高いことが明らかとなった(図 27)。YSK12-MEND を用いることで 3 nM という低い siRNA 濃度で 80%以上の SOCS1 ノックダウンが可能であり、BMDC の免疫機能を大幅に増強していることが予想された。

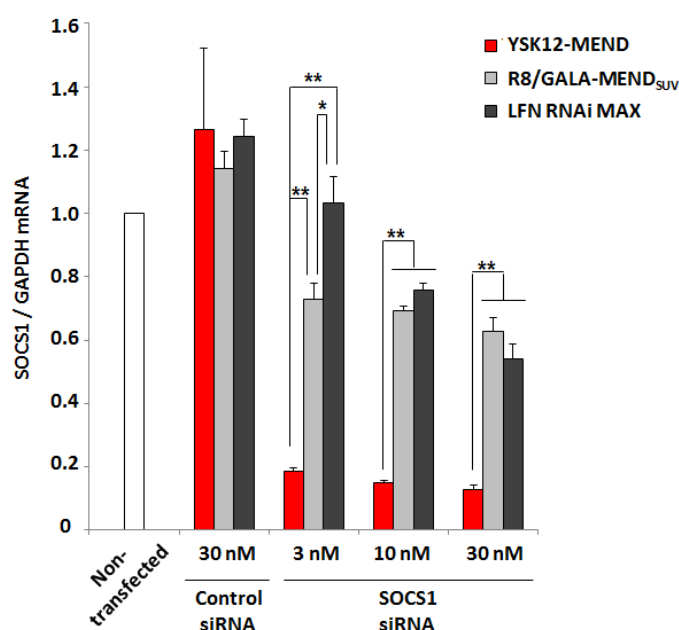


図 27 SOCS1 のノックダウン効率評価

SOCS1 に対する siRNA を各キャリアを用いて BMDC に導入した。6 時間後に IFN- γ (50 ng/mL) を添加し、30 時間後の mRNA 量を定量的 RT-PCR により評価した。縦軸は SOCS1 の mRNA 量を GAPDH の mRNA 量で補正した値を示す。(n=3) ** P <0.01, * P <0.05

3-2 SOCS1 ノックダウン依存的な免疫機能活性化の評価

次に、SOCS1 ノックダウンによる BMDC の免疫機能活性化を評価した。SOCS1 ノックダウンによりサイトカインシグナルが活性化し、サイトカイン産生が上昇すると考えられるため、3-1 で得られた培養上清中に存在する TNF- α 、IL-6 を ELISA 法により定量した。LFN や R8/GALA-MEND_{SUV} を用いた場合には siRNA 濃度を上昇させることによる TNF- α 、IL-6 産生の増加は認められなかったが、YSK12-MEND を用いることで siRNA の濃度依存的な産生増加が認められた (図 28)。Control siRNA を搭載した YSK12-MEND を用いた

場合では、IL-6 産生がノックダウン群ほど顕著ではないものの増加した一方、TNF- α 産生の増加は認められなかった。Control siRNA を搭載した YSK12-MEND による IL-6 の産生増加は、3-3 で後述する SOCS1 ノックダウン非依存的な免疫機能活性化による影響を受けたためと考えられる。

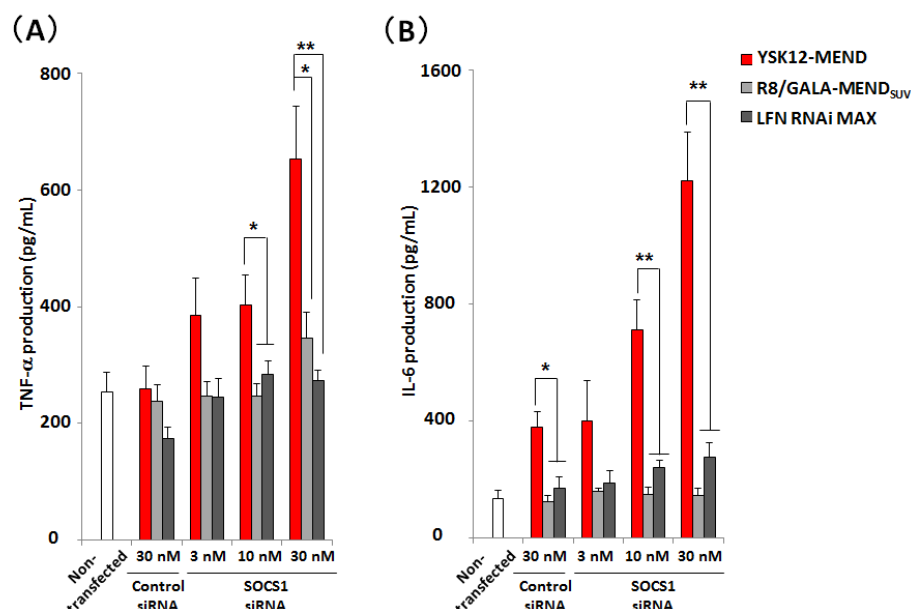


図 28 SOCS1 をノックダウンした BMDC によるサイトカイン産生評価

SOCS1 に対する siRNA を各キャリアを用いて BMDC に導入した。6 時間後に IFN- γ を添加し、24 時間後の上清中の(A) TNF- α 、(B) IL-6 を ELISA 法により定量した。 (n=3) ** P <0.01, * P <0.05

3-3 SOCS1 ノックダウン非依存的な免疫機能活性化の評価

また、siRNA キャリア自身が有する免疫機能活性化能も評価した。第二章の 2-7、2-10 において、YSK12-MEND をトランスフェクションした BMDC ではエンドソーム膜破壊による細胞質への Cathepsin B 漏出が誘起されていることが示された。Cathepsin B 漏出は、細胞質に存在する NLRP3 インフラマソームの活性化による IL-18 産生をはじめとする様々な免疫応答を誘導することが報告されている^{79, 80}。そこで、3-1 で得られた培養上清中に存在する IL-18 を ELISA 法により定量した。LFN や R8/GALA-MEND_{SUV} を用いた場合にはほとんど増加しなかった IL-18 産生が、YSK12-MEND を用いることで siRNA の濃度依存的に増加した (図 29)。Control siRNA を用いた場合においてもほぼ同等の産生増加が認められたことから、YSK12-MEND による IL-18 産生誘導は、SOCS1 ノックダウンに起因するものではなく、キャリア自身が有する性質によるものであることが示唆された。さらに、Cathepsin B の阻害剤を用いることで IL-18 産生が完全に抑制された (データ未提示) ことから、YSK12-MEND は膜破壊を介した Cathepsin B 漏出により、IL-18 産生を誘導していることが明らかとなった。

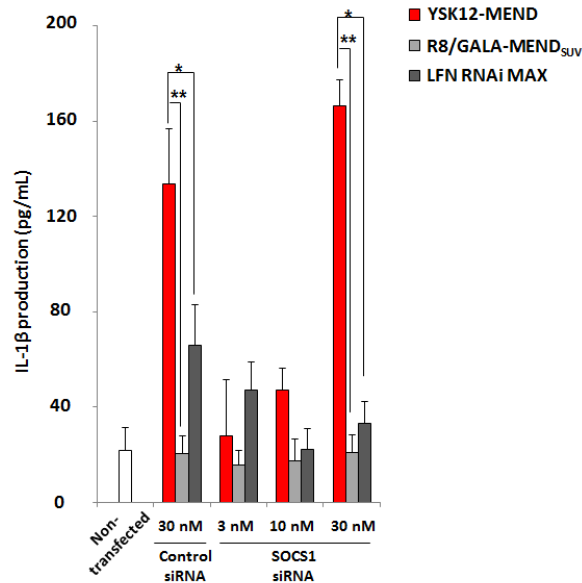


図 29 キャリアのトランスフェクションによるサイトカイン産生への影響
SOCS1 に対する siRNA を各キャリアを用いて BMDC に導入した。6 時間後に IFN- γ を添加し、24 時間後の上清中の IL-1 β を ELISA 法により定量した。(n=3) ** P <0.01, * P <0.05

3-4 SOCS1 ノックダウン BMDC の投与による予防的抗腫瘍活性の評価

YSK12-MEND を用いることで SOCS1 ノックダウン依存的・非依存的に BMDC の免疫機能を大幅に活性化させることに成功したので、DC 療法の効果を増強することが可能であるか評価した。初めに、がん細胞を移植する前に BMDC 投与による免疫を行う方法である予防的な抗腫瘍活性の評価を行った。*in vitro*において各キャリアを用いた SOCS1 ノックダウン及び OVA 抗原タンパク質・ペプチド・アジュバント (polyI:C) 添加による免疫機能活性化を施した BMDC を footpad に投与した 7 日後に、OVA 抗原ペプチドを MHC 分子上に提示するがん細胞である E.G.7-OVA をマウスに移植し、その後の腫瘍体積を経時的に測定した。LFN、R8/GALA-MEND_{SUV} をトランスフェクションした BMDC や Control siRNA を搭載した YSK12-MEND をトランスフェクションした BMDC を投与した群では、20 日程度の腫瘍成長抑制効果を示した。それに対して、YSK12-MEND により SOCS1 をノックダウンした BMDC を投与した群では、移植 30 日以降においても腫瘍成長が認められない完全な予防効果を示した (図 30)。この結果から、YSK12-MEND による SOCS1 ノックダウンは DC 療法の効果を増強する有用な手段である可能性が示唆された。

3-5 SOCS1 ノックダウン BMDC の投与による生着したがん治療効果の評価

3-4 において、YSK12-MEND を用いた SOCS1 ノックダウン BMDC の投与により、R8/GALA-MEND_{SUV} を用いた場合を大幅に上回る予防効果が得られたため、

R8/GALA-MEND_{SUV} では成し得なかった生着したがんに対する治療効果の誘導が期待された。E.G.7-OVA をマウスに移植した 4、7、15 日後に、3-4 で記述した方法で免疫機能活性化を施した BMDC を footpad に投与し、その後の腫瘍体積を経時的に測定した。その結果、YSK12-MEND を用いて SOCS1 をノックダウンすることで、BMDC 投与による生着したがんに対する治療効果の増強に成功した (図 31)。このことから、YSK12-MEND は DC 療法の効果を増強することが可能な非ウイルスキャリアであることが示唆された。

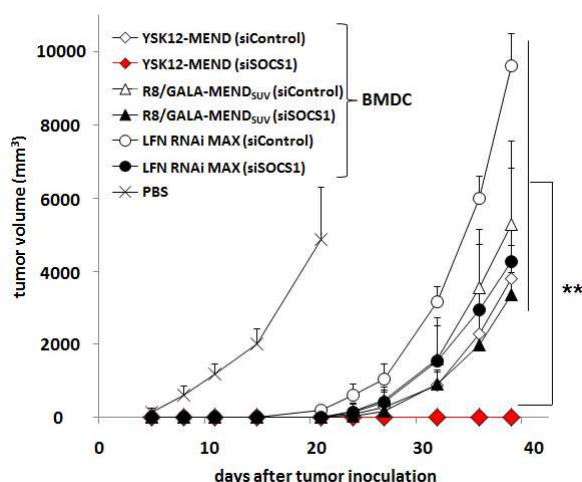


図 30 活性化 BMDC の投与による予防的な抗腫瘍活性評価

SOCS1 に対する siRNA を各キャリアを用いて BMDC に導入した。6 時間後に OVA ペプチドと OVA タンパク質を添加し、polyI:C (500 ng/mL) で刺激後、マウスの footpad に投与した (4.0×10^5 cells)。7 日後に E.G.7-OVA (1.0×10^6 cells) を皮下に移植し、経時的に腫瘍の大きさを測定した。縦軸は腫瘍の長径と短径より算出した腫瘍体積を示す。(n=3-5) ** $P < 0.01$

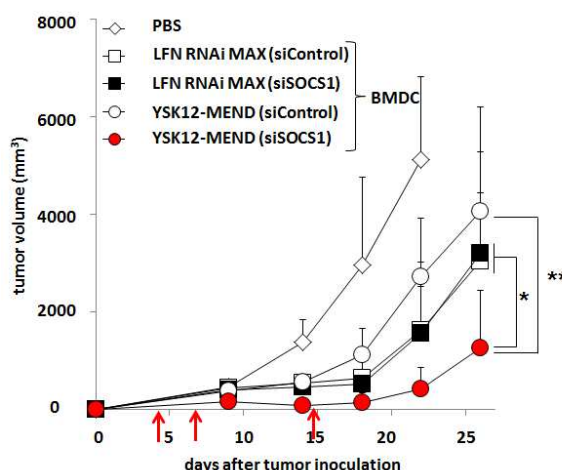


図 31 活性化 BMDC の投与による生着したがんに対する治療効果の評価

E.G.7-OVA (1.0×10^6 cells) を皮下に移植した 4、7、15 日後に、図 30 における実験と同様の方法で活性化した BMDC をマウスの footpad に投与し (3.0×10^5 cells)、その後経時的に腫瘍の大きさを測定した。縦軸は腫瘍の長径と短径より算出した腫瘍体積を示す。赤色矢印は BMDC を投与した日を示す。(n=5) ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

3-6 TGFβRII ノックダウン評価

腫瘍環境を考慮した DC 療法の効果増強戦略を実現するため、YSK12-MEND を用いた受容体構成因子 TGF β RII ノックダウンによる BMDC の TGF- β シグナルの遮断を試みた。BMDC へ YSK12-MEND を用いて TGF β RII に対する siRNA をトランスフェクションし、24 時間後に発現している mRNA を定量的 RT-PCR により定量することでノックダウン効率を算出した。SR-B1、SOCS1 の場合と同様に、YSK12-MEND を用いることで TGF β RII の効率的なノックダウンに成功した (図 32)。TGF- β 処理による BMDC の免疫機能 (サイトカイン産生) 低下が TGF β RII ノックダウンにより回避されたことから、戦略通りに TGF- β シグナルが遮断されたことが示唆された。

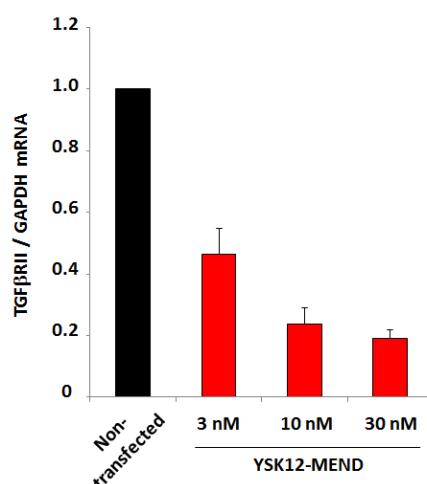


図 32 YSK12-MEND を用いた TGF β RII ノックダウン評価

TGF β RII に対する siRNA を YSK12-MEND を用いて BMDC に導入し、24 時間後の mRNA 量を定量的 RT-PCR により評価した。縦軸は TGF β RII の mRNA 量を GAPDH の mRNA 量で補正した値を示す。

3-7 TGF β RII ノックダウン BMDC の投与による生着したがん治療効果の評価

最後に、*in vitro* において TGF β RII をノックダウンした BMDC を腫瘍に局所投与することによる治療効果を評価した。本検討では、TGF- β を分泌することが確認されている (データ未提示) E.G.7-OVA を用いた。E.G.7-OVA を移植した 6、9、13、16 日後に、YSK12-MEND を用いた TGF β RII ノックダウン及び OVA 抗原タンパク質・ペプチド・アジュバント (polyI:C) 添加による免疫機能活性化を施した BMDC を腫瘍に局所投与し、その後の腫瘍体積を経時的に測定した。その結果、YSK12-MEND を用いて TGF β RII をノックダウンすることで、BMDC 投与による生着したがんに対する治療効果の増強に成功した (図 33)。この結果は、投与された BMDC が腫瘍環境における TGF- β の免疫抑制作用を回避し、本来の免疫機能を発揮することでがん細胞に対する免疫応答を効率的に誘導したことに起因すると推察される。

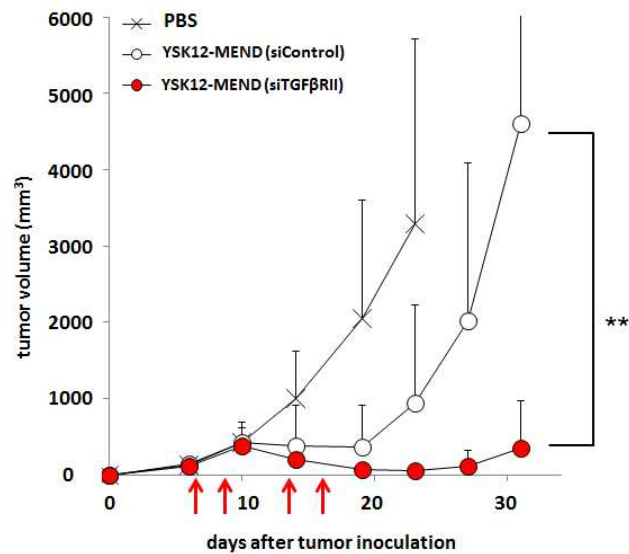


図 33 TGFβRII ノックダウン BMDC の局所投与による抗腫瘍活性評価

E.G.7-OVA (8.0×10^5 cells) を皮下に移植した。その 6、9、13、16 日後に、TGFβRII に対する siRNA を各キャリアを用いて BMDC に導入し、6 時間後に OVA ペプチドと OVA タンパク質を添加し、polyI:C (500 ng/mL) で刺激した BMDC を腫瘍へ局所投与した (4.0×10^5 cells)。その後、経時的に腫瘍の大きさを測定した。縦軸は腫瘍の長径と短径より算出した腫瘍体積を示す。(n=4-5) **P<0.01

第三章 小括

第三章では、非ウイルスキャリアを用いた免疫抑制性因子ノックダウンによる DC 療法の効果増強戦略の実現を目指して、第二章において開発した YSK12-MEND の応用を試みた。YSK12-MEND を用いることで、BMDC に発現する免疫抑制性関連因子の効率的なノックダウン及び BMDC の免疫機能の増強・回復に成功した。さらに、これらの BMDC を用いた免疫を行うことで、生着したがんに対する治療効果を挙げることに成功した。SOCS1 ノックダウンと TGFβRII ノックダウンによる BMDC の免疫機能の活性化コンセプトは異なっているため、SOCS1 と TGFβRII の同時ノックダウンにより DC に‘剣’と‘盾’の両方を持たせることで、相乗的な機能活性化によるさらなるがん治療効果の増強が期待される。本章で得られた結果は、従来不可能であった非ウイルスキャリアを用いた生着がんに対する治療を可能にしたものであり、そのインパクトは高い。

総括

【総括】

本研究では、MEND を基盤技術として DC への効率的な siRNA 導入を可能とする新規非ウイルスキャリアを開発し、DC 療法の効果増強を目的とした免疫抑制性因子ノックダウン戦略の有用性を示すことを目指した。

第一章では、R8/GALA-MEND_{SUV}を用いた A20 ノックダウンにより、DC 療法で用いる DC の免疫機能を増強することを試みた。その結果、BMDC の A20 ノックダウン及び免疫機能活性化には成功したが、A20 をノックダウンした BMDC の投与による抗腫瘍活性の増強は認められなかった。R8/GALA-MEND_{SUV}を用いることで得られた A20 ノックダウン活性は 40%程度であり、ウイルスキャリアにより得られる 90%以上のノックダウン活性と比較して顕著に低いことが、A20 ノックダウンによる免疫機能の増強効果を弱め DC 療法の効果が現れない原因となっていると考えられた。そのため第二章では、R8/GALA-MEND_{SUV}以上に DC への効率的な siRNA 導入を可能とする非ウイルスキャリアの開発を目指した。キャリアの脂質膜に組み込むことで優れた siRNA 送達・導入を実現することが報告されている YSK05 の構造を部分的に有する YSK12 に着目し、YSK12 を脂質膜に組み込んだ YSK12-MEND を新たに構築することで、R8/GALA-MEND_{SUV}や世界最高水準の siRNA 導入試薬である LFN と比較して BMDC への siRNA 導入効率を飛躍的に高めることに成功した。第三章では、第二章において開発した YSK12-MEND を用いて免疫抑制関連因子のノックダウンによる DC の免疫機能活性化及び DC 療法の効果増強を試みた。効率的な SOCS1 ノックダウンにより BMDC のサイトカイン産生及び BMDC を用いたがん治療効果を増強し、効率的な TGFβRII ノックダウンにより TGF-β による免疫抑制作用の解除及び BMDC の局所投与によるがん治療効果を増強した。

本研究で開発に成功した YSK12-MEND は、非ウイルスキャリアによる導入が非常に困難である DC への効率的な siRNA 導入を可能とした画期的な新規キャリアである。また、免疫抑制性因子ノックダウンを介した DC 療法の有用性を複数の観点から示すことに成功したことは、非ウイルスキャリアを用いた DC 療法の効果増強戦略の臨床への応用に向けた大きな一歩であると考えられる。

実際に、YSK12-MEND は世界トップクラスの siRNA 導入効率を示したことから、実用化が期待できる。YSK12-MEND の無菌的かつ大量製造法の確立を行うことで、DC 療法のための医薬品や研究用の siRNA 導入試薬への道が拓けるであろう。

本研究で得られた成果は、今現在も効果増強を目指した検討が盛んに行われている DC 療法に関する研究を大きく進展させるものであると確信している。将来的に、実用化された YSK12-MEND を用いた DC 療法が、がん医療の大きな転換となり得る治療成果の実現により多くの人々の健康に貢献することを願ってやまない。

結語

【結語】

本研究で得られた知見を以下にまとめる。

○新規合成脂質 YSK12 を含有する YSK12-MEND を開発することで、BMDC への効率的な siRNA 導入を実現した

○YSK12-MEND は、膜破壊を介して siRNA のエンドソーム脱出を促進した

○YSK12-MEND を用いて BMDC の SOCS1 をノックダウンすることで、BMDC の免疫機能の飛躍的な増強に成功した

○YSK12-MEND は、免疫抑制性関連因子ノックダウンによる DC 療法の効果増強に用いる非ウイルスキャリアとして有用であることを示した

実験方法

【実験方法】

1 試薬・細胞・動物

1-1 脂質類

DOPE、Cholesterol は Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) から購入した。CHEMS、PA は SIGMA Aldrich (St Louis, MO) から購入した。EPC、POPE、PEG2000-DMG は日油 (Tokyo, JAPAN) から購入した。

1-2 合成品

STR-R8 (Stearyl-RRRRRRRR-NH₂, Mw 1532)、OVA の H-2K^b CD8 エピトープである OVA257-264 ペプチド (H-SIINFELK-OH) は倉敷紡績 (Osaka, JAPAN) に合成を依頼した。Chol-GALA (Cholesteryl-WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA) は倉敷紡績に合成を依頼し、HPLC により精製した。YSK12 は図 34 の反応式に従って合成した。

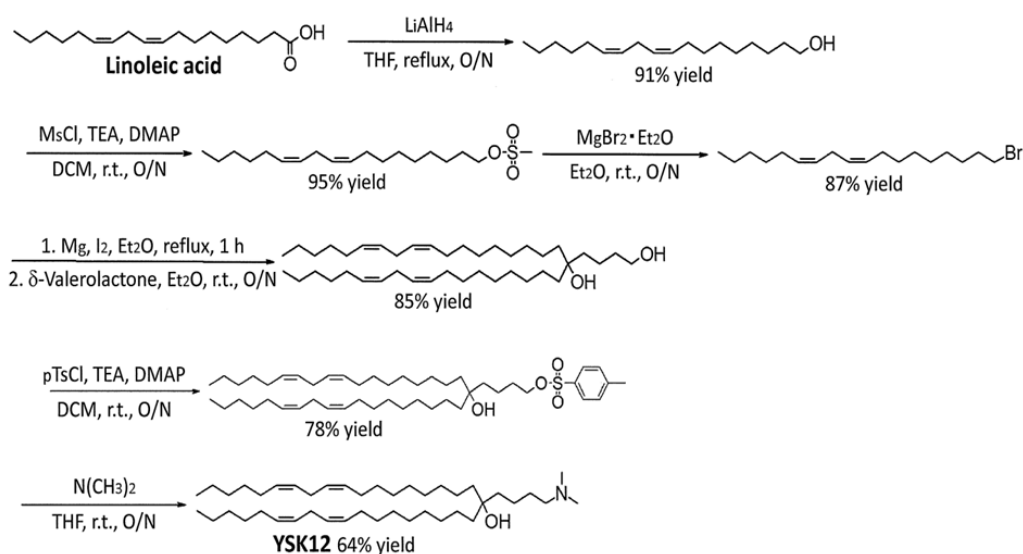


図 34 YSK12 の合成経路

1-3 蛍光色素

DiI、DiO、LysoTracker Red、RiboGreen は invitrogen (Carlsbad, CA) より購入した。Cy5 は TaKaRa Bio (Shiga, JAPAN) より購入した。

1-4 細胞培養

ダルベッコ PBS (-)は日水製薬より購入した。LPS、polyI:C、endotoxin (-) PBS は SIGMA Aldrich より購入した。Recombinant mouse GM-CSF は R&D Systems (Basel, Switzerland) より購入し、endotoxin (-) PBS に溶解後分注して-80℃で保存した。G418 二硫酸塩はナカライテスクより購入した。IFN- γ は PeproTech (Rocky Hill, NJ) より購入した。OPTI-MEM は Invitrogen より購入した。

1-5 抗体

FITC anti-mouse CD11c (由来 Armenian Hamster, クローン N418)、FITC Armenian Hamster IgG isotype control (クローン HTK888) は BioLegend (San Diego, CA) より購入した。mouse IgG κ は SIGMA より購入した。

1-6 その他の試薬

OVA、digitonin は SIGMA Aldrich より購入した。DEPC 処理水はナカライテスク (Kyoto, JAPAN) より購入した。ヘパリンナトリウムは和光純薬 (Osaka, JAPAN) より購入した。

1-7 細胞

E.G.7-OVA は ATCC (Manassas, VA) より購入した。

1-8 マウス

C57BL/6 (H-2K^b)マウス雌 6~10 週齢を日本 SLC または日本クレアより購入した。マウスは全て SPF 環境下で飼育したものを用いた。動物実験は国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に基づき実施した。

その他、特に記述がない限り、市販の特級、または一級のもの、あるいはそれに準ずるものをを用いた。

2 機器

遠心分離には、EX-125 (TOMY)、MX305 (TOMY)、MX200 (TOMY)、3520 (KUBOTA)、5922 (KUBOTA)、CF7D2 (HITACHI) のいずれかを用いた。CO₂ インキュベーターとして、MCO-19AIC (SANYO) を用いた。蛍光強度の測定には、Enspire 2300 Multilabel Reader (PerkinElmer) を用いた。吸光度の測定には、Nano drop (Thermo Scientific) を用いた。粒子径・ ζ 電位の測定には、ZETA SIZER Nano-ZS (Malvern) を用いた。超音波処理には、浴槽型ソニケーターAU25C (アイワ医科工業) 及びプローブ型ソニケーター

SONIFIER MODEL 250D (BRANSON) を用いた。フローサイトメーターには、FACS Calibur (Becton Dickinson) を用いた。共焦点レーザー顕微鏡として、FV10i-LIV (OLYMPUS) を用いた。リアルタイム PCR には、Stratagene MX3005P (Agilent Technologies)、LightCycler 480 (Roche) のいずれかを用いた。

3 試薬調製

非働化胎児牛血清 (FBS)

胎児牛血清を 4℃で溶解し、56℃で 30 分間加熱を行った後、50 mL ずつ分注し-20℃で保存した。

FACS buffer

オートクレーブ滅菌した PBS に 0.1 % NaN₃ 及び 0.5 % BSA を添加し、4℃で保存した。

細胞培養の培地

[樹状細胞、E.G.7-OVA 細胞]

RPMI-1640 (SIGMA) 500 mL

HEPES buffer (1 M, SIGMA) 5 mL

2-Mercaptoethanol (0.55 mM, Invitrogen) 0.5 mL

penicillin/streptomycin (100×, SIGMA) 5 mL

sodium pyruvate (100 mM, SIGMA) 5 mL

FBS 50 mL

G418 400 µg/mL (E.G.7-OVA 細胞のみ)

10 mM HEPES buffer

HEPES 119 mg を秤量し、DDW 40 mL に溶解後、1 N NaOH で pH 7.4 に合わせた。DDW で 50 mL にメスアップし、0.2 µm のフィルターろ過により滅菌し、4℃で保存した。

20 mM クエン酸 buffer

無水クエン酸 192 mg を秤量し、DDW 40 mL に溶解後、1 N NaOH で pH 6.0 に合わせた。DDW で 50 mL にメスアップし、0.2 µm のフィルターろ過により滅菌し、4℃で保存した。

20 U/mL Heparin 溶液

ヘパリン 3.07 mg を DDW 20 mL に溶解した。

4 一般操作

細胞培養 (E.G.7-OVA 細胞)

E.G.7-OVA 細胞は、培地の色が赤からオレンジに変色するのを目安に、継代を行った。細胞を 50 mL コニカルチューブに回収し遠心分離 ($180 \times g$, 5 min) した。上清を除去し、細胞を計数後、細胞を 5×10^5 cells/10 mL の濃度で非コーティングシャーレに添加し、 37°C 、5 % CO_2 条件下で培養した。細胞のストックは 1×10^6 cells/mL となるように 10 % DMSO 培地に懸濁し、1 mL ずつ分注して液体窒素中で保存した。

マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) の誘導

滅菌シャーレに RPMI1640 培地及び PBS をそれぞれ 10 mL 添加し、頸椎脱臼した C57BL/6 マウス (6~10 週齢) より大腿骨及び頸骨を摘出し、70%エタノールで軽く消毒した後、PBS に浸した。骨の両端を切断し、培地入りの 1 mL シリンジ (26 G 針) で骨髄細胞を培地中に押し出した。細胞懸濁液を $40 \mu\text{m}$ のセルストレイナー (FALCON) を通して 50 mL コニカルチューブに移した。遠心分離 ($450 \times g$, 4°C , 5 min) 後上清を除去し、タッピングして細胞を分散させた後、ACK Lysing Buffer (Lonza, Walkersville, MD) 1 mL を添加、混合し、室温で 3~5 分間静置した。培地 10 mL を添加後、遠心分離して上清を除去し、さらに培地 10 mL で 2 回洗浄した。次に、細胞を培地 10 mL に懸濁し、10 cm 細胞培養ディッシュ (FALCON) に添加し、 37°C 、5 % CO_2 条件下で 4 時間以上培養した。軽くピペッティングして浮遊細胞のみを 50 mL コニカルチューブに回収し、遠心分離、上清除去後、培地 10 mL に懸濁して計数した。 1×10^6 cells/mL となるよう培地に懸濁し、GM-CSF (終濃度 10 ng/mL) を添加後、24 well plate (Corning, NY) に 1 mL ずつ播種し、 37°C 、5 % CO_2 条件下で 2 日間培養した。2 日後及び 4 日後に細胞の凝集塊を残し浮遊細胞を除去した後、新しい GM-CSF 含有 RPMI1640 培地 1 mL を添加した。GM-CSF 存在下で培養開始後 6~7 日目の浮遊及び弱付着細胞を未成熟樹状細胞 (BMDC) として実験に用いた。CD11c 抗体を用いた評価では純度は 85 %であった。

5 第一章の実験

siRNA 配列

A20 に対する siRNA は QIAGEN より、Control siRNA は invitrogen より購入し、DEPC 処理水に溶解後分注して凍結保存した。

[Anti-A20 siRNA]

Sense CAAAGUAAUAGUCUAUUATT

Antisense UAAUAGACUAUUAACUUUGAA

[Control siRNA]

Sense UACGCGUCAAUCCGUGAUUCCUCUU

Antisense AAGAGGAAUCACGGAUUGACGCGUA

R8/GALA-MEND_{SUV} の調製

ガラス試験管に DOPE/PA/Chol-GALA (モル比 7:2、1 mol%) からなる脂質薄膜を調製し、DEPC 処理水を脂質濃度が 0.55 mM となるように添加後、室温で 10 分間以上水和した。浴槽型のソニケーターで約 1 分間、さらにプローブ型のソニケーターで 10 分間超音波処理を行った。これをマイクロチューブに移し、遠心分離 (20000 × g、25 °C、5 min) 後、上清をマイクロチューブに回収した。この操作を 3 回繰り返し、プローブから混入したチタン等を除き SUV 溶液とした。

20 μM A20 siRNA 10 μL を DEPC 処理水 16.6 μL で、2 mg/mL STR-R8 2.73 μL を DEPC 処理水 51.9 μL でそれぞれ希釈し、STR-R8 溶液をボルテックスミキサーで混合しながら siRNA 溶液を徐々に添加し、コアを調整した (Charge ratio = 3.4)。コアを調製した 10 分後、SUV 100 μL にコア 50 μL を添加し、ボルテックスミキサーにより混合することで R8/GALA-MEND_{SUV} とした。最後に、2 mg/mL STR-R8 を脂質モル濃度の 10% (4.22 μL) 添加し、ピペッティングにより混合し室温で 30 分間以上インキュベートした。

R8/GALA-MEND_{SUV} のトランスフェクションによる A20 ノックダウン評価

誘導した BMDC を回収し計数後、OPTI-MEM 培地に 6×10^6 cells/mL の濃度で懸濁した。12 well plate (SUMILON) に GM-CSF (培地中終濃度 10 ng/mL) 及び OPTI-MEM 培地を添加し、細胞懸濁液 0.2 mL (1.2×10^6 cells/mL) を添加した。最後に R8/GALA-MEND_{SUV} (40、80 nM siRNA) を添加して全量を 0.5 mL とし、37 °C、5% CO₂ 条件下で 2 時間インキュベートした。その後、GM-CSF 含有 RPMI1640 培地 0.5 mL を添加しさらに 2 時間培養し、培地を新しいものに交換した。さらに 2 時間培養し、LPS を 100 ng/mL で添加した。24 時間後に細胞をマイクロチューブに回収し、遠心分離 (500 × g、4 °C、5 min)、上清を除去後、後述の RNeasy mini kit の Lysis buffer と 2-Mercaptoethanol を 100 : 1 で混合したものを 350 μL 添加し vortex した後、-80 °C で凍結保存した。

RNA の抽出は RNeasy mini kit (QIAGEN) を用い、添付の方法に従って行った。分注した RNA 溶液 85 μL に 10 × DNase I buffer (TaKaRa Bio) 10 μL、Ribonuclease inhibitor (TaKaRa Bio) 1 μL、DNase I (1 unit/μL、TaKaRa Bio) 4 μL を添加し、37 °C で 2 時間インキュベートした。その後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製後、Nano drop を用いて吸光度を測定することで濃度及び純度を算出した。逆転写は、PrimeScript RT reagent kit (TaKaRa Bio) のオリゴ dT プライマーを用いて添付の方法に従って行った。得られた cDNA を下記の組成で混合し、リアルタイム PCR により定量した。GAPDH を内因性遺伝子として、 $\Delta\Delta Ct$ 法による相対定量を用いて A20 の mRNA 量を算

出した。実験は、triplicate で 3 回行い、データはその mean $\pm$ SEM で示した。

[反応液]

cDNA

(+) primer (10 μ M) 0.5 μ L

(-) primer (10 μ M) 0.5 μ L

SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO) 12.5 μ L

DDW

Total 25 μ L

[反応条件]

95 °C, 10 min に続き、95 °C, 15 min と 60 °C, 1 min を 40 サイクル繰り返した。

[プライマー] (GAPDH、A20 : SIGMA Aldrich に合成を依頼)

GAPDH (+) AACTTTGGCATTGTGGAAGG

GAPDH (-) GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT

A20 (+) TGCGGAAAGCTGTGAAGATA

A20 (-) TCTGAACATCTCCAGCGTGT

サイトカイン産生の評価

上記の A20 に対する RNAi 効果評価の項に示した方法で導入後 (40、80 nM)、LPS による刺激を行い、24 時間後の培養上清を回収した。上清中の TNF- α を Quantikine (R&D systems) を用いて定量した。実験は 3 回行い、未処理の群の TNF- α 産生量を 1 としたときの mean $\pm$ SEM をデータとして示した。

樹状細胞の共刺激分子発現評価

上記の A20 に対する RNAi 効果評価の項に示した方法で導入後 (80 nM)、LPS による刺激を行い、24 時間後の BMDC を群毎に 15 mL コニカルチューブに回収した。遠心分離 (500 $\times$ g, 4 °C, 5 min) し上清を除去後、FACS buffer に懸濁、細胞計数し、5 $\times$ 10⁵ cells/tube となるようにマイクロチューブに分取した。FACS buffer 0.5 mL で洗浄後、mouse IgG1, κ (5 μ g/mL, FACS buffer) 溶液を 50 μ L/tube で添加し、4 °C で 30 分間インキュベートした。その後、FACS buffer 1 mL で 2 回洗浄し、細胞を各 FITC 標識化抗体 50 μ L (5 μ g/mL, FACS buffer) に懸濁し、4 °C で遮光条件下 30 分間インキュベートした。その後、FACS buffer 1 mL で 2 回洗浄し、FACS buffer 500 μ L に懸濁しナイロンメッシュを用いて濾過後、フローサイトメーターを用いて蛍光強度を測定した。抗体は、FITC anti-mouse CD80、FITC Armenian Hamster IgG Isotype Control、FITC anti-mouse CD86、FITC Rat IgG2a

Isotype Control (eBioscience) 及び mouse IgG1 κ (SIGMA) を用いた。

細胞毒性評価

トランスフェクションによる細胞毒性を、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (TaKaRa Bio) を用いて細胞生存率を計測することで評価した。

上記の A20 に対する RNAi 効果評価の項に示した方法 (6×10^5 cells/well, 24 well plate) で導入後 (40, 80 nM)、4 時間後に培地を除去し、RPMI1640 培地と WST-1 reagent を 10:1 で混合したものを 250 μ L 添加し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で 2.5 時間培養した。その後、450 nm (630 nm で補正) における吸光度を測定した。

A20 をノックダウンした BMDC の投与による予防的な抗腫瘍活性評価

BMDC に R8/GALA-MEND_{SUV} を濃度が 80 nM siRNA/ 1.2×10^6 cells $\cdot$ 500 μ L OPTI-MEM となるように導入し、4 時間後に血清入り培地と交換した。その 2 時間後に OVA (終濃度 50 μ g/mL) および OVA class I ペプチド (終濃度 0.75 μ M) を添加し、37 °C、5% CO₂ 条件下で 30 分間培養した。LPS を 500 ng/mL となるように添加し、さらに 1 時間培養後、細胞を 15 mL コニカルチューブに回収し、PBS 3 mL で 2 回洗浄した。C57BL/6J マウスの footpad に PBS に懸濁した BMDC (4.0×10^5 cells/40 μ L) をエーテル麻酔下で投与した。その 7 日後に E.G.7-OVA 細胞をマウスのわき腹皮下に移植した (8.0×10^5 cells/40 μ L $\cdot$ mouse, 26G 針)。その後のがんの大きさを経時的に計測し Tumor volume (mm³) = 長径 $\times$ 短径 $\times$ 短径 $\times$ 0.52 の式により体積を算出した。

6 第二章の実験

siRNA 配列

SR-B1 に対する siRNA は北海道システムサイエンスより購入し、DEPC 処理水に溶解後分注して凍結保存した。

[Anti-SR-B1 siRNA]

Sense GUCGCAUGGCUCAGAGAGUTT

Antisense ACUCUCUGAGCCAUGCGACTT

RiboGreen Assay

0 ~ 2000 ng siRNA/mL となるように siRNA 検量線を調製した。各 MEND 溶液は 1000 ng siRNA/mL となるように希釈した。また検出用溶液は、10 mM HEPES buffer 915 (875) μ L、1 mg/mL デキストラン硫酸 80 μ L、10% triton (40 μ L)、RiboGreen 5 μ L を混合し調

製した ((内は triton(+))の検出用溶液調製時の量)。96 well plate に、段階希釈溶液または MEND 溶液を 50 μ L、そして検出用溶液 50 μ L を混合し、5 min、700 rpm で振とうした。その後、プレートリーダーを用いて測定した (Ex/Em : 500/525 nm)。回収率は、(全 siRNA の濃度) / (100%回収時の濃度) で算出した。

YSK12-MEND の調製

YSK12-MEND は t-BuOH 希釈法により調製した。マイクロチューブに規定した脂質組成となるように各脂質溶液を調製した。また、別のマイクロチューブに 8 μ g 分の siRNA と DEPC 処理水を混合し 200 μ L とした siRNA 溶液を調製した。脂質溶液を vortex しながら siRNA 溶液を徐々に添加し、その後 1 mL シリンジ (27G) にとり、20 mM クエン酸 buffer (pH 6.0) 2 mL が入った 15 mL チューブを vortex しているところへ徐々に注入した。その後 PBS 3.5 mL を添加し、あらかじめ PBS 7mL の入った Amicon Ultra-15-100K にデカントで移した。PBS 3.5 mL で 15 mL チューブを共洗いし、同様にデカントで Amicon Ultra-15-100K に移した。1000 $\times$ g、室温、12 min で遠心し、その後 PBS 12 mL を添加し、再度 1000 $\times$ g、室温、12 min で遠心した (MEND 溶液が 500 μ L 程度になるまで)。MEND を回収後、適量の PBS でフィルターを共洗いすることで MEND の volume を調節した。DiI、DiO 修飾した YSK12-MEND を調製する場合は、総脂質の 1 mol%に相当する DiI、DiO を脂質溶液に加え、それ以降は上記と同様に行った。

BMDC における SR-B1 ノックダウン評価

誘導した BMDC を回収し計数後、OPTI-MEM 培地に 6×10^6 cells/mL の濃度で懸濁した。12 well plate (SUMILON) に GM-CSF (培地中終濃度 10 ng/mL) 及び OPTI-MEM 培地を添加し、細胞懸濁液 0.1 mL (6.0×10^5 cells/mL) を添加した。最後に siRNA キャリア (YSK12-MEND、LFN RNAi MAX、R8/GALA-MEND_{SUV}) を適切な siRNA 濃度となるように添加して全量を 0.5 mL とし、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下で 2 時間インキュベートした。その後、GM-CSF 含有 RPMI1640 培地 0.5 mL を添加しさらに 24 時間培養した。BMDC をマイクロチューブに回収し、遠心分離 (800 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、3 min)、上清を除去後、第一章の項で記述した RNA 抽出及び定量的 RT-PCR の方法に従ってノックダウン活性を算出した。

[プライマー] (SR-B1 : SIGMA Aldrich に合成を依頼)

SR-B1 (+) TCCAGCCTGACAAGTCGCATGG

SR-B1 (-) GCTTGCTCTCCATCAATATCGAGCC

毒性評価

siRNA の毒性評価には、Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay

(Promega) を使用した (代謝活性がある細胞のデヒドロゲナーゼによって産生される NADPH または NADH によって行われる化合物の変換を利用し、細胞の生存率を測定するアッセイ)。BMDC (1×10^5 cells) と適切な濃度の siRNA キャリアを混合した OPTI-MEM 培地 100 μ L を添加した 96 well plate に、Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent を 20 μ L ずつ添加・混合し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で 2 時間インキュベートした。その後、プレートリーダーで 490 nm の吸光を測定した。細胞有無補正済み Non Treatment サンプルの吸光度を 100% とし、各サンプルの吸光度から細胞生存率を求めた。

定量的 siRNA 取り込み評価

BMDC を回収し計数後、OPTI-MEM 培地に 4×10^6 cells/mL の濃度で懸濁した。1.7 mL マイクロチューブに細胞懸濁液 50 μ L (2×10^5 cells) を添加後、DiI ラベル化 siRNA キャリアを添加して全量を 0.1 mL とした。37 °C、5 % CO₂ 条件下で所定の時間インキュベート後、細胞画分、上清画分、全体画分を調製し、RLB 5 $\times$ を 25 μ L/tube で添加した。サンプルを凍結融解し 100 μ L を 96 well plate に添加し、プレートリーダーで DiI の蛍光を測定した。上清を除去した①BMDC の蛍光強度と、②上清と BMDC の両者を含有する画分の蛍光強度をそれぞれ測定し、①を②で除し siRNA 添加量を掛けることで siRNA 取り込み量を算出した。

$$\text{siRNA 取り込み量 (pmol)} = \frac{\text{細胞画分の蛍光強度}}{\text{全体の蛍光強度}} \times \text{siRNA dose}$$

siRNA 取り込み機構評価

Cy5 ラベル化 siRNA を搭載した siRNA キャリアをガラスベース dish 上で DC にトランスフェクション (60 nM、 2.0×10^6 cells) し、37 °C、5 % CO₂ 条件または 4 °C 条件下で 3 時間インキュベートした。20 U/mL ヘパリン溶液で洗浄後、FV10i-LIV を用いて観察した。

CLSM 観察

Cy5 ラベル化 siRNA を搭載した siRNA キャリアをマイクロチューブ内で DC にトランスフェクション (60 nM、 1.2×10^6 cells) し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で 1 時間インキュベートした。規定インキュベート時間の 15 分前に 1 mg/mL Hoechst33342 を 5 μ L、10 μ M LysoTracker Red を 25 μ L 添加し、20 U/mL ヘパリン溶液で洗浄後にガラスベースディッシュに移し FV10i-LIV を用いて観察した。各色の占有面積を Image-Pro Plus 7.0 を用いて求め、赤色ドットの面積を赤色ドットと黄色ドットの和の面積で除することでエンドソーム脱出効率を算出した。

$$\text{エンドソーム脱出効率 (\%)} = \frac{\text{Red area}}{\text{Red area} + \text{Yellow area}} \times 100$$

siRNA 分離能評価

脂質膜を DiO、siRNA を Cy5 でラベル化した siRNA キャリアをマイクロチューブ内で DC にトランスフェクション (60 nM、 1.2×10^6 cells) し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で 30 分間インキュベートした。medium change を行うことで取り込まれていない siRNA キャリアを除去し、総トランスフェクション時間が 3 または 5 時間となるように 37 °C、5 % CO₂ 条件でインキュベートした。規定インキュベート時間の 15 分前に 10 μM LysoTracker Red を 25 μL 添加し、20 U/mL ヘパリン溶液で洗浄後にガラスベースディッシュに移し FV10i-LIV を用いて観察した。各色の占有面積を Image-Pro Plus 7.0 を用いて求め、細胞内全体及び細胞質におけるキャリアからの siRNA の分離をそれぞれ算出した。

$$\begin{aligned} \text{dissociation rate (\%)} &= 100 \times \left[\frac{\text{Red area} + \text{Purple area}}{\text{Red area} + \text{Yellow area} + \text{Purple area} + \text{White area}} \right] \\ &\quad \text{(細胞内全体)} \\ \text{dissociation rate (\%)} &= 100 \times \left[\frac{\text{Red area}}{\text{Red area} + \text{Yellow area}} \right] \\ &\quad \text{(細胞質)} \end{aligned}$$

Hemolysis assay

マウス心臓より 25G 針を用いて 1 mL 採血し、ノボヘパリン注 (持田製薬) 2 μL と混合し 4 °C を保った。生理食塩水 9 mL を穏やかに入れ混合し、4 °C、400 × g で 10 分間遠心し上清を除去した。この操作を 5 回繰り返し、赤血球を単離した。

検量線は、PBS に赤血球を 0 ~ 5 μL、さらに 0.5 w/v % となるように triton を添加した。その後攪拌して、100 μL を 96 well plate にアプライした。測定サンプルは、各 pH の PBS、siRNA carrier、赤血球 4 μL の計 250 μL を穏やかに混合し 37 °C、900 rpm、30 min で振とうした。その後、4 °C、400 × g で 5 分遠心し、上清 100 μL を 96 well plate にアプライし、540 nm における吸光度を測定した。

Hemolysis Activity は、赤血球 4 μL と triton 溶液を混合した検量線サンプルの吸光度を 100% とした場合の各サンプルの値として算出した。

Cathepsin B 活性評価

siRNA キャリアのトランスフェクションによりエンドソームから細胞質に漏出した CathepsinB の活性を、CathepsinB Activity Assay kit (abcam) を用いて評価した。

マイクロチューブ内で、BMDC (1.0×10^6 cells) と siRNA キャリアを混合し、OPTI-MEM 培地で合計 500 μ L となるようにした。37 °C、5 % CO₂ 条件下で 2 h インキュベート後、遠心し上清を除去した。その後氷冷 PBS 0.5 mL に懸濁し、10 mg/mL ジギトニンを siRNA キャリア添加サンプル群には 1.6 μ L (細胞膜は透過するが、エンドソーム膜は透過しない条件)、siRNA キャリア未処理群には 1.6 μ L または 10 μ L (細胞膜、エンドソーム膜共に透過する条件) 添加・転倒混和した。氷上で 15 分間インキュベート後 20000 $\times$ g、2 min、4 °C で遠心し、上清を回収した。各 siRNA キャリアの上清 50 μ L と基質反応液 50 μ L を黒 96 well plate 内で混合し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で 2 h インキュベートした。最後にプレートリーダーで蛍光強度 (ex:400 nm, em:505 nm) を測定した。

CathepsinB 活性は、siRNA キャリア未処理 (ジギトニン 10 μ L) の蛍光強度を 100%、siRNA キャリア未処理 (ジギトニン 1.6 μ L) の蛍光強度を 0% としたときの値を各サンプルの蛍光強度から算出した。

7 第三章の実験

siRNA 配列

SOCS1、TGF β RII に対する siRNA は invitrogen より購入し、DEPC 処理水に溶解後分注して凍結保存した。

[Anti-SOCS1 siRNA]

Sense GAGAACCUGGCGCGCAUCCCUCUUA

Antisense UAAGAGGGAUGCGCGCCAGGUUCUC

[Anti- TGF β RII siRNA]

Sense GGGAUUGCCAUAAGCUGUCAUCAUCA

Antisense UGAUGAUGACAGCUAUGGCAAUCCC

SOCS1 ノックダウン評価

誘導した BMDC を回収し計数後、OPTI-MEM 培地に 6×10^6 cells/mL の濃度で懸濁した。12 well plate (SUMILON) に GM-CSF (培地中終濃度 10 ng/mL) 及び OPTI-MEM 培地を添加し、細胞懸濁液 0.1 mL (6.0×10^5 cells/mL) を添加した。最後に siRNA キャリア (3、10、30 nM siRNA) を添加して全量を 0.5 mL とし、37 °C、5% CO₂ 条件下で 2 時間インキュベートした。その後、GM-CSF 含有 RPMI1640 培地 0.5 mL を添加しさらに

2 時間培養し、培地を新しいものに交換した。さらに 2 時間培養し、IFN- γ を 50 ng/mL で添加した。24 時間後に細胞をマイクロチューブに回収し、遠心分離 (800 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 3 min)、上清を除去後、第一章の項で記述した RNA 抽出及び定量的 RT-PCR の方法に従ってノックダウン活性を算出した。

[プライマー] (SOCS1 : Applied Biosystems に合成を依頼)

SOCS1 (+) ACCTTCTTGGTGCGCGAC

SOCS1 (-) AAGCCATCTTCACGCTGAGC

サイトカイン産生の評価

上記の SOCS1 ノックダウン評価の項に示した方法で導入後 (3、10、30 nM)、IFN- γ による刺激を行い、24 時間後の培養上清を回収した。上清中の TNF- α 、IL-6、IL-18 を Quantikine (R&D systems) を用いて定量した。実験は 3 回行い、mean $\pm$ SEM として示した。

SOCS1 をノックダウンした BMDC の投与による予防的な抗腫瘍活性評価

BMDC に siRNA キャリアを濃度が 30 nM siRNA/6.0 $\times$ 10⁵ cells $\cdot$ 500 μ L OPTI-MEM となるように導入し、4 時間後に血清入り培地と交換した。その 2 時間後に OVA (終濃度 50 μ g/mL) および OVA class I ペプチド (終濃度 50 nM) を添加し、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下で 30 分間培養した。polyI:C を 500 ng/mL となるように添加し、さらに 1 時間培養後、細胞を 15 mL コニカルチューブに回収し、PBS 3 mL で 2 回洗浄した。C57BL/6J マウスの footpad に PBS に懸濁した BMDC (4.0 $\times$ 10⁵ cells/40 μ L) をエーテル麻酔下で投与した。その 7 日後に E.G.7-OVA 細胞をマウスのわき腹皮下に移植した (1.0 $\times$ 10⁶ cells/40 μ L $\cdot$ mouse, 26G 針)。その後のがんの大きさを経時的に計測し Tumor volume (mm³) = 長径 $\times$ 短径 $\times$ 短径 $\times$ 0.52 の式により体積を算出した。

SOCS1 をノックダウンした BMDC の投与による生着したがんに対する治療効果の評価

E.G.7-OVA 細胞を C57BL/6J マウスのわき腹皮下に移植した (1.0 $\times$ 10⁶ cells/40 μ L $\cdot$ mouse, 26G 針)。その 4、7、15 日後に、予防的な抗腫瘍活性評価で行った方法と同様に *in vitro* 系において SOCS1 ノックダウン、OVA 抗原添加、polyI:C 刺激を施した PBS に懸濁した BMDC を、マウスの footpad にエーテル麻酔下で投与した (3.0 $\times$ 10⁵ cells/40 μ L)。その後のがんの大きさを経時的に計測し Tumor volume (mm³) = 長径 $\times$ 短径 $\times$ 短径 $\times$ 0.52 の式により体積を算出した。

BMDC における TGF β RII ノックダウン評価

誘導した BMDC を回収し計数後、OPTI-MEM 培地に 6 $\times$ 10⁶ cells/mL の濃度で懸濁し

た。12 well plate (SUMILON) に GM-CSF (培地中終濃度 10 ng/mL) 及び OPTI-MEM 培地を添加し、細胞懸濁液 0.1 mL (6.0×10^5 cells/mL) を添加した。最後に YSK12-MEND を適切な siRNA 濃度 (3、10、30 nM) となるように添加して全量を 0.5 mL とし、37 °C、5% CO₂ 条件下で 2 時間インキュベートした。その後、GM-CSF 含有 RPMI1640 培地 0.5 mL を添加しさらに 24 時間培養した。BMDC をマイクロチューブに回収し、遠心分離 (800 × g、4 °C、3 min)、上清を除去後、第一章の項で記述した RNA 抽出及び定量的 RT-PCR の方法に従ってノックダウン活性を算出した。

[プライマー] (TGFβRII : SIGMA Aldrich に合成を依頼)

TGFβRII (+) CATGGTCAAATTGCGGGTAG

TGFβRII (-) GGCAATCCAAAAGAAGCAAG

TGFβRII ノックダウン BMDC の局所投与による生着したがんに対する治療効果の評価

E.G.7-OVA 細胞を C57BL/6J マウスのわき腹皮下に移植した (8.0×10^5 cells/40 μL · mouse、26G 針)。その 6、9、13、16 日後に、SOCS1 ノックダウン BMDC の投与による生着したがんに対する治療効果評価の項で行った方法と同様に *in vitro* 系において TGFβRII ノックダウン、OVA 抗原添加、polyI:C 刺激を施した PBS に懸濁した BMDC を、マウスに形成した腫瘍の中心部へエーテル麻酔下で局所投与した (4.0×10^5 cells/40 μL)。その後のがんの大きさを経時的に計測し Tumor volume (mm³) = 長径 × 短径 × 短径 × 0.52 の式により体積を算出した。

9 データ解析

3 回以上の実験を行うことで得られたデータについては、mean ± SEM or SD として表記している。第一章では、複数群の比較は一元配置分散分析により検定を行い、 $P < 0.05$ で有意差が認められた際には、Tukey-Kramer 法または Scheffe's F test による多重比較検定を行った。第二章、第三章では、複数群の比較は一元配置分散分析または繰り返しのある二元配置分散分析により検定を行い、 $P < 0.05$ で有意差が認められた際には、Tukey-Kramer 法または Bonferroni/Dunn 法による多重比較検定を行った。統計処理を行ったすべてのデータにおいて、 $P < 0.05$ の場合に有意であるとみなした。

参考文献

【参考文献】

1. 平成 25 年 (2013) 人口動態統計の年間推計 (厚生労働省ホームページ)
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suikei13/>
2. がんを学ぶ (phizer 社ホームページ)
<http://ganclass.jp/>
3. Makkouk, A., Weiner, GJ. *et al.* Cancer Immunotherapy and Breaking Immune Tolerance: New Approaches to an Old Challenge. *Cancer Res.* **75**, 5-10 (2015)
4. Eric, V., Sophie, U., Didier, B. *et al.* Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 239-52 (2012)
5. Yang, Q., Goding, SR., Hokland, ME. *et al.* Antitumor activity of NK cells. *Immunol. Res.* **36**, 13-25 (2006)
6. Schumacher, K., Haensch, W., Roefzaad, C. *et al.* Prognostic significance of activated CD8⁺ T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* **61**, 3932-6 (2001)
7. Parmiani, G., Castelli, C., Dalerba, P. *et al.* Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 805-18 (2002)
8. Ljunggren, HG., Kärre, K. Experimental strategies and interpretations in the analysis of changes in MHC gene expression during tumour progression. Opposing influences of T cell and natural killer mediated resistance? *J. Immunogenet.* **13**, 141-51 (1986)
9. Margreet, A., Wolfert, GB. Adaptive immune activation: glycosylation does matter. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 776-84 (2013)
10. Chan, CJ., Smyth, MJ., Martinet, L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ.* **21**, 5-14 (2014)
11. Steinman, RM., Banchereau, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**, 419-26 (2007)
12. Cornelissen, R., Lievense, LA., Heuvers, ME. *et al.* Dendritic cell-based immunotherapy in mesothelioma. *Immunotherapy* **4**, 1011-22 (2012)
13. Merad, M., Sathe, P., Helft, J. *et al.* The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563-604 (2013)
14. Ferlazzo, G., Munz, C. Dendritic cell interactions with NK cells from different tissues. *J. Clin. Immunol.* **29**, 265-73 (2009)

15. Lipscomb, MF., Masten, BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol. Rev.* **82**, 97-130 (2002)
16. Pinzon-Charry, A., Maxwell, T., López, JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 451-61 (2005)
17. Alexander, WS. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 410-6 (2002)
18. Hymowitz, SG., Wertz, IE. A20: from ubiquitin editing to tumour suppression. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 332-41 (2010)
19. Massague, J. TGF- β in cancer. *Cell* **134**, 215-30 (2008)
20. Wrzesinski, SH., Wan, YY., Flavell, RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **13**, 5262-70 (2007)
21. Pardoll, DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252-64 (2012)
22. Vanneman, M., Dranoff, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 237-51 (2012)
23. Elbashir, SM., Harborth, J., Lendeckel, W. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8 (2001)
24. Akhtar, S., Benter, IF. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J. Clin. Invest.* **117**, 3623-32 (2007)
25. Liechtenstein, T., Perez-Janices, N., Bricogne, C. *et al.* Immune modulation by genetic modification of dendritic cells with lentiviral vectors. *Virus Res.* **176**, 1-15 (2013)
26. Chiarella, E., Carrà, G., Scicchitano, S. *et al.* UMG Lenti: Novel Lentiviral Vectors for Efficient Transgene- and Reporter Gene Expression in Human Early Hematopoietic Progenitors. *PLoS One* **9**, e114795 (2014)
27. Shen, L., Evel-Kabler, K., Strube, R. *et al.* Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1546-53 (2004)
28. Song, XT., Evel-Kabler, K., Shen, L. *et al.* A20 is an antigen presentation attenuator, and its inhibition overcomes regulatory T cell-mediated suppression. *Nat. Med.* **14**, 258-65 (2008)
29. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M. *et al.* A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **348**, 255-6 (2003)

30. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M. *et al.* LMO-2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415-9 (2003)
31. Fox, J.L. Gene therapy safety issues come to fore. *Nat. Biotechnol.* **17**, 1153 (1999)
32. S, Zhang., B, Zhao., H, Jiang. *et al.* Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J. Control. Release* **123**, 1-10 (2007)
33. Kogure, K., Akita, H., Harashima, H. Multifunctional envelope-type nano device for non-viral gene delivery: concept and application of Programmed Packaging. *J. Control. Release* **122**, 246-51 (2007)
34. Nakamura, T., Akita, H., Yamada, Y. *et al.* A multifunctional envelope-type nanodevice for use in nanomedicine: concept and applications. *Acc. Chem. Res.* **45**, 1113-21 (2012)
35. Hatakeyama, H., Akita, H., Ito, E. *et al.* Systemic delivery of siRNA to tumors using a lipid nanoparticle containing a tumor-specific cleavable PEG-lipid. *Biomaterials* **32**, 4306-16 (2011)
36. Kusumoto, K., Akita, H., Ishitsuka, T. *et al.* Lipid envelope-type nanoparticle incorporating a multifunctional peptide for systemic siRNA delivery to the pulmonary endothelium. *ACS Nano* **7**, 7534-41 (2013)
37. Akita, H., Kogure, K., Moriguchi, R. *et al.* Nanoparticles for ex vivo siRNA delivery to dendritic cells for cancer vaccines: programmed endosomal escape and dissociation. *J. Control. Release* **143**, 311-7 (2010)
38. Futaki, S., Ohashi, W., Suzuki, T. *et al.* Stearylated arginine-rich peptides: a new class of transfection systems. *Bioconjug. Chem.* **12**, 1005-11 (2001)
39. Khalil, I.A., Kogure, K., Futaki, S. *et al.* High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression. *J. Biol. Chem.* **281**, 3544-51 (2006)
40. Khalil, I.A., Kogure, K., Futaki, S. *et al.* Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nanoparticles for gene delivery. *Gene Ther.* **14**, 682-9 (2007)
41. Parente, R.A., Nadasdi, L., Subbarao, N.K. *et al.* Association of a pH-sensitive peptide with membrane vesicle: role of amino acid seaquence. *Biochemistry* **29**, 8713-9 (1990)
42. Parente, R.A., Nir, S., Szoka, F.C. Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. *Biochemistry* **29**, 8720-8 (1990)
43. Kakudo, T., Chaki, S., Futaki, S. *et al.* Transferin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system.

- Biochemistry* **43**, 5618-28 (2004)
44. 東智子. 2007 年度北海道大学大学院薬学研究院修士論文.
 45. 森口留美子. 2008 年度北海道大学大学院薬学研究院博士論文.
 46. Strioga, MM., Felzmann, T., Powell, DJ. Jr. *et al.* Therapeutic dendritic cell-based cancer vaccines: the state of the art. *Crit. Rev. Immunol.* **33**, 489-547 (2013)
 47. Takeuchi, O., Akira, S. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol. Rev.* **220**, 214-24 (2007)
 48. Akira, S., Takeda, K. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev. Immunol.* **4**, 499-511 (2004)
 49. Meylan, E., Tschopp, J., Karin, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**, 39-44 (2006)
 50. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006)
 51. Mozer-Lisewska, I., Sikora, J., Kowala-Piaskowska, A. *et al.* The incidence and significance of pattern-recognition receptors in chronic viral hepatitis types B and C in man. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* **58**, 295-302 (2010)
 52. Huang, H., Ostroff, GR., Lee, CK. *et al.* Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal beta-glucans and toll-like receptor agonists. *Infect. Immun.* **77**, 1774-81 (2009)
 53. Fujimoto, C., Nakagawa, Y., Ohara, K. *et al.* Polyriboinosinic polyribocytidylic acid [poly(I:C)]/TLR3 signaling allows class I processing of exogenous protein and induction of HIV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* **16**, 55-63 (2004)
 54. Datta, SK., Redecke, V., Prilliman, KR. *et al.* A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **170**, 4102-10 (2003)
 55. Clarkson, BD., Héninger, E., Harris, MG. *et al.* Innate-adaptive crosstalk: how dendritic cells shape immune responses in the CNS. *Adv. Exp. Med. Biol.* **946**, 309-33 (2012)
 56. Van Duin, D., Medzhitov, R., Shaw, AC. Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends in Immunology* **27**, 49-55 (2006)
 57. Warashina, S., Nakamura, T., Harashima, H. A20 silencing by lipid envelope-type nanoparticles enhances the efficiency of lipopolysaccharide-activated dendritic cells. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 1348-51 (2011)

58. Hobo, W., Novobrantseva, T., Fredrix, H. *et al.* Improving dendritic cell vaccine immunogenicity by silencing PD-1 ligands using siRNA-lipid nanoparticles combined with antigen mRNA electroporation. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 285-97 (2013)
59. Heo, MB., Cho, MY., Lim, YT. Polymer nanoparticles for enhanced immune response: combined delivery of tumor antigen and small interference RNA for immunosuppressive gene to dendritic cells. *Acta Biomater.* **10**, 2169-76 (2014)
60. Alshamsan, A., Haddadi, A., Hamdy, S. *et al.* STAT3 silencing in dendritic cells by siRNA polyplexes encapsulated in PLGA nanoparticles for the modulation of anticancer immune response. *Mol. Pharm.* **7**, 1643-54 (2010)
61. Sato, Y., Hatakeyama, H., Sakurai, Y. *et al.* A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity in vitro and in vivo. *J. Control. Release* **163**, 267-76 (2012)
62. Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K. *et al.* Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *J. Control. Release* **107**, 276-87 (2005)
63. Alabi, CA., Love, KT., Sahay, G. *et al.* Multiparametric approach for the evaluation of lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 12881-6 (2013)
64. Guha, S., Padh, H. Cathepsins: fundamental effectors of endolysosomal proteolysis. *Indian J. Biochem. Biophys.* **45**, 75-90 (2008)
65. Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J. *et al.* Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J. Biol. Chem.* **285**, 9792-802 (2010)
66. Szabo, G., Csak, T. Inflammasomes in liver diseases. *J. Hepatol.* **57**, 642-54 (2012)
67. Zhang, H., Zhong, C., Shi, L. *et al.* Granulysin induces cathepsin B release from lysosomes of target tumor cells to attack mitochondria through processing of bid leading to Necroptosis. *J. Immunol.* **182**, 6993-7000 (2009)
68. Endo, TA., Masuhara, M., Yokouchi, M. *et al.* A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* **387**, 921-4 (1997)
69. Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M. *et al.* Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* **387**, 924-9 (1997)
70. Starr, R., Willson, TA., Viney, EM. *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **387**, 917-21 (1997)
71. Song, XT., Evel-Kabler, K., Rollins, L. *et al.* An alternative and effective HIV

- vaccination approach based on inhibition of antigen presentation attenuators in dendritic cells. *PLoS Med.* **3**, e11 (2006)
72. Iozzo, RV., Sanderson, RD. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J. Cell Mol. Med.* **15**, 1013-31 (2011)
 73. Massague, J. TGF β in cancer. *Cell* **134**, 215-30 (2008)
 74. Wrzesinski, SH., Wan, YY., Flavell, RA. Transforming growth factor- β and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **13**, 5262-70 (2007)
 75. Padua, D., Massague, J. Roles of TGF- β in metastasis. *Cell Res.* **19**, 89-102 (2009)
 76. Finkelstein, SE., Iclozan, C., Bui, MM. *et al.* Combination of external beam radiotherapy (EBRT) with intratumoral injection of dendritic cells as neo-adjuvant treatment of high-risk soft tissue sarcoma patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **82**, 924-32 (2012)
 77. Song, S., Zhang, K., You, H. *et al.* Significant anti-tumour activity of adoptively transferred T cells elicited by intratumoral dendritic cell vaccine injection through enhancing the ratio of CD8(+) T cell/regulatory T cells in tumour. *Clin. Exp. Immunol.* **162**, 75-83 (2010)
 78. Yang, L., Pang, Y., Moses, HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* **31**, 220-7 (2010)
 79. Sun, B., Wang, X., Ji, Z. *et al.* NLRP3 inflammasome activation induced by engineered nanomaterials. *Small* **9**, 1595-607 (2013)
 80. Bruchard, M., Mignot, G., Derangère, V. *et al.* Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat. Med.* **19**, 57-64 (2013)

謝辭

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、終始御指導・御鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室教授、原島秀吉先生に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、様々な場面で多大なる御指導・御助言を頂きました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室助教、中村孝司先生に深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、有益な御助言・深い理解を頂きました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室准教授、秋田英万先生に深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、有益な御助言・御指摘を頂きました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室助教、山田勇磨先生、北海道大学大学院薬学研究院未来創剤学研究室特任准教授、梶本和昭先生、同特任助教、櫻井遊先生、同特任助教、佐藤悠介先生に深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、様々な御助言・御教示を頂きました、広島大学大学院医歯薬保健学研究院核酸分析化学研究室教授、紙谷浩之先生に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、有益な御指導・多くの励ましを頂きました、愛知工業大学工学部応用化学科講師、兵藤守先生、テキサス州立大学 MD アンダーソンがんセンター、畠山浩人先生、サンフォード・バーナム医学研究所、林泰弘先生に深く感謝申し上げます。

長い研究生活の中で互いに競い合い励まし合いました、すべての同期の皆様に心より感謝申し上げます。

研究生活における様々な場面でお世話になりました、北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学研究室並びに未来創剤学研究室の皆様へ心より感謝申し上げます。特に、至らない先輩の元で共に研究に取り組んだ中村先生グループの皆様へ深く感謝申し上げます。

最後に、長い学生生活の間、あらゆる面で私を支えて下さいました、家族、友人へ心より感謝申し上げます。

2015 年 3 月