



Title	KALAペプチド修飾ナノ粒子を基盤としたワクチン技術の開発とがん免疫療法への応用
Author(s)	三浦, 尚也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第13179号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13179
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88767
Type	doctoral thesis
File Information	Naoya_Miura.pdf



博士学位論文

**KALA ペプチド修飾ナノ粒子を基盤とした
ワクチン技術の開発とがん免疫療法への応用**

三浦尚也

**北海道大学大学院 生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
薬剤分子設計学研究室**

2018 年 3 月

【目次】

略語表	2
序論	7
本論	17
第1章	
KALA ペプチド修飾多機能性エンベロープ型ナノ構造体の DNA ワクチン技術への応用	19
緒言	21
実験結果	23
考察	38
小括	41
第2章	
KALA ペプチド修飾リポプレックス型ナノ粒子の mRNA ワクチン技術への応用	43
緒言	45
実験結果	47
考察	64
小括	68
結語	69
実験材料・実験方法	73
参考文献	90
謝辞	104

【略語表】

Abs	absorbance
ACK	ammonium-chloride-potassium
AIM-2	absent in melanoma-2
ALB	albumin
AMP	adenosine monophosphate
ANOVA	analysis of variance
APC	allophycocyanin
ATCC	american type culture collection
ATP	adenosine triphosphate
BCA	bicinchoninic acid
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
β-Gal	beta-galactosidase
BMDC	bone marrow-derived dendritic cell
BSA	bovine serum albumin
CCL	C-C motif chemokine ligand
CD	clusters of differentiation
CFSE	carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester
cGAMP	cGMP-AMP
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase
Chol	cholesterol
CPRG	chlorophenol red-β-D-galactopyranoside
CMV IE	cytomegalovirus intermediate/early
CTL	cytotoxic T-Lymphocyte
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
DC	dendritic cell
DDW	deionized distilled water
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3'- phosphatidyl ethanolamine
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
dsDNA	double stranded DNA
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EF1α	human elongation factor-1 alpha

eIF2 α	eukaryotic initiation factor 2 alpha
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPC	egg phosphatidylcholine
EtOH	ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FDA	food and drug administration
FITC	fluorescein isothiocyanate
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GMP	guanosine monophosphate
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid
HMW	high molecular weight
HSD17B4	hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 4
IFIT1	IFN-induced protein with tetratricopeptide repeat 1
IFN	interferon
IFNAR	interferon- α/β receptor
IL	interleukin
IKK	inhibitor of NF- κ B kinase
IP-10	interferon gamma-induced protein 10
IRF	interferon regulatory factor
ISG	IFN stimulated gene
IVT	<i>in vitro</i> transcribed
KALA-MEND	KALA peptide-modified MEND
LPS	lipopolysaccharide
Luc	luciferase
mAbs	monoclonal antibodies
MDA5	melanoma differentiation antigen 5
MEND	multifunctional envelope-type nano device
MeOH	methanol
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MHC	major histocompatibility complex
MIG	monokine induced by gamma interferon
MIP-1 β	macrophage inflammatory protein 1 beta
MPLA	monophosphoryl lipid A
mRNA	messenger RNA

mV	milli volt
N.D.	not detected
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NLRP	NLR family, pyrin domain-containing
N.S.	not significant
NTDC	non-treated BMDC
OAS	2'-5'-oligoadenylate synthase
ODN	oligodeoxyribonucleotide
ORF	open reading frame
OS	overall survival
OVA	ovalbumin
PA	phosphatidic acid
PAP	prostatic acid phosphatase
pAsp	poly-aspartic acid
PBS	phosphate buffered saline
PCI	pan-caspase inhibitor
PD-1	programmed cell death-1
PD-L1	programmed cell death-1 ligand 1
pDNA	plasmid DNA
PE	phycoerythrin
PFS	progression-Free Survival
pH	power of hydrogen
PKR	dsRNA-activated protein kinase R
Poly(dA:dT)	poly(deoxyadenylic-deoxythymidylic) acid
Poly(I:C)	poly(inosinic-polycytidylic) acid
QD	quantum dot
QOL	quality of life
R8	octaarginine
R8-MEND	R8 peptide-modified MEND
RIG-I	retinoic acid-inducible gene-I
RLU	relative light unit
RNA	ribonucleic acid
RPMI	roswell park memorial institute
rRNA	ribosomal RNA
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate

SEM	standard error of the mean
SPF	specific pathogen free
SSC	side scatter
STING	stimulator of IFN genes
STR	stearyl
TBK1	TANK-binding kinase 1
Th	T helper
TLR	toll-like receptor
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
tpRNA	5'-triphosphate double-stranded RNA
Treg	regulatory T cell
tRNA	transfer RNA
UTR	untranslated region
v.s.	versus
WT	wild type

【序論】

【序論】

がん（悪性新生物）は、1981年以降、日本人の死因の第1位を占める疾患として知られている。これは近年の医療技術の進歩により、それ以前に上位の死因となっていた他の疾患（脳血管疾患や心疾患）による死亡が減少した事にもよるが、平成28年度においては、約37万人もの日本人ががんにより死亡している¹。がんによる死亡率も年々増加しており、以前にも増して、がんに対する効果的な治療法の開発の重要性が高まっている。がんに対する治療法としては、外科的療法・化学療法・放射線療法の3大療法が以前よりおこなわれており、医療技術の進歩により多くのがん患者の根治や延命、緩和に成功している。しかしながら、それぞれの療法には欠点も存在する。外科的療法は、早期のがんなど病巣範囲が限定されている場合には極めて有効であるが、転移巣が多く生じた場合には効果が薄い。化学療法や放射線療法においては、耐性がんの出現が問題となっている。加えて、特に化学療法においては副作用による Quality of life (QOL) の低下が著しい。従って、これらの欠点を補い、3大療法のみでは治療が困難ながんに対する代替療法の開発が望まれている。

がん免疫療法は、生体内に備わる免疫系を人為的に活性化することでがんを治療する手法である^{2,3}。その機序は、物理的にがんを除く外科的療法や、がん細胞の分裂能の高さを標的とする化学療法・放射線療法とは異なる事、及び生体内に元々備わる機構を用いるため副作用が少ないという利点から、第4のがん治療法として期待され、開発が進められている (Figure I)⁴。その歴史は古く、1960年代には、*Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) 菌を含む免疫賦活化剤のがん治療への応用が報告された。その後1976年には Morales らが、膀胱がん患者に対する BCG 菌の膀胱内注入療法の有用性を報告して以来、膀胱がん、特に非筋層浸潤膀胱がんのゴールドスタンダードとなっている⁵。また、その後も腫瘍細胞に対するモノクローナル抗体や、リコンビナントサイトカイン (I 型 interferon (IFN)・interleukin (IL)-2)、あるいは獲得免疫系を利用した抗原特異的な免疫応答によるがん治療の研究開発が精

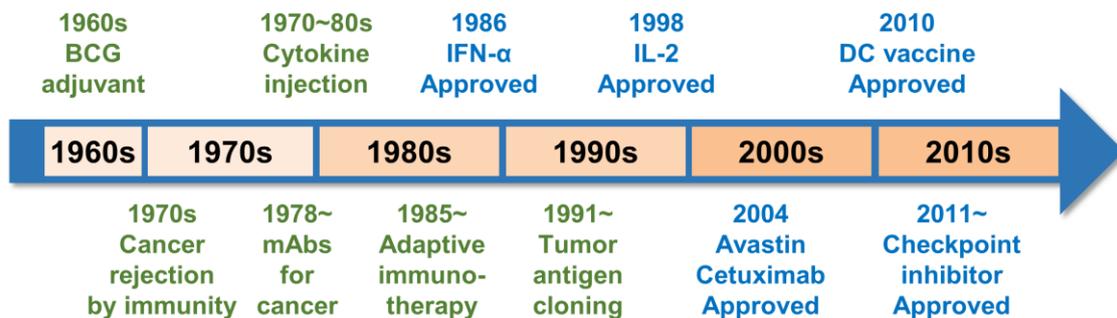


Figure I. 現在までに開発されてきたがん免疫療法、及び関連する技術の一例。緑字はがん免疫療法の概念や技術の確立に関する出来事を表す。青字はがん免疫療法に関連する薬剤の承認を表す。Kirkwood, J. M. et al, C. A. Cancer J. Clin., 2012より一部改変。BCG: *Bacillus Calmette-Guerin*, mAbs: monoclonal antibodies, IFN: interferon, IL: interleukin, DC: dendritic cell.

力的に行われてきた。特に 2010 年代におけるがん免疫療法の発展は目覚ましく、免疫細胞療法である Sipleucel-T⁶ が 2010 年に、免疫チェックポイント阻害剤である抗 cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4 (CTLA-4) 抗体 (イピリムマブ)⁷ や抗 programmed cell death-1 (PD-1) 抗体 (ニボルマブ・ペンブロリズマブ)⁸ がそれぞれ 2011 年、2014 年に米国食品医薬品局 (food and drug administration (FDA)) から認可を取得している。

獲得免疫を介したがん排除機構は以下のようなプロセスを経て達成される (Figure II)。

Step 1: がんの特異的なタンパク質 (がん抗原) が抗原提示細胞 (樹状細胞やマクロファージ) によって貪食される

Step 2: がん抗原がペプチド断片に分解され、抗原提示細胞から T 細胞に提示される

Step 3: がん抗原特異的な T 細胞が増殖・活性化し、がん細胞に対し免疫応答を起こす

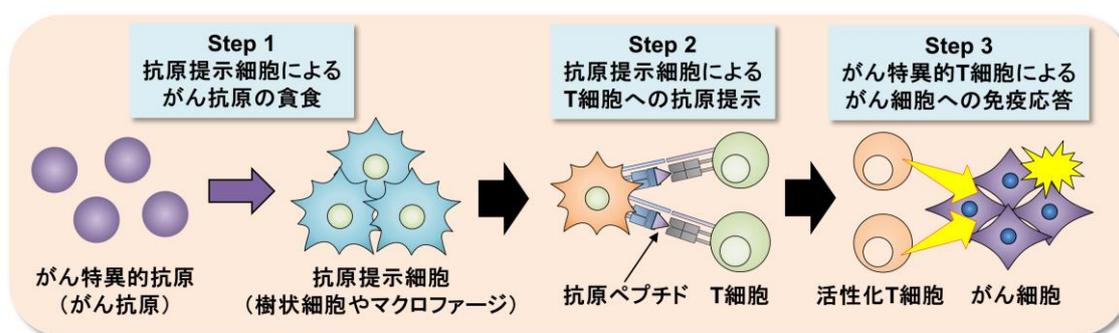


Figure II. 獲得免疫を介したがん排除機構の簡単な要約。Step 1: がん特異的なタンパク質であるがん抗原が、抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージに貪食される。Step 2: 貪食されたがん抗原は抗原提示細胞内でペプチド断片に分解され、獲得免疫の働き手である T 細胞へ抗原提示する。Step 3: 抗原提示を受けた T 細胞が増殖・活性化し、がん組織へ移行したのち抗原情報を元にがん細胞への免疫応答を引き起こす。

2010 年に上市された Sipleucel-T は、ホルモン療法抵抗性進行性前立腺がんに対する世界初の免疫細胞療法薬であり、患者末梢血より採取した単核球を「prostatic acid phosphatase (PAP) / granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 融合タンパク質」と培養し患者へ戻す治療法である。抗原提示細胞への取り込み促進と活性化を担う GM-CSF と、前立腺がん特異的な抗原である PAP の融合タンパク質を処理する事で、「Step 1」を人為的に誘導し、PAP 特異的な獲得免疫を誘起するというメカニズムを有している⁹。本治療法は、プラセボ群に比べ、全生存期間中央値を 4.1 カ月延長する事が示され、FDA による認可を取得している。しかしながら、病勢進行までの期間 (Objective disease progression) の中央値の延長は見られず (Sipleucel-T 群 : 3.7 カ月、プラセボ群 : 3.6 カ月)、効果が限定的であった。後述のように、がん免疫に有効な細胞性免疫の惹起には、抗原の細胞質への到達が重要である事から、より効率的な抗原タンパク質の抗原提示細胞への導入法の開発が重要であると考えられる。

Sipleucel-T に続き FDA の認可を取得したがん免疫療法薬である免疫チェックポイント阻害剤は、獲得免疫応答の各段階に存在する確認点（免疫チェックポイント）をコントロールする薬剤である。免疫チェックポイントには多くの機構が知られているが、多くは細胞間における細胞膜タンパク質同士の相互作用により作用している¹⁰。例えば、抗 CTLA-4 抗体（イピリムマブ）が標的とするのは、T 細胞上の CTLA-4 分子と抗原提示細胞上の clusters of differentiation (CD) 80/86 といった共刺激分子の相互作用である。一般的に抗原提示細胞から抗原提示を受けたナイーブ T 細胞は、同時に CD80/86 分子から CD28 分子を介して共刺激シグナルを受け取る事で、活性化・増殖する。一方で過剰な活性化を防ぐため、共刺激シグナルにより CTLA-4 分子が T 細胞上に誘導されると、CD28 と競合する事で共刺激シグナルを遮断する。腫瘍組織は、自身が有する腫瘍微小環境により CTLA-4 を誘導する、あるいは CTLA-4 を高発現する抑制性 T 細胞 (regulatory T cell (Treg)) を誘導する事で、腫瘍特異的な T 細胞を抑制している事が知られている。抗 CTLA-4 抗体はこのような免疫チェックポイント経路を阻害する事で、「Step 2」における腫瘍特異的な T 細胞の抑制を阻害し、抗腫瘍免疫を活性化する¹⁰⁻¹²。また、抗 PD-1 抗体（ニボルマブ・ペンプロリズマブ）が標的とするのは、T 細胞上の PD-1 分子と標的細胞上の programmed cell death-1 ligand 1 (PD-L1) 分子の相互作用である。活性化した抗原特異的 CD8⁺T 細胞は PD-1 を発現するようになる。一方、体細胞などの標的細胞は、攻撃中の CD8⁺T 細胞によって産生される IFN- γ に応答し、PD-L1 を発現する。この PD-L1 が活性化 CD8⁺T 細胞上の PD-1 と相互作用すると、T 細胞側へシグナルが伝達され、T 細胞の抑制が誘導される。腫瘍組織においては、がん細胞等に PD-L1 が発現し、腫瘍特異的な T 細胞のがん細胞への攻撃が抑制される。抗 PD-1 抗体はこの抑制経路を阻害する事で、「Step 3」における腫瘍特異的な T 細胞のがん細胞への攻撃を促進し、抗腫瘍免疫を活性化する^{10, 13-14}。

これらの免疫チェックポイント阻害剤は、臨床試験において優れた効果を発揮した。2011 年に行われたイピリムマブの PhaseIII 試験においては、遠隔転移を有する既治療・切除不能メラノーマに対するランダム化比較 PhaseIII として初めて有意な治療効果を得る事に成功している⁷。また、2014 年におこなわれた、ニボルマブによる未治療メラノーマに対する PhaseIII 試験においては、標準治療であるダカルバジンに比べ死亡リスクを 58%減少させ、全生存期間 (Overall Survival: OS)、無進行生存期間 (Progression-Free Survival: PFS) を有意に延長させる事に成功している¹⁵。また、メラノーマ以外の腫瘍に対してもその有効性が示されている¹⁶。これら免疫チェックポイント阻害剤は、既存の免疫療法に比べ優れた効果を示し、がん免疫療法が幅広い腫瘍に対して有効である事を初めて明確に示したものである。

一方で、その奏効率は、最も効果の高いメラノーマに対しても 40%程度、認可を取得している非小細胞肺癌や頭頸部癌においては 10~20%に留まっており¹⁶、未だ改善の余地があると考えられている。奏効率を改善するための手法として、腫瘍特異的 T 細胞の活性化技術との併用が提唱されている。Le らは、大腸がん患者において Mismatch-repair deficiency

を有する患者群と持たない患者群におけるペンブロリズマブの効果と比較した¹⁷。その結果、Mismatch-repair deficiency を有する患者群の方が、OS、PFS 共に有意に延長した事が明らかとなった。Mismatch-repair deficiency を有する場合、遺伝子変異が修復されにくい事が知られており、本結果より、遺伝子変異の生じやすさが抗 PD-1 抗体の効果に影響を及ぼすことが示唆された。Alexandrov らによって報告された、各がん種における変異の発生率を見た場合も、免疫チェックポイント阻害剤が有効であるがん種 (Melanoma, Lung squamous, Bladder, Colorectum, Kidney) において変異発生率が高い事から、遺伝子変異の頻度が免疫チェックポイント阻害剤の効果に影響を与える事が示唆されている¹⁸。遺伝子変異の頻度が高いほど、遺伝子変異により抗原性を得る新規がん抗原 (neoantigen) が多くなり、腫瘍特異的な免疫応答が起きやすくなる¹⁹ ことを考慮すると、腫瘍特異的な免疫応答の存在が免疫チェックポイント阻害剤の効果を高めると考えられる。Tumeh らは、メラノーマ患者に対して、ペンブロリズマブ投与前の腫瘍近傍における CD8⁺T 細胞の密度を評価し、ペンブロリズマブ奏功群では非奏功群に比べ CD8⁺T 細胞の密度が有意に高いことを報告している²⁰。この結果は、抗 PD-1 抗体が既に患者内に存在する腫瘍特異的 CD8⁺T 細胞を活性化し、抗腫瘍効果を発揮しているという Proof of concept であると同時に、腫瘍特異的 CD8⁺T 細胞の誘導が、抗 PD-1 抗体の奏効率の向上に繋がる事を示唆するものである。実際に、抗 PD-1 抗体と腫瘍特異的 CD8⁺T 細胞を誘導する技術 (抗 CTLA-4 抗体²¹、がんワクチン^{14,22}、放射線照射²³) の併用により、抗腫瘍効果が増強する事が報告されている。以上より、腫瘍特異的 CD8⁺T 細胞を誘導する技術の開発は、更なるがん免疫療法の発展に寄与すると考えられる。

抗原特異的な免疫応答は、抗体を介した液性免疫と細胞を介した細胞性免疫の 2 つに大別される。これらは抗原タンパク質の局在により、どちらが優位に誘導されるかが異なる (Figure III)。細胞外に存在する抗原は、エンドサイトーシスにより抗原提示細胞、特に樹状細胞へ取り込まれたのち、ライソソーム内でペプチド断片に分解される。その後、主要組織適合抗原複合体 (Major Histocompatibility Complex: MHC) Class-II と結合し、抗原提示細胞の表面上に提示される。この場合、CD4⁺T 細胞がこれを認識し、B 細胞と協調して働くことで、抗体を介した液性免疫が誘導される。一方で、細胞質内に存在する抗原は、細胞質中のプロテアソームによってペプチド断片へ分解され、小胞体で MHC Class-I 分子と結合する。その後、抗原提示細胞の表面に提示される事で、CD8⁺T 細胞がこれを認識する。活性化した CD8⁺T 細胞は直接細胞を傷害する、細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T-Lymphocyte: CTL) として細胞性免疫に寄与する。従って、腫瘍特異的 CD8⁺T 細胞の誘導には、がん抗原の細胞質への到達が重要となる。

これを達成する 1 つの手法として、核酸ワクチンが挙げられる (Figure IV)²⁴。本手法では、抗原タンパク質そのものを用いるのではなく、それをコードする DNA や RNA を用いて、抗原タンパク質の導入をおこなう。この場合、抗原タンパク質は細胞質において発現するため、結果として、細胞性免疫が誘導されやすく、がんワクチンとしての有用性が高い

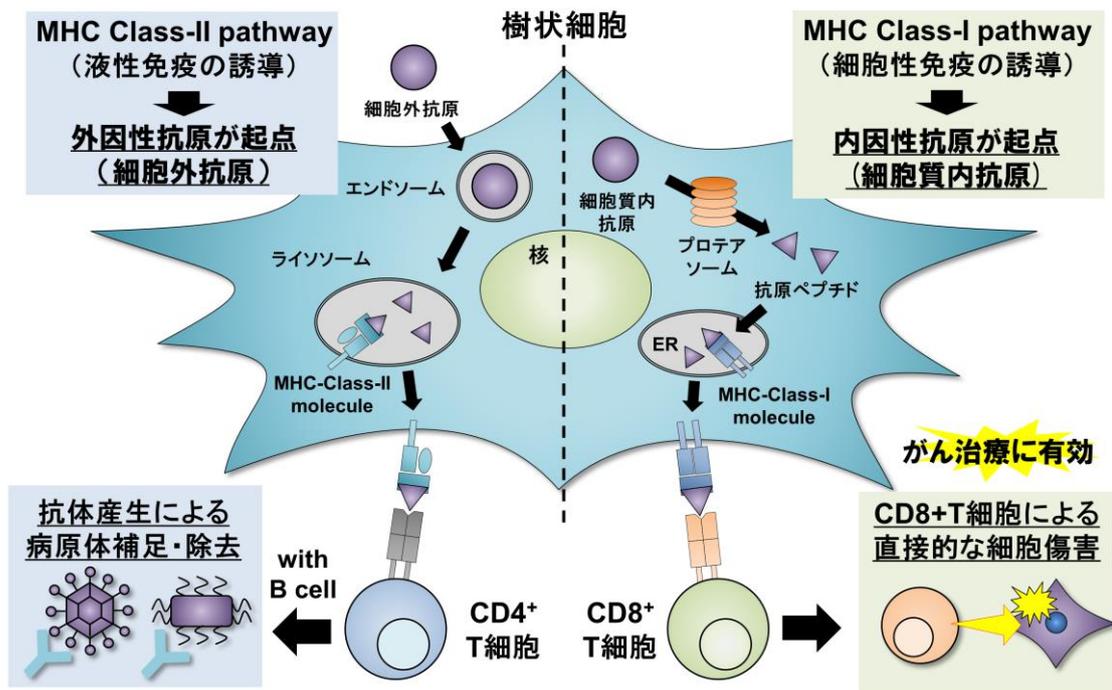


Figure III. 抗原の局在と抗原特異的免疫の誘導型。(左)細胞外の抗原はライソソーム中でペプチド断片に分解されたのち、MHC-Class-II分子によってCD4⁺T細胞へ提示されることで、抗体産生を伴う液性免疫を誘導する。(右)細胞質内の抗原はプロテアソームによってペプチド断片に分解され小胞体上でMHC Class-I分によってCD8⁺T細胞へ提示されることで、直接的な細胞傷害を伴う細胞性免疫を誘導する。

と考えられている。更に、核酸ワクチンの特徴として、細胞自身に抗原タンパク質を発現させることから、タンパク質の調製が不要である点や、遺伝子組み換えにより容易に抗原を改変可能である事が挙げられる。このような観点からも、変異が生じやすく、新たな抗原が多様に存在するがんという疾患に対して有効であると考えられる。一方で、核酸は巨大な分子量を有する水溶性分子である事から、単独での細胞への導入は困難である。従って、核酸を効率的に細胞へ導入可能なキャリアの開発は、がんに対するワクチン技術の開発に重要である。

また、抗原を導入する標的細胞を考慮する事も重要である。Corrらは naked plasmid DNA (pDNA) を筋肉内投与した際の抗原特異的な CTL の誘導において、骨髄由来の抗原提示細胞による抗原提示が主に関与し、筋細胞などの体細胞における抗原提示は CTL 誘導に関与しない事を報告している²⁵。また、筋細胞によって発現した抗原タンパク質は、抗原提示細胞が細胞外抗原として取り込むため、細胞性免疫よりも液性免疫が優位になると考えられる。そのため、細胞性免疫を誘導するためには、抗原をコードする核酸の導入先として、抗原提示細胞を標的とすることが重要であると考えられる。特に、抗原提示細胞の中でも、ナイーブ T 細胞を唯一活性化可能な、樹状細胞への導入が特に効率的であるという報告もある²⁶⁻²⁷。以上を踏まえると、樹状細胞へ効率的に核酸を導入可能なキャリアの開発が、核酸ワクチンに必要不可欠であると考えられる。

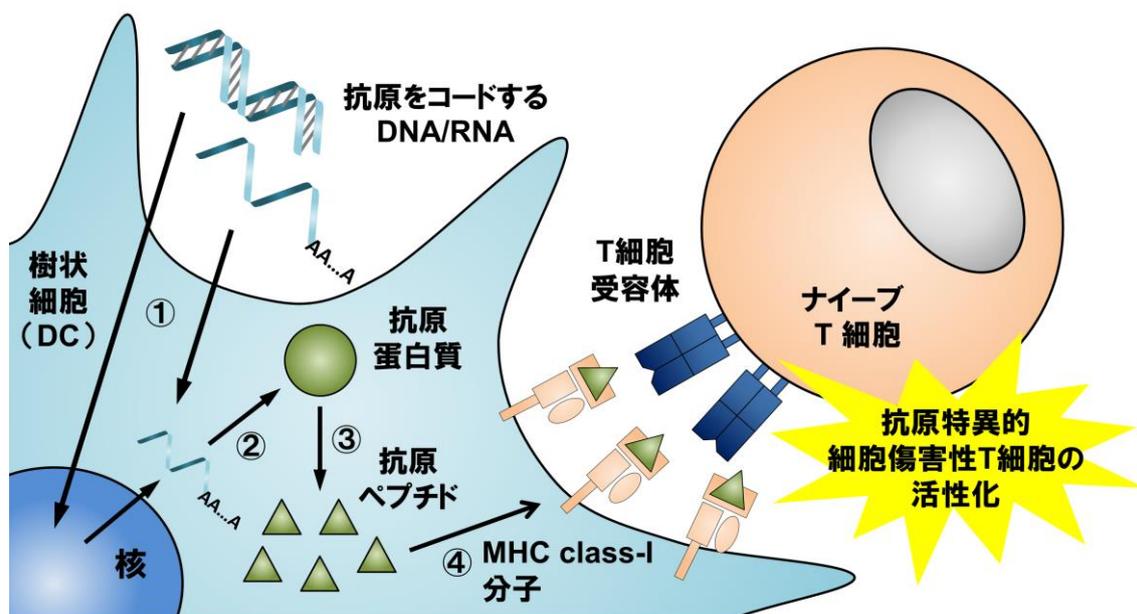


Figure IV. 核酸ワクチンによる細胞性免疫の誘導メカニズム。抗原をコードするDNAあるいはRNAが樹状細胞に導入される(①)と、転写・翻訳を経て細胞質へ抗原蛋白質が産生される(②)。その後、細胞質のプロテアソーム等により抗原ペプチドまで分解され(③)、MHC class-I分子に提示され(④)、ナイーブT細胞を抗原特異的な細胞傷害性T細胞へと活性化する。

当研究室で開発された、多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (Multi-functional Envelope-type Nano Device: MEND) は、核酸をポリカチオンで凝縮させコア粒子化し、その表面を脂質膜で覆う構造を持つ核酸キャリアである²⁸⁻²⁹。pDNAの導入キャリアとしては、MEND脂質膜表面に、細胞透過性ペプチドとして知られるオクタアルギニン (RRRRRRRR: R8) ペプチドを修飾する事で、分裂細胞であるヒト子宮頸がん細胞株 HeLa やヒト腺がん細胞株 A549 に対して、アデノウイルスに匹敵する遺伝子導入能を示すことが明らかとなっている³⁰。一方で、非分裂細胞であるマウス骨髄由来樹状細胞 (Bone Marrow-derived Dendritic Cell: BMDC) に対しては、遺伝子導入能が認められなかった。本結果より、R8 ペプチド修飾 MEND (R8-MEND) の核酸ワクチンへの応用は困難であった。

そこで、当研究室のシャヒーンらは、樹状細胞へ遺伝子導入可能なキャリアの開発のため、核膜との融合能を高める目的で、中性条件下で α -helix 構造を有する KALA ペプチド (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKA) を MEND 表面に修飾した。本ペプチドはインフルエンザウイルスのヘマグルチニンを元に設計された機能性ペプチド GALA (WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA)³¹⁻³² を元に Wyman らによって設計されたカチオン性ペプチドである。GALA は酸性条件下において α -helix 構造を有するアニオン性ペプチドであり、エンドソーム内の酸性環境に反応して膜融合能を発揮する。Wyman らは DNA の導入のため、GALA のアスパラギン酸残基をリジン残基に置換する事で、中性条件下において α -helix 構造を有する KALA ペプチドを設計した³³。本報告において、KALA ペプチドと pDNA と静電的な相互作用を介して複合体を形成させ、培養細胞への pDNA の導入効率を向上させる事に成功している。このように開発された KALA ペプチドを MEND

表面に修飾し、マウス樹状細胞株 JAWSII に対して Luciferase をコードする pDNA を導入したところ、R8-MEND に比べ高い遺伝子導入活性を得る事に成功した (Figure V)³⁴。また秋田らは、KALA ペプチド修飾 MEND (KALA-MEND) を JAWSII 細胞へ処理した際に、サイトカイン・ケモカイン等の免疫関連因子の mRNA 発現レベルが大きく向上する事をマイクロアレイ解析により明らかとした³⁵。これらの結果より、KALA-MEND は樹状細胞への遺伝子導入能、及び免疫活性化能に優れた DNA キャリアである事が明らかとなり、核酸ワクチンへの応用可能性が示唆された。一方、非分裂細胞であるプライマリー樹状細胞への遺伝子導入能・免疫活性化能やがんワクチンとしての機能については未だ明らかとなっていなかった。

以上を踏まえて本研究では、KALA ペプチド修飾ナノ粒子を基盤とした、樹状細胞への遺伝子導入キャリアの開発と、がん免疫療法への応用を試みた。第一章では、マウス骨髄細胞より分化誘導した、マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用い、樹状細胞株である JAWSII において得られた遺伝子導入能、免疫活性化能について検証した。また、免疫活性化機構の分子メカニズムの解明、及びモデル抗原であるオボアルブミン (OVA) を用いた樹状細胞ワクチンとしての応用可能性を検討した。続いて第二章では、モデル抗原ではなく、実際にヒト臨床で用いられる抗原を用いた治療的な抗腫瘍効果を得るため、より発展的なメッセンジャーRNA (mRNA) を用いた mRNA ワクチンの開発を試みた。その過程で、mRNA ワクチンのアジュバントとして適切な分子種の選定をおこない、ヒト実弾抗原である NY-ESO-1 に対する治療的な抗腫瘍効果の検討をおこなった。

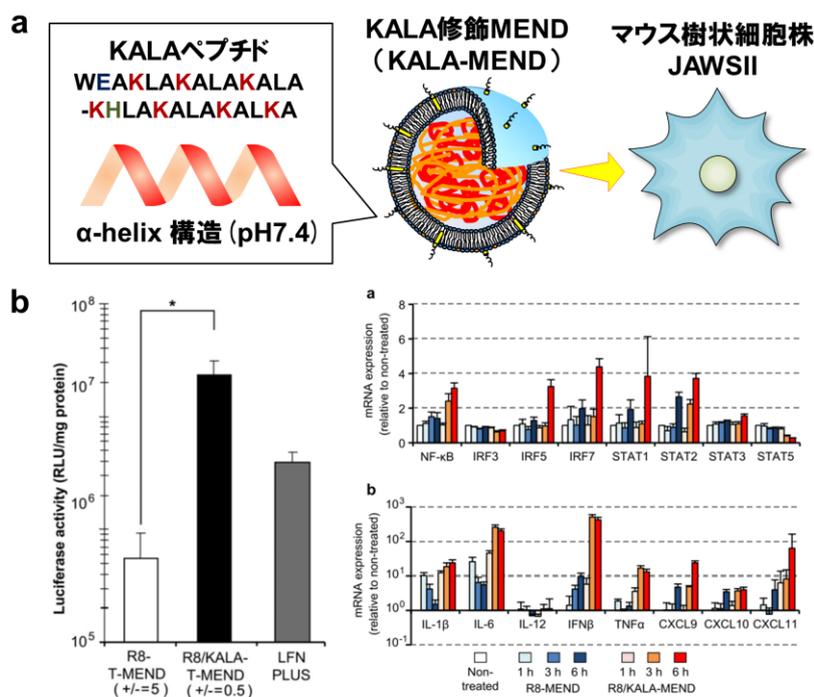


Figure V. JAWSII細胞に対するKALA-MENDの遺伝子導入能・免疫活性化能。(a) KALA-MENDの模式図 (b) (左)KALA-MENDのJAWSII細胞への遺伝子導入能評価。Shaheen S.M. et al., Biomaterials, 2011.より引用。(右) マイクロアレイ解析を用いたKALA-MENDのJAWSII細胞への免疫活性化能評価。Akita H. et al., Biomaterials, 2013.より引用。

【本論】

第一章

KALA ペプチド修飾 多機能性エンベロップ型ナノ構造体の DNA ワクチン技術への応用

【緒言】

DNA ワクチンは、抗原をコードする DNA により抗原タンパク質を導入し、抗原特異的な免疫応答を誘導する手法である³⁶⁻³⁸。核酸ワクチンとして、従来のタンパク質を基盤としたワクチン技術（弱毒化ワクチン・不活化ワクチン等）に比べ、感染のリスクが無いまま、液性免疫のみならず細胞性免疫を誘導可能な技術である。また、製剤的な観点から考えた際にも、有用な DNA ワクチン製剤が一度開発されれば、遺伝子工学技術を用いた抗原情報の書き換えのみで多様な抗原や変異、疾患に適応可能であり、抗原の変異が早いウイルスによる感染症や腫瘍に対する優れたワクチン技術になり得ると考えられている。実際に DNA ワクチンによる、感染症やがんに対する多くの臨床試験が行われており³⁹、獣医学領域においてはヒトに先立ち、DNA ワクチンが上市されている⁴⁰。

序論でも述べたように、効率的な DNA ワクチンの開発には、遺伝子導入をおこなう細胞の選定が重要である^{36,41}。T 細胞への抗原提示をおこなう抗原提示細胞の中でも、特に樹状細胞は、唯一ナイーブ T 細胞を活性化可能な抗原提示細胞として知られており、様々な感染制御や腫瘍に対する抑制的な効果を発揮する⁴²⁻⁴⁴。従って、腫瘍に対する DNA ワクチン技術には、樹状細胞へ遺伝子導入可能な技術の開発が重要である。これまでにウイルスベクターや非ウイルスベクターを用いた樹状細胞への遺伝子導入技術の開発が進められている⁴⁵。一般的にウイルスベクターは非ウイルスベクターに比べて遺伝子導入効率に優れるため、アデノウイルスや改変ワクシニアウイルス等のウイルスベクターを用いた臨床試験が多く行われている⁴⁵⁻⁴⁷。その一方で、ウイルスベクターを用いた臨床試験では、がん原性や過剰な免疫応答に代表される安全性の問題⁴⁸⁻⁴⁹、患者がウイルスベクターに対する免疫応答 (vector-specific immunity) を有している場合に有効性が低くなるという問題が報告されている⁵⁰⁻⁵¹。従って、ウイルスベクターにおける問題点を補完し、樹状細胞への優れた遺伝子導入能を有する非ウイルスベクターの開発が、DNA ワクチン技術の選択肢を広げ、その臨床応用への可能性を広げるものになると考えられる。

当研究室の Shaheen らによって開発されたリポソーム型非ウイルスベクターである KALA ペプチド修飾 MEND (KALA-MEND) は、樹状細胞株である JAWSII に対して遺伝子導入能、免疫活性化能を有する DNA ベクターである事が明らかとなっている³⁴⁻³⁵。一方でプライマリー樹状細胞である BMDC に対する DNA ワクチンベクターとしての機能は未だ明らかではなかった。そこで第 1 章の前半において、KALA-MEND の BMDC に対する遺伝子導入能・免疫活性化能の検証をおこなった。DNA ワクチン技術において抗原遺伝子の導入効率が重要である事は当然ながら、同時に自然免疫系の活性化も、抗原特異的な免疫応答を誘起する際に極めて重要となる⁵²⁻⁵³。特に、自然免疫活性化を伴わない抗原提示（共刺激分子の欠落等）は、提示された抗原に対する不応答（アネルギー）を引き起こす⁵⁴。そのため本研究では、KALA-MEND がどのような自然免疫応答を誘導するかについても詳細に検討をおこなった。また後半では、KALA-MEND により抗原遺伝子を導入された BMDC

を免疫した際の抗原特異的な免疫応答についても検討をおこなった。特に、モデル抗原である OVA を用いた評価、及びヒト臨床でも用いられる抗原 NY-ESO-1 における DNA ワクチンとしての機能評価もおこなった。NY-ESO-1 は腫瘍組織及び精巣（免疫系から隔絶された組織）のみに発現する、がん精巣抗原（cancer-testis antigen）の 1 つであり、メラノーマや子宮頸がん、食道がん等の多くの腫瘍組織において発現する事が知られている⁵⁵。そのため、ヒト臨床におけるがん抗原として、ワクチン技術に広く用いられている。本抗原はマウスの MHC Class-I の 1 つである H-2K^d にも結合する事が知られており、マウスモデルにおける抗原としても機能する⁵⁶。モデル抗原であり高い抗原性を有する OVA のみならず、NY-ESO-1 を用いた系においてワクチン効果の検証を行う事で、KALA-MEND の DNA ワクチンとしての有用性を評価した。

【実験結果】

1-1. KALA-MEND による BMDC への遺伝子導入能評価

始めに、KALA-MEND による BMDC への遺伝子導入能評価をおこなった。BMDC は、C57BL/6J マウスの骨髄を採取し、Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 存在下で 6 日間培養する事で分化誘導した。BMDC に対し、Luciferase をコードする pDNA を内封した KALA-MEND を処理し、24 時間後の細胞ライセート中の Luciferase 活性を測定する事で、遺伝子導入能の指標とした。比較対象の粒子としては、R8-MEND を用いた。また、CpG 配列を有する pcDNA3.1-Luc (cytomegalovirus intermediate/early (CMV IE) promoter) と CpG 配列を完全に除いた pCpGfree-Luc(0) (human elongation factor-1 alpha (EF1 α) promoter) を pDNA として用いた。それぞれのナノ粒子の物性を **Table 1-1** に示す。粒子物性に大きな差は認められなかった。

Table 1-1. Figure 1-1において用いた各種MENDの粒子径及びゼータ電位(n=3-6, Mean \pm SD)

	Size (d.nm)	ζ -potential (mV)
R8-MEND (pcDNA3.1-Luc)	248 \pm 41	45 \pm 6
R8-MEND (pCpGfree-Luc(0))	185 \pm 42	40 \pm 2
KALA-MEND (pcDNA3.1-Luc)	162 \pm 5	38 \pm 2
KALA-MEND (pcDNA3.1-Luc(0))	164 \pm 3	46 \pm 1
KALA-MEND (pCpGfree-Luc)	172 \pm 22	42 \pm 1
KALA-MEND (pCpGfree-Luc(0))	160 \pm 4	37 \pm 1

これらのナノ粒子を BMDC へ処理した結果、どちらの pDNA を用いた際にも、KALA-MEND の方が R8-MEND に比べ有意に高い遺伝子導入能を示した (**Figure 1-1a**)。本結果より、樹状細胞株 JAWSII で得られた結果と同様、KALA-MEND はプライマリー樹状細胞である BMDC に対しても優れた遺伝子導入能を有する事が明らかとなった。また、pDNA からの CpG 配列の除去は BMDC への遺伝子導入能を高める事が示唆された。CpG 配列の除去による影響についてより詳細に検討をおこなうため、**Table 1-2** に示した 4 種類の pDNA を KALA-MEND により BMDC へ導入した際の遺伝子発現活性を評価した。その結果、CpG の配列の含有量に応じて遺伝子発現活性は減弱した (**Figure 1-1b**)。従って、BMDC への遺伝子導入においては pDNA より CpG 配列を除くことが、遺伝子発現活性の上昇に繋がる事が示唆された。

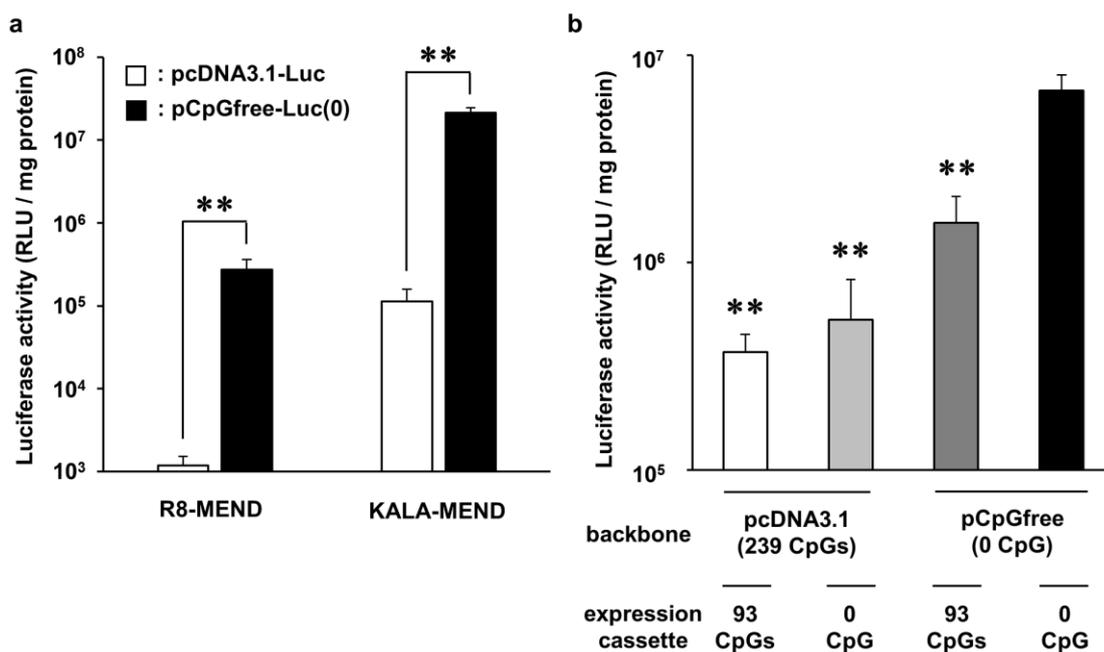


Figure 1-1. BMDCに対するKALA-MEND及びR8-MENDの遺伝子導入能評価。(a) BMDC (4.0×10^5 cells) に対して $0.4 \mu\text{g}$ pDNA (pcDNA3.1-Luc; Luc(+)) あるいは pCpGfree-Luc(0); Luc(-) 相当の KALA MEND あるいは R8-MEND をトランスフェクションし、24 時間後における細胞ライセート中の単位タンパク質あたりのルシフェラーゼ活性を定量した。Mean \pm SEM (n=3), **p < 0.01, Student's T-test (b) BMDC (4.0×10^5 cells) に対して $0.4 \mu\text{g}$ pDNA 相当の各種 pDNA を内封した KALA-MEND をトランスフェクションし、24 時間後における細胞ライセート中の単位タンパク質あたりのルシフェラーゼ活性を定量した。Mean \pm SEM (n=3), **p < 0.01, vs pCpGfree-Luc(0) (one-way ANOVA followed by Bonferroni test)

Table 1-2. Figure 1-1において用いたLuciferaseをコードするpDNA

	Backbone	ORF	Total number of CpG
pcDNA3.1-Luc	pcDNA3.1 (239 CpGs, CMV IE promoter)	Luc (93 CpGs)	342 CpGs
pcDNA3.1-Luc(0)	pcDNA3.1 (239 CpGs, CMV IE promoter)	Luc(0) (0 CpG)	293 CpGs
pCpGfree-Luc	pCpGfree (0 CpG, EF1 α promoter)	Luc (93 CpGs)	93 CpGs
pCpGfree-Luc(0)	pCpGfree (0 CpG, EF1 α promoter)	Luc(0) (0 CpG)	0 CpGs

1-2 KALA-MEND による BMDC の免疫活性化評価

次に、JAWSII において得られたもう 1 つの知見である、KALA-MEND の免疫活性化効果について BMDC を用いて評価した。まず、前検討として、BMDC \rightarrow KALA-MEND、あるいは R8-MEND を処理した際の 6 時間後の上清を回収し、Multiplex Suspension Array System (Millipore、株式会社ジェネティクスラボに委託解析) を用いて、上清中のサイトカイン・ケモカインについて網羅的に評価した。その結果、検出限界以上の濃度が認められた

サイトカイン・ケモカインの大部分において、KALA-MENDの方がR8-MENDに比べて産生を誘導している事が明らかとなった (Figure 1-2)。

その中でも特に差が大きい8種のサイトカイン・ケモカイン (IFN- β ・interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) (= C-X-C motif chemokine ligand (CXCL) 10)・IL-1 β ・IL-6・tumor necrosis factor alpha (TNF- α)・macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP-1 β) (= C-C motif chemokine ligand (CCL) 4)・monokine induced by gamma interferon (MIG) (= CXCL9)・IL-27p28) について、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて、上清中の濃度を測定した。本検討においては、既存のアジュバントとして知られる lipopolysaccharide (LPS) (toll-like receptor (TLR) 4 リガンド, 100 ng/mL)、CpG-oligodeoxyribonucleotide (ODN) (TLR9 リガンド, 1 μ g/mL) の処理時との比較をおこなった⁵⁷。その結果、Multiplex Suspension Array Systemの結果と同様に、8種のサイトカイン・ケモカインのいずれにおいてもR8-MENDに比べて、KALA-MENDによる産生が高かった (Figure 1-3a)。特に、KALA-MENDの処理によってIFN- β 、IL-1 β の上清中濃度がR8-MENDに比べ、それぞれ50倍、230倍高かった。また、LPSやCpG-ODNと比較して、IFN- β ・IP-10・IL-1 β ・MIGはKALA-MEND処理の方が高く産生されていたのに対し、IL-6・TNF- α ・MIP-1 β ・IL-27p28はLPSやCpG-ODNの方が強く産生を誘導してい

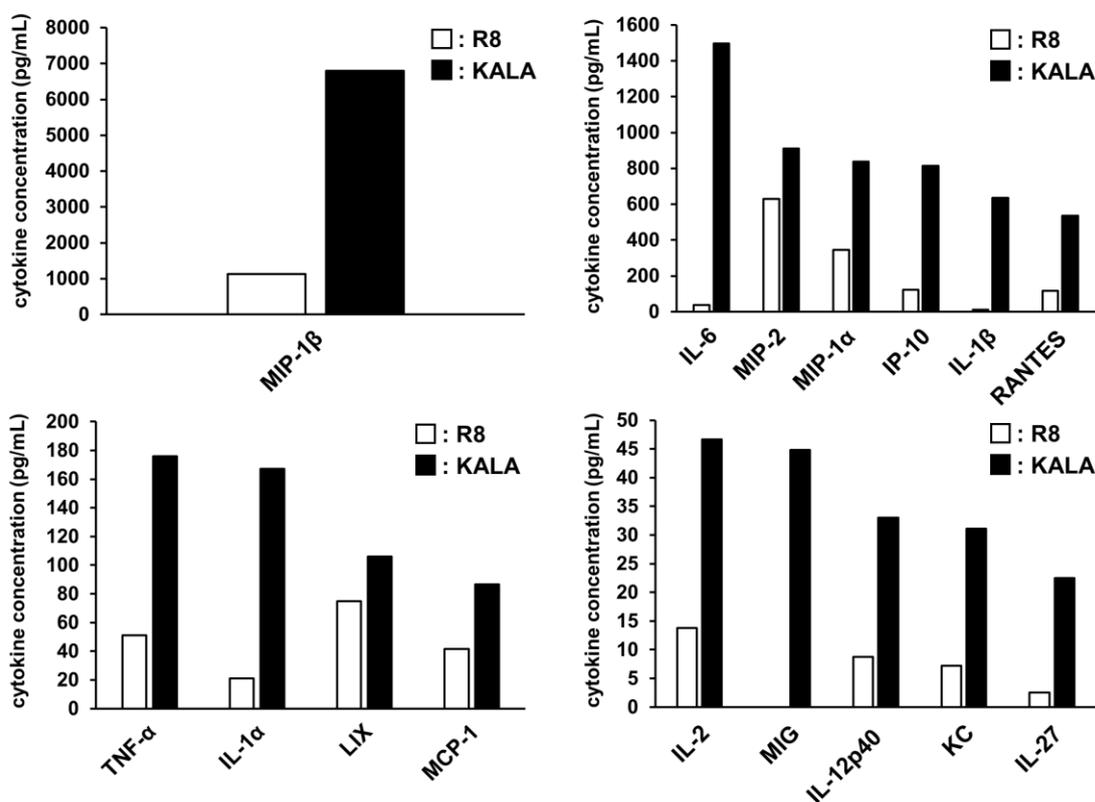


Figure 1-2. Multiplex Suspension Array を用いた網羅的サイトカイン産生評価。BMDC (4.0×10^5 cells) に対して 0.4 μ g pDNA 相当の KALA-MEND あるいは R8-MEND をトランスフェクションし、6 時間後の上清を Multiplex Suspension Array により解析した (n=1)。解析は株式会社ジェネティックラボに委託した。

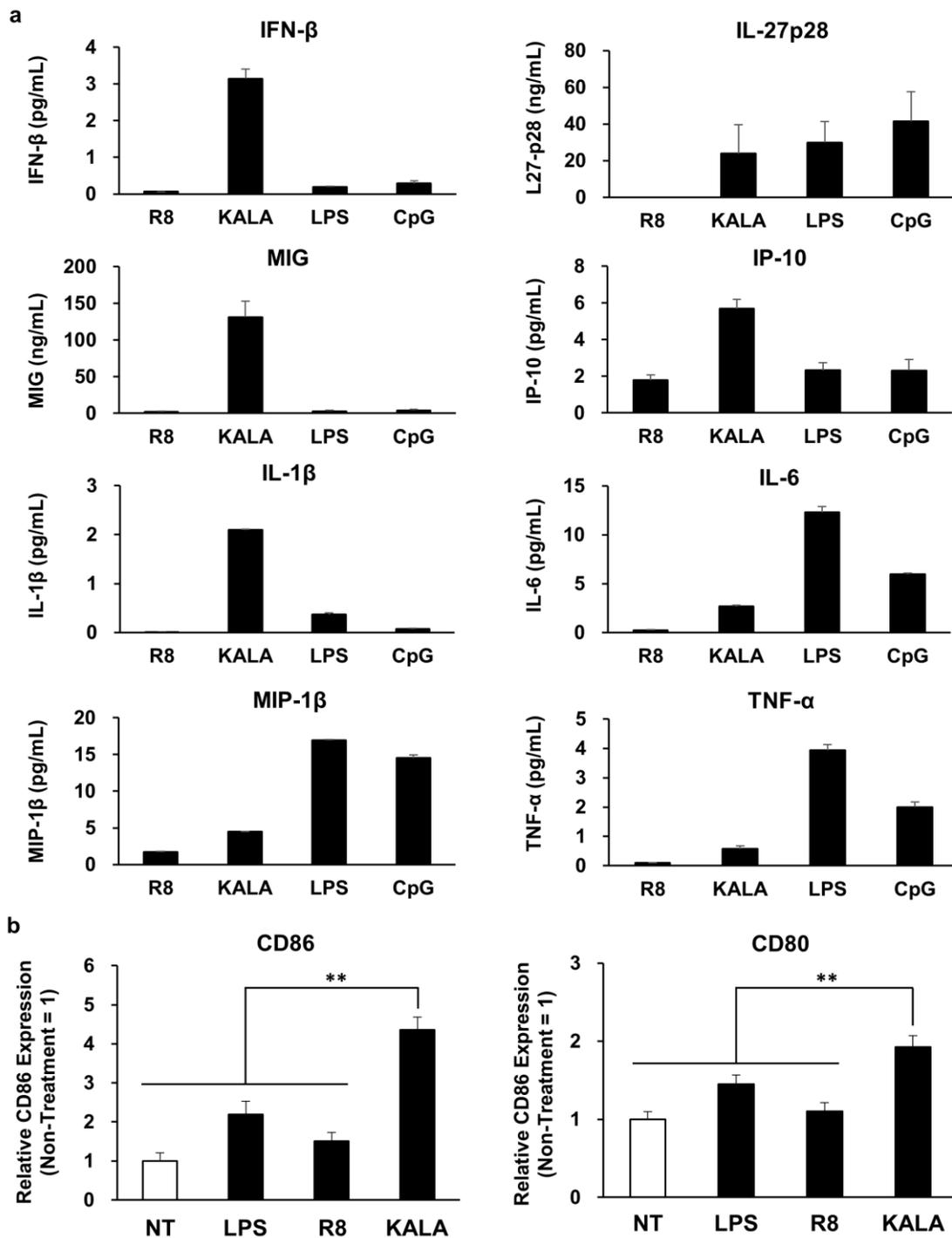


Figure 1-3. 上清中サイトカインの定量と樹状細胞活性化マーカーの発現解析。(a) BMDC (4.0×10^5 cells) に対して $0.4 \mu\text{g}$ pDNA 相当の KALA-MEND あるいは R8-MEND をトランスフェクション、もしくは $1 \mu\text{g/mL}$ の CpG-ODN、 100 ng/mL の LPS を処理した際の、6 時間後の上清を ELISA 法により定量した。Mean \pm SEM ($n=3$) (b) BMDC (8.0×10^5 cells) に対して $0.4 \mu\text{g}$ pDNA 相当の KALA-MEND あるいは R8-MEND をトランスフェクション、もしくは $1 \mu\text{g/mL}$ の LPS を処理後、21 時間後に細胞を回収し、anti-mouse CD80 antibody-PE あるいは anti-mouse CD86 antibody-PE で染色した。フローサイトメーターにより蛍光強度を測定した。Mean \pm SEM ($n=3$), ** $p < 0.01$, vs KALA MEND (one-way ANOVA followed by Bonferroni test)

た。また、樹状細胞の活性化マーカーとして知られる共刺激分子 CD80, CD86⁵⁸ の発現量についても、フローサイトメトリーを用いて定量した。その結果、KALA-MEND 処理群における CD80, CD86 の発現量は、R8-MEND 処理群及び LPS 処理群に比べて有意に高いことが明らかとなった (**Figure 1-3b**)。以上の結果より、KALA-MEND はマウスプライマリー樹状細胞である BMDC に対して、サイトカイン・ケモカインの産生、及び活性化マーカーである CD80, CD86 の発現量上昇を誘導する事が明らかとなった。本結果は、KALA-MEND が樹状細胞に対する免疫活性化効果を有する事を示唆するものである。また、既存のアジュバントとして知られる LPS や CpG サイトカイン・ケモカインの産生プロファイルが異なる事から、これらの既存のアジュバントとは異なるメカニズムを有する事が示唆された。

1-3 BMDC の免疫活性化に必要な KALA-MEND の構成要素の検証

前項において、KALA-MEND が BMDC の活性化を誘導する事が明らかとなった。一方、既存のアジュバントとして知られる TLR アゴニストである LPS や CpG-ODN とは異なる活性化プロファイルを有する事から、これらの認識機構とは異なるメカニズムにより BMDC を活性化している事が示唆された。そこで、KALA-MEND による免疫活性化のメカニズムの検証をおこなった。本項ではまず、BMDC の免疫活性化に必要な KALA-MEND の構成要素の検証を行った。KALA-MEND は pDNA とポリカチオンであるプロタミンからなるコア粒子を、膜融合性脂質組成として知られる 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl ethanolamine (DOPE) と phosphatidic acid (PA) からなる脂質膜⁵⁹ で覆う構造を有している。これらの構成要素のうち、核酸と脂質膜を異なる材料に置換した際の免疫活性化効果、今回は IL-6 の産生を指標に評価した。本項で用いた各種ナノ粒子の物性は **Table 1-3** の通りである。

Table 1-3. Figure 1-4において用いた各種MENDの粒子径及びゼータ電位 (n=3, Mean ± SD)

	Size (d.nm)	ζ-potential (mV)
pDNA (CpG(-) / Luc)	160 ± 4	37 ± 1
pDNA (CpG(+)/ Luc)	162 ± 5	38 ± 2
pDNA (CpG(-) / Non-coding)	193 ± 12	42 ± 5
ODN (20 mer.)	136 ± 11	34 ± 1
Liposome (empty)	121 ± 20	37 ± 2
EPC/Chol (Low-fusiogenic)	200 ± 10	38 ± 1
pDNA/KALA complex	96 ± 5	27 ± 2

始めに、pDNA について、CpG 配列の有無の寄与と、pDNA 中の open reading frame (ORF) の影響を評価した。CpG 配列を持たず Luciferase をコードする pDNA(Luc/CpG(-))、CpG 配列を有し Luciferase をコードする pDNA(Luc/CpG(+))、CpG 配列を持たず Luciferase をコードしない pDNA(Non-coding/CpG(-))を KALA-MEND により BMDC へ導入した際の IL-6 産生を評価した。その結果、pDNA(Non-coding/CpG(-))は pDNA(Luc/CpG(-))と同程度の IL-6 産生を示し、pDNA(Luc/CpG(+))は IL-6 産生が若干高い傾向を示したが、pDNA(Luc/CpG(-))との間に有意な差は認められなかった (Figure 1-4)。本結果より、KALA-MEND によるサイトカイン産生は、pDNA 中の ORF (Luciferase) や CpG 配列の有無に依らず誘導されることが示唆された。

次に内封核酸そのものについて検証するため、DNA を内封しない KALA 修飾リポソーム (empty) と、アデニンとチミンを繰り返す 20 塩基の短鎖 DNA を内封する KALA-MEND (AT 20 mer.) による IL-6 産生を評価した。その結果、どちらの粒子においても IL-6 産生は認められなかった (Figure 1-4)。本結果より、KALA-MEND によるサイトカイン産生には、pDNA あるいは長鎖 DNA が必要である事が示唆された。

最後に MEND 脂質膜の寄与を検証した。これまでに用いていた高膜融合性の脂質組成である DOPE/PA に比べ、低い膜融合性しか持たない Egg phosphatidylcholine (EPC) と Cholesterol (Chol) により構成される脂質膜からなる KALA-MEND (Low-fusiogenic)、及び脂質膜を持たない pDNA と KALA ペプチドの複合体 (pDNA/KALA) による IL-6 産生を評価した。その結果、いずれの粒子を用いた場合においても、IL-6 の産生は認められな

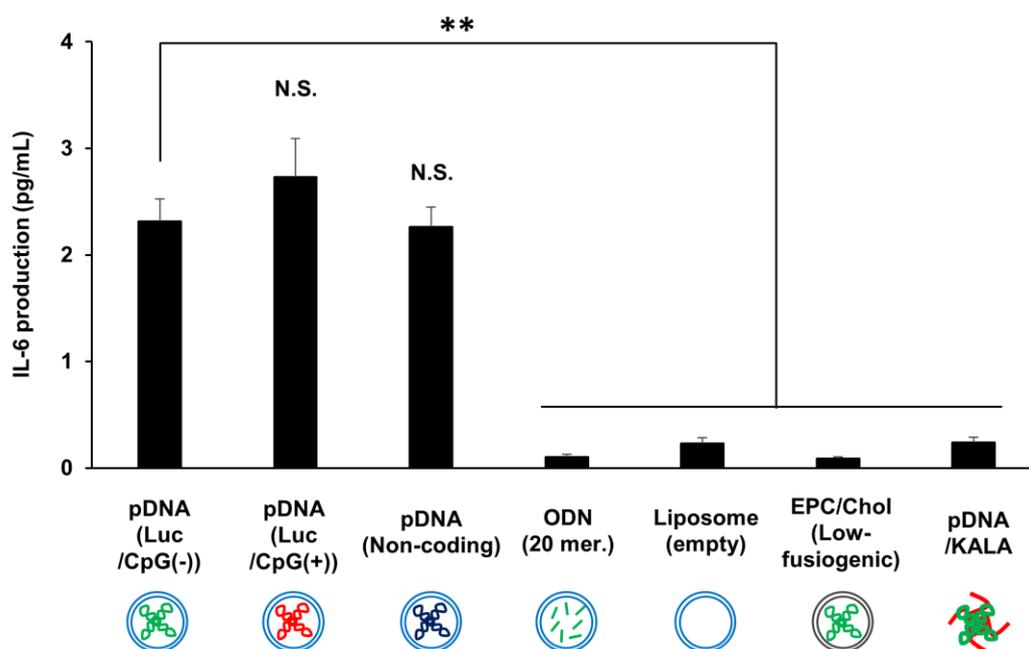


Figure 1-4. KALA-MENDによる免疫活性化に必要な構成要素の検証。BMDC (4.0×10^5 cells)に対して0.4 μ g pDNA相当の各種KALA-MENDをトランスフェクション後、6時間後の上清をELISA法により定量した。Mean \pm SEM (n=3), N.S. Not Significant, **p < 0.01, vs pDNA (Luc/CpG(-)) (one-way ANOVA followed by Bonferroni test)

かった (Figure 1-4)。本結果より、KALA-MEND による IL-6 産生には高膜融合性の脂質組成が必要である事が示唆された。以上の結果より、KALA-MEND による BMDC の免疫活性化には、KALA-MEND を構成する KALA ペプチド、高膜融合性脂質、及び pDNA の全ての構成要素が必要である事が示唆された。

1-4 KALA-MEND によるエンドソーム脱出能の評価

前項において、KALA-MEND による BMDC の免疫活性化には、KALA ペプチドと高膜融合性の脂質膜が必要である事が示唆された。高膜融合性脂質膜は、MEND の生体膜との融合、及びその突破に寄与すると考えられる。また KALA ペプチドも元来、核膜との融合性の向上を期待して用いられた。そこでまず、KALA-MEND の生体膜との融合性を、モデル生体膜系として赤血球を用いた Hemolysis assay により評価した。ヘパリン存在下で採取されたマウス血液より赤血球懸濁液を調製し、pH 7.4, 6.5, 5.5 において各種ナノ粒子とインキュベートした際のヘモグロビンの漏出を、吸光度を指標に評価した。本実験により、各種 pH 環境下において、内封物の漏出を伴う膜傷害能を評価する事が可能である。その結果、R8-MEND ではいずれの pH においてもヘモグロビンの漏出は認められなかったが、

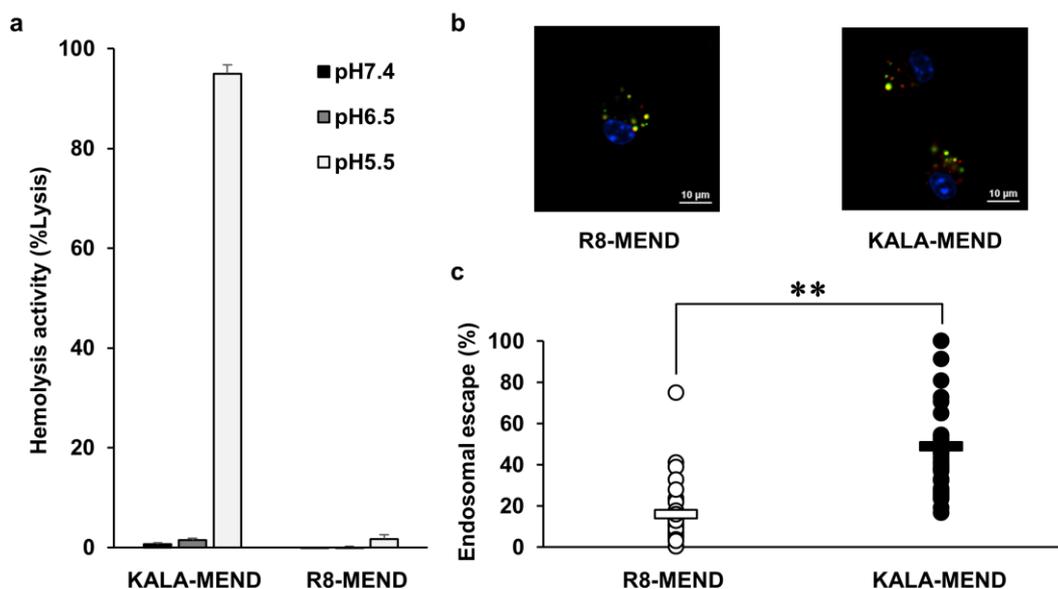


Figure 1-5. KALA-MENDのエンドソーム脱出能評価。(a) マウス静脈血より採取した赤血球を、pH 5.5~7.4の緩衝液中でKALA-MENDあるいはR8-MENDと混合し、37°C、30分インキュベートした際の、赤血球膜の障害によるヘモグロビンの漏出を定量した。ただし、Positive Control (Triton- X100)で完全に溶血させた際の漏出を100%、緩衝液のみの際の漏出を0%とした。Mean \pm SEM (n=3)。 (b,c) BMDC (4.0×10^5 cells) に対して $0.4 \mu\text{g}$ pDNA 相当の、QD705修飾pDNA封入KALA-MENDあるいはR8-MENDをトランスフェクション後、 1.6×10^5 cellsのBMDCをガラスベースディッシュのガラス面にアプライン2時間インキュベート、1mLの培地を加えて更に4時間インキュベートした。観察の10分前にHoechst33342、5分前にLysotracker Green DND-26処理を行った。(b) トランスフェクションから6時間後にスピンディスク型共焦点顕微鏡を用いて、QD705修飾pDNA (疑似カラー: 赤)、Hoechst 33342 (核、疑似カラー: 青)、Lysotracker Green DND-26 (酸性コンパートメント、疑似カラー: 緑)の観察を行った。bars: 10 μm 。(c) 取得した画像を用いて、以下の式に従い酸性コンパートメント脱出率を評価した: $((1 - (\text{黄色色ピクセルの積分強度} / \text{赤色ピクセルの積分強度})) \times 100)$ 。それぞれの点は1つの細胞における値を示し、横棒は全体の平均値を表す。Mean (n=30), **p < 0.01 (Student's T test)

KALA-MEND においては、pH5.5 において強いヘモグロビンの漏出が認められた (**Figure 1-5a**)。本結果より、KALA-MEND は酸性条件下において、生体膜と中身の漏出を伴う相互作用を発揮する事が明らかとなった。この結果は、酸性環境下であるエンドソーム/ライソソームにおいて KALA-MEND が膜融合を起こすことを示唆する結果である。

そこで実際に、KALA-MEND のエンドソーム/ライソソーム脱出を検証するため、共焦点顕微鏡を用いて酸性コンパートメントと KALA-MEND (pDNA) の共局在を評価した。pDNA をビオチン化し、quantum dot (QD) 705-ストレプトアビジンを反応させることで、QD705 標識 pDNA (QD705-pDNA) を調製した。これを KALA-MEND に内封する pDNA の 50% と置換し、QD705-pDNA 内封 KALA-MEND を調製した。本 KALA-MEND を BMDC へ処理し、6 時間後にスピンドイスク型共焦点顕微鏡により観察をおこなった。その際には、Lysotracker Green DND-26 を処理する事で、酸性コンパートメントを蛍光標識した。その結果、R8-MEND においては、赤色で疑似カラー表示された QD705-pDNA と緑色で疑似カラー表示された酸性コンパートメントが多く共局在している様子が観察されたが、KALA-MEND においては、多くの QD705-pDNA が酸性コンパートメントとは異なる位置に観察された (**Figure 1-5b**)。また、QD705-pDNA と酸性コンパートメントの共局在を、画像解析ソフトである Image Pro を用いて解析・定量した結果、KALA-MEND の方が R8-MEND よりも有意に酸性コンパートメントと共局在していない事が明らかとなった (**Figure 1-5c**)。以上の結果より、KALA-MEND は酸性環境下において高い膜傷害能を有し、エンドソーム/ライソソームから効率的に脱出し、細胞質へ pDNA を送達している事が示唆された。

1-5 KALA-MEND による樹状細胞活性化の分子メカニズムの検討

近年、pDNA のような double stranded DNA (dsDNA) が細胞質において、TLR 非依存的・細胞質内 DNA センサー依存的に認識されることが報告されている⁶⁰⁻⁶²。例えば、dsDNA が stimulator of IFN genes (STING) / TANK-binding kinase 1 (TBK1) 経路によって認識されると IFN- β を、absent in melanoma-2 (AIM-2) インフラマソームによって認識されると IL-1 β が産生される^{61,63-64}。KALA-MEND はこれらのサイトカインを誘導し (**Figure 1-3a**)、これには pDNA あるいは長鎖 DNA が重要である事が示唆されている (**Figure 1-4**)。また、KALA-MEND が効率的に pDNA を BMDC の細胞質へ送達していることが示唆されている (**Figure 1-5**) 事を考えると、KALA-MEND が細胞質内 DNA センサーを刺激して、BMDC の活性化を誘起する事が推測される。そこで、これら 2 つの経路の阻害剤を処理した際の KALA-MEND による BMDC からのサイトカイン産生を評価した。STING / TBK1 経路に対しては、TBK1 / inhibitor of NF- κ B kinase (IKK ϵ) の阻害剤である BX795 を、AIM-2 インフラマソーム経路に対して caspase-1 の阻害剤である Ac-YVAD-CMK を用いた。KALA-MEND の処理と同時に、Ac-YVAD-CMK が 0 μ M, 8 μ M, 40 μ M、BX795 が 0 μ M, 0.1 μ M, 0.01 μ M となるようにそれぞれ BMDC へ処理し、6 時間後の上清中の IL-1 β 、

及び IFN- β の濃度をそれぞれ測定した。その結果、Ac-YVAD-CMK の処理により IL-1 β の産生が、BX795 の処理により IFN- β の産生が有意に抑制された (Figure 1-6a)。本結果より、KALA-MEND による IL-1 β や IFN- β の産生は、細胞質内 DNA センサーである AIM-2 インフラマソームや STING / TBK1 経路を介して誘導されていることが示唆された。また、同様の条件において IL-6 の産生を評価したところ、どちらの阻害剤処理によっても一定の産生抑制が認められた (Figure 1-6b)。本結果より、IL-6 の産生に関しても、それぞれの経路が部分的に関与している事が示唆された。

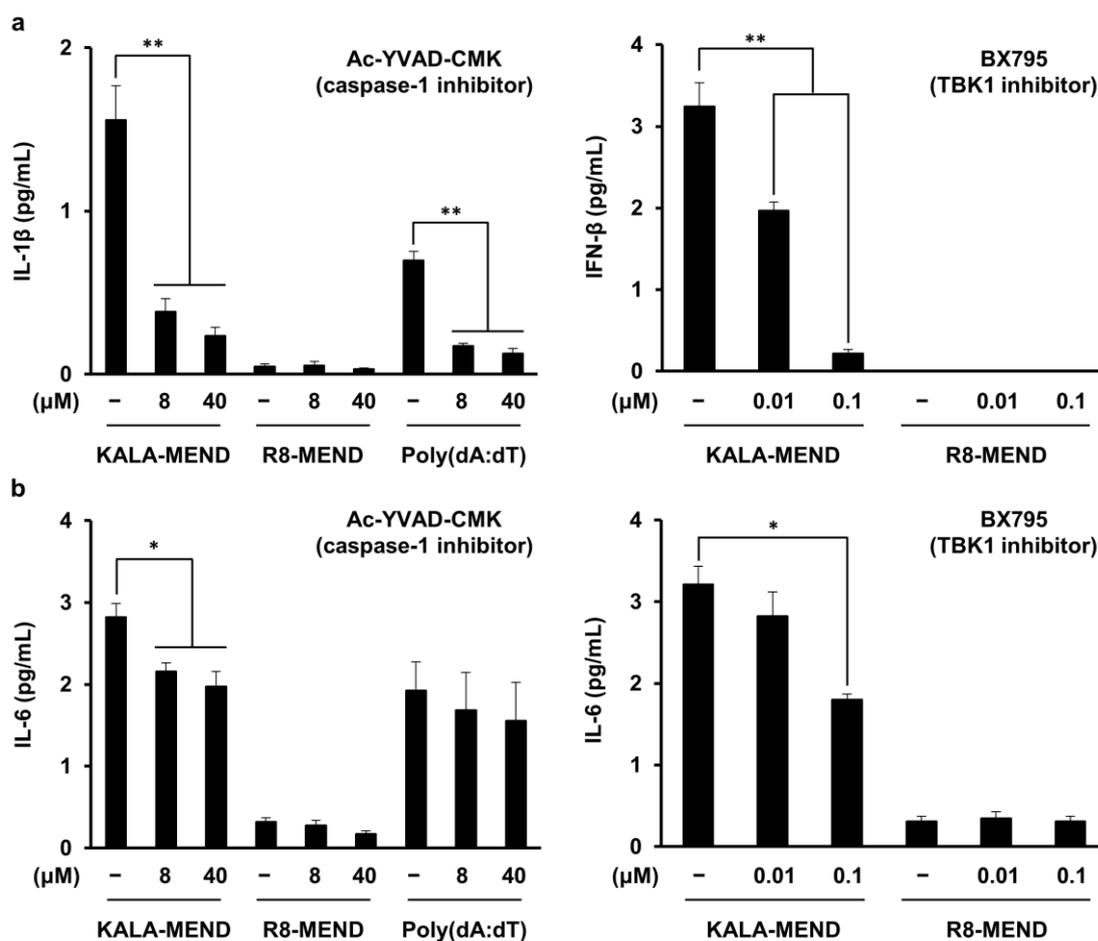


Figure 1-6. Caspase-1, TBK1阻害剤存在下におけるサイトカイン産生評価。0, 8, 40 μ M Ac-YVAD-CMK (caspase-1阻害剤)、あるいは0, 0.01, 0.1 μ M BX795(TBK1阻害剤)存在下において、BMDC (4.0×10^5 cells) に対して0.4 μ g pDNA相当の各種KALA-MENDをトランスフェクションした際の、6時間後の上清における、(a) IL-1 β , IFN- β 、(b) IL-6の濃度をELISA法を用いて定量した。Mean \pm SEM (n=3), *p < 0.05, **p < 0.01, vs no inhibitor (one-way ANOVA followed by Bonferroni test)

1-6 KALA-MEND の抗原提示誘導能評価

次に、KALA-MEND の DNA ワクチンベクターとしての評価を行うため、始めにモデル抗原である OVA を用いた抗原提示アッセイをおこなった。本アッセイにおいては、OVA₂₅₇₋₂₆₄/H-2K^b を認識し、IL-2 と共に β-galactosidase (β-Gal) を産生する T 細胞株である B3Z を用いた⁶⁵。CpG 配列を持たない、OVA をコードする pDNA として pCpGfree-OVA(0) を KALA-MEND により BMDC へ導入した。その 24 時間後に細胞を回収したのち、B3Z 細胞と共培養した。更に 15 時間後に β-Gal 活性を、基質である chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG) を用いた比色定量により評価する事で、OVA の抗原提示強度の指標とした。その結果、KALA-MEND により pCpGfree-OVA(0) を導入された BMDC は、導入 pDNA 量依存的に抗原提示を示した (Figure 1-7)。一方で R8-MEND により導入した場合には抗原提示は認められなかった。また、CpG を有する、OVA をコードする pDNA である pcDNA3.1-OVA を用いた場合には、pCpGfree-OVA(0) と比較して 1/10 程度の抗原提示強度であった。以上の結果より、KALA-MEND による、CpG 配列を持たない抗原コード pDNA の導入は、BMDC からの抗原提示を効率的に誘導する事が明らかとなった。

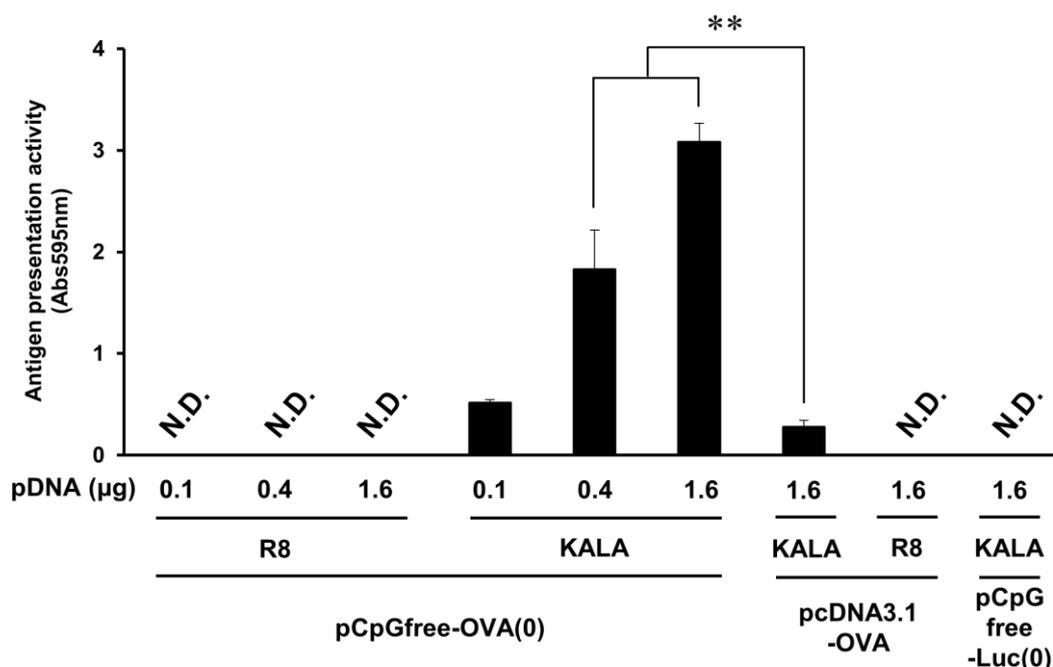


Figure 1-7. H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特異的抗原提示能評価。BMDC (2.0×10⁶ cells) に対して 0.1, 0.4, 1.6 µg pDNA 相当の各種 MEND をトランスフェクションし、24 時間後に B3Z 細胞と共培養した。16 時間後に産生された β-Gal をその基質である CPRG を用いて定量した。Mean ± SEM (n=3), N.D.: Not detected, **p < 0.01 vs KALA (pcDNA3.1-OVA) (one-way ANOVA followed by Bonferroni test)

1-7 抗原遺伝子導入 BMDC による抗原特異的 CTL 活性の評価

腫瘍に対する抗原特異的免疫において、がん細胞を直接傷害する CTL の役割は非常に重要である事が知られている。そこで本項では、KALA-MEND により OVA をコードする pDNA を導入された BMDC をマウスへ免疫した際の、OVA 特異的 CTL 活性について、*in vivo* CTL assay により評価した。KALA-MEND により pCpGfree-OVA(0)を導入された BMDC をマウスの footpad より免疫した。1 週間後にナイーブマウスより脾臓細胞を単離し、OVA₂₅₇₋₂₆₄ ペプチドを処理した標的細胞、及び未処理のコントロール細胞を調製した。その後、標的細胞は、1 μ M の Carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) で染色し (CFSE^{High}) コントロール細胞は 0.1 μ M で染色する (CFSE^{Low}) ことで蛍光標識を行った。これらの細胞を等量混合し、免疫マウスの尾静脈より投与した。その 20 時間後、脾臓を回収し脾臓細胞として単離したのち、CFSE^{High} と CFSE^{Low} の細胞数をフローサイトメトリーにより測定した。OVA 特異的な CTL 活性が免疫マウスの生体内で誘導されている場合、OVA₂₅₇₋₂₆₄ ペプチドを処理された標的細胞 (CFSE^{High}) のみ選択的に傷害されることから、CFSE^{High} と CFSE^{Low} の比を算出する事で、CTL 活性の指標とした。その結果、KALA-MEND による pCpGfree-OVA(0)のトランスフェクション量依存的に、OVA 特異的な CTL 活性が上昇した (Figure 1-8)。また、R8-MEND により pCpGfree-OVA(0)を導入された BMDC では、CTL 活性がほとんど認められなかった。本結果より、KALA-MEND により抗原遺伝子を導入された BMDC の免疫により、OVA 特異的な CTL 活性が誘導されることが明らかとなった。

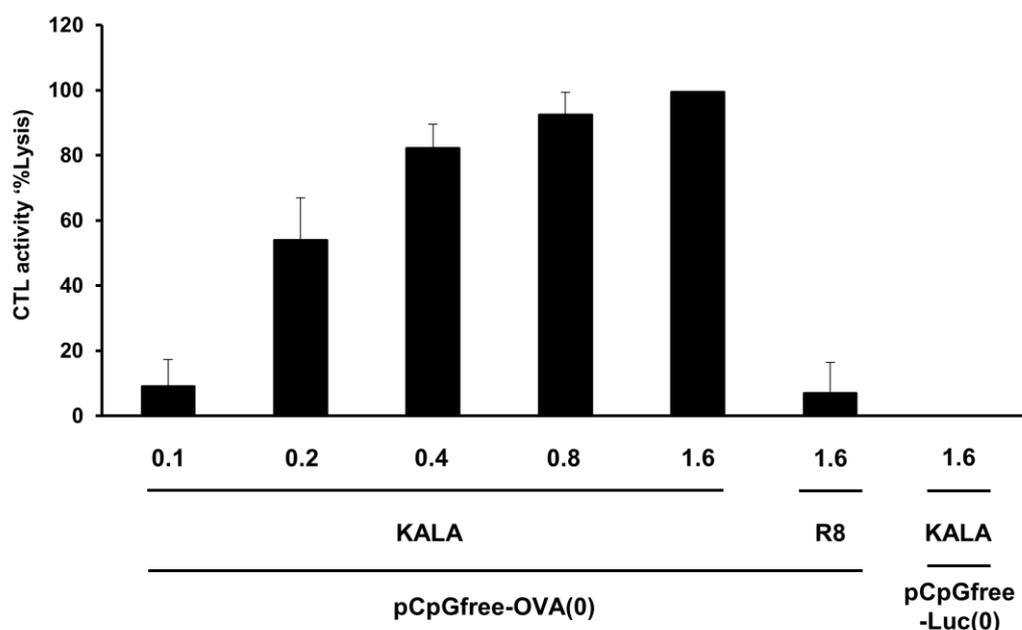


Figure 1-8. マウス生体内におけるOVA特異的細胞傷害性T細胞活性評価。BMDC(2.0×10^6 cells)に対して、適当量のpDNA相当のMENDをトランスフェクションし、6時間後に回収後 5.0×10^5 cells/mouseで免疫した。1週間後、等量の標的細胞 (CFSE^{high})とコントロール細胞 (CFSE^{low})を静脈内投与し、20時間後の脾臓におけるCFSE^{high}/CFSE^{low}比を算出した。ただしナイーブマウスにおけるCFSE^{high}/CFSE^{low}比を0% Lysisとした。Mean \pm SEM (n=3-6)

1-8 KALA-MENDによる治療的な抗腫瘍効果の検討

次に、がんワクチンとしての有用性を評価するため、OVAを用いた治療的な抗腫瘍効果の検討を行った。OVAを発現するEL4リンパ腫であるE.G7-OVAを、C57BL/6Jマウスの右脇腹皮下へ移植した。腫瘍サイズが100 mm³以上となったマウスに対して、移植から1週間後及び2週間後に、各ナノ粒子により抗原遺伝子を導入されたBMDCをfootpadより免疫した。その後の皮下腫瘍のサイズを経時的に測定する事で、治療的な抗腫瘍効果の検討をおこなった。その結果、KALA-MENDによってpCpGfree-OVA(0)を導入されたBMDCの免疫により、PBS投与群に比べ有意な腫瘍体積の減少が認められた (Figure 1-9)。また、R8-MENDによりpCpGfree-OVA(0)を導入されたBMDCや、KALA-MENDによりpCpGfree-Luc(0)を導入されたBMDCにおいては、そのような腫瘍体積の減少は認められなかった。本結果より、KALA-MENDは樹状細胞型DNAワクチンベクターとして有用である事が示唆された。

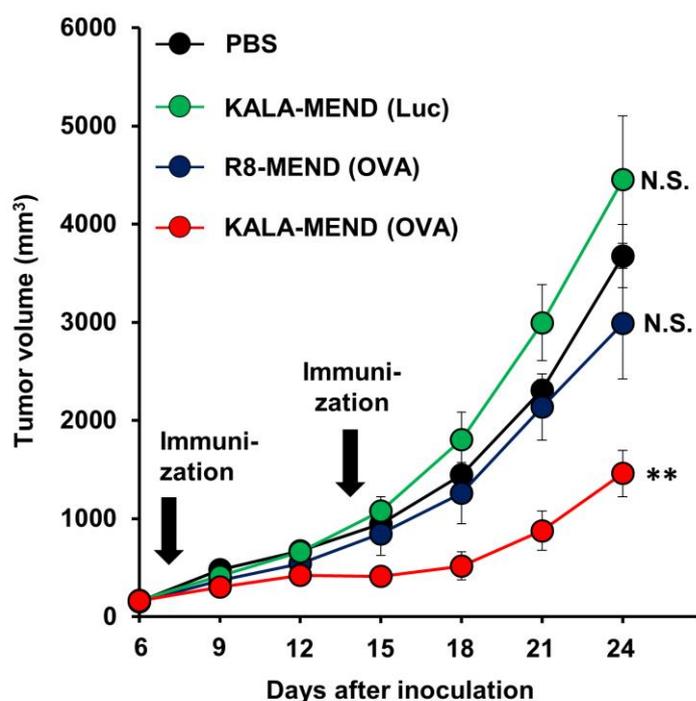


Figure 1-9. OVA発現リンパ腫に対する治療的抗腫瘍効果の検証。OVA発現リンパ腫であるE.G7-OVAをマウス右脇腹に、 8.0×10^5 cells/mouse移植した。その1週間後に、BMDC (2.0×10^6 cells) に対して1.0 μ g pDNA相当のMENDをトランスフェクションし、6時間後に回収後 5.0×10^5 cells/mouseで免疫した。その1週間後に同様の方法で再度免疫を行った。E.G7-OVA移植後6日目から3日おきに腫瘍の体積を以下の式に従って算出した: (長軸×短軸×短軸)/0.52。Mean \pm SEM (n=5), **p < 0.01, N.S.; Not Significant, vs PBS (one-way ANOVA followed by Bonferroni test)

1-9 がん精巢抗原 NY-ESO-1 を用いた DNA ワクチンとしての有用性評価

ここまでは OVA を用いた DNA ワクチンとしての評価をおこなってきたが、OVA は抗原性の高いモデル抗原であり、比較的抗原特異的免疫応答を起こしやすい。そこで、KALA-MEND の DNA ワクチンベクターとしての有用性を更に評価するため、ヒト臨床でも治療用抗原として頻用される、がん精巢抗原 NY-ESO-1 を抗原として用いた DNA ワクチンの検討をおこなった。NY-ESO-1 のマウスにおける CTL エピトープは H-2K^d に関して知られているため、NY-ESO-1 を用いた実験においては、BALB/c マウスを用いている。

CpG 配列を含まない、NY-ESO-1 をコードする pDNA として pCpGfree-NY-ESO-1(0) を構築し、KALA-MEND により BMDC へ導入した。本実験においては 1.2 μg pDNA 相当の KALA-MEND を BMDC へ処理している。本 BMDC を BALB/c マウスへ免疫し、1 週間後に *in vivo* CTL assay を用いて、NY-ESO-1 特異的 CTL 活性を評価したところ、20% 程度の NY-ESO-1 特異的な CTL 活性が認められた (Figure 1-10a, PCI(-))。本結果より、NY-ESO-1 を用いた系においても、KALA-MEND が DNA ワクチンベクターとして機能す

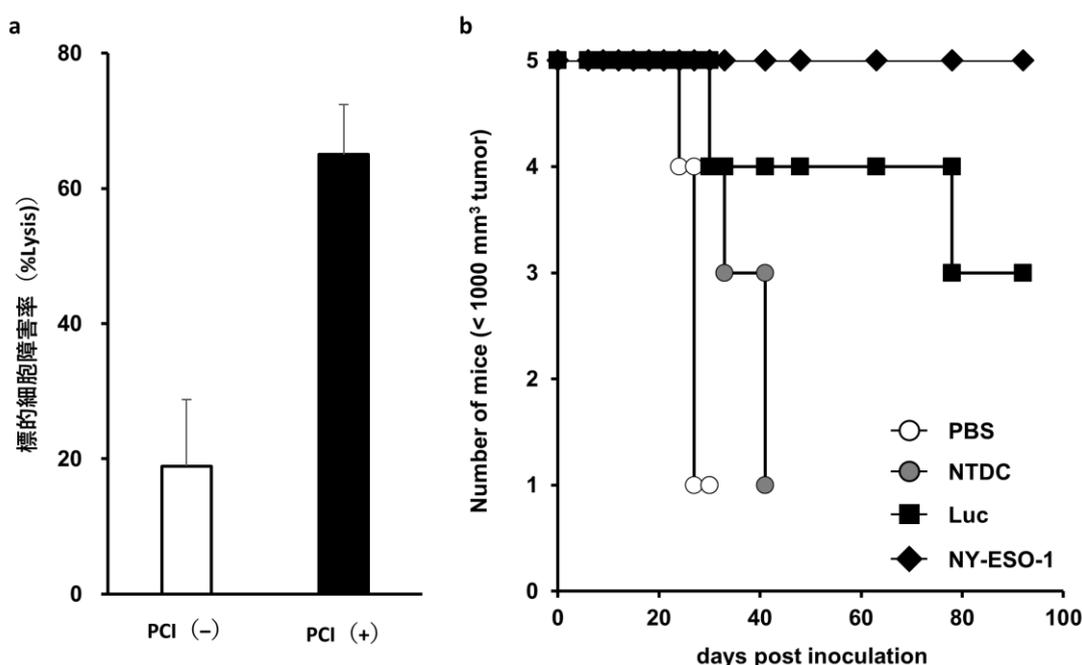


Figure 1-10. NY-ESO-1を用いた*in vivo* CTL assayと予防的抗腫瘍効果評価。(a) BMDC(2.0×10^6 cells)に対して、1.2 μgのpCpGfree-NY-ESO-1(0)をKALA-MENDによりトランスフェクションした。PCI(+/-)群においては、KALA-MENDのトランスフェクションと同時にPCIを10 μMとなるようにBMDCへ処理した。6時間後にBMDCを回収し、 5.0×10^5 cells/mouseで免疫した。1週間後、等量の標的細胞(CFSE^{high})とコントロール細胞(CFSE^{low})を静脈内投与し、20時間後の脾臓におけるCFSE^{high}/CFSE^{low}比を算出した。ただしナイーブマウスにおけるCFSE^{high}/CFSE^{low}比を0% Lysisとした。Mean ± SEM (n=3-6)。(b) BMDC(2.0×10^6 cells)に対して、1.2 μgのpCpGfree-NY-ESO-1(0)あるいはpCpGfree-Luc(0)をKALA-MENDによりトランスフェクションした。同時に、PCIを10 μMとなるようにBMDCへ処理した。6時間後にBMDCを回収し、 5.0×10^5 cells/mouseで免疫した。トランスフェクションを行っていないBMDCを非処理BMDCとして同様にマウスへ投与した(NTDC)。1週間後、同様の方法で免疫をおこなった。その1週間後、CT26/NYESO1細胞を、 1.0×10^6 cells/mouseの条件で、免疫マウスの右脇腹皮下に移植した。CT26/NYESO1の移植6日後から腫瘍の体積を以下の式に従って算出した:(長軸×短軸×短軸)/0.52。Mean ± SEM (n=5)。各群における腫瘍体積が1000 mm³を超えないマウスの数を継続的にプロットした。

る事が示唆された。しかしながら、**Figure 1-8**において OVA を用いた場合には、1.2 μg の pDNA トランスフェクションにより 100%近くの CTL 活性が認められたことを考えると、その CTL 活性は低いものであった。BALB/c マウス由来の BMDC において、0.4 μg 相当の pCpGfree-Luc(0)を KALA-MEND により導入した際の Luciferase 活性は、 $2.76 \pm 0.63 \times 10^7$ RLU / mg protein (n=3, Mean \pm SEM)であり、C57BL/6J マウス由来の BMDC における同様の実験で得られた値 ($2.12 \pm 0.32 \times 10^7$ RLU / mg protein) と同程度であった。従って、NY-ESO-1 に対する CTL 活性の相対的な低さは、用いたマウスの系統の違いによる遺伝子導入効率の違いには寄らないと考えられる。

NY-ESO-1 に対する CTL 活性を向上させるため、BMDC の細胞毒性を低減させる目的で、KALA-MEND の処理時に Pan-caspase inhibitor (PCI) である Q-VD-OPh を同時に処理した際の CTL 活性を評価した。その結果、PCI の同時処理によって、NY-ESO-1 特異的な CTL 活性の上昇が認められた (**Figure 1-10a**)。そこで、がんワクチンとしての機能を評価するため、始めに NY-ESO-1 発現を発現する大腸がん細胞株 CT26 (CT26/NYESO1) に対する予防的な抗腫瘍効果を評価した。CT26/NYESO1 移植 2 週間前、及び 1 週間前に、KALA-MEND により pCpGfree-NY-ESO-1 を導入された、PCI 処理 BMDC をマウスへ免疫した。その後 CT26/NYESO1 を脇腹皮下に移植し、その後の腫瘍体積を経時的に測定した。その結果、pCpGfree-NY-ESO-1 導入 BMDC の免疫により、約 90 日間に渡って腫瘍の生着を予防する事に成功した (**Figure 1-10b**)。

最後に、CT26/NYESO1 に対する治療的な抗腫瘍効果を検証した。CT26/NYESO1 を右脇腹皮下に移植し、その 1 週間後、及び 2 週間後に KALA-MEND により pCpGfree-NY-ESO-1 を導入された、PCI 処理 BMDC を免疫した。経時的に腫瘍体積を測定し抗腫瘍効果を検証したところ、pCpGfree-NY-ESO-1 導入 BMDC の免疫をおこなっても、PBS 投与群や未処理 BMDC 投与群、pCpGfree-Luc(0)導入 BMDC 免疫群との間に差は認められなかった (**Figure 1-11**)。本結果より、KALA-MEND による樹状細胞型 DNA ワクチンは、ヒト実弾抗原である NY-ESO-1 を用いたモデルにおいて、治療的な抗腫瘍効果を得る事は困難である事が明らかとなった。

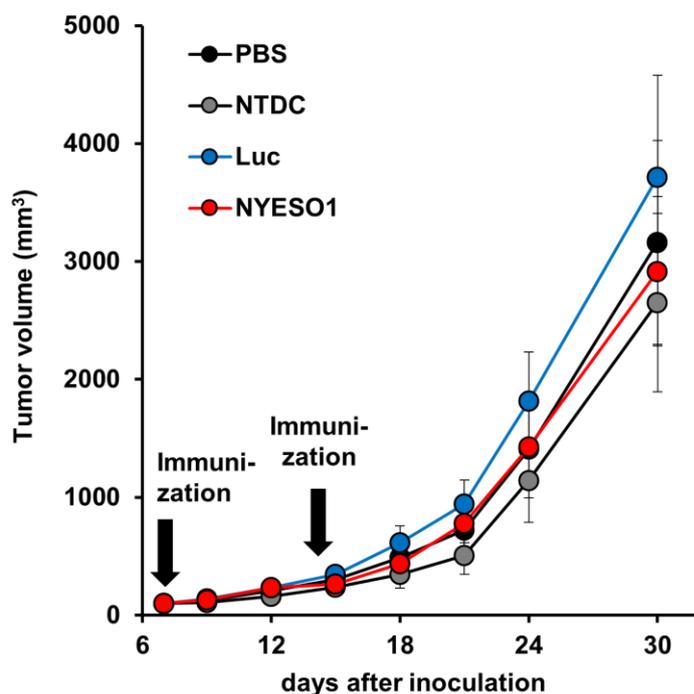


Figure 1-11. NY-ESO-1発現CT26大腸がん細胞に対する治療的抗腫瘍効果の検証。NY-ESO-1発現大腸がん細胞であるCT26/NYESO1をマウス右脇腹に、 1.0×10^6 cells/mouseの条件で移植した。その1週間後に、BMDC (2.0×10^6 cells)に対して1.2 μ gのpCpGfree-NY-ESO-1(0)、あるいはpCpGfree-Luc(0)をKALA-MENDIによりトランスフェクションした。同時に、PCIを10 μ MとなるようにBMDCへ処理した。6時間後にBMDCを回収し、 5.0×10^5 cells/mouseで免疫した。トランスフェクションを行っていないBMDCを非処理BMDCとして同様にマウスへ投与した(NTDC)。その1週間後に同様の方法で再度免疫を行った。CT26/NYESO1移植後6日目から腫瘍の体積を以下の式に従って算出した:(長軸 \times 短軸 \times 短軸)/0.52. Mean \pm SEM (n=5).

【考察】

第1章では、KALA ペプチド修飾 MEND (KALA-MEND) の DNA ワクチンとしての機能評価をおこなった。

KALA-MEND による樹状細胞への高い遺伝子導入能は、培養細胞である JAWSII 同様、プライマリー樹状細胞である BMDC においても認められた (Figure 1-1)。この際、pDNA 中の CpG 配列の影響を評価したところ、332 個の CpG 配列を持つ pcDNA3.1-Luc に比べ、CpG 配列を持たない pCpGfree-Luc(0)は、約 100 倍の遺伝子発現活性を示した。この現象は、KALA-MEND のみならず、R8-MEND においても認められたことから、BMDC に対する pDNA 導入において、pCpGfree ベクターが優れている事が示唆された。いくつかの先行論文において、CpG 配列の除去は CHO 細胞や 293 細胞などの培養細胞⁶⁶、あるいはエレクトロポレーション法による筋肉内投与時⁶⁷の遺伝子発現を減少させる事が報告されているが、一般的には、遺伝子発現効率やその持続性を高める事が知られている⁶⁸⁻⁷²。これらの効果においては、炎症反応の抑制が重要であると考えられている。CpG 配列は TLR9 のリガンドであり⁷³⁻⁷⁴、それ自身が免疫細胞の活性化能を有する事から、BMDC における遺伝子発現の上昇にも、炎症応答が関連する事がまず想定された。過去の文献報告においても、pDNA 中の CpG 配列が遺伝子発現を負に制御し、それには炎症応答が関連する事が明らかとなっている。しかしながら、その後の検討において、pCpGfree ベクターを用いても、IL-1 β 、IL-6、TNF- α を筆頭とする炎症性サイトカインの産生が誘導されることが明らかとなった (Figure 1-3, 4)。従って、BMDC に対する pDNA 導入において、CpG 配列の除去による遺伝子発現活性の増強は、炎症応答では説明が困難であると考えられる。想定される仮説の1つは、CpG 配列のサイレンシングである。ゲノム DNA においては、CpG 配列がメチル化される事で転写の抑制を受ける事が知られている⁷⁵。これは、エピソームに存在する pDNA においても同様の現象が報告されている⁷⁶。他の仮説としては、プロモーターの違いが考えられる。CpG 配列を有する pcDNA3.1 ベクターにおいては CMV IE promotor を用いているが、CpG 配列を除去した pCpGfree ベクターにおいては EF1 α promotor を用いている。EF1 α promotor は、CMV IE promotor が有効でない、胚性幹細胞において効率的な遺伝子導入が可能である事が報告されており、同様に初代培養系である BMDC においても同様であった可能性が考えられる⁷⁷。

マウス樹状細胞株 JAWSII に対し KALA-MEND をトランスフェクションした際のマイクロアレイ解析において、mRNA レベルで発現が上昇したサイトカイン・ケモカインを、プライマリー樹状細胞である BMDC においてタンパク質レベルにおける産生評価をおこなったところ、多数のサイトカイン・ケモカインの発現が認められた (Figure 1-2, 3a)。自然免疫系の活性化に伴うサイトカインやケモカインの産生は、免疫応答において極めて重要

な役割を有する事が知られている⁷⁸⁻⁸⁰。特に、KALA-MENDによる産生が認められたサイトカイン・ケモカインの機能を考えると、これらの発現の上昇は、腫瘍に対するワクチン効果を考える上で非常に有効であると言える。例えば、IL-6やIL-1 β 、TNF- α のような炎症性サイトカインは、樹状細胞による獲得免疫の誘導に重要であり⁸¹、IFN- β のようなI型IFNは獲得免疫系の中でも細胞性免疫(T helper 1 (Th1) 免疫)の誘導を様々なメカニズムにより促進する⁸²。例えば、CD4⁺T細胞のTh1型への分化促進や⁸³、樹状細胞によるCD8⁺T細胞へのクロスプレゼンテーションの促進⁸⁴⁻⁸⁶、メモリーCTLの増加⁸⁷等が挙げられる。また、樹状細胞の活性化マーカーであるCD80/86やCD40, MHC分子の発現上昇も誘起する⁴²。実際、KALA-MENDのトランスフェクションにより、CD80やCD86の発現量が増加していた(**Figure 1-3b**)。ケモカインであるMIG (CXCL9) やIP-10 (CXCL10) は、リンパ節においてC-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) を介したCD4⁺T細胞のTh1型への分化を促進する事が知られており⁸⁸⁻⁸⁹、IL-27についても同様の作用が報告されている⁹⁰。またMIP-1 β は活性化T細胞を誘引すると同時に、IL-1 α によって活性化された血管内皮細胞への接着能を高める事で、MIP-1 β 産生部位(主に炎症部位)へのT細胞の遊走に関与する事が報告されている⁹¹。これらのサイトカイン・ケモカインの発現プロファイルは、既存のアジュバントとして知られるLPSやCpG-ODNと異なっていた(**Figure 1-3a**)。従って、アジュバントの観点から考えても、既存のアジュバントと比較して、KALA-MENDは抗腫瘍ワクチンの効果に重要な細胞性免疫の誘導能に優れると考えられる。

KALA-MENDによる樹状細胞の活性化機序を調べる過程で、その構成要素について検討をおこなったところ、KALAペプチド・高膜融合性脂質膜・pDNAというKALA-MENDのほぼ全ての要素が必須である事が明らかとなった(**Figure 1-4**)。本結果は、KALA-MENDそのものがアジュバントである事を示唆するものである。また、KALA-MENDの酸性条件下における高い膜傷害活性は、エンドソーム/ライソソーム脱出を介したpDNAの細胞質への送達を達成し、細胞質内DNAセンサーによる認識を促進するものであると考えられる(**Figure 1-6**)。本膜傷害活性は、細胞透過性ペプチドとして知られるR8の修飾では達成されない事から、KALAペプチドに起因すると考えられる。元来KALAペプチドは中性条件下における膜融合能の促進を目的として修飾されたものであるが、酸性環境下においてのみ、高い膜傷害能が示された(**Figure 1-5**)。KALAペプチドにおいて酸性環境に応答する残基はヒスチジンのみである事から、このヒスチジン残基が酸性環境における膜傷害能に影響を及ぼしている事が考えられる。いくつかのウイルス膜タンパク質においてヒスチジン残基は、酸性環境下におけるエンドソーム膜との融合に重要な役割を有していることが報告されている⁹²⁻⁹³。KALAペプチドはGALAペプチドを元に設計されたペプチドであるが、GALAペプチド自身は、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン由来である。ヒスチジン残基はその名残であり、それが保存されているKALAペプチドもウイルス膜タンパク質のような機序により、酸性環境下に高い膜傷害能を有している可能性も考えられる。

KALA-MEND の免疫活性化効果が、pDNA の細胞質内 DNA センサーによる認識に起因する事が、阻害剤を用いた実験により明らかとなった (Figure 1-6)。TBK1 / IKK ϵ の阻害剤である BX795 によって、KALA-MEND による IFN- β の産生が抑制された。TBK1 が STING 依存的⁶³、interferon regulatory factor 3 (IRF3) 依存的⁶⁰ に B 型 DNA による IFN- β 産生に寄与する事が報告されており、本結果と合わせて考えると、KALA-MEND による IFN- β 産生は、B 型 DNA の STING / TBK1 / IRF3 経路を介したものであると考える事が出来る。一方で、STING の直接のリガンドは cyclic-di-GMP 等の環状ジヌクレオチドであり⁹⁴、B 型 DNA そのものは直接認識されない。従って、更に上流に B 型 DNA を直接認識する分子が存在すると考えられている。近年の研究の発展により、DNA を認識し STING を活性化するタンパク質が明らかになっている⁹⁵。例えば cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) は、細胞質内の B 型 DNA を認識し、GMP と AMP からセカンドメッセンジャーとして cyclic-di-GAMP を合成し、STING を活性化する事が報告されている⁹⁶⁻⁹⁸。どのような DNA 認識センサー分子が、KALA-MEND により送達された pDNA を認識し、下流の STING / TBK1 / IRF3 を活性化するのか、またその寄与率などは、それぞれのタンパク質の KO マウス由来の BMDC に対する IFN- β 誘導能の評価により明らかにできると考えられる。一方で、KALA-MEND により活性化された経路全てが、DNA ワクチンとしての活性の発揮に必要な経路であるかどうかについては、更なる検討が必要であると考えられる。*in vivo* での検討ではあるが、筋肉内投与型の pDNA を用いた DNA ワクチンにおいて、cGAS 非依存的な STING の活性化が、DNA ワクチンとしての薬効発揮に寄与するという報告もある⁹⁹。いずれの経路の活性化が DNA ワクチンのアジュバント活性として重要であるかについても、KO マウスを用いた検討により明らかにする事が期待される。

一方で、caspase-1 の阻害剤である Ac-YVAD-CMK によって、KALA-MEND による IL-1 β の産生が抑制された。caspase-1 は、別名 Interleukin-1 converting enzyme と呼ばれる IL-1 β の成熟化をおこなうカスパーゼであり、インフラマソームを構成する分子の1つである¹⁰⁰。caspase-1 はインフラマソームが形成されると自己切断により活性型となり、pro-IL-1 β を IL-1 β へと変換し、細胞外への産生を誘導する。種々のインフラマソームの中でも、AIM-2 インフラマソームは細胞質内の B 型 DNA を認識する事が報告されている^{64,101}。そのため、KALA-MEND による IL-1 β 産生には、AIM-2 インフラマソームが関与している可能性が考えられる。一方で、Hemolysis assay により、KALA-MEND が酸性環境下において高い膜傷害能を有していることが明らかとなったが、これはエンドソーム/ライソソームの傷害を引き起こしている可能性が考えられる。その場合、エンドソーム/ライソソームの傷害によって活性化する NLR family, pyrin domain-containing (NLRP) 3 インフラマソームの活性化も誘起している可能性が考えられる¹⁰²。

【小括】

第1章では、KALA-MENDのDNAワクチンとしての機能評価をおこなった。

マウスプライマリー樹状細胞であるBMDCへ、KALA-MENDによりCpG配列を含まないpDNAの導入をおこなう事で、効率的な遺伝子導入と多岐に渡るサイトカイン・ケモカインの産生が誘導された。これらのサイトカイン・ケモカインは、抗腫瘍ワクチンにおいて重要な役割を持つ細胞性免疫を促進するものであった。また、同時に樹状細胞の成熟化・活性化マーカーであるCD80, CD86の発現も上昇していた。

KALA-MENDのBMDC活性化に必要な構成要素について検討をおこなったところ、KALAペプチドに加え、高膜融合性脂質やpDNA(長鎖DNA)の必要性が明らかとなった。また、KALA-MENDはpH5.5のような酸性条件下において、高い膜傷害能を有し、樹状細胞内でも効率的な酸性コンパートメントからの脱出を達成していた。これらの知見から、樹状細胞の活性化には、細胞質内のDNAセンサーが寄与している可能性が考えられたため、阻害剤を用いてその検証をおこなったところ、STING/TBK1経路や(AIM-2)インフラマソームの関与が示唆された。

KALA-MENDにモデル抗原であるOVAをコードするpDNAを内封し、BMDCへ導入する事で、MHC Class-I分子を介したOVAの抗原ペプチドの提示が認められた。また、このようなBMDCをマウスへ免疫することによって、OVA特異的なCTL活性、及びOVA発現リンパ腫であるE.G7-OVAに対する治療的な抗腫瘍効果を得る事に成功した¹⁰³。更にKALA-MENDのDNAワクチンベクターとしての有用性を評価するため、ヒト臨床でも用いられるがん精巣抗原NY-ESO-1に対する検討をおこなった。その結果、樹状細胞の毒性を低減させる目的で使用したPan-caspase inhibitorと併用する事で、NY-ESO-1特異的CTL活性の誘導、及びNY-ESO-1発現大腸がん細胞CT26(CT26/NY-ESO-1)に対する予防的な抗腫瘍効果を得る事に成功した。

第二章

KALA ペプチド修飾 リポプレックス型ナノ粒子の mRNA ワクチン技術への応用

【緒言】

Messenger RNA (mRNA) は生体内においてセントラルドグマの中間に位置し、ゲノム DNA を鋳型として転写されたのち、多くの生体機構の働き手であるタンパク質へ翻訳される。無細胞系のシステムにより人為的に合成された *in vitro* transcribed (IVT) mRNA は、pDNA やウイルスベクターと同様、遺伝子導入技術への応用が現在までになされてきた¹⁰⁴⁻¹⁰⁵。遺伝子導入技術のツールとしての研究は、mRNA がその易分解性等の問題点から pDNA やウイルスベクターに先行されていた。しかしながら、近年では mRNA の特性に基づくメリットが注目され、臨床応用を含めた盛んな研究が進められており、免疫療法、特にワクチン技術への応用が最も盛んにおこなわれている¹⁰⁶⁻¹⁰⁷。mRNA による遺伝子導入のメリットとしては、まずその安全性が挙げられる。pDNA や一部のウイルスベクターでは、ゲノムへの挿入によるゲノム毒性 (がん原性等) や発現レベルのコントロールの困難さが問題となるが、mRNA の場合ゲノムへの挿入は起き得ない。また、遺伝子発現も一過的であり、持続的な発現による免疫寛容の誘導も起きにくいと考えられている¹⁰⁸⁻¹⁰⁹。ゲノムへの挿入以外の観点においても、pDNA やウイルスベクターにおけるバックボーン配列等の、遺伝子発現に不要な配列が必要ないことや、ベクターそのものに対する免疫応答 (例: pDNA では抗 DNA 抗体、ウイルスベクターではウイルス特異的な免疫応答) も起きないことから、安全性に優れていると考えられる。実際、FDA の分類として mRNA を用いた治療は、“gene therapy”ではないとされており、pDNA や一部のウイルスベクターに課されるような遺伝毒性に関する評価も回避可能であると考えられている¹⁰⁸⁻¹⁰⁹。また、効率面から考えると、pDNA による発現は、核膜の消失を伴う過程 (細胞分裂等) が必要であり、非分裂細胞への導入は効率が低い。mRNA による発現の場合は、細胞質への送達のみで達成されることから、非分裂細胞に対しても効率的に遺伝子導入が可能である。以上のように、mRNA を用いたワクチン技術は、pDNA を用いた場合と比べて、安全性と効率に優れると考えられる。一方で、pDNA と同様に mRNA も水溶性の高い巨大分子であることから、それ単独での細胞質への到達は困難である。細胞への mRNA の取り込みはスカベンジャー受容体によって行われるが、その後の多くの mRNA 分子がライソソームにおいて分解される事が報告されている¹¹⁰。従って、mRNA を効率的に細胞質へ導入可能なキャリアの開発は、mRNA ワクチンの成功に不可欠である。

本論文では第 1 章において、KALA-MEND の DNA ワクチンへの応用を試みたが、モデル抗原である OVA では優れた効果を示した一方、実弾抗原である NY-ESO-1 では治療的な抗腫瘍効果を得る事が困難であった。そこで第 2 章では、KALA ペプチド修飾ナノ粒子を用いた mRNA ワクチン技術の開発を試みた。遺伝子ベクターとして mRNA を用いる事で、より効率的な遺伝子導入を達成し、抗原特異的な免疫応答の向上を考えた。mRNA キャリアとして KALA ペプチド修飾ナノ粒子を考えた場合には、KALA ペプチドの修飾による優れた酸性コンパートメント脱出能や、細胞質への核酸送達能が、mRNA の導入に有効であ

ると考えられる。まず第 2 章の前半では、mRNA 導入に適した KALA 修飾ナノ粒子製剤の検討をおこない、OVA モデルを用いて CTL に関する評価をおこなった。また第 2 章の後半では、樹状細胞型 mRNA ワクチンに適したアジュバント分子の選定をおこなった。mRNA ワクチンにおいては、IVT mRNA そのものが免疫活性化分子として機能すると考えられており、IVT mRNA がワクチン技術に適する理由の 1 つとみなされている¹¹¹⁻¹¹²。免疫細胞においては、IVT mRNA が TLR3, TLR7, TLR8 等の TLRs や retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) 等の RIG-I-like receptor (RLR) によって認識されることで、I 型 IFN 等が誘導されることが報告されている^{106, 113-114}。一方で、I 型 IFN が mRNA ワクチンに与える影響に関しては、未だ議論の余地がある。Kranz ら¹¹⁵や Broos ら¹¹⁶の報告においては I 型 IFN 受容体 (interferon- α/β receptor (IFNAR)) が mRNA ワクチンの活性発揮に重要であったが、De Koker ら¹¹⁷⁻¹¹⁸の報告によると、WT マウスに比べ IFNAR-KO マウスにおいて mRNA ワクチンの効果が上昇した。これらはいずれも異なる mRNA ナノキャリアをマウス生体へ直接投与した場合の結果であるが、本研究の主眼である KALA ペプチド修飾ナノ粒子を用いた樹状細胞型 mRNA ワクチンにおいても、I 型 IFN、あるいはアジュバントがどのように機能するかは明らかでない。そこで、各種アジュバントを mRNA と同時に共導入した際の、遺伝子発現活性や CTL 活性を指標にアジュバントの選定をおこない、最後に CT26/NYESO1 に対する治療的な抗腫瘍効果の検証をおこなった。

【実験結果】

2-1 BMDC への mRNA 導入に適した新規 KALA ペプチド修飾リポソーム製剤の設計

mRNA の BMDC への効率的な導入をおこなうため、まず予備検討として、pDNA と同様の方法で、mRNA を KALA-MEND に封入し、BMDC への遺伝子導入能を評価した。この際に用いた mRNA は、pDNA において BMDC への遺伝子導入に有効であった pCpGfree-Luc(0) の ORF を T7 promoter の下流に有する pcDNA3.1-Luc(0) を、*in vitro* 転写する事で得られた mRNA-Luc(0) である。本 mRNA を内封する KALA-MEND を BMDC へ処理したところ、得られた Luciferase 活性は、KALA-MEND により pCpGfree-Luc(0) を導入した場合と同程度であった (Figure 2-1a)。本予備検討より、KALA-MEND を BMDC への mRNA 導入キャリアとして用いる事は困難である事が示唆された。

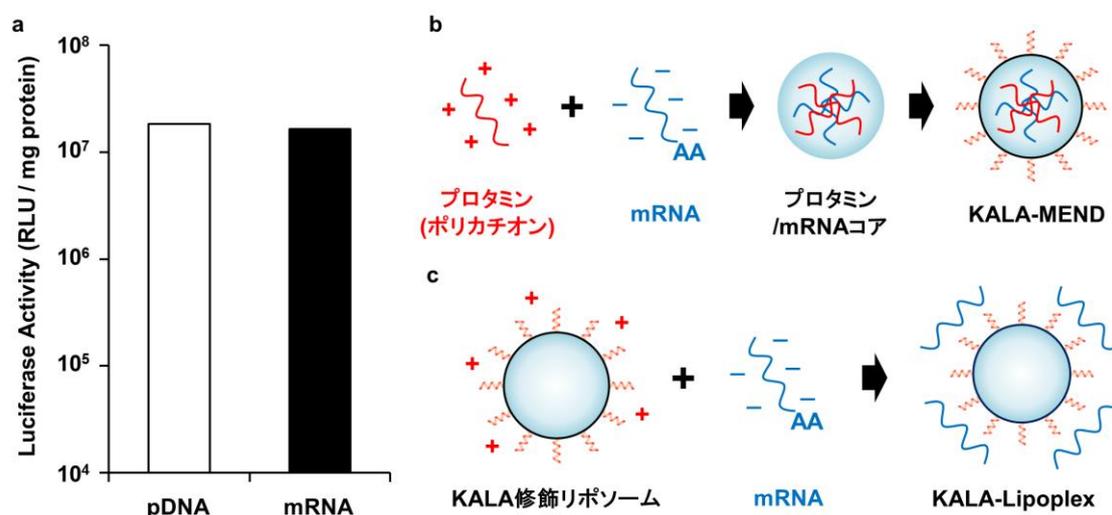


Figure 2-1. KALA-MENDによるmRNA導入とKALA-Lipoplexの設計。(a) BMDC (4.0×10^5 cells) に対して $0.4 \mu\text{g}$ pCpGfree-Luc(0)、あるいは mRNA-Luc(0) 相当の KALA-MEND をトランスフェクションし、24 時間後における細胞ライセート中の単位タンパク質あたりのルシフェラーゼ活性を定量した。n=1。(b) KALA-MEND の調製過程と構造の模式図。(c) KALA-Lipoplex の調製過程と構造の模式図。

そこで次に、BMDC へ mRNA を効率的に導入可能な新規 KALA ペプチド修飾リポソーム製剤の設計を試みた。第 1 章より、KALA-MEND は酸性環境下における高い膜融合性を有していることから、エンドソーム脱出の観点から考えると、KALA ペプチド修飾リポソームは、mRNA 導入に適したキャリアであると考えられる。すなわち、エンドソーム脱出後について考慮する必要があると考えられる。そこで注目したのが、キャリアからの mRNA の解離である。KALA-MEND は核酸をポリカチオンである protamine と凝縮させたコアを始めに形成させ、それを脂質膜で覆う構造を有している (Figure 2-1b)。そのため、核酸が KALA-MEND と強く相互作用し、mRNA の細胞質への放出が達成されない可能性が考えられた。そこで、mRNA を内封するのではなく、粒子表面に静電的相互作用により

結合させるリポプレックス型の KALA 修飾ナノ粒子を考案した (**Figure 2-1c**)。この KALA ペプチド修飾リポプレックス (KALA-Lipoplex) は、まず DOPE/PA からなるリポソームを単純水和法により調製し、その後 KALA ペプチドを修飾する事で KALA 修飾リポソームを調製したのち、KALA 修飾リポソームに mRNA 溶液を添加する事で調製した。この際、ポリカチオンである protamine を用いておらず、KALA-MEND に比べ正電荷の量が減少している事から、KALA-MEND と同様の脂質組成 (DOPE/PA = 7/2, 10mol%KALA modification) では粒子の凝集が見られた。そこで脂質組成を変更する事で安定な KALA-Lipoplex の形成を目指し、検討をおこなった。その結果、負電荷脂質である PA の含有量の減少 (約 22.2% → 約 18.2%)、及び正電荷ペプチドである KALA ペプチドの修飾量を増加 (10 mol%→15 mol%) させることで、安定な KALA-Lipoplex の調製に成功した。mRNA-Luc(0)を搭載した KALA-Lipoplex の物性は **Table 2-1** の通りであり、mRNA-Luc(0)を内封した KALA-MEND の物性と大きな差は認められなかった。

Table 2-1. KALA-MEND及びKALA-Lipoplexの脂質組成及び粒子物性(Mean ± SD)

	KALA-MEND	KALA-Lipoplex
脂質組成	DOPE/PA = 7/2	DOPE/PA = 9/2
KALA修飾量	10 mol%	15 mol%
粒子径	157 ± 7	150.9 ± 11
ζ-電位	26.3 ± 0.3	30.4 ± 0.9
Pdl	0.15 ± 0.03	0.10 ± 0.03

KALA-Lipoplex の mRNA キャリアとしての有用性を評価する前に、mRNA の放出能について評価をおこない、そのコンセプトの検証をおこなった。mRNA-Luc(0)を内封する KALA-MEND、mRNA-Luc(0)を搭載した KALA-Lipoplex、及び naked mRNA-Luc(0)を 145 mM NaCl / 5 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) 緩衝液中で、モデルポリアニオンである Poly-aspartic acid (pAsp) と 30 分間、37°C でインキュベートした。その後、非変性 1%アガロースゲルを用いて 2 時間、4°C で電気泳動した際の mRNA のバンドを撮像した。その結果、KALA-MEND は、今回用いた pAsp 濃度の範囲では mRNA を放出しなかったのに対し、KALA-Lipoplex は pAsp 濃度依存的に搭載 mRNA を放出する事が明らかとなった (**Figure 2-2**)。本結果より、KALA-Lipoplex は KALA-MEMD に比べ効率的に mRNA を放出可能である事が示唆された。

mRNA を内封する KALA-MEND とは異なり、KALA-Lipoplex は機能性素子である KALA ペプチドと mRNA が直接、静電的な相互作用をするような構造が想定される (**Figure 2-1b**)。そのため、KALA ペプチドの機能、例えば酸性環境下における膜傷害能に

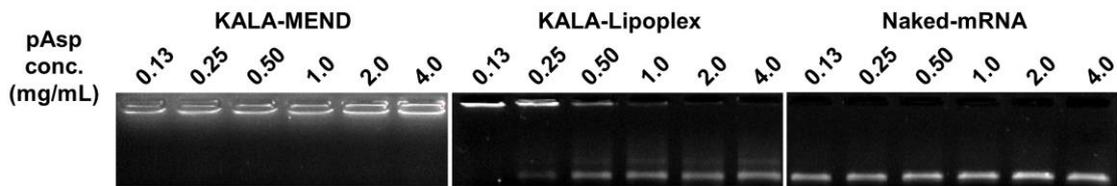


Figure 2-2. 電気泳動によるKALA-MEND及びKALA-LipoplexのmRNA放出能評価。0.1 µg mRNA-Luc(0)、あるいは0.1 µg mRNA相当のKALA-MEND, KALA-Lipoplexを、145 mM NaCl / 5 mM HEPES (pH 7.4)緩衝液中、種々の濃度のpAsp存在下で37°C、30 minインキュベートした。GelRed含有非変性1%アガロースゲルを用いて、4°C、2時間電気泳動したのち撮像した。

影響が出る可能性が考えられた。そこで、KALA-Lipoplex の膜傷害能を Hemolysis assay により評価した。ヘパリン存在下で採取されたマウス血液より赤血球懸濁液を調製し、pH 7.4, 6.5, 5.5 において各種ナノ粒子とインキュベートした際のヘモグロビンの漏出を、吸光度を指標に評価した。その結果、意外なことに、KALA-Lipoplex は KALA-MEND に比べ、酸性環境下における膜傷害能が高いことが明らかとなった (Figure 2-3)。また、R8 ペプチドを用いて調製した、mRNA 搭載 R8 ペプチド修飾リポプレックス (R8-Lipoplex) は、酸性環境下における膜傷害能を示さなかった。これは、カチオン性ペプチドを用いたリポプレックスである事が、膜傷害能を示す要因ではない事を示唆するものである。以上の結果より、KALA-Lipoplex は mRNA の放出能、及び酸性環境下における膜傷害能を両立する mRNA キャリアであり、効率的な mRNA 導入能を有する事が示唆された。

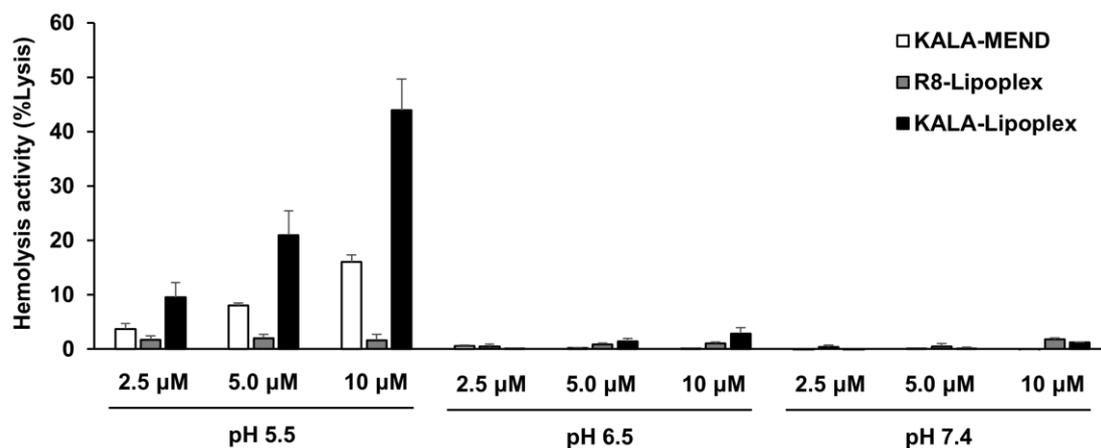


Figure 2-3. Hemolysis assayによるKALA-Lipoplexの膜傷害能評価。マウス静脈血より採取した赤血球を、pH 5.5~7.4の緩衝液中でKALA-MEND、R8-Lipoplex、あるいはKALA-Lipoplexと混合し、37°C、30分インキュベートした際の、赤血球膜の障害によるヘモグロビンの漏出を定量した。ただし、Positive Control (Triton- X100)で完全に溶血させた際の漏出を100%、緩衝液のみの際の漏出を0%とした。Mean ± SEM (n=3).

2-2 KALA-Lipoplex による BMDC への mRNA 導入能評価と mRNA の配列最適化

前項において、KALA-Lipoplex が mRNA 導入に有用なキャリアである事が示唆されたことから、本項では実際に BMDC に対する遺伝子導入能を評価した。比較対象の 1 つとして、KALA-MEND による pDNA (pCpGfree-Luc(0))、あるいは mRNA-Luc(0) の導入をおこなった。また、一般に mRNA 導入に用いられる、カチオン性脂質 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) からなるリポプレックス (DOTAP-Lipoplex)^{107, 119} による mRNA-Luc(0) の導入との比較をおこなった。

本実験において用いられた各種ナノ粒子の物性は **Table 2-2** の通りであった。その結果、KALA-MEND や DOTAP-Lipoplex による mRNA-Luc(0) の導入は、KALA-MEND による pCpGfree-Luc(0) の導入と同程度の遺伝子発現活性しか得られなかったのに対し、KALA-Lipoplex による mRNA-Luc(0) の導入では、約 7.4 倍の遺伝子発現活性の上昇が認められた

Table 2-2. Figure 2-4 で用いたナノ粒子の物性 (Mean ± SD)

Carrier	Nucleic acids	Size (d.nm)	ζ-potential (mV)	Pdl
KALA-MEND	pCpGfree-Luc(0)	162±9	33±4	0.12±0.01
	mRNA-Luc(0)	162±12	27±3	0.13±0.02
DOTAP-Lipoplex	mRNA-Luc(0)	131±6	37±1	0.11±0.05
KALA-Lipoplex	mRNA-Luc(0)	140±14	31±5	0.13±0.02
	mRNA-Luc(UTR/OPT)	153±15	31±3	0.12±0.02

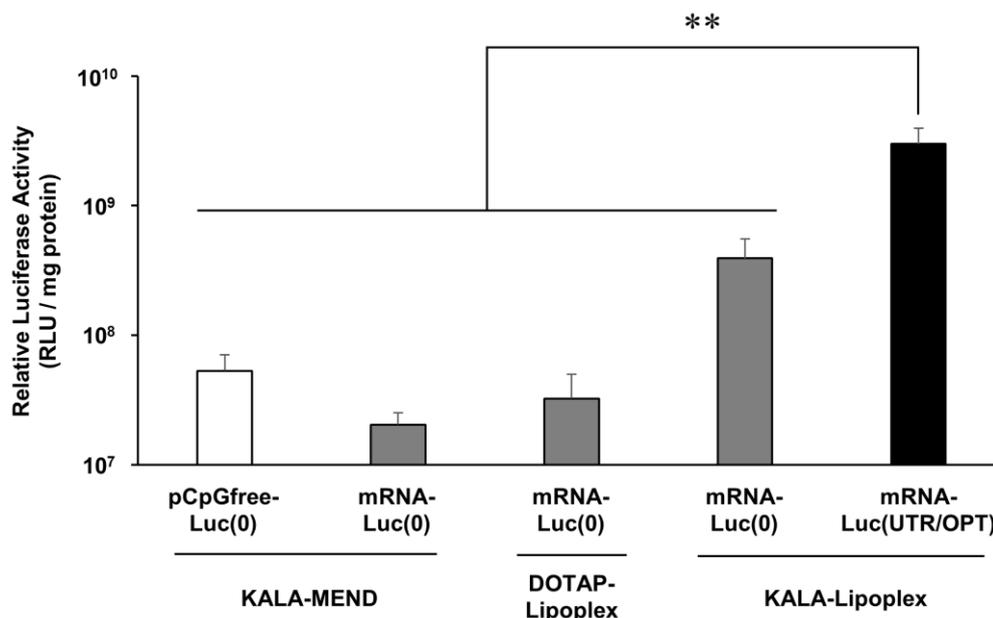


Figure 2-4. BMDC に対する KALA-Lipoplex の mRNA 導入能評価。 BMDC (4.0×10^5 cells) に対して $0.4 \mu\text{g}$ の pDNA あるいは mRNA 相当の KALA-MEND, DOTAP-Lipoplex, KALA-Lipoplex をトランスフェクションし、6 時間後における細胞ライセート中の単位タンパク質あたりのルシフェラーゼ活性を定量した。Mean ± SEM (n=3), **p < 0.01, vs KALA-Lipoplex(mRNA-Luc(UTR/OPT)), one-way ANOVA followed by SNK test.

(Figure 2-4)。本結果より、KALA-Lipoplex は BMDC に対する mRNA 導入キャリアとして有用である事が示唆された。また、用いる mRNA の ORF の配列と untranslated region (UTR) について検討をおこなった。今回用いた mRNA-Luc(0)は CpG 配列を持たない Luciferase 遺伝子の ORF を用いたものであるが、この場合、用いるコドンに制限が生じ、比較的使用頻度の少ないコドンが採用される可能性が上昇する。導入先の宿主において使用頻度の少ないコドンを有する mRNA は、その遺伝子発現産物の量が少なくなることが報告されており¹²⁰⁻¹²¹、コドンの使用頻度に基づいた ORF の最適化は重要である。BMDC への pDNA による遺伝子導入の場合は、コドンの使用頻度の最適化よりも CpG 配列を除く事の方が遺伝子発現活性を増強する効果が高い事が Figure 1-1b において示唆されたが、mRNA に関してはその限りでない可能性も考えられた。そこで、CpG 配列を制限せず、マウスに対してコドンを最適化した ORF を有する mRNA の使用を試みた。また、5'-UTR 及び 3'-UTR としては、Thess らが報告した、5'-UTR: hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 4 (HSD17B4), 3'-UTR: albumin (ALB) の組み合わせを用いた¹²²。このように改変された Luciferase をコードする mRNA (mRNA-Luc(UTR/OPT)) を KALA-Lipoplex により BMDC へ導入する事で、mRNA-Luc(0)に比べ約 7.6 倍の遺伝子発現活性が得られた (Figure 2-4)。以上の結果から、KALA-Lipoplex による改変 mRNA の導入により、KALA-MEND による pDNA 導入に比べ約 50 倍遺伝子発現活性を上昇させることに成功した。

2-3 KALA-Lipoplex の抗原提示誘導能評価

次に、OVA をコードする mRNA を KALA-Lipoplex により BMDC へ導入した際の、抗原提示強度について評価をおこなった。用いたキャリアとしては、KALA-MEND, R8-Lipoplex, DOTAP-Lipoplex, KALA-Lipoplex である。また、KALA-MEND と KALA-Lipoplex については、OVA をコードする mRNA (mRNA-OVA(0))、あるいは OVA をコードする pDNA (pCpGfree-OVA(0))を導入した際の抗原提示強度を評価した。本実験において用いられた各種ナノ粒子の物性は Table 2-3 の通りであった。抗原提示強度の評価については、第 1 章同様、B3Z 細胞と共培養した際の β -Gal 活性を指標におこなった (Figure 2-5)。その結果、KALA-MEND や R8-Lipoplex による mRNA-OVA(0)の導入では、KALA-

Table 2-3. Figure 2-5で用いたナノ粒子の物性 (Mean \pm SD)

Carrier	Nucleic acids	Size (d.nm)	ζ -potential (mV)	Pdl
KALA-MEND	pCpGfree-OVA(0)	159 \pm 5	36 \pm 2	0.11 \pm 0.02
	mRNA-OVA(0)	159 \pm 6	27 \pm 2	0.12 \pm 0.02
R8-Lipoplex	mRNA-OVA(0)	164 \pm 24	29 \pm 7	0.14 \pm 0.05
DOTAP-Lipoplex	mRNA-OVA(0)	125 \pm 9	41 \pm 2	0.12 \pm 0.03
KALA-Lipoplex	pCpGfree-OVA(0)	143 \pm 7	38 \pm 5	0.08 \pm 0.04
	mRNA-OVA(0)	147 \pm 11	32 \pm 3	0.11 \pm 0.02

MEND による pCpGfree-OVA(0)の導入と比較して、有意な抗原提示強度の上昇は認められなかった。一方、DOTAP-Lipoplex 及び KALA-Lipoplex を用いる事で、有意な抗原提示強度の上昇が認められ、特に KALA-Lipoplex は DOTAP-Lipoplex に比べて有意に抗原提示強度が高かった。本結果より、BMDC への KALA-Lipoplex による抗原 mRNA の導入は、MHC Class-I を介した抗原提示を効率的に誘導する事が明らかとなり、樹状細胞型 mRNA ワクチンキャリアとして有用である事が示唆された。

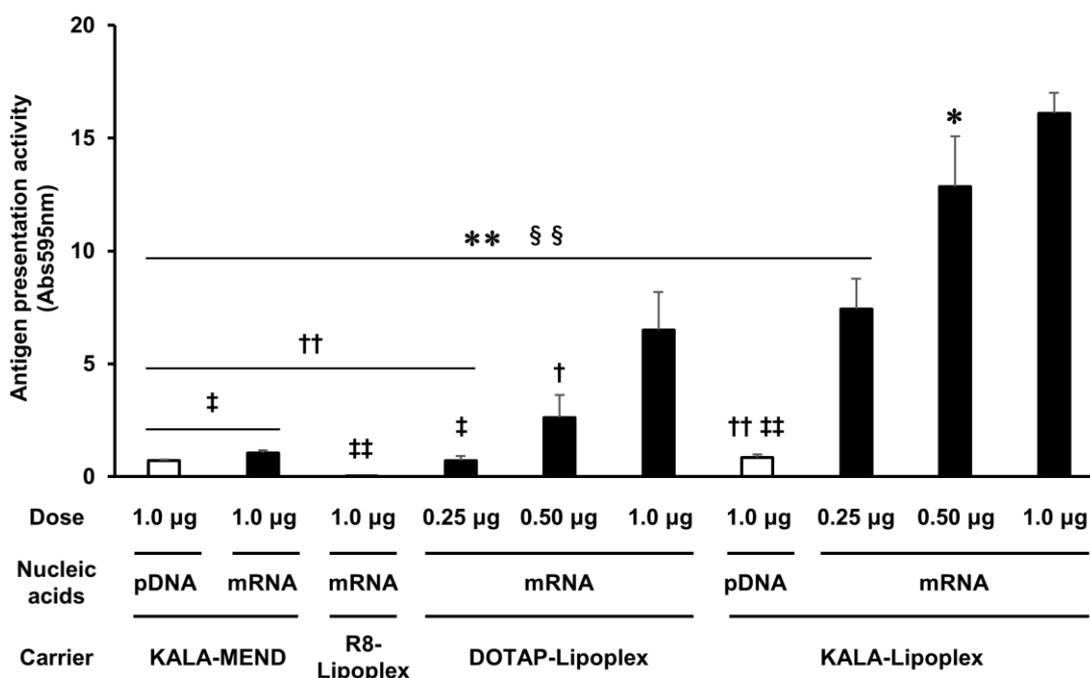


Figure 2-5. H-2Kb/OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特異的抗原提示能評価。BMDC (2.0×10⁶ cells) に対して 1.0 µg pDNA あるいは 0.25 ~ 1.0 µg mRNA 相当の各種ナノ粒子をトランスフェクションし、24時間後に B3Z 細胞と共培養した。16時間後に産生された β-Gal をその基質である CPRG を用いて定量した。Mean ± SEM (n=3-9). *p<0.05, **p<0.01 v.s. KALA-Lipoplex (mRNA, 1.0 µg), §p<0.05, §§p<0.01 v.s. KALA-Lipoplex (mRNA, 0.5 µg), †p<0.05, ††p<0.01 v.s. KALA-Lipoplex (mRNA, 0.25 µg), ‡p<0.05, ‡‡p<0.01 v.s. DOTAP-Lipoplex (1.0 µg), one-way ANOVA followed by SNK test.

2-4 抗原 mRNA 導入 BMDC の抗原特異的 CTL 誘導能評価

前項までに、KALA-Lipoplex は BMDC に対し、効率的に mRNA を導入可能である事を明らかとした。そこで本項では、樹状細胞ワクチンとしての機能評価をおこなった。まず始めに細胞内サイトカイン染色法を用いて、抗原特異的 CD8⁺T 細胞の誘導効率の評価をおこなった。KALA-MEND, DOTAP-Lipoplex, KALA-Lipoplex により mRNA-OVA(0) を導入された BMDC を、マウスへ 1 週間おきに 2 回免疫した。2 回目の免疫から 1 週間後に、免疫マウスの脾臓を回収し、OVA₂₅₇₋₂₆₄ ペプチドによる刺激をおこなった。この際に、Protein transport inhibitor (GoldiPlug: Brefeldin A) を処理する事で、産生されるサイトカインを細胞内に保持させた。本細胞に対し固定・透過処理をおこない、抗 IFN-γ 抗体により染色

後、フローサイトメーターにより、IFN- γ 陽性 CD8⁺T 細胞の頻度を測定した。この場合、IFN- γ 陽性 CD8⁺T 細胞は OVA 特異的な CTL であると考えられることから、その存在率は、OVA 特異的な CTL の誘導能を示す。その結果、KALA-Lipoplex は他のキャリアに比べ、高い IFN- γ 陽性 CD8⁺T 細胞の頻度を示した (Figure 2-6)。本結果より、KALA-Lipoplex を用いて OVA をコードする mRNA を導入された BMDC は、効率的に OVA 特異的 CTL を誘導可能である事が示唆された。

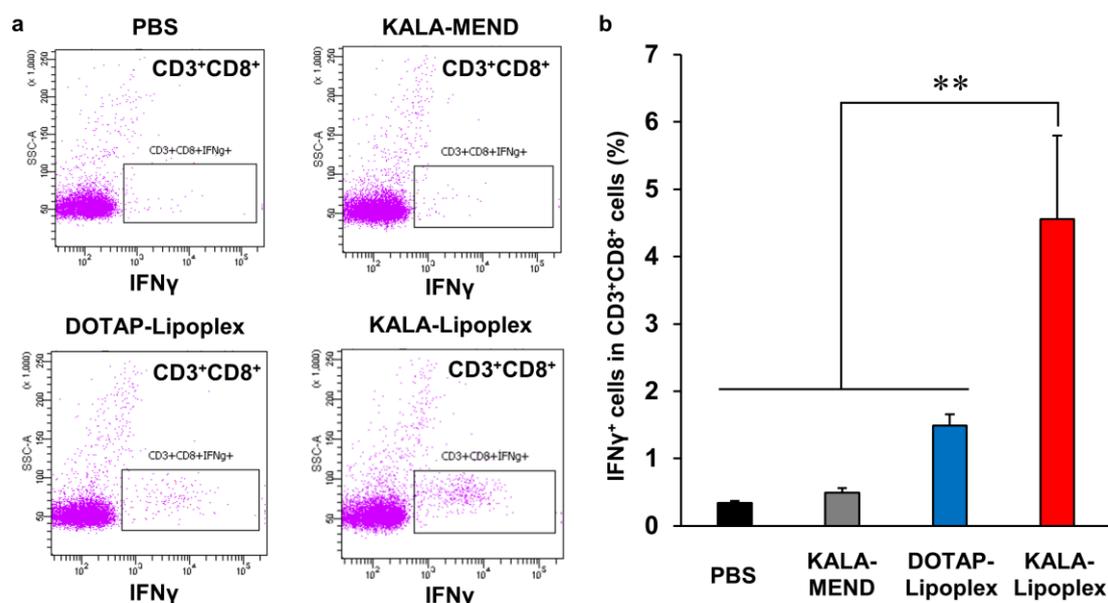


Figure 2-6. 細胞内サイトカイン染色によるOVA特異的CTLの誘導評価。BMDC (2.0×10^6 cells) に対して、 $1.0 \mu\text{g}$ mRNA相当のKALA-MEND, DOTAP-Lipoplex, KALA-Lipoplexをトランスフェクションし、6時間後に回収後 5.0×10^5 cells/mouseで免疫した。1週間後に同様の方法で2回目の免疫をおこなった。2回目の免疫から1週間後に、免疫マウスの脾臓を回収し、OVA₂₅₇₋₂₆₄ペプチドによる刺激をProtein transport inhibitor(GoldiPlug; Brefeldin A)の存在下でおこなった。CD3, CD8の染色後に固定・透過処理をおこない、抗IFN γ 抗体により染色後、フローサイトメーターにより、IFN γ 陽性CD8⁺T細胞の頻度を測定した。(a) CD3⁺CD8⁺群について、SSC(縦軸)とIFN γ (横軸)で展開したdot plotの代表例。(b) CD3⁺CD8⁺細胞群におけるIFN γ 細胞の割合。Mean \pm SEM (n=4) **p<0.01 v.s. KALA-Lipoplex, one-way ANOVA followed by SNK test.

次に、OVA 特異的な CTL 活性をどの程度示すかについて、*in vivo* CTL assay により評価した。本検討において、導入 mRNA 量を変化させた際の OVA 特異的 CTL 活性をプロットする事で、Dose response curve を取得した。KALA-MEND, DOTAP-Lipoplex, KALA-Lipoplex により mRNA-OVA(0)を導入された BMDC をマウスへ免疫し、1週間後に OVA ペプチドを処理された標的細胞を投与した際の傷害率をフローサイトメーターにより測定した。その結果、KALA-Lipoplex により mRNA-OVA(0)を導入された BMDC の免疫群が最も強力な OVA 特異的 CTL 活性を示した (Figure 2-7)。KALA-MEND による導入に比べると、約 1/10 程度の mRNA 量で同程度の CTL 活性を示した。以上の結果より、KALA-Lipoplex による樹状細胞への抗原 mRNA 導入は、強力な抗原特異的細胞性免疫を誘導可能である事が示唆された。

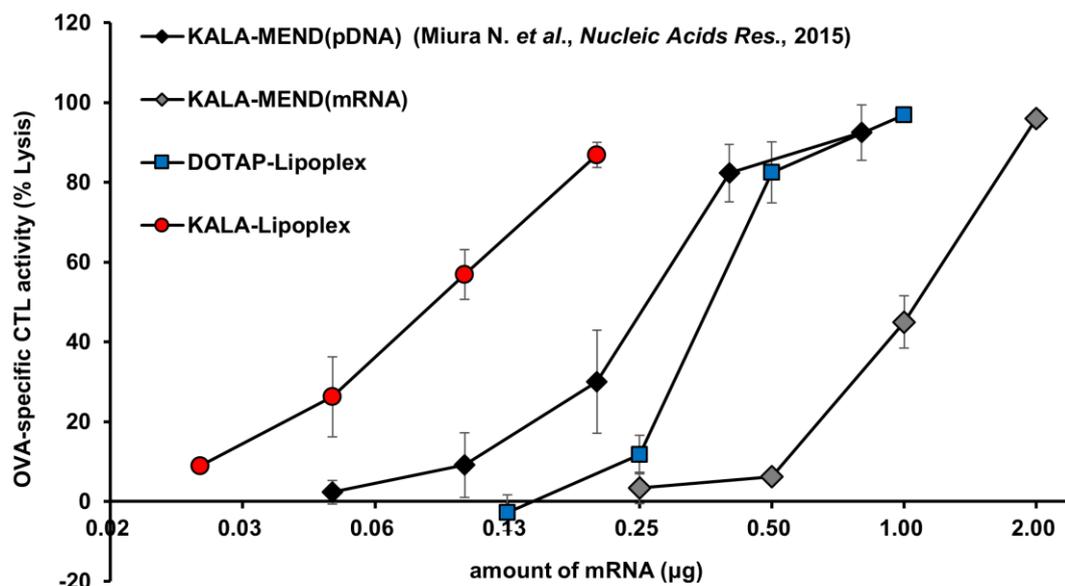


Figure 2-7. マウス生体内におけるOVA特異的細胞傷害性T細胞活性評価。BMDC (2.0×10^6 cells) に対して、適当量のmRNA相当のKALA-MEND, DOTAP-Lipoplex, KALA-Lipoplexをトランスフェクションし、6時間後に回収後 5.0×10^5 cells / mouse で免疫した。1週間後、等量の標的細胞(CFSE^{high})とコントロール細胞(CFSE^{low})を静脈内投与し、20時間後の脾臓におけるCFSE^{high}/CFSE^{low}比を算出した。ただしナイーブマウスにおけるCFSE^{high}/CFSE^{low}比を0% Lysisとした。Mean \pm SEM (n=3-9)。

2-5 樹状細胞型 mRNA ワクチンに適切なアジュバント分子の選定

ここまでの検討により、KALA-Lipoplex は BMDC への効率的な mRNA 導入を可能とするキャリアである事が示された。一方で、KALA-Lipoplex により mRNA を導入した場合には、サイトカイン産生誘導等の、BMDC の免疫活性化はほとんど見られなかった（後述の Figure 2-10 参照）。第 1 章でも述べたように、獲得免疫系を誘導するワクチン技術において、自然免疫系の活性化は極めて重要である。そこで、KALA-Lipoplex による mRNA ワクチン効果を更に増強させるため、がん治療へ応用可能な樹状細胞型 mRNA ワクチンに適するアジュバント分子の選定をおこなった。今回の検討で用いたアジュバント分子は、それぞれ認識機構の異なる以下の 5 つの分子である：Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly(I:C))、CpG-ODN、pDNA (double-stranded DNA として)、5'-triphosphate double-stranded RNA (tpRNA)、Monophosphoryl Lipid A (MPLA)。それぞれの認識受容体とその下流の転写因子は Figure 2-8 に示す通りである⁶²。これらのアジュバント分子のうち、Poly(I:C)、CpG-ODN、pDNA、tpRNA は核酸アジュバントである事から、mRNA と共に Lipoplex として搭載した。一方、MPLA は糖脂質アジュバントである事から、リポソームの脂質膜成分の 1 つとして脂質膜に搭載した。想定される KALA-Lipoplex の構造模式図は Figure 2-9 の通りである。核酸アジュバントを搭載した mRNA-Luc (UTR/OPT) 搭載 KALA-Lipoplex の物性は Table 2-4 の通りである。核酸アジュバントに関しては、搭載核酸 (4 μ g / 55 nmol lipid) 中の mRNA と核酸アジュバントの重量比を変化させる事で、mRNA トランスフェ

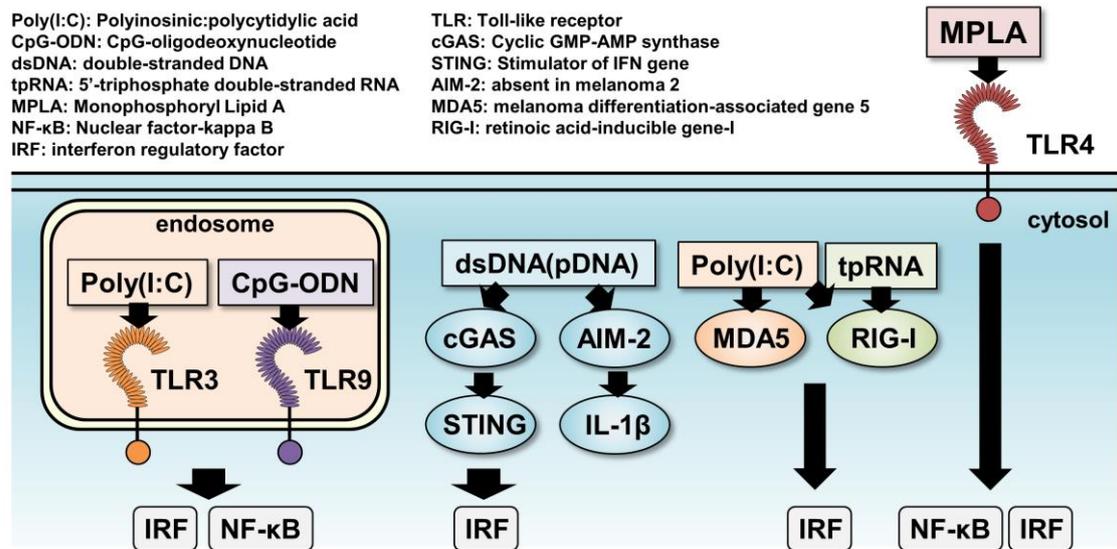


Figure 2-8. Poly(I:C), CpG-ODN, pDNA, tpRNA, MPLAの認識機構。M. Schlee, *et al*, Nat. Rev. Immunol., 2016より
 改変して作成した

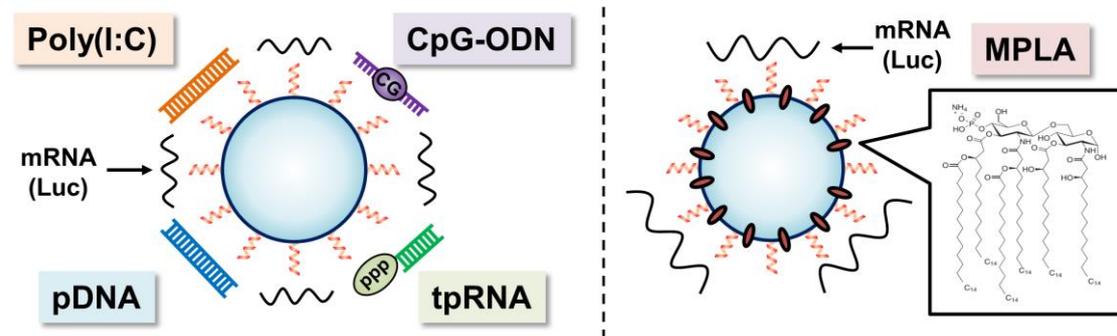


Figure 2-9. 各種アジュバント分子を搭載したKALA-Lipoplexの模式図

クション量を固定したままアジュバントの処理量を変化させた。この場合、導入する mRNA を一定にした際に、トランスフェクションに用いられる KALA-Lipoplex の量は多くなる。mRNA と核酸アジュバントを共に KALA-Lipoplex に搭載した場合には、粒子の物性に大きな差は認められなかった。一方、MPLA 搭載粒子に関しては、これまでの KALA-Lipoplex と同様に、55 nmol lipid からなる MPLA 搭載 KALA-Lipoplex に対して 4 μg mRNA を搭載した際に、凝集が引き起こされた。これは MPLA が負電荷を有する事から、KALA-Liposome に搭載した際に KALA-Lipoplex の電荷のバランスが中性に寄り、静電的な反発が減少したためと考えられた。そこで、55 nmol lipid からなる MPLA 搭載 KALA-Liposome に対し、3 μg mRNA を搭載するように粒子の調製をおこなったところ、凝集は認められず、均一な KALA-Lipoplex が調製可能であった。MPLA を搭載した mRNA-Luc (UTR/OPT) 搭載 KALA-Lipoplex の物性は **Table 2-5** の通りである。核酸アジュバント搭載 KALA-Lipoplex に比べると粒子径が小さい傾向が認められたが、MPLA 非搭載 KALA-Lipoplex

Table 2-4. Poly(I:C), pDNA, CpG-ODN, tpRNA搭載KALA-Lipoplexの物性。いずれも4 µg mRNA/ 55 nmol lipidとして調製した(Mean ± SD)

adjuvant	adjuvant / mRNA weight ratio	Size (d.nm)	ζ-potential (mV)	Pdl
—	—	153±15	31±3	0.12±0.02
Poly(I:C)	1/8	168±18	31±3	0.13±0.03
	1/32	177±15	30±0	0.10±0.03
	1/128	173±8	30±4	0.11±0.02
pDNA	1/1	148±13	34±3	0.10±0.02
	1/4	148±7	33±2	0.10±0.02
	1/16	152±12	33±1	0.11±0.01
	1/64	152±6	34±3	0.09±0.03
CpG-ODN	1/2	149±9	35±3	0.11±0.02
	1/8	154±16	34±1	0.11±0.02
	1/32	165±16	29±4	0.11±0.04
	1/128	144±5	34±3	0.11±0.01
tpRNA	1/0.5	153±15	34±3	0.10±0.03
	1/2	168±18	33±6	0.11±0.03
	1/8	177±15	34±2	0.10±0.02

Table 2-5. MPLA搭載KALA-Lipoplexの物性。いずれも3 µg mRNA/ 55 nmol lipidとして調製した (Mean ± SD)

adjuvant	adjuvant / mRNA weight ratio	Size (d.nm)	ζ-potential (mV)	Pdl
—	—	133±7	33±3	0.13±0.03
MPLA	1/5.33	122±8	31±3	0.11±0.02
	1/21.3	130±6	32±3	0.11±0.03
	1/85.3	125±6	32±5	0.12±0.02
	1/341	126±10	34±2	0.11±0.00

(3 µg mRNA/ 55 nmol lipid) においても同様の傾向が見られたことから、脂質に対する搭載 mRNA 量が少ないことによる影響であると考えられる。これらのような KALA-Lipoplex を BMDC へ処理した際の Luciferase 活性を評価する事で、アジュバント分子の共導入が mRNA 導入に与える影響を評価した。また、核酸アジュバントに関しては主な産生誘導サイトカインである I 型 IFN として IFN-β を、MPLA に関しては IL-6 を、トランスフェクションされた BMDC の培養上清から ELISA 法により定量した。

始めに Poly (I:C) を共導入した際の遺伝子発現活性と IFN- β 産生を評価したところ、Poly (I:C) の導入量依存的に IFN- β 産生が誘導されたが、同時に遺伝子発現活性が 1/10~1/100 程度まで減弱した (Figure 2-10a)。次に pDNA を共導入した際の評価をおこなったところ、Poly (I:C) と同様に、IFN- β の産生上昇と共に遺伝子発現活性が減弱していく事が明らかとなったが、その減少率は最大でも 1/5 程度と Poly (I:C) に比べれば小さかった (Figure 2-10b)。一方で、CpG-ODN (Figure 2-10c) や tpRNA (Figure 2-10d) のような核酸アジュバントに関しては、IFN- β が産生される処理量においても、遺伝子発現活性の減弱は認められなかった。糖脂質アジュバントである MPLA を共導入した場合も、IL-6 の産生が認められるような条件において、遺伝子発現活性の減弱は認められなかった (Figure 2-10e)。また、細胞ライセートのタンパク質濃度を指標に細胞毒性について検討した結果、共導入アジュバント量の増加に伴いわずかに細胞毒性が生じる傾向は認められたが、顕著な毒性は認められなかった (Figure 2-11)。以上の結果より、少なくとも Poly (I:C) の共導入は、遺伝子発現活性の観点から考えて、mRNA ワクチンにおいて不適であり、その他の 4 種のアジュバント (pDNA, CpG-ODN, tpRNA, MPLA) は遺伝子発現活性と免疫活性化を両立可能である事が示唆された。

2-6 アジュバント共導入時の NY-ESO-1 に対する mRNA ワクチンとしての機能評価

前項において、遺伝子発現活性と免疫活性化を両立するアジュバントの選定をおこなった。本項においては、それらのアジュバントの共導入時における CTL 活性について評価をおこなった。本検討においては、NY-ESO-1 を抗原として用いた。NY-ESO-1 をコードする mRNA を各種アジュバントと共導入した BMDC をマウスへ免疫し、1 週間後に *in vivo* CTL assay により NY-ESO-1 特異的な CTL 活性を評価した (Figure 2-11)。その結果、いずれのアジュバントを用いた場合においても、有意に CTL 活性が増強する処理量が存在した。本結果より、CTL 活性の誘導能の観点からは、がん治療のための mRNA ワクチン技術に最も適したアジュバントを決定する事は困難であった。

そこで最後に、アジュバント共導入時の CT26/NY-ESO-1 に対する治療的な抗腫瘍効果を検証した。アジュバントとしては pDNA, CpG-ODN, tpRNA, MPLA を用い、それぞれの処理量は、Figure 2-11 において最も CTL 活性が高かった条件を用いた。BALB/c マウスの右脇腹皮下へ CT26/NYESO1 を移植した。その 1 週間後、及び 2 週間後に KALA-Lipoplex により mRNA-NY-ESO-1、及び各種アジュバントを導入された BMDC を免疫し、経時的に腫瘍体積を測定する事で抗腫瘍効果を検証した (Figure 2-12)。その結果、mRNA 単独処理群においても腫瘍体積が減少する傾向が認められた。本結果より、KALA-MEND により抗原 pDNA を導入した場合と比べて、KALA-Lipoplex により抗原 mRNA を導入する事で、実弾抗原である NY-ESO-1 を用いた系において、治療的な抗腫瘍効果を得る事に成功した。またその効果は、pDNA や tpRNA、MPLA の共導入により増強され、特に MPLA の共導入は、最も顕著な抗腫瘍効果を示した。

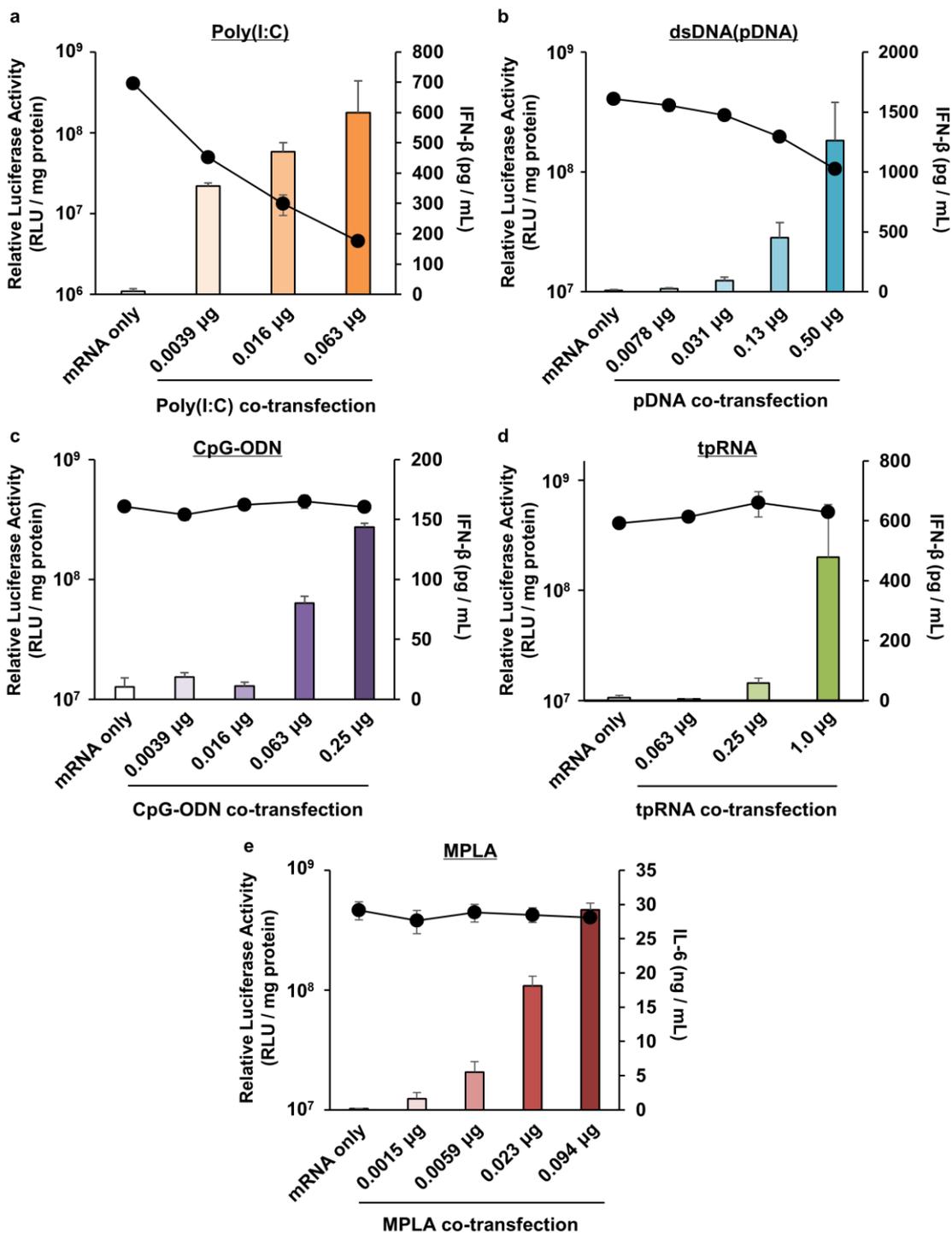


Figure 2-10. アジュバント共導入時の遺伝子発現活性とサイトカイン産生評価。BMDc (2.0×10^6 cells) に対して $0.5 \mu\text{g}$ の mRNA 相当のアジュバント搭載 KALA-Lipoplex をトランスフェクションし、6 時間後における細胞ライセート中の単位タンパク質あたりのルシフェラーゼ活性、及び上清中サイトカイン濃度を定量した。Mean \pm SEM (n=3-5)。棒グラフはサイトカイン産生、折れ線グラフは遺伝子発現活性を表す。それぞれ、(a) Poly(I:C), (b) dsDNA (pDNA), (c) CpG-ODN, (d) tpRNA, (e) MPLA 共導入時の結果を示している。

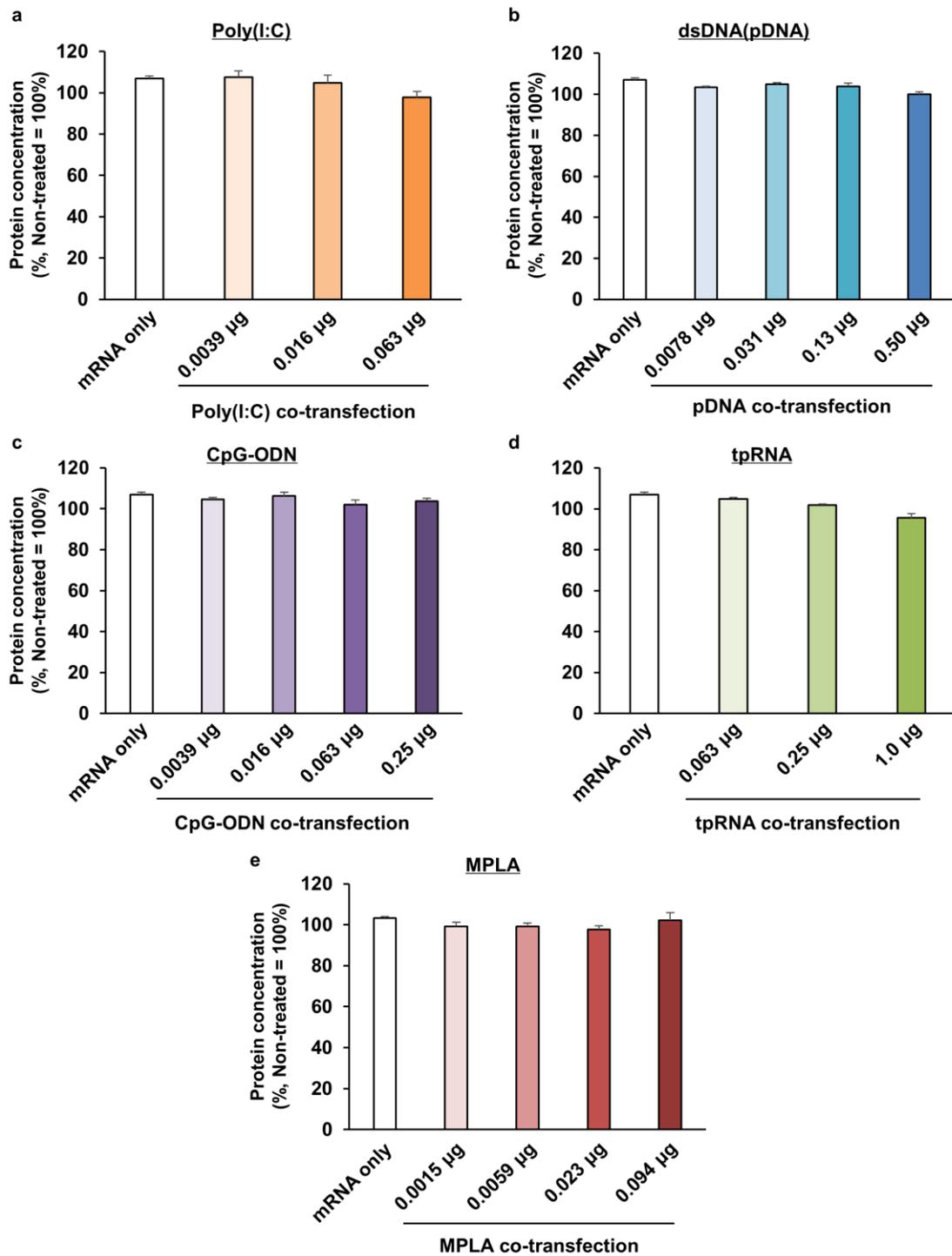


Figure 2-11. アジュバント共導入時のタンパク質定量による毒性評価。BMDC (2.0×10^6 cells) に対して $0.5 \mu\text{g}$ の mRNA 相当のアジュバント搭載 KALA-Lipoplex をトランスフェクションし、6 時間後における細胞ライセート中のタンパク質濃度を BCA 法により定量した。Non-treated BMDC における値を 100% として計算をおこなった。Mean \pm SEM (n=3-5)。それぞれ、(a) Poly(I:C)、(b) dsDNA (pDNA)、(c) CpG-ODN、(d) tpRNA、(e) MPLA 共導入時の結果を示している。

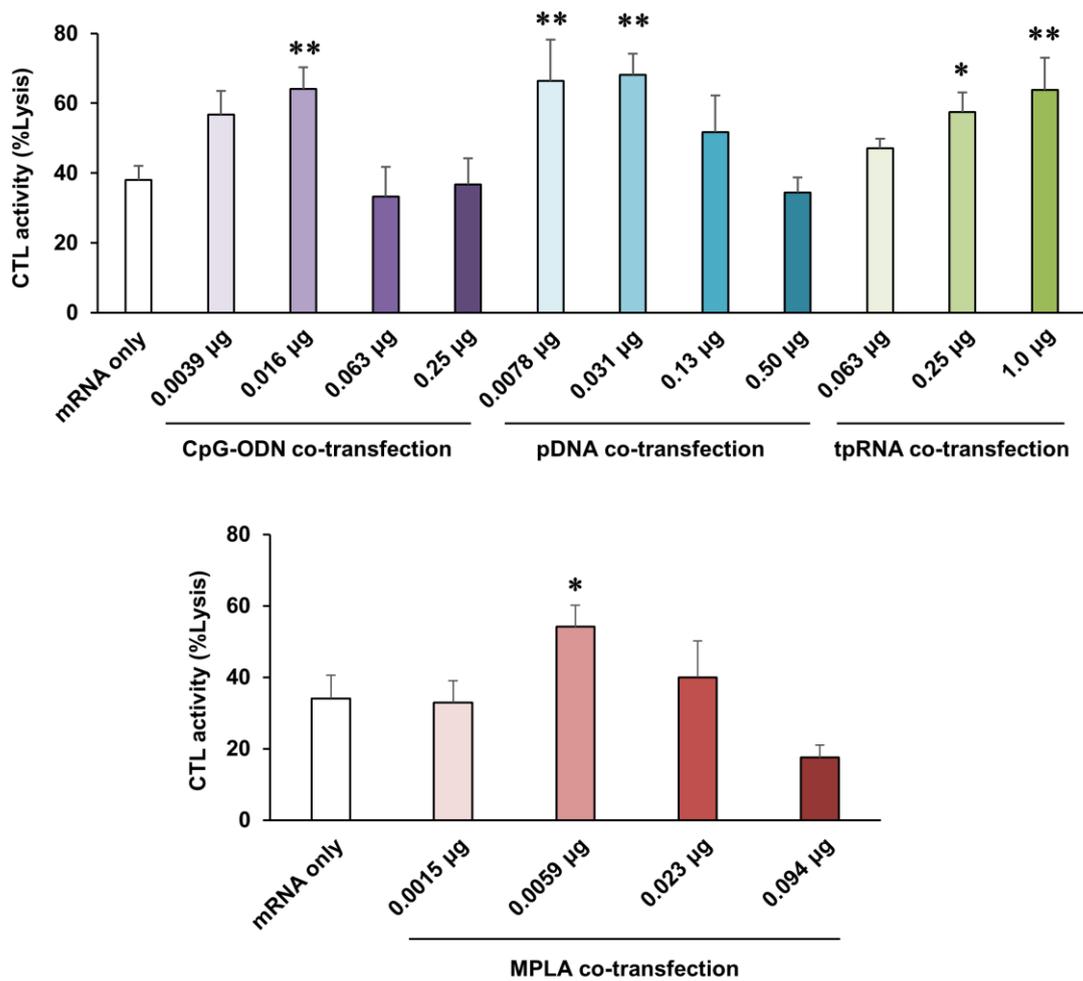


Figure 2-12. アジュバント共導入時のNY-ESO-1特異的CTL活性の評価。BMDC (2.0×10^6 cells) に対して、適量 mRNA 相当のアジュバント搭載 KALA-Lipoplex をトランスフェクションし、6 時間後に回収後、 2.0×10^5 cells / mouse で免疫した。1 週間後、等量の標的細胞 (CFSE^{high}) とコントロール細胞 (CFSE^{low}) を静脈内投与し、20 時間後の脾臓における CFSE^{high}/CFSE^{low} 比を算出した。ただしナイーブマウスにおける CFSE^{high}/CFSE^{low} 比を 0% Lysis とした。Mean \pm SEM (n=4-11). *p<0.05, **p<0.01, vs mRNA only, Non-repeated measures ANOVA followed by Bonferroni test.

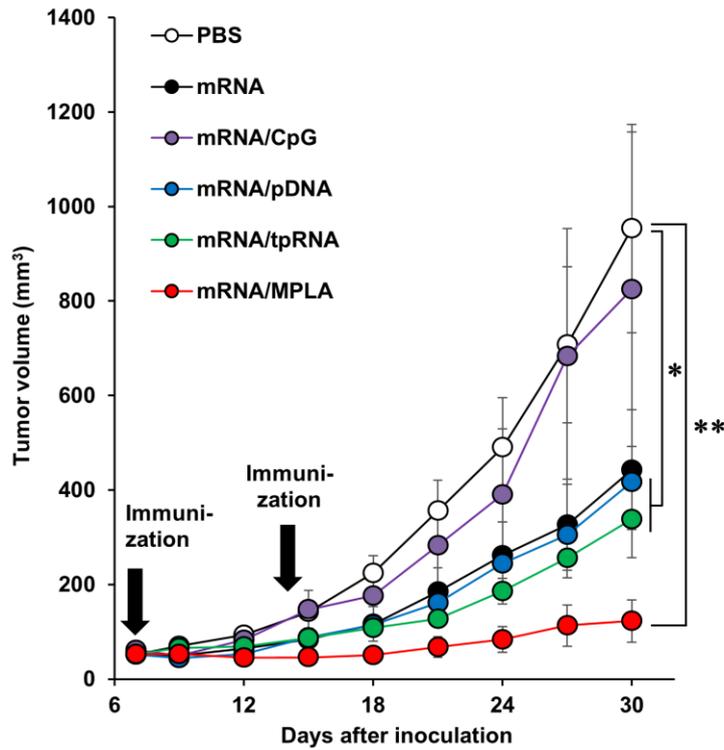


Figure 2-13. NY-ESO-1発現CT26大腸がん細胞に対する治療的抗腫瘍効果の検証。NY-ESO-1発現大腸がん細胞であるCT26/NYESO1をマウス右脇腹に、 1.0×10^6 cells/mouseの条件で移植した。その1週間後に、BMDC (2.0×10^6 cells) に対して1.0 μ gのmRNA-NY-ESO-1をKALA-Lipoplexによりトランスフェクションした。各種アジュバント共導入群のアジュバント処理量は以下の通りである: 0.016 μ g CpG-ODN (mRNA/CpG), 0.031 μ g pDNA (mRNA/pDNA), 1.0 μ g tpRNA (mRNA/tpRNA), 0.059 μ g MPLA (mRNA/MPLA)。6時間後にBMDCを回収し、 1.0×10^6 cells/mouseで免疫した。その1週間後に同様の方法で再度免疫を行った。CT26/NYESO1移植後6日目から腫瘍の体積を以下の式に従って算出した: (長軸 \times 短軸 \times 短軸)/0.52。Mean \pm SEM (n=5)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Non-repeated measures ANOVA followed by Bonferroni test.

2-7 生体への直接投与により抗原特異的 CTL を誘導可能な KALA-Lipoplex の検討

ここまでの検討において、樹状細胞を介した *ex vivo* 型 mRNA ワクチンキャリアとして KALA-Lipoplex が有用である事を明らかとしてきた。一方、臨床応用を考えた際に、生体へ直接投与可能なワクチンキャリアは簡便性の観点から有用性が高い。そこで、生体へ直接投与する事で抗原特異的 CTL を誘導可能な KALA-Lipoplex の調製について検討した。

一般的にカチオン性キャリアは、*in vitro* における遺伝子導入能に優れるが、生体への直接投与をおこなった場合には、負電荷を有する生体分子との相互作用により、*in vitro* において発揮されるような優れた遺伝子導入能が認められない場合が多い^{71, 123}。そこで、KALA-Lipoplex の調製条件を変更する事で、負の表面電位を有する KALA-Lipoplex の調製を試みた。具体的には、Lipoplex を形成する際の、KALA-Liposome と mRNA の混合比を変更した。これまでに用いていた KALA-Lipoplex は、27.5 nmol lipid 相当の KALA-Liposome に対し、2 μ g の mRNA を添加する事で正電荷を有する Lipoplex としていた。そこで、mRNA の添加量を増やすことで、負電荷を有する Lipoplex の調製を試みた。その結果、27.5nmol lipid 相当の KALA-Liposome に対して、3 μ g の mRNA を添加した場合は粒子の凝集が見られたが、4 μ g 以上 mRNA を添加する事で ζ -電位が負を示す KALA-Lipoplex を調製する事に成功した (Table 2-6)。mRNA の添加量が多いほどより強い負の ζ -電位となった。mRNA-OVA(0)を用いて、それぞれの mRNA 添加比率の KALA-Lipoplex を調製し、マウスへ皮下投与、あるいは尾静脈投与をおこなった際の、OVA 特異的 CTL 活性を評価した。皮下投与の場合は、2 μ g mRNA / mouse の条件で投与をおこない、尾静脈投与の場合は、1 μ g mRNA / mouse の条件で投与した。その結果、皮下投与の場合は、いずれの粒子においても 30~40%程度の CTL 活性であった (Figure 2-14)。一方、尾静脈投与の場合は、4 μ g mRNA / 27.5 nmol の条件で調製した KALA-Lipoplex において顕著な CTL 活性が認められた。しかし、本条件よりも mRNA の添加比率が多い KALA-Lipoplex の場合は、CTL 活性は 20%以下となった。本結果より、負電荷を有する KALA-Lipoplex は、尾静脈投与型 mRNA ワクチンキャリアとして機能する事が明らかとなった。

Table 2-6. 負電荷KALA-Lipoplexの物性。(Mean, n=2)

	Size (d.nm)	ζ -potential (mV)	Pdl
4 μ g mRNA / 27.5 nmol lipid	180.0	-23.9	0.25
5 μ g mRNA / 27.5 nmol lipid	150.1	-33.2	0.13
6 μ g mRNA / 27.5 nmol lipid	139.9	-35.0	0.15

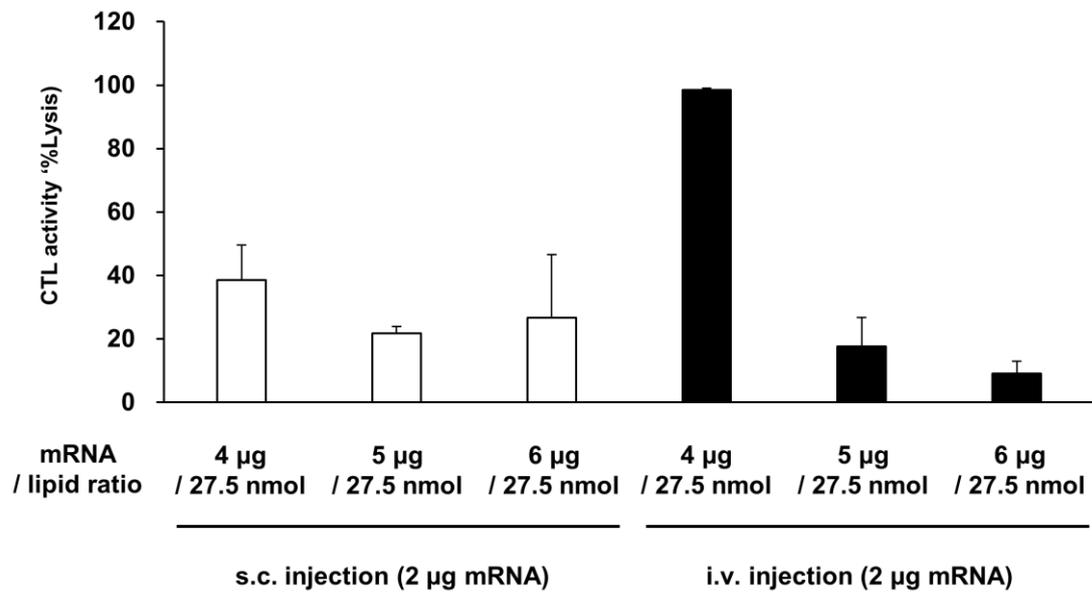


Figure 2-14. 負電荷KALA-Lipoplexの投与によるOVA特異的細胞傷害性T細胞活性評価。2 µg mRNA相当(皮下投与)、あるいは1 µg mRNA相当(尾静脈投与)の各種KALA-Lipoplexを皮下投与、あるいは尾静脈投与した。1週間後、等量の標的細胞(CFSE^{high})とコントロール細胞(CFSE^{low})を静脈内投与し、20時間後の脾臓におけるCFSE^{high}/CFSE^{low}比を算出した。ただしナイーブマウスにおけるCFSE^{high}/CFSE^{low}比を0% Lysisとした。Mean ± SEM (n=3)

【考察】

第2章では、KALA修飾リポプレックスの mRNA ワクチンへの応用について検討をおこなった。

本章では始めに、KALA ペプチド修飾リポソームと mRNA を用いたリポプレックス型ナノ粒子の調製を試みた。KALA-MEND と同様の脂質組成 (DOPE/PA = 7/2) と脂質/mRNA 比 (110 nmol lipid / 8 µg mRNA) となるようにリポプレックスの調製を試みたところ、粒子の凝集が見られた。これは、KALA-Lipoplex の調製時に、KALA-MEND において用いたポリカチオンである protamine を除いたため、粒子全体の電荷が中性に寄り、安定なりポプレックス形成に必要な静電的反発が得られなかったためであると考えられる。そこで脂質組成を変更し検討したところ、DOPE/PA = 9/2, 15 mol%KALA modification の条件において、KALA-MEND と同様の脂質 / mRNA 比のまま安定なりポプレックスを形成する事が明らかとなった (Table 2-1)。この際、KALA-Lipoplex は KALA-MEND に比べ、表面電位を表す ζ-電位が高い傾向が認められた。これは、mRNA の一部が KALA 修飾リポソームと相互作用していないためではなく、脂質組成変更と KALA 修飾量増加の影響であるとされる。実際に KALA-Lipoplex を電気泳動したところ、ポリアニオン非存在下においては mRNA の泳動は見られなかった (Figure 2-2)。本結果より、今回用いた脂質組成では、脂質/mRNA 比が 110 nmol lipid / 8 µg mRNA の条件において、全ての mRNA が KALA リポソームと相互作用していると考えられる。そのような状態においても、ζ-電位が正であることを考えると、リポソーム表面の全ての KALA ペプチドが mRNA と相互作用しているわけではなく、一部のみが mRNA との相互作用に用いられるのみであると想定される。実際に、mRNA の搭載量を段階的に増やしていくと、110 nmol lipid あたり、12 µg mRNA の添加では粒子が凝集し、16 µg mRNA の添加では ζ-電位が負となった (Table 2-6)。

Figure 2-4 あるいは Figure 2-5 で示したように、KALA-MEND においては pDNA と mRNA を用いた際の遺伝子導入能に差はなかったが、KALA-Lipoplex においては mRNA を用いた方が優れた遺伝子発現活性を示した。これは、KALA-Lipoplex が酸性環境下における高い膜傷害能、及びポリアニオンに応答した mRNA 放出能を持つためと考えられる (Figure 2-2, 2-3)。KALA-Lipoplex は同じ KALA ペプチドを粒子表面に有する KALA-MEND に比べ高い膜傷害能を有していたが、これは粒子表面への KALA ペプチドの修飾量の違いが表れたものであると考えられる。ポリアニオンに応答した mRNA 放出能に関して、細胞質内においては、transfer RNA (tRNA) や ribosomal RNA (rRNA) 等の核酸分子が mRNA 放出を引き起こすポリアニオンとして機能する事が考えられる。一方で、細胞質内はタンパク質や RNA 分子等により極めて高分子濃度が高い環境となっており、分子クラウディング効果により、希薄溶液中では見られない現象や反応が引き起こされる¹²⁴。例えば、

大腸菌内においては高分子濃度が 300~400 mg/mL にも達する事が報告されている¹²⁵。このような環境に比べ、**Figure 2-2**において用いた pAsp 濃度は低く、完全に細胞質内を模倣できていないと考えられる。より詳細な細胞質内における mRNA 放出の検討をおこなうには、ポリエチレングリコールや Ficoll などの分子クラウディング剤を反応系に添加する事、あるいはウサギ赤血球ライセートを用いた *in vitro* 翻訳系にナノ粒子を加えた際の mRNA 発現活性評価等が考えられる。また、細胞へナノ粒子をトランスフェクションした際の fluorescence resonance energy transfer (FRET) を用いた、リポソームと mRNA の解離、あるいは mRNA 同士の解離を顕微鏡やフローサイトメーターを用いて検出する事で、実際に細胞内で起きている現象を評価する事も考えられる。

また今回用いた KALA-Lipoplex の組成では、pAsp 濃度が 0.5 mg/mL の際に mRNA の放出が見られたが、この mRNA 放出のプロパティが BMDC への遺伝子導入に最も適しているかについては、未だ検討の余地があると考えられる。内田らによると、カチオン性ポリプレックスである N-substituted polyaspartamides により mRNA を導入する場合には、素早くエンドソーム脱出をおこない細胞質では不安定なポリプレックスよりも、比較的遅くエンドソーム脱出をし、細胞質で mRNA を安定に保持するポリプレックスの方が、優れた遺伝子発現活性を示す事が報告されている¹²⁶。KALA ペプチドの長さや、カチオン性残基の数、その修飾量を変化させた際の mRNA 放出能と遺伝子発現活性の関係を評価する事で、より効率的な mRNA 導入キャリアの構築が可能である事が考えられる。

樹状細胞型 mRNA ワクチンに適切なアジュバントを選定するため、Poly (I:C), pDNA, CpG-ODN, tpRNA, MPLA を mRNA と共導入した際の遺伝子発現活性を評価した結果、Poly (I:C)及び pDNA の共導入において、mRNA の遺伝子発現活性が減弱する結果となった (**Figure 2-10a, b**)。粒子の物性面から考えると、**Table 2-4, 2-5**において示したように、アジュバント非搭載 KALA-Lipoplex と各種アジュバント搭載 KALA-Lipoplex の間に、粒子径や ζ 電位において大きな違いは認められなかった。また、いずれの核酸アジュバント搭載 KALA-Lipoplex においても、KALA-Liposome と mRNA+核酸アジュバントの間の N/P 比が同じである事から、細胞取り込み等の動態に関連する違いも少ないと考えられる。遺伝子発現活性の減弱の要因の1つとしては、アジュバントが引き起こすシグナルが mRNA の発現を低下させる方向に働いた事が考えられる。例えば Poly (I:C) のような double stranded RNA (dsRNA) は、エンドソーム内の TLR3¹²⁷⁻¹²⁸ や細胞質の RIG-I^{114, 129}, Melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5)¹²⁹ のような IRF の活性化を伴う核酸センサー以外にも、dsRNA-activated protein kinase R (PKR)¹³⁰ や 2'-5'-oligoadenylate synthase (OAS)¹³¹⁻¹³² のような抗ウイルス感染タンパク質によっても認識される。PKR や OAS のような抗ウイルス感染タンパク質は、ウイルス感染時のように外来 dsRNA が細胞質に存在する場合、その翻訳を抑制するために機能する^{62, 133}。例えば PKR は dsRNA を認識すると自己リン酸化をおこない、翻訳開始因子の1つである eukaryotic initiation factor

2 alpha (eIF2 α) をリン酸化する事で、Cap 依存的な翻訳反応を抑制する¹³⁰。また OAS は、dsRNA を認識した際に ATP から 2'-5' oligoadenylate を合成し、RNaseL を活性化する事で、細胞内の RNA を非特異的に分解する¹³²。今回 KALA-Lipoplex により dsRNA である Poly(I:C) を導入する事で、これらの機構により、同時に導入した mRNA の翻訳の阻害あるいは分解が引き起こされ、発現が低下したと考えられる。一方、pDNA のような dsDNA はこれらの機構は働かないため、別のメカニズムが働いたと考えられる。一例としては、dsDNA によって活性化される AIM-2 inflammasome による影響が考えられる。Lu らの報告によると、AIM-2 inflammasome を含む種々の inflammasome の活性化に伴い、PKR の自己リン酸化が認められた¹³⁴。リン酸化 PKR は先述の通り、eIF2 α のリン酸化による Cap 依存性の翻訳を抑制する事から、pDNA と同時に導入した mRNA の翻訳が阻害されたと考えられる。CpG-ODN や tpRNA では共導入した mRNA の発現に大きな影響は見られなかったが、これは I 型 IFN である IFN- β の産生が認められる条件においても同様であった (**Figure 2-10c, d**)。一般的に I 型 IFN は産生細胞自身や周囲の細胞に対して IFNAR を介して、IFN stimulated gene (ISG) の発現を促進し抗ウイルス反応を誘導する^{106,135}。ISG の発現亢進によって誘導されるタンパク質の中には PKR や OAS、あるいは IFN-induced protein with tetratricopeptide repeat 1 (IFIT1) と呼ばれる、mRNA のキャップ構造を認識して、非自己の mRNA の翻訳を抑制するタンパク質が含まれる。これら ISG の発現が、I 型 IFN の発現により mRNA ワクチンの効果が減弱する理由の1つであると考えられている。しかしながら、特に tpRNA の共導入においては、IFN- β の産生が誘導される条件においても mRNA の遺伝子発現活性、及び CTL 誘導能が減弱する事は無かった (**Figure 2-10d, 2-12**)。本結果より、少なくとも KALA-Lipoplex を用いた樹状細胞型 mRNA ワクチンにおいて、I 型 IFN の誘導が直接 mRNA ワクチンの効果の減弱に繋がるわけではない事が示唆された。KALA-Lipoplex による mRNA ワクチン技術、あるいは各種アジュバントを共導入した際の I 型 IFN の寄与の詳細については、既報と同様に IFNAR-KO マウスを用いる事で明らかにすることが可能であると考えられる。

Figure 2-12 において各種アジュバントを共導入した際の NY-ESO-1 特異的 CTL 活性について評価した結果、それぞれのアジュバントにおいて最適値がある事が明らかとなった。pDNA の場合は、その導入量に依存して遺伝子発現活性が減弱する事がその要因の1つであると考えられる。一方で CpG-ODN や MPLA の場合、遺伝子発現活性の減弱が認められないのにも関わらず、導入量が多いほど CTL 活性が減弱した。本現象の原因は明らかになっていないが、仮説としては BMDC の過剰な活性化が挙げられる。多量のアジュバントの処理によって、過剰な活性化が誘導され、抑制シグナルの誘導が引き起こされた可能性が考えられる。例えば MPLA によって強力に誘導された IL-6 は炎症性サイトカインとして、免疫応答初期においては自然免疫系を活性化するが、慢性的な曝露はむしろ免疫応答を抑制する方向に働くことが報告されている¹³⁶。また、MPLA は炎症促進性の応答と同時に、IL-

10のような抑制性サイトカインの産生を誘導し、免疫応答を調節していることも報告されている¹³⁷⁻¹³⁸。CpG-ODNもIL-6の産生を誘導する事から、同様の現象が誘導されている可能性も考えられる。また、TLRアゴニストはアポトーシスを誘導する事も報告されている¹³⁹。BMDCへのトランスフェクションの段階では目立った毒性は認められなかったが(Figure 2-11)、マウスへ投与後のBMDCの挙動は不明である。従って、免疫後のBMDCの動態を*in vivo*で追跡し評価する事で、より詳細な知見が得られる可能性が考えられる。

本研究においては、主に樹状細胞を生体外で誘導し、刺激を加えたのちに生体内へ戻すという、*ex vivo*型のがんワクチンの検討をおこなった。*ex vivo*樹状細胞ワクチンは、最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞へ効率的に抗原情報や免疫活性化シグナルを導入可能なシステムである事から、優れた免疫応答を示す。その一方で、患者自身から採取した細胞を用いるという煩雑な手順が存在するため、そのコストが高くなるという欠点が存在する⁴³。実際、世界初のがん免疫療法薬として認可を受けた Sipleucel-T (Provenge) の製造元である Dendreon 社は 2014 年に経営破綻に追い込まれた。そのため、*in vivo*に直接投与可能な mRNA ワクチン技術の開発は、従来にも増して重要であると考えられる。Kranz らは、カチオン性脂質である 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane (DOTMA) を含みリポプレックスによる *in vivo*直接投与型 mRNA ワクチンの報告をおこなっているが、その際には脂質と mRNA の重量比を変化させ、表面電荷を負に制御する事で、優れたワクチン効果を達成した¹¹⁵。Figure 2-14 で示したように、KALA-Lipoplex も KALA 修飾リポソームと mRNA の重量比を変化させることで負電荷に調整可能であり、尾静脈投与により *in vivo*直接投与型の mRNA ワクチンとして機能する事が明らかとなった。mRNA と KALA-Liposome の混合比率に最適値がある事も本結果より明らかとなったことから、今後、より詳細な粒子検討やそのメカニズムの解明が望まれる。

【小括】

第 2 章では、KALA-Lipoplex の mRNA ワクチンへの応用を試みた。

第 1 章で用いた KALA-MEND では mRNA の有用性を示す事が困難であったため、mRNA に適した新規 KALA 修飾ナノ粒子の設計をおこなった。その結果、KALA ペプチド修飾リポソームの表面に、静電的相互作用により mRNA を結合させた KALA-Lipoplex を設計し調製する事に成功した。KALA-Lipoplex はモデルポリアニオンである pAsp の濃度に応じて、搭載 mRNA を放出する事が明らかとなった。また、KALA-MEND で見られた、酸性条件下における膜傷害能も保持していた。KALA-Lipoplex を用いて Luciferase をコードする mRNA を BMDC へ導入したところ、KALA-MEND や一般的に mRNA 導入に用いられるカチオン性脂質 DOTAP からなる Lipoplex に比べ、効率的に mRNA を導入可能である事が明らかとなった。更に KALA-Lipoplex を用いてモデル抗原である OVA をコードする mRNA を導入する事で、効率的に OVA 特異的 CTL を誘導可能である事が明らかとなった。

KALA-Lipoplex を用いて BMDC へ mRNA を導入した場合には、BMDC の免疫活性化はほとんど見られなかったことから、樹状細胞型 mRNA ワクチンに適したアジュバント分子の選定をおこなった。用いたアジュバントのうち、Poly (I:C) は導入量に応じて遺伝子発現活性が大きく減弱した事から、アジュバントとしての応用は困難であった。残りの 4 種のアジュバント、pDNA, CpG-ODN, tpRNA, MPLA について、NY-ESO-1 をコードする mRNA と BMDC へ共導入したところ、いずれのアジュバントにおいても有意に NY-ESO-1 特異的 CTL 活性が増強する条件が存在した。そこで、その条件を用いて、CT26/NYESO1 に対する治療的抗腫瘍効果を評価した結果、MPLA を共導入した BMDC の免疫により最も強力な抗腫瘍効果を得る事に成功した。

KALA-Lipoplex の *in vivo* 直接投与型 mRNA ワクチンへの応用を検討した結果、樹状細胞型 mRNA ワクチンに用いていた KALA-Lipoplex よりも脂質に対する核酸量を増加させることで調製される、負電荷 KALA-Lipoplex の尾静脈投与が、効率的な抗原特異的 CTL 誘導能を有する事が明らかとなった。

結語

【結語】

本研究により得られた知見は以下の通りである。

- KALA-MEND は、マウスプライマリー樹状細胞である BMDC に対する効率的な遺伝子導入能と、細胞質内 DNA センサーを介した免疫活性化能を両立する DNA キャリアである事が明らかとなった。
- KALA-MEND によりモデル抗原である OVA をコードする pDNA を導入された BMDC をマウスへ免疫することで、OVA 特異的 CTL 活性の誘導、及び OVA 発現リンパ腫に対する治療的な抗腫瘍効果を得る事に成功した。
- KALA ペプチド修飾リポソームの表面に mRNA を結合させた KALA-Lipoplex を設計し、KALA-Lipoplex が BMDC へ効率的に mRNA を導入可能なキャリアである事を明らかとした。
- KALA-Lipoplex により実弾抗原である NY-ESO-1 をコードする mRNA とアジュバントとして MPLA を導入された BMDC をマウスへ免疫することで、NY-ESO-1 特異的 CTL の誘導、及び NY-ESO-1 発現大腸がんに対する治療的な抗腫瘍効果を得る事に成功した。

本研究により得られた成果は、樹状細胞型 DNA/RNA ワクチンのがん免疫療法への応用可能性を広げるものである。これらの知見が今後のがん免疫療法、あるいは核酸ワクチン技術の発展に寄与し、更なる医療の発展に貢献する事を期待して本項を終える。

実験方法・実験材料

実験材料

●マウス

C57BL/6J マウス (C57BL/6JJmsSlc) 6~10 週齢, ♀ 日本 SLC

BALB/c マウス (BALB/cCrSlc) 6~10 週齢, ♀ 日本 SLC

ICR マウス (Slc:ICR) 4~6 週齢, ♂ 日本 SLC

マウスはコンベンショナル環境下あるいは SPF 環境下で飼育したものを用いた。ま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、及び国立大学法人千葉大学動物実験に関する規定に基づき実施した。それぞれの施設における承認番号は以下の通りである：第 13-0101 号（北海道大学）、動 28-303（千葉大学）。

●細胞

E.G7-OVA (OVA-expressing murine lymphoma (EL4)) ATCC

B3Z (OVA₂₅₇₋₂₆₄/H-2K^b specific murine CD8⁺ T cell)

Dr. Shastri (University of California, Berkeley) より供与頂いた

CT26/NY-ESO-1

(NY-ESO-1-expressing murine colon carcinoma (CT26))

珠玖洋博士（三重大学）よりご供与頂いた

●脂質

DOPE Avanti Polar Lipid

Phosphatidic acid from egg yolk, Sigma-Aldrich

Chol Avanti Polar Lipid

EPC Avanti Polar Lipid

DOTAP Avanti Polar Lipid

●ペプチド

STR-KALA Stearyl-WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKA

STR-R8 Stearyl-RRRRRRRR

OVA₂₅₇₋₂₆₄ SIINFEKL

NY-ESO-1₈₁₋₈₈ RGPESRLL

STR 化ペプチドは倉敷紡績へ合成依頼、その他のペプチドは東レリサーチセンターへ合成依頼したものを使用した。いずれのペプチドも純度は 95%以上であった。

●溶媒, 緩衝液

EtOH ナカライテスク

MeOH ナカライテスク

CHCl ₃	和光純薬工業 (第 1 章) ナカライテスク (第 2 章)
Dulbecco's PBS (powder)	ニッスイ
HEPES	DOJINDO
MES	DOJINDO
BSA (pH 7.0)	Sigma-Aldrich (第 1 章) ナカライテスク (第 2 章)
生理食塩水	大塚製薬

●樹状細胞関連

RPMI-1640	Sigma-Aldrich
1M HEPES	Sigma-Aldrich (第 1 章) ナカライテスク (第 2 章)
Sodium pyruvate	Sigma-Aldrich (第 1 章) ナカライテスク (第 2 章)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (第 1 章) ナカライテスク (第 2 章)
2-Mercaptethanol	Invitrogen
murine recombinant GM-CSF	R&D systems
Dulbecco's PBS (water, endotoxin free for BMDC)	Sigma-Aldrich (第 1 章) ナカライテスク (第 2 章)
ELISA (IFN-β以外)	R&D systems
ELISA (IFN-β)	PBL assay science (第 1 章) R&D systems (第 2 章)
LPS	Sigma-Aldrich
CpG-ODN1688 (5'-TCCATGACGTTTCCTGATGCT-3', S 化)	日本バイオサービス
ACK Lysing buffer	Lonza

●抗体

PE anti-mouse CD80 (Armenian Hamster IgG, Clone: 16-10A1)	BioLegend
PE Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl (Clone: HTK888)	BioLegend
PE anti-mouse CD86 (Isotype: Rat IgG2a, κ, Clone: GL-1)	BioLegend
PE Rat IgG2a Isotype Ctrl (Clone: RTK2758)	BioLegend
FITC anti-mouse CD11c (Armenian Hamster IgG, Clone: N418)	BioLegend
FITC Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl (HTK888)	BioLegend
APC anti-mouse CD3ε (Armenian Hamster IgG, Clone: 145-2C11)	BioLegend

APC Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl (HTK888)	BioLegend
FITC anti-mouse CD8 α Antibody (Rat IgG2a, κ , Clone: 53-6.7)	BioLegend
FITC Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody (Clone: RTK2758)	BioLegend
PE anti-mouse IFN- γ Antibody (Rat IgG1, κ , Clone: XMG1.2)	BioLegend
PE Rat IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody (Clone: RTK2071)	BioLegend
Anti-mouse CD16/32 antibody (Rat IgG2a, λ , Clone: 93)	BioLegend

●MEND 調製関連

AT 20mer ODN (5'-ATATATATATATATATATAT-3')	Sigma-Aldrich
Protamine Sulfate	CALBIOCHEM
Poly(I:C) (HMW)	Invivogen
CpG-ODN 1826	Invivogen
5' -ppp-dsRNA	Invivogen
Lipid A, monophosphoryl from Salmonella enterica serotype minnesota Re 595 (Re mutant)	Sigma-Aldrich

●その他の試薬・キット

Qiagen Endofree Plasmid Giga Kit	Qiagen
Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
GelRed TM Nucleic Acid Stain, 10,000X in DMSO	Biotium
BCA Protein Assay Reagent	Thermo scientific (第 1 章)
TaKaRa BCA Protein Assay Kit	TaKaRa-bio (第 2 章)
5 \times Reporter Lysis Buffer	Promega
Luciferase Assay System	Promega
Mirus Label IT biotin nucleic acid labeling kit	Mirus
Qdot [®] 705 ITK TM Streptavidin Conjugate Kit	Invitrogen
Poly-(α , β)-DL-aspartic acid sodium salt	Sigma-Aldrich
Lysotracker Green DND-26	Life Technologies
Hoechst 33342	DOJINDO
Ac-YVAD-CMK	CALBIOCHEM
BX795	Invivogen
CPRG	Roche
IGEPAL CA 630	Sigma-Aldrich
TritonX-100	Sigma-Aldrich
CFSE	Invitrogen (第 1 章)
-Cellstain- CFSE	DOJINDO (第 2 章)

InSolution™ Q-VD-OPh	CALBIOCHEM
グリコーゲン溶液 (20mg/ml) 水溶液, Nuclease tested	ナカライテスク
XhoI	New England Biolabs
BspeI	New England Biolabs
EcoRV-HF	New England Biolabs
mMESSAGE mMACHINE™ T7 ULTRA Transcription Kit	ThermoFischer Scientific
THE RNA Storage solution	ThermoFischer Scientific
Protein Transport Inhibitor (Containing Brefeldin A)	BD
Transcription Factor Buffer Set	BD
Cell Activation Cocktail (without Brefeldin A)	Biolegend
CELLBANKER® 1plus	TaKaRa-bio
ジエチルエーテル	和光純薬工業

●プラスチック器具類

1.5 mL tube	WATSON
5 mL チューブ	BioBil
50 mL チューブ	Greiner Bio-one (第 1 章)
	Nunc (第 2 章)
15 mL チューブ	Greiner Bio-one (第 1 章)
	Nunc (第 2 章)
10 mL ディスポーザブルピペット	As One
滅菌シャーレ	As One
26G 注射針	テルモ
1 mL シリンジ	テルモ
5 mL シリンジ	テルモ
non-treated bottom 12 well plate	住友ベークライト
24 well plate	Corning
96 well black plate	Corning
96 well clear plate	Corning
ナイロンメッシュ	三商
セルストレイナー (40 μm)	FALCON

●測定機器

Luminescenser-PSN AB2200	ATTO (第 1 章)
GLOMAX 20/20 Luminometer	Promega (第 2 章)
マイクロプレートリーダー-Benchmark plus	Bio-Rad (第 1 章)

プレートリーダー Enspire™ (Multireader 2300)	PerkinElmer (第1章)
ARVO SX 1420 Multilabel counter	ARVO (第2章)
SpectraMAX i3	Molecular Devices (第2章)
微量吸光測定器 Nano Drop (ND-1000)	Thermo Scientific (第1章)
BioSpec-nano	SHIMADZU (第2章)
蛍光顕微鏡 (Nikon ECLIPSE TE-2000-U)	Nikon
スピンドディスク型共焦点ユニット (CSU-X1)	横河電機
Zeta Sizer (Nano-ZS)	Malvern
FACSCaliber	BD
Gallios	Beckman-Coulter
FACSCantII	BD

●遠心機

低速冷却遠心機 EX-125	TOMY
微量高速冷却遠心機 3700	KUBOTA
微量高速冷却遠心機 MX-200	TOMY
微量高速冷却遠心機 MX-205	TOMY

●細胞培養関連機器

自動炭酸ガス細胞培養装置 BNA-111	ESPEC (第1章)
自動炭酸ガス細胞培養装置 5400	NAPCO (第1章)
自動炭酸ガス細胞培養装置 MCO-19AIK	SANYO (第1章)
自動炭酸ガス細胞培養装置 4020	Asahi (第2章)
自動炭酸ガス細胞培養装置 320	ThermoFisher Scientific (第2章)
クリーンベンチ MCV-710ATS	SANYO (第1章)
クリーンベンチ VG-1304L	AIRTECH (第1章)
クリーンベンチ MCV-710ATS-PJ	Panasonic
クリーンベンチ NS-13B	BIOLABO
オートクレーブ BS-325・BS-235	TOMY

●その他の機器

浴槽型ソニケーターAU25C	アイワ医科工業
卓上型冷却トラップ装置 UT-1000	EYELA
ダイヤフラムポンプ型真空ポンプ	EYELA
ボルテックスミキサーVortex GENIE2	Scientific Industries
pH メーターDocu-pH Meter	Sartrius

実験方法

●緩衝液や培地の調製

- ・ PBS(-)

Dulbecco's PBS (powder) 9.6 g を 1 L の DDW へ溶解し、オートクレーブ後 4°C で保存した。

- ・ 10 mM HEPES buffer (pH 7.4)

HEPES 238.3 mg を 80 mL の DDW に溶解し、1 N NaOH 溶液で pH 7.4 へ調整後、100 mL にメスアップした。その後、0.22 μ m 混合セルロースフィルターを用いてろ過後、4°C で保存した。

- ・ 1% Triton X-100 in DDW

0.1 g の Triton X-100 を 8 mL の DDW へ溶解し、10 mL となるようにメスアップした。

- ・ FACS buffer (1% BSA, 0.1% NaN₃ in PBS(-))

Dulbecco's PBS (powder) 9.6 g を 1L の DDW へ溶解し、オートクレーブ後、BSA 10 g、NaN₃ 1 g を混合し、4°C で保存した。

- ・ CPRG buffer (5 mM CPRG, 0.125 % (v/v) NP-40, 9 mM MgCl₂ in PBS)

CPRG 30.37 mg、NP-40 12.5 μ L、MgCl₂ · 6H₂O 18.3 mg を 8 mL の PBS(-)へ溶解し、10 mL となるようにメスアップした。

- ・ BMDC 用培地

RPMI-1640 500 mL に対し、1 M HEPES 5 mL、100 mM Sodium Pyruvate 5 mL、55 mM 2-Mercaptoethanol 500 μ L、10,000 U/mL Penicillin, 10,000 μ g/mL Streptomycin 5 mL、FBS 50 mL を添加し、4°C で保存した。

- ・ CT26/NY-ESO-1 用培地

RPMI-1640 500 mL に対し、10,000 U/mL Penicillin, 10,000 μ g/mL Streptomycin 5 mL、FBS 50 mL を添加し、4°C で保存した。

●脂質溶液の調製

DOPE は EtOH を溶媒として 1 mM あるいは 2 mM とした。PA は CHCl_3 / EtOH = 1 / 1 を溶媒として、1 mM あるいは 2 mM とした。DOTAP は EtOH を溶媒として 4 mM とした。MPLA は CHCl_3 / MeOH = 75 / 25 を溶媒として 0.5 mg/mL とした。

●マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC)の誘導

滅菌シャーレに BMDC 用培地及び Endotoxin-free PBS をそれぞれマウス 1 匹につき 10 mL 加えた。頸椎脱臼した C57BL/6J マウス (6~10 週齢)、あるいは BALB/c マウス (6~10 週齢) より大腿骨および頸骨を摘出し、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、1 mL シリンジ(26G 針)により培地で骨髄細胞を押し出した。細胞懸濁液を 40 μm のセルストレイナーに通して 50 mL コニカルチューブに移した。遠心 (500 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min)後、上清を除去し、ACK Lysing Buffer 1 mL を添加、混合し、室温で 5 min 静置した。BMDC 用培地 9 mL を添加後、遠心して上清を除去し、さらに BMDC 用培地 10 mL で 2 回洗浄した。次に、細胞を BMDC 用培地 10 mL に懸濁し、10 cm 細胞培養ディッシュに添加し、37 $^{\circ}\text{C}$, 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、上清除去後、BMDC 用培地 10 mL に懸濁してセルカウントした。1 $\times 10^6$ cells/mL となるように BMDC 用培地で懸濁し、GM-CSF (終濃度 10 ng/mL) を添加後、24 well plate に 1 mL ずつ播種し、37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下で培養した。24 well plate への播種から 2 日後、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 BMDC 用培地 1 mL を添加した。GM-CSF 存在下で培養開始後 6 日目の浮遊及び弱付着細胞を未成熟樹状細胞として実験に用いた。

●細胞培養

B3Z 細胞、及び E.G7-OVA 細胞は、10 cm 滅菌シャーレを培養皿として使用し、BMDC 用培地を用いて培養を行った。5.0 $\times 10^5$ cells/dish となるように播種してから 2 日間培養し、BMDC 用培地を 50 mL チューブに回収後、シャーレを PBS(-) 5 mL で洗い込み、BMDC 用培地を回収したチューブへ加えた。この細胞懸濁液を、4 $^{\circ}\text{C}$ 、200 g、5 min で遠心し、上清を除去後、適当な細胞濃度になるように BMDC 用培地で細胞を懸濁した。0.3% トリパンブルー/PBS でセルカウントを行い、5.0 $\times 10^5$ cells/10 mL/dish となるように再播種を行った。培養は 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下でおこなった。E.G7-OVA の場合は、400 μg mL G418 存在下で培養をおこなった。セルストックは、1.0 $\times 10^6$ cells/1 mL 10% DMSO 含有 BMDC 用培地 (第 1 章) or CELLBANKER® 1plus (第 2 章) となるように細胞を懸濁し、スクリーキャップチューブに移した。10%DMSO 含有 BMDC 用培地の場合は-1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で、CELLBANKER® 1plus の場合は直接ディープフリーザーに入れる事で、-80 $^{\circ}\text{C}$ まで温度を低下させ凍結した。その後、液体窒素気相中で保存した。

CT26/NY-ESO-1 は、10 cm 接着細胞用 dish を培養皿として使用し、CT26/NY-ESO-1 用

培地を用いて培養をおこなった。5.0 × 10⁵ cells/dish となるように播種してから 3 日間培養し、培地をアスピレーターにより除去後、5 mL の PBS (-) で洗浄した。1 mL の PBS (-) と 1 mL の 0.25(w/v)%トリプシン、1 mM EDTA・4Na 溶液を加え、37°C で 1~2 分間インキュベートした。CT26/NY-ESO-1 用培地を 8 mL 加え、よく懸濁したのち、50 mL チューブに回収した。5 mL の CT26/NY-ESO-1 用培地で dish を洗いこみ、同様に回収した。細胞懸濁液を、4°C、200 g、5 min で遠心し、上清を除去後、適当な細胞濃度になるように培地で細胞を懸濁した。0.3 % トリパンプルー/PBS でセルカウントを行い、400 µg/mL G418 存在下で、5.0 × 10⁵ cells/10 mL/dish となるように再播種を行った。培養は 37°C、5%CO₂ 条件下で行った。セルストックは、1.0 × 10⁶ cells/1 mL 10% DMSO 含有 CT26/NY-ESO-1 用培地 (第 1 章) or CELLBANKER® 1plus (第 2 章) となるように細胞を懸濁し、スクリーキャップチューブに移した。10%DMSO 含有 CT26/NY-ESO-1 用培地の場合は-1°C/min の速度で、CELLBANKER® 1plus の場合は直接ディープフリーザーに入れる事で、-80°Cまで温度を低下させ凍結した。その後、液体窒素気相中で保存した。

●単純水和法による MEND の調製

1 mM DOPE in EtOH	85.6 µL
1 mM PA in EtOH / CHCl ₃ =1 / 1	24.4 µL
CHCl ₃	90 µL

上記のようにガラス試験管内に溶液を加えた後、デシケーターで溶媒を留去し脂質薄膜を形成した。また、100 µL の 120 µg/mL protamine sulfate in 10 mM HEPES (pH 7.4)を、ボルテックスミキサーにかけながら、100 µL の 80 µg/mL 核酸 in 10 mM HEPES (pH 7.4) を 1 滴ずつ滴下し、Core 溶液 200 µL を作成した(N/P = 2.2)。脂質薄膜を形成させたガラス試験管に作成した Core 溶液を添加し、10 分間室温で水和をした。Core を用いないリポソームを作成する場合は、水和に 10 mM HEPES buffer (pH 7.4)を用いた。浴槽型ソニケーターで超音波処理をしたのち、MEND 溶液をボルテックスミキサーにかけながら、適切な量の STR-KALA in DDW、STR-R8 in DDW を加えた。

●mRNA搭載Lipoplexの調製

○ 0.55 mM DOPE / PA 9 / 2 Liposome (200 µL)	
2 mM DOPE in EtOH	45 µL
2 mM PA in EtOH / CHCl ₃ =1 / 1	10 µL
CHCl ₃	45 µL
○ 0.55 mM DOTAP / DOPE 1 / 1 Liposome (200 µL)	
2 mM DOPE in EtOH	27.5 µL
4 mM DOTAP in EtOH	13.8 µL
CHCl ₃	41.3 µL

上記のようにガラス試験管内に溶液を加えた後、デシケーターで溶媒を留去し脂質薄膜を形成した。MPLA搭載粒子を調製する場合は、0.5 mg/mL MPLA in CHCl_3 / MeOH = 75 / 25を適宜 CHCl_3 で希釈したものを脂質溶液内に混合した。1,000 μL の10 mM HEPES (pH 7.4)を試験管に加え、15分間室温で水和したのち、浴槽型ソニケーターで超音波処理する事でリポソーム懸濁液とした。リポソーム懸濁液100 μL を10 mM HEPES (pH7.4) 100 μL で希釈し、ボルテックスミキサーにかけながら、8.25 μL の1 mM STR-KALA in DDWを、次いで100 μL の40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 核酸溶液を加えた。mRNAと同時に核酸アジュバント (Poly (I:C) (HMW), CpG-ODN1826, 5'-ppp-dsRNA, pCpGfree-NewMCS) を混合する場合は、KALA-Liposomeと核酸 (mRNA+ 核酸アジュバント) の重量比は固定したまま、mRNAの一部を核酸アジュバントに置換した。

●遺伝子発現活性評価 (Luciferase Assay)

○24 well plate を用いたトランスフェクション、破碎処理

BMDC 4.0×10^5 cells / pDNA or mRNA 0.4 μg / BMDC 用培地 500 μL となるよう BMDC 懸濁液、MEND 懸濁液、BMDC 用培地 (血清-)を混合し、24 well plate に播種した。3 時間後、1500 μL / well となるように BMDC 用培地 (血清+) を各 well に添加した。その 3 時間後 (第 2 章) あるいは 21 時間後 (第 1 章) に、well の洗浄と Lysis buffer の添加を以下のようにおこなった。始めに各 well の上清を 1.5 mL tube に回収し、その後 500 μL の PBS で well を洗浄した。洗浄に用いた PBS も、先に上清を回収した 1.5 mL tube に回収した。上清と洗浄に用いた PBS の合計量が 1.5 mL tube の容量を超える場合は、複数回に分けて遠心・上清除去をおこなった。well の洗浄後、5 \times Lysis buffer を 5 倍希釈したものを 75 μL 加えた。上清と洗浄に用いた PBS を回収した 1.5 mL tube を 4 $^{\circ}\text{C}$ 、500 g、5 min で遠心し、上清を除去した。遠心により生じた細胞ペレットを、対応する well の Lysis buffer を 40 μL により、よく懸濁して well に戻し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で 30 min 以上静置した。

○12 well plate を用いたトランスフェクション、破碎処理 (第 2 章)

BMDC 2.0×10^6 cells / mRNA 0.5 μg / BMDC 用培地 500 μL となるよう BMDC 懸濁液、MEND 懸濁液、BMDC 用培地 (血清-)を混合し、24 well plate に播種した。3 時間後、1500 μL / well となるように BMDC 用培地 (血清+) を各 well に添加した。その 3 時間後に、well の洗浄と Lysis buffer の添加を以下のようにおこなった。始めに各 well の上清を 1.5 mL tube に回収し、その後 500 μL の PBS で well を洗浄した。洗浄に用いた PBS も、先に上清を回収した 1.5 mL tube に回収した。上清と洗浄に用いた PBS の合計量が 1.5 mL tube の容量を超える場合は、複数回に分けて遠心・上清除去をおこなった。well の洗浄後、5 \times Lysis buffer を 5 倍希釈したものを 75 μL 加えた。上清と洗浄に用いた PBS を回収した 1.5 mL tube を 4 $^{\circ}\text{C}$ 、500 g、5 min で遠心し、上清を除去した。遠心により生じた細胞ペレットを、対応する well の Lysis buffer を 40 μL により、よく懸濁して well に戻し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で 30 min 以上静置した。

○Luciferase Assay、タンパク定量

各 well の Lysis buffer を常温で溶かし、氷上でセルスクレイパーを用いて well の底の細胞を剥がした。液を回収し 4℃、20,000 g、2 min で遠心し、その上清 50 μ L を回収した。得られた上清を用いてルシフェラーゼ活性測定 (RLU/mL)、BCA 法によるタンパク定量 (mg/mL) を行い、単位タンパク質量当たりのルシフェラーゼ活性 (RLU/mg protein) を算出した。

●サイトカイン産生評価

BMDC 4.0×10^5 cells / pDNA 0.4 μ g / BMDC 用培地 500 μ L (第 1 章) あるいは BMDC 2.0×10^6 cells / mRNA 0.5 μ g / BMDC 用培地 1,000 μ L (第 2 章) となるよう BMDC 懸濁液、MEND 懸濁液、BMDC 用培地 (血清-) を混合し、24 well plate (第 1 章) あるいは 12 well plate (第 2 章) に播種した。3 時間後、1500 μ L/well となるように BMDC 用培地 (血清+) を各 well に添加した。その 3 時間後、上清を回収し、4℃、500 g、5min で遠心した。上清を回収したのち、速やかに液体窒素で急速凍結させ -80℃ で保存した。Mouse Quantikine ELISA kit (R&D systems) を用いて、その推奨プロトコルに従って ELISA をおこなった。

●CD80, CD86 発現評価

4.0×10^5 cells の BMDC と pDNA 0.4 μ g 相当の各種 MEND を混合した BMDC 用培地 (血清-)、及び LPS を 100 ng/mL となるよう添加した BMDC 用培地 (血清-) 250 μ L を、接着細胞用 24 well plate に添加し、37℃、CO₂ 5% の条件で 3 時間インキュベートした。その後 BMDC 用培地 (血清+) 500 μ L を添加し、37℃、CO₂ 5% の条件で 17 時間インキュベートした。樹状細胞を well より回収し、それぞれの群の BMDC 5.0×10^5 cells をエップendorf チューブへ移した。ブロッキングのため、mouse IgG1, κ (5 μ g/mL, FACS buffer, SIGMA) 溶液を 50 μ L ずつ添加し、4℃ 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、細胞に各 PE 標識化抗体 (2 μ g/mL, FACS buffer) 溶液 50 μ L を添加し遮光条件下で 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、FACSCalibur フローサイトメーターを用いて蛍光強度を測定した。

●抗原提示アッセイ

2.0×10^6 cells/1,000 μ L/ well となるように BMDC を non-treated bottom 12 well plate へ播種し、適切な濃度となるように MEND あるいは Lipoplex を添加した (血清-)。2 時間後に BMDC 用培地 (血清+) 1,000 μ L を加えた。その 22 時間後に各 well から BMDC をピペティングにより、回収しセルカウントののち、96 well plate で B3Z 細胞と 16 時間共培養を行った (BMDC : 2.0×10^5 cells/well, B3Z : 1.0×10^5 cells/well)。

共培養後、各 well から上清を回収し、4℃、400 g、5 min で遠心して上清を取り除いた。上

清を取り除いた各 well (PBS で穏やかに洗浄) と遠心した細胞に対し、それぞれ 50 μ L ずつの CPRG 溶液を加え、それらを混合し 4 時間 37°C でインキュベートした。その後、必要に応じて CPRG diluents で溶液を希釈して、Abs (595nm) を測定した。

● *in vivo* CTL アッセイ

○ day0

2.0 \times 10⁶ cells/1,000 μ L/well となるように BMDC を non-treated bottom 12 well plate へ播種し、適切な濃度となるように MEND あるいは Lipoplex を添加した (血清-)。2 時間後に BMDC 用培地 (血清+) 1,000 μ L を加えた。その 4 時間後に各 well から BMDC をピペティングにより回収し、セルカウントののち、適切な細胞濃度となるように PBS で希釈した。C57BL/6J あるいは BALB/c マウス (7~9 週齢雌) の両足の裏から合計 40 μ L の BMDC 懸濁液を皮下投与した。

○ day7

C57BL/6J あるいは BALB/c マウス (7~9 週齢雌) の脾臓を摘出し、脾臓細胞を 10 mL の BMDC 用培地に懸濁した。5 mL シリンジを用いて凝集塊をほぐし、40 μ m のセルストレイナーを通した。500 g, 4°C, 5 min で遠心し、1 つの脾臓当たり 1 mL の ACK Lysing buffer を添加して室温で 5 分間インキュベートした。BMDC 用培地で 5 倍希釈し 500 g, 4°C, 5 min で遠心した。上清を除去し、10 mL の BMDC 用培地で懸濁後、同様の条件で遠心した。上清を除去し細胞数を計測後、40 μ m のセルストレイナーを通して脾臓細胞を 2 群に分けた (High 群及び Low 群)。500 g, 4°C, 5 min で遠心し上清を除去後、1 \times 10⁷ cells/mL となるように BMDC 用培地で懸濁した。High 群に 2 mM OVA₂₅₇₋₂₆₄ SIINF EKL あるいは 2 mM NY-ESO-1₈₁₋₈₈ RGPESRLL ペプチドを培地量の 1/400 量を添加し、素早く懸濁した。両群を 37°C, 5% CO₂ で 1 時間インキュベートした。500 g, 4°C, 5 min で遠心し、上清を除去後、10 mL の BMDC 用培地で 2 回洗浄した。10 mL の PBS を用いて細胞を懸濁し、40 μ m のセルストレイナーを通した。5 mL の PBS で洗いこみ、同様に 40 μ m のセルストレイナーを通した。セルカウントをおこなったのち、500 g, 4°C, 5 min で遠心し、上清を除去後、1 μ M CFSE in PBS (High 群) または 0.1 μ M CFSE in PBS (Low 群) で 3 \times 10⁷ cells/mL となるように懸濁し、遮光しながら 37°C の水浴で 10 分間インキュベートした。10 mL の BMDC 用培地を添加し、500 g, 4°C, 5 min で遠心した。上清を除去後、10 mL の BMDC 用培地・10 mL の PBS で洗浄した。両群の細胞数を計測し、5 \times 10⁷ cells/mL となるように PBS で懸濁した。High 群と Low 群を等量混合した細胞懸濁液を、day0 に免疫したマウスの尾静脈から 26G 注射針を用いて投与した。

○ day8

脾臓細胞の尾静脈投与から 20 時間後、各マウスから脾臓を回収し、脾臓細胞を 3 mL の BMDC 用培地に懸濁後、5 mL シリンジを使って凝集塊をほぐした。ナイロンメッシュを通して均一な細胞懸濁液とし、500 g, 4°C, 3 min で遠心した。上清を除去後、1 mL の ACK

Lysing buffer を添加し室温で 5 分間インキュベートした。9 mL の FACS buffer を添加し、500 g, 4°C, 3 min で遠心した。上清を除去後、5 mL の FACS buffer を用いて 2 回洗浄した。5 mL の FACS buffer で懸濁し、フローサイトメーターにより、CFSE^{High} 群と CFSE^{Low} 群を計測し非免疫マウスの High/Low 比から各マウスにおける High 群減少率を算出した。

●細胞内 IFN- γ 染色

○ day 0, 7

BMDC 2.0×10^6 cells/ mRNA 1.0 μ g/Medium 1,000 μ L となるよう BMDC 懸濁液、粒子懸濁液、BMDC 用培地(血清-)を混合し、non-treated bottom 12 well plate に播種した。トランスフェクションから 2 時間後、1,000 μ L/well となるように BMDC 用培地(血清+)を各 well に添加した。その 4 時間後に各 well から BMDC を回収しセルカウントののち、 125×10^5 cells / mL (=5.0 $\times 10^5$ cells / 40 μ L)となるように PBS で希釈した。C57BL/6J(6w, ♀)の両足の裏から 40 μ L の BMDC 懸濁液を皮下投与した。

○ day 14

マウスより脾臓を摘出し、脾臓細胞を BMDC 用培地に懸濁した。5 mL シリンジを用いて凝集塊をほぐし、40 μ m のセルストレイナーを通した。4°C、500 g、5 min で遠心し、1 mL の ACK Lysing buffer を添加して室温で 5 分間インキュベートした。BMDC 用培地で 10 倍希釈し 4°C、500 g、5 min で遠心した。上清を除去し、5 mL の BMDC 用培地で wash を 2 回おこなったのち 5 mL の BMDC 用培地で細胞を懸濁後、細胞数の計測を行った。30 $\times 10^6$ cells 相当の懸濁液を 15 mL tube へ分注し、4°C、500 g、5 min で遠心した。上清を除いたのち、3 μ g/mL OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (SIINF EKL) Medium 1 mL で細胞を懸濁し、うち 500 μ L を non-treated bottom 12 well plate に播種後、1 mL の Medium を混合した (ペプチド終濃度 : 1 μ g/mL)。37°C、5% CO₂、1 hr インキュベート後、2.5 μ L/mL GoldiPlug, 1 μ g/mL OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide Medium を各 well に 1 mL ずつ入れピペッティングにより懸濁した (終濃度 : 1 μ L/mL GoldiPlug, 1 μ g/mL peptide)。ポジティブコントロールとして、4.5 $\times 10^6$ cells / Cell Activation Cocktail 5 μ L / BMDC 用培地 1500 μ L となるように混合した細胞を well へ播種した。非刺激コントロールには、GoldiPlug のみ混合した。37°C、5% CO₂、6 hr インキュベートをおこなった。各 well からピペッティングにより細胞を回収し 5 mL の氷冷 BMDC 用培地で 2 回 wash したのちセルカウントした。

○ 細胞内 IFN- γ 染色

1.0 $\times 10^6$ cells 相当を 500g, 4°C, 5 min で遠心、上清除去を行い、1 mL の FACS buffer で 2 回 wash した。ブロッキングのため、10 μ g/mL anti-mouse CD16/32 antibody 50 μ L で各ペレットを懸濁し、4°C, 10 min の条件でインキュベートした。APC anti-Mouse CD3 (4.0 μ g/mL), FITC anti-Mouse CD8a (10.0 μ g/mL) in 10 μ g/mL anti-mouse CD16/32 antibody を 50 μ L 添加し、タッピングにより混和後、4°C, 30min の条件で細胞表面分子の染色をおこなった。1 mL の FACS buffer で 2 回 wash 後、Fix/Perm Solution 250 μ L で

ペレットを懸濁し、3 sec ボルテックス後、4°C, 45 min インキュベートする事で膜透過処理及び固定処理をおこなった。500 µL の Perm/Wash solution で 2 回 wash したのち、1.2 µg/mL PE Rat Anti-Mouse IFN-γ in 10 µg/mL anti-mouse CD16/32 antibody (Perm/Wash solution) を 50 µL 添加してペレットを懸濁し、4°C, 30min インキュベートする事で細胞内染色をおこなった。500 µL の Perm/Wash solution で 2 回 wash したのち、500 µL の FACS buffer で懸濁し、解析をおこなった。

●E.G7-OVA 担癌マウスに対する治療的抗腫瘍評価

○ day 0

8.0 × 10⁵ cells/40 µL/mouse となるように E.G7-OVA (OVA 発現 EL4 リンパ腫) を右脇腹に皮下投与した。

○ day 6

ノギスを用いて腫瘍の長軸と短軸を測定し、以下の式に従って腫瘍体積を計算した：
 $\text{tumor volume}(\text{mm}^3) = (\text{major axis}(\text{mm})) \times (\text{minor axis}(\text{mm}))^2 \times 0.52$ 。その後、体積が 100 mm³以上のマウスに関して、ランダムに再グループ化をおこなった

○ day 7

2.0 × 10⁶ cells/1,000 µL/well となるように BMDC を non-treated bottom 12 well plate へ播種し、適切な濃度となるように MEND を添加した (血清-)。トランスフェクションから 2 時間後、1,000 µL/well となるように BMDC 用培地 (血清+) を各 well に添加した。その 4 時間後に各 well から BMDC を回収しセルカウントののち、適切な細胞濃度となるように PBS で希釈した。C57BL/6J (7~9 週齢雌) をジエチルエーテルで麻酔し、両足の裏から合計 40 µL の BMDC 懸濁液を皮下投与した。1 週間後に再度同様の方法で免疫を行った。E.G7-OVA 移植から 9, 12, 15, 18, 21, 24 日後にノギスを用いて腫瘍の長軸と短軸を測定し、前述の式に従って腫瘍体積を計算した。

●CT26/NY-ESO-1 担癌マウスに対する治療的抗腫瘍評価

○ day 0

1.0 × 10⁶ cells/50 µL/mouse となるように CT26/NY-ESO-1 (NY-ESO-1 発現 CT26 大腸がん細胞) を右脇腹に皮下投与した。

○ day 7

ノギスを用いて腫瘍の長軸と短軸を測定し、以下の式に従って腫瘍体積を計算した：
 $\text{tumor volume}(\text{mm}^3) = (\text{major axis}(\text{mm})) \times (\text{minor axis}(\text{mm}))^2 \times 0.52$ 。その後、体積が 40 mm³以上のマウスに関して、ランダムに再グループ化をおこなった

2.0 × 10⁶ cells/1,000 µL/well となるように BMDC を non-treated bottom 12 well plate へ播種し、適切な濃度となるように MEND を添加した (血清-)。トランスフェクションから 2 時間後、1,000 µL/well となるように CT26/NY-ESO-1 用培地 (血清+) を各 well に添加

した。その4時間後に各 well から BMDC を回収しセルカウントののち、適切な細胞濃度となるように PBS で希釈した。BALB/c マウス (7~9 週齢雌) をジエチルエーテルで麻酔し、両足の裏から合計 40 μ L の BMDC 懸濁液を皮下投与した。1週間後に再度同様の方法で免疫を行った。CT26/NY-ESO-1 移植から 9, 12, 15, 18, 21, 24 日後にノギスを用いて腫瘍の長軸と短軸を測定し、前述の式に従って腫瘍体積を計算した

●QD705 修飾 pDNA の調製

○ビオチン化 pDNA の調製 (Mirus Label IT biotin nucleic acid labeling kit を用いた)

以下の組成となるように各種溶液を混合し、37°C で 1 時間インキュベートした。

DDW	158 μ L
10 \times buffer A	20 μ L
pDNA (1 mg/mL)	20 μ L
Label IT reagent	2 μ L

その後、500 μ L の EtOH、5 M NaCl 10 μ L、2 mg/mL Glycogen 1 μ L を加え転倒混和後、-80°C で 20 min インキュベートした。20,000 g、4°C、20 min 遠心し、上清を除いた。70% EtOH を 200 μ L 添加しピペッティングによりペレットを洗浄後、20,000 g、4°C、5 min 遠心した。上清を除き、20 min 風乾後、20 μ L の滅菌水に溶解した。

○Qdot®705-Streptavidin の修飾 (Qdot®705 ITK™ Streptavidin Conjugate Kit を用いた)

以下の組成となるように各種溶液を混合し、室温で 30 min インキュベートした。

1 mg/mL ビオチン化 pDNA	10 μ L
2 μ M Qdot®705	0.5 μ L
10 mM HEPES (pH 7.4)	39.5 μ L

その後、予め 10 mM HEPES (pH 7.4) で平衡化させた、Sephadex G50 mini column (Mirus Label IT Kit に付属) へ反応液を入れ、4°C、800 g、2 min 遠心することで未反応の Qdot®705 を除いた。

●エンドソーム脱出能評価

BMDC 4×10^5 cells/pDNA 0.4 μ g/Medium 500 μ L となるよう BMDC 懸濁液、MEND 懸濁液 (50% の pDNA を QD705 修飾 pDNA (赤色として疑似カラー表示) へ置換した)、BMDC 用培地 (血清-) を混合し、200 μ L をガラスベースディッシュのガラス上にアプライした。37°C、5%CO₂ 条件下で 2 時間インキュベートし、1 mL の BMDC 用培地 (血清+) を添加した。その 4 時間後に 1 mL の培地と 1 mL の 20 U/mL ヘパリンナトリウム溶液で 2 回ずつ洗浄し、ディスク型共焦点走査型顕微鏡 (CSU-X1 搭載 Nikon ECLIPSE TE-2000-U) で観察を行った。観察の 10 分前に Hoechst33342 (青色として疑似カラー表示)、5 分前に LysoTracker Green DND-26 (緑色として疑似カラー表示) で、核と酸性コンパートメ

ントをそれぞれ染色した (いずれも 1,000 倍希釈)。エンドソーム脱出効率は以下の式を用いて計算した。

$$((1 - (\text{黄色の積分ピクセル強度} / \text{赤の積分ピクセル強度})) \times 100 (\%))$$

● Hemolysis アッセイ

ICR マウス (4~6 週齢・雄) の下大静脈より約 1 mL 程度の血液を採取し、10 mg/mL ヘパリンナトリウム溶液 1 μ L と混合した。氷冷生理食塩水と混合し 10 mL としたのち、4°C、400 g、10 min の条件で遠心し、上清を除いた。同様の操作を 3 回繰り返す、赤血球懸濁液を得た。0.02(w/v)% Triton-X100/緩衝液中と適当な量の赤血球懸濁液を混合して 500 μ L とし、ボルテックスミキサーで攪拌後、200 μ L を透明 96 well plate へ加え、545 nm における吸光度を測定した。545 nm における吸光度が 1.0 となる赤血球懸濁液量を決定し、その量の赤血球懸濁液とサンプル、及び緩衝液を混合し 500 μ L としたのち、37°C、900 rpm、30 min の条件で攪拌しながらインキュベートした。その後、4°C、400 g、5 min の条件で遠心し、上清 200 μ L を透明 96 well plate へ加え、545 nm における吸光度を測定した。100% lysis された場合の値として 0.02(w/v)% Triton-X100/緩衝液中での吸光度、0% lysis された場合の値として緩衝液中での吸光度を用い、サンプルの% lysis を算出した。

● in vitro 転写による mRNA 合成

mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA Transcription Kit (invitrogen) を用いて、その推奨プロトコルに従っておこなった。

ただし *in vitro* 転写反応に用いた pDNA と線状化に用いた制限酵素は以下の通りである。

- mRNA-Luciferase(0) \rightarrow pcDNA3.1-Luc(0) / EcoRV-HF
- mRNA-Luciferase(UTR/OPT) \rightarrow pcDNA3.1-Luc(UTR/OPT) / BspEI
- mRNA-Ovalbumin(0) \rightarrow pcDNA3.1-OVA(0) / XhoI
- mRNA-hNYESO1(UTR/WT) \rightarrow pcDNA3.1-hNYESO1(UTR/WT) / BspEI

● 電気泳動による mRNA 放出能評価

以下のように試薬を混合し、37°C、30 min インキュベートをおこなった

mRNA or mRNA 搭載粒子懸濁液	mRNA 0.1 μ g 相当 (10 μ L)
0.031 ~ 10 mg/mL poly-aspartic acid	8 μ L
1.45 M NaCl	2 μ L

その後、6 \times Loading dye (SDS 不含) を 4 μ L 加え良く混合したのち、10,000 倍希釈 GelRed 含有 1% アガロースゲルに全量アプライし、4°C で 2 時間泳動した。

【参考文献】

1. 厚生労働省, 平成 28 年人口動態統計月報年計 (概数) の概況. **2017**.
2. Blattman, J. N.; Greenberg, P. D., Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* **2004**, *305*(5681), 200-5.
3. Mellman, I.; Coukos, G.; Dranoff, G., Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **2011**, *480*(7378), 480-9.
4. Kirkwood, J. M.; Butterfield, L. H.; Tarhini, A. A.; Zarour, H.; Kalinski, P.; Ferrone, S., Immunotherapy of cancer in 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* **2012**, *62*(5), 309-35.
5. Morales, A.; Eidinger, D.; Bruce, A. W., Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *The Journal of urology* **1976**, *116*(2), 180-3.
6. Kantoff, P. W.; Higano, C. S.; Shore, N. D.; Berger, E. R.; Small, E. J.; Penson, D. F.; Redfern, C. H.; Ferrari, A. C.; Dreicer, R.; Sims, R. B.; Xu, Y.; Frohlich, M. W.; Schellhammer, P. F., Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England journal of medicine* **2010**, *363*(5), 411-22.
7. Hodi, F. S.; O'Day, S. J.; McDermott, D. F.; Weber, R. W.; Sosman, J. A.; Haanen, J. B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J. C.; Akerley, W.; van den Eertwegh, A. J.; Lutzky, J.; Lorigan, P.; Vaubel, J. M.; Linette, G. P.; Hogg, D.; Ottensmeier, C. H.; Lebbe, C.; Peschel, C.; Quirt, I.; Clark, J. I.; Wolchok, J. D.; Weber, J. S.; Tian, J.; Yellin, M. J.; Nichol, G. M.; Hoos, A.; Urba, W. J., Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* **2010**, *363*(8), 711-23.
8. Robert, C.; Ribas, A.; Wolchok, J. D.; Hodi, F. S.; Hamid, O.; Kefford, R.; Weber, J. S.; Joshua, A. M.; Hwu, W. J.; Gangadhar, T. C.; Patnaik, A.; Dronca, R.; Zarour, H.; Joseph, R. W.; Boasberg, P.; Chmielowski, B.; Mateus, C.; Postow, M. A.; Gergich, K.; Ellassaiss-Schaap, J.; Li, X. N.; Iannone, R.; Ebbinghaus, S. W.; Kang, S. P.; Daud, A., Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet (London, England)* **2014**, *384*(9948), 1109-17.
9. Sims, R. B., Development of sipuleucel-T: autologous cellular immunotherapy for the treatment of metastatic castrate resistant prostate cancer. *Vaccine* **2012**, *30*(29), 4394-7.
10. Pardoll, D. M., The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer* **2012**, *12*(4), 252-64.

11. Quezada, S. A.; Peggs, K. S.; Curran, M. A.; Allison, J. P., CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation* **2006**, *116*(7), 1935-45.
12. Gubin, M. M.; Zhang, X.; Schuster, H.; Caron, E.; Ward, J. P.; Noguchi, T.; Ivanova, Y.; Hundal, J.; Arthur, C. D.; Krebber, W. J.; Mulder, G. E.; Toebes, M.; Vesely, M. D.; Lam, S. S.; Korman, A. J.; Allison, J. P.; Freeman, G. J.; Sharpe, A. H.; Pearce, E. L.; Schumacher, T. N.; Aebbersold, R.; Rammensee, H. G.; Melief, C. J.; Mardis, E. R.; Gillanders, W. E.; Artyomov, M. N.; Schreiber, R. D., Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* **2014**, *515*(7528), 577-81.
13. Iwai, Y.; Ishida, M.; Tanaka, Y.; Okazaki, T.; Honjo, T.; Minato, N., Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*(19), 12293-7.
14. Karyampudi, L.; Lamichhane, P.; Scheid, A. D.; Kalli, K. R.; Shreeder, B.; Krempski, J. W.; Behrens, M. D.; Knutson, K. L., Accumulation of memory precursor CD8 T cells in regressing tumors following combination therapy with vaccine and anti-PD-1 antibody. *Cancer research* **2014**, *74*(11), 2974-85.
15. Robert, C.; Long, G. V.; Brady, B.; Dutriaux, C.; Maio, M.; Mortier, L.; Hassel, J. C.; Rutkowski, P.; McNeil, C.; Kalinka-Warzocha, E.; Savage, K. J.; Hernberg, M. M.; Lebbe, C.; Charles, J.; Mihalciou, C.; Chiarion-Sileni, V.; Mauch, C.; Cognetti, F.; Arance, A.; Schmidt, H.; Schadendorf, D.; Gogas, H.; Lundgren-Eriksson, L.; Horak, C.; Sharkey, B.; Waxman, I. M.; Atkinson, V.; Ascierto, P. A., Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *The New England journal of medicine* **2015**, *372*(4), 320-30.
16. Prasad, V.; Kaestner, V., Nivolumab and pembrolizumab: Monoclonal antibodies against programmed cell death-1 (PD-1) that are interchangeable. *Seminars in oncology* **2017**, *44*(2), 132-135.
17. Le, D. T.; Uram, J. N.; Wang, H.; Bartlett, B. R.; Kemberling, H.; Eyring, A. D.; Skora, A. D.; Luber, B. S.; Azad, N. S.; Laheru, D.; Biedrzycki, B.; Donehower, R. C.; Zaheer, A.; Fisher, G. A.; Crocenzi, T. S.; Lee, J. J.; Duffy, S. M.; Goldberg, R. M.; de la Chapelle, A.; Koshiji, M.; Bhajee, F.; Huebner, T.; Hruban, R. H.; Wood, L. D.; Cuka, N.; Pardoll, D. M.; Papadopoulos, N.; Kinzler, K. W.; Zhou, S.; Cornish, T. C.; Taube, J. M.; Anders, R. A.; Eshleman, J. R.; Vogelstein, B.; Diaz, L. A., Jr., PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *The New England journal of medicine* **2015**, *372*(26), 2509-20.

18. Alexandrov, L. B.; Nik-Zainal, S.; Wedge, D. C.; Aparicio, S. A.; Behjati, S.; Biankin, A. V.; Bignell, G. R.; Bolli, N.; Borg, A.; Borresen-Dale, A. L.; Boyault, S.; Burkhardt, B.; Butler, A. P.; Caldas, C.; Davies, H. R.; Desmedt, C.; Eils, R.; Eyfjord, J. E.; Foekens, J. A.; Greaves, M.; Hosoda, F.; Hutter, B.; Ilicic, T.; Imbeaud, S.; Imielinski, M.; Jager, N.; Jones, D. T.; Jones, D.; Knappskog, S.; Kool, M.; Lakhani, S. R.; Lopez-Otin, C.; Martin, S.; Munshi, N. C.; Nakamura, H.; Northcott, P. A.; Pajic, M.; Papaemmanuil, E.; Paradiso, A.; Pearson, J. V.; Puente, X. S.; Raine, K.; Ramakrishna, M.; Richardson, A. L.; Richter, J.; Rosenstiel, P.; Schlesner, M.; Schumacher, T. N.; Span, P. N.; Teague, J. W.; Totoki, Y.; Tutt, A. N.; Valdes-Mas, R.; van Buuren, M. M.; van 't Veer, L.; Vincent-Salomon, A.; Waddell, N.; Yates, L. R.; Zucman-Rossi, J.; Futreal, P. A.; McDermott, U.; Lichter, P.; Meyerson, M.; Grimmond, S. M.; Siebert, R.; Campo, E.; Shibata, T.; Pfister, S. M.; Campbell, P. J.; Stratton, M. R., Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **2013**, *500* (7463), 415-21.
19. Rooney, M. S.; Shukla, S. A.; Wu, C. J.; Getz, G.; Hacohen, N., Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* **2015**, *160* (1-2), 48-61.
20. Tumeu, P. C.; Harview, C. L.; Yearley, J. H.; Shintaku, I. P.; Taylor, E. J.; Robert, L.; Chmielowski, B.; Spasic, M.; Henry, G.; Ciobanu, V.; West, A. N.; Carmona, M.; Kivork, C.; Seja, E.; Cherry, G.; Gutierrez, A. J.; Grogan, T. R.; Mateus, C.; Tomasic, G.; Glaspy, J. A.; Emerson, R. O.; Robins, H.; Pierce, R. H.; Elashoff, D. A.; Robert, C.; Ribas, A., PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **2014**, *515* (7528), 568-71.
21. Larkin, J.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Grob, J. J.; Cowey, C. L.; Lao, C. D.; Schadendorf, D.; Dummer, R.; Smylie, M.; Rutkowski, P.; Ferrucci, P. F.; Hill, A.; Wagstaff, J.; Carlino, M. S.; Haanen, J. B.; Maio, M.; Marquez-Rodas, I.; McArthur, G. A.; Ascierto, P. A.; Long, G. V.; Callahan, M. K.; Postow, M. A.; Grossmann, K.; Sznol, M.; Dreno, B.; Bastholt, L.; Yang, A.; Rollin, L. M.; Horak, C.; Hodi, F. S.; Wolchok, J. D., Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *New England Journal of Medicine* **2015**, *373* (1), 23-34.
22. Sawada, Y.; Yoshikawa, T.; Shimomura, M.; Iwama, T.; Endo, I.; Nakatsura, T., Programmed death-1 blockade enhances the antitumor effects of peptide vaccine-induced peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *International journal of oncology* **2015**, *46* (1), 28-36.
23. Deng, L.; Liang, H.; Burnette, B.; Beckett, M.; Darga, T.; Weichselbaum, R. R.; Fu, Y. X., Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor

- immunity in mice. *The Journal of clinical investigation* **2014**, *124* (2), 687-95.
24. Aurisicchio, L.; Ciliberto, G., Genetic cancer vaccines: current status and perspectives. *Expert opinion on biological therapy* **2012**, *12* (8), 1043-58.
 25. Corr, M.; Lee, D. J.; Carson, D. A.; Tighe, H., Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *The Journal of experimental medicine* **1996**, *184* (4), 1555-60.
 26. Porgador, A.; Irvine, K. R.; Iwasaki, A.; Barber, B. H.; Restifo, N. P.; Germain, R. N., Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *The Journal of experimental medicine* **1998**, *188* (6), 1075-82.
 27. Akbari, O.; Panjwani, N.; Garcia, S.; Tascon, R.; Lowrie, D.; Stockinger, B., DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *The Journal of experimental medicine* **1999**, *189* (1), 169-78.
 28. Kogure, K.; Moriguchi, R.; Sasaki, K.; Ueno, M.; Futaki, S.; Harashima, H., Development of a non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2004**, *98* (2), 317-23.
 29. Sato, Y.; Nakamura, T.; Yamada, Y.; Akita, H.; Harashima, H., Multifunctional enveloped nanodevices (MENDs). *Advances in genetics* **2014**, *88*, 139-204.
 30. Khalil, I. A.; Kogure, K.; Futaki, S.; Hama, S.; Akita, H.; Ueno, M.; Kishida, H.; Kudoh, M.; Mishina, Y.; Kataoka, K.; Yamada, M.; Harashima, H., Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nanoparticles for gene delivery. *Gene therapy* **2007**, *14* (8), 682-9.
 31. Parente, R. A.; Nir, S.; Szoka, F. C., Jr., Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. *Biochemistry* **1990**, *29* (37), 8720-8.
 32. Li, W.; Nicol, F.; Szoka, F. C., Jr., GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews* **2004**, *56* (7), 967-85.
 33. Wyman, T. B.; Nicol, F.; Zelphati, O.; Scaria, P. V.; Plank, C.; Szoka, F. C., Jr., Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry* **1997**, *36* (10), 3008-17.
 34. Shaheen, S. M.; Akita, H.; Nakamura, T.; Takayama, S.; Futaki, S.; Yamashita, A.; Katoono, R.; Yui, N.; Harashima, H., KALA-modified multi-layered nanoparticles as gene carriers for MHC class-I mediated antigen presentation for a DNA vaccine. *Biomaterials* **2011**, *32* (26), 6342-50.
 35. Akita, H.; Ishii, S.; Miura, N.; Shaheen, S. M.; Hayashi, Y.; Nakamura, T.; Kaji, N.;

- Baba, Y.; Harashima, H., A DNA microarray-based analysis of immune-stimulatory and transcriptional responses of dendritic cells to KALA-modified nanoparticles. *Biomaterials* **2013**, *34* (35), 8979-90.
36. Shedlock, D. J.; Weiner, D. B., DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal of leukocyte biology* **2000**, *68* (6), 793-806.
37. Kutzler, M. A.; Weiner, D. B., DNA vaccines: ready for prime time? *Nature reviews. Genetics* **2008**, *9* (10), 776-88.
38. Liu, M. A., DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunological reviews* **2011**, *239* (1), 62-84.
39. Ferraro, B.; Morrow, M. P.; Hutnick, N. A.; Shin, T. H.; Lucke, C. E.; Weiner, D. B., Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2011**, *53* (3), 296-302.
40. Brun, A.; Barcena, J.; Blanco, E.; Borrego, B.; Dory, D.; Escribano, J. M.; Le Gall-Recule, G.; Ortego, J.; Dixon, L. K., Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development. *Virus research* **2011**, *157* (1), 1-12.
41. Li, L.; Saade, F.; Petrovsky, N., The future of human DNA vaccines. *Journal of biotechnology* **2012**, *162* (2-3), 171-82.
42. Steinman, R. M.; Hemmi, H., Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Current topics in microbiology and immunology* **2006**, *311*, 17-58.
43. Tacken, P. J.; de Vries, I. J.; Torensma, R.; Figdor, C. G., Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nature reviews. Immunology* **2007**, *7* (10), 790-802.
44. Melief, C. J., Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity* **2008**, *29* (3), 372-83.
45. Chen, Y. Z.; Yao, X. L.; Tabata, Y.; Nakagawa, S.; Gao, J. Q., Gene carriers and transfection systems used in the recombination of dendritic cells for effective cancer immunotherapy. *Clinical & developmental immunology* **2010**, *2010*, 565643.
46. Bins, A. D.; van den Berg, J. H.; Oosterhuis, K.; Haanen, J. B., Recent advances towards the clinical application of DNA vaccines. *The Netherlands journal of medicine* **2013**, *71* (3), 109-17.
47. Shirakawa, T., Clinical trial design for adenoviral gene therapy products. *Drug news & perspectives* **2009**, *22* (3), 140-5.
48. Fox, J. L., Gene therapy safety issues come to fore. *Nature biotechnology* **1999**, *17* (12), 1153.
49. Hacein-Bey-Abina, S.; Von Kalle, C.; Schmidt, M.; McCormack, M. P.; Wulffraat, N.;

- Leboulch, P.; Lim, A.; Osborne, C. S.; Pawliuk, R.; Morillon, E.; Sorensen, R.; Forster, A.; Fraser, P.; Cohen, J. I.; de Saint Basile, G.; Alexander, I.; Wintergerst, U.; Frebourg, T.; Aurias, A.; Stoppa-Lyonnet, D.; Romana, S.; Radford-Weiss, I.; Gross, F.; Valensi, F.; Delabesse, E.; Macintyre, E.; Sigaux, F.; Soulier, J.; Leiva, L. E.; Wissler, M.; Prinz, C.; Rabbitts, T. H.; Le Deist, F.; Fischer, A.; Cavazzana-Calvo, M., LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **2003**, *302* (5644), 415-9.
50. Frahm, N.; DeCamp, A. C.; Friedrich, D. P.; Carter, D. K.; Defawe, O. D.; Kublin, J. G.; Casimiro, D. R.; Duerr, A.; Robertson, M. N.; Buchbinder, S. P.; Huang, Y.; Spies, G. A.; De Rosa, S. C.; McElrath, M. J., Human adenovirus-specific T cells modulate HIV-specific T cell responses to an Ad5-vectored HIV-1 vaccine. *The Journal of clinical investigation* **2012**, *122* (1), 359-67.
51. Mingozi, F.; Maus, M. V.; Hui, D. J.; Sabatino, D. E.; Murphy, S. L.; Rasko, J. E.; Ragni, M. V.; Manno, C. S.; Sommer, J.; Jiang, H.; Pierce, G. F.; Ertl, H. C.; High, K. A., CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nature medicine* **2007**, *13* (4), 419-22.
52. Greenland, J. R.; Letvin, N. L., Chemical adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Vaccine* **2007**, *25* (19), 3731-41.
53. Iwasaki, A.; Medzhitov, R., Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* **2010**, *327* (5963), 291-5.
54. Appleman, L. J.; Boussiotis, V. A., T cell anergy and costimulation. *Immunological reviews* **2003**, *192*, 161-80.
55. Gnjjatic, S.; Nishikawa, H.; Jungbluth, A. A.; Gure, A. O.; Ritter, G.; Jager, E.; Knuth, A.; Chen, Y. T.; Old, L. J., NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Advances in cancer research* **2006**, *95*, 1-30.
56. Muraoka, D.; Nishikawa, H.; Noguchi, T.; Wang, L.; Harada, N.; Sato, E.; Luescher, I.; Nakayama, E.; Kato, T.; Shiku, H., Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8(+) T cells. *Vaccine* **2013**, *31* (17), 2110-8.
57. Kumar, H.; Kawai, T.; Akira, S., Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications* **2009**, *388* (4), 621-5.
58. McAdam, A. J.; Schweitzer, A. N.; Sharpe, A. H., The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunological reviews* **1998**, *165*, 231-47.
59. Akita, H.; Kudo, A.; Minoura, A.; Yamaguti, M.; Khalil, I. A.; Moriguchi, R.; Masuda, T.; Danev, R.; Nagayama, K.; Kogure, K.; Harashima, H., Multi-layered

- nanoparticles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process. *Biomaterials* **2009**, *30*(15), 2940-9.
60. Ishii, K. J.; Coban, C.; Kato, H.; Takahashi, K.; Torii, Y.; Takeshita, F.; Ludwig, H.; Sutter, G.; Suzuki, K.; Hemmi, H.; Sato, S.; Yamamoto, M.; Uematsu, S.; Kawai, T.; Takeuchi, O.; Akira, S., A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nature immunology* **2006**, *7*(1), 40-8.
 61. Barber, G. N., Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Current opinion in immunology* **2011**, *23*(1), 10-20.
 62. Schlee, M.; Hartmann, G., Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nature reviews. Immunology* **2016**, *16*(9), 566-80.
 63. Ishikawa, H.; Ma, Z.; Barber, G. N., STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* **2009**, *461* (7265), 788-92.
 64. Hornung, V.; Ablasser, A.; Charrel-Dennis, M.; Bauernfeind, F.; Horvath, G.; Caffrey, D. R.; Latz, E.; Fitzgerald, K. A., AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **2009**, *458* (7237), 514-8.
 65. Shastri, N.; Gonzalez, F., Endogenous generation and presentation of the ovalbumin peptide/Kb complex to T cells. *Journal of immunology* **1993**, *150*(7), 2724-36.
 66. Bauer, A. P.; Leikam, D.; Krinner, S.; Notka, F.; Ludwig, C.; Langst, G.; Wagner, R., The impact of intragenic CpG content on gene expression. *Nucleic acids research* **2010**, *38*(12), 3891-908.
 67. Kosovac, D.; Wild, J.; Ludwig, C.; Meissner, S.; Bauer, A. P.; Wagner, R., Minimal doses of a sequence-optimized transgene mediate high-level and long-term EPO expression in vivo: challenging CpG-free gene design. *Gene therapy* **2011**, *18*(2), 189-98.
 68. Hyde, S. C.; Pringle, I. A.; Abdullah, S.; Lawton, A. E.; Davies, L. A.; Varathalingam, A.; Nunez-Alonso, G.; Green, A. M.; Bazzani, R. P.; Sumner-Jones, S. G.; Chan, M.; Li, H.; Yew, N. S.; Cheng, S. H.; Boyd, A. C.; Davies, J. C.; Griesenbach, U.; Porteous, D. J.; Sheppard, D. N.; Munkonge, F. M.; Alton, E. W.; Gill, D. R., CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nature biotechnology* **2008**, *26*(5), 549-51.
 69. Mitsui, M.; Nishikawa, M.; Zang, L.; Ando, M.; Hattori, K.; Takahashi, Y.; Watanabe, Y.; Takakura, Y., Effect of the content of unmethylated CpG dinucleotides in plasmid DNA on the sustainability of transgene expression. *The journal of gene medicine* **2009**, *11*(5), 435-43.
 70. Lesina, E.; Dames, P.; Rudolph, C., The effect of CpG motifs on gene expression and

- clearance kinetics of aerosol administered polyethylenimine (PEI)-plasmid DNA complexes in the lung. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2010**, *143* (2), 243-50.
71. Ukawa, M.; Akita, H.; Hayashi, Y.; Ishiba, R.; Tange, K.; Arai, M.; Kubo, K.; Higuchi, Y.; Shimizu, K.; Konishi, S.; Hashida, M.; Harashima, H., Neutralized Nanoparticle Composed of SS-Cleavable and pH-Activated Lipid-Like Material as a Long-Lasting and Liver-Specific Gene Delivery System. *Advanced healthcare materials* **2014**.
 72. Hodges, B. L.; Taylor, K. M.; Joseph, M. F.; Bourgeois, S. A.; Scheule, R. K., Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2004**, *10* (2), 269-78.
 73. Krieg, A. M.; Yi, A. K.; Matson, S.; Waldschmidt, T. J.; Bishop, G. A.; Teasdale, R.; Koretzky, G. A.; Klinman, D. M., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **1995**, *374* (6522), 546-9.
 74. Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H.; Matsumoto, M.; Hoshino, K.; Wagner, H.; Takeda, K.; Akira, S., A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **2000**, *408* (6813), 740-5.
 75. Kobow, K.; Blumcke, I., The emerging role of DNA methylation in epileptogenesis. *Epilepsia* **2012**, *53 Suppl 9*, 11-20.
 76. Hong, K.; Sherley, J.; Lauffenburger, D. A., Methylation of episomal plasmids as a barrier to transient gene expression via a synthetic delivery vector. *Biomolecular engineering* **2001**, *18* (4), 185-92.
 77. Kim, S.; Kim, G. J.; Miyoshi, H.; Moon, S. H.; Ahn, S. E.; Lee, J. H.; Lee, H. J.; Cha, K. Y.; Chung, H. M., Efficiency of the elongation factor-1alpha promoter in mammalian embryonic stem cells using lentiviral gene delivery systems. *Stem cells and development* **2007**, *16* (4), 537-45.
 78. Akira, S., Innate immunity and adjuvants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **2011**, *366* (1579), 2748-55.
 79. Awate, S.; Babiuk, L. A.; Mutwiri, G., Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in immunology* **2013**, *4*, 114.
 80. Spellberg, B.; Edwards, J. E., Jr., Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **2001**, *32* (1), 76-102.
 81. Joffre, O.; Nolte, M. A.; Sporri, R.; Reis e Sousa, C., Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological reviews* **2009**, *227* (1), 234-47.

82. Zitvogel, L.; Galluzzi, L.; Kepp, O.; Smyth, M. J.; Kroemer, G., Type I interferons in anticancer immunity. *Nature reviews. Immunology* **2015**, *15* (7), 405-14.
83. Huber, J. P.; Farrar, J. D., Regulation of effector and memory T-cell functions by type I interferon. *Immunology* **2011**, *132* (4), 466-74.
84. Le Bon, A.; Etchart, N.; Rossmann, C.; Ashton, M.; Hou, S.; Gewert, D.; Borrow, P.; Tough, D. F., Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nature immunology* **2003**, *4* (10), 1009-15.
85. Le Bon, A.; Durand, V.; Kamphuis, E.; Thompson, C.; Bulfone-Paus, S.; Rossmann, C.; Kalinke, U.; Tough, D. F., Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. *Journal of immunology* **2006**, *176* (8), 4682-9.
86. Beignon, A. S.; Skoberne, M.; Bhardwaj, N., Type I interferons promote cross-priming: more functions for old cytokines. *Nature immunology* **2003**, *4* (10), 939-41.
87. Ilander, M.; Kreutzman, A.; Rohon, P.; Melo, T.; Faber, E.; Porkka, K.; Vakkila, J.; Mustjoki, S., Enlarged memory T-cell pool and enhanced Th1-type responses in chronic myeloid leukemia patients who have successfully discontinued IFN-alpha monotherapy. *PloS one* **2014**, *9* (1), e87794.
88. Groom, J. R.; Richmond, J.; Murooka, T. T.; Sorensen, E. W.; Sung, J. H.; Bankert, K.; von Andrian, U. H.; Moon, J. J.; Mempel, T. R.; Luster, A. D., CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation. *Immunity* **2012**, *37* (6), 1091-103.
89. Loetscher, M.; Gerber, B.; Loetscher, P.; Jones, S. A.; Piali, L.; Clark-Lewis, I.; Baggiolini, M.; Moser, B., Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **1996**, *184* (3), 963-9.
90. Takeda, A.; Hamano, S.; Yamanaka, A.; Hanada, T.; Ishibashi, T.; Mak, T. W.; Yoshimura, A.; Yoshida, H., Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *Journal of immunology* **2003**, *170* (10), 4886-90.
91. Taub, D. D.; Conlon, K.; Lloyd, A. R.; Oppenheim, J. J.; Kelvin, D. J., Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* **1993**, *260* (5106), 355-8.
92. Carneiro, F. A.; Stauffer, F.; Lima, C. S.; Juliano, M. A.; Juliano, L.; Da Poian, A. T., Membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus depends on histidine protonation. *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278* (16), 13789-94.
93. Kampmann, T.; Mueller, D. S.; Mark, A. E.; Young, P. R.; Kobe, B., The Role of

- histidine residues in low-pH-mediated viral membrane fusion. *Structure (London, England : 1993)* **2006**, *14* (10), 1481-7.
94. Burdette, D. L.; Monroe, K. M.; Sotelo-Troha, K.; Iwig, J. S.; Eckert, B.; Hyodo, M.; Hayakawa, Y.; Vance, R. E., STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* **2011**, *478* (7370), 515-8.
 95. Bhat, N.; Fitzgerald, K. A., Recognition of cytosolic DNA by cGAS and other STING-dependent sensors. *European journal of immunology* **2014**, *44* (3), 634-40.
 96. Sun, L.; Wu, J.; Du, F.; Chen, X.; Chen, Z. J., Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* **2013**, *339* (6121), 786-91.
 97. Wu, J.; Sun, L.; Chen, X.; Du, F.; Shi, H.; Chen, C.; Chen, Z. J., Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* **2013**, *339* (6121), 826-30.
 98. Ablasser, A.; Goldeck, M.; Cavlar, T.; Deimling, T.; Witte, G.; Rohl, I.; Hopfner, K. P.; Ludwig, J.; Hornung, V., cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* **2013**, *498* (7454), 380-4.
 99. Suschak, J. J.; Wang, S.; Fitzgerald, K. A.; Lu, S., A cGAS-Independent STING/IRF7 Pathway Mediates the Immunogenicity of DNA Vaccines. *Journal of immunology* **2016**, *196* (1), 310-6.
 100. van de Veerdonk, F. L.; Netea, M. G.; Dinarello, C. A.; Joosten, L. A., Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends in immunology* **2011**, *32* (3), 110-6.
 101. Fernandes-Alnemri, T.; Yu, J. W.; Datta, P.; Wu, J.; Alnemri, E. S., AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* **2009**, *458* (7237), 509-13.
 102. Hornung, V.; Latz, E., Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation. *European journal of immunology* **2010**, *40* (3), 620-3.
 103. Miura, N.; Shaheen, S. M.; Akita, H.; Nakamura, T.; Harashima, H., A KALA-modified lipid nanoparticle containing CpG-free plasmid DNA as a potential DNA vaccine carrier for antigen presentation and as an immune-stimulative adjuvant. *Nucleic acids research* **2015**, *43* (3), N1317-31.
 104. Sahin, U.; Kariko, K.; Tureci, O., mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs. *Nature reviews. Drug discovery* **2014**, *13* (10), 759-80.
 105. Steinle, H.; Behring, A.; Schlensak, C.; Wendel, H. P.; Avci-Adali, M., Concise Review: Application of In Vitro Transcribed Messenger RNA for Cellular Engineering and Reprogramming: Progress and Challenges. *Stem cells (Dayton,*

- Ohio*) **2017**, *35*(1), 68-79.
106. Devoldere, J.; Dewitte, H.; De Smedt, S. C.; Remaut, K., Evading innate immunity in nonviral mRNA delivery: don't shoot the messenger. *Drug Discov Today* **2016**, *21*(1), 11-25.
 107. McNamara, M. A.; Nair, S. K.; Holl, E. K., RNA-Based Vaccines in Cancer Immunotherapy. *Journal of immunology research* **2015**, *2015*, 794528.
 108. Pascolo, S., Vaccination with messenger RNA (mRNA). *Handbook of experimental pharmacology* **2008**, (183), 221-35.
 109. Pollard, C.; De Koker, S.; Saelens, X.; Vanham, G.; Grooten, J., Challenges and advances towards the rational design of mRNA vaccines. *Trends in molecular medicine* **2013**, *19*(12), 705-13.
 110. Lorenz, C.; Fotin-Mleczek, M.; Roth, G.; Becker, C.; Dam, T. C.; Verdurmen, W. P.; Brock, R.; Probst, J.; Schlake, T., Protein expression from exogenous mRNA: uptake by receptor-mediated endocytosis and trafficking via the lysosomal pathway. *RNA biology* **2011**, *8*(4), 627-36.
 111. Weissman, D.; Ni, H.; Scales, D.; Dude, A.; Capodici, J.; McGibney, K.; Abdool, A.; Isaacs, S. N.; Cannon, G.; Kariko, K., HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response. *Journal of immunology* **2000**, *165*(8), 4710-7.
 112. Fotin-Mleczek, M.; Duchardt, K. M.; Lorenz, C.; Pfeiffer, R.; Ojkić-Zrna, S.; Probst, J.; Kallen, K. J., Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* **2011**, *34*(1), 1-15.
 113. Kariko, K.; Buckstein, M.; Ni, H.; Weissman, D., Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* **2005**, *23*(2), 165-75.
 114. Hornung, V.; Ellegast, J.; Kim, S.; Brzozka, K.; Jung, A.; Kato, H.; Poeck, H.; Akira, S.; Conzelmann, K. K.; Schlee, M.; Endres, S.; Hartmann, G., 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **2006**, *314*(5801), 994-7.
 115. Kranz, L. M.; Diken, M.; Haas, H.; Kreiter, S.; Loquai, C.; Reuter, K. C.; Meng, M.; Fritz, D.; Vascotto, F.; Hefesha, H.; Grunwitz, C.; Vormehr, M.; Husemann, Y.; Selmi, A.; Kuhn, A. N.; Buck, J.; Derhovanessian, E.; Rae, R.; Attig, S.; Diekmann, J.; Jabulowsky, R. A.; Heesch, S.; Hassel, J.; Langguth, P.; Grabbe, S.; Huber, C.; Tureci, O.; Sahin, U., Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* **2016**, *534*(7607), 396-401.

116. Broos, K.; Van der Jeught, K.; Puttemans, J.; Goyvaerts, C.; Heirman, C.; Dewitte, H.; Verbeke, R.; Lentacker, I.; Thielemans, K.; Breckpot, K., Particle-mediated Intravenous Delivery of Antigen mRNA Results in Strong Antigen-specific T-cell Responses Despite the Induction of Type I Interferon. *Molecular therapy. Nucleic acids* **2016**, *5*, e326.
117. Pollard, C.; Rejman, J.; De Haes, W.; Verrier, B.; Van Gulck, E.; Naessens, T.; De Smedt, S.; Bogaert, P.; Grooten, J.; Vanham, G.; De Koker, S., Type I IFN counteracts the induction of antigen-specific immune responses by lipid-based delivery of mRNA vaccines. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2013**, *21* (1), 251-9.
118. De Beuckelaer, A.; Pollard, C.; Van Lint, S.; Roose, K.; Van Hoecke, L.; Naessens, T.; Udhayakumar, V. K.; Smet, M.; Sanders, N.; Lienenklaus, S.; Saelens, X.; Weiss, S.; Vanham, G.; Grooten, J.; De Koker, S., Type I Interferons Interfere with the Capacity of mRNA Lipoplex Vaccines to Elicit Cytolytic T Cell Responses. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2016**, *24* (11), 2012-2020.
119. Dewitte, H.; Verbeke, R.; Breckpot, K.; Vandenbroucke, R. E.; Libert, C.; De Smedt, S. C.; Lentacker, I., Choose your models wisely: how different murine bone marrow-derived dendritic cell protocols influence the success of nanoparticulate vaccines in vitro. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2014**, *195*, 138-46.
120. Gustafsson, C.; Govindarajan, S.; Minshull, J., Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in biotechnology* **2004**, *22* (7), 346-53.
121. Cannarozzi, G.; Schraudolph, N. N.; Faty, M.; von Rohr, P.; Friberg, M. T.; Roth, A. C.; Gonnet, P.; Gonnet, G.; Barral, Y., A role for codon order in translation dynamics. *Cell* **2010**, *141* (2), 355-67.
122. Thess, A.; Grund, S.; Mui, B. L.; Hope, M. J.; Baumhof, P.; Fotin-Mleczek, M.; Schlake, T., Sequence-engineered mRNA Without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2015**, *23* (9), 1456-64.
123. Zylberberg, C.; Gaskill, K.; Pasley, S.; Matosevic, S., Engineering liposomal nanoparticles for targeted gene therapy. *Gene therapy* **2017**, *24* (8), 441-452.
124. Kuznetsova, I. M.; Turoverov, K. K.; Uversky, V. N., What Macromolecular Crowding Can Do to a Protein. *International journal of molecular sciences* **2014**, *15* (12), 23090-23140.
125. Zimmerman, S. B.; Trach, S. O., Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of Escherichia coli. *Journal of molecular*

- biology* **1991**, *222* (3), 599-620.
126. Uchida, H.; Itaka, K.; Nomoto, T.; Ishii, T.; Suma, T.; Ikegami, M.; Miyata, K.; Oba, M.; Nishiyama, N.; Kataoka, K., Modulated protonation of side chain aminoethylene repeats in N-substituted polyaspartamides promotes mRNA transfection. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (35), 12396-405.
 127. Alexopoulou, L.; Holt, A. C.; Medzhitov, R.; Flavell, R. A., Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **2001**, *413* (6857), 732-8.
 128. de Bouteiller, O.; Merck, E.; Hasan, U. A.; Hubac, S.; Benguigui, B.; Trinchieri, G.; Bates, E. E.; Caux, C., Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH. *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280* (46), 38133-45.
 129. Kato, H.; Takeuchi, O.; Sato, S.; Yoneyama, M.; Yamamoto, M.; Matsui, K.; Uematsu, S.; Jung, A.; Kawai, T.; Ishii, K. J.; Yamaguchi, O.; Otsu, K.; Tsujimura, T.; Koh, C. S.; Reis e Sousa, C.; Matsuura, Y.; Fujita, T.; Akira, S., Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **2006**, *441* (7089), 101-5.
 130. Balachandran, S.; Roberts, P. C.; Brown, L. E.; Truong, H.; Pattnaik, A. K.; Archer, D. R.; Barber, G. N., Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity* **2000**, *13* (1), 129-41.
 131. Zhou, A.; Hassel, B. A.; Silverman, R. H., Expression cloning of 2'5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* **1993**, *72* (5), 753-65.
 132. Li, Y.; Banerjee, S.; Wang, Y.; Goldstein, S. A.; Dong, B.; Gaughan, C.; Silverman, R. H.; Weiss, S. R., Activation of RNase L is dependent on OAS3 expression during infection with diverse human viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**, *113* (8), 2241-6.
 133. Pichlmair, A.; Reis e Sousa, C., Innate recognition of viruses. *Immunity* **2007**, *27* (3), 370-83.
 134. Lu, B.; Nakamura, T.; Inouye, K.; Li, J.; Tang, Y.; Lundback, P.; Valdes-Ferrer, S. I.; Olofsson, P. S.; Kalb, T.; Roth, J.; Zou, Y.; Erlandsson-Harris, H.; Yang, H.; Ting, J. P.; Wang, H.; Andersson, U.; Antoine, D. J.; Chavan, S. S.; Hotamisligil, G. S.; Tracey, K. J., Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* **2012**, *488* (7413), 670-4.
 135. Schneider, W. M.; Chevillotte, M. D.; Rice, C. M., Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual review of immunology* **2014**, *32*, 513-45.

136. Tsukamoto, H.; Fujieda, K.; Senju, S.; Ikeda, T.; Oshiumi, H.; Nishimura, Y., Immune-suppressive effects of interleukin-6 on T-cell-mediated anti-tumor immunity. *Cancer science* **2017**.
137. Cekic, C.; Casella, C. R.; Eaves, C. A.; Matsuzawa, A.; Ichijo, H.; Mitchell, T. C., Selective activation of the p38 MAPK pathway by synthetic monophosphoryl lipid A. *The Journal of biological chemistry* **2009**, *284* (46), 31982-91.
138. Duthie, M. S.; Windish, H. P.; Fox, C. B.; Reed, S. G., Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunological reviews* **2011**, *239* (1), 178-96.
139. Salaun, B.; Romero, P.; Lebecque, S., Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *European journal of immunology* **2007**, *37* (12), 3311-8.

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、本研究を遂行する機会を与えて頂き、またマンスリーディスカッション・実験セミナー等、多くの場面で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、日々多大なる御指導御教示、及び千葉大学での実験環境や研究室立ち上げという貴重な体験を賜りました、千葉大学大学院薬学研究院 薬物学研究室教授・秋田英万先生に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、有益な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准教授・山田勇磨先生、同助教・中村孝司先生、同・佐藤悠介先生、ならびに北海道大学大学院薬学研究院 未来創剤学研究室特任助教、櫻井遊先生に心より感謝申し上げます。また、現在は他の場所でご活躍されておりますが、在籍時には多くの御指導を頂きました、元特任准教授・梶本和昭先生、元特任助教・兵藤守先生、同・畠山浩人先生、同・林泰弘先生に深く感謝申し上げます。

本論文を審査して頂くと同時に、その広い見識から貴重な議論を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 生体分析化学研究室教授・小川美香子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、実験系の構築に多大なる御助力を賜りました、三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学教授・珠玖洋先生、同准教授・原田直純先生、元助教・村岡大輔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、有益な御指導御助言と千葉大学における実験環境を賜りました、千葉大学大学院薬学研究院 薬物学研究室准教授・小林カオル先生、千葉大学大学院医学研究院 薬理学研究室助教・降幡知己先生に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、数多くの日々のディスカッションを通して多くの有意義な示唆を与えて下さり、また千葉大学において研究を進める中でも多大なるサポートを頂きました、千葉大学大学院薬学研究院 薬物学研究室特任助教・田中浩揮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、在籍時には同じ秋田英万先生の下で、数多くの深く有意義なディスカッションを頂き、また快適な研究環境を提供して頂いた、北海道大学大学院薬学研究

院 薬剤分子設計学研究室 富樫亮平博士、Sarochin Santiwarangkool 博士、West Paraiso 博士、渡辺綾香修士、清水那由多学士、河合美典学士に心より感謝申し上げます。

既に卒業されてしまいましたが、学部 1 年半、修士 2 年間の 3 年半の研究生活を送るにあたって、様々な面で支えていただき、また唯一無二の同期として楽しい研究生活を送らせて頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室、末光永理奈修士、鈴木嘉晃修士、田端麻衣修士、村田真那美修士、佐々木駿学士、宮部寛子学士に心より感謝申し上げます。

研究室生活を終えてなお、親交を深めて頂いた、野口裕生修士、黒井萌花学士、中谷太一修士、福田豊修士、松井秀樹修士、前田滯修士に心より感謝申し上げます。

博士後期課程 2 年次から千葉大学において研究活動をおこなうにあたり、秋田英万先生の下、共に研究に邁進し、楽しい研究環境を築いてくださいました、千葉大学大学院薬学研究院薬物学研究室、大東昂良学士、白根大貴学士、舘下菜穂学士、小西真奈美さん、五味昌樹くん、高橋達成くん、高田奈依さんに心より感謝申し上げます。

研究生活を送る上で様々なご協力を頂き、有意義で楽しい日々を送らせて頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室、並びに千葉大学大学院薬学研究院 薬物学研究室の皆様心から感謝申し上げます。

最後になりましたが、これまで私を支えて下さった両親、妻、ならびに友人達に心より感謝申し上げます。

2018 年 3 月 三浦尚也