

新規アジュバントとしての TLR7 リガンド・ 糖鎖固定化金ナノ粒子の開発

山口 徹¹⁾, 新地 浩之¹⁾, 諸石 寿朗^{2,3,4)}, 若尾 雅広¹⁾, 林 公子⁵⁾,
Cottam B. Howard⁵⁾, Carson A. Dennis⁵⁾, 隅田 泰生^{1,6)}

¹⁾鹿児島大学大学院理工学研究科, ²⁾熊本大学大学院生命科学研究部分子酵素化学講座,
³⁾同 生命科学研究部附属健康長寿代謝制御研究センター, ⁴⁾国立研究開発法人科学技術振興機構さきがけ,
⁵⁾Moores Cancer Center, University of California, San Diego, ⁶⁾(株) スディックスバイオテック

Development of Toll-like receptor 7 ligand and sugar chain immobilized gold nanoparticles for vaccine adjuvant and immunotherapy

Toru Yamaguchi¹⁾, Hiroyuki Shinchi¹⁾, Toshiro Moroishi^{2,3,4)}, Masahiro Wakao¹⁾, Tomoko Hayashi⁵⁾,
Howard B. Cottam⁵⁾, Dennis A. Carson⁵⁾, Yasuo Suda^{1,6)}

¹⁾Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University

²⁾Department of Molecular Enzymology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

³⁾Center for Metabolic Regulation of Healthy Aging, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

⁴⁾Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Agency (JST)

⁵⁾Moores Cancer Center, University of California, San Diego

⁶⁾SUDx-Biotech, Corporation

Abstract

Adjuvants enhance immune system during vaccination. Among FDA-approved adjuvants, aluminum salts are most commonly used for vaccines. Although aluminum salts enhance antibody production, they show a limited effect for the cell-mediated immune response. Thus, further development of adjuvants inducing T cell mediated immuno-responses are demanded. Toll-like receptors (TLRs) are immune-related receptors that recognize specific pathogen-associated molecular patterns and play important roles in the activation of innate immunity, which is crucial to shape adaptive immunity. Studies using TLR ligands as novel adjuvants for anti-microbial and anti-cancer immunotherapies have therefore attracted much attention. Among them, a low molecular weight TLR7 ligand, Imiquimod, has been approved for clinical use, but its use is restricted only for local administration due to unwanted adverse effects. Since TLR7 is mainly located in the endosomal compartment of immune cells, efficient transport of the ligand into the cell is important for activating TLR7. Our previous work indicated that the conjugation of a low molecular weight TLR7 ligand with serum albumin and polysaccharides can greatly enhance its potency. In this study, we examined gold nanoparticles (GNPs) as carriers, as GNPs are less toxic and can immobilize multiple molecules including antigens for pathogens and tumors. Furthermore, α -mannose for targeting antigen presenting cells was also examined for the efficient delivery of GNPs. In this paper, we describe preparation of a low molecular weight TLR7 ligand and α -mannose immobilized GNPs and its *in vitro* and *in vivo* immunostimulatory activities.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 35~39, 2019

Key words : アジュバント, Toll 様受容体, 金ナノ粒子, C 型レクチン, 自然免疫

はじめに

アジュバントは、ワクチン抗原とともに投与し、その効果を増強する目的で使用される物質（免疫増強剤）の

総称である。ワクチンによる獲得免疫の誘導には、抗原分子の投与のみでは不十分な場合が多く、その免疫原性を増強するためにアジュバントがしばしば使用される。近年では、自身の免疫系を活性化させることでがんなど

の疾患を治療する免疫療法にもアジュバントが使用されるようになり、その応用範囲が拡大している。一方、アジュバントとして最も臨床利用されているアルミニウム塩類は、液性免疫を増強するが細胞性免疫の誘導能が低いいため、免疫増強活性が十分に高くない。そのため、新たな効果的なアジュバントの開発が求められており、自然免疫を活性化する Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) のリガンドが注目されている。

TLR は、膜貫通型パターン認識レセプターの種類で、ウイルスや細菌などの病原体に特有の分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を認識する。ヒトでは 10 種類が同定されており、病原体の感染を察知するセンサーとして働く。樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞をはじめとする免疫細胞に多く発現し、それぞれ異なる PAMPs を認識する。TLR に PAMPs が結合し、シグナル伝達が始まると、炎症性サイトカインや I 型インターフェロンなどが産生され、自然免疫が活性化される。その後、獲得免疫の誘導が促進されることから、TLR は宿主の生体防御機構において重要な役割を担っている。

現在までにいくつかの TLR リガンドの臨床利用が認可されている。例えば、TLR4 リガンドのモノホスホリルリポド A は、アルミニウム塩に吸着させた混合アジュバントとして子宮頸がんのワクチンアジュバントに利用されている。また、TLR7 の合成低分子リガンドであるイミキモドは、尖圭コンジローマや皮膚悪性黒色腫の治療薬として利用されている。この他にも種々の TLR リガンドの臨床研究が行われており、感染症やがんに対するワクチンや免疫療法のアジュバントとしての利用が期待されている¹²⁾。本稿では、TLR7 リガンドに焦点をあて、最近の研究について紹介する。

1. TLR7 リガンド

TLR7 は、細胞内のエンドソームに局在し、ウイルス特有の 1 本鎖 RNA を選択的に認識する。また、イミダゾキノリン様骨格やプリン様骨格を有する低分子化合物も認識する³⁾。低分子化合物に関しては、これまでに構造活性相関が明らかにされており、イミキモドをはじめ、レシキモド (R848) や Gardiquimod, 852A などの種々の合成低分子リガンドが開発されている。TLR7 にリガンド分子が結合すると I 型インターフェロンの産生が促進されることから、抗ウイルス薬やがん免疫療法のアジュバントとしての臨床研究が行われている。一方、合成低分子 TLR7 リガンドの多くは、全身投与すると血流で急速に拡散されるため、サイトカイン放出症候群などの重篤な副作用を引き起こす危険性がある。したがって、その利用法は局所投与に制限される。TLR7 は主に免疫細胞内のエンドソームに局在するため、TLR7 リガンドの効力を強くするためには、エンドサイトーシスに

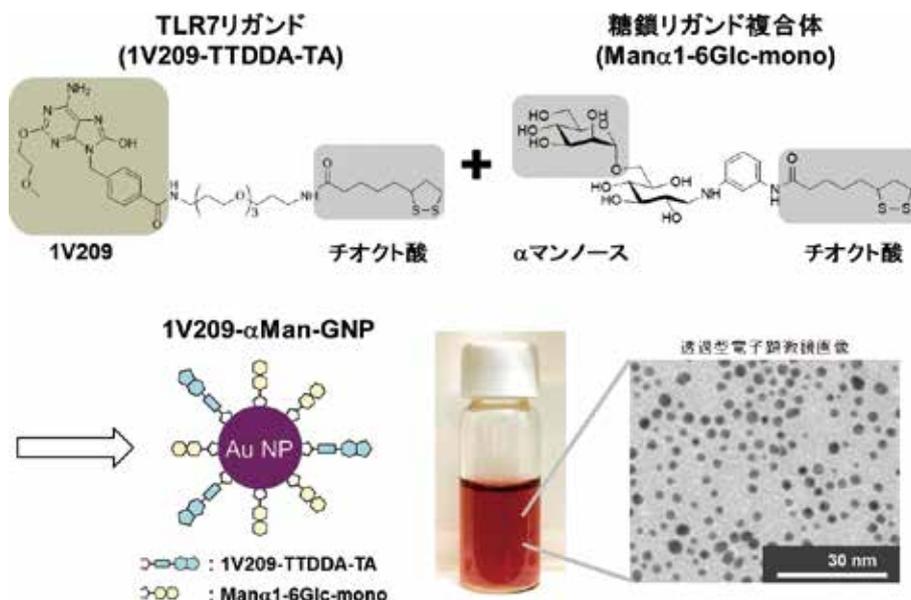
よりリガンド分子を免疫細胞内に効率的に輸送する必要がある。そこで、合成低分子 TLR7 リガンドをタンパク質や多糖類、ポリマー、ナノ粒子などの巨大分子と複合化することで薬物動態を改善し、免疫増強活性を向上させる研究が行われている⁴⁾。われわれはこれまでに、プリン様骨格を有する低分子 TLR7 リガンド (1V209) を開発し、血清アルブミンやデキストランなどに複合化することで、*in vitro* および *in vivo* での免疫増強活性が 10~10³ 倍向上したことを報告している^{5,6)}。

2. TLR7 リガンド・糖鎖固定化金ナノ粒子

われわれは最近、合成低分子 TLR7 リガンドのキャリア分子に金ナノ粒子 (Gold Nanoparticle : GNP) を用いた新規アジュバントを開発したので紹介する⁷⁾。GNP は、化学的に安定で、特徴的な光学的特性を持つ直径数 nm~数百 nm のナノ粒子である。GNP 表面はチオール基を有する機能性分子や生体分子を簡便に固定化できるため、バイオセンサーや診断薬などへの応用研究が展開されている⁸⁾。また、バイオイメージングや光線力学療法⁹⁾、ドラッグデリバリー¹⁰⁾など、医療分野での応用も検討されており、生体に対しても安全だと考えられている¹¹⁾。さらにわれわれは、GNP を免疫細胞に選択的に輸送するための分子として糖鎖を使用した。すなわち、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞表層には、外来異物を捕捉するためのマンノース受容体やマクロファージガラクトースレクチンなどの C 型レクチン受容体¹²⁾が発現しているため、これらに結合する糖鎖を TLR7 リガンドとともに GNP 表面に固定化することで、抗原提示細胞の細胞内に効率的に輸送できるようになると考えた。本稿では、合成低分子 TLR7 リガンドと糖鎖成分の α マンノース (α Man) を共固定化した GNP の調製と *in vitro* および *in vivo* での免疫増強作用について紹介する。

2-1. 1V209- α Man-GNP の調製

合成低分子 TLR7 リガンドには、1V209 を用いた⁵⁾。1V209 を GNP 表面に固定化するために、4,7,10-トリオキサ-1,13-トリデカンジアミン (TTDDA) を介してチオクト酸を修飾した 1V209 誘導体 (1V209-TTDDA-TA) を合成した。1V209- α Man-SGNP の合成は既報¹³⁾を参考にした。1V209 誘導体と α マンノースを有するリガンド複合体 (Man α 1-6Glc-mono) のモル比が 1 : 9 になるように混合し、GNP 表面に共固定化した (図 1)。得られた 1V209- α Man-GNP は、透析 (Spectra/Por[®] 3, 分画分子量 : 3,500) により精製した。1V209- α Man-GNP に固定化された 1V209-TTDDA-TA および Man α 1-6Glc-mono を定量したところ、1 : 19 のモル比で固定化されていた。1V209- α Man-GNP の水溶液中での平均粒径を動的散乱 (DLS) 法により測定したところ、 9.4 ± 2.1 nm

図 1 1V209- α Man-GNP の調製

であった。これは、透過型電子顕微鏡 (TEM) で測定した粒径 (平均粒径 4.4 ± 1.3 nm) と類似しており、水溶液中で単一の粒子として分散していると考えられる。

2-2. 1V209- α Man-GNP の *in vitro* での免疫増強活性

In vitro での免疫増強活性をマウス骨髄由来樹状細胞 (Bone marrow-derived Dendritic cell : BMDC), マウスマクロファージ細胞株 J774A.1 細胞, ヒト末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cell : PBMC) の 3 種類を用いて評価した。1V209- α Man-GNP の存在下で細胞を 18 時間培養後, 培養上清中に産生されたサイトカインを ELISA 法で定量し, サイトカイン産生能を評価した。

マウス BMDC を用いてインターロイキン-6 (Interleukin-6 : IL-6) の産生能を評価したところ, GNP に固定化した 1V209 誘導体の濃度依存的な IL-6 の産生が観察され, 1V209 誘導体単体に比べて 50% 効果濃度が約 6 倍低かった。1V209 誘導体を固定化していない α Man-GNP では IL-6 が産生されなかったことから, GNP に固定化した 1V209 誘導体によって IL-6 の産生が誘導されたと考えられる (図 2A)。また 1V209- α Man-GNP の細胞毒性を MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) アッセイにより評価したところ, 1V209 誘導体の濃度に依存的な細胞死は観察されなかったことから, 細胞障害性の低いアジュバントと考えられる (図 2B)。

次に, J774A.1 細胞を用いて IL-6 の産生能を評価した。その結果, 1V209 誘導体に比べて IL-6 の産生能が著しく低下した (図 2C)。これは, 未分化の J774A.1 細胞

はマンノース受容体の発現量が非常に少ないため¹⁴⁾, マンノース受容体を介した 1V209- α Man-GNP の取り込みが起こらず, TLR7 を活性化できないためだと考えられる。したがって, TLR7 の活性化には, 1V209- α Man-GNP がマンノース受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞内に移行することが重要だと考えられる。

続いて, ヒト PBMC に対する腫瘍壊死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α : TNF- α) の産生能を評価した。その結果, 1V209 誘導体に比べて, より低濃度で TNF- α の産生が誘導された (図 2D)。したがって, 1V209- α Man-GNP は, ヒト細胞においても高いサイトカイン産生能を有することが示唆された。

2-3. 1V209- α Man-GNP の *in vivo* でのアジュバント活性

In vivo での免疫増強活性を C57BL/6 マウスを用いて評価した。0 日目と 14 日目に, モデルタンパク質抗原のオボアルブミン (Ovalbumin : OVA) と, アジュバントとなる 1V209- α Man-GNP をマウス尾部に皮内投与した。その後, 免疫 38 日目に眼窩静脈叢より採血し, 血中の OVA に対する IgG1 抗体と IgG2c 抗体の産生価を評価した。その結果, 1V209 単体に比べて IgG2c 抗体の産生価が 10^3 倍以上高かったことから, 細胞性免疫の誘導能が高いことが示唆された (図 3)。これは, これまでに開発した 1V209 とデキストランの複合体 (1V209-dextran)⁶⁾ と同様の結果であったが, 免疫 38 日目のマウスの体重に対する脾臓の重さの割合を比較したところ, 1V209-dextran を投与したマウスでは脾臓が腫大していた一方で, 1V209- α Man-GNP ではほとんど変化がなかった。以上から, 1V209- α Man-GNP は, B 細胞増加

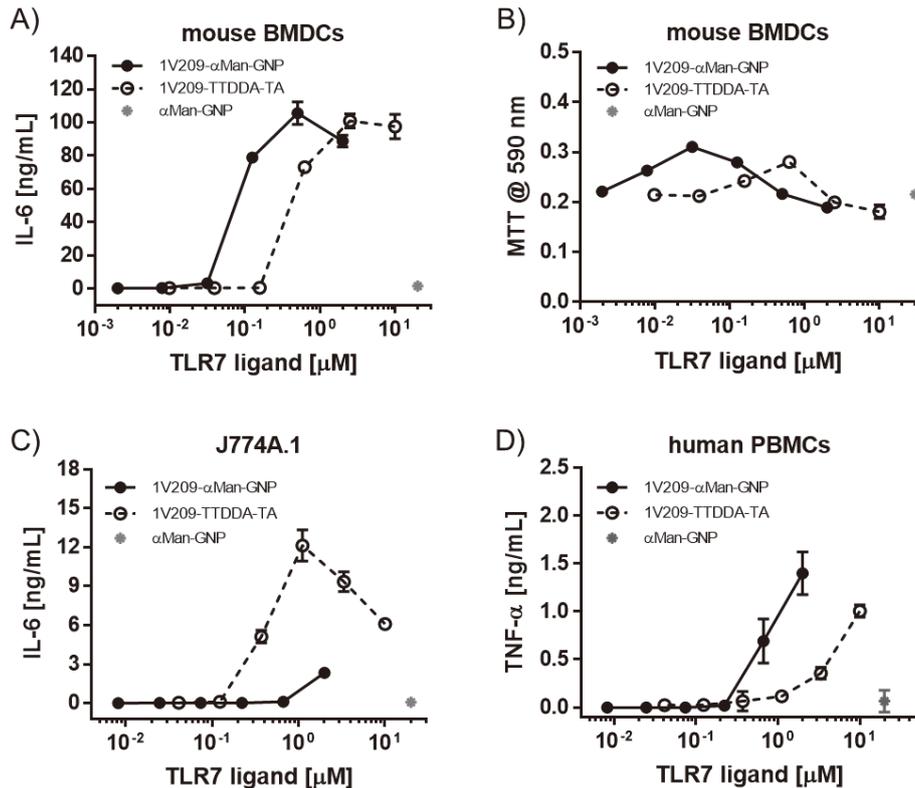


図 2 1V209- α Man-GNP の *in vitro* での免疫増強活性と細胞毒性

1V209- α Man-GNP または 1V209-TTDDA-TA の存在下で 18 時間培養後、培養上清中に産生されたサイトカイン (A) マウス BMDC より産生された IL-6 の産生量、B) マウス BMDC の MTT アッセイ、C) J774A.1 細胞より産生された IL-6 の産生量、D) ヒト PBMC より産生された TNF- α の産生量。すべての結果は 3 回の独立した実験の平均値と標準偏差を示す。

などの過剰な免疫応答を起こさない効果的なアジュバントであることが示された。

おわりに

本稿では、TLR7 リガンドに焦点をあて、最近の研究について紹介した。われわれが合成低分子 TLR7 リガンドのキャリアに用いた GNP は、チオール基を有するさまざまな分子を簡便に固定化できることが特徴である。抗原分子とアジュバント化合物が単一の分子に修飾されているとワクチン効果が向上することが報告されていることから、TLR リガンドだけでなく、多様な分子を共固定化できる GNP は、さまざまな疾患に対するワクチン開発のための有力な分子基盤になると期待できる。また、1V209- α Man-GNP は高い免疫増強作用を有することから、免疫療法のためのアジュバントとしての利用など、さまざまな応用が期待できる。

謝辞

本研究の一部は、「[「知」の集積と活用場による研究開発モデル事業]」、「JSPS 科研費若手研究 (B) (17K17968)」、「公

益財団法人米盛誠心育成会研究助成事業]」、「JST さきがけ (JPMJPR17HA)」の御支援を受けて行われました。

文献

- 1) Dowling JK, Mansell A : Toll-like receptors : the swiss army knife of immunity and vaccine development. Clin Transl Immunology 5 : e85, 2016
- 2) Smith M, Garcia-Martinez E, Pitter MR, et al. : Trial Watch : Toll-like receptor agonists in cancer immunotherapy. Oncoimmunology 7 : e1526250, 2018
- 3) Zhang Z, Ohto U, Shibata T, et al. : Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. Immunity 45 : 737-748, 2016
- 4) Ignacio BJ, Albin TJ, Esser-Kahn AP, et al. : Toll-like Receptor Agonist Conjugation : A Chemical Perspective. Bioconjug Chem 29 : 587-603, 2018
- 5) Chan M, Hayashi T, Kuy CS, et al. : Synthesis and immunological characterization of toll-like receptor 7 agonistic conjugates. Bioconjug Chem 20 : 1194-1200,

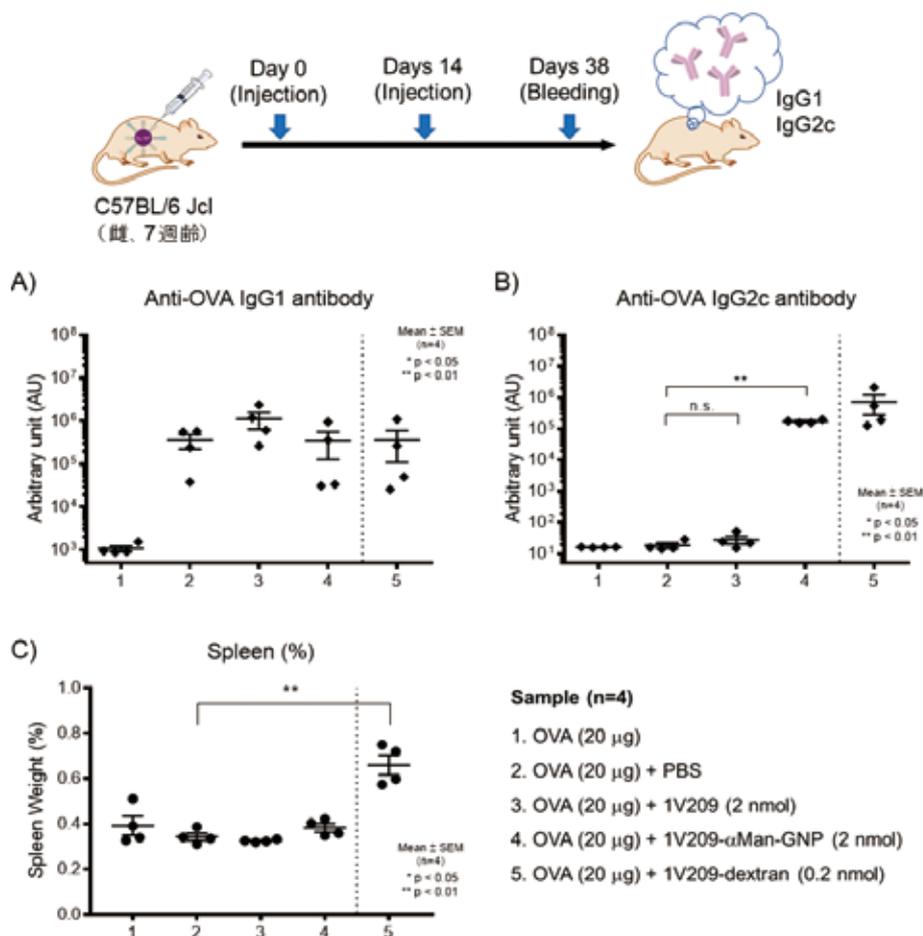


図 3 1V209- α Man-GNP の *in vivo* でのアジュバント活性と毒性

OVA (20 μ g) と 1V209- α Man-GNP (2 nmol), 1V209 (2 nmol), または, 1V209-dextran (0.2 nmol) を C57BL/6 マウスの尾部に皮内投与し, 38 日後の A) 抗 OVA IgG1 抗体の産生価, B) 抗 OVA IgG2c 抗体の産生価, C) マウスの体重に対する脾臓の割合。

2009

- 6) Shinchi H, Crain B, Yao S, et al. : Enhancement of the Immunostimulatory Activity of a TLR7 Ligand by Conjugation to Polysaccharides. *Bioconj Chem* 26 : 1713-1723, 2015
- 7) Shinchi H, Yamaguchi T, Moroishi T, et al. : Gold nanoparticles coimmobilized with small molecule toll-like receptor 7 ligand and α -mannose as adjuvants. *Bioconj Chem*, 2019 (doi : 10.1021/acs.bioconjchem.9600560)
- 8) Saha K, Agasti SS, Kim C, et al. : Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chem Rev* 112 : 2739-2779, 2012
- 9) Libutti SK, Paciotti GF, Byrnes AA, et al. : Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clin Cancer Res* 16 : 6139-6149, 2010
- 10) Koonce NA, Quick CM, Hardee ME, et al. : Combination

of Gold Nanoparticle-Conjugated Tumor Necrosis Factor- α and Radiation Therapy Results in a Synergistic Antitumor Response in Murine Carcinoma Models. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 93 : 588-596, 2015

- 11) Yang X, Yang M, Pang B, et al. : Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine. *Chem Rev* 115 : 10410-10488, 2015
- 12) Geijtenbeek TB, Gringhuis SI : C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 16 : 433-448, 2016
- 13) Nakamura-Tsuruta S, Kishimoto Y, Nishimura T, et al. : One-step purification of lectins from banana pulp using sugar-immobilized gold nano-particles. *J Biochem* 143 : 833-839, 2008
- 14) Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al. : The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25 : 677-686, 2004