

抗原提示細胞表層のC型レクチン受容体を標的とする糖鎖を用いたドラッグデリバリーシステム

新地 浩之¹, 若尾 雅広¹, 隅田 泰生²

1. はじめに

樹状細胞 (dendritic cells : DCs) やマクロファージをはじめとする抗原提示細胞 (antigen presenting cells : APCs) は, 自然免疫および獲得免疫の誘導と制御に中心的な役割を果たす免疫担当細胞である. 近年, 有効性の高いワクチンやがん免疫療法を開発するために, APCsを標的とした抗原分子やアジュバント分子 (免疫賦活剤) の選択的な輸送システムが活発に研究されている. その中でも, 糖鎖認識受容体であるC型レクチン受容体 (C-type lectin receptors : CLR) を標的とする戦略は, 効率的に獲得免疫を誘導するための有望な戦略である. 本稿では, CLRを標的とした選択的輸送を実現するための糖鎖を利用した輸送システムについて, 著者らの報告も含めて概説する.

2. C型レクチン受容体 (CLR) s

CLRは, 細胞外領域に糖鎖認識ドメインを有するカルシウム (Ca^{2+}) 依存性の膜貫通型タンパク質である¹⁾. Dectin-1 (CD205) やマンノース受容体 (mannose receptor : MR/CD206), Langerin (CD207), DC-SIGN (CD209), マクロファージガラクトースレクチン (macrophage galactose lectin : MGL/CD301) などがあり, 糖鎖を介して受容体に結合した分子をエンドサイトーシスによって細胞内

に輸送する働きを持っている (表1). これらのCLRは, APCsに多く発現し, 細胞種ごとに発現が異なる²⁾. それぞれのCLRが認識する糖鎖構造も異なっており, たとえばMRは, 細菌や酵母などの細胞壁上に存在するマンノースやフコース, *N*-アセチルグルコサミンなどの糖分子を認識する. 一方, DC-SIGNは, ウイルスや酵母などに存在する分岐した高マンノース型糖鎖やルイス型糖鎖, フコース含有糖鎖を認識する. MGLは, MRやDC-SIGNとは異なり, 非還元末端にガラクトースや*N*-アセチルガラクトサミンを含有する糖鎖構造を認識する. CLRは, 外来微生物の捕捉だけでなく, 獲得免疫の誘導にも深く関与し, APCsの活性化や抗原分子のプロセッシング, MHCクラスIおよびクラスII分子への抗原提示を促進する. そのため, 抗原分子やアジュバント分子をAPCs選択的に輸送し, 効率的に免疫応答を誘導するための有望な標的として考えられている.

3. CLRを標的とした糖鎖による抗原分子・アジュバント分子の選択的輸送

CLRを標的とした抗原分子・アジュバント分子の選択的輸送を行うために, 糖鎖が高密度に修飾されたキャリア分子や, 抗原分子・アジュバント分子に糖鎖を高密度に修飾する設計が考えられている³⁾. 糖鎖1分子と糖鎖認識受容体との結合親和性は, 抗体などのタンパク質どうしの結合親和性に比べて一般的に弱い (K_d 値: mM~ μ M). 多くのCLRはオリゴマーとして存在しており, 生体内に存在する糖鎖が相互作用する場合, 密集して相互作用することで多価効果 (クラスター効果) が発揮され, 見かけの親和性が向上する⁴⁾. そのため, 抗原分子やアジュバント分子のCLR選択的輸送では, 糖鎖を高密度に修飾したデンドリマー⁵⁾, リポソーム^{6,7)}, ナノ粒子^{8,9)}などのナノ材料がキャリアとして利用されている (図1). García-Vallejoら⁵⁾は, Lewis B修飾デンドリマーを用いたDC-SIGN選択的ペプチド抗原の選択的輸送システムを構築している. これによって, ペプチド抗原に特異的なCD4陽性およびCD8陽性T細胞の誘導活性が向上し, ペプチドワクチンを開発するための優れたプラットフォームになることを報告している. また, Moignicら⁶⁾は, 腫瘍抗原をコードす

¹ 鹿児島大学大学院理工学研究科工学専攻化学生命工学プログラム (〒890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元1-21-40)

² 鹿児島大学大学院理工学研究科糖鎖ナノテクノロジー共同研究講座 (〒890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元1-21-40)

Sugar chain based drug delivery system for targeting C-type lectin receptors on antigen presenting cells

Hiroyuki Shinchi¹, Masahiro Wakao¹ and Yasuo Suda² (¹Department of Engineering, Chemistry and Biotechnology Program, Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Korimoto 1-21-40, Kagoshima, Kagoshima 890-0065, Japan, ²Collaborative Research Laboratory on Glyco-nanotechnology, Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Korimoto 1-21-40, Kagoshima, Kagoshima 890-0065, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載.

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950645

© 2023 公益社団法人日本生化学会

表1 免疫細胞表面に発現する CLR とそれらが認識する糖鎖の構造 (Geijtenbeek らの文献²⁾ を参考に著者が一部改変)

CLR s	発現細胞	結合糖鎖
Dectin-1 (CD205)	DCs, 単球, マクロファージ, B細胞	β -1,3-グルカン
MR (CD206)	DCs, M2 マクロファージ	マンノース, フコース, N-アセチルグルコサミン含有糖鎖
Langerin (CD207)	ランゲルハンス細胞, Dermal DCs	高マンノース型糖鎖, ルイス Y 糖鎖, ルイス B 糖鎖, N-アセチルグルコサミン
DC-SIGN (CD209)	DCs, マクロファージ	分岐高マンノース型糖鎖, フコース含有糖鎖, ルイス型糖鎖
MGL (CD301)	DCs, マクロファージ	末端 N-アセチルガラクトサミン, Tn 抗原
Mincle (CLEC4E)	DCs, マクロファージ, 好中球, 単球	トレハロースジミコール酸, β -グルコシルセラミド (糖脂質)
Dectin-2 (CLEC6A)	DCs, マクロファージ, 好中球, 単球	α -1,2-マンノース, リポアラビノマンナン

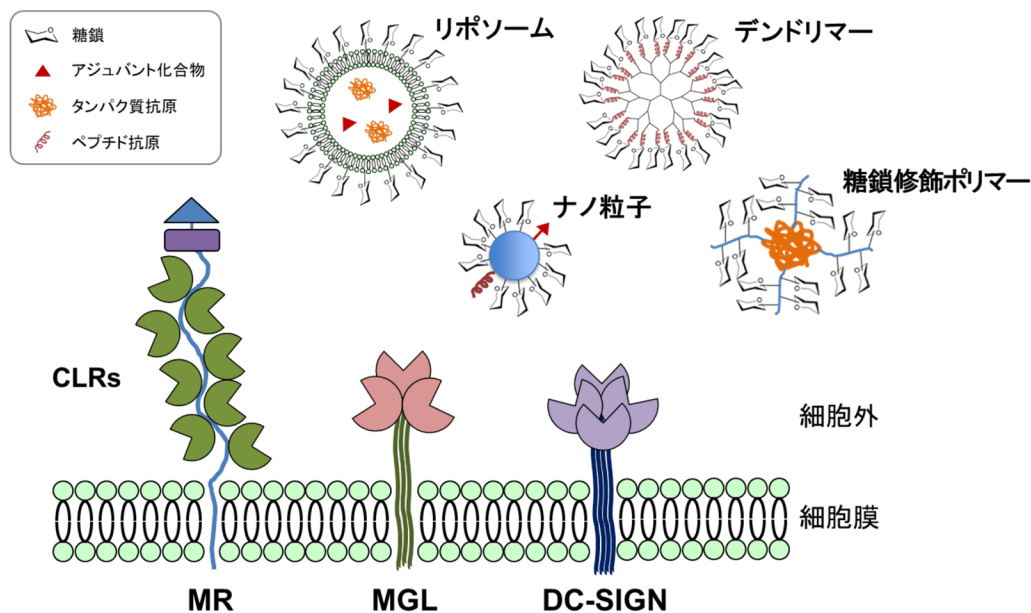


図1 抗原提示細胞表面の CLR s を標的とした糖鎖によるドラッグデリバリーシステムの概要

抗原分子やアジュバント分子の CLR s 選択的な輸送では、糖鎖を高密度に修飾したデンドリマー、リポソーム、ナノ粒子などのナノ材料がキャリアとして利用されている。また、抗原分子・アジュバント分子に糖鎖担持ポリマー等を修飾する設計も検討されている。

る合成 mRNA をマンノース含有糖脂質で修飾した脂質ナノ粒子に内包し、DCs に発現する DC-SIGN および Langerin を標的とした輸送システムを構築している。腫瘍抗原を内包したマンノース修飾脂質ナノ粒子は、マンノースの修飾密度が高いほど DC-SIGN 発現および Langerin 発現細胞への細胞内移行性が高く、抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導活性および腫瘍増大抑制効果も向上することを実証している。一方、抗原分子やアジュバント分子にポリマーや多糖類を用いて高密度に糖鎖を修飾する方法も有効である。Wilson ら¹⁰⁾ は、マンノースおよびアジュバントとなる合成低分子 TLR7 リガンドを担持したランダム共重合ポリマーをタンパク質抗原に修飾し、DCs に発現する MR を標的とする輸送システムを構築している。これによって、DCs へのタンパク質抗原およびアジュバント分子の MR 依存的な取り込みが促進され、効率的に抗原特異的な液性免

疫および細胞性免疫が誘導される。タンパク質抗原やアジュバント分子に短い糖鎖を直接修飾する場合、修飾部位に限られるため CLR s への十分な結合親和性を得ることが難しいが、ポリマーや多糖類を用いることでより高密度に糖鎖を修飾できるため、CLR s への結合親和性を飛躍的に高めることができると考えられる。

4. 糖鎖固定化金ナノ粒子をキャリアに用いた合成低分子 TLR7 リガンドの選択的輸送

著者らは、糖鎖を固定化した金ナノ粒子 (sugar chain-immobilized gold nanoparticles: SGNPs) をキャリアに用いた合成低分子 Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) 7 リガンドの輸送システムを構築した¹¹⁻¹³⁾。

TLRs は、ウイルスや細菌などの病原体関連分子パター

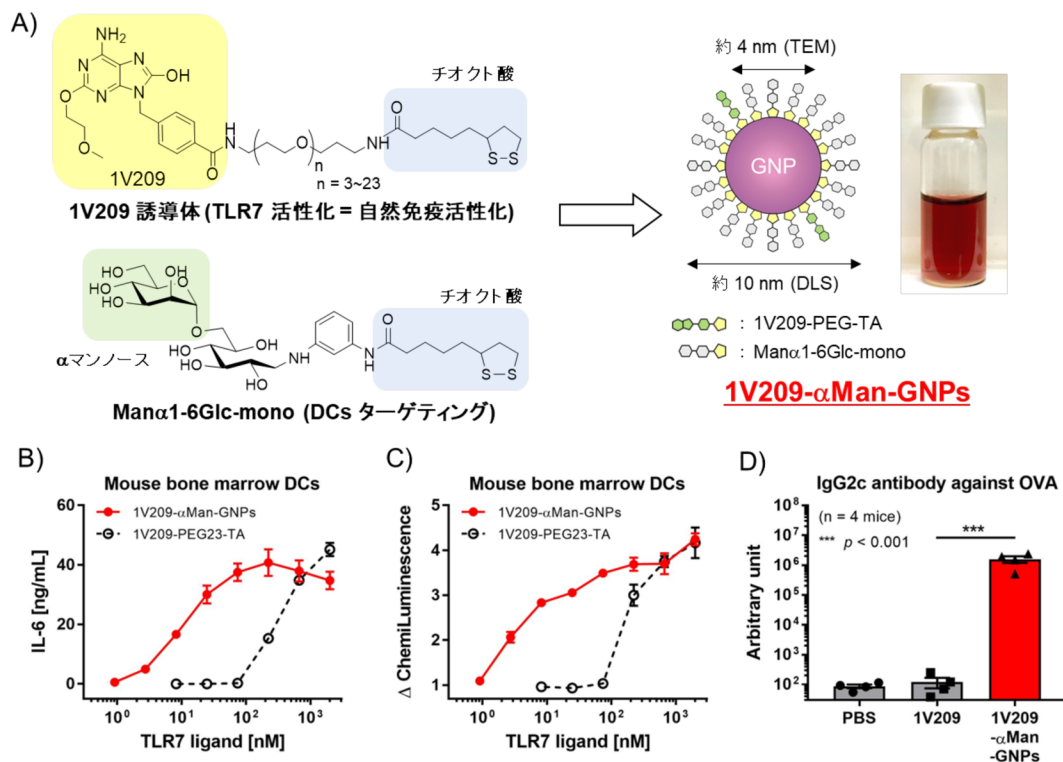


図2 1V209- α Man-GNPsのデザインと生物活性

(A) 1V209誘導体およびMan α 1-6Glc-monoを1:9の混合モル比で調製した1V209- α Man-GNPsのデザイン。(B) 1V209- α Man-GNPsの存在下でマウス骨髄由来DCsを18時間培養後に培養上清に産生されたIL-6。IL-6の産生量はELISAで定量した。(C) (B)と同様の方法でマウス骨髄由来DCsを培養後に培養上清に産生されたI型IFN。I型IFNの産生量は、ISRE-L929細胞を用いたレポーターアッセイで評価した。(D) OVA (20 μ g) と1V209- α Man-GNPs (1V209 0.05 nmol, 1V209誘導体には1V209-PEG23-TAを用いた) を、0, 14日目にC57BL/6マウスの尾部皮下に共投与し、免疫開始35日後に回収した血清中のOVA特異的なIgG2c抗体の抗体価。OVA特異的な抗体価はELISAで評価した (n=4匹)。

ンを認識し、病原体の感染を察知するセンサーとして働く。APCsをはじめとする免疫担当細胞に多く発現し、ヒトでは10種類が同定されている。TLRsに特定の病原体関連分子が結合すると、炎症性サイトカインやI型インターフェロン (interferon: IFN) などが産生され、自然免疫が誘導される。自然免疫の活性化は、獲得免疫の誘導にも寄与するため、TLRは宿主防御の最前線としてきわめて重要な役割を担う。近年、TLRを活性化するリガンド分子を、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に利用することが検討されている¹⁴⁾。その中でも、細胞内のエンドソームに局在するTLR7を活性化するリガンド分子が、抗ウイルス免疫や抗腫瘍免疫に重要なI型IFNの産生を促進することから特に有望視されており、多くの合成低分子リガンドが開発されている。しかし、合成低分子TLR7リガンドは、全身投与すると血中で拡散してサイトカイン放出症候群のような致命的な副反応を誘発する恐れがある。したがって、その利用は皮膚への局所投与に限定されている。APCs選択的にTLR7を活性化すれば、副反応を回避し、TLR7リガンドの薬効を最大限利用できると

考えられる。そこで我々は、合成低分子TLR7リガンドのキャリアにSGNPsを用いて、APCsのCLRsを標的とした選択的輸送を検討した。

SGNPsのコアである金ナノ粒子 (gold nanoparticles: GNPs) は、毒性がきわめて低く、生体安定性が高い。GNPsの表面は、チオール基と強く結合する性質があり、チオール基を有するリンカー分子を用いれば、簡便かつ高密度に生体分子を固定化できる。また、複数の生体分子を共固定化することもでき、ドラッグデリバリーシステムのキャリアとしての臨床研究が行われている¹⁵⁾。著者らは、APCsの中でもDCsに豊富に発現するMRを標的として、 α -マンノースを固定化したGNPsをキャリアに用いた合成低分子リガンドの選択的輸送を検討した。合成低分子TLR7リガンドには、1V209を用い、ポリエチレングリコール鎖からなるスペーサーを介してチオクト酸を修飾した^{11, 13)}。1V209誘導体は、チオクト酸を修飾した α -マンノース (Man α 1-6Glc-mono) とともに1:9の混合モル比でGNPs表面に固定化し、リン酸生理緩衝液中で単一粒子として安定に分散するナノ粒子 (1V209- α Man-GNPs) を

合成した (図2A)。

細胞レベルでの1V209- α Man-GNPsの免疫賦活活性を、マウス骨髄由来DCsを用いて評価したところ、IL-6およびI型IFNの誘導活性は、1V209誘導体単体と比べて10~100倍向上した (図2B, C)。一方、MRを発現しないマクロファージ細胞株のJ774A.1細胞では、IL-6の誘導活性は1V209誘導体単体と比べて大きく低下した¹¹⁾。したがって、免疫賦活活性の向上には、1V209- α Man-GNPsがMRを介して細胞内に輸送されることが必要であることが示唆された。次に、ナノ粒子がMRを介したエンドサイトーシスによって細胞内移行することを確かめるために、GNPsと同程度の粒径の蛍光性ナノ粒子を用いて1V209および α -マンノースを共固定化した蛍光性ナノ粒子 (fluorescent nanoparticles: FNPs, 1V209- α Man-FNPs) を合成し、フローサイトメトリー解析を行った¹²⁾。MRの競合リガンドであるマンナン、またはエンドサイトーシス阻害剤であるサイトカラシンDの存在下でマウス骨髄由来DCsをそれぞれ培養すると、1V209- α Man-FNPsの細胞内移行が著しく阻害された。これらの結果から、1V209および α -マンノースを共固定化したナノ粒子が、MRを介したエンドサイトーシスによって選択的に細胞内に輸送されることを実証した。

次に、*in vivo*での1V209- α Man-GNPsのアジュバント活性を、モデルタンパク質抗原にニワトリ卵白由来オボアルブミン (ovalbumin: OVA) を用いて評価した^{11, 13)} (図2D)。1V209- α Man-GNPsは、低分子の1V209に比べてOVA特異的なIgG2c抗体の誘導活性が10,000倍以上高く、マウスの体重減少や致命的な副反応は生じなかった。また、免疫後のマウスから脾臓細胞を回収し、OVAのMHCクラスIまたはクラスIIエピトープで再刺激後、それに伴ってIFN- γ を産生した細胞を定量するELISpotアッセイを行った。その結果、いずれの抗原で再刺激した場合でも、低分子の1V209に比べてIFN- γ 産生T細胞 (CD4陽性およびCD8陽性T細胞) の誘導活性が有意に向上した。以上のことから、1V209- α Man-GNPsのMRを介した輸送によって、1V209の薬物活性および安全性が大幅に改善され、全身投与可能な優れたアジュバントになることが示された。現在、1V209- α Man-GNPsを感染症ワクチン等のアジュバントに利用する応用研究を展開している。

5. おわりに

CLRsは、抗原分子やアジュバント分子をAPCs選択的に輸送するための魅力的な標的である。特定の受容体タンパク質を標的とする場合、一般に抗体が用いられるが、抗体を用いると製造コストが高くなることや抗体に対する免疫応答が誘導されることなどが問題となる。一方、糖鎖は、抗体に比べて安定性が高く、抗原性も低い。また、

CLRsに結合する糖鎖は、化学合成によって比較的容易に入手できる。CLRsに対する親和性の問題は、糖鎖のクラスター化で解決でき、高密度に糖鎖を修飾したキャリア分子を用いる手法、抗原分子やアジュバント分子に高密度に糖鎖を修飾する手法は有用な戦略である。今後、修飾する糖鎖構造や密度、アジュバント分子のデザインなどのさらなる最適化が進めば、次世代ワクチン・アジュバントの開発につながると期待できる。

文 献

- 1) Mayer, S., Raulf, M.K., & Lepenies, B. (2017) C-type lectins: Their network and roles in pathogen recognition and immunity. *Histochem. Cell Biol.*, **147**, 223-237.
- 2) Geijtenbeek, T.B. & Gringhuis, S.I. (2009) Signalling through C-type lectin receptors: Shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 465-479.
- 3) Johannssen, T. & Lepenies, B. (2017) Glycan-based cell targeting to modulate immune responses. *Trends Biotechnol.*, **35**, 334-346.
- 4) Mammen, M., Choi, S.K., & Whitesides, G.M. (1998) Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **37**, 2754-2794.
- 5) Garcia-Vallejo, J.J., Ambrosini, M., Overbeek, A., van Riel, W.E., Bloem, K., Unger, W.W., Chiodo, F., Bolscher, J.G., Nazmi, K., Kalay, H., et al. (2013) Multivalent glycopeptide dendrimers for the targeted delivery of antigens to dendritic cells. *Mol. Immunol.*, **53**, 387-397.
- 6) Le Moignic, A., Malard, V., Benvegna, T., Lemiegre, L., Berchel, M., Jaffres, P.A., Baillou, C., Delost, M., Macedo, R., Rochefort, J., et al. (2018) Preclinical evaluation of mRNA trimannosylated lipopolyplexes as therapeutic cancer vaccines targeting dendritic cells. *J. Control. Release*, **278**, 110-121.
- 7) Jiang, P.L., Lin, H.J., Wang, H.W., Tsai, W.Y., Lin, S.F., Chien, M.Y., Liang, P.H., Huang, Y.Y., & Liu, D.Z. (2015) Galactosylated liposome as a dendritic cell-targeted mucosal vaccine for inducing protective anti-tumor immunity. *Acta Biomater.*, **11**, 356-367.
- 8) Yang, R., Xu, J., Xu, L., Sun, X., Chen, Q., Zhao, Y., Peng, R., & Liu, Z. (2018) Cancer cell membrane-coated adjuvant nanoparticles with mannose modification for effective anticancer vaccination. *ACS Nano*, **12**, 5121-5129.
- 9) Climent, N., Garcia, I., Marradi, M., Chiodo, F., Miralles, L., Maleno, M.J., Gatell, J.M., Garcia, F., Penades, S., & Plana, M. (2018) Loading dendritic cells with gold nanoparticles (GNPs) bearing HIV-peptides and mannosides enhance HIV-specific T cell responses. *Nanomedicine (Lond.)*, **14**, 339-351.
- 10) Wilson, D.S., Hirose, S., Raczy, M.M., Bonilla-Ramirez, L., Jeanbart, L., Wang, R., Kwissa, M., Franetich, J.F., Broggi, M.A.S., Diaceri, G., et al. (2019) Antigens reversibly conjugated to a polymeric glyco-adjuvant induce protective humoral and cellular immunity. *Nat. Mater.*, **18**, 175-185.
- 11) Shinchi, H., Yamaguchi, T., Moroishi, T., Yuki, M., Wakao, M., Cottam, H.B., Hayashi, T., Carson, D.A., & Suda, Y. (2019) Gold nanoparticles coimmobilized with small molecule Toll-like receptor 7 ligand and alpha-mannose as adjuvants. *Bioconjug.*

Chem., **30**, 2811–2821.

- 12) Shinchi, H., Yuki, M., Yamauchi, T., Niimura, M., Wakao, M., Cottam, H.B., Hayashi, T., Carson, D.A., Moroishi, T., & Suda, Y. (2021) Glyco-nanoadjuvants: Sugar structures on carriers of a small molecule TLR7 ligand affect their immunostimulatory activities. *ACS Appl. Bio Mater.*, **4**, 2732–2741.
- 13) Shinchi, H., Komaki, F., Yuki, M., Ohara, H., Hayakawa, N., Wakao, M., Cottam, H.B., Hayashi, T., Carson, D.A., Moroishi, T., et al. (2022) Glyco-nanoadjuvants: Impact of linker length for conjugating a synthetic small-molecule TLR7 ligand to glyco-nanoparticles on immunostimulatory effects. *ACS Chem. Biol.*, **17**, 957–968.
- 14) Anwar, M.A., Shah, M., Kim, J., & Choi, S. (2019) Recent clinical trends in Toll-like receptor targeting therapeutics. *Med. Res. Rev.*, **39**, 1053–1090.
- 15) Yang, X., Yang, M., Pang, B., Vara, M., & Xia, Y. (2015) Gold Nanomaterials at work in biomedicine. *Chem. Rev.*, **115**, 10410–10488.

著者寸描

●新地 浩之 (しんち ひろゆき)

鹿児島大学大学院理工学研究科助教 (研究准教授)。博士 (工学)。

■略歴 2010年鹿児島大学工学部卒業。12年同大学院理工学研究科博士前期課程修了。15年同大学院理工学研究科博士後期課程修了。14年カリフォルニア大学サンディエゴ校博士研究員。15年より現職。

■研究テーマと抱負 糖鎖の分子レベルでの機能解析や相互作用解析, 糖鎖を利用したドラッグデリバリーシステムの開発について研究している。糖鎖が関与する生命現象や疾患の理解を深め, 新たな治療薬・ワクチンの開発に繋げたい。

■ウェブサイト <http://www.cb.kagoshima-u.ac.jp/lab/biochem-lab/>

■趣味 写真・ガーデニング。