

東海大学大学院令和元年度博士論文

オリゴマンノース被覆リポソーム (OML) による  
*in vitro* での単核貪食細胞の活性化に関する研究

指導 小島直也教授

東海大学大学院総合理工学研究科

総合理工学専攻

松岡祐子

## 目次

略語一覧	4
第1章 研究背景	
1-1 ワクチンとアジュバントの必要性	7
1-2 免疫応答の概略	8
1-3 パターン認識受容体とC型レクチン受容体	10
1-4 オリゴマンノース被覆リポソーム(OML)	11
1-5 OMLの投与による細胞性免疫応答の誘導と疾患の制御	12
1-6 本研究の目的	14
1-7 参考文献	16
第2章 マウス末梢血単核球の糖鎖被覆リポソームへの応答	
2-1 序論	30
2-2 実験材料および方法	
2-2-1 試薬および細胞、実験動物	31
2-2-2 オリゴマンノース被覆リポソーム(OML)の作製	31
2-2-3 マウス末梢血単核球の分画	33
2-2-4 OMLの取り込み評価	33
2-2-5 OML取り込みによる <i>in vitro</i> での細胞表面の分子の評価	33
2-2-6 OML取り込みによるMHC-I上への抗原の提示	34
2-2-7 OML取り込みによる <i>in vitro</i> での抗原提示能の評価	34
2-2-8 OML取り込み後の <i>ex vivo</i> での抗原提示能の評価	35
2-3 結果	
2-3-1 OMLは炎症性単球に選択的に取り込まれる	35
2-3-2 末梢血単球上のSIGNR1の発現	36
2-3-3 OML取り込みによって炎症性単球は抗原提示分子の発現が増加する	37
2-3-4 <i>in vitro</i> でOMLを取り込んだ単球のMHC-I上への抗原提示とOT-1マウス由来CD8T細胞の活性化	38
2-3-5 OML/OVA取り込み後の単球の移植によるTh1免疫応答の誘導	39
2-4 考察	40

2-5 参考文献	43
第3章 ヒト単球系培養細胞(THP-1)の糖鎖被覆リポソームへの応答	
3-1 序論	57
3-2 実験材料および方法	
3-2-1 試薬および細胞	58
3-2-2 様々な糖鎖被覆リポソーム	58
3-2-3 PMA stimulated THP-1 における OML 取り込みに伴う細胞表面分子の評価と IL-12p40 の産生評価	59
3-2-4 PMA stimulated THP-1 におけるさまざまなリポソームに対する応答評価	59
3-2-5 OML によって誘導される IL-12p40 の産生への特異シグナル阻害剤の影響	60
3-3 結果	
3-3-1 OML による PMA stimulated THP-1 の活性化は LPS 刺激と同等の活性化を示す	60
3-3-2 さまざまな OML による PMA stimulated THP-1 の活性化	61
3-3-3 特異的シグナル伝達阻害剤による IL-12p40 産生の阻害	62
3-4 考察	63
3-5 参考文献	67
第4章 ヒト単球および単球由来樹状細胞の糖鎖被覆リポソームへの応答	
4-1 序論	77
4-2 実験材料および方法	
4-2-1 試薬および細胞	77
4-2-2 ヒト単球および単球由来樹状細胞(moDC)における OML の取り込み評価	78
4-2-3 ヒト単球および moDC における OML 取り込みに伴う細胞表面分子の評価	78
4-2-4 ヒト単球および moDC における OML の取り込みに伴うサイトカイン産生能の評価	79
4-3 結果	
4-3-1 OML はヒト末梢血単核貪食細胞(MNP)を活性化する	79
4-3-2 OML はヒト moDC を活性化する	80

4-3-3 OML 刺激した moDC からのサイトカイン産生	81
4-4 考察	82
4-5 参考文献	84
第5章 全体の総括	
5-1 総括	93
5-2 がんの細胞療法への OML の応用展開	96
5-3 OML 実用化に向け克服すべき課題	99
5-4 結語	101
5-5 参考文献	101
謝辞	

## 略語一覧

APC : 抗原提示細胞

(Antigen presenting cell)

APCy : アロフィコシアニン

(Allophycocyanin)

BL : 糖鎖を被覆していないリポソーム

(Bare liposome)

BSA : ウシ血清アルブミン

(Bovine serum albumin)

CCR : C-C ケモカイン受容体

(C-C chemokine receptor)

CLR : C 型レクチン受容体

(C-type lectin receptor)

CTL : 細胞傷害性 T 細胞

(Cytotoxic T lymphocyte)

DC : 樹状細胞

(Dendritic cell)

DPPC : ジパルミトイルフォスファチジルコリン

(Dipalmitoylphosphatidylcholine)

DPPE : ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン

(Dipalmitoylphosphatidylethanolamine)

FACS : 蛍光標示式細胞分取器

(Fluorescence-activated cell sorter)

FITC : フルオレセインイソチオシアネート

(Fluorescein isothiocyanate)

GM-CSF : 顆粒球単球コロニー刺激因子

(Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor)

HLA : ヒト白血型抗原

(Human leukocyte antigen)

HPLC : 高速液体クロマトグラフィー

(High performance liquid chromatography)

IFN：インターフェロン  
(Interferon)

IL：インターロイキン  
(Interleukin)

LPS：リポ多糖  
(Lipopolysaccharide)

Man2：マンノビオース  
(Mannobiose)

Man3：マンノトリオース  
(Mannotriose)

Man5：マンノペンタオース  
(Mannopentaose)

MHC：主要組織適合遺伝子複合体  
(Major histocompatibility complex)

MNP：単核貪食細胞  
(Mononuclear phagocyte)

Mo：単球  
(Monocyte)

MoDC：単球由来樹状細胞  
(Monocyte derived DC)

OML：オリゴマンノース被覆リポソーム  
(Oligomannose-coated liposome)

OVA：卵白アルブミン  
(Ovalbumin)

PAMPs：病原体関連分子パターン  
(Pathogen associated molecular patterns)

PBMC：末梢血単核球  
(Peripheral blood mononuclear cell)

PBS：リン酸緩衝液  
(Phosphate buffered saline)

PE：フィコエリトリン  
(Phycoerythrin)

PerCP-Cy-5.5 : ペリジニクロロフィルプロテインシアニン 5.5

(Peridinin chlorophyll protein -cyanin 5.5)

PMA : フォルボールエステル

(Phorbol 12-myristate 13-acetate)

PRR : パターン認識受容体

(Pattern recognition receptor)

TCR : T 細胞受容体

(T cell receptor)

Th : ヘルパーT 細胞

(Helper T cell)

TLC : 薄層クロマトグラフィー

(Thin-layer chromatography)

TLR : Toll 様受容体

(Toll like receptor)

## 第1章 研究背景

### 1-1. ワクチンとアジュバントの必要性

1980年に世界保健機関（WHO）により、天然痘の撲滅が宣言された。これは人類が感染症の撲滅に成功した最初の事例であり、人類が感染症に勝利したと言われた。しかしその後、人に感染する感染症において撲滅した例はなく、エイズや新型インフルエンザなど数多くの新興感染症が発生するとともに、結核などの再興感染症の脅威が、地球温暖化とグローバル化の進行とともに世界的に増加している。世界的にみれば、感染症は未だ死因の第1位を占めており、これら感染症に対するワクチンの整備は急務である。一方で、免疫チェックポイントに関する理解が進んだことにより、がんワクチンのようながんの免疫療法が治療の選択肢の一つになりつつある。さらに、アレルギーや自己免疫疾患など免疫の破綻によって発症する疾患に対しても免疫療法の可能性が示されるなど、ワクチンの需要の幅は大きくなってきている。

現在使用されているワクチンは、生ワクチンや不活性化ワクチンが主であるが、副作用などの問題から、抗原性のあるタンパク質の純度が高いサブユニットワクチン（コンポーネントワクチン）への転換が強く望まれている。しかし、抗原タンパク質単独では免疫原性が弱く免疫応答を誘導できない。そのため、サブユニットワクチンには免疫を賦活化するアジュバントが必須となっている。現在用いられている代表的なアジュバントである水酸化アルミニウムゲル（Alum）は抗体産生が主体となる液性免疫を広く誘導することはできるが、ウイルス感染症の制御やがん免疫に必要な細胞性免疫の誘導能は極めて低い。一方、実験的に細胞性免疫を強く誘導できるリポ多糖（LPS）やフロイント完全アジュバントなどは毒



性が強いためにヒトに対して使用することはできない。そこで、特に細胞性免疫が疾患制御の主体となるようなウイルス感染症やがんに対するサブユニットワクチンの開発のためには、細胞性免疫を強く誘導でき副作用の少ない新規アジュバントの開発が必須となっている。

## 1-2. 免疫応答誘導の概略

いわゆる抗原特異的な獲得免疫は、Fig.1-1 に示したような流れで誘導されることがわかっている。まず、体内に侵入してきた病原体は、樹状細胞（DC）などの抗原提示細胞（APC）によって認識・貪食される。DC は最も強力な APC であり、免疫応答の中心的役割を担っていると考えられている。DC は末梢組織に未熟な状態で存在しており、この未熟 DC が末梢で病原体などの抗原を捕食すると、成熟して所属リンパ節の T 細胞領域に遊走し、そこで T 細胞に抗原を提示することで T 細胞を活性化する。

DC などの APC に捕食された病原体はペプチド断片に分解され、その一部が抗原ペプチドとして主要組織適合遺伝子複合体クラス I（MHC-I）およびクラス II（MHC-II）に受け取られたのち、MHC-抗原ペプチド複合体として APC の表面に提示される。T 細胞はそれぞれ固有の T 細胞受容体（T cell receptor; TCR）を用いてこの複合体を認識することで活性化する。MHC-II 分子は外来性抗原に由来する抗原ペプチドを提示するのに対して、MHC-I 分子は一般的に内在性タンパク質のペプチド断片を提示している。しかしながら、外来性抗原もクロスプレゼンテーションという過程を経て MHC-I 上に提示される場合がある。この過程は、がん細胞やウイルス感染細胞に対する細胞傷害性 T 細胞（CTL）を誘導するために必須

である。

MHC-II 上の抗原ペプチドは CD4<sup>+</sup>ヘルパーT 細胞 (Th 細胞) によって認識され Th 細胞が活性化する。活性化した Th 細胞は様々なサイトカインの存在下で Th1、Th2、Th17 細胞など特定の機能をもつエフェクター細胞へと分化する。その概略図を Fig.1-2 に示した。Th1 細胞はインターフェロン  $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) を産生することで、マクロファージや NK (Natural Killer) 細胞などを活性化し、これらがウイルス感染細胞やがん細胞を攻撃する。一方で、MHC-I に提示されたペプチド抗原は CD8<sup>+</sup>T 細胞によって認識され、CD8<sup>+</sup>T 細胞を活性化する。活性化 CD8<sup>+</sup>T 細胞は Th1 細胞から産生される IFN- $\gamma$  の介助によって抗原特異的な CTL へと分化し、ウイルス感染細胞やがん細胞を抗原特異的に攻撃・排除する。すなわち、Th1 細胞の誘導が細胞性免疫誘導にとって必須である。一方で、IL-4 などによって誘導される Th2 細胞は液性免疫を主に誘導し、IL-17 などによって誘導される Th17 細胞は局所での炎症反応を担っている。T 細胞の活性化と機能性 T 細胞の誘導には、①MHC-TCR 間の特異的な認識シグナル、②補助刺激シグナル、③およびサイトカインシグナルの3つが必須である。Fig. 1-1 に示したように、このような機能性 T 細胞を主体とした獲得免疫応答誘導の起点となっているのが APC である (1,2)。従って、Th1 免疫を誘導できるようなワクチンの開発研究においては、T 細胞活性化につながる分子、すなわち MHC-II, 補助刺激分子 (CD80, CD86, CD40) および所属リンパ節への細胞遊走に関連するケモカイン受容体 CCR7 などの発現を誘導増強できるように DC をはじめとする APC に介入し、同時に MHC-II だけでなく MHC-I にも抗原を送達することで CD4<sup>+</sup>および CD8<sup>+</sup>T 細胞の両者を活性化でき

る技術をいかに構築するかが重要な課題になっている (3,4)。

### 1-3. パターン認識受容体と C 型レクチン受容体

APC である DC やマクロファージなどの単核貪食細胞 (mononuclear phagocytes; MNPs) は自然免疫に関わる細胞に分類され、自然免疫と獲得免疫をつなぐ重要な役割を担っている。これら MNP の表面には様々なパターン認識受容体 (Pattern recognition receptors; PRRs) が発現しており、病原体が持つ分子パターン (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) をこれら PRRs が認識することで、MNP を含む自然免疫系細胞が活性化する (5)。最も良く知られた細胞表面に発現している PRRs として Toll 様受容体 (TLRs) があり、PRRs、特に TLRs を標的としたアジュバントの開発が世界中で精力的に行われている (6)。例えば、TLR9 のリガンドである CpG オリゴヌクレオチドを含有したリポソームが *in vivo* で DC の活性化と抗腫瘍免疫応答をもつ CTL の誘導ができることが報告されている。また poly-IC や monophosphoryl lipid A (MPLA) といった TLR リガンドを含有するナノ粒子が DC の成熟を *in vitro* で誘導できることも示されている (7,8)。

一方で、細胞表面に存在する PRRs のひとつとして C-型レクチン受容体 (C-type lectin receptors; CLR) が知られている。CLR は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的に糖鎖を認識する受容体であり、Table.1 に示した様な多くの CLR がマクロファージや DC といった MNP 上に存在していることが知られている (9)。いくつかの CLR は抗原の取り込みとエンドソームへの移送に関するモチーフやシグナル伝達に参与するモチーフを細胞内領域に持っているため、CLR は微生物の取り込みと抗原提示に参与できるとともに、T 細胞の分極を決定するサイトカインの産生誘導シグナルを活性化ある

いは調節できる (10,11)。また、CLR は TLR など他の受容体と相互作用することで自然免疫応答を調節していることも明らかにされている。Table.1 に示した様に、MNP 上に発現している CLR の多くは、糖タンパク質糖鎖である高マンノース型オリゴ糖 (high mannose oligosaccharides) など末端にマンノースを含むオリゴ糖を認識する (12)。末端にマンノースを有する糖鎖構造は、哺乳動物の組織や細胞表層ではそれほど頻繁に現れる構造ではないが、多くの微生物の細胞表層には比較的普遍的に存在している。従って、マンノースを表面にもつりポソームはこれらの CLR を標的とした APC への抗原送達媒体として有望である。

#### 1-4. オリゴマンノース被覆リポソーム (OML)

脂質二重層からなる小胞であるリポソームは、大きく多様な抗原配列などを内部に封入することができることから、抗原の送達媒体として適している。様々なリポソームが免疫応答を増強する目的で試されており、MNP によるこれらリポソームの効率的な取り込みが抗原特異的な免疫誘導に重要であることが示されている (13)。従って、CLR のリガンドとなる糖鎖で表面を修飾されたリポソームも効率的な抗原送達媒体になると予想された。小島らの研究グループでは、リポソームの表面を糖鎖で修飾するために人工糖脂質を用いて研究を進めてきた。人工糖脂質とは天然に存在するオリゴ糖と天然のリン脂質 (DPPE) とを還元アミノ化により縮合した非天然型糖脂質であり、その疎水部分はリン脂質からなるリポソームの脂質二重層に容易に取り込まれ、またオリゴ糖部分はその親水性のために水層に向かって露出する。

本論文では主としてマンノトリオース (Man<sub>3</sub>; Man $\alpha$ 1-6(Man $\alpha$ 1-3)Man) をオ

リゴ糖部分としてもつ Man3-DPPE を構成成分に含むリポソーム (Man3-OML) を用いて研究を展開した (Fig.1-3)。Man3-OML は、Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) : Cholesterol : Man3-DPPE (モル比 10:10:1) で構成され粒子径を約 1  $\mu\text{m}$  に調整したリポソームである。Man3-OML はマンノース残基を表面に提示しているため、生体内でマンノース結合 CLR によって認識されると予想される。実際、マンノースを認識する Concanavalin A によって Man3-OML は凝集することが知られている。

#### 1-5. OML の投与による細胞性免疫応答の誘導と疾患の制御

池原らは、Man3-OML をマウス腹腔内に投与すると、腹腔内常在性 MNP である CD11b<sup>high</sup> 細胞が 1 時間以内に Man3-OML を取り込み、Man3-OML を取り込んだ細胞が乳斑と呼ばれる大網中の節外性リンパ組織や腸間膜リンパ節に 24 時間以内に集積することを見出した (14)。また高木らは、Man3-OML を *in vivo* で取り込んだ腹腔内の CD11b<sup>high</sup> 細胞では、その取り込みに応答して CD86 などの補助刺激分子や MHC-II の発現が顕著に増加すること、Man3-OML を取り込んだ腹腔内細胞は、Th1 細胞の分化や Th1 免疫応答の誘導に重要な働きをしているサイトカインである IL-12 を効率よく産生することを明らかにした (15)。このことは、Man3-OML が MNP に対して刺激シグナルも送達し、細胞遊走や成熟化を誘導できることを示していた。

Man3-OML は MNP に選択的に取り込まれ、取り込んだ MNP はリンパ組織へ遊走するので、Man3-OML 中に封入された抗原が MHC 分子に提示されれば、Man3-OML によって任意の抗原に対する獲得免疫の誘導が期待できる。池原らは、

卵白アルブミン (Ovalbumin; OVA) を抗原として封入した OML (OML/OVA) を投与した C57BL/6 マウスから調製した腹腔 MNP と OT-II マウス (OVA ペプチド<sub>323-339</sub> 提示 MHC-II 特異的 TCR 遺伝子導入マウス) 由来の CD4<sup>+</sup> T 細胞、または OT-I マウス (OVA ペプチド<sub>257-264</sub> 提示 MHC-I 特異的 TCR 遺伝子導入マウス) 由来 CD8<sup>+</sup> T 細胞を混合培養することで、Man3-OML に封入された抗原がこれら T 細胞を活性化できるかについて検討し、Man3-OML を取り込んだ MNP が、Man3-OML に封入された抗原をその MHC-I および MHC-II 分子に提示し、抗原特異的な CD4<sup>+</sup> および CD8<sup>+</sup> T 細胞を活性化できることを明らかにした (16)。さらに OML/OVA で免疫したマウスの脾臓細胞から単離した CD8<sup>+</sup> T 細胞は OVA ペプチドを腫瘍抗原として提示している E.G7-OVA (OVA 遺伝子を導入した EL4 細胞) に対して強い細胞傷害活性を示すことも見出した (16)。以上をまとめると、腹腔内の常在性 MNP は CLR などの受容体を介して糖鎖依存的に Man3-OML を取り込んだのち、Fig.1-4 に示したような応答を介して抗原特異的な Th1 免疫応答および CTL を誘導すると考えられた。

このような Man3-OML による免疫応答誘導能の特質から、Th1 や CTL が病態制御において主体となる疾患では Man3-OML を基盤としたワクチンで疾患の制御や予防が可能となると予想される。特に、がん特異的な CTL は腫瘍免疫の最も重要なエフェクター細胞であるので、がん抗原を封入した Man3-OML ワクチンによる抗腫瘍免疫誘導についての検証が小島らによって行われ、Man3-OML/OVA を E.G7-OVA 担がんマウスに投与することで劇的に腫瘍の増殖抑制と退縮が認められ、約半数のマウスでは腫瘍が完全に消失するという結果が示された (17)。I 型アレルギー反応はアレルゲン特異的な Th2 細胞に依存しているため、アレルゲン

を封入した Man3-OML ワクチンの接種で Th1 免疫応答を惹起することによる抗アレルギー効果が期待できる。石井らは、あらかじめスギ花粉アレルゲン (Cry j 1) で感作したマウスに Cry j 1 を封入した Man3-OML で免疫すると、Cry j 1 の過剰投与によって観察される血清中の IgE 濃度の上昇が、Cry j 1 特異的な Th1 免疫応答の誘導によって著しく抑制されることを見出した (18)。さらに帯広畜産大学の西川らは抗原特異的な Th1 免疫応答が排除ファクターとなるような原虫感染症、例えばマラリアやトキソプラズマ感染症が、組替え抗原タンパク質を封入した Man3-OML ワクチンによって予防できることを明らかにした (19)。これらの事例から、適切な抗原を封入した Man3-OML ワクチンの接種によって、抗原特異的な Th1 免疫の誘導と疾患の病態制御が可能になることが示唆される。これまでに Table. 2 に示すように、原虫・ウイルス感染症、腫瘍ならびにアレルギー疾患において Man3-OML ワクチンの有効性がマウスおよびウシを用いた研究から示されている。

#### 1-6. 本研究の目的および本論文の構成

これまで述べてきたように、Man3-OML は細胞性免疫を誘導できる優れたアジュバント活性を有しているため、ヒトの細胞性免疫誘導型ワクチンアジュバントとして非常に魅力的な材料である。しかし Man3-OML の細胞性免疫誘導アジュバント活性は、Man3-OML をマウス生体に直接投与した場合のみに観察される活性であり、マウスの腹腔内 MNP や骨髄由来 DC を *in vitro* で Man3-OML を用いて刺激しても、Man3-OML のアジュバント活性を再現することはできなかった。Man3-OML を細胞性免疫誘導型ヒトワクチンのアジュバントとして応用展開

するためには、ヒト APC を用いて Man3-OML のアジュバント活性を検証する必要がある、そのためにはまず *in vitro* で Man3-OML のアジュバント活性を再現する必要があった。そこで筆者は、Man3-OML がヒト APC を活性化できることを明らかにする研究を企画し、そのためのマイルストーンとして、① Man3-OML によってマウス MNP は細胞性免疫を誘導できるように *in vitro* で活性化されるのか、② マウスでアジュバント活性が見られる Man3-OML は、ヒト APC をマウスの場合と同じように *in vitro* で活性化できるのか、という 2 点を明らかにすることを目的として研究に着手し、その成果を踏まえて、③ 健常人から得られた MNP およびそれから誘導される DC を、細胞性免疫が誘導できるような表現型をもつ成熟 APC として、Man3-OML によって活性化されるのかを検証することを最終目標とした。

第 2 章では、Man3-OML を用いた *in vitro* でのマウス末梢血単核球の活性化と機能評価を行った。第 3 章では、Man3-OML および類似した構造を持つ人工糖脂質で被覆したリポソームを用いて、これらリポソームによる *in vitro* でのヒト MNP の活性化をヒト MNP モデルである THP-1 細胞を用いて評価し、Man3-OML のヒトの系への展開の可能性を検証した。さらに第 4 章では、ヒトワクチンアジュバントとしての適合性を検証するため、健常人の末梢血由来の炎症性単球および単球由来樹状細胞 (moDC) の Man3-OML による活性化および成熟状態を評価した。以上の成果を踏まえ第 5 章では、がん細胞免疫療法やヒトワクチンへの Man3-OML の応用展開の可能性とがん細胞免疫療法への展開の有用性について考察した。



1-7.参考文献

1. R.M. Steinman. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, 9, 271-296 (1991)
2. K. Palucka, J. Banchereau. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol.*, 19(1), 12-25 (1999)
3. P.J. Tacke, R. Torensma, C.G. Figdor. Targeting antigens to dendritic cells *in vivo*. *Immunobiology*, 211 (6-8), 599-608 (2006)
4. G. Moron, G. Dadaglio, C. Leclerc. New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trend Immunol*, 25(2), 92-97 (2004)
5. C.A. Janeway Jr, R. Medzhitov. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.*, 20, 197-216 (2002)
6. T. Kawai, S. Akira. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 17 (4), 338-344 (2005)
7. V. Jérôme, A. Graser, R. Müller, R. E. Kontermann, A. Konur. Cytotoxic T lymphocytes responding to low dose TRP2 antigen are induced against B16 melanoma by liposome-encapsulated TRP2 peptide and CpG DNA adjuvant. *J. Immunother*, 29, 294-305 (2006)
8. H. Sun, K. G. Pollock, J. M. Brewer. Analysis of the role of vaccine adjuvants in modulating dendritic cell activation and antigen presentation *in vitro*. *Vaccine*, 21, 849-855 (2007)
9. M.J. Robinson, D. Sancho, E.C. Slack, S.L.Landmann, C.R. Sousa, Myeloid C-type

- lectins in innate immunity. *Nat Immunol*, 7, 1258-1265 (2006)
10. T.B. Geijtenbeek, R. Torensma, S.J. van Vliet, G.C. van Duijnhoven, G.J. Adema, Y. van Kooyk, C.G. Figdor. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, 100, 575-578 (2000)
  11. Y. van Kooyk. C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Trans*, 36, 1478-1481 (2008)
  12. R.T. Lee, T.L.Hsu, S.K. Huang, S.L. Hsieh, C.H. Wong, Y.C. Lee. Survey of immune-related, mannose/fucose-binding C-type lectin receptors reveals widely divergent sugar-binding specificities. *Glycobiology*, 21, 512 (2011)
  13. G. Chikh, M.P. Schutze-Redelmeir. Liposomal delivery of CTL epitopes to dendritic cells. *Bioscience Reports*, 22, 339 (2002)
  14. Y.Ikehara, T. Niwa, L. Biao, S.K. Ikehara, N. Ohashi, T. Kobayashi, Y. Shimizu, N. Kojima, H. Nakanishi. A carbohydrate recognition-based drug delivery and controlled release system using intraperitoneal macrophages as acellular vehicle. *Cancer Res.*, 66, 8740-8748 (2006)
  15. H. Takagi, N. Furuya, N. Kojima. Preferential production of IL-12 by peritoneal macrophages activated by liposomes prepared from neoglycolipids containing oligomannose residues. *Cytokine*, 40, 241-250 (2007)
  16. Y. Ikehara, N. Shiuchi, S. Kabata-Ikehara, H. Nakanishi, N. Yokoyama, H. Takagi, T. Nagata, Y. Koide, K. Kuzushima, T. Takahashi, K. Tsujimura, N. Kojima. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal macrophage. *Cancer Lett.*, 260, 137-145 (2008)

17. N.Kojima, L. Biao, T. Nakayama, M. Ishii, Y. Ikehara, K. Tsujimura.  
Oligomannose-coated liposomes as a therapeutic antigen-delivery and an adjuvant vehicle for induction of in vivo tumor immunity. *J. Control. Rel.*, 129, 26-32 (2008)
18. M. Ishii, A. Koyama, H. Iseki, H. Narumi, N. Yokoyama, N. Kojima. Anti-allergic Potential of Oligomannose-Coated Liposome-Entrapped Cry j 1 as Immunotherapy for Japanese Cedar Pollinosis in Mice. *Int Immunopharm*, 10, 1041-1046 (2010)
19. S. Tanaka, Y. Kuroda, F. Ihara, M. Nishimura, J. Hiasa, N. Kojima, Y. Nishikawa. Vaccination with profilin encapsulated in oligomannose-coated liposomes induces signify protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Vaccine*, 1;32(16), 1781-1785 (2014)
20. Y. Shimizu, H. Takagi, T. Nakayama, K. Yamakami, T. Tadakuma, N. Yokoyama, N. Kojima. Intraperitoneal Immunization With Oligomannose-Coated Liposome-Entrapped Soluble Leishmanial Antigen Induces Antigen-Specific T-helper Type 1 Immune Response in BALB/c Mice Through Uptake by Peritoneal Macrophages. *Parasit. Immunol.*, 29, 229-239 (2007)
21. H. Zhang, Y. Nishikawa, J. Yamagishi, J. Zhou, Y. Ikehara, N. Kojima, N. Yokoyama, X. Xuan. *Neospora caninum*: Application of apical membrane antigen 1 encapsulated in the oligomannose-coated liposomes for reduction of offspring mortality from infection in BALB/c mice. *Exp. Parasitol.*, 2125, 130-136(2010)
22. M. Ishii, N. Kojima. Mucosal adjuvant activity of oligomannose-coated liposomes for nasal immunization. *Glycoconj. J.*, 27, 115-123 (2010)
23. A. Kawakita, H. Shirasaki, M. Yasutomi, S. Tokuriki, M. Mayumi, H. Naiki, Y.

- Ohshima. Immunotherapy with oligomannose-coated liposomes ameliorates allergic symptoms in a murine food allergy model. *Allergy*, 67, 371-379 (2012)
24. T. Kawano, J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, M. Taniguchi. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of  $\alpha$ 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*, 287, 1626-1629 (1997)
25. K. Senchi, S. Matsumoto, H. Hasegawa, H. Kimura, A. Ryo. Development of oligomannose-coated liposome-based nasal vaccine against human parainfluenza virus type 3. *Front. Microbiol.*, 24, 346 (2013) doi: 10.3389/fmicb.2013.00346.
26. M. A. Terkawi, Y. Kuroda, S. Fukumoto, S. Tanaka, N. Kojima, Y. Nishikawa. Plasmodium berghei circumsporozoite protein encapsulated in oligomannose-coated liposomes confers protection against sporozoite infection in mice. *Malaria J.*, 13, 426. (2014)
27. T. Kozako, S. Hirata, Y. Shimizu, Y. Satoh, M. Yoshimitsu, Y. White, F. Lemonnier, H. Shimeno, S. Soeda, N. Arima. Oligomannose-coated liposomes efficiently induce human T cell leukemia virus-1-specific cytotoxic T lymphocytes without adjuvant. *FEBS J.*, 278, 1358-1366 (2011)
28. Y. Matsuoka, Y. Kuroda, N. Kojima. Chapter Nine. Oligomannose-Coated Liposomes: An Efficient Platform for Vaccines for Tumor Immunotherapy, Allergies, and Infectious Diseases. *Liposomes: Historical, Clinical and Molecular Perspectives*, ed. Benjamin R. Pearson, CHAPET 9, 237-264 (2017).
29. M. Mizuuchi, Y. Hirohashi, T. Torigoe, T. Kuroda, K. Yasuda, Y. Shimizu, T. Saito, N.

- Sato, Novel oligomannose liposome-DNA complex DNA vaccination efficiently evokes anti-HPV E6 and E7 CTL responses. *Exp. Mol. Pathol.* 92, 185-190 (2012)
30. M. Nishimura, J. Kohara, Y. Kuroda, J. Hiasa, S. Tanaka, Y. Muroi, N. Kojima, H. Furuoka, Y. Nishikawa. Oligomannose-coated liposome-entrapped dense granule protein 7 induces protective immune response to *Neospora caninum* in cattle. *Vaccine*, 31, 3528-3535 (2013)

Table 1. CLRs expressed on myeloid cells.

CLRs	Cell types	Specificities
Mannose receptor (CD206)	DC/LC/M $\phi$ /Mo	Man, Fuc, GlcNAc, Sialyl Lewis X
Dec205 (CD205)	DC/LC/M $\phi$ /B	Man, Fuc, GlcNAc, Sialyl Lewis X
Endo 180	M $\phi$	Man, Fuc, GlcNAc
DC-SIGN (CD209)	DC/M $\phi$	Mannan, High mannose, Fuc Lewis antigens, Man
SIGNR1 (CD209b)	M $\phi$	Mannan, High mannose, Fuc Lewis antigens, Man
Dectin-2	DC/M $\phi$	High mannose
BCDA-2	DC	n.d.
DCIR	DC/Mo/M $\phi$ /B	Man, Fuc
Langerin (CD207)	LC/DC	Man, Fuc, GlcNAc,
MGL	DC/M $\phi$	GalNAc, Gal, Lewis X
Dectin-1	DC/LC/M $\phi$	beta-Glucan
CLEC-1	DC	n.d.
CLEC-2	Mo/DC	n.d.
DCAL	DC	n.d.

DC: Dendritic cell, LC: Langerhans cell, M $\phi$ : Macrophage, Mo: Monocyte B: B cell,

n.d: not determined

Table. 2. Prophylactic and therapeutic potential of OML-based vaccines.

Encased antigen	Animal	Immunization		Outcomes and responses	Ref
		route	antigen dose/head × times		
Crude extract of <i>Leishmania</i>	Balb/c <sup>1)</sup>	i.p. <sup>2)</sup>	1 µg x 2	Suppression of footpad swelling by <i>Leishmania major</i> infection with significant amount of IFN-g production	[20]
OVA	C57BL/6	i.p.	1 µg x 2	Induction of OVA-peptide specific CTL Complete prevention of the growth of EG7.-OVA in pre-immunized mice	[16]
		s.c.	1 µg x 1	Elimination of established EG7.-OVA tumor in post-immunized mice	[17]
EL4 tumor cell extract	C57BL/6	s.c.	1 µg x 3	Marked delay of established EL4 tumor growth and prolonged survival in post-immunized mice	[17]
Cry j 1	Balb/c	s.c.	1 µg x 2	Prevention of IgE elevation in sera in response to Cry j 1 sensitization	[18]
Recombinant NcGRA7	Balb/c	s.c.	40 nmol x 3	Protection of dams and offspring from <i>Neospora caninum</i> infection	[21]
OVA	Balb/c	i.n.	1 µg x 2	Induction of mucosal immune responses	[22,23]
			1 µg x 5	Suppression of development of allergic diarrhea induced by oral OVA administration	[24]
Hemmagglutinin-neuraminidase of human parainfluenza virus	Balb/c	i.n.	1 µg x 3	Induction of virul-specific IgA in nasal wash and IgG in serum, which can protect viral infection in cell culture model	[25]
Circumsporozoite protein of <i>Plasmodium berghei</i>	Balb/c	s.c.	3 µg x 2	Induction of antigen-specific humoral and cellular responses Protection against sporozoite infection of <i>Plasmodium berghei</i>	[25]

Continued

$\alpha$ GalCer	C57BL/6	i.p.	1 $\mu$ g x 1	More effective activation and expansion of NKT cell compared with uncoated liposomes	[27]
				Effective suppression of lung metastasis of B16 melanoma	[28]
HLA-restricted HTLV-1 Tax epitope peptide	HLA-transgenic mouse	s.c.	1 $\mu$ g x 2	Induction of HTLV-1-specific CTL	[29]
Recombinant NcGRA7	Cattle	s.c.	50 $\mu$ g x 2	Suppression of Neospora infection in brain	[30]

<sup>1)</sup> C57BL/6 : mouse strain C57BL/6, Balb/c : mouse strain Balb/c

<sup>2)</sup> i.p. : Intraperitoneal injection, s.c. : Subcutaneous injection, i.n. : Intranasal administration



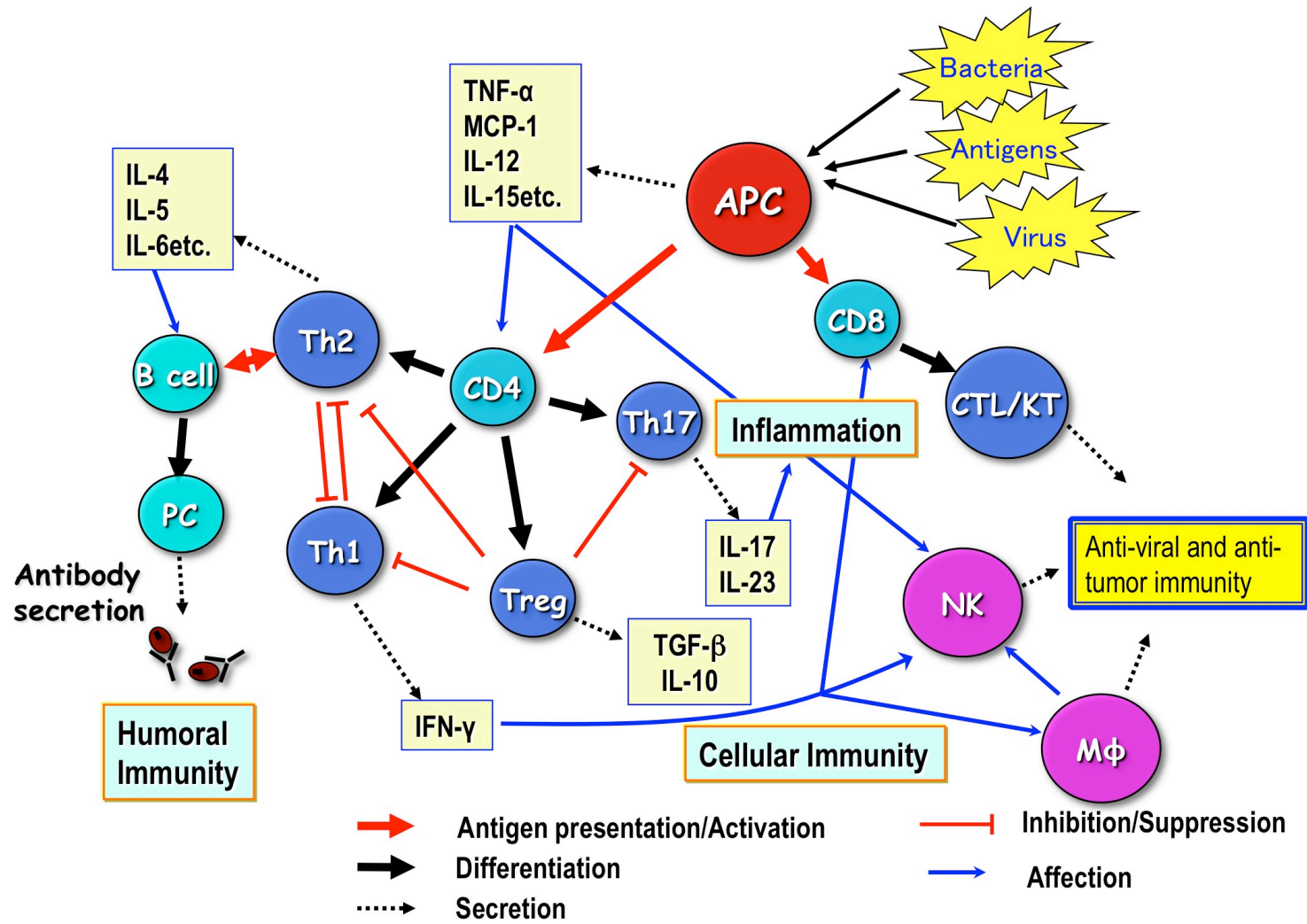


Fig.1-1. Induction of antigen specific adaptive immunity.

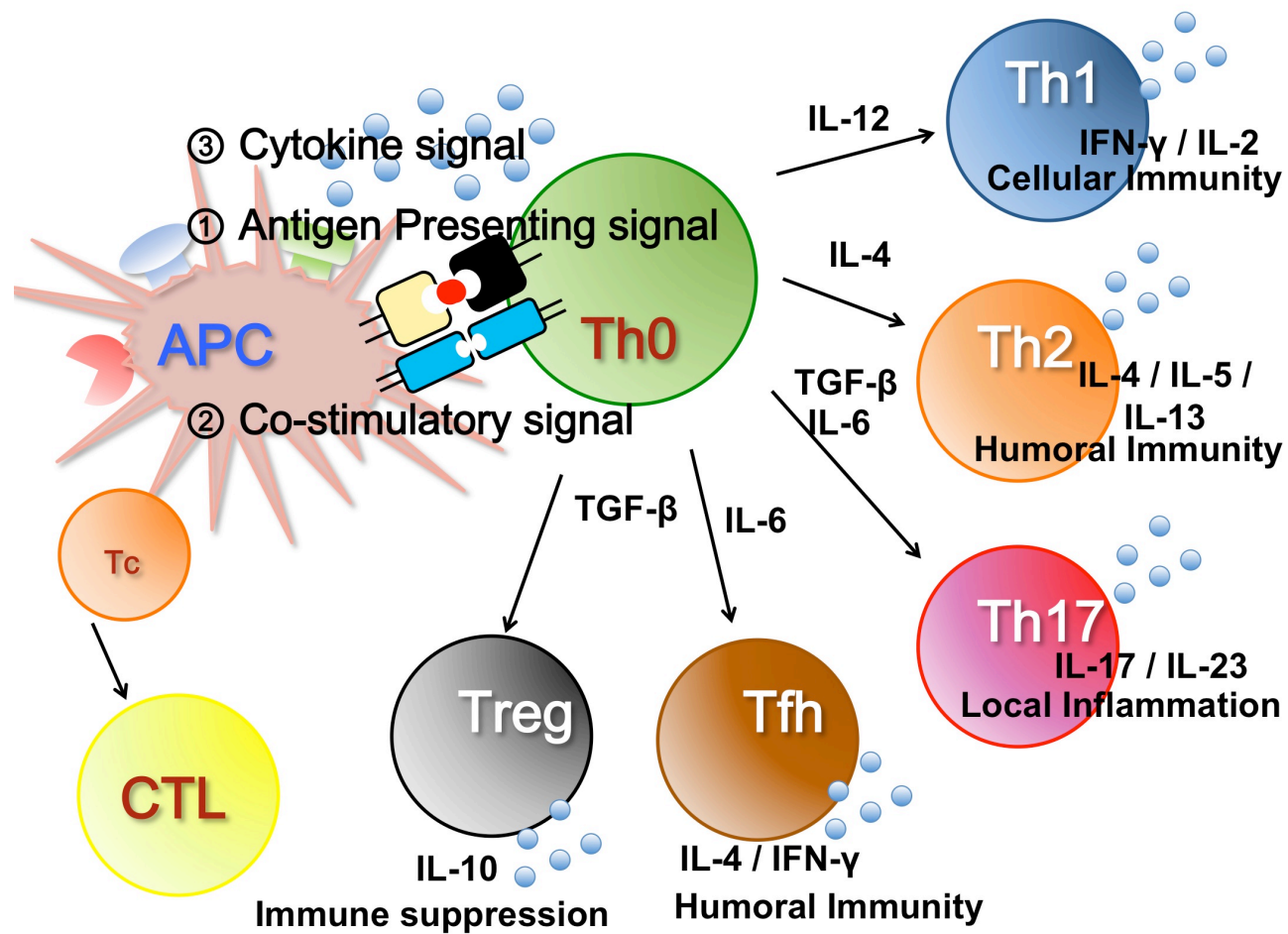
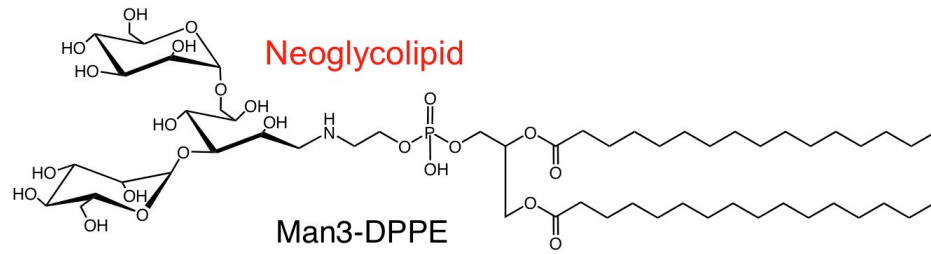


Fig.1-2. The summary of T cell activation.

The T cell activation and differentiation require ① antigen-peptide-MHC complex, ② co-stimulatory molecules, and ③ cytokines.



1 μm  
↔

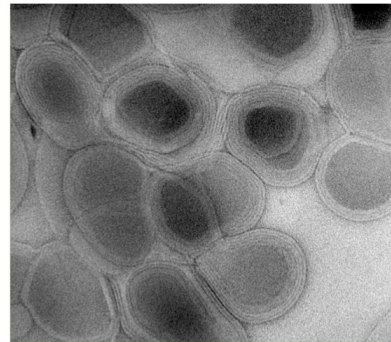
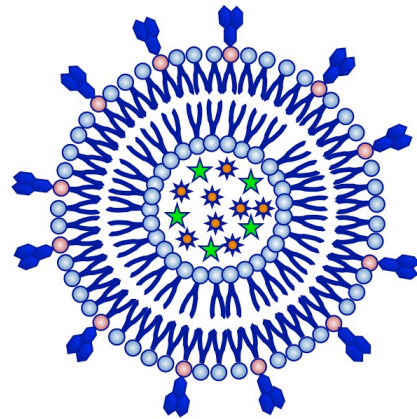


Fig.1-3. Oligomannose-cated liposome (OML)

Neoglycolipids containing oligomannose were prepared by reductive amination of an aldehyde group at the end of the mannotriose with an amino group of DPPE. OMLs are prepared from DPPC, Cholesterol, and Man3-DPPE at a molar ratio of 10:10:1 by intense vortex dispersion with antigen containing PBS and extruded through a 1  $\mu\text{m}$  pore membrane.

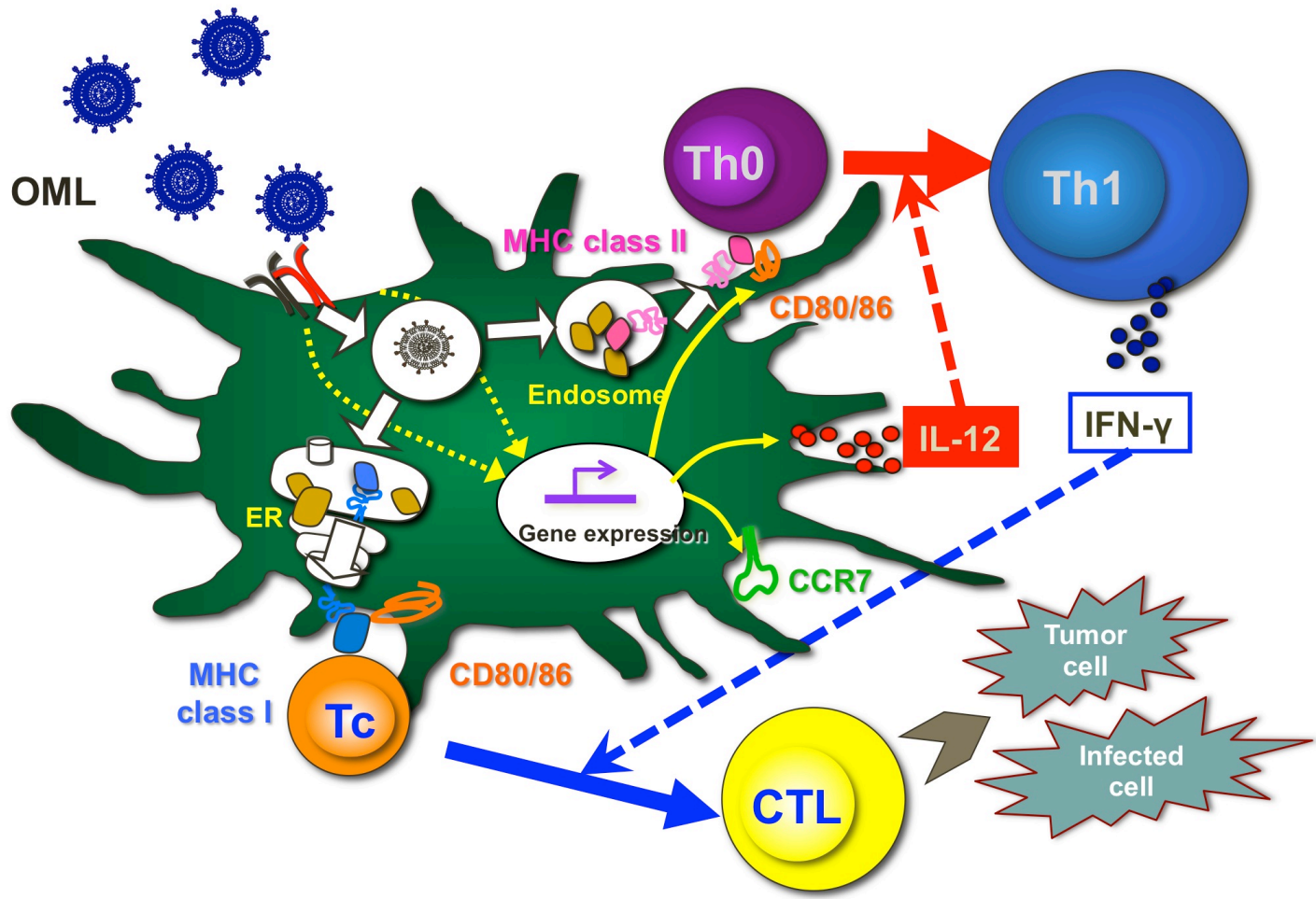


Fig.1-4. Presumed mechanism of induction of anti-tumor and anti-infectious immunity by OML.

OMLs are ingested into APCs via CLRs. The encapsulated antigens are degraded in interacellular compartments and the antigenic peptides are presented efficiently on both MHC class II and class I molecules. OML uptake also triggers activation of unidentified signaling pathway, which leads enhanced expression of co-stimulatory molecules and chemokine receptors such as CCR7 on APC, and preferential production of IL-12 from the APCs. Naïve CD4<sup>+</sup>T cells (Th0) are activated by antigen-presented MHC class II on APCs that take up OML, and the activated Th0 cells predominantly differentiate into Th1 phenotype in the presence of IL-12 produced by OML-ingested APCs. Naïve CD8<sup>+</sup>T cells are activated by antigen-presented MHC class I on APC. The Th1 cells produce IFN- $\gamma$ , which can help differentiation of naïve CD8<sup>+</sup>T cell to CTL.

## 第2章 マウス末梢血単核球のオリゴマンノース被覆リポソームへの応答

### 2-1. 序論

第1章で述べた通り、筆者が所属する研究グループのこれまでの研究から、dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)、cholesterol および Man3-DPPE を 10:10:1 で含み粒子径を約 1  $\mu\text{m}$  に調整した Man3-OML をマウス腹腔内へ投与すると、Man3-OML は腹腔内の常在性 MNP に速やかに取り込まれ、Man3-OML を取り込んだ細胞は抗原提示分子の発現増強や IL-12 の選択的産生を伴って活性化し、所属リンパ節へ集積し、強い Th1 免疫応答や Man3-OML 封入抗原特異的な CTL を誘導することが明らかになっている (1-5)。また様々な Man3-OML を基盤としたワクチンが Th1 や CTL を病態制御のエフェクターとする疾患において有効なことも示されている。しかし、これらの応答はいずれもマウスの腹腔内や皮下などに直接 Man3-OML を投与した場合にのみ認められる現象であり、腹腔細胞や脾臓細胞あるいは骨髄由来の DC を試験管内 (*in vitro*) で Man3-OML とともに処理しても、上記の応答の再現性は得られていなかった。第1章で述べた通り、Man-OML のヒトへの応用を目指す上で、*in vitro* での応答を確認することは必須である。

最近になり、HTLV (Human T cell leukemia virus) -1 の抗原を封入した Man3-OML を HTLV-1 患者の末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMC) と *in vitro* で培養したところ、HTLV-1 に特異的な CTL が誘導されたという報告がなされた (6)。この結果はヒト PBMC 中の細胞が Man3-OML を取り込み、その結果として T 細胞を活性化できるような成熟 APC が誘導された可能性を示唆していた。そこで筆者は、マウス PBMC を用いることで Man3-OML の

応答を *in vitro* で再現できるのではないかと考えた。本章ではマウス PBMC 中の MNP への Man3-OML の *in vitro* での取り込みと、その後の Man3-OML を取り込んだ細胞の活性化について検討した。

## 2-2. 実験材料および方法

### 2-2-1. 試薬および細胞、実験動物

Cholesterol、Ovalbumin (OVA)、Dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE)、Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)は Sigma-Aldrich より購入した。 $\alpha$ 1-6/ $\alpha$ 1-3 構造を持つ mannotriose は Funakoshi より購入した。FITC でラベルされた抗 Ly6C 抗体、抗 CD49b 抗体、抗 CD80 抗体、PE でラベルされた抗 CD86 抗体、抗 CCR2 抗体、抗 CCR7 抗体、抗 I-A/I-E 抗体、抗 CD206 抗体、抗 CD207 抗体、APCy でラベルされた抗 SIGNR1 (CD209b) 抗体は eBioscience と BioLegend から購入した。PerCP-Cy-5.5 でラベルされた抗 CD11b 抗体は BD Pharmingen より購入した。6-8 週齢のメス C57BL/6 マウスは日本 SLC 株式会社より購入した。全ての動物実験は東海大学の動物実験委員会の承認を得て行なった。

### 2-2-2. オリゴマンノース被覆リポソーム(OML)の作製

人工糖脂質は以下の方法で合成した。Chloroform/Methanol/Water (10:10:1, v/v/v) に溶かした 20  $\mu$ mol オリゴ糖と 70  $\mu$ mol DPPE を反応バイアル中で 10 分間超音波処理し完全に溶解した。次いで、300  $\mu$ mol の Sodium cyanoborohydride を 1 mL の Methanol に溶かし加え、80 °C で 5 時間反応させた。反応終了後溶媒を除去し、反応生成物を Chloroform/Methanol/Water (4:50:50, v/v/v) 10 mL に溶かし、平衡



化した C18 カラム (Bond Elute, MEGA BE-C18, Varian, Harbor City, CA) にアプライした。カラムを Chloroform/methanol/water (4:50:50, v/v/v) 50 mL で洗浄・脱塩し、Chloroform/Methanol/Water (10:10:3, v/v/v) 30 mL で全脂質を溶出した。溶出液から人工糖脂質のみを、Chloroform/Methanol/Water (65:30:5) から Chloroform/Methanol/Water (50:55:18) に至る直線濃度勾配条件下でシリカゲルカラム (Wakosil5SiL-120, 0.75×30 cm, Wako Pure Chemical, Tokyo, Japan) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製した。人工糖脂質の構造と純度は高性能薄層クロマトグラフィー (HPTLC) と Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS, Autoflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) を用いて確認した。精製した人工糖脂質は全リン酸量を測定することで定量した。

次に Man3-OML の作製の手順を示す (7)。Chloroform/Methanol (2:1, v/v) で溶解した DPPC と Cholesterol を各 1.5  $\mu\text{mol}$ 、人工糖脂質 0.15  $\mu\text{mol}$  をなし型フラスコ内で混合しエバポレーターで脂質フィルムを作製した。乾かした脂質フィルムに 5 mg/mL Alexa647-BSA もしくは 5 mg/mL OVA/PBS を加え、ボルテックスで分散させ多重層の小胞を調製した。その後、得られた小胞を 1  $\mu\text{m}$  のポリカーボネート膜 (Nucleopore, Pleasanton, CA) に 10 回以上通し、1  $\mu\text{m}$  の粒径に整え、リポソームを PBS で 3 回洗浄し、封入されなかった Alexa647 で標識された BSA (Alexa647-BSA) もしくは OVA/PBS を除去した。リポソーム内部に封入されたタンパク質の量は Modified Lowry protein assay Kit を使って定量し調製した。また、リポソームの粒子径サイズが 1  $\mu\text{m}$  であることを動的光散乱式粒径分布測定装置 (LB-550, Horiba, Kyoto, Japan) により確認した (データ未掲載)。

さらに、同様の手順で粒子径  $1\ \mu\text{m}$  の糖鎖を被覆していないリポソーム(BL)を、DPPC : Cholesterol (モル比 1:1) の構成比で作製した。

### 2-2-3. マウス末梢血単核球 (PBMC) の分画

マウス末梢血は麻酔下で心臓採血により回収し、Lympholyte-Mammal (Cedarlane Laboratories Ltd.) を用いて、遠心分離 (800 G, 20 分, RT) によって分画後 PBMC を得た。

### 2-2-4. OML の取り込み評価

マウス PBMC ( $1 \times 10^6$  /mL) を 10 % ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地に懸濁し、5%マウス血清存在化で Alexa647-BSA 封入 OML もしくは BL (Cholesterol 量で 40  $\mu\text{g}$  相当) を添加し、37 °C で 1 時間穏やかに攪拌しながら培養した。その後、PerCP-Cy-5.5 ラベル抗 CD11b 抗体、FITC ラベル抗 Ly6C 抗体、PE ラベル抗 CCR7 抗体、抗 CD206 抗体、抗 CD207 抗体、APCy ラベル抗 CD209b 抗体で染色しフローサイトメトリー (BD, FACS Verse) を用いて細胞表面分子の発現を観察した。

### 2-2-5. OML 取り込みによる *in vitro* での細胞表面分子の評価

マウス PBMC ( $1 \times 10^6$  /mL) を 10 % ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地に懸濁し、5 %マウス血清存在下で Man3-OML もしくは BL と 37 °C で 30 分間、穏やかに攪拌しながら培養した。その後、細胞が接着しないように特殊なポリマーでコーティングされた培養プレート (HydroCell®, CellSeed Inc.) に播種し

( $1 \times 10^6$  /mL) 37 °C で 24 時間培養した。PerCP-Cy-5.5 ラベル抗 CD11b 抗体、FITC ラベル抗 Ly6C 抗体、PE ラベル抗 CCR7 抗体、抗 CD206 抗体、抗 CD207 抗体、APCy ラベル抗 CD209b 抗体で染色しフローサイトメトリーで発現を確認した。

#### 2-2-6. OML 取り込みによる MHC-I 上への抗原の提示

マウス PBMC ( $1 \times 10^6$  /mL) を OVA 封入 OML もしくは OVA 封入 BL (OVA として 1  $\mu$ g) を 37 °C で 30 分間穏やかに攪拌し培養した。その後、温度応答性ポリマーで表面をコーティングされた培養プレート (UpCell®, CellSeed Inc.) に播種し、37 °C で 1 時間 5 % CO<sub>2</sub> 条件下で静置し浮遊細胞を除いた後、接着した細胞だけを 24 時間培養した。24 時間培養後培養プレートを低温下に置くことで接着細胞を浮遊させた。その後、細胞を PerCP-Cy-5.5 ラベル抗 CD11b 抗体、FITC ラベル抗 Ly6C 抗体、PE ラベル抗 H-2K<sup>b</sup> bound to SINFEKL 抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーで細胞表面分子の発現を確認した。

#### 2-2-7. OML 取り込みによる *in vitro* での抗原提示能の評価

マウス PBMC ( $1 \times 10^6$  /mL) を、10 % ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地に懸濁し、5 % マウス血清存在化で OVA 封入 Man3-OML もしくは OVA (1  $\mu$ g) を 37 °C で 30 分間穏やかに攪拌し培養した。その後、細胞を培養プレートに播種し、37 °C で 24 時間培養した。24 時間後に浮遊細胞を除去し、接着細胞に OT-1 マウスの脾臓から分離した CD8<sup>+</sup> T 細胞 ( $5 \times 10^5$  cells) (8) を加え、さらに 72 時間混合培養し培養上清を回収した。回収した上清をサンプルとして ELISA 法を用いて IFN- $\gamma$  産生量を測定した。

### 2-2-8. OML 取り込み後の *ex vivo* での抗原提示能の評価

Man3-OML を取り込んだ細胞を用いた養子免疫投与を行うために、OVA 封入 Man3-OML と 24 時間混合培養した接着細胞 ( $5 \times 10^4$  cells) を PBS に懸濁しマウスに皮下投与した。1 週間後に同様の投与を行った後、最後の投与から 2 週間後にマウスから脾細胞を回収した。回収した脾細胞 ( $5 \times 10^6$  /mL) を培養プレートに播種し 50  $\mu$ g/mL の OVA 存在下または非存在下で 72 時間培養した。この培養上清をサンプルとして ELISA 法を用いて IFN- $\gamma$  産生量を測定した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. OML はマウス炎症性単球に選択的に取り込まれる

抗原封入 Man3-OML と HTLV-1 患者から得た PBMC を共培養することで HTLV-1 特異的 CTL が *in vitro* で効率的に誘導されることが報告されている(6)。この結果は、ヒト PBMC 中の細胞が Man3-OML を取り込み、活性化したことで、生体外で CD8<sup>+</sup>T 細胞を活性化し抗原特異的な CTL が誘導したことを示唆していた。しかしながら、OML を取り込み、*in vitro* で T 細胞を活性化させる細胞は不明であった。そのため、*in vitro* で Man3-OML を積極的に取り込み、それに応答して活性化するマウス PBMC 中の細胞を明らかにすることを試みた。

まず、C57BL/6 マウスの末梢血から得た PBMC と Alexa647-BSA 封入 OML をマウス血清の有無条件下で共培養し Man3-OML を取り込んだ細胞内の Alexa647-BSA に由来する蛍光強度をフローサイトメトリーで解析した。マウス血清存在下において CD11b<sup>high</sup> 細胞に Man3-OML が取り込まれていることを確認した (Fig. 2-1A, right panel)。このときマウス血清非存在下では Man3-OML は

ほとんど取り込まれていなかった (Fig. 2-1A, left panel)。Man3-OML を取り込んだ CD11b<sup>high</sup> 細胞はマクロファージや単球のマーカーである F4/80 を発現していたことからマウス末梢血単球であると予想された (データ未掲載)。マウスにおける主な単球サブセットは Ly6C と CCR2 の発現で 2 種類に大別できることが知られている (9)。そこで Man3-OML を取り込む細胞上の Ly6C の発現を調べた。その結果、Man3-OML は CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞と CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>low</sup> 細胞に同程度に取り込まれていた。一方で CD11b<sup>low</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞には取り込まれなかった (Fig. 2-1B)。Ly6C は一部の B 細胞や T 細胞にも発現していることが知られているので、CD11b<sup>low</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞は Ly6C 陽性の B 細胞または T 細胞であることが考えられた。CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞では CCR2 を発現しており、他に CD49b の発現が確認できたが、CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>low</sup> 細胞ではどちらも発現していなかった (データ未掲載)。これらの結果から CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞はマウスにおける炎症性単球であり、CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>low</sup> 細胞は常在性単球であることが予想された。一方で糖を被覆していない BL はこれらの細胞に取り込まれなかった。そのため Man3-OML は糖鎖依存的に取り込まれたと考えられた。

### 2-3-2. 末梢血単球上の SIGNR1 の発現

筆者らのグループはこれまでに、腹腔内 MNP における Man3-OML の取り込みにマンノース結合型 C 型レクチン受容体 (CLR) の一つである SIGNR1 (CD209b) の関与を報告している (10)。そこでマウス PBMC における Man3-OML の取り込みにも CLR が関与しているか調べた。SIGNR1 の発現レベルは CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞において最も多く、CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>low</sup> 細胞での発現は

低いレベルであった (Fig. 2-2A)。一方で MMR (CD206) や Langerin (CD207) はどちらの細胞群にも発現が見られなかった。さらに SIGNR1 の発現が OML の取り込みに関与しているかを調べるために無標識抗 SIGNR1 抗体を用いて処理したところ、2つの細胞群は共に Man3-OML の取り込みが著しく低下した (Fig. 2-2B)。以上の結果から、血清存在下における *in vitro* でのマウス単球における Man3-OML の取り込みに関与している可能性が示された。以降の実験では 5%マウス血清存在下の条件を用いた。

### 2-3-3. OML を取り込むことにより炎症性単球は抗原提示分子の発現が増加する

腹腔内 MNP 上の MHC-II と補助刺激分子の発現は *in vivo* での Man3-OML の取り込みに応じて発現量が増加する (6)。そこで *in vitro* での Man3-OML の取り込みがマウス PBMC の活性化に関与するのか調べた。PBMC を Man3-OML と共に 30 分間、穏やかに攪拌しながら培養し、その後 24 時間培養した後、CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞と CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>low</sup> 細胞の細胞表面に存在する MHC-II と補助刺激分子 CD80、CD86 の発現量を比較した。CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞ではこれらの分子が顕著に増加した (Fig. 2-3 lower panel)。CD86 に関しては CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>low</sup> 細胞も発現量が増加していたが、MHC-II と CD80 においては、ほとんど発現量に変化は見られなかった (Fig. 2-3 upper panel)。さらに、CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞では CCR7 の発現量も増加していた。PBMC と BL を共に培養したところ、これらの分子の発現量の増加はどちらの細胞群でも見られなかった (データ未掲載)。

#### 2-3-4. *In vitro* で OML を取り込んだ単球の MHC-I 上への抗原提示と OT-1 由来 CD8<sup>+</sup>T 細胞の活性化

第 1 章で述べたとおり、MHC-I 上への外来性抗原のクロスプレゼンテーションは抗原特異的 CTL を誘導するために必須である。*in vivo* で Man3-OML を取り込んだ MNP は封入抗原を MHC-I にクロスプレゼンテーションすることは明らかにされているが (5)、*in vitro* で Man3-OML を取り込んだ MNP も同様に封入抗原をクロスプレゼンテーションできるかについては明らかではなかった。そこで、Man3-OML 内に封入された抗原が *in vitro* で Man3-OML を取り込んだ細胞上の MHC-I に提示されるかについて検討した。PBMC を OVA 封入 Man3-OML (Man3-OML/OVA) と共に 24 時間培養し、MHC-I の H-2Kb に結合した OVA 由来ペプチドである SIINFEKL (OVA<sub>257-264</sub> ペプチド) を特異的に認識する抗体 (anti-mouse H-2Kb bound to SIINFEKL) を用い、フローサイトメトリーで観察した。その結果、CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞はこの抗体で明確に染色されたことから、CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞では MHC-I-OVA ペプチド複合体として Man3-OML に封入された抗原がクロスプレゼンテーションされていることが確認できた (Fig. 2-4A right panel)。一方で CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>low</sup> 細胞では MHC-I への抗原ペプチドの提示を確認できなかった (Fig. 2-4A left panel)。この結果を踏まえ、Man3-OML 内の抗原を MHC-I へ提示した MHC-I-OVA ペプチド複合体分子を持つ CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞が CD8<sup>+</sup>T 細胞を活性化させて抗原特異的な CTL を誘導するような機能を保持しているかを検証することとした。PBMC を Man3-OML/OVA、BL/OVA、OVA (OVA 1 µg) と共にそれぞれ穏やかに攪拌しながら培養した後、培養プレートに播種した。1 時間後に浮遊細胞を除去、接着

細胞のみを 24 時間培養した。24 時間後、OT-I マウスの脾細胞から分離した CD8<sup>+</sup>T 細胞を加え、さらに 72 時間培養した。72 時間後の培養上清をサンプルとし、ELISA 法を用いて IFN- $\gamma$  の産生量を測定した。その結果、CD8<sup>+</sup>T 細胞は Man3-OML/OVA 処理した細胞と混合培養した時にだけ、IFN- $\gamma$  を顕著に産生した (Fig. 2-4B)。これらの結果から、*in vitro* で Man3-OML を取り込んだ CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞は Man3-OML 内の抗原をクロスプレゼンテーションすることで MHC-I-ペプチド複合体として細胞表面に提示し、CD8<sup>+</sup>T 細胞を活性化できることが明らかになった。

### 2-3-5. OML/OVA 取り込み後の単球の移植による Th1 免疫応答の誘導

清水らは、抗原封入 Man3-OML の投与により抗原特異的な Th1 免疫応答を誘導することを明らかにしている (11)。そこで、PBMC に *in vitro* で Man3-OML/OVA を取り込ませ、得られた活性化細胞が生体において正常に機能し、Man3-OML を直接投与した場合と同様に Th1 免疫応答を導くことができるかを調べるため、養子免疫を行った。PBMC を Man3-OML/OVA、BL/OVA、OVA と共に培養し培養プレートに接着した細胞を回収し、C57BL/6 マウスの皮下へ  $5.0 \times 10^4$  cells の細胞を投与 (週 1 回、2 週間) した。最終投与から 2 週間後の脾細胞を回収して OVA で再感作し、72 時間培養後の培養上清中の IFN- $\gamma$  の産生量を、ELISA 法を用いて測定した。Man3-OML/OVA 処理した細胞を皮下投与したマウス由来の脾細胞からの IFN- $\gamma$  の産生量は、Man3-OML/OVA を直接投与したマウス由来の脾細胞と同等のレベルであった (Fig. 2-5)。一方で、BL/OVA 処理した細胞と未処理細胞を投与したマウスでは IFN- $\gamma$  の産生は誘導されなかった。また、



Man3-OML/OVA を投与したマウスからは Th2 免疫応答の指標となる IL-4 の産生は確認されなかった。このことから、*in vitro* で Man3-OML を取り込んだ CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞は MHC-II 上に抗原ペプチドを提示し、生体内において Th1 免疫応答を導くことができる成熟 APC に分化していることが示唆された。

#### 2-4. 考察

末梢血単球は、生体を循環する単核細胞のサブセットであり、組織マクロファージや DC に分化できることが知られている。マウスの末梢血単球では Ly6C、CCR2、CX3CR の発現に基づいて次の様な二つの主要なサブセットに分類される(9)。Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup>CXCR1<sup>-</sup> の表現型を持つマウス単球は CD49b と CD62L を発現しており (12)、この様な単球は感染部位や炎症部位へ速やかにリクルートされることから、一般に炎症性単球 (Inflammatory monocytes) とよばれている。また炎症性単球は、炎症状態などにおいて速やかにマクロファージや DC に分化できる。一方、Ly6C<sup>low</sup>CCR2<sup>-</sup>CXCR1<sup>+</sup>の表現型を持つ単球は定常状態でのみ組織内へ移行できる単球であるため、常在性あるいはパトロール単球 (resident or patrolling monocytes) とよばれており、生体の恒常性を維持するために重要であると考えられている (9)。

第 2 章では、マウス末梢血を用いた検討から、マウス炎症性単球 (CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞) が *in vitro* で Man3-OML を取り込み、Man3-OML の取り込みに応答して活性化・成熟化することを以下の 4 つの主要な結果で示した。

① CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞および CD11b<sup>high</sup> Ly6C<sup>low</sup> 細胞はともに *in vitro* で Man3-OML を細胞内に取り込む。② *in vitro* で Man3-OML を取り込んだ

CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞は 24 時間以内に MHC-II、補助刺激分子、CCR7 の発現の上昇がみられる。③ *in vitro* で Man3-OML を取り込んだ CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> 細胞では Man3-OML に封入された抗原が MHC-I に提示される。④ *in vitro* で Man3-OML を取り込んだ単球は OT-I マウス由来の CD8<sup>+</sup>T 細胞を活性化する。これらの知見は、Man3-OML が *in vitro* で炎症性単球に対し、抗原と活性化シグナルの両者を送達して、CD8<sup>+</sup>T 細胞を活性化できるような成熟した抗原提示細胞へと誘導できることを示している。

循環系における炎症性単球の役割は未だにはっきりしていないが、これらの単球が真皮感染部位にリクルートされ、原虫感染に対する Th1 免疫応答に関与していることが示されている (13)。また炎症性単球は Thioglycolate の投与によって腹腔内に急速に蓄積するが (9)、この様な単球は局所的で防御的な CTL 応答を示す NO 産生型の DC と同等であるという報告もある (14,15)。また炎症性単球がリンパ節にリクルートされたのちに、IL-12 を産生し Th1 免疫応答を誘導できる炎症性の DC に分化することも報告されている (16)。

さて、炎症性単球上の Ly6C は炎症性単球がマクロファージや DC に分化するときに急速に減少することが知られている (17)。しかしながら、Man3-OML 取り込み後 24 時間の炎症性単球では、MHC-II の発現上昇などは明確に認められたにも関わらず、Ly6C や F4/80 の発現にはほとんど変化がみられなかった (データ未掲載)。この様なことから、マウス炎症性単球は *in vitro* で Man3-OML を取り込んで 24 時間以内ではまだ完全に DC には分化していないと考えられた。

本章で筆者は、*in vitro* で Man3-OML を取り込んだ単球を皮下に養子免疫したマウスで抗原特異的な Th1 免疫応答が誘導されることも示した。Man3-OML は

炎症性単球および常在性単球の両細胞群に取り込まれるが、常在性単球は LPS 刺激のような炎症性の刺激に対してほとんど応答しないことが知られており (18)、実際に Man3-OML の取り込みに対してもほとんど応答を示さなかった。したがって、Man3-OML を取り込んだ単球の養子免疫による Th1 免疫応答の誘導は、主に Man3-OML を取り込んだ炎症性単球によってもたらされており、この炎症性単球は生体内に戻されたのち、獲得免疫を誘導できるような DC へと分化したと考えられた。一方最近の研究から、炎症性単球がマクロファージや DC に分化することなく非リンパ組織に侵入できることが示唆されており、このような細胞は「組織単球 (Tissue monocyte)」とみなされている (18)。炎症性単球由来の組織単球は、組織で抗原を取り込んだ後に MHC-II などの発現上昇を伴い活性化し、リンパ組織に移動して T 細胞に対して抗原を提示することで獲得免疫を誘導できる (19)。したがって、皮下に移植された Man3-OML を取り込んだ炎症性単球が組織単球のような細胞へと組織内で分化し、リンパ組織に移動後に獲得免疫を誘導している可能性も考えられる。

本章では、マウス末梢血中の炎症性単球が *in vitro* で Man3-OML を取り込み活性化し、抗原をクロスプレゼンテーションして Th1 免疫応答を誘導できる細胞へと分化することを示した。この結果は、第 1 章でも述べた通り、*in vivo* で得られていた Mna3-OML のアジュバント活性が *in vitro* でも、ほぼ *in vivo* の場合と同様に再現できたことを意味している。従って、ヒト単球または DC において *in vitro* で Man3-OML のアジュバント活性が再現できれば、Man3-OML が細胞性免疫誘導型のヒトアジュバントとしても使用できると考えられる。一方で、*in vitro* で Man3-OML によって活性化し、抗原をクロスプレゼンテーションした細

胞を生体に戻すことで抗原特異的な Th1 免疫応答を誘導できたということは、Man3-OML を用いた新たな細胞免疫療法の構築の可能性を示している。がんに対する DC 療法 (DC-based cancer immunotherapy) は 20 年来にわたって試行錯誤が続いている (20)。この療法の鍵の一つが生体外での成熟 DC の作製にある。抗原を提示した成熟 DC を生体外で作製する典型的な方法として、ヒト末梢血単球をサイトカイン存在下で未成熟 DC へと生体外 (*ex vivo*) で分化させた後、特異的ながん抗原を DC の MHC 上に強制的に負荷し、最終的に特別なサイトカインカクテルを用いることで未成熟 DC を成熟 DC へと導く。このようにして誘導された成熟 DC を患者に再導入することで、がんに対するがん細胞特異的 CTL を誘導することが DC 療法の基本的戦略となる。マウス末梢血炎症性単球で見出された *in vitro* での Man3-OML に対する応答がヒト炎症性単球および単球由来 DC でも再現できるのであれば、Man3-OML を用いて簡便かつ迅速に成熟 APC を作製できると考えられる。

## 2-5. 参考文献

1. H. Takagi, N. Furuya, N. Kojima. Preferential production of IL-12 by peritoneal macrophages activated by liposomes prepared from neoglycolipids containing oligomannose residues. *Cytokine*, 40, 241-250 (2007)
2. M. Ishii, C. Kato, A. Hakamata, N. Kojima. Targeting with oligomannose-coated liposomes promotes maturation and aplanic trafficking of dendritic cells in the peritoneal cavity. *Int Immunopharm*, 11(2), 164-171 (2011)
3. Y. Ikehara, T. Niwa, L. Biao, S.K. Ikehara, N. Ohashi, T. Kobayashi, Y. Shimizu, N,

- Kojima, H. Nakanishi. A carbohydrate recognition-based drug delivery and controlled release system using intraperitoneal macrophages as acellular vehicle. *Cancer Res*, 66, 8740-8748 (2006)
4. H. Takagi, N. Furuya, N. Kojima. Preferential production of IL-12 by peritoneal macrophages activated by liposomes prepared from neoglycolipids containing oligomannose residues. *Cytokine*, 40, 241-250 (2007)
  5. Y. Ikehara, N. Shiuchi, S. Kabata-Ikehara, H. Nakanishi, N. Yokoyama, H. Takagi, T. Nagata, Y. Koide, K. Kuzushima, T. Takahashi, K. Tsujimura, N. Kojima. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal macrophage. *Cancer Lett.*, 260,137-145 (2008)
  6. T. Kozako, S. Hirata, Y. Shimizu, Y. Satoh, M. Yoshimitsu, Y. White, F. Lemonnier, H. Shimeno, S. Soeda, N. Arima. Oligomannose-coated liposomes efficiently induce human T-cell leukemia virus-1-specific cytotoxic T lymphocytes without adjuvant. *FEBS J.*, 278, 1358-1366 (2011)
  7. N.Kojima, L. Biao, T. Nakayama, M. Ishii, Y. Ikehara, K. Tsujimura. Oligomannose-coated liposomes as a therapeutic antigen-delivery and an adjuvant vehicle for induction of in vivo tumor immunity. *J. Control. Rel.*, 129, 26-32 (2008)
  8. Y. Ikehara, N. Shiuchi, S. Kabata-Ikehara, H. Nakanishi, N. Yokoyama, H. Takagi, T. Nagata, Y. Koide, K. Kuzushima, T. Takahashi, K. Tsujimura, N. Kojima. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal macrophage. *Cancer Lett.*, 260,137-145 (2008)
  9. F. Geissmann, S. Jung, R.D. Littman. Blood monocytes consist of two principal

- subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19, 71-82, (2003)
10. H. Takagi, M. Numazaki, T. Kajiwara, Y. Abe, M. Ishii, C. Kato, N. Kojima. Cooperation of specific ICAM-3 grabbing nonintegrin related 1 (SIGNR1) and complement receptor type 3 (CR3) in uptake of oligomannose-coated liposomes by macrophages. *Glycobiology*, 19, 258-266 (2009)
  11. Y. Shimizu, H. Takagi, T. Nakayama, K. Yamakami, T. Tadakuma, N. Yokoyama, N. Kojima. Intraperitoneal Immunization With Oligomannose-Coated Liposome-Entrapped Soluble Leishmanial Antigen Induces Antigen-Specific T-helper Type 1 Immune Response in BALB/c Mice Through Uptake by Peritoneal Macrophages. *Parasit. Immunol.*, 29, 229-239 (2007)
  12. S. Gordon, R.P. Taylor Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 5, 953-964 (2005)
  13. B. Leon, M. Lopez-Bravo, C. Ardavin. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity*, 26, 519-531 (2007)
  14. N.V. Serbina, T.P. Salazar-Mather, C.A. Biron, W.A. Kuziel, E.G. Pamer. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*, 19, 59-70 (2003)
  15. J.R. Aldridge Jr., C.E. Moseley, D.A. Boltz, N.J. Negovetich, C. Reynolds, J. Franks, S.A. Brown, P.C. Doherty, R.G. Webster, P.G. Thomas. TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106, 5306-5311 (2009)

16. H. Nakano, K.L. Lin, M. Yanagita, C. Charbonneau, D.N. Cook, T. Kakiuchi, M.D. Gunn. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat. Immunol.*, 10, 394-402 (2009)
17. M. Plantinga, M. Guilliams, M. Vanheerswynghele, K. Deswarte, F. Branco-Madeira, W. Toussaint, L. Vanhoutte, K. Neyt, N. Killeen, B. Malissen, H. Hammad, B.N. Lambrecht. Conventional and monocyte-derived CD11b<sup>+</sup> dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity*, 38, 322-335 (2013)
18. P. Italiani, D. Boraschi. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.*, 5, 514 (2014)
19. C. Jakubzick, E.L. Gautier, S.L. Gibbings, D.K. Sojka, A. Schlitzer, T.E. Johnson, S. Ivanov, Q. Duan, S. Bala, T. Condon, N. van Rooijen, J.R. Grainger, Y. Belkaid, A. Ma'ayan, D.W. Riches, W.M. Yokoyama, F. Ginhoux, P.M. Henson, G.J. Randolph. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*, 39, 599-610 (2013)
20. S. Anguille, E. L. Smits, C. Bryant, H. H. V. Acker, H. Goossens, E. Lion, P. D. Fromm, D. N. Hart, V. F. V. Tendeloo, Z. N. Berneman. Dendritic Cells as Pharmacological Tools for Cancer Immunotherapy. *Oharmacol Rev.*, 67(4), 731-753 (2015)

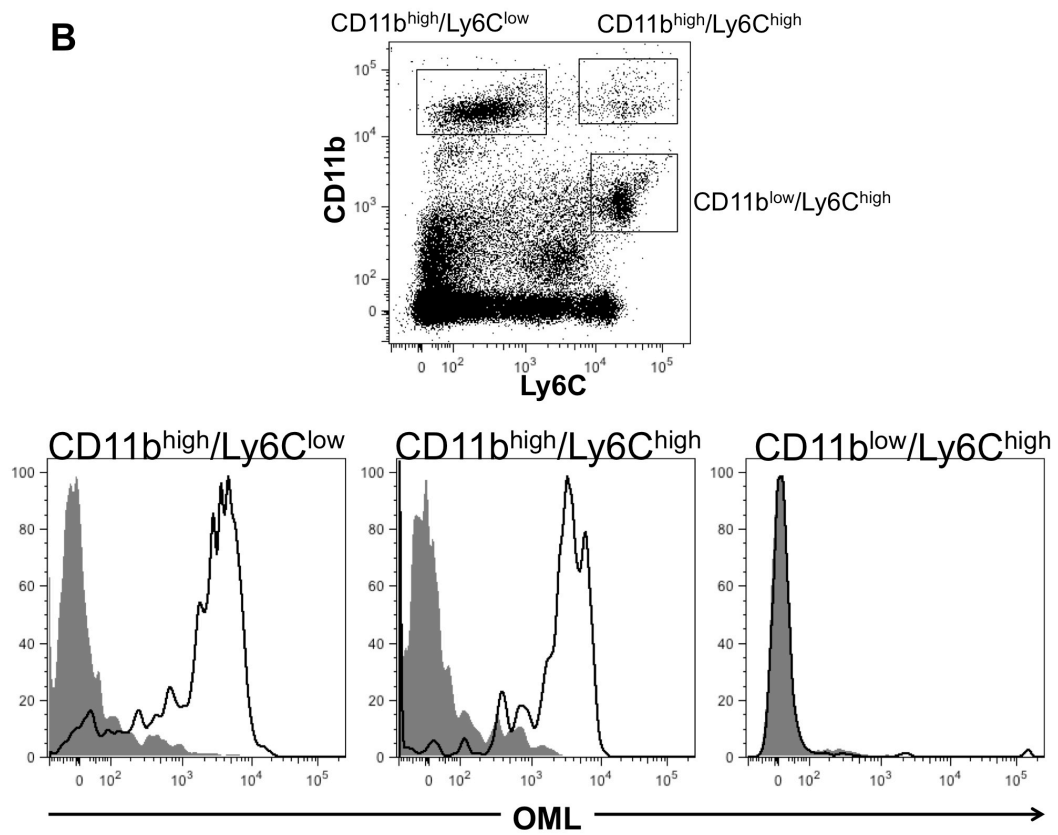
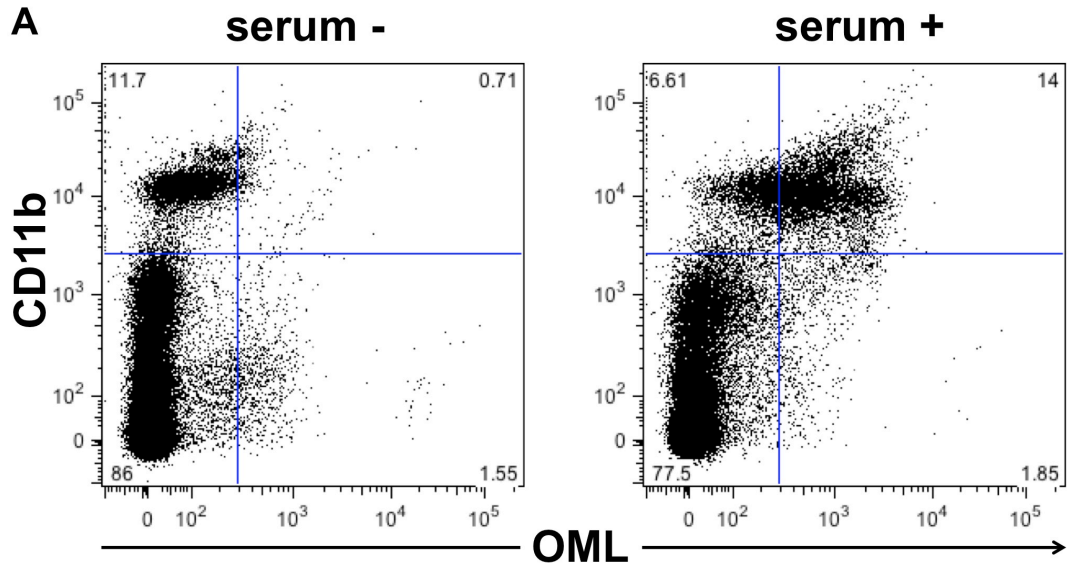




Fig.2-1. Uptake of OML by peripheral blood monocytes *in vitro*.

(A) Peripheral blood mononuclear cells isolated from C57BL/6 mice were incubated with Alexa647 labeled-BSA encasing OMLs (Alexa647-OML) for 30 min with or without mouse serum, stained with cell lineage markers, and then uptake of OMLs was evaluated based on the fluorescent intensity of Alexa647 in the cells.

(B) The OML-treated or BL-treated cells were gated based on the expression of CD11b and Ly6C (indicated by rectangles), and the uptake of OMLs into CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>high</sup> cells (Ly6C<sup>high</sup>monocytes), CD11b<sup>high</sup>Ly6C<sup>low</sup> cells (Ly6C<sup>low</sup>monocytes), and CD11b<sup>low</sup>Ly6C<sup>high</sup> cells was analyzed. The open peaks and gray closed peaks indicate OML-treated and BL-treated cells, respectively.

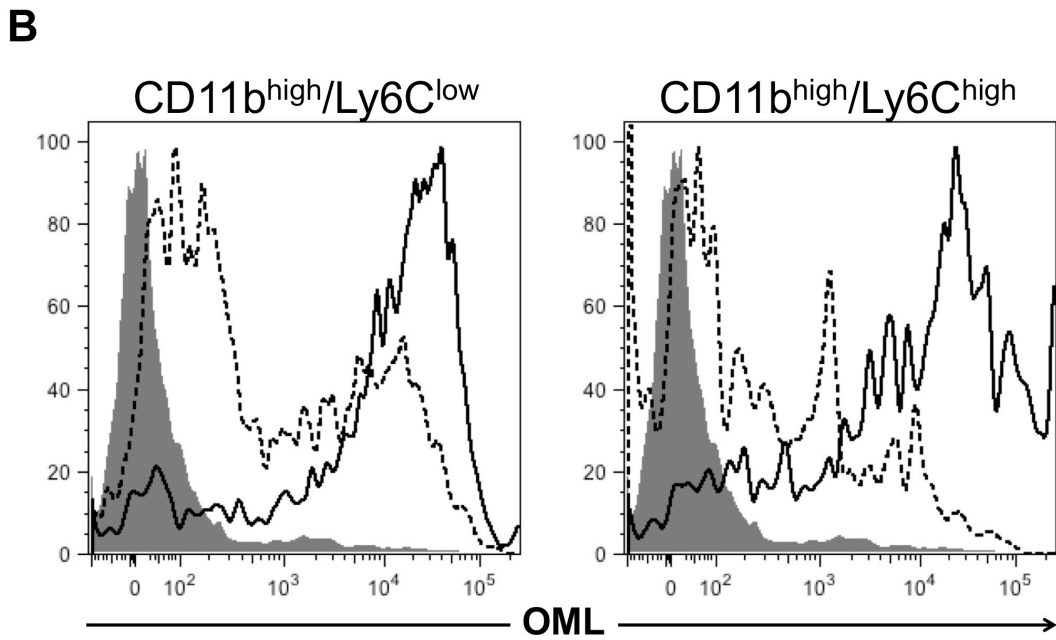
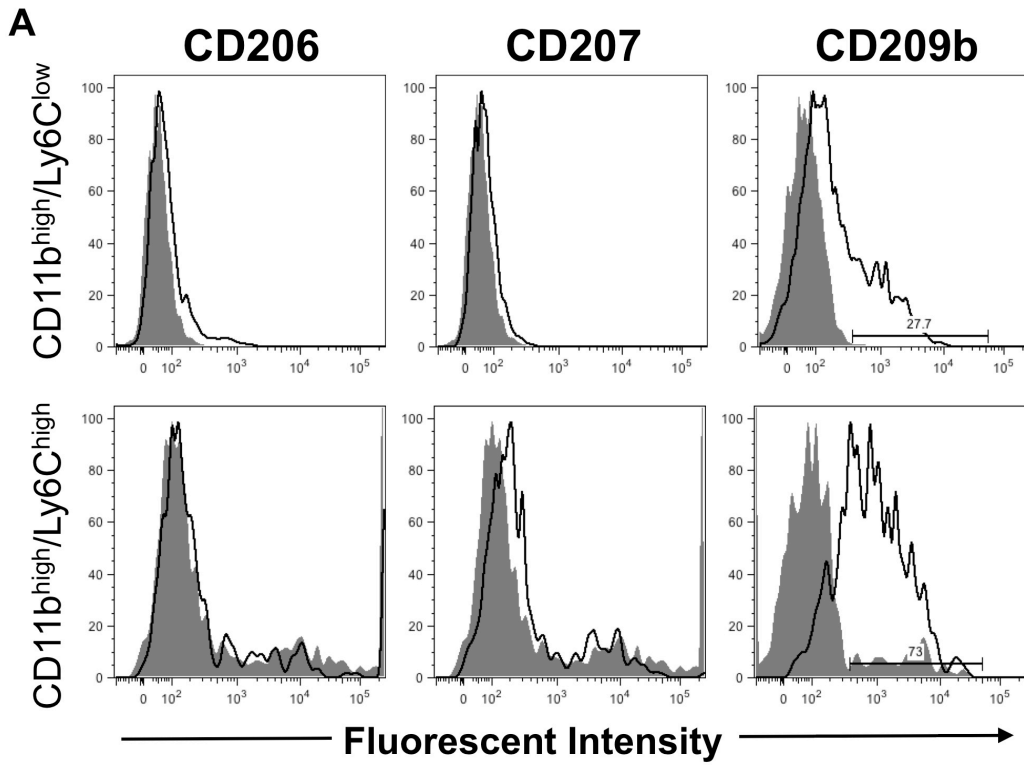


Fig. 2-2. Expression of C-type lectin receptors on peripheral blood monocytes.

(A) The expression of SIGNR1 (CD209b), CD206, and CD207 on both Ly6C<sup>high</sup> and Ly6C<sup>low</sup> monocytes was analyzed. The open peaks and gray closed peaks indicate specific antibody and isotype control, respectively.

(B) Cells were first treated with either 10µg/ml of an anti-SIGNR1 monoclonal antibody (dashed lines) or the corresponding isotype (solid lines) for 1 h and then incubated with Alexa647 labeled-BSA encasing OMLs for 1 h. Then, the uptake of OMLs by Ly6C<sup>high</sup> monocytes and Ly6C<sup>low</sup> monocytes was evaluated. The gray closed peaks indicate nontreated cell.

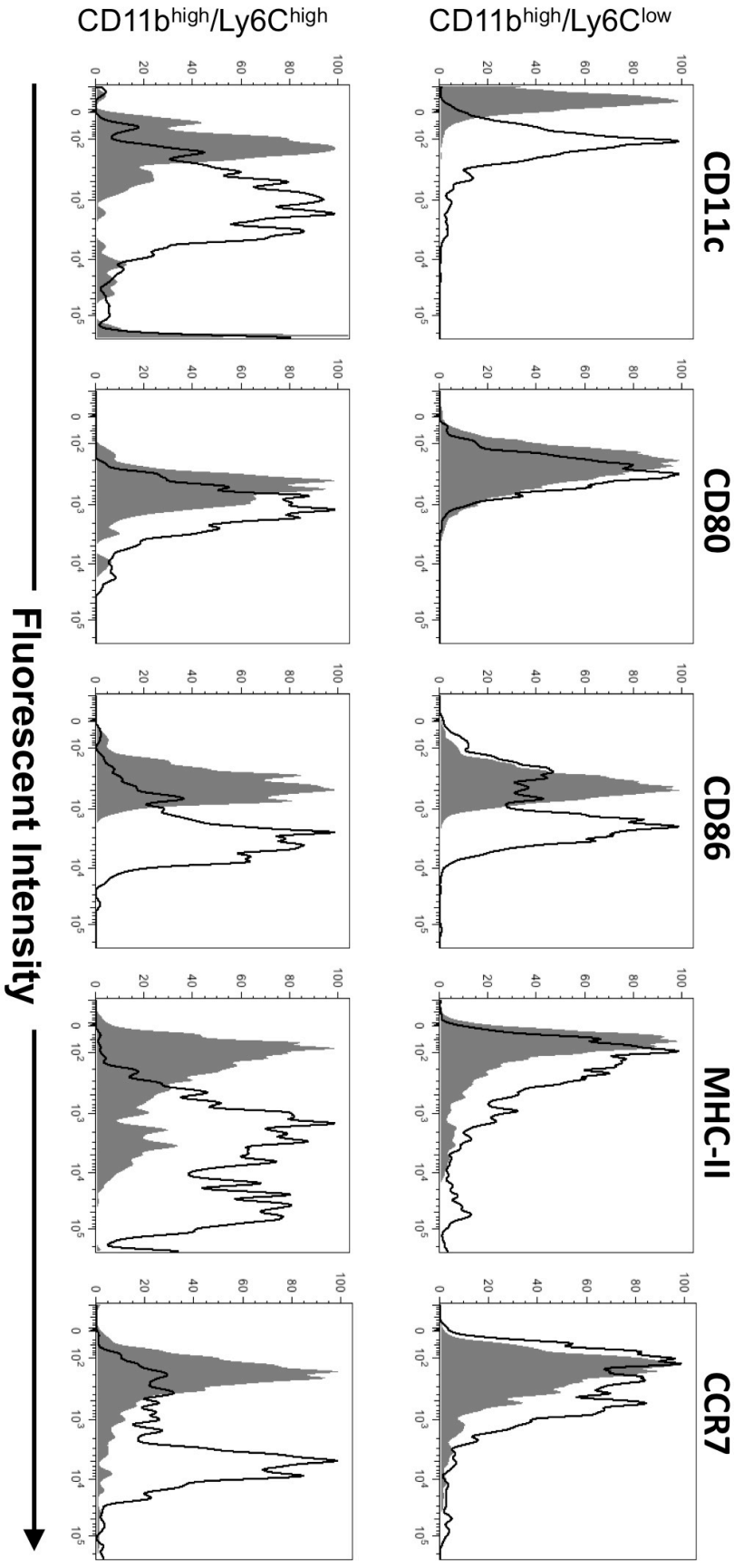


Fig. 2-3 Upregulation of co-stimulatory molecules and MHC-II on Ly6C<sup>high</sup> monocytes in response to OML uptake.

Peripheral blood mononuclear cells were incubated with unlabeled OMLs for 30 min and then cultured for 24 h in non-adherent wells. Expression of CD11c, CD80, CD86, MHC-II and CCR7 was analyzed before (gray peaks) and after 24 h of culture (open peaks).

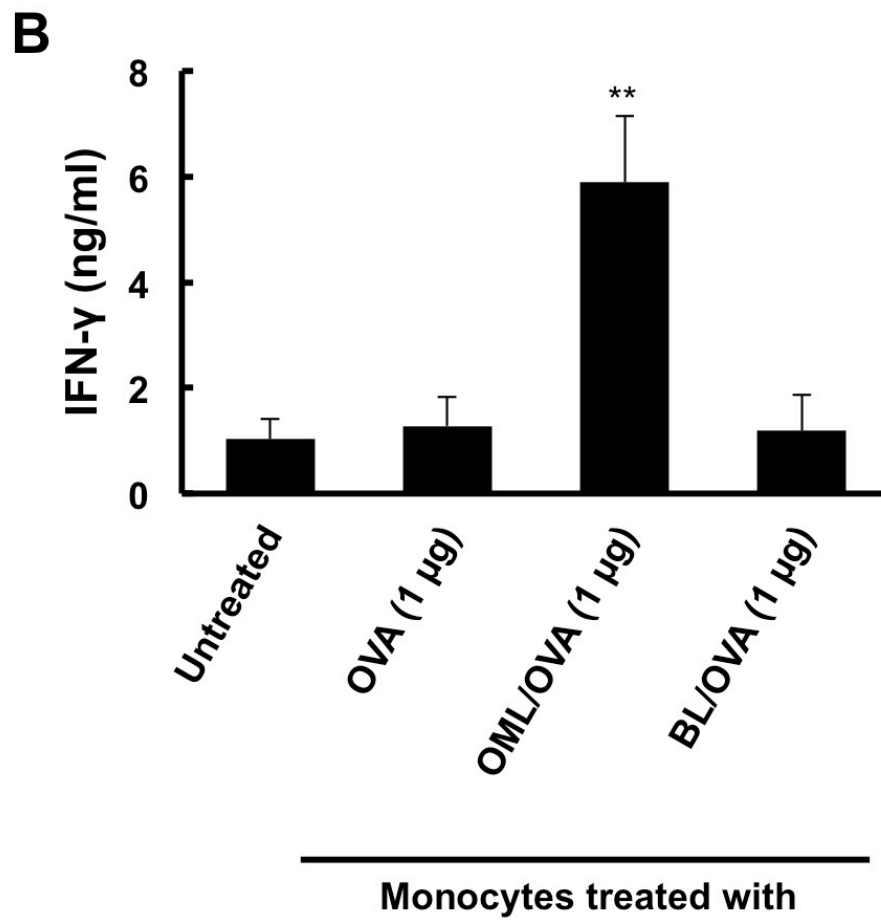
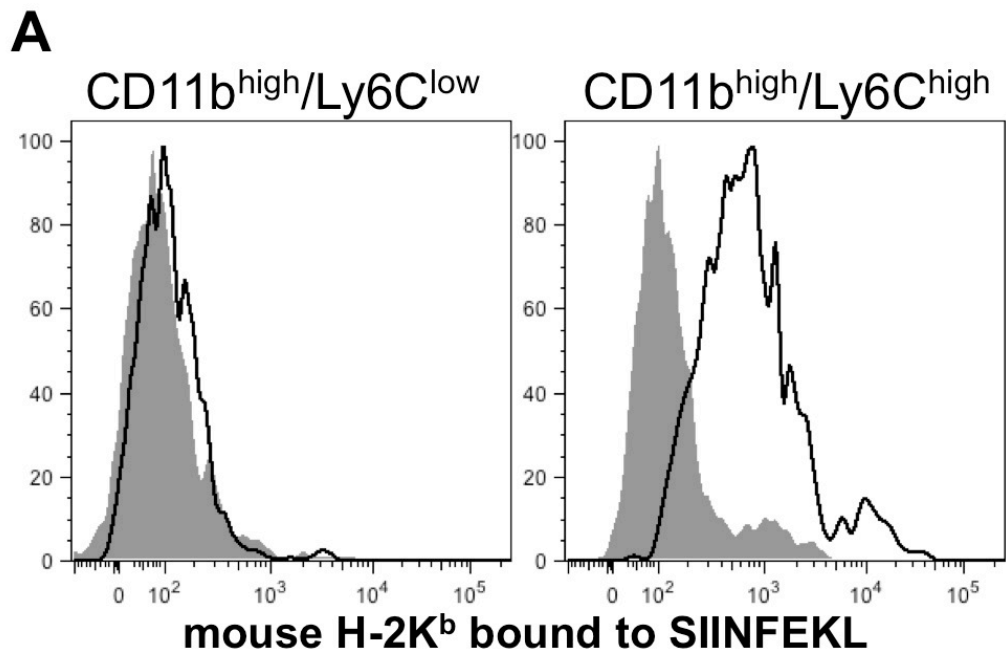


Fig.2-4 Presentation of OML-encased antigen on MHC class I and activation of CD8<sup>+</sup> T cells from OT-I mice.

(A) Peripheral blood mononuclear cells were incubated with OVA-encased OMLs (20µg/ml of cholesterol) for 30 min, and then cultured for 24 h in non-adherent wells. The cells were stained with anti-CD11b, anti-Ly6C, and anti-H-2Kb bound to SIINFEKL.

(B) Mononuclear cells treated either with OML/OVA, BL/OVA, or OVA were seeded on wells of a 24-well culture plate and incubated for 1 h at 37 °C. After washing off the non-adherent cells, the adherent cells were cultured with CD8<sup>+</sup>T cells ( $5 \times 10^5$ ) isolated from OT-I mouse spleens. After 72 h incubation, the culture supernatants were collected, and the IFN- $\gamma$  levels were analyzed by ELISA. Each bar shows the means  $\pm$  SD for 5 mice. Statistical significance among the groups was evaluated by t-test of variance.

\*\*P < 0.01 vs. untreated cells.

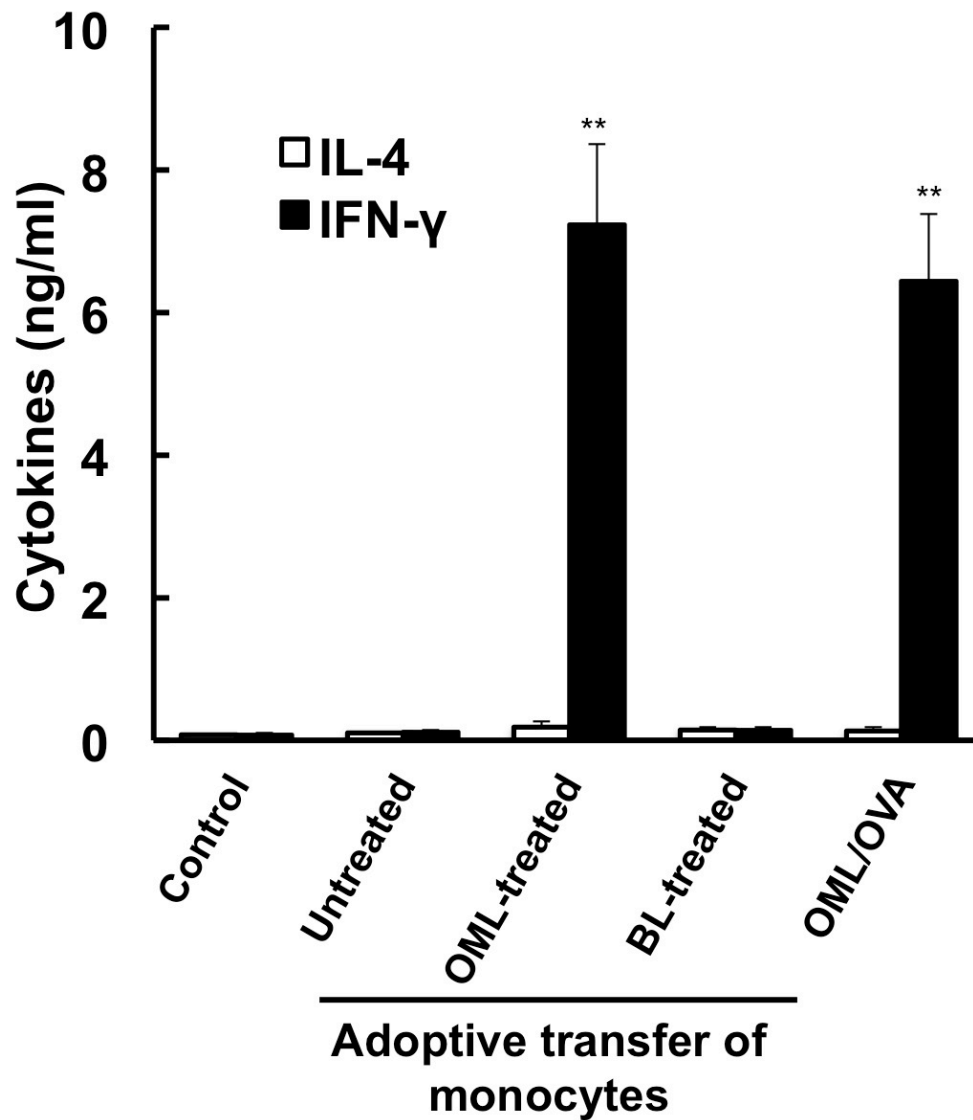


Fig. 2-5 Adoptive transfer of monocytes treated with OML/OVA.

Mononuclear cells treated with either OML/OVA, BL/OVA, or OVA were seeded on a culture dish with a surface grafted containing a temperature-responsive polymer, and incubated at 37 °C for 1 h. After non-adherent cells were removed by extensive washing with pre-warmed culture medium, adherent cells were recovered by culturing the cells at 4 °C for 30 min. The resulting adherent cells ( $5 \times 10^4$ ) were suspended in PBS and



injected subcutaneously into C57BL6 mice. Alternatively, OML/OVA (1 $\mu$ g of OVA) as a control was injected subcutaneously. A booster administration was given seven days after the first immunization. One week after the final administration, mice were sacrificed, and single cell suspensions were prepared from spleens isolated from each mouse, and cultured in the presence or absence of OVA. The supernatants were collected at 72 h, and the IFN- $\gamma$  and IL-4 levels in the culture supernatants were quantified. Each bar shows the mean  $\pm$  SD for 5 mice. Statistical significance among the groups was evaluated by t-test of variance. \*\*P < 0.01 vs. untreated cells.

## 第3章 ヒト単球系培養細胞（THP-1）の糖鎖被覆リポソームへの応答

### 3-1. 序論

第2章で筆者は、抗原封入 Man3-OML と末梢血単核球を生体外で混合培養することでマウス末梢血中の炎症性単球が CTL を誘導できるような APC へと成熟化すること、生体外で Man3-OML を用いて処理した炎症性単球を生体内に戻した時に抗原特異的な Th1 免疫応答を誘導できることを示した。この知見は、マウスの *in vivo* で観察されていた Man3-OML による細胞性免疫応答の誘導がマウス炎症性単球を用いることで *in vitro* で再現できたことを示している。従って、ヒト炎症性単球を用いることで、マウス炎症性単球でみられた様な Man3-OML による免疫応答誘導 *in vitro* で再現できれば Man3-OML をヒトの細胞性免疫誘導型ワクチンアジュバントとして利用できると考えられる。しかし、ヒト MNP がマウス同様に Man3-OML に応答するかについては未だに検証されておらず、Man3 とは異なる構造をもつオリゴマンノースがヒトでは細胞性免疫応答誘導に適している可能性もある。

THP-1 細胞はヒト急性単球性白血病（Human acute monocytic leukemia）由来の培養細胞株であり、phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA）で適切に処理することでマクロファージ様に分化することが知られおり、PMA で処理した THP-1 細胞はマクロファージや炎症性単球のモデル細胞として数多くの研究で使用されている (1)。そこで本章では、PMA-stimulated THP-1 細胞をヒト MNP のモデル細胞として用いて、様々なオリゴマンノースを被覆した OML によるヒト MNP の活性化を検証し、その活性化メカニズムについても検討した。

## 3-2. 実験材料および方法

### 3-2-1. 試薬および細胞

THP-1 細胞は 2 mM グルタミン、100 U/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンおよび 10 %ウシ胎児血清含有 RPMI1640 培地で培養した。THP-1 細胞 ( $5 \times 10^5$  /mL) を 5 ng/mL の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で 24 時間刺激した。24 時間後、浮遊細胞は取り除き接着細胞だけをさらに 48 時間 PMA 非存在下で培養した。この細胞を PMA-stimulated THP-1 とした。

### 3-2-2. 様々な糖鎖被覆リポソーム

$\alpha$ 1-3,1-6-Mannotriose (Man3)、Mannopentaose (Man5)、 $\alpha$ 1-2-Mannobiose ( $\alpha$ 1-2-Man2)、 $\alpha$ 1-3-Mannobiose ( $\alpha$ 1-3-Man2)、 $\alpha$ 1-4-Mannobiose ( $\alpha$ 1-4-Man2)、 $\alpha$ 1-6-Mannobiose ( $\alpha$ 1-6-Man2) をフナコシより購入した。人工糖脂質は第 2 章で述べた手順に従って、各オリゴ糖と DPPE を還元アミノ化により縮合させ合成・精製し、Man3-DPPE, Man5-DPPE,  $\alpha$ 1-2-Man2-DPPE,  $\alpha$ 1-3-Man2-DPPE,  $\alpha$ 1-4-Man2-DPPE,  $\alpha$ 1-6-Man2-DPPE を得た。それぞれの人工糖脂質の構造を Fig. 3-1 に示した。次にこれら人工糖脂質を用いて第 2 章で述べた手順に従って(2)、Man3-OML、Man5-OML、 $\alpha$ 1-2Man2-OML、 $\alpha$ 1-3Man2-OML、 $\alpha$ 1-4Man2-OML、 $\alpha$ 1-6Man2-OML を作製した。また、粒子径は 1  $\mu$ m、0.8  $\mu$ m、0.4  $\mu$ m、0.2  $\mu$ m のポリカーボネート膜 (Nucleopore, Pleasanton, CA) に順次 10 回以上通し、各粒子径に整えた。各種 OML の構成は、前章と同様 DPPC、cholesterol、人工糖脂質が 10 : 10 : 1 のモル比率である。

### 3-2-3. PMA-stimulated THP-1 における OML 取り込みに伴う細胞表面分子の評価と IL-12p40 の産生評価

PMA-stimulated THP-1 ( $1 \times 10^6$  /mL) に 5 % ヒト血清存在下において FITC 封入 Man3-OML (Cholesterol 量で 40  $\mu$ g 相当) を 37 °C で、30 分間穏やかに攪拌し、非接着培養プレート (HydroCell®, CellSeed Inc.) に播種し、48 時間培養した。ポジティブコントロールとして *E.coli* O111:B5 由来の LPS (400 ng/mL) と Zymosan (1  $\mu$ g/mL) で刺激した。これらの細胞に FITC ラベル抗 CD11c 抗体、抗 CD16 抗体、抗 CD40 抗体、抗 CD80 抗体、抗 CD123 抗体、PE ラベル抗 CD86 抗体、抗 CD209 抗体、抗 CD169 抗体、抗 CCR7 抗体、APCy ラベル抗 CD14 抗体、抗 CD83 抗体、抗 CD206 抗体、抗 HLA-DR (hMHC-II) 抗体 (全て eBioscience より購入した) で染色し、フローサイトメトリーを用いて細胞表面の発現分子を確認した。また、培養 48 時間の培養上清をサンプルとし ELISA 法を用いて IL-12p40 産生量を測定した。

### 3-2-4. PMA-stimulated THP-1 におけるさまざまなリポソームに対する応答評価

PMA-stimulated THP-1 ( $1 \times 10^6$  /mL) と FITC-BSA を封入した Man3-OML、Man5-OML、 $\alpha$ 1-2Man2-OML、 $\alpha$ 1-3Man2-OML、 $\alpha$ 1-4Man2-OML、 $\alpha$ 1-6Man2-OML を 5 % ヒト血清存在下において 37°C で混合し、30 分間穏やかに攪拌し、その後培養プレートに播種し 48 時間培養した後の細胞表面 HLA-DR と OML の取り込みをフローサイトメトリーで確認した。

### 3-2-5. OML によって誘導される IL-12p40 の産生への特異的シグナル阻害剤の影響

PMA-stimulated THP-1 ( $2 \times 10^6$  /mL) に、各特異的シグナル阻害剤 c-jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤 (SP600125; 10  $\mu$ M)、Extracellular Signal-regulated Kinase-1/2 (ERK-1/2) 阻害剤 (PD98059; 10  $\mu$ M)、Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 阻害剤 (Ly294002; 25  $\mu$ M)、I $\kappa$ B kinase (IKK) 阻害剤 (IKK inhibitor VII; 2  $\mu$ M)、Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) -dependent signaling network 阻害剤 (BAY11-7082; 5  $\mu$ M) で処理し、OML もしくは LPS を加え 37 °C 1 時間穏やかに攪拌した後、48 時間培養した。細胞培養上清をサンプルとし、ELISA 法を用いて IL-12p40 の産生量を測定した。

## 3-3. 結果

### 3-3-1. OML による PMA-stimulated THP-1 の活性化は LPS 刺激と同等の活性化を示す

THP-1 は PMA で処理すると MNP の表現型を示すことが知られているため(1)、本研究においても PMA-stimulated THP-1 をヒト MNP モデルとして用いた。PMA-stimulated THP-1 は Man3-OML を取り込むと、TLR-4 agonist である LPS や TLR-2 agonist である Zymosan で刺激した時と同様に HLA-DR (ヒト MHC-II) と CD80 の発現が増加した (Fig. 3-2A)。一方で、糖鎖を被覆していないリポソーム (BL) で処理した場合これらの発現の増加は確認できなかった。さらに、Man3-OML を取り込んだ PMA-stimulated THP-1 は LPS と同程度の IL-12p40 を産

生しており (Fig. 3-2B)、細胞表面に発現する CD40、CCR7、CD123 (IL-3 receptor  $\alpha$ chain)も増加していた (Fig. 3-2C, D)。また、CD169 (Siglec1) は LPS で刺激した場合のみ、CD209 (DC-SIGN) は Man3-OML で刺激した場合のみ発現が増加した (Fig. 3-2C)。

### 3-3-2. 様々な OML による PMA stimulated THP-1 の活性化

第 2 章において、マウス炎症性単球ではマンノトリオースで被覆した Man3-OML により細胞の活性化を確認したが、ヒト MNP の活性化における最適な糖鎖被覆リポソームは明らかになっていない。そこでオリゴマンノース構造を持つ各種 OML を用いて PMA-stimulated THP-1 細胞の活性化を検討した。FITC-BSA を封入した各種リポソームを用いて PMA-stimulated THP-1 と 48 時間混合培養した。その結果、PMA-stimulated THP-1 は血清存在下で Man3-OML と Man5-OML を取り込んだ (Fig. 3-3A left panel)。しかし、Man3-OML で処理された細胞では HLA-DR の明瞭な発現上昇が認められたにもかかわらず、Man5-OML で処理された細胞ではその発現上昇は見られなかった (Fig.3-3A right panel)。一方、 $\alpha$ 1-6Man2-OML の細胞への取り込みは Man3-OML や Man5-OML のそれと比較すると低いレベルであったが、 $\alpha$ 1-6Man2-OML で処理された細胞では Man3-OML で処理された細胞と同程度の HLA-DR の発現を示した。そこで、様々なオリゴマンノース含有糖脂質で被覆された OML による細胞の活性化を細胞からの IL-12p40 の産生を指標として検証した。その結果、Man3-OML と  $\alpha$ 1-6Man2-OML で処理した場合にだけ IL-12p40 の顕著な産生が認められ、それ以外のオリゴマンノースをもつ OML では認められなかった。従って、ヒトの

MNP への抗原送達と細胞の活性化にはマウス MNP と同様、Man3-DPPE で被覆された OML (Man3-OML) が最も適していることが明らかになった。

次に OML の粒子径が細胞の活性化に及ぼす効果を検証した。粒子径を 1  $\mu\text{m}$ 、0.4  $\mu\text{m}$ 、0.2  $\mu\text{m}$  に調整した Man3-OML で PMA-stimulated THP-1 処理したところ、粒子径 0.4  $\mu\text{m}$  および 0.2  $\mu\text{m}$  の Man3-OML で処理した細胞からの IL-12p40 の産生量は粒子径 1  $\mu\text{m}$  の Man3-OML に比べて顕著に低かった (Fig. 3-3 B)。この結果から OML による PMA-stimulated THP-1 の活性化にはある程度の粒子径を必要とすることが示唆された。

### 3-3-3. 特異的シグナル伝達阻害剤による IL-12p40 産生の阻害

Man3-OML で刺激した PMA-stimulated THP-1 は LPS で刺激した時と非常に良く似た応答を示すので、Man3-OML による PMA-stimulated THP-1 の活性化シグナル経路を明らかにするため特異的シグナル阻害剤を用いて IL-12p40 の産生応答を検討した。PMA-stimulated THP-1 を各種阻害剤で処理し、Man3-OML もしくは LPS により刺激したときの IL-12p40 産生量を、ELISA 法を用いて測定した。Man3-OML および LPS によって刺激された PMA-stimulated THP-1 は共に、IKK-inhibitor VII と PI3K の阻害剤である LY294002 によって IL-12p40 の顕著な産生抑制を受けた。一方で、JNK の阻害剤である SP600125 と ERK1/2 の阻害剤である PD98059 では弱く抑制されるにとどまった (Fig.3-4)。興味深いことに、MyD88 依存的なシグナル伝達の特異的阻害剤である BAY11-7082 は LPS 刺激による IL-12p40 の産生を顕著に抑制したが、Man3-OML 刺激による IL-12p40 の産生はあまり抑制しなかった (Fig.3-4)。以上の結果は、Man3-OML による細胞の

活性化には、LPS の場合とは異なり、TLR/MyD88 の経路はほとんど関与しないことを示している。

### 3-4. 考察

本章では、PMA-stimulated THP-1 細胞が血清存在下、*in vitro* で Man3-OML を素早く取り込み、その取り込みに応答して HLA-DR や CD80 の発現上昇および IL12p40 の産生を伴い活性化することを示した。

また本章では、様々なオリゴマンノースを持つ糖脂質で被覆したリポソームを用いて、PMA-stimulated THP-1 細胞の活性化に必要な Man3-DPPE の最小単位を推定した。Man5-DPPE を構成成分に含むリポソーム (Man5-OML) は Man3-OML と同程度の細胞への取り込みが観察されたにも関わらず、HLA-DR の発現上昇および IL-12p40 の産生は観察されなかった。これに対して  $\alpha$ 1-6Man2-DPPE を構成成分に含むリポソーム ( $\alpha$ 1-6Man2-OML) は、細胞への取り込みのレベルは Man3-OML に比べて低かったが、HLA-DR の発現上昇および IL-12p40 の産生は Man3-OML と同程度に認められた。これまでのマウスを用いた *in vivo* での検討から、血清存在下 (オプソニン条件下) での OML の細胞への取り込み効率が MNP の活性化と関連していると予想されていたが、筆者が本章で示した結果は、MNP への OML の血清存在下での取り込み効率と OML による細胞の活性化は関連していないことを示している。また、様々なオリゴマンノース構造を持つ人工糖脂質で被覆したリポソームを用いた検討から、 $\alpha$ 1-6Man2-OML だけが Man3-OML と同様に PMA-stimulated THP-1 細胞の活性化を誘導できることを明らかにした。 $\alpha$ 1-6Man2-DPPE は Man3-DPPE の部分構造で



あり、ともに Man $\alpha$ 1-6Mannitol 構造をもつ。一方で、Man3-DPPE の部分構造である  $\alpha$ 1-3Man2-DPPE で被覆されたリポソームは細胞を活性化する能力がない。従って、Man $\alpha$ 1-6Mannitol 構造がヒト MNP の活性化には必要であると予想された。Man $\alpha$ 1-6Mannitol 構造は Man5-DPPE にも含まれているが、先に述べたように Man5-OML は細胞を活性化することはできなかった。Man5-DPPE の場合、図に示したように Man $\alpha$ 1-6Mannitol のマンノース残基にさらにマンノースが  $\alpha$ 1-6 結合と  $\alpha$ 1-3 結合で結合している。このことから、置換を受けていない末端の Man $\alpha$ 1-6Mannitol 構造が細胞の活性化に重要であると推察された。

糖鎖で覆われた粒子によって免疫を誘導しようとする試みは他の研究グループでも行われており、APC への効率的な抗原送達と抗原提示を達成している(3,4)。しかし、これらのシステムでは免疫誘導のためにアジュバントの同時投与が必要である。一方で Man3-OML には MNP を成熟化させるアジュバント活性もあり、Man3-OML の投与だけで封入抗原特異的な Th1 免疫応答や CTL を誘導できる。これまでの研究および本論文では、基本的に粒子径を約 1  $\mu$ m に調整したリポソームを用いている。それに対し他の研究グループの研究では、100-200 nm の大きさのリポソームが多く用いられている(3,4)。そこで、粒子径を 0.4  $\mu$ m や 0.2  $\mu$ m にした Man3-OML による PMA-stimulated THP-1 細胞の活性化を検討したところ、細胞内に取り込みは見られたが（データ未掲載）、IL-12p40 を基準とした活性化能は認められなかった。マウス腹腔の常在性マクロファージを用いた場合でも 500 nm 以下の Man3-OML には細胞の活性化能がないことが示されている（小島ら、未発表データ）。通常、MNP は粒子径が 500 nm 以上の粒子を

貪食作用 (Phagocytosis) によって取り込むが (5)、それより小さい粒子径をもつものは食作用 (Endocytosis) で取り込むといわれている (6)。従って、末端の  $\text{Man}\alpha 1\text{-6Mannitol}$  構造を認識することで始まる貪食作用がヒトの MNP の活性化に重要であると考えられた。しかし、 $\text{Man3-OML}$  末端  $\text{Man}\alpha 1\text{-6Mannitol}$  構造を認識するような糖鎖認識受容体の同定には未だ至っていない。

糖鎖認識受容体としてはマンノースを認識できるようなレクチン受容体が想定される。DC-SIGN や Mannose receptor のような一般的によく知られているマンノース認識受容体は  $\text{Man5}$  構造を含む高マンノース型オリゴ糖を強く認識する (7)。しかしながら、PMA-stimulated THP-1 細胞が  $\text{Man5-OML}$  では活性化しないこと、DC-SIGN を発現している細胞が  $\alpha 1\text{-6Man2-DPPE}$  や  $\text{Man3-DPPE}$  およびそれらを被覆したリポソームをあまり認識しないこと (小島ら、未発表データ)、OML 刺激前の PMA-stimulated THP-1 細胞が DC-SIGN を発現していないことから、これらのレクチン受容体が OML の受容体として機能している可能性は低いと考えられる。しかしながら第 1 章で述べた通り、MNP には様々なレクチン受容体が発現していることから、DC-SIGN や Mannose receptor 以外の CLR が関与している可能性は否定できない。

その一方で、レクチンには分類されない分子でも糖鎖を認識できる分子が存在する。補体受容体である  $\text{CD11b/CD18}$  (CR3) はマウスの MNP においてオプソニン条件下で  $\text{Man3-OML}$  の取り込みに関係する受容体として同定された補体受容体である (7)。この分子は特異抗体を用いた検討から、PMA-stimulated THP-1 細胞でもオプソニン条件下での  $\text{Man3-OML}$  の取り込みに部分的に関与していることが判明している (8)。しかし、細胞の活性化は CR3 に対する抗体では阻害

されなかったことから、細胞の活性化には関与していないと判断した。一方で、CR3 は血清非存在下（非オプソニン条件下）でマンノースや  $\beta$ -グルカンを補体認識部位とは異なる部位で認識することが報告されているため（8, 9）、糖鎖認識分子としての機能も有する。本章ではオプソニン条件下での Man3-OML による PMA-stimulated THP-1 細胞の活性化についてのみ記述したが、実際には細胞の活性化は非オプソニン条件下でも同様に活性化が起こることがわかっている。従って、糖鎖認識分子としての CR3 が Man3-OML を認識することで細胞の活性化に関与している可能性も考えられる。

最近の研究から、自然免疫の活性化を誘導できる受容体である TLR2 と TLR4 はマンノースを含むオリゴ糖と相互作用できることが示されている（10, 11）。従って、これらの TLR が OML と相互作用することで細胞の活性化や成熟化が引き起こされている可能性がある。しかし、BAY11-7082 は LPS 刺激による PMA-stimulated THP-1 細胞の IL-12p40 の産生を強く抑制したのに対し、OML 刺激による IL-12p40 の産生をほとんど抑制しなかった。BAY11-7082 は MyD88 依存的なシグナルネットワークの阻害剤である（12）。MyD88 は TLR のアダプター分子であり、TLR からのシグナルが MyD88 を介して下流の NF- $\kappa$ B へと伝達されることで、炎症性サイトカインなどの産生が惹起される。従って筆者が得た結果は、MyD88、すなわち TLR が OML による PMA-stimulated THP-1 細胞の活性化には関与していないことを示している。筆者は TLR ノックアウトマウスを用いて TLR2 および 4 がマウス MNP の Man3-OML による活性化や成熟化には関与していないことをすでに示しているが（11）、マウスと同様にヒトでも、Man3-OML による MNP の活性化に TLR2 および 4 は関与していないと考えられ

る。一方で、Man3-OMLによる細胞の活性化はLPSの場合と同様にIKK inhibitor VIIとPI3K阻害剤であるLY294002によって強く阻害された。最近の研究によりIL-12の産生にはPI3 Kinaseを介するシグナル経路が用いられているという報告があり(13, 14)、Man3-OMLはTLR/MyD88非依存的経路で細胞を活性化するが、細胞内シグナルの下流においてはLPSと共通したPI3Kが関与する経路を介して細胞を活性化していると考えられた。

本章では、ヒトMNPのモデル細胞であるPMA-stimulated THP-1がMan3-OMLでマウス炎症性単球と同様に活性化することを示した。この結果はヒト末梢血中の単球やそれに由来するDCもMan3-OMLによって*in vitro*で活性化できる可能性があることを物語っている。そこで次章ではヒト由来PBMCを用いてMan3-OMLによる細胞の活性化・成熟化を検討した。

### 3-5. 参考文献

1. W. Chanput, J.J. Mes, H.J. Wichers. THP-1 cell line: An *in vitro* cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharm.*, 23, 37-45 (2014)
2. N.Kojima, L. Biao, T. Nakayama, M. Ishii, Y. Ikehara, K. Tsujimura. Oligomannose-coated liposomes as a therapeutic antigen-delivery and an adjuvant vehicle for induction of *in vivo* tumor immunity. *J. Control. Rel.*, 129, 26-32 (2008)
3. W.W. Unger, A.J. van Beelen, S.C. Brujins, M. Joshi, C.M. Fehes, L. van Bloois, M.I. Verstege, M. Ambrosini, H. Kalay, K. Nazmi, J.G. Bolscher, E. Hooijberg, T.D. de Gruijl, G. Storm, Y. van Kooyk. Glycan-modified liposomes boost

- CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses by targeting DC-SIGN on dendritic cells. *J Control Release*. 30;160 (1), 88-95 (2012)
4. B. Carrillo-Conde, E.H. Song, A. Chavez-Santoscoy, Y. Phanse, A.E. Remer-Tait, N.L. Pohl, M.J. Wannemuehler, B.H. Bellaire, B. Narasimhan. Mannose-functionalized "pathogen-like" polyanhydride nanoparticles target C-type lectin receptors on dendritic cells. *Mol Pharm*. 8(5), 1877-1886 (2011)
  5. A. Aderem, D.M. Underhill. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.*, 17, 593–623 (1999)
  6. T.B. Geijtenbeek, S.I. Gringhuis. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 9, 465-479 (2009)
  7. Y. Abe, Y. Kuroda, N. Kuboki, M. Matsushita, N. Yokoyama, N. Kojima. Contribution of complement component C3 and complement receptor type 3 to carbohydrate-dependent uptake of oligomannose-coated liposomes by peritoneal macrophages. *J. Biochem.*, 144, 563-570 (2008)
  8. H. Takagi, M. Numazaki, T. Kajiwara, Y. Abe, M. Ishii, C. Kato, N. Kojima. Cooperation of specific ICAM-3 grabbing nonintegrin related 1 (SIGNR1) and complement receptor type 3 (CR3) in uptake of oligomannose-coated liposomes by macrophages. *Glycobiology*, 19, 258-266 (2009)
  9. S.M. Levitz. Innate recognition of fungal cell wall. *PLoS Pathol.*, 6, 1–3 (2010)
  10. M.G. Netea, N.A. Gow, C.A. Munro, S. Bates, C. Collins, G. Ferwerda, R.P. Hobson, G. Bertram, H.B. Hughes, T. Jansen, L. Jacobs, E.T. Buurman, K. Gijzen, D.L. Williams, R. Torensma, A. McKinnon, D.M. MacCallum, F.C.

- Odds, J.W. van der Meer, A.J. Brown, B.J. Kullberg. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J. Clin. Invest.*, 116, 1642–1650 (2006)
11. Y. Matsusoka, H. Takagi, M. Yamatani, Y. Kuroda, K. Sato, N. Kojima. Requirement of TLR4 signaling for the induction of a Th1 immune response elicited by oligomannose-coated liposomes. *Immunol. Lett.*, 178, 61-67 (2016)
  12. S. Strickson, D.G. Campbell, C.H. Emmerich, A. Knebel, L. Plater, M.S. Ritorto, N. Shpiro, P. Cohen. The anti-inflammatory drug BAY 11-7082 suppresses the MyD88-dependent signaling network by targeting the ubiquitin system. *Biochem. J.*, 451, 427-437 (2013)
  13. M. Utsugi, K. Dobashi, A. Ono, T. Ishizuka, T. Hisada, Y. Koga, Y. Shimizu, T. Kawata, S. Matsuzaki, H. Aoki, Y. Kamide, M. Mori. JNK1 and JNK2 differently regulate IL-12 production in THP-1 macrophage cells. *Cytokine*, 51 (2), 127-131 (2010)
  14. M. Utsugi, K. Dobashi, A. Ono, T. Ishizuka, S. Matsuzaki, T. Hisada, Y. Shimizu, T. Kawata, H. Aoki, Y. Kamide, M. Mori. PI3K p110beta positively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages and dendritic cells and JNK1 plays a novel role. *J Immunol.*, 1:182(9), 5225-5231, (2009)

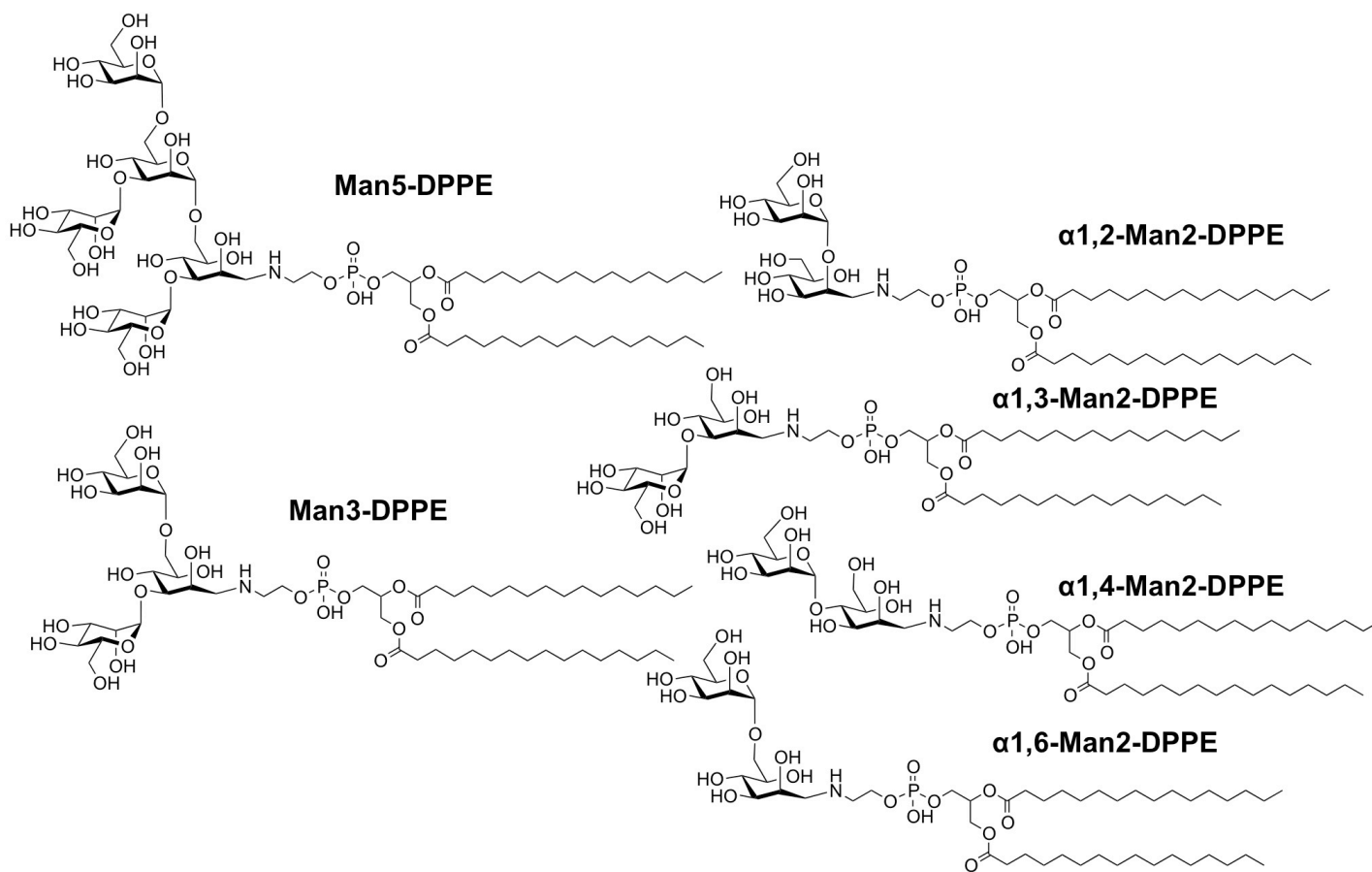


Fig. 3-1. Structures of neoglycolipids used in this study.

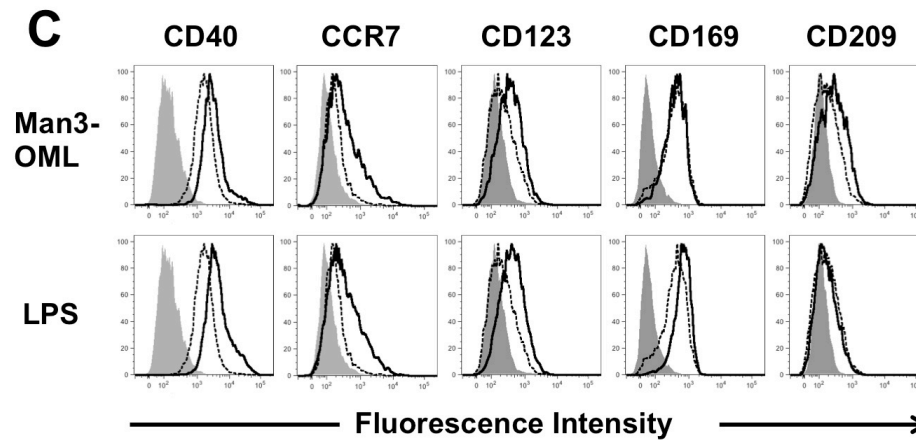
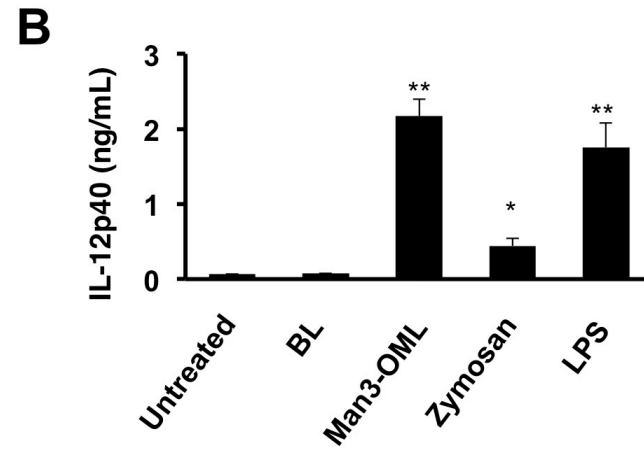
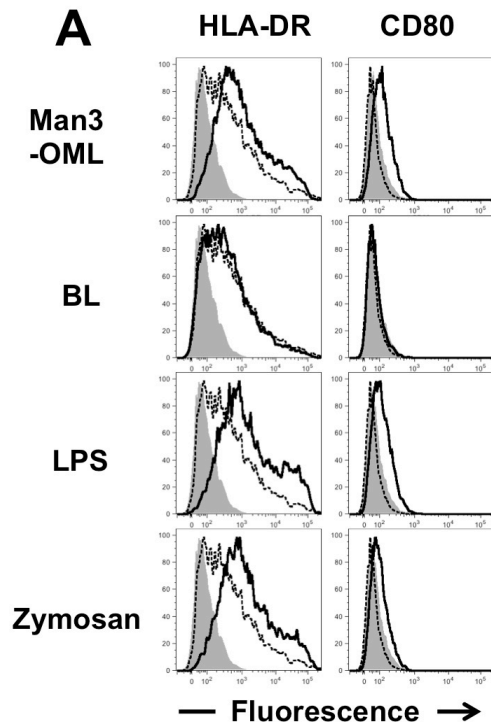




Fig. 3-2. Activation of PMA-stimulated THP-1 cells by Man3-OML.

THP-1 cells were treated with 5 ng/ml PMA for 24 h, and cultured for another 48 h without PMA. The cells were then treated with Man3-OMLs, neoglycolipid-uncoated bare liposomes (BL), LPS, or Zymosan.

(A) Expression of HLA-DR and CD80 on the cells. Dashed and solid lines indicate untreated and treated cells, respectively. Gray peaks indicate isotype controls.

(B) Induction of IL-12p40 secretion. Each bar shows the mean  $\pm$  SE for 5 independent experiments. Statistical significance among the groups was evaluated by t-test of variance. \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 vs. untreated cells.

(C) Representative expression of other cell surface markers. Dashed and solid lines indicate untreated and treated cells respectively. Gray peaks indicate isotype controls.

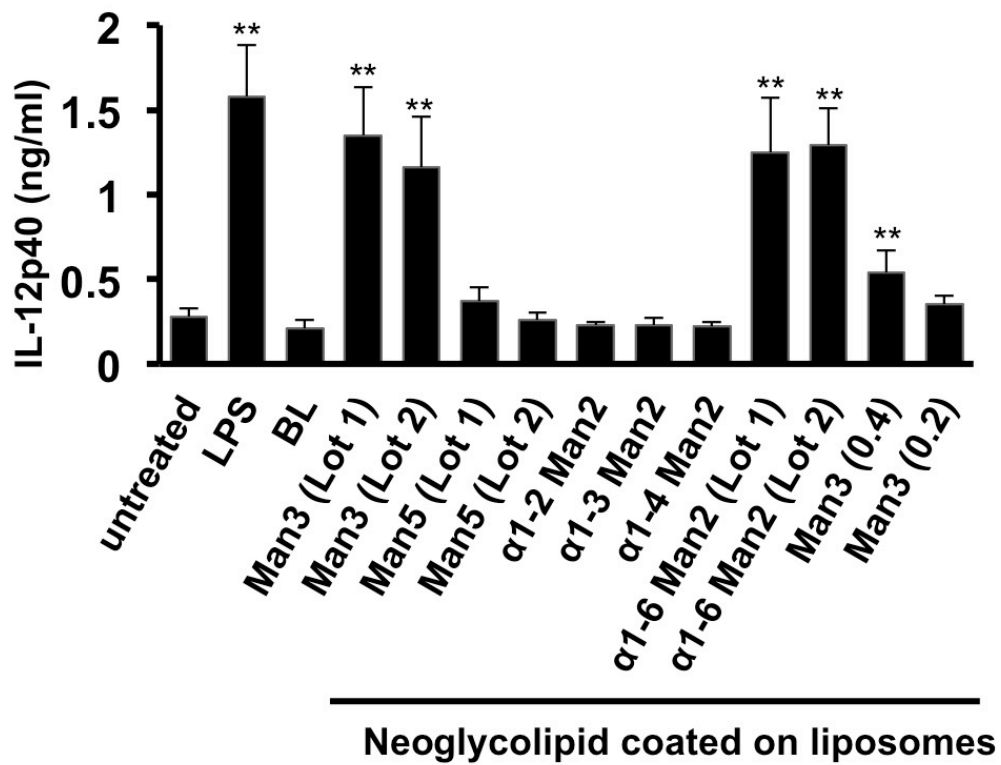
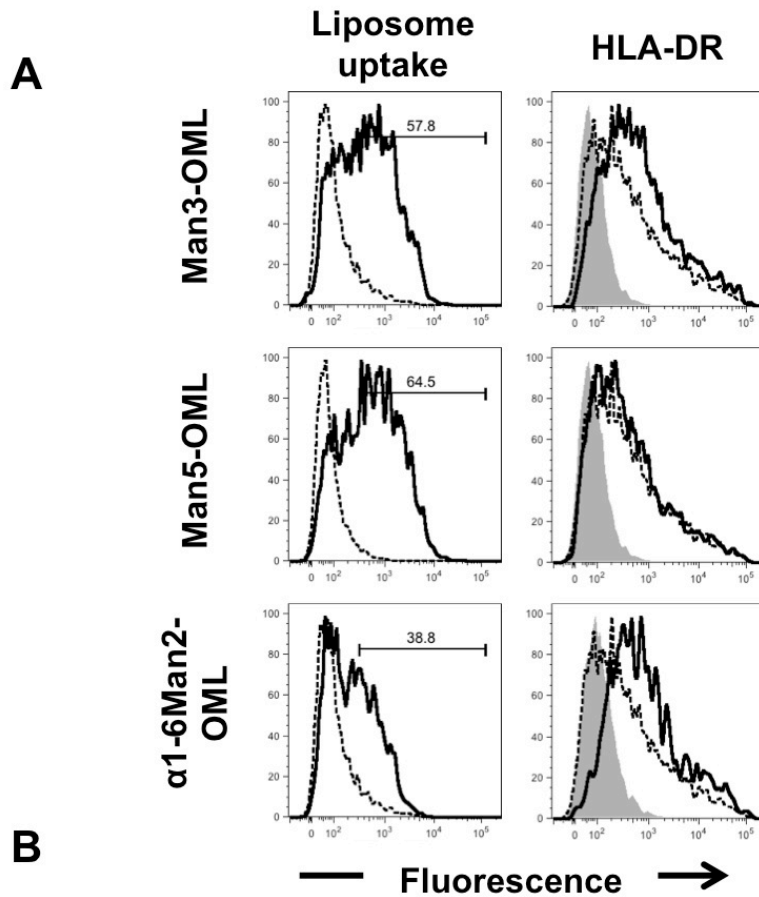


Fig.3-3. Responses of PMA-stimulated THP-1 cells to liposomes containing various oligomannoses.

(A) PMA-stimulated THP-1 cells were treated with FITC-labeled Man3-OMLs, Man5-OMLs, and  $\alpha$ 1-6Man2-OMLs and uptake of liposomes and expression of HLA-DR (MHC-II) were analyzed by FACS. Dashed and solid lines indicate untreated and treated cells, respectively, and the gray peaks indicate isotype controls in figures for HLA-DR expression (right panel). Dashed and solid lines indicate FITC-labeled BL and respective OMLs, respectively, in figures for liposome uptake (left panel).

(B) PMA-stimulated THP-1 cells were treated with liposomes coated with various types of oligomannose-containing neoglycolipids (as indicated on the abscissa) and IL-12p40 secreted in the culture media was determined after 48 h of treatment as an index of cellular activation. Each bar shows the mean  $\pm$  SE for 3 independent experiments. Statistical significance among the groups was evaluated by one-way analysis of variance. \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated cells. The particle size of each liposome sample was adjusted to about 1  $\mu$ m unless otherwise indicated. Man3 (0.4) and Man3 (0.2) indicate Man3-OML with the particle sizes of about 0.4  $\mu$ m and 0.2  $\mu$ m, respectively.

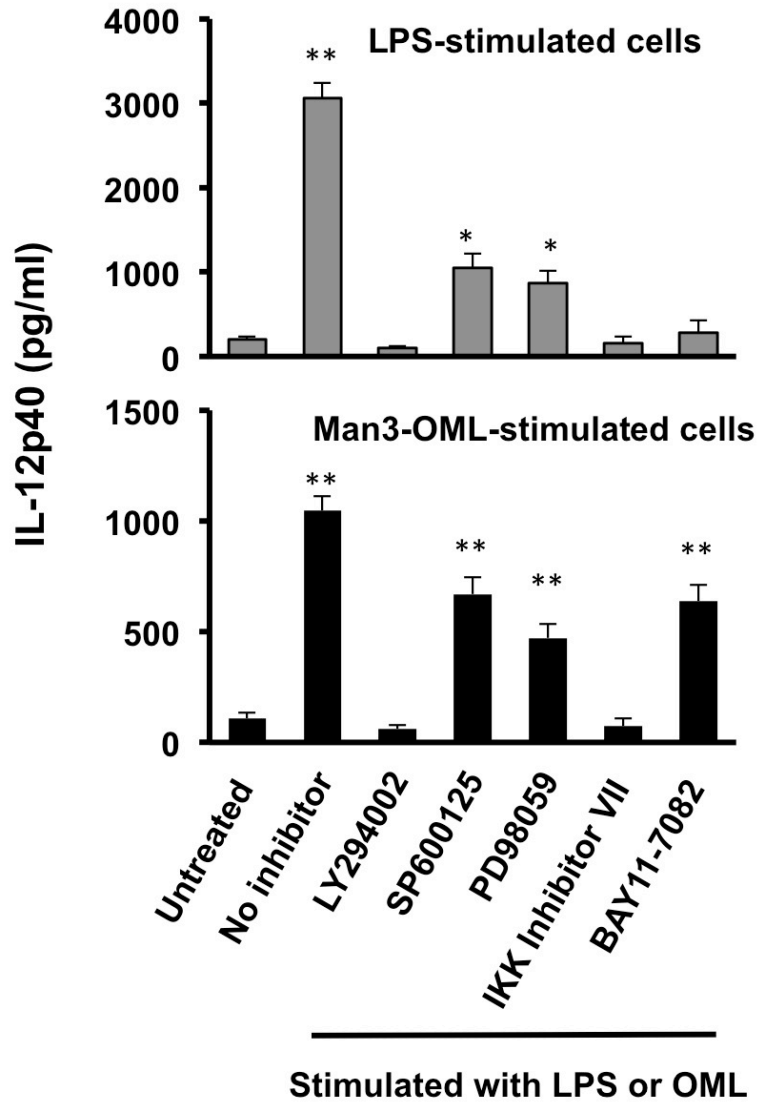


Fig. 3-4. Effects of signal transduction inhibitors on IL-12p40 production from PMA-stimulated THP-1 cells.

The specific signal transduction inhibitors of JNK (SP600125; 10  $\mu$ M), ERK1/2 (PD98059; 10  $\mu$ M), PI3K (Ly294002; 25  $\mu$ M), IKK (IKK inhibitor VII; 2  $\mu$ M) or MyD88 dependent signaling network (BAY11-7082; 5  $\mu$ M) was added to PMA stimulated THP-1 cells 30 min prior to stimulation with Man3-OML or LPS. As a

control, cells were treated with medium containing 0.1% DMSO. The culture supernatants were collected after 48 h of stimulation, and IL-12p40 in the media were determined by ELISA. Each bar shows the mean  $\pm$  SE for 5 independent experiments. Statistical significance among the groups was evaluated by t-test of variance.

\*P < 0.05 and \*\* P < 0.01 vs. unstimulated cells

## 第4章 ヒト単球および単球由来樹状細胞の糖鎖被覆リポソームに対する応答

### 4-1. 序論

第3章で筆者は、Man3-OMLが *in vitro* でヒト MNP のモデル細胞である PMA-stimulated THP-1 をマウス MNP 同様に活性化できることを IL-12p40 の産生や、抗原提示分子や補助刺激分子の発現増強の結果によって示した。しかし、これらはあくまでヒトモデル細胞で得られた結果である。Man3-OML をヒトの細胞性免疫誘導型ワクチンのアジュバントとして用いるためには、健康なボランティアから得られるヒト MNP を用いて検証する必要がある。そこで第4章では、健康なボランティアから得られたヒト PBMC を用いて、Man3-OML が PBMC 中の単核貪食細胞を活性化できるかを検証するとともに、最も強力な APC である DC も活性化・成熟化できるかについて、末梢血単球由来樹状細胞 (moDC) のを用いて検証した。

### 4-2. 実験材料および方法

#### 4-2-1. 試薬および細胞

ヒト PBMC は健康なボランティアから採取した末梢血 20 mL より Lymphoprep™ Tube (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) を用いて遠心分画し得た。また、PBMC を培養プレートに播種し、2 時間後に浮遊細胞を除去し (1)、接着細胞のみを 1000 U/mL GM-CSF と 500 U/mL IL-4、5% ヒト血清含有 RPMI-1640 で 3 日間培養し、ゆるく接着した細胞を単球由来樹状細胞(moDC) とした (2)。なおヒト由来の細胞を用いた全ての実験は東海大学のヒトを対象とする研究倫理委員会の倫理審査を受け、その承認を得て行った(承認番号

15042)。使用した Man3-OML は前章までと同様 DPPE : Cholesterol : 人工糖脂質 (Man3-DPPE) の構成モル比率が 10:10:1 で作製した粒子径 1  $\mu\text{m}$  のものを用いた (3,4,5)。フローサイトメトリーに用いた蛍光標識抗体は第 3 章で述べたものと同様である。ELISA 法に用いた ELISA kit は第 3 章で述べたものと同様である。

#### 4-2-2. ヒト単球および単球由来樹状細胞 (moDC) における OML の取り込みの評価

ヒト PBMC および moDC ( $1 \times 10^6$  /mL) と FITC 封入 OML (Cholesterol 量で 40  $\mu\text{g}$  相当) を 5 % ヒト血清存在下で 37  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間穏やかに攪拌し培養した。その後フローサイトメトリーと共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV1000, Olympus) を用いて観察した。PBMC は抗 CD11b 抗体の蛍光強度により 3 つの画分に分類し、それぞれの細胞における FITC 蛍光シグナルを観察した。

#### 4-2-3. ヒト単球および moDC における OML 取り込みに伴う細胞表面分子の評価

ヒト PBMC ( $1 \times 10^6$  /mL) と OML (chol. 40  $\mu\text{g}$ ) を 5 % ヒト血清存在下で 37  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間穏やかに攪拌し培養した。その後特殊なポリマーでコーティングされた非接着培養プレート (HydroCell®, CellSeed Inc.) に播種し 48 時間培養した細胞を第 3 章で述べた蛍光標識抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーを用いて細胞表面上に発現する成熟マーカーを観察した。moDC の成熟化の評価には、moDC ( $1 \times 10^6$  /ml) を 5 % ヒト血清存在下で Man3-OML を穏やかに攪拌しながら混合し Man3-OML を取り込ませた後、非接着培養プレートに播種し 48 時間培

養した。その後、細胞を回収し、第 3 章で述べた蛍光標識抗体を用いて観察した。

#### 4-2-4. ヒト mo および moDC における OML 取り込みに伴うサイトカイン産生能の評価

ヒト PBMC ( $5 \times 10^5$  /mL) および moDC ( $2 \times 10^5$  /mL) と Man3-OML (Cholesterol 量で 40  $\mu$ g 相当) を混合し 5 %ヒト血清存在下で 30 分間穏やかに攪拌した。その後培養プレートに播種し、48 時間後の培養上清をサンプルとし、ELISA 法を用いて IL-12p40、IL-12p70、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の産生量を、ELISA 法を用いて測定した。また、CD40 リガンド (CD40L) 発現 Th 細胞と DC とのコンタクトを擬似的に作りだすため、CD40L トリマー (MEGACD40L®, Enzo Life Science, Inc.) を 1  $\mu$ g/mL 加え、24 時間後の培養上清サンプルとし、ELISA 法を用いて IL-12p70 の産生量を測定した。

### 4-3. 結果

#### 4-3-1. Man3-OML はヒト末梢血単核貪食細胞 (MNP) を活性化する

第 3 章において Man3-OML は PMA-stimulated THP-1 細胞の活性化と Phagocytosis による封入抗原の送達が可能であることを示した。そこで Man3-OML と健康なボランティア由来 PBMC を 5 %ヒト血清存在下で混合培養し、その取り込みをフローサイトメトリーで確認した。抗 CD11b 抗体を用いることで PBMC をその発現レベルにより 3 集団に分類した (Fig. 4-1A left panel) ところ、CD11b<sup>high</sup> 細胞において Man3-OML が強く取り込まれて (Fig. 4-1A Gate



II)、CD11b<sup>int</sup>細胞群では OML は全く取り込まれなかった (Fig. 4-1A Gate I)。CD11b<sup>high</sup>細胞は CD14、CD40、CD86、HLA-DR を高いレベルで発現していたが、CD16 は発現していなかった (Fig. 4-1C)。一方、CD11b<sup>int</sup>細胞は CD16 と HLA-DR を発現していたが、CD14 は発現していなかった (データ未掲載)。ヒト単球はマウスの単球と同様に 2 つのサブセット、すなわち CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>単球および CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>単球に分類される。CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>細胞はマウス Ly6C<sup>+</sup>単球と相同でヒト炎症性単球であり、一方、CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>細胞は常在性単球である。Fig.1.に示した結果は、Man3-OML が *in vitro* でヒト炎症性単球に選択的に取り込まれ、常在性単球には取り込まれないことを示している。Man3-OML は CD11b<sup>low</sup>細胞 (Fig. 4-1A Gate III) にも見られたが、この細胞は CD19 と CD40 を発現していたため B 細胞であると考えられる (データ未掲載)。さらに、BL は CD11b<sup>high</sup>細胞にとり込まれたが、その蛍光強度は Man3-OML の 1/20 であった (Fig4-1B)。

ヒト PBMC を OML と 48 時間混合培養すると CD11b<sup>high</sup>細胞 (ヒト炎症性単球) 上で HLA-DR、CD80、CD86 の発現が明らかに増加した (Fig. 4-1C)。さらに、培養前は確認されなかった CCR7、CD123、CD209 の発現が Man3-OML の取り込みに応じて誘導された (Fig. 4-1C)。CD209 はヒト DC マーカーのひとつであり Man3-OML による刺激によって炎症性単球に発現するようになるのは興味深い。これらの結果は第 3 章で得られた Man3-OML に対する PMA-stimulated THP-1 の応答と同様であり、Man3-OML がヒト MNP を *in vitro* で活性化できることを示している。しかしながら Man3-OML と混合培養した CD11b<sup>int</sup>細胞 (ヒト常在性単球) ではこれらの分子の増加は確認できなかった (データ未掲載)。

#### 4-3-2. OML はヒト単球由来樹状細胞 (moDC) を活性化する

次にヒト moDC が Man3-OML との混合培養により活性化するかを検討した。CD14<sup>+</sup> monocyte から IL-4 と GM-CSF で分化誘導した moDC は、HLA-DR、CD86、CD209、CD206 を顕著に発現しており、単球のマーカーである CD14 の発現が減少していた。この表現型は未熟 DC と一致している。そこで、未熟 moDC を 5% ヒト血清存在下で Man3-OML と 48 時間混合培養しところ、Man3-OML は moDC に取り込まれたが BL は全く取り込まれなかった (Fig4-2A)。また細胞表面に発現する HLA-DR、CD40、CD86 の発現量が Man3-OML の処理によって顕著に増加した (Fig. 4-2B)。その一方で、CD206 と CD14 の発現は明らかに低下した (Fig. 4-2B)。さらに、OML で処理した moDC は補助刺激分子 CD80、成熟樹状細胞マーカー CD83 およびケモカイン受容体 CCR7 を発現するようになっていた。この表現型、すなわち CD83<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD14<sup>-</sup>、CD80<sup>+</sup>、CD86<sup>high</sup>、HLA-DR<sup>high</sup> という表現型は、成熟 DC の表現型と一致していることから、Man3-OML は *in vitro* で未熟 DC を成熟 DC へと誘導できることが明らかになった。

#### 4-3-3. OML 刺激した moDC からのサイトカインの産生

炎症性メディエーターによって刺激された DC は IL-12 を産生する。これはナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を Th1 細胞へ分極するために重要なサイトカインであり、Th1 細胞は CD8<sup>+</sup>T 細胞の CTL への分化を促進する (6)。そこで CD14<sup>+</sup> monocyte から分化した moDC を Man3-OML で処理し、48 時間後の培養上清を回収し、IL-12p40 の産生量を測定した。CD14<sup>+</sup> monocyte を GM-CSF と IL-4 処理しても IL-12p40 を産生しなかったが、Man3-OML 処理すると 24 時間で IL-12p40 を産

生するようになった (Fig.4-3A)。一方で、BL による処理では IL-12p40 は確認できなかった。さらに、moDC は Man3-OML 処理によって 24 時間で低いレベルではあるが、生物活性をもつ IL-12p70 を産生した (Fig.4-3B)。また moDC は、TNF- $\alpha$  および IL-6 も産生していた。一方ヒト単球は Man3-OML 処理後に moDC に比べて低いレベルの IL-12p40 を産生したが IL-12p70 は産生しなかった (Fig 4-3B)。BL での処理は、単球も moDC からのこれらのサイトカインの産生を誘導しなかった。

IL-12p70 は p40 と p35 から成るヘテロダイマーであり、APC がナイーブ T 細胞と所属リンパ組織で出会った時にその微小環境で APC から産生されることでナイーブ T 細胞を Th1 細胞へと導く (7)。そこで、T 細胞とコンタクトした時に成熟 DC が IL-12p70 の産生能を有している必要がある。そこで DC とナイーブ Th 細胞とのコンタクトを模倣するために、Man3-OML で処理した moDC をさらに CD40L トリマーで処理した。CD40L による刺激だけではサイトカインの誘導は確認できなかったが、OML で刺激した moDC をさらに DC40L 処理することによって、moDC からの IL-12p70 の産生が顕著に増加した (Fig4-3C)。この結果は、OML 刺激によって成熟した moDC が T 細胞とコンタクトする時も IL-12p70 の産生能を維持していることを示唆している。

#### 4.4. 考察

第 4 章で筆者は、健康なボランティアから得られた PBMC を Man3-OML と混合培養すると、Man3-OML が PBMC 中の炎症性単球 (CD14<sup>+</sup> monocytes) に選択的かつ効率よくとりこまれ、第 2 章で示したマウス炎症性単球や第 3 章で

示したヒトモデル細胞と同じように MHC-II や補助刺激分子などの発現上昇と IL-12p40 の産生を伴って活性化することを示した。一方で糖鎖を被覆していないリポソームは炎症性単球にある程度はとりこまれる (Man3-OML の 1/20 程度) が、細胞の活性化は認められなかった。第 2 章で示したように、マウスの常在性単球は炎症性単球と同程度 Man3-OML を *in vitro* で取り込むが、ヒトの常在性単球 (CD16<sup>+</sup> monocytes) は Man3-OML を全くとりこまなかった。大変興味深いことに、健常人から採取・分離したばかりのヒト炎症性単球では IL-3 receptor  $\alpha$  chain (CD123)、DC-SIGN (CD209) および siglec 1 (CD169) は全く発現していないにも関わらず、Man3-OML の刺激によってこれらの分子の発現も特異的に誘導された。単球上の CD123 の発現は IL-4 の刺激によって亢進する(8)。また、PMA-stimulated THP-1 細胞上の CD209 の発現もまた IL-4 の刺激によって亢進する(9)。IL-4 は PI3 kinase および STAT5 シグナルを活性化し、IL-4 による DC-SIGN の発現上昇には JAK-STAT、ERK、NF- $\kappa$ B 経路が必要であるといわれている(10,11)。筆者は第 3 章で Man3-OML による PMA-stimulated THP-1 細胞の活性化には PI3 kinase と NF- $\kappa$ B のシグナルが重要であることを示したが、CD123 や CD209 の Man3-OML 刺激に応答した発現は、Man3-OML によるヒト末梢血中の炎症性単球の活性化においても、PI3 kinase と NF- $\kappa$ B のシグナル経路が関与していることを示唆している。

筆者は最後に、成熟 DC の生体外での作製に Man3-OML が利用できるかを評価した。Man3-OML 処理後 48 時間で、単球由来樹状細胞 (moDC) は CD40, CD86, CD80, CD83 および MHC-II といった DC の成熟マーカーの発現が増加し、CD14 と CD206 の発現が顕著に減少した。すなわち、moDC は Man3-OML の刺激に応

答して成熟 DC の表現型を示すようになった。また OML 刺激した moDC は、CCR7 を顕著に発現するようになっていた。CCR7 は DC が T 細胞を活性化するために所属リンパ節へホーミングする際に必要なケモカイン受容体であり (12)、さらに、Man3-OML で刺激した moDC は生物活性をもつ IL-12p70 を産生していた。さらに、IL-12p70 の産生は CD40L で moDC を処理することで著しく増加した。APC 上には CD40 が補助刺激分子として発現しており、T 細胞上には CD40L が発現している。これらが CD40-CD40L の相互作用することで T 細胞へ活性化シグナルが伝達されるため、CD40L での処理は、T 細胞とのコンタクトを模倣していることになる。つまり、Man3-OML による moDC からの IL-12p70 の産生が CD40L 処理によって増加するという結果は、Man3-OML によって成熟化した moDC が T 細胞とコンタクトした後も IL-12p70 を産生する能力を維持していることを示している。

以上をまとめると、Man3-OML で刺激した未熟 moDC は、① CD83 を含む適切な成熟 DC のマーカーを発現する、② CCR7 を発現するようになり所属リンパ節への遊走能力をもつ、③ ナイーブ T 細胞を Th1 細胞へと導くことができる IL-12p70 の産生能力をもち、その能力は T 細胞とコンタクトすることで著しく増強される、という表現型をもつようになることが確かめられた。すなわち Man3-OML は他のサイトカインや刺激物質を必要とせず、*in vitro* でナイーブなヒト MNP を活性化し、未熟 moDC を CTL や Th1 応答を惹起できるような完全に成熟化した状態へと導くことができる。

#### 4-5. 参考文献

1. E. Scandella, Y. Men, S. Gillessen, R. Förster, M. Groettrup. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 100, 1354-1361 (2002)
2. M. Dauer, B. Obermaier, J. Hertel, C. Haerle, K. Pohl, S. Rothenfusser, M. Schnurr, S. Enders, A. Eigler. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: A novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J. Immunol.*, 170, 4069-4076 (2003)
3. H. Takagi, N. Furuya, N. Kojima. Preferential production of IL-12 by peritoneal macrophages activated by liposomes prepared from neoglycolipids containing oligomannose residues. *Cytokine*, 40, 241-250 (2007)
4. Y. Ikehara, N. Shiuchi, S. Kabata-Ikehara, H. Nakanishi, N. Yokoyama, H. Takagi, T. Nagata, Y. Koide, K. Kuzushima, T. Takahashi, K. Tsujimura, N. Kojima. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal macrophage. *Cancer Lett.*, 260, 137-145 (2008)
5. Y. Matsuoka, Y. Kawauchi, Y. Kuroda, K. Kawauchi, N. Kojima. *In vitro* uptake of oligomannose-coated liposomes leads to differentiation of inflammatory monocytes into mature antigen-presenting cells that can activate T cells. *Int. Immunopharm.*, 57, 102-111 (2018)
6. G. Trinchieri. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 133-146 (2003)
7. A. Aderem, D.M. Underhill. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.*

- Rev. Immunol., 17, 593–623 (1999)
8. F. Borriello, M. Longo, R. Spinelli, A. Pecoraro, F. Granata, R.I. Staiano, S. Loffredo, G. Spadaro, F. Beguinot, J. Schroeder, G. Marone. IL-3 synergises with basophil-derived IL-4 and IL-13 to promote the alternative activation of human monocytes. *Eur J Immunol.*, 45, 2042-2051 (2015)
  9. A. Puig-Kröger, D. Serrano-Gómez, E. Caparrós, A. Domínguez-Soto, M. Relloso, M. Colmenares, L. Martínez-Muñoz, N. Longo, N. Sánchez-Sánchez, M. Rincon, L. Rivas, P. Sánchez-Mateos, E. Fernández-Ruiz, A.L. Corbí. Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and macrophages. *J Biol Chem.*, 279, 25680-25688 (2004)
  10. A.E. Kelly-Welch, E.M. Hanson, M.R. Boothby, A.D. Keegan. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science*, 300, 1527-1528 (2003)
  11. C. Jin, L. Wu, J. Li, M. Fang, L. Cheng, N. Wu. Multiple Signaling pathways are involved in the interleukine-4 regulated expression of DC-SIGN in THP-1 cell line. *J Biomed Biotechnol.*, 357060. doi: 10.1155/2012/357060 (2012)
  12. H. Saeki, A.M. Moore, M. J. Brown, S.T. Hwang. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J. Immunol.*, 162, 2472–2475 (1999)

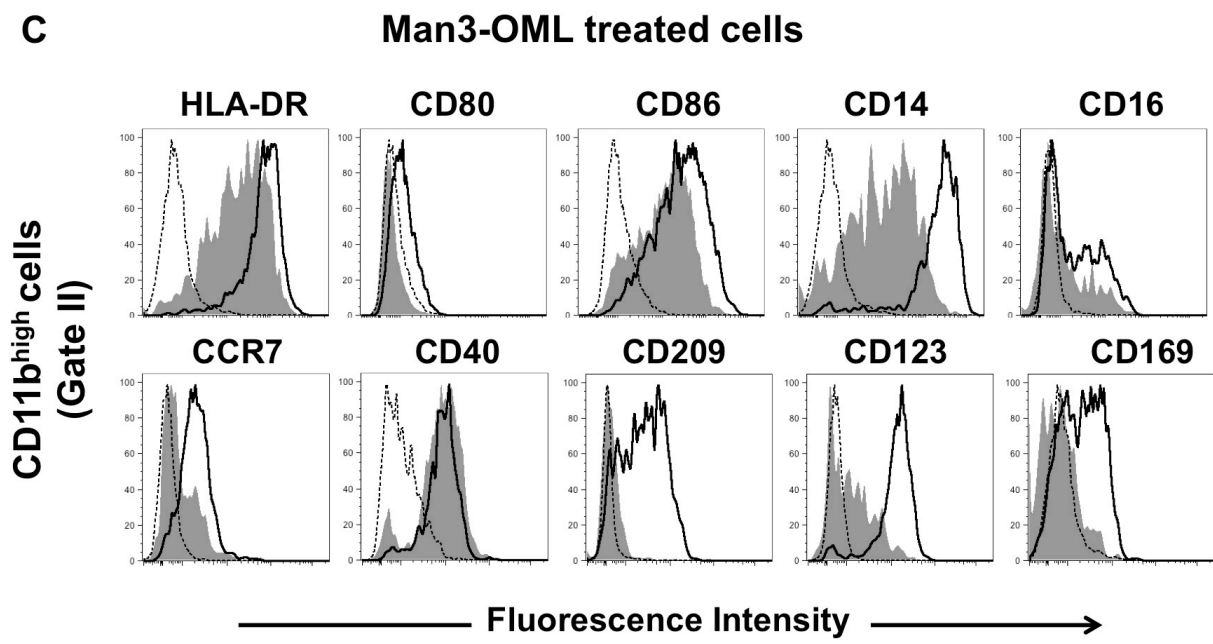
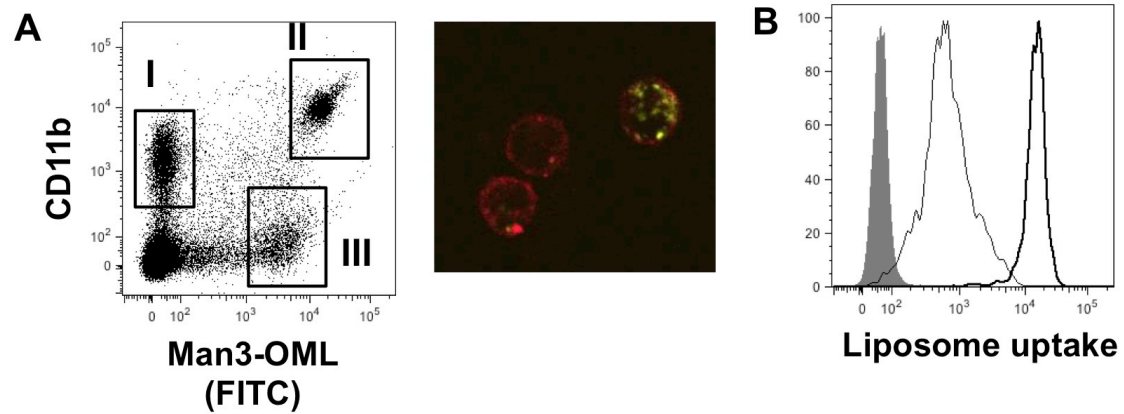




Fig. 4-1. Activation of naïve human mononuclear phagocytes by Man3-OML.

(A) Freshly isolated peripheral mononuclear cells were cultured with FITC-labeled Man3-OMLs for 30 min and then stained with either a PerCP-Cy5.5-labeled or PE-labeled anti-CD11b antibody. Then, the fluorescent signals from the OMLs were analyzed by FACS (left panel) and microscope (right panel, Red; anti-CD11b, Green; Man3-OML).

(B) Uptake of BLs into CD11b<sup>high</sup> cells. Thin and bold lines indicate cells treated with FITC-BLs and FITC-Man3-OMLs, respectively. The gray closed peak indicate nontreat.

(C) Responses of inflammatory monocytes to Man3-OML treatment or BL treatment. Mononuclear cells were isolated from peripheral blood and then treated with either unlabeled Man3-OMLs or BLs. After 48 h, the expression of cell surface markers on the CD11b<sup>high</sup> cells was determined by FACS.

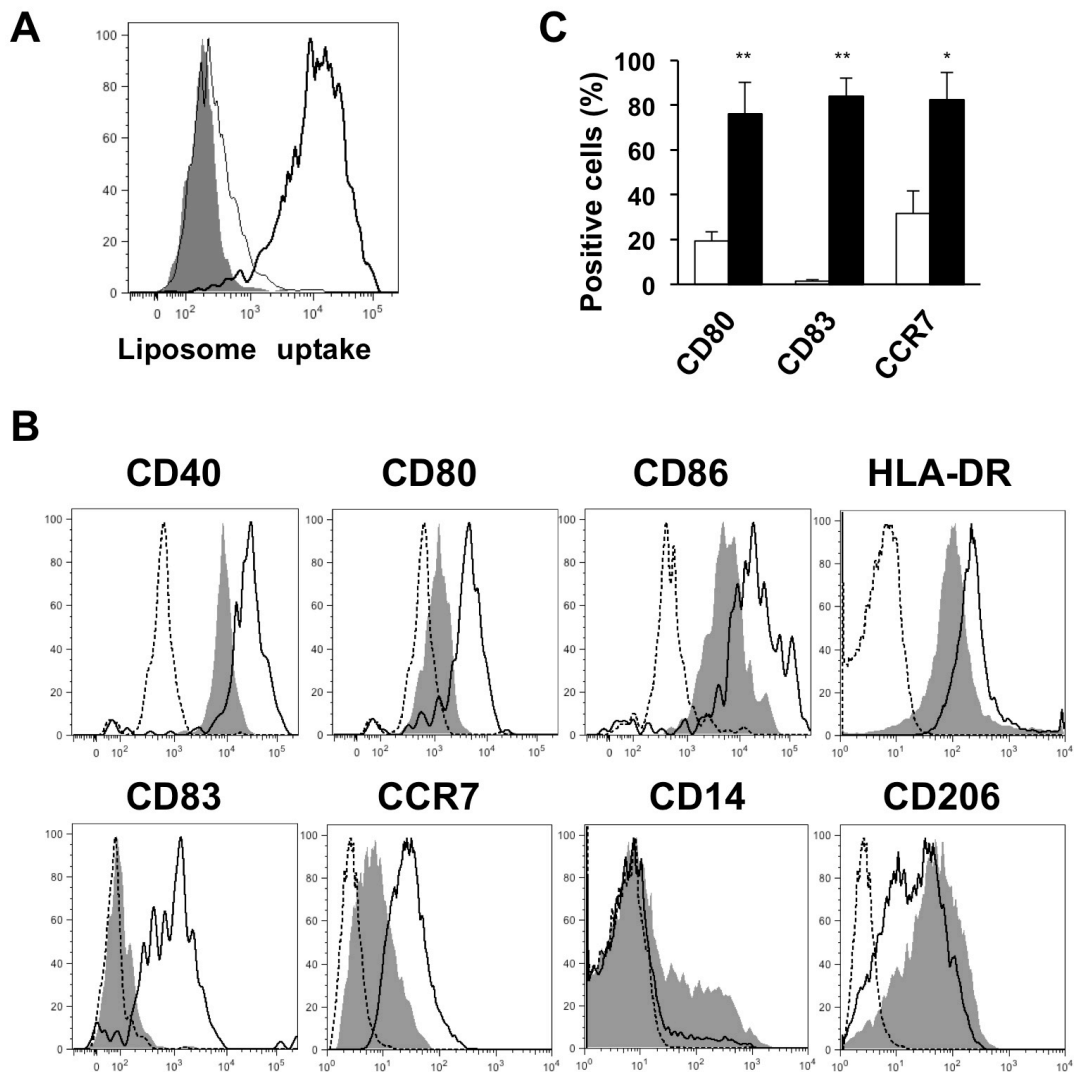


Fig. 4-2. Responses of moDCs to Man3-OML treatment.

MoDCs ( $1 \times 10^5/\text{ml}$ ) were treated with OMLs for 48 h, and then expression of surface markers on the cells was determined by FACS.

(A) Uptake of Man3-OML into moDCs. Dotted and Solid lines indicate untreated and treated with FITC-Man3-OML, respectively. The gray peaks indicates isotype controls.

(B) Up- or down-regulation of cell surface markers on moDCs. A representative result of three experiments is shown. Dotted and solid lines indicate untreated and treated cells,

respectively. The gray peaks indicate isotype controls.

(C) Expression of CD80, CD83, and CCR7 on moDCs after Man3-OML treatment. The gray and hatched columns indicate untreated and Man3-OML-treated cells, respectively. Data are the mean  $\pm$  SE of three independent experiments. Statistical significance among the groups was evaluated by t-test of variance. \*\*P < 0.01 and \*P < 0.05 vs. untreated cells

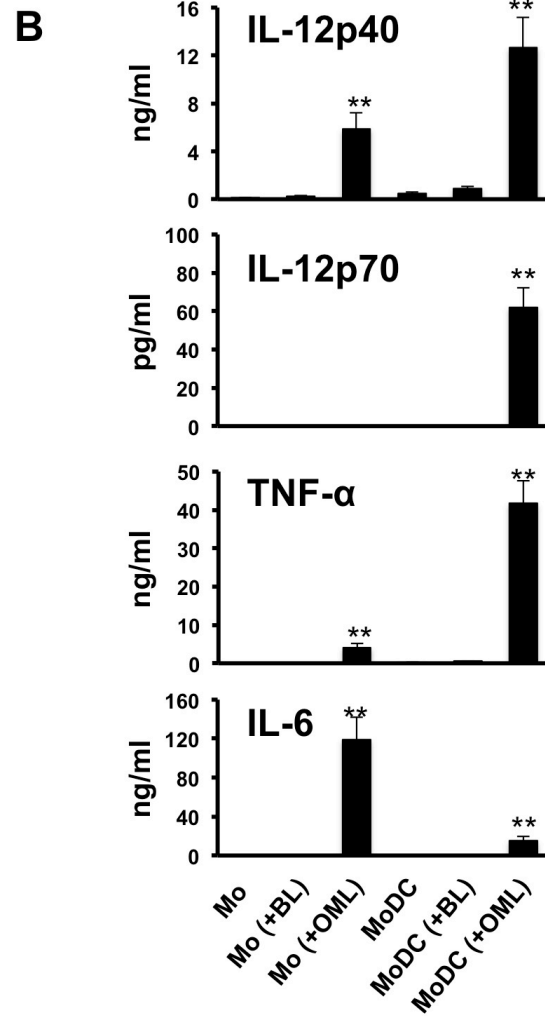
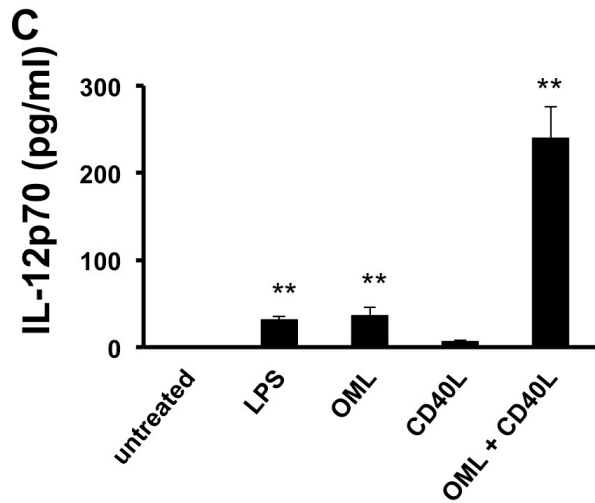
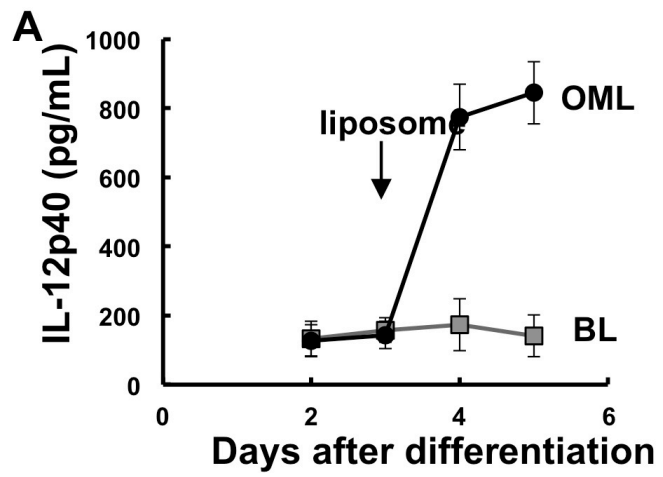


Fig. 4-3. IL-12 production by moDCs following OML treatment.

(A) Human mononuclear cells ( $5 \times 10^5/\text{ml}$ ) were treated with IL-4 and GM-CSF at day 0, and then cultured for 3 days. The resulting cells were treated with either OML (circles) or BL (squares), and the culture supernatants (100  $\mu\text{l}$ ) were collected on days 2, 3, 4, and 5. IL-12p40 in each culture supernatant was determined. Data are the mean  $\pm$  SE of three donors.

(B) MoDCs or inflammatory monocytes (Mo) ( $1 \times 10^5/\text{ml}$ ) were treated with OMLs, and the cytokines secreted into the supernatants were determined after 48 h. Data are the mean  $\pm$  SE of three donors. Statistical significance among the groups was evaluated by t-test of variance.  $**P < 0.01$  vs. untreated cells.

(C) MoDCs treated with or without Man3-OML were seeded in a 48-well plate, and then CD40L trimers were added. For positive control, moDCs were treated with LPS. After a 24 h culture, supernatants were collected, and IL-12p70 was determined. Data are the mean  $\pm$  SE of three donors. Statistical significance among the groups was evaluated by t-test of variance.  $**P < 0.01$  vs. untreated cells.

## 第5章 全体の総括

### 5-1. 総括

リポソーム媒体はリン脂質の脂質二重層からなる小胞であり、水溶性の抗原タンパク質のような高分子を内部に、また脂質のような非極性抗原を脂質二重層の中に取り込むことができるので、APC への抗原送達媒体として優れている。実際に TLR リガンドなど DC を活性化できる分子を内包させたリポソームを用いることで、DC に抗原を送達し、抗原特異的な免疫応答を誘導できることが報告されている (1, 2)。DC をはじめとする MNP の活性化に関わる PRR の一つである CLR に対するリガンド (糖鎖) をもつリポソームもまた APC への抗原送達に有用である。

筆者が属する研究グループでは、DPPC、Cholesterol および Man3-DPPE から構成される Man3-OML が、抗原を MHC-I と MHC-II の両方にクロスプレゼンテーションできる優れた抗原送達媒体として機能するだけでなく、MNP を活性化・成熟化できるアジュバントとしての機能を併せ持つことを、マウスを用いて明らかにしてきた (3-5)。加えて、Man3-OML を基盤としたワクチンの接種によって、がん、アレルギー、原虫感染症といった Th1 免疫が病態の制御に必要な疾患の治療や予防が可能であることを動物実験で示してきた (第1章 Table.1) (4-15)。また、Man3-DPPE のオリゴ糖部分である  $\text{Man } \alpha 1-6(\text{Man } \alpha 1-3)\text{Man}$  構造はすべての生物に普遍的に存在する高マンノース型オリゴ糖の一部であり、Man3-OML を構成する他の分子も生体内に普遍的に存在する物質であることから、Man3-OML そのものには抗原性や顕著な毒性は認められていないことが知られている (16)。このことは、Man3-OML は細胞性免疫を誘導でき

るアジュバントしてヒトに対して安全に使用できる可能性を示している。しかし、ヒトへの展開を目指すためにはヒトの MNP の応答を検証する必要があり、そのためには *in vitro* で細胞応答を再現する必要がある。ところが、本研究に着手する前までに得られていた Man3-OML による免疫細胞応答は、すべて Man3-OML をマウスに直接投与した場合に観察されたものであり、*in vitro* で細胞応答を再現することはできていなかった。以上のような背景を踏まえ、筆者はヒト MNP の Man3-OML に対する応答を *in vitro* で評価し、Man3-OML がヒトの細胞性免疫誘導型ワクチンアジュバントとして適しているかを判断することを最終目標として研究に着手した。

本論文は 5 章から成り、第 1 章では、ワクチンならびに新規アジュバントの必要性について論述し、Mna3-OML に関する過去の研究成果を総括するとともに、本論文の背景および目的について述べた。

第 2 章では、*in vivo* へ投与した場合にだけ観察されていた Man3-OML に対するマウス MNP の応答を *in vitro* で再現することを試みた。その結果、マウスの末梢血単核細胞を用いることで、末梢血中の炎症性単球が *in vitro* で Man3-OML に対して応答性を示し、MHC-II および補助刺激分子の発現上昇を伴い活性化することを明らかにした。本章で得られた結果の中で特筆すべき点は以下の 2 点である。

- ① *in vitro* で抗原封入 Man3-OML を用いて刺激をしても、*in vivo* に投与した場合と同様に MHC-I へ抗原をクロスプレゼンテーションできる。
- ② *in vitro* で抗原封入 Man3-OML を取り込んで活性化した炎症性単球を生体内に再導入すると、Man3-OML で直接免疫した場合と同様に抗原特異的な

Th1 免疫応答を誘導できる。

これらの結果は、*in vitro* で Man3-OML によって活性化した細胞が生体内で T 細胞を活性化できる APC へと導かれ、適切な Th1 免疫応答を誘導できることを示しており、*in vitro* で Man3-OML をマウスに直接投与した場合に観察された細胞応答を再現できたと言える。また本研究の成果は、生体外でのヒト成熟 APC の作製への Man3-OML の応用の可能性を示すものでもある。

第 3 章では、Man3-OML がヒトの MNP を活性化できるかについて、ヒト MNP モデルである PMA-stimulated THP-1 細胞で検証した。その結果、以下の成果が得られた。

- ① PMA-stimulated THP-1 細胞もまた、マウス炎症性単球と同様に、*in vitro* で Man3-OML を取り込み、MHC-II と補助刺激分子の発現上昇と IL-12p40 の産生を伴い活性化することを確認した。
- ② 様々な構造をもつ Man3-OML に対する PMA-stimulated THP-1 細胞の応答を検討したところ、これまでマウスに対して用いてきた Man3 で被覆された粒子径 1  $\mu\text{m}$  の Man3-OML がヒトの MNP の活性化においても最も適していることを確認した。
- ③ LPS による細胞の活性化との比較から、Man3-OML は LPS とは異なり TLR/MyD88 非依存的経路で細胞を活性化することも明らかにした。

これらの成果から、Man3-OML を実際のヒト MNP に対して適応できることが明らかになった。

第 4 章では、健常人の末梢血由来の MNP および moDC の Man3-OML による活性化を評価し、以下の成果を得た。



- ① 健常人の末梢血中の炎症性単球が Man3-OML を素早く取り込み、マウス炎症性単球や PMA-stimulated THP-1 細胞と同様に活性化する。
- ② 末梢血単球 (CD14<sup>+</sup> monocytes) から誘導した未熟 moDC を Man3-OML で刺激すると、DC の成熟マーカーである CD83 と所属リンパ節への遊走に必須である CCR7 の発現を伴い、成熟 DC の表現型を示す細胞へと誘導される。
- ③ Man3-OML 処理によって成熟化した mo DC は、Th1 細胞を誘導するために必須である IL-12p70 を産生する能力も有している。またその能力は T 細胞とコンタクトした後も維持される。

これらの結果は、Man3-OML は他のサイトカインなどを必要とせず単独で、ヒト未熟 DC を細胞性免疫応答 (Th1 および CTL) の誘導が可能な成熟 DC へと *in vitro* で導くことできるアジュバント活性を持っていることを示している。従って本研究を通して、Man3-OML が CTL や Th1 免疫応答が病態制御のエフェクターとなるような疾患、すなわちウイルス感染症やがんに対するヒトワクチンアジュバントとして適していることが明確に証明された。一方で本研究の成果は、生体外での成熟 DC の作製技術への応用が可能であることも示している。

## 5-2. がんの細胞療法への OML の応用展開

がんの排除に関わるエフェクター細胞はがん抗原特異的 CTL であり、がんの免疫療法においては、がん抗原特異的 CTL を誘導する必要がある。いわゆる細胞療法では、生体外でがん抗原を提示した成熟 DC を作製し患者に再導入して生体内でがん特異的 CTL の誘導を期待するか、生体外でがん特異的 CTL を作製・増殖させて、それらを患者に戻す戦略が取られる。どちらの場合も CTL/Th1

を誘導できるように成熟した DC を生体外で作製する必要がある。

未熟 DC は末梢血中にはほとんど存在しないため、末梢血中の CD14<sup>+</sup>単球から GM-CSF と IL-4 で 7 日間処理して誘導した未熟 moDC を用いるのが一般的である。その後適切な抗原と混合することで MHC 上に抗原を強制的に提示させた moDC は、TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, および Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) を含むサイトカインカクテルで 1 日から 2 日刺激を行うことで、抗原を提示した成熟 DC へと導かれる (17)。しかし、現在行われている方法では、抗原を DC に提示させるステップ、および成熟化ステップに問題点が指摘されている。特に PGE<sub>2</sub> を含む上記サイトカインカクテルで成熟させた DC は、活性化 T 細胞を Th1 細胞へと導くために必須である IL-12p70 の産生能が著しく低く、免疫抑制に関わる制御性 T 細胞 (Treg) が誘導されてしまうという重大な欠点がある (18, 19)。また、強制的に外部から MHC 上に載せられた抗原ペプチドは、MHC-ペプチド複合体の半減期が短いことから、CTL 誘導には適していないという指摘もある (20)。そこで、これらの問題点を克服するための方法が模索されている。その一つとして PGE<sub>2</sub> の代わりに TLR リガンドなどを含むカクテルが試されており、一定の成果が得られている。

ところで本研究で筆者が明らかにしたように、Man3-OML の刺激によって導かれた成熟 DC は、従来のサイトカインカクテルの刺激によって導かれた成熟 DC とは異なり、Th1 応答や CTL を誘導する能力が高いと考えられる。さらに重要なことは、Man3-OML に応答した DC の成熟にはいかなるサイトカインや他の刺激分子を必要としない点にある。現在用いられているカクテルには複数の組換えサイトカインが含まれており、それぞれの作製および品質管理に多くの

コストが必要となる。一方 Man3-OML に含まれている DPPC および Cholesterol はいずれも安価なものであり、Man3-DPPE も大量に合成ができるため品質管理に多くのコストを割く必要性がない。これらの理由から、Man3-OML をサイトカインカクテルの代わりに用いることは、生体外で CTL 誘導型の DC を作製できるだけでなく、細胞療法に関わる費用の削減につながると予想される。

また、既存の方法では DC に抗原を提示させるためのステップは、成熟化のステップとは別のステップになっているのに対して、第 2 章で述べた通り、Man3-OML を用いることで抗原の MHC へのクロスプレゼンテーションと DC の成熟化が同時に達成できる。従ってこの点においても、Man3-OML による DC の成熟過程は既存の方法よりも優れているといえる。リポソーム媒体を用いる利点の一つは、非常に大きいタンパク質も内部に封入できることである。MHC-I 上に提示されるがん抗原 (TAA) のいくつかは同定されているが、MHC-II 上へ提示される TAA を含めてその多くは同定されていない。このような場合、患者由来のがん組織の抽出物そのものが TAA として用いられる。Man3-OML 中にこれらの抽出物も封入することで DC へと送達することが可能となる。すでにかん細胞抽出物や原虫抽出物を封入したリポソームを用いたワクチン接種で、抗原特異的 CTL や Th1 免疫応答が誘導されることがマウスで示されていることから (4, 6)、ヒト DC に取り込まれた抗原タンパク質も細胞内で適切にプロセスされて MHC 上にプレゼンテーションされると期待される。

一方、筆者は第 2 章において、*in vitro* で Man3-OML 処理した炎症性単球が活性化して成熟 APC の表現型を示すようになり、これを生体に再導入することで封入抗原特異的 Th1 免疫応答を誘導できることを示した。このことは、*in vitro*

で成熟 APC の表現型を示すようになった炎症性単球が、生体内で適切にリンパ組織に移行して獲得免疫応答を誘導できる DC 様細胞に自発的に誘導されることを示唆している。ヒト炎症性単球もマウスの場合と同様に Man3-OML 刺激によって活性化して成熟 APC の表現型を示すようになる。従ってヒトの場合でも、単離した炎症性単球を Man3-OML で刺激したのち生体内に再導入することで、炎症性単球が適切な抗原提示細胞へと生体内で自発的に誘導され、がんに対する適切な獲得免疫応答を誘導することも期待できる (Fig. 5-1)。しかし、この検証のためにはヒト化したマウスでのさらなる詳細な検討が必要である。

### 5-3. OML 実用化に向け克服すべき課題

Man3-OML は細胞性免疫誘導型ヒトワクチンアジュバントとして非常に適しているので、Man3-OML を基盤とした細胞性免疫誘導型ワクチンの開発が期待される。しかしそのためには幾つかの克服すべき課題がある。第 2 章で述べた通り、マウス MNP では Man3-OML に封入された抗原が MHC-I および MHC-II にクロスプレゼンテーションされることを示した。様々な傍証はヒト MNP においても封入抗原が提示されることを示している。しかし、本研究で筆者は Man3-OML に封入された抗原がヒト DC の MHC 分子上に提示され、T 細胞を活性化できるかという点についての検証を行っていない。したがって、ヒトへの応用を目指す上で、この課題を解決する必要がある。また筆者は第 3 章で、Man3-OML のヒト MNP の活性化には PI3 kinase と TLR/MyD88 経路非依存的な NF $\kappa$ B の活性化が必要であること、「糖鎖認識を起点とした貪食」が重要であることを示したが、未だ Man3-OML を認識する分子の同定には至っていない。し

たがって、認識分子とその分子を起点としたシグナル経路について明確にする必要がある。さらに、「糖鎖認識を起点とした貪食」という現象が MNP の活性化にどのように関わっているかを明らかにしなければならない。

本研究で使用した Man3-OML は基本的に Vortex mixer で脂質混合物を抗原溶液の中に分散させることで作製している。この方法は、小規模の実験には適しているが、実際のワクチン作製では実用的な方法ではない。したがって、抗原封入 OML を簡便にかつ大量に作製できる実用的な作製方法の確立も必須である。筆者が研究員として参画した「革新的技術開発・緊急展開事業」（生研支援センター）の「牛の放牧管理の効率化・生産性向上のための小型ピロプラズマ病ワクチンの実証研究」プロジェクト（帯広畜産大学・東海大学・産業技術総合研究所・共立製薬）において、東海大学の研究チームは、Man3-OML を大量に作製できる実用的な Man3-OML の製造方法の開発と、作製した Man3-OML の品質管理法の確立を達成している。開発された方法で実製造法に即して製造された Man3-OML を基盤とした小型ピロプラズマ病ワクチン（1ロット約 40,000 頭分）は、野外において牛の小型ピロプラズマ感染と疾患の発症を抑制するという一定の効果を示し、その Man3-OML ワクチン製剤は少なくとも 2 年間は安定であることも確認した（16）。残念ながら GLP および GCP 試験が実施できず動物医薬品としての製造販売承認の申請には至らなかったが、「革新的技術開発・緊急展開事業」で培われた技術はヒトに対するワクチン製剤へと応用できる。いずれにしろ、ヒトワクチンの薬機法上の GLP および GCP 試験を早急に実施する必要がある。

#### 5-4. 結語

本論文の冒頭にも述べたとおり、新興・再興感染症の脅威は確実に高まっております。この脅威に対応するために Th1 免疫誘導型ワクチンに資するアジュバントの開発は緊急の課題である。本研究で筆者は、Man3-OML がヒト未熟 DC を Th1 免疫誘導ができるように T 細胞を活性化できる成熟状態に導くことを実証した。本研究で得られた成果は、Man3-OML がヒトにおいて Th1 免疫を誘導できる有効で実用的なアジュバントとなりうることを示しており、感染症予防やがんの免疫療法に対して大きく貢献できると確信している。新規アジュバントの医療ニーズは高く、様々な研究ががん治療や感染症予防の枠を超えて広がっている (21)。リポソームのような粒子状のキャリアを用いて抗原を送達する方法は一つの抗原だけでなく、複数の抗原を同時に送達することや、他の免疫促進あるいは調節物質と抗原を同時に送達できるという優れた利点を持っている。さらに糖鎖は安定な低分子であり、化学合成が可能であることから薬学的に優れたターゲティングシグナルとなる。従ってこの両者の利点を兼ね備えた Man3-OML のような糖鎖修飾粒子は大変魅力的な抗原送達・細胞活性化のプラットフォームとなる。Man3-OML を基盤としたワクチンが 1 日も早く実用化されることを期待したい。

#### 5-5. 参考文献

1. Jérôme, A. Graser, R. Müller, R. E. Kontermann, A. Konur, Cytotoxic T lymphocytes responding to low dose TRP2 antigen are induced against B16 melanoma by liposome-encapsulated TRP2 peptide and CpG DNA adjuvant. *J. Immunother.* 29,

- 294-305 (2006)
2. H. Sun, K. G. Pollock, J. M. Brewer. Analysis of the role of vaccine adjuvants in modulating dendritic cell activation and antigen presentation *in vitro*. *Vaccine*, 21, 849-855 (2007)
  3. H. Takagi, N. Furuya, N. Kojima. Preferential production of IL-12 by peritoneal macrophages activated by liposomes prepared from neoglycolipids containing oligomannose residues. *Cytokine*, 40, 241-250 (2007)
  4. Y. Ikehara, N. Shiuchi, S. Kabata-Ikehara, H. Nakanishi, N. Yokoyama, H. Takagi, T. Nagata, Y. Koide, K. Kuzushima, T. Takahashi, K. Tsujimura, N. Kojima. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal macrophage. *Cancer Lett.*, 260,137-145 (2008)
  5. Y. Shimizu, H. Takagi, T. Nakayama, K. Yamakami, T. Tadakuma, N. Yokoyama, N. Kojima. Intraperitoneal Immunization With Oligomannose-Coated Liposome-Entrapped Soluble Leishmanial Antigen Induces Antigen-Specific T-helper Type 1 Immune Response in BALB/c Mice Through Uptake by Peritoneal Macrophages. *Parasit. Immunol.*, 29, 229-239 (2007)
  6. N.Kojima, L. Biao, T. Nakayama, M. Ishii, Y. Ikehara, K. Tsujimura. Oligomannose-coated liposomes as a therapeutic antigen-delivery and an adjuvant vehicle for induction of *in vivo* tumor immunity. *J. Control. Rel.*, 129, 26-32 (2008)
  7. M. Ishii, A. Koyama, H. Iseki, H. Narumi, N. Yokoyama, N. Kojima. Anti-allergic Potential of Oligomannose-Coated Liposome-Entrapped Cry j 1 as Immunotherapy for Japanese Cedar Pollinosis in Mice. *Int Immunopharm.*, 10, 1041-1046 (2010)

8. H. Zhang, Y. Nishikawa, J. Yamagishi, J. Zhou, Y. Ikehara, N. Kojima, N. Yokoyama, X. Xuan. *Neospora caninum*: Application of apical membrane antigen 1 encapsulated in the oligomannose-coated liposomes for reduction of offspring mortality from infection in BALB/c mice. *Exp. Parasitol.*, 2125, 130-136 (2010)
9. M. Ishii, N. Kojima. Mucosal adjuvant activity of oligomannose-coated liposomes for nasal immunization. *Glycoconj. J.*, 27, 115-123 (2010)
10. A. Kawakita, H. Shirasaki, M. Yasutomi, S. Tokuriki, M. Mayumi, H. Naiki, Y. Ohshima. Immunotherapy with oligomannose-coated liposomes ameliorates allergic symptoms in a murine food allergy model. *Allergy*, 67, 371-379 (2012)
11. T. Kawano, J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, M. Taniguchi. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of  $\alpha$ 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*, 287, 1626-1629 (1997)
12. K. Senchi, S. Matsumoto, H. Hasegawa, H. Kimura, A. Ryo. Development of oligomannose-coated liposome-based nasal vaccine against human parainfluenza virus type 3. *Front. Microbiol.*, 24, 346, doi: 10.3389/fmicb.2013.00346 (2013)
13. M.A. Terkawi, Y. Kuroda, S. Fukumoto, S. Tanaka, N. Kojima, Y. Nishikawa. *Plasmodium berghei* circumsporozoite protein encapsulated in oligomannose-coated liposomes confers protection against sporozoite infection in mice. *Malaria J.*, 13, 426 (2014)
14. T. Kozako, S. Hirata, Y. Shimizu, Y. Satoh, M. Yoshimitsu, Y. White, F. Lemonnier, H. Shimeno, S. Soeda, N. Arima. Oligomannose-coated liposomes efficiently induce



- human T-cell leukemia virus-1-specific cytotoxic T lymphocytes without adjuvant. *FEBS J.*, 278, 1358-1366 (2011)
15. M. Nishimura, J. Kohara, Y. Kuroda, J. Hiasa, S. Tanaka, Y. Muroi, N. Kojima, H. Furuoka, Y. Nishikawa. Oligomannose-coated liposome-entrapped dense granule protein 7 induces protective immune response to *Neospora caninum* in cattle. *Vaccine*, 31, 3528-3535 (2013)
16. 「牛の放牧管理の効率化・生産性向上のための小型ピロプラズマ病ワクチンの実証研究」最終報告書、平成 31 年 4 月
17. H. Jonuleit, U. Kühn, G. Müller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop, A.H. Enk. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.*, 27, 3135–3142 (1997)
18. P. Kaliński, P.L. Vieira, J.H. Schuitemaker, E.C. de Jong, M.L. Kapsenberg. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood*, 97, 3466-3469 (2001)
19. W. Jongmans, D.M. Tiemessen, I.J. van Vlodrop, P.F. Mulders, E. Oosterwijk. Th1-polarizing capacity of clinical-grade dendritic cells is triggered by Ribomunyl but is compromised by PGE2: the importance of maturation cocktails. *J. Immunother.*, 28, 480–487 (2005)
20. B. Ludewig, K. McCoy, M. Pericin, A.F. Ochsenbein, T. Dumrese, B. Odermatt, R.E.M. Toes, C.J.M. Melief, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel. Rapid peptide turnover and inefficient presentation of exogenous antigen critically limit the

activation of self-reactive CTL by dendritic cells. J. Immunol., 166, 3678-3687

(2001)

21. 石井健、第9回厚生科学審議会予防接種・ワクチン分科会研究開発及び生産・流通部会、資料1、平成27年1月30日

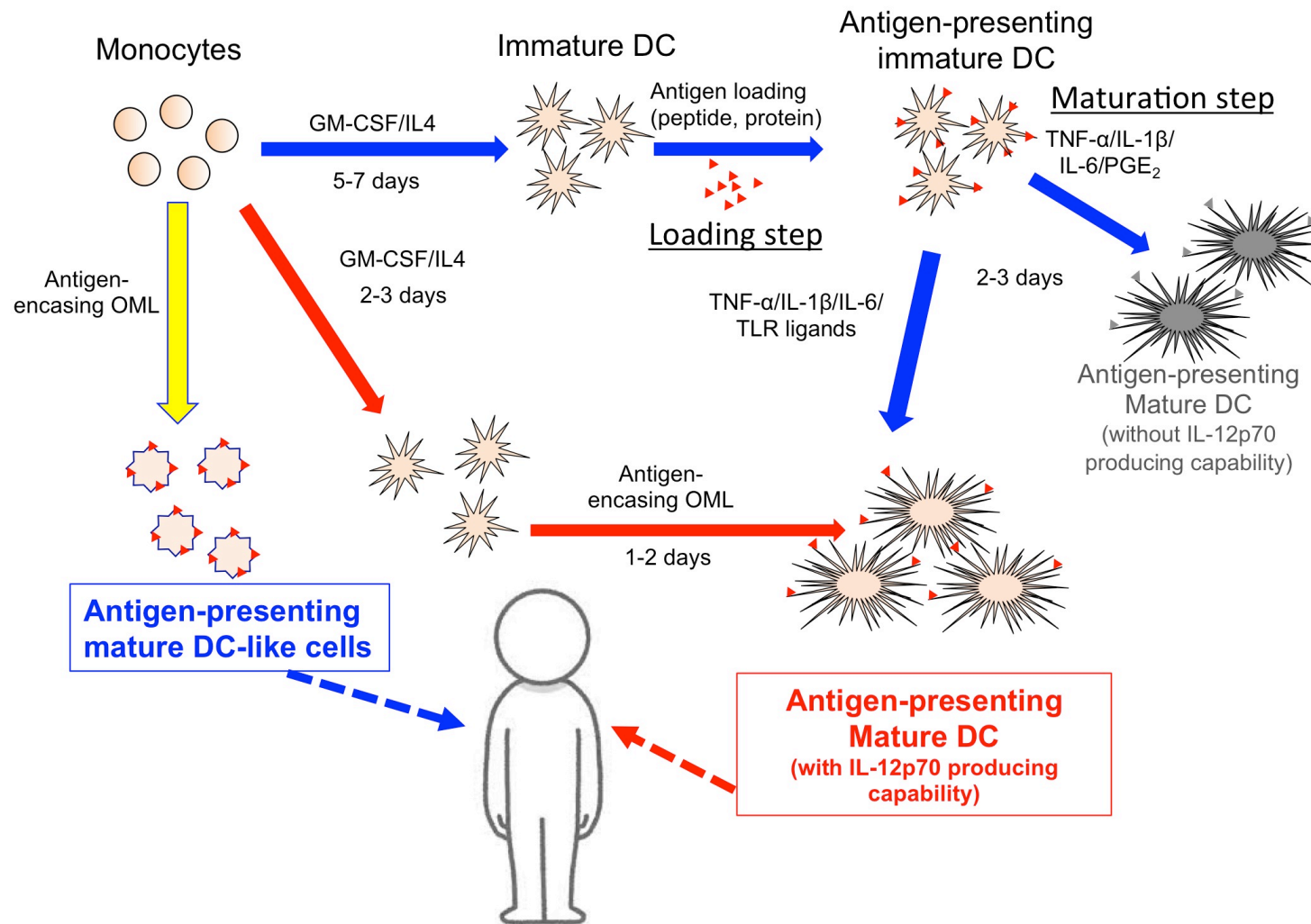


Fig.5-1. The strategy of antigen presenting mature APC using antigen-encasing OML

## 謝辞

東海大学工学部生命化学科小島直也教授には本研究を行う機会を与えていただき、終始温かいご指導を頂きました。心より感謝申し上げます。東京女子医科大学の川内喜代隆博士には本研究で用いましたヒト由来細胞の作製にあたり健常者からの採血をご協力いただきました。また、宮崎大学医学部医学科感染症学講座免疫学分野 佐藤克明教授、高木秀明准教授には OT-I マウスの脾細胞をご提供いただきました。帯広畜産大学原虫病研究センター 横山直明教授、千葉大学医学部腫瘍病理学講座 池原譲教授、共立製薬 浅井健一博士には生検支援センターのプロジェクトにおいて多大なご協力を頂きました。心より感謝申し上げます。東海大学工学部生命化学科黒田泰弘准教授、川内暢子博士には本研究を行うにあたり多大なご協力を頂きました。石井麻莉子さんをはじめとする歴代小島研究室の諸先輩方には本研究を行うための実験手技などをご指導頂きました。皆様に心より感謝申し上げます。

ありがとうございました。

本論文は以下の原著論文を基に作製しました。

・ Y. Matsuoka, Y. Kawauchi, Y. Kuroda, K. Kawauchi, N. Kojima, In vitro uptake of oligomannose-coated liposomes leads to differentiation of inflammatory monocytes into mature antigen-presenting cells that can activate T cells. *Int. Immunopharm.* 57, 102-111 (2018)

・ Y. Matsuoka, Y. Kawauchi, K. Kawauchi, A. Takiyama, S. Kojima, Y. Kuroda, N. Kojima, In vitro activation and maturation of human mononuclear phagocytes by stimulation with liposomes coated with a neoglycolipid containing  $\alpha$  1-3,  $\alpha$  1-6-mannotriose. *Glycoconjugate journal.* 36, 185-197 (2019)