薬 剤 学, **77** (4), 206–210 (2017)

≪若手研究者紹介≫

PEG 修飾リポソームに対する免疫反応機構解明とワクチンへの応用

清　水　太　郎*　Taro Shimizu
徳島大学大学院 医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野

1. は　じ　め　に

薬学部に入学した頃は，大学で研究を続けるとは全く思っていなかったが，気づけば学術研究の魅力に惹かれて現在に至っている．自分で言うのも何だが，真面目さと勉強熱心さだけが取り柄であり，創造的な研究を続けられるとは思っていなかった．しかし，学部時代から博士課程までの間，自由な発想のもとで研究できる環境で，際田弘志先生（現名誉教授），石田竜弘先生（現教授）からご指導を賜り，研究を一生の仕事として続けていきたいと思うようになった．研究テーマは，一貫してドラッグデリバリーシステム（DDS）と免疫に係るものであり，現在特にがん免疫療法に注目した研究を行っている．まだ学術研究者としての一歩を踏み出したばかりの私であるが，これまでの研究生活について，研究内容についても少し触れながら紹介させていただく．

2. 研究との出会い（学部・修士時代）

私の研究生活は，際田先生主宰の徳島大学薬学部薬剤学教室で開始した．私は高校の生物で免疫を習った時から，異物に特異的に反応して排除する免疫系の素晴らしさに衝撃を受け，免疫に絡んだ研究を行いたいと強く考えていた．当研究室ではリポソームに対する免疫反応について研究しており，私は迷わず選択した．当時から薬剤学教室は学生の人気も高く，最終的にじゃんけんで配属を勝ち取った．今思えば，恐ろしい話である．一方で，配属後の研究テーマの決定では，同期の皆が抗がん剤や siRNA を用いたがん治療デバイスの開発に関するテーマを希望したため，私は希望通りリポソームに対する免疫反応に関するテーマを選択することができた．研究テーマの選択では学生間で揉めることもあるかと思うが，自分が好きなものを選べたことが幸運であった．

希望通りの研究テーマで研究を開始したものの，正直，研究者として生きていけるとは全く考えていなかった．と言うのも手先が不器用で，なかなか動物実験がうまくできなかったからである．なかなかうまくできない私に辛抱強く付き合ってくれた当時の先輩方には今でも感謝している．この時期には，不器用なりに，人よりも多く実験をこなし，論文情報を多く集めて勉強し，考えることに必死に取り組んだ．また当時は，王新宇博士（現大塚製薬），跡部一孝博士（現徳島文理大学助教），田上辰秋博士（現名古屋市立大学講師）などをはじめとした先輩方に助けていただいた．特に研究グループの直近の先輩である王博士には大変お世話になった．何か新しい実験を始める際にはいろいろと相談にのってもらい，最後には「いける，いける（阿波弁で，大丈夫，何とかなる，という意）」と背中を押していただいたことで心強い気持ちで実験を始めることができたこ

*2009 年 3 月，徳島大学大学院薬科学教育部修士課程修了．同年，（株）廣貫堂入社（2011 年 7 月退社）．2014 年 9 月，同学博士課程修了，博士（薬学）取得．2014 年 10 月より，同学の総合薬学研究推進室特任助教に着任．その間，ブリティッシュコロンビア大学に半年間留学．受賞歴は，第 41 回製剤・創剤セミナー，第 25 回 DDS カンファランスにて Postdoctoral Presentation Award を受賞．研究テーマ：DDS を利用したワクチン開発．連絡先：〒770–8505 徳島市庄町 1–78–1
E-mail: shimizu.tarou@tokushima-u.ac.jp

とを記憶している．一方で，研究を始めたての頃にはよくあることではあるが，拙い知識と技術で何か新しいことができると思い込み，横道に逸れることも多々あった．その度に際田先生には「お花畑でただ花を摘んでばかりじゃ駄目だぞ」と諫められることもあった．そうは言っても，際田先生，石田先生ともに自由な発想でいろいろな実験をさせてくれたため，研究が面白く感じるようになった時期でもあった．

学部生の当時の私が取り組んでいた研究は，PEG修飾リポソーム繰り返し投与時に生じるAccelerated Blood Clearance（ABC）現象の発現機構の解明であり，特にPEG修飾リポソームに結合する抗体の特性評価であった．ABC現象の詳細については他の総説[1]をご覧いただければと思う．抗体の特性評価に関しては，ELISAの測定系を確立することから始まり，誘導された抗体がPEGに結合することを明らかにした．遊離型のPEGへの結合を評価する際には競合ELISA法を用いたが，この測定法の妥当性については先生方と何度か議論になった．本実験では，遊離型のPEGを競合物質として用いたが，PEGはタンパク沈殿にも用いられるため添加量が増えると抗体を沈殿させ，結果抗体の結合を阻害したように見えているのではないか，PEGがコーティング物質を剥がすのではないかなど様々な指摘を受けた．最終的にはいずれも問題ないことを確認できたが，何か新しい測定系を確立するには，その妥当性を様々な観点から確認しなければならないことを実感した．

一つの自信になったのが，研究室配属から１年経たない４年生の夏という早い時期にDDS学会で口頭発表をする機会を与えていただいたことだ．質疑応答の時に石田先生のヘルプが出る羽目となったが，それでも発表したこと自体が少し自信になった．また，王博士の実験のお手伝いもさせてもらい，初めて論文に名前が載ることになり，非常に嬉しかった[2]．このような第三者の目から批評してもらう機会は，自分の研究を見つめ直す良い機会であったことは言うまでもない．加えて，研究に取り組む別のモチベーションもあった．私は日本学生支援機構の奨学金をいただいていたが，大学院生では成績優秀者が全額免除される．学会発表や論文投稿は一つの評価点であったため積極的に取り組み，最終的に修士修了時に全額免除をいただけた．研究自体に対する直接的なモチベーションではないが，研究に必死に取り組む一つのきっかけであり，そこからいつしか研究に魅了されるようになった．

修士課程で取り組んだ主な研究は，PEG修飾タンパクやPEG修飾アデノウイルスに対する抗PEG免疫反応[3]（今回は割愛させていただく）と，PEG修飾リポソーム反応性の脾臓細胞の解析である．当時，PEG修飾リポソームは脾臓辺縁帯に存在する辺縁帯B細胞を刺激して，抗PEG抗体が誘導されることが既に明らかになっていた．私は，蛍光標識したPEG修飾リポソームを単回投与した後の脾臓切片観察やフローサイトメトリー解析を行うことで，当該細胞の挙動を観察しようとしたが，残念ながら，測定に用いた機器の感度の問題もあり，当時は観察できなかった．このまま終わるのももったいないと考えた私は，ひとまずPEG修飾リポソームの繰り返し投与時の脾臓内動態に着目した．ABC現象発現時には肝臓のマクロファージがPEG修飾リポソームを多量に取り込むことが分かっていた．そのため，脾臓のマクロファージも取り込み，脾臓にも多く蓄積すると予想していたが，実際その通りだった．そして興味深いことに，取り込みに関わる細胞はマクロファージではなく，辺縁帯B細胞であった[4]．さらに，本来辺縁帯に局在するはずの辺縁帯B細胞が濾胞に遊走することで，PEG修飾リポソームの蓄積が辺縁帯から濾胞に変化することが分かった（図1）．これは，辺縁帯B細胞が辺縁帯から濾胞へとリ

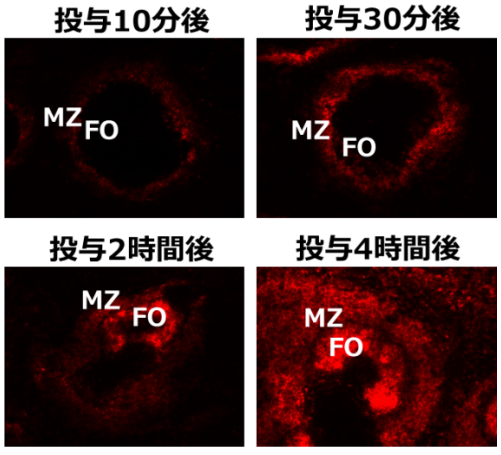


図１　PEG修飾リポソーム２回繰り返し投与時の脾臓内動態変化

ポソームを輸送することを示唆する初めての発見であり，現在にまで続く研究のスタート地点となった．

3. 企業における研究（社会人時代）

学術研究の魅力に惹かれていた私ではあるが，修士課程修了後は博士課程に進学せず，製薬企業に就職した．理由は幾つかあり，ポジティブな理由としては製品となる研究もやってみたいということ，ネガティブな理由としては博士課程に進学してアカデミックで生きていける自信がなかったこと，もう一つは経済的な問題である．

私が入社したのは，富山県の老舗企業である株式会社廣貫堂であり，開発本部に配属され主に製剤研究に携わった．短い期間ではあったが，口腔内崩壊錠や徐放性製剤の製剤技術の開発に携わり，ジェネリック医薬品や健康食品開発の一端にも触れる機会を得た．その他にも，工場でのスケールアップ検討や受託の営業も少し経験させていただいた．このような多くの経験をさせてもらえたのはなかなかないことであり，当時直属の上司であった林庸平さんをはじめ，様々な方に大変お世話になり，感謝の念に堪えない．

企業に入って変わったことは，学術論文よりも特許を読むようになったことである．当然ではあるが，特許に抵触していれば販売まで導くのは困難であり，意味をなさないからである．製造スケールや製造コストについても同様である．また各種ガイドラインやレギュレーションについても勉強するようになった．大学で研究していた際は，新しい素材を使って，特殊な製法でもとにかく良いものを作ろうとしていたが，それだけではいけないということも実感できた．

最終的には，製品となる研究を面白く感じた一方で，基礎的な部分をもっと勉強したいという強い思いから，2年4か月で退職することになった．博士課程では母校の徳島大学に進学し，再び際田先生・石田先生のお世話になった．際田先生からは，社会に送り出したのに中途半端なことをするのは良くないとお叱りを受けたが，最終的には受け入れていただき，新しい挑戦が始まった．

4. 学術研究者を目指して（博士課程時代）

博士課程に戻り，自分の研究だけに全て集中できるかというと，そういうわけではなかった．後輩の実験の面倒をみることが増え，生活のためにアルバイトをする必要もあった．これまで少し逃げていた論文執筆もやらなければという意志が固まっていった．そんな中，学術振興会の特別研究員（DC2）に採択されたことで，生活および研究の面で励みになった．

ここで特別研究員としての研究内容について簡単に紹介させていただく．修士課程までの研究から，PEG修飾リポソームの繰り返し投与時に2回目投与リポソームが辺縁帯B細胞に結合し，濾胞に輸送されることを明らかにした．濾胞は免疫反応の成熟領域であるため，2回目投与リポソームに抗原を封入すれば，抗原に対する免疫反応を増強できるのではないかと考えた．実際に，抗原特異的な体液性免疫反応および細胞性免疫反応を誘導できることを明らかにした．また，2回目投与リポソームが辺縁帯B細胞に選択的に結合するメカニズムについても検討した[5]．辺縁帯B細胞はPEG特異的にリポソームを取り込んでいたため，従来はB細胞上のPEG特異的抗体（B細胞受容体）を介して取り込まれると考えていた．しかし実際は，血中の抗PEG抗体がリポソームに結合した後，補体が結合し，補体受容体を高発現する辺縁帯B細胞がこれを取り込んでいることを示した（図2）．

博士課程に進学してからは，海外での学会発表も行うようになった．そもそも海外に行ったことがな

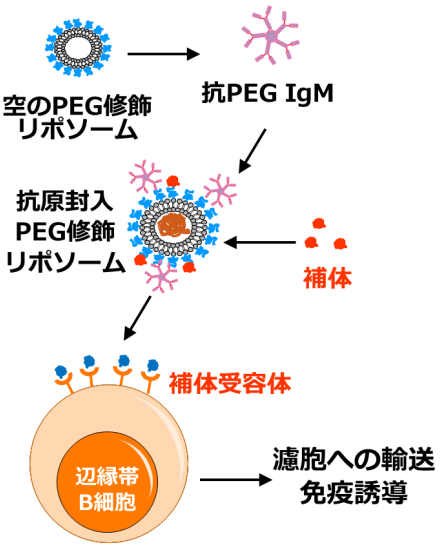


図2　抗PEG抗体および補体依存的なPEG修飾リポソームの取り込みと濾胞への輸送

かった私だったが，進学後すぐにロンドンで開催された International Liposome Society に参加し，ポスター発表を行った．先生方が所用のため参加できず，後輩との２人旅でありかなり不安だったのを覚えている．しかし，現地では日本から参加されていた奥直人先生（静岡県立大学）や丸山一雄先生（帝京大学）が気にかけてくださり，大変助かった．このように著名な先生方と知り合いになり，その後挨拶を交わせるようになることは，国際学会参加の良いところだと思う．また，博士課程２年の時にはハワイで開催された Controlled Release Society で初めて英語で口頭発表する機会を得た．ポスター発表だろうと高をくくっていたので，決まった時は正直焦ったのを覚えている．留学生と話すようにしたり，NIH の Podcast などを見たりして英語に慣れるように頑張った．終わってみれば，発表も無難にこなし，その上，口頭発表の後にフロアや廊下で質問を多くもらったり，多くの参加者と名刺交換をすることができたりと非常に有意義な経験をすることができた．また，永井記念薬学国際交流財団から Travel Grant を受けていたこともあり，永井恒司先生が講演を聞きに来てくださっており，大変名誉に思ったのを覚えている．改めて御礼申し上げたい．同世代の学生間の交流が盛んになったのもこの時期である．日本薬剤学会の学生シンポジウム（SNPEE）で組織委員を務めさせてもらった．シンポジウムの準備の大変さを学んだのはもちろんだが，組織委員間でメールのやり取りや情報交換を密に行い，同世代の学生が研究に対してどんな考えを持っているか知る機会になり，刺激を受けた．

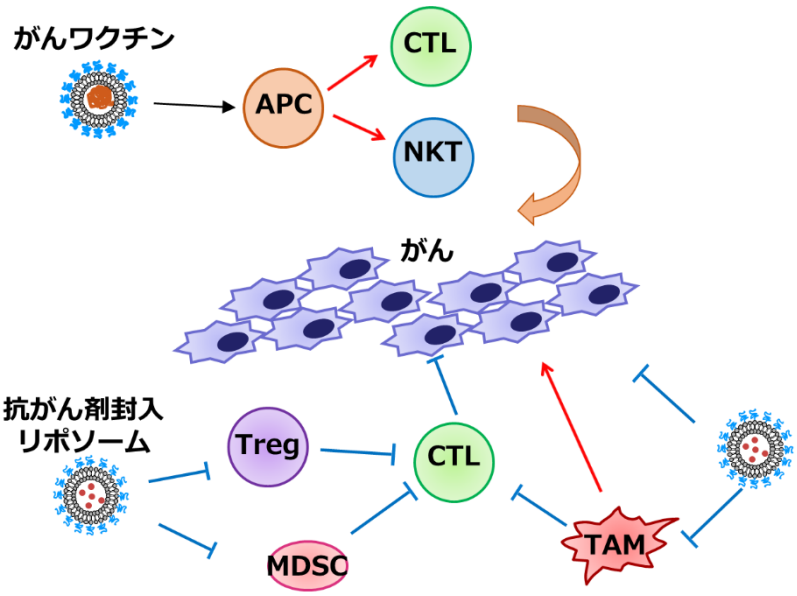
5. 博士取得後からこれまで

博士課程修了後，これまでのご縁もあって母校の徳島大学の石田先生の研究室にて特任助教として働くことになった．しかし，そんな矢先にボスの石田先生から留学してみないかとのお誘いがあり，半年後には留学を経験した．行先はカナダのバンクーバーにある University of British Columbia（UBC）の Shyh-Dar Li 先生の研究室だった．Li 先生のもとには以前，研究室の先輩の田上先生が留学していた経緯もあり，話は順調に進んだ．UBC で働くための Work Permit（カナダでの就労 VISA）の申請やアパート探しには苦労した．また留学期間中に指導している学生が困らないように上手く引き継ぎもしなければならなかった．最終的には，周りの様々なサポートを得て何とか出発できた．なお留学に際しては，永井記念薬学国際交流財団より Research Grant をいただき，ご支援をいただいたことに改めて御礼申し上げたい．

UBC での研究生活では，週１回の研究ミーティングや半期に１回の文献紹介（Journal Club）があった．初めのうちは自分の意見を伝えるのにかなり苦労したが，研究領域が近いこともあり，大学院生から多くの質問を受けたり，議論したりする機会が多かったおかげで，最後には多少はスムーズに議論できるようになった．また，半年間の研究成果などについて他の研究室との合同セミナーで１時間発表を行い，それを乗り切ったことは一つの自信となった．研究室のメンバーの中でも，台湾出身の大学院生とは特に仲良くなり，昼食をよく一緒にとり，休日には台湾料理や日本料理を食べに行ったり，安いスーパーを紹介してもらったりした．カナダで就職することを望んでいた彼は，研究にも非常に熱心で，研究の進め方や学術雑誌への論文の投稿についてよく議論し，その意識の高さに驚かされた．一方で，お互いの文化や歴史について話す機会もあったが，私自身の知識の不足もあり，伝えきれないこともあって難しかった．今後の課題である．

もちろん，教員となった後，現所属で学んだことも数えきれない．特に石田先生からは，博士課程時代から引き続き数多くのご指導を賜った．研究の進め方はもちろんのこと，論文作成や助成金の獲得のノウハウについて詳細に解説していただき，将来独立するためのことを考え，時には厳しく時には優しく指導してくださっている．

現在行っている主な研究テーマは，「補体活性化ポリマー修飾リポソームを用いた新規がんワクチン開発に関する研究」（科研費若手 B）である．博士課程時代の研究から，辺縁帯 B 細胞とリポソームの結合に補体が必要であることを明らかにしたため，補体活性化能を持つポリマー修飾リポソームを設計し，辺縁帯 B 細胞へと抗原を送達できる新規がんワクチンの開発を行っている．また，近年抗がん剤による腫瘍免疫系の調節に関する研究が盛んに行われており，抗がん剤封入リポソームと私が開発したがんワクチンを併用して，がん治療効果を増強できないか



APC:抗原提示細胞、CTL:細胞傷害性T細胞、NKT:ナチュラルキラーT細胞、Treg:制御性T細胞、MDSC:骨髄由来抑制性細胞、TAM:腫瘍関連マクロファージ

図3　がんワクチンと抗がん剤封入リポソームの併用によるがん治療効果増強戦略

と検討を行っているところである（図3）.

これまで，大学ではがむしゃらに基礎的な知見を得ることを目的として研究を行い，会社では製品として完成させるまでの難しさを学んだ．今後は，これまでの経験を生かし，最終的には臨床に繋がるようながん免疫療法を開発したいと考えている．また最近になってがん免疫療法開発に関するガイダンスについてまとめられてきたが，種差の問題，がんモデルの問題，安全性の問題などまだまだ多数の問題が存在している．がんワクチンに関しては，薬物動態学的知見も不足しており，薬剤学で学んだことを基に明らかにしていければと思う.

6. お　わ　り　に

本稿では，研究と出会ってからのこれまでの経緯を徒然なるままに紹介させていただいた．正直，人付き合いも苦手な私だが，幸運なことにこれまで周りの人達に恵まれ，様々な経験を積ませていただいた．指導してくださった先生方，先輩，そして一緒に頑張ってきてくれた後輩，学生に改めて感謝申し上げたい．これから研究を通して皆様に少しでも恩返しできるよう精進していきたいと思う.

引　用　文　献

1) 清水太郎, 石田竜弘, Polyethylene glycol に対する抗体の特性，評価，抑制, *Drug Delivery System*, **31**, 300–307 (2016).
2) T. Ishida, X. Wang, T. Shimizu, K. Nawata, H. Kiwada, PEGylated liposomes elicit an anti-PEG IgM response in a T cell-independent manner, *J. Controlled Release*, **122**, 349–355 (2007).
3) T. Shimizu, M. Ichihara, Y. Yoshioka, T. Ishida, S. Nakagawa, H. Kiwada, Intravenous administration of polyethylene glycol-coated (PEGylated) proteins and PEGylated adenovirus elicits an anti-PEG immunoglobulin M response, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1336–1342 (2012).
4) T. Shimizu, T. Ishida, H. Kiwada, Transport of PEGylated liposomes from the splenic marginal zone to the follicle in the induction phase of the accelerated blood clearance phenomenon, *Immunobiology*, **218**, 725–732 (2013).
5) T. Shimizu, Y. Mima, Y. Hashimoto, M. Ukawa, H. Ando, H. Kiwada, T. Ishida, Anti-PEG IgM and complement system are required for the association of second doses of PEGylated liposomes with splenic marginal zone B cells, *Immunobiology*, **220**, 1151–1160 (2015).