

平成13年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

## ファイバーミュータントアデノウイルスベクターにより 遺伝子導入した樹状細胞の免疫学的機能評価と癌免 疫療法への応用

所 属 京都薬科大学

研究者 岡田 直貴

### 要 旨

従来型および RGD ファイバーミュータントアデノウイルスベクターによりモデル抗原遺伝子を導入した樹状細胞の免疫学的特性を比較検討し、樹状細胞を用いた免疫療法における RGD ファイバーミュータントアデノウイルスベクターの高い有用性を実証した。

### 1. 研究目的

ワクチン開発における重要な検討課題として、より有効な免疫応答を惹起できる抗原デリバリー法の開発が挙げられる。近年の免疫学および分子生物学の著しい発展に伴い、免疫系を構成する細胞あるいは機能分子の生物学的特性が急速に解明されてきており、免疫系の司令塔とも言うべき樹状細胞 (dendritic cell; DC) が抗原デリバリーのためのキャリアーとして注目されている。骨髄幹細胞に由来する DC は未熟な状態で生体内に広く分布しており、旺盛な貪食能によって細胞内に取り込んだ抗原を主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) とともに細胞表面上に提示可能なペプチドにまでプロセッシングする。この抗原刺激や炎症反応に伴って DC は成熟し、細胞表面に MHC 分子・共刺激分子といった抗原提示に必須な機能分子の発現を高めるとともに、輸入リンパ管や血管を介して最寄りのリンパ組織へと遊走する。リンパ組織に到達した成熟 DC は抗原特異的に naive T 細胞を感作・活性化することにより、T 細胞依存性の初期免疫応答を惹起することができる。現在、このような DC の免疫学的機能を利用した DC-based immunotherapy が、腫瘍特異抗原分子を標的とした癌の免疫学的抑圧に向けて精力的に研究されており、とりわけ腫瘍関連抗原 (tumor-associated antigen; TAA) ペプチドをパルスした DC による癌免疫療法に関しては既に臨床試験として進行しつつある。

しかしながら、TAA ペプチドをパルスした DC の抗原提示機能は、TAA ペプチドと MHC 分子の結合アフィニティーが低い、あるいは MHC 分子のターンオーバーにより TAA ペプチドが MHC 分子と解離してしまうことにより、一過性であることが報告されている。さらに、TAA ペプチドをパルスした DC による癌免疫療法は、患者の MHC ハプロタイプに適合する TAA ペプチドエピトープを同定することが不可欠であり、その適用において大きな制限を受けることになる。これらの問題点を解決するために、最近、DC に TAA をコードする遺伝子を導入することによって、DC への持続的な抗原供給を行うとともに、DC 内に full-length の TAA を発現させることで未同定の抗原エピトープをも DC に提示させようという試みが注目されている。

近年、種々の遺伝子導入法が開発されており、なかでもアデノウイルスベクター (Ad) は、増殖期・静止期の如何を問わず広範な種類の細胞・組織に効率良く遺伝子導入可能であることから、遺伝子治療のみならず基礎研究の分野においても広く用いられている。DC への遺伝子導入においても、Ad は現存する遺伝子治療用ベクターの中で、最も遺伝子導入・発現効率に優れたベクターである。しかしながら、DC は他の細胞種と比較して、Ad による遺伝子導入に比較的抵抗性を示すことが知られており、十分な遺伝子発現を達成するには高用量のベクター粒子を必要とする

ため、AdによるDCへの細胞毒性 (cytopathic effect) を発現する可能性が高い。従って、より少量の適用でDCへの十分な遺伝子発現が達成できるAdの開発が、DC-based gene immunotherapyの分野において急務とされている。このような現状に鑑み、これまでに報告者は、Ad遺伝子導入に対するDCの抵抗性がDCにおけるcoxsackie-adenovirus receptor (CAR)の低発現あるいは欠損に起因することを明らかとし、さらに、その結果に基づいて作製したファイバー領域にArg-Gly-Asp (RGD)配列を挿入したファイバーミュータントAd (RGD-Ad)が、従来型Adと比較してDCへの遺伝子導入・発現効率に極めて優れることを見出してきた。

そこで本研究では、DCへの遺伝子導入・発現におけるRGD-Adの優位性が、DC-based gene immunotherapyの治療効果増強に反映されるかについて詳細に検討することとした。具体的には、モデル抗原であるニワトリ卵白アルブミン (ovalbumin; OVA)の遺伝子を搭載したRGD-Adおよび従来型Adを作製し、両者によりそれぞれ遺伝子導入したDCのOVA特異的免疫誘導能を比較することで、DC-based gene immunotherapyにおけるRGD-Adシステムの有用性の実証を試みた。さらに、DCが細菌・ウイルス由来産物による刺激を受けることで成熟し、T細胞感作をより効果的に行うための機能変化を伴うという知見に基づき、ウイルス由来成分を含むRGD-Adの感染がDC機能に及ぼす影響についても詳細な検討を行った。

## 2. 研究方法

### 【培養細胞およびマウス】

本研究で用いたDC2.4細胞 (H-2<sup>b</sup>)は、Dr. Kenneth. L. Rock (Department of Pathology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA)から供与を受けた。DC2.4細胞は、C57BL/6マウス骨髄由来DCにレトロウイルスベクターを用いてマウスGM-CSF、v-myc、v-rafの各遺伝子を導入することにより樹立化され、未熟DCの表現型および機能を保持していることが明らかとされている。本細胞の培養には、RPMI 1640培地 (10% ウシ胎仔血清 (FBS)、2 mM L-グルタミン、100 μM 非必須アミノ酸、50 μM 2-メルカプトエタノール (2-ME)、抗生物質を含む)を用いた。また、OVAペプチド-MHC class I複合体を特異的に認識してIL-2を分泌するCD8-OVA 1.3細胞は、Dr. Clifford V. Harding (Department of Pathology, Case Western Reserve University, Cleveland, OH)から供与を受け、DMEM培地 (10% FBS、50 μM 2-ME、抗生物質を含む)を用いて培養した。EL4細胞 (H-2<sup>b</sup>)はRPMI 1640培地 (10% FBS、50 μM 2-ME、抗生物質を含む)を用いて培養した。E.G7-OVA細胞 (EL4細胞のOVAトランスフェクタント)はRPMI 1640培地 (10% FBS、50 μM 2-ME、400 μg/ml G418を含む)を用いて培養した。HEK293細胞はDMEM培地 (10% FBS、抗生物質を含む)を用いて培養した。C57BL/6マウス (H-2<sup>b</sup>; 7週齢、メス)は、清水実験材料株式会社 (京都)から購入した。

### 【Adの構築】

本研究に用いた非増殖性Adは、E1およびE3領域を欠損させたアデノウイルス type 5をもとに、共同研究者である水口裕之博士 (国立医薬品食品衛生研究所)らの開発したimproved in vitro ligation methodに従って作製した。本法は、AdゲノムのE1欠損領域に3つのユニークな制限酵素サイトを挿入することにより、プラスミド構築等で一般的に行われているin vitro ligation methodを用いるだけでAdゲノムへの目的遺伝子の組み込みを可能とし、従来の相同組換えを利用したAd作製法と比較して、極めて簡便に且つ高い効率で新規Adを構築できる画期的な方法である。Fig. 1に今回作製したAdのコンストラクトを示す。従来型AdであるAd-OVAは、サイトメガロウイルスプロモーターの制御下にOVA cDNAを組み込んだAdである。また、AdRGD-OVAは従来型Adと同一の発現カセットを持ち、さらにファイバーのHI loop領域にRGD配列に相当するオリゴヌクレオチドを組み込んだRGD-Adである。ファイバー領域の遺伝子改変は水口博士の開発したtwo-step methodに準拠して行った。この遺伝子改変についても、HI loop領域にユニークな制限酵素サイトが挿入されていることにより、任意の合成オリゴヌクレオチドを簡便に効率良く挿入することが可能である。作製したAdはHEK293細胞内で増殖させ、塩化セシウム密度勾配遠心にて精製し、Ad粒子

数の測定は Maizel らの方法に従った。

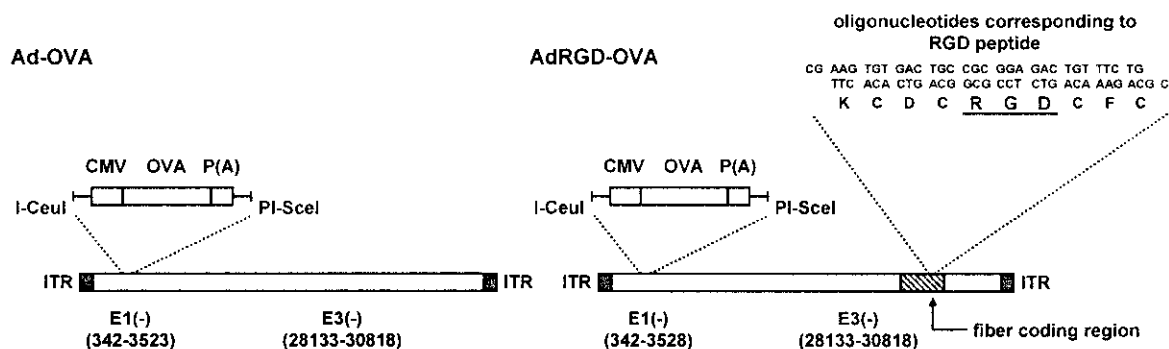


Fig. 1. Schematic representation of Ad-OVA and AdRGD-OVA. ITR, inverted terminal repeat; CMV, cytomegalovirus promoter; P(A), bovine growth hormone polyadenylation signal.

【Ad-OVA あるいは AdRGD-OVA を用いた遺伝子導入に伴う DC2.4 細胞への細胞毒性】

96 穴培養プレートに  $5 \times 10^4$  cells/well で DC2.4 細胞を播種し、種々の用量の AdRGD-OVA あるいは Ad-OVA を  $37^\circ\text{C}$  で 1.5 時間感染させた。その後、上清を除去し、新たな培地を添加して培養した。24 時間後および 48 時間後に MTT assay を行い、DC2.4 細胞の viability を測定した。

【Ad-OVA あるいは AdRGD-OVA を感染させた DC2.4 細胞の MHC class I 抗原提示レベル】

96 穴培養プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で DC2.4 細胞を播種し、一晩培養した。種々の用量の AdRGD-OVA あるいは Ad-OVA を  $37^\circ\text{C}$  で 1.5 時間感染させ、新たな培地を添加してさらに培養した。6 時間後、24 時間後あるいは 48 時間後に上清を除去し、 $1 \times 10^5$  cells/well の CD8-OVA 1.3 細胞と 20 時間共培養した。その後、上清を回収し、IL-2 ELISA KIT (BIOSOURCE INTERNATIONAL, Camarillo, CA) を用いて IL-2 濃度を定量した。

【Ad-OVA あるいは AdRGD-OVA を感染させた DC2.4 細胞のマウスへの免疫】

Ad-OVA あるいは AdRGD-OVA を 1000 あるいは 4000 vector particles/cell の用量で DC2.4 細胞に 1.5 時間感染させた。2 日間培養した後、DC2.4 細胞を  $50 \mu\text{g/ml}$  のマイトマイシン C 溶液で 30 分間インキュベートし、細胞増殖を抑制した。リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) で細胞を洗浄・再懸濁し、 $1 \times 10^6$  cells/100  $\mu\text{l}$ /mouse あるいは  $1 \times 10^5$  cells/100  $\mu\text{l}$ /mouse でマウス右側腹部に皮内免疫した。

【OVA 特異的細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) 活性の測定】

免疫 1 週間後にマウスから調製した脾細胞を、 $50 \mu\text{g/ml}$  のマイトマイシン C 溶液で 30 分間処理した E.G7-OVA 細胞と 5 日間共培養することにより in vitro 抗原再刺激を行い、エフェクター細胞とした。ターゲット細胞となる E.G7-OVA 細胞および EL4 細胞は europium でラベルし、 $1 \times 10^4$  cells/well で 96 穴丸底培養プレートに播種した。種々のエフェクター細胞/ターゲット細胞 (E/T) 比となるようにエフェクター細胞を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間インキュベートした。その後、上清中の europium 放出量を時間分解蛍光測定法で定量し、エフェクター細胞の細胞傷害活性を評価した。

【腫瘍拒絶実験】

免疫 1 週間後に、E.G7-OVA 細胞を  $1 \times 10^6$  cells/50  $\mu\text{l}$ /mouse でマウス左側腹部に皮内接種した。経目的に腫瘍径を測定し、以下の式に従って腫瘍体積を算出した。

$$(\text{腫瘍体積; mm}^3) = (\text{腫瘍の長径; mm}) \times (\text{腫瘍の短径; mm})^2 \times 0.5236$$

尚、腫瘍の長径が 10 mm を超えたマウスあるいは腫瘍体積が  $400 \text{ mm}^3$  を超えたマウスは安楽死させた。また、腫瘍接種後 21 日目において全てのマウスは安楽死させた。

【Flow cytometry による DC2.4 細胞の表面マーカー発現解析】

Ad-OVA、AdRGD-OVA、目的遺伝子の発現カセットを含まない従来型 Ad (Ad-Null) あるいは RGD-Ad (AdRGD-Null) を 4000 vector particles/cell で DC2.4 細胞に 1.5 時間感染させ、新たな培地を添加して 24 時間培養した。また、成熟に伴う DC 機能変化のポジティブコントロールには、10 µg/ml のリポポリサッカライド (LPS) と 100 U/ml のマウス IFN- $\gamma$ を含む培地で 24 時間培養した DC2.4 細胞を用いた。各 DC2.4 細胞を staining buffer (0.1% ウシ血清アルブミン、0.01% NaN<sub>3</sub>を含む PBS) を用いて  $1 \times 10^5$  cells/100 µl に懸濁し、anti-Fc $\gamma$ RII/III モノクローナル抗体 (2.4G2) を添加して、氷上で 30 分間インキュベートすることによりブロッキング処理を行った。細胞を洗浄後、100 µl の staining buffer で再懸濁し、ビオチン標識した各抗体 (28-8-6 (anti-H-2K<sup>b</sup>/D<sup>b</sup>), AF6-120.1 (anti-I-A<sup>b</sup>), 16-10A1 (anti-CD80), GL1 (anti-CD86), 3/23 (anti-CD40), 3E2 (anti-CD54)) を添加して、氷上で 30 分間インキュベートした。細胞を洗浄後、phycoerythrin (PE) 標識ストレプトアビジンを含む 100 µl の staining buffer で再懸濁し、氷上で 30 分間インキュベートした。細胞を洗浄後、500 µl の staining buffer で再懸濁し、FACScalibur と CellQuest software (Becton Dickinson; 東京) を用いて表面マーカー発現レベルを解析した。尚、全ての免疫化学試薬は Phamingen (San Diego, CA) から購入した。

#### 【RT-PCR による DC2.4 細胞の IL-12 p40 mRNA 発現解析】

Ad-OVA、AdRGD-OVA、Ad-Null あるいは AdRGD-Null を 4000 vector particles/cell で DC2.4 細胞に 1.5 時間感染させ、新たな培地を添加して 24 時間培養した。また、成熟に伴う DC 機能変化のポジティブコントロールには、10 µg/ml の LPS を含む培地で 24 時間培養した DC2.4 細胞を用いた。各 DC2.4 細胞からの total RNA の抽出は、TRIZOL reagent (Life Technologies; 東京) を用いて行った。10 µg total RNA、10 µl 10×PCR buffer、20 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>、40 µl 2.5 mM dNTP、1 µM random hexamer、1 µM oligo(dT)、200 U ReverTra Ace (TOYOBO; 大阪) を含む反応混合液 (100 µl) を 42°C で 60 分間反応させ、逆転写を行った。マウス IL-12 p40 の PCR は、5 µl RT 産物、1.25 U Taq DNA ポリメラーゼ (TOYOBO)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM dNTP、0.5 µM プライマーを含む反応混合液 (50 µl) を用いて以下の条件で行った。

(センスプライマー): 5'-CTCACCTGTGACACGCCTGA-3'

(アンチセンスプライマー): 5'-CAGGACACTGAATACTTCTC-3'

(変性): 95°C、45 秒

(アニーリング): 48°C、60 秒

(伸長): 72°C、120 秒

(サイクル数): 40 回

PCR 産物は 3%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色の後、UV イルミネーター上で写真に記録した。尚、各 RT 産物を用いたβアクチンの PCR も同時に行い、RT-PCR 解析の精度確認を行った。

### 3. 研究成果

#### 【Ad-OVA あるいは AdRGD-OVA を用いた遺伝子導入に伴う DC2.4 細胞への細胞毒性】

Ad-OVA あるいは AdRGD-OVA を 4000 vector particles/cell 以下の用量で適用した際には、DC2.4 細胞の viability 低下は認められなかった。しかし、両ベクターともに 8000 vector particles/cell では、DC2.4 細胞にわずかな傷害を与えた。従って以降の検討では、両ベクターを 4000 vector particles/cell 以下で感染させた DC2.4 細胞について比較検討を行った。

#### 【Ad-OVA あるいは AdRGD-OVA を感染させた DC2.4 細胞の MHC class I 抗原提示レベル】

AdRGD-OVA 感染後 2 日間培養した DC2.4 細胞においては、ベクター粒子数依存的に MHC class I 抗原提示量が増大し、4000 vector particles/cell においては Ad-OVA を感染させた DC2.4 細胞と比較して約 10 倍の高値を示した (Fig. 2-A)。この結果は、AdRGD-OVA によって効率良く OVA 遺伝子が導入されることによって、DC2.4 細胞内で

高い OVA 発現が達成されたことを反映したものと考えられた。また、AdRGD-OVA 感染 DC2.4 細胞の MHC class I 抗原提示量は、感染後の培養時間に依存して増大することが判明した (Fig. 2-B)。この結果に基づき以降の検討では、Ad 感染後 2 日間培養した DC2.4 細胞を用いて検討することとした。

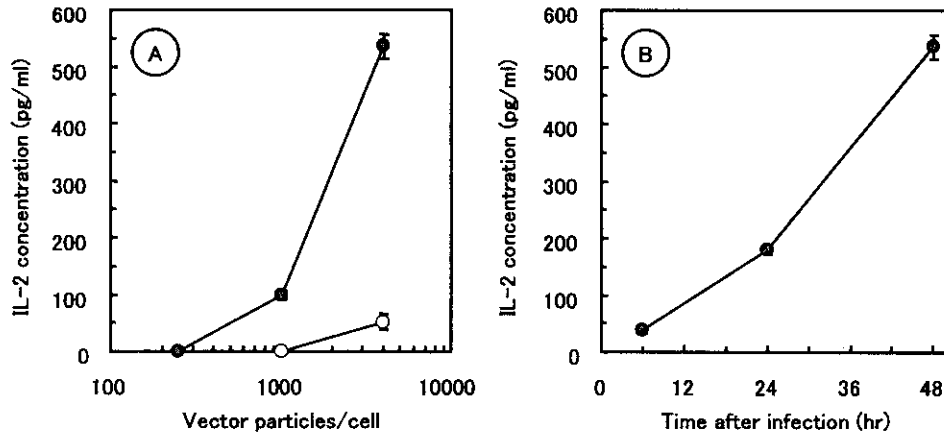


Fig. 2. Antigen presentation on MHC class I molecules by DC2.4 cells infected with Ad-OVA or AdRGD-OVA. A: DC2.4 cells were infected with Ad-OVA (○) or AdRGD-OVA (●) at 250, 1000, or 4000 vector particles/cell for 1.5 h. Two days later, antigen presentation was determined using CD8-OVA 1.3 cells. B: DC2.4 cells were infected with AdRGD-OVA at 4000 vector particles/cell for 1.5 h. After cultivation for the indicated time, an antigen presentation assay was performed. Each point represents the mean  $\pm$  SE of three independent cultures.

#### 【Ad-OVAあるいはAdRGD-OVAを感染させたDC2.4細胞のOVA特異的CTL誘導効果】

OVAトランスフェクタントであるE.G7-OVA細胞をターゲット細胞とした際には、Ad-OVA感染DC2.4細胞免疫群と比較して、AdRGD-OVA感染DC2.4細胞免疫群においてより強力な傷害活性が検出された。一方、AdRGD-LacZ(コントロールベクター)感染DC2.4細胞あるいはnaive DC2.4細胞を免疫した群ではE.G7-OVA細胞の傷害は認められず、また、OVAペプチドをMHC class I分子上に提示していないEL4細胞をターゲット細胞とした際には、どの群の脾細胞にも顕著な細胞傷害活性は検出されなかった (Fig. 3)。以上の結果から、AdRGD-OVAによりOVA遺伝子を効率良く導入されたDC2.4細胞は、高いMHC class I抗原提示を示すばかりでなく、in vivoにおいてOVA特異的CTL活性をより効果的に誘導できることが示された。

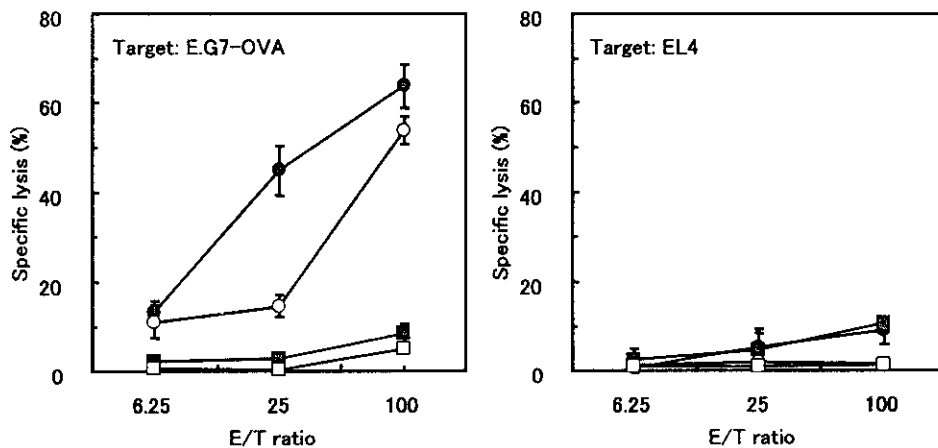


Fig. 3. OVA-specific CTL responses in mice immunized with Ad-OVA-infected or AdRGD-OVA-infected DC2.4 cells. C57BL/6 mice were immunized by intradermal injection of  $1 \times 10^6$  DC2.4 cells transduced by Ad-OVA (○), AdRGD-OVA (●), or AdRGD-LacZ (■). Similarly, naive DC2.4 cells (□) were intradermally injected into mice. One week later, mice were sacrificed, their spleens removed, and splenocytes were prepared. After in vitro restimulation with E.G7-OVA cells for 5 days, cytotoxic effects of splenocytes against E.G7-OVA cells or EL4 cells were evaluated by europium-release assay. Each point represents the mean  $\pm$  SE of 3-5 mice.



【Ad-OVA あるいは AdRGD-OVA を感染させた DC2.4 細胞の抗 E.G7-OVA 腫瘍効果】

免疫 1 週間後のマウスに E.G7-OVA 細胞を攻撃接種したところ、1000 vector particles/cell の AdRGD-OVA を感染させた DC2.4 細胞を  $1 \times 10^6$  cells/mouse で免疫した群では、4000 vector particles/cell の Ad-OVA を感染させた DC2.4 細胞を同様に免疫した群に匹敵する効果的な腫瘍増殖抑制効果が認められた。さらに、4000 vector particles/cell の AdRGD-OVA を適用した群では、 $1 \times 10^6$  cells/mouse あるいは  $1 \times 10^5$  cells/mouse で DC2.4 細胞を免疫することによって、全例における腫瘍の完全拒絶が達成された (Table 1)。この結果は、DC2.4 細胞への抗原遺伝子導入に RGD-Ad を用いることで、有効な腫瘍免疫を成立させるための感染ベクター量および投与 DC 数を少なく抑えられることを示しており、これは benefit/risk 比の高い DC-based gene immunotherapy の開発に貴重な基礎的情報を与えると考えられる。

Table 1. Summary of anti-E.G7-OVA tumor effect by immunization with DC2.4 cells infected with AdRGD-OVA or Ad-OVA

Ad-treatment for DC2.4 cells (vector particles/cell)	Number of administered DC2.4 cells	Tumor volume (mm <sup>3</sup> ) <sup>a)</sup>		Tumor-free mice <sup>b)</sup>
AdRGD-OVA (4000)	$1 \times 10^6$	0.0 ±	0.0	6/6
AdRGD-OVA (4000)	$1 \times 10^5$	0.0 ±	0.0	6/6
AdRGD-OVA (1000)	$1 \times 10^6$	17.0 ±	11.1	4/6
Ad-OVA (4000)	$1 \times 10^6$	20.4 ±	16.2	4/6
Ad-OVA (4000)	$1 \times 10^5$	72.6 ±	30.3	0/6
Ad-OVA (1000)	$1 \times 10^6$	48.4 ±	19.2	1/6
—	$1 \times 10^6$	144.8 ±	48.2	0/6

<sup>a)</sup>: Day 9 after tumor challenge, tumor volume (mm<sup>3</sup>) = (major axis) × (minor axis)<sup>2</sup> × 0.5236. Data are presented as means ± SE of 6 mice.

<sup>b)</sup>: Day 21 after tumor challenge, (tumor-free mice)/(tumor-challenged mice).

【Ad-OVA あるいは AdRGD-OVA を感染させた DC2.4 細胞の表面マーカーおよび IL-12 p40 mRNA 発現変化】

AdRGD-OVA を感染させた DC2.4 細胞では、MHC class I および class II 分子、CD80、CD86、CD40、CD54 の顕著な発現増強が認められ、そのレベルは LPS と IFN- $\gamma$  で刺激した DC2.4 細胞に匹敵した。一方、Ad-OVA、Ad-Null あるいは AdRGD-Null を感染させた DC2.4 細胞では、MHC class I 分子と CD40 の発現レベルにわずかな上昇が認められたに過ぎなかった (Table 2)。この結果は、Ad 感染により DC2.4 細胞は若干の成熟傾向を示し、AdRGD-OVA による十分な抗原遺伝子の導入と発現が達成されることによって、一層成熟が促されることを示唆している。

Table 2. Flow cytometry analysis of surface markers in Ad-infected DC2.4 cells

Treatment	Mean of fluorescence intensity (% of naive DC2.4 cells)					
	H-2K <sup>b</sup> /D <sup>b</sup>	I-A <sup>b</sup>	CD80	CD86	CD40	CD54
Ad-Null	127	102	103	107	200	91
AdRGD-Null	143	108	112	105	192	103
Ad-OVA	132	109	106	102	225	87
AdRGD-OVA	221	217	158	153	589	166
LPS + IFN- $\gamma$	226	348	130	145	1056	300

また、Ad-Null あるいは AdRGD-Null を感染させた DC2.4 細胞では、無処理の DC2.4 細胞と同様に IL-12 p40 mRNA の発現は検出されなかったが、Ad-OVA あるいは AdRGD-OVA を感染させた DC2.4 細胞では、わずかではあ

るが IL-12 p40 mRNA の発現増強が認められた (Fig. 4)。この結果から、抗原遺伝子の導入および発現が DC2.4 細胞における IL-12 産生の増強に繋がることが予想された。

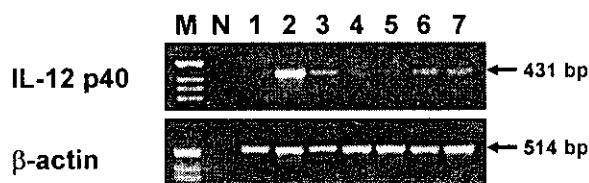


Fig. 4. RT-PCR analysis of murine IL-12 p40 in Ad-infected DC2.4 cells. DC2.4 cells were infected with four types of Ad at 4000 vector particles/cell, and then cultured for 24 h. Lane M: 100 bp molecular ruler, lane N: PCR using water as template, lane 1: RT-PCR from intact DC2.4 cells, lane 2: RT-PCR from B16/EMC cells (murine IL-12 transfectant), lane 3: RT-PCR from DC2.4 cells after treatment with LPS for 24 h, lane 4: RT-PCR from Ad-Null-infected DC2.4 cells, lane 5: RT-PCR from AdRGD-Null-infected DC2.4 cells, lane 6: RT-PCR from Ad-OVA-infected DC2.4 cells, lane 7: RT-PCR from AdRGD-OVA-infected DC2.4 cells.

#### 4. 考 察

癌免疫療法においては腫瘍抗原特異的な抗体産生の増強を主体とする液性免疫系の活性化ばかりでなく、むしろ腫瘍抗原特異的な CTL の誘導を中心とした細胞性免疫系の活性化が、有効な治療効果を得る上で重要であることが知られている。CTL の活性化には DC による抗原提示が MHC class I 分子を介して為される必要があることから、抗原を如何に効率良く DC の MHC class I 抗原提示経路に送達しうかが、有効な腫瘍免疫の誘導を目指した新規 DC 免疫療法の開発におけるキーファクターと言えよう。一般に、DC を含めた生体内の細胞が MHC class I 分子上に提示する抗原は、内在性抗原と呼ばれる細胞質内に発現した非自己あるいは変異タンパクである。従って、免疫療法の標的となる抗原をコードした遺伝子を DC に導入することは、内在性に且つ持続的に抗原を発現させることで DC に効率の良い MHC class I 抗原提示を促すことのできる魅力的な手法である。しかしながら、DC は現存するどの遺伝子導入法に対しても比較的抵抗性を示し、種々の細胞・組織に最も効率良く遺伝子導入可能とされる Ad を用いてさえ、細胞毒性を発現しないベクター用量で十分な遺伝子導入・発現を達成することは困難である。報告者は、これまでの研究において、DC には Ad 遺伝子導入の最初のステップに不可欠な CAR の発現が極めて乏しいあるいは欠損していることを見出しており、また、Ad ファイバーの HI ループに RGD ペプチドに相当するオリゴヌクレオチドを挿入した RGD-Ad が、従来型 Ad と比較して極めて優れた DC への遺伝子導入・発現効率を示すことを世界に先駆けて明らかとした。そこで本研究では、DC への遺伝子導入における RGD-Ad の優位性が、DC-based gene immunotherapy における治療効果増強に繋がるか否かについて、OVA をモデル抗原とした基礎的検討を行った。

まず、AdRGD-OVA および Ad-OVA を作製し、これらにより遺伝子導入した DC2.4 細胞における MHC class I 抗原提示レベルを比較検討したところ、AdRGD-OVA を適用した DC2.4 細胞ではベクター粒子数および感染後の培養時間に依存して抗原提示量が上昇し、Ad-OVA 感染 DC2.4 細胞と比較すると顕著に高い値を示した (Fig. 2)。この知見は、以前に LacZ 遺伝子あるいは EGFP 遺伝子をレポーター遺伝子として RGD-Ad および従来型 Ad による DC2.4 細胞への遺伝子導入・発現効率を評価した結果と極めて高い相関を示しており、AdRGD-OVA 感染 DC2.4 細胞における高い OVA 発現量が MHC class I 抗原提示レベルに直接反映されたものと推察できた。また報告者は、OVA タンパクをカチオニックリポソームである Lipofectin との複合体として DC2.4 細胞にパルスすると、ファゴサイトーシスによりエンドソーム内に高濃度に蓄積された OVA が細胞質中へと漏出することで、外来性抗原にもかかわらず MHC class I 抗原提示経路への指向性が向上することも既に明らかとしている。この OVA-Lipofectin 複合体を最適な条件で適用した DC2.4 細胞と比較して、今回 AdRGD-OVA を適用した DC2.4 細胞では著しく高い MHC class I 抗

原提示レベルが認められた。従って、RGD-Ad により DC2.4 細胞に導入された OVA 遺伝子の発現レベルは、ファゴサイトーシスにより取り込んだ外来性 OVA タンパクの細胞内蓄積量を大幅に上回るものであり、RGD-Ad による抗原遺伝子導入が DC における MHC class I 抗原提示の増強に非常に優れた手法であることが示唆された。

次に、DC-based gene immunotherapy における RGD-Ad システムの有用性を実証する目的で、AdRGD-OVA あるいは Ad-OVA を感染させた DC2.4 細胞のワクチン効果について比較を行った。近年、高用量の従来型 Ad を用いて抗原遺伝子あるいはサイトカイン遺伝子を導入した DC を免疫することにより、マウスモデルにおいて強力な腫瘍免疫を誘導できることが数多く報告されている。しかしながら、高用量の Ad 適用は DC への細胞毒性に繋がることから、治療効果は維持したまま、遺伝子導入に使用する Ad 用量をできる限り少なく抑えることのできるプロトコルの確立が望まれる。今回の検討では、DC への細胞毒性を発現しない用量 (4000 vector particles/cell) で AdRGD-OVA を感染させた DC2.4 細胞が、同用量の Ad-OVA を適用した DC2.4 細胞と比較して、免疫 7 日目のマウスにおける OVA 特異的 CTL 活性をより効果的に誘導できることが示された (Fig. 3)。さらに、4000 vector particles/cell の Ad-OVA を感染させた DC2.4 細胞を  $1 \times 10^6$  cells/mouse で免疫した場合とほぼ同等の抗 E.G7-OVA 腫瘍効果を引き出すために、AdRGD-OVA 感染 DC2.4 細胞を用いた免疫プロトコールにおいては、1/4 の感染 Ad 量あるいは 1/10 の免疫 DC2.4 細胞数で十分であった (Table 1)。従って、DC への遺伝子導入に用いる Ad 用量および有効な治療に必要とされる DC 数の調製を削減できるという観点から、RGD-Ad システムは臨床的に benefit/risk 比が高く且つより簡便性の増した新規 DC-based gene immunotherapy の開発に大きく貢献できるものと確信している。

最近、DC の生物学および免疫学的機能に関する研究が格段の進展を遂げたのに伴って、DC が免疫監視機構の根幹に位置する細胞であり、種々の刺激に应答して自らの表現型を変化させることで支配下の免疫応答を緻密に制御していることが明らかとなってきた。一般に DC は、未熟な状態で末梢組織に広く分布しており、抗原あるいは炎症反応に伴うメディエーターに刺激されることで成熟 DC へと機能変化する。DC が成熟すると、その細胞表面上の MHC 分子および共刺激分子の発現レベルが増強されるとともに、IL-12 の産生・分泌量が増大し、T 細胞を感作する抗原提示細胞としての能力を一層高めることが数多く報告されている。また、LPS、CpG モチーフ、二重鎖 RNA といった細菌・ウイルス由来産物が、Toll-like receptor によるシグナル伝達を介して DC の成熟を促すことも解明されてきた。そこで本研究では、ウイルス由来成分を含む Ad の感染が DC の成熟に影響を与えるか否かについて、表面マーカー (MHC class I, class II, CD80, CD86, CD40, CD54) 発現変化および IL-12 p40 mRNA 発現変化を指標に検討した。Ad-OVA あるいは目的遺伝子の発現を伴わない Ad-Null および AdRGD-Null を感染させた DC2.4 細胞では、MHC class I と CD40 の発現レベルにわずかな上昇を認めたに過ぎなかったが、AdRGD-OVA の感染では今回検討した全ての表面マーカーにおいて発現の増強が観察された (Table 2)。また、IL-12 p40 mRNA の発現レベルについては、Ad-Null あるいは AdRGD-Null の感染が影響を及ぼさなかったのに対して、AdRGD-OVA あるいは Ad-OVA を感染させた DC2.4 細胞では明らかな上昇が検出された (Fig. 4)。これらの結果を総合すると、4 種類の Ad の中で AdRGD-OVA の感染が最も DC2.4 細胞を成熟させることを示しており、これは DC2.4 細胞へ侵入できた Ad 粒子数の増加よりも、むしろ OVA 遺伝子の十分な導入・発現に起因するのではないかと推察された。しかし Morelli らは、Ad に組み込まれた目的遺伝子の種類や発現に関わらず、Ad を感染させた DC が NF- $\kappa$ B の活性化を伴って成熟することを報告している。一方で Dietz らは、Ad 感染およびそれに伴う遺伝子発現が、DC 成熟マーカーである CD83 の発現レベルおよび IL-12 p40 産生量に全く影響を及ぼさないことを示している。現在このように、DC 成熟に及ぼす Ad 感染の影響に関する世界的なコンセンサスは得られていないが、DC-based gene immunotherapy において効果的な免疫学的特性を備えた DC の調製に繋がる基礎的情報を収集するためにも、この点については今後さらに詳細な検討が必要であろうと考えている。

## 5. まとめ

細胞毒性を示さない用量の RGD-Ad を用いて効率良く OVA 遺伝子を導入した DC2.4 細胞では、同用量の従来型 Ad を適用した場合と比較して、MHC class I 分子を介した OVA ペプチド提示レベルの増強が認められ、さらに in vivo 免疫した際には、一層効果的な OVA 特異的 CTL 活性の誘導に基づく強力な抗 E.G7-OVA 腫瘍効果が観察された。また、AdRGD-OVA によって十分な OVA 発現を達成された DC2.4 細胞では、効果的な T 細胞の感作・活性化に繋がる MHC 分子・共刺激分子の発現増強ならびに IL-12 p40 の産生増強が認められ、成熟していることが示された。これらの結果は、癌患者末梢血より単離・分化誘導した DC を有効に利用し且つ効果的な免疫応答を惹起するという観点から、DC-based gene immunotherapy において RGD-Ad が非常に有用性の高いベクターシステムであることを示唆している。しかしながら今回の検討では、OVA がマウスにおいて極めて抗原性の高いモデル抗原であること、ならびに DC として cell line である DC2.4 細胞を用いていること、といった RGD-Ad を応用した DC-based gene immunotherapy の将来的な臨床展開の可能性を探る上で改善すべき点も残されている。今後、マウスおよびヒト初代培養 DC を用いた RGD-Ad 遺伝子導入の免疫学的優位性の実証を行うとともに、腫瘍に本来的に発現する腫瘍関連抗原を標的としたマウスモデル実験が不可欠であると考えている。

## 6. 研究発表

- 1) N. Okada, T. Saito, Y. Masunaga, Y. Tsukada, S. Nakagawa, H. Mizuguchi, K. Mori, Y. Okada, T. Fujita, T. Hayakawa, T. Mayumi, and A. Yamamoto. Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate anti-tumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells. *Cancer Res.* **61**, 7913-7919 (2001).
- 2) 岡田直貴 ファイバーミュータントアデノウイルスベクターを用いた樹状細胞への効率的な遺伝子導入 *薬学雑誌* **121**, 593-600 (2001).
- 3) N. Okada, T. Saito, K. Mori, Y. Masunaga, Y. Fujii, J. Fujita, K. Fujimoto, T. Nakanishi, K. Tanaka, S. Nakagawa, T. Mayumi, T. Fujita, and A. Yamamoto. Effects of lipofectin-antigen complexes on major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation pathway in murine dendritic cells and on dendritic cell maturation. *Biochim. Biophys. Acta* **1527**, 97-101 (2001).
- 4) N. Okada, M. Tsujino, Y. Hagiwara, A. Tada, Y. Tamura, K. Mori, T. Saito, S. Nakagawa, T. Mayumi, T. Fujita, and A. Yamamoto. Administration route-dependent vaccine efficiency of murine dendritic cells pulsed with antigens. *Br. J. Cancer* **84**, 1564-1570 (2001).
- 5) N. Okada, Y. Tsukada, S. Nakagawa, H. Mizuguchi, K. Mori, T. Saito, T. Fujita, A. Yamamoto, T. Hayakawa, and T. Mayumi. Efficient gene delivery into dendritic cells by fiber-mutant adenovirus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 173-179 (2001).

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社