

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

RGD 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てメラノーマ関連抗原遺伝子を導入した樹状細胞の免疫学的特性、抗メラノーマ効果および腫瘍免疫誘導機序を解析した。

1. 研究目的

樹状細胞 (DC) は生体内で最も強力な抗原提示細胞であることから、癌免疫療法のワクチン担体として大いに注目されており、近年、抗原遺伝子あるいはサイトカイン遺伝子を導入した DC の腫瘍免疫誘導効果が、種々の動物モデルにおいて数多く報告されている。DC への遺伝子導入には、広範な細胞種に最も効率良く遺伝子導入可能とされるアデノウイルスベクター (Ad) が専ら利用されているが、DCに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が必要とされ、AdによるDCへの細胞毒性を発現する可能性が高い。従って、細胞毒性を示さない用量でDCへの十分な遺伝子発現が達成できるベクターシステムの開発が、DC免疫療法の分野において急務とされてきた。

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) の低発現に起因することを見出し、さらに、 α_v インテグリン指向性を付与した RGD ファイバーミュータント Ad (AdRGD) を応用することにより、細胞毒性を示さないベクター用量における DC への極めて効率の良い遺伝子導入に成功した。また、モデル抗原遺伝子としてニワトリ卵白アルブミン (OVA) 遺伝子を用いた系において、AdRGD により遺伝子導入した DC が、従来型 Ad を適用した DC と比較して、MHC 分子を介した抗原提示能に優れており、マウスに免疫した際には、より効果的な OVA 特異的免疫応答を誘導することも明らかとした。これらの研究成果は、AdRGD を用いた DC への効率の良い抗原遺伝子デリバリーが、DC 免疫療法の有効性改善に直結することを強く示唆するものであるが、マウスにとって OVA は異種タンパクであり高い抗原性を有することから、腫瘍細胞に本来的に発現する腫瘍関連抗原を標的とした DC 免疫療法モデルにおける検討が不可欠である。

そこで本研究では、メラノーマ関連抗原 (MAA) の一つである gp100 の遺伝子を搭載した AdRGD および従来型 Ad を作製し、これらにより遺伝子導入した DC の免疫学的特性および抗メラノーマ効果を比較検討することで、DC 免疫療法における AdRGD 遺伝子導入の高い有用性を実証することとした。また、AdRGD で gp100 遺伝子を導入した DC のワクチン接種における腫瘍免疫誘導機序についても解析した。

2. 研究方法

【DC の単離】

C57BL/6 マウス (H-2^b) の骨髓細胞を GM-CSF 存在下で 8~12 日間培養することにより、未熟 DC を分化誘導した。また、未熟 DC を 1 μ g/ml の LPS で 24~48 時間刺激することで成熟 DC を調製した。

【Ad および AdRGD の構築】

非増殖性 Ad および AdRGD は、E1/E3 欠損アデノウイルス type 5 をもとに、improved *in vitro* ligation method に従って構築した。作製したベクター (Table 1) は HEK293 細胞を用いて増幅し、塩化セシウム密度勾配遠心にて精製した。各ベクターの力価 (PFU) は、HEK293 細胞を用いた end-point dilution method に準拠して測定した。

Table 1. Fiber type and expression cassette involved in each AdRGD and conventional Ad.

Vector ID	Fiber type	Promoter	cDNA (species)
Ad-gp100	WT	CA	gp100 (human)
AdRGD-gp100	RGD-mutant	CA	gp100 (human)
Ad-LacZ	WT	CMV	β -galactosidase (<i>E. coli</i>)
AdRGD-LacZ	RGD-mutant	CMV	β -galactosidase (<i>E. coli</i>)
Ad-Null	WT	-	-
AdRGD-Null	RGD-mutant	-	-

【DC への遺伝子導入】

適当な multiplicities of infection (MOI) に調整した Ad あるいは AdRGD 懸濁液で DC を 5×10^6 cells/ml に懸濁し、37°C で 2 時間インキュベーションした。その後、DC を PBS で 3 回洗浄し、以降の実験に供した。

【Ad-gp100 および AdRGD-gp100 の DC への遺伝子導入効率の評価】

Ad-gp100 あるいは AdRGD-gp100 により遺伝子導入した DC (Ad-gp100/DC あるいは AdRGD-gp100/DC) を 2 日間培養した後、total RNA を単離し、RT-PCR 解析により gp100 mRNA 発現レベルを評価した。また、これらの DC の細胞内 gp100 タンパク発現レベルは、抗 gp100 抗体 (HMB50) を用いた flow cytometry 解析により評価した。

【DC 表面マーカー発現レベルの解析および IL-12 の定量】

50 MOI で種々の Ad あるいは AdRGD を感染させた DC を 24 時間培養した後、標識抗体 (抗 I-A^b、抗 CD80、抗 CD86、抗 CD40) を用いた flow cytometry 解析により表面マーカー発現レベルを評価した。また、これらの DC を 1×10^5 cells/100 μ l/well で 96 穴プレートに播種し、24 および 48 時間後に回収した培養上清中の IL-12 濃度を ELISA により定量した。

【Mixed leukocyte reaction (MLR)】

50 MOI で遺伝子導入した Ad-gp100/DC あるいは AdRGD-gp100/DC を 2 日間培養し、50 μ g/ml の MMC で 30 分間処理した後、種々の細胞濃度で 96 穴プレートに播種した。BALB/c マウス (H-2^d) の脾細胞からナイロンウールカラムを用いて T 細胞を調製し、DC を播種した 96 穴プレートに 1×10^5 cells/well で添加した。これらの細胞を 3 日間共培養し、最後の 18 時間は培養液中に BrdU を共存させた。細胞を洗浄後、BrdU-ELISA を用いて T 細胞増殖を評価した。

【腫瘍拒絶実験】

50 MOI で遺伝子導入した Ad-gp100/DC あるいは AdRGD-gp100/DC を 1×10^6 cells/mouse で右側腹部に皮内免疫し、1 週間後に B16BL6 細胞 (H-2^b) を 2×10^5 cells/mouse で左側腹部に皮内接種した。経日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。(腫瘍体積; mm³) = (腫瘍の長径; mm) \times (腫瘍の短径; mm)² \times 0.5236

【肺転移実験】

ワクチンプロトコール: 1、5 あるいは 25 MOI で遺伝子導入した Ad-gp100/DC あるいは AdRGD-gp100/DC を 1×10^6 cells/mouse で右側腹部に皮内免疫し、1 週間後に B16BL6 細胞を 5×10^5 cells/mouse で尾静脈内投与した。2 週間後、これらのマウスから肺を摘出し、転移結節数を計測した。

治療プロトコール: B16BL6 細胞を 5×10^5 cells/mouse で尾静脈内投与し、その直後、3 日後および 7 日後に 5、25 あるいは 50 MOI で遺伝子導入した Ad-gp100/DC あるいは AdRGD-gp100/DC を 1×10^6 cells/mouse で右側腹部に皮内免疫した。最終免疫から 1 週間後、これらのマウスから肺を摘出し、転移結節数を計測した。

【Natural killer (NK)/細胞傷害性 T 細胞 (CTL) assay】

50 MOI で遺伝子導入した Ad-gp100/DC あるいは AdRGD-gp100/DC を 1×10^6 cells/mouse で右側腹部に皮内免疫し、1 週間後にこれらのマウスから脾細胞を単離・調製した。NK 活性測定にはこの脾細胞をエフェクター細胞として用いた。また、CTL 活性測定のエフェクター細胞は、脾細胞を B16BL6 細胞で 5 日間 *in vitro* 抗原再刺激を行うこ

とにより調製した。エフェクター細胞の傷害活性は Eu-release assay により測定し、NK 活性測定ターゲット細胞には YAC-1 細胞 (NK 高感受性) を、CTL 活性測定ターゲット細胞には B16BL6 細胞および EL4 細胞 (H-2^b) を用いた。

【*in vivo* depletion analysis】

50 MOI で遺伝子導入した AdRGD-gp100/DC を 1×10^6 cells/mouse で右側腹部に皮内免疫し、1 週間後に B16BL6 細胞を 1×10^5 cells/mouse で左側腹部に皮内接種した。免疫誘導相における CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞および NK 細胞の枯渇は、それぞれ GK1.5 (抗 CD4) 抗体、53-6.72 (抗 CD8) 抗体および抗 asialoGM1 抗体を AdRGD-gp100/DC を免疫する 3 日前から 1 日間隔で 3 回腹腔内投与した。また、免疫エフェクター相における各リンパ球サブセットの枯渇は、各抗体を B16BL6 細胞接種の 3 日前から 1 日間隔で 5 回腹腔内投与した。

3. 研究成果

【Ad-gp100 および AdRGD-gp100 の DC への遺伝子導入効率】

RT-PCR 解析の結果、Ad-gp100/DC および AdRGD-gp100/DC における gp100 mRNA の発現レベルはベクター用量依存的に増加し、同 MOI で比較した場合には、AdRGD-gp100/DC において Ad-gp100/DC よりも明らかに高い発現レベルが検出された (Fig. 1-A)。また、両ベクターを 50 MOI で感染させた際の細胞内 gp100 タンパク陽性 DC 率は、Ad-gp100/DC においてはわずか 8.3%であったのに対し、AdRGD-gp100/DC では 95%以上であり、AdRGD を用いることでほぼ全ての DC に腫瘍関連抗原遺伝子を送達できることが明らかとなった (Fig. 1-B)。尚、Ad-gp100 および AdRGD-gp100 の DC に対する細胞傷害性を検討したところ、両ベクターとも 50 MOI 以下の用量では DC の viability に全く影響を及ぼさなかった。

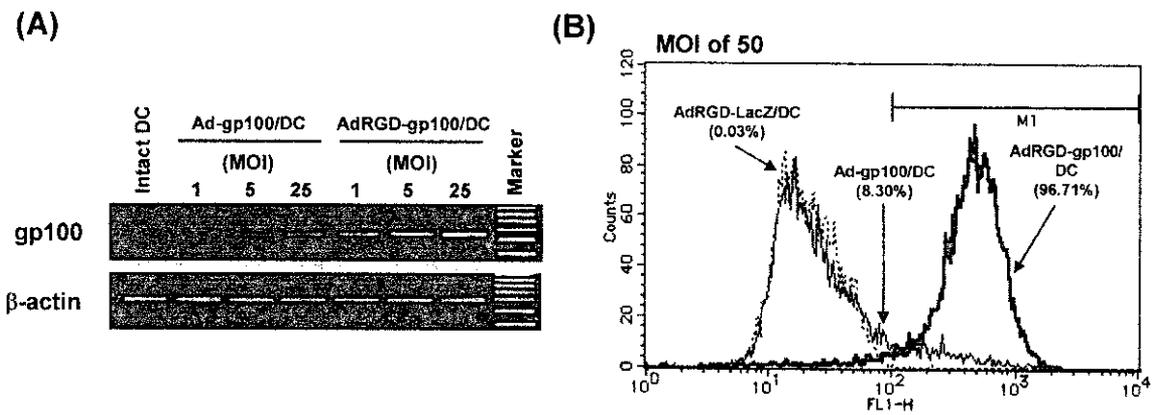


Fig. 1. Human gp100 expression in AdRGD-gp100/DC and Ad-gp100/DC. DCs were infected with AdRGD-gp100, Ad-gp100, or AdRGD-LacZ at the indicated MOI. After 48 h-cultivation, human gp100 gene expression was assessed by RT-PCR analysis (A) and flow cytometric analysis with an intracellular staining method using HMB50 antibody (B). A: PCR for human gp100 and mouse β-actin transcripts was performed on the same RT samples using each specific primer set to ensure the quality of the procedure. B: the % value in the parenthesis expresses % of M1-gated cells.

【Ad-gp100/DC および AdRGD-gp100/DC の免疫学的表現型の変化】

Flow cytometry を用いて、種々の従来型 Ad あるいは AdRGD を 50 MOI で感染させた DC の MHC 分子/共刺激分子発現レベルを解析したところ (Table 2)、従来型 Ad 感染 DC では、intact な DC と比較して MHC class II、CD80 および CD86 について発現増加が認められた。また、これらの分子の発現増強は、ベクターに搭載した発現カセットの有無あるいは種類に関わらず AdRGD 感染 DC においてより顕著であり、LPS で刺激した成熟 DC に匹敵するレベルであった。さらに、従来型 Ad 感染 DC における CD40 発現レベルは intact な DC と同程度であったが、AdRGD を適用した DC においては明らかな CD40 の発現増加も認められた。

Table 2. Flow cytometric analysis of surface markers in Ad- or AdRGD-infected DC.

Treatment	MHC class II	CD80	CD86	CD40
Intact	90.6 ^{a)}	67.0	39.0	18.5
LPS	163.5	117.3	113.1	218.2
Ad-Null	167.1	79.9	38.2	17.8
AdRGD-Null	172.1	93.9	131.7	108.9
Ad-LacZ	141.5	84.4	52.7	19.6
AdRGD-LacZ	171.7	122.1	81.1	53.4
Ad-gp100	131.0	81.2	62.1	21.6
AdRGD-gp100	174.4	122.8	96.5	43.7

^{a)}: MFI

次に、これらの DC における IL-12 産生能を ELISA にて評価した (Fig. 2)。培養 48 時間において、intact な DC の IL-12 分泌は検出限界以下であったのに対し、従来型 Ad を感染させた DC ではわずかではあるが IL-12 の産生分泌が認められ、AdRGD 感染 DC においてはより顕著な IL-12 産生亢進が観察された。

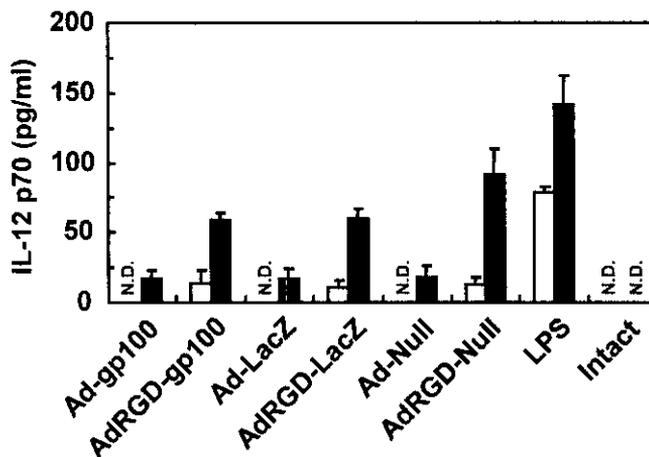


Fig. 2. IL-12 p70 secretion levels in various Ad-infected DC. DCs were infected with six types of Ad at MOI of 50 for 2 h and then cultured. At 24 (white column) or 48 h (black column) after infection, concentration of murine IL-12 p70 accumulated in culture supernatants was measured by ELISA. Data are presented as mean \pm SD of three independent cultures. N.D.: IL-12 p70 secreted from DCs was not detectable.

【Ad-gp100/DC および AdRGD-gp100/DC の T 細胞増殖刺激能】

Ad-gp100/DC および AdRGD-gp100/DC による allogenic T 細胞の増殖刺激能を MLR で評価した (Fig. 3)。Ad-gp100/DC は、intact な DC と比較して T 細胞増殖をより効果的に惹起することができ、LPS 刺激した成熟 DC とほぼ同等の T 細胞増殖刺激能を有していた。さらに、AdRGD-gp100/DC で刺激した T 細胞の増殖は最も顕著であり、AdRGD-gp100/DC を用いた免疫が T 細胞依存性免疫応答を効率良く誘導できる可能性が示された。

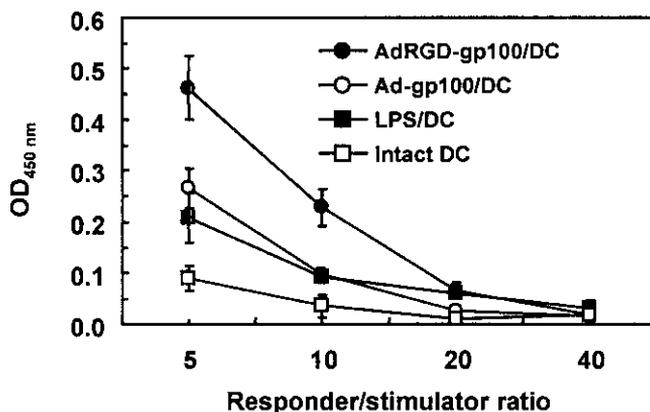


Fig. 3. Allogenic T cell-stimulating ability of AdRGD-gp100/DC and Ad-gp100/DC. C57BL/6 DCs were infected with AdRGD-gp100 or Ad-gp100 at MOI of 50, and cultured for 2 days. Naive BALB/c T cells were co-cultured with AdRGD-gp100/DC, Ad-gp100/DC, LPS/DC, or intact DC at different responder/stimulator ratios for 3 days. Cell cultures were pulsed with BrdU during the last 18 h, and then T cell proliferation was assessed by BrdU-ELISA. Results are expressed as mean \pm SE of three independent cultures using T cells prepared from three individual mice.

【Ad-gp100/DC および AdRGD-gp100/DC の抗メラノーマ効果】

マウス B16BL6 メラノーマモデルにおいて、Ad-gp100/DC および AdRGD-gp100/DC の腫瘍増殖抑制効果ならび

に肺転移抑制効果を比較検討した。あらかじめ Ad-gp100/DC あるいは AdRGD-gp100/DC を皮内免疫したマウスに B16BL6 腫瘍を攻撃接種したところ (Fig. 4)、Ad-gp100/DC 免疫群で明らかな腫瘍増殖の遅延が観察され、さらに AdRGD-gp100/DC 免疫群では 6 例中 4 例で腫瘍の完全拒絶が達成されるという強力な抗腫瘍効果が認められた。一方、コントロールベクターを感染させた DC (AdRGD-Null/DC) を免疫したマウスでは、腫瘍の増殖抑制は全く観察されなかった。

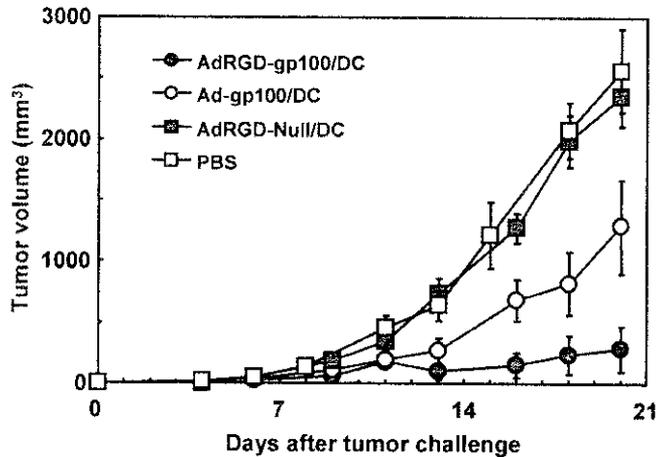


Fig. 4. Vaccine efficacy of AdRGD-gp100/DC and Ad-gp100/DC against B16BL6 melanoma challenge. AdRGD-gp100/DC, Ad-gp100/DC, and AdRGD-Null/DC were prepared using corresponding vectors at MOI of 50. C57BL/6 mice were immunized by intradermal injection of transduced DCs into the right flank at 1×10^6 cells, and then 2×10^5 B16BL6 melanoma cells were inoculated into the mouse left flank after 1 week post-vaccination. The size of tumors was assessed using microcalipers three times per week. Each point represents the mean \pm SE from six mice.

また、あらかじめ Ad-gp100/DC あるいは AdRGD-gp100/DC を免疫したマウスに B16BL6 細胞を尾静脈内投与し、肺転移抑制効果を観察したところ (Fig. 5-左)、両群とも DC への感染ベクター量に依存して転移結節数の減少が認められ、その効果は AdRGD-gp100/DC 免疫群でより優れていた。さらに、B16BL6 細胞の尾静脈内投与後に Ad-gp100/DC あるいは AdRGD-gp100/DC を 3 回免疫することによる治療プロトコールを行った際には (Fig. 5-右)、ワクチンプロトコールと比較して全体に肺転移抑制効果は弱まったものの、やはり AdRGD-gp100/DC 処理マウスでより有効な転移結節数の減少が観察された。

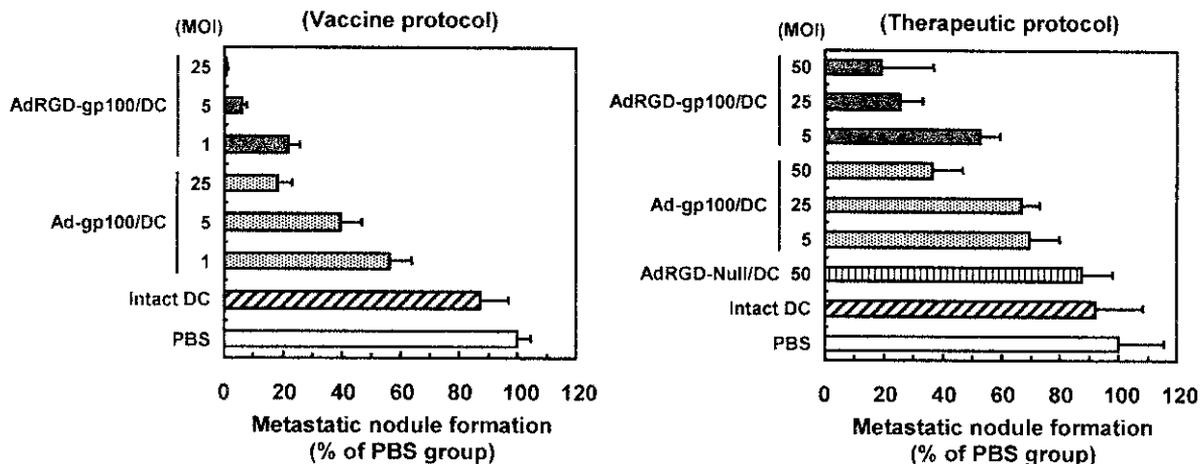


Fig. 5. Inhibition of B16BL6 pulmonary metastasis by immunization with AdRGD-gp100/DC or Ad-gp100/DC. AdRGD-gp100/DC, Ad-gp100/DC, and AdRGD-Null/DC were prepared using corresponding vectors at the indicated MOI. Experimental procedure of both vaccine and therapeutic protocols was described in Method section. Results are expressed as mean \pm SE from six mice.

【Ad-gp100/DC および AdRGD-gp100/DC の NK/CTL 活性誘導能】

次に、Ad-gp100/DC あるいは AdRGD-gp100/DC を免疫したマウスにおける NK 細胞活性を測定した (Fig. 6)。Ad-gp100/DC 免疫群の脾細胞には、コントロール群と同程度の NK 活性が認められたに過ぎなかったが、AdRGD-gp100/DC を免疫したマウスの脾細胞においては、YAC-1 細胞に対する傷害活性の明らかな上昇が検出された。

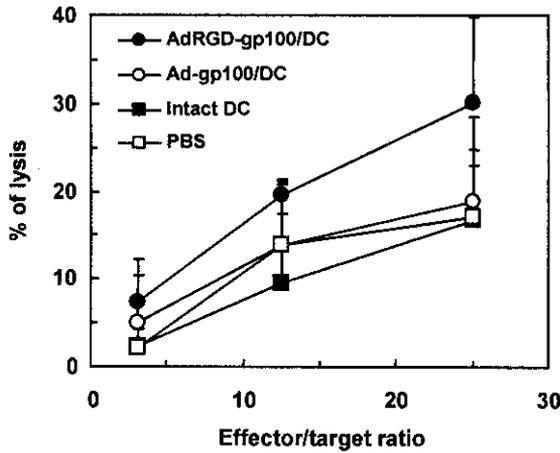


Fig. 6. NK activity of splenocytes from mice immunized with AdRGD-gp100/DC or Ad-gp100/DC. AdRGD-gp100/DC and Ad-gp100/DC were prepared using corresponding vectors at MOI of 50. Transduced or intact DCs were vaccinated once intradermally into C57BL/6 mice at 1×10^6 cells. At 1 week after immunization, non-adherent splenocytes were prepared from these mice, and directly used in cytolytic assays against YAC-1 cells. Each point represents the mean \pm SE from three independent cultures using splenocytes prepared from three individual mice.

また、これらのマウスの CTL 活性を評価したところ (Fig. 7)、Ad-gp100/DC 免疫群のエフェクター細胞に B16BL6 細胞に対する傷害活性が認められ、さらに、AdRGD-gp100/DC 免疫群のエフェクター細胞は、より効果的に B16BL6 細胞を傷害した。一方、gp100 を発現しない EL4 細胞をターゲット細胞とした際には、どの群のエフェクター細胞も傷害活性を示さなかったことから、Ad-gp100/DC あるいは AdRGD-gp100/DC の免疫により誘導される CTL 活性は B16BL6 特異的であることが示された。

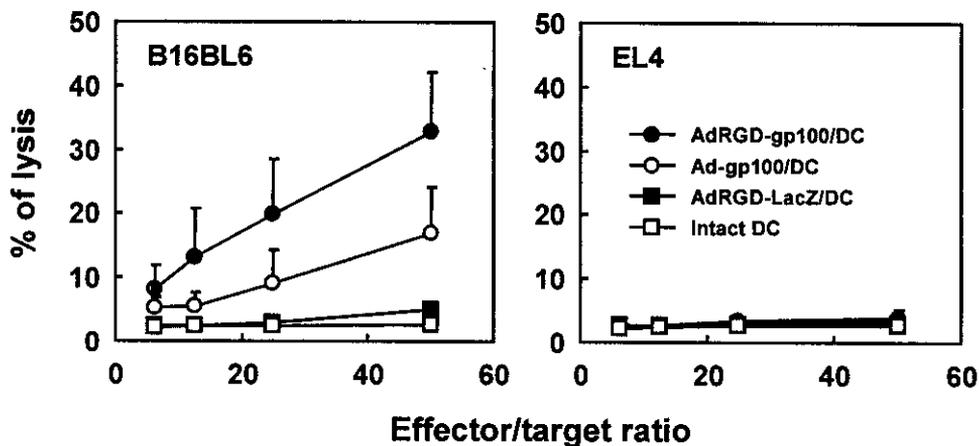


Fig. 7. B16BL6-specific CTL response in mice immunized with AdRGD-gp100/DC or Ad-gp100/DC. AdRGD-gp100/DC, Ad-gp100/DC, and AdRGD-LacZ/DC were prepared using corresponding vectors at MOI of 50. Transduced or intact DCs were vaccinated once intradermally into C57BL/6 mice at 1×10^6 cells. At 1 week after immunization, non-adherent splenocytes were prepared from these mice, and then were re-stimulated *in vitro* for 5 days with IFN- γ -stimulated and mitomycin C-inactivated B16BL6 cells. A cytolytic assay was performed using B16BL6 cells and EL4 cells. Each point represents the mean \pm SE of three independent cultures using re-stimulated splenocytes prepared from three individual mice.

【AdRGD-gp100/DC の腫瘍免疫誘導機序】

AdRGD-gp100/DC の免疫による抗 B16BL6 腫瘍効果の誘導機序を解析するために、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、および抗 asialoGM1 抗体を用いた *in vivo* depletion assay を行った (Fig. 8)。免疫誘導相における CD8⁺ T 細胞および NK 細胞の枯渇は、AdRGD-gp100/DC の免疫により誘導される腫瘍増殖抑制効果にほとんど影響を及ぼさなかったが、CD4⁺ T 細胞の枯渇により著しい抗腫瘍効果の減弱が観察された。一方、免疫エフェクター相における CD4⁺ T 細胞の枯渇は、AdRGD-gp100/DC によるワクチン効果にほとんど影響を及ぼさず、CD8⁺ T 細胞および NK 細胞を枯渇させることで抗腫瘍効果の低下が認められた。従って、AdRGD-gp100/DC 免疫によって誘導される抗 B16BL6 腫瘍効果の主要なエフェクター細胞は、CD8⁺ CTL および NK 細胞であり、また、これらエフェクター細胞の十分な活性化は、免疫誘導相における活性化 CD4⁺ T 細胞のヘルパー機能に大きく依存することが判明した。

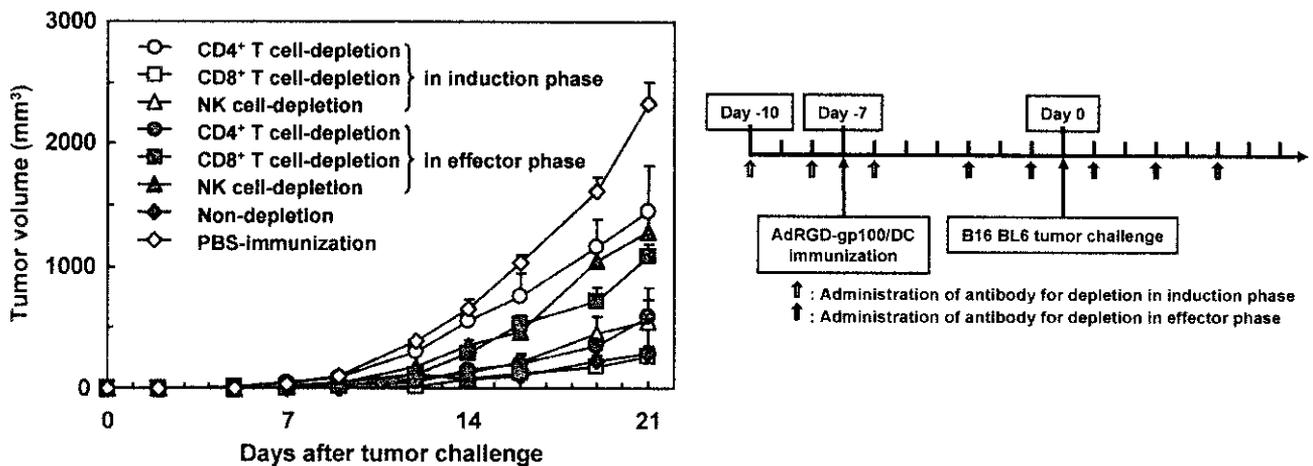


Fig. 8. Determination of immune subsets responsible for the protective immunity induced by vaccination with AdRGD-gp100/DC. C57BL/6 mice were immunized once with 1×10^6 DCs transduced with AdRGD-gp100 at MOI of 50, and inoculated with 1×10^5 B16BL6 cells at 1 week after immunization. Antibodies, GK1.5 (anti-CD4), 53-6.72 (anti-CD8), or anti-asialoGM1, were intraperitoneally injected according to the indicated schedule. Depletion of T cell subsets and NK cells was monitored by flow cytometry, which showed >95% specific depletion in splenocytes at the time of immunization or tumor challenge in each administration schedule. Each point represents the mean \pm SE of six mice.

4. 考 察

近年、メラノサイトの分化およびメラニン形成経路に関与している種々の MAA がクローニングされ、メラノーマに対する能動免疫療法の開発に新たな可能性を切り拓いた。MAA の一つである gp100 は、マウスおよびヒトメラノーマで構成的に過剰発現されており、また非常に高い免疫原性を有するため、ヒトを対象とした特異的免疫療法における重要な標的分子と考えられている。また、マウス gp100 と塩基配列で 75.5%、アミノ酸配列で 77%の相同性を有するヒト gp100 遺伝子を搭載した Ad をマウスに投与すると、ヒト gp100 特異的 T 細胞反応を誘導するばかりでなく、マウス B16 メラノーマに対して交差反応を示す T 細胞活性を惹起し、防御免疫を成立させることが報告されている。そこで本研究では、AdRGD を用いた DC への効率の良いヒト gp100 遺伝子導入が、マウス B16BL6 メラノーマモデルにおける DC 免疫療法の有効性を改善することができるかについて検討した。

これまでに報告者は、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、レポーター遺伝子を用いた検討から、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 AdRGD 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にすることができた。今回の検討においても、AdRGD-gp100/DC の mRNA レベルおよびタンパクレベルでの gp100 発現は、Ad-gp100/DC と比較して格段に優れており、50 MOI で AdRGD-gp100 を適用した場合には、ほぼ全ての DC に gp100 遺伝子を導入することができた。この結果は、DC への抗原遺伝子デリバリーに AdRGD が極めて有用であることを示しているばかりでなく、AdRGD 遺伝子導入が、従来のベクターシステムでは困難とされてきた種々の遺伝子による DC 修飾を可能とし、遺伝子導入できた細胞や生存細胞のソーティングを必要とすることなく、これらの DC の機能を詳細に解析できる手段となりうることを意味する。

次に、AdRGD により遺伝子導入された DC の免疫学的特性を *in vitro* 培養系で解析したところ、MHC 分子/共刺激分子の発現増強ならびに IL-12 分泌の亢進が認められ、詳細な分子機構は不明であるが、AdRGD 介在性の遺伝子導入によって DC が表現型的に成熟することが明らかとなった。また、これらの効果は、ベクターに搭載された遺伝子やプロモーターの有無および種類に関わらず、従来型 Ad を感染させた DC よりも AdRGD を適用した DC で顕著であった。従って、AdRGD あるいは従来型 Ad を用いた遺伝子導入に伴う DC の成熟は、DC 内へ侵入してきたベクター粒子数に依存しているのではないかと推察された。さらに、MLR の結果、AdRGD-gp100/DC は Ad-gp100/DC よりも優れた T 細胞増殖刺激能を示し、AdRGD による抗原遺伝子導入が機能的にも DC を成熟させることが示された。

これらの免疫学的特性ならびに遺伝子導入効率に関連して、AdRGD-gp100/DC のワクチン接種は、Ad-gp100/DC 接種と比較して、マウス B16BL6 メラノーマモデルにおけるより強力な腫瘍増殖抑制効果および肺転移

抑制効果を誘導することができ、さらに、治療プロトコールにおいても AdRGD-gp100/DC の投与は優れた肺転移抑制効果を発揮した。メラノーマが高転移性の腫瘍であることや、メラノーマ患者の予後が極めて不良であることを考えると、既に定着した転移メラノーマに対しても AdRGD-gp100/DC の投与が有効であるという結果は、メラノーマの再発予防の観点から非常に意義深い。また、Ad-gp100/DC 免疫群と比較して、AdRGD-gp100/DC を免疫したマウスにおいては、NK 細胞および B16BL6 特異的 CTL の活性化が増強されており、これらは AdRGD-gp100/DC による T 細胞への効率の良い gp100 抗原提示と IL-12 分泌の亢進に基づくものと考えられた。さらに、*in vivo* depletion analysis の結果、AdRGD-gp100/DC のワクチン接種により誘導される B16BL6 腫瘍免疫の中心的なエフェクター細胞が、CD4⁺ T 細胞のヘルパー機能依存的に活性化された NK 細胞と B16BL6 特異的 CD8⁺ CTL であることも示唆された。すなわち、AdRGD により腫瘍関連抗原遺伝子を効率良く導入した DC は、内在性に発現した腫瘍関連抗原を MHC class I 分子を介して CD8⁺ T 細胞へ提示するばかりでなく、MHC class II 分子を介した CD4⁺ T 細胞への抗原提示も同時に行っており、且つ DC 成熟に伴う IL-12 分泌亢進によって細胞性免疫優位 (Th1 偏向) な環境を宿主免疫系に提供していると考えられた。

本研究成果を総合すると、AdRGD は DC への遺伝子導入において非常に有用性の高いベクターシステムであり、AdRGD を用いて腫瘍関連抗原遺伝子を導入した DC が、NK 活性および抗原特異的 CTL 活性の増強に基づく腫瘍免疫を効率良く誘導できる有望なワクチン担体であることが実証された。

5. まとめ

本研究では、AdRGD を用いた DC への遺伝子導入が、腫瘍関連抗原を標的とした DC 免疫療法の有効性改善に繋がる非常に魅力的な手法であることを実証できた。最近、免疫系に深く関与するサイトカインや共刺激分子の遺伝子を導入した DC が、マウス腫瘍モデルで効果的な腫瘍免疫を誘導できるという報告がいくつかなされた。これらの戦略に AdRGD システムを応用した場合、DC への極めて優れた遺伝子導入効率によって、有効性の向上が見込めるばかりでなく、修飾された DC の免疫学的特性をソーティング等の処理をすることなく詳細に解析することができる。従って、AdRGD を用いた DC の遺伝子修飾は、実験的および臨床的に最適な DC ワクチンを設計・開発するためのブレークスルー的な手法となりうる。

6. 研究発表

- 1) N. Okada, Y. Masunaga, Y. Okada, S. Iiyama, N. Mori, T. Tsuda, A. Matsubara, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, T. Fujita, and A. Yamamoto. Gene transduction efficiency and maturation status in mouse bone marrow-derived dendritic cells infected with conventional or RGD fiber-mutant adenovirus vectors. *Cancer Gene Ther.* in press (2003).
- 2) Y. Okada, N. Okada, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, T. Mayumi, and N. Mizuno. An investigation of adverse effects caused by the injection of high-dose TNF α -expressing adenovirus vector into established murine melanoma. *Gene Ther.* in press (2003).
- 3) Y. Okada, N. Okada, S. Nakagawa, H. Mizuguchi, K. Takahashi, N. Mizuno, T. Fujita, A. Yamamoto, T. Hayakawa, and T. Mayumi. Tumor necrosis factor α -gene therapy for an established murine melanoma using RGD (Arg-Gly-Asp) fiber-mutant adenovirus vectors. *Jpn. J. Cancer Res.* **93**: 436-444 (2002).
- 4) Y. Okada, N. Okada, S. Nakagawa, H. Mizuguchi, M. Kanehira, N. Nishino, K. Takahashi, N. Mizuno, T. Hayakawa, and T. Mayumi. Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors. *Cancer Lett.* **177**: 57-63 (2002).