

## 遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規 癌免疫療法の開発

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ケモカイン・ケモカインレセプター遺伝子を導入した樹状細胞ワクチンを創製し、それらの免疫学的特性ならびに癌免疫療法における有用性を評価した。

### A. 研究目的

樹状細胞 (DC) は生体内における免疫監視機構の根幹を担う抗原提示細胞であることから、腫瘍関連抗原 (TAA) あるいは腫瘍細胞コンポーネントを取り込ませた DC をワクチン担体として利用する“DC 免疫療法”は、癌に対する新たな治療戦略として非常に有望であると考えられている。しかし、本療法に対する当初の過剰な期待に反して、満足な有効性を認めた臨床研究報告は極めて少ないのが現状であり、患者に投与する DC の免疫学的機能を最適化するための条件 (DC コンディショニング) についても未だ十分な情報は得られていない。

一方、近年の免疫学および分子生物学の著しい進展に伴い、免疫系を構築する細胞や分子の情報ネットワークが詳細に解明されつつあり、DC 免疫療法の治療効果改善に向けた種々の免疫機能分子の応用が提案されている。例えば、免疫細胞の局所への遊走・浸潤を制御しているケモカインを利用すれば、生体に投与した DC ワクチンの周辺に免疫細胞を積極的に集積させることで、より効果的な免疫応答を惹起できると予想される。また、DC が末梢組織からリンパ組織 (免疫応答誘導の場) へと遊走するために不可欠なケモカインレセプター (CCR7) を抗原導入 DC に高発現させることができれば、少ない投与量で効率良く免疫エフェクター細胞の感作/活性化を誘導できる DC ワクチンの創製に繋がるであろう。これらのアプローチに則った DC コンディショニングを考慮した場合、DC に効率良くケモカインあるいはケモカインレセプターの遺伝子を導入する方法が挙げられる。

そこで本研究では、DC への遺伝子導入効率に圧倒的に優れる RGD ファイバーミュータントアデノウイルス (AdRGD) ベクターを駆使することによって、ケモカイン・ケモカインレセプターの遺伝子修飾を施した DC の免疫学的機能を解析し、優れた免疫賦活能を有する DC ワクチンの創製に関する基礎的情報の収集を図った。

### B. 研究方法

#### 【AdRGD ベクターの構築および調製】

8 種類のマウスケモカイン遺伝子をそれぞれ搭載した AdRGD ベクター (AdRGD-CCL17, -CCL19, -CCL20, -CCL21, -CCL22, -CCL27, -XCL1, -CX3CL1) およびマウス CCR7 遺伝子を搭載した AdRGD ベクター (AdRGD-CCR7) は、improved *in vitro* ligation method に従って構築した。また本研究には、以前に構築した 2 種類の TAA 発現 AdRGD ベクター (AdRGD-gp100, -gp70) およびコントロールベクターとしてルシフェラーゼ発現 AdRGD ベクター (AdRGD-Luc) を使用した。各 AdRGD ベクターは HEK293 細胞を用いて増幅した後、CsCl 密度勾配遠心法で精製し、HEK293 細胞を用いた end-point dilution method によって感染力価 (PFU) を算出した。

#### 【ケモカイン遺伝子搭載 AdRGD ベクターにより産生されるケモカインの生物活性評価】

本検討の標的細胞には、内在性マウスケモカインの影響を除外するためにヒト由来カルシノーマである A549 細胞を使用した。A549 細胞に各ケモカイン遺伝子搭載 AdRGD ベクターを 50 MOI (multiplicity of infection; PFU/cell) で適用し、遺伝子導入 24 時間後の培養上

清を回収した。培養上清中に分泌された各ケモカインタンパクの生物活性は、対応するケモカインレセプターを安定に発現する L1.2 細胞を用いた *in vitro* chemotaxis assay により評価した。

#### 【ケモカイン遺伝子導入 DC の腫瘍内投与による抗腫瘍効果の評価】

あらかじめマウスに生着させた B16BL6 腫瘍（長径：約 5 mm）内に各ケモカイン発現 AdRGD ベクター（50 MOI）により遺伝子導入した DC を  $5 \times 10^5$  cells/50  $\mu$ l/tumor で投与した。4 日後に再度、ケモカイン遺伝子導入 DC を同様に腫瘍内投与し、経日的に腫瘍体積をモニタリングした。

#### 【ケモカイン遺伝子と TAA 遺伝子を共導入した DC によるワクチン効果の評価】

ケモカイン発現 AdRGD ベクター（50 MOI）と TAA 発現 AdRGD ベクター（AdRGD-gp100 or -gp70; 50 MOI）により遺伝子共導入した DC を PBS で懸濁し、 $5 \times 10^5$  cells/50  $\mu$ l/mouse でマウスの左側腹部皮内に免疫した。免疫 1 週間後、B16BL6 細胞（TAA として gp100 を発現）あるいは CT26 細胞（TAA として gp70 を発現）を  $4 \times 10^5$  cells/50  $\mu$ l/mouse でマウス右側腹部皮内に攻撃接種し、経日的に腫瘍体積をモニタリングした。

#### 【CCR7 遺伝子発現レベルの評価】

AdRGD-CCR7（50 MOI）により遺伝子導入した DC を 24 時間培養し、flow cytometry 解析および CCL21（CCR7 のリガンド）に対する *in vitro* chemotaxis assay によって CCR7 遺伝子の発現レベルならびに発現させた CCR7 タンパクの生物活性を評価した。

#### 【CCR7 遺伝子導入 DC のリンパ節集積性の評価】

EGFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞から DC を調製し、AdRGD-CCR7（50 MOI）を用いて遺伝子導入した。24 時間培養後、遺伝子導入 DC を野生型マウスの腹部皮内に  $2 \times 10^6$  cells/50  $\mu$ l/mouse で投与した。48 時間後、所属リンパ節（鼠径部リンパ節）から細胞を調製し、そのリンパ節細胞中に含まれる EGFP 陽性 DC 数を flow cytometry 解析により測定した。

#### 【CCR7 遺伝子と TAA 遺伝子を共導入した DC によるワクチン効果の評価】

AdRGD-CCR7（25 MOI）と AdRGD-gp100（25 MOI）により遺伝子共導入した DC を 24 時間培養し、 $2 \times 10^5$

あるいは  $5 \times 10^5$  cells/50  $\mu$ l/mouse でマウスの左側腹部皮内に免疫した。免疫 1 週間後、B16BL6 細胞を  $4 \times 10^5$  cells/50  $\mu$ l/mouse でマウス右側腹部皮内に攻撃接種し、経日的に腫瘍体積をモニタリングした。

#### 【倫理面への配慮】

AdRGD ベクターの作製・精製、遺伝子導入実験ならびに遺伝子導入した DC による動物実験は P2 レベル封じ込め施設内で行い、器具・細胞・動物屍体等はすべてオートクレーブ滅菌してから廃棄することで、ベクターの環境への伝播に対して万全の対策を講じた。尚、報告者は京都薬科大学組換え DNA 実験安全委員会から、本研究に関する承認を受けている（承認番号 168）。

動物実験は「京都薬科大学動物実験に関する指針」を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施した。特に癌拒絶実験をはじめとする腫瘍移植を受けたマウスについては、腫瘍径が 20 mm を越えた時点で麻酔による安楽死処置を施し、実験を終了した。また、マウスへの腫瘍細胞接種および DC 投与は、苦痛を軽減するために麻酔下で行った。

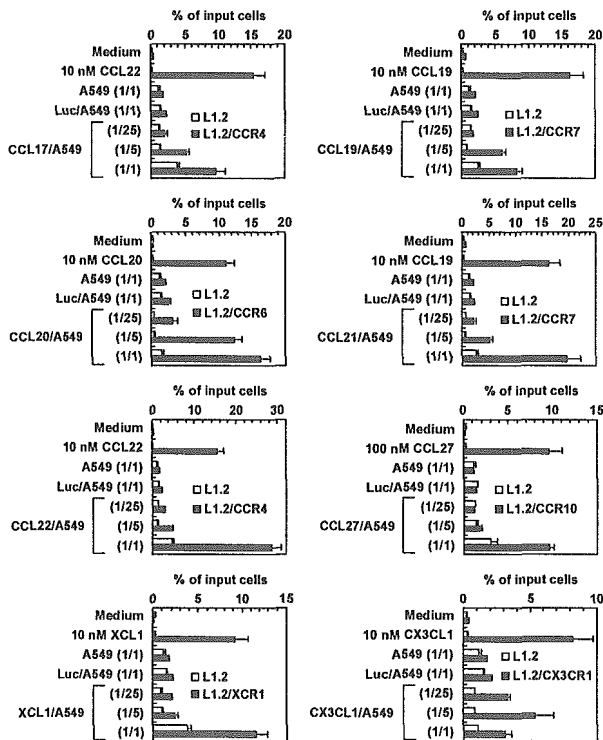
### C. 研究結果

#### 【ケモカイン遺伝子搭載 AdRGD ベクターにより発現させたケモカインの生物活性】

新たに構築した 8 種類のケモカイン遺伝子搭載 AdRGD ベクターの機能、すなわち、遺伝子導入した細胞から遊走活性を持つ機能的ケモカインタンパクが分泌されることを *in vitro* chemotaxis assay により確認した（Fig. 1）。各ケモカイン遺伝子搭載 AdRGD ベクターにより遺伝子導入した A549 細胞の培養上清中には、目的のケモカインに特異的なケモカインレセプターを発現する L1.2 細胞を顕著に遊走させる活性が検出された。一方、遺伝子導入していない A549 細胞や AdRGD-Luc（コントロールベクター）を適用した A549 細胞の培養上清に対しては、いずれのケモカインレセプタートランスフェクタントの遊走も低レベルに抑えられていた。またデータは示していないが、各ケモカイン発現 AdRGD ベクターにより遺伝子導入したマウス DC においても、RT-PCR 解析により目的のケモカイン mRNA の高い発現が確認された。

したがって、新規に構築したケモカイン遺伝子搭載

AdRGD ベクターは、標的細胞に目的とするケモカイン遺伝子を効率良く導入することが可能であり、また遺伝子導入された細胞からは、生体内における元来の生理活性を有した機能的なケモカインタンパクが分泌されることが示された。

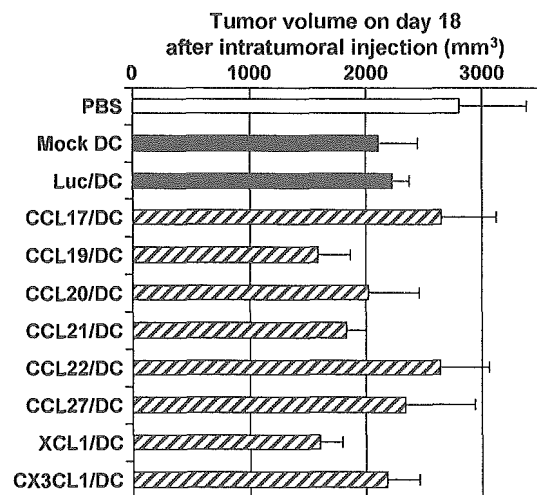


**Fig. 1. Chemoattractant activity of culture supernatants of A549 cells transfected with each chemokine gene-carried AdRGD against the stable specific chemokine receptor-expressing cells.** The culture supernatants of intact A549 cells, AdRGD-Luc-transfected A549 (Luc/A549) cells, and chemokine gene-transduced A549 cells were prepared and diluted with an assay medium. The fractional values with parenthesis in each panel express the dilution factor. These samples and recombinant chemokines dissolved with the assay medium were added to a 24-well culture plate. Cells expressing specific receptors for CCL17 and CCL22 (L1.2/CCR4), CCL20 (L1.2/CCR6), CCL19 and CCL21 (L1.2/CCR7), CCL27 (L1.2/CCR10), XCL1 (L1.2/XCR1), or CX3CL1 (L1.2/CX3CR1) were suspended with the assay medium and were placed in a Chemotaxicell-24 installed on each well at  $1 \times 10^6$  cells. Likewise, parental L1.2 cells for these transfectants were prepared and added to Chemotaxicell-24. Cell migration was allowed for 2 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cells that migrated to the lower well were lysed and quantitated using a PicoGreen dsDNA quantitation reagent. The data is expressed as the mean  $\pm$  SE of the triplicate results.

#### 【ケモカイン発現 DC の腫瘍内投与による抗腫瘍効果】

各ケモカイン発現 AdRGD ベクターにより遺伝子導入した DC を B16BL6 腫瘍 (長径: 約 5 mm) 内に投与し、その後の腫瘍体積変化を観察した (Fig. 2)。PBS 腫瘍内投与群と比較して、遺伝子導入していない DC (mock DC) あるいはコントロールベクターを適用した DC (Luc/DC) を投与したマウスにおいては、若干の腫瘍増殖抑制効果が認められた。これは、アポトーシスやネクロトーシスによって死滅した腫瘍細胞の断片を投与した

DC が捕食し、その中に含まれる TAA に特異的な免疫応答を誘導したことに起因すると考えられた。これら mock DC 投与群および Luc/DC 投与群と比較して、CCL19、CCL21 あるいは XCL1 を導入した DC を腫瘍内投与した群では、わずかではあるが抗腫瘍効果の増強が観察された。これら増強効果のメカニズムについては今後詳細な解析が必要であるが、投与した DC から分泌された CCL19、CCL21、XCL1 が腫瘍組織内への免疫細胞集積を促進することで、より効率よく DC によるエフェクター細胞の活性化が誘導されたのではないかと推察された。一方、CCL17、CCL20、CCL22、CCL27 あるいは CX3CL1 を導入した DC は、本 B16BL6 腫瘍モデルにおいてはコントロール DC よりも優れた抗腫瘍効果を誘導することができなかった。今後、他の腫瘍モデルにおけるケモカイン発現 DC の有効性についても検討を進める予定である。



**Fig. 2. B16BL6 tumor growth inhibition in response to the intratumoral injection of chemokine-expressing DCs.** Established B16BL6 tumors in C57BL/6 mice were injected twice with each chemokine-expressing DCs at  $5 \times 10^5$  cells in 50- $\mu$ l PBS. Likewise, control groups were intratumorally injected with PBS, mock DCs, or Luc/DCs. Tumor growth was monitored by calculating tumor volume. Data were presented as mean  $\pm$  SE of tumor volumes on day 18 after 1st intratumoral injection of DCs or PBS in 6-12 mice.

#### 【ケモカイン遺伝子および TAA 遺伝子を共導入した DC のワクチン投与による抗腫瘍効果】

各ケモカインと gp100 (B16BL6 腫瘍の TAA) とを共導入した DC をマウスに皮内免疫し、1 週間後に攻撃接種した B16BL6 腫瘍の増殖に対するワクチン効果を評価した (Fig. 3A)。我々の以前の報告のとおり、AdRGD-gp100 単独で遺伝子導入した DC を免疫したマウスでは、コントロール DC (Luc/DC) を投与した群と比

較して、B16BL6 腫瘍の増殖を顕著に抑制することができた。しかし、この gp100/DC のワクチン効果に対して、残念ながらいずれのケモカイン遺伝子共導入においても抗腫瘍効果の増強は認められなかった。一方、ケモカインと gp70 (CT26 腫瘍の TAA) とを共導入した DC ワクチンにおいては、gp70 のみを導入した DC による抗腫瘍効果を CCL21、CCL22、CCL27 の共発現によって増強することができた (Fig. 3B)。これらの結果は、DC 免疫療法に用いる TAA の種類や腫瘍の特性 (増殖速度や免疫原性) に依存してケモカイン発現 DC ワクチンの有効性は大きく異なることを示唆しており、今後、抗腫瘍効果の増強が認められたケモカイン発現 DC の作用機序を解析することによって、本ワクチン戦略の有用性の実証と最適化を図る必要がある。

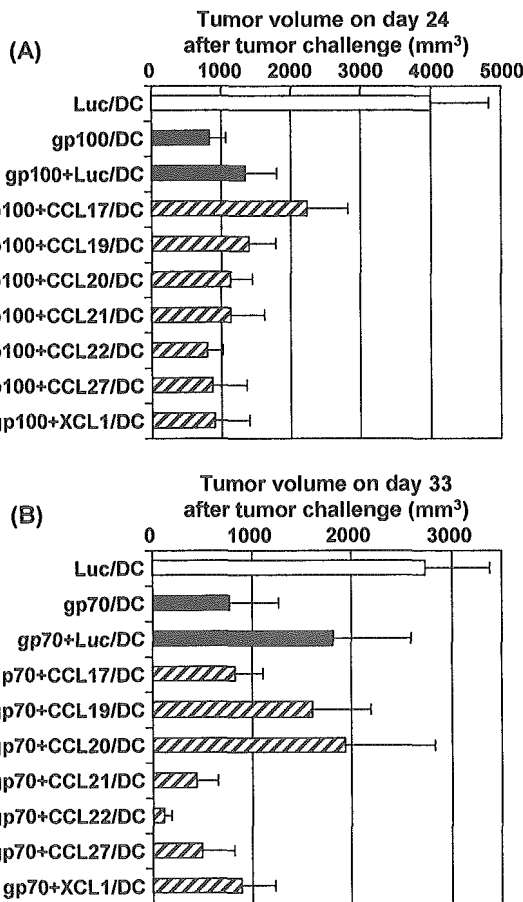


Fig. 3. Vaccine efficacy of DCs co-transduced with chemokine and TAA gene by AdRGD against B16BL6 (A) or CT26 (B) tumor challenge. DCs were co-transduced with chemokine-expressing AdRGD and TAA-expressing AdRGD (AdRGD-gp100 or AdRGD-gp70) at 50 MOI for 2 h. Mice were immunized by intradermal injection of transduced DCs into the left flank at  $5 \times 10^5$  cells. At 1 week post-vaccination,  $4 \times 10^5$  B16BL6 cells (A) or CT26 cells (B) were inoculated into the right flank of the mice. Data represents the mean  $\pm$  SE of tumor volumes on day 24 or 33 after tumor challenge in 6-12 mice.

### 【AdRGD-CCR7 により遺伝子導入した DC (CCR7/DC) における CCR7 発現解析】

AdRGD-CCR7 を 50 MOI で適用した DC の細胞表面における CCR7 発現レベルを flow cytometry により解析した (Fig. 4A)。LPS で活性化した DC (LPS/DC) およびコントロールベクターを適用した DC (Luc/DC) の CCR7 発現は、mock DC と同等の低いレベルであったのに対して、CCR7/DC においては 90%以上の細胞で豊富な CCR7 発現が認められた。また、*in vitro* chemotaxis assay において CCR7/DC は CCL21 (CCR7 のリガンド) の濃度に依存した遊走活性の上昇を示したことから (Fig. 4B)、AdRGD-CCR7 を用いた遺伝子導入によって細胞膜上に発現した CCR7 タンパクは、CCL21 濃度を感知して DC に遊走刺激を伝える本来の生物活性を保持したケモカインレセプターであることも判明した。

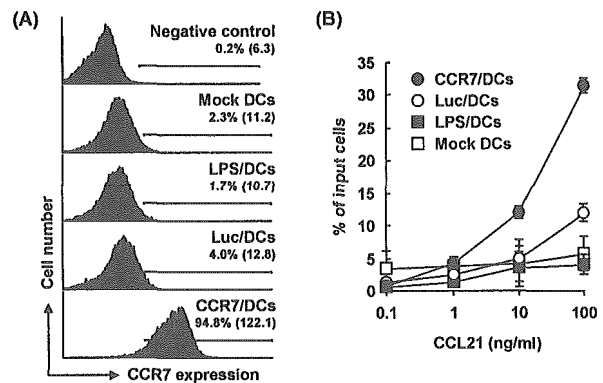
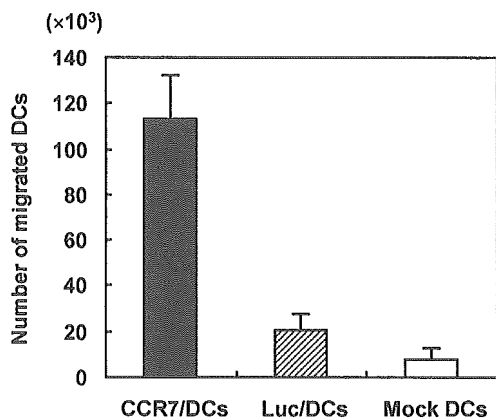


Fig. 4. Flow cytometric analysis for mouse CCR7 expression levels (A) and chemotactic activity of CCR7/DCs in response to CCL21 (B). DCs were transduced with AdRGD-CCR7 or AdRGD-Luc at 50 MOI. These transduced cells, LPS-stimulated DCs, and mock DCs were cultured for 24 h in GM-CSF-free medium. (A); flow cytometric analysis was performed by using anti-mouse CCR7 antibody. Negative control represents mock DCs stained by second antibody alone. The data are representative of two independent experiments, and the % value and the numerical value indicated in the upper part of each panel express % of gated cells and mean fluorescence intensity (MFI), respectively. (B); *in vitro* chemotaxis assay was performed by a Chemotaxicell-24 installed on 24-well culture plate. CCL21 solution was added in the lower compartment at the indicated concentration, and DCs were placed in the upper chamber at  $10^6$  cells. After 4 h-incubation, the number of cells that migrated to the lower compartment was counted on a NucleoCounter. Data are presented as mean  $\pm$  SD of four independent cultures.

### 【CCR7/DC の所属リンパ節への集積性】

EGFP トランスジェニックマウス由来の CCR7/DC、Luc/DC あるいは mock DC を野生型マウスの側腹部皮下内に投与し、48 時間後における所属リンパ節 (鼠径部リンパ節) への集積性を比較検討した (Fig. 5)。CCR7/DC 投与群では、mock DC 投与群と比較して約

15倍、Luc/DC投与群と比較して約5.5倍高いリンパ節へのDC集積が認められたことから、CCR7/DCは*in vivo*において非常に優れたリンパ組織移行能を發揮できるワクチン担体であることが判明した。データには示していないが、CCR7/DCを投与した反対側の鼠径部リンパ節にはEGFP陽性DCが検出されなかったこと、また反対側のリンパ節と比較してCCR7/DCを投与した側のリンパ節は肉眼的に明らかに大きく、調製できたリンパ節細胞数も顕著に多いことを考え合わせると、CCR7/DCを投与した所属リンパ節内には、遊走してきたDCをはじめT細胞など免疫担当細胞が集積して活性化状態になっていることが推察された。

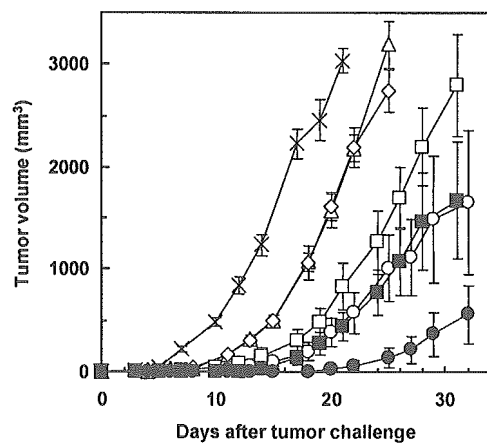


**Fig. 5. Migration of CCR7/DCs from administration site to draining lymph node.** DCs derived from EGFP-transgenic mice were transduced with AdRGD-CCR7 or AdRGD-Luc at 50 MOI, and then were cultured for 24 h. These transduced cells and mock DCs were intradermally injected into the left flank of C57BL/6 mice at  $2 \times 10^6$  cells/50  $\mu$ l. Two days later, the draining inguinal lymph nodes were collected from these mice, and a single cell suspension was prepared and stained by indirect immunofluorescence using anti-CD11c monoclonal antibody. The abundance of EGFP<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DCs was assessed by flow cytometric analysis acquiring 500,000 events. The number of DCs that had migrated into draining lymph nodes was calculated by multiplying the EGFP<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC-frequency by the total number of isolated lymph node cells. Data are presented as mean  $\pm$  SE of results from four mice.

#### 【CCR7とgp100を共導入したDCのワクチン投与による抗腫瘍効果】

gp100遺伝子とCCR7遺伝子とを共導入したDCを調製し、B16BL6腫瘍モデルにおけるワクチン効果を検討した (Fig. 6)。Mock DCあるいはCCR7遺伝子のみを導入したDC (CCR7/DC)を $5 \times 10^5$  cells/mouseで免疫した群と比較して、gp100遺伝子のみを導入したDC (gp100/DC)を免疫したマウスにおいては攻撃接種したB16BL6腫瘍の顕著な増殖遅延が誘導された。またその抗腫瘍効果は、免疫するgp100/DC数に依存して増大した。一方、CCR7遺伝子とgp100遺伝子を共導入し

たDC (gp100+CCR7/DC)を $2 \times 10^5$  cells/mouseで免疫した群においては、 $5 \times 10^5$ のgp100/DCを免疫したマウスと同等の抗腫瘍効果が観察され、さらに $5 \times 10^5$  cells/mouseでのgp100+CCR7/DCワクチン投与は、より強力にB16BL6腫瘍の増殖を抑制することができた。またデータは示していないが、gp100+CCR7/DCを投与したマウスの脾細胞中には、gp100/DC投与群を上回るB16BL6特異的傷害活性が検出された。したがって、DC免疫療法にTAA遺伝子とCCR7遺伝子を共導入したDCを応用することで、従来のTAA遺伝子のみを導入したDCの適用と比較して、より少ない投与細胞数で効果的な腫瘍免疫を誘導できることが示された。



**Fig. 6. Vaccine efficacy of DCs co-transduced with CCR7 and gp100 gene against B16BL6 melanoma challenge.** CCR7/DCs, gp100/DCs, and gp100+CCR7/DCs were prepared using corresponding vectors at 25 MOI, and then cultured for 24 h. C57BL/6 mice were immunized by intradermal injection of transduced DCs into the left flank at the indicated cell dosage, and then  $4 \times 10^5$  B16BL6 cells were inoculated into the right flank of the mice at 1 week post-vaccination. The tumor sizes were assessed using microcalipers three times per week. Each point represents the mean  $\pm$  SE of 5-10 mice.

**Fig. 6. Vaccine efficacy of DCs co-transduced with CCR7 and gp100 gene against B16BL6 melanoma challenge.** CCR7/DCs, gp100/DCs, and gp100+CCR7/DCs were prepared using corresponding vectors at 25 MOI, and then cultured for 24 h. C57BL/6 mice were immunized by intradermal injection of transduced DCs into the left flank at the indicated cell dosage, and then  $4 \times 10^5$  B16BL6 cells were inoculated into the right flank of the mice at 1 week post-vaccination. The tumor sizes were assessed using microcalipers three times per week. Each point represents the mean  $\pm$  SE of 5-10 mice.

#### D. 考 察

DCはナイーブなT細胞を感作・活性化できる唯一の抗原提示細胞であり、最近では、獲得免疫応答および自然免疫応答の両者を統御する免疫系の司令塔として理解が深まっている。このようなDCの免疫学的特性は、ワクチン開発における標的として極めて魅力的であり、

齧歯類およびヒトの DC を大量に調製する技術が確立されたことに伴って、現在多くの研究機関において様々な方法で腫瘍関連抗原を導入した DC のワクチン機能が解析されている。しかし、抗原導入 DC の投与だけでは十分な腫瘍免疫が誘導できないという本療法の限界も次第に明らかとされ、投与 DC のリンパ組織（効果器官）への集積性や免疫エフェクター細胞に対する活性化能を増強しうる DC コンディショニングの必要性が浮き彫りとなってきた。

生体内における白血球の局所への遊走・浸潤には、ケモカインと総称される 8~14 kDa 程度の塩基性・ヘパリン結合性分泌タンパク群が深く関与しており、種々の細胞接着分子と協調して炎症反応やリンパ球のホーミングを制御している。現在、ヒトでは約 50 種類のケモカインが同定されており、それらは保存された 4 つのシステイン残基のうち N 末端の 2 個のシステインの位置から C ケモカイン、CC ケモカイン、CXC ケモカイン、および CX3C ケモカインの 4 つのサブグループに分類されるスーパーファミリーを形成している。また、すべてのケモカインは 7 回膜貫通 G タンパク共役型レセプターを介して作用し、同定されている約 20 種類のケモカインレセプターもスーパーファミリーを構築している。ケモカインは当初、好中球や単球を遊走させるサイトカインの一群として発見され、おもに炎症での役割が研究されてきた。これら炎症性ケモカインに対して、1990 年代後半より、バイオインフォマティクスを駆使して EST データベースを検索するという手法により新しいケモカインが次々と発見され、リンパ球や DC など主要な標的細胞とする免疫系ケモカインの存在が明らかとなった。これによって、免疫細胞の生体内での移動や局在の制御機構に関する理解が急速に進展するとともに、癌免疫療法へのケモカイン/ケモカインレセプター関連の応用が、免疫細胞の体内動態制御に基づく有効性改善に非常に有用であろうという議論がなされるようになってきた。そこで本研究では、AdRGD ベクターを用いてケモカイン/ケモカインレセプター遺伝子を効率よく導入した DC を創製し、それらの腫瘍免疫誘導能を評価した。

まず、ケモカイン遺伝子導入 DC の腫瘍内投与あるいは TAA 遺伝子とケモカイン遺伝子とを共導入した DC のワクチン投与による抗腫瘍効果を解析した結果、2 種

類の腫瘍モデル（B16BL6 および CT26）間で増殖抑制を示すケモカインの種類は一致せず、また、同一腫瘍モデル（B16BL6）においても DC 投与方法の違いによってケモカインの有効性は異なることが明らかとなった。したがって、投与した DC ワクチンから分泌されるケモカインによって導かれる DC 免疫療法の有効性改善効果は、適用する腫瘍の特性や治療プロトコールによって大きく影響を受けると考えられ、ケモカインを応用した DC 免疫療法の有効性評価には臨床的に治療対象に設定する腫瘍の特性や併用する他の治療法の特性をできる限り反映した前臨床モデルの使用が重要であることが示唆された。今後、本研究において効果的であったケモカイン発現 DC ワクチンの作用メカニズムを解析することにより、免疫細胞の投与 DC 近傍への集積やそれらの活性化状態と治療効果との関連を解明したいと考えている。

一方、生体に投与した DC ワクチンのリンパ組織移行性が極めて乏しいことも、現状の DC 免疫療法の有効性を制限する要因のひとつに挙げられる。DC のリンパ組織移行に関する分子メカニズムについては、炎症反応に伴って DC に発現誘導される CCR7 とリンパ組織で構成的に産生される CCL21 との連関が中心的な役割を果たすことが判明しており、生体に投与する DC に CCR7 を高発現させることができれば、“リンパ組織指向性 DC”ともいふべき強力なワクチン担体を創製できる可能性がある。そこで、AdRGD-CCR7 により遺伝子導入した DC のワクチン機能を解析したところ、CCR7/DC は優れたリンパ組織移行能を獲得しており、この機能を反映して TAA 遺伝子を共導入した CCR7/DC は、TAA 遺伝子のみを導入した DC よりも少ない投与量で効果的な抗原特異的免疫応答を惹起することができた。これらの成果は、積極的なリンパ組織移行能を有する CCR7/DC の DC 免疫療法への応用が、有効な治療効果を達成するために必要とされていた DC 投与量を大幅に低減できることを示しており、① DC 前駆細胞単離のために必要な患者の採血負担の軽減、② DC ワクチン調製における労力・コストの削減、という観点から DC 免疫療法の臨床応用実現に大いに貢献するものと期待される。

## E. 結論

8種類のケモカインに関する検討において、AdRGDを用いて遺伝子導入することによりDCのワクチン効果を増強できる数種のケモカインを見いだすことができた。今後、これらのケモカイン遺伝子導入DCにより誘導される腫瘍免疫の機序を解析することによって、DC免疫療法における免疫細胞動態制御の有用性を実証したいと考えている。

また、CCR7遺伝子を導入したDCの機能解析において、投与部位からリンパ組織への高い移行能を付与したDCワクチンがより効果的に腫瘍特異的免疫応答を活性化できることを示した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., and Mayumi T. Transcriptional targeting of RGD fiber-mutant adenovirus vectors can improve the safety of suicide gene therapy for murine melanoma. *Cancer Gene Ther.* in press.
- 2) Okada N., Mori N., Koretomo R., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., and Yamamoto A. Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction. *Gene Ther.* 12: 129-139 (2005).
- 3) Okada N., Iiyama S., Okada Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., and Yamamoto A. Immunological properties and vaccine efficacy of murine dendritic cells simultaneously expressing melanoma-associated antigen and interleukin-12. *Cancer Gene Ther.* 12: 72-83 (2005).
- 4) Okada N., Gao J.-Q., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., Tsutsumi Y., Mayumi T., and Nakagawa S. Anti-tumor activity of chemokine is affected by both kinds of tumors and the activation state of the host's immune system: implications for chemokine-based cancer immunotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317: 68-76 (2004).
- 5) Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Takahashi K., Hayakawa T., Mayumi T., and Mizuno N. Optimization of antitumor efficacy

and safety of in vivo cytokine gene therapy using RGD fiber-mutant adenovirus vector for preexisting murine melanoma. *Biochim. Biophys. Acta* 1670: 172-180 (2004).

- 6) 岡田直貴. 腫瘍関連抗原遺伝子を導入した樹状細胞による腫瘍免疫誘導. *臨床免疫* 41: 355-362 (2004).

### 2. 学会発表

- 1) 岡田直貴. 細胞性製剤の設計・創製と細胞療法への展開. 日本薬学会第125年会, 東京, 2005年3月. (奨励賞受賞講演)
- 2) 岡田直貴. 癌の免疫遺伝子治療とその評価. 日本薬学会第125年会, 東京, 2005年3月. (シンポジウム講演)
- 3) 岡田直貴. 癌免疫療法の有効性改善を目指した Cell Delivery System の構築. 日本薬剤学会第20年会, 東京, 2005年3月. (奨励賞受賞講演)
- 4) 杉田敏樹, 高 建青, 金川尚子, 飯田恵介, 本村吉章, 畑中 豊, 谷 洋一, 中山隆志, 義江 修, 水口裕之, 早川堯夫, 岡田直貴, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作. IL-12 と CCL27 の併用による抗腫瘍効果増強機構の解明. 日本薬学会第125年会, 東京, 2005年3月.
- 5) 吉川友章, 丹羽貴子, 小田淳史, 下川摩里子, 岡田直貴, 堤 康央, 水口裕之, 早川堯夫, 麻生定光, 太田成男, 真弓忠範, 中川晋作. 変異型 Bcl-XL (FNK) 遺伝子導入樹状細胞を用いた腫瘍ワクチン療法の最適化-2. 日本薬学会第125年会, 東京, 2005年3月.
- 6) 丹羽貴子, 吉川友章, 小田淳史, 下川摩里子, 岡田直貴, 堤 康央, 水口裕之, 早川堯夫, 麻生定光, 太田成男, 真弓忠範, 中川晋作. 変異型 Bcl-XL (FNK) 遺伝子導入樹状細胞を用いた腫瘍ワクチン療法の最適化-1. 日本薬学会第125年会, 東京, 2005年3月.
- 7) 宇都口直樹, 岡田直貴, 山本 昌, 丸山一雄. 腫瘍組織血管内皮細胞を抗原とした樹状細胞による癌免疫療法の開発. 第34回日本免疫学会総会, 札幌, 2004年12月.
- 8) 岡田直貴, 中川晋作, 畑中 豊, 谷 洋一, 中山隆志, 義江 修, 早川堯夫, 藤田卓也, 山本 昌. ケモカイン発現ベクターの腫瘍内投与による抗腫瘍効果と免疫細胞浸潤. 第34回日本免疫学会総会, 札幌, 2004年12月.
- 9) 杉田敏樹, 畑中 豊, 谷 洋一, 中山隆志, 義江 修, 水口裕之, 早川堯夫, 岡田直貴, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作. IL-12 及び CCL27 発現アデノウイルスベクターの併用投与による抗腫瘍効果と免疫系細胞の浸潤. 第34回日本免疫学会総会, 札幌, 2004年12月.
- 10) 岡田直貴, 水口裕之, 早川堯夫, 義江 修, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌. リンパ組織指向性樹状細胞の創製と癌免疫療法への

応用. 第63回日本癌学会総会, 福岡, 2004年9月.

- 11) 宇都口直樹, 鈴木 亮, 滝澤知子, 岡田直貴, 山本 昌, 小泉桂一, 済木育夫, 丸山一雄. 腫瘍組織血管内皮細胞を標的とした樹状細胞による癌免疫療法の開発. 第63回日本癌学会総会, 福岡, 2004年9月.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。