

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

HS研究

第1分野

課題番号

KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（総合研究報告）	西田基宏 ……	1
KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（平成17年度報告）	西田基宏 ……	6
KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二 ……	10

第2分野

KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先 ……	15
KH23304	Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生 ……	22
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦 ……	27
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇 ……	34
KH23331	寄生性原虫の生育に必要な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 ……	39

第3分野

KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太 ……	47
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル ……	55
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一 ……	60
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタデューの基礎的および応用的研究	川上浩司 ……	65

第5分野

KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 ……	69
KH53313	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	岡田直貴 ……	74
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介 ……	84

KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 89
KH53333	治療ターゲットとしてのFc γ 受容体を介したデング出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 94
エイズ研究		
第1分野		
KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の解明	藤室雅弘 …… 99

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

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 大阪大学薬学研究科
研究者 岡田 直貴

研究要旨 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、抗アポトーシス分子遺伝子を導入した樹状細胞ワクチンを創製し、*in vitro*培養系における免疫学的特性ならびに *in vivo*腫瘍モデルにおける腫瘍免疫誘導能について解析した。

A. 研究目的

腫瘍免疫学の進展によって、様々な癌種における腫瘍関連抗原 (tumor-associated antigen; TAA) の同定が進み、TAA 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) 応答を人為的に増強することで癌を排除しようとする免疫療法が次世代の癌治療法としての基盤を確立しつつある。なかでも、免疫系の司令塔として自然免疫応答および獲得免疫応答の両者の制御を担う樹状細胞 (dendritic cell; DC) をアジュバントとして捉え、*in vitro*にて TAA を導入した DC をワクチン担体として生体に投与する細胞免疫療法が注目を集めている。この『DC 癌免疫療法』は、マウスモデルでの検討において顕著な有効性を示したとする研究成果が多数報告されていることから、既に TAA 導入 DC ワクチンを用いたトランスレーショナルリサーチが多くの研究機関で試みられている。しかしながらこれら臨床研究においては、癌の完全治癒あるいは病状の寛解といった満足な治療効果が得られていないのが現状であり、DC 癌免疫療法の癌患者での有効性については未だ科学的根拠が証明されるに至っていない。このような背景のもと、DC の生理的機能ならびに生物学的特性の解明が進展したことを受けて、DC 癌免疫療法の有効性向上を目的として生体に投与する DC ワクチンの機能を最大限に発揮させるための方法論の開発が盛んに行われている。

生体内に広く分布する DC は、外界から侵入してきた病原体 (抗原) を捕捉・貪食した後、細胞内で抗原分子をエピトープペプチドへと断片化 (プロセッシング) するとともに所属リンパ節へと遊走し、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC)

分子を介してナイーブ T 細胞あるいはメモリー T 細胞を抗原特異的に感作・活性化する。すなわち、DC 癌免疫療法においては、投与した DC ワクチンがリンパ節へと到達し、T 細胞と直接的に相互作用して初めて免疫応答が惹起される。しかしながら最近の研究において、ワクチンとして投与した DC の生体内寿命が予想以上に短命 (4 日程度) であること、ならびに投与部位から実際に所属リンパ節へと移行する DC 数が投与細胞数のわずか 1% にも満たないこと、が明らかとなってきた。この原因の一つは、投与 DC ワクチンのアポトーシスによる細胞死であり、“生きた細胞”を投与する DC 癌免疫療法の有効性改善には、『細胞医薬』である DC ワクチンの生体内寿命の延長、すなわち薬学的観点から言い換えれば DC ワクチンの生体内利用能を向上させるアプローチが有効であると考えられる。

アポトーシス制御因子として代表的な Bcl-2 family 分子は、主にミトコンドリア外膜上に局在してシトクロム c などのアポトーシス誘導因子の流出を制御することが知られている。また、最近まで不明であった DC の生体内寿命制御機構に Bcl-2 family 分子が深く関与し、DC の生死のタイミングを決定する“分子タイマー”として機能することが明らかとなりつつある。Bcl-2 family 分子のなかでも特に Bcl-x_L は、DC が自身の細胞表面上に発現している CD40 や TLR4、TLR9 を介した成熟・活性化刺激を受けた際に発現が一過性に上昇することから、DC の生存維持にとって非常に重要な分子であることが示唆されている。さらに、Bcl-x_L のコンディショナルノックアウトマウス由来の DC を用いた解析から、Bcl-x_L^{-/-} DC はリンパ節への移行性やその後の免疫誘導能が著減する

ことが明らかとなっており、Bcl-x_LがDCの免疫機能を維持する上でも重要な因子であることが示唆されている。そこで報告者は、野生型 Bcl-x_Lならびに点突然変異法によってBcl-x_Lのミトコンドリア外膜への結合性を向上させた抗アポトーシス活性増強変異体 (Bcl-xFNK; FNK) をTAA導入DCワクチンに発現させることで『アポトーシス抵抗性 DC ワクチン』を創製することができれば、DCワクチンの生体内利用能の改善に基づいたDC癌免疫療法の飛躍的な有効性向上に繋がるのではないかとの着想に至った。

一般に、DCにTAAペプチドをパルス、またはTAA蛋白質を貪食させる方法と比較して、DCにTAA分子を遺伝子として導入する手法は、TAAがDC内で内在性抗原として持続的に発現し、CTLの感作・活性化に必須のMHC class I分子を介した抗原提示経路へと送達されるため、より効果的なアジュバント活性をもったDCワクチンの創製に繋がること報告されている。したがって、TAA分子とともに抗アポトーシス分子を遺伝子としてDCに共導入するアプローチは、アポトーシス抵抗性を付与したDCワクチンの創製に対して極めて有効なアプローチであると考えられる。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、抗アポトーシス分子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】

本研究に用いたヒトアデノウイルス type 5 (E1/E3領域欠損) を基本骨格とする非増殖型 AdRGD ベクターは、水口裕之博士 (医薬基盤研究所) らの開発した improved *in vitro* ligation method に準拠して作製した。Bcl-x_L cDNA あるいは FNK cDNA を搭載したプラスミド (pEF1BOSbcl-x および pEF1BOSbcl-xFNK) は太田成男博士 (日本医科大学大学院医学研究科) より供与を受け、CMV プロモーター支配下に Bcl-x_L あるいは FNK を発現する AdRGD-Bclx_L および AdRGD-FNK を構築した。また本研究には、以前に構築したニワトリ卵白アル

ブミン (ovalbumin; OVA) あるいはメラノーマ関連抗原の一つである gp100 を発現する AdRGD ベクター (AdRGD-OVA および AdRGD-gp100)、ならびに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、塩化セシウム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 (plaque-forming unit; PFU) を算出した。

【Bcl-x_L および FNK 蛋白質の発現確認】

ヒト肺癌由来 A549 細胞に AdRGD-Bclx_L、AdRGD-FNK、あるいは AdRGD-Luc を 50 MOI (multiplicity of infection; PFU/cell) で2時間作用させることで遺伝子導入した。培養48時間後に回収した細胞から細胞溶解液を調製し、その SDS-PAGE/western blotting を行うことによって Bcl-x_L あるいは FNK 蛋白質の発現確認を行った。なお、1次抗体には抗 Bcl-x_L 抗体、2次抗体には HRP 標識抗マウス IgGκ抗体を使用した。また、同様に遺伝子導入した A549 細胞に細胞膜透過処理を施し、1次抗体として抗 Bcl-x_L 抗体、2次抗体として FITC 標識抗マウス IgGκ light chain 抗体を用いた flow cytometry (FCM) 解析も併せて行った。

【マウス骨髄由来 DC の調製と遺伝子導入】

C57BL/6 マウス (H-2^b) の骨髄細胞を GM-CSF 存在下で8日間培養することにより、未熟 DC を分化誘導した。DC への遺伝子導入は、種々の MOI に調製した AdRGD ベクター懸濁液を用いて DC を 5 × 10⁶ cells/ml に懸濁し、15分毎に穏やかに攪拌しながら 37°C で2時間インキュベーションした。PBS で洗浄後、以降の実験に供した。

【*In vitro* 培養系における DC 生存率の評価】

50 MOI の AdRGD-FNK あるいは AdRGD-Luc で遺伝子導入した DC を48時間培養し、アポトーシス誘導剤である staurosporine を種々の濃度で共存させてさらに20時間培養した。DC の生存率は MTT 法にて測定した。また、25 MOI の AdRGD-Bclx_L、AdRGD-FNK、あるいは AdRGD-Luc で遺伝子導入した DC を GM-CSF (DC

の増殖因子) 非存在下で培養し、経日的な生存率変化をPI染色法にて評価した。

【DCの抗原貪食能および表面マーカー発現レベルの解析】

50 MOIのAdRGD-Bclx_L、AdRGD-FNK、あるいはAdRGD-Lucで遺伝子導入したDCを24時間培養し、1 mg/ml FITC標識デキストラン (FITC-Dex) を含有するPBSで 5×10^6 cells/mlに懸濁した。4°Cまたは37°Cで1時間インキュベーションした後、氷冷したPBSで細胞を5回洗浄し、FITC-Dexの細胞内取り込み(抗原貪食能)をFCMにて解析した。また、同様に遺伝子導入したDCのMHC class I/II分子、共刺激分子(CD40, CD80, CD86)、およびDCマーカーであるCD11cの発現レベルは、それぞれの分子に特異的な抗体を用いたFCM解析により評価した。なお、成熟DCとして1 μg/mlのLPSを添加して24時間培養したDCを使用した。

【DCにおけるMHC class I分子を介した抗原提示レベルの測定】

50 MOIのAdRGD-Bclx_L、AdRGD-FNK、あるいはAdRGD-OVAを単独あるいは種々の組み合わせで用いてDCに遺伝子導入した。これらの遺伝子導入DCを 10^5 cells/wellで96穴培養プレートに播種し、培養経日的に0.05%グルタルアルデヒドを用いて固定した。これらのサンプルにOVA₂₅₇₋₂₆₄ペプチドとMHC class I (H-2K^b)分子の複合体を特異的に認識してIL-2を産生するCD8-OVA1.3細胞を 10^5 cells/100 μl/wellで添加し、24時間後の培養上清中に含まれるIL-2濃度をELISAにより測定した。

【E.G7-OVA腫瘍拒絶実験】

25 MOIのAdRGD-Bclx_L、AdRGD-FNK、AdRGD-OVA、あるいはAdRGD-Lucを単独あるいは種々の組み合わせで用いて遺伝子導入したDCを24時間培養し、 5×10^4 cells/50 μl/mouseでC57BL/6マウスの右側腹部皮内に免疫投与した。1週間後、E.G7-OVA細胞(OVA cDNAのトランスフェクタント; H-2^b)を 10^6 cells/50 μl/mouseでマウス左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。

腫瘍体積は以下の式に従って算出し、腫瘍の長径が20 mmを超えたマウスは安楽死させた。

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

【B16BL6腫瘍拒絶実験】

25 MOIのAdRGD-Bclx_L、AdRGD-FNK、AdRGD-gp100、あるいはAdRGD-Lucを単独あるいは種々の組み合わせで用いて遺伝子導入したDCを24時間培養し、 1.5×10^6 cells/50 μl/mouseでC57BL/6マウスの右側腹部皮内に免疫投与した。1週間後、B16BL6細胞(TAAとしてgp100を発現; H-2^b)を 5×10^4 cells/50 μl/mouseでマウス左側腹部皮内に攻撃接種し、上記と同様に経日的に腫瘍体積をモニタリングした。

【OVA特異的細胞傷害試験 (⁵¹Cr-release assay)】

25 MOIのAdRGD-Bclx_L、AdRGD-FNK、AdRGD-OVA、あるいはAdRGD-Lucを単独あるいは種々の組み合わせで用いて遺伝子導入したDCを24時間培養し、 2.5×10^4 cells/50 μl/mouseでC57BL/6マウスの右側腹部皮内に免疫投与した。1週間後にこれらのマウスから脾臓を摘出し、単離した脾細胞をE.G7-OVA細胞と5日間共培養(*in vitro*抗原再刺激)することでエフェクター細胞を調製した。エフェクター細胞の傷害活性は⁵¹Cr-release assayにより測定し、ターゲット細胞にはE.G7-OVA細胞およびその親株であるEL4細胞(H-2^b)を使用した。

【DCのリンパ節移行量の評価】

EGFPトランスジェニックマウス(H-2^b; 大阪大学微生物病研究所 岡部 勝博士より供与)の骨髄細胞からDCを調製し、25 MOIのAdRGD-FNKあるいはAdRGD-Luc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 2×10^6 cells/50 μl/mouseで投与した。経日的に所属リンパ節(鼠径部リンパ節)を回収し、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、凍結組織切片を作製した。これらの標本を蛍光顕微鏡下にて観察し、1切片あたりのEGFP陽性細胞数を計測することによって、投与したDCのリンパ節移

行量を評価した。

【リンパ節における T 細胞活性化レベルの解析】

25 MOI の AdRGD-FNK あるいは AdRGD-gp100 を単独あるいは種々の組み合わせで用いて遺伝子導入した DC を 24 時間培養し、 1.5×10^6 cells/50 μ l/mouse で C57BL/6 マウスの右側腹部皮内に免疫投与した。1 週間後に摘出した所属リンパ節（鼠径部リンパ節）からリンパ節細胞を調製し、B16BL6 細胞と共培養することで *in vitro* 抗原再刺激を加えた。共培養 18 時間後にゴルジ輸送阻害剤を添加してさらに 6 時間培養し、FITC 標識抗 CD4 抗体あるいは FITC 標識抗 CD8 抗体を用いて蛍光染色した。さらに細胞膜透過処理を施した後、PE 標識抗 IFN- γ 抗体で染色し、FCM によりリンパ節細胞中の活性化（IFN- γ 産生）T 細胞サブセットの頻度を解析した。

【倫理面への配慮】

本研究における遺伝子組換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守して行った。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。なお、報告者は大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会から本研究に関する承認を受けている。動物実験は「大阪大学動物実験指針」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

【Bcl-x_L および FNK 蛋白質の発現】

AdRGD-Bclx_L あるいは AdRGD-FNK により遺伝子導入した A549 細胞の溶解液を抗 Bcl-x_L 抗体を用いて western blotting したところ、Bcl-x_L の分子量 (28 kDa)

付近に鮮明なバンドが認められた。また、FCM 解析の結果から、AdRGD-Bclx_L および AdRGD-FNK は、50 MOI のベクター用量で 90% 以上の遺伝子導入・発現効率を示した。なお、コントロールベクター (AdRGD-Luc) を適用した A549 細胞では、両測定系において Bcl-x_L ならびに FNK の発現は検出されなかった。

【Bcl-x_L あるいは FNK 遺伝子を導入した DC のアポトーシス抵抗性】

アポトーシス誘導剤である staurosporine 共存下で培養したところ、遺伝子導入していない DC (mock DC) およびコントロールベクター (AdRGD-Luc) を適用した DC (Luc/DC) では staurosporine 濃度依存的な生存率の低下が認められた。これらコントロール DC と比較して、AdRGD-Bclx_L あるいは AdRGD-FNK により遺伝子導入した DC (Bcl-x_L/DC, FNK/DC) は、いずれの staurosporine 濃度下においても 30% 程度高い生存率を維持していた。また、DC 増殖に必須のサイトカインである GM-CSF を含まない培養液で mock DC および Luc/DC を培養したところ、それらの生存率は経日的に低下し、培養 7 日目においては約 30% にまで低下した (Fig. 1)。一方、Bcl-x_L/DC および FNK/DC の生存率は、培養 4 日目まで 80% 以上を示し、7 日目においても約 60% の細胞が生存していた。したがって、Bcl-x_L あるいは FNK 遺伝子の導入が、DC にアポトーシス抵抗性を付与できるアプローチであることが明らかとなった。

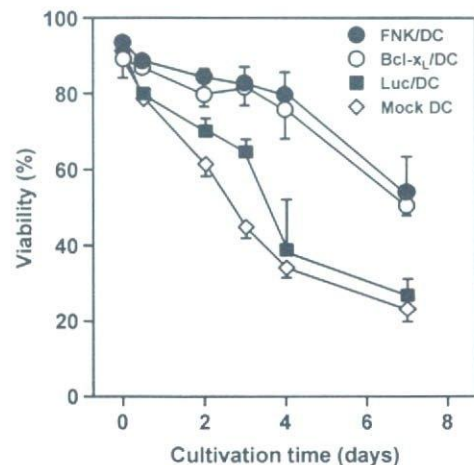


Fig. 1. Improved viability of DCs by transduction of Bcl-x_L or FNK in GM-CSF-free culture condition. FNK/DCs, Bcl-x_L/DCs, and Luc/DCs were prepared using corresponding vectors at 25 MOI, and then these transduced cells and mock DCs were cultured without GM-CSF. The viability of DCs was determined by propidium iodide staining at the indicated day. Each point represents the means \pm SD of triplicate cultures.

【アポトーシス抵抗性 DC の表現型】

Bcl-x_L/DC および FNK/DC による FITC-Dex 取り込み活性を検討したところ、mock DC および Luc/DC とほぼ同等であり、遺伝子導入処理による DC の抗原貪食能への影響はほとんど認められなかった。一方、LPS 刺激により成熟させた DC では、未熟な mock DC と比較して明らかな抗原貪食能の低下が認められた。また、細胞表面の MHC 分子および共刺激分子の発現レベルを比較した結果、Bcl-x_L/DC、FNK/DC、および Luc/DC においては未熟 DC (mock DC) よりも発現レベルが増強されており、成熟 DC (LPS/DC) に近い発現パターンが認められた (Fig. 2)。

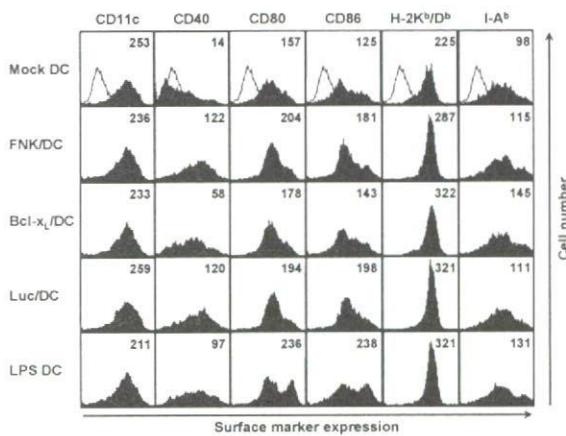


Fig. 2. Flow cytometric analysis of surface markers in DCs transduced with AdRGD-Bclx_L or AdRGD-FNK. DCs were transduced with AdRGD-Bclx_L, AdRGD-FNK, or AdRGD-Luc at 50 MOI. DCs treated with 1 μg/ml LPS for 24 h were used as positive controls for phenotypical DC-maturation. At 24 h after transduction, cells were stained by indirect immunofluorescence using biotinylated mAbs of the indicated specificities (solid histogram). Dotted histograms represent cells stained by phycoerythrin-conjugated streptavidin alone. The data are representative of three independent experiments, and values indicated in the upper part of each panel represent the mean fluorescence intensity (MFI) of FCM analysis.

【アポトーシス抵抗性 DC における MHC class I 分子を介した抗原提示レベル】

OVA ペプチドと MHC class I の複合体を認識して IL-2 を分泌する T 細胞ハイブリドーマ (CD8-OVA1.3 細胞) を用いた bioassay により、モデル抗原遺伝子である OVA 遺伝子と共に Bcl-x_L あるいは FNK 遺伝子を導入した DC の経日的な抗原提示レベル変化を評価した (Fig. 3)。その結果、OVA 遺伝子単独導入 DC (OVA/DC) は、遺伝子導入後 2 日目では高い抗原提示レベルを示していたものの、培養 4 日目には大きく低下し、培養 7 日目には検出限界以下であった。一方、Bcl-x_L あるいは FNK と OVA 遺伝子とを共導入した DC (Bcl-x_L+OVA/DC, FNK+OVA/DC) では、培養 2 日目

において OVA/DC よりも高い抗原提示レベルを示し、その後経日的な抗原提示レベルの低下は認められたものの、培養 7 日目においても 2 日目の 40% 程度の抗原提示レベルが維持されていた。したがって、DC に抗原遺伝子とともに Bcl-x_L あるいは FNK 遺伝子を導入することで、生存期間の延長とそれに伴う抗原提示機能の長期維持を達成できることが明らかとなった。

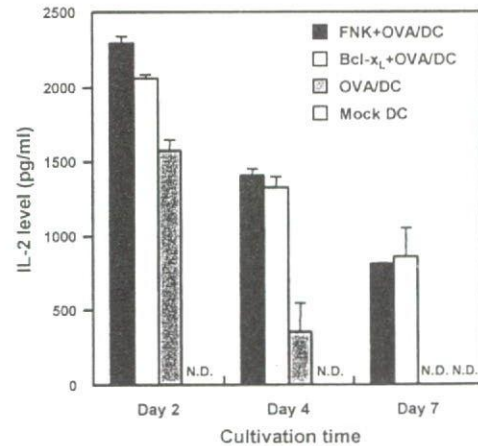


Fig. 3. Antigen presentation levels in DCs transduced with OVA gene alone, Bcl-x_L plus OVA genes, or FNK plus OVA genes. DCs were transduced with AdRGD-OVA (50 MOI) alone, AdRGD-Bclx_L (50 MOI) plus AdRGD-OVA (50 MOI), or AdRGD-FNK (50 MOI) plus AdRGD-OVA (50 MOI) for 2 hr, and then these transduced cells and mock DCs were cultured without GM-CSF. At the indicated day, the levels of OVA peptide presentation via MHC class I molecules were determined by bioassay using CD8-OVA1.3 cells. The data represents the means ± SD of three independent cultures. N.D.: not detectable.

【アポトーシス抵抗性 DC による抗腫瘍効果】

TAA として OVA を発現する E.G7-OVA 腫瘍モデルにおいて、OVA 遺伝子と共に Bcl-x_L あるいは FNK 遺伝子を導入した DC のワクチン効果を評価したところ、OVA/DC を皮内免疫したマウスにおいて認められた腫瘍増殖抑制効果が、Bcl-x_L+OVA/DC あるいは FNK+OVA/DC を免疫した群ではより一層強力に現れた (Fig. 4A)。また、OVA/DC 免疫群では全例において腫瘍生着が認められたのに対して、Bcl-x_L+OVA/DC 免疫群および FNK+OVA/DC 免疫群ではどちらも 10 例中 3 例で腫瘍の完全拒絶が認められた (Fig. 4B)。さらに、メラノーマ関連抗原の一つである gp100 を標的としたワクチンプロトコールを行った場合にも、Bcl-x_L 遺伝子を共導入した DC (Bcl-x_L+gp100/DC) あるいは FNK を共導入した DC (FNK+gp100/DC) を免疫したマウスにおいては、gp100 遺伝子単独導入 DC (gp100/DC) 免疫群よりも強力な腫瘍増殖抑制を達成することができた。これらの結果は、抗原遺伝子のみを導入する従来

の DC ワクチンと比較して、アポトーシス抵抗性を付与した DC ワクチンが有効性に優れるワクチン担体であることを実証するものである。

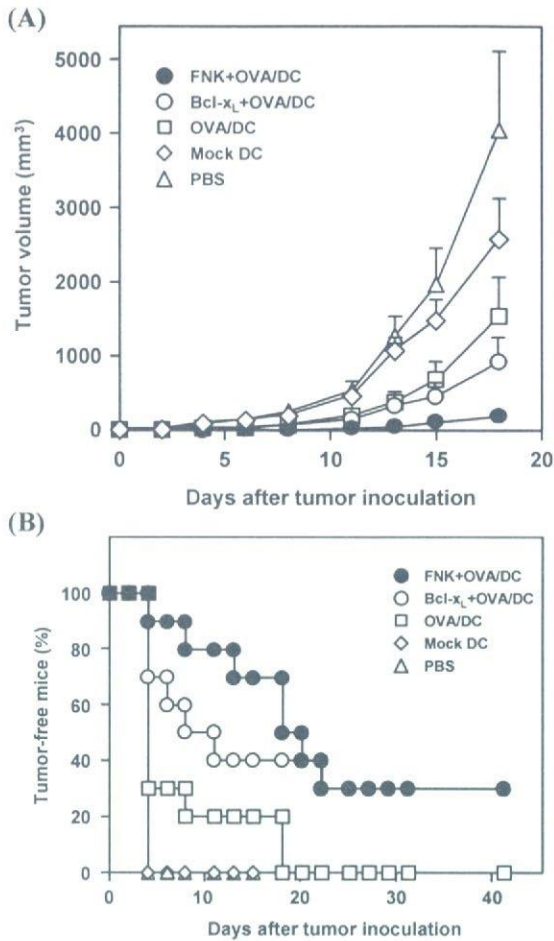


Fig. 4. Vaccine efficacy of DCs co-transduced with OVA and either FNK or Bcl-x_L gene against E.G7-OVA challenge. FNK+OVA/DC, Bcl-x_L+OVA/DC, and OVA/DC were prepared using corresponding vectors at 25 MOI, and then these transduced cells were cultured for 24 hr. C57BL/6 mice were immunized by intradermal injection of transduced DCs into right flank at 5×10^4 cells. One week later, E.G7-OVA cells were intradermally inoculated into the left flank of these mice at 10^6 cells. (A): The size of tumors was assessed using microcalipers three times per week. Each point represents the mean \pm SE from 5-10 mice. (B): Each point represents the percentage of tumor-free mice in all tested mice.

【アポトーシス抵抗性 DC の抗原特異的 CTL 誘導能】

Bcl-x_L+OVA/DC あるいは FNK+OVA/DC を免疫したマウスの脾細胞から調製したエフェクター細胞は、OVA/DC 免疫群のエフェクター細胞を上回る強力な E.G7-OVA 細胞傷害活性を發揮した (Fig. 5)。また、どの群のエフェクター細胞においても OVA を発現していない EL4 細胞をほとんど傷害しなかったことから、Bcl-x_L+OVA/DC および FNK+OVA/DC は、OVA/DC と比較して *in vivo* における OVA 特異的 CTL 誘導能に優れることが明らかとなった。

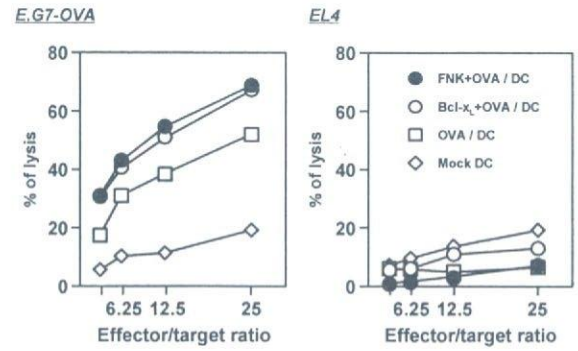


Fig. 5. OVA-specific CTL response in mice immunized with DCs co-transduced with OVA and either FNK or Bcl-x_L by AdRGD. OVA/DC, FNK+OVA/DC, and Bcl-x_L+OVA/DC were prepared using corresponding vectors at 25 MOI, and then cultured for 24 hr. These transduced DCs and mock DCs were vaccinated intradermally into C57BL/6 mice at 2.5×10^4 cells. One week later, splenocytes were prepared from these mice, and were re-stimulated *in vitro* for 5 days with E.G7-OVA cells. Cytolytic effects of re-stimulated splenocytes (effector cells) against E.G7-OVA or EL4 cells (target cells) were evaluated by ⁵¹Cr-release assay. Each point represents the means of three independent cultures.

【アポトーシス抵抗性 DC のリンパ節移行性】

EGFP トランスジェニックマウス由来 DC から調製した FNK/DC および Luc/DC を野生型マウスに投与し、経目的に所属リンパ節への移行量を評価したところ、投与後 2~8 日目において FNK/DC 群では Luc/DC 群の 2 倍以上の DC 集積が認められた (Fig. 6)。さらに、FNK/DC 群のリンパ節には投与後 8 日目においても、Luc/DC 群の初期到達量と同等以上の DC が存在することが明らかとなった。

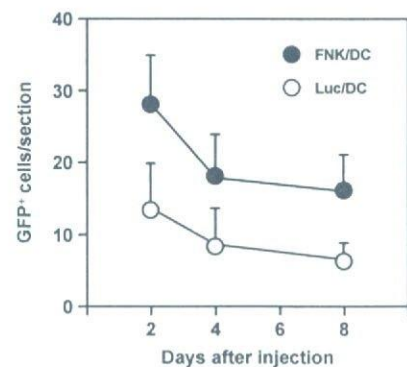


Fig. 6. Accumulation and survival of FNK/DC in the draining lymph node to administration site. DCs derived from EGFP-transgenic mice were transduced with AdRGD-FNK or AdRGD-Luc at 25 MOI, and then were cultured for 24 hr. These transduced cells were injected intradermally into the right flank of C57BL/6 mice at 2×10^6 cells. The draining lymph nodes were harvested at the indicated days post-injection, and the frozen sections (6 μ m) were prepared. The number of EGFP⁺ DCs per section was counted under fluorescence microscopy. Each point represents the mean \pm SE of three mice.

【アポトーシス抵抗性 DC によるリンパ節 T 細胞の活性化】

FNK+gp100/DC および gp100/DC の投与によって所

属リンパ節内で活性化される gp100 特異的 T 細胞サブセットの頻度を、細胞内 IFN- γ 産生を指標として FCM により解析した。その結果、gp100/DC 免疫マウスでは CD8⁺ IFN- γ 細胞が mock DC 投与群の約 4 倍に増加し、CD4⁺ IFN- γ 細胞の頻度には変化が認められなかった。一方、FNK+gp100/DC 免疫マウスの所属リンパ節では、mock DC 投与群と比較して約 7 倍の CD8⁺ IFN- γ 細胞と約 2 倍の CD4⁺ IFN- γ 細胞が検出された。

D. 考 察

近年のライフサイエンス研究の著しい進展によって、生体から分離した前駆細胞を培養系において DC へと大量調製することが可能となり、DC 免疫療法が癌やウイルス感染症に対するワクチンのみならず、自己免疫性疾患や臓器移植に対する新たな治療戦略として注目されている。しかしながら、DC を用いた細胞療法は未完の治療法であり、実用化するためには乗り越えるべき障壁がいくつも残されている。その中のひとつが、DC をそれぞれの治療戦略に見合った細胞医薬へと昇華させる方法論の確立であり、薬学的観点から言い換えれば DC を素材として細胞医薬を創製するための技術の開発である。すなわち、生体から単離した DC 前駆細胞をそのままの状態で投与して有効性が得られるケースは皆無であり、増殖因子・分化因子による分化制御や、遺伝子や蛋白質等の細胞内送達によって機能の付与あるいは最適化を図ることが必須である。

低分子有機化合物や、蛋白質・遺伝子などの生体高分子を薬物として投与する場合、これら薬物の薬効を向上させるために、薬物担体の適用や誘導体化などの手法を用いて体内安定性を向上させるアプローチが広く用いられている。当然のことながら、細胞医薬においても体内での安定性、すなわち生存性を向上させることで、薬効を持続化することが可能となり、ひいては治療効果を劇的に向上させることが可能になると考えられる。DC 癌免疫療法においては、生体に投与する DC ワクチンがリンパ節へと到達し、そこで T 細胞を抗原特異的に感作・活性化することによってはじめて治療効果が発揮される。したがって、DC ワクチンの短命性やそれに伴う機能喪失は、本療法の有効性を大きく低下させる要因であると考えられる。このような観点から報告者は、DC へ

の遺伝子導入効率に圧倒的に優れる AdRGD ベクターを駆使することにより、Bcl-x_L あるいはその活性増強変異体 FNK を高発現させることにより DC の体内安定性を向上させる新たなアプローチを考案し、本研究においてアポトーシス抵抗性 DC が生体内安定性の増強を基盤とする抗原特異的 T 細胞の活性化とそれに伴う優れたワクチン効果を発揮することを実証した。

Bcl-x_L あるいは FNK を発現させた DC は、*in vitro* 培養系において staurosporine 誘導性アポトーシスあるいは GM-CSF 非存在条件による細胞死に対して耐性を示した。高濃度の staurosporine 存在下では、抗アポトーシス分子を発現させた DC においても生存率に若干の低下が認められたが、これは staurosporine がミトコンドリア依存性経路 (Bcl-x_L および FNK の作用点) のみならず非依存性経路を介したアポトーシスをも誘導することに起因すると考えられた。また、GM-CSF 非存在下において認められた Bcl-x_L/DC および FNK/DC の培養 4 日目以降における生存率低下は、AdRGD ベクターにより導入された各遺伝子の発現低下に基づく可能性が考えられた。また、GM-CSF 非存在下での Bcl-x_L/DC と FNK/DC の生存性に差が認められなかった理由として、本条件下での細胞死にミトコンドリア非依存性経路によるアポトーシスの寄与が大きかったために、活性増強変異体である FNK の効果が十分に発揮されなかったのではないかと推察された。

これまでに報告者は、DC 表面上の MHC 分子や CD40、CD80、CD86 などの共刺激分子といった抗原提示に不可欠な機能分子の発現レベルが、AdRGD ベクターによる遺伝子導入処理によって上昇し、それに伴って DC の T 細胞活性化能が増強されることを見出している。今回、Bcl-x_L あるいは FNK 遺伝子の導入によっても DC 表面マーカーの発現上昇が認められ、アポトーシス抵抗性 DC ワクチンの創製における AdRGD ベクターの応用がワクチン機能の維持・増強にふさわしいことが示唆された。実際に、OVA 遺伝子と抗アポトーシス分子遺伝子とを共導入した DC では、MHC class I 分子を介した T 細胞への抗原提示機能に低下は認められず、むしろ生存期間の延長を反映して高い抗原提示レベルが長期間にわたって維持されることが明らかとなった。

そこで次に、アポトーシス抵抗性 DC ワクチンの *in*

*vivo*での機能を評価するために、抗アポトーシス分子とモデル抗原 OVA あるいはメラノーマ関連抗原 gp100 とを共発現させた DC をあらかじめマウスに免疫投与し、その後攻撃接種した腫瘍に対する増殖抑制効果を比較検討した。いずれの抗原を標的とした場合にも、抗原遺伝子単独導入 DC ワクチンと比較して、抗アポトーシス分子を共導入した DC ワクチンのほうがより強力な抗腫瘍効果を誘導することが可能であり、これが抗原特異的 CTL 活性の誘導増強に基づくことを明らかとした。さらに、アポトーシス抵抗性 DC はコントロール DC と比較して、所属リンパ組織への移行量が明らかに増大しており、その後の所属リンパ組織での生存期間も延長していることが判明した。この効果を反映して、アポトーシス抵抗性 DC ワクチンを投与したマウスでは、所属リンパ節内で抗原特異的な T 細胞が効率よく感作・活性化されており、当初の目的どおり DC ワクチンの生体内寿命の改善が免疫応答の効果的な誘導とその維持に大きく貢献できることが示唆された。

近年、リンパ節に到達した抗原提示 DC はナイーブ T 細胞を抗原特異的に感作・活性化する一方で、既に活性化された抗原特異的 T 細胞によって認識され排除される可能性が報告されている。DC の生体内寿命と免疫応答の終息との連関については未だ不明な部分が多く残されているものの、アポトーシス抵抗性 DC が抗原特異的 T 細胞によるアポトーシス誘導に対して抵抗性を有しているか否かについては今後の検討が必要であり、これら両 T 細胞サブセットを枯渇させた条件下におけるアポトーシス抵抗性 DC の生存性あるいは T 細胞活性化能などを解析することで明らかとなるであろう。また、抗アポトーシス蛋白質を強制発現させた DC はワクチン担体としてのみならず、DC の生体内寿命・運命とその免疫応答調節機構との関係解明においても重要なツールになりうるものと考ええる。

最近、DC の生体内寿命の制御には、 $Bcl-x_L$ に加えてアポトーシス抑制蛋白質 $Bcl-2$ やアポトーシス促進蛋白質 Bim の発現量や発現時期のバランスが大きく寄与していると報告されている。本研究では、DC の生存性を高める手法として $Bcl-x_L$ の発現増強に着目したが、 $Bcl-2$ を高発現させる、または siRNA などを用いて Bim をノックダウンする、あるいはそれらの組み合わせると

いったアプローチによっても DC にアポトーシス抵抗性を付与することが可能であると推測される。今後、DC の生体内運命・寿命や免疫原性に関する詳細なメカニズムが解明されることで最適の標的分子を選択可能になるものと期待される。

種々の細胞の分離や培養技術の進歩に伴って、現在では DC のみならず T 細胞や体性幹細胞、胚性幹細胞を用いた再生医療をはじめ、様々な細胞療法が次世代の治療体系として世界的に研究されている。本研究で提唱した細胞死抑制による細胞医薬の体内安定性向上という新たな概念は、DC のみならず種々の細胞に対して適用可能であり、将来的にこれら細胞療法の実用化に大きく貢献できるものと考ええる。

E. 結論

DC 癌免疫療法の有効性向上を目指してアポトーシス抵抗性 DC の創製とその抗腫瘍ワクチン機能の解析を行い、以下の結論を得た。

- アポトーシス抑制分子である $Bcl-x_L$ あるいはその活性増強型変異体 FNK の遺伝子を AdRGD ベクターにより導入することで、DC にアポトーシス抵抗性を付与可能であることが明らかとなった。
- AdRGD ベクターによる $Bcl-x_L$ あるいは FNK 遺伝子の導入は、DC 表面上の MHC 分子/共刺激分子の発現レベルを上昇させた。
- 抗アポトーシス分子とともに抗原を発現させた DC においては、抗原のみを発現させた DC と比較して、MHC class I 分子を介した抗原提示レベルの増強と抗原提示期間の延長が達成された。
- 抗アポトーシス分子とともに抗原を発現させた DC ワクチンは、抗原のみを発現させた従来の DC ワクチンと比較して、*in vivo*における抗原特異的 CTL 誘導能の増強に基づく強力な抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。
- アポトーシス抵抗性 DC ワクチンは投与部位から所属

リンパ節への到達性ならびにリンパ節での生存性に優れており、これらの効果がリンパ節内における抗原特異的 T 細胞の効率的な活性化に繋がることを明らかとした。

以上、DC のアポトーシスを抑制して生体内安定性を高めるアプローチが、DC 癌免疫療法の有効性向上に繋がることを実証した。細胞の生体内安定性を高める本手法は、DC のみならず CTL や腫瘍浸潤リンパ球などの機能強化を実現する新たなテクノロジーとして、癌に対する免疫細胞療法の実用化に大きく貢献できるものと期待する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naoki Okada, Cell delivery system: A novel strategy to improve efficacy of cancer immunotherapy by manipulation of immune cell trafficking and biodistribution. *Biol. Pharm. Bull.* 28(9): 1543-1550 (2005).
- 2) 岡田直貴, 細胞性製剤と細胞療法 ～樹状細胞ワクチンを用いた癌免疫療法を例に. *月刊薬事* 47(9): 1551-1558 (2005).
- 3) 岡田直貴, 細胞性製剤の設計・創製と細胞療法への展開. *薬学雑誌* 125(8): 601-615 (2005).

2. 学会発表

- 1) 上羽美貴, 岡田直貴, 木村芳伸, 郷谷真嗣, 藤井 愛, 水口裕之, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌. ケモカイン・サイトカイン遺伝子を導入した樹状細胞の創製と抗腫瘍効果の評価. 日本薬学会第 126 年会, 仙台市, 2006 年 3 月 28-30 日.
- 2) 大西康司, 岡田直貴, 森川愉香里, 水口裕之, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌. TERT 遺伝子を導入した樹状細胞ワクチンの腫瘍増殖抑制効果. 日本薬学会第 126 年会, 仙台市, 2006 年 3 月 28-30 日.
- 3) 丹羽貴子, 吉川友章, 後藤美千代, 水口裕之, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作. アポトーシス

抵抗性樹状細胞の創製と抗腫瘍ワクチン機能の評価. 日本薬学会第 126 年会, 仙台市, 2006 年 3 月 28-30 日.

- 4) 後藤美千代, 丹羽貴子, 吉川友章, 水口裕之, 岡田直貴, 中川晋作. 抗アポトーシス分子を導入した樹状細胞ワクチンの特性と抗腫瘍メカニズムの解析. 日本薬剤学会第 21 年会, 金沢市, 2006 年 3 月 16-18 日.
- 5) 松尾圭祐, 宇都口直樹, 鈴木 亮, 岡田直貴, 中川晋作, 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ワクチンによる癌免疫療法の開発. 日本薬剤学会第 21 年会, 金沢市, 2006 年 3 月 16-18 日.
- 6) 篠原郁美, 鈴木 亮, 宇都口直樹, 滝澤知子, 川村和子, 門脇則光, 内山 卓, 笠岡 敏, 岡田直貴, 丸山一雄. 樹状細胞を用いた癌免疫療法における抗原送達キャリアーとしての IgG 修飾リポソームの有用性評価. 日本薬剤学会第 21 年会, 金沢市, 2006 年 3 月 16-18 日.
- 7) 丹羽貴子, 吉川友章, 小田淳史, 飯田恵介, 松尾一彦, 萱室裕之, 岡田直貴, 堤 康央, 水口裕之, 中川晋作. 変異型抗アポトーシス蛋白質 Bcl-xFNK 発現樹状細胞を用いた抗腫瘍効果に関する検討. 第 35 回日本免疫学会総会, 横浜市, 2005 年 12 月 13-15 日.
- 8) 鈴木 亮, 宇都口直樹, 滝澤知子, 門脇則光, 内田 卓, 岡田直貴, 丸山一雄. 樹状細胞を用いた癌免疫療法における抗原送達キャリアーとしての IgG 修飾リポソームの有用性評価. 第 64 回日本癌学会総会, 札幌市, 2005 年 9 月 14-16 日.
- 9) 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. 腫瘍誘導血管内皮細胞を抗原としてパルスした樹状細胞による癌免疫療法の開発. 第 21 回日本 DDS 学会, 佐世保市, 2005 年 7 月 22-23 日.
- 10) 丹羽貴子, 吉川友章, 小田淳史, 飯田恵介, 松尾一彦, 下川摩里子, 岡田直貴, 堤 康央, 水口裕之, 中川晋作. 活性増強変異型抗アポトーシス蛋白質 Bcl-xFNK 発現樹状細胞を用いた

腫瘍ワクチン療法. 第 21 回日本 DDS 学会, 佐世保市, 2005 年 7 月 22-23 日.

- 11) 篠原郁美, 鈴木 亮, 宇都口直樹, 滝澤知子, 川村和子, 門脇則光, 内山 卓, 笠岡 敏, 岡田直貴, 丸山一雄. IgG 修飾リポソーム (IgG-lipo) の樹状細胞ワクチンへの応用～ IgG-lipo による抗原特異的細胞性および液性免疫誘導～. 第 21 回日本 DDS 学会, 佐世保市, 2005 年 7 月 22-23 日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

平成17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18年7月31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