

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

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 …… 1
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 …… 12
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 …… 26
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 …… 37
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 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須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 …… 60
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 …… 66
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 …… 79
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 …… 92
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ィーの基礎的および応用的研究	川上浩司 …… 101
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 …… 105
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 …… 116
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 …… 126
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 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFcγ受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

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 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼ二量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

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種々の機能分子遺伝子を導入した樹状細胞を創製し、これら遺伝子改変樹状細胞の免疫学的特性を解析するとともに癌免疫療法への応用を図った。

A. 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り、T 細胞依存性の獲得免疫応答の開始/増幅、さらには自然免疫応答の発動をも統御する免疫監視機構の司令塔として機能している。この免疫学的特性に基づいて、腫瘍関連抗原 (TAA) を導入した DC を“nature’s adjuvant”として生体に投与する DC 癌免疫療法が精力的に研究されており、DC の腫瘍免疫誘導能を最大限に発揮させる方法論の確立が望まれている。

DC 癌免疫療法の有効性増強に適う DC を創製する手法の一つとして、DC への TAA 送達あるいは機能付加を遺伝子導入によって達成しようとする試みが挙げられる。本アプローチには、細胞毒性を示さない用量で DC への十分な遺伝子導入を達成できるベクターシステムが要求され、報告者は、 α_v -integrin 指向性を付与した RGD ファイバーミュータントアデノウイルスベクター (AdRGD) が、DC への遺伝子導入効率に極めて優れることを世界に先駆けて明らかとした。

そこで本研究では、AdRGD を応用して種々の機能分子遺伝子を導入した DC を創製し、これら遺伝子改変 DC の免疫学的特性および癌免疫療法における有用性を精査した。

B. 研究方法

非増殖性 AdRGD は、E1/E3 領域欠損ヒトアデノウイルス serotype 5 を基本骨格として、improved *in vitro* ligation method に準拠して構築した。また、DC はマウスの骨髄細胞を GM-CSF 存在下で 8 日間培養することにより調製した。

AdRGD を用いて、ケモカインレセプター (CCR7) 遺伝子、アポトーシス抑制分子 (Bcl-xFNK) 遺伝子、あるいは TNF 関連分子 (LIGHT) 遺伝子を DC に導入し、各機能分子の発現レベルを FCM 解析あるいは ELISA

により評価した。また、遺伝子導入 DC の T 細胞への抗原提示能および T 細胞増殖刺激能は、T 細胞ハイブリドーマを用いた bioassay および混合白血球反応 (MLR) によりそれぞれ検討した。遺伝子導入 DC の *in vivo* 腫瘍免疫誘導能は、腫瘍拒絶実験、腫瘍退縮実験、および CTL assay により評価した。また、各遺伝子導入 DC の投与部位から所属リンパ節への移行性を免疫組織染色法および FCM 解析により検討した。

(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 の作製・精製、遺伝子導入実験ならびに遺伝子導入 DC を用いた動物実験は、すべて 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 (承認番号: 2292)。

本研究で行った動物実験はすべて、「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。特に腫瘍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

AdRGD を用いて CCR7 遺伝子を導入した DC (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、その遊走活性は CCL21 (CCR7 のリガンド) 濃度依存的に上昇した。また、EGFP トランスジェニックマウス由来 DC から作製した CCR7/DC を

野生型マウスの腹部皮内に投与したところ、mock DC 投与群と比較して約 15 倍も効率よく所属リンパ節（鼠径部リンパ節）に移行することが判明した。さらに、TAA 遺伝子と CCR7 遺伝子とを共導入した DC (TAA+CCR7/DC) を調製し、マウス腫瘍モデルにおけるワクチン効果を検討したところ、TAA 遺伝子のみを導入した DC (TAA/DC) と比較して、より強力な腫瘍増殖抑制効果を発揮することができた。また、TAA+CCR7/DC を投与したマウスの脾細胞中には、TAA/DC 投与群を上回る腫瘍特異的 CTL 活性が検出された。したがって、DC 癌免疫療法に 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、より効果的な腫瘍免疫を誘導できることが示された。

次に、Bcl-xFNK 遺伝子を導入した DC (FNK/DC) においては、90%以上の効率で Bcl-xFNK の発現が認められ、アポトーシス誘導剤共存下で培養したところ、mock DC と比較して高い生存率を維持できた。また、TAA 遺伝子と Bcl-xFNK 遺伝子を共導入した DC (TAA+FNK/DC) は、TAA/DC と比較して、より長期間にわたって T 細胞への抗原提示能を発揮できることが判明した。そこで、TAA+FNK/DC のワクチン効果を評価したところ、TAA/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。また、TAA+FNK/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、TAA/DC 免疫群のエフェクター細胞を上回る強力な腫瘍傷害活性を発揮した。さらに、EGFP トランスジェニックマウス由来 DC から調製した FNK/DC を野生型マウスに投与したところ、投与後 2~8 日目の所属リンパ節においてコントロール DC 投与群の 2 倍以上高い DC 集積が認められた。以上の結果より、DC に TAA 遺伝子とともに Bcl-xFNK 遺伝子を導入することで、DC の体内寿命の延長とそれに伴う腫瘍免疫誘導能の長期維持を達成できることが明らかとなった。

また、LIGHT 遺伝子を導入した DC (LIGHT/DC) においては、細胞膜表面に膜型 LIGHT を発現する DC はわずかであり、多くが可溶性 LIGHT として分泌していた。この LIGHT/DC は、腫瘍細胞を直接傷害する活性を有するとともに、T 細胞に強力な増殖刺激を与えることが判明した。さらに、マウスにあらかじめ生着させた腫瘍内に LIGHT/DC を投与したところ、劇的な腫瘍退縮効果が得られることを見出した。この治療効果は、腫瘍特異的 CTL の効率的な誘導を反映した結果であり、また LIGHT/DC を投与した腫瘍内には CD8⁺ CTL の浸潤が顕著に亢進していることも明らかとなった。これらの結果は、LIGHT/DC の腫瘍内投与が、腫瘍免疫の誘導に基づいた定着腫瘍の退縮と転移・再発予防とを同時に達成できる可能性を示しており、DC 癌免疫療法の適応拡大に貢献できるアプローチとして期待される。

D. 考察

癌を免疫学的に征圧するためには、腫瘍免疫の中心的なエフェクター細胞である腫瘍特異的 CTL を強力に誘導できる方法論の確立が必要とされる。本観点から従来の DC 癌免疫療法研究では、“nature’s adjuvant”として用いる DC への効率的な TAA 送達法の探索に焦点が当てられてきた。しかし、単に TAA を導入しただけの DC は、動物実験において著効を発揮したとしても、臨床試験では残念ながら良好な成績が得られていないのが現状である。この原因は様々考えられるが、報告者は生体内に存在する DC の免疫応答誘導機序を鑑みて、生体に投与する TAA 導入 DC の①リンパ節への移行性、②生体内寿命、③T 細胞増殖刺激能、をそれぞれ亢進することができれば、DC 癌免疫療法の有効性を飛躍的に改善し、臨床応用実現に大きく貢献できるのではないかと考えた。

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 AdRGD を駆使することによって、上述の①~③の機能を遺伝子工学的に増強・付与した DC を創製し、それらの腫瘍免疫誘導効果の解析を通して DC 癌免疫療法の最適化に繋がる基礎情報の集積を図った。まず、DC のリンパ節への遊走を制御するケモカインレセプター CCR7 に着目し、TAA 導入とともに CCR7 を豊富に発現させた DC を作製した。この TAA+CCR7/DC は、リンパ節から構成的に分泌されているケモカイン CCL21 に応答して遊走活性が増大する特性を示し、投与部位から所属リンパ節への移行性増強を反映してより効率よく腫瘍免疫を誘導することができた。次に、アポトーシス抑制分子であり、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 Bcl-x_L の活性増強変異体 Bcl-xFNK の遺伝子を導入した DC を作製した。TAA+FNK/DC においては、生体内寿命の延長とそれに伴う抗原提示機能の持続が認められ、より強力な腫瘍免疫を誘導できる DC 医薬であることが明らかとなった。さらに、TNF superfamily の一員である LIGHT を発現させた DC を創製し、従来の DC 癌免疫療法では治療効果を得ることが困難とされる定着腫瘍に対する有効性を評価した。腫瘍内投与した LIGHT/DC は癌細胞を直接傷害するのみならず、傷害により生じた癌細胞断片を捕捉して腫瘍特異的 CTL を効率よく誘導することができた。この免疫学的機序には、LIGHT/DC の所属リンパ節移行性の増大、T 細胞増殖刺激能の増強、リンパ球腫瘍内浸潤の亢進、が関与することを見出しており、今後これらのイベントと LIGHT 機能との連関を精査する予定である。

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。生体から単離した DC をそのままの状態ですべての有効性が得られるケースは皆無であり、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。本研究で得られた知見に基づいて、今後、より有効かつ安全な DC 癌免疫療法の開発に貢献しうる DC 医薬の設計・創製を進めていきたいと考えている。

E. 結論

AdRGD を用いた DC の遺伝子工学的な機能修飾が、腫瘍免疫誘導能に優れる DC 医薬の創製に極めて有用性の高いアプローチであることを実証した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岡田直貴, 中川晋作. 免疫細胞の体内動態制御に基づいた癌免疫療法の最適化. *薬学雑誌* 127(2): 327-339 (2007).
- 2) 杉田敏樹, 岡田直貴, 中川晋作. ケモカイン・ケモカインレセプター連関を利用した抗腫瘍免疫の増強. *臨床免疫* 45(5): 525-532 (2006).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) Naoki Okada, Naoki Mori, Ryosuke Koretomo, Yuka Okada, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi, Takuya Fujita, and Akira Yamamoto. Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction. *Gene Ther.* 12(2): 129-139 (2005).
- 7) Naoki Okada, Sayaka Iiyama, Yuka Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi, Takuya Fujita, and Akira Yamamoto. Immunological properties and vaccine efficacy of murine dendritic cells simultaneously expressing melanoma-associated antigen and interleukin-12. *Cancer Gene Ther.* 12(1): 72-83 (2005).
- 8) 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(4): 355-362 (2004).
- 9) Naoki Okada, Jian-Qing Gao, Akinori Sasaki, Masakazu Niwa, Yuka Okada, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Takuya Fujita, Akira Yamamoto, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, and Shinsaku Nakagawa. 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(1): 68-76 (2004).

2. 学会発表

- 1) 大西康司, 金川尚子, 金本雄次, 藤田卓也, 山本 昌, 中川晋作, 岡田直貴. TERT 遺伝子導入樹状細胞の腫瘍免疫誘導機序および安全性に関する検討. *日本薬学会第 127 年会*, 富山市, 2007 年 3 月 28-30 日.
- 2) 後藤美千代, 金川尚子, 岡田裕香, 向 洋平, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作. TNF 関連分子発現樹状細胞を用いた定着腫瘍に対する新規免疫療法の開発. *日本薬学会第 127 年会*, 富山市, 2007 年 3 月 28-30 日.
- 3) 大西康司, 岡田直貴, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌. 種々のマウス腫瘍モデルを用いた TERT 遺伝子導入樹状細胞ワクチンの有効性と汎用性の評価. *第 36 回日本免疫学会総会*, 大阪市, 2006 年 12 月 11-13 日.
- 4) 大西康司, 岡田直貴, 金本雄次, 森川愉加里, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌. TERT 遺伝子導入樹状細胞ワクチンを用いた汎用性に優れる癌免疫療法の開発. *第 2 回創剤フォーラム若手研究発表討論会*, 京都市, 2006 年 10 月 13-14 日.
- 5) 前田葉子, 岡田直貴, 上羽美貴, 松永知子, 藤井 愛, 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癌免疫療法への応用. *第 2 回創剤フォーラム若手研究発表討論会*, 京都市, 2006 年 10 月 13-14 日.
- 6) 吉川友章, 岡田直貴, 中川晋作. 遺伝子工学的手法を用いて DDS 機能を付与した樹状細胞ワクチンの有用性. *第 22 回日本 DDS 学会*, 東京都, 2006 年 7 月 7-8 日.
- 7) 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. アポトーシス抵抗性を付与した樹状細胞の生体内生存期間延長と免疫誘導との連関評価. *第 22 回日本 DDS 学会*, 東京都, 2006 年 7 月 7-8 日.
- 8) 岡田直貴. 免疫細胞の体内動態制御に基づい

- た癌免疫療法の最適化. *日本薬学会第 126 年会*, 仙台市, 2006 年 3 月 28-30 日.
- 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 是友良介, 岡田直貴, 村上さや香, 大西善洋, 水口裕之, 中川晋作, 藤田卓也, 山本 昌. アデノウイルスベクターによる樹状細胞の表現型変化とその作用機序に関する基礎的検討. *日本薬剤学会第 21 年会*, 金沢市, 2006 年 3 月 16-18 日.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) Ryosuke Koretomo, Naoki Okada, Naoki Mori, Hiroyuki Mizuguchi, Shinsaku Nakagawa, Takuya Fujita, and Akira Yamamoto. Lymphoid tissue directivity and vaccine efficacy of dendritic cells transduced with CCR7 gene by using RGD fiber-mutant adenoviral vector. *20th JSSX-13th NA ISSX Joint Meeting*, Hawaii, October 23-27, 2005.
 - 16) 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.
 - 17) 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*, 東京都, 2005 年 3 月 29-31 日.
 - 18) 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*, 東京都, 2005 年 3 月 29-31 日.
 - 19) 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, 眞弓忠範, 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*, 東京都, 2005 年 3 月 29-31 日.
 - 20) 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, 眞弓忠範, 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*, 東京都, 2005 年 3 月 29-31 日.
 - 21) 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*, 東京都, 2005 年 3 月 25-27 日.
 - 22) 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*, 福岡市, 2004 年 9 月 29 日-10 月 1 日.
 - 23) 岡田直貴. 改変型アデノウイルスベクターを用いた癌遺伝子治療・免疫療法の最適化. *遺伝子・デリバリー研究会第 4 回シンポジウム*, 京都市, 2004 年 5 月 10 日.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

平成18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成19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