

氏 名	たけもとせいじ 竹本誠二
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第625号
学位授与の日付	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	Heat shock protein 70 を利用した抗腫瘍免疫システムの開発に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 高倉喜信 教授 橋田 充 教授 佐治英郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

癌抗原を生体に投与することで細胞性免疫を誘導し、標的癌細胞のみを選択的に殺傷する癌免疫療法は有効かつ副作用の少ない次世代型の癌治療法として期待される。近年、分子シャペロンとして知られる heat shock protein 70 (Hsp70) が、細胞外に存在する場合には LOX-1 などのレセプターを介してマクロファージ (MΦ) や樹状細胞などの抗原提示細胞 (APC) に効率よく取り込まれること、また CD40 や Toll-like receptor-2, -4 を介して APC を活性化するアジュバント活性を有することが明らかとされた。こうした Hsp70 の特性を利用した抗原デリバリーが試みられているが、未だ十分な治療効果が得られていない。Hsp70 を利用した抗腫瘍免疫誘導による有効な癌治療の実現には、Hsp70-抗原の体内動態及び細胞内動態を厳密に制御することが必要と考えられる。そこで著者は、Hsp70 を基盤とする新規抗腫瘍免疫治療システムの開発を目的に、Hsp70 の体内動態特性を解明するとともに、Hsp70-抗原結合体に種々の機能性分子を付与した誘導体を開発し、効率的な抗原デリバリーの実現による抗腫瘍免疫の増強を試みた。

#### I. Hsp70 を基盤とする抗原デリバリーシステム開発を目的とした Hsp70 の体内動態解析

Hsp70 の基本的な体内動態特性の解明を目的に、<sup>111</sup>In で放射標識したマウス Hsp70 を用いてマウス静脈内投与実験を行った。その結果、Hsp70 は血中より速やかに消失し、主に肝臓に集積すること、また主として肝実質細胞に取り込まれること、さらにその取り込みには CD91 が関与することが明らかとなった。一方、皮下投与の場合には、Hsp70 は投与部位より徐々に消失し、所属リンパ節への移行が高いことが示された。

そこで、体内分布実験の結果を元に算出される組織取り込みクリアランスなどの薬物動態パラメータに対し、統計学的検定を行うことで Hsp70 体内動態の投与量依存性の評価を試みた。そのために動態パラメータの平均値に加えて分散値まで算出可能な新規薬物動態解析プログラム MOMENT (BS) を開発した。Hsp70 の体内分布データに対して速度論解析を行い、各パラメータを算出したところ、Hsp70 の体内動態は検討した投与量範囲内では線形であることを明らかにした。

#### II. 細胞内動態制御機能を付与した Hsp70 を基盤とする抗原デリバリーシステムの開発

Hsp70 を利用した抗原デリバリーによる免疫応答には、APC に取り込まれた Hsp70-抗原結合体がエンドソームやリソソームから細胞質へ移行し、MHC クラス I 分子に提示されることが必要である。そこで効率的な免疫応答を誘導するために、APC に発現する Hsp70 レセプターを介して取り込まれた Hsp70-抗原結合体の細胞内動態制御を試みた。APC のエンドソームから細胞質への移行を促進する機能分子として25あるいは50残基の polyhistidine (His25, His50) を N 末側に融合し、モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) の代表的 MHC クラス I エピトープ (pepI; OVA<sub>257-264</sub>) とプロテアソームでの効率良い切断が可能とされるスペーサー配列を C 末側に融合した新規 Hsp70 融合タンパク質を構築した。樹状細胞株 DC2.4 細胞を用いて各融合タンパク質の取り込みを評価したところ、His25-Hsp70-pepI は効率よく取り込まれるとともに、細胞質全体への分布が観察され、polyhistidine の利用による Hsp70 融合タンパク質の効率的な細胞質デリバリーが示唆された。また、DC2.4 細胞に His25-Hsp70-pepI を添加後の抗原提示は、polyhistidine を有しない Hsp70-pepI

の場合と比較して有意に高かった。そこで、マウスに皮内投与時の OVA 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 活性を指標に融合タンパク質の免疫誘導活性を評価したところ、His25-Hsp70-pepI 投与により高い CTL 活性が得られた。以上、polyhistidine の融合により Hsp70-抗原結合体を積極的に細胞質にデリバリーすることで、MHC クラス I 提示ならびに CTL 誘導を増強することに成功した。

### Ⅲ. MHC クラス I・II 両エピトープを付与した Hsp70 抗原デリバリーシステムの開発

近年、高い CTL 活性の誘導には MHC クラス I エピトープのみならず、MHC クラス II エピトープ (pepII) も同時に APC にデリバリーすることの重要性が認識されるようになってきた。そこで、Hsp70 を基盤とした抗原デリバリーによる抗腫瘍免疫誘導のさらなる増強を目的に、Hsp70 に pepI と pepII を同時に搭載した Hsp70 誘導体を開発した。Hsp70 に pepII (OVA<sub>323-339</sub>) を融合した Hsp70-pepII および pepII-Hsp70, pepII-Hsp70-pepI を作成し、MΦ を用いて pepII 抗原提示を確認後、マウス皮内に免疫した。その結果、pepII-Hsp70-pepI 投与群は Hsp70-pepI と pepII-Hsp70 の混合物投与群や Hsp70-pepI 単独投与群に比較して、非常に高い CTL 活性を示すとともに OVA 発現マウス胸腺腫細胞株 EG7 が形成する腫瘍増殖の有意な抑制が認められた。そこで、pepI と pepII の両分子搭載による抗腫瘍効果増強のメカニズムの解明を目的に、各 Hsp70 誘導体をあらかじめ *in vitro* で添加した DC2.4 細胞をマウスに移植し、CTL 活性を評価した。その結果、Hsp70-pepI と pepII-Hsp70 を別々に取り込ませた DC2.4 細胞を混合してマウスに投与した場合に比較して、pepII-Hsp70-pepI を取り込ませた DC2.4 細胞を投与したマウスで高い CTL 活性が得られ、同一 APC 上に MHC クラス I, クラス II の両エピトープを提示させることの有用性が実証された。以上の結果より、Hsp70 一分子上に pepI, pepII の両分子を搭載した新規 pepII-Hsp70-pepI は、強力な抗腫瘍免疫を誘導可能であることが明らかになった。

以上、申請者は体内・細胞内動態を制御した Hsp70 誘導体を系統的に開発し、その分子設計ならびに最適化に対して新たな指針を得ると共に、効率よく細胞性免疫を誘導できる抗腫瘍免疫システムの開発に成功した。本研究で得られた知見は Hsp70 を利用した抗腫瘍免疫療法に対して有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

癌抗原を生体に投与することで細胞性免疫を誘導し、標的癌細胞のみを選択的に殺傷する癌免疫療法は有効かつ副作用の少ない次世代型の癌治療法として期待される。近年、分子シャペロンとして知られる heat shock protein 70 (Hsp70) が、細胞外に存在する場合には LOX-1 などのレセプターを介してマクロファージ (MΦ) や樹状細胞などの抗原提示細胞 (APC) に効率よく取り込まれること、また CD40 や Toll-like receptor-2, -4 を介して APC を活性化するアジュバント活性を有することが明らかとされた。こうした Hsp70 の特性を利用した抗原デリバリーが試みられているが、未だ十分な治療効果が得られていない。Hsp70 を利用した抗腫瘍免疫誘導による有効な癌治療の実現には、Hsp70-抗原の体内動態及び細胞内動態を厳密に制御することが必要と考えられる。そこで著者は、Hsp70 を基盤とする新規抗腫瘍免疫治療システムの開発を目的に、Hsp70 の体内動態特性を解明するとともに、Hsp70-抗原結合体に種々の機能性分子を付与した誘導体を開発し、効率的な抗原デリバリーの実現による抗腫瘍免疫の増強を試みた。

### I. Hsp70 を基盤とする抗原デリバリーシステム開発を目的とした Hsp70 の体内動態解析

Hsp70 の基本的な体内動態特性の解明を目的に、<sup>111</sup>In で放射標識したマウス Hsp70 を用いてマウス静脈内投与実験を行った。その結果、Hsp70 は血中より速やかに消失し、主に肝臓に集積すること、また主として肝実質細胞に取り込まれること、さらにその取り込みには CD91 が関与することが明らかとなった。一方、皮下投与の場合には、Hsp70 は投与部位より徐々に消失し、所属リンパ節への移行が高いことが示された。

そこで、体内分布実験の結果を元に算出される組織取り込みクリアランスなどの薬物動態パラメータに対し、統計学的検定を行うことで Hsp70 体内動態の投与量依存性の評価を試みた。そのために動態パラメータの平均値に加えて分散値まで算出可能な新規薬物動態解析プログラム MOMENT (BS) を開発した。Hsp70 の体内分布データに対して速度論解析を行い、各パラメータを算出したところ、Hsp70 の体内動態は検討した投与量範囲内では線形であることを明らかにした。

### II. 細胞内動態制御機能を付与した Hsp70 を基盤とする抗原デリバリーシステムの開発

Hsp70 を利用した抗原デリバリーによる免疫応答には、APC に取り込まれた Hsp70-抗原結合体がエンドソームやリ

ソソームから細胞質へ移行し、MHC クラス I 分子に提示されることが必要である。そこで効率的な免疫応答を誘導するために、APC に発現する Hsp70 レセプターを介して取り込まれた Hsp70 一抗原結合体の細胞内動態制御を試みた。APC のエンドソームから細胞質への移行を促進する機能分子として25あるいは50残基の polyhistidine (His25, His50) を N 末側に融合し、モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) の代表的 MHC クラス I エピトープ (pepI; OVA<sub>257-264</sub>) とプロテアソームでの効率良い切断が可能とされるスペーサー配列を C 末側に融合した新規 Hsp70 融合タンパク質を構築した。樹状細胞株 DC2.4 細胞を用いて各融合タンパク質の取り込みを評価したところ、His25-Hsp70-pepI は効率よく取り込まれるとともに、細胞質全体への分布が観察され、polyhistidine の利用による Hsp70 融合タンパク質の効率的な細胞質デリバリーが示唆された。また、DC2.4 細胞に His25-Hsp70-pepI を添加後の抗原提示は、polyhistidine を有しない Hsp70-pepI の場合と比較して有意に高かった。そこで、マウスに皮内投与時の OVA 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 活性を指標に融合タンパク質の免疫誘導活性を評価したところ、His25-Hsp70-pepI 投与により高い CTL 活性が得られた。以上、polyhistidine の融合により Hsp70 一抗原結合体を積極的に細胞質にデリバリーすることで、MHC クラス I 提示ならびに CTL 誘導を増強することに成功した。

### Ⅲ. MHC クラス I・II 両エピトープを付与した Hsp70 抗原デリバリーシステムの開発

近年、高い CTL 活性の誘導には MHC クラス I エピトープのみならず、MHC クラス II エピトープ (pepII) も同時に APC にデリバリーすることの重要性が認識されるようになってきた。そこで、Hsp70 を基盤とした抗原デリバリーによる抗腫瘍免疫誘導のさらなる増強を目的に、Hsp70 に pepI と pepII を同時に搭載した Hsp70 誘導体を開発した。Hsp70 に pepII (OVA<sub>323-339</sub>) を融合した Hsp70-pepII および pepII-Hsp70, pepII-Hsp70-pepI を作成し、MΦ を用いて pepII 抗原提示を確認後、マウス皮内に免疫した。その結果、pepII-Hsp70-pepI 投与群は Hsp70-pepI と pepII-Hsp70 の混合物投与群や Hsp70-pepI 単独投与群に比較して、非常に高い CTL 活性を示すとともに OVA 発現マウス胸腺腫細胞株 EG7 が形成する腫瘍増殖の有意な抑制が認められた。そこで、pepI と pepII の両分子搭載による抗腫瘍効果増強のメカニズムの解明を目的に、各 Hsp70 誘導体をあらかじめ *in vitro* で添加した DC2.4 細胞をマウスに移植し、CTL 活性を評価した。その結果、Hsp70-pepI と pepII-Hsp70 を別々に取り込ませた DC2.4 細胞を混合してマウスに投与した場合に比較して、pepII-Hsp70-pepI を取り込ませた DC2.4 細胞を投与したマウスで高い CTL 活性が得られ、同一 APC 上に MHC クラス I, クラス II の両エピトープを提示させることの有用性が実証された。以上の結果より、Hsp70 一分子上に pepI, pepII の両分子を搭載した新規 pepII-Hsp70-pepI は、強力な抗腫瘍免疫を誘導可能であることが明らかになった。

以上、申請者は体内・細胞内動態を制御した Hsp70 誘導体を系統的に開発し、その分子設計ならびに最適化に対して新たな指針を得ると共に、効率よく細胞性免疫を誘導できる抗腫瘍免疫システムの開発に成功した。本研究で得られた知見は Hsp70 を利用した抗腫瘍免疫療法に対して有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

よって、本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。

更に、平成19年2月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。