

氏名	かわせあつし 川瀬篤史
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第580号
学位授与の日付	平成17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	DNA ワクチンの最適化を目指したプラスミド DNA および樹状細胞の動態解析と免疫応答の制御に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 高倉喜信 教授 橋田 充 教授 乾 賢一

論 文 内 容 の 要 旨

抗原タンパク質の遺伝子をコードしたプラスミド DNA (pDNA) を投与する DNA ワクチンは、ガンや感染症に対する治療法としての開発が期待されている。しかしながら、pDNA の投与時の局所動態や効果発現機構の詳細は十分に解明されておらず、治療の最適化を実現するためには、これらに関する情報の蓄積が不可欠と考えられる。pDNA 投与後の免疫応答の誘導過程においては、樹状細胞 (DC) に代表される抗原提示細胞が重要な役割を果たしているが、pDNA が DC に直接取り込まれ発現・提示に至る経路と、抗原提示細胞以外の細胞に取り込まれた後、そこで発現した抗原タンパク質を DC が取り込む経路が考えられる。それらの経路により誘導される免疫応答が決定されると考えられるため、DC への pDNA デリバリーや投与局所への DC の集積も効果発現には非常に重要であると言える。そこで本研究では、投与局所での pDNA および DC の動態に焦点を当て、pDNA による DNA ワクチン効果の改善、ならびに免疫応答修飾の可能性を検討した。即ち、まず pDNA の局所動態を解析するとともに、DC へのデリバリーを目的にカチオン性高分子との複合体化を行い、これによる免疫応答の変動を評価した。また、DC 内で発現した抗原タンパク質・ペプチドの細胞内局在を制御する pDNA を構築し免疫応答における有用性を評価するとともに、DC 遊走・成熟化に影響を及ぼすサイトカイン遺伝子をコードした pDNA の併用による DC 動態制御、免疫応答の修飾を試みた。

I. プラスミド DNA の局所投与時の体内動態・遺伝子発現およびカチオン性高分子複合体化の影響

まず、pDNA を水溶液の形でマウスに局所投与した後の体内動態および遺伝子発現に関して基礎的検討を行った。投与部位としては、長期にわたり高い遺伝子発現が得られる筋肉、DC が豊富に存在する皮膚、ならびに DNA ワクチンの重要な対象疾患の一つである皮下腫瘍を選択した。その結果、いずれの部位に投与した場合にも pDNA は投与局所から一部リンパ系を介して比較的速やかに消失することが明らかとなった。種々のポリアニオンを同時に投与したところある種のポリアニオンの場合に限り遺伝子発現は有意に低下し、局所投与された pDNA はポリアニオンを認識する何らかの機構を介して細胞に取り込まれることが示唆された。

次に、pDNA とカチオン性高分子であるメチル化ウシ血清アルブミン (mBSA) との複合体化が pDNA の体内動態および遺伝子発現に及ぼす影響について検討するため、種々の混合比で物理化学的性質の異なる複合体を調製し、局所投与実験を行なった。その結果、表面電荷の高い複合体が投与部位近傍に滞留するとともに所属リンパ節へも高率に移行することが明らかとなった。一方、筋肉での見かけの遺伝子発現量は pDNA 水溶液投与と比較して有意に減少する傾向を示した。

II. カチオン性高分子複合体化が免疫応答に及ぼす影響

第 I 章において、カチオン性高分子との複合体化により pDNA の局所動態制御の可能性が示されたため次にモデル抗原として卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) をコードした pDNA を用い免疫応答に関する検討を行なった。mBSA との複合体化により Th2 型の免疫応答である抗原特異的な抗体産生が認められ、特に高い表面電荷を持つ複合体は水溶液投与と比較し有意に高い抗体産生を誘導することが明らかとなった。一方、Th1 型の免疫応答である細胞障害性 T 細胞 (CTL)

の活性は複合体化により減少する傾向が認められた。投与部位における DC の分布を検討したところ、複合体の投与により投与部位への DC の集積が促進されることが明らかとなり、この機構として皮膚の主な構成細胞であるケラチノサイトからの tumor necrosis factor α の産生の関与が示唆された。また、マウス DC の細胞株 DC2.4 細胞を用いた *in vitro* の検討において、複合体化により遺伝子発現およびサイトカイン産生が増大することが示された。以上の結果より、複合体化により投与部位に pDNA が滞留するとともに DC が集積することで複合体が直接 DC に作用する機会が増大すること、その結果 DC における遺伝子発現ならびにサイトカイン産生が増大し、MHC class II 分子への抗原提示が亢進することが示唆された。

Ⅲ. 抗原の細胞内動態制御および樹状細胞の動態制御による免疫応答の修飾

前章の結果より、免疫応答の誘導における DC の投与部位での集積と pDNA を直接 DC に送達させることの重要性が示された。そこでまず、抗原ペプチドの細胞内動態を制御することによる MHC class I 提示の改善を試みた。OVA あるいはその抗原ペプチドの細胞内動態を制御可能な pDNA を構築したところ、抗原タンパク質のユビキチン化効率の改善、あるいは小胞体 (ER) への直接的な送達を目的として設計した pDNA が、DC2.4 細胞における効率的な MHC class I への抗原提示に有効であることが示された。次に局所への DC 集積を目的に、未成熟 DC の遊走に関する regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) および DC の分化および interleukin 12 の産生を促進するサイトカインとして知られる transforming growth factor β 1 の併用を試みた。その結果、RANTES をコードした pDNA の併用で高い投与部位への DC の集積および所属リンパ節での抗原の存在が認められ、pDNA 単独と比べ高い CTL 活性が誘導されることが明らかとなった。

以上、本研究では、pDNA および DC の局所動態の特性を明らかにすると共に、これらを制御することで免疫応答が修飾できる可能性を示した。これらの知見は対象となる疾患に適した免疫応答を効率良く誘導させる DNA ワクチンのアプローチを確立するための有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

抗原タンパク質の遺伝子をコードしたプラスミド DNA (pDNA) を投与する DNA ワクチンは、ガンや感染症に対する治療法としての開発が期待されている。しかしながら、pDNA の投与時の局所動態や効果発現機構の詳細は十分に解明されておらず、治療の最適化を実現するためには、これらに関する情報の蓄積が不可欠と考えられる。pDNA 投与後の免疫応答の誘導過程においては、樹状細胞 (DC) に代表される抗原提示細胞が重要な役割を果たしているが、pDNA が DC に直接取り込まれ発現・提示に至る経路と、抗原提示細胞以外の細胞に取り込まれた後、そこで発現した抗原タンパク質を DC が取り込む経路が考えられる。それらの経路により誘導される免疫応答が決定されると考えられるため、DC への pDNA デリバリーや投与局所への DC の集積も効果発現には非常に重要であると言える。そこで筆者は、投与局所での pDNA および DC の動態に焦点を当て、pDNA による DNA ワクチン効果の改善、ならびに免疫応答修飾の可能性を検討した。即ち、まず pDNA の局所動態を解析するとともに、DC へのデリバリーを目的にカチオン性高分子との複合体化を行い、これによる免疫応答の変動を評価した。また、DC 内で発現した抗原タンパク質・ペプチドの細胞内局在を制御する pDNA を構築し免疫応答における有用性を評価するとともに、DC 遊走・成熟化に影響を及ぼすサイトカイン遺伝子をコードした pDNA の併用による DC 動態制御、免疫応答の修飾を試みた。

まず、pDNA を水溶液の形でマウスに局所投与した後の体内動態および遺伝子発現に関して基礎的検討を行った。投与部位としては、長期にわたり高い遺伝子発現が得られる筋肉、DC が豊富に存在する皮膚、ならびに DNA ワクチンの重要な対象疾患の一つである皮下腫瘍を選択した。その結果、いずれの部位に投与した場合にも pDNA は投与局所から一部リンパ系を介して比較的速やかに消失することが明らかとなった。種々のポリアニオンを同時に投与したところある種のポリアニオンの場合に限り遺伝子発現は有意に低下し、局所投与された pDNA はポリアニオンを認識する何らかの機構を介して細胞に取り込まれることが示唆された。次に、pDNA とカチオン性高分子であるメチル化ウシ血清アルブミン (mBSA) との複合体化が pDNA の体内動態および遺伝子発現に及ぼす影響について検討するため、種々の混合比で物理化学的性質の異なる複合体を調製し、局所投与実験を行なった。その結果、表面電荷の高い複合体が投与部位近傍に滞留するとともに

所属リンパ節へも高率に移行することが明らかとなった。一方、筋肉での見かけの遺伝子発現量は pDNA 水溶液投与と比較して有意に減少する傾向を示した。

以上より、カチオン性高分子との複合体化により pDNA の局所動態制御の可能性が示されたため次にモデル抗原として卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) をコードした pDNA を用い免疫応答に関する検討を行なった。mBSA との複合体化により Th2 型の免疫応答である抗原特異的な抗体産生が認められ、特に高い表面電荷を持つ複合体は水溶液投与に比較し有意に高い抗体産生を誘導することが明らかとなった。一方、Th1 型の免疫応答である細胞障害性 T 細胞 (CTL) の活性は複合体化により減少する傾向が認められた。投与部位における DC の分布を検討したところ、複合体の投与により投与部位への DC の集積が促進されることが明らかとなり、この機構として皮膚の主な構成細胞であるケラチノサイトからの tumor necrosis factor α の産生の関与が示唆された。また、マウス DC の細胞株 DC2.4 細胞を用いた *in vitro* の検討において、複合体化により遺伝子発現およびサイトカイン産生が増大することが示された。以上の結果より、複合体化により投与部位に pDNA が滞留するとともに DC が集積することで複合体が直接 DC に作用する機会が増大すること、その結果 DC における遺伝子発現ならびにサイトカイン産生が増大し、MHC class II 分子への抗原提示が亢進することが示唆された。

以上の検討より、免疫応答の誘導における DC の投与部位での集積と pDNA を直接 DC に送達させることの重要性が示された。そこでまず、抗原ペプチドの細胞内動態を制御することによる MHC class I 提示の改善を試みた。OVA あるいはその抗原ペプチドの細胞内動態を制御可能な pDNA を構築したところ、抗原タンパク質のユビキチン化効率の改善、あるいは小胞体 (ER) への直接的な送達を目的として設計した pDNA が、DC2.4 細胞における効率的な MHC class I への抗原提示に有効であることが示された。次に局所への DC 集積を目的に、未成熟 DC の遊走に関与する regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) および DC の分化および interleukin 12 の産生を促進するサイトカインとして知られる transforming growth factor β 1 の併用を試みた。その結果、RANTES をコードした pDNA の併用で高い投与部位への DC の集積および所属リンパ節での抗原の存在が認められ、pDNA 単独と比べ高い CTL 活性が誘導されることが明らかとなった。以上、本研究では、pDNA および DC の局所動態の特性を明らかにすると共に、これらを制御することで免疫応答が修飾できる可能性を示した。これらの知見は対象となる疾患に適した免疫応答を効率良く誘導させる DNA ワクチンのアプローチを確立するための有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

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17年3月7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。