

( 続紙 1 )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                               |    |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 博士（薬学）                                                                                                                                                                                        | 氏名 | 周 舒 文 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Enhancement in cancer immunotherapeutic effect of CpG DNA by change of administration route and combination with photohyperthermic treatment<br>（投与経路の選択や光線温熱療法併用によるCpG DNAがん免疫療法の効果増強に関する研究） |    |       |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                               |    |       |
| <p>現在のがん治療においては、転移、再発、重篤な副作用、あるいは治療対象者に対する制限などのために、依然として根治には至らない例が多く、これを克服するために、新規がん治療法の開発が強く求められている。がん免疫療法は、がん細胞に対する免疫系を活性化し特異的な免疫反応を誘導することによりがん細胞の増殖抑制を図るもので、一般に副作用が少なくまた全身性の免疫誘導により再発や転移の防止が期待できる。バクテリアゲノムに特徴的なDNA配列であるCpGモチーフを含む短鎖DNA (CpG DNA) は、脊椎動物の生体内の樹状細胞やマクロファージ等の免疫担当細胞を活性化してTNF-<math>\alpha</math>やIL-12などのTh1型サイトカインの産生を誘導し、その強い免疫活性化能によりがん免疫治療への応用が期待されている。しかし、核酸医薬品であるCpG DNAは、生体内安定性が悪く、またポリアニオンであることから負に帯電する標的細胞である抗原提示細胞表面への吸着、細胞内への取り込みも低いなどの問題を有し、CpG DNA単独投与では十分な抗腫瘍効果は得られていない。そこで、申請者はCpG DNAの治療効果増強を目的として、投与形態や投与経路に関する検討と、発熱素材であるカーボンナノチューブ(CNT)との複合化による外部エネルギー照射との組み合わせに基づく新規ながん免疫療法の開発を行った。</p> <p>第1章 免疫活性化能を有するCpG DNA/カチオン性リポソーム複合体の経鼻投与によるがんの肺転移及び腹膜播種抑制</p> <p>鼻などの呼吸器官にはリンパ組織や免疫担当細胞が豊富に存在し、外界から侵入する異物に対して応答する免疫システムが確立されている。また、鼻などの粘膜で活性化された免疫細胞は、所属リンパ節、胸管、血流を経て全身性に免疫を活性化することから、経鼻投与法は全身性免疫の誘導法としても有望と考えられる。そこで、自然免疫を活性化するCpG DNAに対し、免疫担当細胞内への細胞取り込み促進による免疫応答誘導の増強を期待して、カチオン性リポソームと複合体 (CpG DNA lipoplex) を調製した。マウスにCpG DNA lipoplexを経鼻投与後、CpG DNAのCG配列依存的に肺組織内IFN-<math>\gamma</math>濃度の有意な増大が認められ、colon26/LucならびにB16 F10細胞の肺転移に対する抑制効果、マウス生存率の有意な延長も認められた。また、colon26/LucおよびB16F10細胞の腹膜播種に対する抑制効果も認められた。そこで、CpG DNA lipoplex経鼻投与によるがんの転移抑制機構をさらに詳細に検討するため、CpG DNA lipoplex投与マウスから回収した各種マクロファージを用いてcolon26への細胞傷害効果を比較した結果、肺マクロファージに比べて腹腔マクロファージがより高い細胞傷害性を示した。一方、脾臓から回収したNK細胞もYac-1細胞に対して有意に高い細胞傷害効果を示した。しかしながら、in vivoにおいてマクロファージ枯渇処理によるCpG DNA lipoplex投与後の肺転移並びに腹膜播種抑制効果への影響は小さかったのに対し、NK細胞を枯渇させることにより肺転移並びに腹膜播種抑制効果の消失が認められ、NK細胞活性化が転移抑制効果発現に大きな役割を果たしている可能性が示された。以上、CpG DNA lipoplex経鼻投与においては、NK細胞を主に活性化することにより、効</p> |                                                                                                                                                                                               |    |       |

果的ながんの肺転移並びに腹膜播種抑制効果が得られていることが示唆された。

## 第2章 免疫活性化能を有するCpG DNAとカーボンナノチューブ複合体の調製及びその癌免疫療法における有用性の評価

CpG DNA単独投与による治療効果増強の方策として、温度の上昇による免疫システムの活性化増強に着目し、温度上昇によって細胞死を誘導する温熱療法と、CpG DNAを用いた免疫療法との併用による新規がん治療法の開発を試みた。CNTは、光エネルギーを熱エネルギーに変えることから、近赤外線照射によるCNTの発熱効果に基づいてがん細胞死を誘導することが可能で、がん温熱療法への展開が期待されている。しかし、CNTは水への分散性が極めて悪く、その生体応用には分散性の改善が必要である。そこで、CNTが核酸と $\pi$ - $\pi$ 相互作用し分散化できることに着目し、CpG DNAとCNTの複合体 (CNT/CpG DNA複合体) を調製して、近赤外線照射による発熱効果を利用したがん免疫療法としての有用性を評価した。CNT/CpG DNA複合体への近赤外線照射により温度上昇が認められ、また、colon26細胞のin vitro培養系において、CNT/CpG DNA複合体を添加したのち近赤外線照射を行うことにより細胞死が誘導されることが示された。さらに、CNT/CpG DNA複合体をマウスの腫瘍内に投与後近赤外線を照射することにより、腫瘍のサイズが顕著に減少することを確認し、併せて本条件下において腫瘍内TNF- $\alpha$ の産生量が有意に増大していることを明らかにした。以上より、CNT/CpG DNA複合体の投与と近赤外線照射の併用により、免疫療法と温熱療法による相乗的な抗腫瘍効果が得られる可能性が示された。

以上、申請者は免疫活性化能を有するCpG DNAとカチオン性リポソームの複合体の経鼻投与により、効率的にがんの肺転移や腹膜播種の抑制が得られることを明らかにした。また、体外からの近赤外線照射により発熱するCNTと複合体化することで、優れた免疫活性化能及び治療効果が得られることを明らかにした。以上の知見は、CpG DNAを用いたがん免疫療法の開発に対して重要な基礎的情報を与えるものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

バクテリアゲノムに特徴的なDNA配列であるCpGモチーフを含む短鎖DNA (CpG DNA) は、脊椎動物の生体内の樹状細胞やマクロファージ等の免疫担当細胞を活性化してTNF- $\alpha$ やIL-12などのTh1 型サイトカインの産生を誘導し免疫を活性化することによりがん免疫治療への応用が期待されている。しかし、核酸医薬品であるCpG DNAは生体内安定性が悪く、またポリアニオンであることから標的細胞である抗原提示細胞表面への吸着、細胞内への取り込みも低いなどの問題を有し、CpG DNA単独投与では十分な抗腫瘍効果は得られていない。そこで、著者はCpG DNAの治療効果増強を目的として、投与形態や投与経路に関する検討と、発熱素材であるカーボンナノチューブ(CNT)との複合化による外部エネルギー照射との組み合わせに基づく新規ながん免疫療法の開発を行った。

鼻などの呼吸器官にはリンパ組織や免疫担当細胞が豊富に存在し、外界から侵入する異物に対して応答する免疫システムが確立されている。また、粘膜で活性化された免疫細胞は、所属リンパ節、胸管、血流を経て全身性に免疫を活性化することから、経鼻投与法は全身性免疫の誘導法としても有望と考えられる。そこで、自然免疫を活性化するCpG DNAに対し、免疫担当細胞内への細胞取り込み促進による免疫応答誘導の増強を期待して、カチオン性リポソームとの複合体 (CpG DNA lipoplex) を調製した。マウスにCpG DNA lipoplexを経鼻投与後、CpG DNAのCG配列依存的に肺組織内IFN- $\gamma$ 濃度が有意に上昇し、colon26/LucならびにB16F10細胞の肺転移や腹膜播種に対する抑制効果および生存日数延長効果が認められた。また、NK細胞の枯渇により肺転移並びに腹膜播種抑制効果が消失し、NK細胞が転移抑制に大きな役割を果たしている可能性が示された。次に、CpG DNA投与による効果をさらに増強することを目的として、温熱療法とCpG DNAを用いた免疫療法との併用による新規がん治療法の開発を試みた。CNTは、光エネルギーを熱エネルギーに変えることから、近赤外線照射によるCNTの発熱効果に基づいてがん細胞死を誘導することが可能で、がん温熱療法への展開が期待されている。しかし、CNTは水への分散性が極めて悪くその生体応用においては分散性の改善が条件となるため、核酸が $\pi$ - $\pi$ 相互作用に基づく吸着によりCNTを水に分散化できることに着目し、CpG DNAとCNTの複合体 (CNT/CpG DNA複合体) を調製してがん免疫治療効果を評価した。CNT/CpG DNA複合体分散液への近赤外線照射により温度上昇が認められ、またin vitro colon26細胞培養系においてCNT/CpG DNA複合体添加と近赤外線照射を組み合わせることにより細胞死が誘導されることが示された。さらに、CNT/CpG DNA複合体をマウスの腫瘍内に投与後近赤外線を照射することにより、腫瘍サイズの顕著な縮小と腫瘍内TNF- $\alpha$ の産生量の有意な増大が認められ、免疫療法と温熱療法の組み合わせによる相乗的な抗腫瘍効果が得られる可能性が示唆された。

以上、申請者は免疫活性化能を有するCpG DNAとカチオン性リポソームの複合体を調製し、経鼻投与によってがん細胞の肺転移や腹膜播種が抑制できることを明らかにした。また、体外からの近赤外線照射により発熱するCNTとCpG DNAを複合体化することで、担がんマウスに対する優れた免疫活性化および治療効果が得られることを明らかにした。以上の知見は、CpG DNAを用いたがん免疫療法の開発に対して重要な基礎的情報を与えるものと考えられる。

よって本論文は博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成24年2月22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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。  
特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に  
公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成      年      月      日以降