

氏 名	はっ とり よし ゆき 服 部 芳 幸
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 574 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	抗原提示細胞選択的遺伝子導入に基づく細胞性免疫誘導型新規 DNA ワ クチン製剤の開発に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 橋 田 充 教 授 高 倉 喜 信 教 授 乾 賢 一

論 文 内 容 の 要 旨

近年、抗原をコードした遺伝子を抗原提示細胞（APC）内で発現させ細胞性免疫誘導を行う DNA ワクチン療法が、がん、エイズ、C 型肝炎など種々の難治性疾患に対する新しい免疫療法として期待されている。現在、臨床にて行われた DNA ワクチン療法としては、プラスミド溶液の筋肉内や皮内への局所投与による免疫感作が試みられているが、細胞傷害性 T 細胞（CTL）の活性化に重要な APC 内における遺伝子発現効率は極めて低く、十分な効果は未だ得られていない。したがって、DNA ワクチン療法の臨床応用に向けて、安全に適用できる非ウイルスベクターを基盤とし、APC 選択的に *in vivo* において遺伝子導入できる標的指向型遺伝子導入キャリアシステムの開発が強く望まれる。非ウイルスベクターの中でも、カチオン性リポソームは遺伝子導入効率が高く、一方 APC は細胞固有で比較的厳密な基質認識特性を示すマンノースレセプターを有することから、マンノース修飾カチオン性リポソーム製剤を開発することにより、*in vivo* において APC 選択的かつ効率的な遺伝子発現が実現できるものと期待される。そこで著者は、薬品動態制御学分野において開発したマンノース修飾コレステロール誘導体（Man-C4-Chol）を用い、マンノース修飾カチオン性リポソームによる APC 選択的 *in vivo* 遺伝子導入法を開発した。さらに、モデル抗原の ovalbumin（OVA）をコードしたプラスミド DNA（pCMV-OVA）を構築し、APC 選択的遺伝子導入キャリアを用いて調製した DNA ワクチン製剤の有効性を評価した。

I. APC 選択型マンノース修飾カチオン性リポソーム/DNA ワクチン製剤の静脈内投与における免疫誘導効果

静脈内投与は、簡便で臨床応用に適するとともに、脾臓に多数存在する APC に対し選択的に遺伝子導入することにより効果的な免疫誘導が期待できる。マンノース修飾リポソーム/pCMV-OVA 複合体の静脈内投与により、未修飾リポソーム複合体および naked プラスミド DNA（pDNA）の投与に比べ、脾臓中の樹状細胞における MHC class I 抗原提示および脾臓細胞における OVA 特異的 IFN- γ 産生が増強され、APC 選択的遺伝子導入による細胞性免疫応答の増強が確認された。しかし、OVA 特異的な CTL 活性は検出されなかった。そこで、遺伝子発現効率が低かった原因の一端を探るため、 ^{32}P 標識 pDNA を用いて静脈内投与後の複合体の体内動態を解析した結果、マンノース修飾リポソーム複合体は投与後、血中から速やかに消失するが、標的と異なる肝非実質細胞へ高い集積を示し、より高い遺伝子導入を実現するためには動態パターンの最適化に向けたさらなる工夫が必要なが示唆された。

II. マンノース修飾カチオン性リポソームの腹腔内投与による APC への選択的遺伝子導入法の開発

リポソーム複合体の遺伝子発現効率は、APC への取り込みと安定性、そして非標的細胞への移行性など複数の因子のバランスにより決定される。腹腔内投与は、血管内投与に比べ投与後の滞留性と安定性の改善が期待できるとともに、腹腔内およびリンパ節内に存在する多数の APC への遺伝子導入が可能と考えられる。そこで、遺伝子発現を定量的かつ簡便に評価できるホタルルシフェラーゼ遺伝子をコードした pDNA（pCMV-Luc）を用い、マンノース修飾リポソーム複合体の腹腔内投与による APC に対する遺伝子導入効果を評価した。腹腔内投与後、APC が多数存在する肝臓、脾臓、リンパ節などの組織および腹腔滲出細胞（PEC）においてマンノース修飾リポソーム複合体は未修飾リポソーム複合体に比べ、2-10

倍高い遺伝子発現を示した。また、脾臓や肝臓など APC が多数存在する臓器における遺伝子発現レベルは、静脈内投与よりいずれの臓器においても10倍以上高く発現期間も2倍以上持続できることが明らかとなった。さらに、腹腔内投与後に脾臓および PEC より単離精製した APC における遺伝子発現活性を測定した結果、マンノース修飾リポソーム複合体は、未修飾リポソーム複合体および naked pDNA に比べ、有意に高い遺伝子発現を示した。以上、マンノース修飾リポソーム複合体の腹腔内投与は、腹腔内組織および細胞中に存在する APC に対して効率的かつ持続的に遺伝子発現が得られることから、DNA ワクチン製剤の投与方法として有効であることが示された。

Ⅲ. APC 選択型マンノース修飾リポソーム/DNA ワクチン製剤の腹腔内投与による免疫誘導効果

次に、pCMV-OVA を用い腹腔内投与後の免疫誘導効果に関して検討を行った。マンノース修飾リポソーム複合体を腹腔内投与後、脾臓および PEC より APC を単離し、OVA の遺伝子の発現レベルを細胞レベルで評価した結果、マンノース修飾リポソーム複合体は naked pDNA および未修飾リポソーム複合体と比べ、顕著に高い遺伝子発現を示すことが明らかとなった。また、複合体投与後の OVA 特異的 CTL 活性を評価した結果、naked pDNA および未修飾リポソーム複合体の腹腔内投与や従来の感作法である naked pDNA の筋肉内投与と比べて、強力な CTL 活性を誘導できることが示された。さらに、がん治療における有用性を評価することを目的に、免疫感作後に OVA 発現がん細胞 E.G7-OVA 細胞あるいはその親株 EL4 細胞を皮下へ移植し、がん細胞移植後の生存日数を評価した結果、マンノース修飾リポソーム複合体投与群では、naked pDNA および未修飾リポソームの複合体腹腔内投与群や naked pDNA 筋肉内投与群と比べ、OVA 発現がん細胞 E.G7-OVA 細胞特異的に生存日数が大きく延長するとともに、一部ではがんの完全拒絶が認められた。以上の結果より、マンノース修飾リポソームが APC への DNA ワクチンキャリアとして有効に機能することが明らかとなった。

以上、申請者は、マンノース修飾カチオン性リポソームを用いた APC 選択的遺伝子導入に対して、系統的な検討を行い、製剤設計ならびに投与方法に関して新たな指針を得ると共に、細胞性免疫誘導型 DNA ワクチン製剤の開発に成功した。本研究で得られた知見は、がんや感染症を対象疾患とする DNA ワクチン製剤の開発に対して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

近年、抗原をコードした遺伝子を抗原提示細胞 (APC) 内で発現させ細胞性免疫誘導を行う DNA ワクチン療法が、がん、エイズ、C 型肝炎など種々の難治性疾患に対する新しい免疫療法として期待されているが、臨床検討が行われているプラスミド溶液の筋肉内や皮内への局所投与による免疫感作では、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化に重要な APC 内における遺伝子発現効率は極めて低く、十分な効果は得られていない。したがって、APC 選択的に in vivo において遺伝子導入できる標的指向型遺伝子導入キャリアシステムの開発が強く望まれている。申請者は APC が細胞固有で比較的厳密な基質認識特性を示すマンノースレセプターを有することに着目し、マンノース修飾コレステロール誘導体 (Man-C4-Chol) を用いてマンノース修飾カチオン性リポソームによる APC 選択的 in vivo 遺伝子導入法を開発した。

静脈内投与は簡便で、脾臓に多数存在する APC に対し選択的に遺伝子導入することにより効果的な免疫誘導が期待できる。モデル抗原の ovalbumin (OVA) をコードしたプラスミド DNA (pCMV-OVA) を構築し、マンノース修飾リポソーム複合体の形で静脈内投与することにより、脾臓中の樹状細胞における MHC class I 抗原提示および脾臓細胞における OVA 特異的 IFN- γ 産生の増強が確認されたが、OVA 特異的な CTL 活性は検出されなかった。そこで、 $[^{32}\text{P}]$ 標識 pDNA を用いて静脈内投与後の複合体の体内動態を解析した結果、マンノース修飾リポソーム複合体は標的と異なる肝非実質細胞へ高い集積を示し、動態パターンの最適化がさらに必要なことが示唆された。

一般に、リポソーム複合体の遺伝子発現効率は、APC への取り込みと安定性、そして非標的細胞への移行性など複数の因子のバランスにより決定される。腹腔内投与は、血管内投与に比べ投与後の滞留性と安定性の改善が期待できるとともに、腹腔内およびリンパ節内に存在する多数の APC への遺伝子導入が可能と考えられる。そこで、マンノース修飾リポソーム複合体の腹腔内投与による APC に対する遺伝子導入効果を評価した結果、APC が多数存在する肝臓、脾臓、リンパ節などの組織および腹腔滲出細胞 (PEC) において高い遺伝子発現が得られた。次に、腹腔内投与後の免疫誘導効果に関して検討を行い、マンノース修飾リポソーム複合体を腹腔内投与後、脾臓および PEC より APC を単離し OVA の遺伝子の発

現レベルを細胞レベルで評価した結果、マンノース修飾リポソーム複合体が顕著に高い遺伝子発現を示すことが明らかとなり、強力な OVA 特異的 CTL 活性を誘導できることも証明された。さらに、免疫感作後に OVA 発現がん細胞 E. G7-OVA 細胞あるいはその親株 EL4細胞を皮下へ移植し免疫効果を評価した結果、マンノース修飾リポソーム複合体投与群では、E. G7-OVA 細胞特異的に生存日数が大きく延長し一部ではがんの完全拒絶が認められた。

以上、申請者は、マンノース修飾カチオン性リポソームを用いた APC 選択的遺伝子導入に対して系統的な検討を行い、製剤設計ならびに投与方法に関して新たな指針を得ると共に、細胞性免疫誘導型 DNA ワクチン製剤の開発に成功した。

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2日論文内容とそれと関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。