

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬 学)	氏名	関 心
論文題目	Development of DNA vaccine-based anti-tumor immunotherapeutic system (DNAワクチンに基づく抗腫瘍免疫治療システムの開発に関する研究)		

(論文内容の要旨)

抗原特異的な免疫応答を誘導する免疫療法は、癌や感染症などの様々な難治性疾患に対する次世代型治療法として期待されている。抗原タンパク質を遺伝子の形で投与するDNAワクチン療法は、体液性免疫に加えて細胞性免疫をも誘導できることから、安全性・汎用性に優れるプラスミドDNAを利用する方法を利用した癌治療が期待されている。DNAワクチンによる抗腫瘍免疫治療では、抗原投与により誘導された細胞傷害性Tリンパ球（CTL）が、標的となる癌細胞を攻撃することが重要である。そのためには抗原提示細胞（APC）が抗原をペプチド断片に分解し、これをTリンパ球に提示する必要がある。しかしながら、癌治療に必要な高いレベルのCTL応答を誘導することは困難であり、十分な治療効果が得られていないのが現状である。その主な原因として、1) 抗原のAPCへの不十分な取り込み、2) APC内での抗原の利用率低さ、3) APCのCTL誘導能の低さが挙げられる。そこで本研究では、有効な抗腫瘍免疫治療システムの開発を目的に、APCによる抗原取り込みならびに抗原提示を増大することによるDNAワクチン治療効果の増強を試みた。すなわち、モデル抗原として卵白アルブミン（OVA）を選択し、DNAワクチンの投与部位の選択、ならびに熱ショックタンパク質70（Hsp70）を利用した新規抗原デリバリーシステムの開発を試みた。最後に、非担癌マウスと担癌マウスにおけるDNAワクチン効果の相違の原因究明を試みた。

第1章 DNAワクチンの注射部位依存的免疫応答の誘導

一般に皮膚や筋肉がDNAワクチンの投与部位とされるが、二次リンパ器官として多数のリンパ球が存在する脾臓も有効な投与部位と考えられる。そこでDNAワクチンの投与部位としての脾臓の有用性についてOVAに対する免疫応答を指標に評価した。ルシフェラーゼ発現プラスミドを用いた検討から、脾臓での遺伝子発現は皮膚と比較して高いことが示された。これに反し、OVAを発現するpCMV-OVAプラスミドを投与したところ、皮膚投与群で高いCTL活性ならびに血中抗OVA IgG抗体価が得られた。また、OVA発現マウス胸腺細胞株EG7腫瘍の増殖も、皮膚投与により効果的に抑制された。以上から、脾臓はDNAワクチンの投与部位としては好ましくないことが示された。

第2章 熱ショックタンパク質70を基盤とするDNAワクチンシステムの開発による抗原デリバリーの最適化

近年、分子シャペロンとして知られるHsp70の免疫賦活化作用が注目されている。Hsp70を利用した癌免疫治療を目的に、Hsp70-抗原複合体の体内および細胞内動態を厳密に制御可能なDNAワクチンシステムを開発し、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。Hsp70を基盤とするタンパク質ワクチンの研究において、OVAのMHC class Iエピトープ (pepI) をHsp70に結合するだけでは十分な免疫応答が得られないこと、融合タンパク質を細胞質へ送り込む機能分子としてpolyhistidine (His) を組み込むことで初めて抗腫瘍免疫が増強可能であることが示されている。そこで、His-Hsp70-pepIを発現するプラスミドを構築し、His非融合型発現プラスミドと比較した。その結果、pHis-Hsp70-pepIを用いることで、樹状細胞上の抗原提示ならびにマウスにおける抗原特異的CTL誘導の増強が認められた。さらに強力なCTL活性の誘導には CTLに加えてCD4⁺ ヘルパーT細胞を同時に活性化することが重要と考えられる。そこで、pepIに加えてclass IIエピトープ (pepII) の利用を試みた。マウスを用いた検討の結果、Hsp70-pepIとpepII-Hsp70をそれぞれ発現する2種類のプラスミド、あるいは両方のエピトープを一つのHsp70分子に融合したpepII-Hsp70-pepIを発現するプラスミドを投与することで高いCTL活性が得られ、EG7腫瘍の増殖が顕著に抑制可能であった。

次に、上記の方法で必要な癌関連抗原の同定を不要とするシステムの開発を目的に、内因性癌抗原を利用した抗腫瘍免疫システムの開発を試みた。癌細胞内に存在する様々な抗原をAPCにデリバリーするために、単純ヘルペスウイルス由来VP22タンパク質の細胞透過ペプチド部分 (Δ VP22) を選択し、pHsp70- Δ VP22を発現するプラスミドを構築した。ここでHsp70は、分子内のペプチド結合ドメインで癌抗原ペプチドを捕捉するとともに細胞外ではAPCへのデリバリーの役割を、 Δ VP22はHsp70-ペプチド複合体を癌細胞外へ運び出す機能を担うものとして設計した。pHsp70- Δ VP22を腫瘍内投与したところ、高い抗腫瘍効果ならびに担癌マウスの生存日数の延長が認められた。

第3章 DNAワクチンからの抗原発現及び抗腫瘍免疫誘導に担癌状態が及ぼす影響の解明

DNAワクチンは非担癌動物に対しては顕著な抗腫瘍効果を誘導できるが、担癌動物ではその効果が大きく減弱することが問題とされる。担癌動物での免疫応答の抑制には抑制性細胞の関与が指摘されている。これに加えて、DNAワクチンの投与により新たに抗原を発現する細胞は抗原特異的免疫応答の標的細胞にもなりうることから、担癌・非担癌状態での抗原に対する免疫反応性の違いがDNAワクチンの抗腫瘍効果に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、担癌・非担癌マウスを用い、OVA発現プラスミドを繰り返し投与した時の遺伝子発現及びOVA特異的免疫応答について検討した。非担癌マウスへの繰り返し投与により、2回目以降の遺伝子発現が有意に低下すること、OVAに対する免疫応答が誘導されることが明らかとなった。EG7担癌マウスではDNAワクチン投与前にすでにOVAに対する免疫が誘導されており、これがpCMV-OVAの投与でより増強されることが示された。一方、投与部位での遺伝子発現は、癌細胞移植後比較的初期には、2回目に投与したOVA発現プラスミドからの遺伝子発現が有意に抑制されたが、腫瘍が増大した状態では1回目の投与と同程度の遺伝子発現が認められた。以上より、担癌動物ではDNAワクチン投与前に抗原特異的な免疫応

答が認められるものの、抗原発現細胞の排除作用を殆ど示さないことが明らかとなった。

以上、申請者は、DNAワクチンを利用した抗腫瘍免疫治療システムの開発を目的に、本システムの特徴について上記に示す3章にわたり様々な角度から検討した。その結果、Hsp70と抗原ペプチドとの融合タンパク質を発現するプラスミドベクターを皮内に投与する方法が、効率的な免疫誘導法になりうることを示すとともに、内因性の抗原を利用する新たなDNAワクチンの可能性も見出した。また、担癌状態において高い治療効果を得るためには、DNAワクチンからの遺伝子発現効率を増大する方法以外のアプローチの重要性を明らかにした。本研究で得られた知見は、DNAワクチンを利用した抗腫瘍免疫治療システムの開発に有益な基礎的情報を提供するものと考え

(論文審査の結果の要旨)

抗原特異的な免疫応答を誘導する免疫療法は、癌や感染症などの様々な難治性疾患に対する次世代型治療法として期待されている。抗原タンパク質を遺伝子の形で投与するDNAワクチン療法は、体液性免疫に加えて細胞性免疫をも誘導できることから、安全性・汎用性に優れるプラスミドDNAを利用する方法を利用した癌治療が期待されている。DNAワクチンによる抗腫瘍免疫治療では、抗原投与により誘導された細胞傷害性Tリンパ球（CTL）が、標的となる癌細胞を攻撃することが重要である。そのためには抗原提示細胞（APC）が抗原をペプチド断片に分解し、これをTリンパ球に提示する必要がある。しかしながら、癌治療に必要な高いレベルのCTL応答を誘導することは困難であり、十分な治療効果が得られていないのが現状である。その主な原因として、1) 抗原のAPCへの不十分な取り込み、2) APC内での抗原の利用率の低さ、3) APCのCTL誘導能の低さが挙げられる。そこで本研究では、有効な抗腫瘍免疫治療システムの開発を目的に、APCによる抗原取り込みならびに抗原提示を増大することによるDNAワクチン治療効果の増強を試みた。すなわち、モデル抗原として卵白アルブミン（OVA）を選択し、DNAワクチンの投与部位の選択、ならびに熱ショックタンパク質70（Hsp70）を利用した新規抗原デリバリーシステムの開発を試みた。最後に、非担癌マウスと担癌マウスにおけるDNAワクチン効果の相違の原因究明を試みた。

第1章 DNAワクチンの注射部位依存的免疫応答の誘導

一般に皮膚や筋肉がDNAワクチンの投与部位とされるが、二次リンパ器官として多数のリンパ球が存在する脾臓も有効な投与部位と考えられる。そこでDNAワクチンの投与部位としての脾臓の有用性についてOVAに対する免疫応答を指標に評価した。ルシフェラーゼ発現プラスミドを用いた検討から、脾臓での遺伝子発現は皮膚と比較して高いことが示された。これに反し、OVAを発現するpCMV-OVAプラスミドを投与したところ、皮膚投与群で高いCTL活性ならびに血中抗OVA IgG抗体価が得られた。また、OVA発現マウス胸腺細胞株EG7腫瘍の増殖も、皮膚投与により効果的に抑制された。以上から、脾臓はDNAワクチンの投与部位としては好ましくないことが示された。

第2章 熱ショックタンパク質70を基盤とするDNAワクチンシステムの開発による抗原デリバリーの最適化

近年、分子シャペロンとして知られるHsp70の免疫賦活化作用が注目されている。Hsp70を利用した癌免疫治療を目的に、Hsp70-抗原複合体の体内および細胞内動態を厳密に制御可能なDNAワクチンシステムを開発し、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。Hsp70を基盤とするタンパク質ワクチンの研究において、OVAのMHC class Iエピトープ（pepI）をHsp70に結合するだけでは十分な免疫応答が得られないこと、融合タンパク質を細胞質へ送り込む機能分子としてpolyhistidine（His）を組み込むことで初めて抗腫瘍免疫が増強可能であることが示され

ている。そこで、His-Hsp70-pepIを発現するプラスミドを構築し、His非融合型発現プラスミドと比較した。その結果、pHis-Hsp70-pepIを用いることで、樹状細胞上の抗原提示ならびにマウスにおける抗原特異的CTL誘導の増強が認められた。さらに強力なCTL活性の誘導には CTLに加えてCD4⁺ ヘルパーT細胞を同時に活性化することが重要と考えられる。そこで、pepIに加えてclass IIエピトープ (pepII) の利用を試みた。マウスを用いた検討の結果、Hsp70-pepIとpepII-Hsp70をそれぞれ発現する2種類のプラスミド、あるいは両方のエピトープを一つのHsp70分子に融合したpepII-Hsp70-pepIを発現するプラスミドを投与することで高いCTL活性が得られ、EG7腫瘍の増殖が顕著に抑制可能であった。

次に、上記の方法で必要な癌関連抗原の同定を不要とするシステムの開発を目的に、内因性癌抗原を利用した抗腫瘍免疫システムの開発を試みた。癌細胞内に存在する様々な抗原をAPCにデリバリーするために、単純ヘルペスウイルス由来VP22タンパク質の細胞透過ペプチド部分 (Δ VP22) を選択し、pHsp70- Δ VP22を発現するプラスミドを構築した。ここでHsp70は、分子内のペプチド結合ドメインで癌抗原ペプチドを捕捉するとともに細胞外ではAPCへのデリバリーの役割を、 Δ VP22はHsp70-ペプチド複合体を癌細胞外へ運び出す機能を担うものとして設計した。pHsp70- Δ VP22を腫瘍内投与したところ、高い抗腫瘍効果ならびに担癌マウスの生存日数の延長が認められた。

第3章 DNAワクチンからの抗原発現及び抗腫瘍免疫誘導に担癌状態が及ぼす影響の解明

DNAワクチンは非担癌動物に対しては顕著な抗腫瘍効果を誘導できるが、担癌動物ではその効果が大きく減弱することが問題とされる。担癌動物での免疫応答の抑制には抑制性細胞の関与が指摘されている。これに加えて、DNAワクチンの投与により新たに抗原を発現する細胞は抗原特異的免疫応答の標的細胞にもなりうることから、担癌・非担癌状態での抗原に対する免疫反応性の違いがDNAワクチンの抗腫瘍効果に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、担癌・非担癌マウスを用い、OVA発現プラスミドを繰り返し投与した時の遺伝子発現及びOVA特異的免疫応答について検討した。非担癌マウスへの繰り返し投与により、2回目以降の遺伝子発現が有意に低下すること、OVAに対する免疫応答が誘導されることが明らかとなった。EG7担癌マウスではDNAワクチン投与前にすでにOVAに対する免疫が誘導されており、これがpCMV-OVAの投与でより増強されることが示された。一方、投与部位での遺伝子発現は、癌細胞移植後比較的初期には、2回目に投与したOVA発現プラスミドからの遺伝子発現が有意に抑制されたが、腫瘍が増大した状態では1回目の投与と同程度の遺伝子発現が認められた。以上より、担癌動物ではDNAワクチン投与前に抗原特異的な免疫応答が認められるものの、抗原発現細胞の排除作用を殆ど示さないことが明らかとなった。

以上、申請者は、DNAワクチンを利用した抗腫瘍免疫治療システムの開発を目的に、本システムの特徴について上記に示す3章にわたり様々な角度から検討した。そ

の結果、Hsp70と抗原ペプチドとの融合タンパク質を発現するプラスミドベクターを皮内に投与する方法が、効率的な免疫誘導法になりうることを示すとともに、内因性の抗原を利用する新たなDNAワクチンの可能性も見出した。また、担癌状態において高い治療効果を得るためには、DNAワクチンからの遺伝子発現効率を増大する方法以外のアプローチの重要性を明らかにした。本研究で得られた知見は、DNAワクチンを利用した抗腫瘍免疫治療システムの開発に有益な基礎的情報を提供するものと考ええる。

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22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。

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