



Title	新規癌ワクチンのための抗原送達システム開発に関する研究
Author(s)	林, 哲
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43365
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	はやし 林 哲
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 9 6 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	新規癌ワクチンのための抗原送達システム開発に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 真弓 忠範 (副査) 教 授 山元 弘 教 授 馬場 明道 教 授 松田 敏夫

論 文 内 容 の 要 旨

近年、癌抗原ペプチドを免疫することで癌細胞特異的な細胞傷害性T細胞（CTL）を誘導し、癌を治療しようとする癌ペプチドワクチン療法が注目を集めている。CTLが癌細胞排除の中核をなすエフェクター細胞であることから、効果的な癌抗原特異的 CTL さえ誘導できれば癌治療が可能となると考えられている。しかしながら、癌ペプチド免疫により CTL を確実に誘導できる方法が存在しないために、明確な抗腫瘍効果が得られていないのが現状である。

単に抗原ペプチドを投与したのでは、CTL の誘導は極めて難しい。CTL は、B 細胞や抗体のように可溶性抗原を直接認識できず、抗原提示細胞の細胞膜上で MHC class I 分子と複合体を形成した抗原ペプチドを T 細胞レセプターにより認識する。一般にこの抗原ペプチドは、細胞質内に存在するタンパク質（内在性抗原）に由来している。内在性抗原は、細胞質内に存在する巨大な多機能性プロテアーゼ、プロテアソームによって断片化された後、transporter associated with antigen processing (TAP) を介して小胞体に輸送され、新たに合成された MHC class I 分子と小胞体内で複合体を形成した後、ゴルジを経由したエキソサイトーシスにより細胞膜上に提示される。これに対して、ワクチンとして投与する癌抗原ペプチドは細胞外に存在する外来性抗原であるため MHC class I 提示されず、したがって CTL に認識されない。この理由のために、癌ワクチンを創製していくためには、抗原ペプチドをいかに MHC class I 分子を介して提示させるか、言い換えるなら、いかに抗原を MHC class I 抗原提示経路に送達するかという「抗原送達」を実現可能にすることが枢要となる。しかしこの研究分野に対する認知度は低く、いくつかの報告があるものの、十分な研究成果を挙げるには至っていない。

そこで本研究では、効果的な CTL 誘導を達成できる癌ペプチドワクチン療法の開発を目指して、DDS (Drug delivery system; 薬物送達システム) の観点から、MHC class I 抗原提示経路への抗原送達システムの構築を試みた。前述の通り、CTL が認識するのは、細胞膜表面で MHC class I 分子と複合体を形成したペプチドのみであることから、癌抗原ペプチドを積極的に MHC class I 提示させることが可能なシステムによって、効率的な CTL 誘導を達成できるものと期待できる。具体的には、まず第 1 段階として MHC class I 分子を介して抗原提示される抗原ペプチドは一般に細胞質内に存在する内在性抗原由来であることから、当研究室で開発した細胞質内への導入キャリアである膜融合リポソーム (fusogenic liposome; FL) を用いて抗原を細胞質内に導入し、外来性抗原を内在性抗原として提示させるシステムを開発した。FL は、リポソームにセンダイウイルスの細胞膜融合能を付与したキャリアであ

り、細胞膜と速やかに融合することで、*in vitro*、*in vivo*双方において遺伝子、タンパク質などリポソーム内に封入した物質を、細胞に傷害を与えることなく効率的に細胞質内に直接導入することが可能である。抗原ペプチドを FL に封入することにより、外来性の抗原ペプチドを細胞質内へ導入し、細胞の抗原処理機構により内在性抗原として認識させ、同様のプロセッシングを経て MHC class I 提示させられると予想された。

そこでまず、FL を用いて外来性抗原を内在性抗原と同じ MHC class I 提示経路へ送達可能か検討した。その結果、FL を用いてエンドサイトーシス非依存的に細胞質内に導入された外来性抗原は、効率良く MHC class I 提示される事が明らかとなり、その提示経路は内在性抗原と同様であった。FL が *in vitro*、*in vivo* 双方で細胞質内への物質導入が可能であることから、FL の MHC class I 提示経路への効率的な抗原送達は、*in vivo* においても可能であると示唆され、抗原が効率良く MHC class I 提示された結果、CTL の誘導が可能になると考えられる。そこで Ovalbumin 由来ペプチドをモデル抗原に用い、これを封入した FL を免疫した C57BL/6 マウスにおける CTL 誘導を評価した。その結果、FL 使用群は現時点で最強の免疫アジュバントと言われるフロイントの完全アジュバント (CFA) と同等以上の抗原特異的 CTL 誘導が確認された。抗腫瘍免疫システムにおいて CTL が主要なエフェクター細胞であることを考えると、FL の優れた CTL 誘導能はそのまま優れた抗腫瘍ワクチン効果誘導能に繋がると考えられる。そこで次に SL8 ペプチド封入 FL を免疫した C57BL/6 マウスに、モデル腫瘍を移植し腫瘍径を経日的に測定することで抗腫瘍ワクチン効果誘導能について検討した。その結果、CFA を用いて免疫した群においてもわずかに増殖抑制が観察されるに留まったのに対し、SL8 ペプチド封入 FL 免疫群では13例全例において腫瘍の生着は見られず、著しい抗腫瘍ワクチン効果が示された。

以上のことから FL を用いて外来性抗原を細胞内に効率よく導入して、MHC class I 提示経路に送達することにより効果的な CTL 誘導が可能であること、またそれに伴う抗腫瘍効果誘導も可能であることが示された。

さらに第2段階として、MHC class I 分子と抗原ペプチドの複合体生成の場である小胞体への積極的な抗原送達をアデノウイルス由来の小胞体挿入配列 (endoplasmic reticulum insertion sequences ; Eris) を抗原ペプチドの N 末側に付加することで可能とし、MHC class I 提示経路への抗原送達の更なる効率化を試みた。

Eris を含む抗原ペプチドは、TAP を介さずに効率良く細胞質から小胞体内に移行し、MHC class I 提示されることが報告されている。しかしこの抗原ペプチドは細胞外から細胞質に移行できないため、このままでは MHC class I 提示されず、CTL に認識されることもない。このような理由から実用化に向けた検討は全くなされていない。FL に封入することにより、細胞質内から小胞体内への移行に小胞体挿入配列を用いて、積極的に MHC class I 提示させるための抗原ペプチド送達システムの構築を試行した。

まず TAP 非依存的に効率良く MHC class I 提示されるか TAP 欠損 RMAS 細胞を用いて検討した。その結果、Eris を含むペプチドは FL に封入して細胞質内へ導入することで TAP 非依存的に MHC class I 提示されるばかりでなく、Eris を含まないペプチドの場合と比較して顕著に長期にわたって MHC class I 提示が促進される事を明らかにした。更に Eris を含むペプチドを封入した FL を免疫すると、Eris を含まないペプチドを封入した FL を免疫した場合と比較して顕著に高い CTL 誘導が確認された。またその際の抗腫瘍ワクチン効果誘導能について検討した結果、Eris を含むペプチドを封入した FL を免疫しても抗腫瘍効果が不完全な条件においても Eris を含むペプチドを封入した FL 群では全例において腫瘍の生着が見られず、著しい抗腫瘍ワクチン効果が示された。

以上の様に、外来性抗原ペプチドを細胞質内へ直接送達可能な FL と、小胞体への移行を促進する小胞体挿入配列を組み合わせた本システムによって、極めて効率的な MHC class I 提示と、*in vivo* における効果的な CTL 誘導、抗腫瘍効果誘導が可能になることが示された。このシステムの応用により、抗原性の低い癌抗原を用いた場合であっても効果的なワクチン開発が可能になるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

現在までに多くの CTL 認識ヒト腫瘍抗原が同定され、癌抗原の免疫により癌細胞特異的免疫誘導を目指す癌ワクチン療法が注目を浴び、我が国でも複数の機関で第1相試験が進みつつある。しかしながら、今なお明確な抗腫瘍効

果が得られていないのが現状である。その原因として、同定された抗原を投与しても CTL の誘導ができない事が挙げられる。さて、CTL は癌細胞排除に携わる癌免疫の中心的なエフェクター細胞である。しかし単に抗原を投与したのでは、CTL の誘導は極めて難しい。CTL は抗原提示細胞の細胞膜上で MHC class I 分子と複合体を形成した抗原ペプチドを T 細胞レセプターにより認識する。一般にこの抗原ペプチドは、細胞質内に存在する内在性タンパク質に由来している。しかし、ワクチンとして投与する抗原は細胞外に存在する外来性抗原であるため MHC class I 提示されず、CTL がこれを認識できないことが、CTL 誘導を困難にしている。この理由のために、癌ワクチンを創製していくためには、いかに抗原を MHC class I 抗原提示経路に送達させるかという「抗原送達」を実現可能にすることが枢要となる。そこで著者は、効果的な CTL 誘導を達成できる癌ワクチン療法の開発を目指して、MHC class I 抗原提示経路への抗原送達システムの構築を試みた。その結果、以下の成果が得られた。

- 1) 膜融合リボソーム (FL) を抗原送達キャリアとして用いることにより、エンドサイトーシス非依存的に外来性抗原を効率良く MHC class I 提示経路へ送達できる。
- 2) 外来性抗原を封入した FL を用いて直接免疫すると、極めて効果的な CTL と抗腫瘍ワクチン効果を誘導することが可能である。
- 3) N 端側に小胞体挿入配列を付加した抗原を FL を用いて細胞質内へ直接導入することにより、TAP 非依存的な MHC class I 抗原提示を著しく効率的に実現できる。
- 4) 小胞体挿入配列付加抗原と FL を組み合わせた本システムは、効率的かつ効果的な CTL 誘導と抗腫瘍ワクチン効果を発揮する。

以上、積極的な MHC class I 提示経路への抗原送達は、CTL 誘導が必須の癌ワクチン開発に新たな視点を提示し、具体的な新規技術を提供している点、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。