The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

【10】

氏　　名	林（はやし）　哲（あきら）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　16963　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MHCclass 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とした。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）膜融合リポソーム（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。