



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Integration of Dendritic Cells and Adenoviral Vectors for Tumor Immunotherapy                                                                                                                                                                                                       |
| Author(s)    | 治井, 愛莉                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Citation     | 大阪大学, 2006, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/46530">https://hdl.handle.net/11094/46530</a>                                                                                                                                                                                                 |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について <a>&lt;/a&gt;</a> 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           | はる い あい り<br>治 井 愛 莉                                                                                                |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (薬 学)                                                                                                           |
| 学 位 記 番 号     | 第 20546 号                                                                                                           |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 18 年 3 月 24 日                                                                                                    |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                                                                                    |
| 学 位 論 文 名     | Integration of Dendritic Cells and Adenoviral Vectors for Tumor Immunotherapy<br>(腫瘍免疫治療への樹状細胞とアデノウイルスベクターの組み合わせ応用) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 山 元 弘<br><br>(副査)<br>教 授 八 木 清 仁    教 授 前 田 正 知    教 授 中 川 晋 作                                          |

### 論 文 内 容 の 要 旨

樹状細胞 (DC) は強力な抗原提示細胞であり、獲得免疫と自然免疫の両方を制御し、T 細胞の活性化を中心とする抗原特異的免疫応答を誘導する重要な役割を果たしている。近年、これらの特性を利用して、DC を用いて癌抗原などに対する抗原特異的免疫反応を誘導する研究が精力的にされてきた。しかしながら、DC は極めて希少な細胞であり、癌患者の体内ではさらに減少し、その機能が阻害されていることが知られている。すなわち、効率的に抗原特異的免疫応答を誘導するためには、DC を分化・誘導し、成熟させた上、目的抗原の取り込み能や抗原提示能を向上させる必要がある。今回、学位申請者は、抗原特異的免疫応答の誘導を目的に、まず DC の分化・誘導と機能向上に着目した。マウスモデルで GM-CSF/IL-4 を用いて *in vivo* でマウス骨髄前駆細胞から DC を分化・誘導し、得られた DC の機能について詳細な分析を行った。さらに、DC への抗原導入に着目し、効果的に抗原遺伝子を導入するアデノウイルスベクター (AdV) を起用した。その際の問題点に取り込み、抗原遺伝子の導入効率と発現能の高い AdV の応用を検討し、遺伝子導入した DC が誘導する特異的免疫反応を詳しく検出した。

DC の分化・誘導にさまざまなサイトカインや成長因子が使われてきたが、*in vitro* では GM-CSF と IL-4 の組み合わせがもっとも効果的である。これまで、*ex vivo* で DC を分化・誘導するアプローチが研究されてきたが、DC の全先駆体に働きかけ、分化・誘導した DC を *in situ* で活性化するために、本論文では、初めて *in vivo* で GM-CSF/IL-4 の持続投与によって DC の分化・誘導を試みた。その結果、脾臓とリンパ節において、ミエロイド系とリンパ系 DC の両方の細胞数が増加し、割合が増大した。そして、MHC クラス I と MHC クラス II 分子の発現が上昇し、抗原取り込み能と提示能が向上した。また、GM-CSF/IL-4 を持続投与するのみでは、抗腫瘍効果が得られなかったが、腫瘍抗原を持つ遺伝子を、ワクチンとして AdV で導入すると、抗原特異的抗腫瘍免疫が観察された。

次に、DC への効率的な抗原導入に着目した。DC への抗原導入は、抗原ペプチド、抗原蛋白あるいは抗原遺伝子を持つウイルスベクターを用いるなどさまざまな方法が報告されてきたが、AdV による抗原遺伝子の導入がもっとも効果的な方法の一つである。しかしながら、第一世代 AdV は抗ウイルス反応を誘導するなどの問題点がある。すなわち、抗ウイルス反応を避けるために、少量で十分な抗原発現を果たす AdV の応用が必要である。本研究では、まず、高い抗原発現を示すヘルパー依存型 AdV (HD-AdV) の DC への応用を検討した。HD-AdV が第一世代のベクターに比べて、より高いレベルで抗原を発現し、効果的に抗原特異的抗体と CTL 活性を誘導できた。また、ワクチン

としてマウスに投与した時、腫瘍の成長を顕著に抑制することが観察できた。HD-AdV は効率よく DC で抗原遺伝子を高いレベルで発現したが、遺伝子導入率が第一世代の AdV と変わらなかった。そのため、遺伝子導入率を上げるために、DC をターゲットした AdV の応用を検討した。DC は、他の細胞や組織に比べて、AdV による感染率が極めて低いため、大量のベクターが必要である。そのため、DC をターゲットした方法がいくつか報告されてきた。一方、GM-CSF/IL-4 で DC を分化・誘導すると、AdV の受容体である  $\alpha$ V インテグリン陽性の DC が増加する結果が得られたため、本研究では  $\alpha$ V インテグリンをターゲットした RGD-AdV の DC への応用を検討した。その結果、従来のベクターに比べて、RGD-AdV がより効率よく DC に遺伝子を導入した。また、Adoptive Transfer Model を用いて、OVA 遺伝子を導入された DC の OVA 特異的 T 細胞の活性化を検討したところ、従来のベクターに比べて、RGD-AdV がより効率よく、OVA 特異的 T 細胞の増殖と IFN- $\gamma$  の産生を促進した。

本研究の結果により、GM-CSF/IL-4 の *in vivo* 持続的投与が機能的な DC の分化・誘導に新しいアプローチを与えることができた。また、より効果的に、抗原特異的免疫反応を誘導するために、GM-CSF/IL-4 で分化・誘導した機能的な DC に、抗原導入を導入する必要があることがわかった。さらに、第一世代の AdV に比べ、HD-AdV がより高いレベルで導入遺伝子の発現をもたらし、より効果的に、腫瘍特異的免疫を誘導することがわかった。また、インテグリンをターゲットした RGD-AdV を用いることによって、高い遺伝子導入率を得ることができ、抗原特異的免疫反応を誘導することを *in vivo* で証明することができた。これらの結果は、HD-AdV と RGD-AdV の両ベクターを組み合わせた RGD-HD-AdV を用いて、GM-CSF/IL-4 の投与と組み合わせることによって、高いレベルの抗原遺伝子導入率と発現を同時に得られ、より効率的に抗原特異的免疫反応を誘導する可能性を示唆した。本研究により得られた知見は DC による遺伝子治療に新たなアプローチを与えたと推察される。

#### 論文審査の結果の要旨

樹状細胞 (DC) は強力な抗原提示細胞であり、獲得免疫と自然免疫の両方を制御し、T 細胞の活性化を中心とする抗原特異的免疫応答を誘導する重要な役割を果たしている。近年、これらの特性を利用して、DC を用いて腫瘍抗原などに対する抗原特異的免疫反応を誘導する研究が精力的にされてきた。しかしながら、DC は極めて希少な細胞であり、癌患者の体内ではさらに減少し、その機能が阻害されていることが知られている。DC の数を増やし、DC に腫瘍抗原をうまく発現させることができれば、有効な治療法の開発が期待できる。

そこで本学位申請者は、マウスに持続的に GM-CSF と IL-4 を投与することで、脾臓とリンパ節にミエロイド系とリンパ系系の両方の DC 細胞数を増加させることに成功した。またこうして得た DC は、MHC クラス I、クラス II いずれの発現も上昇し、また抗原取り込み能と提示能が向上していることを明らかにした。

次に、DC への効率的な抗原導入法を検討した。第一世代アデノウイルス (AdV) は有用ではあるが、抗ウイルス抗体の産生能が高く、臨床応用にはふさわしくない。そこで高い抗原発現を示すヘルパー依存型 AdV (HD-AdV) の DC への応用を検討したところ、効果的にモデル抗原特異的抗体とキラー T 細胞 (CTL) 活性が誘導できた。また HD-AdV にモデル抗原遺伝子を組み込んだ後ワクチンとしてマウスに投与した時、腫瘍の成長を顕著に抑制することが観察できた。しかし遺伝子導入効率は決して第一世代 AdV より優れてはおらず、更なる工夫が必要であった。

そこで AdV 受容体である  $\alpha$ V インテグリンをターゲットした RGD-AdV の DC への応用を検討した。その結果、従来のベクターに比べて、RGD-AdV がより効率よく DC に遺伝子を導入できた。また、Adoptive Transfer Model を用いて、モデル腫瘍抗原遺伝子を導入した DC の抗原特異的 T 細胞の活性化を検討したところ、従来のベクターに比べて、RGD-AdV がより効率よく、抗原特異的 T 細胞の増殖と IFN- $\gamma$  の産生を促進した。

以上本研究は、抗腫瘍免疫応答能を強化する新しい手法を組み立てた。本研究は博士 (薬学) の学位を授与するにふさわしいものと判断した。