The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Cell Delivery Systemの概念を導入した免疫細胞医薬の創製とその癌免疫療法への応用に関する研究 |
| Author(s) | 金川, 尚子 |
| Citation | 大阪大学, 2009, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/49655 |
| 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">大阪大学の博士論文について</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

【11】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 金　川　尚　子（かながわ なおこ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（薬　学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　２２８８０　号 |
| 学位授与年月日 | 平成21年３月24日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第４条第１項該当<br>薬学研究科応用医療薬科学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | **Cell Delivery Systemの概念を導入した免疫細胞医薬の創製とその癌免疫療法への応用に関する研究** |
| 論　文　審　査　委　員 | （主査）<br>教　授　中川　晋作<br>（副査）<br>教　授　馬場　明道　　教　授　八木　清仁　　教　授　水口　裕之 |

## 論　文　内　容　の　要　旨

生体には、癌細胞を認識して排除するという腫瘍免疫が備わっている。近年、この機構を利用した癌免疫療法が次世代の癌治療戦略として期待され様々なアプローチが開発されてきたが、臨床研究においてはいまだ満足な治療成績を報告した例が少ないのが現状である。そこで、腫瘍免疫誘導に必須の免疫細胞を機能発揮の場へと効率よく送達可能な体内動態制御法の確立が、癌免疫療法の有効性改善に有用なのではないかと考えた。この方法論は、従来の薬物療法の最適化を目指した「医薬品を必要なときに、必要な場所へ、必要な量」送達させる”Drug Delivery System”を基盤としている。薬学的観点から癌免疫療法を眺めてみると、免疫細胞はまさに治療効果を規定する医薬品と捉えられ、それら免疫学的機能が薬理作用を示すことになる。つまり申請者は、癌免疫療法においても医薬品（免疫細胞）の体内動態を制御した上で、その薬理作用（免疫学的機能）を効果的に発揮させるという“Cell Delivery System”とも言うべき概念を取り入れた治療戦略が重要であると考えた。

実質的な癌細胞排除を担うエフェクター細胞は、細胞傷害性T細胞（CTL）である。これまでに、ワクチン療法やサイトカイン療法などCTLを活性化する手法が報告されてきたが、癌細胞特異的なCTLがたとえ患者体内に誘導されたとしても、それらが十分に腫瘍組織に移行して癌細胞と接触できなければ、癌免疫療法の有効性は大きく制限されてしまう。そこで第一に、CTLをその活躍の場である腫瘍組織へと動員した上で活性化させるという治療プロトコルを考案した。通常、リンパ球の体内動態は、組織から分泌されるケモカインとリンパ球上に発現するケモカインレセプターによって制御されていることから、T細胞に対する遊走活性に優れたCCL27を腫瘍組織に高発現させれば、CTLの腫瘍集積性が向上するのではないかと考えた。そこで、このCCL27と細胞性免疫の強力な誘導因子であるIL-12とを腫瘍内に共導入したところ、癌細胞特異的なCTLの腫瘍内動員とその活性化とが相乗的に作用した強力な抗腫瘍効果を得ることに成功した。また癌免疫療法には、体外で増幅・活性化された癌細胞特異的なCTLを再び体内へと移入する癌養子免疫療法も考案されている。この癌養子免疫療法においても、移入CTLの腫瘍集積性の乏しさが克服すべき課題であることから、前述のケモカインシステムの利用が有効なのではないかと考えた。そこで、活性化されたCTL上に高発現するケモカインレセプターに対応するケモカインを腫瘍内に導入したところ、移入CTLの腫瘍集積性は向上し、それに伴って抗腫瘍効果が増強することを確認した。したがって、腫瘍環境にケモカイン遺伝子を導入して癌細胞特異的なCTLを腫瘍組織へ動員するという“Cell Delivery System”の概念に基づいた方法論が、従来までの癌免疫療法をより有効な治療戦略として改良・再生しうる革新的な基盤技術であることを明らかとした。

ケモカインシステムを利用した上記の治療戦略は、腫瘍内投与が可能な原発巣に対して有効であると考えられるが、癌免疫療法には転移巣を有する症例に適用できるアプローチも望まれる。そこで第二に、腫瘍環境に左右されないCTLの新

たな体内動態制御技術として、一本鎖抗体発現システムを利用したCTLの腫瘍ターゲティング療法を考案した。腫瘍組織における血管新生は、腫瘍の成長に必須であり様々な癌種に共通する生命現象であることから、汎用性の観点から標的分子には腫瘍新生血管内皮細胞に高発現するflk1分子を選択した。遺伝子工学的にflk1分子に対する一本鎖抗体をCTLに提示させたところ、CTLの腫瘍集積性の向上とそれに伴う治療効果の増強が認められたことから、一本鎖抗体がCTLに対して有用なターゲティング素子になることを見出した。この研究成果を応用して、CTLが腫瘍組織に効率よく集積するのみならず腫瘍血管内皮細胞を傷害することができれば、従来までの癌養子免疫療法がより有効性・汎用性に優れた治療戦略になるものと期待される。そこで、flk1分子に対する一本鎖抗体と殺細胞シグナルの発生に必須の領域を融合させたキメラレセプター（cTCR）が、CTLにおいてflk1発現細胞を認識できる新たな抗原レセプターとして働くのかを検討した。その結果、cTCRを発現させたCTLは、確かに腫瘍組織に効率よく集積するとともに腫瘍血管を認識・傷害し、癌養子免疫療法の適用範囲を拡大することが明らかとなった。さらに、癌細胞特異的な内因性のT細胞レセプター（TCR）と腫瘍血管特異的なcTCRを共発現するCTLは、癌免疫療法の課題である癌細胞とCTLとの接触効率を自ら改善し、治療効果を増強するのではないかと考えた。そこで、このCTLの癌養子免疫療法における有用性を検証したところ、cTCRのみを発現するCTLよりも強力な抗腫瘍効果を発揮し、腫瘍の完全退縮をも可能とした。本結果は、CTLが腫瘍血管に効率よく集積した上で、その腫瘍血管を傷害して腫瘍の退縮を誘導するとともに多くの癌細胞を殺傷するという、段階的な作用に基づいた新たな方法論が有効な治療戦略になりうることを実証するものである。

癌免疫療法には、これらCTLの腫瘍組織への動員を達成する治療戦略に加え、腫瘍免疫の成立に欠かせない樹状細胞（DC）に対しても"Cell Delivery System"を適用することが有用なのではないかと考えた。これまでに、申請者らの研究グループでは、T細胞に抗原提示が行なわれる所属リンパ節へと、効率よくDCを送達させる方法論の構築に成功している。したがって、このDCの体内動態制御技術に加え、抗原提示能を増強させる技術をも確立することができれば、DCの所属リンパ節における利用率が上昇し、免疫学的機能に優れたDCの創製が可能になるものと考えられる。そこで、免疫機能分子として報告されているTNF-α、4-1BBL、LIGHT分子を遺伝子工学的にDCに発現させたところ、いずれのDCも腫瘍免疫を効率よく成立させ、強力なCTL誘導能を有することを見出した。このような免疫学的機能を増強させたDCと、前述したようなCTLの体内動態制御技術とを併用した方法論は、エフェクター機能と腫瘍免疫誘導の両面から増強できる新しい治療戦略を提唱するものと考えられる。

以上、本博士論文においては、遺伝子工学的手法を駆使したDCやCTLに対するCell Delivery Systemの適用が、癌免疫療法の実用化に向けて有効な治療戦略であることを実証した。さらに、"Cell Delivery System"という全く新しい概念を癌免疫療法研究に導入することで、体内動態制御技術と機能増強技術とを融合させた新たな研究分野が開拓されるものと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

癌免疫療法におけるエフェクター細胞はまさに治療効果を規定する細胞医薬である。従って癌免疫療法の有効性を改善するためには、医薬品を「必要な時に、必要な場所に、必要な量」送達する"Drug Delivery System"の概念に基づいた"Cell Delivery System"とも言うべき新規方法論の開発が望まれる。すなわち、免疫エフェクター細胞を標的部位である腫瘍組織に積極的に送達する"Cell Delivery System"を構築することができれば、従来の癌免疫療法（ワクチン療法・サイトカイン療法・養子免疫療法等）をより有効な治療戦略として改良・再生しうる革新的な基盤技術になるものと期待される。本研究では、遺伝子導入技術を駆使することによって免疫細胞の体内動態制御の実現を図るとともに、癌免疫療法に"Cell Delivery System"を導入することの意義と有用性について検証し、以下の結論を得た。

1. 細胞遊走因子であるケモカイン遺伝子と免疫活性化因子であるサイトカイン遺伝子の腫瘍内導入が、エフェクター細胞の活性化と腫瘍内動員の同時増強に基づいた強力な抗腫瘍効果を誘導することを実証した。
2. IL-12 遺伝子とCCL27 遺伝子の腫瘍内併用投与は、IL-12 遺伝子に起因する副作用を軽減可能であることを明らかにした。
3. ケモカイン-ケモカインレセプター連関は、移入したCTL の腫瘍集積性の向上に基づく癌養子免疫療法の有効性改善に有用であることを見出した。
4. 腫瘍血管を標的としたCTL が、腫瘍集積性の向上に基づく癌養子免疫療法の有効性改善に有用な免疫細胞医薬であることを見出した。
5. 一本鎖抗体に殺細胞シグナルを伝達する領域を融合させたキメラ構造体が、抗原レセプターとして機能することを実証し、CTL への腫瘍血管傷害性の付与に成功した。
6. 腫瘍血管に効率よく集積したCTL が、その腫瘍血管を傷害して腫瘍組織の退縮を誘導した上で、癌細胞を効率よく殺傷するという、新たな作用機序に基づく癌治療戦略の有用性を明らかにした。
7. 遺伝子工学的手法を用いてDC に免疫機能分子を発現させることが、DC の抗原感作能力を著しく増強できることを実証した。
8. TNFR1 指向性TNFαおよびLIGHT 分子を発現させたDC が、腫瘍免疫の成立に必須の免疫イベントの促進を可能とする有用な免疫DC 医薬であることを見出した。

以上、本研究では細胞を医薬品として捉え、細胞医薬を標的部位へと送達させる"Cell Delivery System"とも言うべきコンセプトを提唱し、サイトカイン・ケモカイン発現システムまたは一本鎖抗体発現システムを適用することで、免疫細胞医薬の体内動態制御・機能制御を可能とする基盤テクノロジーを構築した。本方法論は、免疫細胞医薬を用いた癌免疫療法にとどまらず、移植療法、また近年注目されるiPS細胞や組織幹細胞を用いた再生療法にまで展開できるものであり、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものと考える。