The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	CD63-Mediated Antigen Delivery into Extracellular Vesicles via DNA Vaccination Results in Robust CD8+ T Cell Responses
Author(s)	神沼, 智裕
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/67080
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　神沼　智裕

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	石井 健
	副　査	大阪大学教授	塩井俊宏
	副　査	大阪大学教授	熊ノ郷 淳

論文審査の結果の要旨

DNAワクチンは液性免疫のみならず、細胞性免疫応答、特に細胞傷害性T細胞を強く誘導出来る事から、感染症の予防ワクチンやがん治療ワクチンへの応用を期待され、世界中で開発研究が行われている。ヒトにおいては、免疫原性が弱く臨床試験において期待された効果が得られていないため、実用化に至っていない。この課題を克服するための方法の一つとして、細胞外小胞の細胞間コミュニケーション機能に注目し、細胞外小胞への抗原の送達を試みたDNAワクチンの免疫原性の増強について申請者は研究を行った。

申請者は本研究において、DNAワクチンにおいて抗原を細胞外小胞に搭載させることで、抗原特異的CD8 T細胞を強く誘導できることを明らかにした。この研究結果は、抗原を発現している細胞外小胞が細胞傷害性T細胞の誘導能を有しており、新しい細胞療法への応用が可能である事を示唆する。

以上の理由から申請者　神沼智裕氏は博士（医学）の学位に値するものと認める。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	神沼　智裕
論文題名 Title	CD63-Mediated Antigen Delivery into Extracellular Vesicles via DNA Vaccination Results in Robust CD8$^+$ T Cell Responses （細胞外小胞を介したDNAワクチン効果は、抗原特異的な強いCD8$^+$T細胞応答を示す）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

DNAワクチンは液性免疫のみならず、細胞性免疫応答、特に細胞傷害性T細胞を強く誘導出来る事から、感染症の予防ワクチンやがん治療ワクチンへの応用を期待され、世界中で開発研究が行われている。動物用ワクチンとしては既に認可され使用されているが、ヒトにおいては、免疫原性が弱く臨床試験において期待された効果が得られていないため、実用化に至っていない。この課題を克服するための方法として、プライム-ブースト法、エレクトロポレーション法、ジェネティックアジュバントが研究されている。さらには、DNAワクチンの効果および特異性を高める一つの手段として、抗原やDNAワクチンのデリバリー技術も研究されており、低い免疫原性の改善に貢献している。

近年、エクソソームやマイクロベシクルなどといった細胞外小胞の細胞間コミュニケーション機能が注目され、抗原デリバリーシステムへの応用が試みられており、実際に、DNAワクチンへの応用も報告されている。細胞外小胞は直径40-100 nmの小胞で、細胞外小胞の表面マーカーの一つとしてテトラスパニンファミリータンパク質が知られている。そこで本研究では、テトラスパニンファミリーであるCD63を用いた細胞外小胞への抗原の送達を試み、DNAワクチンの免疫原性の増強について研究を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

抗原を細胞外小胞へと発現させるためにモデル抗原である卵白アルブミン（OVA）にCD63を融合させたプラスミドDNA（pCD63-OVA）を作製した。培養細胞において、OVAとCD63の融合タンパク質（CD63-OVAタンパク質）は、細胞分画のみならず細胞外小胞分画にも発現していたことから、CD63は細胞外小胞への抗原送達におけるドラッグデリバリーシステムとして機能する可能性が示唆された。培養細胞から細胞外小胞を精製し、CD63-OVAタンパク質を搭載した細胞外小胞をマウスに免疫したところ、OVA特異的な細胞傷害性T細胞の数は、OVAタンパク質を搭載した細胞外小胞を投与した群と比較して、CD63-OVA 免疫群で有意に増強していることが確認された。次に、pCD63-OVAを筋注エレクトロポレーション法によりマウスに投与した結果、OVAのみを発現するDNAワクチン免疫群と比較して、強い細胞傷害性T細胞の誘導が確認された。また、この強い細胞傷害性T細胞の誘導は、単に膜への局在だけではなく、抗原を細胞外小胞にターゲットした結果得られたものである事が、小胞体の膜タンパクであるカルネキシンとOVA抗原を発現するDNAワクチンの実験結果から明らかとなった。さらに、このpCD63-OVA DNAワクチンのがんの予防効果と治療効果に関して検討を行った。pCD63-OVA DNAワクチン投与後、OVAタンパク質を発現しているマウスの胸腺種であるE.G-7腫瘍細胞をマウス皮下に移植したところ、腫瘍増殖はpOVA DNAワクチン投与群と比較して有意に腫瘍増殖抑制効果が認めたれた。また、E.G-7腫瘍細胞をマウス皮下に移植し、その後DNAワクチンの接種を行った。その結果、コントロール群と比べて、pCD63-OVA DNAワクチンを接種した群では、腫瘍増殖を強く抑制することが確認された。

〔総　括(Conclusion)〕

DNAワクチンにおいて抗原を細胞外小胞に搭載させることで、抗原特異的CD8 T細胞を強く誘導できる、新しいDNAワクチンとしての可能性を示唆された。これらの結果は、抗原を発現している細胞外小胞が細胞傷害性T細胞の誘導能を有しており、新しい細胞療法への応用が可能である事を示唆している。

DNAワクチンは液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導するメリットがある一方で、アミノ酸配列が既知の抗原しか搭載できず、標的抗原が分かっていない疾患には応用できないデメリットがある。近年、がん免疫療法において、がんにのみ特異的に発現する変異抗原（ネオアンチゲン）が近年注目を浴びている。このネオアンチゲンはがん患者個人ごとに同定される抗原で、この抗原遺伝子配列をDNAワクチンとして使用することで、DNAワクチンのデメリットをメリットにすることが期待される。この研究成果を応用し、細胞外小胞にネオアンチゲンを搭載することで、ネオアンチゲン特異的な細胞傷害性T細胞を強く誘導することができれば、有効ながんDNAワクチン開発につながると考えている。