

学 位 論 文 題 名

Liposome-Encapsulated CpG Oligodeoxynucleotides as a Potent Adjuvant for Inducing Type 1 Innate Immunity

(リポソーム封入 cytosine-phosphorothioate-guanine (CpG) による
1 型自然免疫の誘導に関する検討)

学位論文内容の要旨

背景と目的

癌の免疫療法において自然免疫と獲得性免疫はともに重要な役割を担っており、抗原提示細胞、特に樹状細胞は自然免疫と獲得性免疫の橋渡しに重要な役割を果たしている。獲得性免疫では interferon (IFN)- γ 産生性 helper T lymphocyte type 1 (Th1)、cytotoxic T lymphocyte type 1 (Tc1) 細胞が高い抗腫瘍活性を有することが知られ、担癌状態で腫瘍特異的 Th1、Tc1 主導免疫を確立することがより効果的な治療につながると期待される。また、最近、interleukin (IL)-12 や IFN- γ を産生する dendritic cell (DC、樹状細胞)、natural killer (NK) 細胞、natural killer T (NKT) 細胞などの自然免疫系も 1 型免疫を制御することが知られるようになったが、そのメカニズムは明かではない。そこで本研究では、Th1 反応を誘導し、NK 活性も増強する非メチル化 CpG をリポソームで封入した CpG-liposome を用いて DC、NK・NKT 細胞等の自然エフェクター細胞の活性化とそのメカニズムについて解析し、これらの細胞群が 1 型自然免疫を誘導することをマウスモデルにて検討を行った。さらには、仮想腫瘍抗原を CpG-liposome に共に封入することによって抗原特異的な cytotoxic T lymphocyte (CTL、細胞傷害性 T 細胞) の誘導および抗腫瘍活性についても検討した。

方 法

CpG と liposome を用いて CpG-liposome を作成し、C57BL/6 マウスに静注後に脾細胞を採取することにより DC の IL-12 産生、NK・NKT 細胞からの IFN- γ 産生をフローサイトメトリーにて評価した。また、NKT 細胞を特異的に活性化させる α -galactosylseramide (α -Galcel) を投与、または CpG-liposome 投与マウスに抗 IL-12 抗体を投与し NK・NKT 細胞のサイトカイン産生を比較した。次に、生食または CpG-liposome を静注したマウスより脾細胞を採取した後に DC と NK1.1⁺細胞を分離して in vitro で抗 IL-12 抗体を添加して共培養または DC と NK1.1⁺細胞を transwell で共培養することによって IFN- γ の産生を共培養後の上清を用いて ELISA にて評価した。さらには、仮想癌抗原として ovalbumin (OVA、卵白アルブミン) を用い、マウスに OVA を一緒に封入した CpG-liposome および各々単独の封入体を foot pad へ免疫し、その後、膝下リンパ節を採取して CD4⁺、CD8⁺細胞の抗原特異性についてフローサイトメトリーを用いて評価した。また、OVA 発現腫瘍に対する細胞傷害活性を 4 時間の ⁵¹Cr リリース試験にて評価した。

結果

1 CpG の DC への取り込みおよび DC からの IL-12 産生：CD11c⁺ DC への fluorescein isothionate (FITC)-CpG の取り込みは非修飾 CpG に比較し CpG-liposome 投与の方が多く認められた。また、CpG-liposome 投与では血清 IL-12 も増加し、DC の IL-12 産生をフローサイトメトリーで分析したところ、約 15% の CD11c⁺ DC が刺激 1 時間後、細胞質内に IL-12 を認めた。

2 NK・NKT細胞の IFN- γ 産生：DC の活性化に伴って、NK・NKT細胞も CpG-liposome によって活性化され大量の IFN- γ 産生を誘導した。しかし、T 細胞による IFN- γ 産生はごくわずかであった。つまり、CpG-liposome はNK・NKT細胞による IFN- γ 産生を誘導する強力なアジュバントであることが示された。さらに、このアジュバント効果は Toll like receptor (TLR、Toll 様受容体) 9欠損マウスではほぼ完全に認められなかったことから、CpG-liposome は TLR9 依存的な機構でNK・NKT細胞を活性化することが示された。

3 α -GalCer との比較：CD1dに結合する NKTのライガンドである α -GalCer をマウスに投与すると NKT 細胞は IFN- γ と IL-4の両方を産生する。対称的に CpG-liposome は生体内において NKT 細胞より IFN- γ のみを産生しIL-4は産生しなかった。この結果から、CpG-liposome はDC から IL-12 産生を、NK・NKT細胞から IFN- γ 産生を誘導し、これらのサイトカインは 1 型免疫に関係する重要なサイトカインであるため CpG-liposome は 1 型免疫を誘導する強力で選択的なアジュバントであることが示された。

4 IL-12の関与：CpG-liposome を投与されたマウスにおけるNK・NKT細胞の IFN- γ 産生は抗 IL-12 抗体を投与されたマウスでは大きく減少した。さらに、CpG-liposome および生食を投与したマウスの脾細胞より CD11c⁺DC とNK・NKT細胞の表面マーカーである NK1.1⁺細胞を分離し in vitro で共培養実験を行ったところ CpG-liposome により活性化された DC は NK1.1⁺細胞から IFN- γ 産生を誘導した。この効果は抗 IL-12 抗体によって強く阻害された。また、非活性化 DC でも recombinant IL-12 の存在下ではNK1.1⁺細胞を活性化することができたが、DC とNK1.1⁺細胞を IL-12 存在下に transwell で培養しても NK1.1⁺細胞より IFN- γ 産生を認めなかった。同様に、CpG-liposome で活性化された DC とNK1.1⁺細胞を transwell で培養しても NK1.1⁺細胞から IFN- γ 産生は認めなかった。以上のことから IL-12 だけでなく DC とNK1.1⁺細胞の直接的な接触が IL-12 依存的な NK1.1⁺細胞の IFN- γ 産生に必須であることが示された。

5 抗原特異的 CD4、CD8 の誘導：最後に、CpG-liposome は腫瘍のワクチン療法に適応できるか検討を行った。この目的のために、仮想腫瘍抗原 OVA を一緒に封入した(CpG+OVA)-liposome を用意した。(CpG+OVA)-liposome でワクチンしたマウスでは IFN- γ を産生する CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞は増加していた。また、(CpG+OVA)-liposome のワクチンではテトラマー陽性の CD8⁺ T 細胞が多く認め、OVA 特異的なCTLが誘導されていることが示された。細胞傷害活性試験では (CpG+OVA)-liposome のワクチン群が OVA を発現している EG-7 を特異的に障害したが、OVA を発現していない親株の EL-4 は障害しなかった。以上の結果から、(CpG+OVA)-liposome は 1 型獲得性免疫を活性化させていることが示された。

まとめ

CpG-liposome により 1 型自然免疫が活性化されていることが示され、また、CpG と抗原を liposome に封入することにより 1 型獲得性免疫が活性化していることが示された。この結果から CpG-liposome は免疫系を活性化することにより 1 型自然免疫と 1 型獲得性免疫の橋渡しをして抗腫瘍活性を増大させることが予想された。本研究によって、腫瘍抗原と CpG-liposome を組み合わせることは癌患者へのワクチン療法として癌免疫治療の有効な方策になるものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 西 村 孝 司
副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Liposome-Encapsulated CpG Oligodeoxynucleotides as a Potent Adjuvant for Inducing Type 1 Innate Immunity

(リポソーム封入 cytosine-phosphorothioate-guanine (CpG) による
1 型自然免疫の誘導に関する検討)

非メチル化 CpG により 1 型免疫が活性化されることは知られているがその初期免疫活性機序は不明である。今回申請者は、liposome で封入した CpG を用いて樹状細胞(DC)、NK・NKT 細胞を介した自然免疫の活性化を検討し、さらには獲得性免疫の活性化についても検討を行った。

CpG と liposome を用いて CpG-liposome を作成し、C57BL/6 マウスに静注後に脾細胞を採取することにより DC の IL-12 産生、NK・NKT 細胞からの IFN- γ 産生をフローサイトメトリーにて評価した。また、NKT 細胞を特異的に活性化させる α -galactosylseramide (α -Galcel) を投与、または CpG-liposome 投与マウスに抗 IL-12 抗体を投与し NK・NKT 細胞のサイトカイン産生を比較した。次に、生理食塩水または CpG-liposome を静注したマウスより脾細胞を採取した後に DC と NK1.1⁺ 細胞を分離して *in vitro* で抗 IL-12 抗体を添加して共培養、または DC と NK1.1⁺ 細胞を transwell で共培養することによって IFN- γ の産生を共培養後の上清を用いて ELISA にて評価した。さらには、仮想癌抗原として ovalbumin (OVA、卵白アルブミン) を用い、マウスに OVA を一緒に封入した CpG-liposome および各々単独の封入体を foot pad へ免疫し、その後、膝窩リンパ節を採取して CD4⁺、CD8⁺細胞の抗原特異性についてフローサイトメトリーを用いて評価した。また、OVA 発現腫瘍に対する細胞傷害活性を 4 時間の ⁵¹Cr 遊離試験にて評価した。

結果は、CD11c⁺DC への CpG の取り込みは非修飾 CpG に比較し CpG-liposome 投与で多く認められた。また、CpG-liposome 投与では血清 IL-12 も増加し、DC の IL-12 産生をフローサイトメトリーで分析したところ、約 15%の CD11c⁺ DC で刺激 1 時間後、細胞質内に IL-12 を認めた。

DC の活性化に伴って、NK・NKT 細胞も CpG-liposome によって活性化され、大量の IFN- γ 産生が誘導された。しかし、T 細胞による IFN- γ 産生はわずかであった。つまり、CpG-liposome は NK・NKT 細胞による IFN- γ 産生を誘導する強力なアジュバントであることが示された。さらに、このア

ジュバント効果は Toll like receptor (TLR、Toll 様受容体) 9 欠損マウスではほぼ完全に認められなかったことから、CpG-liposome は TLR9 依存的な機構で NK・NKT 細胞を活性化することが示された。

CD1d に結合する NKT 細胞のライガンドである α GalCer をマウスに投与すると NKT 細胞は IFN- γ と IL-4 の両方を産生する。対称的に CpG-liposome は生体内において NKT 細胞より IFN- γ のみを産生させ、IL-4 を産生させなかった。この結果から、CpG-liposome は DC から IL-12 産生を、NK・NKT 細胞から IFN- γ 産生を誘導し、これらのサイトカインは 1 型免疫に関係する重要なサイトカインであるため CpG-liposome は 1 型免疫を誘導する強力で選択的なアジュバントであることが示された。

CpG-liposome を投与されたマウスにおける NK・NKT 細胞の IFN- γ 産生は抗 IL-12 抗体を投与されたマウスでは大きく減少した。さらに、CpG-liposome および生理食塩水を投与したマウスの脾細胞より CD11c⁺DC と NK・NKT 細胞の表面マーカーである NK1.1⁺細胞を分離し *in vitro* で共培養実験を行ったところ、CpG-liposome により活性化された DC は NK1.1⁺細胞から IFN- γ 産生を誘導した。この効果は抗 IL-12 抗体によって強く阻害された。また、非活性化 DC でも recombinant IL-12 の存在下では NK1.1⁺細胞を活性化することができたが、DC と NK1.1⁺細胞を IL-12 存在下に transwell で培養しても、NK1.1⁺細胞より IFN- γ 産生を認めなかった。同様に、CpG-liposome で活性化された DC と NK1.1⁺細胞を transwell で培養しても、NK1.1⁺細胞から IFN- γ 産生は認めなかった。以上のことから、IL-12 だけでなく DC と NK1.1⁺細胞の直接的な接触が IL-12 依存的な NK1.1⁺細胞の IFN- γ 産生に必須であることが示された。

最後に、CpG-liposome は腫瘍のワクチン療法に応用できるか検討を行った。仮想腫瘍抗原を OVA とし、両者を封入した (CpG+OVA)-liposome を用意した。(CpG+OVA)-liposome でワクチンしたマウスでは IFN- γ を産生する CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞は増加していた。また、(CpG+OVA)-liposome のワクチンではテトラマー陽性の CD8⁺ T 細胞が多く認められ、OVA 特異的な CTL が誘導されていることが示された。細胞傷害活性試験では (CpG+OVA)-liposome のワクチン群が OVA を発現している EG-7 を特異的に障害したが、OVA を発現していない親株の EL-4 を障害しなかった。以上の結果から、(CpG+OVA)-liposome は 1 型獲得性免疫を活性化させていることが示された。

口頭発表において、副査秋田教授より CpG-liposome 投与で NKT 細胞から IL-4 が産生されない機序および今後の癌ワクチンとしての臨床応用についての質問があった。ついで、副査近藤教授より癌の免疫治療に 2 型免疫の関与は障害になるかどうか、また、臨床応用の際の安全性についての質問があった。主査今村教授からは NK 細胞と NKT 細胞の活性化の相違および CpG-liposome で活性化された DC の役割と DC 療法について、さらには今回検討した抗原以外でも獲得性免疫の活性化を認めるかどうかについての質問があった。ついで、副査西村教授より最近の研究で解明された知見についての質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

この論文は、1 型自然免疫の誘導における CpG の役割を明らかにし、CpG-liposome の新たな癌ワクチンとしての臨床的有用性を示した点で高く評価され、審査員一同協議の結果、申請者が博士 (医学) の学位授与に値するものと判定した。