

## 免疫活性化 CpG DNA の腹膜播種に対する免疫療法への応用

倉本夕香里, 橋田 充\*

## Immunotherapy against Peritoneal Dissemination by Immunostimulatory CpG DNA

Yukari KURAMOTO and Mitsuru HASHIDA\*

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan*

(Received June 14, 2007)

Peritoneal dissemination is one of the most common causes of metastasis from malignancies in the abdominal cavity. However, the treatment of peritoneal dissemination is difficult; patients receiving normal chemotherapy have a 0–1% chance of surviving for 5 years. Milky spots in the greater omentum are considered to facilitate the adhesion and invasion of abdominal free cancer cells, and subsequently lymph node metastasis occurs. Since immune cells such as macrophages and lymphocytes are present in the greater omentum and lymph nodes, the activation of immune cells would be a promising strategy for treatment. Single-stranded oligonucleotides containing CpG dinucleotides (CpG DNA) are recognized by Toll-like receptor-9 on antigen-presenting cells such as macrophages to stimulate Th-1-type immune responses. However, a delivery system for CpG DNA to immune cells is essential to develop effective therapy against peritoneal dissemination. Here we review the pathophysiologic basis of peritoneal dissemination and introduce our approach that employs cationic liposomes as a carrier for CpG DNA as a new approach in the treatment of peritoneal dissemination.

**Key words**—drug delivery system; CpG DNA; cationic liposome; peritoneal dissemination; cancer immunotherapy

## 1. はじめに

がん転移及びそれに伴うがんの再発は、がん患者の生命を脅かす最大の要因である。中でも、胃がん患者で頻発する腹膜播種の治療成績は極めて不良である。腹膜播種とは、腹腔内臓器に発生したがん細胞が増殖し、臓器漿膜を破り腹腔内へ遊離されることにより、腹腔内に多数・広範囲にがん転移を形成する病態である。腹膜播種で死亡する患者は本邦で年間約1万数千人、アメリカで合衆国では2万人にも及ぶ。特に、日本人のがん死の1位を占める胃がんの非治癒因子・再発形式の中でも腹膜播種の占める割合は最も多く、罹患した患者の半分以上が腹膜播種により死亡する。また、卵巣がんや大腸がんの死因の上位を占める。しかしながら、腹膜播種の治療成績は、通常行われる全身化学療法において、胃

がんや大腸がんで5年生存率は0–1%であり、現状を打開するための新規治療法開発が急務である。<sup>1)</sup> 腹膜播種治療上の最大の問題点は、原発巣の臓器漿膜から離脱したがん細胞の大網乳斑を介した経リンパ行性転移が挙げられる。一方、大網乳斑やリンパ節にはマクロファージ等の免疫担当細胞が多数存在することから、<sup>2)</sup> 免疫担当細胞活性化により、経リンパ行性転移に対する効率的な免疫療法が行えると考えられる。

近年、強力なアジュバント活性を有する非メチル化 CpG モチーフを含む短鎖 DNA (CpG DNA) が報告され、腹膜播種に対する免疫療法への適用にも大きく期待されている。しかし、効率的な腹膜播種の治療のためには、CpG DNA をドラッグデリバリーシステムの概念に従い、リンパ系のマクロファージ等の免疫担当細胞へ細胞特異的に送達するための精密な製剤設計法の確立が必要である。そこで本稿では、腹膜播種に関する病態生理学的情報を整理するとともに、CpG DNA のカチオン性リポソームを用いたターゲティングに基づく腹膜播種免疫治

京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

\*e-mail: hashidam@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウム SD1 で発表したものを中心に記述したものである。

療に関して論述する。

## 2. 腹膜播種とリンパ節転移

胃がんは日本におけるがん腫の中で最も頻度が高く、その死因の大部分は腹膜播種に起因することが知られている。腹膜播種性がん転移は、臓器の漿膜を突き破り腹腔内に浸潤したがん細胞、あるいは手術の際に腹腔内に残存したがん細胞の標的組織での増殖に起因する。腹腔内に播種されたがん細胞が漿膜面に接着着床して転移巣を形成する場合、腹膜腔における転移好発部位は特異的な分布を示す。

萩原らは悪性腫瘍細胞株を用い、腹腔内移植時の腹膜面への転移巣形成を観察し、転移巣は大網乳斑に特異的に形成されており、他の部分には形成されないこと及びがん細胞数の対数と乳斑数との間には密接な関係があることを明らかにした。<sup>3)</sup> 実際、ヒトの胃がん症例の検討でも、大網乳斑を観察すると、特異的に微小ながん転移巣が発見される。このように、腹膜播種の初期にがん細胞は、乳斑やストマータなどのリンパ特異的に着床し、転移巣を形成すると考えられる。

大網乳斑の表面には腹腔内のリンパ管起始部である小孔、またその直下にはリンパ腔があり、輸出リンパ管は胃大網動脈リンパ節に連絡している。大網以外にも乳斑は腸間膜、ダグラス腔において多数存在する。横隔膜の表面には多数の小孔がありストマータと呼ばれ、乳斑と同様直下のリンパ腔に連絡している。呼気に伴う陰圧により腹腔内液はストマータを介して移行し、縦隔、大動脈リンパ節へと流出する。腹腔内遊離細胞は、このような腹腔内液の流れに従い、乳斑、横隔膜ストマータを介して中皮下リンパ節に転移する。したがって、腹膜播種の早期に経リンパ転移が完成する (Fig. 1).<sup>1)</sup>

## 3. CpG DNA と癌治療

CpG モチーフを含む短鎖 DNA は、強い免疫活性化能による単独でのがん免疫治療への応用、あるいはがんワクチンアジュバントとしての利用が期待されている。1984年、BCGから抽出したDNA分画が強力なインターフェロン誘導能を有することが徳永らにより報告された。<sup>4)</sup> さらに、その活性中心がシトシンとグアニンを含むパリンδροーム(回文)配列であることを示し、CpGの名を提唱した。CpG配列は、細菌やDNAウイルスの16塩基につき1つという高頻度に認められる特徴的な配列であ

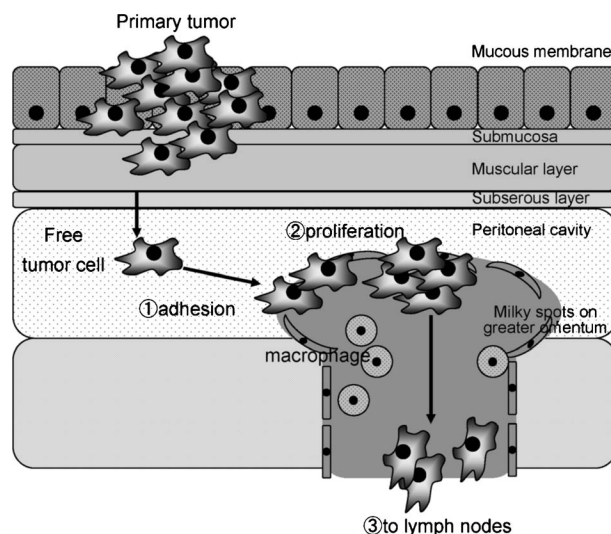


Fig. 1. Process of Trans-lymphatic Metastasis in Peritoneal Dissemination

り、シトシンのメチル化率が極端に低いことが知られている。対照的に、脊椎動物では CpG 配列は細菌や DNA ウイルスの 1/3-4 程度であり、また認められた場合でもメチル化されている。Krieg らは大腸菌由来の DNA が B 細胞の活性化を誘導すること及び CpG 配列をメチル化することでその活性が著しく低下することを明らかにした。<sup>5)</sup> 本知見を基に、CpG モチーフを含む合成オリゴデオキシヌクレオチドを用いた免疫活性化誘導による多数のがん免疫療法の研究が行われている。<sup>6-8)</sup>

CpG DNA の免疫活性化機構を Fig. 2 に示す。まず CpG DNA は、樹状細胞やマクロファージ、B 細胞に発現する TLR-9 に結合する。<sup>9)</sup> TLR-9 は、生理的な状態では細胞質の小胞体に存在するが、活性化によりエンドソームに移行し、細胞外からエンドサイトーシス経路で取り込まれた CpG DNA と結合する。その後、アダプター分子である Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) が TLR9 にリクルートされ、IL-1 receptor associat-



橋田 充

京都大学大学院薬学研究科教授。1951年大阪市生まれ。京都大学薬学部卒業。同大学院博士課程修了。カンサス大学研究員、京都大学助手、同助教授を経て1992年より現職。薬剤学、DDS研究に従事し、日本薬学会賞、CRS学会 Founders Award 等を受賞。2000年より国際薬学連合 (FIP) 副会長を務め、薬学、薬剤師職能の国際化を目指す。

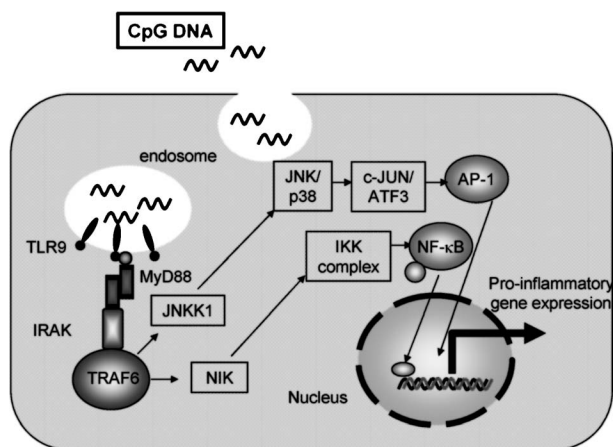


Fig. 2. CpG DNA-TLR9-mediated Cell Signaling

ed kinase (IRAK) 4/Interferon Regulatory Factor (IRF) 5/Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor (TRAF) 6/Transforming Growth Factor- $\beta$  activated kinase (TAK) 1 を介して MAP キナーゼ経路及び I $\kappa$ B Kinase (IKK)-I $\kappa$ B 経路の活性化が引き起こされる。さらに、転写調節因子である AP-1 や NF- $\kappa$ B の核内移行が促進され、Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$  や interleukin (IL)-12 などのサイトカインの産生誘導が起こる。<sup>10)</sup> 近年、Th1 型免疫賦活において、産生されるサイトカインの中でも IL-15 が重要な役割を担うことが報告されている。<sup>11)</sup>

CpG DNA の塩基配列に関して、マウス等の齧歯類においては、5'-GACGTT5'-を含むオリゴヌクレオチドが高い免疫活性化能を持つことが知られている。<sup>12,13)</sup> 一方、ヒトでは5'-GTCGTT5'-を含むオリゴヌクレオチドが高い免疫活性化能を有する。<sup>14)</sup> また、骨格修飾や周囲の配列の違いにより D/A タイプ、K/B タイプ、また C タイプに分類される。D/A タイプは主に plasmacytoid DC (pDC) からの I 型インターフェロンの産生、K/B タイプは B 細胞の増殖と IgM や IL-6 などの産生をそれぞれ誘導することが示唆されている。<sup>15)</sup> しかしながら、依然として *in vivo* でこれらの誘導体の治療効果に関しては不明な点が多く、更なる研究が必要である。

天然型 (ホスホジエステル, PO 型) の CpG DNA は、血清中や細胞内に存在するヌクレアーゼによって急速に分解されるため生体からの消失が早く、十分な効果が得られない。このため通常は CpG DNA 中ヌクレオチド結合のリン酸基の P-O

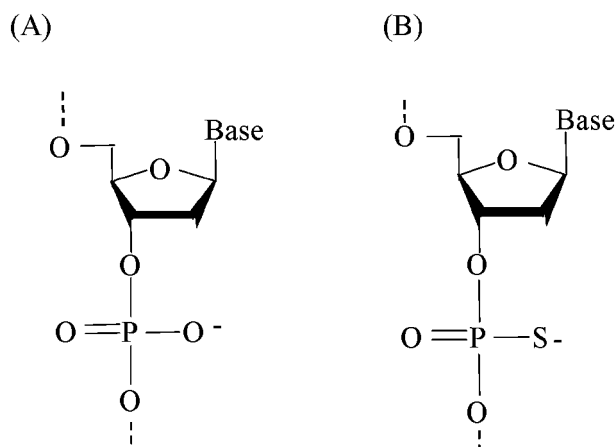


Fig. 3. Schematic Illustration of Chemical Modification of Oligonucleotides

(A) The natural phosphodiester backbone that is highly susceptible to nuclease degradation. (B) The phosphorothioate-modified backbone that provides required stability to DNA against nuclease degradation.

結合をチオリン酸基 P-S 結合に置換することによりヌクレアーゼ耐性を改善した化学修飾体であるホスホロチオエート (PS) 型 CpG DNA が汎用されている (Fig. 3)。

#### 4. リンパ節への DDS

腹膜播種治療への CpG DNA の適用に関して、一般的に使用されている CpG DNA は約 30 塩基程度の 1 本鎖 DNA であり、その分子量は約 8,000 程度と比較的小さく、腹腔内投与後、転移好発部位であるリンパ節への移行性は低い。CpG DNA を用いた腹膜播種治療を成功させるためには、ドラッグデリバリーシステムの概念に基づいて CpG DNA をリンパ節へ効率的に送達することが重要と考えられる。ドラッグデリバリーシステムは現在、投与部位から作用発現部位に至るまでの薬物の体内動態を 1 つのシステムとして捉え制御する技術と理解される。<sup>16)</sup>

腹膜腔は、リンパ管内皮と類似した漿膜中皮細胞の単層膜によって覆われている。漿膜腔からの物質の吸収経路は 2 つに大別される。その 1 つは、血管系を介する水溶性低分子の吸収であり、他方はリンパ系からの吸収で、水溶性低分子以外の物質を吸収する。これらの吸収過程と速度は、吸収される物質の大きさと水溶性以外にも電荷や分子の形にも左右される。サイズの比較的小さな水溶性高分子は、漿膜中皮層と血管内皮層を容易に透過することが可能であり、漿膜下に分布する豊富な毛細血管を介して

循環血液中に吸収される。毛細血管からの吸収は、腹腔からの吸収の場合、門脈系の毛細血管が優位であるので、腹腔から血液中に吸収された薬剤は、網脈から肝臓を通過したのちに、全身循環に運ばれる。毛細血管経路を介する吸収は比較的速やかであり、多くの注射用薬剤のような水溶性低分子を腹腔内に投与しても、腹腔内での病巣に十分に長い期間に渡り薬剤を作用させることができない。がんに対する化学療法は、通常、抗がん剤を静脈内あるいは腹腔内に持続的に投与し、がん細胞の増殖を抑制するものである。これにより血行性の転移に関しては再発防止が可能となる。しかし、一般的な抗がん剤は低分子であるため、上述したように静脈内あるいは腹腔内投与してのリンパ移行性は低く、リンパ転移に対する治療効果は悪いことが知られている。<sup>17)</sup> 一方、外科的切除では、がんを手術により切除するが、がんのリンパ節転移防止のため、付近のリンパ節も同時に切除するか、また、どの範囲までリンパ節を切除するかが効果的治療において重要である。リンパ節に十分な濃度の抗がん剤を存在させることで、転移の再発防止が期待できるため、抗がん剤をリンパ系に送り込むことで効果的ながん転移治療が可能となる。

腹腔内からリンパ系への移行に関しては、薬物サイズが重要な因子であることが報告されている。比較的サイズの大きな水溶性高分子や脂溶性高分子、赤血球程度までの粒子などは、漿膜中皮や毛細血管壁を通過することが困難であり、全身循環血中へは直接に移行せず、リンパ系へと移行する。腹腔内投与後、リンパ系への移行は、全身循環血への移行速度に比べると非常に遅く、長時間腹腔内に滞留する。これらの物質の直接的なリンパ系への移行は、漿膜の非連続部で、リンパ管へ移行する部位と考えられているストーマータと呼ばれる部位や乳斑と呼ばれる部位で行われる。上述のように、がん治療において臨床上重要な問題となるがん細胞の転移は主としてこれらリンパ系を介して起こるため、腹腔内投与後のリンパ指向性を賦与するためには、薬物の微粒子性製剤化が有効であると考えられる。そこで、油滴が組織間隙より選択的にリンパ系へ吸収される事実に基づき、エマルションにより抗がん剤をリンパ系へ効率よくターゲティングする試みが始められた。<sup>18,19)</sup> 臨床において高橋らは、抗がん剤をエマル

ションの形で患者に投与し、がんのリンパ節転移が抑制されることを報告している。<sup>20)</sup> 上述したように、リンパ移行性を決定する因子としては、薬物の分子量と粒子サイズが挙げられる。分子量によるリンパ移行性の制限に関して、Ballard は筋肉注射又は皮下注射された分子量 5000 以下の薬物は主に毛細血管系により吸収され全身循環血へ移行し、分子量 20000 以上の薬物は主にリンパ系へ移行することを示した。<sup>21)</sup> Garlick らは血液-リンパ輸送をアルブミンとデキストランを用い、リンパ流と高分子の透過性との関連を検討した。<sup>22)</sup> また、村西らはブレオマイシンとデキストラン硫酸塩の結合体によるリンパ移行性の増大を報告している。<sup>23)</sup> 腹腔内投与時のサイズによるリンパ節移行の制限に関しては、平野らが分子サイズの影響を詳細に検討し、100-200 nm 程度のサイズがリンパ移行並びにリンパ節における滞流性に優れていることを明らかにした。<sup>24)</sup>

一方、他の研究グループにおいて CpG DNA のヌクレオチド骨格を修飾し、生体内での安定性を向上させる試みが検討されているが、その分子量に起因するリンパ節への到達性の低さが隘路となると考えられる。

##### 5. CpG DNA の製剤化と腹膜播種治療への適用

近年、多くの過程が複雑に絡み合った結果として生じるがん転移のメカニズムが徐々に明らかにされ、転移抑制を目的として各過程の抑制法の開発が進められている。しかしながら、がん細胞の多様性からその効果はがん細胞の性質に左右されることが多く、一般的に適用可能な抑制法はいまだ開発に至っていない。一方で、臓器重量の変化や転移結節数の計数等の従来の抗腫瘍効果の評価方法では、感度の低さが問題である。そこで、がん転移・増殖における高感度な評価系の確立が重要である。

そこでわれわれは、転移素過程を定量的に評価することを可能とする実験評価法の確立を目指し、レポーター遺伝子をがん細胞に恒常的に発現させることでがん細胞の体内動態、増殖を高感度かつ定量的に解析可能とする新規がん転移・増殖過程の解析法の開発を行った。モデルがん細胞としてマウスメラノーマ細胞株 B16-BL6 及び結腸がん由来細胞株 colon26 に対して、ホタルルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を導入し、レポータータンパク質を安定に発現するがん細胞株 (B16-BL6/Luc, colon26/Luc)

を樹立した。得られた安定発現株のうち、ルシフェラーゼ遺伝子発現活性が高く、また形質及び転移能が親細胞株と同等のものを選択し、以降の検討に用いた。ルシフェラーゼ活性はがん細胞数と広範囲において比例し、得られた換算式から計算すると、組織 1 g 中 400 個程度のがん細胞があれば検出可能な評価系であった。これは、従来の目視による転移結節数の計測に基づく評価法と比較して 10000 倍以上の感度を有していた。以上、客観的かつ極めて感度の高いがん転移・増殖過程評価系の確立に成功した。<sup>25)</sup> 複雑な組織構造のためこれまで定量的評価が困難であった腹膜播種性がん転移においても本評価系は適用可能であり、経時的に解析した結果、腹腔内に播種されたがん細胞が大網に集積することが明らかとなった。さらに *in vivo* バイオルミネッセンスイメージングシステムを用いた非侵襲的観察でも同様に、リンパ系組織、取り分け大網でのがん細胞の集積を確認した。<sup>26,27)</sup> 以上の知見から、腹膜播種治療に対し CpG DNA を応用するためには、CpG DNA を転移好発部位であるリンパ系組織、取り分け大網へと移行させることが重要であることを定量的に明らかにした。本知見は前述の萩原らの知見ともよく対応するものである。

CpG DNA はポリアニオンとしての性質を有し、負に帯電する細胞表面への取り込みは低い。ポリアニオンである CpG DNA はカチオン性ポリマーやカチオン性リポソーム等の非ウイルス性遺伝子導入ベクターと混合することで静電的相互作用により複合体を形成し、DNA の生体内での安定性だけでなく細胞への取り込み促進も期待される。非ウイルスベクターは、生産性、経済性、汎用性の各観点からも優れており、臨床応用が期待される。そこでわれわれは、静電的相互作用による CpG DNA の微粒子性製剤化並びに細胞取り込み増大のため、カチオン性脂質である *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium chloride (DOTMA) と中性脂質 cholesterol から構成される DOTMA-cholesterol リポソームを選択し、CpG DNA とのナノ微粒子化を試みた。DNA とカチオン性リポソームとの混合比や溶媒の塩濃度等の各種条件を最適化することで、平均粒子径約 100–200 nm 程度のナノ微粒子化に成功した。

マウス初代培養腹腔マクロファージに CpG DNA/

カチオン性リポソーム複合体 (CpG DNA 複合体) を添加した結果、CpG DNA 単独と比較して、CpG DNA の細胞取り込み量の有意な増大が認められた。また、取り込み実験の結果とよく対応した形で TNF- $\alpha$  や IL-12 などの Th1 型サイトカイン増大が認められ、CpG DNA の細胞取り込み量がサイトカイン産生に影響していることが示唆された。そこで、マウス腹膜播種モデルを用いて、サイトカイン産生及び腹膜播種治療効果に関する評価を行った。腹腔内投与後、CpG DNA 複合体では、CpG DNA 単独と比較して、腹腔内 Th1 型サイトカイン産生の有意な増大が認められた。一方、腹膜播種モデルマウスに対して CpG DNA を静脈内投与あるいは皮内投与した場合、腹腔内における有意な Th1 型サイトカインの産生は認められなかった。次に、がん細胞の定量的評価系を用いて、CpG DNA 複合体の抗腫瘍効果について検討した結果、CpG DNA 複合体投与群では、CpG DNA 単独投与群と比較して腹腔内のがん細胞数を約 50 分の 1 にまで減少可能であり、担がんマウスの生存日数も有意に延長可能であることが明らかとなった (Fig. 4)。以上、CpG DNA-カチオン性リポソーム複体の腹腔内投与が有効な腹膜播種治療が可能となる可能性が示された。<sup>28)</sup>

## 6. CpG DNA の細胞選択的送達による免疫応答増強の可能性

CpG DNA はマクロファージや樹状細胞に発現する Toll 様受容体に認識されるため、免疫担当細胞へのターゲティングにより免疫活性化をさらに増大させることができると考えられる。細胞選択的な認識能を有する DNA キャリアの開発に関しては、これまでガラクトース、マンノース、葉酸、トランスフェリン、VEGF などのリガンドを挿入することで、細胞表面へ特異的に発現しているレセプターを介して細胞選択的に導入する方法が検討されている。中でも肝実質細胞が有するアシアロ糖タンパクレセプターや肝非実質細胞及びマクロファージが有するマンノースレセプター等の糖鎖認識機構は、特定の細胞に発現し、また厳密な基質特異性を有することから *in vivo* での細胞選択的ターゲティングが可能である。<sup>29,30)</sup>

われわれは、糖修飾リポソームを調製するための糖脂質として、①糖脂質の安定なりポソームへの封

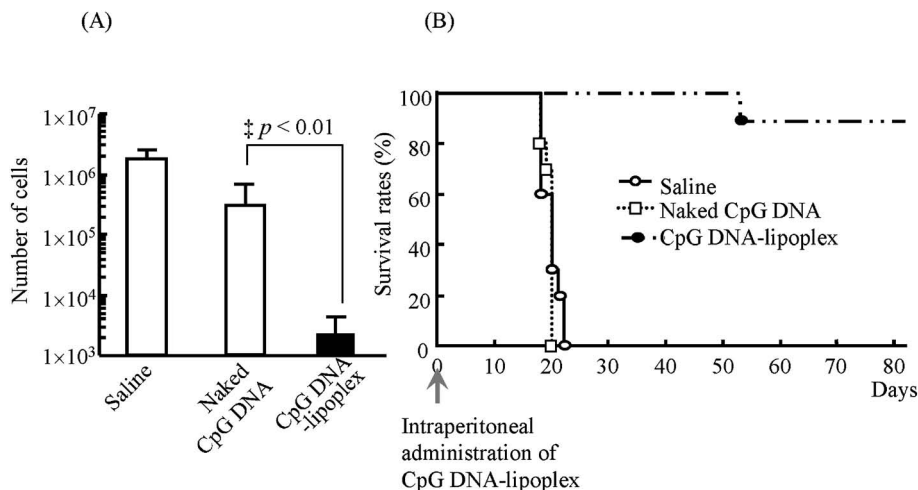


Fig. 4. Antitumor Effect of Intraperitoneal Injection of CpG DNA/DOTMA-cholesterol Lipoplex against Peritoneal Dissemination

(A) C57BL/6 mice were inoculated intraperitoneally with B16-BL6/Luc cells. Soon after tumor inoculation, saline, naked CpG DNA, and CpG DNA-lipoplex were administered into the peritoneal cavity. Seven days after injection, mice were sacrificed and the luciferase activity of the greater omentum was measured. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of at least four mice. (B) Survival rate of colon26/Luc tumor-bearing mice. On day 0, CDF1 mice were intraperitoneally inoculated with colon26/Luc cells. Tumor-bearing mice were treated with saline (○), naked CpG DNA (□), and CpG DNA-lipoplex (●). (Reprinted from Ref. 28) with permission from Elsevier).

入, ②レセプターとの認識に重要な高密度な糖鎖の導入, を可能とする新規マンノース修飾コレステロール誘導体 cholesten-5-yloxy-*N*-(4-((1-imino-2- $\beta$ -D-thiomannosylbutyl) amino) alkyl) formamide を合成し (Fig. 5), 本物質により表面修飾したマンノース修飾リポソームに関する評価を行った.<sup>31-33</sup> 本物質は, コレステロール骨格を有するため, リポソーム膜に安定にマンノースを修飾可能であり, スペーサー部にイミノ基を有するため, DNA との静電的相互作用に必要なカチオン性を維持した状態で多数のマンノース残基をリポソームに導入することが可能である. また, リポソームのみならず, O/W エマルジョンの修飾も可能であり, 特に, 脂溶性薬物のターゲティングに応用できることを明らかにした.<sup>34</sup> マンノースレセプターへの認識には, マンノース修飾リポソーム表面へ導入したマンノース密度が非常に重要であり,<sup>35</sup> 効率的な免疫担当細胞へのターゲティングを可能にできると考えられる. 実際, マンノース修飾カチオン性リポソーム/プラスミド DNA を静脈内投与後, マンノースレセプターが特異的に発現している肝臓及び脾臓での遺伝子発現の増大が認められた. これら臓器の遺伝子発現はマンノース修飾タンパクによる競合阻害実験によりマンノースレセプターを介した取り込みによるものである可能性が示された. また, コラゲナーゼ灌流法により肝臓における遺伝子発現を分離評価した結

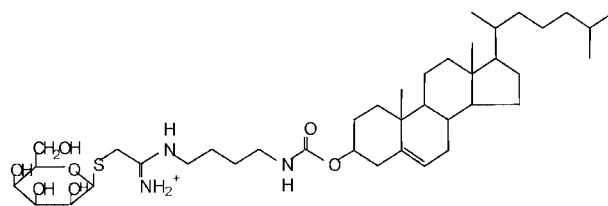


Fig. 5. Chemical Structure of Cholesten-5-yloxy-*N*-(4-((1-imino-2- $\beta$ -D-thiomannosylbutyl) amino) alkyl) formamide (Man-C4-chole)

果, マンノースレセプターが発現する肝非実質細胞において高い遺伝子発現が得られた. 以上の結果から, マンノース修飾リポソームを用いることで, マンノース受容体介在性エンドサイトーシスにより核酸を細胞内に導入できる可能性が強く示された.

さらに得られた知見を基に本キャリアシステムの遺伝子治療への応用を目指して, マンノース修飾リポソームとがん抗原をコードしたプラスミド DNA の複合体を調製し, がん特異的な細胞性免疫誘導によるがん免疫療法の評価を行った. 複合体の腹腔内投与後の脾臓の抗原提示細胞における抗原発現を評価した結果, マンノース修飾リポソーム複合体を腹腔内投与後, 対照の未修飾カチオン性リポソーム投与群と比較して有意に高い樹状細胞への発現が確認され,<sup>36</sup> また, 導入抗原特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) 誘導に基づくがん治療効果も認められた.<sup>37,38</sup> 最近, 同様にマンナン修飾アデノウイルス

の腹腔内投与を用いた遺伝子導入による CTL に基づくがん治療が報告されている。<sup>39)</sup> 以上の知見を基に、マンノース修飾リポソーム/CpG DNA 複合体による腹膜播種治療において、大網、リンパ管における免疫担当細胞選択的ターゲティングとそれに基づく免疫応答の増強及び抗腫瘍効果の増大が期待できると考えており、現在、検討を進めている。

## 7. おわりに

本稿では、新規腹膜播種治療法として、カチオン性リポソームによる CpG DNA のナノ粒子化の有効性に関して論述した。また、CpG DNA の免疫担当細胞選択的送達による免疫誘導効率化の可能性を示した。現在行われているがん免疫治療の多数が全身性の免疫誘導に関する検討であるが、臨床における腫瘍の発症や維持においては宿主免疫系を回避する複数の機構の関与が報告されており、これらの要因により効果的な治療が妨げられている。したがって、有効ながん免疫治療を達成するためには、これら腫瘍回避機構を考慮し、免疫細胞を腫瘍局所に集積させ、十分に抗腫瘍免疫を機能させることが必要である。CpG DNA はケモカイン誘導により、リンパ球の局所への遊走を促進し、腫瘍回避機構への関連が示唆される腫瘍関連マクロファージ活性化や制御性 T 細胞活性化抑制が関与することが報告されている。<sup>40,41)</sup> 以上、がん免疫治療において CpG DNA は有望であるが、十分に効果を発揮させるためには、ドラッグデリバリーシステムの確立が必要不可欠であると言える。本 CpG DNA デリバリーシステムに関する総説が、安全かつ有効ながん免疫治療法の開発の一助になれば幸いである。

**謝辞** 本研究の遂行に当たり有益なご助言及び多大なご支援を賜りました山下富義先生（京都大学大学院薬学研究科准教授）並びに川上 茂先生（京都大学大学院薬学研究科助教）、また実験にご協力いただきました大学院生・学生の方々に深く御礼申し上げます。また、薬学会大学院生シンポジウムに参加する機会を与えていただきました薬学会関係者の皆様方に改めて感謝の意を表します。

## REFERENCES

1) Yonemura Y., Endo Y., Obata T., Sasaki T., *Cancer Sci.*, **98**, 11–18 (2007).

2) Dux K., Janic P., Szaniauska B., *Cell Immunol.*, **32**, 97–109 (1977).

3) Hagiwara A., Takahashi T., Sawai K., Taniguchi H., Shimotsuma M., Okano S., Sakakura C., Tsujimoto H., Osaki K., Sasaki S., Shirasu M., *Cancer Res*, **53**, 687–692 (1992).

4) Tokunaga T., Yamamoto H., Shimada S., Abe H., Fukuda T., Fujisawa Y., Furutani Y., Yano O., Kataoka T., Sudo T., Makiguchi N., Suganuma T., *J. Natl. Cancer Inst.*, **72**, 955–962 (1984).

5) Krieg A. M., Yi A.-K., Matson S., Waldschmidt T. J., Bishop G. A., Teasdale R., Koretzky G. A., Klinman D. M., *Nature*, **374**, 546–549 (1995).

6) Kawarada Y., Ganss R., Garbi N., Sacher T., Arnold B., Hammerling G. J., *J. Immunol.*, **167**, 5247–5253 (2001).

7) Weigel B. J., Rodeberg D. A., Krieg A. M., Blazar B. R., *Clin. Cancer Res.*, **9**, 3105–3114 (2003).

8) Krieg A. M., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 471–484 (2006).

9) Hemmi H., Takeuchi O., Kawal T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S., *Nature*, **408**, 740–745 (2000).

10) Hacker H., Vabulas R. M., Takeuchi O., Hoshino K., Akira S., Wagner H., *J. Exp. Med.*, **192**, 595–600 (2000).

11) Kuwajima S., Sato T., Ishida K., Tada H., Tezuka H., Ohteki T., *Nat. Immunol.*, **7**, 740–746 (2006).

12) Yi A.-K., Chang M., Peckham D. W., Krieg A. M., Ashman R. F., *J. Immunol*, **160**, 5898–5906 (1998).

13) Rankin R., Pontarollo R., Ioannou X., Krieg A. M., Hecker R., Babiuk L. A., Van Drunen Littel-van den Hurk S., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **11**, 333–340 (2001).

14) Hartmann G., Krieg A. M., *J. Immunol.*, **164**, 944–953 (2000).

15) Verthelyi D., Ishii K. J., Gursel M., Takeshita F., Klinman D. M., *J. Immunol*, **166**, 2372–2377 (2001).

16) Sezaki H., Hashida M., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **1**, 1–38 (1984).

17) Ikehara Y., Niwa T., Biao L., Ikehara S. K., Ohashi N., Kobayashi T., Shimizu Y., Kojima

- N., Nakanishi H., *Cancer Res.*, **66**, 8740–8748 (2006).
- 18) Nakamoto Y., Fujiwara M., Noguchi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2232–2238 (1975).
- 19) Hashida M., Muranishi S., Sezaki H., *Int. J. Pharm.*, **2**, 245–256 (1979).
- 20) Takahashi T., Mizuno M., Fujita Y., Ueda S., Nishioka B., Majima S., *Gann*, **64**, 345–350 (1973).
- 21) Ballad B. E., *J. Pharm. Sci.*, **57**, 357–378 (1968).
- 22) Garlick D. G., Renkin E. M., *Am. J. Physiol.*, **219**, 1595–1605 (1970).
- 23) Muranishi S., Takahashi Y., Hashida M., Sezaki H., *J. Pharmacobiodyn.*, **2**, 383–391 (1979).
- 24) Hirano K., Hunt C. A., *J. Pharm. Sci.*, **74**, 915–921 (1985).
- 25) Hyoudou K., Nishikawa M., Umeyama Y., Kobayashi Y., Yamashita F., Hashida M., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 7685–7691 (2004).
- 26) Hyoudou K., Nishikawa M., Kobayashi Y., Kuramoto Y., Yamashita F., Hashida M., *Clin. Exp. Metastasis*, **23**, 269–278 (2006).
- 27) Hyoudou K., Nishikawa M., Kobayashi Y., Mukai S., Ikemura M., Kuramoto Y., Yamashita F., Hashida M., *J. Control. Release*, **119**, 121–127 (2006).
- 28) Kuramoto Y., Nishikawa M., Hyoudou K., Yamashita F., Hashida M., *J. Control. Release*, **115**, 226–233 (2006).
- 29) Hashida M., Nishikawa M., Yamashita F., Takakura Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **52**, 187–196 (2001).
- 30) Hashida M., Kawakami S., Yamashita F., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 871–880 (2005).
- 31) Kawakami S., Sato A., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M., *Gene Ther.*, **7**, 292–299 (2000).
- 32) Kawakami S., Wong J., Sato A., Hattori Y., Yamashita F., Hashida M., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1524**, 258–265 (2000).
- 33) Opanasopit P., Higuchi Y., Kawakami S., Yamashita F., Nishikawa M., Hashida M., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1511**, 134–145 (2001).
- 34) Yeeprae W., Kawakami S., Higuchi Y., Yamashita F., Hashida M., *J. Drug Target*, **13**, 479–487 (2005).
- 35) Yeeprae W., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., *J. Control. Release*, **114**, 193–201 (2006).
- 36) Hattori Y., Kawakami S., Nakamura K., Yamashita F., Hashida M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**, 828–834 (2006).
- 37) Hattori Y., Kawakami S., Lu Y., Nakamura K., Yamashita F., Hashida M., *J. Gene Med.*, **8**, 824–834 (2006).
- 38) Lu Y., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M., *Biomaterials*, **28**, 3255–3262 (2007).
- 39) Ding Z.-Y., Wu Y., Luo Y., Su J.-M., Li Q., Zhang X.-W., Liu J.-Y., He Q.-M., Yang L., Tian L., Zhao X., Deng H.-X., Wen Y.-J., Li J., Kang B., Wei Y.-Q., *Gene Ther.*, **14**, 657–663 (2007).
- 40) Guiducci C., Vicari A. P., Sangaletti S., Trinchieri G., Colombo M. P., *Cancer Res.*, **65**, 3437–3466 (2005).
- 41) Chiffolleau E., Heslan J.-M., Heslan M., Louvet C., Condamine T., Cuturi M.-C., *Int. Immunol.*, **19**, 193–201 (2007).