

免疫細胞の体内動態制御に基づいた癌免疫療法の最適化

岡田直貴,* 中川晋作

Optimization of Cancer Immunotherapy by Controlling Immune Cell Trafficking and Biodistribution

Naoki OKADA,* and Shinsaku NAKAGAWA

Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan

(Received May 31, 2006)

An immunosurveillance system for tumor-associated antigens (TAAs) plays an important role in the elimination of cancer cells during the initial stage. Although cancer immunotherapy targeting TAAs has progressed steadily with the development of various vaccine strategies, excellent therapeutic efficacy, as evidenced by marked tumor regression and complete response, has not been reported in a clinical setting to date. To improve the therapeutic effects of cancer immunotherapy, we are attempting to establish an innovative concept, the “cell delivery system,” capable of better controlling the trafficking and biodistribution of immune cells by applying chemokine-chemokine receptor coupling, which regulates leukocytic migration and infiltration of local sites in the living body. This review introduces our approaches that employ an Arg-Gly-Asp (RGD) fiber-mutant adenovirus vector encoding the chemokine or chemokine receptor gene in cancer immunotherapy.

Key words—cell delivery system; chemokine-chemokine receptor coupling; cancer immunotherapy; adenovirus vector; tumor-infiltrating immune cell; dendritic cell

1. はじめに

腫瘍免疫学の進展によって、遺伝子変異を蓄積した癌細胞が正常細胞とは質的・量的に異なる腫瘍関連抗原 (TAA) と呼ばれる分子を発現しており、TAA に対する免疫監視機構が初期癌細胞の排除という生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかとされた。これに伴って、TAA を標的とした免疫療法が次世代の癌治療戦略として世界的に活発に研究されており、基礎研究と臨床研究の連携によって着実な進歩を遂げている。しかしながら、腫瘍の完全退縮あるいは病状の寛解といった顕著な治療効果を報告した臨床研究はほとんど認められないのが現状であり、この一因として、従来の癌免疫療法研究の多くが腫瘍免疫の存在実証とその効率的な誘導法の探索を中心に進められ、効果的な治

療を達成する上で必要な免疫エフェクター細胞の腫瘍組織への集積性改善という側面がまだまだ十分に検討されていないことが挙げられる。つまり、癌細胞を殺傷する能力を有する免疫エフェクター細胞が例えば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・浸潤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と考えられる。

また近年、免疫系を構成する細胞の機能解明が急速に進んだことによって、樹状細胞 (DC) が T 細胞依存性の獲得免疫応答の始動及び増幅、さらには自然免疫応答の制御をも含めて、免疫監視機構を多方面から統御する抗原提示細胞であることが明らかとされた。このような免疫学的特性に基づいて、TAA を導入した DC を “nature’s adjuvant” として利用する細胞免疫療法が有望な新規癌治療戦略として精力的に研究されており、DC の腫瘍免疫誘導能を最大限に発揮させる方法論の探索が進められている。¹⁾ 生体に投与した TAA 導入 DC ワクチンは、投与部位から所属リンパ組織へ移行することによ

大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6)

*e-mail: okada@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S33 で発表したものを中心に記述したものである。

て始めて T 細胞への抗原提示・感作を行い一連の初期免疫応答を惹起する。すなわち、患者に投与した TAA 導入 DC ワクチンのリンパ組織集積性が、DC 免疫療法の治療効果を規定する要因の 1 つとして考えられる。しかし現在の DC 免疫療法では、投与部位からリンパ組織に移行させるための最適な DC コンディショニングについて十分な検討がなされていないため、投与 DC ワクチンのうちリンパ組織に集積するものはわずか 0.1—1% 程度とされている。²⁻⁴⁾したがって、TAA 導入 DC ワクチンに高いリンパ組織移行性を付与することができれば、リンパ組織における免疫エフェクター細胞の活性化を増強することが可能であり、ひいては DC 免疫療法の有効性を飛躍的に改善できるものと期待される。

以上のような観点から筆者らは、癌免疫療法の有効性改善に貢献するアプローチとして、“Cell Delivery System”ともいべき新たなコンセプトに基づいた免疫細胞の体内動態制御法の構築を試みている。本稿では、ケモカイン—ケモカインレセプター連関を応用した 1) 免疫エフェクター細胞の腫瘍集積性、並びに 2) DC ワクチンのリンパ組織集積性、を増強し得る方法論を紹介するとともに、これら Cell Delivery System の癌免疫療法における有用性について概説する。

2. ケモカイン—ケモカインレセプター連関

癌免疫療法の有効性及び安全性を確保・向上するためには、生体内の免疫細胞あるいは細胞医薬として生体に投与（移入）する免疫細胞を「必要なときに、必要な場所に、必要な量」送達できる Cell Delivery System の確立が必要とされる。しかし、生体を構成する約 60 兆個の細胞の秩序を保った移動・分布・配列等を制御する巧妙な仕組みに関する知見はいまだ乏しく、Cell Delivery System の構築へと展開できる基礎情報並びに基盤技術は限られている。現時点で Cell Delivery System への応用に最も利用価値の高い生命現象は、ケモカイン—ケモカインレセプター連関に基づいた免疫細胞の局所への遊走・浸潤制御機構であろう。

ケモカインは 8—14 kDa 程度の塩基性・ヘパリン結合性分泌タンパク群であり、種々の細胞接着分子と協調して炎症反応やリンパ球のホーミングを制御している (Fig. 1).⁵⁾ 現在、ヒトでは約 50 種類のケモカインが同定されており、それらは保存された 4 つのシステイン残基のうち N 末端の 2 個のシステインの位置から C ケモカイン, CC ケモカイン, CXC ケモカイン, 及び CX₃C ケモカインの 4 つのサブグループに分類されるスーパーファミリーを形成している。⁶⁾ また、すべてのケモカインは 7 回膜貫通 G タンパク質共役型レセプターを介して作用

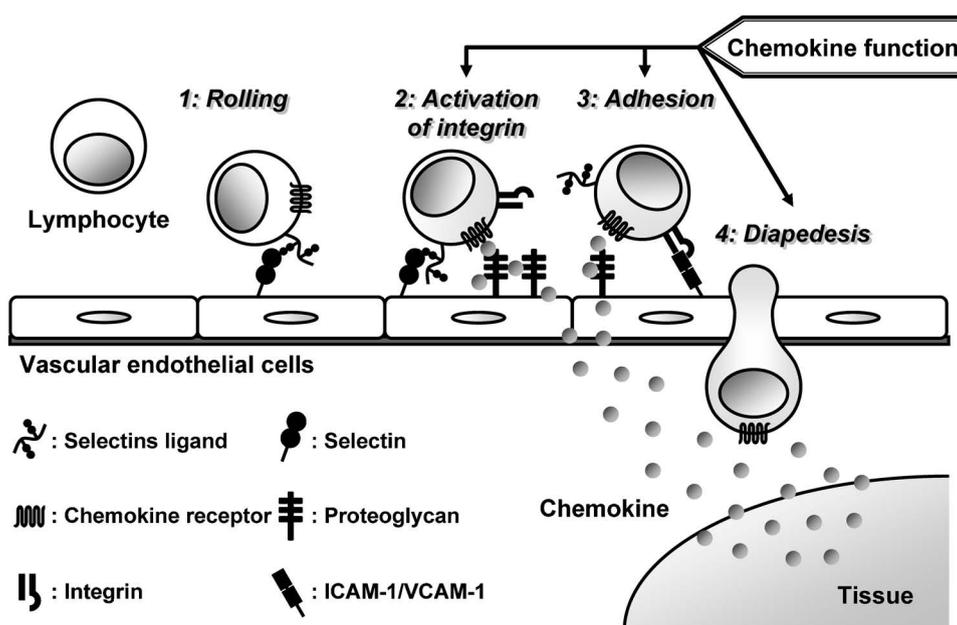


Fig. 1. Schematic Representation of Chemokine Functions in Tissue Infiltration of Lymphocyte

し、同定されている約 20 種類のケモカインレセプターもスーパーファミリーを構築している。^{7,8)} ケモカインは当初、好中球や単球を遊走させるサイトカインの一群として発見され、主に炎症での役割が研究されてきた。これら炎症性ケモカインに対して、1990 年代後半より、バイオインフォマティクスを駆使して EST データベースを検索するという手法によって新しいケモカインが次々と発見され、リンパ球や DC などを標的細胞とする免疫系ケモカインの存在が明らかとなった (Table 1)。これによって、免疫細胞の生体内での移動や局在の制御機構に関する理解が急速に進展するとともに、ケモカイン-ケモカインレセプター連関を応用することによ

って免疫細胞の体内動態・体内分布を制御し得る新たな癌免疫療法の開発に足掛かりができた。

3. RGD ファイバーミュータントアデノウイルス (AdRGD) ベクター

ケモカイン-ケモカインレセプター連関を利用した Cell Delivery System を実現するためには、生体内局所あるいは生体に投与する細胞医薬にケモカインやケモカインレセプターを豊富かつ持続的に発現させる必要があり、遺伝子導入技術はそれらを満足する有力な手段である。アデノウイルス (Ad) ベクターは、現存する遺伝子導入ベクターの中で最も高い遺伝子導入効率を誇り、かつ高力価のベクター調製が容易であることから *in vivo* 直接投与への応

Table 1. Chemokine-Chemokine Receptor Coupling in Immune Cell Trafficking

Immune cell subset	Chemokine receptor expression	Corresponding chemokines	Immune cell subset	Chemokine receptor expression	Corresponding chemokines
Naive T cell	CCR7	CCL19, 21	NK cell	CCR1	CCL3, 5, 7
	CXCR4	CXCL12		CCR2	CCL2, 7, 13
Th1	CCR2	CCL2, 7, 13	CCR4	CCL17, 22	
	CCR5	CCL3, 4, 5	CCR5	CCL3, 4, 5	
	CXCR3	CXCL9, 10, 11	CCR7	CCL19, 21	
	CXCR6	CXCL16	CCR8	CCL1	
	CX ₃ CR1	CX ₃ CL1	CXCR1	CXCL6, 8	
Th2	CCR2	CCL2, 7, 13	CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8	
	CCR3	CCL5, 7, 8, 11, 13, 24, 26	CXCR3	CXCL9, 10, 11	
	CCR4	CCL17, 22	CXCR4	CXCL12	
	CCR8	CCL1	CXCR6	CXCL16	
CTL	CCR5	CCL3, 4, 5	XCR1	XCL1	
	CXCR1	CXCL6, 8	CX ₃ CR1	CX ₃ CL1	
	CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8	Monocyte	CCR1	CCL3, 5, 7
	CXCR3	CXCL9, 10, 11		CCR2	CCL2, 7, 13
	CXCR6	CXCL16		CCR5	CCL3, 4, 5
CX ₃ CR1	CX ₃ CL1	CCR8		CCL1	
Memory T cell	CCR1	CCL3, 5, 7	CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8	
	CCR2	CCL2, 7, 13	CXCR4	CXCL12	
	CCR4	CCL17, 22	CX ₃ CR1	CX ₃ CL1	
	CCR6	CCL20	Immature DC	CCR1	CCL3, 5, 7
	CCR7	CCL19, 21		CCR2	CCL2, 7, 13
	CCR10	CCL27		CCR3	CCL5, 7, 8, 11, 13, 24, 26
	CXCR1	CXCL6, 8		CCR5	CCL3, 4, 5
	CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8		CCR6	CCL20
	CXCR4	CXCL12		CCR9	CCL25
	B cell	CCR6	CCL20	CXCR4	CXCL12
CCR7		CCL19, 21	Mature DC	CCR7	CCL19, 21
CXCR3		CXCL9, 10, 11		CCR9	CCL25
CXCR4		CXCL12		CXCR4	CXCL12
CXCR5		CXCL15			

用も図り易いという利点を有している。しかし、Ad ベクターが標的細胞内に侵入するには、ファーストステップとして細胞表面上の感染受容体 (coxsackievirus-adenovirus receptor; CAR) に結合する必要がある^{9,10}。一部の癌細胞、血球系細胞及び幹細胞においては CAR の発現が乏しいあるいは欠損しているために、Ad ベクター介在性遺伝子導入に抵抗性を示すことが知られている。この問題点を克服した次世代型ベクターシステムの1つが AdRGD ベクターであり、 α_v -integrin に親和性を有する RGD (Arg-Gly-Asp) 配列を Ad ベクターのカプシドタンパク質 (ファイバー領域) に表現させることによって感染域の拡大を図り、CAR 低発現の細胞・組織にも極めて効率よく遺伝子導入することが可能となった (Fig. 2)¹¹。実際に、CAR 低発現のマウス B16BL6 メラノーマ細胞並びにマウス骨髄由来 DC への AdRGD ベクターによる遺伝子導入効率を従来型 Ad と比較してみると、Fig. 3 に示すように従来型 Ad ベクターでは両細胞への遺伝子導入効率は 20% にも満たないレベルであったのに対して、AdRGD ベクターでは 90% 以上もの効率で外来遺伝子を発現させることができた¹²⁻¹⁴。そこで、種々のケモカイン遺伝子あるいはケモカインレセプター遺伝子の発現カセットを搭載した AdRGD

ベクターを構築し、これらを用いた免疫細胞の体内動態制御法の確立と癌免疫療法への応用を試みた。

4. 免疫エフェクター細胞の腫瘍集積性の増強

免疫細胞の腫瘍組織内浸潤率と癌患者の予後を調査した結果から、原発腫瘍に多くの免疫細胞が集積している症例では、治療後の再発あるいは転移が高率に抑制されるという相関が報告されており¹⁵⁻¹⁷、免疫系による腫瘍細胞認識を促進させる方法論の開発が癌の治療率の向上にいかにか重要であるかをうかがわせる。また、T 細胞、特に細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が腫瘍免疫における最も強力なエフェクター細胞であると広く考えられており¹⁸⁻²⁰、これまでの癌免疫療法研究によって腫瘍特異的 CTL を効率よく誘導できる様々なワクチン戦略が提案されている。しかし、腫瘍細胞のケモカイン産生レベルは正常細胞よりも低いことや²¹、腫瘍組織に新生された血管内皮細胞には接着分子がほとんど発現していない²²などの理由から、癌免疫療法によって活性化された免疫エフェクター細胞は一般的に腫瘍組織内に十分に集積することができない。したがって、免疫細胞の局所への遊走・浸潤を制御するケモカインを利用することによって腫瘍組織内への免疫細胞の集積を増強しようとする試みは、効果的な癌免疫療法の開発において非常に魅力的な手段であると言

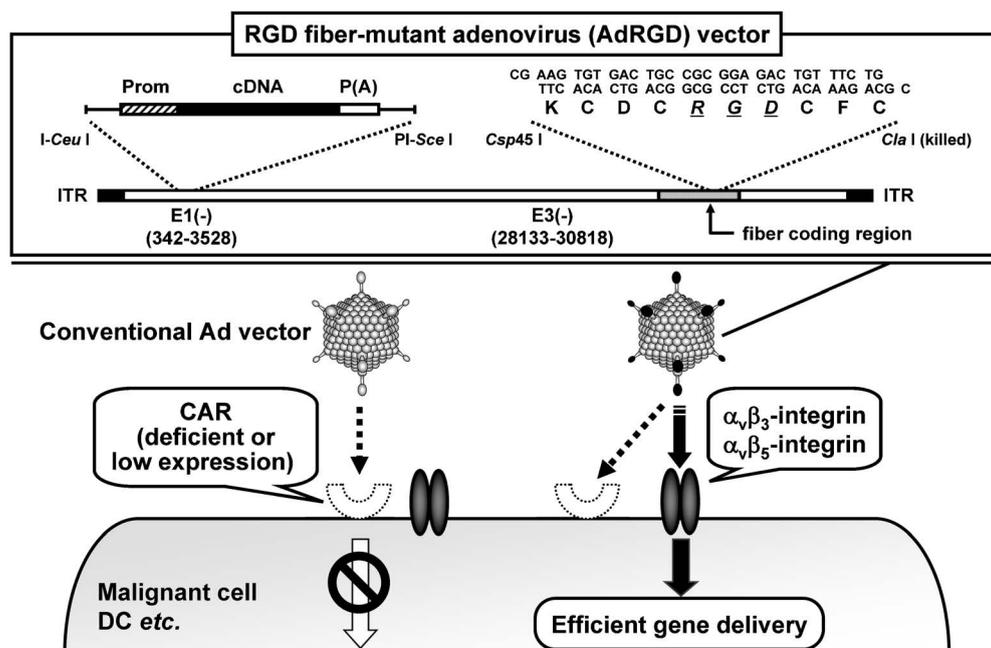


Fig. 2. Construct and Tropism of RGD Fiber-mutant Adenovirus (AdRGD) Vector

ITR: inverted terminal repeat, Prom: promoter, P(A): polyadenylation signal, CAR: coxsackievirus-adenovirus receptor.

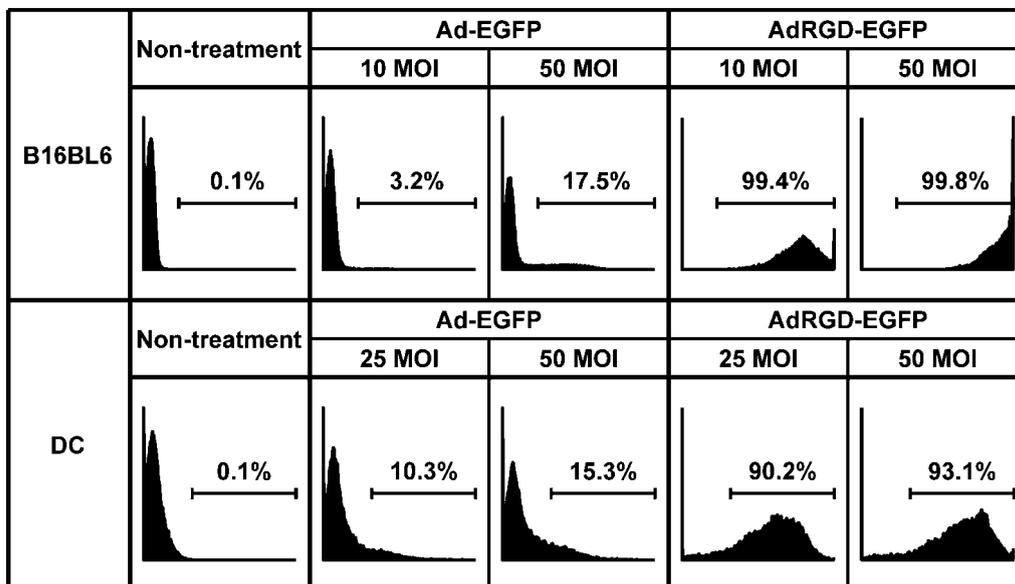


Fig. 3. EGFP Expression in Murine B16BL6 Cells and DCs Transduced with EGFP cDNA by AdRGD or Conventional Ad Vector
 B16BL6 cells and DCs were transfected for 2 h with Ad-EGFP or AdRGD-EGFP at the indicated MOI (multiplicity of infection). Two days later, EGFP expression in cells was evaluated by flow cytometric analysis. The % value expresses the percentage of EGFP-positive cells.

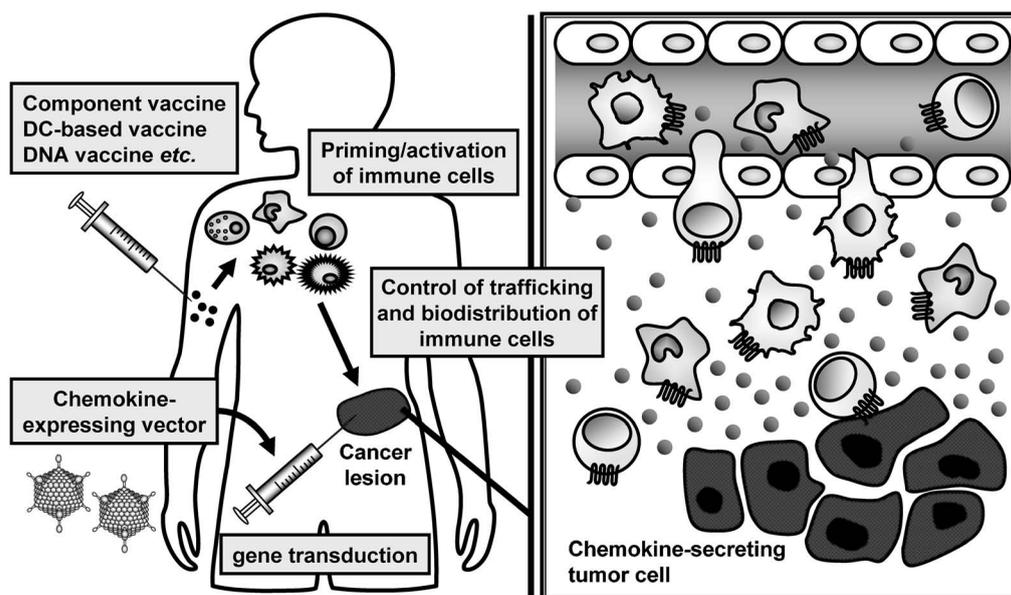


Fig. 4. Conceptual Representation of *In vivo* Chemokine Gene Transduction to Manipulate Immune Cell Trafficking and Biodistribution in Cancer Immunotherapy

えよう (Fig. 4). そこで筆者らは、目的遺伝子の搭載が簡便であるとともに、広範な種類の腫瘍細胞に対して非常に効率よく遺伝子導入することができる AdRGD ベクターを駆使することによって、種々の免疫系ケモカインを発現させた腫瘍の免疫細胞浸潤度と治療効果との連関を網羅的に解析した。²³⁻²⁷⁾ それらの中から本稿では、マウス B16BL6

腫瘍モデルにおいて CCL17 及び CCL19 を発現する AdRGD ベクター (AdRGD-CCL17, AdRGD-CCL19) を用いた検討結果について紹介する。

まず、マウスの腹部皮内に生着させた B16BL6 腫瘍に AdRGD-CCL17 あるいは AdRGD-CCL19 を投与し、2 日後における免疫細胞の腫瘍実質内浸潤度を免疫組織染色により解析したところ (Fig. 5

(A), AdRGD-CCL19 投与腫瘍においては, コントロールベクター (ルシフェラーゼ発現 AdRGD ベクター; AdRGD-Luc) を投与した腫瘍と比較して CD3⁺ T 細胞の著しい浸潤増加が観察された. また, これら T 細胞のサブセット解析の結果から, AdRGD-CCL19 の投与によって腫瘍内には CD4⁺ ヘルパー T 細胞と CD8⁺ CTL がともに集積していることも判明した. 一方, AdRGD-CCL17 を投与した腫瘍ではコントロール群と比較して有意な T 細胞数の増加を認めなかった. このように腫瘍組織への T 細胞動員能が大きく異なる CCL17 と CCL19 ではあるが, Fig. 5 (B) に示すように AdRGD-CCL17 あるいは AdRGD-CCL19 の投与は B16BL6 腫瘍の増殖をコントロール群と比較してわずかに遅延させたのみであり, ケモカイン両群間の抗腫瘍効果に明らかな差は認められなかった. 筆者らはこの一見矛盾する結果に対して, 腫瘍組織に発現させた CCL19 によって動員される T 細胞が腫瘍細胞を排除する活性に乏しい未感作 (naive) な状態であったために, 効果的な腫瘍退縮が観察されなかったのではないかと考えた. 事実, CCL19 に対応するケモカインレセプターである CCR7 は, T 細胞サブ

セットの中でも主に naive T 細胞に発現することが知られており (Table 1), また活性化 T 細胞の細胞傷害分子の 1 つであるパーフォリンに対する免疫組織染色において, CCL19 により腫瘍内に動員された T 細胞の大半がパーフォリン陰性であることを確認している. したがって, ケモカイン遺伝子の腫瘍内導入に基づいた免疫細胞の腫瘍内浸潤増強 (Cell Delivery System) を癌免疫療法の開発に活かすためには, 免疫細胞を腫瘍特異的に活性化し得るワクチン戦略との併用によってこそ真価が発揮されるであろうと考えられた.

そこで, B16BL6 腫瘍の TAA の 1 つである gp100 の遺伝子を導入した DC ワクチン (gp100/DC) を免疫投与することによって, gp100 特異的 CTL が感作・活性化された状態の担癌マウスを作成し, その後ケモカイン発現 AdRGD ベクターを腫瘍内投与した際の治療効果とそのメカニズムを解析した. Figure 6 (A) に示すように, B16BL6 腫瘍を接種したマウスに gp100/DC を皮内投与し, その後 PBS あるいはコントロールベクターを腫瘍内投与した群では効果的な腫瘍退縮は認められず, この結果はひとたび増殖を始めた B16BL6 腫瘍を

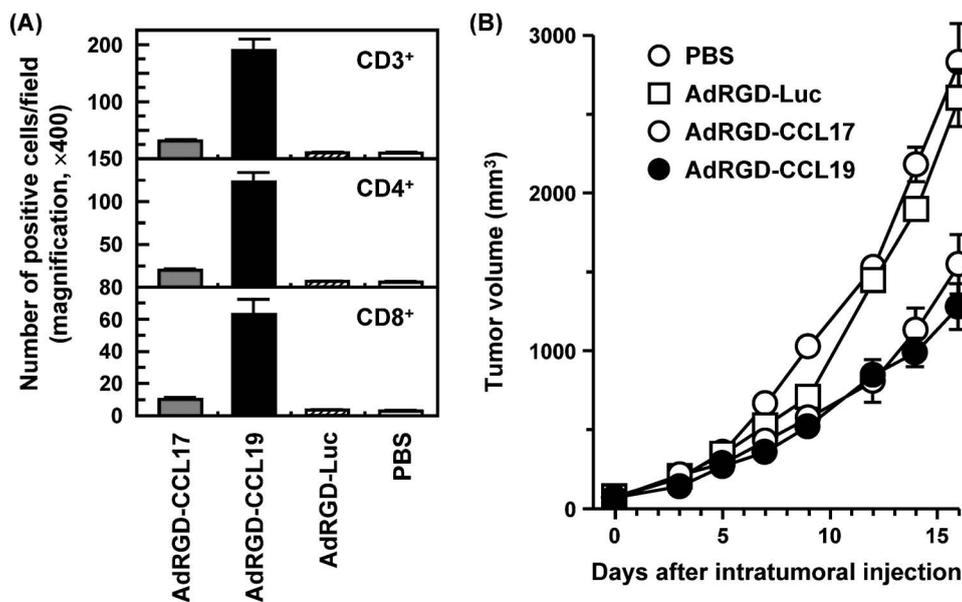


Fig. 5. T Cell Infiltration (A) and Growth Suppression (B) in B16BL6 Tumors Injected with AdRGD-CCL17 or AdRGD-CCL19

B16BL6 cells were intradermally inoculated into the right flank of C57BL/6 mice at 4×10^5 cells/mouse. One week later, tumors (5–7 mm in diameter) were injected with AdRGD-CCL17, AdRGD-CCL19, or AdRGD-Luc (control vector) at 3×10^8 PFU (plaque-forming unit). PBS was administered to control tumors. (A): On day 2 after intratumoral injection, immunohistochemical staining against CD3 (pan-T marker), CD4 (helper T marker), and CD8 (CTL marker) was performed using frozen tumor sections. Then, the number of positive cells in tumor parenchyma was assessed by counting six fields per specimen under $\times 400$ magnification. (B): The tumor sizes were assessed using microcalipers, and the tumor volume was calculated using the following formula: (tumor volume [mm³]) = (major axis [mm]) \times (minor axis [mm])² \times 0.5236.

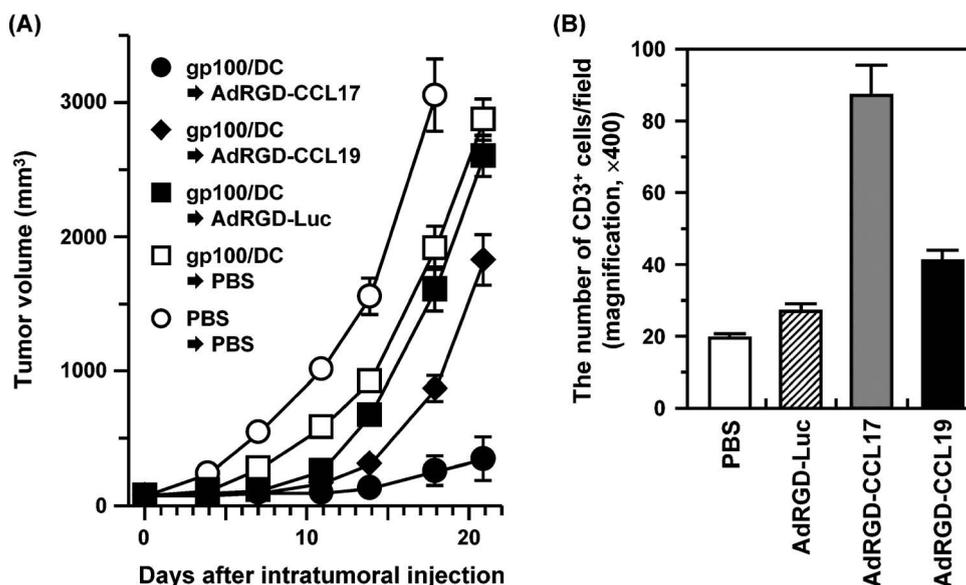


Fig. 6. Growth Suppression (A) and T Cell Infiltration (B) in B16BL6 Tumors of Mice Treated with the Combination of gp100/DC-immunization and Intratumoral Injection of Chemokine-expressing AdRGD Vector

B16BL6 cells were intradermally inoculated into the right flank of C57BL/6 mice at 4×10^5 cells/mouse. One day later, the mice were intradermally immunized in the left flank with 10^6 DCs transduced with AdRGD-gp100 at 25 MOI. Then, the tumors (5–7 mm in diameter) were injected with AdRGD-CCL17, AdRGD-CCL19, or AdRGD-Luc (control vector) at 3×10^8 PFU. PBS was administered to control tumors of mice immunized with gp100/DCs or PBS. (A): The tumor volume was assessed as described in the legend to Fig. 5. (B): In mice immunized with gp100/DCs, immunohistochemical staining against CD3 to determine T cells was performed with frozen tumor sections on day 2 after intratumoral injection with each AdRGD vector or PBS. The number of CD3-positive cells in tumor parenchyma was assessed by counting six fields per specimen under $\times 400$ magnification.

gp100/DC の単回免疫投与だけで抑制することは非常に困難であることを示している。これに対して、gp100/DC 免疫後に AdRGD-CCL17 を腫瘍内投与した場合には、極めて強力な腫瘍増殖抑制効果が観察され、AdRGD-CCL17 投与 2 日後における腫瘍組織にはコントロール群と比較して顕著な CD3⁺ T 細胞の浸潤増加が検出された (Fig. 6 (B))。一方、gp100/DC を免疫投与した担癌マウスに AdRGD-CCL19 を腫瘍内投与した場合には、腫瘍増殖のわずかな遅延が観察されたのみであり、腫瘍浸潤 T 細胞数もコントロール群と比較して若干の増加を認めるのみであった。これらの結果は、Fig. 5 に示したケモカイン発現 AdRGD ベクターの腫瘍内投与だけを施した際の抗腫瘍効果及び腫瘍浸潤 T 細胞数の結果とは全く異なる傾向を示し、免疫細胞のケモカイン応答性 (ケモカインレセプターの発現パターン) が自身の分化・活性化とともに変化することを考え合わせると、有効な治療プロトコルを確立するためには腫瘍内に発現させるケモカインの種類を併用する癌免疫療法の特性 (宿主免疫細胞の活性化状態) を考慮して選択する必要があることを示唆している。また、ケモカイン遺伝子を導入した腫

瘍内へ集積する免疫細胞のサブセット並びに細胞数を、これまでに報告されている *in vitro* 解析に基づいた特定のケモカインと標的細胞との対応関係から予測することは極めて困難であり、これらは、発現したケモカインの作用・腫瘍組織の環境要因・集積した免疫細胞による二次的な作用・宿主免疫系の活性化状態などを包含した複合的イベントとして決定されると考えられた。したがって、ケモカインを応用した有効な癌免疫療法を開発するためには、腫瘍組織内への免疫細胞の集積性増強ばかりでなく、腫瘍局所に集積した免疫細胞を腫瘍特異的に活性化するためのサイトカイン療法や細胞療法の併用をも視野に入れた取り組みが必要であろうと思われる。

以上に紹介した筆者らの研究成果は、ケモカインを利用した腫瘍浸潤免疫細胞の増強 (Cell Delivery System) が癌免疫療法の有効性改善に大いに貢献できるアプローチであることを実証するものであり、今後、免疫系におけるケモカイン-ケモカインレセプター連関のより詳細な解明に伴って、免疫エフェクター細胞の緻密な体内動態制御を導入した有効かつ安全な癌免疫療法の開発に結びついていくものと期待している。

5. DC ワクチンのリンパ組織集積性の増強

骨髄幹細胞に由来する DC は生体内に広く分布しており、外来性の病原体や内在性の変異細胞（癌細胞・ウイルス感染細胞）断片を捕食すると、それらに含まれるタンパク抗原をペプチドにまでプロセッシングして細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子上に提示する。さらに、輸入リンパ管を介して最寄りのリンパ組織へと遊走し、リンパ組織に存在する T 細胞を抗原特異的に感作・活性化することにより病原体や変異細胞の排除に働く CTL を増幅する。^{28,29} DC をワクチン担体として利用する癌免疫療法は、患者から単離した DC 前駆細胞を *in vitro* 培養系において DC へと増殖・分化させ、TAA 導入処理を施した DC を患者に投与することによって、DC が誘発する一連の免疫応答の活性化に基づいた癌治療を達成しようとするものである（Fig. 7）。本療法の一部のプロトコールについては既に臨床試験も開始されているが、残念ながら劇的な有効性は報告されておらず、現在、DC ワクチンの免疫誘導能を最大限に発揮させる調製法の探索が筆者らを含めて多くの研究グループによって進められている。³⁰⁻³⁵ 前述の通り AdRGD ベクターは、DC に対しても他のベクターシステムと比較して圧倒的に優れる遺伝子導入効率を有することから、筆者らは、AdRGD ベクターを応用して TAA

遺伝子を効率よく導入した DC ワクチンの創製が、これまで DC に対する低い TAA 導入効率によって制限されていた DC 癌免疫療法の有効性を飛躍的に改善できることを報告してきた。^{12,32,33} また、AdRGD ベクターは DC への抗原遺伝子デリバリーのみならず、従来の遺伝子導入法では困難とされてきた種々の機能修飾を目的とする遺伝子改変 DC ワクチンの創製をも可能とする。³⁴ したがって、AdRGD ベクターを用いた DC への効率的な遺伝子導入は、臨床的に最適な DC ワクチンを設計・開発するためのブレークスルー的な手法になり得ると期待される。このコンセプトに基づいて筆者らは、ケモカインレセプター遺伝子を搭載した AdRGD ベクターを応用することにより、生体に投与する DC ワクチンの体内動態を操作し、より効果的な DC 癌免疫療法の開発へと発展させるという独自のアイデアを実践している。³⁶ その一例として、CC ケモカインレセプター 7 (CCR7) 遺伝子を導入することでリンパ組織移行性を増強した DC ワクチンの創製とその癌免疫療法における有用性を紹介する。

生体内に存在する DC の末梢組織からリンパ組織への遊走は、抗原認識・捕捉や炎症反応に伴って成熟分化した DC に CCR7 が一過性に発現し、リンパ組織から構成的に産生・分泌されている CCL21 に応答することによって誘発されるというコンセン

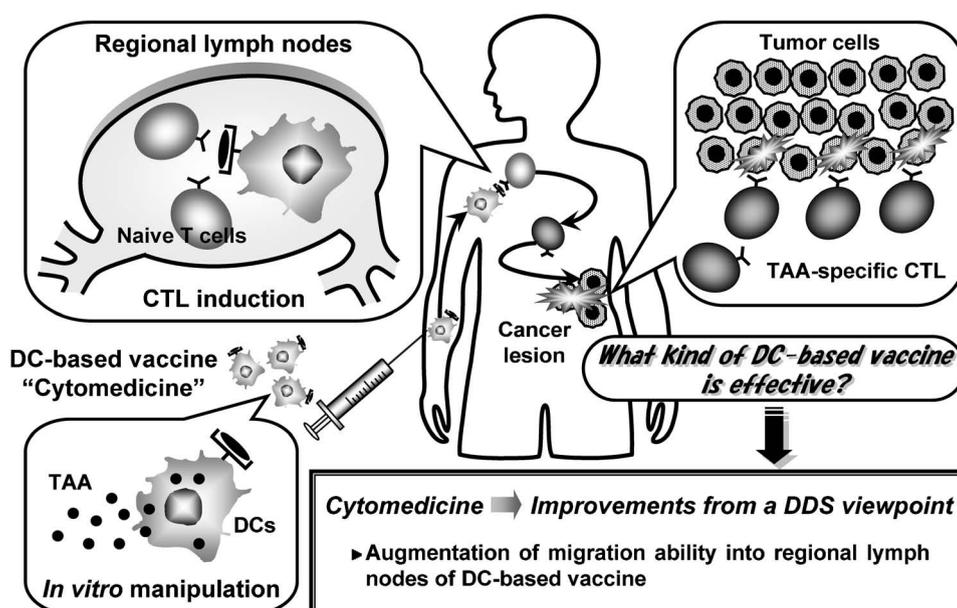


Fig. 7. Schematic Representation of DC-based Cancer Immunotherapy

サスが得られている.^{37,38)}したがって、抗原導入とともに CCR7 を十分に発現させた DC ワクチンは、生体に投与したあとに積極的にリンパ組織へと移行して免疫系を効率よく活性化できることが強く予測され、この“リンパ組織指向性 DC”ともいうべき新たなワクチンの創製手段として DC への CCR7 遺伝子導入が挙げられる (Fig. 8). そこでまず、CCR7 遺伝子搭載 AdRGD ベクター (AdRGD-CCR7) を用いて遺伝子導入した DC (CCR7/DC) における CCR7 発現レベルを flow cytometry により解析したところ、90%以上の DC で細胞表面に豊富な CCR7 タンパク発現が確認された (Fig. 9 (A)). また、*in vitro* chemotaxis assay において CCR7/DC は CCL21 の濃度に依存した遊走活性の上昇を示したことから、遺伝子導入によって細胞膜上に強制発現させた CCR7 タンパクは、CCL21 濃度を感知して DC に遊走刺激を伝える本来の生物活性を保持したケモカインレセプターであることも判明した (Fig. 9(B)). さらに、CCR7/DC をマウスの側腹部皮内に投与し、48 時間後に投与部位から所属リンパ節 (鼠径部リンパ節) へと遊走した DC 数を解析したところ、コントロール DC と比較して 5—15 倍高いリンパ節への集積が認められた (Fig.

9(C)). これらの結果は、AdRGD ベクターを応用した DC へのケモカインレセプター遺伝子の導入によって、DC のケモカイン応答性並びに生体に投与した際の体内挙動を改変できることを示すとともに、CCR7/DC が、DC 免疫療法における効率のよい免疫エフェクター細胞の活性化と全身への迅速なエフェクター細胞の供給という観点から、非常に優れたワクチン担体として機能することを示唆するものである.

そこで、CCR7/DC の優れたリンパ組織集積性と DC 免疫療法の有効性改善との関連性を検証するために、メラノーマ関連抗原 (gp100) 遺伝子と CCR7 遺伝子とを共導入した DC (gp100+CCR7/DC) を調製し、マウス B16BL6 メラノーマモデルにおけるワクチン機能を解析した (Fig. 10(A)). Mock DC あるいは CCR7/DC を投与した群と比較して、gp100 遺伝子のみを導入した DC (gp100/DC) をワクチン投与したマウスにおいては攻撃接種した B16BL6 腫瘍の顕著な増殖遅延が観察され、さらに gp100+CCR7/DC を免疫した群においてはより強力な腫瘍増殖抑制効果が認められた。また、これらの遺伝子導入 DC ワクチンを投与したマウスにおける CTL 活性を比較したところ、gp100

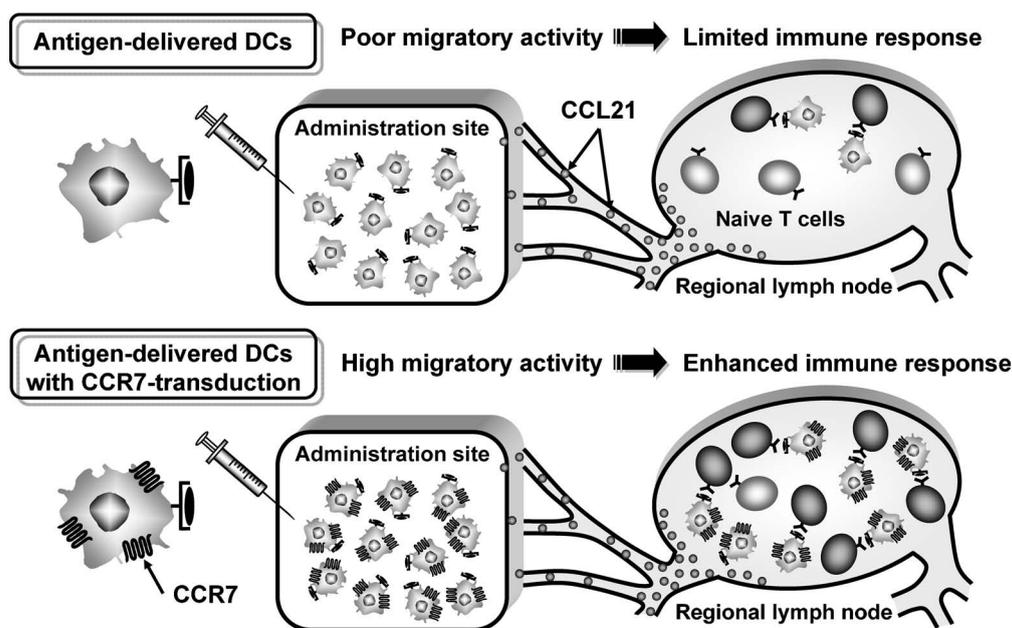


Fig. 8. Conceptual Representation of “Lymphoid Tissue-directivity DC” Vaccine Created by CCR7 Gene-transduction

The migration of DCs from administration site to regional lymph nodes is critical for the priming of T cells in DC-based immunotherapy. However, the poor migratory ability of antigen-delivered DCs limits the induction of a potent immune response. On the other hand, DCs transduced efficiently with the CCR7 gene may adequately respond to CCL21, which is constitutively released from lymphoid tissue, and acquire migratory ability to lymph nodes. Consequently, antigen-delivered DCs with CCR7 transduction can enhance the initiation and amplification of the T cell-dependent immune response.

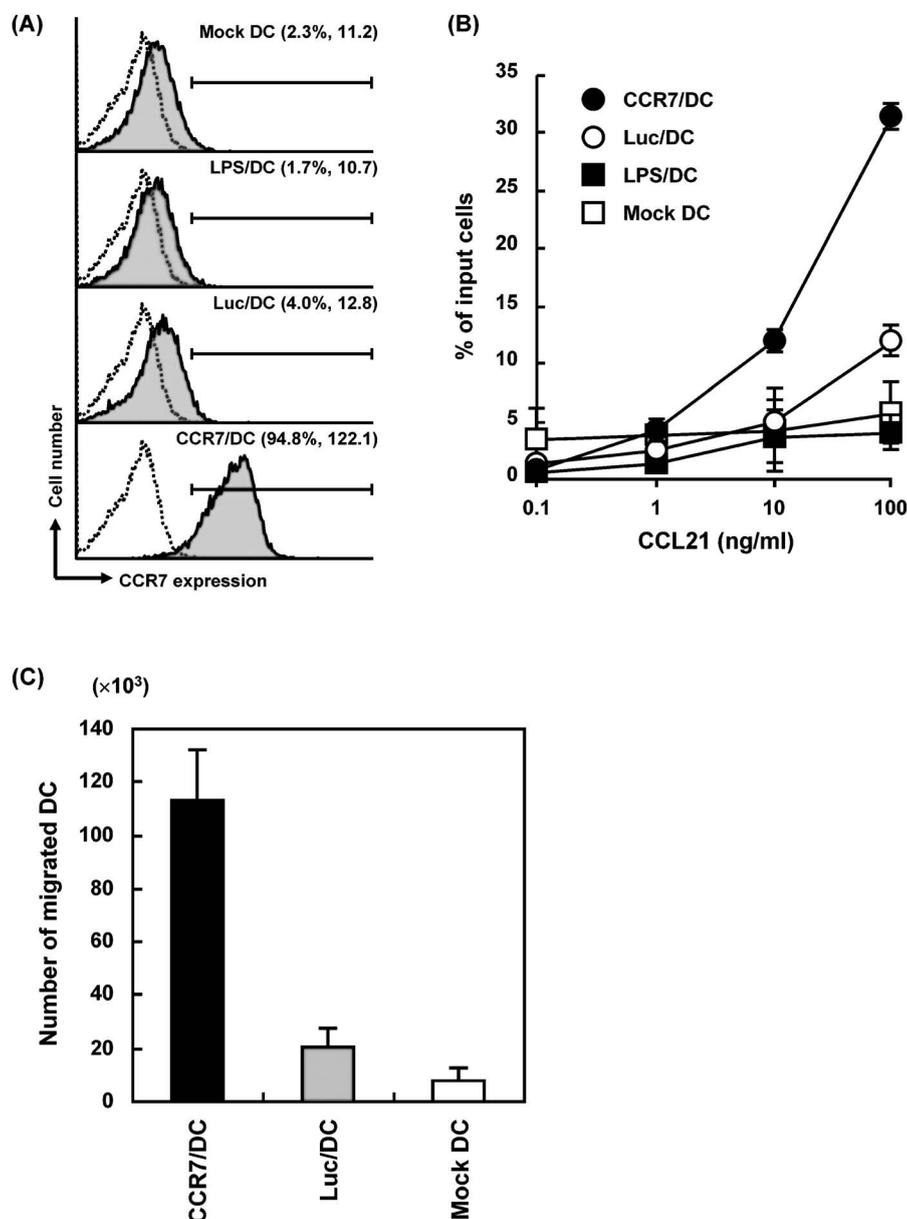


Fig. 9. Analysis for CCR7 Expression Levels (A), *In vitro* Chemotaxis (B), and *In vivo* Migration (C) of CCR7/DCs

DCs were transduced with AdRGD-CCR7 or AdRGD-Luc at 50 MOI. These transduced cells (CCR7/DC and Luc/DC), LPS/DCs stimulated with 1 μ g/ml lipopolysaccharide, and mock DCs were cultured for 24 h. (A): Flow cytometric analysis was performed by using anti-mouse CCR7 antibody. Negative control (dotted line) represents mock DCs stained by second antibody alone. The % value and the numerical value indicated in the upper part of each panel express % of gated cells and mean fluorescence intensity (MFI), respectively. (B): *In vitro* chemotaxis assay was performed by a Chemotaxicell-24 installed on 24-well culture plate. CCL21 solution was added in the lower compartment at the indicated concentration, and DCs were placed in the upper chamber at 10^6 cells. After 4 h-incubation, the number of cells that migrated to the lower compartment was counted. The chemotactic activity was expressed in terms of the percentage of the input cells calculated by the following formula: (% of input cells) = (the number of migrated cells) / (the number of cells placed in Chemotaxicell-24 [10^6 cells]) $\times 100$. (C): DCs derived from EGFP-transgenic mice were transduced with AdRGD-CCR7 or AdRGD-Luc at 50 MOI, and then were intradermally injected into the left flank of C57BL/6 mice at 2×10^6 cells/ 50μ l. Two days later, the draining inguinal lymph nodes were collected from these mice, and a single cell suspension was prepared. The abundance of EGFP-positive DCs was assessed by flow cytometric analysis acquiring 500000 events. The number of DCs that had migrated into draining lymph nodes was calculated by multiplying the EGFP-positive DC-frequency by the total number of isolated lymph node cells.

+ CCR7/DC を投与したマウスの脾細胞中には gp100/DC 投与群を上回る B16BL6 特異的細胞傷害活性が検出された (Fig. 10(B)). これらの結果は、CCR7-CCL21 連関を利用した DC ワクチンへの積極的なリンパ組織移行能の付与 (Cell Delivery Sys-

tem) が、細胞医薬としての DC ワクチンの生物学的利用能を向上させることを意味しており、DC 免疫療法の臨床応用実現に貢献する有益な基礎情報を提供できるものと考えている。

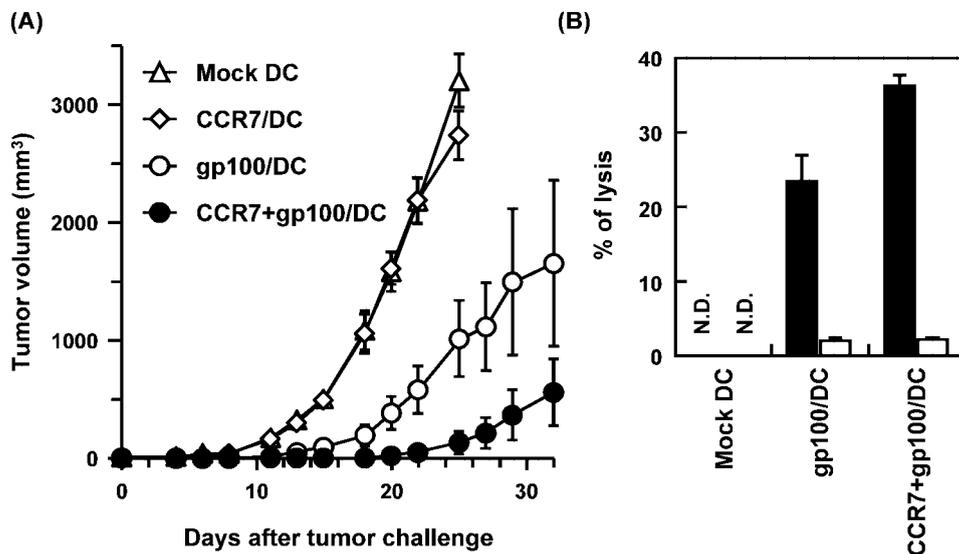


Fig. 10. Anti-B16BL6 Tumor Efficacy (A) and CTL Activity (B) in Mice Immunized with DCs Cotransduced with CCR7 and gp100 Gene by AdRGD

CCR7/DCs, gp100/DCs, and gp100+CCR7/DCs were prepared using corresponding AdRGD vectors at 25 MOI, and then cultured for 24 h. C57BL/6 mice were immunized by intradermal injection of 5×10^5 transduced DCs or mock DCs into the left flank. (A): One week later, 4×10^5 B16BL6 cells were inoculated into the right flank of the mice, and then the tumor volume was assessed as described in the legend to Fig. 5. (B): At 1 week after immunization, non-adherent splenocytes were prepared from these mice, and then were re-stimulated *in vitro* for 5 days with IFN- γ -stimulated and mitomycin C-inactivated B16BL6 cells. A cytolytic assay using the re-stimulated splenocytes (effector cells) was performed against IFN- γ -stimulated B16BL6 (closed column) or EL4 cells (open column) at effector/target ratio at 25. N.D.: not detectable.

6. おわりに

近年の免疫学及び分子生物学の著しい進展に伴い、免疫系を構築する細胞や分子の情報ネットワークが詳細に解明されつつあり、さらに DC や CTL など免疫機能細胞を医薬品として捉えた細胞療法の研究が精力的に推し進められている。しかし、これら細胞医薬自身の体内動態制御あるいは細胞医薬により活性化された免疫細胞の体内動態制御によって治療効果の改善を目指した研究は、いまだ緒に就いたばかりであり、癌免疫療法へと展開するために必要とされる基礎的な情報さえ不足しているのが現状である。筆者らは、本稿で紹介したケモカイン-ケモカインレセプター連関を利用した Cell Delivery System のみならず、アポトーシス抑制機構を利用した細胞医薬の生体内安定性（生存性）の向上、抗原-抗体反応を利用した細胞医薬への標的指向性の付与、といった様々な Cell Delivery System の開発を試みており、これらが免疫療法に留まらず、細胞機能によって疾病治療を達成しようとする次世代医療（再生療法、*ex vivo* 遺伝子治療など）の現在の治療限界を切り崩す有望な方法論となるものと考えている (Fig. 11)。これら次世代医療の臨床応用に向けてはまだまだ長い道のりが待っており、治療法

の理論的根拠、有効性・安全性の評価基準、遺伝子医薬や細胞医薬の性能・品質管理など、従来の低分子有機化合物を用いた薬物治療がなし遂げてきたような厳しい基準をクリアしていくことが要求される。現在はこれら多岐に渡る検討課題を個々に克服している段階であるが、筆者らの Cell Delivery System がより確かな次世代医療を実現するための一助となることを期待する。

謝辞 本研究の遂行に有益な御助言及び多大な御支援を賜りました水口裕之先生（医薬基盤研究所基盤研究部遺伝子導入制御プロジェクトプロジェクトリーダー、大阪大学大学院薬学研究科招聘助教授）、山本 昌先生（京都薬科大学薬剤学教室教授）、並びに藤田卓也先生（京都薬科大学薬剤学教室助教授）を始めとする共同研究者の先生方、及び実験に御協力頂きました大学院生・学生諸氏に厚く御礼申し上げます。なお本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金、厚生労働省科学研究費補助金、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業、薬学研究奨励財団研究助成金、佐川がん研究助成振興財団研究助成、千里ライフサイエンス振興財団奨励研究助成の援助の下に行われたことを記して感謝申

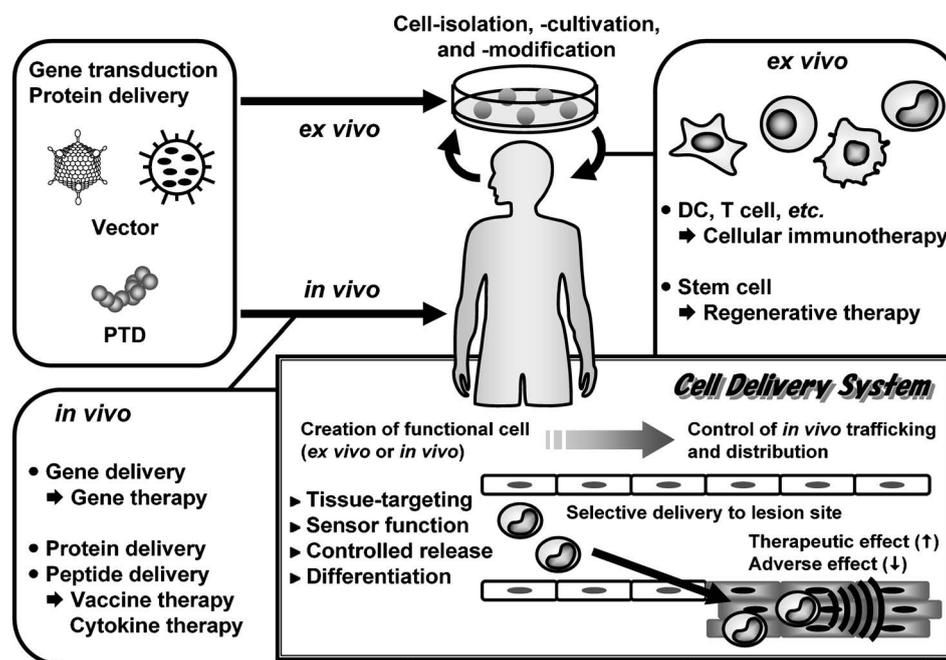


Fig. 11. Conceptual Illustration of Cell Delivery System in Next Generation Medical Treatment

し上げます。

REFERENCES

- Esche C., Shurin M. R., Lotze M. T., *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **1**, 72–81 (1999).
- Kupiec-Weglinski J. W., Austyn J. M., Morris P. J., *J. Exp. Med.*, **167**, 632–645 (1988).
- Lappin M. B., Weiss J. M., Delattre V., Mai B., Dittmar H., Maier C., Manke K., Grabbe S., Martin S., Simon J. C., *Immunology*, **98**, 181–188 (1999).
- Martin-Fontecha A., Sebastiani S., Hopken U. E., Ugucioni M., Lipp M., Lanzavecchia A., Sallusto F., *J. Exp. Med.*, **198**, 615–621 (2003).
- Yoshie O., Imai T., Nomiya H., *Adv. Immunol.*, **78**, 57–110 (2001).
- Zlotnik A., Yoshie O., *Immunity*, **12**, 121–127 (2000).
- Bokoch G. M., *Blood*, **86**, 1649–1660 (1995).
- Murphy P. M., *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 593–633 (1994).
- Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L., Finberg R. W., *Science*, **275**, 1320–1323 (1997).
- Wickham T. J., Mathias P., Cheres D. A., Nemerow G. R., *Cell*, **73**, 309–319 (1993).
- Mizuguchi H., Kay M. A., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 2013–2017 (1999).
- Okada N., Tsukada Y., Nakagawa S., Mizuguchi H., Mori K., Saito T., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 173–179 (2001).
- Okada N., Masunaga Y., Okada Y., Iiyama S., Mori N., Tsuda T., Matsubara A., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., *Cancer Gene Ther.*, **10**, 421–431 (2003).
- Okada Y., Okada N., Nakagawa S., Mizuguchi H., Takahashi K., Mizuno N., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 436–444 (2002).
- Eerola A. K., Soini Y., Paakko P., *Clin. Cancer Res.*, **6**, 1875–1881 (2000).
- Yin X. Y., Lu M. D., Lai Y. R., Liang L. J., Huang J. F., *Hepatogastroenterology*, **50**, 1281–1284 (2003).
- Fukunaga A., Miyamoto M., Cho Y., Murakami S., Kawarada Y., Oshikiri T., Kato K., Kurokawa T., Suzuoki M., Nakakubo Y., Hiraoka K., Itoh T., Morikawa T., Okushiba S., Kondo S., Katoh H., *Pancreas*, **28**, e26–e31 (2004).
- Naito Y., Saito K., Shiiba K., Ohuchi A.,

- Saigenji K., Nagura H., Ohtani H., *Cancer Res.*, **58**, 3491–3494 (1998).
- 19) Shankaran V., Ikeda H., Bruce A. T., White J. M., Swanson P. E., Old L. J., Schreiber R. D., *Nature*, **410**, 1107–1111 (2001).
- 20) Zhang L., Conejo-Garcia J. R., Katsaros D., Gimotty P. A., Massobrio M., Regnani G., Makrigiannakis A., Gray H., Schlienger K., Liebman M. N., Rubin S. C., Coukos G., *N. Engl. J. Med.*, **348**, 203–213 (2003).
- 21) Paillard F., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 695–696 (1999).
- 22) Dvorak H. F., *N. Engl. J. Med.*, **315**, 1650–1659 (1986).
- 23) Gao J.-Q., Tsuda Y., Katayama K., Nakayama T., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Cancer Res.*, **63**, 4420–4425 (2003).
- 24) Okada N., Gao J., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 68–76 (2004).
- 25) Gao J.-Q., Alexandre L. S., Tsuda Y., Katayama K., Eto Y., Sekiguchi F., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakayama T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Pharmazie*, **59**, 238–239 (2004).
- 26) Gao J.-Q., Sugita T., Kanagawa N., Iida K., Okada N., Mizuguchi H., Nakayama T., Hayakawa T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1066–1070 (2005).
- 27) Okada N., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Nakagawa S., Fujita T., Yamamoto A., *Cancer Gene Ther.*, **13**, 393–405 (2006).
- 28) Banachereau J., Steinman R. M., *Nature*, **392**, 245–252 (1998).
- 29) Mellman I., Steinman R. M., *Cell*, **106**, 255–258 (2001).
- 30) Okada N., Saito T., Mori K., Masunaga Y., Fujii Y., Fujita J., Fujimoto K., Nakanishi T., Tanaka K., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1527**, 97–101 (2001).
- 31) Okada N., Tsujino M., Hagiwara Y., Tada A., Tamura Y., Mori K., Saito T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Br. J. Cancer*, **84**, 1564–1570 (2001).
- 32) Okada N., Saito T., Masunaga Y., Tsukada Y., Nakagawa S., Mizuguchi H., Mori K., Okada Y., Fujita T., Hayakawa T., Mayumi T., Yamamoto A., *Cancer Res.*, **61**, 7913–7919 (2001).
- 33) Okada N., Masunaga Y., Okada Y., Mizuguchi H., Iiyama S., Mori N., Sasaki A., Nakagawa S., Mayumi T., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., *Gene Ther.*, **10**, 1891–1902 (2003).
- 34) Okada N., Iiyama S., Okada Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Cancer Gene Ther.*, **12**, 72–83 (2005).
- 35) Kawamura K., Kadowaki N., Suzuki R., Udagawa S., Kasaoka S., Utoguchi N., Kitawaki T., Sugimoto N., Okada N., Maruyama K., Uchiyama T., *J. Immunother.*, **29**, 165–174 (2006).
- 36) Okada N., Mori N., Koretomo R., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Gene Ther.*, **12**, 129–139 (2005).
- 37) Gunn M. D., Kyuma S., Tam C., Kakiuchi T., Matsuzawa A., Williams L. T., Nakano H., *J. Exp. Med.*, **189**, 451–460 (1999).
- 38) Förster R., Schubel A., Breitfeld D., Kremmer E., Renner-Meller I., Wolf E., Lipp M., *Cell*, **99**, 23–33 (1999).