HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	KALAペプチド修飾ナノ粒子を基盤としたワクチン技術の開発とがん免疫療法への応用［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	三浦，尚也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第13179号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/69963
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Naoya_Miura_abstract.pdf，論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　氏　名　　三浦　尚也

学 位 論 文 題 名

KALA ペプチド修飾ナノ粒子を基盤としたワクチン技術の開発とがん免疫療法への応用

がん免疫療法は、生体内に備わる免疫系を人為的に活性化する事でがんを治療する手法であり、第 4 のがん治療法として開発が進められている。特に免疫チェックポイント阻害剤は、高い効果を示し、がん免疫療法の有用性を広く知らしめた薬剤である。一方で奏効率は未だ改善の余地があり、免疫チェックポイント阻害剤が初めて認可された悪性黒色腫でも 40%程度である。奏効率を高める戦略の 1 つとして、ワクチン技術との併用が期待されている。免疫チェックポイント阻害剤の 1 種である抗 PD-1/L1 抗体は、腫瘍細胞と腫瘍細胞を攻撃する細胞障害性 T 細胞（Cytotoxic T-Lymphocyte: CTL）間の抑制機構を阻害する事から、腫瘍特異的な CTL が薬効発現に必要である事が提唱されている。すなわち、腫瘍特異的 CTL を誘導可能なワクチン技術の開発は、従来に増してがん免疫療法の発展に寄与すると考えられる。これを達成する 1 つの手法として、核酸ワクチンが挙げられる。本手法では抗原をコードする DNA や RNA を用いて、抗原タンパク質の導入をおこなう。この場合、抗原タンパク質は細胞質において発現するため、結果として、細胞性免疫が誘導されやすく、がんワクチンとしての有用性が高いと考えられている。一方で、核酸は巨大な分子量を有する水溶性分子である事から、単独での細胞への導入は困難である。従って、核酸を効率的に細胞へ、特にプロフェッショナル抗原提示細胞である樹状細胞へ導入可能なキャリアの開発は、がんに対するワクチン技術の開発に重要である。

当研究室で開発された、多機能性エンベロープ型ナノ構造体（Multi-functional Envelop-type Nano Device: MEND）は、核酸をポリカチオンで凝縮させコア粒子化し、その表面を脂質膜で覆う構造を持つ核酸キャリアである。これまでに中性条件下で α-helix 構造を有する KALA ペプチド（WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKA）を MEND 表面に修飾することで、樹状細胞株 JAWSII に対する遺伝子導入能と免疫活性化能を示す事が報告されてきた。一方で、プライマリー樹状細胞への遺伝子導入能・免疫活性化能やがんワクチンとしての機能については未だ明らかとなっていなかった。上を踏まえて本研究では、KALA ペプチド修飾ナノ粒子を基盤とした、樹状細胞への遺伝子導入キャリアの開発と、がん免疫療法への応用を試みた。第一章では、マウス骨髄細胞より分化誘導した、マウス骨髄由来樹状細胞（BMDC）を用い、樹状細胞株である JAWSII において得られた遺伝子導入能、免疫活性化能について検証した。また、免疫活性化機構の分子メカニズムの解明、及びモデル抗原であるオボアルブミン（OVA）を用いた樹状細胞ワクチンとしての応用可能性を検討した。続いて第二章では、モデル抗原ではなく、実際にヒト臨床で用いられる抗原を用いた治療的な抗腫瘍効果を得るため、より発展的なメッセンジャーRNA

（mRNA）を用いた mRNA ワクチンの開発を試みた。その過程で、mRNA ワクチンのアジュバントとして適切な分子種の選定をおこない、ヒト実弾抗原である NY-ESO-1 に対する治療的な抗腫瘍効果の検討をおこなった。

第 1 章ではまず、マウスプライマリー樹状細胞である BMDC へ、KALA-MEND により CpG 配列を含まない pDNA を導入する事で、効率的な遺伝子導入と多岐に渡るサイトカイン・ケモカインの産生が誘導される事を明らかとした。KALA-MEND のサイトカイン産生に必要な構成要素について検討をおこなったところ、KALA ペプチドに加え、高膜融合性脂質や pDNA（長鎖 DNA）の必要性が明らかとなった。また、KALA-MEND は樹状細胞内で、効率的な酸性コンパートメントからの脱出を達成していた。これらの知見から、樹状細胞の活性化には、細胞質内の DNA センサーが寄与している可能性が考えられたため、阻害剤を用いてその検証をおこなったところ、STING/TBK1 経路や（AIM-2）インフラマソームの関与が示唆された。KALA-MEND にモデル抗原である OVA をコードする pDNA を内封し、BMDC へ導入する事で、MHC Class-I 分子を介した OVA の抗原ペプチドの提示が認められた。また、このような BMDC をマウスへ免疫することによって、OVA 特異的な CTL 活性、及び OVA 発現リンパ腫である E.G7-OVA に対する治療的な抗腫瘍効果を得る事に成功した。更に KALA-MEND の DNA ワクチンベクターとしての有用性を評価するため、ヒト臨床でも用いられるがん精巣抗原 NY-ESO-1 に対する検討をおこなった。しかしながら、NY-ESO-1 発現大腸がん細胞 CT26（CT26/NY-ESO-1）に対する予防的な抗腫瘍効果を得る事に成功したものの、CT26/NY-ESO-1 に対する治療的な抗腫瘍効果を得る事は出来なかった。

CT26/NY-ESO-1 に対する治療的な抗腫瘍効果を得るため、mRNA を用いた検討を第 2 章においておこなった。第 1 章で用いた KALA-MEND では mRNA の有用性を示す事が困難であったため、mRNA に適した新規 KALA 修飾ナノ粒子の設計をおこなった。その結果、KALA ペプチド修飾リポソームの表面に、静電的相互作用により mRNA を結合させた KALA-Lipoplex を設計・調製した。KALA-Lipoplex を用いて Luciferase をコードする mRNA を BMDC へ導入したところ、KALA-MEND や一般的に mRNA 導入に用いられるカチオン性脂質 DOTAP からなる Lipoplex に比べ、効率的に mRNA を導入可能である事が明らかとなった。また、KALA-Lipoplex を用いて、モデル抗原である OVA をコードする mRNA を導入する事で、効率的に OVA 特異的 CTL を誘導可能である事が明らかとなった。KALA-Lipoplex を用いて BMDC へ mRNA を導入した場合には、BMDC の免疫活性化はほとんど見られなかったことから、樹状細胞型 mRNA ワクチンに適したアジュバント分子の選定をおこなった。用いたアジュバントのうち、Poly(I:C)は導入量に応じて遺伝子発現活性が大きく減弱した事から、アジュバントとしての応用は困難であった。残りの 4 種のアジュバント、pDNA, CpG-ODN, tpRNA, MPLA について、NY-ESO-1 をコードする mRNA と BMDC へ共導入したところ、MPLA を共導入した BMDC の免疫により最も強力な CT26/NY-ESO-1 に対する治療的抗腫瘍効果を得る事に成功した。

以上の結果より、KALA ペプチド修飾ナノ粒子を基盤とした核酸キャリアは、樹状細胞型がんワクチンキャリアとして有用である事が示された。本研究により得られた成果は、樹状細胞型 DNA/RNA ワクチンのがん免疫療法への応用可能性を広げるものである。