

平成22年 6月 7日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591504

研究課題名（和文） 癌免疫遺伝子治療を目的とした遺伝子導入樹状細胞の品質評価システムの開発

研究課題名（英文） The development of the quality evaluation system of gene-modified dendritic cells for cancer immunotherapy and gene therapy

研究代表者

片野 尚子（KATANO HISAKO）

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50376620

研究成果の概要（和文）：ウイルスベクターを介してサイトカイン等の治療遺伝子を導入した樹状細胞は癌免疫療法の画期的な手法になると考えられているが、臨床試験薬としての遺伝子導入樹状細胞の品質を定めた公的な基準は存在せず、各実施機関の判断に任されているのが現状である。そこで我々は最終産物である遺伝子導入樹状細胞の品質評価システムの開発を目的として、原料となるベクターと細胞のそれぞれの品質・安定性を明らかにし、その結果をふまえた遺伝子導入樹状細胞調製法の検討を行った。

研究成果の概要（英文）：Virus-mediated delivery of therapeutic genes into dendritic cells(DCs) is a promising method for cancer immunotherapy. As there is not the public standard that determined the quality of the gene-modified DCs as the clinical experimental drug, it is the present conditions that the quality of gene-modified DCs is left to the judgment of each the enforcement organization. To develop the quality evaluation system of the gene-modified dendritic cells which are the final product, we clarified quality and stability of a vector / cells which are correspond to raw materials, then examined a method of gene transfer into dendritic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：トランスレーショナルリサーチ、ウイルスベクター、遺伝子治療、細胞療法、樹状細胞、免疫学

1. 研究開始当初の背景

樹状細胞（Dendritic cell; DC）は免疫ネットワークを形成する個々の免疫担当細胞の機能を統括・制御することのできる最も強力

な抗原提示細胞であり、生体内に起こる様々な免疫反応を決定づける重要な役割を担っている。このような機能を有したDCが癌の治療に応用可能ではないかという発想のも

と、腫瘍抗原ペプチドをパルスした DC の癌免疫療法の研究が進められてきた。実際、合成ペプチドをパルスした DC を担癌動物に投与した系では強い抗腫瘍効果と共に延命効果も明らかであり、多くの報告がなされている。このような結果を受けて一部その臨床応用も始まっている。しかし、このシステムは問題も残っており、ペプチド抗原には癌種および HLA 拘束性による対象者の制限がつかまとう。その弱点を補う新たな手段として癌免疫遺伝子治療法の開発が進められてきた。利点としては導入される遺伝子にはサイトカイン、ケモカイン、接着分子など症例に応じた選択が可能であること、特にアデノウイルスベクターを治療遺伝子導入運搬体として利用する方法は高い導入効率と発現率からその効果が期待される点である。

一方、臨床試験に対する環境整備は欧米に比較して進んでいるとはいえ、ようやく国産の臨床試験用アデノウイルスベクターの製造が開始されたが、安定供給までには至っていない。しかも、治療効果を求めるためには治療遺伝子導入樹状細胞の安全性を含めた品質が試験治療製剤として相応しいものであることが不可欠であるが、現段階では試験治療製剤としての品質基準を定めたものはなく、また、調製された治療遺伝子導入樹状細胞の安定性についての情報もない。こうした基準・品質情報の不足は臨床試験の実現を遅らせる原因の1つであると考えられ、実際、臨床試験の申請数や実施数においても欧米に比較した場合に遅れを取っていると言わざるを得ない。これらの問題を解決し、臨床試験での検証を行うためには、早急に癌免疫遺伝子治療を目的とした遺伝子導入樹状細胞の品質評価システムの開発を行うことが必要である。

以上のような構想のもとに、研究代表者の所属組織に属する研究分担者とともに本研究活動を開始した。

2. 研究の目的

治療遺伝子導入樹状細胞は試験治療製剤として最終産物となるが、その品質は中間原料である治療遺伝子導入用ベクターならびに未成熟樹状細胞の品質に大きく依存していることは明白である。従って、治療遺伝子導入樹状細胞の品質評価を行う前に原料となるベクターと細胞の品質および安定性を明らかにし、それぞれの特性が最大に活かされる状態を確保した上で、樹状細胞に対して効果的な治療遺伝子導入手法を検討し、最適化された条件の下で調製された遺伝子導入細胞の特性解析を行うことができるシステムを構築する。

3. 研究の方法

治療遺伝子としては Th1 誘導性サイトカインとして免疫調節を行っているインターロイキン 12 (IL-12) を選択した。この IL-12 遺伝子運搬として構造・機能およびその体内動態が判明しているヒトアデノウイルス type5 を選択した。これらを用いて IL-12 発現アデノウイルスベクター (Ad-IL12) を調製し、その品質-物理的特性・感染力価・サイトカイン産生能-を測定する。続いて、Ad-IL12 の安定性 (凍結後・融解後) を品質変化の有無を指標として評価する。一方、Ad-IL12 の感染対象となる未成熟樹状細胞 (iDC) は健常人ボランティア等より得られた末梢血単核球から分離・誘導したものを用いて、同様に品質-回収細胞数・生存率・細胞表面抗原解析-を測定し、安定性 (凍結後・融解後) を評価する。ベクターおよび細胞の品質が明確になった後に、両者の安定性が保証される条件を検討し、IL-12 発現アデノウイルスベクター導入樹状細胞 (Ad-IL12/DC) の調製を行う。Ad-IL12/DC の品質測定は iDC の品質測定項目に残留アデノウイルスベクター量測定・成熟度の評価、および IL-12 産生能測定を加えて行う。

(1) 治療遺伝子発現アデノウイルスベクターの作製と評価

CA プロモーターに human IL-12 遺伝子 (hp40-IRES-hp35) を結合した発現カセットをアデノウイルス type5 の全長遺伝子を含むコスミドベクターに挿入し、293 細胞を用いて E1 領域欠損非増殖型の組換えアデノウイルスベクター (Ad-IL12) を調製する。

① Ad-IL12 の特性評価

得られた精製ウイルス液の pH 測定、ならびに SDS 可溶化ウイルス液の OD260 値よりウイルス粒子数を算出し、物理的特質とする。また、TCID50 法によるウイルス感染価測定、および Ad-IL12 感染細胞の培養上清中に含まれる IL-12 量から IL-12 産生能を測定し、生物学的特質を評価する。

② Ad-IL12 の安定性評価

バイアル分注量の多少による長期安定性を検討するために Ad-IL12 を異なる容量で -150°C 保管し、3 か月おきに①で求めた特質に変化があるかどうかを評価する。また、解凍後の短期安定性を検討するために、細胞に感染させる際の作業工程を想定し、室温・4°C で保管した検体について①の評価を行う。

(2) 末梢単核球由来樹状細胞の調製

健常人ボランティア等から採取した末梢血より得られた単核球を IL-4・GM-CSF 存在下にて培養し、未成熟樹状細胞 (iDC) を誘導する。

① iDC の特性評価

回収した細胞についてトリパンブルーを用いた生存率の算定、細胞数測定を行う。さらに蛍光標識された抗 CD11c, 抗 CD86, 抗 CD40, 抗 CD80 を用いたフローサイトメトリにより表面抗原の分析を行い、細胞群の構成・表面抗原発現強度を求める。

② iDC の安定性評価

感染工程を想定し、回収方法・回収時の細胞懸濁液の種類・輸送中の温度・輸送時間について①の評価を比較して検討を行う。

(3)IL-12 発現アデノウイルスベクター導入樹状細胞の調製

調製した IL-12 発現アデノウイルスベクター (Ad-IL12) を遠心操作により iDC に感染させ、Ad-IL12 導入樹状細胞 (Ad-IL12/DC) を調製する。また、細胞凍結プログラムを作成し、一部の細胞を液体窒素容器にて凍結保存する。

① Ad-IL12/DC の特性評価

感染後の細胞に関しては抗 CD86 抗体等により表面抗原の解析を行い、成熟度についての評価を行う。また、感染後 48 時間培養を行い、培養上清中の IL-12 量を測定する。さらに残留アデノウイルスベクター量を検討するために感染後の細胞洗浄液を用いて、Ad-IL12 の E4 領域を標的としてプライマーおよび Taqman プローブを設計し、リアルタイム PCR 法によりアデノウイルスベクターを定量する。

② Ad-IL12/DC の安定性評価

最終産物である Ad-IL12/DC の適切な使用法を検討するために、解凍後の保管温度・移動許容時間を想定し、条件を変えて品質劣化が起こらない条件を求める。

個体差に由来する Ad-IL12/DC の特性評価異なる由来による iDC を用いて Ad-IL12/DC を調製し、①の評価を行う。

4. 研究成果

(1)治療遺伝子発現アデノウイルスベクターの作製と評価

治療遺伝子発現アデノウイルスベクターとして、CA プロモーターに human IL-12 遺伝子 (hp40-IRES-hp35) を結合した発現カセットをアデノウイルス type5 の全長遺伝子を含むコスミドベクターに挿入し、293 細胞を用いて E1 領域欠損非増殖型の組換えアデノウイルスベクター (Ad-IL12) を調製した。Ad-IL12 の生物学的特質の評価として TCID50 法によるウイルス感染力価、および Ad-IL12 感染細胞の培養上清に含まれる

IL-12 タンパク量を選び、それらについて再現性のある方法を確定した。一方、物理的性質の評価として散乱強度比 A320/A260 値を用いてウイルスベクターの凝集を測定する方法を検討したが、精製ウイルスベクターが高力価でない場合には測定される個々の吸光度値が低く、信頼性のある散乱強度比が算定できないことが判明したため、別法として白色光源下で凝集の有無を観察する方法を開発した。さらに臨床試験薬の要求事項として -150°C での長期保存に対する容器の完全性を確認する方法を規定した。これらの確立した手法によりウイルスベクターの製造直後の評価値を基準値として、製造後 30 か月までその品質が失われていないことを確認した。

(2)末梢単核球由来樹状細胞の調製

臨床研究に用いられる培養容器の主流がプラスチックディッシュから閉鎖系の培養バッグに移行していることを勘案し、本研究の細胞調製法をフッ素樹脂製ガス透過性培養バッグに切り替えた。そこで、品質評価項目を再検討し、遺伝子導入工程のもたらす細胞への影響をより詳細にとらえるため、細胞表面抗原の発現解析の他に微分干渉観察、および蛍光色素標識細菌を用いた食作用の観察を加えた。

(3)IL-12 発現アデノウイルスベクター導入樹状細胞の調製

Ad-IL12 を遠心操作により効果的に iDC に感染させ、Ad-IL12/DC を調製するための条件検討用モデルを作成した。具体的には、遠心工程自体による細胞への影響を観察するために遠心容器を丸底チューブから平底 96well プレートに変更し、遠心操作前後、および、そのまま培養を継続したときの変化を撮影し、比較できるようにした。この検討モデルによる解析を進行中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. 佐藤まりも、金本彰、片野尚子、地主将久、米山公康、伊藤精彦、田原秀晃 Cancer vaccine against malignant melanoma using monocyte-derived dendritic cells stimulated with OK-432 and PGE 第 68 回 日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1-3 日
2. 佐藤まりも、金本彰、地主将久、片野尚子、米山公康、伊藤精彦、田原秀晃 Clinical dendritic cell therapy using OK-432 and

prostaglandin E2 (Phase I study)、第 19
回日本樹状細胞研究会、2009 年 7 月 10、11
日

3. 佐藤まりも、金本彰、地主将久、片野尚子、
米山公康、伊藤精彦、田原秀晃、第 13 回日
本がん免疫学会総会 2009 年 6 月 24、25 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片野 尚子 (KATANO HISAKO)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：50376620

(2) 研究分担者

田原 秀晃 (TAHARA HIDEAKI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70322071

佐々木 勝則 (SASAKI KATSUNORI)

東京大学・医科学研究所・研究拠点

形成特任教員

研究者番号：60336394 (2007 年度)