



Title	遺伝子治療用ベクターにより惹起される免疫応答のメカニズム解明に関する研究
Author(s)	桜井, 晴奈
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49183
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	さくら 井 晴奈
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 21958 号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	遺伝子治療用ベクターにより惹起される免疫応答のメカニズム解明に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 中川晋作 (副査) 教授 八木清仁 教授 山元弘 教授 松田敏夫

論文内容の要旨

近年のゲノム研究の目覚しい進歩により、様々な疾患関連遺伝子の同定とその機能解析が行われ、得られた知見に基づいた新たな治療方法の確立が期待されている。そのアプローチのひとつとして遺伝子治療が挙げられる。しかしながら、1990年に世界初の遺伝子治療臨床研究が行われて以来、欧米を中心に1200プロトコール以上の臨床研究が進められているものの、当初期待されていたような明確な有効性を示すことができた例は限られている。その原因は、標的細胞にのみ遺伝子を効率よく、かつ安全に導入することのできる遺伝子導入法(ベクターを含む)の開発が遅れていることがある。したがって、安全性および有効性の高い遺伝子治療を実現するためには、高い遺伝子導入効率と低抗原性を兼ね備えた理想的なベクターの開発が急務となっている。そこで本研究では、安全性の高い遺伝子治療の実現に向けて、『自然免疫応答を回避することができる遺伝子治療用ベクターの創製』を目指し研究を行ってきた。具体的には、①ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターの全身投与による自然免疫誘導能の比較、②アデノウイルス(Ad)ベクターにより誘導される自然免疫応答に関与する分子の探索、さらに③自然免疫応答誘導能の低いAdベクターの創製に関して検討を行ったところ、大変興味深い知見を得たので、博士論文として以下にまとめる。

現在、遺伝子治療に用いられているベクターは、AdベクターをはじめとするウイルスベクターとLipoplex(カチオン性リポソームとプラスミドDNAとの複合体)をはじめとする非ウイルスベクターに大別される。ウイルスベクターは幅広い組織において高い遺伝子導入効率を示すが、高い免疫原性など副作用が懸念されている。その点、非ウイルスベクターによる遺伝子導入効率は低いものの、病原性タンパク質を含まないため安全性が高いとされている。しかし近年、非ウイルスベクターの基本骨格であるプラスミドDNAによって自然免疫応答が惹起されることが報告され、ウイルスベクターだけでなく、非ウイルスベクターの安全性に関して再考が必要と考えられ始めている。そこで、ウイルスベクターの代表として、既存のベクターの中で最も遺伝子導入効率が高いAdベクターを、非ウイルスベクターの代表として、in vivoにおける汎用性が多く報告されているLipoplexを選択し、両ベクターの全身投与による安全性の比較を行った。同一のルシフェラーゼ発現カセットを搭載した両ベクターを静脈内投与したマウスの各臓器における遺伝子発現量を測定したところ、Lipoplex投与群における遺伝子発現は心臓および肺に限局していたのに対し、Adベクター投与群では解析した全ての臓器(心臓、肺、腎臓、肝臓、脾臓)において発現が認められ、その発現量はLipoplex投与群の10~100000倍高い値であった。また、両ベクター投与マウスの血清中における炎症

性サイトカイン濃度 (IL-6、IL-12、および TNF- α) を測定したところ、Lipoplex 投与群は Ad ベクター投与群と比較して 5~10 倍高い値を示した。したがって、Lipoplex は遺伝子発現効率が低いにも関わらず、全身投与により誘導される自然免疫応答は Ad ベクターと比較しても強く、決して樂観視できるものではないことが判明した。本結果は、いずれのベクターを用いた遺伝子治療を行う際においても投与後の自然免疫応答には充分注意を払う必要があることを世に示すものであり、ベクターの投与による自然免疫応答が原因で発生する重篤な事故を未然に防ぐための警告となることを期待する。

Ad ベクターは、現存するベクターの中で最も遺伝子導入効率が高いベクターであり、また自然免疫誘導能も比較的低いことが本研究により明らかとなった。しかし、1999 年の臨床研究において、Ad ベクターの全身投与を受けた患者が死亡する事故が発生しており、Ad ベクターによる安全性の高い遺伝子治療を実現するためには、Ad ベクターによる免疫応答を回避する方法の開発が不可欠となっている。そこで本研究では、自然免疫誘導能がさらに低い Ad ベクターの開発を試みた。まず、Ad ベクターにより誘導される自然免疫応答の分子メカニズムを解明するため、DNA マイクロアレイシステムを用いて Ad ベクター誘発自然免疫応答関連候補遺伝子の網羅的探索を行った。Ad ベクターを静脈内投与したマウスの肝臓（全身投与した Ad ベクターの 95% 以上が集積）および脾臓（Ad ベクターの全身投与により炎症性サイトカインを産生）における遺伝子発現変動を解析したところ、両臓器において免疫シグナル関連分子や代謝シグナル関連分子の発現上昇が検出された。Ad ベクターを認識して免疫応答を活性化する受容体の存在は未だ明らかとなっていないが、本研究においていくつかの核酸受容体 (DAI、RIG-I など) の発現上昇が見出されたことから、Ad ベクターによる自然免疫誘導には、Ad ゲノムが関与している可能性が示唆された。次に、DNA マイクロアレイ解析により発現変動した遺伝子に関して詳細な検討を行ったところ、Ad ベクターにより誘導される炎症性サイトカイン産生シグナルには JAK2/STAT5 経路が関与しており、このシグナルは SOCS1 によって抑制されることが明らかとなった。また、SOCS1 を搭載した Ad ベクター (Ad-SOCS1) を全身投与したところ、ルシフェラーゼ発現 Ad ベクター (Ad-L2) 投与群と比較して炎症性サイトカイン産生が顕著に抑制された。さらに、Ad-SOCS1 と Ad-L2 を共投与することにより、Ad-L2 による遺伝子発現を妨げることなく自然免疫応答 (炎症性サイトカイン産生・肝傷害) を抑制することに成功した。本結果により、Ad-SOCS1 は治療用遺伝子の発現を妨げることなく免疫応答を抑制することができる、非常に有用なツールとなりうることが明らかとなった。

現在の遺伝子治療では、安全性の観点からベクターの局所投与が主流となっているが、特に体内に存在する組織（細胞）を標的として投与する際には、医療従事者に対し高度な技術が要求される。本研究により開発された Ad-SOCS1 共投与システムは、安全性の観点から困難であった遺伝子発現ベクターの全身投与を可能にする画期的なシステムであり、安全性および有効性の高い遺伝子治療の実現に向けて、本系が実用化されることを期待する。

論文審査の結果の要旨

1990 年に世界初の遺伝子治療臨床研究が行われて以来、欧米を中心 1200 プロトコール以上の臨床研究が進められているものの、当初期待されていたような明確な有効性を示すことができた例は限られている。その原因是、標的細胞にのみ遺伝子を効率よく、かつ安全に導入することのできる遺伝子導入法の開発が遅れていることがある。したがって、安全性および有効性の高い遺伝子治療を実現するためには、高い遺伝子導入効率と低抗原性を兼ね備えた理想的なベクターの開発が急務となっている。本研究では、安全性の高い遺伝子治療の実現に向けて、自然免疫応答を回避することができる遺伝子治療用ベクターの創製を目指して検討を行い、以下のような結論を得た。

- 1、代表的な非ウイルスベクターである Lipoplex はアデノウイルス (Ad) ベクターに比べ自然免疫誘導能が高く、全身投与による遺伝子治療の際には自然免疫応答に注意を払う必要があることを明らかにした。
- 2、Ad ベクターにより活性化される免疫応答のメカニズム解析を試み、Ad ベクターによる炎症性サイトカイン産生には、JAK2/STAT5 経路が関与していることを明らかにした。
- 3、JAK の活性化を阻害することによりサイトカインシグナルを負に制御する因子である SOCS1 は、Ad ベクターにより誘導される自然免疫応答を抑制することを明らかにした。

4、SOCS1 を発現する Ad ベクターである Ad-SOCS1 は、自身により誘導される炎症性サイトカイン産生を回避するだけでなく、共投与した Ad ベクターの遺伝子発現を妨げることなく、Ad ベクターによる自然免疫応答（炎症性サイトカイン産生および肝傷害）を回避できることを明らかにした。

以上、本研究では、①ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターの全身投与による自然免疫誘導能の比較、②Ad ベクターにより誘導される自然免疫応答に関与する分子の探索、さらに③自然免疫応答誘導能の低い Ad ベクターの創製に関して検討を行い、遺伝子治療用ベクターによる自然免疫応答に関する基礎情報を構築した。本研究成果は、Ad ベクターおよび非ウイルスベクターを用いた安全性の高い遺伝子治療を実現するための貴重な情報を提供するものであり、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。