The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	アデノウイルスベクターによる自然免疫誘導メカニズムの解明に関する研究
Author(s)	山口, 朋子
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57948
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

【4】

氏　　名	山　口　朋　子（やま　くち　とも　こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２３７４７　号
学位授与年月日	平成22年３月23日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学　位　論　文　名	アデノウイルスベクターによる自然免疫誘導メカニズムの解明に関する研究
論文審査委員	（主査） 教　授　水口　裕之 （副査） 教　授　山元　　弘　　教　授　八木　清仁　　教　授　中川　晋作

論　文　内　容　の　要　旨

米国においてアデノシンデアミナーゼ欠損症に対する世界初の遺伝子治療臨床研究が1990年に実施されてから約20年が経過し、我が国を含め各国で癌などの難治性疾患をはじめとする様々な疾病に対する遺伝子治療が行われている。遺伝子治療の成功は、治療用遺伝子を効率良くかつ安全に標的細胞に導入することのできる治療用ベクターの開発が鍵をにぎっている。アデノウイルス(Ad)ベクターは既存のベクターの中でも最も高い遺伝子導入効率を示すこと、非分裂細胞にも遺伝子導入可能なこと、比較的大きな遺伝子(最大約8.1kbp)が挿入可能であることなど遺伝子治療用ベクターとして優れた特徴を有することから、遺伝子治療臨床研究の約25%で使用されている。しかしながら、1999年には米国で行われた遺伝子治療臨床研究において、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いる。この事故は、ベクター投与後初期の免疫応答の過剰な活性化が原因と考えられており、遺伝子治療用ベクターにより誘導される初期の免疫応答のメカニズムを解明し、これを回避することがより安全性の高い遺伝子治療を実現するための重要な課題であると考えられている。そこで、本研究では、Adベクターを用いた安全性の高い遺伝子治療の実現に向けて、「Adベクターにより活性化される自然免疫応答のメカニズム解明」を目指して研究を行った。

まず、Adベクターによる自然免疫応答の誘導に細胞内のどのような因子が関与しているのかについて、ウイルスや細菌を認識する受容体として最もよく知られているtoll-like receptor(TLR)のアダプター分子であるMyD88およびCpGモチーフを含んだDNAを認識するTLR9に着目し、炎症性サイトカインの産生機構について検討を行った。その結果、Adベクター作用後のGM-CSFを用いて誘導した樹状細胞（DC; dendritic cell）やFlt3Lを用いて誘導したコンベンショナルDCではTLR9/MyD88依存的に炎症性サイトカインを産生していることが明らかとなった。一方、腹腔内マクロファージではAdベクターにより惹起される炎症性サイトカインはTLR9/MyD88非依存的に産生されることが示された。したがって、細胞種によりAdベクター作用後の

炎症性サイトカイン産生経路が異なることが明らかになった。また、Adベクターを投与されたマウスでは、TLR非依存的に炎症性サイトカインを産生することが明らかとなった。これまでの報告では、Adベクターを*in vivo*に投与した際のサイトカイン産生にはDCが重要な役割を担っているとの報告があったが、DCだけでなく他の細胞も重要である可能性が示唆された。

次に、AdベクターによるI型インターフェロン(IFN)の産生機構について同様に検討した。その結果、Adベクターを作用させた線維芽細胞では、TLR非依存的にIFNの産生を誘導することが明らかとなった。近年、TLR以外の核酸受容体としてretinoic acid-inducible gene I (RIG-I)およびmelanoma differentiation-associated gene 5(Mda5)が同定された。RIG-IやMda5は、IFN-β promoter stimulator 1(IPS-1)とよばれるアダプター分子と会合し、下流にシグナルを伝えることがこれまでに報告されている。そこで、TLR非依存経路に関わる分子としてRIG-I、Mda5のアダプター分子であるIPS-1に着目し、IPS-1がAdベクターによるIFNの産生に関与しているかどうかについて検討した。その結果、繊維芽細胞ではIPS-1依存的にIFNの産生を誘導することが明らかとなり、RNAウイルスだけでなくAdのようなDNAウイルスの認識にもIPS-1シグナルが関与することが示された。一方、AdベクターによるDCでのIFNの産生にはTLRやIPS-1シグナル以外の経路も関与している可能性が示唆された。

また、ウイルスのいかなる構成分子が自然免疫応答を惹起しているかについて、ウイルス側因子の同定を試みた。自然免疫応答を惹起させるAdベクター側の因子としては、①ウイルスタンパク質、②ウイルスゲノムDNA、③ウイルスがコードする小分子RNAなどの転写産物が考えられる。そこで、ウイルスゲノムの複製とパッケージングに必要な領域以外の全てのウイルス遺伝子を欠損させたヘルパー依存性Ad(HD-Ad)ベクターを用いて自然免疫応答を惹起するようなウイルス側因子の絞りこみを行った。その結果、Adベクターによる線維芽細胞およびDCでのIFNの産生にはウイルスの転写産物などをはじめとするカプシドタンパク質以外の因子が関与している可能性が示唆された。そこで、EBウイルスがコードする小分子RNAであるEBERがRIG-Iと相互作用することによってI型IFNの産生を誘導することが報告されたことから、Adがコードする小分子RNAであるvirus-associated RNA (VA-RNA)に着目した。VA-RNAがRNAポリメラーゼIIIによって転写されてくることから、まずRNAポリメラーゼIII阻害剤を用いて検討を行った。その結果、阻害剤の濃度依存的にIFNの産生が抑制された。以上より、Adベクターにより誘導されるIFNの産生はRNAポリメラーゼIIIによって転写されるRNAを介して行われることが明らかとなった。次に、VA-RNAの直接的関与について検討するために、plasmid DNAやVA-RNA欠損Adを用いて様々な検討を行った。その結果、IFNの産生にはVA-RNAが重要な役割を担っていることがはじめて示された。以上、本研究で解明したAdベクターによる自然免疫応答の誘導メカニズムが、今後Ad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足がかりになることを期待する。

論文審査の結果の要旨

近年のゲノム研究の進展に伴い、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、遺伝子そのものを「薬」とみなした遺伝子治療に注目が集まっている。遺伝子治療には、治療用遺伝子を効率よくかつ安全に様々な標的細胞に導入することの出来る治療用ベクターが必要となる。遺伝子治療用ベクターの中でも、アデノウイルス(Ad)ベクターは最も高い遺伝子導入効率を示すこと、非分裂細胞にも遺伝子導入可能なこと、比較的大きな遺伝子が挿入可能であることなど優れた特徴を有することから遺伝子治療臨床研究で幅広く使用されている。しかし、Adベクターを生体内に投与した場合に生じる免疫応答が副作用として問題になっている。免疫応答の中でも投与数日以降に生じる獲得免疫に関しては多くの研究が行われており、そのメカニズムや克服法が開発されている。一方、投与初期に生じる自然免疫応答については詳細なメカニズムがほとんど明らかとなっていないことから、Adベクターにより生じる自然免疫応答の詳細なメカニズム解明とその制御法の開発がより安全性の高い遺伝子治療を実現するための重要な課題であると考えられている。本研究では、Adベクターにより活性化される自然免疫応答のメカニズム解明を目指して研究を行い、以下のような結論を得た。

1. Adベクターを作用させた樹状細胞ではtoll-like receptor(TLR)依存的に、マクロファージではTLR非依存的に炎症性サイトカインを誘導することから、細胞種によってAdベクター作用後のサイトカイン産生機構が異なることを明らかとした。
2. Adベクターを作用させたマウス胎児線維芽細胞では、interferon(IFN)-・ promoter stimulator-1(IPS-1)依存的にIFNを産生することから、RNAウイルスだけでなくAdのようなDNAウイルスの自然免疫活性化機構にもIPS-1が関与することを明らかとした。
3. Adによって惹起されるIFNの産生にはAdがコードする小分子RNAであるVA-RNAが重要な役割を担っていることをはじめて明らかとした。

以上、本研究ではAdベクターによって惹起される自然免疫応答の細胞内シグナルの解析およびウイルス側因子の同定に取り組み、各種遺伝子欠損マウス由来細胞を用いることによりAdベクターによって惹起される炎症性サイトカインおよびIFNの産生に細胞内のどのような因子が関与しているのかを明らかにした。さらに、ヘルパー依存性AdベクターやVA-RNA欠損Adなどの改変型Ad(ベクター)を用いることで、自然免疫応答を惹起するようなAd(ベクター)側の責任因子をはじめて明らかにした。本研究で解明したAdベクターにより惹起される自然免疫応答のメカニズムは、Ad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足がかりとなることが期待され、極めて意義深い。