



Title	ウイルスおよび導入遺伝子に対する免疫応答がアデノウイルスベクターによる遺伝子導入に及ぼす影響に関する研究
Author(s)	富田, 恭子
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61679
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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

論文内容の要旨

氏名 (富田 恭子)

論文題名

ウイルスおよび導入遺伝子に対する免疫応答がアデノウイルスベクターによる遺伝子導入に及ぼす影響に関する研究

論文内容の要旨

遺伝子治療は、治療上有効な蛋白質をコードした遺伝子を標的細胞に導入することにより遺伝子の欠陥を補完・修復する治療方法であり、先天性遺伝子欠損症をはじめとする種々の難治性疾患に対する根本的治療法として研究されてきた。治療遺伝子を標的細胞に送達する遺伝子導入用ベクターの中でもアデノウイルス (Ad) ベクターは、遺伝子導入用ベクターとして多くの長所を有することから世界の遺伝子治療臨床研究において最も汎用されている。しかし、Adベクターを生体に投与すると①Adベクターに対する免疫応答、ならびに②Adベクターの搭載遺伝子産物に対する免疫応答が惹起される。Adベクターに対する免疫応答の一つとして、抗Ad抗体の誘導が挙げられる。一方Adベクターの搭載遺伝子産物に対する免疫応答としては、搭載遺伝子産物に対する抗体や細胞傷害性T細胞の誘導が挙げられる。これらにより投与したAdベクターや搭載遺伝子発現細胞が排除または傷害されることで、搭載遺伝子発現が減弱してしまうことが、Adベクターを用いた遺伝子治療の際の大きな障壁となっている。このように、Adベクターを用いた遺伝子治療において免疫応答とその治療効果は密接に関わるものであるにも関わらず、これまで詳細な検討は行われていないことから、本論文では上記の2つの免疫応答について種々の検討を行った。

Adベクターはその特性からがん遺伝子治療研究で汎用されてきた。がん遺伝子治療では血中の抗Ad抗体による中和を避けるためAdベクターは腫瘍部位へ局所投与されることがほとんどであるが、腫瘍内投与されたAdベクターの遺伝子導入効率における抗Ad抗体の影響については議論が分かれている。そこで第一章では、様々な抗Ad抗体価を有するマウスを用いて、抗Ad中和抗体がAdベクター腫瘍内投与後の腫瘍での遺伝子発現にどのような影響を及ぼすのか検討することとした。まず、Adベクターを種々の力価でマウスに投与することで様々な抗Ad抗体価を有するマウスを調製した。そしてこれらのマウスに腫瘍を形成させた後、ルシフェラーゼ発現Adベクターを腫瘍内投与し、腫瘍および肝臓における遺伝子発現を検討した。その結果、腫瘍においては抗Ad抗体価が200以下であれば、効率的な遺伝子発現が得られたが、投与部位から漏れ出したAdベクターによる肝臓における遺伝子発現は、抗Ad抗体により顕著に阻害された。以上の検討により、抗Ad抗体存在下でのAdベクターの局所投与においては、ある閾値以下の抗体価では局所投与部位で効率的な遺伝子発現が得られることが明らかとなった。一方で今回得られた抗体価200という値を直接ヒトのがん遺伝子治療臨床研究に適用するには、様々な癌種におけるさらなる検討が必要であると考えている。

Adベクター全身投与による遺伝子導入は抗Ad抗体によって顕著に阻害されるため、Adベクターの繰り返し投与は非常に困難である。Adベクターに対する抗体は、Adの主要な外殻蛋白質であるヘキソンに対する抗体が主に誘導されることがこれまで報告されている。しかし本当に抗ヘキソン抗体がAdベクターによる肝臓への遺伝子導入を阻害しているのか、他のAd外殻蛋白質に対する抗体は遺伝子導入を阻害しないのかについては明らかになっていない。そこで第二章では、Adのどの外殻蛋白質に対する抗体が抗Ad中和活性を主に担っているのか、またその遺伝子導入阻害のメカニズムの解明を試みた。まずAdの各外殻蛋白質に対する抗体を誘導したマウスにAdベクターを全身投与し、どのAd外殻蛋白質に対する抗体が最もAdベクターによる肝臓への遺伝子導入を阻害するか検討することとした。その結果、Adのヘキソンに対する抗体を誘導したマウスでは遺伝子導入効率の有意な低下は観察されず、ファイバーおよびペントンベースに対する抗体を誘導したマウスで顕著に遺伝子導入効率が低下した。全身投与されたAdベクターは、血液凝固第X因子 (FX) 依存的に肝臓へ集積し肝細胞に取り込まれることが明らかとなっているため、続いてFX依存的な遺伝子導入に及ぼす抗ファイバー抗体および抗ペントンベース抗体の影響について検討した。その結果、AdのファイバーおよびペントンベースにはFXは直接結合しないにも関わらず、抗ファイバー抗体および抗ペントンベース抗体はFX依存的な遺伝子導入を顕著に阻害した。さらなる検討の結果、抗ファイバー抗体はFXとヘパラン硫酸との結合を阻害することでFX依存的な遺伝子導入を阻害していることが示唆された。

第三章では、Adベクターの搭載遺伝子産物に対する免疫応答に着目した検討を行った。まず、長期間の搭載遺伝子

発現が可能なAdベクターの開発を目指し、免疫応答を惹起するような細胞群には搭載遺伝子を発現させず、免疫寛容を誘導可能な細胞群への遺伝子導入を行うというストラテジーを立案し、肝臓特異的な搭載遺伝子発現を行うこととした。肝臓特異的プロモーター（AHAプロモーター）の制御下にLacZを発現するAdベクターAd-AHA-LacZと、対照群としてAd-CMV-LacZをマウスに投与した際の免疫応答について検討したところ、Ad-AHA-LacZ投与群ではβ-galに対する細胞性および液性免疫応答が誘導されなかった。従って、搭載遺伝子を脾臓（抗原提示細胞）では発現させず肝臓特異的に発現させることで、搭載遺伝子特異的な免疫応答を誘導しないシステムの構築に成功した。Adベクターを生体に投与すると、獲得免疫応答のみならず自然免疫応答も誘導され、また自然免疫応答はその後の獲得免疫応答にも影響することが当研究室の過去の研究からも明らかになっている。そこで肝臓特異的な搭載遺伝子発現における免疫応答に及ぼす自然免疫シグナルの影響について、特に今回はI型IFNシグナルに着目し検討を行った。野生型（WT）マウスおよびI型IFN受容体2ノックアウト（IFNAR2KO）マウスにAd-AHA-LacZを投与しβ-galに対する免疫応答を検討したところ、IFNAR2KOマウスにおいては抗β-gal抗体が誘導されることが明らかとなった。従って、肝臓特異的な搭載遺伝子発現においてはI型IFNシグナルが搭載遺伝子産物特異的な抗体の誘導を抑制していることが示唆された。搭載遺伝子の発現細胞を巧みに制御することでその後に誘導される自然免疫応答および獲得免疫応答の制御も可能となり、長期間の搭載遺伝子発現が達成されるものと考えられる。そのためにはAdベクター投与後の搭載遺伝子産物に対する免疫応答の誘導メカニズムをさらに詳細に明らかにすることが必要であり、本研究成果はその一端を明らかにできたと考えている。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (富 田 恭 子)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 水口 裕之
	副 査	教 授 中川 晋作
	副 査	教 授 辻川 和丈
<p>アデノウイルス (Ad) ベクターは、治療遺伝子を標的細胞に送達する遺伝子導入用ベクターの中で最も優れた遺伝子導入・発現効率を示すこと、容易に高力価のベクターが得られること等の多くの長所を有することから、がん遺伝子治療臨床研究をはじめとした遺伝子治療臨床研究において最も汎用されているベクターである。しかし、Adベクターを用いた遺伝子治療においてはその免疫応答惹起能が問題であり、Adベクターの実用化の際の大きな障壁となっている。すなわち、Adベクター自身およびAdベクターの搭載遺伝子産物に対する抗体や細胞傷害性T細胞が誘導されることにより、導入遺伝子の発現が減弱してしまう。しかしながら、これら獲得免疫応答の誘導メカニズムや、Adに対する免疫を保持した生体における遺伝子導入効率に関してはこれまでに詳細な検討がなされていなかった。Adベクターを用いた遺伝子治療において免疫応答とその治療効果は密接に関わるものであることから、申請者は特に、①抗Ad抗体存在下での腫瘍への遺伝子導入効率、②抗Ad抗体によるAdベクターの遺伝子導入阻害メカニズム、③導入遺伝子産物に対する免疫応答を抑制するシステムの構築の3点に関して検討を行い、以下の結果を得た。</p> <p>(1) 抗 Ad 抗体存在下での Ad ベクターの腫瘍内投与後の腫瘍における遺伝子発現は、ある閾値以上の抗体価では阻害されるが、それ以下の抗体価であれば効率的な遺伝子発現が得られることを明らかとした。</p> <p>(2) Ad 感染により誘導される各 Ad 外殻蛋白質に対する抗体のうち、ファイバーおよびペントンベースに対する抗体が Ad ベクターによる肝臓への遺伝子導入を阻害していることを明らかとした。また、抗ファイバー抗体および抗ペントンベース抗体は Ad ベクターと FX、もしくは FX とヘパラン硫酸との結合性を変化させるため、FX 依存的な肝臓への遺伝子導入を顕著に阻害することを示唆した。</p> <p>(3) Ad ベクターの搭載遺伝子を肝臓特異的に発現させることで、搭載遺伝子の長期間の発現を維持することに成功した。また I 型 IFN シグナルが Ad ベクターの搭載遺伝子産物に対する抗体の誘導を抑制していること示唆した。</p> <p>以上、本研究ではAdベクターを用いた遺伝子治療の最適化に向け、Adベクターに対する免疫応答に着目した検討を行い、新規の知見を得た。近年、欧州や米国において遺伝子治療薬が相次いで承認され、先天性遺伝子欠損症のみならず、がんや難治性慢性疾患など様々な疾患に対する革新的治療法の一つとして遺伝子治療の確立が、本邦においても強く望まれている。本研究で得られた成果は遺伝子治療臨床研究および基礎研究の発展の一助となり、Adベクターや腫瘍溶解性Adを用いた遺伝子治療法の確立に大きく貢献するものと期待されることから、極めて意義深く、博士 (薬科学) の学位論文に値するものと認める。</p>		

