

厚生労働科学研究研究費補助金

トキシコゲノミクス研究事業

遺伝子治療薬の生体内投与後の  
毒性発現機構解析に関する研究

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成19（2007）年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

遺伝子治療薬の生体内投与後の毒性発現機構解析に関する研究-----	1
主任研究者 独立行政法人 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー 水口裕之	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	31
---------------------------	----

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

総括研究報告書

遺伝子治療薬の生体内投与後の毒性発現機構解析に関する研究

主任研究者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

基盤研究部 遺伝子導入制御プロジェクト プロジェクトリーダー

医薬品にとって最も重要な安全性を保証・予測・評価する技術として、トキシコゲノミクステクノロジーの構築が期待されている。現在、これらの技術を用いて、一般的な医薬品化合物について毒性的データの解析やトランスクリプトーム解析が行われている。将来の医薬品候補である遺伝子治療薬についても、トキシコゲノミクステクノロジーを利用した安全性の評価や、それらの評価をフィードバックして更なる安全性を確保するためのテクノロジー開発が必要である。アデノウイルス(Ad)ベクターは遺伝子治療臨床研究に最も広く用いられているベクターであるが、生体への投与後、免疫系等に及ぼす副作用を生じることが知られており、今後の遺伝子治療の進展のためには、系統的な毒性発現機構の解析が必要不可欠である。本研究では、Adベクター(研究代表者が先駆的に開発を進めている改良型Adベクターを含む)投与後の細胞や生体(マウス)での網羅的なトランスクリプトーム解析と、ウイルスカプシドタンパク質と生体(細胞)との相互作用を個別に詳細に解析する両アプローチから研究を進めることで、毒性発現に至る分子メカニズムの解明や、関与する細胞(生体)側およびウイルス側因子の同定を行う。本年度は各課題について以下の結果を得た。

- (1) 各種Adベクターを全身投与したマウス肝臓、脾臓における遺伝子発現変動をDNA microarrayにより網羅的に解析した。従来型Adベクター投与群における炎症性サイトカイン/ケモカイン遺伝子の変動は主に脾臓で起こっており、一部肝臓でも変動がみられた。さらに、自然免疫誘導能の異なる各種Adベクターを用いた解析により、自然免疫誘導に関与する遺伝子群を抽出した。今後、これらの遺伝子の機能を解析することにより、Adベクターによる自然免疫応答のメカニズムがより詳細に明らかになるものと考えられる。
- (2) Adベクターの問題点の一つである自然免疫誘導と肝障害メカニズムの解析を行った。その結果、Adベクター投与後の炎症性サイトカインは主に脾臓で産生され、特に脾臓中のコンベンショナル樹状細胞が関与していること、さらにAdベクター投与後に産生されるIL-6が肝障害に関与していること、脾臓への移行性を抑えたベクターが安全性に優れることが明らかとなった。
- (3) MyD88欠損およびTLR9欠損マウスより調製した樹状細胞にAdベクターを作用させた結果、MyD88/TLR9一部依存的にIL-6産生が行われていることが明らかとなった。一方、マクロファージではMyD88/TLR9非依存的経路を介しIL-6産生が行われており、細胞種によってAdベクターによる炎症性サイトカイン産生経路が異なることが明らかとなった。
- (4) 炎症性サイトカイン産生に重要な転写因子であるNF- $\kappa$ Bに対するデコイDNAを、フコースもしくはマンノース修飾カチオン性リポソームを用いて肝臓や脾臓のマクロファージに選択的に送達することにより、Adベクター投与による炎症性サイトカイン(IL-6、IL-12)産生ならびに肝障害を有意に抑制することに成功した。従って、NF- $\kappa$ Bデコイを用いることにより、Adベクター投与後の自然免疫誘導を抑制できる可能性が示唆された。

## 協力研究者

川端健二	(独) 医薬基盤研究所 主任研究員
櫻井文教	(独) 医薬基盤研究所 研究員
小泉直也	昭和薬科大学 助手
黄海瑛	(独) 医薬基盤研究所 流動研究員
山口朋子	(独) 医薬基盤研究所 研究支援者
櫻井晴奈	大阪大学大学院薬学研究科
菅野純	国立医薬品食品衛生研究所
五十嵐勝秀	国立医薬品食品衛生研究所
相崎健一	国立医薬品食品衛生研究所

## A. 研究目的

医薬品にとって最も重要な安全性を保証・予測・評価する技術として、トキシコゲノミクステクノロジーの構築が期待されている。現在、これらの技術を用いて、一般的な医薬品化合物について毒性学的データの解析やトランスクリプトーム解析が行われている。将来の医薬品候補である遺伝子治療薬についても、トキシコゲノミクステクノロジーを利用した安全性の評価や、それらの評価をフィードバックして更なる安全性を確保するためのテクノロジー開発が必要である。

アデノウイルス (Ad) ベクターは遺伝子治療臨床研究で最も広く使用されているベクターのひとつであり、現在までに癌を中心として全遺伝子治療臨床研究プロトコールの 25.9% (2004 年 7 月現在) で用いられている。我が国においては遺伝子治療臨床研究プロトコールの約半数で使用されている。その間、1993 年の嚢胞性繊維症の遺伝子治療臨床研究で明らかとなった起炎性に関する

副作用事例や、1999 年のオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対する遺伝子治療臨床研究での死亡事故などが起こり、有効性や安全性を高めたベクターの開発や、安全性 (毒性あるいは副作用) を評価する研究の進展が望まれている。Ad ベクターを生体に投与した場合に起こる副作用は、1) 投与後直後に起こる自然免疫、2) 投与 1-2 週間後にわずかに産生されたウイルスタンパク質によって起こる細胞性免疫、および 3) ウイルスカプシドに対する液性免疫に大別される。これらの課題を克服するため、申請者らのグループはカプシドタンパク質を改変した種々の改良型 Ad ベクターを開発している。本研究では、現在臨床で汎用されている Ad ベクターをはじめ、種々の改良型 Ad ベクターを *in vitro*、*in vivo* に作用後の遺伝子発現情報を網羅的に解析 (トランスクリプトーム解析) し、毒性発現に至る遺伝子やタンパク質を同定し、遺伝子治療の安全性の向上や実用化に向けての基礎情報を得ることを目的とする。さらに、上記 1)~3) の副作用の中でも 1) の自然免疫が現在の最も大きな課題であることから、ウイルスカプシドタンパク質と生体 (細胞) との相互作用を、自然免疫に関与する分子である Toll like receptor (TLR) およびその下流シグナル伝達物質を中心に、組換えウイルスカプシドタンパク質やノックアウト動物などを用いて個別に詳細に解析する。

本年度は、(1) Ad ベクター投与後のトランスクリプトーム解析を *in vivo* (マウス) で検討すると共に、(2) Ad ベクターをマウスに投与後の自然免疫誘導および肝障害発現メカニズムの解明、(3) Ad ベクター作用後の炎症性サイトカイン産生における Toll-like receptor (TLR) の関与に関する検討、および (4) 糖修飾カチオン性リポソームを用いた NF- $\kappa$ B デコイの臓器選択的デリバリー

による Ad ベクター投与初期に起こる副作用軽減の試みに関する研究を行った。

本研究は、安全性の高い遺伝子治療法の確立と評価、安全性の高い遺伝子治療薬の開発に向けた情報提供、及びそれらを通じた保健医療の向上への貢献が期待される。

## B. 研究方法

### B.1 Adベクター感染により変動する遺伝子群の網羅的解析

#### (1) Adベクターの作製

Adベクターの作製は、improved *in vitro* ライゲーション法により行った。シャトルプラスミド pHCMV6 のマルチクローニング部位にルシフェラーゼ遺伝子を挿入し、ルシフェラーゼ発現シャトルプラスミド pHCMV6-L2 を作製した。次に、pHCMV6-L2 を I-CeuI と PI-SceI で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdHM4 とライゲーションを行うことにより、ルシフェラーゼ発現従来型 Adベクタープラスミド pAdHM4-L2 を得た。作製したベクタープラスミドを PacI で消化し、SuperFect (QIAGEN 社) を用いて 293 細胞にトランスフェクションすることにより、ルシフェラーゼ発現従来型 Adベクターを作製した。同様の方法を用いて、ファイバー改変型 Adベクターである K7 型 Adベクター (ファイバーノブ部分にポリリジン (K7) 配列を付与することにより、ヘパラン硫酸に対する指向性を付加した Adベクター) およびトリプル改変型 Adベクター (Adベクターがその受容体である coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR)、インテグリンおよびヘパラン硫酸を認識・結合するのに必要な配列を遺伝子工学的に除去した Adベクター) を作製した。なお、得られた Adベクターは塩化セシウム溶液を用いた密度勾配遠心により精製し、10 mM Tris (pH 7.5)、1 mM MgCl<sub>2</sub>、10% glycerol からなる溶液で透析した。精製したベクターの物理的力価は、分光学的方法により測定した。

#### (2) サンプルの回収

C57BL/6 (10 週齢、オス、日本 SLC) マウスを、環境に順応させるため 2 週間飼育した。従来型 Ad

ベクター、K7 型 Adベクター、もしくはトリプル改変型 Adベクター ( $1 \times 10^{11}$  VP/mouse) を尾静脈内より投与した。投与 3 時間後、エーテル麻酔を行ったマウスの頸動脈を切断し末梢血を回収するとともに脱血した後、肝臓および脾臓を摘出した。

#### (3) Adベクター投与による変動遺伝子の探索

摘出した肝臓および脾臓から total RNA を回収し、定法にしたがって GeneChip 解析を行った。得られたデータは Percellome 法によりデータの補正を行った後、各種 Ad vector により発現が変動する遺伝子の選択を行った。なお、クラスター解析には、NetAffx (Affymetrix 社) を用いて行った。

#### (4) 血中サイトカイン濃度の測定

採取した末梢血を氷上で 2-3 時間インキュベートし、15000×g、4°C で 10 分間遠心を行った後、上清を回収し血清サンプルとした。血清中 IL-6 および IL-12 濃度は BIOSOURCE 社の ELISA キットを用いて測定した。

### B.2 Adベクター生体投与後の自然免疫誘導および肝障害発現メカニズムの解明

#### (1) ヘパラン硫酸との結合性を持つ Adベクターの作製

ヘパラン硫酸との結合性を持つ改変型 Adベクター AdK7-L2 はベクタープラスミド pAdHM41K7 (J. Gene Med., 5, 267-276 (2003)) を用いて、*in vitro* ライゲーション法により作製した。AdK7-L2 はルシフェラーゼ発現カセットが E1 領域に挿入されており、さらにファイバーノブの C 末端部位にポリリジン (リジンを 7 つつなげた) アミノ酸配列が挿入されているためにヘパラン硫酸との結合

を介して感染可能な Ad ベクターである。PacI で消化したベクタープラスミドを 293 細胞にトランスフェクションし、CPE が起こるまで培養した。CPE 確認後、3 次感染までさせることにより大量調製し、5 型の従来型 Ad ベクター (Ad-L2) と同様に塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2 回)、10mM Tris (pH7.5)、1mM MgCl<sub>2</sub>、10% Glycerol からなる溶液で透析した。ベクターの物理化学的 (particle) タイターは Maizel らの方法に従って決定した。

## (2) マウス遺伝子導入実験

マウス (C57BL/6、5 週齢、メス)の尾静脈より Ad-L2、および AdK7-L2 (1x10<sup>10</sup> vector particle (VP)/mouse) を投与し、投与 2 日後の各臓器 (心臓、肺臓、肝臓、腎臓、脾臓) におけるルシフェラーゼ活性を測定した。

## (3) ルシフェラーゼ活性の測定

ルシフェラーゼ活性は luciferase assay system (ピッカジーン、東洋インキ) を用い、ルミノメーター (Lumat LB9507、Berthold) で測定した。

## (4) Ad ベクター投与後のマウス組織分布の測定

マウス (C57BL/6、5 週齢、メス)の尾静脈より Ad-L2、および AdK7-L2 (1x10<sup>10</sup> VP/mouse) を投与し、2 日後の各臓器の DNA を自動核酸抽出機 (NA-2000) により回収した。Ad ベクターの E4 領域のゲノム配列を鋳型として設定したプライマーならびに蛍光標識プローブを用いて TaqMan fluorogenic detection system (ABI Prism 7700 sequence detector、Perkin-Elmer Applied Biosystems)にて臓器 DNA 中に含まれる Ad ゲノム DNA 量を定量した。なお、実験に用いたプライマ

ーおよびプローブの配列は以下の通りである。

Forward primer; 5' -CACCACCTCCCGGTACCATA-3'

Reverse primer; 5' -CCGCACCTGGTTTTGCTT-3'

Probe; 5' FAM-AACCTGCCCGCGGCTATACACTG-TAMRA 3'

## (5) Ad ベクター投与後の血清中インターロイキン (IL)-6、-12 の測定

マウス (C57BL/6、5 週齢、メス)の尾静脈より Ad-L2、および AdK7-L2 (1x10<sup>11</sup> VP/mouse) を投与した。投与後 3 時間に採血し、血清を回収した。IL-6 および IL-12 は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BIOSOURCE) にて血清中 IL 濃度を測定した。

## (6) Ad ベクター投与後の血清中肝逸脱酵素の測定

マウス (C57BL/6、5 週齢、メス)の尾静脈より Ad-L2、および AdK7-L2 (3x10<sup>10</sup>VP/mouse) を投与した。投与 24 および 48 時間後に採血し、血清を回収した。血清中肝逸脱酵素は Transaminase-CII kit (Wako)にて血清中 AST 濃度を測定した。

## (7) Ad ベクター投与後の肝臓組織切片の作製

マウス (C57BL/6、5 週齢、メス)の尾静脈より Ad-L2、および AdK7-L2 (3x10<sup>10</sup> VP/mouse) を投与した。投与後 48 時間にマウスより肝臓を摘出し、ホルマリン処理した。その後、組織切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を行い病理学的観察をおこなった。

## (8) Ad ベクター投与後の臓器中サイトカイン mRNA 量の測定

マウス (C57BL/6、5 週齢、メス)の尾静脈より Ad-L2、および AdK7-L2 (1x10<sup>11</sup> VP/mouse) を投

与した。投与 3 時間後に臓器を回収し、ISOGEN (Wako) により total RNA を抽出した。SuperScript™ First-Strand Synthesis System for first strand cDNA synthesis (Invitrogen) を用いて cDNA を作製し、臓器中 IL-6、IL-12 の mRNA 量を TaqMan fluorogenic detection system (Perkin-Elmer Applied Biosystems) にて定量的に測定した。また、TNF $\alpha$ 、RANTES、MIP-2、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$ 、GAPDH の mRNA 量は RT-PCR により半定量的に測定した。

PCR プライマー、およびプローブには以下のものを用いた。IL-6: forward, 5' - GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC -3'; reverse, 5' - AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA -3'; probe, 5' - CAG AAT TGC CAT TGC ACA ACT CTT TTC TCA -3'; IL-12p40: forward, 5' - GGA AGC ACG GCA GCA GAA TA -3'; reverse, 5' - AAC TTG AGG GAG AAG TAG GAA TGG -3'; probe, 5' - CAT CAT CAA ACC AGA CCC GCC CAA -3'; TNF $\alpha$ : forward, 5' - CCT GTA GCC CAC GTC GTA GC -3'; reverse, 5' - TTG ACC TCA GCG CTG AGT TG -3'; RANTES: forward, 5' - ATG AAG ATC TCT GCA GCT GCC CTC ACC -3'; reverse, 5' - CTA GCT CAT CTC CAA ATA GTT GAT G -3'; MIP-2: forward, 5' - ACC TGC CGG CTC CTC AGT GCT GC -3'; reverse, 5' - GGC TTC AGG GTC AAG GCA AAC -3'; IFN $\alpha$ : forward, 5' - AGG CTC AAG CCA TCC CTG T -3'; reverse, 5' - AGG CAC AGG GGC TGT CTT TCT TCT -3'; IFN $\beta$ : forward, 5' - TTC CTG CTG TGC TTC TCC AC -3'; reverse, 5' - GAT TCA CTA CCA GTC CCA GAG TC -3'; IFN $\gamma$ : forward, 5' - GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC -3'; reverse, 5' - AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA -3'; GAPDH: forward, 5' - TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC -3'; reverse, 5' - GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA -3'

(9) Ad ベクター投与後の脾臓樹状細胞における サイトカイン mRNA 量の測定

マウス (C57BL/6、5 週齢、メス) の尾静脈より Ad-L2 ( $1 \times 10^{11}$  VP/mouse) を投与した。投与 3 時間後に脾臓を摘出し細胞を回収、Fc 受容体阻害抗体を作用後 FITC 標識抗マウス CD11c ハムスター抗体および PE 標識抗マウス CD45R (B220) ラット抗体にて染色した。細胞洗浄後、CD11c と B220 にて細胞を分離し、FACS Aria (BD bioscience, Tokyo, Japan) を用いて CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup> のコンベンショナル樹状細胞と、CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> のプラズマサイトイド樹状細胞および CD11c<sup>-</sup>B220<sup>+</sup> の B 細胞を分離・回収した。これらの細胞から ISOGEN (Wako) により total RNA を抽出し、SuperScript™ First-Strand Synthesis System for first strand cDNA synthesis (Invitrogen) を用いて cDNA を作製し、各細胞中の IL-6、IL-12 mRNA 量を RT-PCR により半定量的に測定した。

(10) Ad ベクター投与後の肝障害における IL-6 産生の関与

マウス (C57BL/6、5 週齢、メス) の腹腔内に IL-6 受容体阻害抗体 (clone: D7715A7, Biolegend, San Diego, CA) またはコントロール抗体 (clone: R3-34, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) を 100  $\mu$ g 投与した。抗体投与 1.5 時間後に尾静脈内より従来型 Ad ベクター ( $3 \times 10^{10}$  VP/mouse) を投与し、48 時間後に血清を回収した。血清中肝逸脱酵素濃度を Transaminase-CII kit (Wako) にて測定し、IL-6 受容体阻害時の Ad ベクターによる肝障害について検討した。

B.3 Adベクター作用後の炎症性サイトカイン産生における Toll-like receptor (TLR) の関与に関する検討

### (1) Ad ベクターの作製

Ad ベクターの作製は、improved in vitro ligation 法により行った。作製した Ad ベクターは 293 細胞を用いて増幅し、塩化セシウム密度勾配遠心法にて精製した。その後、10 mM Tris (pH 7.5)、1 mM MgCl<sub>2</sub>、10% glycerol からなる溶液で透析した。精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定した。また、精製後のベクター溶液中に含まれる LPS 量は Limulus Color KY Test (和光純薬工業株式会社) を用いて測定し、LPS フリーであることを確認した。

### (2) マウス骨髄由来樹状細胞の調製

マウス骨髄由来樹状細胞 (DC) は、Lutz らの方法 (*J. Immunol. Methods.*, 223, 77-92, 1999) を若干改変して調製した。野生型、MyD88 および TLR9 遺伝子欠損マウスの大腿骨・脛骨を摘出し、10% ウシ胎仔血清 (FBS)、50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol、および抗生物質を含む RPMI1640 培地中に骨髄を flash した。セルストレーナー (70  $\mu$ m ナイロンメッシュ) を通過させた骨髄細胞を回収し、10 ng/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、10% FBS、50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol、および抗生物質を含む RPMI1640 培地で 100 mm 細菌培養用シャーレに播種した。4 日目に新たな培養液を各シャーレに 10 ml ずつ添加した。培養 8 日目に非接着細胞を回収し、未熟 DC として以下の実験に用いた。

### (3) マウス腹腔内マクロファージの調製

腹腔内マクロファージの浸潤を促すため、野生型、MyD88 および TLR9 遺伝子欠損マウスにチオグリコレート培地 (日水製薬株式会社) 1 ml を腹腔内投与した。投与より 4 日後、腹水を回収した。

腹水を遠心後、沈降した細胞を RPMI1640 培地に懸濁し、以下の実験に腹腔内マクロファージとして用いた。

### (4) 樹状細胞ならびに腹腔内マクロファージへの刺激およびサイトカイン産生の測定

各細胞を 24 穴プレートに  $5 \times 10^5$  cells/well で播種し、Ad ベクター 10,000 VP/cell または、CpG-DNA (北海道システムサイエンス) 2.5  $\mu$ M を 48 時間作用させ、その後培養上清を回収した。培養上清中インターロイキン (IL)-6 濃度は ELISA により測定した。ELISA キットは R&D System のものを用いた。

### (5) GM-CSF 誘導 DC における CD86 および CD40 発現量の解析

各細胞を 24 穴プレートに  $5 \times 10^5$  cells/well で播種し、Ad ベクター 10,000 VP/cell または CpG-DNA 2.5  $\mu$ M を 48 時間作用させ、その後細胞を回収した。回収した細胞に抗 CD16/32 モノクローナル抗体 (BioLegend) を添加してブロッキングを行った後、fluorescein-isothiocyanate (FITC) 標識した抗 CD11c 抗体 (HL3, eBiosciences) ならびに phycoerythrin (PE) 標識した抗 CD86 抗体 (GL1, eBiosciences) もしくは抗 CD40 抗体 (3/23, eBiosciences) を含む staining buffer (1% FBS 含有 PBS) に懸濁し、氷上で 30 分インキュベートした。細胞を洗浄後、フローサイトメーター (FACSCalibur flowcytometer; Beckton-Dickinson) を用いて DC の成熟化のマーカーである CD86 および CD40 の発現を解析した。

### (6) RT-PCR

GM-CSF で誘導した DC および腹腔内マクロファージから total RNA を抽出し、GAPDH、myeloid

differentiating factor 88 (MyD88)、toll-like receptor (TLR) 3、TLR7、TLR9 の各遺伝子発現 RT-PCR にて調べた。PCR プライマーには以下のものを用いた。

MyD88 (F)

: 5' - ATG TCT GCG GGA GAC CCC CGC GTG -3'

MyD88 (R)

: 5' - TCA GGG CAG GGA CAA AGC CTT GG -3'

TLR3 (F)

: 5' - TCA CTT GCT CAT TCT CCC TT-3'

TLR3 (R)

: 5' - GAC CTC TCC ATT CCT GGC -3'

TLR7 (F)

: 5' - GGT ATG CCG CCA AAT CTA AA -3'

TLR7 (R)

: 5' - TTG ACC TTT GTG TGC TCC TG -3'

TLR9 (F)

: 5' - ATG GAC GGG AAC TGC TAC TAC A -3'

TLR9 (R)

: 5' - GAC CTT GGA ACC AGG AAG AGT T -3'

B. 4 糖修飾カチオン性リポソームを用いた NF- $\kappa$ B デコイの臓器選択的デリバリーによる Ad ベクター投与初期に起こる副作用軽減の試み

(1) Ad ベクターの調製

Ad ベクターの作製は improved *in vitro* ライゲーション法により行った。即ち、ルシフェラーゼ発現シャトルプラスミド pCMVL1 を I-CeuI および PI-SceI で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdHM4 とライゲーションを行うことによりルシフェラーゼ発現ベクタープラスミド pAdHM4-CMVL2 を得た。作製したベクタープラスミドを PacI で消化し、SuperFect (キアゲン社より入手) を用いて 293 細胞にトランスフェクトすることにより、ルシフェラーゼ発現 Ad ベクター

Ad-L2 を得た。Ad ベクターを 293 細胞に 3~4 次感染までさせることにより大量調製し、ベクターを塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し(2回)、10mM Tris (pH 7.5)、1mM MgCl<sub>2</sub>、10% glycerol からなる溶液で透析した。精製したベクターの物理的力価は分光学的方法により測定した。

(2) NF- $\kappa$ B デコイ/糖修飾カチオン性リポソーム複合体の作製

マンノースもしくはフコース修飾コレステロール誘導体と 1,2-dioleoy-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (DOPE) (モル比 3:2) から構成されるマンノースもしくはフコース修飾カチオン性リポソーム、及び cholesteryl-3(beta)N-dimethyl aminoethyl (DC-Chol) と DOPE (モル比 3:2) から構成されるコントロールリポソームは京都大学薬学部・川上茂先生より供与していただいた。5% dextrose 溶液で希釈したデコイを 5% dextrose 溶液で希釈した糖修飾カチオン性リポソームにチャージ比 1:2.3 となるように加え、速やかに混合したのち、室温で 30 min インキュベーションすることにより NF- $\kappa$ B デコイ/糖修飾カチオン性リポソーム複合体を作製した。

なお用いた NF- $\kappa$ B デコイならびにコントロールとして用いたランダムデコイの配列は以下の通りである。下線部領域は NF- $\kappa$ B 結合領域を示す。

NF-  $\kappa$  B デ コ イ 配 列 :  
5' -AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC- 3'

3' -TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG- 5'

Random デ コ イ 配 列 :  
5' -AGTTGAGGTGAGTTTCACAGGC- 3'

3' -TCAACTCCACTCAAAG

(3) Ad ベクターによる各臓器における遺伝子発現効率

マウスは C57BL/6 (5-6 週齢、雌; 日本 SLC より購入) を用いた。上記(2)の方法で作製した複合体をマウス尾静脈より (デコイ投与量: 20  $\mu$ g /mouse) 投与し、その 10 分後上記(1)で作製した Ad ベクターを  $5 \times 10^{10}$  vector particle (VP)/mouse で静脈内投与した。投与後 3、6、9、24、48 時間後に経時的に眼窩より採血するとともに、投与 48 時間後に各臓器 (心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓) を回収し、各臓器のルシフェラーゼ活性を測定した。

マウスより回収した臓器は in vivo lysis buffer (0.05 % Triton X, 2 mM EDTA, 0.1 M Tris pH 7.8) を加え氷上でホモジナイズした。作製したホモジネート液を一回凍結融解後 15000 rpm、10 分間遠心し、上清を回収した。回収したホモジネート上清 10  $\mu$ l をピッカジーン 5500 (東洋インキ社より入手) 100  $\mu$ l に加え、発光量 (Relative light Unit, RLU) を測定した。測定した発光量より付属のスタンダードで作製した検量線を用いてルシフェラーゼタンパク量を算出した。

(4) 血清中炎症性サイトカイン量および肝障害マーカーの測定

上記 (3) で経時的に回収した血液を氷上で 2-3 時間インキュベーションした後 15000 rpm、10 分間遠心し、その上清を回収して血清とした。血清中 Interleukin(IL)-6、IL-12 濃度は ELISA Kit (Biosource 社より入手) を用いて推奨プロトコールに従い測定した。また、血清中 ALT (alanine transferase)、AST (aspartate transferase) 活性はトランスアミナーゼ CII-テスト (和光純

薬工業株式会社) を用いて推奨プロトコールに従い測定した。

(5) 肝臓凍結切片の作製および Hematoxylin-Eosin (HE) 染色

複合体および Ad ベクター投与後、マウスより肝臓を回収し、PBS で洗浄したのち OCT コンパウンドに包埋・凍結した。その後、クリオスタット (LEICA CM 1850, ライカ社) を用いて凍結切片を作製した。凍結切片を 10% 中性ホルマリン緩衝液で固定、HE 染色を行った後、顕微鏡下観察した。

## C. 研究結果

### C.1 Ad ベクター感染により変動する遺伝子群の網羅的解析

Ad ベクターをマウスに全身投与すると、サイトカイン産生をはじめとする自然免疫応答が惹起されるが、そのメカニズムは未だ解明されていない。そこで、*in vivo*におけるAdベクター誘発自然免疫応答に関与する因子を探索するため、Adベクターを尾静脈内投与したマウスの臓器内における遺伝子発現変動を、DNA microarrayを用いて網羅的に解析した。全身投与したAdベクターは主に肝臓に集積すること、および*in vivo*における主要なサイトカイン産生臓器は肝臓および脾臓であることがこれまでに報告されていることから、解析対象とする臓器は肝臓および脾臓とした。Adベクターにより変動する遺伝子は自然免疫応答に関与する遺伝子以外にも数多く存在すると考えられる。したがって、発現変動した遺伝子群から自然免疫応答に関与する遺伝子群のみを抽出するため、3種のAdベクター（従来型Adベクター、K7型Adベクターおよびトリプル改変型Adベクター）を用いて解析した。すなわち、遺伝子発現効率、自然免疫誘導能が共に高い従来型Adベクターを投与した場合で発現量が変化（増加もしくは減少）し、遺伝子発現効率は高いが自然免疫誘導能は低いK7型Adベクターおよび遺伝子発現効率、自然免疫誘導能が共に低いトリプル改変型Adベクターの投与により発現量が変化しない遺伝子群をAdベクター誘発自然免疫応答に関与する候補遺伝子として抽出した（Fig. 1）。

まず、各種Adベクターを投与したマウスにおいて自然免疫応答が惹起されていることを確認するため、ベクター投与後の炎症性サイトカイン産生について検討した。投与3時間後の血清中におけるIL-6およびIL-12濃度をELISAにて測定

したところ、従来型Adベクター投与群におけるIL-6産生量が最も高く、K7型Adベクター投与群とトリプル改変型Adベクター投与群ではそれぞれ、従来型Adベクター投与群の約2/3、約1/5であった。一方、IL-12産生については、いずれのAdベクターを投与した群でも顕著な差は見られなかった（Fig. 2）。

DNA microarrayの解析結果は、PerceLLome法を用いてtemplateとなるDNAゲノムあたりのmRNA絶対量に換算した。全ての群においてmRNA絶対量が1コピー以下であったものを除去したところ、Gene Chip上の全スポット（45101個）中、発現が確認できたスポット（いずれかの群においてmRNAコピー数が1以上検出できたスポット）の数は、肝臓で34000個程度、脾臓で12000個程度であり、いずれのAdベクターを投与した場合でもほぼ同数の遺伝子が発現していた。Adベクター投与により惹起される炎症性サイトカインおよびケモカイン産生臓器を特定するため、肝臓および脾臓におけるこれら遺伝子群の発現変動を解析したところ、IL-6や、ケモカインCXCL1、CCL3などは従来型Adベクター投与群の脾臓でのみ発現が上昇しており、Adベクター投与による炎症性サイトカイン産生臓器は脾臓であることが確認できた（Fig. 3）。また、一部のケモカイン類（CXCL10、CXCL9）やToll-like Receptorファミリー（TLR2、TLR3）などは肝臓でも発現増加が見られた。

次に、Adベクター誘発自然免疫応答に関与する候補遺伝子数の解析を行った。まず、各種Adベクター投与群のコントロール群に対する変動率を算出したところ、従来型Adベクター投与群において5倍以上の発現増加を検出したプローブ数は、肝臓ではトリプル改変型Adベクター投与群の約3倍、脾臓では約5倍存在した。また、K7

型 Ad ベクター投与群における発現変動は従来型 Ad ベクター投与群とはほぼ同等であった (Fig. 4)。次に、Ad ベクター投与により誘発される自然免疫応答に関与する遺伝子を探索するため、従来型 Ad ベクター投与群で遺伝子発現が 5 倍以上増加、もしくは 1/5 以下に低下した遺伝子群のうち、トリプル改変型 Ad ベクター投与群で発現量が変化しなかった遺伝子群を抽出したところ、肝臓、脾臓においてそれぞれ 101 遺伝子、22 遺伝子が抽出され、共通に抽出されてきた遺伝子は 1 遺伝子 (ankyrin repeat domain2 (stretch responsive muscle); Ankrd2) であった。なお、抽出されてきた遺伝子のうち、機能未知の遺伝子はそれぞれ、33 遺伝子、2 遺伝子であった。

## C.2 Ad ベクター生体投与後の自然免疫誘導および肝障害発現メカニズムの解明

Ad ベクターは遺伝子導入効率に優れていることから、遺伝子治療臨床研究や、遺伝子機能解析等を目的とした基礎研究に汎用されている。しかしながら、動物個体への投与により自然免疫反応および肝障害を引き起こすことが知られており、副作用の面から問題となっている。しかし、これら副作用のメカニズムについては不明な点が多い。遺伝子導入効率に優れ、副作用を回避できる新規遺伝子導入ベクターを開発できれば、遺伝子治療研究のさらなる発展が期待できる。

一方、我々は過去にポリリジン配列をファイバーに発現させヘパラン硫酸との結合性を増強させたファイバー改変型 Ad ベクター (AdK7-L2) を作製し、*in vitro* ヒト癌細胞等に対して従来型 Ad ベクター以上の遺伝子導入効率を示すことを見出している。近年の報告により、Ad ベクターとヘパラン硫酸との結合性が Ad ベクターの肝臓への高い遺伝子導入効率に関与していることが示

されたことから、AdK7-L2 を用いてマウスへの尾静脈投与後の各組織、特に肝臓での遺伝子発現能および組織集積性、さらに自然免疫誘導能と肝障害性について検討した。静脈内投与 48 時間後の各臓器遺伝子発現および組織集積性を検討したところ、AdK7-L2 は従来型 Ad ベクター (Ad-L2) に比べ肝臓において遺伝子発現量、組織集積量共に約 6 倍上昇していた (Fig. 5A)。一方、興味深いことに脾臓においては、AdK7-L2 の集積量は Ad-L2 の 56 倍以上低いものであった (Fig. 5B)。次に、AdK7-L2 をマウスの尾静脈より投与し 3 時間後の血清中 IL-6、IL-12 濃度および 48 時間後の血清中 AST 濃度を測定することで、自然免疫誘導能と肝障害性を検討した。その結果、血清中 IL-6 濃度は Ad-L2 の約 4 倍減少し、血清中 AST 濃度はほぼコントロールレベルであった (Fig. 6A, B)。また、肝臓組織切片を作製し病理学的に観察したところ、AdK7-L2 投与後の肝障害は認められなかった (Fig. 6C)。すなわち、AdK7-L2 は Ad ベクターの動物投与において誘導される自然免疫反応を一部誘導しないこと、さらに肝臓への高い遺伝子導入能を持つだけでなく低い肝障害性を示すことが明らかとなった。これらの結果は肝臓をターゲット組織とした場合、AdK7-L2 は Ad-L2 以上の有用性を持ち、高効率かつ安全性の高い遺伝子治療用ベクターになりうることを強く示唆している。

Ad ベクターの自然免疫反応および組織障害を引き起こすメカニズムを解明することは、安全で副作用の少ない遺伝子治療用ベクターの開発にとって極めて重要である。そこで次に、Ad ベクターが引き起こすこれら副作用の発現メカニズムについて検討した。まず、マウスへの尾静脈投与後にサイトカイン産生を行う組織を調べるため、各 Ad ベクター投与後 3 時間における肝臓、脾臓

の RNA を抽出し、IL-6、IL-12 の mRNA 量をタックマン PCR により定量し、TNF $\alpha$ 、RANTES、MIP-2、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$  の mRNA 量を RT-PCR により半定量的に検討した。その結果、測定した全てのサイトカインは肝臓よりも脾臓で強い発現が観察された (Fig. 7)。特に IL-12、IFN $\alpha$  および IFN $\beta$  の mRNA は肝臓において全く検出されなかったことから、Ad ベクター投与後の自然免疫誘導 (サイトカイン産生) は主に脾臓で行われていることが明らかとなった。

Ad ベクター投与後のサイトカイン産生に脾臓が関与していることから、次に脾臓中のどのような細胞集団がサイトカイン産生を行っているのかを検討した。近年、免疫反応を担う機能細胞として樹状細胞が注目されており、強力な免疫誘導能が報告されていることから、まずは脾臓中の樹状細胞に着目し検討した。従来型 Ad ベクターをマウスに尾静脈内投与し 3 時間後の脾臓を摘出した。FITC 標識 CD11c 抗体および PE 標識 B220 抗体を用い FACSaria にて細胞を各ポピュレーションに分離し、コンベンショナル樹状細胞およびプラズマサイトイド樹状細胞をソーティングした。ソーティングした樹状細胞より RNA を回収し IL-6、IL-12 の mRNA 量を RT-PCR により半定量的に検討した。その結果、IL-6 および IL-12 の mRNA は脾臓中のコンベンショナル樹状細胞で強く発現していることが示された (Fig. 8)。これらの結果より、マウスへ静脈内投与後の Ad ベクターによるサイトカイン産生は主に脾臓で行われており、特に脾臓中のコンベンショナル樹状細胞が強く関わっていることを明らかとした。

これまでの検討により、Ad ベクター投与による自然免疫誘導のメカニズムを明らかとしたことから、次に Ad ベクターによる肝障害の発現メカニズムについて検討した。Ad ベクターによる肝障

害には自然免疫と細胞性免疫の両者が関与していることが報告されており、いくつかのサイトカイン産生が Ad ベクターによる肝障害発現メカニズムに密接に関与していることも報告されている。今回の研究により、肝障害を示さない改変型 Ad ベクターである AdK7-L2 は従来型 Ad ベクターに比べ一部のサイトカイン、特に IL-6 産生が低下していることを見出していることから、IL-6 産生と肝障害発現との関与について検討した。IL-6 受容体阻害抗体をマウスの腹腔内に投与し、次に Ad ベクターを尾静脈内投与した際の血清中 AST 濃度を検討したところ、従来型 Ad ベクター投与による血清中 AST 濃度は有意に低下していた (Fig. 9)。この時の肝臓における遺伝子発現は抗体投与の有無に関わらず変化がなかったことから、Ad ベクターによる肝障害には IL-6 産生および IL-6 受容体からのシグナルが関与していると考えられる。

以上より、従来型 Ad ベクター投与によるサイトカイン産生は脾臓で行われており、特に脾臓中のコンベンショナル樹状細胞が主に関与していることを明らかとした。また Ad ベクターによる肝障害には IL-6 産生および IL-6 受容体からのシグナル伝達に関与していることを明らかとした。一方、受容体認識能を改変した改変型 Ad ベクターを用いることで脾臓への集積性を低下させ、肝臓への高い遺伝子導入と低い肝障害を同時に達成することが可能であることを示した。これら知見は安全性と機能性に優れた遺伝子導入ベクターの開発、さらには遺伝子治療やウイルス療法等の発展に貢献できると考えられる。

C.3 Ad ベクター作用後の炎症性サイトカイン産生における Toll-like receptor (TLR) の関与に関する検討

自然免疫に関与する DC やマクロファージは主に TLRs とよばれる受容体群を用いてウイルスや細菌を認識する。そこで我々は、TLR シグナルに必須のアダプター分子である MyD88 および TLR の中でも CpG モチーフを含んだ DNA (Ad ゲノム中にも存在する)を認識する TLR9 の欠損マウスより単離した DC やマクロファージに Ad ベクターを作用させ、IL-6 などの炎症性サイトカイン産生を検討することにより、Ad ベクターによる自然免疫誘導に TLRs が関与しているかどうかについて検討を行った。

まず、Ad ベクターによる IL-6 産生において TLRs が関与しているかどうかについて、野生型、MyD88 および TLR9 遺伝子欠損マウス由来 GM-CSF 誘導 DC を用いて検討した。その結果、野生型マウス由来 DC に Ad ベクターを作用させた場合、顕著な IL-6 産生が観察された (Fig. 10A)。しかしながら、MyD88 および TLR9 遺伝子欠損マウス由来 DC における IL-6 産生量は野生型と比べ有意に低下していた。

次に、Ad ベクター作用後の DC における CD86 および CD40 の発現解析を行った。その結果、野生型由来 DC では未刺激群と比較し有意な CD86 の発現上昇がみられた (Fig. 10B)。MyD88 遺伝子欠損マウス由来 DC においても未刺激群と比較し有意な CD86 の発現上昇がみられたものの、その上昇率は野生型由来 DC のものと比べ若干低いものであった。一方、TLR9 遺伝子欠損マウス由来 DC では、野生型マウス DC と同程度の CD86 の発現上昇がみられた。同様の傾向が CD40 の発現においても観察された (data not shown)。

さらに、マウス腹腔内マクロファージを用いて、Ad ベクター作用時の IL-6 産生における TLRs の関与についても検討した。その結果、野生型マクロファージに Ad ベクターを作用させた場合、IL-6

産生を誘導した (Fig. 11)。しかし、DC の場合と異なり、MyD88 および TLR9 遺伝子欠損マクロファージに Ad ベクターを作用させても野生型と同程度の IL-6 産生がみられた。

これまでの結果から、GM-CSF 誘導 DC では Ad ベクターによる IL-6 産生に MyD88/TLR9 経路が関与していることが明らかとなった。これに対し、腹腔内マクロファージでは MyD88/TLR9 非依存経路を介し IL-6 を産生していることが示唆された。したがって、DC と腹腔内マクロファージでの Ad による自然免疫誘導に関する分子の発現パターンが異なることが考えられたため、野生型のそれぞれの細胞の total RNA を用いて MyD88、ならびにウイルス認識に関与するとされている TLR3、TLR7、TLR9 の発現を RT-PCR を用いて確認した。その結果、MyD88 ならびに TLR9 の発現量に関しては顕著な差は見られなかった (Fig. 12)。一方、TLR3、TLR7 の発現に関しては腹腔内マクロファージでより強い発現がみられた。

#### C. 4 糖修飾カチオン性リポソームを用いた NF- $\kappa$ B デコイの臓器選択的デリバリーによる Ad ベクター投与初期に起こる副作用軽減の試み

Ad ベクターをマウスに静脈内投与した場合、炎症性サイトカインを産生する細胞としては肝臓・クッパー細胞および脾臓・樹状細胞もしくはマクロファージなどが挙げられる。そこで肝臓および脾臓に対し選択的に移行するマンノースもしくはフコース修飾カチオン性リポソームを用いて、炎症性サイトカイン・ケモカインの発現に重要な転写因子である NF- $\kappa$ B に対するデコイ DNA を臓器選択的に送達することにより、Ad ベクターによる自然免疫活性化を抑制し安全性の高い治療方法の確立を試みた。

まず Ad ベクター静脈内投与後に誘導される血

中の炎症性サイトカインについて検討するため血清中 IL-6、IL-12 濃度を測定したところ、Ad 単独投与群では IL-6、IL-12 共に投与 6h 後をピークに多量のサイトカイン産生が誘導された (Fig. 14)。一方、デコイ複合体前投与群では、Ad 単独投与群と比べ、明らかなサイトカイン産生の抑制が見られた。また、フコース修飾カチオン性リポソームからなる複合体 (以下 Fuc/デコイ複合体) とマンノース修飾カチオン性リポソームからなる複合体 (以下 Man/デコイ複合体) を比較すると、Man/デコイ複合体のほうが高い抑制効果を示した。特に投与 6 時間後、Fuc/デコイ複合体前投与群では Ad-L2 単独投与群より IL-6 が 47.5%、IL-12 が 74.1%まで、Man/デコイ複合体前投与群では IL-6 が 27.5%、IL-12 が 37.0%まで低下した。したがって、デコイ複合体前投与により、Ad ベクターによる炎症性サイトカイン産生を効率良く抑制可能であることが明らかとなった。

次に、Ad-L2 投与により生じる肝障害を血清中 ALT、AST 活性を測定するとともに、肝臓の組織切片を観察することにより検討した。Ad-L2 投与 48 時間後の血清中 ALT、AST 活性を測定したところ、複合体前投与群では Ad-L2 単独投与群と比較し、明らかな ALT、AST 活性の低下が観察された (Fig. 14A)。ALT 活性については、Ad-L2 単独投与群より Fuc/デコイ複合体前投与群では 53.6%、Man/デコイ複合体前投与群では 42.9%まで低下した。一方、ランダムデコイ前投与群では、Ad-L2 単独投与群とほぼ同程度の値を示した。また、肝臓の組織切片を観察したところ、Ad-L2 単独投与群では臓器レベルでの広範壊死は観察されなかったものの、組織学的レベルでは肝実質細胞の巣状壊死、帯状壊死などによる肝細胞索の乱れが認められた (Fig. 14B)。Fuc/デコイもしくは Man/デコイ複合体前投与群では Ad ベクター単独投与

群よりも障害の程度は軽かった (巣状壊死のみ)。これらの結果は複合体前投与により誘導された血中 ALT、AST 活性がデコイ複合体前投与により抑制されたという結果と一致した。

さらに複合体ならびに Ad-L2 投与 48 時間後の各臓器 (心臓、肺、腎臓、肝臓、脾臓) におけるルシフェラーゼ発現を検討した。その結果、複合体前投与群においても Ad-L2 単独投与群と比べ、回収した全ての臓器においてルシフェラーゼ発現量に有意な差は見られなかった (Fig. 15)。従ってデコイ複合体前投与が Ad ベクターによる遺伝子発現を阻害することはないものと思われる。

以上、本研究により、デコイを糖修飾カチオン性リポソームを用いて臓器選択的に送達することにより、Ad ベクターによる炎症性サイトカイン産生ならびに肝障害が抑制可能であることが示された。

## D. 考察

### D.1 Ad ベクター感染により変動する遺伝子群の網羅的解析

Ad ベクターを生体に全身投与することにより、炎症性サイトカイン産生をはじめとする自然免疫応答が惹起されるが、そのメカニズムは未だ解明されていない。そこで、Ad ベクターを全身投与した際に誘発される自然免疫応答に關与する遺伝子を網羅的に探索するため、各種 Ad ベクター投与後のマウス脾臓、肝臓における遺伝子発現変化を DNA microarray を用いて網羅的に解析した。

Ad ベクター全身投与後の肝臓および脾臓では、自然免疫応答に關与する遺伝子以外にも、Ad ベクターの感染や搭載遺伝子の発現に關与する遺伝子など種々の遺伝子が発現していると考えられる。そこで、遺伝子発現効率や自然免疫誘導能などの特性が異なるファイバー改変ベクターを用いて、Ad ベクター誘発自然免疫応答に關与する遺伝子群の抽出を試みた。すなわち、遺伝子発現効率も自然免疫応答誘導能が高いと考えられる従来型 Ad ベクター、遺伝子発現効率は高いが、脾臓に移行しにくいために自然免疫応答誘導能が低い K7 型 Ad ベクター、および遺伝子発現効率、自然免疫応答誘導能、共に低いトリプル改変型 Ad ベクターの 3 種の Ad ベクターをそれぞれ投与し、変動する遺伝子群の中から従来型 Ad ベクター投与により変動するが、K7 型 Ad ベクターおよびトリプル改変 Ad ベクター投与により変動しない遺伝子群を自然免疫応答関連候補遺伝子群として抽出した (Fig. 1)。

自然免疫応答関連因子の変動を解析したところ、炎症性サイトカイン遺伝子やケモカイン遺伝子の発現は主に脾臓で顕著な上昇が見られ、自然免疫応答に關与し、病原体成分を認識する受容体として知られる Toll-like Receptor ファミリー

(TLRs) の中でも、TLR2 および TLR3 のみの発現上昇が肝臓で検出された。肝臓におけるその他の TLRs や脾臓における TLRs では発現変動は認められなかった。したがって、Ad ベクター誘発サイトカイン/ケモカインは主に脾臓で産生されていることが明らかとなった (Fig. 3)。次に、各種 Ad ベクター投与群のコントロール群に対する変動率を算出したところ、従来型 Ad ベクターおよび K7 型 Ad ベクター投与群の方が、トリプル改変型 Ad ベクター投与群に比べて発現が上昇した遺伝子が多く見られたが、従来型 Ad ベクター投与群と K7 型 Ad ベクター投与群における発現変動パターンはほぼ同様であった (Fig. 4)。この結果は、各種 Ad ベクター投与後の血中 IL-6 産生量と相関していた (Fig. 2)。K7 型 Ad ベクターは主要なサイトカイン産生臓器と考えられる脾臓への移行が減少することにより、ベクター投与による自然免疫誘導能が従来型 Ad ベクターに比べ低いベクターであるが、それでもなお高い自然免疫応答が惹起されており (Fig. 2)、K7 型ベクターの全身投与による遺伝子発現変動は従来型 Ad ベクターと変化がなかったと考えられた。従来型 Ad ベクター投与群において発現が変動した遺伝子群のうち、トリプル改変型 Ad ベクター投与群では発現変動が見られなかった (0.5-1.5 倍) 遺伝子群は、肝臓、脾臓においてそれぞれ 101 遺伝子、22 遺伝子であり、これらが自然免疫応答関与候補遺伝子として抽出された。この中には、インターフェロン経路関連因子 (interferon-induced protein 44, interferon-stimulated protein: ともに肝臓) やケモカイン (CCL6; 肝臓) などが含まれており、in vivo において Ad ベクターによる自然免疫応答活性化には、これらの因子が複雑に関連しているものと考えられる。

## D.2 Ad ベクター生体投与後の自然免疫誘導および肝障害発現メカニズムの解明

遺伝子治療の更なる発展には、機能性と安全性を兼ね備えた遺伝子治療用ベクターの開発が必要不可欠である。Ad ベクターは遺伝子導入効率に優れているが、自然免疫反応や肝障害を引き起こすことが知られており、副作用の面から問題となっている。そこで本研究では、Ad ベクターの自然免疫反応および肝障害発現のメカニズムをマウス *in vivo* 実験により検討した。

これまでの研究により、静脈内投与後の Ad ベクターはそのほとんどが肝臓に集積すること、さらに肝臓の血管内皮細胞やクッパー細胞等は Ad ベクターを取り込み免疫反応の活性化を行うことが報告されている。このため、Ad ベクターによる免疫反応は主に肝臓において誘導されると考えられてきた。過去の我々の研究においても、マウス尾静脈内投与後の Ad ベクターは肝臓の血管内皮細胞やクッパー細胞等に多く取り込まれていることを確認している。しかしながら、今回の検討により静脈内投与後の Ad ベクターによる自然免疫反応、特に炎症性サイトカインの産生は脾臓が主に行っており、肝臓の寄与は少ないことが明らかとなった。さらに細胞レベルでの検討により、脾臓中のコンベンショナル樹状細胞が Ad ベクター投与によるサイトカイン産生に強く関与していることが明らかとなった。もう一つの副作用として問題となっているのが Ad ベクターによる肝障害である。今回の検討により IL-6 が Ad ベクター投与後の肝障害に関与していることを明らかとした。これまでの報告では、Ad ベクターによる肝障害に TNF $\alpha$  や IL-1 が関与していることが報告されているが、今回初めて IL-6 の肝障害への関与を示した。IL-6 は自然免疫反応により産生される炎症性サイトカインであるが、細胞性免

疫にも大きく関与していることが知られている。このため IL-6 および IL-6 受容体がどのような機構を介して肝障害に関与しているのかは不明であるが、IL-6 による Ad ベクターの肝障害発現メカニズムの解明は、組織障害性を抑えた遺伝子治療用ベクターの開発に多くのヒントを与えてくれると期待できる。さらに、本研究では Ad ベクターの感染受容体を改変することで肝臓への遺伝子導入効率を上昇させ、さらに組織障害性を減少させることに成功した。このことは既存のウイルスベクターを人為的に改変した改変型ウイルスベクターが、機能性と安全性を兼ね備えた遺伝子治療用ベクターになりうることを示す成果であり、さらなる有用性を持つ改変型 Ad ベクターの開発が期待される。

## D.3 Ad ベクター作用後の炎症性サイトカイン産生における Toll-like receptor (TLR) の関与に関する検討

Ad ベクターを用いた遺伝子治療臨床研究において最も問題となっているのが、投与後初期に生じる炎症等の自然免疫応答である。しかしながら、Ad ベクターによる自然免疫誘導のメカニズムはほとんど明らかになっていないのが現状である。したがって、Ad ベクターの安全性向上のためには、Ad により誘導される自然免疫誘導のメカニズム解明が必須であると考えられる。本研究では、DC やマクロファージが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 TLRs のうち、CpG-DNA を認識する TLR9 やその下流のアダプター分子である MyD88 の欠損マウスを用いて、これらの遺伝子欠損マウスから単離した DC やマクロファージに Ad ベクターを作用後のサイトカイン産生を検討することで、Ad ベクターによる自然免疫誘導における TLRs の関与について検討した。

現在までに、マウスサイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス、バキュロウイルスを含む二本鎖DNAウイルスによる炎症性サイトカイン産生に TLR9 が関与していることが報告されている。Ad も DNA ウイルスであり、これらの二本鎖 DNA ウイルスと同様の経路を介し炎症性サイトカインが産生されていることが考えられる。

本研究により、GM-CSF 誘導 DC における Ad ベクター作用後の IL-6 産生には、MyD88 ならびに TLR9 経路が関与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 MyD88/TLR9 非依存経路を介し IL-6 を産生していることが明らかとなった。RT-PCR 解析の結果より、腹腔内マクロファージにおける MyD88 および TLR9 の発現は GM-CSF 誘導 DC と同程度であった。これらの結果から、腹腔内マクロファージにおける Ad ベクターによる IL-6 産生には TLR 以外の経路が関与することが示唆された。近年、DNA 右巻き螺旋の二本鎖構造が、TLR を介さない DNA の自然免疫賦活化に重要であり、細胞内の IPS-1、TBK1 といったシグナル伝達分子を介し、炎症性サイトカインや I 型インターフェロンを産生することが報告されている。よって、今後 Ad ベクターによる TLR を介さない自然免疫誘導経路についても検討する予定である。

また、本研究では、*in vivo* に Ad ベクターを投与した際に生じる IL-6 および IL-12 の産生源は肝臓ではなく脾臓の conventional DC であることを報告している。DC において Ad ベクターによる IL-6 産生は一部 MyD88/TLR9 依存経路を介していることから、今後、マウス生体内に Ad ベクターを投与した際の血清中に含まれる炎症性サイトカインに関しても MyD88 および TLR9 遺伝子欠損マウスを用いて検討を行い、Ad ベクター投与による自然免疫の活性化にこれらの分子が関与し

ているかどうか明らかにしていく予定である。

#### D.4 糖修飾カチオン性リポソームを用いた NF- $\kappa$ B デコイの臓器選択的デリバリーによる Ad ベクター投与初期に起こる副作用軽減の試み

NF- $\kappa$ B デコイは NF- $\kappa$ B 結合サイトと同じ塩基配列を含む二本鎖 DNA であり、細胞内に導入することにより、NF- $\kappa$ B がゲノム DNA に結合するのを防ぐことで NF- $\kappa$ B による転写を抑制している。これまで、アトピー性皮膚炎、関節リウマチや血管狭窄などに対して用いられており、優れた治療効果が報告されている。Ad ベクターによる炎症性サイトカイン産生について詳細なメカニズムはまだ不明であるが、何らかのシグナルにより NF- $\kappa$ B が活性化し炎症性サイトカイン遺伝子の転写が起こることが明らかとなっている。また、Ad ベクターによる炎症性サイトカイン産生には主に肝臓や脾臓のマクロファージが重要な役割を果たしていると考えられる。そこで我々は、肝臓や脾臓のマクロファージに対し親和性を有するフコースもしくはマンノース修飾カチオン性リポソームを用いて NF- $\kappa$ B デコイを送達することにより、Ad ベクターによる自然免疫活性化の抑制を試みた。

Fuc/デコイもしくは Man/デコイ複合体前投与群では、Ad-L2 単独投与群と比較し有意な IL-6 および IL-12 産生抑制が認められた。特に Man/デコイ複合体では最も優れた抑制効果が観察された。なぜフコース複合体よりもマンノース受容体の方が優れた抑制効果を示したのかは現在不明である。マンノース受容体およびフコース受容体ともに、マンノースおよびフコース両方を認識することから、マンノース複合体およびフコース複合体ともに肝臓・脾臓に効率良く取り込まれることが報告されている。しかしフコース複合体は

マンノース複合体に比べ、肝臓・クッパー細胞により特異的に取り込まれる。Ad ベクターによる炎症性サイトカイン産生には肝臓よりも脾臓が大きく関与していることを我々は明らかにしていることから、肝臓だけでなく脾臓に対しても効率良く送達可能であるマンノース複合体のほうが優れた抑制効果を示したのではないかとと思われる。

また複合体前投与により Ad ベクター投与後の炎症性サイトカインの産生が抑制されただけでなく、肝障害も有意に抑制された。Ad ベクターによる肝障害のメカニズムについても不明な点が多いが、今回炎症性サイトカイン産生の抑制により肝障害も抑制されたことから、炎症性サイトカインが肝障害の要因の一つであることが推察された。ただし、肝障害は複合体前投与より完全に抑制されないことから、Ad ベクターによる肝障害には炎症性サイトカイン以外の要因も関与する可能性が示唆された。