

厚生労働科学研究費補助金

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19年度 総括研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成20(2008)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 -----	33
---------------------------	----

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 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

基盤的研究部 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、体系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) Ad ベクターをマウスに投与後の脾臓を用いた DNA マイクロアレイ解析において、サイトカインシグナルを負に制御するタンパク質である Suppressor of Cytokine Signaling-1 (SOCS1) が発現上昇することを見出し、SOCS1 が Ad ベクターにより誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制することを明らかにした。また、SOCS1 を発現する Ad ベクターである Ad-SOCS1 およびルシフェラーゼ発現 Ad ベクター (Ad-L2) をマウスに共投与することにより、Ad-L2 による遺伝子発現を抑制することなく自然免疫応答を抑制することに成功した。
- (2) Ad ベクターによる生じる毒性発現の分子メカニズムの解明を目的として、Ad ベクター投与後のマウス臓器を用いた DNA マイクロアレイ解析を行った。発現変動の認められたいくつかの遺伝子を 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。このうち、遺伝子 X は Ad ベクターだけでなくリポポリサッカライド (LPS) によっても誘導されることが明らかとなり、遺伝子 X が Ad ベクターによる毒性発現に何らかの役割を担っている可能性が示された。
- (3) 炎症性サイトカインの産生に必須の転写因子である NF- $\kappa$ B の活性化を抑制するアプタマー（低分子 RNA）を発現する Ad ベクター (Ad-eAp50-L3) を作製し、マウス血管内皮細胞株である MS1 細胞に作用させたところ、LPS により誘導される IL-6 mRNA の発現が有意に抑制された。また、Ad-eAp50-L3 をマウスの静脈内に投与したところ、コントロールベクターを投与したマウスと比較し僅かではあるが血清中 IL-12 濃度の低下が観察され、NF- $\kappa$ B アプタマー搭載 Ad ベクターは Ad ベクターによる毒性発現を抑制可能なツールとなり得る可能性を示した。

## 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
岡本まり子	(独) 医薬基盤研究所 流動研究員
香山絵美	(独) 医薬基盤研究所 流動研究員
黄海瑛	(独) 医薬基盤研究所 流動研究員
西島美妙江	(独) 医薬基盤研究所 実験補助員
桜井晴奈	大阪大学大学院薬学研究科
山口朋子	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により同定された遺伝子 SOCS1 を用いた毒性発現抑制法の開発、(2) トランスクリプトーム解析を用いた Ad ベクターによる毒性発現の分子機構の解明、(3) NF- $\kappa$ B アプタマーを用いた Ad ベクターによる毒性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 SOCS1 を用いた Ad ベクター誘発自然免疫応答の抑制

#### (1) 細胞培養

マウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞は、10%FCS を含む DMEM (Sigma) を用いて培養した。STAT5 のドミナントネガティブ変異体を安定発現する RAW-STAT5DN 細胞およびそのコントロール細胞である RAW-neo 細胞(いずれも(独)医薬基盤研究所 仲哲治博士より御供与頂いた)は 10%FCS および G418 (GIBCO、500  $\mu$ g/ml) を含む RPMI-1640 (Sigma) を用いて培養した。

#### (2) SOCS1 安定発現 RAW264.7 細胞変異株 (RAW264.7-SOCS1) の作製

Mouse SOCS1 発現プラスミド (pIRESneo-mSOCS1) は mouse SOCS1 の cDNA (九州大学 吉村昭彦博士より御供与頂いた) を pIRESneo (Clontech) のマルチクローニング部位に挿入することで作製した。RAW264.7 細胞に pIRESneo-mSOCS1 もしくは pIRESneo を Fugene6 (Roche) を用いて遺伝子導入し、G418 (GIBCO、終濃度 600  $\mu$ g/ml) を用いて RAW264.7-SOCS1 および RAW264.7-neo をモノクローン化した。作製した RAW264.7-SOCS1 における SOCS1 の発現は、ウエスタンブロッティング法を用いて確認した。

#### (3) Ad ベクターの作製および調製

CMV プロモーター制御下でルシフェラーゼを発現する Ad ベクターである Ad-L2 (従来型 Ad ベクター) および AdRGD-L2 (ファイバーノブ (HI ループ) 領域にインテグリン指向性ペプチドである RGD ペプチドを提示したファイバー改変型 Ad ベクター) は、Mizuguchi らの報告 (Gene Ther、8、730-735、2001) に従って作製した。Mouse SOCS1

を発現する Ad ベクターである Ad-SOCS1 および GFP を発現する Ad ベクターである Ad-GFP1 は、in vitro ligation 法に従って作製した。CMV プロモーターおよびイントロン A 配列を持つシャトルプラスミドである pHMCMV10 のマルチクローニング部位に mouse SOCS1 の cDNA を挿入することで pHMCMV10-mSOCS1 を得た。CMV プロモーターを持つシャトルプラスミドである pHMCMV6 のマルチクローニング部位に GFP の cDNA を挿入することで pHMCMV-GFP1 を得た。従来型 Ad ベクタープラスミドである pAdHM4 の I-CeuI/PI-SceI 領域に、pHMCMV10-mSOCS1 または pHMCMV-GFP1 の I-CeuI/PI-SceI 領域を挿入することで、pAdHM4-mSOCS1 および pAdHM4-GFP1 を得た。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後、293 細胞に順次感染させるによりベクターを大量増幅した。得られたベクターは塩化セシウム溶液を用いた密度勾配遠心(2回)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。ベクターの物理学的力価 (Particle Titer) は、Maizel らの方法 (Virology、36、115-125) に従って測定し、生物学的力価は Adeno-X Rapid Titer Kit (Clontech) を用いて測定した。各ベクターの生物学的力価: 物理学的力価は、1:8 (Ad-L2 および AdRGD-L2)、1:12 (Ad-SOCS1)、1:7 (Ad-GFP) および 1:11 (Ad-null) であった。

#### (4) In vivo への遺伝子導入とルシフェラーゼアッセイ

Ad ベクター ( $5 \times 10^{10}$  Viral Particle (VP)/mouse) をマウス (C57BL/6、6-8 週齢、♀、日本 SLC より購入) の尾静脈に投与した。ベクター投与 6 時間後および 24 時間後に眼窩より末梢血を採取し、ベクター投与 24 時間後に主要臓器

(心臓、肺、腎臓、肝臓、脾臓)を摘出した。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。ホモジネート液を凍結融解した後、15000×g、4℃条件下で 10 分間遠心し、上清を回収した。サンプル中のルシフェラーゼ活性は、ピッカジーン 5500 (東洋ビーネット株式会社) を用いて測定した。また、Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad) を用いてサンプル中の総タンパク質濃度を定量した。

#### (5) *In vitro* への遺伝子導入とルシフェラーゼアッセイ

IFN- $\gamma$  (200 ng/ml) で一晩前刺激した RAW264.7 細胞を JAK2 inhibitor II (Calbiochem, 50  $\mu$ M) で 1 時間前処理した後、Ad ベクター (10,000 VP/cell) を 24 時間感染させ、細胞培養液を回収した。細胞は Alamar Blue (Biosource) を用いて細胞生存率の測定を行った後、PBS で洗浄し、1/5 濃度に希釈した細胞溶解液 (LC- $\beta$ ; TOYO INK Co. LTD.) を 150  $\mu$ l 加えて 37℃条件下で 15 分間静置した。セルスクレーパーを用いて回収した細胞溶解液を凍結融解後、15000×g、4℃条件下で 10 分間遠心し、上清を回収した。サンプル中のルシフェラーゼ活性は、ピッカジーン 5500 (東洋ビーネット株式会社) を用いて測定した。

#### (6) 炎症性サイトカイン濃度及び ALT 活性の測定

血清サンプルは、Ad ベクターを投与したマウスの眼窩から採取した全血を氷上で 2~3 時間静置した後、15000×g、4℃条件下で 10 分間遠心し、回収した上清を用いた。細胞培養液サンプルは、IFN- $\gamma$  (200 ng/ml) で一晩前刺激した RAW264.7 細胞に対し Ad ベクターを 24 時間感染させたときの細胞培養液を 15000×g、4℃条件下で 10 分間遠

心し、回収した上清を用いた。サンプル中の IL-6 及び IL-12p40、TNF- $\alpha$  濃度は、各 ELISA キット (R&D Research Systems) を用いて測定した。血清中の IL-1 $\beta$  及び IL-10、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、RANTES 濃度は Bio-plex (Bio-Rad Laboratories) を用いて測定した。血清中 ALT 活性の測定は、トランスアミナーゼ CII-テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。

#### (7) 肝臓パラフィン切片の作製とヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色

マウス (C57BL/6、6-8 週齢、♀、日本 SLC より購入) に Ad-L2 : Ad-SOCS1 の VP 比が 1 : 9 となるように調製した Ad ベクター混合溶液を  $5 \times 10^{10}$  VP/mouse となるように尾静脈内より投与し、24 時間後に肝臓を摘出した。肝臓を PBS で洗浄し、中性ホルマリン緩衝液中で固定を行った。固定した肝臓をパラフィン包埋し、切片を作製した後、H&E 染色を行った。なお、一連の作業はアプライドメディカルリサーチに委託した。

#### (8) ウェスタンブロット

細胞及び臓器は lysis buffer for western blot (臓器 ; 1% Triton-X100 及び 2 mM EDTA を含む PBS、細胞 ; 1% NP-40, 1 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, 5 mM NaF and 150 mM NaCl、どちらも 1/100 量のプロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma) を含む) 中でホモジナイズした。ホモジネート液を凍結融解後、15000×g、4℃条件下で 10 分間遠心し、上清を回収した。溶解液のタンパク質濃度を BCA protein assay kit (Bio-Rad Laboratories) を用いて測定した後、sample buffer と混和し 96℃条件下で 5 分インキュベートした。サンプルを 15% ポリアクリルアミドゲルに添加し、30 mA で 90 分間電気泳動した。電気泳動後のゲルを PVDF 膜 (ミリポア) に転写し、一次抗体として rabbit

anti-SOCS1 antibody (Immuno-Biological Laboratories, ブロッキング液で 1/20 希釈) 及び mouse anti- $\alpha$ -tubulin antibody (Santa Cruz Biotechnology, ブロッキング液で 1/200 希釈)、mouse anti- $\beta$  actin antibody (SIGMA, ブロッキング液で 1/5000 希釈)、二次抗体として HRP 標識 anti-rabbit IgG もしくは anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology)、発光基質として ECL Plus Western blotting detection reagents (GE Healthcare) を用いてウェスタンブロットを行った。なお、各ステップ間における PVDF 膜の洗浄は 0.1% Tween 20 を含む TBS (TBS-T0.1) を使い、ブロッキングには 5% skim milk を含む TBS-T0.1 を用いて行った。

#### (9) 脾臓細胞を用いたフローサイトメトリー解析

マウス (C57BL/6、6-8 週齢、♀、日本 SLC より購入) に Ad-GFP1 ( $5 \times 10^{10}$  VP/mouse) を尾静脈より投与し、投与 6 時間後に脾臓を摘出した。摘出した脾臓をすりガラスで単細胞にし、RPMI-1640 で懸濁した後、溶血して脾細胞を回収した。回収した細胞数を NucleoCounter で測定し、 $5 \times 10^6$  cells/tube となるように分注した後、1% BSA-PBS で懸濁した。次に anti-CD16/32 antibody (Fc Block) 存在下で PE 標識 monoclonal anti-mouse CD11c antibody (BD bioscience) 及び APC 標識 monoclonal anti-mouse B220 antibody (BD bioscience) を添加し、氷上で 20 分インキュベートした。細胞を 1% BSA-PBS で 2 回洗浄後、FACSCanto ならびに CellQuest software (Becton-Dickinson) を用いて測定及び解析を行った。

#### B.2 トランスクリプトーム解析を用いた Ad ベクター誘発毒性発現分子機構の解明

#### (1) 細胞刺激

$1 \times 10^6$  個の RAW264.7 細胞を 60 mm 細胞培養用ディッシュ (NUNC) に播種し、37°C で 2 日間培養した。その後、培地を除去し、LPS (Lipopolysaccharide, SIGMA-Aldrich) を終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$  となるように添加した培地を加え、37°C で 0.5、1、2、4、8 時間インキュベートした。

#### (2) RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction)

刺激した細胞より ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて total RNA を調製した。SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて逆転写反応 (42°C、60 min) を行い cDNA (complementary DNA) を合成し、以下に示す条件で PCR を行った。すべての PCR において  $200 \mu\text{M}$  dNTPs (deoxyribonucleoside triphosphate, Applied Biosystems)、400nM 各プライマー、1 unit の Ampli Taq GOLD (Applied Biosystems) を含む PCR buffer (Applied Biosystems) を使用した。また、反応液はあらかじめ 95°C、10 分間処理し Taq ポリメラーゼを活性化させた。それぞれの遺伝子特異的な PCR サイクルを行ったあとは、72°C、7 分間の伸長反応を行った。

使用したプライマー

マウス GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 検出用プライマー

GAPDH-F : 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

GAPDH-R : 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

PCR 条件

マウス GAPDH 検出 : 94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 45 秒を 27 サイクル

マウス gene X 検出 : 94°C 30 秒、57°C 30 秒、72°C 60 秒を 27 サイクル

マウス gene Y 検出 : 94°C 30 秒、61°C 30 秒、72°C 60 秒を 35 サイクル



### (3) Western blotting

刺激した細胞を、PBS (Phosphate buffered saline; 140mM NaCl, 3mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) で洗浄 (270g、5 分遠心) し、20mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (以下 HEPES, pH7.5, DOJINDO)、2mM EGTA (DOJINDO)、1% TritonX-100 (SIGMA-Aldrich)、2 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride, SIGMA Aldrich)、5mM DTT ([±]-Dithiothreitol, Wako) からなる lysis buffer 30 μl に細胞を懸濁し、氷上に 30 分インキュベートすることによって細胞を可溶化した後 16,000g、10 分遠心し、その上清を回収した。可溶化上清のタンパク濃度を Protein Assay (BIO-RAD) で測定した。

30 μg のタンパクを SDS-PAGE の 5-20 % グラディエントゲル (SuperSep, Wako) を用いて電気泳動を行った後、バッファートランスファー装置 (BE-351, BIO-CRAFT) を用いて PVDF (Polyvinylidene difluoride) メンブレン (Millipore) にタンパクを転写した。メンブレンを skim milk (Snow-brand) を終濃度 5% になるように、20mM Tris (tris[hydroxyl methyl] amino methane, SIGMA-Aldrich) - HCl [pH7.6]、0.1 % Tween20 (Wako)、150 mM NaCl (SIGMA-Aldrich) からなる TBST に加えた blocking buffer にて 1 時間室温で振とうさせた後、blocking buffer で希釈した 1 次抗体を 4°C で 1 晩反応させた。TBST で洗浄 (室温、10 分間 x 3 回) した後、blocking buffer で希釈した HRP 結合 2 次抗体 (Cell Signaling) を室温で 1 時間反応させた。TBST で洗浄 (室温、10 分間 x 3 回) した後、ECLplus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, Amersham) を用いて発光反応を行い、ルミノ・イメージアナライザー LAS3000

(Fujifilm) にて検出した。発光反応・検出後のメンブレンは、場合によっては stripping buffer (100mM 2-mercaptoethanol [Nakarai Tesque]、2% SDS、62.5 mM Tris-HCl [pH6.7]) にて 55°C 30 分インキュベートした後、TBST で洗浄 (室温、10 分間 x 3 回) し blocking buffer にて 1 時間室温で振とうさせた後、上述の方法で抗体反応を行った。

1 次抗体として以下のものを使用した。

ウサギ抗タンパク質 X 抗体

マウス抗 β-actin 抗体 (AC-15, SIGMA-Aldrich)

2 次抗体として以下のものを使用した。

HRP (horseradish peroxidase) 結合抗ウサギ Ig (immunoglobulin) G 抗体 (Cell signaling)

HRP 結合抗マウス IgG 抗体 (Cell signaling)

### (4) 遺伝子 X 発現ベクターの作製

Ad ベクター投与後のマウスの脾臓由来の cDNA (詳細は平成 18 年度総括研究報告書参照) を鋳型として TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ (Takara) をつかって遺伝子 X のコーディング領域全長を PCR にて増幅させた。得られた PCR 産物は 0.7% アガロースゲルで電気泳動後、遺伝子 X のコーディング領域由来の増幅産物をゲルより切り出して精製し、発現ベクター pcDNA3 (Invitrogen) に組み込んだ (X/pcDNA3)。得られたコンストラクトを鋳型として ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) でシーケンス反応を行い、反応物を 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を決定し、遺伝子 X のコーディング領域に変異がないことを確認した。

(5) RAW264.7 細胞にタンパク X を過剰発現させた stable clone (X/RAW) の作製

マウス X cDNA を組み込んだ発現ベクター

X/pcDNA3 を制限酵素 Pvu I (New England BioLabs) で処理し直線化した。10  $\mu$ g の直線化した発現ベクターを 3 x 10<sup>6</sup> 個の RAW264.7 細胞へ Gene Pulser X-cell エレクトロポレーションシステム (BioRad) を用いて 300 V、950  $\mu$ F の条件で導入した。96 well プレート (NUNC) に 1-3 x 10<sup>4</sup> 細胞/well となるように分注し 24 時間培養した後、G418 (Geneticin, GIBCO) を終濃度 1mg/ml となるように加え、14-20 日間培養し薬剤耐性クローンを選別した。G418 によって選別した細胞から可溶化上清を抽出し western blotting を行い タンパク X の発現を調べた。なお、コントロール用として、発現ベクター pcDNA3 を同様に RAW264.7 細胞へ導入し G418 選別を行い、薬剤耐性クローンを得た (mock/RAW)。

#### (6) X/RAW stable clone のサブクローニング

(5) で得られた X/RAW stable clone を 5 cell/ml となるように G418 (1mg/ml) 含有培地で希釈した後、100  $\mu$ l づつ 96 well プレートに播種した。13-17 日間培養し 1 ウェルあたり 1 クローンの割合で増えてきた細胞を回収した。個々のサブクローンから可溶化上清を抽出し western blotting を行い タンパク X の発現を調べた。

### B.3 NF- $\kappa$ B アプタマー発現ベクターによる毒性発現の抑制

#### (1) プラスミド

合成オリゴ DNA (5' -GATCCCGATCTTGAAACTGTTTAAAGGTTGGCCGATCTTTT TGGAAA-3' ) および (5' -TCGATTTCCAAAAAGATCGGCCAACCTTAAAACAGTTTCAA GATCGG-3' )、(5' -GATCCCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGAC ACGTTCGGAGAATTTTTGGAAA-3' ) および (5' -TCGATTTCCAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTCTTGA

AACGTGACACGTTCCGGAGAACGG-3' ) をハイブリダイゼーションしたフラグメントをライゲーションした後、BamHI および SalI で消化し、同酵素で消化した H1 プロモーターを有する pHM5-H1 プラスミドとライゲーションを行うことにより、pHM5-eAp50、pHM5-eAp50 control を得た。

NF- $\kappa$ B によるホタルルシフェラーゼ発現プラスミド pELAM-L を XbaI および NcoI で制限酵素処理しホタルルシフェラーゼ領域を除去後、同酵素で処理したウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド pGL4.70(hRluc) のウミシイタケルシフェラーゼ領域を pELAM に挿入することで、ウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド pELAM-RL を得た。

#### (2) 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。pHM5-eAp50、pHM5-eAp50 control のプラスミドを I-CeuI および PI-SceI で消化し、同酵素で消化した E3 領域にルシフェラーゼを有するベクタープラスミド pAdHM23-L3 とライゲーションを行うことにより、pAdHM23-eAp50-L3、pAdHM23-eAp50control-L3 を得た。作製したベクタープラスミドを PacI で消化し、SuperFect Transfection Reagent (QIAGEN) を用いて 293 細胞にトランスフェクトすることにより、eA-p50 発現 Ad ベクター Ad-eAp50-L3、eA-p50 control 発現 Ad ベクター Ad-eAp50control-L3 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、Ad 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学的力価は分光学的方法により測定した。

### (3) 遺伝子導入後の細胞増殖測定

10%FCS を含む MEM で培養した A549 細胞を 96 well プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、翌日 Ad ベクターを 3000 vector particle (VP)/cell の濃度で添加した。24 時間培養後にアラマブルーを 10 % 添加し 2 時間培養後に吸光度 (570 nm、600 nm) をサンライズレインボーサーモ (Wako) で測定した。

### (4) LPS 刺激による炎症性サイトカイン産生と mRNA 量の測定

10 %FCS を含む DMEM で培養した MS-1 細胞を 24 well プレートに  $5 \times 10^5$  cells/well で播種し、翌日に Ad ベクターを 3000 VP/cell の濃度で添加した。24 時間後に Ad ベクターを除去後、LPS  $0.5 \mu\text{g}/\text{well}$  添加し 24 時間培養後に培養上清と細胞を回収した。培養上清中インターロイキン (IL)-6、IL-12 濃度は ELISA により測定した。ELISA キットは R&D System を用いた。各群を一つにまとめた回収細胞は、ISOGEN (Wako) により total RNA を抽出し、SuperScript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for first strand cDNA synthesis (Invitrogen) を用いて cDNA を作製した。各細胞中の IL-6、IL-12、GAPDH mRNA 量は定量的 Real-time PCR により測定した。50 倍希釈した cDNA  $5 \mu\text{l}$ 、 $0.5 \mu\text{M}$  プライマー、 $0.6 \mu\text{M}$  TaqMan probe、 $25 \cdot \mu\text{l}$  TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems) を含む反応液 ( $50 \cdot \mu\text{l}$ ) を ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いて、 $95^\circ\text{C}$  10 分間処理後、 $95^\circ\text{C}$  15 秒及び  $60^\circ\text{C}$  1 分のサイクルを 40 サイクル反応させることにより行った。プライマー及びプローブは以下の通りである。

IL-6 Forward:

5' -GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3' ,

IL-6 Reverse:

5' -AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3' ,

IL-12p40 Forward:

5' -GGAAGCACGGCAGCAGAATA-3' ,

IL-12p40 Reverse:

5' -AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG-3' ,

GAPDH Forward:

5' - TTCACCACCATGGAGAAGGC-3' ,

GAPDH Reverse:

5' -GGCATGGACTGTGGTCATGA-3' ,

IL-6 probe:

5' -CAGAATTGCCATTGCACAACCTCTTTTCTCA-3' ,

IL-12p40 probe:

5' -CATCATCAAACCAGACCCGCCCAA-3' ,

GAPDH probe:

5' -TGCATCCTGCACCACCAACTGCTTAG-3'

### (5) NF- $\kappa$ B によるウミシイタケシフェラーゼ発現プラスミドを用いた eA-p50 の活性化測定

A549 細胞を  $1 \times 10^6$  cells/100  $\phi$  dish で播種し、翌日プラスミド pELAM-RL  $10 \mu\text{g}$  を SuperFect Transfection Reagent (QIAGEN) を用いてトランスフェクトした。24 時間後に細胞回収し、24 well プレートに  $5 \times 10^4$  cells/well で播種し、翌日に Ad ベクターを 3000 VP/cell の濃度で添加した。24 時間後に Ad ベクターを除去後、LPS  $5 \mu\text{g}/\text{well}$  ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 添加した。1 時間培養後に培地を除去し、Passive Lysis Buffer (Promega) を加え細胞を溶解した。細胞溶解液は一回凍結融解後 15000 rpm、5 分間遠心し上清を回収した。回収した上清  $20 \mu\text{l}$  を Luciferase Assay Reagent II (Promega)  $100 \mu\text{l}$  に加え、ホタルルシフェラーゼ活性を測定した。さらに、Stop & Glo Reagent (Promega)  $100 \cdot \mu\text{l}$  を加えウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。発光量 (Relative Light Unit, RLU) はルミノメーター (Lumat LB9507,

Berthold)で測定した。

#### (6) 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。Ad ベクターを  $5 \times 10^{10}$  VP/mouse で静脈内投与した。投与後 3、6、9 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。

#### (7) 血清中炎症性サイトカイン量の測定

上記 (6) 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 により測定した。ELISA キットは R&D System のものを用いた。

## C. 研究結果

### C.1 SOCS1 を用いた Ad ベクター誘発自然免疫応答の抑制

Ad ベクターを全身投与すると、炎症性サイトカイン産生や組織傷害を伴う自然免疫応答が誘導されるが、その分子メカニズムは明らかとなっていない。昨年度我々は、Ad ベクターを全身投与したマウスの臓器を用いた DNA マイクロアレイ解析を行い、Ad ベクター誘発自然免疫応答関連候補遺伝子の抽出を試みた。その結果、Ad ベクターを全身投与したマウスの肝臓および脾臓において Suppressor of Cytokine Signaling-1 (SOCS1) mRNA の発現が上昇（肝臓：10.1 倍、脾臓：4.8 倍）することを見出した。SOCS1 は抗原刺激による免疫応答を抑制する機能を持つことから、SOCS1 が Ad ベクターにより誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制すると考え、検討を行った。まず、*in vivo* における SOCS1 mRNA 発現上昇を *in vitro* で再現するため、マウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞に Ad-L2 または AdRGD-L2 を 6 時間作用させたところ、特に AdRGD-L2 を作用させた群において免疫応答活性化の指標である IL-6 mRNA の発現上昇とともに、SOCS1 mRNA の発現上昇が認められた (Fig. 1)。なお、Ad-L2 を作用させた群において両遺伝子の発現上昇が認められなかったのは、RAW264.7 細胞が Ad の第 1 受容体である coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) 陰性細胞であるために、CAR 依存的に細胞内へ導入される Ad-L2 が充分接着・導入されなかったためと考えている。そこで次に、SOCS1 を安定発現させた RAW264.7 細胞 (RAW264.7-SOCS1) を作製し (Fig. 2A)、Ad ベクターにより誘導される炎症性サイトカイン産生に対する SOCS1 の抑制効果を検討した。IFN- $\gamma$  で前処理した RAW264.7-SOCS1 細胞およびそのコントロール細胞である RAW264.7-neo 細胞に

Ad-L2 または AdRGD-L2 を 24 時間作用させたところ、RAW264.7-SOCS1 細胞は RAW264.7-neo 細胞と比較して、IL-6 および TNF- $\alpha$  産生が顕著に抑制された (Fig. 2B)。

次に、SOCS1 を発現する Ad ベクターである Ad-SOCS1 が自身により誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制するか検討した。ただし、このアプローチが成功するためには、Ad-SOCS1 の全身投与後、①炎症性サイトカイン産生が起こる前に SOCS1 が充分量発現し、かつ②Ad ベクターに应答して炎症性サイトカインを産生する細胞で SOCS1 が発現する必要がある。そこで、レポーター遺伝子を発現する Ad ベクターを用いた検討により、Ad-SOCS1 がこれらの条件を満たすことができるのか検証した。まず、投与した Ad ベクターが脾臓において遺伝子を発現するのに要する時間を検討した。Ad-L2 を投与したマウスから経時的に摘出した肝臓および脾臓におけるルシフェラーゼ発現量を測定したところ、投与 1 時間後においても両臓器で充分量のルシフェラーゼ発現が検出された (Fig. 3B)。次に、Ad ベクターによる遺伝子発現が炎症性サイトカインを産生する細胞で起こるか検討した。我々は昨年度、脾臓に存在するコンベンショナル樹状細胞 (cDC) が Ad ベクターに应答して炎症性サイトカインを産生することを報告している。GFP を発現する Ad ベクター (Ad-GFP1) を静脈内投与したマウスの脾臓に存在する GFP 陽性細胞の細胞種をフローサイトメトリーにより解析したところ、脾臓 cDC の約 13% が GFP 陽性を示した (Table 1)。以上の結果より、全身投与した Ad-SOCS1 は投与早期から脾臓の cDC で充分量 SOCS1 を発現すると考えられ、Ad-SOCS1 が自身により誘導される自然免疫応答を抑制する可能性が強く示唆された。

そこで、Ad-SOCS1 の全身投与による Ad ベクター誘発炎症性サイトカイン産生の抑制効果を検

討した。まず、Ad-SOCS1を全身投与したマウスの肝臓および脾臓におけるSOCS1の発現をウェスタンブロット法により検討したところ、投与3時間後から両臓器でSOCS1の発現が認められ、それ以前では発現が確認できなかった (Fig. 3A)。ただし、Ad-L2を用いた検討 (Fig. 3B) では投与1時間後からルシフェラーゼ発現が検出されたことから、Ad-SOCS1投与1時間後においてもSOCS1は発現しているものの、その発現量は非常に微量であり、ウェスタンブロット法の検出限界以下であったと考えられた。また、Ad-L2を投与してから6時間後の脾臓でもSOCS1のバンドがわずかながら検出されたことから、Adベクターの全身投与によるSOCS1の発現上昇がタンパク質レベルでも確認された。次に、Ad-SOCS1を静脈内投与したマウスの血清中炎症性サイトカイン濃度を測定したところ、Ad-L2投与群に比べ、Ad-SOCS1投与群ではIL-6産生が完全に抑制され、IL-12産生も約1/2まで抑制されていた (Fig. 4)。また、IL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ 、RANTES、MCP-1といった、様々な炎症性サイトカイン・ケモカインの産生も抑制されていた (Fig. 5)。また、Adベクターを全身投与しても、血清中IL-10濃度の上昇は認められなかった。本結果により、Ad-SOCS1は自身により誘導される複数の炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかとなった。

そこで、本システムの応用として、Ad-SOCS1の共投与がAd-L2により誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制できるのではないかと考えた。Ad-L2とAd-SOCS1をVP比が1:9となるように混合し、マウスに静脈内投与したところ、外来遺伝子を搭載していないAdベクター (Ad-null) とAd-L2を共投与した群に比べ、Ad-SOCS1を共投与した群ではAd-L2により誘導されるIL-6産生が完全に抑制され、IL-12産生も約1/2まで抑制された (Fig. 6A)。このとき、Ad-SOCS1の共投与

によりAd-L2の遺伝子発現効率が妨げられることはなかった (Fig. 6B)。Adベクターの全身投与による自然免疫応答には肝傷害も報告されていることから、次に、Ad-SOCS1を共投与することで、Ad-L2による肝傷害が抑制されるか検討した。両ベクターを共投与したマウスの血清中ALT活性 (肝傷害マーカー) を測定したところ、Ad-null共投与群では血清中ALT活性の上昇が認められたのに対し、Ad-SOCS1共投与群における血清中ALT活性はMock群と同レベルであった (Fig. 6C)。また、Ad-SOCS1の共投与を行ったマウスの肝臓を用いて組織学的解析を行ったところ、Ad-null共投与群では肝細胞の壊死・アポトーシスが多数認められたのに対し、Ad-SOCS1共投与群の肝組織には死細胞の数が減少していた (Fig. 6D)。したがって、Ad-SOCS1の共投与により、Ad-L2による遺伝子発現を妨げることなく、炎症性サイトカイン産生や肝傷害を含む自然免疫応答を抑制することに成功し、本ベクター系があらゆる治療用遺伝子を用いた遺伝子治療においても応用可能であることが強く示唆された。

Adベクターによる自然免疫応答の分子メカニズムは未だ未解明である。SOCS1によりAdベクター誘発炎症性サイトカイン産生が抑制されたことから、SOCS1の標的分子であるJAKがAdベクターによる自然免疫応答に関与していると考えた。特にJAK2およびSTAT5a分子はAdベクターを全身投与したマウスの脾臓において発現上昇が認められた分子であったことから、Adベクターによる炎症性サイトカイン産生における両分子の関与を検討した。JAK2 inhibitor IIを用いてJAK2の活性化を選択的に阻害したRAW264.7細胞にAd-L2およびAdRGD-L2を作用させたところ、阻害剤非作用群と比較して、IL-6およびTNF- $\alpha$ の産生が顕著に抑制された (Fig. 7A) ことから、Adベクターによる炎症性サイトカイン産生は、JAK2

の活性化を介して起こることが明らかとなった。なお、JAK2 活性化阻害条件下における Ad ベクター誘発炎症性サイトカイン産生抑制は、mRNA レベルにおいても確認された (Fig. 7A)。ただし、JAK2 活性化阻害条件下においても Ad ベクターによる遺伝子発現量に変化がなかった (Fig. 7B) ことから、Ad ベクターによる免疫細胞活性化は遺伝子発現効率には影響しないことが明らかとなった。次に、Ad ベクターにより誘導される炎症性サイトカイン産生における STAT5 の関与について検討を行った。STAT5 のドミナントネガティブ変異体 (STAT5DN) を安定発現する RAW264.7 変異株 (RAW-STAT5DN) に Ad-L2 および AdRGD-L2 を作用させたところ、コントロール細胞株 (RAW-neo) と比較して、特に AdRGD-L2 により誘導される IL-6 産生が顕著に抑制された (Fig. 8)。本結果により、Ad ベクター誘発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が明らかとなった。

## C.2 トランスクリプトーム解析を用いた Ad ベクター誘発毒性発現分子機構の解明

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 マイクロアレイを用いて網羅的に解析した (詳細は平成 18 年度総括研究報告書参照)。そして変動の見られたいくつかの遺伝子を 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。候補遺伝子のひとつとして、我々は遺伝子 X および Y に注目した。X は最近、炎症性サイトカインの発現を誘導する転写因子 NF- $\kappa$ B の核内移行を促進するこ

とが報告されており、また、Y は最近 TLRs (Toll-like receptors) 非依存的に DNA ウィルスを認識する受容体として報告された細胞内タンパクである。そこでこれらのタンパクの Ad ベクター誘発自然免疫応答への関与について検討した。

まず、*in vitro* の自然免疫応答に関する実験でよく用いられているマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞に対し、極めて強い炎症性サイトカイン誘発作用を有する LPS を作用させ、遺伝子 X および Y の発現を調べた。LPS 投与後、30 分後には X mRNA の発現が認められた。そして作用後 1 時間から 2 時間で発現量は最大に達し、その後は発現の減少が見られた (Fig. 9)。次に、遺伝子 X のタンパクとしての発現について検討した (Fig. 10)。タンパク X の発現は X mRNA の発現よりも遅く LPS 投与後 1 時間後にわずかながら認められ、4 時間後に発現量は最大となった (Fig. 10)。LPS 投与後 8 時間後には発現の減少が見られた (data not shown)。これらの結果より、X は LPS 応答における immediate early response gene であることが明らかとなった。

一方、遺伝子 Y の発現については、現在入手可能なタンパク Y に対する抗体がないため、LPS 投与した RAW264.7 細胞における Y mRNA 発現について調べることにした (Fig. 9)。Y mRNA の発現は LPS 投与後 4 時間後から認められ (Fig. 9)、その発現は 24 時間後も検出された (data not shown)。これらの結果より、遺伝子 Y は報告されている DNA ウィルスによる誘導だけでなく、LPS にも応答して発現が誘導されることが明らかとなった。

次に、X が自然免疫応答すなわち炎症性サイトカインの産生に関与しているかどうかを検討するため、RAW264.7 細胞にマウス X 発現ベクターを導入した。エレクトロポレーションによる導入

後、細胞を 96 well plate に播種し、G418 による選別を行い、薬剤耐性コロニーを形成させたところ、1 ウェルに多コロニーが出現し、1 コロニーごとの回収は困難と判断した。そのため、ウェルごとに細胞を回収し、それぞれをとりあえず 1 クローンとしてナンバリングすることにした（そのためこの段階での 1 つのクローンは、幾種類のクローンが混じっているヘテロな細胞集団である）。得られた薬剤耐性クローン (X/RAW) について、X の発現を western blotting により調べた。48 クローンについてタンパク X の発現を調べたところ、X/RAW クローン No33 において無刺激状態においても X の発現が検出された (Fig. 11 A、ここでは 48 クローンについて行なった westren blotting の結果の一部を示してある)。RAW264.7 細胞は無刺激状態ではタンパク X の発現がみられないこと (Fig. 10) や、X cDNA を挿入していない発現ベクター pCDNA3 のみを導入して得られたクローン (mock/RAW) ではタンパク X の発現が検出されなかったことより、X/RAW No33 において無刺激状態で観察された X の発現は外来遺伝子由来であることが示された (Fig. 11A)。

X/RAW No33 は前述したとおり、幾種類のクローンが混じっているヘテロな細胞集団であるためサブクローニングを行い、タンパク X を過剰発現する単一クローンの同定を試みた。得られたサブクローンについて、X の発現を westren blotting により調べた。サブクローン 24 クローンのうち、X/RAW クローン No3313 において無刺激状態でもタンパク X の発現が検出された (Fig. 11B、ここでは 24 クローンについて行なった westren blotting の結果の一部を示してある)。同様の実験の結果さらに 3 クローン (X/RAW No. 3306, 3310, 3311) において外来遺伝子由来の X の発現が認められることを確認した (data not shown)。

今後、得られた X/RAW クローンにおける炎症性サイトカインの産生能、またそれに関わる分子の発現・細胞内局在について調べていくとともに Ad ベクター作用時の X の関与についても検討していく予定である。

### C.3 NF- $\kappa$ B アプタマー発現ベクターによる毒性発現の抑制

Ad ベクターを静脈内投与すると、投与後直後に起こる自然免疫応答によって IL-6 をはじめとする多くの炎症性サイトカイン産生が誘導される。これらの炎症性サイトカインの発現には転写因子である NF- $\kappa$ B が重要な役割を担っており、この NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することで自然免疫応答の低下の誘導が可能であると考えられる。一方、特定の分子と特異的に結合する核酸分子の一つである RNA アプタマーは、免疫原性がほとんどない利点を持っており、抗体に代わる分子認識が可能な生体物質として薬剤への応用が期待されている。そこで選択的に NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する RNA アプタマーを搭載した Ad ベクターを作製し、炎症性サイトカイン産生の抑制をすることで、Ad ベクターによる安全性の高い治療方法の確立を試みた。

E3 にルシフェラーゼ発現カセットが挿入されている Ad ベクターを用いて、NF- $\kappa$ B の p-50 に特異的に結合することが確認されている RNA アプタマー (eA-p50) を E1 に挿入することで、eA-p50 発現 Ad ベクターを作成した。まず、eA-p50 発現 Ad ベクターによって副作用を生じるかどうか確認するために、A549 細胞を用いて検討した。A549 に各 Ad ベクターを感染させたところ、24 時間後の細胞生存率に関して eA-p50 による顕著な生存率低下は認められなかった (Fig. 12)。さらに、48、72 時間後でも同様の結果が得られ、またマウス内皮細胞株 MS-1 細胞においても eA-p50 による



生存率への顕著な影響は観察されなかった (data not shown)。

次に、MS-1 細胞を用いて炎症性サイトカインの産生に eA-p50 が影響を及ぼすかどうかを検討した。Ad ベクターのみの刺激では MS-1 細胞のサイトカイン産生が低いため、Ad ベクター感染後の細胞に LPS で刺激し IL-6 および IL-12 の測定を行った。培養上清中に産生された IL-6 を ELISA で測定した結果、IL-6 産生の eA-p50 による影響は観察されなかった。しかし IL-6 の mRNA の発現量を TaqMan PCR により定量したところ、Ad-eAp50-L3 を感染後さらに LPS で刺激を行った場合において IL-6 の mRNA 量が抑制されていることが観察された (Fig. 13)。一方で、IL-12 の産生は ELISA の検出限界以下であり、mRNA 量もわずかであった (data not shown)。eA-p50 による炎症性サイトカイン IL-6 産生の影響が明確に観察されなかったため、eA-p50 が NF- $\kappa$ B を直接抑制しているかどうか検討した。細胞は NF- $\kappa$ B に依存してウミシイタケルシフェラーゼを発現するプラスミドをトランスフェクションした A549 細胞を用いた。その結果、Ad-eAp50-L3 は Ad-L3 よりもウミシイタケルシフェラーゼの発現低下がわずかに観察された (Fig. 14)。しかしながら、Ad-eAp50control-L3 でも同様の発現低下が観察された。また各 Ad ベクターに挿入されているホタルルシフェラーゼ発現の差は見られなかったことから、Ad ベクター間で遺伝子導入効率は変わらなかった (data not shown)。

さらに in vivo での eA-p50 による炎症性サイトカインの影響を検討するために、Ad ベクターを静脈内投与し誘導される血中の IL-6 と IL-12 の濃度を測定した。IL-6 においては Ad ベクターの違いによる影響は観察されなかったが、IL-12 では Ad-eAp50-L3 投与群でわずかに抑制していることが観察された (Fig. 15)。Ad ベクター投与後

48 時間後の各主要臓器 (心臓、肺、脾臓、腎臓、肝臓) におけるルシフェラーゼ発現は Ad-eAp50-L3 投与群においても Ad-L3 と比べ、回収したすべての臓器においてルシフェラーゼ発現量に顕著な差はなかった (Fig. 16)。以上より、NF- $\kappa$ B アプタマー発現 Ad ベクターは in vivo においても毒性発現を軽減可能であることが示された。

## D. 考察

### D.1 SOCS1 を用いた Ad ベクター誘発自然免疫応答の抑制

Ad ベクターの全身投与による遺伝子治療の問題点として、炎症性サイトカイン産生や組織傷害を伴う自然免疫応答が挙げられるが、その分子メカニズムは未だほとんど解明されていない。そこで、Ad ベクターによる自然免疫応答の分子メカニズムの解明と、免疫誘導能の低い Ad ベクターの開発を試みた。

Ad ベクターを全身投与したマウスの脾臓において発現上昇を示した遺伝子を詳細に解析したところ、Ad ベクター誘発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が明らかとなった。本結果は、これまで明らかとなっていなかった Ad ベクター誘発自然免疫応答シグナルの一端を示す非常に有用な知見といえる。さらに、JAK2 の活性化を阻害する分子である SOCS1 が Ad ベクターにより誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制することを明らかとし、SOCS1 を発現する Ad ベクターである Ad-SOCS1 を Ad-L2 と共投与することにより、Ad-L2 による遺伝子発現を抑制することなく自然免疫応答（炎症性サイトカイン産生および肝傷害）を抑制することに成功した。全身投与した Ad ベクターが搭載した遺伝子を発現するまでの時間を検討したところ、投与 1 時間後では、脾臓における遺伝子発現量の方が肝臓よりも 10 倍高かった。本結果は、脾臓の免疫細胞に分布した Ad ベクターによる遺伝子発現の方が他の細胞よりも早く起こる可能性を示しており、これが Ad-SOCS1 による炎症性サイトカイン産生抑制を可能にしたと考えている。また、全身投与した Ad ベクターに応答して炎症性サイトカインを産生する細胞である cDC における遺伝子発現効率を検討したところ、脾臓 cDC のうち約 13% が GFP 陽性を示し、約 85% の cDC では GFP

発現が検出できなかったが、これは、Ad-SOCS1 投与マウスの脾臓 cDC にはごく少量の SOCS1 しか発現していないものの、Ad ベクターによる炎症性サイトカイン産生を抑制するには充分量であったことを示唆している。Ad-SOCS1 の共投与により、様々な炎症性サイトカイン・ケモカインの産生が抑制されたものの、その抑制の程度は個々によって異なっていたことから、Ad ベクターにより誘導される炎症性サイトカイン産生に関与するシグナル経路は複数存在し、その種類によって使い分けられていると考えられる。さらに、Ad-SOCS1 を Ad-L2 と共投与することにより、肝傷害の抑制にも成功した。本研究において、SOCS1 の過剰発現によりマクロファージ様細胞株における Ad ベクター誘発炎症性サイトカイン産生が抑制されたことから、SOCS1 が肝臓に常在するマクロファージである Kupffer 細胞に働きかけることで、Ad ベクターによる活性化や細胞死を免れたのではないかと考えている。

### D.2 トランスクリプトーム解析を用いた Ad ベクター誘発毒性発現分子機構の解明

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。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。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。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関与する遺伝子を網羅的に探索するため、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 マイクロアレイを用いて網羅的に解析した（詳細は平成 18 年度総括研究報告書参照）。そして変動の見られたいくつかの遺伝子を 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選び出した。

候補遺伝子のひとつ遺伝子 X の転写産物は、増殖シグナルのネガティブフィードバック機構に関与するタンパクとして研究が進められてきたが、最近タンパク X を皮膚において高発現するトランスジェニックマウスを作成したところ炎症性サイトカインである IL-6 の産生が亢進したことや、炎症性サイトカインの発現を誘導する転写因子 NF- $\kappa$ B の核内移行を X が促進することが報告されている。一方、他の候補遺伝子 Y の転写産物は、最近 TLRs (Toll-like receptors) 非依存的に DNA ウイルスを認識する受容体として同定された細胞内タンパクであり、細胞内の Y の発現を siRNA (short interfering RNA) で低下させると DNA および DNA ウイルス作用による炎症性サイトカイン産生の減少がみられることが報告されている。これらの知見より、X および Y は Ad ベクター誘発自然免疫応答において重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられたため、これら 2 つのタンパクについて先に調べていくことにした。

これまでに我々は、*in vivo* での Ad ベクターによる IL-6 産生には脾臓の樹状細胞が大きく関わっていること、そして *in vitro* において 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を明らかにしてきた(詳細は平成 18 年度総括研究報告書参照)。しかし、MyD88 および TLR9 遺伝子欠損マウスにおいて血中の炎症性サイトカイン量は野生型マウスと比べ顕著な差が見られなかった。また、腹腔内マクロファージでは MyD88/TLR9 非依存的に IL-6 を産生していることが確認されたことより、*in vivo* での Ad ベクターによる自然免疫応答には樹状細胞だけではなく、マクロファージも MyD88/TLR9 非依存的な経路を使って貢献しているのではないかと考えた。そこで、マウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞を用いて実験を行なった。通常状態では RAW264.7 細胞において X および Y の発現は見られなかったが、非常に強い炎症性サイトカイン誘導作用を有する LPS

でこの細胞を刺激したところ、遺伝子 X および Y の発現が誘導された (Fig. 9, 10)。X についてはタンパクの発現が LPS 投与後 1 時間後には認められ、LPS 応答における immediate early response gene であった。Y はすでに DNA および DNA ウイルス作用により発現が誘導されることは報告されているが、LPS によっても発現が誘導されることが明らかとなった。DNA ウイルスだけではなくその他の多くの外来病原体によって引き起こされる自然免疫応答に広く関与している可能性が示唆される。

X の機能について調べるために、X を高発現する RAW264.7 細胞の stable clone の作製を試みた。しかし得られた薬剤耐性コロニーを調べても X を高発現しているものは現在までに 1 サンプルしか得ることができなかった (Fig. 11)。X 発現ベクターは、X とネオマイシン耐性遺伝子がそれぞれ別々のプロモーターで制御されていることより、ネオマイシン耐性遺伝子のみ発現している細胞のみが薬剤耐性コロニーとして出現しているのかもしれない。そのため IRES (internal ribosome entry site) の下流にネオマイシン耐性遺伝子をつなげた発現ベクターを使って、RAW264.7 細胞の stable clone の作製を現在行なっている。また、X は増殖シグナルのネガティブフィードバック機構に関与することが報告されているため、RAW264.7 細胞においても過剰発現により細胞の増殖が低下し、その結果 stable clone を効率よく得ることができない可能性もある。その場合は、タンパク X の inducible clone を作製する予定である。また、得られた X/RAW stable clone (No. 3306, 3313, 3310, 3311) については、炎症性サイトカインの産生能、またそれに関わる分子の発現・細胞内局在について調べていくとともに Ad ベクター作用時の X の関与についても検討していく予定である。さらに、RAW264.7 細胞において LPS 刺激により X および Y

の発現が誘導されたので、このときに siRNA を利用して X および Y の発現の発現を低下させサイトカイン産生に何らかの影響を及ぼすのかどうか調べていくことで、X および Y の自然免疫応答機構における役割について明らかにしていく予定である。

### D.3 NF- $\kappa$ B アプタマー発現ベクターによる毒性発現の抑制

RNA アプタマーは特定の分子と特異的に結合する核酸分子であり、抗体に代わる分子認識が可能な生体物質として薬剤への応用が期待されている。RNA アプタマーの eA-p50 は NF- $\kappa$ B の p-50 に特異的に結合することで、NF- $\kappa$ B の核内移行を阻害し転写活性を抑制することが報告されている。一方、Ad ベクターによる炎症性サイトカイン産生の詳細なメカニズムは不明な点が多いが、炎症性サイトカインの転写には NF- $\kappa$ B が大きく関与していることが明らかとなっている。そこで我々は、NF- $\kappa$ B 活性を抑制させる eA-p50 を搭載した Ad ベクターを用いて炎症性サイトカイン産生の抑制を試みた。

まず、Ad-eAp50-L3 による細胞内の eA-p50 の発現を検討したところ、Ad-L3 を感染させた群と比較して eA-p50 による NF- $\kappa$ B 活性の抑制はわずかながら認められた (Fig. 14)。今回使用した Ad ベクターには eA-p50 配列を 1 コピーしか搭載していないため、LPS 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化を抑制するために十分なアプタマーを発現しておらず、eA-p50 によるわずかな影響しか観察できなかった可能性も考えられる。しかし、コントロール配列を挿入した Ad ベクターも NF- $\kappa$ B 活性化が抑制されたことについては、原因は不明である。可能性としてはコントロール配列が何らかの細胞内物質を抑制した可能性も考えられる。今後、eA-p50 が発現しているか否か直接確認するため

にノザンプロットで検討する予定である。

MS-1 細胞株による炎症性サイトカイン (IL-6) 産生を ELISA にて検討したところ、Ad-eAp50-L3 による顕著な抑制は認められなかったが、mRNA レベルでは LPS 刺激をした場合において抑制が認められた (Fig. 13)。この結果より、刺激後 24 時間以降にサイトカイン産生が抑制されている可能性が示唆されるため、eA-p50 による IL-6 産生の抑制効果を観察するには、LPS 刺激後の培養上清の回収時間を検討する必要があると考えられる。また、IL-6 の mRNA 発現は LPS 刺激数時間後が発現ピークである報告が多いことから、刺激後より早い時間の mRNA 測定でより顕著な結果が得られると考えられる。しかし、Ad-eAp50-L3 感染後の LPS 未刺激で、IL-6 mRNA 発現が最も上昇していることについては、現在のところ不明である。

一方、今回の MS-1 細胞では eA-p50 による IL-12 産生への影響が確認できなかったのは、もともと IL-12 産生が低い細胞であるためであると考えられる。Ad ベクターの *in vivo* 投与実験で Ad-eAp50-L3 投与群において IL-12 産生の抑制が観察されていることから、*in vitro* での IL-12 産生への影響を詳細に検討すべきである。そのため、MS-1 細胞以外のマクロファージや樹状細胞などの IL-12 産生細胞を用いて、eA-p50 の IL-12 産生への影響を今後詳細に検討することで、炎症性サイトカイン産生への影響を明らかにする予定である。