

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17～19年度

総合研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成20(2008)年4月

目 次

I. 総合研究報告

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 -----	60
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

総合研究報告書

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った。本研究課題では以下の結果を得た。

- (1) 一般にウイルスベクターはその高い抗原性などから非ウイルスベクターに比べ安全性に問題があると考えられている。しかしながら、ウイルスベクターと非ウイルスベクターの遺伝子発現効率および自然免疫誘導能などの副作用を系統的に比較した報告はない。そこで、Ad ベクターと非ウイルスベクター（plasmid DNA-cationic liposome complex ; lipoplex）をマウスに全身投与した場合の遺伝子発現能や自然免疫誘導能を比較解析することで、有効性と安全性に関する検討を行った。Ad ベクター投与群では lipoplex 投与群に比べ、各臓器において 1~5 オーダー以上高い遺伝子発現が得られた。一方、自然免疫誘導能の指標となる血中 IL-6 及び IL-12 濃度については、lipoplex 投与群は Ad ベクター投与群に比べ 5~15 倍高い濃度を示した。さらに非メチル化 CpG モチーフを減少させた plasmid からなる lipoplex を作製し同様の検討を行ったが、血中 IL-6 濃度は依然として Ad ベクター投与群に比べ高いものであった。従って lipoplex は遺伝子発現能が低だけでなく、少なくとも自然免疫誘導能に関する副作用が Ad ベクターよりも高く、in vivo 遺伝子治療を進める場合には注意を要することが示唆された。
- (2) 従来型 Ad ベクターおよび RGD 型ファイバー改変 Ad ベクターを初代培養腹腔内マクロファージに作用させた後の遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、作用 1、3 時間後のいずれにおいても RGD 型 Ad ベクターのほうが従来型 Ad ベクターより多くの遺伝子発現変化を引き起こしていることが明らかとなった（RGD 型 Ad ベクターの方が遺伝子導入活性が高いため）。また、従来型 Ad ベクターおよび RGD 型 Ad ベクター作用 3 時間後において両ベクター共通に発現が上昇する遺伝子を調べた結果、ケモカイン等炎症時に産生されるサイトカインが多く見られた。この中には、インターフェロン誘導遺伝子も多く含まれており、Ad ベクターによりインターフェロンカスケードが活性化されていることが明らかとなった。

- (3) 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 マイクロアレイ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。
- (4) 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。
- (5) 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。
- (6) 炎症性サイトカイン産生に重要な転写因子である NF- κ 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- κ 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。
- (7) 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 (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。
- (8) Ad ベクターによる毒性発現に関する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。発現変動のみと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。
- (9) 炎症性サイトカインの産生に必須の転写因子である NF- κ 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- κ 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
小泉直也	昭和薬科大学 助教
黄 海瑛	(独) 医薬基盤研究所 流動研究員
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
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。

本研究課題では、(1) マウスへの Ad ベクターおよび非ウイルスペクター投与後の毒性学的解析、遺伝子発現効率に関する比較検討、(2) Ad ベクター作用後のマウス腹腔内マクロファージにおけるトランスクリプトーム解析、(3) Ad

ベクター投与後のマウス生体におけるトランスクリプトーム解析、(4) 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、(5) 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、(6) 糖修飾カチオン性リポソームを用いた NF- κ 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、(7) 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、(8) 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、(9) NF- κ 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 Adベクターおよび非ウイルスベクター投与後の毒性学的解析

(1) 各種ベクターの調製

ウイルスベクターとして Ad ベクターを、非ウイルスベクターとして plasmid DNA/cationic liposome complex (lipoplex) を使用した。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 pHMCMV5 のマルチクロ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 pHMCMV5-L2 を作製した。次に、pHMCMV5-L2 を I-Ceu I と PI-Sce I 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。また、ファイバー改変 Ad ベクターを作製するため、pAdHM15-RGD (ファイバーノブの HI ループ領域に RGD ペプチド配列を挿入した Ad ベクターのためのベクタープラスミド) とともにライゲーションを行い、pAdHM15-RGD-CMVL2 を作製した。作製したベクタープラスミドを Pac I で消化し、SuperFect (キアゲン社) 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、AdRGD-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)、10 mM Tris (pH 7.5)、1 mM MgCl₂、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。

plasmid DNA は CMV プロモーターの制御下においてルシフェラーゼを発現する pCMV-L1、および CpG motif を減少させた plasmid である pCpG-mcs (Invivogen) を用いた。各 plasmid は大腸菌株 DH5 α (pCpG-mcs は GT115 を用いた) を用いて増

幅し、EndoFree-Mega kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製後の plasmid 溶液中に含まれる LPS 量は Limulus HS-F Single 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) Lipoplex の作製

等モルの DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)]-N,N,N-trimethylammonium propane methylsulfate) (AVANTI POLAR LIPIDS INC.) とコレステロール (Nacalai Tesco) をクロロホルム中で溶解し、エバポレーターを用いて溶媒を蒸発させ乾燥フィルムを作製した後、デシゲーター内で一昼夜乾燥させた。5 % デキストロース溶液を加えて 37 °C 水浴上で振とう、水和した後、sonication を行い、liposome を作製した。5 % デキストロースを用いて希釈した plasmid 溶液に liposome をチャージ比 4.6 となるように加え、室温で 30 分インキュベートすることにより lipoplex を作製した。

(3) In vivo への遺伝子導入とルシフェラーゼアッセイ

マウスは C57BL/6 (5-7wks, ♀; 日本 SLC) を用いた。Ad ベクターと Lipoplex の投与量は外見の毒性がみられない限界の濃度 (Ad vector; 5×10^{10} VP/mouse、lipoplex; 25 μ g plasmid DNA/mouse) を high dose として、その 1/5 量 (Ad vector; 1×10^{10} VP/mouse、lipoplex; 5 μ g plasmid DNA/mouse) を low dose として選択した。Ad ベクター (Ad-L2)、lipoplex をマウス尾静脈より投与し、投与後 3、6、9、24、48 時間後に各臓器 (心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓) を回収した。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。作製したホモジネー

ト液は凍結融解後 15000 ×g、10 分遠心し、上清を回収した。ルンフェラーゼアッセイはピッカジーン 5500 (東洋ビーネット株式会社) 100 μl にホモジネート上清 10 μl を加え、発光量 (RLU) を測定した。測定した発光量は付属のスタンダードを用いて作製した検量線を用いて補正し、ルンフェラーゼタンパク量を算出した。

(4) 血清中各種サイトカイン濃度および ALT、AST 活性の測定

上記と同量のベクターを投与後 3、6、9、24、48 時間の末梢血を採取し、氷上で 2-3 時間インキュベートしたのち 15000 ×g、10 分遠心しその上清を回収し血清とした。血清中 IL-6、IL-12、TNF-α 濃度はそれぞれ、BIOSOURCE (IL-6、IL-12)、BD Bioscience (TNF-α) のキット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) 肝臓切片の作製と HE 染色

各種ベクターを投与したマウスから肝臓を回収し、PBS で洗浄したのち中性ホルマリン緩衝液中で固定を行った。固定した肝臓はアプライドメディカルリサーチに委託してパラフィンブロックの作製、切片作製、HE 染色を行った。

B.2 Ad ベクター作用後のマウス腹腔内マクロファージにおけるトランスクリプトーム解析

(1) マウス腹腔内マクロファージの培養

C57BL/6 ♂ 10 週令マウスの腹腔内にチオグリコール酸を投与し、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 (10% FCS) に懸濁し、60 mm dish に播種した。

(2) Ad ベクター作用時の応答遺伝子の探索

マウス腹腔内マクロファージに 10,000VP/cell の濃度で、従来型 Ad ベクター (Ad-L2) および RGD 型 Ad ベクター (AdRGD-L2) を作用させた。1、3 時間後に total RNA を回収し、定法にしたがって GeneChip 解析を行った。チップデータの解析には GeneSpring ソフトウェアを用い、遺伝子の発現強度に応じて漸次的に発現比の有意水準を設定することにより、ステップワイズに遺伝子の選択を行った。

B.3 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

先と同様に、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・結合するのに必須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。

(2) サンプルの回収

C57BL/6 (10 週齢、♂、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 (1×10^{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.4 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) マウス遺伝子導入実験
マウス(C57BL/6、5週齢、♀)の尾静脈より Ad-L2、および AdK7-L2 (1×10^{10} 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。

(2) 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。

(3) 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、♀)の尾静脈より Ad-L2、および AdK7-L2 (1×10^{10} 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-AACCTGCCCGCGCTATACACTG-TAMRA 3'

(4) 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、♀)の尾静脈より Ad-L2、および AdK7-L2 (1×10^{11} 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。

(5) 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、♀)の尾静脈より Ad-L2、および AdK7-L2 (3×10^{10} 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。

(6) 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、♀)の尾静脈より Ad-L2、および AdK7-L2 (3×10^{10} 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。

(7) 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, ♀) の尾静脈より Ad-L2、および AdK7-L2 (1×10^{11} 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 α 、RANTES、MIP-2、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、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 α : 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 α : forward, 5' - AGG CTC AAG CCA TCC CTG T -3'; reverse, 5' - AGG CAC AGG GGC TGT CTT TCT TCT -3'; IFN β : forward, 5' - TTC CTG CTG TGC TTC TCC AC -3'; reverse, 5' - GAT TCA CTA CCA GTC CCA GAG TC -3'; IFN γ : 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'

(8) 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, ♀) の尾静脈より Ad-L2 (1×10^{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⁺B220⁻ のコンベンショナル樹状細胞と、CD11c⁺B220⁺ のプラズマサイトイド樹状細胞および CD11c⁻B220⁺ 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。

(9) 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, ♀) 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 μ 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 (3×10^{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.5 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ベクター先と同様に作製した。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 μ 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 μ 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 μ 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 5×10^5 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 μ 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 5×10^5 cells/well で播種し、Ad ベクター 10,000 VP/cell または CpG-DNA 2.5 μ 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.6 糖修飾カチオン性リポソームを用いた NF- κ 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) NF- κ 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、および 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 分インキュベーションすることにより NF- κ 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- κ 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- κ B 結合領域を示す。

NF- κ B デコイ配列 :
5' -AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3'

3' -TCAACTCCCCTGAAAGGTCCG- 5'

Random デコイ配列 :
5' -AGTTGAGGTGAGTTTCACAGGC- 3'

3' -TCAACTCCACTCAAAGTGTCCG- 5'

(2) 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、♀ ; 日本 SLC より購入) を用いた。上記 (1) 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 μ g /mouse) 投与し、その 10 分後上記 (1) で作製した Ad ベクターを 5×10^{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 μ l をピッカジーン 5500 (東洋インキ社より入手) 100 μ 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。

(3) 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(2)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15000rpm、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。

(4) 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。

B.7 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 μg/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 μg/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pHCMV10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pHCMV10-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pHCMV6のマルチクローニング部位にGFPのcDNAを挿入することでpHCMV-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、pHCMV10-mSOCS1またはpHCMV-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 MgCl₂、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 (5×10^{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°C 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- γ (200 ng/ml) で一晩前刺激した RAW264.7 細胞を JAK2 inhibitor II (Calbiochem、50 μ 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- β ; TOYO INK Co. LTD.) を 150 μ l 加えて 37°C 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°C 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°C 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- γ (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°C 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- α 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 β 及び IL-10、TNF- α 、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 5×10^{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°C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°C 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- α -tubulin antibody (Santa Cruz Biotechnology, ブロッキング液で 1/200 希釈)、mouse anti- β 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) を用い、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 (5×10^{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、 5×10^6 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.8 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

1×10^6 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 Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄) 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 (Phenylmethylsulfonyl fluoride, 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 skimmilk (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 μ g の直線化した発現ベクターを 3×10^6 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 μ F の条件で導入した。96 well プレート (NUNC) に $1 \sim 3 \times 10^4$ 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 1 mg/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 μ 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.9 NF- κ 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' -TCGATTTCCAAAAAAGATCGGCCAACCTTAAAAACAGTTTCAA GATCGG-3')、(5' -GATCCCGTTCTCCGAACGTGTACGTTTCAAGAGAACGTGAC ACGTTCGGAGAATTTTTTGGAAA-3') および (5' -TCGATTTCCAAAAAATTCTCCGAACGTGTACGTTCTCTTGA AACGTGACACGTTCCGAGAACGG-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- κ 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 MgCl₂、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 1×10^4 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ーブルーを 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 5×10^5 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 μ g/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、SuperScriptTM 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 μ l、0.5 μ M プライマー、0.6 μ M TaqMan probe、25 \cdot μ l TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems)を含む反応液 (50 \cdot μ l)を ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems)を用いて、95 $^{\circ}$ C 10 分間処理後、95 $^{\circ}$ C 15 秒及び 60 $^{\circ}$ 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- κ 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 1×10^6 cells/100 ϕ dish で播種し、翌日プラスミド pELAM-RL 10 μ 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 5×10^4 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 μ g/well (10 μ g/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 μ l を Luciferase Assay Reagent II (Promega) 100 μ 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 μ 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 5×10^{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 μ l をピッカジーン 5500 (東洋インキ社より入手) 100 μ 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 Adベクターおよび非ウイルスベクター投与後の毒性学的解析

ウイルスベクターとして Ad ベクター（ここでは従来型 Ad ベクターの Ad-L2 を用いた）を、非ウイルスベクターとして plasmid DNA-cationic liposome complex (lipoplex) を用い、これらをマウスに尾静脈内投与したときに得られる遺伝子発現効率や自然免疫誘導能を比較解析することで、有効性と安全性に関する検討を行った。

まず、各ベクターをマウスに尾静脈内投与し、投与 6 時間後の各臓器（心臓、肺、腎臓、肝臓、脾臓）のルシフェラーゼ発現を検討したところ、Ad ベクター投与群では回収したすべての臓器において 1-5 オーダー以上高いルシフェラーゼ発現量が得られた (Fig. 1)。また、その遺伝子発現は投与量依存的に増加していた。各ベクターにおける遺伝子発現には臓器特異性があり、Ad ベクター投与群では特に肝臓、脾臓におけるルシフェラーゼ発現が高く、48 時間後まで持続していた。一方、lipoplex 投与群におけるルシフェラーゼ発現は心臓および肺に局限し、投与 6 時間後にピークを迎えた後減少した。この結果から、lipoplex に比べ Ad ベクターは種々の臓器において高い遺伝子発現を示すことが確認された。

次に各ベクターの投与により惹起される副作用を比較するため、自然免疫誘導能と肝毒性について検討を行った。両ベクター投与 6 時間後における血清中 IL-6、IL-12、TNF- α 濃度を測定したところ、予期せぬことに、lipoplex 投与群の方が Ad ベクター投与群に比べ 5-15 倍高い濃度を示した (Fig. 2a-c)。したがって、炎症性サイトカイン産生量、すなわち自然免疫誘導能に関しては Ad ベクターより lipoplex の方が高いことが明らかとなった。

次に、各ベクター投与により生じる肝障害を血

中 ALT 活性および肝臓の組織切片 (HE 染色) により比較した。両ベクター投与 24 時間後における血中 ALT 活性を測定したところ、ベクター投与量依存的に活性の増加が見られるものの、自然免疫誘導能の場合 (Fig. 2) とは異なり、Ad ベクター投与群と lipoplex 投与群との間に大きな差は見られなかった (Fig. 3)。次に投与 3、6、48 時間後における肝臓の切片を作製し、HE 染色を行った結果、lipoplex 投与群では投与 3 時間後で肝細胞の顆粒化が観察された (Fig. 4d)。さらに投与 6 時間後では一部脱顆粒化が見られ始め、投与 48 時間後では脱顆粒化に加え、脱核化も生じていた (Fig. 4 e および f)。一方、Ad ベクター投与群では投与 3 時間後ではほぼ正常な肝臓の構造を保っていたものの、6 時間後では lipoplex 投与群と同様に脱顆粒化が、48 時間後には一部脱核化が見られた (Fig. 4 a-c)。したがって、lipoplex 投与により引き起こされる肝障害の方が Ad ベクター投与群に比べて急性度が高いものの、長時間レベルで見れば同程度であった。この結果は両ベクター投与により誘導された血中 ALT 活性に大きな差がなかったという結果と一致するものである。

Toll-like receptor (TLR) は、細胞外から進入した病原異物を認識するレセプターとして同定された受容体であり、これまでにヒトでは 10 種類が報告されている。このうち、TLR9 はバクテリア DNA 由来の unmethylated CpG motif を認識することから、CpG motif を減少させた plasmid DNA を用いることにより、lipoplex 投与により誘導される自然免疫応答がどの程度抑制できるか検討を行った。CpG motif を欠損させたプラスミドとして pCpG-mcs を用い、pCMV-L1 と同様に DOTAP/chol を用いて lipoplex (non CpG lipoplex) を作製した。これをマウスに尾静脈内投与し経時的に血中 IL-6 濃度を測定したところ、ピーク時