

る。まず EDTA 存在下においては GFP の発現が有意に低下し、5mM EDTA 存在下で約 80%GFP 発現量が減少した。一方、各種 2 価カチオンの影響については、Mg<sup>2+</sup>および Ca<sup>2+</sup>ではほとんど GFP 発現量に変化は見られなかったが、Mn<sup>2+</sup>存在化においては大きく GFP 発現細胞数が増加した (Fig. 3)。

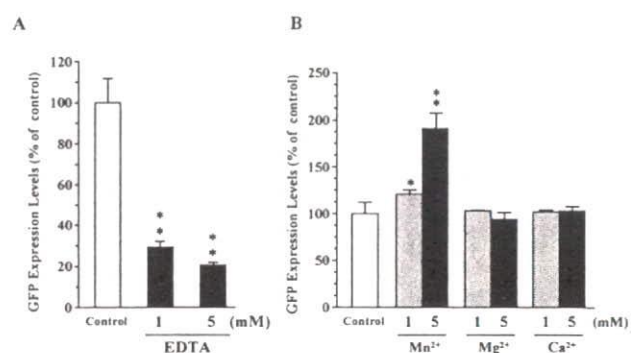


Fig. 3 Effects of divalent cations on Ad35 vector-mediated transduction. (A) Ad35GFP-mediated transduction in the presence of EDTA. (B) Ad35GFP-mediated transduction in the presence of Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, or Mn<sup>2+</sup> ions.

さらに 35 型 Ad ペントンベース・RGD 配列の感染への関与について検討するために、RGD ペプチドによる 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入阻害実験を行った。その結果、インテグリンに結合しない RGE ペプチド作用群と比較して、RGD ペプチド存在下では濃度依存的に有意な遺伝子導入阻害が見られた (Fig. 4)。RGD ペプチド 1000 μg/mL 存在下で約 60%まで遺伝子導入効率が低下した。以上の結果より、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入にはペントンベース・RGD 配列が関与していることが示唆された。また本結果より、インテグリンの中でも RGD 配列を認識するインテグリンが関与していることが示唆された。

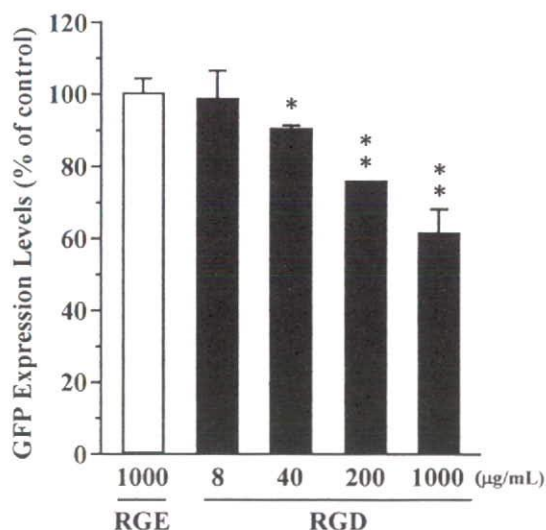


Fig. 4 Inhibition of Ad35 vector-mediated transduction by synthetic RGD peptide in K562 cells. K562 cells were transduced with Ad35GFP at 1000 VP/cell for 1 hr.

さらにペントンベースの RGD 配列の関与について検討するため、35 型 Ad ベクターのペントンベースに存在する RGD モチーフを RGE に置換 (Ad35RGE<sub>3</sub>GFP)、または欠損 (Ad35ΔRGD<sub>3</sub>GFP) させた 35 型 Ad ベクターを作製し、通常の 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入効率と比較した。その結果、通常の 35 型 Ad ベクターと比較して、Ad35RGE<sub>3</sub>GFP および Ad35ΔRGD<sub>3</sub>GFP のいずれのベクターを作用させた場合においても遺伝子導入効率の有意な低下が観察され、それぞれ Ad35GFP の約 70%まで遺伝子発現量が低下した (Fig. 5)。従って、前節の RGD ペプチドを用いた 35 型 Ad ベクター遺伝子導入阻害実験および本実験の結果より、35 型 Ad ベクターによる遺伝子導入にペントンベース・RGD 配列とインテグリンの結合が関与していることが明らかとなった。

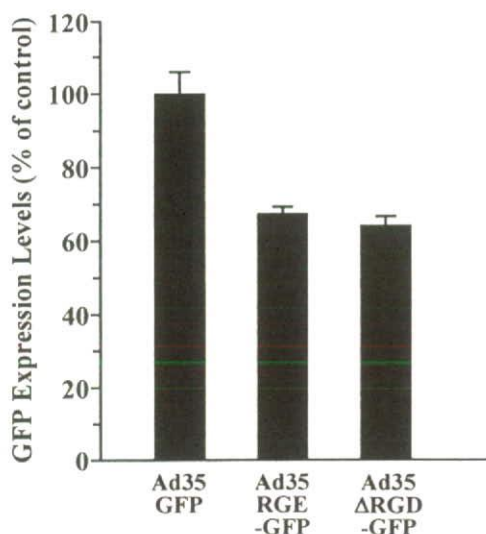


Fig. 5 Effects of modification of penton RGD motifs on transduction efficiencies of Ad35 vectors. K562 cells were transduced with Ad35GFP, Ad35RGE-GFP, or Ad35ΔRGD-GFP at 3000 VP/cell for 1.5 hr.

さらに35型AdベクターによるK562細胞への遺伝子導入に関与しているインテグリン分子を同定するために、種々の抗インテグリン阻害抗体を用いて35型Adベクターの遺伝子導入阻害実験を行った。その結果、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、および $\alpha_4$ インテグリンに対する抗体存在下で有意に遺伝子導入効率が低下した (Fig. 6)。またK562細胞では $\alpha_5$ もしくは $\alpha_6$ インテグリンの発現は確認できなかったものの、両インテグリンに対する抗体存在下において有意な遺伝子発現の減少が観察された。しかし、その他の抗体を作用させた場合には有意な差は認められなかった。従って、35型AdベクターによるK562細胞への遺伝子導入に上記インテグリンが関与していることが示された。

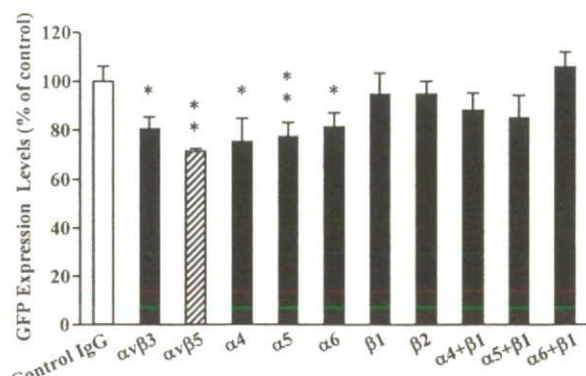


Fig. 6 Inhibition of Ad35 vector-mediated transduction by monoclonal anti-integrin antibodies. K562 cells were preincubated with each antibody at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 1 h at 4  $^{\circ}\text{C}$ , and then added 3000 VP/cells of Ad35GFP. The cells were incubated at 3 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ .

#### C-2. 35型Adベクターによる自然免疫活性化

Adベクターは免疫担当細胞に取り込まれると、その細胞の自然免疫を強く活性化することが知られている。これはAdベクターをワクチンベクターとして用いる場合には、長所となりうる。そこで35型Adベクターの自然免疫活性化能を検討した。まず、野生型マウス (WT) およびCD46TGマウス由来BMDCに対し、5型ならびに35型Adベクターを作用させたところ、WT-BMDCにおいては5型Adベクターが優れた遺伝子導入効率を示したが、CD46TG-BMDCに対しては35型Adベクターの方が高い遺伝子導入効率を示し、約60%の細胞がGFP陽性であった (Fig. 7)。

次に5型ならびに35型Adベクターによる炎症性サイトカイン産生量を測定した。その結果、35型AdベクターはCD46TG-BMDCに対し、5型Adベクターよりも5倍以上高いIL-6、IL-12産生を誘導した (Fig. 8)。なお、WT-BMDCにおいては5型、35型Adベクターともに同程度の炎症性サイ

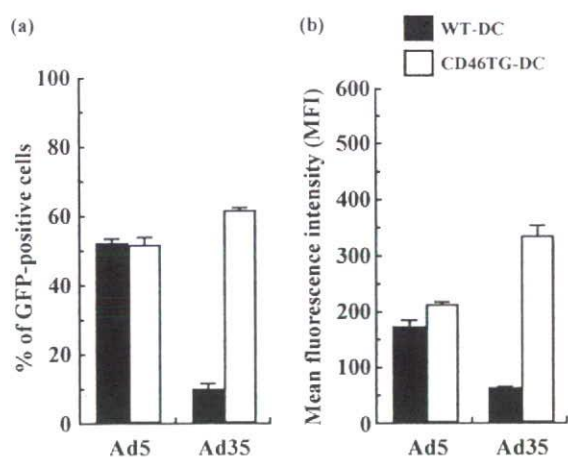


Fig. 7 Transduction efficiencies of Ad5 and Ad35 vectors in WT-BMDC and CD46TG-BMDC. (a) percentages of GFP-positive cells, (b) mean fluorescence intensity. WT-BMDC and CD46TG-BMDC were transduced with Ad5 or Ad35 vectors expressing GFP at 3000 VP/cell for 1.5 hr. GFP expression was evaluated using flow cytometry following a 48 hr-incubation.

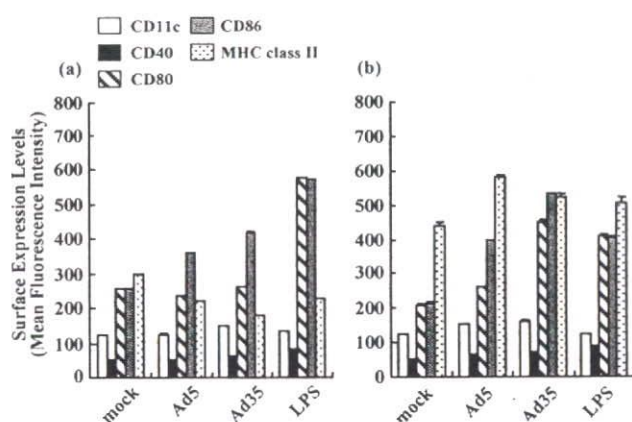


Fig. 8 Expression levels of maturation markers in BMDCs following transduction with Ad vectors. WT-BMDC and CD46TG-BMDC were transduced as described in Fig. 7. Expression levels of maturation markers were assessed by flow cytometry.

トカイン産生を誘導した。さらに、35型 Ad ベクター感染後の BMDC の成熟化マーカー (CD11、CD80、

CD86、CD40、MHC class II) の発現について検討したところ、CD46TG-BMDC では 5 型 Ad ベクターよりも 35 型 Ad ベクターの方が高い値を示した (Fig. 9)。また WT-BMDC と CD46TG-BMDC を比較すると、WT-BMDC より CD46TG-BMDC の方が高い発現量を示した。これは CD46TG-BMDC では 35 型 Ad ベクターの受容体である CD46 が高発現しているため、より多くの 35 型 Ad ベクターが感染可能となり、より強く自然免疫を活性化したものと思われる。ヒト樹状細胞が CD46 を発現していることを考慮すると、35 型 Ad ベクターはヒト樹状細胞に対する優れた遺伝子導入ベクターとなりうる。とともに、強く樹状細胞を活性化することから、ワクチンベクター (抗原遺伝子をコードしたベクター) としても有用であることが示唆された。

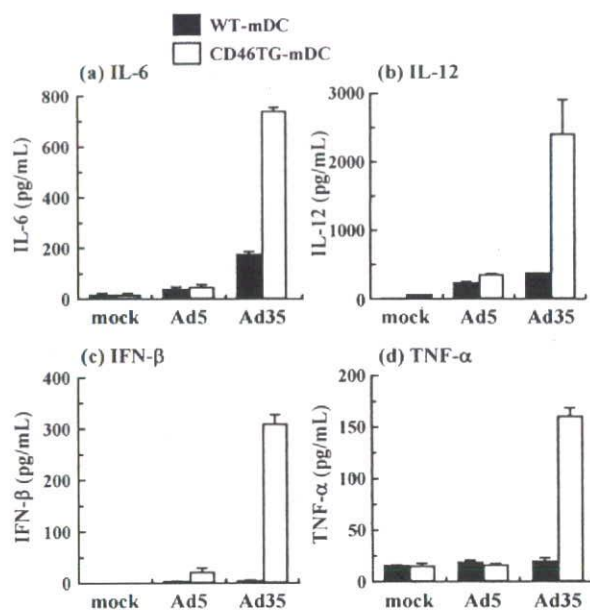


Fig. 9 Inflammatory cytokine productions in WT-BMDC and CD46TG-BMDC following transduction with Ad vectors. WT-BMDC and CD46TG-BMDC were transduced with Ad vectors as described in Fig. 7. Inflammatory cytokine levels in the medium were assessed by ELISA.

さらに *in vivo* における 35 型 Ad ベクターの自然免疫活性化能について検討した。野生型マウスならびに CD46TG マウスに 35 型 Ad ベクターを尾静脈内投与したところ、投与 6 時間後には有意な IL-6 の産生が認められた (Fig. 10)。しかしながら、その産生量に関して野生型マウスと CD46TG マウスとの間に有意な差は見られなかった。従って、35 型 Ad ベクターは静脈内投与後、CD46 非依存的な機構で免疫細胞に取り込まれ、炎症性サイトカインの産生を誘導することが示唆された。

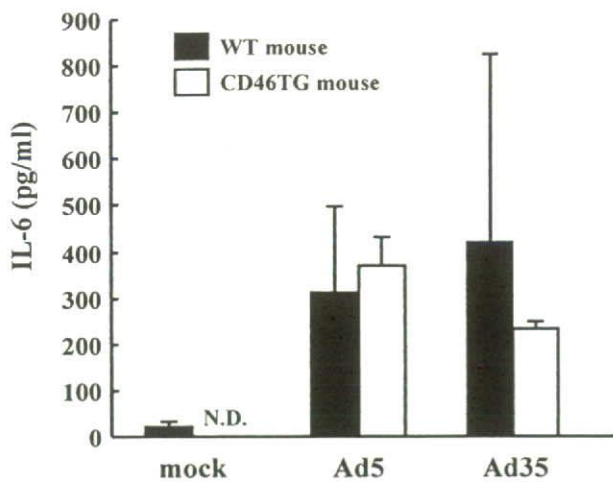


Fig. 10 Inflammatory cytokine production following intravenous administration of Ad vectors into wild-type mice or CD46TG mice. Wild-type mice and CD46TG mice were administered with Ad5 or Ad35 vectors at the dose of  $1.5 \times 10^{10}$  VP/mouse. Blood samples were recovered via retro-orbital bleeding 6 hr after injection. IL-6 levels in the serum were assessed by ELISA.

### C-3. 35 型 Ad ベクター感染による受容体 CD46 発現量変化

麻疹ウイルスなどの CD46 を受容体とする病原

体は感染後、細胞表面の CD46 発現量を減少させることが知られている。CD46 は自己の細胞を補体による攻撃から守る役割を担っていることから、CD46 発現量減少により補体による攻撃を受けやすくなる可能性がある。そこで 35 型 Ad ベクター感染後の CD46 発現量を測定した。その結果、CD46TG-BMDC は 35 型 Ad ベクター感染後、細胞表面の CD46 発現量を大きく減少させることが明らかとなった (Fig. 11)。一方、5 型 Ad ベクターでは CD46 発現量の減少は観察されなかった (data not shown)。従って、35 型 Ad ベクターを用いる際には注意を要することが示唆された。

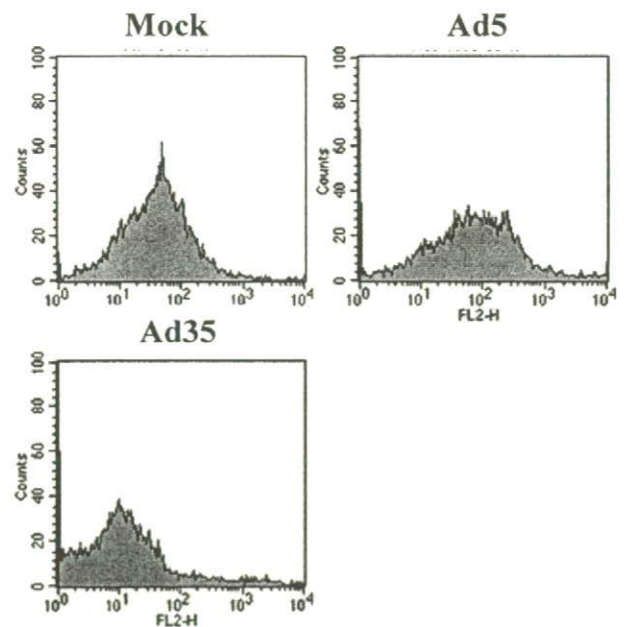


Fig. 11 Surface CD46 expression levels on CD46TG-BMDC following transduction with Ad vectors. CD46TG-BMDC were transduced as described in Fig. 7. CD46 expression levels were assessed by flow cytometry.

### D. 考察

35 型 Ad による感染症の解明、また、より高性能なベクター開発に向けては、35 型 Ad の感染機構の解明が必要不可欠である。従来より遺伝子導

入ベクターとして汎用されている 5 型 Ad は、まず①ファイバーノブが第一受容体である coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) に結合した後、②ペントンベース・RGD 配列が $\alpha_v$ インテグリンに結合することにより内在化を受け、感染にいたる。一方で、①subgroup B に属する 35 型 Ad のペントンベースにも RGD 配列が存在する、②subgroup B Ad の受容体である CD46 が細胞膜上で一部のインテグリンと会合していることから、ペントンベース・RGD 配列とインテグリンとの結合が 35 型 Ad 感染にも何らかの役割を果たしていることが推察される。そこで本研究では、35 型 Ad ベクターによる K562 細胞への遺伝子導入におけるインテグリンの関与について検討を行い、35 型 Ad ベクターのペントンベース RGD 配列が感染過程に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

本研究において、2 価カチオンのキレートや RGD ペプチド、ペントンベース・RGD 配列の改変により、35 型 Ad ベクターのペントンベース RGD 配列とインテグリンとの結合を阻害することで有意に遺伝子発現効率が減少したことから、ペントンベース RGD 配列とインテグリンとの結合が感染過程に重要な役割を果たしていることが示された。ペントンベース RGD 配列とインテグリンとの結合が感染過程のどのステップに関与しているかは不明であるが、5 型 Ad の場合、RGD 配列が $\alpha_v\beta_5$ インテグリンに結合することにより、ウイルス粒子がエンドソームから脱出するのを促進することが報告されている。従って 35 型 Ad においても、細胞表面への吸着や細胞内への取り込みのみならず、細胞内に取り込まれた後にエンドソーム膜を破壊し細胞質へ脱出する過程にもインテグリンとの結合が関与しているのではないかと考えられる。しかし 35 型 Ad にとってインテグリンは

あくまでも第二受容体であり、その感染には CD46 が必須であると思われる。我々は 35 型 Ad ベクターを、 $\alpha_v\beta_3$  インテグリンを発現しているが CD46 を発現していないマウス黒色腫由来 B16 細胞に作用させたが、ほとんど遺伝子発現は得られなかった (data not shown)。

Shayakhmetov らは、5 型 Ad ベクターのノブを 35 型 Ad のノブに置換し、さらにペントンベース・RGD 配列を欠損させた Ad ベクターを作製し、遺伝子導入効率を検討している。従来の 5 型 Ad ベクターの場合、ペントンベース RGD 配列の欠損により遺伝子導入効率に変化は認められなかったが、35 型ファイバーノブを有する 5 型 Ad ベクターでは RGD 配列の改変により有意に遺伝子導入効率が低下したと報告している。今回の検討においても、35 型 Ad ベクターのペントンベース・RGD 配列を改変させることにより有意に遺伝子発現が減少していることから、35 型 Ad 感染におけるペントンベース RGD 配列とインテグリンとの結合の寄与は 5 型 Ad ベクターより大きいと言える。つまり、第一受容体として何を認識するかによってインテグリンの寄与の程度が異なっているものと思われる。

どの受容体に結合するかによりウイルスの細胞内輸送機構も異なってくると予想される。5 型 Ad ベクターの場合、CAR と結合した後、RGD 配列とインテグリンとの結合により phosphatidylinositol-3-kinase が活性化され、アクチンの重合が促進されることによりクラスリン被覆小胞が形成され、内在化を受ける。35 型 Ad がクラスリン依存的経路により内在化されるかどうかは不明であるが、Crismeen-Irwin らは、CD46 を受容体とする麻疹ウイルスが CD46 との結合を介してマクロピノサイトーシスにより取り込まれることを報告している。35 型 Ad ベクター

は5型 Ad ベクターの細胞内取り込みとは異なり、マクロピノサイトーシスにより取り込まれているのかも知れない。35 型 Ad がどのような内在化機構により細胞内に侵入しているかは更なる検討が必要である。

RGD ペプチドと RGD 配列を認識するインテグリンとの親和性は RGD に続く 4 番目のアミノ酸に影響を受けること、35 型 Ad ベクターのペントンベースに含まれる RGDN (N=Asn) 配列は $\alpha_5\beta_1$  インテグリンとの親和力が強いという報告がある。従って当初 35 型 Ad ベクターの遺伝子導入に関与するインテグリンは $\alpha_5\beta_1$  ではないかと推察していた。 $\alpha_5\beta_1$  インテグリンは 5 型 Ad の細胞表面への結合にも関与することが報告されている。K562 細胞において $\beta_1$  インテグリンはほとんど発現していなかったが、 $\alpha_5$  インテグリンは高発現しており、また抗 $\alpha_5$  インテグリン抗体により約 20%の遺伝子発現阻害が認められた。一方で、 $\alpha_v\beta_5$  インテグリンの発現は約 17%と低かったものの、抗 $\alpha_v\beta_5$  インテグリン抗体存在下では約 30%と用いた抗インテグリン抗体のなかで最も高い阻害効果を示した。K562 細胞では 1 種類のインテグリンではなく、RGD 配列を認識する様々なインテグリンが寄与しているものと思われる。

Ad ベクターによる自然免疫活性化は、副作用を引き起こす要因である一方で、がん治療などにおいては免疫を活性化することによりポジティブに作用する。特に樹状細胞を遺伝子導入の標的としたワクチン療法においては、樹状細胞を活性化することから、Ad ベクターの自然免疫活性化能は治療効果を左右する重要な要因であると思われる。現在、Ad ベクターによる自然免疫活性化メカニズムは明らかになっていないが、Toll-like-receptor 9 が関与することが報告されている。今回 35 型 Ad ベクターは 5 型 Ad ベク

ターよりも高い炎症性サイトカイン産生および樹状細胞成熟化マーカーの発現上昇を誘導したが、これは 35 型 Ad ベクターと 5 型 Ad ベクターの細胞内動態の違いによるものと推察される。5 型 Ad ベクターが細胞内在化後、速やかにエンドソームから脱出するのに対し、35 型 Ad ベクターのエンドソーム・ライソソームでの滞留時間が長いことが報告されており、そのためエンドソーム・ライソソームで Toll-like receptor 9 に認識される確率が高いのではないかとと思われる (Toll-like receptor 9 はエンドソーム膜に局在する)。また、WT-BMDC と CD46TG-BMDC を比較すると、CD46TG-BMDC において高い自然免疫活性化が観察された。これは CD46TG-BMDC では、35 型 Ad の受容体である CD46 を発現しているため、感染した 35 型 Ad ベクター量が WT-BMDC よりも多かったためだと思われる。

しかしマウス尾静脈内投与後の血清中サイトカイン量は、CD46TG マウスと野生型マウスとで有意な差は観察されなかった。これは 35 型 Ad ベクターが静脈内投与後、肝臓のクッパー細胞を初めとする細網内皮系に貪食されることにより炎症性サイトカインの産生を誘導していると思われ、細網内皮系への取り込みには CD46 は関与していないためと考えられる。

CD46 は補体を分解することにより、自己の細胞を補体による攻撃から守る役割を担っている。従って CD46 の発現量低下は、細胞が補体による攻撃にさらされやすくなることを示唆している。CD46 を受容体とする他の病原体は感染後、CD46 発現量を減少させることから、35 型 Ad ベクターについても検討してみた。その結果、35 型 Ad ベクター感染により、CD46TG-BMDC の CD46 発現量は顕著に減少した。また、その他の細胞においても同様に CD46 発現量の減少は観察された (data now

shown)。現在、35 型 Ad ベクターによる CD46 発現量減少のメカニズムは不明であるが、今後 CD46 発現量減少がどのような影響をもたらすか、詳細に検討する必要があると思われる。

## E. 結論

本研究により、①35 型 Ad ベクターによる K562 細胞への遺伝子導入において、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、および  $\alpha_5$  インテグリンとペントンベース・RGD 配列との結合が重要な役割を果たしていること、②35 型 Ad ベクターは従来の 5 型 Ad ベクターよりも高い自然免疫活性化能を有することが明らかとなった。しかしながら、マウス全身投与後の炎症性サイトカイン産生には CD46 は関与しないことが示唆された。また、③35 型 Ad 感染後、受容体である CD46 発現量が減少することを見出した。本研究成果は B 群 Ad 感染症の予防・治療法の開発、および B 群 Ad ベクターの遺伝子導入特性の解明に向けて重要な知見になるものと思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Murakami S, Sakurai F, Okada N, Fujita T, Yamamoto A, Hayakawa T, Mizuguchi H. Interaction of penton base Arg-Gly-Asp motifs with integrins is crucial for adenovirus serotype 35 vector transduction in human hematopoietic cells. *Gene Ther.* 14:1525-33 (2007)

2. Sakurai F, Kawabata K, Mizuguchi H. Adenovirus vectors composed of subgroup B adenoviruses. *Curr Gene Ther.* 7:229-38 (2007)

3. Sakurai F, Development and evaluation of a novel gene delivery vehicle composed of adenovirus serotype 35. *Biol. Pharm. Bull.*

31:1819-1825 (2008).

4. 櫻井文教、35 型アデノウイルスを基本骨格とした新規アデノウイルスベクターの開発、*薬学雑誌*、128:1751-1761 (2008).

### 2. 学会発表

1. 櫻井文教、村上さや香、川端健二、岡田直貴、藤田卓也、山本昌、水口裕之. 35 型アデノウイルスベクター感染におけるインテグリンの関与. 第 7 回遺伝子・デリバリー研究会、東京、2007 年 5 月

2. Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Naoki Okada, Takuya Fujita, Akira Yamamoto, Takao Hayakawa, Hiroyuki Mizuguchi. The crucial role of penton base RGD motifs in adenovirus serotype 35 vector transduction in human hematopoietic cells. 第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月

3. 櫻井文教、35 型アデノウイルスを基本骨格とした新規遺伝子導入ベクターの開発および機能評価に関する研究 (薬学会奨励賞受賞講演) 日本薬学会第 128 年会、横浜、2008 年 3 月

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## ウイルスベクターをゲノムの特定領域に挿入させることによる安全性の高い遺伝子治療法の革新的技術開発

所 属 国立国際医療センター研究所  
難治性疾患研究部  
研究者 小山 貴芳

研究要旨 本研究課題は、iPS 細胞樹立や遺伝子治療に用いられるウイルスベクターをゲノムの特定領域に挿入させることで、その安全性を高める技術の確立を目的としている。本研究によって得られる成果は、再生医療や遺伝子治療の発展に多いに貢献できるものと期待される。

### A. 研究目的

本研究課題の最終的な目的は、iPS 細胞樹立や遺伝子治療に用いるウイルスベクターの安全性を高める技術を開発し、臨床応用へのプレイクスルーとなる技術として、医療に貢献することである。

主任研究者らのグループはこれまでに、HIV-1 が感染の際、宿主ゲノムに二重鎖切断 (double-strand break, DSB) を引き起こすという現象を発見し、報告した。この HIV-1 感染による DSB 誘導の意義と機序を解明する過程で、ウイルス DNA が宿主ゲノムの DSB 部位に挿入されるということを発見した。同様の現象は B 型肝炎ウイルスやウイルスのコア部位を欠如させたアデノ随伴ウイルスベクターでも報告されていることから、DSB 部位へのウイルス DNA 挿入は外来 DNA に普遍的な現象である可能性が出てきた。

そこで本研究課題では、(1) レアカッター制限酵素を使ってヒトゲノムの特定部位に DSB を引き起こし、(2) ウイルスベクターを感染させることで、(3) DSB 部位にウイルスベクターを挿入できるのではないか、という作業仮説を立て、研究を行った。

既述した HIV-1、B 型肝炎ウイルスあるいはアデノ随伴ウイルスベクターの研究では 18bp 認識制限酵素 I-SceI による人工的な DSB 誘発の系が用いられるが、本来ヒトゲノム中には I-SceI の認識配列が存在しない。近年、ヒトゲノム中に 200~300 コピー存在する rDNA 内の配列を特異的に切断する 15bp 認識制限酵素 I-PpoI が単離された。そこで本研究課題ではこの I-PpoI を用いてヒトゲノムの rDNA を一部切断し、切断部位への HIV-1 ベースのレンチウイルスベクター挿入を試みた。



## B. 研究方法

### 【rDNA に DSB を誘導する細胞株の樹立】

I-PpoI を用いた rDNA への DSB 誘導系は米 St. Jude Children's Research Hospital の Michael Kastan 博士らのシステムを用いた。即ち、I-PpoI にエストロゲンレセプター(ER)を融合させたコンストラクト(ER-I-PpoI)を HEK293T 細胞に導入し、tamoxifen 添加によって ER-I-PpoI が核内移行して rDNA 内の I-PpoI サイトを切断する系を作った。コントロールには empty vector を導入した細胞(293T/vector)を用いた。I-PpoI サイトの切断頻度はサザンプロット解析によって調べた。

### 【I-PpoI アデノウイルスベクターの作製】

I-PpoI を発現させるアデノウイルスベクターを作製し、様々な細胞株への DSB 誘導に用いた。

### 【レンチウイルスベクターの感染】

レンチウイルスベクターは invitrogen 社の pLenti6-V5-DEST に EGFP 遺伝子を導入し (pLenti6-EGFP)、同社 ViraPower Lentiviral Packaging Mix を用いて作製した。レンチウイルス感染の 24h 前から 24h 後まで 293T/ER-I-PpoI 細胞に temoxifen を添加し、I-PpoI サイトの切断を誘導した。感染 48h 後から Blasticidin を添加し、感染細胞の選択を行った。HT1080 細胞への DSB 誘導は I-PpoI アデノウイルスベクターを用いて行った。レンチウイルス感染の 24h 前から I-PpoI アデノウイルスベクターを 24h 感染させて I-PpoI サイトの切断を誘導した。

### 【PCR 解析】

I-PpoI サイトにレンチウイルスベクターが挿入されたかを調べるため、rDNA とレ

ンチウイルスベクターにそれぞれアニールするよう設計したプライマーペアを用いて PCR を行った。

### 【シーケンス解析】

PCR 産物をプラスミドにクローニング後、あるいは直接鋳型としてシーケンス解析を行った。

### 【サザンプロット解析】

細胞の染色体に挿入されたウイルス DNA のコピー数を調べるため、DIG システム(Roche Diagnostics 社)を用いてサザンプロット解析を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究は培養細胞株を用いて行うことから、動物実験、ヒト幹細胞を用いる研究、臨床研究、あるいは個人情報保護法に抵触する研究内容などの倫理面へ配慮すべき内容は含まれない。

## C. 研究結果

### 【PCR 解析】

レンチウイルス(Lenti6-EGFP)を感染させ、Blasticidin で選択した 293T/ER-I-PpoI 細胞あるいは 293T/vector 細胞をプールの状態で回収し、DNA を抽出して PCR を行った。その結果、293T/ER-I-PpoI/Lenti-EGFP サンプルのみ目的の大きさにバンドが検出できた。

Blasticidin 耐性細胞を 14 クローン単離し、PCR 解析したところ 3 クローンで目的のサイズ付近にバンドが検出された。

### 【シーケンス解析】

293T/ER-I-PpoI/Lenti-EGFP 細胞プールからの PCR 産物のシーケンスを解析したところ、14 サンプル中 9 サンプルにお

いて、レンチウイルスが I-PpoI サイトの切断部位に挿入されていた。

クローニングした細胞の PCR 産物をシーケンス解析した結果、PCR で DNA が増幅した 3 クローン中 2 クローンで、レンチウイルスが I-PpoI サイトに挿入されていた。

#### 【サザンブロット解析】

クローニングした細胞について、染色体に挿入されたウイルス DNA のコピー数をサザンブロット解析により調べたところ、clone#10 のみ 1 コピー挿入されており、それ以外のクローンは 2 コピー以上挿入されていた。PCR とシーケンス解析によって I-PpoI サイトにウイルス DNA が挿入されていることが確認できた clone#4 と#9 のウイルス DNA コピー数は 2 コピー以上挿入されており、バンドのサイズから I-PpoI サイト以外の場所にも挿入されている可能性が明らかとなった。

感染時のウイルス量を 100ng p24 /  $1 \times 10^6$  cells から 10ng p24 /  $1 \times 10^6$  cells に減らしたところ、ウイルス DNA が 1 コピーのみ挿入されている細胞は 7 割以上であった。

#### D. 考察

近年、遺伝子治療がヒトに応用されつつあるが、治療に用いられるレトロウイルスベクターやレンチウイルスは宿主ゲノムへランダムに挿入されるため、それが原因となって白血病などを引き起こすことが大きな問題となっている。また最近、ヒト iPS 細胞の樹立成功が報告され、臨床応用が現実味を帯びてきたように思えるが、外来 DNA 導入に用いられるウイルスベクターの安全性を高めない限り、臨床応用は難し

い。iPS 細胞の応用は再生医療のみならずドラッグスクリーニングや特定疾患の病因解明への利用も期待されているが、通常のレトロ/レンチウイルスベクターを用いた方法ではウイルス DNA が染色体にランダムに挿入されるため、樹立した iPS 細胞株間の質のバラツキが生じてしまい、解析が困難となる。従ってウイルスベクターを染色体の特定領域に挿入させる技術開発が必要であるが、従来法の改良では不十分であり、新たな方法開発による技術的ブレイクスルーが求められている。

主任研究者らはこれまでに行ってきた研究により、HIV-1 は宿主ゲノムの DSB 部位に挿入されることを明らかにした。この現象を応用し、遺伝子治療に使用されるウイルスベクターを感染させる際に、染色体の特定領域に DSB を誘導することで、その場所にウイルス DNA を挿入させることが出来るのではないかとの作業仮説を立てて本研究を行った。

ヒト染色体の特定部位に DSB を誘導するレアカッター制限酵素として、真性粘菌 (*Physarum polycephalum*) 由来の制限酵素 I-PpoI を用いた。I-PpoI が認識、切断する配列はヒトを含む真核生物の rDNA 28S 上に高度に保存されている。ヒトの場合、rDNA はゲノム中に 200~300 コピー存在することから、I-PpoI が認識する配列も 200~300 コピー存在する。本研究では 200~300 コピー存在する I-PpoI のターゲット配列中の 1~数コピーに DSB を誘導し、ウイルス DNA の挿入を試みた。

実験には HEK293T 細胞と HT1080 細胞を用いた。両細胞株ともにレンチウイルスベクターを I-PpoI サイトに挿入させること

に成功したことから、DSB サイトへのウイルスベクター挿入は他の様々な細胞種でも可能であることが示唆された。

I-PpoI サイトへの挿入頻度を調べたところ、14 クローン中 2 クローンでウイルス DNA が I-PpoI サイトへ挿入されていた。しかし、サザンブロット解析の結果から、ウイルス DNA は I-PpoI サイト以外の場所にも挿入されていることが判明した。このことから、現在はレンチウイルスの MOI を下げて感染し、ウイルスベクターが I-PpoI サイトのみに挿入されているクローンの単離を試みている。また、本年度は HIV-1 由来のレンチウイルスを用いて実験を行ったが、次年度では MoMLV 由来のレトロウイルスベクターでも同様に DSB 部位に挿入されるかを調べる予定である。

本研究では、ウイルスを挿入させるターゲット配列として、rDNA 上に存在する I-PpoI サイトを標的としている。しかし、rDNA に DSB を誘導することや外来遺伝子を挿入させることによって細胞に毒性を示す可能性がある。本年度の研究ではレンチウイルスを rDNA 上の I-PpoI サイトに挿入させることに成功したが、遺伝子をコードする配列や調節配列以外の安全と考えられる配列に挿入させることが望ましい。ヒトゲノム中に存在する塩基配列を認識、切断するレアカッター制限酵素は I-PpoI 以外にも I-CreI、I-MsoI あるいは I-Vdi141I などが存在するが、いずれの認識配列も I-PpoI と同様に rDNA 上に存在する。これら以外の制限酵素の候補としては Sangamo BioSciences 社が開発している ZFN (Zink Finger Nuclease) が挙げられる。ZFN はオーダーメイド型のレアカッター

制限酵素であり、目的のターゲット配列を認識するジンクフィンガーモチーフをスクリーニングあるいは組み合わせて作られる。将来的には、I-PpoI の代わりとして ZFN を用い、ヒト染色体の安全と思われる領域にウイルスベクターを挿入させることが出来れば、遺伝子治療におけるより安全性の高いウイルスベクター導入システムが構築できるものと期待される。

## E. 結論

- ・レンチウイルスベクターをヒトゲノムの rDNA 上に存在する I-PpoI サイトに挿入させることに成功した。
- ・レンチウイルスベクターの挿入箇所はほとんどが I-PpoI の切断部位直下であった。
- ・レンチウイルスベクターが染色体に挿入された細胞をクローニングし、挿入部位を調べたところ、14 クローン中 2 クローンで I-PpoI サイトに挿入されていた。しかし、この 2 クローンは I-PpoI サイト以外の場所にもウイルスベクターが挿入されていた。
- ・レンチウイルスベクター感染時の MOI を下げ、ウイルス DNA が 1 コピーのみ挿入される条件で感染させることで、I-PpoI のみにレンチウイルスベクターが挿入された細胞クローンを単離できると思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

#### 第 31 回 日本分子生物学学会年会

レンチウイルスベクターをヒトゲノムの特定領域に挿入させる技術の開発  
～site specific integration of exogenous

DNA; SPIED システムの開発～

小山貴芳<sup>1</sup>、矢代寿子<sup>1</sup>、奥平准之<sup>1</sup>、石坂幸人<sup>1</sup>

国立国際医療セ研・難治性疾患<sup>1</sup>

4th German-Japanese HIV-Symposium

Facilitated integration of HIV-1 DNA into sites of DNA double-strand breaks; application for improved gene therapy by site-specific integration of exogenous DNA.

Takayoshi Koyama<sup>1</sup>, Binlian Sun<sup>1</sup>, Chikako Nakai-Murakami<sup>1</sup>, Yuzuru Minemoto<sup>1</sup>, Shigeki Hoshino<sup>1</sup>, Kenzo

Tokunaga<sup>2</sup>, Tetsutaro Sata<sup>2</sup>, Yukihiro Ishizaka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Intractable Diseases, International Medical Center of Japan

<sup>2</sup>Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## Fc $\gamma$ 受容体を介したデング出血熱病態形成機序をターゲットとした治療法の開発

所 属 国立感染症研究所 ウイルス第一部  
研究者 林 昌宏

デング出血熱のFc $\gamma$  IIA受容体(CD32)を介する病態形成機序を解析するためCD32を恒常発現するBHK-21細胞を作製した。また患者血清中のデングウイルスを迅速に検出するためフラビウイルス迅速診断法を開発した。

### A. 研究目的

デングウイルス(DENV)は蚊によって媒介されるアルボウイルスであり、熱帯アジア、中南米、アフリカ、オーストラリア、南太平洋諸島など世界の熱帯・亜熱帯の地域で発生している。本邦においては海外渡航者の増加とともに帰国後発症する例が増加しており旅行者感染症として重要である。DENVはフラビウイルス科フラビウイルス属に分類される一本鎖(+)RNAウイルスであり、蚊によって媒介されるアルボウイルスである。DENVには1-4型の4つの異なるウイルスが存在し、いずれの型のウイルスによっても同様の病気が起こるが同じ型のウイルスに対しては終生免疫が成立するため再感染しない。しかし他の型のウイルスに対する防御免疫は短期間で消失するためその後他の型のDENVに感染・発症しうる。DENVの感染により典型的な症状を示す場合一過性の熱性疾患であるデング熱(DF)、致死性疾患であるデング出血熱(DHF)という2つの異なる病態を示す。これまでに*in vitro*抗体依存

性感染増強(ADE)モデルとしてFc $\gamma$  IIA受容体(CD32)を強発現させたサル腎由来細胞Vero細胞、Cos-7細胞等を確立し、ADEの発生機序においてDENV-DENV型交差抗体複合体とCD32の結合に続くCD32とraftとの会合及びCD32のシグナル伝達がADEの誘導に重要であることを明らかとしてきた。本研究の目的はDHFの治療ターゲットとしてCD32に注目し、DENV治療法における基盤的研究としてADEを阻害する物質の探索を行うにあたりCD32を恒常発現する細胞培養系を確立することである。

### B. 研究方法

培養細胞：ハムスター由来BHK-21細胞(American Type Culture Collection)はEMEM(SIGMA)に10%の牛胎児血清を加えた培地にて維持した。

フローサイトメトリー：CD32発現細胞を4℃x20min処理しPBS(-)で洗浄後、1 $\mu$ g/mlのマウスIgGを用いて細胞表面に発現しているCD32

を15分間室温にてブロックした。10 $\mu$ lのCD32-PE抗体で4 $^{\circ}$ C、45分間反応した。PBS(-)で2回洗浄後0.4mlのPBS(-)に再浮遊し、フローサイトメトリー (Becton Dickinson) にて解析した。コントロールとしてマウス-PE抗体を用意した。DENV感染細胞の染色は抗DENV抗体を用いて行った。

遺伝子導入：10cm デッシュに5 $\times$ 10<sup>6</sup>のBHK-21細胞を播種し、3 $\mu$ gのpcDNA3.1-CD32プラスミドをLipofectoamin LTX (Invitrogen)を用いて導入した。導入2日後にこれを観察し実験に用いた。発現した蛋白質はフローサイトメトリーおよび蛍光抗体染色法にて行った。CD32の恒常発現細胞の選択はネオマイシンによって行った。

感染増強実験：抗DEN抗体を有するDEN患者血清を10倍階段希釈し、DENV(1型)と混合後37 $^{\circ}$ C1時間反応した。CD32発現細胞にDENV-患者血清複合体を接種し4日間培養した。DENV感染力価をVero細胞を用いたプラーク法にて算出した。

RT-PCR:RT-PCRのプライマー設計はフラビウイルス非構造蛋白質領域の塩基配列相同性の高い配列をターゲットとした。

#### (倫理面への配慮)

組換えDNA実験を行うにあたり「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき実施した。これに伴い、国立感染症研究所での当該実験申請手続きを行った。国立感染症研究所での実験は、特に研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令(平成16年文部科学省・環境省令第1号。)の定めによるほか、「国立感染症研究所組換えDNA実験実施規則に定めるところによるものである。

上記の定めるところにより遺伝子の改変、使用された技術およびこれらの結果改変された生物に生じた特性に関する情報を明らかにするとともにその移動を制限し実験に供した。

また適切に包装、ラベルし保存した。

#### C. 研究結果

CD32恒常発現BHK-21細胞の作製：CD32をBHK-21細胞に導入し、ネオマイシンによってCD32発現細胞を選択したところCD32を恒常発現する2つのクローンBHK-CD32-2とBHK-CD32-4を得た。フローサイトメトリーによりCD32の発現を確認したところ約80%の細胞にCD32の発現が認められた(図1)。それぞれのクローンを6継代したところCD32の発現に差が認められなかった。

CD32発現BHK-21細胞におけるDENVのADEの検討：抗DENV抗体を有する患者血清とDENVを37 $^{\circ}$ Cで1時間反応し、CD32発現BHK-21細胞に感染した。プラーク法によりDENVの感染を確認した結果デング患者血清と反応させたDENVはデング患者血清と反応させていないDENVと比較して約10倍のADE効果が観察された。したがってDENVは患者血清中に含まれる抗DENV抗体と複合体を形成し、CD32を介してBHK-21細胞に感染していることが示唆された。次に様々なDEN患者血清を用いてADEアッセイを行った。その結果DENV中和抗体価上昇が認められない急性期患者血清ではADEは観察されなかったが、中和抗体の上昇した回復期血清ではADEが観察された。

フラビウイルス迅速診断法の確立：様々なDENV株を患者血清より検出し、サンプルとして供試するためにDENVを含むフラビウイルス迅速診断法をRT-PCR法にて確立した。フラビウイルスに共通する配列をもとにプライマーを設計し、検討したところDENV、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、ウエストナイルウイルス等の蚊媒介性ウイルス等の蚊媒介性ウイルスのみみならず、ロシア春夏ウイルス、ランガットウイルス、ネギシウイルス等のダニ媒介性脳炎ウイルス、さらにヨコセウウイルスも検出可能であることが明らかとなった(図2)。

#### D. 考察

CD32恒常発現BHK-21細胞であるBHK-CD32細胞を作製し、BHK-CD32細胞を用いてDENVの*in vitro*におけるADEモデルを作製した。BHK-CD32細胞においては6継代までCD32の安定発現が確認されたため、BHK-CD32細胞作製によりADEアッセイに安定的にCD32発現細胞を供給することが可能となった。これまでに中和能を有しないDENV型交差抗体とDENVの免疫複合体による各細胞へのADEにおいてCD32の関与が報告されている。本実験において、DEN抗体を有する患者血清を用いてCD32を発現したBHK-21細胞におけるDENVのADEを検討した。その結果患者血清とDENVを反応させることによりDENVのADEが観察されDENVのADEはDENV-抗DENV抗体複合体によるCD32を介した感染であることが示唆された。これはこれまでに我々がCos-7細胞およびVero細胞を用いて得た結果と一致した。また様々なDEN患者血清を用いた検討の結果、ADEは回復期の患者血清においてのみ観察された。今後DEN病態形成機序におけるCD32の役割をさらに検討する。

また様々なDENV株を患者血清より検出し、サンプルとして供試するためにDENVを含むフラビウイルス迅速診断法を確立した。DENV流行地域では日本脳炎ウイルスや黄熱ウイルス、ウエストナイルウイルス等の他のフラビウイルスが流行しているため、フラビウイルス迅速診断法の開発は本研究のみならず、フラビウイルスに係る公衆衛生の恒常に資する。

#### E. 結論

現在DENV感染に対するワクチン及び特異的治療法はなく、世界の熱帯・亜熱帯地域においてDF、DHFの流行は今後も続くことが予想され、本邦においても海外渡航者の増加とともに帰国後発症する例が増加しており旅行者感染症として重要である。またDENVの動向にはヒト、蚊、気候、環境等の多くの要因が複雑に関わり、その流行状況の予測は困難

である。DHFやデングショック症候群はひとたび発症するとその致死率は高い重篤な疾患であり、本感染症の病態形成機序を解明し、その治療法を開発することは本邦への防疫のみならず世界の公衆衛生の向上に貢献する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Lim, C.K., Takasaki, T., Kotaki, A., Kurane, I. Vero cell-derived inactivated West Nile (WN) vaccine induces protective immunity against lethal WN virus infection in mice and shows a facilitated neutralizing antibody response in mice previously immunized with Japanese encephalitis vaccine. *Virology*, 374(1), 60-70, 2008.

Takasaki, T., Kotaki, A., Nishimura, K., Sato, Y., Tokuda, A., Lim, C.K., Ito, M., Tajima, S., Nerome, R., Kurane, I. Dengue Virus Type 2 Isolated From an Imported Dengue Patient in Japan: First Isolation of Dengue Virus From Nepal. *J Travel Med*. 15(1), 46-9, 2008.

Ito, M., Takasaki, T., Kotaki, A., Tajima, S., Yuwono, D., Rimal, H.S., Santos, F.D., De Jesus, M.D., Lina, B.B., Tsuda, Y., Lim, C.K., Nerome, R., Caleres, A., Shindo, N., Dragaer, R.D., Japaridze, A., Kurane, I. Dengue outbreak in East Timor In 2005: Emergence of Dengue virus type 3. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* (in press)

林 昌宏. チクングニヤ熱. 化学療法の領域, 24 (11):1606-1613, 2008.

林 昌宏, 高崎智彦. 黄熱. 産業保健ハンドブックVI 職場の感染症対策—予防管理・発生時対策・臨床・補償のすべて—, 260-264, 2008.

林 昌宏, 高崎智彦. セントルイス脳炎. ブルーノースハンドブック (in press)

## 2. 学会発表

Lim, C.K., Takasaki, T., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Kurane, I. Two Chikungunya Virus Strains with Different Characteristics isolated from One Patient Who Returned to Japan from Sri Lanka. 42nd Joint Working Conference on Viral Diseases, Japan-US Cooperative Medical Science Program (Nagasaki, Japan) 2008/5/27-28.

Lim, C.K., Takasaki, T., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Kurane, I. Two Chikungunya Virus Strains with Different Characteristics isolated from One Patient Who Returned to Japan from Sri Lanka. XIV. International Congress of Virology (Istanbul, Turkey) 2008/8/10-15.

Lim, C.K., Kotaki, A., Takasaki, T., Kurane, I. Development of Universal Primers for Rapid Detection of Flavivirus. The Second International Conference on Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (Phuket, Thailand) 2008/10/15-17

Moi, M.L., Lim, C.K., Takasaki, T., Kurane, I. Role of Fc-gamma II receptor in antibody dependant enhancement of dengue viral infection. The Second International Conference on Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever (Phuket, Thailand) 2008/10/15-17

Lim, C.K., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Kurane, I., Takasaki, T. Chikungunya Virus Isolated from a Patient Who Came Back to Japan from Sri

Lanka: Isolation of two strains with different characteristics. The West Nile virus 2009 National Conference (Savannah, GA, USA) 2009/2/19-20.

林 昌宏. チクングニヤ熱の疫学と実験室診断法. 衛生微生物技術協議会第29回研究会 (東京都) 2008年6月24-25.

林 昌宏, 西堀武明, 渡辺香奈子, 小滝 徹, 伊藤美佳子, 倉根一郎, 高崎智彦. チクングニヤ熱輸入症例患者血清より分離された CHIKV の性状解析. 第56回日本ウイルス学会 (岡山県) 2008年10月26-28日

モイ=メンリン, 林 昌宏, 高崎智彦, 倉根一郎. Determination of the regions in FcgRIIA which is responsible for antibody dependent enhancement in dengue viral infection. 第56回日本ウイルス学会 (岡山県) 2008年10月26-28日

林 昌宏. チクングニヤ熱検査法. 平成20年度希少感染症診断技術研修会 (東京都) 2009年2月24-25日

## G. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特記事項無し

### 2. 実用新案登録

特記事項無し

### 3. その他

特記事項無し



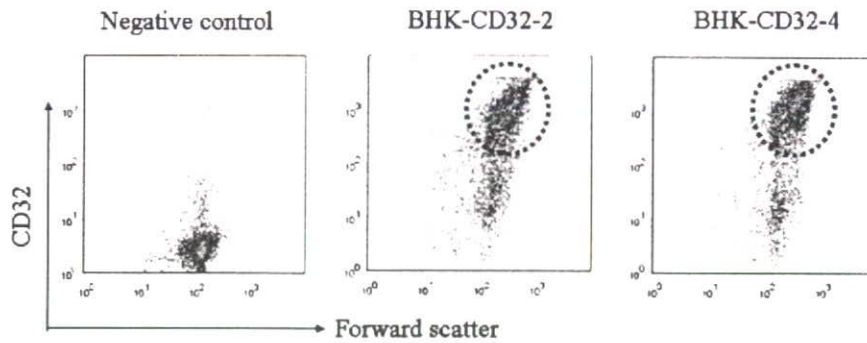


図1. BHK-21細胞におけるCD32の発現  
 BHK-21細胞にCD32をトランスフェクションにより導入しクローニングしたところCD32を80%発現するBHK-CD32-2とBHK-CD32-4を得た。それぞれの細胞は6継代後も安定的にCD32を発現した。

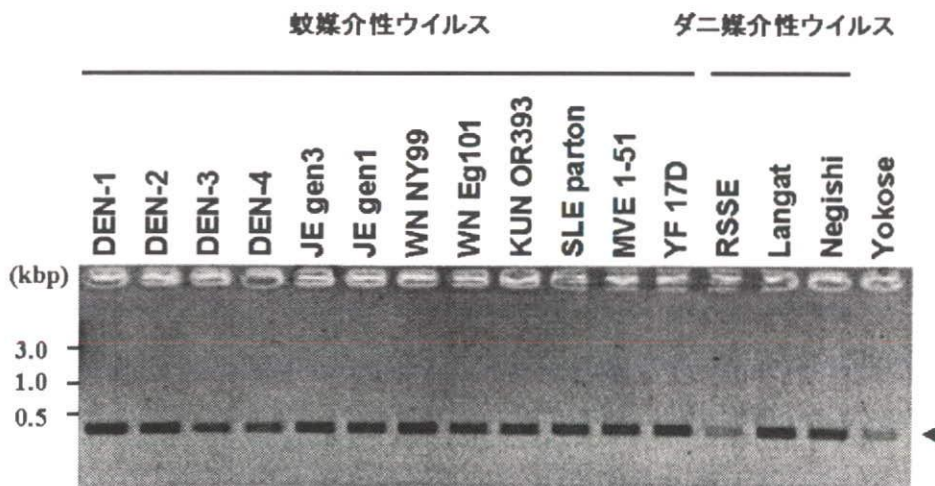


図2. 様々なフラビウイルスに対するFVcx7f/rプライマーの検討  
 フラビウイルス共通プライマーFVcx7f/rの様々なフラビウイルスに対する条件検討を行った。DEN:デングウイルス, JE:日本脳炎ウイルス, WN:ウエストナイルウイルス, KUN:クンジンウイルス, SLE:セントルイス脳炎ウイルス, MVE:マレーパレー脳炎ウイルス, YF:黄熱ウイルス, RSSE:ロシア春夏脳炎ウイルス, Langat:ランガットウイルス, Negishi:ネギシウイルス, Yokose:ヨコセウイルスを示す。

## 日和見感染症の予防・早期診断・治療法の開発に向けた基礎的研究

所属 国立感染症研究所 生物活性物質部  
研究者 金子幸弘

研究要旨 日和見感染症の主たる病原体である、*Candida albicans*のバイオフィルムに対する新しい治療法開発のための基礎的検討を行った。また、免疫学的なアプローチによる日和見感染症の基礎的検討を行った。

### A. 研究目的

日和見感染症は、移植手術の主な死亡原因であり、術後のコントロールを困難にしている主要因でもある。日和見感染症の多くは、治療に抵抗性であり、治療の長期化は耐性菌出現の温床ともなっている。特に、バイオフィルムと呼ばれる菌の集塊が治療抵抗性に関与しており、バイオフィルムに対する治療の確立は、日和見感染症を克服する上で極めて重要である。

*Candida albicans* は日和見感染症の重要な病原体であり、院内感染症の中でも非常に致死率の高い難治性感染症を引き起こす。同菌は、カテーテルなどの表面に付着して、容易にバイオフィルムを形成することが知られており、このバイオフィルムの形成が耐性の機序として最も重要視されている。

このような観点から、*Candida albicans* を用いて、主に、バイオフィルムに関する基礎的研究を行った。

また、免疫学的アプローチからも検討することで、多角的に日和見感染症の予防・早期診断・治療の開発に寄与することを目的とする。

### B. 研究方法

1. *Candida albicans* の接着・バイオフィルム形成についての基礎研究

#### 使用菌株:

*Candida albicans* SC5314 株

#### 使用薬剤:

エキノキャンディン系抗真菌薬 (Ech)

アゾール系抗真菌薬 (Az)

Hsp90 阻害剤 (Hsl)

カルシニューリン阻害剤 (Cnl)

キチン合成阻害剤 (Chl)

#### 培養方法:

YPD 寒天培地に同菌を開き、single colony をとり、YNB 培地 5ml で、30℃、震盪培養した。

#### バイオフィルムの作成方法:

一晚培養した菌液を遠心し、上清を取り除いた後、菌を 25ml の PBS に浮遊させた。この浮遊液の中に、血清処理した直径 4mm 大のシリコンエラストマーディスク(SE ディスク)を沈め、37℃、90 分静置し、SE ディスクに菌を付着させた。その後、付着していない菌を軽く PBS で洗浄して取り除き、YNB を加えて、37℃で 24 時間培養することで、SE ディスク上にバイオフィルムを形成させた(図 1)。

図1 SEディスク上のバイオフィルム



左は、バイオフィルムを形成させる前のSEディスク、右は、*Candida albicans*のバイオフィルムを形成させたSEディスク

#### 治療:

96well microplate の各 well に、各種濃度の抗真菌薬およびその他の阻害剤を添加した YNB 培地を 200  $\mu$ l ずつ入れ、その中に、バイオフィルムを形成させた SE ディスクを沈めて 37℃で静置した。

目的に応じて、以下に示す濃度、時間およびタイミングで治療を行った。

#### 遺伝子発現:

バイオフィルム形成後、無治療のまま、又は、抗真菌薬 (Ech 0.5  $\mu$ g/ml, Az 1  $\mu$ g/ml)で 4 時間治療したのち、バイオフィルム内の菌を集菌し、ホットフェノール法にて mRNA を抽出し、遺伝子発現解析を行った。

#### 治療群:

- a. 同時併用療法 治療時間はそれぞれ 24 時間
- ① 無治療 (コントロール)
  - ② Ech 0.5  $\mu$ g/ml
  - ③ Az 0.125  $\mu$ g/ml + Ech 0.5  $\mu$ g/ml

- ④ Az 0.125  $\mu$ g/ml + Ech 0.5  $\mu$ g/ml + Hsl 2  $\mu$ M
- ⑤ Az 0.125  $\mu$ g/ml + Ech 0.5  $\mu$ g/ml + Cnl 10  $\mu$ M
- ⑥ Az 0.125  $\mu$ g/ml + Ech 0.5  $\mu$ g/ml  
+ Chl 0.4  $\mu$ g/ml

#### b. 時間差併用療法

- ① 無治療 48 時間 (コントロール)
- ② 無治療 24 時間後、Ech 0.5  $\mu$ g/ml 24 時間
- ③ Az 0.125  $\mu$ g/ml 24 時間後、Ech 0.5  $\mu$ g/ml 24 時間
- ④ Az 0.125  $\mu$ g/ml 24 時間後、Ech 0.5  $\mu$ g/ml + Hsl 2  $\mu$ M 24 時間
- ⑤ Az 0.125  $\mu$ g/ml 24 時間後、Ech 0.5  $\mu$ g/ml + Cnl 10  $\mu$ M 24 時間
- ⑥ Az 0.125  $\mu$ g/ml 24 時間後、Ech 0.5  $\mu$ g/ml + Chl 0.4  $\mu$ g/ml 24 時間

#### 抗真菌効果の評価

評価方法として、ミトコンドリアの還元能を指標として代謝活性を測定する XTT アッセイを用いた。50  $\mu$ g/ml XTT + 4  $\mu$ M menadione を 200  $\mu$ l 加え、37°C で静置した。1 時間後、SE ディスクを取り除き、OD490/630 を測定し、コントロール(無治療)のものと比較して、%コントロールとして菌の代謝活性を示した。

#### 2. ストレス応答因子制御による抗真菌薬活性の増強に関する検討

使用菌株および培養方法は 1 と同様。

##### 抗真菌薬と Hsl 等との併用効果:

96well microplate の各 well に、0-2  $\mu$ g/ml の Ech または Az を 2 倍ごとの段階希釈で添加した。併用薬として、Hsl、Cnl、または Chl をそれぞれ、1  $\mu$ M、10  $\mu$ M、0.2  $\mu$ g/ml (単独では菌の増殖を抑制しない濃度) ずつ添加した。一晚培養した菌液を 10<sup>4</sup>cfu/ml になるように希釈して、各 well に接種した。24 時間 37°C で静置培養後、遠心し、上清のみを取り除いた後、菌の増殖を、XTT を用いて比較した。

#### 3. 免疫学的アプローチによる基礎的検討

免疫学的アプローチの一つとして、遺伝子欠損マウスの真菌感受性の変化について検討した。今回は、好中球遊走因子の一つと考えられている LECT2 のノックアウトマウスを用いた。

##### 使用動物:

Balb/c 系、8 週齢、野生型マウス(WT)および LECT2 ノックアウトマウス(LECT2-KO)。

##### 使用菌株:

*Candida albicans* SC5314 株

#### 培養および菌の接種:

YPD 培地を用いて、mid-log phase まで菌を増殖させ、遠心し、上清を取り除いた後、約 10<sup>5</sup>cfu/ml となるように PBS に菌を浮遊させた。同菌液を 500  $\mu$ l ずつ、マウスの尾静脈から接種した。

#### 生存比較

菌接種後の経過日数をプロットし、log-rank 検定により生存率を比較した。

#### 倫理面への配慮:

\* 実験動物に対する動物愛護上の配慮: 動物実験(マウス実験)に際しては、国の定める「動物の愛護及び管理に関する法律」および本研究所の定める「国立感染症研究所動物実験実施規程」に基づき行った。

\* 組換え体の使用に関する配慮: 組換え体の作成・使用に際しては、国の定める「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」および本研究所の定める「組換え DNA 実験実施規則」に基づき行った。

#### C. 研究結果

##### 1. *Candida albicans* の接着・バイオフィーム形成についての基礎研究

##### バイオフィームの遺伝子発現

現在解析の進行中であり、4 月末頃に終了予定である。

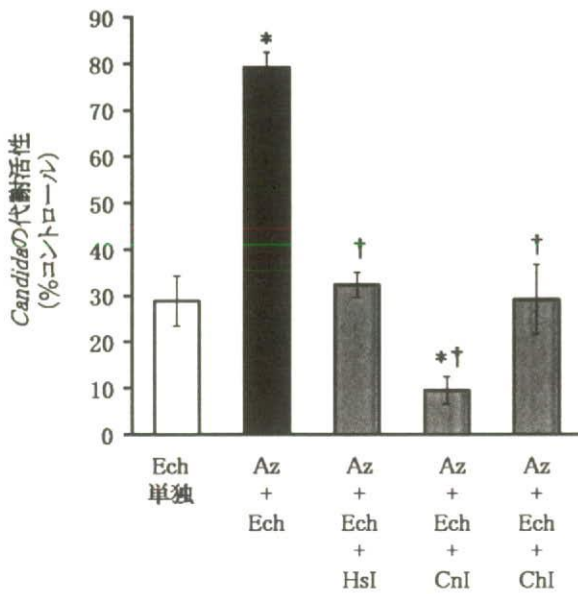
##### 抗真菌薬の併用効果とストレス応答因子制御の効果

Ech 単独では、バイオフィーム内の菌の代謝活性を約 30% 程度に抑制するが、Az と併用することで、抑制効果が低下し、代謝活性は約 80% を示した。すなわち、*Candida albicans* のバイオフィームに対して、Az と Ech を併用すると、拮抗的に作用すること、特に Az が、Ech の殺菌作用を減弱することが明らかとなった(図 2a)。

また、Hsl、Cnl、Chl を加えて、ストレス応答因子を制御する事により、Ech の殺菌作用が回復した(図 2a)。

このことから、*Candida albicans* のバイオフィームは、Az 存在下では、Hsp90 を介した経路により、Ech に対して抵抗性となることが示唆された(図 4)。

図2 AzによるEchの代謝抑制効果の阻害およびHsl、Cnl、Chlの効果



a. 同時投与による効果

Echは、*Candida* バイオフィルム内の菌の代謝活性を、約30%まで抑制した。Azは、Echの効果に拮抗し、代謝活性は、80%程度まで上昇した。

Hsl、Cnl、Chl(それぞれ単独では代謝を抑制しない濃度)を加えると、Azの拮抗作用は消失し、Echによる代謝抑制効果が回復していた。

\* p<0.01 対 Ech 単独

† p<0.01 対 Ech + Az

Ech: エキノキャンディン系抗真菌薬

Az: アゾール系抗真菌薬

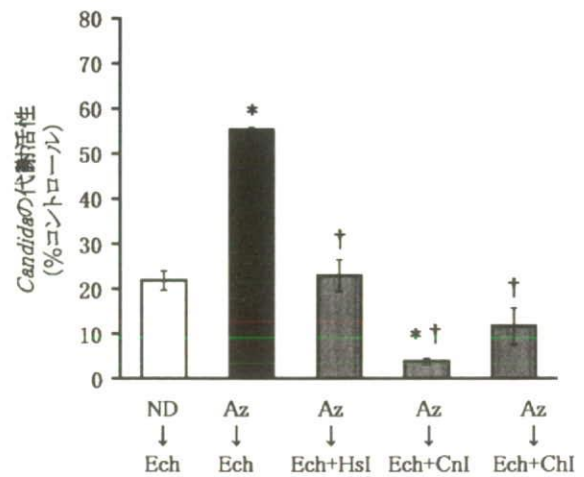
Hsl: Hsp90 阻害剤

Cnl: カルシニューリン阻害剤

Chl: キチン合成阻害剤

また、ストレス応答因子が関与していることから、Azへの暴露が終了したのちにもEchに対する抵抗性が残っている可能性が予想された。そこで、Azで24時間治療後に、Echで24時間治療を行い、抗真菌効果を比較した。

同時併用の場合と同様に、Azの治療後にEchで治療をした場合でも、Echの抗真菌効果が低下していた。さらに、同時併用の場合と同様に、Hsl、Cnl、Chlが有効であり、Echの抗真菌効果を回復させた(図2b)。



b. 時間差で投与した場合の効果

バイオフィルムを形成させた後、無治療またはAzで治療後、24時間後に、Ech単独で治療、または、Hsl等を併用した。

同時投与時のみならず、Azを取り除いた場合でも、Echに対する抵抗性が残っていた。同時投与時と同様に、Hsl、Cnl、Chlが有効であった。

\* p<0.01 対 ND→Ech

† p<0.01 対 Az→Ech

ND: 無治療(no drug)

ND → Ech: 無治療で24時間培養後にEch単独

Az → Ech: Azで24時間治療後にEch単独

Az → Ech + Hsl: Azで24時間治療後にEch + Hsl

Az → Ech + Cnl: Azで24時間治療後にEch + Cnl

Az → Ech + Chl: Azで24時間治療後にEch + Chl

2. 浮遊菌の増殖に関わるストレス応答因子制御の効果

Ech および Az の増殖抑制曲線を図3に示す。

Ech は、非常に強い増殖抑制効果を示すが、0.25 μg/ml 以上で効果が減弱した(paradoxical effect(PE))。Hsl、Cnl、Chlを加えることにより、PEの消失が認められた(図3a)。このことから、Hsp90経路がEchのPEに関与していることが示唆された(図4)。

Azは、0.008 μg/mlで増殖抑制効果を認めるものの、Echに比べて弱く、また、それ0.016以上の濃度でも増殖抑制効果の増強は認めなかった。Hsl、Cnlを加えることにより、明らかに作用の増強を認めた(図3b)。しかしながら、Chlは、Azに関しては、その作用増強の程度はわずかであった。