

caa aaa acg ctg agt act tgc aaa ttc tct tga aat ttc gaa
gta ctc agc gtc g-3'.

(2) Ad ベクタープラスミドの構築

Ad ゲノムの E1 および E3 欠損領域に、shRNA 発現カセットを挿入可能な Ad ベクタープラスミド pAdHM41-E3(+) を作製した。

(3) Ad ベクターの調製

ルシフェラーゼ遺伝子に対する shRNA 配列を有した Ad ベクタープラスミドを PacI で処理した後、293 細胞にトランスフェクションすることにより Ad ベクターを得た。精製およびタイターの測定に関しては、定法に従った。

6. 遺伝子導入実験

既に当プロジェクトにおいて作製済みであったホタルルシフェラーゼ安定発現 A549 細胞 (A549-Luc) を 1×10^4 cells/well で 96 well-plate に播種した。翌日、培地を取り除いたのち、ホタルルシフェラーゼに対する shRNA 発現カセットを搭載した各種 Ad ベクターを、300 vector particles (VP)/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。計 72 時間培養したのち、LT2.0 (Toyoinki) を用いてホタルルシフェラーゼ活性を測定した。

C. 研究結果

1. Ad ベクター認識レセプターの確認

MT4、Molt3、HSB2 細胞において CAR の発現を検討した。いずれの細胞においても CAR が発現している事が確認された[Fig.1]。

2. 血球系細胞における最適な Ad ベクターの導入条件の検討

MT4、Molt3、HSB2、Jurkat 細胞に対し Ad ベ

クターを 3000 VP/cell で 1.5hr 感染させ、48 hr 培養したところ、いずれの Ad ベクターでも 90%前後の遺伝子導入効率が確認された[Table. 2]。特に AdK7 と Ad35、そして AdF35 に強い遺伝子発現が確認された(95%以上)[Fig.2]。しかしながら AdK7 はヘパラン硫酸、Ad35、AdF35 は CD46 を認識しており、ヘルペスウイルスの用いるレセプターと同一であることから、二重感染においてヘルペスウイルスの感染阻害を起こす可能性が考えられた。そこで本研究では Ad5 を用いることとした。なお、Ad5 でも高い遺伝子導入効率(90%以上)が確認されていた。血球系細胞株の中では MT4 と Jurkat への遺伝子導入が容易であり、細胞障害性も顕著ではなかった。HSB2 と Molt3 は MT4 や Jurkat と比べると遺伝子導入効率が若干低く、また、細胞毒性も出やすいという現象が観察された。ルシフェラーゼ発現 Ad ベクターにおいても同様の結果が得られた[Fig.3]。

3. 繊維芽細胞における最適な Ad ベクターの導入条件の検討

MeWo 細胞、MRC5 細胞に対しては、3000vp/cell まで Ad ベクター感染による細胞障害性は観察されず、高い遺伝子導入効率が確認された [Fig.4]。それ以上のタイターだと、細胞障害性が観察された。ルシフェラーゼ発現 Ad ベクターを用いた検討においても、血球系細胞での検討と同様に AdK7 による高い遺伝子導入効率が確認された [Fig.4]。また、300vp/cell、1.5hr の感染、24hr の培養の条件まで低いタイターに下げても、90%以上の遺伝子導入効率を確認することができた [Fig.5]。MRC5 と MeWo は接着細胞であるため、血球系細胞より容易に低タイターで高効率の遺伝子導入可能であると推察された。なお、血球系細胞と同様の理由から、以降の検討で使用する

Ad ベクターは Ad5 とした。

4. Ad ベクター感染がヘルペスウイルス感染に及ぼす影響に関する検討

Ad ベクター感染がヘルペスウイルス感染に与える影響を評価するため、Ad ベクター感染後のヘルペスウイルス感染効率について検討した。Ad ベクター 3000 VP/cell の条件では VZV、HHV-6 のいずれの感染にも阻害がかかる上、細胞毒性が観察されたため、Ad ベクターのタイターを出来る限り低く抑える事が必要となった。血球系細胞においては、Ad ベクターを 1000vp/cell の条件まで抑えると、HHV-6 によって感染の指標である CPE が確認された。しかしながら、Ad ベクター未処理の細胞に比べて明らかに HHV-6 感染に抑制がかかっていることが観察されたため、1000 VP/cell より低いタイターで検討することとした。一方、MeWo 細胞においては、Ad ベクター 1000 VP/cell の条件下でようやく VZV による CPE が起こり始め、300 VP/cell の条件では Ad ベクター未処理の細胞に近い結果が得られた。以上のことより 300 VP/cell 以下での条件検討を行う。MeWo 細胞では今回の検討において Ad ベクター 30vp/cell まで低いタイターに下げても 60-70% の遺伝子導入が可能である事が明らかとなった [Fig.5]。今後 Ad ベクターをより低タイターで作用させた場合の遺伝子発現効率と、ヘルペスウイルス(VZV、HHV-6)の感染効率への影響を検討することで、最適な遺伝子導入条件の決定を行う。

本検討で検討した Ad ベクターは CMV プロモータを持つベクターであるが、CA promoter を持つ Ad ベクターとの遺伝子導入効率の比較も行った。その結果、CA プロモータを持つ Ad ベクターの遺伝子導入効率が CMV プロモータを持つ

Ad ベクターに比べて若干高くなることを確認した (data not shown)。

5. 標的遺伝子に対するターゲット配列の選定

VZV の標的遺伝子である ORF62 及び ORF68 に対する標的配列の中から、効果的にその発現を抑制できると考えられる配列を選定した [Fig.7]。また、より高いノックダウン効率を目指してルーブ配列の検討を行い、ノックダウン効率を改善する事に成功した [Fig.8]。Poly(II)系のプロモーターでドライブさせる場合と Poly(III)系のプロモーターでドライブさせる場合のノックダウン効果も比較したところ、Poly(II)系プロモーターを搭載したプラスミドでは著明なノックダウン効果を得られなかった。従って以降の検討は Poly(III)系プロモーターを使用することとした。

6. shRNA-Ad ベクター前処理による VZV 粒子数増殖抑制効果

shRNA-Ad ベクターを MeWo 細胞に 300 VP/cell で作用させて 24 hr 培養した。その後、VZV を感染させた後、プラークの形成を観察した。VZV のみを感染させた群において明らかにプラークが確認された時点 (7 日目) で固定染色した図を示した。ORF68 に対する shRNA-Ad ベクター作用群において、明らかなプラーク形成能の低下が観察された [Fig.10]。また、NIH の画像解析ソフトである Image-J にて解析した結果も同時に示した [Fig.11]。なお、Image-J においては VZV のみ感染させた群においてプラーク数が 50 となるように threshold の条件を決定して分析を行った。

7. shRNA-Ad ベクターによる VZV 粒子数の抑制効果

Taqman Real time PCR 法を用いて、VZV の増殖

粒子数への shRNA-Ad ベクターの効果を判定した。ORF68 に対する shRNA-Ad ベクター処理において有意に増殖抑制効果がある事が確認された。しかしながら AdHM4-ihU6-Lu5 (control)、AdHM4-ihU6-VZVORF62-3T1 を処理した群が VZV のみを作用させた群よりも VZV 粒子数が高く検出されるという現象が確認された [Fig.12]。

8. shRNA-Ad ベクターによる標的遺伝子発現量の変化

RT-PCR 法を用い、標的遺伝子である ORF62 と ORF68 の発現を確認した。VZV の感染タイトルが低いとウイルス遺伝子の発現は全体的に低い事が判明した(lane 1-4 が 10 pfu/well、1-8 が 50 pfu/well)。ORF62 に対する shRNA-Ad ベクターは ORF62 の発現にも ORF68 に発現にも大きな影響は与えなかった。しかしながら ORF68 に対する shRNA-Ad ベクターは 50 pfu/well の条件において、ターゲットである ORF68 の発現を明らかに減弱させるだけでなく、ORF62 の発現にも弱い抑制がかかっていると考えられた [Fig.13]。

9. shRNA-Ad ベクターによる shRNA 及び siRNA の発現確認

DIG を用いた Non-RI の系での検出を試みた。しかしながら、効果の見られた shRNA-Ad ベクター感染後 48hr のサンプルにおいても shRNA 及び siRNA は検出することができなかった。このような結果となったのは、5'側 DIG ラベル DNA プロープによる検出感度が RI プロープに比べて低かったことが挙げられた。以上の事より、実験条件の検討と平行し、RI プロープによる検出も検討する必要があると考えられた。

10. Western Blotting による標的遺伝子のノックダ

ウン効率の検討

標的遺伝子である ORF62 に対する shRNA-Ad ベクターは VZV との共感染において著明な抑制効果を示さなかった。しかしながら ORF62 によってコードされる IE62 は VZV の外殻タンパクの構築以外にもウイルスの replication において重要な働きを示す事が知られつつある。本研究にて構築した shRNA-Ad ベクターによる mRNA レベルでのノックダウン効果は僅かであったが、タンパクレベルではどの程度効果を及ぼしているかは不明であったため、確認を試みた。しかしながら MeWo 細胞における IE62 の発現は低く、VZV 作用後 48 hr では Western blot にて検出することは出来なかった。

11. shRNA 発現カセットを 4 種搭載した Ad ベクターの開発

本研究で作製した新規ベクタープラスミド pAdHM41-E3(+)は、E1 領域を欠損した全長の Ad ゲノムを有したベクタープラスミドであり、ゲノム両末端には PacI 部位を有している (Fig.15)。また、E3 領域には外来遺伝子の挿入が容易なように I-CeuI/SwaI/PI-SceI 部位を有し、E1 領域への外来遺伝子の挿入も可能なように XbaI 部位を有している。さらに感染域の制御を目的に、ファイバー領域に自在に外来リガンドコード遺伝子を挿入できるようにファイバーノブの HI ループコード領域に Csp45I 部位を、C 末端領域に ClaI 部位を有している。これらは全てユニークな制限酵素部位である。なお、pAdHM41-E3(+)では、クロニング部位の I-CeuI/SwaI/PI-SceI 部位は Ad ゲノムの 28593bp 部位に挿入した。この部位に外来遺伝子を挿入しても、Adenovirus Death Protein (ADP)の発現には影響を与えないため、通常の E3 領域を欠損した Ad ベクターに比べ、ウイルス増

幅が容易で高タイトーのベクターが得やすいという特徴を有する。

pAdHM41-E3(+)を用いることにより、下記に記載の shRNA 発現 Ad ベクターを *in vitro* ライゲーションを利用することで簡便に作製可能であった。

12. shRNA 発現カセットを4種搭載した Ad ベクターの遺伝子発現抑制効果に関する検討

次にモデル標的遺伝子として、ホタルルシフェラーゼを選択し、ホタルルシフェラーゼ安定発現 A549 細胞 (A549-Luc) に対し、E1 欠損領域にホタルルシフェラーゼに対する shRNA 発現カセットを挿入した Ad ベクター (Ad-sh-Luc1)、E3 欠損領域に挿入した Ad ベクター (Ad-sh-Luc3)、今回作製した4つの shRNA 発現カセットを搭載した Ad ベクター (Ad-4xsh-Luc) を 300 VP/cell で作用させた。その結果、Ad-4xsh-Luc を作用させた群においては、他群と比較し、有意に高い Knockdown 効率を示した (Fig.16)。この結果より、4種の shRNA 発現カセットを搭載することにより、より高い Knockdown 効率を得られることが示唆された。現在、それぞれ異なる遺伝子に対する shRNA の発現カセットを搭載し、その Knockdown 効率について検討している。

D. 考察

Ad ベクター単独、またはヘルペスウイルス単独では影響のない条件でも、Ad ベクターと VZV、HHV6 の二重感染によって毒性が確認された。これはターゲット細胞が二重感染によって未知の影響も受けているためであると思われる。本研究で使用した Ad ベクターは Ad 遺伝子全長の入ったベクターであるため、ウイルス遺伝子による毒性が現れている可能性もある。また、二重感染に

よる相乗効果である可能性もある。このような影響を防ぐため、将来的にはウイルス遺伝子を可能な限り削った第三世代の Ad ベクター (guttled Ad ベクター) の利用も試みる必要があると考えられる。

VZV における検討では、初期遺伝子である ORF62 をターゲットとするよりも後期遺伝子である ORF68 に対する siRNA が増殖抑制に効果的に働いた。また、大きなプラーク形成は見られないものの、小さなプラークは出来ている為、感染を抑制するのではなく、感染後の増殖を抑制していると考えられた。今後処理順序を変える検討を行うことで、増殖抑制のメカニズムや、ターゲット遺伝子の選定に役立つ知見が得られると考えている。しかし、ウイルス感染症の治療への利用を検討する為、VZV 感染の後 shRNA-Ad ベクターで処理する条件を検討したが、VZV に対する増殖抑制効果は観察されなかった。おそらくこれは VZV の増殖があまりにも速いため、Ad ベクターによる shRNA の発現が間に合わなかったものと思われる。

H20 年度においては、より高い Knockdown 効率を示す shRNA 発現 Ad ベクターを開発することを目的として、4つの shRNA 発現カセットを搭載可能な Ad ベクターを開発した (Fig.13)。モデル標的遺伝子であるホタルルシフェラーゼに対する shRNA 発現カセットを4つ搭載した Ad ベクターを作製し、ホタルルシフェラーゼ安定発現株に作用させたところ、従来の shRNA 発現 Ad ベクターと比較し、有意に高い Knockdown 効率を示した。本 Ad ベクターは単純に計算すると、従来の Ad ベクターと比較し、4倍量の shRNA が発現しているために、高い Knockdown 効率を得られたものと思われる。今回は 300 VP/cell の用量で細胞に作用させたが、3000 VP/cell で作用さ

せた場合には、どのベクターにおいても Knockdown 効率は同程度であった (data not shown)。これは shRNA の転写以外のステップが飽和していることを示唆しており、今後は Ago2 や Exportin-5 など、RNAi 機構に関与するとされるたんぱく質を同時に発現させることにより、より高い Knockdown 効率が期待できるものと思われる。

E. 結論

・VZV の標的細胞(MeWo 細胞、MRC5 細胞)、HHV-6 の標的細胞(MT4 細胞、Molt3 細胞、HSB2 細胞、Jurkat 細胞)に対する最適な遺伝子導入効率を示す Ad ベクターを確立した。

・遺伝子発現抑制系としての miRNA 発現プラスミドベクターの構築を行った。

・VZV 感染前に VZV の糖タンパク gE を標的とした shRNA-Ad ベクターを作用させる事によって、効果的に VZV の増殖を抑制できる事が判明した。抑制メカニズムは現時点では不明であるが、shRNA-Ad ベクターを感染症に対して予防的に利用する可能性及び VZV の遺伝子解析ツールとしての有用性が示唆された。

・さらに高い遺伝子発現抑制効果を有した shRNA 発現 Ad ベクターの開発に成功した。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当事項なし。

2. 学会発表

櫻井 文教、中島 加珠子、吉井 洋紀、松浦 正明、川端 健二、森 康子、水口 裕之。siRNA 発現 Ad ベクターを用いた水痘・帯状疱疹ウイルスの増殖抑制。遺伝子・デリバリー研究会第 8 回シンポジウム 2008 年 5 月 9 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当事項なし。

2. 実用新案登録

該当事項なし。

3. その他

該当事項なし。

Table.1 Adenovirus vectors used in the present study

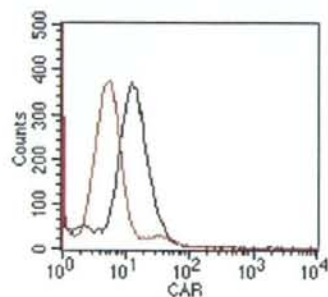
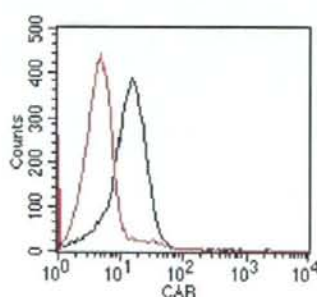
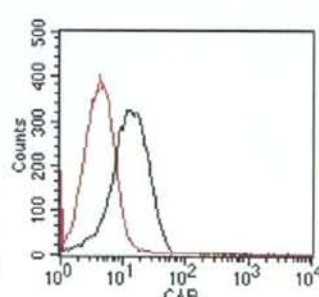
Name	Fiber type	Promoter
Ad5-CMV-GFP	Type 5 fiber	CMV promoter
Ad35-CMV-GFP	Type 35 fiber	CMV promoter
AdK7-CMV-GFP	Polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob	CMV promoter
AdRGD-CMV-GFP	RGD peptide in the HI loop of the fiber knob	CMV promoter
AdF35-CMV-GFP	Type 35 fiber	CMV promoter
Ad5-CA-GFP	Type 5 fiber	CA promoter
AdF35-CA-GFP	Type 35 fiber	CA promoter
Ad5-CMV-Luc	Type 5 fiber	CMV promoter
AdK7-CMV-Luc	Polylysine peptide in the C-terminal of the fiber knob	CMV promoter
AdRGD-CMV-Luc	RGD peptide in the HI loop of the fiber knob	CMV promoter
AdF35-CMV-Luc	Type 35 fiber	CMV promoter

CA promoter: β -actin promoter/CMV enhancer with β -actin intron

Table.2 Efficiency of GFP expression in cell line

Cell name	MT4	Molt3	HSB2	Jurkat	MRC5	MeWo
Ad5(CA)	92.90%	81.22%	37.32%	96.34%	77.39%	N.D.
Ad5(CMV)	87.17%*	92.46%**	84.99%**	94.89%	97.78%	99.67%
Ad35(CMV)	N.D.	N.D.	N.D.	98.95%	99.99%*	99.25%
AdRGD(CMV)	47.66%	3.74%	7.82%	86.82%	98.59%	98.40%
AdK7(CMV)	99.93%*	89.03%*	81.47%*	96.90%	99.97%	82.88%
AdF35(CA)	99.98%	98.68%*	78.88%*	99.60%	99.87%	N.D.
AdF35(CMV)	100.00%	83.06%	72.47%	99.05%	98.29%	99.48%

*48hr incubation, **72hr incubation, N.D.; non data

(A) MT4**(B) Molt3****(C) HSB2****Fig.1 CAR expression in MT4, Molt3 and HSB2 cells.**

MT4(A), Molt3(B), and HSB2(C) cells were stained with FITC-conjugated anti-mouse IgG antibodies and anti human CAR antibodies, and subsequently analyzed by a flowcytometer.

(A) MRC5 cell

(B) MeWo cell

(C) MT4 cell

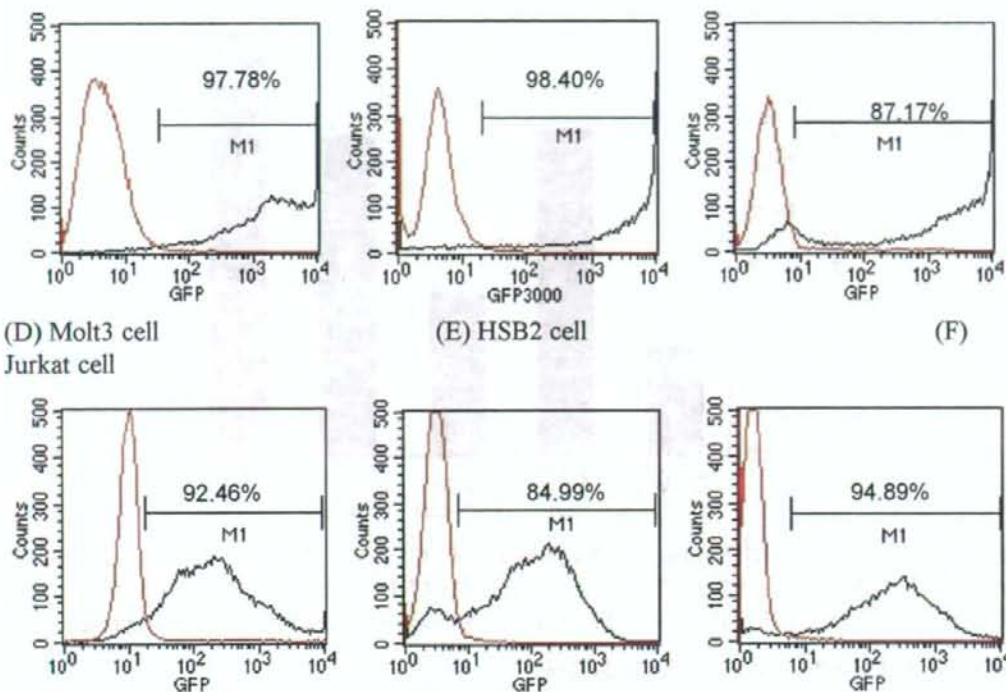
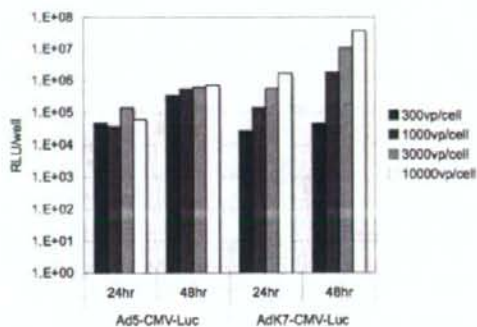


Fig. 2 Gene expression analysis in target cells infected Ad5-CMV-GFP. Human cells were infected with Ad5-CMV-GFP at 3000 VP/cell. After incubation (A,B: 24hr, C,F: 48hr, D,E: 72hr), GFP expression was assessed by flow cytometry analysis. The percent values in the lower panel express the percentage of M1-gated cells.

(A) Molt3 cells



(B) HSB cells

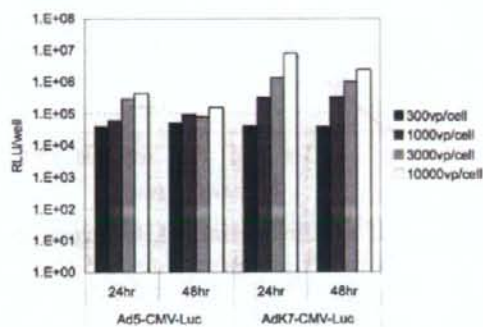


Fig.3 Luciferase assay in Molt3 and HSB2 cells infected Ad vector. (A) Molt3, and (B) HSB2 cells were transduced with Ad5-CMV-Luc or AdK7-CMV-Luc at 300, 1000, 3000 and 10000vp/cell. After 24 or 48 hr incubation, luciferase activity was measured.

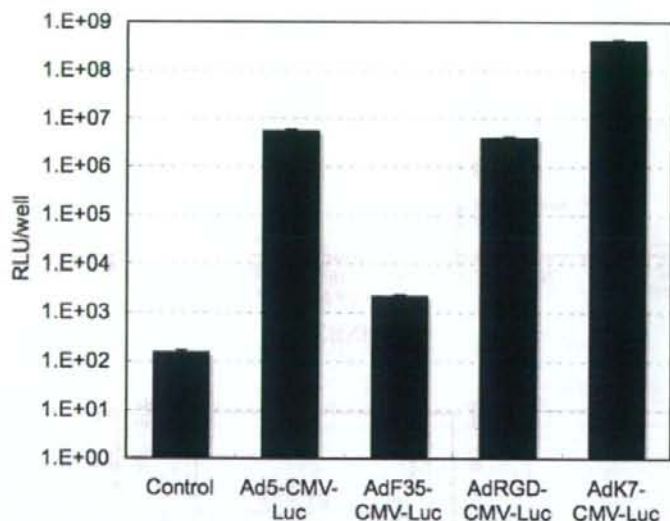


Fig.4 Transduction efficiency of Ad vector in MRC5 cells. MRC5 cells were transduced with Ad5-CMV-Luc, AdF35-CMV-Luc, AdRGD-CMV-Luc, or AdK7-CMV-Luc at 3000vp/cell. After 24 hr-cultivation, luciferase activities was measured. Data represent the mean \pm SD of results from duplicate culture.

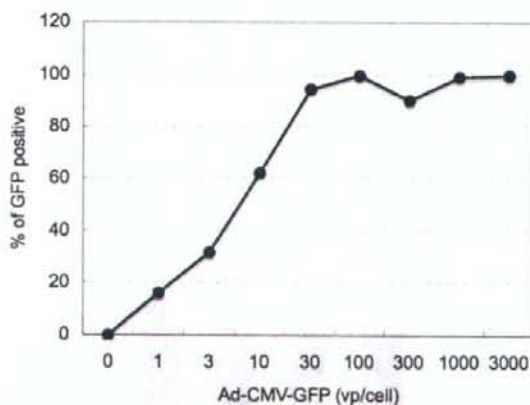


Fig. 5 Ad5 vector-mediated GFP expression in MeWo cells. MeWo cells were transduced with Ad5-CMV-GFP at the indicated concentration (vp/cell) for 1.5hr. After a total of 24 hr incubation, GFP expression in the cells was evaluated by flowcytometric analysis.

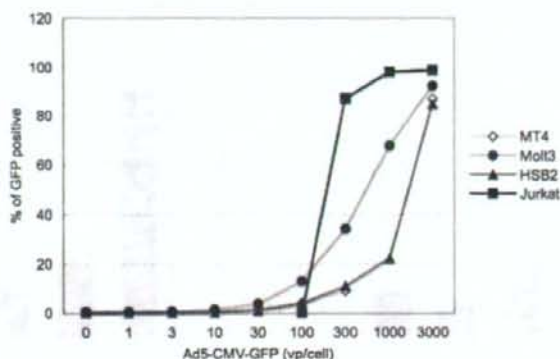


Fig. 6 Ad vector-mediated GFP expression in MT4, Molt3, HSB2, and Jurkat cells. MT4, Molt3, HSB2 and Jurkat cells were transduced with Ad5-CMV-GFP at the indicated concentration (vp/cell) for 1.5hr. After a total of 48hr incubation, GFP expression in the cells was evaluated by flowcytometric analysis.

(A) ORF62

(B) ORF68

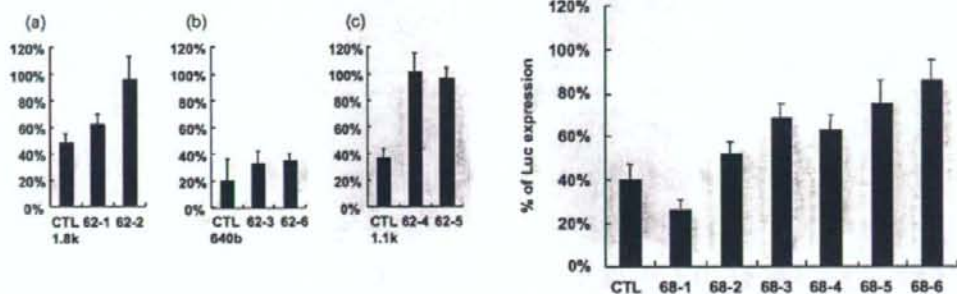
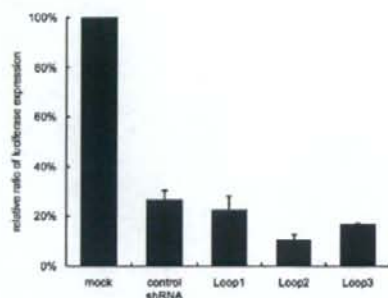


Fig.7 VZV に対する shRNA 標的配列のスクリーニング

標的配列を組み込んだプラスミドによるノックダウン効率を、A549 細胞を用いてスクリーニングした。(A)は ORF62、(B)は ORF68 に対する検討である。(A)の ORF62 は全長が 2kb を超えているので、(a) 1.8kb、(b) 640b、(c) 1.1kb の 3 つに分割した領域において検討した。各標的領域に対して shRNA カセットのないプラスミド(pHM5-ihU6-2)を co-transfection した Luciferase (Luc)の値を 100%とした計算値を示した。

(A) ORF62



(B) ORF68

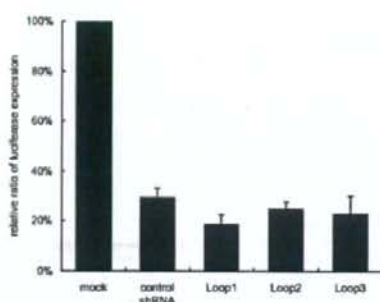


Fig.8. shRNA のループ配列の検討

A549 細胞を用いて 3 種類のループ配列の検討を行った。各 Loop 間に有意な差は観察されなかった。

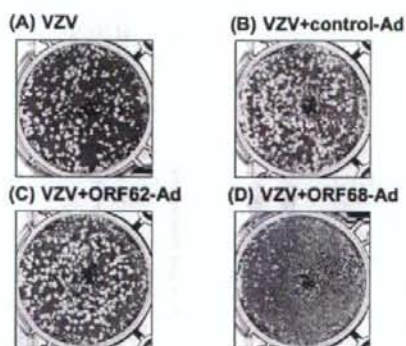


Fig.9 VZV プラーク形成に対する shRNA-Ad ベクターの抑制効果

shRNA-Ad ベクターを 300 VP/cell で作用させた MeWo 細胞に VZV を 50 pfu/well となるように作用させ、プラーク形成能を比較した。(A) VZV のみ、(B)VZV+control Ad ベクター、(C)VZV+ORF62-Ad、(D)VZV+ORF68-Ad. VZV 感染 7 日目にクリスタルバイオレット染色を行った。

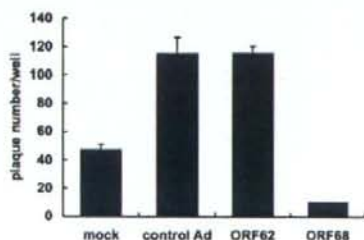


Fig.10 Image-J を用いたプラーク数の比較

Fig.9 において、画像解析にてプラーク数を測定した。プラーク形成数には有意な差が見られた。

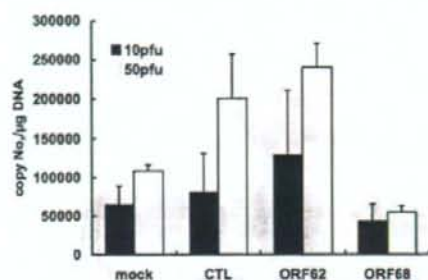


Fig.11 Taqman Real time PCRによるVZV粒子数の測定

shRNA-Adベクター処理後のVZVゲノム量を測定した。MeWo細胞にshRNA-Adベクター 300 VP/cell, VZV 50 pfu/wellで処理を行った。ORF62-Ad処理群をORF62、ORF68-Ad処理群をORF68と示した。



1. VZV (10pfu)
2. VZV 10pfu+AdHIM4-inU6-Lu5 (control)
3. VZV 10pfu+AdHIM4-inU6-VZVORF62-3T1
4. VZV 10pfu+AdHIM4-inU6-VZVORF68-1T1
5. VZV (50pfu)
6. VZV 50pfu+AdHIM4-inU6-Lu5 (control)
7. VZV 50pfu+AdHIM4-inU6-VZVORF62-3T1
8. VZV 50pfu+AdHIM4-inU6-VZVORF68-1T1

All Ad vectors are transduced to MeWo cells in 300VP/cell

Fig.12 RT-PCRによるターゲット遺伝子の発現解析

shRNA-Adベクター感染後、10pfu/well及び50 pfu/wellでVZVを48 hr作用させたのち、ORF62とORF68に対するRT-PCRを実施した。

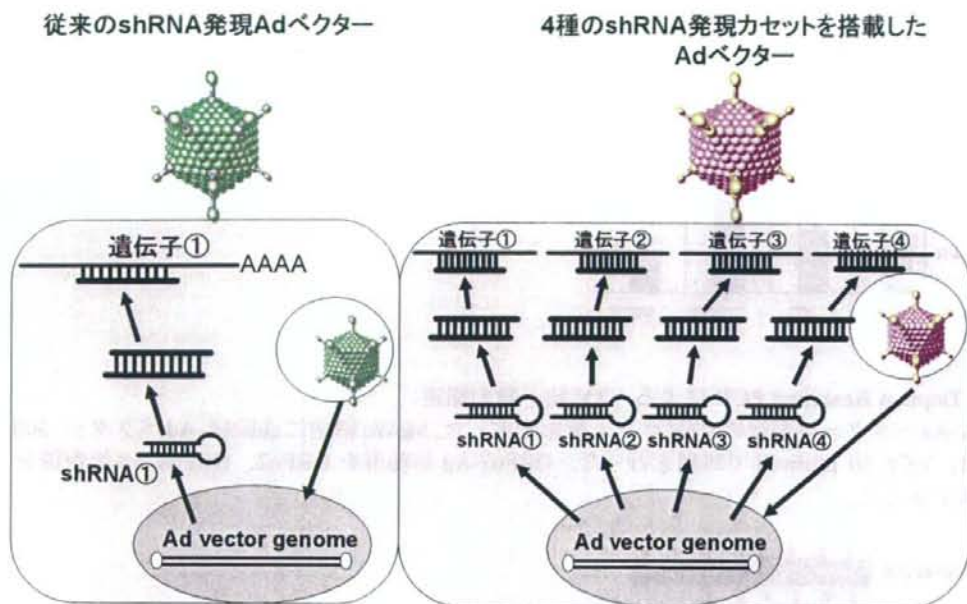


Fig.13 Efficient knock-down of target genes by Ad vectors carrying four different shRNA expression cassettes.

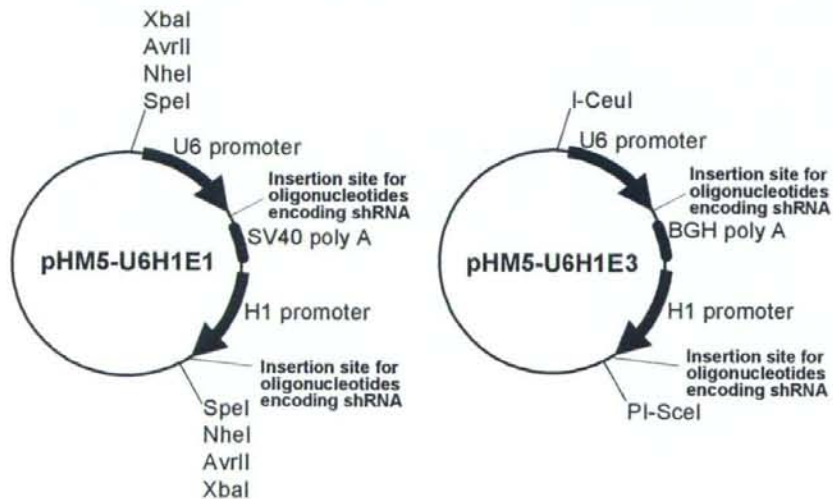


Fig.14 Shuttle vectors carrying shRNA-expression cassettes.

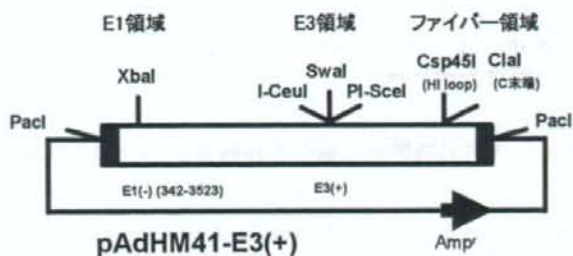


Fig.15 A vector vectors pAdHM41-E3(+)

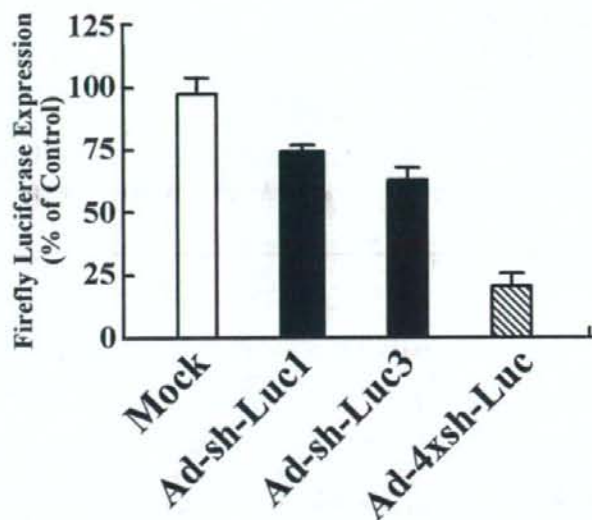


Fig. 16 Knockdown efficiencies in A549 cells stably expressing firefly luciferase after transduction with Ad vectors expressing shRNA against firefly luciferase. A549-Luc cells were transduced with the Ad vectors at 300 VP/cell for 1.5 hr. After a 72 hr-incubation, luciferase activities were determined by chemiluminescence assay.

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

人工リンパ組織による免疫不全マウスへの効果的な適応免疫機能導入に関する研究

研究分担者 末松 佐知子 独立行政法人医薬基盤研究所・免疫細胞制御プロジェクト
プロジェクトリーダー

研究要旨： ウイルス感染の治癒にはウイルス感染細胞に特異的なリンパ球による適応免疫機能が重要な役割を果たす。我々の開発した人工リンパ組織には適応免疫反応の誘導に重要な役割を果たす細胞が集積して免疫機能を発揮することが分かっており、免疫不全状態におけるウイルス感染症に対する治療あるいは予防効果が期待されていた。

今回、本研究課題の研究結果により人工リンパ組織は抗原と免疫細胞の出会いの場として免疫不全個体に効果的な細胞性免疫も導入可能であることが証明されたことから人工リンパ組織によって免疫不全個体の適応免疫機能を賦活化する新しい免疫細胞療法につながるものと考えている。ただし、実際に難治性のウイルス感染症の治療や予防に応用するには、人工リンパ組織の構築方法をどこまで単純化できるかということが課題である。また、人工リンパ組織構築に現時点で最も適したストローマ細胞株を選択できたので、このストローマ細胞株の発現分子を解析し、人工リンパ組織構築の本質を明らかにする基礎研究も重要となる。今後はヒトリンパ球からなる「ヒト人工リンパ組織」の構築を行い、臨床応用可能な治療方法の開発を検討する予定である。

A. 研究目的

悪性腫瘍や臓器移植を受けた患者においては原疾患とそれに対する治療の両者によって適応免疫（抗原特異的リンパ球による免疫反応）機能が抑制状態にあることが多く、しばしばウイルス感染症を含む難治性の感染症が問題となる。本研究では組織工学的にリンパ節や脾臓などの二次リンパ組織の機能を果たす「人工リンパ組織 artificial lymphoid tissue (aLT)」を構築して、免疫担当細胞が抗原を効率的に認識する場を提供して免疫不全状態においても適応免疫機能を賦活することを可能にし、ウイルス感染症の予防や治療に応用することを目的とする。

B. 研究方法

1. 人工リンパ組織の構築方法について

BALB/c マウス由来のストローマ細胞株と抗原で刺激した骨髄由来樹状細胞

(BMDC)をコラーゲンスポンジに添加して同系マウスの腎皮膜下に移植すると、コラーゲンスポンジの周囲にリンパ球が集積し、やがてT、Bリンパ球の集団が区域に分かれて移植後3週間以内に二次リンパ組織のB細胞領域(濾胞)やT細胞領域のような組織構造が構築される。この組織は樹状細胞(DC)や形質細胞、濾胞樹状細胞ネットワークや胚中心など、適応免疫機能を発揮するために重要な細胞や組織構造を有し、免疫組織としての基本構造を備えている。

2. 人工リンパ組織構築に適したストローマ細胞の選択

これまでの研究結果から人工リンパ組織の構築、すなわちリンパ球の集積にはストローマ細胞の重要性が示唆されたため、より優れた適応免疫機能を発揮する人工リンパ組織を構築するためのストローマ細胞を選択してその本質を解明することを目指し

て種々のストローマ細胞（初代培養ストローマ細胞と複数のリンパ組織由来ストローマ細胞株）を用いて人工リンパ組織を構築し、リンパ球の集積とT細胞、B細胞領域の形成を指標として、人工リンパ組織構築に適したストローマ細胞株を選択した。

3. 人工リンパ組織の組織構造解析

二次リンパ組織の特殊な構造が効率のよい適応免疫機能に重要であることが変異マウスを用いた実験により明らかになっているため、人工リンパ組織の組織構造を免疫組織学的解析によって① T細胞、B細胞領域の形成、② 濾胞樹状細胞ネットワークの形成、及び③ 免疫細胞や抗原の経路となる脈管系に関して詳しく調べた。

4. 人工リンパ組織による免疫不全マウスへのT細胞免疫機能導入の検討

ウイルス感染症の治癒にはウイルス抗原特異的抗体による液性免疫と共に細胞性免疫が重要である。

人工リンパ組織によって免疫不全マウスに抗原特異的なT細胞免疫（細胞性免疫）機能を導入できるか否かを調べるために既知の抗原を発現させたBALB/cマウス由来血球系細胞株（flex細胞と略称する）を樹立し、flex細胞に対する人工リンパ組織の細胞免疫機能を評価した。

BALB/cマウスの腹腔内にflex細胞のlysate（溶解物）とalumの混合物を投与して一次免疫しておく。この2-3週間後にストローマ細胞とflex細胞lysateで刺激したBMDCをコラーゲンスポンジに吸着させて腎皮膜下に移植し人工リンパ組織を構築する（flex-aLT）。このflex-aLTを免疫不全マウスに移植して、免疫不全マウスがflex細胞に対する細胞性免疫を獲得するかどうかを検討した。免疫不全マウスとしてT細胞免疫不全であるヌードマウスとT、B細胞両方に機能不全がある重症複合性免疫不全（SCID）マウスを用いた。

C. 研究結果

1. 人工リンパ組織構築に適したストローマ細胞。

種々のストローマ細胞（骨髄由来初代培

養ストローマ細胞と複数のリンパ組織由来ストローマ細胞株）とBMDCをコラーゲンスポンジに添加、吸着させて同系マウスの腎皮膜下に移植し、3週間後に形成される組織を回収して組織学的に解析した。その結果、抗原刺激したBMDCと共にコラーゲンスポンジに吸着させて組み込んだ場合に最も効率よくリンパ球が遊走してT細胞、B細胞領域を形成するのはBALB/cマウス胸腺由来のストローマ細胞株（TEL-2）であることがわかった。このため、現在は専らTEL-2細胞にマウスlymphotoxin α (LT α)cDNAを導入発現させたTEL-2-LT α ストローマ細胞株を人工リンパ組織構築に用いている。

2. 人工リンパ組織の組織構造解析

前述したように種々のストローマ細胞と抗原刺激したBMDCを共にコラーゲンスポンジに吸着させて同系マウスの腎皮膜下に移植して構築される組織の構造を免疫組織学的に詳しく解析した結果、BALB/cマウス胸腺由来のTEL-2-LT α ストローマ細胞株とBMDCの組み合わせにより形成される組織の場合に集積するリンパ球数が最も多いことが分かった。また、大きなB細胞集団（B細胞領域）がT細胞集団（T細胞領域）を取り囲むように存在する特徴的な組織構造を示した。これらの細胞（TEL-2-LT α とBMDC）の組み合わせによって組織工学的に形成される組織のことを人工リンパ組織（aLT）と呼ぶ。aLTのB細胞領域の中心部には濾胞樹状細胞（濾胞樹状細胞マーカー CR1陽性細胞）からなるネットワーク構造形成がしばしば観察されることが明らかになった。濾胞樹状細胞の由来や機能については今のところ諸説あり不明な点も多いが、抗原、抗体や補体などからなる免疫複合体を細胞表面に長期間保持することからB細胞への抗原刺激、免疫記憶、長期に渡る抗体産生などに関与しているのではないかと考えられている。

またaLTが機能的なリンパ管を有すること、またaLTへのリンパ球の遊走に深く関与していると考えられる特殊な血管構造が存在することが分かった。

3. 人工リンパ組織による免疫不全マウスへのT細胞免疫機能の導入

flex細胞lysateとalumの混合物を腹腔内投与して予め一次免疫しておいた正常BALB/cマウスを準備した。このマウスを二群に分けて、第一群にはflex細胞lysateで刺激したBMDC(flex-BMDC)とTEL-2-LT α ストローマ細胞をコラーゲンスポンジに滴下して腎皮膜下に移植し、flex細胞を認識する免疫細胞を集積させて「flex細胞特異的人工リンパ組織(flex-aLT)」を構築した。第二群のマウスにはflex-BMDCを 10^6 個投与した。3週間後に第一群のマウスからflex-aLTを回収してSCIDマウスの腎皮膜下に移植した(aLT-SCID)。もう一群のマウスからは脾臓細胞を調整し、SCIDマウス一匹あたり 4×10^7 個の脾臓細胞を静脈内投与した(spleen-SCID)。未治療対象群としてはSCIDマウスにコラーゲンスポンジのみを腎皮膜下に移植した(sponge-SCID)。

aLT, spleen-, および sponge-SCIDにflex細胞を一匹当たり 4×10^6 個ずつ皮内投与し、皮内に形成される腫瘍の大きさを定期的に計測することによりflex細胞の増殖抑制を検討した(一群あたりのSCIDマウスの数は5-7匹、実験デザイン毎に実験回数3回以上)。sponge-SCIDでは3週間後にはすべてのマウスでflex細胞による腫瘍の大きさが 1 cm^3 を超えた。一方、spleen-SCIDでは3週間後の腫瘍の大きさはsponge-SCIDの腫瘍に比較して $1/3 \sim 1/2$ 以下であった。aLT-SCIDではさらにflex細胞の増殖が遅く、一旦腫瘍ができたマウスでも最終的にflex細胞が完全に排除されたマウスが半数程度存在した。追加の治療としてspleen-SCIDにflex-BMDCを1週おきに 10^6 個ずつ3回皮下投与した場合にはaLT-SCIDと同程度の細胞増殖抑制効果が見られた。ヌードマウスをレシビエントマウスとした場合にもflex-aLTによるflex細胞増殖抑制効果は同様に観察された。

4. aLT-SCID 脾臓細胞内には flex 細胞に

対する細胞傷害活性を示す細胞とIFN- γ 産生する細胞が多数存在する。

flex細胞を皮内投与したaLT-SCIDから調整した脾臓細胞をエフェクター細胞、flex細胞をターゲット細胞として試験管内で細胞傷害活性を検討したところ、aLT-SCIDの脾臓細胞はflex細胞に対して細胞傷害活性を示した。また、ELISPOT法によりaLT-SCIDの脾臓細胞中にはIFN- γ 産生細胞が多数存在する事がわかった。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験は医薬基盤研究所動物実験指針に基づいた研究計画に従って行われた。

D. 考察

抗原刺激した活性化BMDCと組み合わせた場合に最も効率よくリンパ球の集積を誘導するストローマ細胞株がTEL-2-LT α ストローマ細胞株であったことから人工リンパ組織構築の発端となるリンパ球の集積にはストローマ細胞が重要な役割を果たしていることが再確認された。実際に人工リンパ組織をウイルス感染症の治療や予防に応用するためには、人工リンパ組織の構築方法をできるだけ単純化することが必要であり、TEL-2-LT α ストローマ細胞の発現分子を明らかにすることは今後、適応免疫を活性化する新しい免疫細胞療法を開発する上で重要な課題であると考えられる。

一方、人工リンパ組織による免疫不全個体への効率的な適応免疫機能の導入は今回の研究により証明できたと考えている。その根拠の一つとして人工リンパ組織内に存在するリンパ球の数は比較的少なく、flex-aLTの導入により一匹のSCIDマウスに移入されるリンパ球の数は多くとも 10^6 個以内であることが分かっており、このようにflex-aLTの移植によって移入されるリンパ球が少数であるにも関わらず、flex細胞で一次免疫し、さらにflex-BMDCを投与したBALB/cマウスの脾臓細胞を 4×10^7 個導入した場合に比較してflex細胞に対して強い細胞増殖抑制効果(細胞障害活

性)を示すことが明らかになったからである。このことは人工リンパ組織の構築方法とその免疫組織としての特殊な組織構造によって(1)flex 細胞を認識する免疫細胞(メモリー細胞)が人工リンパ組織の中に選択的に集積している、あるいは(2)IFN- γ 以外にも免疫機能を活性化させるサイトカイン産生細胞が人工リンパ組織内に多数存在する可能性が考えられる。

E. 結論

免疫不全個体では様々な理由で適応免疫機能が抑制されており、ウイルスに対するワクチン投与は必ずしも効果的ではない。このような場合には、抗ウイルス剤の投与が第一選択となる有効な治療方法であるが薬剤耐性ウイルスの出現や副反応等の問題も考慮しておく必要がある。今回の我々の研究結果から、人工リンパ組織構築を応用すれば優れた免疫機能をもつ免疫細胞(メモリー細胞を含む)の濃縮、あるいは免疫細胞を刺激して、免疫不全状態でのウイルス感染症予防あるいは治療につながる可能性が示唆された。悪性腫瘍や臓器移植などの原因があつて一時的に適応免疫機能が低下しているような場合には、特に人工リンパ組織は適応免疫機能を賦活する環境を体内に新たに構築する新しい免疫細胞療法につながる事が期待される。

F. 健康危険情報 (該当せず)

G. 研究発表

1. 論文発表

末松 佐知子, 人工リンパ組織構築とは何

か. Organ Biology 15(1) 23-32, 2008

2. 学会発表

1. 服部 祐紀, 末松 佐知子
腫瘍特異的人工リンパ組織による抗腫瘍効果. 第8回再生医療学会総会 東京 2009年3月

2. SUEMATSU Sachiko, HATTORI Yuki.
Characteristic vascular system induction is important for artificial lymphoid tissue construction and its immune function. 第38回日本免疫学会総会 学術集会 京都 2008年12月

3. 末松 佐知子
「ストローマ細胞を用いたマウス人工リンパ組織の構築」日本組織培養学会第80回大会 大阪 2007年5月

4. 末松 佐知子
「ストローマ細胞を用いたマウス人工リンパ組織の構築」第34回臓器保存生物医学会 シンポジウム5「遺伝子工学と組織再生」札幌 2007年11月

5. HATTORI Yuki and SUEMATSU Saclike.
Functional Lymphatic Vessel Formation in Tissue-Engineered Secondary Lymphoid Tissue-Like Organoids in Mice.
第37回日本免疫学会総会 学術集会 東京 2007年11月

6. HATTORI Yuki, WATANABE Takeshi, SUEMATSU Sachiko. Vascular Structure of Tissue-Engineered Secondary Lymphoid Tissue-like Organoid in mice.
第36回日本免疫学会総会 学術集会 大阪 2006年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

研究要旨：水痘帯状疱疹ワクチン接種の必要性の根拠となる疾患別帯状疱疹発症頻度、発症リスクを検討した。

A. 研究目的

帯状疱疹発症のリスクが高い疾患を知り、安全に効率良く予防ができる疾患別帯状疱疹発症頻度、発症リスクを検討する。

B. 研究方法

2001年9月-2007年12月に北野病院を受診された入院、外来患者59,294名の患者記録を基に、19基礎疾患別帯状疱疹発症リスクを検討した。観察期間内に1対象基礎疾患発症後に帯状疱疹を発症した患者における、対象以外の18疾患を有する患者の帯状疱疹発症率を比較して疾患別の帯状疱疹発症リスクをコックス比例ハザードモデルにより解析した。（倫理面への配慮）後方視的研究のため不要。

C. 研究結果

うつ病、シェーグレン症候群、白内障、HIV感染症には帯状疱疹発症率においてリスク上昇はなかった。脳腫瘍、肺癌、乳癌、胃癌、直腸癌、婦人科癌、悪性リンパ種、SLE、RA、シェーグレン症候群、糖尿病、高血圧、腎不全、骨折、椎間板ヘルニアを有する患者においては帯状疱疹発症率のリスクは、他の18基

礎疾患を有する患者の帯状疱疹発症率より上昇した。

D. 考察

従来より免疫機能異常があるとされる基礎疾患の他に、帯状疱疹発症のリスクとなる疾患の存在する可能性が示唆された。

E. 結論

悪性腫瘍、自己免疫疾患、腎不全の他、糖尿病と高血圧患者は帯状疱疹発症のリスクが高かった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Risk of herpes zoster in patients with underlying chronic diseases (submitting to Journal of Infection 2009)

2. 学会発表

1) Hata, A., Matsuda, M., Ohkusa, Y.

History of certain diseases poses higher risk for herpes zoster: a hospital-based study. 33rd International Herpesvirus Workshop, July 27- August 1, 2008, Estoril, Portugal.

2) 羽田敦子、菅原民枝、大日康史 帯状疱疹発症における基礎疾患のリスク 第 12 回

日本ワクチン学会学術集会 2008 年 11 月
8-9 日 熊本県熊本市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）特異的細胞性免疫応答を用いた
帯状疱疹発症高リスク者の検出方法の検討

分担研究者 森 康子：神戸大学大学院医学研究科・教授、医薬基盤研究所感染制御プロジェクト・チーフプロジェクトリーダー（併任）

協力研究者

岡本成史（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・サブプロジェクトリーダー）

定岡 恵、松浦正明（医薬基盤研究所・感染制御プロジェクト・研究員）

羽田敦子（財団法人田附興風会医学研究所・第1研究部・主任研究員）

吉川哲史（藤田保健衛生大学医学部小児科・准教授）

浅野喜造（藤田保健衛生大学医学部小児科・教授）

研究要旨：帯状疱疹の発症には、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）反応性ヘルパー1型T細胞による細胞性免疫応答の抑制との関連が指摘されている。そこで、我々は、細胞性免疫応答の測定方法としてIFN- γ ELISPOT試験および水痘抗原皮内反応試験を用いた帯状疱疹発症の高リスク者の検出の可能性について検討を行った。まず、IFN- γ ELISPOT試験および水痘抗原皮内反応試験の各試験結果間の相関性の有無について比較検討したところ、両試験結果の間に正の相関性が認められた。次に健常人と比べて帯状疱疹の発症率が高いとされる糖尿病患者において、健常人と比較した場合のIFN- γ ELISPOT試験を用いた細胞性免疫応答の比較検討を行ったところ、糖尿病患者の細胞性免疫応答が健常人のそれと比べて有意に低下していることを明らかにした。以上の結果は、IFN- γ ELISPOT試験と水痘抗原皮内反応試験が帯状疱疹の高リスク者検出のためのVZV特異的な細胞性免疫応答を測定し得る可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

帯状疱疹の発症には、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）反応性ヘルパー1型T細胞による細胞性免疫応答の抑制との関連が指摘されている。そこで、本研究では帯状疱疹発症とVZV

特異的な細胞性免疫応答の低下との間の相関性を明らかにするとともに、将来的にVZVに対する細胞性免疫応答の測定による帯状疱疹発症の高リスク者の検出方法の確立を目指す。