

図6 ターゲティング能を有したアデノウイルスベクター

ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターの開発のためには、①ファイバーノブとCARとの結合を介した感染ルート、②低親和性であるがペントンベースのRGDモチーフが α -インテグリンと直接結合することによって起こる感染ルート、③ファイバーシャフト領域がヘパラン硫酸に作用することによって起こる感染ルート、④さらには血液凝固因子依存的な感染ルートを回避し、⑤細胞特異的受容体を介してのみ感染するベクターを開発する必要がある。細胞特異的受容体を認識するターゲティング分子は、ファイバーやヘキシソ (アデノウイルスの主要カプシドタンパク質)、protein IX (ヘキシソとヘキシソの間に存在するタンパク質) 等に付与できる。

ノウイルスベクターの開発が可能になると考えられる。

アデノウイルスベクターの感染域や体内動態を改変するアプローチとしては、ポリエチレングリコール等の高分子でベクター表面を化学的に修飾する方法も活発に研究がなされている¹⁹⁾。また著者らは最近、micro RNAによる遺伝子発現制御機構をアデノウイルスベクターに付与することで、組織特異的に遺伝子発現を制御できるベクター系も開発済みである²⁰⁾。

12.7 おわりに

遺伝子を動物細胞に導入するためのキャリアとしては、自然界で巧妙な仕組みで自身の遺伝子を細胞に導入しているウイルスを利用することが効率面を考えると最適である。しかしながら、ウイルスをキャリアとする場合には、そのウイルス自身が持つ特性のために、適用範囲が限られたり、副作用の原因となることがある。本稿で述べたように、分子生物学、分子ウイルス学の技術を駆使することで、これらの課題点も克服可能になりつつあり、さらには新たな機能を付与して有効性を高めることも可能になっている。このようにして開発された新しいウイルスキャリア (ベクター) は、遺伝子治療への応用だけでなく、今や遺伝子機能解析等を目的とした基礎研究のためのツールとしても必須の基盤技術となっており、改良型ウイルスベクターが生命科学研究

の一層の発展のために貢献することが期待される。

文 献

- 1) H. Sakurai *et al.*, *J. Cont. Rel.*, **117**, 430-437 (2007)
- 2) H. Mizuguchi *et al.*, *Adv. Drug. Deli. Rev.*, **52**, 165-176 (2001)
- 3) H. Mizuguchi *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **9**, 2577-2583 (1998)
- 4) H. Mizuguchi *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **10**, 2013-2017 (1999)
- 5) D.J. Palmer *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **16**, 1-16 (2005)
- 6) D. Palmer *et al.*, *Mol. Ther.*, **8**, 846-52 (2003)
- 7) H. Mizuguchi *et al.*, *Gene Ther.*, **8**, 730-735 (2001)
- 8) N. Koizumi *et al.*, *J. Gene Med.*, **5**, 267-276 (2001)
- 9) S. Kurachi *et al.*, *Gene Ther.*, **14**, 1160-1165 (2007)
- 10) F. Sakurai *et al.*, *Gene Ther.*, **10**, 1041-1048 (2003)
- 11) F. Sakurai *et al.*, *Curr. Gene Ther.*, **7**, 229-238 (2007)
- 12) K. Kawabata *et al.*, *Mol. Pharmaceu.*, **3**, 95-103 (2006)
- 13) H. Mizuguchi *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **15**, 1022-1033 (2004)
- 14) D.M. Shayakhmetov *et al.*, *J. Virol.*, **79**, 7478-91 (2005)
- 15) S.N. Waddington *et al.*, *Cell.*, **132**, 397-409 (2008)
- 16) N. Koizumi *et al.*, *J. Virol.*, **77**, 13062-13072 (2003)
- 17) N. Koizumi *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **17**, 264-279 (2006)
- 18) S. Kurachi *et al.*, *Gene Ther.*, **14**, 266-274 (2007)
- 19) Y. Eto *et al.*, *J. Gene Med.*, **7**, 604-612 (2005)
- 20) T. Suzuki *et al.*, *Mol. Ther.*, in press

改良型アデノウイルスベクター 開発の最前線

みずぐちひろゆき
水口裕之^{1,2)}

¹⁾大阪大学大学院薬学研究科 分子生物学分野
²⁾独立行政法人 医基盤研究所 基盤的研究部 遺伝子導入制御プロジェクト
E-mail: mizuguch@phs.osaka-u.ac.jp

Summary

本稿では、遺伝子導入ベクターとして汎用されているアデノウイルスベクターの諸性質や、機能面で優れた改良型アデノウイルスベクターの開発現状について、著者らの研究成果を中心に解説する。遺伝子導入技術の開発は、遺伝子治療への応用だけでなく、遺伝子機能解析等を目的とした基礎研究のための必須の基盤技術となっており、改良型アデノウイルスベクターが生命科学の一層の発展のために貢献することが期待される。なお本稿では、あえて脳科学、神経科学に限局しないで、改良型アデノウイルスベクターの特徴を広く紹介することに主眼をおかせて頂いた。また、アデノウイルスベクター作製に関する技術面での解説は、本誌 2009 年 4 月号で行う予定である。

III 1. アデノウイルスの性質

ヒトアデノウイルスはこれまでに 51 種類の血清型が発見されており、アデノウイルスベクターは、主にヒト 5 型アデノウイルスを基盤としている。ヒトアデノウイルスは、臨床的には小児期に急性気道炎、角結膜炎、膀胱炎等を起こす。

アデノウイルスは、エンベロープを持たず、252 個のカプソメアよりなる正 20 面体構造をしている。そのうち頂点にある突起構造を持った 12 個はペントン（ペントンベースとファイバーからなる）と呼ば

れ、他の 240 個はヘキソンと呼ばれる。ウイルスの細胞内への侵入は、ファイバーがアデノウイルス受容体（coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR)；5 型等の多くのヒトアデノウイルスにおける受容体）に結合し、その後ペントンベースの RGD (Arg-Gly-Asp) モチーフが細胞表面上のインテグリン ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) に結合することによって起こる。エンドソームに達したウイルスは酸性条件下でカプシドタンパク質の構造変化を起こし、エンドソームを破壊して細胞質内に侵入する。細胞質内に導入されたウイルスゲノムの核への移行は効率良く起こり、細胞に感染したウイルスの 50～80% は 60 分以内に核に到達する。

ヒトアデノウイルスは約 36 kb の線状二本鎖 DNA をゲノムとして持ち、その遺伝子構造は初期遺伝子の E1～E4 と、後期遺伝子の L1～L5 に大別される。初期遺伝子は主にウイルス DNA の複製に、後期遺伝子は主に構造タンパク質の合成に関与する。アデノウイルスベクターは、70 以上にも及ぶウイルスタンパク質の合成を誘導する初期遺伝子である E1 領域 (E1 領域は E1A と E1B に分けられ、E1A により全てのアデノウイルスのプロモーターが活性化される) を外来遺伝子に置き換え、E1 タンパク質を恒常的に発現している 293 細胞等で増殖させる。従って、E1 領域を欠損したアデノウイルスベクターは、E1 タンパク質を発現していない通常の細胞では増殖できず、非増殖型ウイルスとなる。

II. アデノウイルスベクターの特徴

アデノウイルスベクターは、①既存のベクターでは最も遺伝子導入効率が良く、②導入遺伝子が宿主染色体への組み込み活性をもたず、染色体外にエピソームとして存在することから、一過性の遺伝子発現を示すこと（細胞増殖に伴い導入遺伝子が希釈されることで、一過性の遺伝子発現を示す。一方、分化した増殖停止期の細胞に対しては、アデノウイルスに対する免疫の問題が克服されれば、数か月以上の長期の遺伝子発現を示す）、③他のウイルスベクターに比べ圧倒的に高いタイター（力価）のベクターが得られること、等のベクターとしての優れた基本的性質を有している。

一方、①CARを発現していない細胞への適用が困難であること、②組織特異性を示さないこと、③免疫反応を伴うこと、④従来のパッケージング細胞である293細胞を用いた場合、低頻度ながら293細胞に組み込まれたE1遺伝子との間で相同組換えが起こり自己

増殖可能なアデノウイルス（replication competent adenovirus: RCA）が出現する可能性がある等の問題点を有し、これらの問題を克服し、機能面で優れた次世代アデノウイルスベクターの開発が、著者らを含め欧米を中心に盛んに行われている。

III. 増殖性ウイルスの出現を抑えた非増殖型アデノウイルスベクター作製システムの開発

現在汎用されているE1欠損型アデノウイルスベクターは、アデノウイルスゲノムの342-3523 bpを欠損しているものが多く、この部分に外来遺伝子（治療用遺伝子）に挿入している。一方、パッケージング細胞である293細胞の染色体にはアデノウイルス・E1遺伝子を含む1-4344 bpがインテグレートされており、アデノウイルスベクターゲノムとの間にE1領域の前後で相同な遺伝子配列（1-342 bp および 3523-4344 bp）が存在するため、相同組換えによりRCAが出現する（図1）。RCAは通常の細胞に感染した場合、増殖し細胞融解を引き起こすことから、副作用を引き起こす危

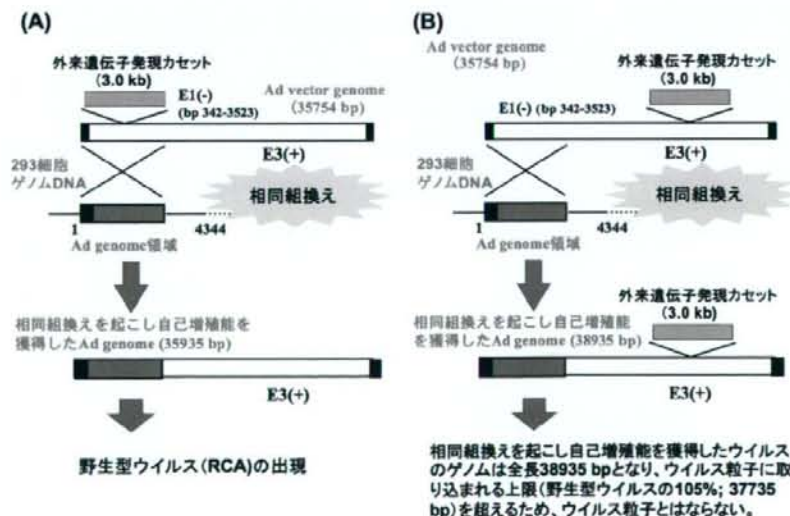


図1 パッケージングリミットを利用したRCA出現回避法の開発

E1欠損領域に外来遺伝子を挿入した従来のアデノウイルスベクター(A)では293細胞にインテグレートされているE1遺伝子との相同組換えによりRCAが出現するが、新しく開発したE1欠損領域以外の部位（ここではE3領域に挿入）に外来遺伝子を挿入したアデノウイルスベクター(B)では、ゲノムサイズを調整することで、E1陽性となったアデノウイルスゲノムはパッケージングリミットを超え、ウイルス粒子とならない。

険性がある。現在、米国FDA (Food and Drug Administration) は遺伝子治療臨床研究で用いるアデノウイルスベクターに含まれるRCAの混入許容値として 3×10^{10} particle titerあたり RCA 1 infectious titer 未満を推奨している。従って、遺伝子治療用のアデノウイルスベクターを調製する際には、RCAの出現・混入を出来る限り抑える必要がある。RCAが理論上出現しない293細胞以外のパッケージング細胞がいくつか報告されているが¹⁾、(使用料が高価であり)一般には普及していない。著者らは最近、アデノウイルスベクターのゲノム配列を改変することで、たとえE1領域で相同組換えを起こしても、アデノウイルスベクターゲノムがパッケージングリミットを超えるように(すなわち、ウイルス粒子とならないように)ベクターを設計することで、RCAの出現を劇的に抑制できるベクター系を開発した(詳細は図1を参照)。本アデノウイルスベクター系を用いれば、RCAの出現頻度が激減するため、安全性の向上やアデノウイルスベクターを製造していく上でのコストの点で、大きな貢献が期待できる。さらに、基礎研究分野でのアデノウイルスベクターの使用に関しても、確実にRCA混入

率が低いベクターストックを調製可能であることから、研究の効率が格段に上がることが予想される。

IV. 標的細胞指向性の制御

1. 遺伝子導入時のCAR依存性を克服したアデノウイルスベクターの開発

前述のようにヒト5型アデノウイルスはCARを受容体として細胞に感染するが、CARの発現が乏しいために従来のアデノウイルスベクターでの効率の良い遺伝子導入が困難な細胞種は意外と多い。例えば、造血幹細胞をはじめとする血液系細胞、樹状細胞、間葉系幹細胞、血管平滑筋細胞、骨格筋細胞、滑膜細胞等が知られている。また、癌細胞は悪性度の進行と共に、CARの発現低下、およびアデノウイルスベクターでの遺伝子導入効率の低下が報告されており²⁾、本ベクターを用いて癌を対象とした遺伝子治療臨床研究を進める上で考慮すべき問題と考えられている。

アデノウイルスベクターによる遺伝子導入時のCAR依存性を克服するために、ファイバータンパク質を改変した改良型ベクターの開発が進んでいる。例

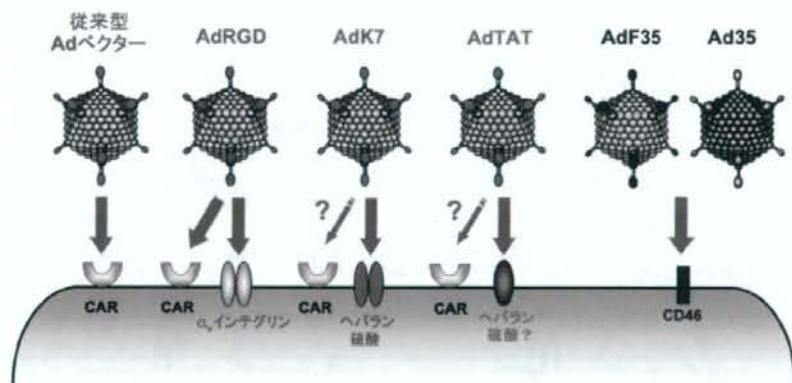


図2 感染域の制御が可能な各種改良型アデノウイルスベクター

野生型のファイバーを持った従来の5型アデノウイルスベクターは細胞表面上のCARを受容体として感染するが、RGD配列やポリリジン配列をファイバーに有したファイバー改変ベクター(AdRGD, AdK7)はCARだけでなく $\alpha_5\beta_1$ インテグリンやヘパラン硫酸を認識しても感染できる。TATペプチドを付与したAdTATは、詳細な細胞内移行メカニズムは不明であるが、CAR非依存的に感染できる。また、35型のアデノウイルスのファイバーを有したベクター(AdF35)や、全ての構造タンパク質が35型アデノウイルスからなるベクター(Ad35)は、CD46を認識して感染する。

例えば、 α_v インテグリンに親和性があるRGDペプチドや、ヘパラン硫酸に親和性があるポリリジンペプチド、受容体は不明であるがHIV (human immunodeficiency virus) 由来のProtein Transduction Domain (PTD: 蛋白質導入ドメイン) として知られているTATペプチドをファイバー表面上に遺伝子工学的に表現させることにより、CARを発現していない細胞に対しても効率良く遺伝子導入できる^{3,5)}(図2)。また、ファイバー部位をCAR以外の分子を認識する他の血清型のアデノウイルスのファイバーに置換することでも遺伝子導入時のCAR依存性を克服することが出来る。例えば、ヒト由来細胞であればほとんど全ての細胞に発現が認められるCD46を受容体としている11・35型アデノウイルス由来のファイバーを付与することで⁶⁾、5型アデノウイルスベクターでの効率の良い遺伝子導入が困難な造血幹細胞、樹状細胞等への効率の良い遺伝子導入が可能になる。

2. ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターの開発

ターゲティング能を有したベクターの開発は、全身

投与での治療効果が期待できるだけでなく、例えば局所にベクターを投与した場合においても、標的細胞以外への感染、拡散を防ぐことが期待できることから、有効性の向上や副作用の抑制につながる。目的の組織でだけ遺伝子を発現させることが可能なアデノウイルスベクターの開発には、①カプシドタンパク質の遺伝子工学的な改変、②抗体やタンパク質、高分子を用いてのベクター表面の修飾、あるいは③組織特異的プロモーターの利用等の方法がある⁷⁾。最終的には、これらの組み合わせが好ましいが、ベクター自身を改変する①が最も基本的で重要な基盤技術になると考えられ、精力的に研究が進められている。

アデノウイルスの*in vivo*への感染は、ファイバーとCARとの結合だけでなく、低親和性であるがファイバーの根本に存在するペントンベースのRGDモチーフやファイバーシャフトのKKTKからなるヘパリン結合ドメインが、 α_v インテグリンやヘパラン硫酸と結合して起こる感染ルートも重要な役割を果たす⁷⁾。さらに、factor X等の血液成分がアデノウイルスと細胞との結合を橋渡しして、受容体非依的に感染する

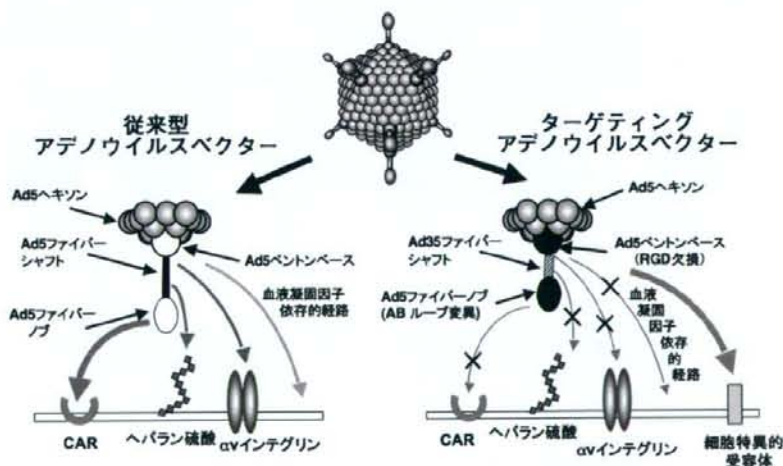


図3 ターゲティング能を有したアデノウイルスベクター

ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターの開発のためには、①ファイバーノブとCARとの結合を介した感染ルート、②低親和性であるがペントンベースのRGDモチーフが α_v インテグリンと直接結合することによって起こる感染ルート、③ファイバーシャフト領域がヘパラン硫酸に作用することによって起こる感染ルート、さらには④血液凝固因子を介した感染ルートを回避したベクターを開発する必要がある。次に、このベクターに標的細胞特異的に結合するリガンド等を付与することで、ターゲティング能を有したアデノウイルスベクターが開発できる。

ルートも報告されている^{8,9}。これらの感染経路を遮断して、標的細胞特異的に結合するリガンド等をウイルス表面タンパク質のファイバーやヘキソン、protein IX 領域（ヘキソンとヘキシソンの間に存在するタンパク質）に付与すれば、ターゲティング能をもったアデノウイルスベクターが開発できる（著者らはこれらの領域に簡便に外来リガンドを挿入する技術も開発済みである¹⁰）。著者らはファイバーノブ、シャフト、ペントンベースの3領域を同時に改変したトリプル改変ベクターを開発し（図3）、このベクターが肝臓をはじめとする *in vivo* での遺伝子発現能をほとんど消失していることを明らかにしている^{11,12}。現在このトリプル改変ベクターに、標的細胞特異的に高親和性を示

すりガンドを付与することでターゲティング能をもったアデノウイルスベクターの開発を進めている。

3. マイクロRNAによる遺伝子発現制御システムを搭載したアデノウイルスベクターの開発

近年、タンパク質をコードしない non-coding RNA であるマイクロRNA (miRNA) とよばれる 21-23 塩基の小さな RNA が発生・分化等の過程に多大な影響を及ぼすことが報告され注目されている。miRNA は細胞特異的に発現し、標的遺伝子のメッセンジャーRNAの3'非翻訳領域に結合することにより、複数 (10 ~ 100 程度の遺伝子) の標的遺伝子の翻訳を厳密に抑制する。最近著者らは、miRNA による遺伝子発現制御システムを利用して、特定の細胞で目的遺伝子の発

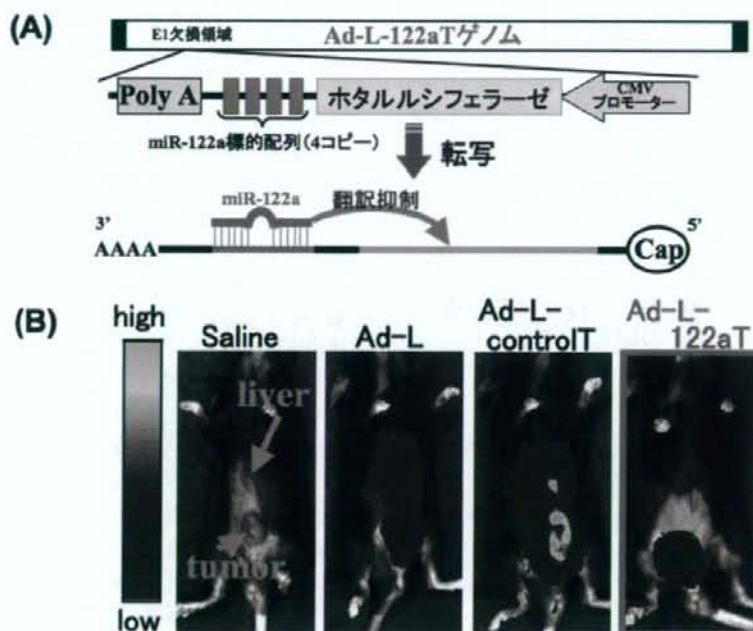


図4 マイクロRNAによる遺伝子発現制御システムを搭載したアデノウイルスベクター

ルシフェラーゼ遺伝子の下流に肝臓特異的な miRNA である miR-199a の標的配列を 4 コピー挿入したアデノウイルスベクター (Ad-L-199aT) (A) は、担癌マウスの腫瘍内に投与した場合、腫瘍特異的な遺伝子発現が認められるが (B) *in vivo* イメージング装置で遺伝子発現を検討) コントロール配列を付与したベクター (Ad-L-controlT) や miRNA の標的配列を付与していない従来のベクター (Ad-L) は、腫瘍のみならず、(腫瘍から漏れ出たベクターが肝臓に移行して) 肝臓での遺伝子発現も認められる。(p8 カラー図参照)

現をオフにするアデノウイルスベクター発現制御系を開発した¹³⁾。

アデノウイルスベクターを全身投与した場合、前述したように肝臓で主に遺伝子発現が認められるが、肝臓特異的な miRNA である miR-199a の認識配列を目的遺伝子の 3' 非翻訳領域に挿入することにより、肝臓での遺伝子発現を 100 分の 1 程度に抑えられることを見いだした¹³⁾ (図 4)。herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) 遺伝子を用いた自殺遺伝子治療においては、ベクターを腫瘍内に投与した場合においても、腫瘍部位から漏れ出たベクターが肝臓をはじめとする正常組織に移行し、組織障害を起こすことが問題となっているが、HSVtk 遺伝子の 3' 非翻訳領域に miR-199a の認識配列を付与した場合、高い抗腫瘍効果を維持したまま肝障害を劇的に軽減させることが可能であった¹³⁾。目的組織での選択的な遺伝子発現を得るためには、組織特異的なプロモーターが汎用されるが (一般的に組織特異的なプロモーターは転写活性が低いことが課題となっている)、miRNA による遺伝子発現制御システムは特定の組織・細胞でのみ遺伝子発現をオフにする新しい遺伝子発現制御法であり、遺伝子治療への応用だけでなく、基礎研究分野においても強力な技術になると期待される。

III V. 免疫反応の抑制が可能なアデノウイルスベクターの開発

アデノウイルスベクターを生体に投与した場合、①数時間以内に生じる自然免疫、②7～10 日以内に生じるベクターにより産生されたウイルスタンパク質 (および外来遺伝子産物) に対する細胞性免疫、そして、③ウイルスタンパク質に対する液性免疫の 3 種類の免疫反応が起こる。これらの免疫反応を克服できるベクターや投与方法 (投与戦略) の開発は、安全性や有効性の高い遺伝子治療の実現にとって必要不可欠である。

ウイルスを始めとする異物を生体に投与すると、生体は即座にインターフェロンやサイトカイン、ケモカイン等を産生し、それらの異物を排除しようとする自然免疫が発動する。アデノウイルスベクターを生体に投与した場合にも自然免疫の活性化は生じ、1999

年に米国で起こったオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対するアデノウイルスベクターを用いた死亡事故では、自然免疫の過剰な活性化が原因と考えられている。アデノウイルスベクターをマウスに全身投与した場合には、IL-6、IL-12 等の産生が投与 3 時間以内に生じる。全身投与されたベクターの 90% 以上は肝臓 (実質細胞とクッパー細胞をはじめとする非実質細胞) に移行するが、多くの炎症性サイトカインは肝臓 (のクッパー細胞) ではなく、主に脾臓で分泌される^{14,15)}。興味深いことに、前述したポリリジンでファイバーを修飾したアデノウイルスベクターでは、脾臓への移行性が減少する結果、血中へ分泌される IL-6 は約 1/4 にまで減少し (肝臓をはじめとする各臓器での遺伝子発現は従来型ベクターと同等以上に起こる)¹⁴⁾、安全性が高いことが明らかとなった。アデノウイルスベクター投与に伴う自然免疫に関与する生体側因子やウイルス側因子、シグナル伝達機構の解明は、自然免疫応答の克服に向けて重要な研究課題であり、著者らのグループでは、各種改変アデノウイルスベクターやノックアウトマウス、RNAi 技術、マイクロアレイ解析を通して、これらの研究を進めている。

一方、アデノウイルスベクター投与後の細胞性免疫の活性化については、従来のアデノウイルスベクターは E1 領域を除去することで、ウイルスタンパク質の産生が生じないように設計されているが、E1 非依存的に他のウイルスタンパク質の合成がわずかながら起こり、これが免疫系のターゲットとなることが原因と考えられている。この問題を克服するために、ウイルスコード遺伝子を全て除去した gutted アデノウイルスベクターが開発されており、本ベクターを用いた場合は、通常のマウスにおいても長期間の遺伝子発現が認められる¹⁶⁾。従来は、高タイターの gutted アデノウイルスベクターの産生が技術的に難しいのが課題点であったが、最近ヘルパーウイルスとパッケージング細胞の改良により、その問題点は一部克服されつつある¹⁷⁾。

液性免疫の制御に関しては、主要カプシドタンパク質のヘキソンに対する抗体が液性免疫の主体であることから、ヘキソン改変ベクターが、この問題を克服するために開発されている¹⁸⁾。また、異なった血清型

(11型や35型)^{19,20}や異なった種(チンパンジー、イヌ、ヒツジ、トリ、ウシ、マウス等)に属するアデノウイルスベクターが開発されており、これらのベクターでは、抗ヒト5型アデノウイルス抗体存在下でも遺伝子導入活性を示す。これらのベクターの中には、CAR以外の受容体を認識して感染するものもあり、感染域を変えることも同時に可能になる。

VI. その他のアプローチによるアデノウイルスベクターの高機能化

従来のアデノウイルスベクターではE1欠損領域の1カ所にしか外来遺伝子を挿入できなかったが、著者らはE1欠損領域に加え、E3(欠損)領域、並びにE4遺伝子と3'ITR(inverted terminal repeat)の間の領域にも同時に外来遺伝子を挿入することが可能なダブル・トリプル遺伝子発現系を搭載したアデノウイルス

ベクターを開発した^{21,22}(図5)。これにより、複数の外来遺伝子を単一のアデノウイルスベクターに搭載することが可能となり、複数のベクターの共投与の場合と異なり、作用させるベクター量も最小限で済ませることができるようになった。これらのベクターの応用例として、テトラサイクリン耐性オペロンを利用した遺伝子発現制御系を単一のベクターに搭載させたシステムを開発し、目的遺伝子の発現を、正あるいは負に自在に制御することが可能となった^{21,22}(図5A)。さらに、E3欠損領域にGFP(green fluorescence protein)発現単位を挿入し、E1欠損領域に目的遺伝子発現単位を挿入することで、遺伝子導入された細胞をGFPで視覚的に同定しながら目的遺伝子の機能を検討する実験系への利用等が可能となった²³(図5B)。

一方、短鎖の二本鎖RNA(small interfering RNA: siRNA)発現カセットをアデノウイルスベクターに搭

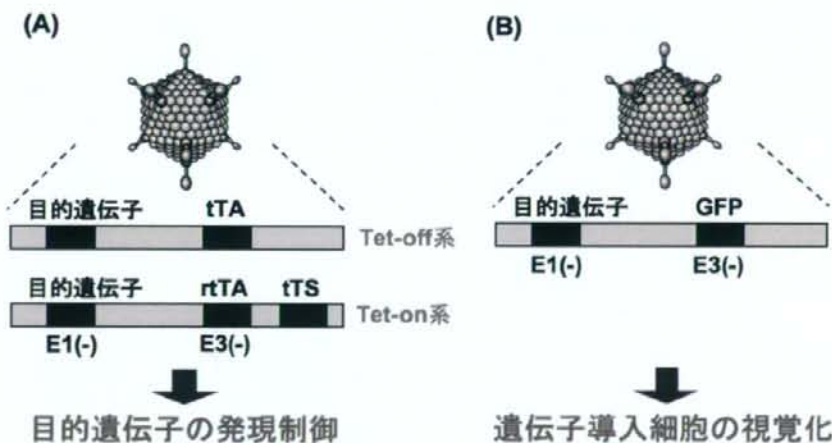


図5 複数の外来遺伝子の搭載が可能なアデノウイルスベクター

- (A) E3欠損領域に tet-off 系の転写活性化因子 tTA を発現するカセットを有し、E1欠損領域にテトラサイクリン誘導性プロモーター下に目的遺伝子を発現するカセットを有したアデノウイルスベクター、あるいは E3欠損領域に tet-on 系の転写活性化因子 rtTA を発現するカセットを、E4 領域と 3'ITR 領域の間にテトラサイクリン制御性サイレンサーの tTS を発現するカセットを挿入し、E1欠損領域にテトラサイクリン誘導性プロモーター下に目的遺伝子を発現するカセットを挿入したアデノウイルスベクターでは、ドキシサイクリン(テトラサイクリンの誘導体)濃度に依存した目的遺伝子の発現制御が可能になる。
- (B) E3欠損領域に GFP を発現するカセットを有し、E1欠損領域に目的遺伝子を発現するカセットを有したアデノウイルスベクターでは、遺伝子導入された細胞を視覚化することが可能になる。いずれのベクターにおいても、ユーザーは E1欠損領域に挿入する遺伝子だけを入れ替えれば使用できる。

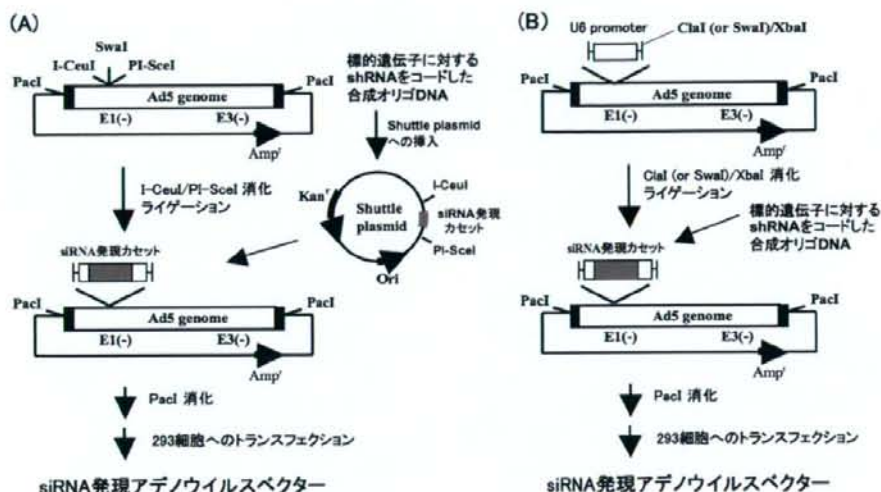


図6 ベクタープラスミドへの直接クローニングによる迅速な siRNA 発現アデノウイルスベクター作製法
従来の *in vitro* ライゲーションに基づくベクター作製法 (A) では、目的遺伝子の siRNA 配列に相当する合成オリゴ DNA をまずシャトルプラスミドに挿入し、次にベクタープラスミドに組み換える必要があるが、直接クローニングによるベクター作製法 (B) では、目的遺伝子の siRNA 配列に相当する合成オリゴ DNA を直接ベクタープラスミドに挿入でき、極めて簡便である。

載させれば、目的遺伝子の発現を特異的にノックダウン可能になるが、著者らは siRNA 発現アデノウイルスベクターの作製法を飛躍的に簡便化することにも成功した²⁴⁾(詳細は図6を参照)。新しい方法では、siRNA 配列に相当する合成オリゴ DNA をアデノウイルスベクタープラスミドにライゲーションし、これを293細胞にトランスフェクションするだけで目的のベクター作製が可能となり、極めて有用である。

III おわりに

本稿で紹介したように、遺伝子治療への応用を通して発展してきたアデノウイルスベクターの改良研究は、ベクター作製の簡便化や高機能化により生命科学を進めていく上での必須の基盤技術になっている。著者らが開発した新しい遺伝子導入技術が、広く生命科学に利用されることを期待している。

参考文献

- 1) Fallaux FJ, et al: New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9: 1909-1917, 1998.
- 2) Okegawa T, et al: The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res* 61: 6592-6600, 2001.
- 3) Mizuguchi H, et al: A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther* 8: 730-735, 2001.
- 4) Koizumi N, et al: Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J Gene Med* 5: 267-276, 2003.
- 5) Kurachi S, et al: Fiber-modified adenovirus vectors containing the TAT peptide derived from human immunodeficiency virus in the fiber knob have efficient gene transfer activity. *Gene Ther* 14: 1160-1165, 2007.
- 6) Mizuguchi H, Hayakawa T: Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes.

- Gene 285 : 69-77, 2002.
- 7) Mizuguchi H, Hayakawa T : Targeted adenovirus vectors. Hum. Gene Ther 15 : 1022-1033, 2004.
 - 8) Shayakhmetov DM, et al : Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. J Virol 79 : 7478-7491, 2005.
 - 9) Waddington SN, et al : Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. Cell 132 : 397-409, 2008.
 - 10) Kurachi S, et al : Characterization of capsid-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in the fiber knob, protein IX, or hexon. Gene Ther 14 : 266-274, 2007.
 - 11) Koizumi N, et al : Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and α_v integrin-binding ablation. J Virol 77 : 13062-13072, 2003.
 - 12) Koizumi N, et al : Modified adenoviral vectors ablated for coxsackievirus-adenovirus receptor, α_v integrin, and heparan sulfate binding reduce in vivo tissue transduction and toxicity. Hum Gene Ther 17 : 264-279, 2006.
 - 13) Suzuki T, et al : miR-122a-regulated expression of a suicide gene prevents hepatotoxicity without disturbing the antitumor effects in suicide gene therapy. Mol Ther 16 : 1719-1726, 2008.
 - 14) Koizumi N, et al : Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production. J Immunol 178 : 1767-1773, 2007.
 - 15) Sakurai H, et al : Adenoviral expression of suppressor of cytokine signaling-1 reduces adenovirus vector-induced innate immune response. J Immunol 180 : 4931-4938, 2008.
 - 16) Palmer DJ, Ng P : Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. Hum Gene Ther 1 : 1-16, 2005.
 - 17) Palmer D, Ng P : Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. Mol Ther 8 : 846-852, 2003.
 - 18) Roberts DM, et al : Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. Nature 441 : 239-243, 2006.
 - 19) Sakurai F, et al : Efficient gene transfer into human CD 34+ cells by an adenovirus type 35 vector. Gene Ther 10 : 1041-1048, 2003.
 - 20) Stone D, et al : Development and assessment of human adenovirus type 11 as a gene transfer vector. J Virol 79 : 5090-5104, 2005.
 - 21) Mizuguchi H, Hayakawa T : The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector. J Gene Med 4 : 240-247, 2002.
 - 22) Mizuguchi H, et al : Tight positive regulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing the rTA and tTS expression cassettes in separate genome regions. Hum Gene Ther 14 : 1265-1277, 2003.
 - 23) Kishimoto H, et al : A novel *in vivo* imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-competent adenovirus containing green fluorescent protein gene. Nature Med 12 : 1213-1219, 2006.
 - 24) Mizuguchi H, et al : Rapid construction of small interfering RNA-expressing adenovirus vectors on the basis of direct cloning of short hairpin RNA-coding DNAs. Hum Gene Ther 18 : 74-80, 2007.

臨床英文の正しい書き方

改訂4版

羽白 清 著

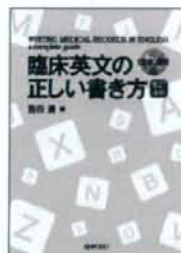
英語で診療録を書くための参考書として定評のある臨床英文表現集。基本語句、例文、疾患名、略語を中心に全編に検討を加え、英米の新知見を加えた。

主要目次

1章 英文診療録 2章 診察の英語表現 3章 病歴の書き方 4章 身体的所見の書き方 5章 薬物・診断の書き方 6章 指示の書き方 7章 経過記録の書き方 8章 検査結果の書き方 9章 手術記録の書き方 10章 退院時抄録の書き方

●全文掲載のCD-ROM付

A5判・上製・548頁 定価5,880円(本体5,600円+税5%)


金芳堂

〒606-8425 京都市左京区藤ヶ谷西寺ノ前町34番地 TEL (075)751-1111・FAX(075)751-6858

<http://www.kinodo-pub.co.jp/>

人工リンパ組織構築とは何か。

末松佐知子

独立行政法人医薬基盤研究所 基盤研究部 免疫細胞制御プロジェクト

What does artificial lymphoid organ mean?

Sachiko Suematsu

Laboratory of Immune Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation

The adaptive immune system consists of multiple aspects of immune reaction arising from specific recognition of antigens. In vertebrates, secondary lymphoid organs are provided to accomplish the series of specialized reactions needed for defense against pathogens. The highly organized microarchitecture of the secondary lymphoid organs enables antigen, antigen-presenting cells and rare antigen-specific lymphocytes to interact, resulting in efficient immune response induction. It is now well known that stromal cells play an important role in the formation of the normal organized secondary lymphoid tissue microarchitecture.

We developed a method for construction of "artificial (secondary) lymphoid organ" introducing a stromal cell line-embedded in collagen sponge along with activated dendritic cells under renal sub-capsular space in mice. The artificial lymphoid organ had a basic but immunologically essential and characteristic feature of normal secondary lymphoid organ microarchitecture. Further, antigen-specific antibody formation could be induced quite effectively in the artificial organ in naive mice and even in severe immunodeficiency (SCID) mice. Our artificial lymphoid organ construction system is useful not only for understanding molecules and cell-cell interaction for the secondary lymphoid organ development and efficient adaptive immune response induction, also may imply a possible application for treatment of immune deficiency or cancer.

【キーワード】

ストローマ細胞, 生体適合性高分子材料,
二次リンパ組織, 適応免疫反応, 組織工学
stromal cell, biocompatible material,
secondary lymphoid organ,
adaptive immunity, tissue engineering

はじめに

二次リンパ組織は体外から侵入してきた病原微生物(抗原)を局所で補足し, 適応免疫が始動する場として高度に組織化された高次構造を備えている。1990年代後半以降の国内外の研究によりその特殊な組織構造が適応免疫反応の誘導に重要で

別刷請求先: 末松佐知子 〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8
独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部 免疫細胞制御プロジェクト
TEL: 072-641-9811 (代表) FAX: 072-641-9812 Email: sachiko@nibio.go.jp

あることが再認識されることになった。

筆者らは近年進歩の著しい生体適合性高分子材料と組織工学技術を利用して二次リンパ組織の構造と機能を模倣した「人工リンパ組織」構築の研究を続けており、あるストローマ細胞を生体適合性高分子材料に組み込んでマウスの腎皮膜下に移植することにより免疫組織としての二次リンパ組織の基本構造を備え、機能的にも抗原特異的免疫反応を誘導し得る人工リンパ組織構築法を確立した。本研究を始めたきっかけはこれまでとは異なる新しい方法を使って二次リンパ組織の発生と適応免疫誘導のメカニズムを解明したいと考えたことによる。また、機能的な人工免疫組織が構築できれば将来様々な応用が可能となるはずである。本稿ではこれまでの二次リンパ組織に関する研究の流れとともに筆者らの人工リンパ組織を用いた研究の可能性について述べてみたい。

1. 二次リンパ組織の特殊な組織構造

「二次リンパ組織」とは脾臓、リンパ節、及び粘膜関連リンパ組織（扁桃、アデノイド、虫垂、パイエル板、気管支関連リンパ組織など）を指す。二次リンパ組織はリンパ球が抗原と効率よく出会うための場でありその目的に適した特殊な高次構造を備えているが、最も特徴的なのはT細胞とB細胞が明確に領域に分かれて存在する事である。B細胞領域（あるいは濾胞: follicle）の中心部には濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell: FDC) と呼ばれる特殊な細胞が突起を伸ばしてネットワーク状構造を形成し成熟B細胞と密に接触しており、抗原特異的なB細胞の選択に関わっているのではないかと考えられているが実はその起源や機能など詳しいことは分かっていない。その他、二次リンパ組織には樹状細胞、マクロファージやストローマ細胞（間質細胞あるいは支持細胞）が存在している。ストローマ細胞の重要性については後述する。

二次リンパ組織は組織によって特徴的な脈管系が発達しており、例えばリンパ節では動脈、静脈とリンパ管の他に背丈の高い内皮細胞からなる特

殊な血管構造があり高内皮細静脈 (high endothelial venule: HEV) と呼ばれている¹⁾。HEVはパイエル板、扁桃などにも存在しており、ナイーブなリンパ球（抗原に出会っていない未感作のリンパ球）はこの HEV を介してリンパ組織に流入する事がわかっている。

2. 二次リンパ組織の発生に関与する因子

1) 遺伝子欠損マウスにおける二次リンパ組織の異常

二次リンパ組織の発生に異常がある遺伝子欠損マウスが多数報告されており、これらのマウスを解析する事により二次リンパ組織の特殊な構造自体が適応免疫機能に重要であることも明らかとなった²⁻⁴⁾。ここでは tumor necrosis factor (TNF) ファミリー関連分子とリンパ組織性ケモカイン関連分子欠損マウスを中心に述べる（表1）。

TNFファミリー関連分子ノックアウトマウスの中で二次リンパ組織の異常が最初に報告されたのは、lymphotoxin α (LT α) ノックアウトマウスである¹⁾。LT α ノックアウトマウスにはパイエル板が存在せず、全身のほとんどのリンパ節は欠損し脾臓の組織構造も大きく乱れていた。さらにLT β 受容体 (LT β R) ノックアウトマウスではリンパ節欠損と脾臓組織構造の異常の程度が増強し、全身のリンパ節が完全に欠損する。LT β RはLT α 1 β 2ヘテロ3量体（膜型LT）の特異的なレセプターである。ちなみにLT α 、LT β は活性化リンパ球が発現しており、一方、LT β Rはリンパ球系細胞表面には存在せず、むしろ種々のリンパ組織のストローマ細胞に発現がみられる¹⁾。Alymphoplasia (aly) 突然変異マウスでは、全身のリンパ節とパイエル板が欠損し脾臓の構造にも異常がみられるが、その原因はLT β R下流のシグナル伝達分子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) inducing kinase (NIK) の点変異によるということが分かっている⁵⁾。これらのマウスの解析結果からLT β Rを介したシグナルが二次リンパ組織の発生に必須であることがわかる。

ケモカインは炎症性ケモカイン inflammatory

Table 1

Knockout mice showing abnormal secondary lymphoid organ development (for TNF family- and chemokine-related molecules)

| knockout mice | | LN | PP | spleen T/B area | spleen marginal zone | primary follicle | FDC network |
|------------------------------|-------------------------|------|-----|-----------------|----------------------|------------------|-------------|
| TNF family-related molecules | TNF <i>-/-</i> | + | ↓ | ○ | enlarged | (-) | (-) |
| | TNFR-I <i>-/-</i> | + | ↓ | ○ | ND | (-) | (-) |
| | TNFR-II <i>-/-</i> | + | + | ○ | ND | + | + |
| | LT α <i>-/-</i> | (-)* | (-) | × | × | (-) | (-) |
| | LT β <i>-/-</i> | (-)* | (-) | × | × | (-) | (-) |
| | LT β R <i>-/-</i> | (-) | (-) | × | × | (-) | (-) |
| | <i>aly/aly</i> | (-) | (-) | × | × | (-) | (-) |
| | TRANCE <i>-/-</i> | (-)* | + | ○ | × | + | ND |
| | TRANCER <i>-/-</i> | (-) | ↓ | ○ | ○ | + | + |
| Chemokine-related molecules | CXCR5 <i>-/-</i> | ↓ | ↓ | ○ | enlarged | × | (-) |
| | CXCL13 <i>-/-</i> | ↓ | ↓ | × | × | (-) | (-) |
| | CCR7 <i>-/-</i> | + | + | × | ND | + | + |
| | <i>plt / plt</i> | + | + | × | + | + | ND |

LN: lymph node PP: Payer's patch

+ : exist ↓ : reduced ND: not determined (-) : absent

(-)* : most of lymph nodes were absent, if not all

○ : normal tissue microarchitecture × : disturbed tissue microarchitecture

chemokineと恒常性ケモカイン homeostatic chemokineの2つに大別される。恒常性ケモカインのうちのCCL19, CCL21およびCXCL13はリンパ組織性ケモカインlymphoid chemokineとも呼ばれ、その名の通りリンパ組織に特異的に発現していてリンパ球や樹状細胞のリンパ組織への遊走に関与している^{3,33}。リンパ組織性ケモカインのノックアウトマウスでもリンパ節欠損など二次リンパ組織の構造異常がみられる(表1)。また、plt (paucity of lymph node T cell) 突然変異を持つplt/pltマウスではリンパ節におけるT細胞と樹状細胞数の著しい減少が観察されるが、この変異の原因はCCL19とCCL21ケモカイン遺伝子の異常によることが明らかとなっている^{3,100}。

2) lymphoid neogenesis「リンパ組織新生」

前述のいくつかの分子については遺伝子欠損マウスと表裏をなす実験系としてトランスジェニックマウスが作製されており、ほぼ共通した興味深い結果が得られている。ラットのインシュリンプロモーターを用いてLT α 遺伝子を脾臓ランゲルハンス島 β 細胞で強制発現させたトランスジェニックマウスではランゲルハンス島周囲の組織に二次リンパ組織に似た組織構造が新生する(lymphoid neogenesis)¹¹¹。二次リンパ組織の発生に関与する他のサイトカインやケモカインのトランスジェニックマウスでも同様のリンパ組織新生が観察されている^{110,112}。

その他、慢性関節リュウマチやシェーグレン症候群などの慢性炎症部位では胚中心形成を伴うリンパ球の集積や二次リンパ組織様の組織像が見られることが昔からよく知られており、しばしばHEVの形成を伴うことが示されている。最近ではこれらの(異所性)リンパ組織新生は"tertiary lymphoid tissue"「三次リンパ組織」と呼ばれることも多い¹¹³。

3) 二次リンパ組織ストローマ細胞の重要性について

リンパ節が欠損するLT β Rノックアウトマウスの骨髓細胞を放射線照射した正常マウスに移植するとリンパ節が再構築されるのに対し、逆に正常

マウスの骨髓細胞を放射線照射したノックアウトマウスに移植した場合にはリンパ節が再構築されない。このことから二次リンパ組織の発生異常は骨髓細胞(血球系細胞)の異常によるものではなく、放射線照射に耐性の細胞、すなわちストローマ細胞に原因があることが示唆される¹¹⁴。さらにストローマ細胞がLT β Rを介した刺激によりケモカインを分泌してリンパ球や樹状細胞の二次リンパ組織への遊走に関与していることが明らかになった¹¹⁵。二次リンパ組織のストローマ細胞は細胞の隙間をうめて構造を支える「間質としての詰め物」であるばかりでなく、二次リンパ組織の構造を保つための「機能を支持」しているのである。

また近年では細胞観察技術の進歩によりリンパ球動態を生体組織内で観察することが可能となっている。リンパ球がリンパ節内でストローマ細胞のネットワーク構造を足場として移動する様子から、リンパ球が抗原と遭遇するためにもストローマ細胞が重要であることがわかる¹¹⁶。

3. 人工リンパ組織の構築

筆者らは二次リンパ組織発生に関する内外の研究結果から人工リンパ組織構築に必要な情報を抽出した結果(1)ストローマ細胞とサイトカインを生体適合性高分子材料に組み込んでマウスに移植すれば二次リンパ組織に似た組織を人工的に構築でき、(2)二次リンパ組織の組織構造に類似した組織を構築すれば、適応免疫機能を発揮するはずである、という2つの作業仮説を立てて人工リンパ組織の構築に取り組むことにした。

1) ストローマ細胞、サイトカインと生体適合性高分子材料

人工リンパ組織構築のために最も重要なのはストローマ細胞であることが予測される。現在、筆者らは専らBALB/cマウス胸腺由来ストローマ細胞であるTEL-2細胞¹¹⁷を用いている(注:胸腺は一次リンパ組織である)。TEL-2細胞は二次リンパ組織ストローマ細胞上の重要因子であるLT β RやVCAM-1を発現しているばかりでなく、比較的容易に遺伝子導入発現細胞株を樹立できる

こと、また同系のBALB/cマウスに移植した場合にも腫瘍を形成しないことなど、本研究に使いやすい長所を持ち合わせている。

サイトカインについては、前述のLT α トランスジェニックマウスの実験と「担瘤マウスに癌抗原に対する抗体とLT α の融合タンパクを投与すると癌組織周囲にlymphoid neogenesisが観察される」という報告²⁾があったため、マウスのLT α cDNAを導入してLT α 遺伝子発現TEL-2ストローマ細胞株(以下、TEL-2-LT α 細胞)を樹立して用いることにした。

ストローマ細胞の足場となる生体適合性高分子材料として筆者らは市販のコラーゲンスポンジを用いている。これまで何種類かの材料を試した経験からその素材自体の性質、あるいは多孔性のものであればポアサイズも人工リンパ組織構築の効率に少なからず影響を及ぼすと感じている。しかし、生体適合性がありマウスに移植した際に移植局所に過剰な生体反応を引き起こす事のない高分子材料であればいろいろな素材が人工リンパ組織構築に適用可能だろうと考えている。

2) 活性化樹状細胞

1) のTEL-2-LT α 細胞をコラーゲンスポンジに組み込んでBALB/cマウスの腎皮膜下に移植して三週間後に移植組織を回収して免疫組織学的解析を行ったところ、T細胞やB細胞が遊走して集まり小さいフォーカスを形成することが確認された。さらに多くのリンパ球を集積させるために骨髓由来の活性化樹状細胞(活性化DC)をTEL-2-LT α 細胞と共にコラーゲンスポンジに組み込んで同様にマウスの腎皮膜下に移植してみた。するとTEL-2-LT α 細胞のみを移植するよりも活性化DCを併せて移植した方がより多くの移植組織でT細胞やB細胞がクラスター状に集合して明確に区別される細胞群を形成するようになった。この移植組織を詳細に調べてみると二次リンパ組織と似た組織構造をもっていることが分った(図1)。以上の結果からストローマ細胞と活性化DCを組織学的に組み合わせマウスの腎皮膜下に移植して形成された組織は二次リンパ組織が免疫

組織として機能するために必要な基本的組織構造を有していると判断したのでこの組織を「人工リンパ組織」と呼ぶことにした。

4. 人工リンパ組織での抗原特異的免疫反応

人工リンパ組織で適応免疫反応が誘導できるかどうかを調べるために、胸腺依存性抗原であるNP-OVA(4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl-ovalbumin)を用いて抗原特異的な抗体産生細胞が誘導できるかどうかを検討した。実験スケジュールはTEL-2-LT α 細胞と活性化DCをマウスの腎皮膜下に移植して三週間後に抗原を静脈内投与し、その4日後に人工リンパ組織と脾臓を回収して抗原(NP)特異的抗体産生細胞がどの程度誘導されるかをELISPOT(enzyme-linked immunospot) assayで検出した(図2a)。このスケジュールにおいて抗原刺激を加えることができるのは(1)レシビエントであるBALB/cマウスの一次免疫(2)樹状細胞の抗原パルス(樹状細胞を活性化させる際に加える抗原刺激)、及び(3)移植三週間後に抗原を静脈内投与することによる二次免疫、の3つの段階である。この3段階の抗原刺激の有無により誘導されるNP特異的IgG抗体産生細胞(NP-IgG、AFCと略す)が人工リンパ組織内で最も高率に誘導されるのは、レシビエントマウスの一次免疫と樹状細胞パルスと二次免疫に用いる抗原がすべてNP-OVAの場合であることが分かった。一方、レシビエントマウスがNP-OVAで一次免疫されていない場合とNP-OVAの静脈内投与による二次免疫を受けない場合は人工リンパ組織、脾臓のいずれの組織にもNP-IgG、AFCは誘導されなかった。

次に人工リンパ組織で検出されるNP-IgG、AFCがレシビエントマウスの正常な二次リンパ組織である脾臓やリンパ節などから遊走して来たのではなく一次免疫であらかじめ抗原刺激を受けたリンパ球が人工リンパ組織を構成しその場所で効率良くNP-IgG、AFCにクラススイッチしたのかどうかを調べるために「再移植」実験を行った(図2

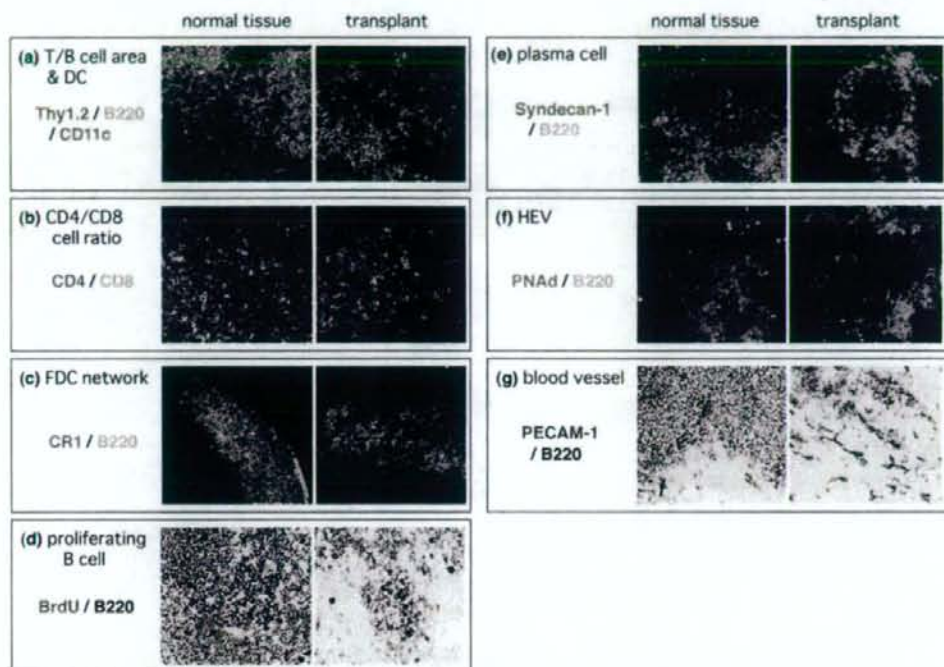


Figure 1

Tissue-engineered transplants (right) have structure similar to secondary lymphoid organs (left). (a) LN and transplant stained for Thy1.2 (T cells), B220 (B cell), and CD11c (dendritic cells). (b) Immunostaining of lymph node (LN) and transplant tissue using mAbs for CD4 T cell and CD8 T cell. (c) LN and transplant stained for CR1 (FDC maker) and for B220. (d) LN from immunized mice and transplant stained for BrdU (bromodeoxyuridine) and B220. Actively proliferating B cells were shown as double positive cells for BrdU and B220. (e) Spleen and transplant stained for Syndecan-1 (plasma cell marker) and B220. (f) LN and transplant stained for PNA_d (one of the HEV-specific adhesion molecules) and B220. (g) Spleen and transplant stained for PECAM-1 (adhesion molecule expressed on endothelial cells of blood vessel) and B220.

(Suematsu S and Watanabe T: Nature Biotech 22:1539, 2004²⁹⁾)

b)。NP-OVAで一次免疫されたBALB/cマウスの腎皮膜下にTEL-2-LT α 細胞とNP-OVAをバルスした活性化DCを移植して構築した人工リンパ組織を回収し、別のマウスの腎皮膜下に「再移植」する。そして再移植後数日以内にレシピエントマウスにNP-OVAを静脈内投与して4日後に脾臓と人工リンパ組織を回収しELISPOT assayによりNP-IgG、AFCの数を調べた。その結果、免疫刺激を受けた事のないBALB/cマウスに再移植した場合、脾臓にはNP-IgG、AFCが検出されなかつ

たのに対し再移植された人工リンパ組織には多数のNP-IgG、AFCが存在する事が分かった。また、抗体産生能のない重症複合型免疫不全症 (SCID) マウスに再移植した場合にもNP-OVAの静脈内投与4日後には血中にNP特異的なIgG抗体が検出された。これらの事より (1) 人工リンパ組織は他のマウスに移植可能であり (2) 人工リンパ組織に存在するNP-IgG、AFCは他のリンパ組織から遊走してきたものではなく、確かに人工リンパ組織内でNP-OVAの二次免疫刺激によりIgG抗

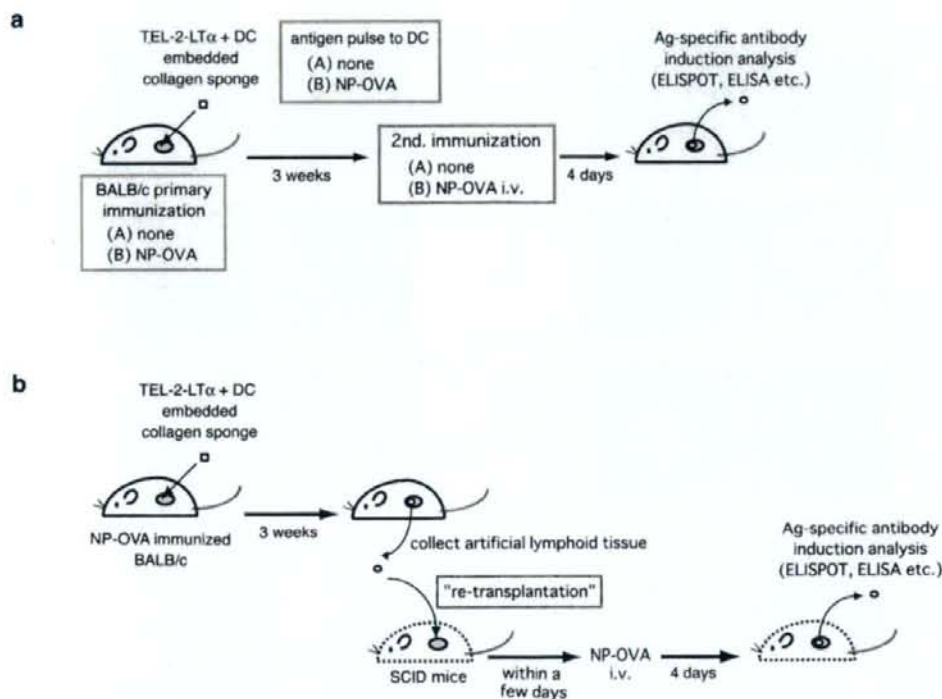


Figure 2

Antigen-specific antibody induction by artificial lymphoid tissue. a. Experimental design and schedule for detection of antigen-specific antibody induction. b. "re-transplantation" experiment to show antigen-specific IgG antibody induction in artificial lymphoid tissue, not in the spleen of the recipient SCID mice. The result shows transplantability of artificial lymphoid tissue and its adaptive immune function to immunodeficient mice. (Suematsu S and Watanabe T: Nature Biotech 22:1539, 2004²³)

体産生細胞にクラススイッチした事が明らかとなった^{21,20}。

おわりに

筆者らはTEL-LT α ストローマ細胞と活性化DCをコラーゲンスポンジに吸着させてマウスの腎皮膜下に移植する事により、移植後三週間で二次リンパ組織の基本構造を備えた組織を人工的に構築する方法を確立し、人工リンパ組織内において抗原特異的な抗体産生細胞が誘導できること、また他の個体に移植した場合にも抗原特異的な免疫反応を速やかに誘導できることを示した。

活性化DCをTEL-2-LT α 細胞と共に移植することによって効率良く人工リンパ組織を構築できることが分かったが、筆者らはTEL-2-LT α 細胞が中心的な役割を果たしていると考えている。なぜなら形成されるT細胞クラスターの数と大きさで判定すると、移植する細胞によって人工リンパ組織構築の効率がTEL-2-LT α 細胞+活性化DC > TEL-2-LT α のみ >> 活性化DCのみ、の順に低下したからである。おそらくTEL-2-LT α 細胞が活性化DCとの相互作用によりケモカインや接着因子を発現するか、あるいはサイトカインを発現して間接的に周囲の他のストローマ細胞にケモ

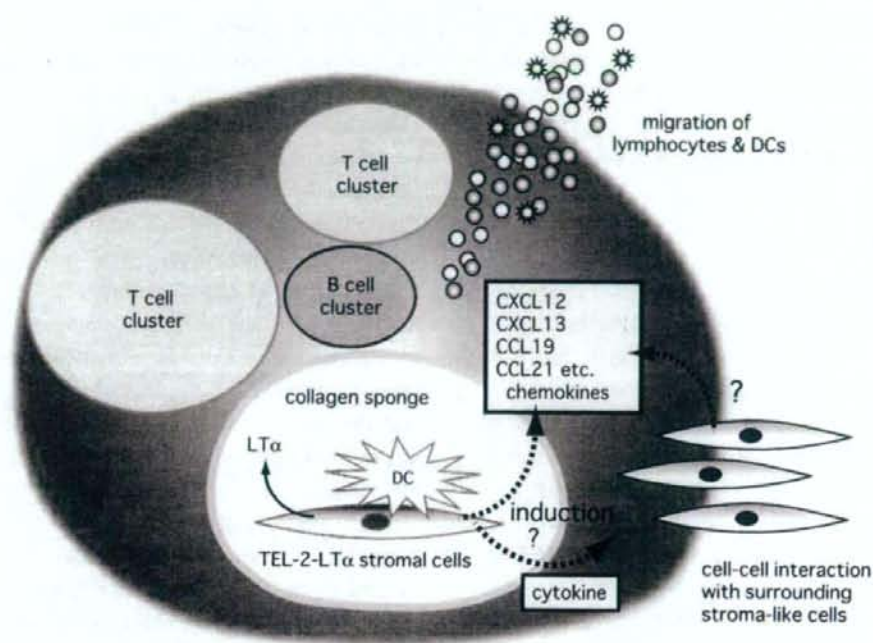


Figure 3

Mechanism of artificial lymphoid tissue construction. It is presumable that TEL-2 stromal cell is induced to express molecules attracting lymphocytes through interaction with activated dendritic cells

カイン分泌を誘導してリンパ球や樹状細胞を遊走させるのではないかと考えている(図3)。遊走してきた細胞がTEL-2-LT α 細胞や他の細胞に作用する事によってさらにこの過程は増強されるのであろう。また、遺伝子を導入していないTEL-2細胞とTEL-2-LT α 細胞を比較すると構築される組織構造には大きな差が見られなかったため、我々の人工リンパ組織構築の方法においてTEL-2細胞からのLT α の発現が必須条件であるとは考えにくい。人工リンパ組織の構築を可能にしたのがTEL-2細胞に特異的な性質なのか、あるいは他のストローマ細胞とも共通する何らかの因子によるのかは今の所は不明であるが、活性化DCとの相互作用によるTEL-2細胞でのサイトカインや接着因子の発現誘導を他のストローマ細胞と比較しながら調べている最中である。

筆者らの人工リンパ組織構築は炎症のプロセスにもよく似ている。また、構築方法が比較的単純であることから、このシステムを用いることによって二次リンパ組織の恒常性や炎症反応のプロセスを規定している新しい因子を見つける事ができるかもしれない。このように常に細胞が入り出し、ダイナミックに変化し続ける二次リンパ組織に類似した組織を自由に構築できるようになったことで今までの遺伝子改変マウスを用いた研究とは全く異なる新しい研究ツールとなると考えている。

最後に、人工リンパ組織を免疫不全マウスに移植した場合にも投与した抗原に対して速やかに効率良く抗原特異的免疫反応が誘導できるということは、将来的には新たな免疫賦活法としてヒトの免疫不全状態や難治性感染症の治療に応用することも不可能ではないであろう。癌に対する新しい

免疫細胞療法として利用することができるかもしれない。免疫不全マウスが人工リンパ組織によって病原微生物を排除して感染症から回復するのかわかるところから始めると共に、ヒト型人工リンパ組織の構築も視野に入れて今後の研究を進めることを計画している。

謝辞

本稿で紹介した人工リンパ組織構築の研究は九州大学生体防御医学研究所の渡邊武教授の研究室において2000年から始めたものであり、2004年4月に渡邊先生と共に異動した横浜理化学研究所では1年間研究を行った。その後、2005年4月に現所属の独立行政法人医薬基盤研究所に移ってから一貫して人工リンパ組織の臨床応用を最終目的として研究を続けている。九州大学在職時には、医用工学の松田武久教授から生体適合性高分子材料と多くの助言を頂いた。ここに両先生はじめ多くの方々に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Miyasaka M and Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol* 4: 360-370, 2004
- 2) Fu Y-X and Chaplin DD. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Ann Rev Immunol* 17: 399-433, 1999
- 3) Magerl G, Hopken UE, and Lipp M. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunol Rev* 195: 117-135, 2003
- 4) Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23: 127-159, 2005
- 5) Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286: 2098-2102, 1999
- 6) Mebius RE. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol* 3: 292-303, 2003
- 7) De Togni P, Goellner J, Ruddle NH, et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 264: 703-707, 1994
- 8) Shinkura R, Kitada K, Matsuda F, et al. Alymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding Nf-kb-inducing kinase. *Nat Genet* 22: 74-77, 1999
- 9) Nakano H and Gunn MD. Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation. *J Immunol* 166: 361-369, 2001
- 10) Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189: 451-460, 1999
- 11) Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, and Ruddle NH. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 183: 1461-1472, 1996
- 12) Fan L, Reilly CR, Luo Y, Dorf ME, and Lo D. Cutting edge: ectopic expression of the chemokine TCA4/SLC is sufficient to trigger lymphoid neogenesis. *J Immunol* 164: 3955-3959, 2000
- 13) Luther SA, Lopez T, Bai W, Hanahan D, and Cyster JG. BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis. *Immunity* 12: 471-481, 2000
- 14) Chen S-C, Vassileva G, Kinsley D, et al. Ectopic expression of the murine chemokines CCL21a and CCL21b induces the formation of lymph node-like structures in pancreas, but not skin, of transgenic mice.