

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
総括分担研究報告書

“生体皮膚への機能性高分子導入法の開発に関する研究”

研究分担者 金田安史 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨：HVJ-EのF蛋白質がマクロファージに作用してIL-18産生を誘導する。このIL18とIL12がT cellに作用して、T-bet, IL12 receptorなどのTh1関連遺伝子の発現を高め、Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )の発現を増強できることが分かった。一本鎖IL12ポリペプチドウイルス粒子表面に有する高機能型HVJ-E (不活性化センダイウイルスエンベロープ)は、免疫細胞に作用してTh1シフトをおこすためアレルギー疾患治療に適していると考えられる。

#### A．研究目的

HVJ-EはSendai virus (hemagglutinating virus of Japan; HVJ)を紫外線等で不活化した粒子に遺伝子や siRNA を封入し、膜融合作用によって直接細胞質内に導入できるベクターである。すでにアレルギー性鼻炎マウスモデルでアレルゲン（卵白アルブミン）の封入 HVJ-E の鼻腔内投与によるIgE産生の抑制、STAT6を抑制するデコイオリゴ核酸を封入して、アトピー皮膚炎のモデルマウスで治療効果が検証されている。この粒子とIL12の組み合わせが、免疫システムをTh1優位にシフトできるが、その分子機構を解明し、アトピー等のアレルギー疾患治療剤としての優位性を明らかにする。

#### B．研究方法

マウスの一本鎖IL12蛋白質をCHO細胞から精製する。膜融合能を有する、或いは欠失したHVJ-Eを作成する。これらを単独或いは併用して、マウス脾臓細胞全体、さらには脾臓細胞から選別したT cell, B cell, macrophageに作用させ、Th1関連遺伝子の発現をRT-PCRで解析し、Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )の産生が亢進するかどうかを、ELISA法で測定した。次にIL12蛋白質をウイルス粒子表面に有する高機能型HVJ-Eの構築を試みた。

(倫理面への配慮)

動物実験は、大阪大学医学系研究科で承認された実験計画に基づいて行った。

#### C．研究結果

HVJ-Eのみを樹状細胞やマウス脾臓細胞に加えてもIFN- $\gamma$ の産生はほとんど認められなかった。0.1 ng/mlのscIL12ではIFN- $\gamma$ の産生は検出できなかった。しかしscIL12(0.1 ng/ml)とHVJ-Eを併用すると150~200 pg/mlのIFN- $\gamma$ が脾臓細胞から産生された。HVJ-EとIL12の組み合わせは脾臓細胞からのIL12 receptor, T-bet, IL18の発現もIL12単独よりも有意に亢進させた。この中でIL18のみ、HVJ-E単独で同様に高い発現を得ることができた。その発現亢進は、膜融合能には左右されず、HVJ-EのF蛋白質に依存した。選別した免疫細胞を用いると、IL18はmacrophageにおいて発現が増強された。macrophageではHVJ-EによりCaspase 11, Caspase 1の発現も亢進した。IFN- $\gamma$ の発現が増強されるのは、T cellであり、そのためにはmacrophageからのIL-18の産生が必要であった。次にscIL12とHVJ-Eを併用する代わりにIL12結合型HVJ-Eの機能について解析した。IL12結合型HVJ-E ( $1.5 \times 10^7$ 粒子)を脾臓細胞( $2 \times 10^5$ 粒子)にかけると24時間後に120~150 pg/mlのIFN- $\gamma$ の産生が検出された。マウス樹状細胞に加えると24時間で40 pg/mlのIFN- $\gamma$ が分泌された。IL12結合型HVJ-Eに含まれるIL12と同じ量のZZ-scIL12や

sclIL12ではIFN- $\gamma$ はほとんど検出されなかった。

#### D . 考察

HVJ-EのF蛋白質がmacrophageからIL18を産生させ、IL12と共同でT cellに作用してIFN- $\gamma$ が産生され、これがT cellでのIL12 receptorの発現をTbetを介して高めることで、免疫細胞間でIFN- $\gamma$ 産生亢進のpositive feedback loopができると考えられる。IL12結合型HVJ-Eはこのような分子機構でIFN- $\gamma$ 産生を増強させ、免疫系をTh1優位に導くことができる。

#### E . 結論

IL12とHVJ-EのF蛋白質があれば強力なアトピー性皮膚炎の治療剤になりうる。

#### F 健康危険情報

異常なし

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tanemura A, Kiyohara E, Katayama I, Kaneda Y. Recent advances and developments in the antitumor effect of the HVJ envelope vector on malignant melanoma: from the bench to clinical application. *Cancer Gene Ther.* 599-605, 2013.
- 2) Kaneda, Y.: Future directions for gene therapy. E-book on "Gene therapy: Technologies and applications" (Ed. By Morishita, R and Nakagami, H.) Future Science Group (London, UK), doi:10.2217/EBO.12.155, 2012.

##### 2. 学会発表

- 1) 金田安史：新規抗癌剤としての不活化ウイルス粒子のポテンシャル 日本脳神経外科学会第71回学術集会（特別医学セミナー）平成24年

10月18日 大阪

- 2) 金田安史：第19回日本遺伝子治療学会 理事長講演 “What will be needed for gene therapy in Japan?” 2013/07/04 岡山
- 3) 第11回日本中性子捕捉療法学会 教育講演 Kaneda, Y. “ウイルスに学ぶ癌治療戦略”2014/7/6 大阪
- 4) 第20回日本遺伝子治療学会 理事長講演 Kaneda, Y. “Development of anti-cancer strategies using Sendai virus envelope (HVJ-E) and current status of clinical applications to treat cancer patients “ 2014/8/7 東京
- 5) 第8回韓国遺伝子細胞治療学会 招待講演 Kaneda, Y. “Virus-mediated cancer treatment ~from basic to clinic~” 2014/10/11 Osong (Korea)

#### 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