

HVJ-Eによるマクロファージからの IL-18産生増強機構、及び IL-18と IL-12の協調的なT細胞からの IFN- γ 産生増強機構の解析

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は不活性化したセンダイウイルス粒子であるが、遺伝子や核酸を封入し膜融合作用により細胞質内への直接導入が可能である。我々が開発した多剤耐性結核に対する治療ワクチンは、結核菌の抗原である HSP65遺伝子とサイトカインの IL-12遺伝子を融合したプラスミド DNAを HVJ-Eに封入している。このベクターを筋肉内投与することにより、結核菌に対する強い免疫反応が誘導されることが分かった。さらに HVJ-E自身がマクロファージに作用して IL-18を誘導できること、この IL-18と IL-12が協調して T cellに作用すると、IFN- γ の産生が誘導されることが分かっている。しかし HVJ-E vectorそのものが、マクロファージからどのようにして IL-18を産生できるのかはわかっていない。本研究では、IL-18の転写の増強は、HVJの膜蛋白質 Fが関わっているが HVJ-Eの融合には依存しないこと、NF- κ Bの経路が関与していることが明らかになった。また HVJ-Eはマクロファージから Caspase 11の転写を活性化すること、これが Caspase 1を活性化すること、これによって IL-18の活性化が起こり分泌されることが示唆された。

A. 研究目的

IL-12と HVJ-Eを併用すると、マクロファージからの IL-18産生を介して T cellからの、IFN- γ の産生が誘導され、これによって免疫反応が増強される。HVJ-Eによって IL-18産生増強が起こる分子機構を明らかにする。

B. 研究方法

マウス脾臓由来の初代培養マクロファージを CD11bの抗体を用いた磁気ビーズ法を用いて分離した。株化細胞としては、マウス腹腔リンパ節由来のマクロファージ細胞株である P388D1を用いた。HVJは ATCCより購入した Sendai virus の Z 株

(VR-105 parainfluenza 1 Sendai/52)を用い、有精鶏卵で増殖させ、遠心法により生成した。LLCMK2細胞に HVJを感染させて 24時間以降に培養液中に産生される HVJは不活性型 F蛋白質 (F0)を有し融合能を持たない。この HVJを低濃度 (0.0004%) のトリプシンで処理すると F1、F2に開裂し融合能を持つようになる。また LLCMK2細胞中に HVJの HN 遺伝子に対する siRNA を導入しておいて、24時間後に HVJを感染させると産生される HVJは HN蛋白質をほとんど有しないため、HVJ受容体であるガングリオシドに結合できず融合能を欠失したウイルスとなる。また高濃度のトリプシンを HVJに処理し膜蛋白質の

F、HNを分解した融合能のないHVJも作成した。いずれのHVJも紫外線(99 m joule/cm²)で不活性化しHVJ-Eとした。IL-18、caspase 1、Caspase 11の発現はq-PCRで行った。NF- Bの阻害剤としては、NF- B activation inhibitorである6-amino-4-(4-phenoxyphenyl)ethylamino)quinolineを用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験についてはすでに大阪大学医学系研究科での審査を受けており、その安全委員会の指針に従って施行された。また組換えDNAの実験については、組換えDNA実験計画の機関承認が得られており、大学等における組換えDNA実験指針に従って行った。本計画においては、臨床研究データの使用や患者資料の使用、ヒト遺伝子解析などは含まれなかった。

C. 研究結果

F0を持つ融合能のないHVJ-EやF1/F2をもつ融合能のあるHVJ-E、またHN欠損のHVJ-Eを初代培養マクロファージやP388D1にかけてもIL-18の発現は増強された。この発現はNF- Bの阻害剤で激減した。F、HNを欠損したHVJ-EではIL-18の発現は起こらなかった。F1/F2をもつHVJ-Eをp388D1細胞にかけると、IL-18、Caspase 11、Caspase 1の発現が増強された。なおマクロファージ以外の細胞(T-cell、B-cell、NK cell)からは、HVJ-EによりIL-18の産生は誘導されなかった。

D. 考察

HVJ-EのF蛋白質がマクロファ-

ージの膜蛋白質に作用してNF- Bのシグナルを活性化してIL-18の転写を増強する。一方、Caspase 11、Caspase 1も同じようにしてHVJ-Eによって発現増強される。Caspase 11はCaspase 1を活性化し、Caspase 11はIL-18のmaturationを促進してIL-18を分泌させることが分かっており、HVJ-Eはいずれのステップにも関わって、IL-18の産生を促進していると推察される。IL-18のELISAが可能な抗体が入手できなかったため、培養液中に分泌されたIL-18を直接測定はできなかった。しかし、IL-12蛋白質とHVJ-EをマクロファージとT cellを含む脾臓細胞に作用させ、産生されるIFN- γ を測定する系を用い、IL-18の抗体やIL-18受容体の抗体の共存により、IFN- γ の産生が劇的に抑制されることが明らかになった。このことより間接的にHVJ-EによりマクロファージからIL-18が産生、分泌されていることが示唆された。マクロファージの膜表面にF受容体があることが示唆されるが、今まで報告がない。F蛋白質とP388D1の膜分画を作用させて、免疫沈降させた中から、複数の受容体候補が見つかっており、今後さらに解析を進める。

E. 結論

HVJ-EのF蛋白質によりマクロファージからのIL-18の発現が増強され、その経路にはNF- Bが関与している。またCaspase 11、Caspase 1の発現もHVJ-Eにより増強され、IL-18の分泌も促進している。

F. 健康危険情報

異常なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Kaneda, Y: 第 11 回日本中性子捕捉療法学会, 教育講演 “ウイルスに学ぶ癌治療戦略”, 2014/7/6, 大阪

2. Kaneda, Y: 第 20 回日本遺伝子治療学会, 理事長講演
“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

3. Kaneda, Y: 第 8 回韓国遺伝子細胞治療学会, 招待講演
“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