

《若手研究者紹介》



アデノウイルスベクターによって惹起される 自然免疫応答メカニズムの解明

山 口 朋 子* Tomoko Yamaguchi
独立行政法人医薬基盤研究所幹細胞制御プロジェクト

1. はじめに

筆者は、大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野水口裕之教授の指導のもと、遺伝子治療用ベクターであるアデノウイルス (Ad) ベクターによって生じる免疫応答のメカニズム解明を目指し、博士後期課程の3年間研究を行ってきた。現在、我が国を含め各国で癌などの難治性疾患をはじめとする様々な疾病に対する遺伝子治療が行われている。遺伝子治療の成功は、治療用遺伝子を効率良くかつ安全に標的細胞に導入することのできる治療用ベクターの開発が鍵をにぎっている。Ad ベクターは既存のベクターの中で最も高い遺伝子導入効率を示すこと、非分裂細胞にも遺伝子導入可能なこと、比較的大きな遺伝子 (最大約 8.1 kbp) が挿入可能であることなど遺伝子治療用ベクターとして優れた特徴を有することから、遺伝子治療臨床研究の約 25% で使用されている。本稿では、自然免疫受容体による Ad ベクター認識機構を中心に概説する。

2. Ad ベクターとは？

Ad は小児の風邪を引き起こすウイルスの一種であり、直径約 80 nm の正 20 面体の安定な殻 (カプシド) の中に二本鎖 DNA ゲノムをもつ。細胞への吸着および感染は、ウイルス粒子から突出したファ

イバータンパク質の先端 (ノブ領域) が細胞表面の受容体である coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) に結合することによって起こる。現在までに少なくとも 51 種類のヒト Ad 血清型 (serotype) が同定されており、赤血球凝集活性の違いなどから A から F の 6 つの subgroup に分類されている。このうち、ウイルス遺伝子の構造解析が最も進んでいる subgroup C に属する serotype 5 型 (Ad5) や serotype 2 型 (Ad2) が遺伝子治療用ベクターとして用いられている。Ad ベクターはすでに全世界で 1.5 万人以上の患者に投与されているものの、1999 年には米国ペンシルバニア大学で行われた遺伝子治療臨床研究において、Ad ベクターの全身投与を受けた患者が死亡する事故が発生している。この事故は、ベクター投与後初期の免疫応答の過剰な活性化が原因と考えられており、遺伝子治療用ベクターにより誘導される初期の免疫応答のメカニズムを解明し、これを回避することがより安全性の高い遺伝子治療を実現するための重要な課題であると考えられている。

Ad ベクターを生体内に投与した場合に起こる免疫応答は、1) 投与直後に生じる自然免疫応答、2) 投与後数日から数週間で誘導される獲得免疫応答に大別される。Ad ベクターにより誘導される自然免疫応答は、急性の炎症性サイトカインや I 型インターフェロン (IFN- α および IFN- β) の産生および抗原提示細胞の活性化を特徴としているのに対し、獲得免疫応答は、抗 Ad 抗体の産生や、Ad あるいは外来遺伝子に対する細胞傷害性 T 細胞の誘導、またそれに伴う組織傷害を特徴としている。獲得免疫応答

*2010 年 3 月大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。2007 年 4 月～2010 年 3 月日本学術振興会特別研究員。2010 年 4 月～独立行政法人医薬基盤研究所創薬基盤研究部幹細胞制御プロジェクト プロジェクト研究員。連絡先：〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8 E-mail: t.yamaguchi@nibio.go.jp

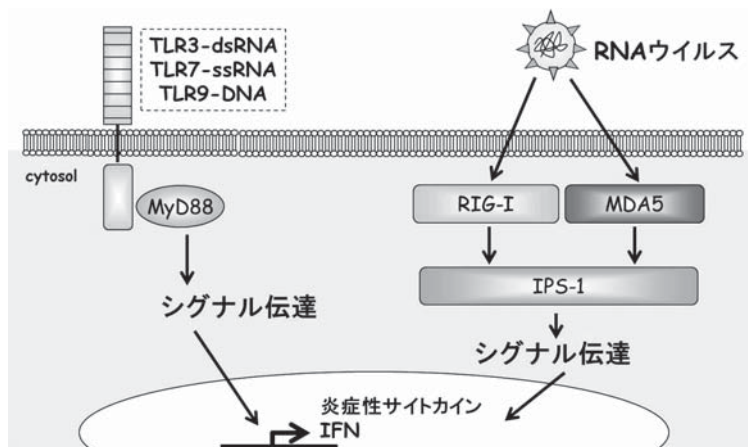


図1 核酸認識に関与する自然免疫受容体

に関してはこれまでに多くの研究が行われており、Ad ベクターから僅かに産生されたウイルスタンパク質が原因の一つであることが報告されており、例えば、Ad ベクターゲノムに含まれるウイルスタンパク質をコードする領域を全て欠損させたヘルパー依存型 Ad (HD-Ad) ベクターや血清型および種の異なる Ad を利用することによって免疫応答が回避できることが報告されている。しかしながら、急性の炎症性サイトカイン産生やインターフェロン産生に代表されるような自然免疫応答に関しては、その活性化メカニズムを含め、未解明な部分が多い。我々はこれまでに、ポリリジン配列をファイバーに有した K7 型 Ad ベクターをマウス尾静脈内に投与した場合、脾臓への Ad ベクター移行量が減少し、その結果、Ad ベクターによって誘導されるインターロイキン (IL)-6 量が低下すること¹⁾、SOCS1 を発現する Ad ベクターをマウス尾静脈内に投与した場合、自身により誘導される炎症性サイトカイン産生を回避するだけでなく、共投与した Ad ベクターの遺伝子発現を妨げることなく、Ad ベクターによる自然免疫応答を回避できることを明らかにしている²⁾。

3. Ad ベクターにより活性化される 自然免疫応答シグナルの解明

Ad ベクターを生体内に投与した場合、投与直後に IL-6 などの急性の炎症性サイトカインが産生され、その後 IL-6 は肝障害を引き起こすことがこれまでに明らかになっていることから、その適用は腫瘍内投与をはじめとする局所投与に限られているのが現状である。したがって、Ad ベクターの全身投与

による安全性の高い遺伝子治療を実現するためには、Ad ベクターによって誘導される IL-6 などの炎症性サイトカインの誘導メカニズムを解明し、それを回避する方法の確立が必須となっている。そこで、Ad ベクターによる自然免疫応答の誘導に細胞内のような因子が関与しているのかについて、ウイルスや細菌を認識する受容体として最もよく知られている Toll-like receptor (TLR) のアダプター分子である myeloid differentiating factor 88 (MyD88) および CpG モチーフを含んだ DNA を認識する TLR9 に着目した (図 1)。その結果、Ad ベクター作用後の GM-CSF を用いて誘導した樹状細胞や Flt3L を用いて誘導したコンベンショナル樹状細胞では、TLR9/MyD88 依存的に炎症性サイトカインを産生していることが明らかとなった。一方、腹腔内マクロファージでは Ad ベクターにより惹起される炎症性サイトカインは TLR9/MyD88 非依存的に産生されることが示された。したがって、細胞種により Ad ベクター作用後の炎症性サイトカイン産生経路が異なることが明らかになった (図 2)。また、Ad ベクターを投与されたマウスでは、TLR 非依存的に炎症性サイトカインを産生することが明らかとなった。これまでの報告では、Ad ベクターを *in vivo* に投与した際のサイトカイン産生には樹状細胞が重要な役割を担っているとの報告があったが、樹状細胞だけでなく他の細胞も重要である可能性が示唆された³⁾ (図 3)。

Ad ベクターによって誘導されてくるサイトカインは炎症性サイトカインだけではなく、I 型インターフェロンも誘導される。I 型インターフェロンは、

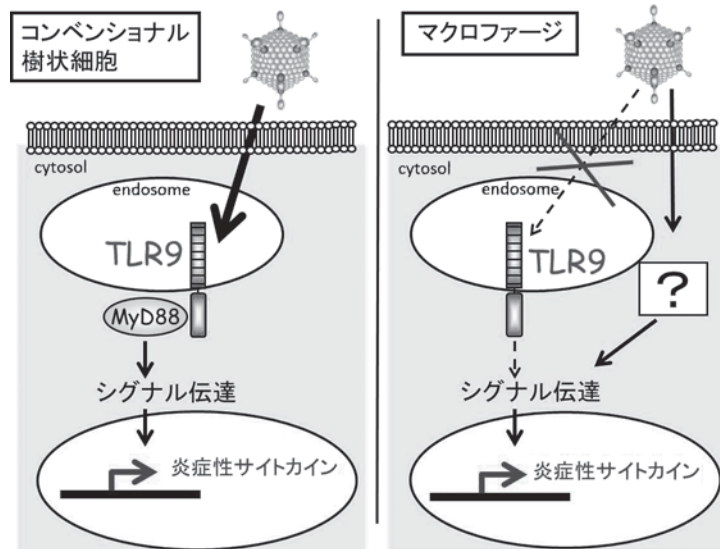


図2 Adベクターによる炎症性サイトカイン産生経路

Adベクターを樹状細胞に作用させた場合、TLR9/MyD88 依存的に炎症性サイトカインが産生される。一方、マクロファージではTLR/MyD88 非依存的に炎症性サイトカインが産生されることから、細胞種によってサイトカイン産生経路が異なる。

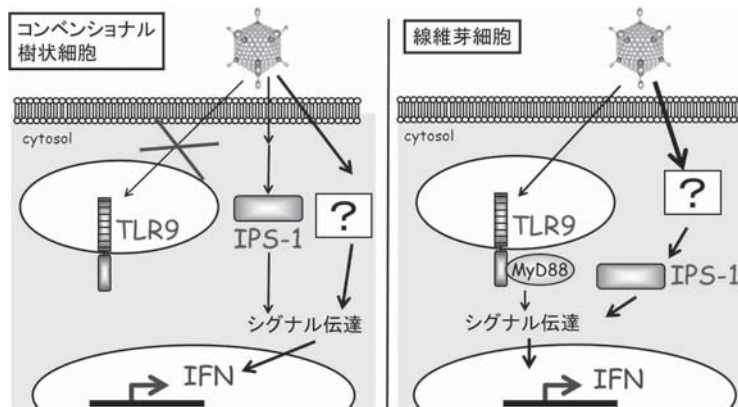


図3 Adベクターによるインターフェロン産生経路

Adベクターを線維芽細胞へ作用させた場合、IPS-1 依存的にインターフェロンが産生される。一方、樹状細胞に作用させた場合、TLR や IPS-1 シグナル以外の経路も関与している可能性が示唆された。

自然免疫応答における抗ウイルス活性の中心的な役割を担っているサイトカインであり、ウイルス感染によって一過的に分泌され、周囲の細胞に働きかけて強力な抗ウイルス活性をもたらす。このようなインターフェロンの産生は、単なる自然免疫応答だけでなく、その後誘導される獲得免疫応答の調節に深く関わっており、インターフェロンが免疫全般において重要な役割を担っていることを示している。実際に、Adベクターを生体内に投与した場合、投与後多量のインターフェロンの産生が誘導されてく

ることからも、Adベクターによるインターフェロンの誘導メカニズムを解明し、それを回避する方法の確立が必須となっている。そこで次に、Adベクターによるインターフェロンの誘導メカニズムについて検討した。その結果、Adベクターを作用させた線維芽細胞では、TLR非依存的にインターフェロンの産生を誘導することが明らかとなった。近年、TLR以外の核酸受容体として retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) および melanoma differentiation-associated gene 5 (Mda5) が同定された。RIG-Iや

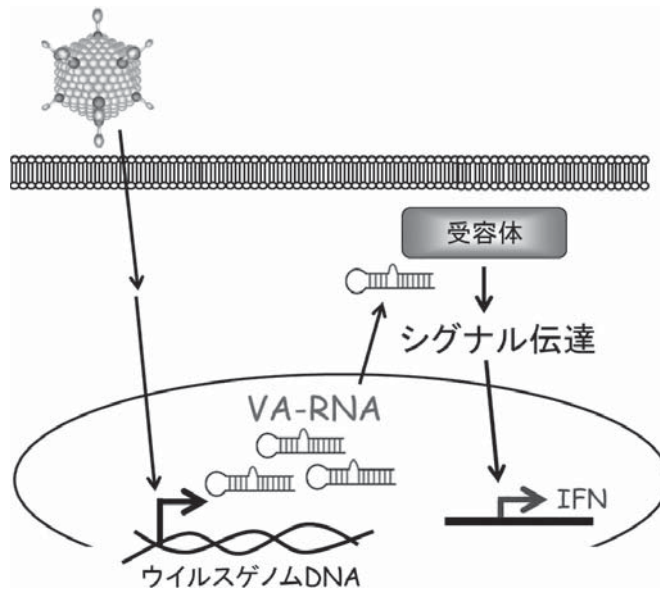


図4 Adから転写されるVA-RNAがインターフェロン産生に関与する

Adから転写されたVA-RNAが、RIG-Iなどの自然免疫受容体を介し、インターフェロンの産生を誘導することが明らかとなった。

Mda5は、IFN- β promoter stimulator 1 (IPS-1)とよばれるアダプター分子と会合し、下流にシグナルを伝えることがこれまでに報告されている。そこで、TLR非依存経路に関わる分子としてRIG-I、Mda5のアダプター分子であるIPS-1に着目し、IPS-1がAdベクターによるインターフェロンの産生に関与しているかどうかについてIPS-1欠損線維芽細胞を用いて検討した。その結果、線維芽細胞ではIPS-1依存的にインターフェロンの産生を誘導することが明らかとなり、RNAウイルスだけでなくAdのようなDNAウイルスの認識にもIPS-1シグナルが関与することが示された。一方、Adベクターによる樹状細胞でのインターフェロンの産生にはTLRやIPS-1シグナル以外の経路も関与している可能性が示唆された⁴⁾。

4. 自然免疫を活性化するAd側の因子の同定

ウイルスのいかなる構成分子が自然免疫応答を惹起しているかについて、ウイルス側因子の解析を試みた。自然免疫応答を惹起させるAdベクター側の因子としては、(1)ウイルスタンパク質、(2)ウイルスゲノムDNA、(3)ウイルスがコードする小分子RNAなどの転写産物が考えられる。そこで、ウイルスゲノムの複製とパッケージングに必要な領域以外

の全てのウイルス遺伝子を欠損させたヘルパー依存性Ad (HD-Ad)ベクターを用いて自然免疫応答を惹起するようなウイルス側因子の絞りこみを行った。その結果、Adベクターによる線維芽細胞および樹状細胞でのインターフェロンの産生にはカプシドタンパク質以外の因子が関与している可能性が示唆された。

そこで、Adがコードする小分子RNAであるvirus-associated RNA (VA-RNA)に着目した。VA-RNAはRNAポリメラーゼIIIによって転写されてくることから、まずRNAポリメラーゼIII阻害剤を用いて検討を行った結果、阻害剤の濃度依存的にインターフェロンの産生が抑制された。また、RNAポリメラーゼIII阻害剤作用群におけるVA-RNAの発現をノーザンプロットで解析したところ、VA-RNAの発現の低下が観察された。一方、二本鎖RNAであるpolyI:C作用群では阻害剤の濃度依存的なインターフェロンの産生は観察されなかった。なお、RNAポリメラーゼIII阻害剤作用条件下においてもAdベクターによる導入遺伝子の発現量には変化がなかったことから、Adベクターにより誘導されるインターフェロンの産生はRNAポリメラーゼIIIによって転写されるRNAを介して行われることが明らかとなった。また、VA-RNAの直接的関与について検討す

るために、plasmid DNAやVA-RNA欠損Adを用いて様々な検討を行った結果、インターフェロンの産生にはAdから転写されるVA-RNAが重要な役割を担っていることが示された(図4)⁴⁾。

5. ま と め

Adベクターにより惹起される炎症性サイトカインおよびインターフェロンの産生メカニズムについて検討した結果、樹状細胞での炎症性サイトカインの産生には自然免疫応答の代表的な受容体であるTLRが重要であることが示された。しかし、マクロファージによる炎症性サイトカインの産生には、TLRは必須でないことから、細胞種によってサイトカインの産生経路が異なることを明らかにした。また、樹状細胞においてインターフェロンの産生には、TLRおよびIPS-1シグナル以外の経路が重要である可能性が示唆された。また、線維芽細胞ではIPS-1がインターフェロンの産生において重要な役割を担っていることが示され、同じ細胞であっても炎症性サイトカインとインターフェロンとで産生経路が異なることが判明した。また、DNAを認識する受容体に関しては現在までに報告されている受容体だけでは説明がつかないことから、他にも受容体があると考えられており、今後さらなる解析が待たれる。

次に、研究があまり進んでいない自然免疫応答を惹起するウイルス側因子の同定を試みた。まず、ウイルスゲノムの複製とパッケージングに必要な領域以外の全てのウイルス遺伝子を欠損させたHD-Adベクターを用いることにより、Adベクターによるインターフェロン産生にウイルスの殻であるカプシ

ドタンパク質以外の因子が関与することを明らかにした。さらに、ウイルスの転写産物であるVA-RNAに着目し検討を行ったところ、樹状細胞や線維芽細胞においてVA-RNAを欠損させたAdを作用させると、インターフェロンの産生が有意に抑制されていたことから、Adによるインターフェロンの産生がVA-RNAにより惹起されている可能性が示された。自然免疫応答を惹起するウイルス側因子が同定できれば、より安全性の高い遺伝子治療ベクターが作成出来るようになるだけでなく、自然免疫応答をさらに増強することで強力なワクチンの開発にもつながることが期待される。

引 用 文 献

- 1) N. Koizumi, T. Yamaguchi, K. Kawabata, F. Sakurai, T. Sasaki, Y. Watanabe, T. Hayakawa, H. Mizuguchi, Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced IL-6 production, *J. Immunol.*, **178**, 1767–1773 (2007).
- 2) H. Sakurai, K. Tashiro, K. Kawabata, T. Yamaguchi, F. Sakurai, S. Nakagawa, H. Mizuguchi, Adenoviral expression of suppressor of cytokine signaling-1 reduces adenovirus vector-induced innate immune responses, *J. Immunol.*, **180**, 4931–4938 (2008).
- 3) T. Yamaguchi, K. Kawabata, N. Koizumi, F. Sakurai, K. Nakashima, H. Sakurai, T. Sasaki, N. Okada, K. Yamanishi, H. Mizuguchi, Role of MyD88 and TLR9 in the innate immune response elicited by serotype 5 adenoviral vectors, *Hum. Gene Ther.*, **18**, 753–762 (2007).
- 4) T. Yamaguchi, K. Kawabata, E. Kouyama, K. Ishii, F. Sakurai, T. Suzuki, S. Kurachi, K. Katayama, S. Akira, H. Mizuguchi, Induction of type I interferon by adenovirus-encoded small RNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17286–17291 (2010).