

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 20 年度～平成 21 年度

課題番号：20790145

研究課題名（和文） 肺胞マクロファージ活性化型／結核治療遺伝子製剤開発のための基礎研究

研究課題名（英文） The development of anti-tuberculosis gene drug inducing autophagy and activation of macrophages

研究代表者

藤原 成芳（FUJIWARA NARUYOSHI）

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：50365425

研究成果の概要（和文）：結核菌は代表的な細胞内寄生菌であり、体力や免疫力の低下に伴い発症する。主に肺胞マクロファージ内に潜伏感染することが知られており、この排除が結核の根治治療につながると考えられる。最近の報告からマクロファージ内においてオートファジーの誘導が結核菌の排除に有効であることが示されている¹⁾。またマクロファージの再活性化も重要と考えられる。

我々はマクロファージ内にオートファジーの誘導し、またマクロファージを活性化して結核菌を排除する遺伝子製剤の開発に向け研究を行って来た。まず始めに候補遺伝子製剤のクローニングを行い(IRF1,IRF3,IRF7,STAT1,TRAF6)、これを発現ベクター(CAT7neo)に組み込んだ。そのうち *Traf6* 遺伝子が効果的なオートファジーの誘導とマクロファージの活性化を誘導することを発見した。*Traf6* 遺伝子はコントロールと比べて約 2.5 倍のオートファジー誘導を示し(LC3-II 発現量)、約 2 倍のマクロファージ活性を誘導した (NO 産生能)。この結果より TLR 受容体下流のシグナル伝達分子をターゲットにした遺伝子製剤の可能性を示すことができた。また現在他の分子、遺伝子に関しても更なる検討を加えているところである。

また我々はこの遺伝子製剤を効果的に投与するためのドラッグキャリアーに付いても研究を進めた。我々がスプレードライ法で作成した粒子径約 2 μ m の PLGA 粒子は効果的に肺胞マクロファージに取り込まれ、かつ封入物質を徐放的にマクロファージ内に放出することが示されたことから効果的なドラッグキャリアーとして用いることが可能であると考えられる²⁾。またリポソームをベースにしたドラッグキャリアーに付いても検討を進め、遺伝子を効果的にマクロファージ内に導入することを示すことができた。これらの結果から、遺伝子製剤を効果的に細胞内に投与する手段も整えられつつあると考えている。

1) Gutierrez, M.G et. al. (2004) Cell 119, 753-766

T. Onoshita, N. Fujiwara et. al. (2010) Colloids and Surface B: Biointerfaces 76 151-157

研究成果の概要（英文）：Tuberculosis, which is caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), is one of the most frequently occurring infections in the world. MTB is an intracellular parasitic bacterium that mainly infects the respiratory tract and hides in alveolar macrophages (AMs). Recently, it was reported that induction of autophagy in macrophages eliminates MTB¹⁾. In this study, we tried to develop a gene drug for inducing autophagy and activating macrophages. The genes, which related to atophagy and macrophage activation were first cloned by PCR and recombined into the expression vector (CAT7 neo). Each gene was then transfected to mouse macrophage cell line, RAW267.4 by using an Amaxa system. After introducing genes, the effects of these gene drug candidates were examined. The induction of autophagy in macrophages and activation of macrophages by some of our gene drugs were confirmed by fluorescent microscopic observation and western blot analysis. Based on these findings, it was shown that the gene drugs were effective for MTB. At present, the side effects such as inflammation by introducing gene drugs into macrophages are being estimated and the other candidates for gene drugs which induce autophagy and activation of macrophages are being screened.

1) Gutierrez, M.G.. et al. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macro- phages. Cell 119, 753-766.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
21年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：医療薬剤学

1. 研究開始当初の背景

日本は世界の中で生活水準が高く、いわゆる先進国の1つであるが、欧米の先進国に比較して結核の罹患率が非常に高く問題となっている（約35%）。従って日本で小児期に行われているBCGが、成人の結核症を減少させているとは必ずしも言えない。むしろ最近になって特に幼年層の集団感染や高齢者の罹患率が高くなっている。これは結核菌が代表的な細胞内寄生菌であり感染しただけでは発病しないが、体力低下や免疫力低下などにより発病することに起因していると考えられる。何らかのきっかけで結核菌が肺内で増殖すると人間の免疫系はこれを全力で攻撃するため、肺内に重大な炎症状態を起こし、肺組織を破壊し、最終的に人間の生命を脅かす。よってあらかじめ寄生している結核菌を排除することは、発症を防ぐという意味においても非常に重要なことである。なお結核登録患者数は現在も増加しつつあり、依然として結核菌の感染源が残っていると示唆される。

2. 研究の目的

そこで肺細胞内に寄生した結核菌の排除と結核症の根絶を目指し、「肺胞マクロファージ活性化型結核治療遺伝子製剤」の開発を目的とし研究を進めた。

3. 研究の方法

- 1、遺伝子製剤の製剤部分のクローニング
PCR法を用いてクローニングを行い、pTA2ベクターへのTAクローニングの後、DNAシーケンスを行い配列の確認を行った。

MTRAF6 primer

Fw : GATCCTGAGCAGATCGACTGA

Rv : ACAAGTACATGGACGCTACAC

- 2、発現ベクターへの組み換え
pCAT7neoベクターおよびpcDNA3.1(+)
ベクターへの組み換えを行った。
- 3、オートファジーの検出
LC3-IIの発現量を指標としてウエスタンブロット法によって確認した。
- 4、マクロファージの活性化の検討
NO産生を指標としてグリース試薬を用いて確認した。
- 5、遺伝子製剤を封入するドラッグキャリアーの作成と導入検討
遺伝子製剤を導入するために、リポソームを作成した。リポソームの導入効率を検討するためにカルセインを封入した。

4. 研究成果

我々は結核菌除去においてオートファジーの重要性を考えていたが、最近の研究からオートファジー誘導にはToll様受容体(TLR)からのシグナルは効果的であることも判明しつつある¹²。シグナル伝達を考慮すると転写因子の1つであるTRAF6が重要である可能性が考えられた(図1)。TRAF6は

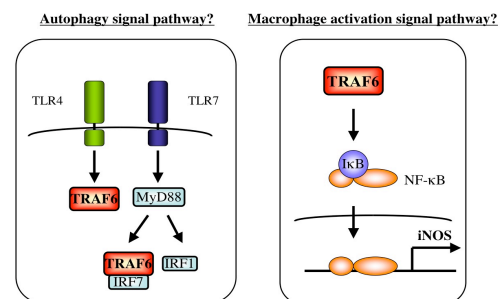


図1. オートファジーのキー転写因子: TRAF6

TLR下流でオートファジーに寄与する一方で、マクロファージの活性化の指標であるiNOSの産生にも寄与している。そこで本実

験では TRAF6 に着目して研究を進めた。PCAT7neo-TRAF6 ベクターをマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に遺伝子導入し(遺伝子導入システム Nucleofector™: LONZA)、24 時間後に細胞を回収した。細胞を 1%NP-40 buffer で可溶化しサンプル調整後 SDS-PAGE を行った。泳動後ニトロセルロース膜にトランスファーし抗 LC3 抗体でブロッティングを行った。その結果 LC3-II の発現増加が見られた(Fig. 1)。なお、オー

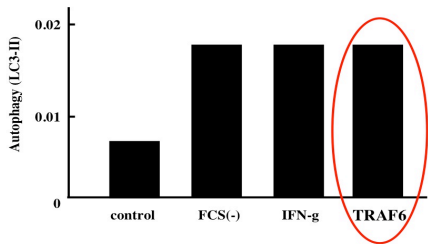


Fig. 1 Autophagy induction in RAW264.7 cells

トファジーが誘導されると、LC3-I の C 末端グリシンにホスファチジルエタノールアミンが共有結合し LC3-II となる。今回の TRAF6 の効果はポジティブコントロール実験である飢餓状態にした条件(FCS(-))と IFN- γ (85ng/ml)投与とほぼ同じレベルの亢進が見られ、このことから十分にオートファジーが誘導されていると思われる。

次にマクロファージ活性化の指標となる iNOS の発現が TRAF6 によって増加するか実験を行った。結核菌はマクロファージに潜伏するとマクロファージ内の活性酸素を除去してしまうので、マクロファージの殺菌力を低下させてしまうので、NO の産生誘導は重要であると考えられる。実験の結果、ポジティブコントロールである IFN- γ (85ng/ml)投与による 4 倍には及ばなかったものの、約 2 倍の産生亢進が見られた(Fig. 2)。この

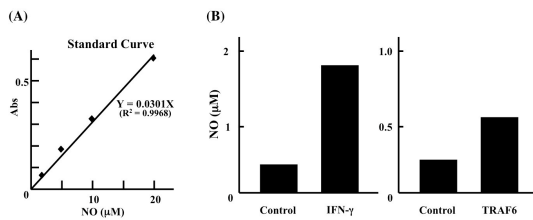


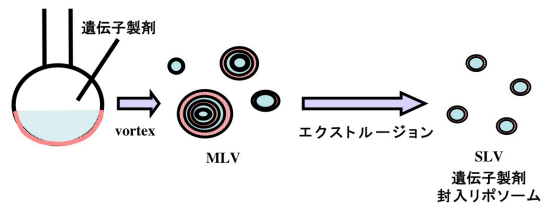
Fig. 2 NO productin in RAW264.7 cells

結果から TRAF6 によりオートファジーとマクロファージ活性化の両方が誘導できることが明らかとなった。しかし NO 産生に関してはまだ改善の余地があり、今後他の遺伝子製剤との混合投与も含め現在引き続き検討中である。

最後に将来的な臨床応用を考慮し、リポソームを遺伝子キャリアーとして用いることを検討した。リポソームは体内、血中内での遺伝子製剤の安定化を実現し、リポソ

ムの作成を工夫することにより目的の臓器にだけ遺伝子製剤を送達させることも可能である等の利点がある。また、その組成は生体構成成分と類似しているため生分解性に優れ細胞毒性も低減できる。今回は卵黄フォスファチジルコリンを主成分とする脂質膜を、Alexa488 でラベルした遺伝子を含む溶液で水和し、多重膜リポソーム(MLV)を作成した。その後、エクストルーダーによりサイジングを行い、粒子径を 100nm 付近に調整し遺伝子入りリポソームを作成した(図 2)。その結果遺伝子を封入したり

○リポソーム作製法



○リポソームの細胞への導入

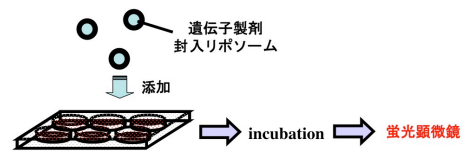


図2. 遺伝子製剤封入リポソームの作成

ポソームは高効率に細胞内に導入され (Fig. 3)、また大きな毒性も見られなかったこと

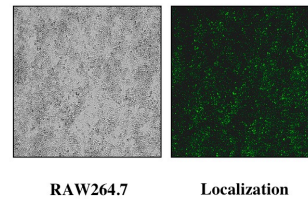


Fig. 3 RAW246.7 cells were treated with GFP labeling DNA encapsulated fusion type liposomes

から臨床への応用も可能であると考えられる。このリポソームを経肺投与法に、またリポソーム膜を肺胞にターゲットするための抗原や抗体等で修飾すれば静注でも利用できる可能性があると考えられる。

今回の実験から TRAF6 遺伝子の結核治療に於ける有用性とその遺伝子をリポソームに内封することで臨床応用の可能性も示すことができた。しかし遺伝子はターゲット以外のところで作用すると重大な副作用を誘導する可能性もある。従って現在は炎症等の副作用の可能性を検討し、また目的の治療部位・肺胞マクロファージに特異的にターゲットするための検討をしている。、また実際に TRAF6 遺伝子をリポソームに内封し、in vivo の実験に取り組む準備を行っているところである。

1. Monica, A. *et al.*, *EMBO J.*, 27: 1110-1121 (2008)
2. Gutierrez, M.G. *et al.*, *Cell*, 119: 753-766 (2004)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. T. Onoshita, N. Fujiwara *et al.* (2010) *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 76 151-157

[学会発表] (計 1 件)

1. Naruyoshi Fujiwara *et al.*
The development of anti-tuberculosis gene drug inducing autophagy and activating of macrophage.
2009 年、11 月 日本薬物動態学会 第 24 回年会 (ポスター)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 ()

研究者番号 :

(2)研究分担者 ()

研究者番号 :

(3)連携研究者 ()

研究者番号 :