

機関番号：84420

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790489

研究課題名 (和文) サイトカイン制御シグナル DNA 経口ワクチンによる炎症性腸疾患の  
新規治療法の開発研究課題名 (英文) Development of a novel therapy for inflammatory bowel disease by oral  
administration of DNA vaccine expressing suppressor of cytokine signaling.

研究代表者

辻村 祐佑 (TSUJIMURA YUSUKE)

独立行政法人 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・研究員

研究者番号：30512404

研究成果の概要 (和文)：

免疫応答のバランス制御の破綻は様々な免疫疾患に直結する。その制御に重要な役割を果たすのが Suppressor of cytokine signaling : SOCS である。本研究はこの SOCS を DNA ワクチンとして用い遺伝子免疫療法の可能性をマウスの腸炎モデルを用いて検討した。また、本研究では免疫反応の誘導が困難な粘膜における効率の良い粘膜免疫誘導を E 型肝炎ウイルス(HEV)のウイルス様中空粒子(VLP)を経口投与のベクターとして SOCS-DNA ワクチン投与を行い、DNA ワクチンの経口投与による新規治療法の確立を目指した。その結果、SOCS3-DNA ワクチンを投与することで、大腸炎の症状の緩和が認められた。また DSS 大腸炎モデルにおいては HEV-VLP に SOCS3 DNA を封入した経口ワクチンを使用することで、DNA ワクチンを全身投与するよりも効率的な治療ができる可能性が示唆された。今後は SOCS3 による大腸炎治療効果のさらに詳細を検討し、疾患治療や遺伝子治療の更なる可能性を検討していく。

研究成果の概要 (英文)：

Imbalance of immune responses cause immune diseases. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) plays a crucial regulatory role in immune response. To assess effectiveness the SOCS DNA vaccine as a therapeutic strategy, we evaluate the clinical assessments using the mouse model of DSS-induced colitis. In addition, We investigate whether hepatitis E virus-like particles (HEV-VLPs) could be utilized as a mucosal vaccine carrier vehicle for SOCS DNA and to stimulate mucosal. We may provide a means to developing a new therapeutic oral vaccination strategy for treating mucosal inflammation. In this study, we investigated the role of SOCS in the development of murine dextran sulfate sodium(DSS)-induced colitis, a model of colitis resembling human IBD. Development of colitis was significantly reduced in SOCS3, but not SOCS1, DNA injected mice treated with DSS. Moreover, SOCS3-DNA vaccine-encapsulated VLP oral administration is involved in suppression of the development of DSS-induced colitis efficiently compared with intraperitoneally injection of SOCS3 DNA vaccine. We found that our novel strategies by oral vaccine administration will lead up to new immune therapies available for induction of mucosal immune responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：粘膜免疫

## 1. 研究開始当初の背景

サイトカインは、生体にとって必要不可欠な細胞間情報伝達物質である。サイトカインはエリスロポエチン等の造血因子や免疫反応や炎症時にリンパ球や単球が分泌するインターフェロンやインターロイキンなどを含む一群のタンパク質性ホルモンである。サイトカインは生体反応を正の反応と負の制御を同時に進行させ恒常性を維持しており、それが破綻すると自己免疫疾患やアレルギー性疾患などの免疫異常に起因する疾患につながる。このようにサイトカインは恒常性の維持や免疫、炎症において極めて重要な役割を果たしている。免疫疾患の制御には、拮抗的に働くサイトカインや、減少・枯渇しているサイトカインの補充的投与および抗体によるサイトカインの産生抑制が主に報告されている。これらに関わる研究からサイトカインシグナルを負に制御するネガティブフィードバック調整因子として発見されたのが Suppressor of cytokine signaling (SOCS) であり、免疫恒常性維持において重要な制御分子であることが明らかにされてきた。そこでこの SOCS 分子の作用を人為的に増強あるいは減弱させることにより、破綻した免疫調整機構の制御や疾患の新規治療法の開発につながる可能性が考えられている。

一方、多くの疾患が粘膜を介して成立していることを考えると、粘膜面に特異的に免疫を誘導できれば効率的にワクチン効果を得られると考えられるが、粘膜免疫の特徴上、通常のワクチン抗原の皮下接種等では全身性に免疫誘導は可能でも、粘膜免疫の誘導は困難であり、抗原を粘膜面に直接投与しなければ誘導することはできない。粘膜面への抗原投与で最も簡便かつ安全なのは経口投与であるが、極端に低い pH や消化酵素等の存在により抗原が安定して粘膜に到達せず、免疫反応の誘導は困難である。その問題を解決し得る新たなデリバリツールとして、経口感染を示す E 型肝炎ウイルス(HEV)のウイルス様中空粒子(VLP)を DNA ワクチンのベクターとして用いる申請者ら独自の方法を試みる。VLP はウイルスの構造を有し、複製することができない空の粒子である。VLP の構造は元のウイルスと同じであり本来の感染標的細胞への結合能やその他の特徴は保持している。そこで本研究ではこれまでのコンセプトとは全く異なり、サイトカインを制御する遺伝子、SOCS を簡便かつ安全、さらに安価で

あり、保存性からも世界中で広く用いられる可能性がある DNA ワクチンとして用いる。またより効率的かつ効果的な新規治療法の確立を目指すため、経口投与による粘膜免疫誘導型のワクチンの開発を目的に、HEV-VLP を DNA ワクチンのベクターとして用いた治療効果の検討を行う。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は SOCS 分子の免疫異常を制御する DNA ワクチンとしての可能性の検討および HEV-VLP を DNA ワクチンのベクターとした粘膜免疫誘導型の新たな効率の良い治療法の開発である。そこで SOCS との関連性が報告されているヒト炎症性腸疾患のマウスモデルであるデキストラン硫酸ナトリウム誘導性腸炎(DSS 腸炎)の実験系を用いて SOCS DNA ワクチンの疾患制御や遺伝子治療における効果を検討し、特に経口 DNA ワクチンによる治療効果を申請者ら独自のツールである HEV-VLP を用いて検討する。また我々は SOCS1 のアンタゴニストとして働く SOCS1 dominant negative(SOCS1DN)の DNA ワクチンも作製しており、消化管粘膜において SOCS の機能を抑制することで生じる免疫反応の恒常性に対する SOCS の影響についても検討する。また、最近では SOCS が直接関与しているとされる疾患も数多く報告されており、こういった疾患においても SOCS の粘膜面における機能を把握し SOCS を標的とした治療法の開発を行うことは大変大きな意味を持つと考えられ、疾患治療や遺伝子治療に向けた基礎的データの集積を行う。

## 3. 研究の方法

ヒト炎症性腸疾患は狭義には潰瘍性大腸炎とクローン病の二つの慢性腸疾患を意味し、消化管の粘膜に炎症を生じ、免疫学的恒常性の異常によって引き起こされる。クローン病は Th1 優位の疾患、潰瘍性大腸炎は Th2 優位の疾患とされている。SOCS との関連も報告されており、実際ヒトの炎症性大腸炎の重症度と SOCS3 の発現誘導に相関性が確認されたこと、SOCS1 欠損マウスにおいて大腸炎の悪化が認められたことなど、SOCS の制御が炎症性大腸炎の治療につながる可能性が示唆されている。これらのことから本研究では、SOCS1, SOCS3 および SOCS1DN の DNA ワク

チンを作製し、HEV-VLP に封入し、経口投与したマウスにて誘導される粘膜免疫応答を評価し、粘膜免疫の異常による疾患に対する新規治療法の可能性を検討することを計画した。

(1) 実験動物として C57BL/6 マウスを使用した。6 週齢のメスのマウスを日本クレアから購入。飼育に関しては医薬基盤研究所が定める「実験動物規定」を遵守した。

(2) SOCS DNA ワクチンの作製

発現ベクター pCAGGS および pcDNA3.1 にマウス SOCS1, SOCS3, SOCS1DN 遺伝子の全長を挿入、クローニングを行った(図 1-②)。

(3) DNA ワクチン封入 HEV-VLP の作製

HEV-VLP は構成分子に Ca イオンを結合してウイルス粒子を構成している。そこで SOCS DNA ワクチン溶液内で EGTA+DTT により Ca イオンをキレートし、いったん VLP 構成分子間を広げ、その後 Ca イオンを再添加することにより DNA ワクチンを HEV-VLP 内に封入した。作製した VLP は電子顕微鏡にて構造確認を行った(図 1-③)。

(4) DSS 腸炎の誘導とワクチンの投与スケジュール (図 1-④-1)

飲料水に 3% の DSS を溶かし自由に与えた。その後は通常の飲料水に変更し解剖、解析日まで観察を続けた。また大腸炎の指標として、体重変化や下痢等の症状を観察した。ワクチン投与タイミングは DSS 水を与える 7 日前と当日にそれぞれ SOCS-DNA ワクチン (100ug) を腹腔内投与、SOCS-DNA 封入 VLP (100ug) を経口投与した。

(5) ワクチン効果の評価 (図 1-④-2)

① 大腸炎の重症度の指標として、解剖後に腸管の長さの測定を行った。

② DSS 投与前後、および SOCS DNA ワクチン投与前後のリンパ節細胞、腸管細胞の細胞数や population の変化をフローサイトメーターにて解析した。

③ GFP 発現ベクターを HEV-VLP に封入後マウスに経口投与し、経口的に腸管やリンパ組織を回収、解析。フローサイトメーターおよび PCR 法を用いて GFP の発現組織や発現細胞を検討した。

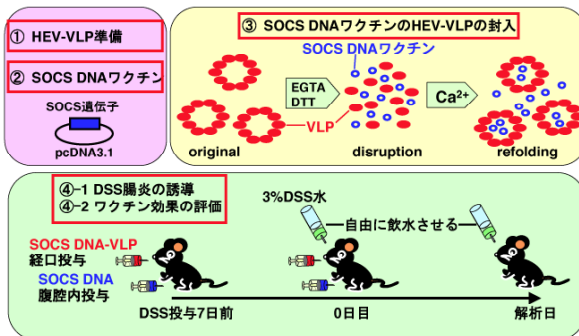


図1 研究の方法

#### 4. 研究成果

##### (1) DSS 腸炎の誘導

ヒト炎症性腸疾患のマウスモデルとして、DSS 誘導性腸炎の実験系を検討した。3% DSS を飲料水に溶かし、マウスに自由に飲ませたところ、4-5 日目に下痢や血便を確認。5-8 日目で体重の減少、8-10 日目に死亡が確認された。また大腸炎の重症度は DSS の濃度依存かつ投与期間依存性であることも腸管の長さの測定等から確認された(図 2)。



図2 DSS腸炎の誘導

① DSS腸炎の症状 ② DSS濃度依存的な大腸炎重症度の増加(5日目)

##### (2) SOCS DNA ワクチンの治療効果

DSS 誘導型の大腸炎モデルにおける SOCS の治療効果を検討するため、作製した SOCS1, SOCS3, SOCS1DN の DNA ワクチンそれぞれを腹腔内投与し大腸炎による体重変化への影響を観察した。その結果、SOCS3 DNA ワクチン投与群においてコントロール群で認められる体重減少および生存率低下の強い抑制効果が確認された。一方 SOCS1 投与群においては、若干の体重減少の回復は確認されたものの、生存率には差がなかった。また SOCS1 の作用を競合的に阻害する SOCS1DN 投与群では体重減少において SOCS1 投与群よりも強い回復効果が確認されたが、生存率には差がなかった。このことから DSS 誘導型大腸炎の制御および治療効果を SOCS3 が有する可能性が強く示唆された(図 3)。これは以前の報告とも一致するデータであった (*J.Exp.Med.* 2001; 193, 471-481)。

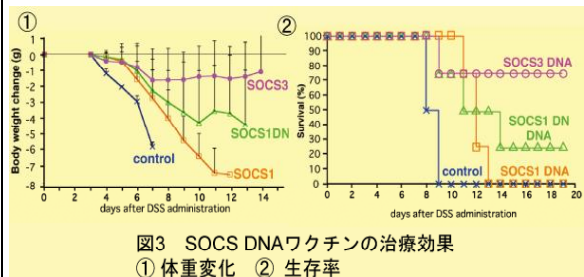


図3 SOCS DNAワクチンの治療効果

① 体重変化 ② 生存率

##### (3) SOCS DNA ワクチン封入 HEV-VLP の作製および封入効率

SOCS3 の DSS 誘導型大腸炎に対する DNA

ワクチンとしての有効性が確認されたので、DNA ワクチンを粘膜面に運搬できれば、さらに効果的な治療効果が期待できる。そこでさらに効率的でストレスの軽減などの利点も多い経口投与可能なワクチン開発を目指し、DNA ワクチン封入 HEV-VLP を作製した。HEV-VLP は Ca イオンを介した結合でウイルス粒子を構成している。これを利用し、DNA 溶液内で Ca イオンをキレートすることで、いったん VLP 構成分子間を広げ、その後 Ca イオンを再添加することで HEV-VLP を再構築し、DNA を封入した。封入された DNA 量を種々の大きさ DNA を用いて検討したところ、50ug の VLP に対して約 18ug の DNA が封入された (*Gene Therapy* 2004; 11, 628-635)。

(4) HEV-VLP 封入 SOCS DNA 経口投与ワクチンによる効率的な治療効果

SOCS1, SOCS3 および SOCS1DN-DNA ワクチンを HEV-VLP に封入し経口投与可能なワクチンを作製し、DSS 腸炎モデルを用いてそれぞれの治療効果について検討した。その結果、SOCS3 DNA-VLP 投与群においてコントロール群で認められる強い体重減少や生存率の低下が抑制された。しかし SOCS1 および SOCS1DN DNA-VLP 投与群において回復は認められなかった。これは DNA ワクチンを腹腔内投与した結果と同じ傾向であった。また SOCS1DN-VLP 投与群においてはコントロール群よりも大腸炎の重症度が高くなることが確認された(図 4)。この結果については今後より詳細な機構について実験を行う必要がある。

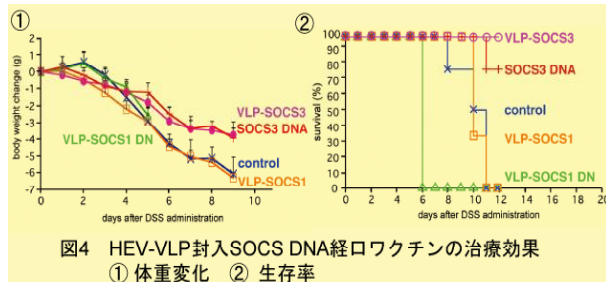


図4 HEV-VLP封入SOCS DNA経口ワクチンの治療効果  
① 体重変化 ② 生存率

(5) ワクチンベクターVLP による腸管粘膜での遺伝子発現誘導

SOCS3 DNA 封入 HEV-VLP の経口投与によって DSS 大腸炎に対する治療効果が確認された。そこで治療効果の更に詳細を検討するため HEV-VLP に GFP 発現プラスミドベクターを封入しマウスに投与することで GFP 陽性細胞を検出し HEV-VLP の標的細胞、標的組織の同定を試みた。その結果、腸上皮間リンパ球および腸管上皮細胞の層に GFP 陽性細胞が存在することがフローサイトメーターの解析にて確認された。また腸間膜リンパ節細胞に GFP が発現していることが PCR 法にて確認された。このことから HEV-VLP は

きちんと腸管粘膜に封入した DNA ワクチンを運搬すること。また運搬された DNA はきちんと所属リンパ節において発現されることが確認された(図 5)。

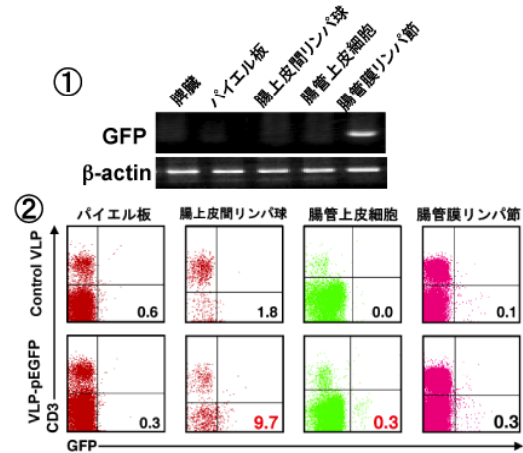


図5 HEV-VLPによる腸管組織での遺伝子発現誘導  
①PCR法と②フローサイトメーターによるGFP遺伝子の検出

(6) SOCS3 治療効果の機構解析

SOCS3 による大腸炎治療効果の機構を検証するため、SOCS3 DNA 投与により腸管に誘導される細胞群をフローサイトメーターにより確認した。その結果、CD4T 細胞に変化は認められなかった(control 群:11.1%→SOCS3 群:12.2%)が、粘膜固有層における制御性 T 細胞(1.4%→4.4%), γδ型 T 細胞(2.1%→4.6%)の増加が確認された。また CD8T 細胞の減少も確認された(46.0%→28.6%)(図 6)。

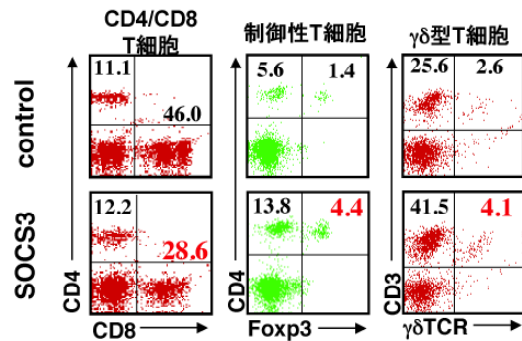


図6 SOCS3 DNA投与による粘膜固有層細胞の変化

最近γδ型 T 細胞と大腸炎の関係についての報告がされており、腸管における恒常性の維持(組織修復やヘルパーT 細胞の分化抑制等)に重要な役割をしていることが分かってきている。SOCS3 とγδ型 T 細胞の関係については今後検討する必要がある。また DSS 腸炎の発症機構は DSS の腸管上皮細胞に対する毒性効果とともに、粘膜層の破壊による腸管粘膜の透過性の増加、それによる粘膜下組織への抗原の侵入によると考えられている。このことから粘膜下層に侵入する CD8T 細胞の減

少は、大腸炎の重症度の抑制に関与しているのかもしれない。また最近大腸炎に関わる因子についての論文が多数報告されており、Th17 細胞や ROR $\gamma$ t 陽性 NK 細胞の産生する IL-17, IL-22 サイトカインや TLR5 陽性の樹状細胞なども重要な役割を担っている。今後はそれらの因子と SOCS 分子の関わりについても検討していく必要がある。

#### 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 4 件)

[学会発表] (計 4 件)

- (1) Tsujimura Y, Yasutomi Y. Therapeutic effects of Ag85B in allergic asthma by inducing not only Th1 response but also Interleukin-17, -22 production. Keystone Symposia. 2011. 3. 1. Fairmont Hotel Vancouver, Canada.
- (2) Tsujimura Y, Yasutomi Y. Therapeutic effects of Ag85B in allergic asthma by inducing not only Th1 response but also Interleukin-17, -22 production. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology. 2010. 8. 26. 神戸ポートピアホテル
- (3) Tsujimura Y, Yasutomi Y. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to allergic asthma by inducing Th1 response and Interleukin-17. 9<sup>th</sup> International Conference on new trends in Immunosuppression and Immunotherapy. 2010. 2. 5. Geneva, Switzerland.

[図書] (計 4 件)

辻村祐佑, 加藤翔太, 保富康宏. (2009). アレルギー疾患に対するワクチンの開発. PHARMSTAGE Vol. 8, No. 10. 14-20. 査読有り

[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

辻村 祐佑 (TSUJIMURA YUSUKE)  
独立行政法人 医薬基盤研究所・霊長類医  
科学研究センター・研究員  
研究者番号 : 3 0 5 1 2 4 0 4

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :