

平成21年 3 月 9 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591163  
 研究課題名（和文） 粘膜特異的サイトカイン発現能を有するウイルスベクターを用いた粘膜免疫療法  
 研究課題名（英文） The mucosal immunotherapy using virus vectors possessing specific expression capacity of a large cytokine in mucosal membranes  
 研究代表者 河野 光雄 (KAWANO MITSUO)  
 三重大学・大学院医学系研究科・講師  
 研究者番号：00234097

研究成果の概要： オボアルブミン(OVA)誘発喘息モデルマウスを用い、気道粘膜特異的にインターロイキン4(IL-4)アンタゴニスト発現能を有する非増殖型パラインフルエンザ2型ウイルス(PIV2)ベクターを経鼻投与することにより、喘息の症状改善を示す結果を得た。また、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発 Inflammatory bowel disease (IBD)モデルマウスの詳細な動態および IBD モデルマウスへの腸管粘膜特異的 IL-4 アンタゴニスト発現能を有する E 型肝炎ウイルス中空粒子(HEV-VLP)の経口投与により、IBD モデルマウスにおける体重減少の抑制、生存率の改善および腸管粘膜再生を促進する効果が得られた。これらの結果により、病態発現部位での粘膜免疫バランス是正による免疫疾患治療の可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ウイルス学、分子生物学、免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：PIV2、HEV-VLP、粘膜免疫、アレルギー、IBD、自己免疫疾患、免疫是正、IL-4 アンタゴニスト

## 1. 研究開始当初の背景

喘息をはじめとするアレルギー・アトピー性疾患は、我が国はもとより世界的に急増しており、その予防・治療は急務である。しかしながら、これらの疾患に対する遺伝子免疫療法は世界的に試みられているが未だ臨床現場で用いられているものはない。また、これらの疾患にはIL-4およびIL-13が関与して

いることが知られており、これらのサイトカインを抑制することにより予防・治療が可能であると考えられている。しかし、これらのサイトカインの抑制には、種々の問題があり実験例以外に報告はなく、また安全かつ有効な臨床的実用例の報告もない。このためにステロイドの投与が現在主流となり行われているが、ステロイドの長期投与は多くの問題

点を抱えている。

本研究では、この抑制をこれまでのサイトカインに対する抗体や非特異的免疫抑制剤であるステロイド等の使用とは全く異なる機序によりIL-4およびIL-13の刺激を抑制する。それはIL-4変異体投与によりレセプターには結合するがその下流には刺激を伝えないというもので、生体に存在するIL-4およびIL-13と拮抗的に働きその作用を遮断するものである[IL-4アンタゴニスト(IL-4a)]。このIL-4変異体は、大量に長期間投与しても抗体産生は認められないというIL-13からのシグナル伝達阻害を示すことから、喘息等のTh2タイプの免疫性疾患に有効利用できると考えられる。

我々が用いるIL-4変異体は、*in vitro*、*in vivo*の双方でIL-4刺激の阻害効果が認められており、*in vivo*においてはIL-4の半減期が極端に短いタンパク体を大量に持続的投与しなければ効果が認められず実際上の利用は困難である。そこで、我々はこれをタンパク体ではなく、分泌型蛋白を発現するDNAとして供与することで、一回の少量投与でも長期間効果が得られ、タンパク体とは異なり血中濃度は測定値以下でも効果が得られることを見いだした(Gene Ther. 10, 2119-2125: 2003)。さらに、我々は世界に先がけ気道粘膜特異的に感染し、ヒトに対してほとんど病原性をもたないパラインフルエンザ2型ウイルス(PIV2)ベクター (Virology. 284, 99-112: 2001)を開発した。このPIV2ベクターにTh2(液性免疫優位)移行を抑制するIL-4アンタゴニスト遺伝子を導入したウイルスベクターを作製し、喘息モデルマウスを用いた経鼻投与による予防・治療効果の検討においても、リンパ球の肺への浸潤等が抑えられておりTh1/Th2(細胞性免疫/液性免疫)バランス是正による遺伝子免疫治療の有用性を示唆する結果を得ている。

現在、実際の治療等に用いられているウイルスベクターは、安全性の観点から自己増殖能を欠損させたウイルスベクターであり、我々も新たにPIV2の発芽および粒子形成に必要な不可欠なM(マトリックス)蛋白遺伝子の2カ所にストップコドン挿入することにより自立増殖能のないPIV2ΔMベクターを開発した。さらに我々は、E型肝炎ウイルス様中空粒子(HEV-VLP)を用いHIV-env発現プラスミドDNAを封入し、マウスへの経口投与により腸管粘膜上皮からの粘膜免疫誘導を行った。その結果、粘膜面でのIgA分泌はもちろんであるが、発現プラスミドDNAそのものでは誘導することができなかったHIV-env

特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導にも成功した。

## 2. 研究の目的

パラインフルエンザ2型ウイルス(PIV2)は、ヒトに対する病原性が殆ど認められず、感染は気道粘膜に限定される。本ウイルスベクターは気道粘膜への遺伝子導入や、粘膜免疫における特徴(一カ所の粘膜免疫の誘導により全身全ての粘膜に免疫を誘導できる)からウイルスに対するワクチン療法および粘膜系の疾患に対する遺伝子免疫療法に用いることが可能である。また、同様にE型肝炎ウイルス様中空粒子(HEV-VLP)は、病原性を示さず腸管粘膜からの遺伝子導入が可能である。

喘息や他の粘膜系におけるアレルギー・アトピー性疾患ならびに自己免疫疾患である潰瘍性大腸炎は、粘膜局所における免疫反応が液性免疫優位(Th2)になっており、一方、自己免疫疾患であるクローン病は細胞性免疫優位(Th1)になっている。これらの疾患は、その免疫反応(Th1/Th2)の是正が疾患の治療・予防に働くことが知られている。

本研究では、それぞれの疾患様モデルマウスを用いて以下の研究を行う。

1) PIV2ベクターならびに新たに開発した自己増殖能をもたないM蛋白欠損型PIV2ベクター(PIV2ΔM)を用いて気道粘膜特異的にIL-4変異体(IL-4アンタゴニスト)分泌を行い、Th2移行抑制による喘息などのアレルギー性疾患に対する粘膜免疫療法の基礎的研究を行う。

2) HEV-VLPを用いて腸管粘膜特異的にIL-4アンタゴニスト分泌を行い、Th2移行抑制による自己免疫疾患である潰瘍性大腸炎に対する粘膜免疫療法の基礎的研究を行う。

本研究は、侵入門戸の異なるウイルスベクターを用いて病態発現部位の粘膜特異的にサイトカインを発現させ、その病態部位の免疫バランス是正により疾患の予防・治療を行うとする新しい試みである。

## 3. 研究の方法

**(1)OVA誘発喘息様モデルマウスを用いた気道粘膜特異的サイトカイン発現による治療効果の検討**

6週齢のBALB/c(♀)マウスにOVA(10μg)を実験開始日とその14日後に腹腔内注射により免疫し、実験開始日から21日目より5日間、ネブライザを用い、チャンバー内で20分間、5%OVA/PBSエアロゾル吸引により感作し、OVA誘発喘息様モデルマウスを作製した。これらのマウスに、実験開始日から20日後(感作1日前)にPIV2ΔM/IL-4a

( $1 \times 10^7$ TCID<sub>50</sub>)を経鼻投与した群と非投与群に分け(各群5匹)、肺胞洗浄液中の総細胞数と総タンパク量により治療効果の検討を行った。

## (2) DSS 誘導 IBD モデルマウスの作製と治療効果の検討

7週齢の C57BL/6J(♀)マウスに、平均分子量 40,000~50,000 の DSS を含む水を継続摂取させることにより IBD を誘発し、以下の2つの実験系で免疫是正による IBD の治療効果の検討を行った。

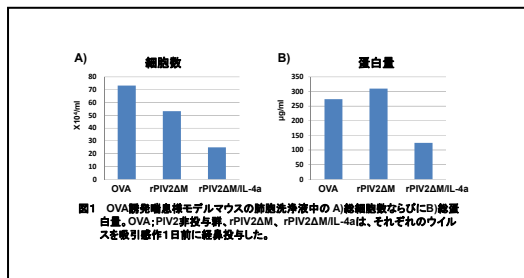
1) 3%DSS(W/V)継続摂取マウスに IL-4 アンタゴニストを封入した HEV-VLP(IL-4a) (50 μg/匹)をゾンデを用いて経口投与した群と非投与群に分け体重の増減と生存率を調べた。

2) 2%DSS(W/V)継続摂取マウスに HEV-VLP(IL-4a) (50 μg/匹)を投与した群と非投与群に分け体重の増減と大腸組織の HE 染色を行い経時的な炎症の推移と大腸の長さを比較した。

## 4. 研究成果

### 1) OVA 誘発喘息様モデルマウスを用いた気道粘膜特異的サイトカイン発現による治療効果の検討

BALB/c マウスを OVA で免疫し、その後 OVA エアロゾルの吸引による感作で誘発した喘息様モデルマウスを用いて、PIV2 ΔM/IL-4a ( $1 \times 10^7$ TCID<sub>50</sub>)の経鼻投与による喘息に対する治療効果の検討を行った。図1に示したように PIV2 ΔM/IL-4a を OVA 吸引感作1日前に経鼻投与したマウスでは、コントロール群(PIV2 ΔM の経鼻投与、非投与群)と比較して肺胞洗浄液(BAL)中の総細胞数ならびに総蛋白質量が著しく減少しており、PIV2 ΔM/IL-4a を用いた病態発現部位での免疫是正による粘膜免疫療法での喘息に対する治療効果の有効性が示唆された。



### 2) DSS 投与によるマウスの体重減少および大腸の萎縮

C57BL/6J マウスに 2%ならびに 3%DSS を飲料水にまぜ自由摂取を続け、実験的に IBD を誘発させたところ、DSS の濃度に関わらず摂取後 6 日目からマウスの体重が著しい減少を示した(図2)。3%DSS の摂取を続けたマウスにおいては、体重が減少しつづけ、摂取後 13

日で全てのマウスが血便を伴い死亡したが、2%DSS の摂取を続けたマウスでは、10 日目以降は徐々に体重増加がみられ 20 日目ではほぼ元の体重にまで回復した(図2)。また、IBD の進行に伴い体重減少とともに大腸の萎縮が観察された。図3に示したように 2%DSS の摂取を続けたマウスにおいて 6 日目から 9 日目まで著しい大腸の萎縮がみられた。一方、体重増加と同様に、20 日目には大腸の萎縮の程度が小さくなっており、体重減少と大腸萎縮に相関が認められた。

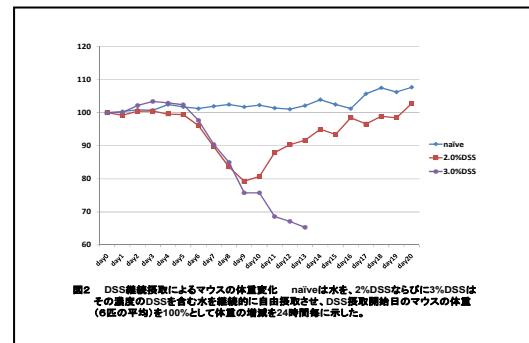


図2 DSS継続摂取によるマウスの体重変化 naiveは水を、2%DSSならびに3%DSSはその濃度のDSSを含む水を継続的に自由摂取させ、DSS摂取開始日のマウスの体重(6匹の平均)を100%として体重の増減を24時間毎に示した。

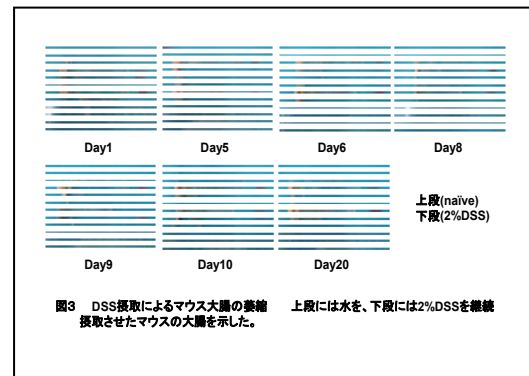


図3 DSS摂取によるマウス大腸の萎縮 上段には水を、下段には2%DSSを継続摂取させたマウスの大腸を示した。

### 3) DSS 摂取によるマウス大腸の病理組織学的検索

DSS 摂取によりマウス大腸の病理組織に関しても体重の減少に伴い著しい変化が認められた。体重減少のほとんど認められない 2%DSS 摂取 4 日までの大腸組織において、明らかな異常所見は認められなかった(図2、図4)。また、2%DSS 摂取 5 日では、一部の粘膜上皮細胞の剥離・脱落が見られ好中球を伴う炎症細胞浸潤像が認められた(図4)。一方、著しい体重減少のみられた 2%DSS 摂取 6~8 日においては、それと相関して大腸組織においては全周性に近く、ほとんどの粘膜上皮細胞の剥離・脱落と高度な炎症所見が認められた(図4)。2%DSS 摂取 9~10 日では、体重減少もややおさまる大腸組織では粘膜上皮細胞の剥離・脱落とともに一部では再生像が認められた(図4)。2%DSS 摂取 20 日では、一部粘膜のびらんが見られるものの多くは粘膜組織の修復がみられたが、再生した腺管は大小不同や分岐構造を含め粘膜筋板が

らの挙上が認められた (図4)。また、ヒトにおける潰瘍性大腸炎の腺管に類似していた。これらの結果は、体重減少と大腸の萎縮、組織学的変化に相関を認めた。

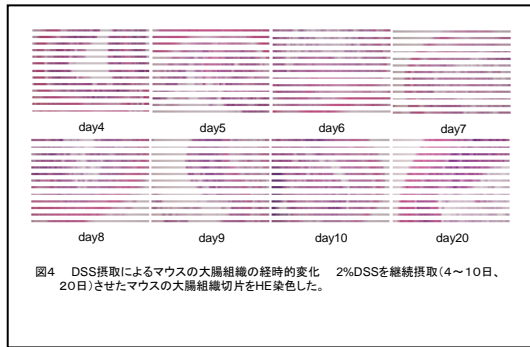


図4 DSS摂取によるマウスの大腸組織の経時的変化 2%DSSを継続摂取(4~10日、20日)させたマウスの大腸組織切片をHE染色した。

#### 4) IBD モデルマウスにおける HEV-VLP (IL-4a) 投与による治療効果

腸管粘膜での HEV-VLP (IL-4a) による IBD に対する治療効果を検討するために、3%DSS の摂取を続けたマウスに HEV-VLP (IL-4a) を 3 回投与 (DSS 摂取の 7 日前、摂取開始日、摂取 7 日目) した群と非投与群において、体重減少 (図5) と生存率 (図6) について比較した。非投与群のマウスは 3%DSS 摂取後 6 日目から著しい体重減少を示し、13 日目には約 35% の体重減少がみられ全てのマウスが死亡した (図6)。一方、HEV-VLP (IL-4a) を投与したマウスでは、3%DSS 摂取を 20 日間続けても約 90% 程度の体重を維持し、100% の生存率を示した (図6)。

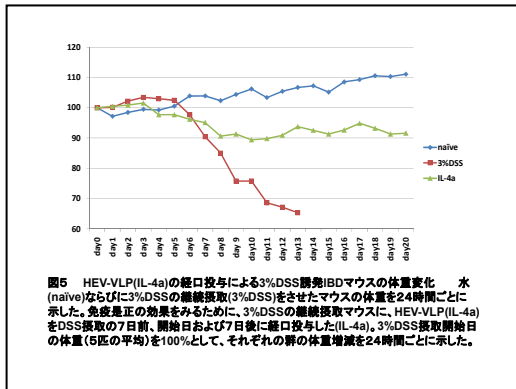


図5 HEV-VLP(IL-4a)の経口投与による3%DSS誘発IBDマウスの体重変化 水 (naive)ならびに3%DSSの継続摂取(3%DSS)をさせたマウスの体重を24時間ごとに示した。免疫是正の効果を見るために、3%DSSの継続摂取マウスに、HEV-VLP(IL-4a)をDSS摂取の7日前、開始日および7日後に経口投与した(IL-4a)、3%DSS摂取開始日の体重(5匹の平均)を100%として、それぞれの群の体重増減を24時間ごとに示した。

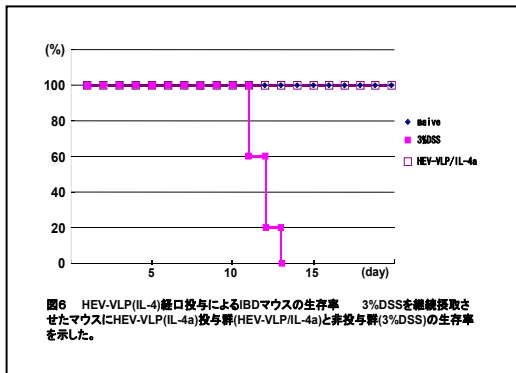


図6 HEV-VLP(IL-4a)経口投与によるIBDマウスの生存率 3%DSSを継続摂取させたマウスにHEV-VLP(IL-4a)投与群(HEV-VLP/IL-4a)と非投与群(3%DSS)の生存率を示した。

3%DSS の継続摂取においては、血便の程度や死亡時期等マウスの生体への影響が大きく、また組織の変性が激しいため病態解析にはマイルドな条件、2%DSS 継続摂取での解析を行った。2%DSS を継続摂取したマウスにおいて、HEV-VLP (IL-4a) を 2 回経口投与 (DSS 摂取開始 2 日前、摂取開始 3 日後) した群と非投与群について体重減少と病理組織学的検索を行った。図7に示したように HEV-VLP (IL-4a) 投与群は、非投与群に比べ体重減少が抑制された。2%DSS 摂取後 9 日の体重減少において、この 2 群間で有意差が認められ明らかな治療効果を示した。また、図8に示したように、2%DSS 摂取 9 日の時点で非投与群では、粘膜のびらん・剥離が持続したが、HEV-VLP (IL-4a) を経口投与した群においては、粘膜のびらん・剥離が一部残る部位もみられたが、多くの領域で腺管上皮に粘膜の再生修復像が認められた。これらの結果は、病態発現部位での粘膜免疫は正により免疫性疾患の治療が可能であることを示唆した。

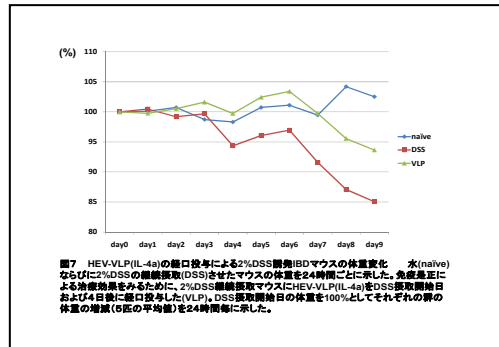


図7 HEV-VLP(IL-4a)の経口投与による2%DSS誘発IBDマウスの体重変化 水 (naive)ならびに2%DSSの継続摂取(DSS)をさせたマウスの体重を24時間ごとに示した。免疫是正による治療効果を見るために、2%DSS継続摂取マウスにHEV-VLP(IL-4a)をDSS摂取開始日および4日後に経口投与した(VLP)、DSS摂取開始日の体重を100%としてそれぞれの群の体重の増減(5匹の平均値)を24時間ごとに示した。

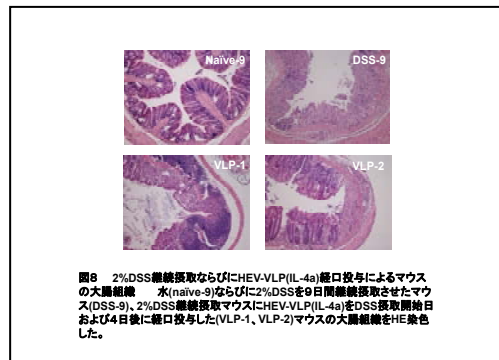


図8 2%DSS継続摂取ならびにHEV-VLP(IL-4a)経口投与によるマウスの大腸組織 水 (naive-9)ならびに2%DSSを9日間継続摂取させたマウス(DSS-9)、2%DSS継続摂取マウスにHEV-VLP(IL-4a)をDSS摂取開始日および4日後に経口投与した(VLP-1、VLP-2)マウスの大腸組織をHE染色した。

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 6 件)

1. Taoda N, Shinji E, Nishii K, Nishioka S, Yonezawa Y, Uematsu J, Hattori E, Yamamoto H, Kawano M, Tsurudome M, O'Brien M, Yamashita T, Komada H. Fucoidan inhibits parainfluenza virus type 2 infection to LLCMK2 cells. *Biomed Res.* 29: 331-334. (2008) 査読有
2. Tsurudome M, Nishio M, Ito M, Tanahashi S, Kawano M, Komada H, Ito Y. Effects of hemagglutinin-neuraminidase protein mutations on cell-cell fusion mediated by human parainfluenza type 2 virus. *J Virol.* 82: 8283-8295. (2008) 査読有
3. Katayama K, Kawano M, Naito I, Ishikawa H, Sado Y, Asakawa N, Murata T, Oosugi K, Kiyohara M, Ishikawa E, Ito M, Nomura S. Irradiation prolongs survival of Alport mice. *J Am Soc Nephrol.* 19: 1692-1700. (2008) 査読有
4. Yasui F, Kai C, Kitabatake M, Inoue S, Yoneda M, Yokochi S, Kase R, Sekiguti S, Morita K, Hishima T, Suzuki H, Karamatsu K, Yasutomi Y, Shida H, Kidokoro M, Mizuno K, Matsushima K, Kohara M. Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J Immunol.* 181: 6337-6348. (2008) 査読有
5. Yamakawa I, Tsurudome M, Kawano M, Nishio M, Komada H, Ito M, Uji Y, Ito Y. Failure of multinucleated giant cell formation in K562 cells infected with Newcastle disease virus and human parainfluenza type 2 virus. *Microbiol Immunol.* 51: 601-608. (2007) 査読有
6. Nishikubo K, Imanaka-Yoshida K, Tamaki S, Hiroe M, Yoshida T, Adachi Y, Yasutomi Y. Th1-type immune responses by Toll-like receptor 4 signaling are required for the development of myocarditis in mice

with BCG-induced myocarditis. *J Autoimmun.* 29: 146-153. (2007) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. 駒田洋、河野光雄、鶴留雅人、西尾真智子、伊藤守弘、伊藤康彦、パラインフルエンザ 4 型ウイルスの全遺伝子解析、第 56 回日本ウイルス学会、平成 20 年 10 月 27 日、岡山コンベンションセンター析、第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月 27 日、岡山コンベンションセンター
2. 鶴留雅人、西尾真智子、伊藤守弘、河野光雄、駒田洋、伊藤康彦、パラミクソウイルスの受容体結合蛋白(HN)による細胞融合(および細胞傷害)の制御機構、第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月 26 日、岡山コンベンショナルセンター
3. 鶴留雅人、西尾真智子、大塚順平、河野光雄、パラミクソウイルスの膜融合誘導における受容体結合蛋白と膜融合蛋白の相互作用：ドメインスワッピング法による膜融合蛋白 F 上の相互作用部位の解析、第 55 回日本ウイルス学会、2007 年 10 月 22 日、札幌コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 光雄 (KAWANO MITSUO)  
三重大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：00234097

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

保富 康宏 (YASUTOMI YASUHIRO)  
医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・センター長  
研究者番号：90281724