

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790215

研究課題名（和文） VA-RNAによる自然免疫誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism of VA-RNA-induced innate immune response

研究代表者 山口朋子（YAMAGUCHI TOMOKO）

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクト研究員

研究者番号：50580130

研究成果の概要（和文）：Doxycycline の添加によって VA-RNA の発現が誘導される 293 細胞を用いて適切な時期に VA-RNA 発現を誘導することで VA-RNA 欠損 Ad ベクターの産生・増幅に成功した。また、VA-RNA 欠損 Ad ベクターは従来型 Ad ベクターと同程度の遺伝子導入・発現活性を有することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We have developed a VA-RNA-deleted Ad (Ad $\Delta$ VR) vector, in which the transcriptional control elements of the VA-RNA-expression were deleted. Although conventional HEK293 cells did not support the propagation of the Ad $\Delta$ VR vectors, HEK293 transformants inducibly expressing VA-RNA I (VR293 cells) with appropriate induction of VA-RNA I expression allowed the propagation of the Ad $\Delta$ VR vector. The Ad $\Delta$ VR vector showed high transduction efficiency comparable to that of the conventional FG-Ad vector in the cultured cells. The Ad $\Delta$ VR vector may be a safer alternative to the FG-Ad vector.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：アデノウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

アデノウイルス (Ad) ベクターは既存のベクターの中では最も遺伝子導入効率に優れており、*in vivo* での遺伝子導入も可能なことから、種々の疾患に対する遺伝子治療用ベクターとして使用されている。しかし、比較的高い免疫原性が問題となっており、1999 年に実施された Wilson らのグループによる Ornithine transcarbamylase deficiency (OTC 欠損症) の遺伝子治療臨床研究の経過中、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、過剰量の Ad ベクターが全身投与されたことによる自然免疫応答の急激かつ過剰な活性化が原因とされており、遺伝子治療用ベクターに

より誘導される自然免疫応答を回避することが、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ことを世に示す形となった。

Ad ベクターを生体内に投与した場合に起こる副作用は、1) 投与直後に生じる自然免疫応答、2) 投与 1-2 週間後わずかに生じたウイルス蛋白質によって起こる細胞性免疫、および 3) ウイルスカプシドに対する液性免疫に大別される。このうち 2) および 3) のいわゆる獲得免疫応答に関しては、ウイルスゲノムのほとんどすべてを欠損させたヘルパー依存型 Ad (HD-Ad) ベクターやカプシド改変 Ad ベクターを用いることにより、回避可能である。一方、自然免疫応答に関する研究は、獲

## 得免疫応答に関する研究と比べて未解明な部分も多く、自然免疫応答を回避可能なベクターも開発されていないのが現状である。

近年、我々は、Ad ベクターによる自然免疫応答 (1) 細胞側のどのようなシグナルが Ad ベクターにより活性化されるのか? (2) Ad のどのような因子が免疫応答を惹起するのか? について今回明らかにした。ウイルスによる自然免疫活性化シグナルに重要とされる遺伝子 (MyD88、RIG-I、Mda5、IPS-1) の欠損マウス由来細胞に Ad ベクターを作用させた結果、RNA ウイルスによる免疫応答に関与することが知られている IPS-1 遺伝子欠損マウス由来細胞で Ad ベクターによる I 型インターフェロン (IFN) 産生が有意に抑制されていたことから、Ad ベクターによる IFN の産生には、IPS-1 が重要な役割を担っていることを明らかにしている。また、免疫応答を惹起する Ad 側の因子としては、Ad がコードする小分子 RNA (VA-RNA) に着目し、VA-RNA を産生しないヘルパー依存型 Ad (HD-Ad) ベクター (ウイルスゲノムをほぼ全て欠損した Ad ベクター) や、VA-RNA 欠損 Ad 作用群では、顕著な IFN の産生低下が観察されたことから、Ad ゲノムから転写される VA-RNA が細胞質内で自然免疫受容体に認識され、その後 IFN の産生を誘導する可能性をはじめて明らかにしている。

### 2. 研究の目的

Ad ベクターは、高効率に種々の細胞に遺伝子導入可能なことから遺伝子治療および基礎研究で汎用されている。しかしながら、Ad ベクターは生体内投与直後、強い自然免疫応答 (炎症性サイトカインや IFN の産生等) を惹起することが大きな問題となっている。Ad ゲノムから転写される VA-RNA によって IFN の産生が惹起されることがはじめて明らかになったことから、VA-RNA を欠損したより安全な遺伝子治療用ベクターの開発が期待される。しかし、VA-RNA がウイルス複製において重要な役割を担っていることから、VA-RNA 欠損 Ad ベクターは増殖能が乏しく、ベクターの大量調製が困難であるという問題点も有する。そこで、本研究では、現在大量調製が困難とされている VA-RNA 欠損非増殖型 Ad ベクターの大量調製法の開発を行う。また、Ad ベクターによって惹起される免疫応答のメカニズムをさらに詳細に解析することを試みる。

### 3. 研究の方法

#### VA-RNA 欠損非増殖型 Ad ベクターの大量調製法の開発

VA-RNA は、Ad 複製時にウイルス dsRNA による PKR の活性化を阻害する中心的な働きをしている。したがって、VA-RNA 欠損非増殖型 Ad ベクターは増殖能が乏しく、ベクターの大量調製が困難であるという問題点を有する。そこで本研究では、Ad ベクター開発の第一人者である水口裕之教授 (大阪大学大学院薬学研究科) の協力のもと Ad ベクター複製時にのみ VA-RNA を発現する 293 細胞を作成し、VA-RNA 欠損 Ad ベクターを効率良く作成することを試みる。また、VA-RNA が PKR の活性化を阻害することにより、ウイルス増殖を促進していることから、PKR 阻害剤などを用いて、VA-RNA 欠損非増殖型 Ad ベクターの作成を行う。

#### Ad ベクターによる免疫応答誘導メカニズムの解明

モデル遺伝子として  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) を発現する Ad ベクターを TBK1 欠損マウスに静脈内投与し、Ad 特異的あるいは  $\beta$ -gal 特異的な抗体産生について ELISA により評価した。静脈内投与後の自然免疫応答を明らかにするため、自然免疫応答に関わる各種サイトカインの遺伝子発現を定量的 RT-PCR で、ならびに血中濃度を ELISA により検討した。

### 4. 研究成果

#### VA-RNA 欠損非増殖型 Ad ベクターの大量調製法の開発

まず、Ad ベクター複製時にのみ VA-RNA を発現する 293 細胞を作成し、VA-RNA をトランスに補うことで、VA-RNA 欠損 Ad ベクターの作製を試みた。VA-RNA は自然免疫を誘導すること、また細胞周期に影響を与えることから、恒常的に VA-RNA を発現する細胞株の作製は困難と考え、薬物の添加により必要時に VA-RNA の発現を誘導可能な細胞株を作製した。その結果、Doxycycline の添加によって VA-RNA の発現が誘導される 293 細胞を用いて適切な時期に VA-RNA 発現を誘導することで VA-RNA 欠損 Ad ベクターの産生・増幅に成功した。また、VA-RNA 欠損 Ad ベクターは従来型 Ad ベクターと同程度の遺伝子導入・発現活性を有することが明らかとなった。

VA-RNA は、shRNA による RNAi 効果を阻害することが報告されているが、実際に shRNA を Ad ベクターによって発現させた場合の RNAi 効果が Ad ベクターゲノムより転写される VA-RNA により阻害されるかを詳細に検討した報告はない。そこで、VA-RNA 遺伝子を含むほぼ全てのウイルス遺伝子を取り除いた

ヘルパー依存型 Ad (HD-Ad) ベクター、ならびに VA-RNA 遺伝子を欠損させた Ad ベクターを用いて、VA-RNA が shRNA 発現 Ad ベクターによる RNAi 効果を阻害するか検討した。各種遺伝子に対する shRNA 発現 HD-Ad ベクターと、shRNA 発現従来型 Ad ベクターのノックダウン効率を比較したところ、shRNA 発現 HD-Ad ベクターは有意に高いノックダウン効率を示した。以上の結果より、VA-RNA は shRNA 発現 Ad ベクターによる RNAi 効果を阻害していることが示された。

また、VA-RNA を発現させることにより免疫応答をさらに増強する可能性があることから、今後、強力なワクチンを開発するためのアジュバンド開発にもつながることが期待される。

#### Ad ベクターによる免疫応答誘導メカニズムの解明

TBK1 欠損マウスにおいて Ad 特異的な抗体産生は減少傾向にあり、 $\beta$ -gal 特異的な抗体産生は有意に低下していた。また、自然免疫応答において重要な役割を果たす I 型 IFN の顕著な低下を認めた。すなわち、Ad ベクターによる免疫応答の誘導には Ad 由来の核酸が強いアジュバンド効果を発揮していることが強く示唆され、この分子メカニズムを利用することで従来よりも発現を長期間維持できるような Ad ベクターの開発に繋がる可能性を示した。

#### 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 2 件)

- (1) Machitani M., Katayama K., Sakurai F., Matsui H., Yamaguchi T., Suzuki T., Miyosho H., Kawabata K., Mizuguchi H.: Development of an adenovirus vector lacking the expression of virus-associated RNAs. *J Control Release*. 154: 285-9 (2011). doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.020
- (2) Machitani M., Yamaguchi T., Shimizu K., Sakurai F., Katayama K., Kawabata K., Mizuguchi H.: Adenovirus vector-derived VA-RNA-mediated innate immune responses. *Pharmaceutics*, 3: 338-353. (2011). doi:10.3390/pharmaceutics3030338

[学会発表] (計 6 件)

- 1 Mitsuhiro Machitani, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hayato

Matsui, Tomoko Yamaguchi, Takayuki Suzuki, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi; Development of a virus-associated RNA-deleted adenovirus vector: American society of gene & cell therapy 14<sup>th</sup> Annual Meeting, Seattle, May, 2011

- 2 Mitsuhiro Machitani, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hayato Matsui, Tomoko Yamaguchi, Takayuki Suzuki, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi: Development of adenovirus vector lacking the expression of virus-associated RNAs., The 6<sup>th</sup> Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, Seoul, Korea, June, 2011
- 3 山口朋子; アデノウイルスベクターによる自然免疫誘導メカニズムの解明: 第 36 回製剤セミナー(静岡): 2011 年 7 月 20-22 日 **Postdoctoral Presentation Award 受賞**
- 4 町谷充洋、形山和史、櫻井文教、立花雅史、山口朋子、鈴木孝幸、川端健二、水口裕之: アデノウイルス由来小分子 RNA (VA-RNA) の機能解析に向けた新規ベクターの開発; 第 11 回遺伝子デリバリー研究会(大阪): 2011 年 9 月 1 日-2 日
- 5 立花雅史、続木沙也加、山口朋子、庄司正樹、櫻井文教、川端健二、小檜山康司、石井健、審良静男、水口裕之: アデノウイルスベクターが惹起する自然免疫応答メカニズムの解析; 日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日
- 6 辺見昌久、続木沙也加、立花雅史、山口朋子、庄司正樹、櫻井文教、川端健二、小檜山康司、石井健、審良静男、水口裕之: アデノウイルスベクターワクチンによる抗原特異的な獲得免疫応答のメカニズム解明; 日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日

[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

山口 朋子 (YAMAGUCHI Tomoko)  
独立行政法人 医薬基盤研究所・創薬基盤  
研究部・プロジェクト研究員  
研究者番号：50580130