

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 6 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450450

研究課題名(和文) 遺伝子治療用アデノウイルスベクターによる糖脂質を介した自然免疫活性化の検討

研究課題名(英文) Innate immune response through glycolipids by adenovirus-vector

研究代表者

岡本 まり子 (Okamoto, Mariko)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：30415111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アデノウイルスベクターは既存の遺伝子治療用ベクターの中では最も遺伝子治療に利用されているベクターであり、獣医療における遺伝子治療(現状よりもさらに実現可能となった場合)においても効果が期待できる。しかし、アデノウイルスベクターには生体投与後に炎症性サイトカインを高産生誘導するなど、必要以上に自然免疫応答を惹起するという問題がある。細胞膜上に存在するスフィンゴ糖脂質はTLRシグナル等を調節している可能性が示唆されているが、アデノウイルスベクター投与による自然免疫応答活性化に関与しているかどうかについては、これまで全く明らかにされていない。そこで本研究課題ではこの点について検討した。

研究成果の概要(英文)：Adenovirus vectors are widely used in cancer gene therapies, and be expected to be effective also in gene therapy in veterinary medicine. However, there is a problem that adenovirus vectors induce innate immune responses more than necessary, such as inducing high production of inflammatory cytokines after administration. It has been suggested that glycosphingolipids on the cell membrane regulate TLR signals, but it has not been cleared whether or not these glycosphingolipids are involved in activation of innate immune response by adenoviral vector administration. In this study, we examined the involvement of glycosphingolipids in activation of innate immune response by adenoviral vector administration.

研究分野：獣医免疫・獣医遺伝子導入制御

キーワード：アデノウイルスベクター 糖脂質 自然免疫 炎症性サイトカイン 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

アデノウイルスベクターは既存の遺伝子治療用ベクターの中では最も遺伝子治療に利用されているベクターであり、獣医療において遺伝子治療(現状より、より実現可能になった場合に)においても効果が期待できる。しかし、アデノウイルスベクターには生体投与後に炎症性サイトカイン産生誘導など、自然免疫応答を惹起するという問題がありその対策が求められている。アデノウイルスベクターによる自然免疫応答活性化経路のひとつとして、細胞膜上の Toll-like receptors (TLR) の関与が明らかにされている。TLR と同様、細胞膜上に存在するスフィンゴ糖脂質は TLR シグナルを調節している可能性が示唆されているが、アデノウイルスベクター投与による自然免疫応答活性化に関与しているかどうかについては、これまで全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究課題ではスフィンゴ糖脂質合成酵素遺伝子、転移酵素遺伝子欠損マウスを使用し、アデノウイルスベクターによる糖脂質を介した自然免疫応答活性化について、炎症性サイトカイン産生誘導を指標にして解析し、細胞膜上の糖脂質が炎症性サイトカイン産生制御に関与しているかどうかについて検討した

3. 研究の方法

まず、a、b、c 系列のスフィンゴ糖脂質が存在しない gentamicin 3 Synthase (GM3S) 遺伝子ノックアウト (KO) マウスあるいは、GM3、GD3、GT3 のみしか存在しない N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAcT) 遺伝子 KO マウスより、チオグリコレート誘導性の腹腔マクロファージを単離した。またそれぞれのマウスより骨髓細胞を回収し、in vitro にてマクロファージあるいは樹状細胞に分化させた。そしてそれぞれの分化効率について解析した。次これらの細胞にアデノウイルスベクター (外来遺伝子として green fluorescent protein [GFP] 遺伝子を挿入してある) を作用させた。アデノウイルスベクターによる遺伝子導入率については GFP 蛍光を指標にして解析した。そして、アデノウイルスベクター作用後に炎症性サイトカインが誘導されたかどうかについて、mRNA 発現およびタンパク産生について解析を行った。

4. 研究成果

腹腔マクロファージの産生について調べた。WT および GM3S KO マウスの腹腔内へチオグリコレート投与後 3 日目に腹腔内の細胞を回収した。チオグリコレートにより誘導されるマクロファージ数は WT マウ

スに比べ、GM3S KO マウスで細胞数が多い傾向が見られた。得られた細胞についてマクロファージの細胞表面マーカーである F4/80 に対する抗体で染色し、Flow cytometry 法で解析した結果、腹腔マクロファージの分化は WT マウスと GM3S KO マウスで差がないことが示された。次に、WT, GM3S KO, GalNAcT KO マウスからそれぞれ骨髓 (BM) 細胞を回収した。回収量はマウス間で大きな差は見られなかった。これらの細胞を in vitro で分化させて BM マクロファージを得た。得られた細胞についてマクロファージの細胞表面マーカーである F4/80 に対する抗体で染色し、Flow cytometry 法で解析したところ、BM マクロファージの分化は WT マウスと GM3S KO マウス、GalNAcT KO マウス間で差がないことが示された。この結果より、GM3S、GalNAcT の欠失は BM マクロファージの分化、産生には影響を与えないことが明らかになった。同様に、各種マウス由来の BM 細胞を in vitro で分化させて BM 樹上細胞 (DCs) を得た。分化効率について解析したところ、WT マウスと GM3S KO マウスでは分化率に大きな差は認められなかった。一方、GalNAcT KO マウスでは WT、GM3S KO マウスに比べると分化率が高い傾向が見られた。この結果より、GM3S の欠失は BMDCs の産生には影響を与えないが、GalNAcT の欠失は BMDCs の分化を促進させる傾向があることが示唆された。

次に、各スフィンゴ糖脂質 KO マウス由来の腹腔マクロファージ、BM マクロファージ、BMDCs において、膜内にフィンゴ糖脂質が欠失することでアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率に差が出るかどうかについて検討した。まず、各マウスから調製した腹腔マクロファージにアデノウイルスベクターを作用させ、24 時間培養した。その後挿入遺伝子である GFP の発現を確認した。WT マウスの腹腔マクロファージにアデノウイルスベクターを作用させたところ、アデノウイルスベクターによる細胞へのダメージ、細胞死誘導による細胞数の減少などは見られなかった。そして、アデノウイルスベクターによって GFP 遺伝子が導入され、GFP が発現していることが確認された。GM3S および GalNAcT KO マウスの腹腔マクロファージにアデノウイルスベクターを作用させたところ、WT マウスと同様、アデノウイルスベクターによる細胞へのダメージ、細胞死誘導による細胞数の減少などは見られなかった。そして、GFP が発現していることが確認された。各マウスから調製した BM マクロファージにアデノウイルスベクターを作用させ、24 時間培養した。その後 GFP の発現を確認した WT マウスの BM マクロファージにアデノウイルスベクターを作用させたところ、アデノウイルスベクターによる細胞へのダ

ダメージ、細胞死誘導による細胞数の減少などは見られなかった。そして、アデノウイルスベクターによって GFP 遺伝子が導入され、GFP が発現していることが確認された。GM3S および GalNAcT KO マウスの BM マクロファージにアデノウイルスベクターを作用させた結果も同様であった。各マウスから調製した BMDCs にアデノウイルスベクターを作用させ、24 時間培養した。その後 GFP の発現を確認した。WT マウスの BMDCs にアデノウイルスベクターを作用させたところ、アデノウイルスベクターによる細胞へのダメージ、細胞死誘導による細胞数の減少などは見られなかった。そして、GFP が発現していることが確認された。GM3S および GalNAcT KO マウスの BMDCs にアデノウイルスベクターを作用させた結果も同様であった。これらの結果より、GM3S KO、GalNAcT KO マウス由来の腹腔マクロファージ、BM マクロファージ、BM DCs は WT マウス由来の細胞と同様アデノウイルスベクターによる遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。

次に、WT、GM3S KO、GalNAcT KO マウスより得られた腹腔マクロファージにアデノウイルスベクターを 24 時間作用させた。その後細胞を回収し、炎症性サイトカイン mRNA 発現について Real Time qPCR により測定した。WT マウス由来の腹腔マクロファージはアデノウイルスベクターに反応して、炎症性サイトカイン発現が誘導された。GM3S KO マウス由来の腹腔マクロファージでは、アデノウイルスベクター未作用時の炎症性サイトカイン発現は低く、アデノウイルスベクター未作用時の WT 腹腔マクロファージと同程度であった。一方アデノウイルスベクターを作用させた GM3S 欠損腹腔マクロファージでは高い炎症性サイトカイン発現が見られ、アデノウイルスベクター作用時 WT 腹腔マクロファージよりも明らかに発現が増加していた。GalNAcT KO 由来の腹腔マクロファージでは、アデノウイルスベクター未作用時の炎症性サイトカイン発現はほとんど見られず、アデノウイルスベクター未作用時の WT 腹腔マクロファージと同程度であった。一方アデノウイルスベクターを作用させた GalNAcT 欠損腹腔マクロファージでは顕著に高い炎症性サイトカイン mRNA 発現の誘導が見られ、アデノウイルスベクター作用後の WT 腹腔マクロファージのサイトカイン発現量を大幅に上回るものであった。これらの結果より、腹腔マクロファージにおけるアデノウイルスベクター作用によって誘導される炎症性サイトカイン発現については、GM3S、GalNAcT いずれかを欠損させると、発現量が WT マウスに比べ増加することが明らかとなった。しかしある炎症性サイトカインについては、アデノウイルスベクターを作用させた

GalNAcT KO 腹腔マクロファージでは高い mRNA 発現の誘導が見られたが、WT 腹腔マクロファージにアデノウイルスベクターを作用した時に誘導される mRNA 発現量よりも低かった。すなわち、腹腔マクロファージにおけるアデノウイルスベクター作用によって誘導されるある特定の炎症性サイトカイン mRNA 発現については WT に比べ、GM3S を欠損させると発現量が増加し、GalNAcT を欠損させると減少することがわかった。

次に、WT、GM3S KO、GalNAcT KO マウスより得られた BM マクロファージにアデノウイルスベクターを 24 時間作用させた。その後細胞を回収し、炎症性サイトカイン mRNA 発現について Real Time qPCR により測定した。WT マウス由来の BM マクロファージはアデノウイルスベクターに反応して、炎症性サイトカイン発現が誘導された。アデノウイルスベクターを作用させた GM3S KO マウス由来 BM マクロファージでは炎症性サイトカイン mRNA 発現誘導が見られたが、アデノウイルスベクター作用後の WT BM マクロファージよりも有意に発現は低かった。GalNAcT KO マウス由来の腹腔マクロファージでは、アデノウイルスベクターを作用させると未作用時に比べ高い炎症性サイトカイン mRNA 発現の誘導が見られたが、アデノウイルスベクター作用後の WT BM マクロファージの mRNA 発現量よりも低い発現であった。BM マクロファージにおけるアデノウイルスベクター作用によって誘導される炎症性サイトカイン mRNA 発現については、GM3S、GalNAcT いずれかを欠損させると、WT に比べ発現量が減少することが示唆された。これらの結果は腹腔マクロファージにアデノウイルスベクターを作用させたときに誘導される炎症性サイトカインにおける各 KO マウスの結果とは反対の結果であり、この原因については不明である。

次に、WT、GM3S KO、GalNAcT KO マウスより得られた BMDCs にアデノウイルスベクターを 24 時間作用させた。その後細胞を回収し、炎症性サイトカイン mRNA 発現について Real Time qPCR により測定した。WT マウス由来の BMDCs はアデノウイルスベクターに反応して、炎症性サイトカイン発現が誘導された。アデノウイルスベクターを作用させた GM3S KO マウス由来 BMDCs では炎症性サイトカイン mRNA 発現誘導が見られ、アデノウイルスベクター作用時の WT BMDCs よりも有意に mRNA 発現が増加していた。GalNAcT KO マウス由来の BMDCs では、アデノウイルスベクターを作用させると高い炎症性サイトカイン mRNA 発現の誘導が見られ、アデノウイルスベクター作用後の WT BMDCs の mRNA 発現量よりも有意に高い発現であった。これらの結果より、BMDCs におけるアデノウイルスベクター

作用によって誘導される炎症性サイトカイン発現については、GM3S, GaINAcT いずれかを欠損させると、WT に比べ発現量が増加することが明らかとなった。

次に、WT, GM3S KO, GaINAcT KO マウスより得られた腹腔マクロファージにアデノウイルスベクターを 24 時間作用させた。その後細胞培養上清を回収し、炎症性サイトカイン protein 発現について ELISA により測定した。WT マウス由来の腹腔マクロファージはアデノウイルスベクターに反応して、炎症性サイトカインタンパクの細胞培地中への分泌が認められた。GM3S KO マウス由来の腹腔マクロファージでは、アデノウイルスベクターを作用させると顕著な protein 発現が見られ、アデノウイルスベクター作用時の WT 由来腹腔マクロファージよりも明らかに培地中への分泌が増加していた。一方アデノウイルスベクターを作用させた GaINAcT KO マウス由来腹腔マクロファージでは高い protein 発現の誘導が見られたが、アデノウイルスベクター作用後の WT 腹腔マクロファージの炎症性サイトカイン protein 発現量と同程度であった。これらの結果より、腹腔マクロファージにおけるアデノウイルスベクター作用によって誘導される protein 発現については、GM3S を欠損させると、発現量が WT に比べ増加することがわかった。

次に、WT, GM3S KO, GaINAcT KO マウスより得られた BM マクロファージにアデノウイルスベクターを 24 時間作用させた。その後細胞培養上清を回収し、炎症性サイトカインの protein 発現について ELISA により測定した。WT マウス由来の BM マクロファージはアデノウイルスベクターに反応して、炎症性サイトカインタンパクの細胞培地中への分泌が認められた。GM3S KO マウス由来の BM マクロファージでは、アデノウイルスベクターを作用させると顕著な炎症性サイトカイン protein 発現が見られ、アデノウイルスベクター作用時の WT BM マクロファージよりも明らかに発現が増加していた。これは mRNA 発現の結果とは反対の結果である。しかし、GaINAcT KO 由来の BM マクロファージでも同様に、アデノウイルスベクターを作用させた GaINAcT KO マウス由来 BM マクロファージでは高い炎症性サイトカイン protein 発現の誘導が見られ、アデノウイルスベクター作用後の WT マウス由来 BM マクロファージの発現量よりも顕著に高い発現であった。これらの結果より、BM マクロファージにおけるアデノウイルスベクター作用によって誘導される炎症性サイトカイン protein 発現については、GM3S, GaINAcT いずれかを欠損させると、発現量が WT に比べ増加することが示唆された。すなわち両方の KO マウス由来の BM マクロファージ

で、アデノウイルスベクター作用時の炎症性サイトカイン protein 分泌が亢進している結果となった。

次に、WT, GM3S KO, GaINAcT KO マウスより得られた BMDCs にアデノウイルスベクター 24 時間作用させた。その後細胞培養上清を回収し、炎症性サイトカイン protein 発現について ELISA により測定した。WT マウス由来の BMDCs はアデノウイルスベクターに反応して、炎症性サイトカインタンパクの細胞培地中への分泌が認められた。GM3S KO マウス由来の BMDCs では、アデノウイルスベクターを作用させると顕著な protein 発現が見られ、アデノウイルスベクター作用時の WT マウス由来 BMDCs よりも明らかに炎症性サイトカイン protein 発現が増加していた。アデノウイルスベクターを作用させた GaINAcT KO マウス由来 BMDCs では高い protein 発現の誘導が見られ、アデノウイルスベクター作用後の WT マウス由来 BMDCs の protein 発現量よりも顕著に高い発現であった。これらの結果より、BMDCs におけるアデノウイルスベクター作用によって誘導される炎症性サイトカイン protein 発現については、GM3S, GaINAcT いずれかを欠損させると、発現量が WT に比べ増加することが明らかとなった。

GM3S が欠損することで a, b, c シリーズのスフィンゴ糖脂質がなくなり、残った o シリーズのスフィンゴ糖脂質が TLR 付近に集積し、その結果 TLR からのシグナルが増強している可能性が考えられる。GA2 や GD1c が TLR を膜上により安定させているのかもしれない。GaINAcT を欠損すると、GM3, GD3, GT3 しか残らないため、これらが炎症性サイトカイン産生増加に積極的に関与している、あるいは GM3, GD3, GT3 より下流のスフィンゴ糖脂質が本来、炎症性サイトカイン産生に抑制的に働いており、これらのスフィンゴ糖脂質が GaINAcT KO マウスでは生成されないため、炎症性サイトカインが増加した可能性がある。GaINAcT KO マウスと GM3S KO マウスの結果を合わせると、GM3, GD3, GT3 はアデノウイルスベクター作用による炎症性サイトカイン産生には正に働き、GM3, GD3, GT3 より下流のスフィンゴ糖脂質である GM2, GD2, GT2 は負に働いている可能性が見い出された。

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1件)

Okamoto M., Asamura A., Tanaka K., Soeda T., Watanabe K., Mizuguchi H. and Ikeda T. Expression of HIF-1 α ODD domain

fused canine caspase 3 by EGFR promoter-driven adenovirus vector induces cytotoxicity in canine breast tumor cells under hypoxia. Veterinary Research Communications 40(3), 131-139, 2016 (査読付)

〔学会発表〕(計6件)

浅村愛、田中光、添田岳史、渡辺京、池田輝雄、岡本まり子 アデノウイルスベクターを利用したイヌの癌治療に向けた human EGFR promoter, ODD domain および dog Caspase3 による腫瘍特異的発現の検討 第157回 日本獣医学会学術集会 2014

添田岳史、渡辺京、浅村愛、田中光、池田輝雄、岡本まり子 イヌの遺伝子治療用アデノウイルスベクターの開発に向けたプロモーター、ODD 差異による腫瘍特異性、導入遺伝子発現の比較 第157回 日本獣医学会学術集会 2014

田中光、渡辺京、池田輝雄、岡本まり子 FLP を利用したアデノウイルスベクターによる乳腺腫瘍にたいする遺伝子治療に向けた基礎検討 第158回 日本獣医学会学術集会 2015

Marika SATO, Teruo IKEDA, Mariko OKAMOTO Role of gangliosides in innate immune response elicited by adenovirus vectors 第44回 日本免疫学会学術集会 2015

渡辺京、池田輝雄、岡本まり子 遺伝子治療用アデノウイルスベクターへの利用に向けたイヌ HER2 プロモーターのクローニング 第159回 日本獣医学会学術集会 2016

森元美紗子、永根大幹、柴田悠貴、齊場遼介、岡本まり子、上家潤一、池田輝雄、山下匡 ガングリオシド GM3 はアレルギー性皮膚炎を抑制する 第89回 日本生化学会大会 2016

〔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
<https://lab-navi.azabu-u.ac.jp/vv-09/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
岡本まり子 (Okamoto Mariko)
麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：30415111

(2) 研究分担者
池田輝雄 (Ikeda Teruo)
麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：60151297

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()