

研究課題名	アレルギーに対する免疫寛容を誘導可能なアデノウイルスベクターの開発
フリガナ	タチバナ マサシ
代表者名	立花 雅史
所属機関（機関名） （役職名）	大阪大学大学院薬学研究科 薬剤学分野 助教
本助成金による発表論文，学会発表	該当なし

研究結果要約

アレルギーは過剰な免疫応答による疾患であることから、免疫応答を抑制することが一つの治療戦略である。肝臓は「免疫抑制」と関わりの深い臓器であり、アレルギー治療の標的の一つとして考えられる。遺伝子導入用ベクターとして広く用いられているアデノウイルスベクター(Adv)は、静脈内投与するとそのほとんどが肝臓に集積する性質を有することから、肝臓を標的とした遺伝子発現を達成するのに適したベクターであると考えられる。そこで本研究では、肝臓での抗原遺伝子発現の特異性を向上させた Adv を用い、肝臓特異的に抗原遺伝子を発現させることで抗原特異的な免疫寛容を誘導可能な方法論の確立を目指した。

肝臓特異的プロモーターである AHA プロモーターによって搭載抗原遺伝子発現を制御する新規 Adv (Adv-AHA)を静脈内投与すると、搭載抗原特異的な抗体産生が認められなかった。さらに、I 型 IFN がこの抗体産生抑制を担う重要な因子であることも明らかにした。

本研究成果は、効率的かつ安全に免疫寛容が誘導可能な Adv によるアレルギー治療法の開発に繋がるとともに、新たな免疫抑制療法の開発や臓器移植の際の免疫抑制剤の開発等にも貢献できると考えられる。以上のような新規治療法によって、近年増加している食物アレルギーを抑制でき、我が国の保健医療の向上に貢献できると期待される。

研究目的

食物アレルギーの発症メカニズムについては未だ不明な点が多く、根本的な治療法の開発には至っていない。根治を目指した治療戦略としては、アレルギーを惹起する食物（成分）に対する免疫寛容を誘導することが理想であると考えられる。

さて、肝臓は全身から大量の血液が集まる組織であり、その血液中には食物由来の栄養分や病原体由来成分などの多くの非自己の物質が含まれているものの、通常はそれらに対する免疫応答は起こらない。また一方で、臓器移植において肝臓は他の臓器に比べて生着率が高い臓器であることから、後天的な免疫寛容が成立する臓器であると考えられている^{1,2)}。これらの知見から我々は、アレルゲンを肝臓特異的に発現させることで、アレルゲン特異的な免疫寛容が誘導できるのではないかと考えた。

遺伝子導入用ベクターとして広く用いられている Adv は、静脈内投与するとそのほとんどが肝臓に集積する性質を有する。このことから、肝臓を標的とした遺伝子発現を達成するのに適したベクターであると考えられるが、Adv を用いて免疫寛容を誘導した報告は全くなされていない。

そこで本研究では、肝臓での抗原遺伝子発現の特異性を向上させた Adv を用い、肝臓特異的に抗原遺伝子を発現させることで抗原特異的な免疫寛容を誘導可能な方法論の確立を目指した。

研究計画及び研究手法

Adv を静脈内投与するとそのほとんどが肝臓に集積するが、免疫応答誘導の場である脾臓にも移行し、脾臓に存在する免疫担当細胞に Adv が感染することで搭載抗原に対する免疫応答が惹起されることが考えられる。そこで、免疫担当細胞での搭載抗原遺伝子の発現を抑制するために、本研究では肝臓特異的プロモーターとして AHA プロモーター（apolipoprotein E enhancer と human α 1-antitrypsin promoter の融合プロモーター）を選択し、その制御下に搭載抗原遺伝子を発現させるベクター(Adv-AHA)を用いることとした。本 Adv-AHA はすでに開発済みであり、静脈内投与した際に脾臓では搭載遺伝子の発現が認められないことを確認している。さらに、対照群の Adv (CMV プロモーター；ユビキタスプロモーター)では投与後 2 週間で搭載抗原に対する細胞性免疫ならびに液性免疫が十分に誘導されたのに対し、Adv-AHA 投与群では搭載抗原特異的な免疫応答が全く誘導されていなかった。

【食物アレルギーモデルマウスの作製と評価】

抗原タンパク(OVA)を週に 3 回、2 週間に渡って皮膚に塗布し（感作相）、3 週目に抗原タンパク(OVA)を経胃投与する（惹起相）ことで、その 1 週間後には抗原特異的な IgE 産生を始めとしたアレルギー症状が観察されると報告されている³⁾。我々が保有している Adv にはモデル抗原として β -galactosidase (β -gal)を搭載している。 β -gal ではこのマウスモデルが作製できない可能性が高かつ

たため、OVA を搭載した各種 Adv の作製を行っている。

【Adv システムの改良に向けたメカニズム解明】

I 型インターフェロン (IFN) 受容体ノックアウト(IFNAR2 KO)マウスに Adv-AHA を投与し、Adv による搭載抗原発現量について検討を行う。さらに、搭載抗原特異的な抗体産生量ならびに細胞傷害性 T 細胞(CTL)誘導効率について評価し、それらの持続期間について検討する。

β-gal reporter gene assay

Adv-CMV-LacZ、Adv-AHA-LacZ を野生型 (WT) マウスおよび IFNAR2 KO マウスに 3×10^{10} VP/mouse で尾静脈内投与し、投与後経日的に肝臓・脾臓を回収し β-gal 活性を測定した。β-gal 活性の測定は β-gal reporter gene assay kit のプロトコルに従って行った。なお、サンプル中のタンパク質濃度は Bio-Rad Protein Assay Kit を用いて測定した。

Adv ゲノム量の測定

肝臓における Adv ゲノム集積量の測定は、肝臓より DNA を抽出し、サンプル中の Adv ゲノムコピー数を TaqMan 2 x Fast Universal PCR Master Mix を用いて定量的 PCR により測定した。

β-gal 特異的 CTL の検出 ; Intracellular staining (ICS) assay

Adv-CMV-LacZ、Adv-AHA-LacZ を WT マウスおよび IFNAR2 KO マウスに尾静脈内投与し (Adv-CMV-LacZ, 5×10^9 VP/mouse; Adv-AHA-LacZ, 3×10^{10} VP/mouse)、投与後 2 週、4 週、6 週で脾臓および肝臓から単核球を単離した。固定及び細胞膜穿孔を行い、各種蛍光標識抗体で染色した細胞を洗浄した後 FACS buffer に懸濁し、フローサイトメーターで解析した。

結果と考察

前述のように、AHA プロモーターにて β-gal を発現させると β-gal に対する CTL および抗 β-gal 抗体がいずれも誘導されないことを明らかにした。すなわち Adv-AHA を用いた場合、何らかの免疫抑制因子が産生されていることが可能性の一つとして考えられた。そこで、肝臓特異的な搭載遺伝子発現による免疫抑制反応に及ぼす自然免疫シグナルについて検討するため、Adv 投与により誘導されるサイトカインである I 型 IFN に着目した。I 型 IFN は抗ウイルス作用を有するサイトカインとして古くから知られているが、近年免疫応答を抑制するという機能も報告されてきている⁴⁾。さらに、我々のこれまでの研究成果から、脾臓と肝臓では異なる制御メカニズムにより産生されることを明らかにしていることから⁵⁾、I 型 IFN は脾臓では免疫活性化因子として、肝臓では免疫抑制因子として機能しているのではないかと仮説を立てた。そこで、その受容体のサブユニットの一つである IFNAR2 のノックアウト (IFNAR2 KO) マウスを用いて種々の検討を行った。

<各 Adv による搭載遺伝子発現>

Adv-CMV-LacZ、Adv-AHA-LacZ を WT マウスおよび IFNAR2 KO マウスに投与し、投与後 2

日、2週、4週、8週で解剖し各組織におけるβ-gal活性とAdvゲノム量を測定した。その結果、肝臓における遺伝子発現は、Adv-CMV-LacZを投与したWTマウスでは投与2日後が最も高く、その後遺伝子発現は急激に低下し投与4週後においてはバックグラウンドレベルまで低下していた。またAdv-CMV-LacZを投与したIFNAR2 KOマウスでは投与4週後まで高い遺伝子発現が認められたが、投与8週後では遺伝子発現は消失していた。一方でAdv-AHA-LacZを投与すると、WTおよびIFNAR2 KOマウス共に投与2日後から8週後まで高い遺伝子発現が持続していた。脾臓における遺伝子発現は、WTおよびIFNAR2 KOマウス共にAdv-CMV-LacZを投与した群においてのみ搭載遺伝子発現が認められ、またその発現量も投与2日後が最も高くその後はバックグラウンドレベルまで低下していた。各Adv投与後の肝臓における経日的な遺伝子発現変化に大きな違いが認められたことから、投与したAdvの動態にも違いが認められるのではないかと考え、肝臓に集積したAdvゲノム量の経日的変化についても検討を行った。その結果、WTおよびIFNAR2 KOマウス共にAdv-CMV-LacZを投与した群では、遺伝子発現量と同様に投与2日後から8週後にかけて急激にAdvゲノム量の減少が認められた。一方でAdv-AHA-LacZを投与した場合は、WTおよびIFNAR2 KOマウス共に投与2日後においてはAdv-CMV-LacZ投与群と比較すると肝臓に集積したAdvゲノム量が減少していたが、その後投与8週後までAdvゲノム量の減少が認められなかった。以上の検討により、搭載遺伝子をユビキタスに発現するAdvを投与した場合の遺伝子発現は、Advゲノムが組織から速やかに排除されるために経日的に低下するが、IFNAR2 KOマウスではWTマウスに比べて長期間遺伝子発現が保たれることが明らかとなった。また搭載遺伝子を肝臓特異的に発現するAdvでは、投与直後から肝臓に集積したAdvゲノムの排除が起こりにくく、その結果投与8週後の時点まで搭載遺伝子発現が維持されることが明らかとなった。

<搭載遺伝子産物特異的な抗体産生>

各AdvをWTおよびIFNAR2 KOマウスに投与した際の搭載遺伝子産物特異的な抗体の産生についてELISAを行い評価した。その結果、β-gal特異的なIgGは、WTマウスではAdv-CMV-LacZ

投与群においては投与2週後から誘導され、8週後まで高い抗体価が維持されており、Adv-AHA-LacZ投与群では投与8週後まで全く誘導されていなかった。一方でIFNAR2 KOマウスでは、Adv-CMV-LacZ投与群においてはWTマウスと同様に投与2週後から誘導され、8週後まで高い抗体価が維持されていたが、Adv-AHA-LacZ投与群では、投与2週後では抗体は産生されていなかったが、その後徐々に産生されはじめ、投与8週後まで抗体価が経過的に上昇した。

次に、他のアイソタイプの抗体の誘導に関してもWTマウスとIFNAR2 KOマウスにおいて違いが認められるのではないかと考え、まず、抗原に対して最初に産生される抗体のアイソタイプであるIgM抗体の誘導について検討を行った。その結果、Adv-CMV-LacZ投与群ではWTおよびIFNAR2

KO マウス共に投与 2 週間のみで検出されたが、Adv-AHA-LacZ を投与した IFNAR2 KO マウスにおいては IgG 抗体と同様に投与 2 週間から経週の抗体価が上昇していた。また IgG 抗体からさらにクラススイッチし産生されるアイソタイプである IgE 抗体の誘導について検討を行ったところ、Adv-CMV-LacZ 投与群のみならず IFNAR2 KO マウスに Adv-AHA-LacZ を投与した群においても投与後抗体価が徐々に上昇する傾向が認められた。

以上の結果より、肝臓特異的プロモーターにて Adv の搭載遺伝子を発現させた場合、WT マウスでは搭載遺伝子産物特異的抗体は産生されないが IFNAR2 KO マウスでは産生されることが明らかとなった。特に、アレルギーの重症度と相関する IgE の産生量が Adv-AHA を用いることで完全に抑制されたのは大きな発見であった。さらに、IFNAR2 KO マウスでは IgE が産生されたことから、IgE の産生抑制には I 型 IFN を産生させることが重要であることを明らかにした。

<搭載遺伝子産物特異的な CTL 誘導>

Adv-CMV-LacZ あるいは Adv-AHA-LacZ を WT マウスおよび IFNAR2 KO マウスに尾静脈内投与後、経週の β -gal 特異的 CTL の存在比について ICS assay を行い検討した。その結果、Adv 投与後 2 週においては WT マウス、IFNAR2 KO マウスとも Adv-CMV-LacZ 投与群では β -gal 特異的 CTL の誘導が認められた。一方で、Adv-AHA-LacZ 投与群では、Adv-CMV-LacZ の 6 倍量の Adv を投与したものの、ほとんど β -gal 特異的 CTL の誘導は認められなかった。またこの傾向は Adv 投与後 4 週、6 週においても同様であった。以上の検討により、IFNAR2 KO マウスに肝臓特異的プロモーターにて Adv の搭載遺伝子を発現させた場合でも、WT マウスと同様に搭載遺伝子産物特異的な CTL が誘導されないことが示唆された。

CTL 誘導メカニズムと抗体産生メカニズムにおいて、I 型 IFN シグナルの寄与が異なることを示唆する結果であった。このことは、IgE 産生抑制のために I 型 IFN を産生させたとしても、CTL 誘導が起きないことを示唆するものであり、抗原発現細胞が排除されないことを示唆している。すなわち、抗原が持続的に発現することで免疫抑制も持続されることが期待され、加えて少なくとも CTL が原因となるような副作用は起きにくいことも期待される。

本実験系におけるメカニズムについては明らかにすることができたが、予定していた病態モデルを用いた検討が実施できなかった。今後は、そのデータも加え、学会発表や論文発表については 1 年後を目途に行いたい。

今後の研究活動について

Adv-AHA の全身投与により目的遺伝子を肝臓特異的に発現させるという簡便な方法によって、搭

載抗原に対する免疫寛容を誘導できれば、食物アレルギーに対する遺伝子治療の可能性が拓けると考えられ、アレルギー治療のブレイクスルーになることが期待される。さらには、過剰な免疫応答が原因である自己免疫疾患に対する新規治療法の開発に繋がる可能性がある。今後、本研究が成功を収めれば Adv を用いた遺伝子治療の進展にも大きく貢献できる。

Adv を用いた遺伝子導入による免疫寛容誘導のメカニズムを明らかにできれば、そのメカニズムにおける責任因子の強制発現やノックダウンなどが可能な Adv を開発することで、より効率的かつ安全に免疫寛容が誘導可能な Adv によるアレルギー治療法の開発に繋がるとともに、新たな免疫抑制療法の開発や臓器移植の際の免疫抑制剤の開発等にも貢献できると考えられる。さらに将来的には、Adv を用いた遺伝子導入による免疫寛容誘導のメカニズムを明らかにすることで、ウイルスベクターを用いずに、例えば目的遺伝子の発現プラスミドと低分子化合物などを用いて免疫寛容を誘導できるようになることも期待される。

以上のような新規治療法によって近年増加している食物アレルギーを抑制でき、我が国の保健医療の向上に貢献できると期待される。

参考文献

- 1) Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jan;3(1):51-62.
- 2) Thomson AW, Knolle PA. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol.* 2010 Nov;10(11):753-66
- 3) Muto T, Fukuoka A, Kabashima K, Ziegler SF, Nakanishi K, Matsushita K, Yoshimoto T. The role of basophils and proallergic cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously sensitized food allergy. *Int Immunol.* 2014 Oct;26(10):539-49.
- 4) Teijaro JR. Type I interferons in viral control and immune regulation. *Curr Opin Virol.* 2016 Feb;16:31-40.
- 5) Tsuzuki S, Tachibana M, Hemmi M, Yamaguchi T, Shoji M, Sakurai F, Kobiyama K, Kawabata K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. TANK-binding kinase 1-dependent or -independent signaling elicits the cell-type-specific innate immune responses induced by the adenovirus vector. *Int Immunol.* 2016 Mar;28(3):105-15.

以上