

(論文内容の要旨)

プラスミド DNA (pDNA) は安全性、生産性の観点から遺伝子治療を行なう上で有用な非ウイルスベクターである。しかしながら、細菌由来の DNA に特徴的な非メチル化 CpG 配列 (CpG モチーフ) が、マクロファージ (Mφ) や樹状細胞等の免疫担当細胞に Toll-like receptor-9 (TLR9) を介して認識され、腫瘍壊死因子-α (TNF-α) やインターロイキン-6 (IL-6) などの炎症性サイトカイン産生を惹起することが知られている。これらのサイトカインは、副作用のみならず遺伝子発現の抑制をも引き起こすため、より安全で有効な遺伝子治療の実現を目的として、pDNA によるサイトカイン産生を制御する試みが多数行なわれている。しかしながら、培養細胞における結果が、生体内に pDNA を投与した際に惹起される免疫応答を反映しないことも多く、pDNA に対する免疫応答の厳密な制御には、細胞レベルでの詳細な解析に加えて、個体に pDNA を投与した際の全身レベルでの評価が必須である。そこで本研究では、pDNA に対する免疫応答メカニズムの解明とその制御を目的に、pDNA 及びそのカチオン性リポソーム複合体 lipoplex によるサイトカイン産生について、炎症性サイトカイン及び、近年二本鎖 DNA による誘導現象が注目されている I 型インターフェロン (IFN) 誘導に関して、細胞及び個体レベルの両面から検討を行なった。

第 I 章 pDNA による初代培養マクロファージからの炎症性サイトカイン産生

細胞レベルでの免疫応答は、培養細胞株や種類の初代培養細胞を用いて議論されることが多く、これが pDNA 全身投与時の免疫応答との乖離の一因と推察される。そこで、腹腔 Mφに加えて、マウスの主要な臓器より脾臓 Mφ、肝クッパー細胞、腎メサンギウム細胞などを単離し、TLR9 発現量と naked pDNA および lipoplex に対する細胞活性化について評価した。その結果、腹腔 Mφとは異なり、肝クッパー細胞を含む肝非実質細胞および脾臓 Mφにおいて、高い TLR9 の発現が認められるとともに顕著な TNF-α産生が観察された。

一方、汎用されるマウス Mφ様培養細胞株 RAW264.7 では、初代培養細胞と比較して TLR9 発現は低いにも関わらず、pDNA 添加による TNF-α産生量は著しく高いことが示された。腹腔 Mφと RAW264.7 との比較検討から、この差は pDNA の細胞内取り込みでは説明できないことが示された。そこで、DNA 結合ドメインを有する細胞外マトリクスであるフィブロネクチン (FN) の関与について検討したところ、腹腔 Mφが大量の FN を細胞内外に発現していることが明らかとなった。そこで、FN を RAW264.7 に添加したところ、pDNA による TNF-α産生は FN 濃度依存的に抑制された。その一方で、FN は生理的二価カチオン濃度条件下では pDNA と結合せず、また pDNA の細胞内取り込み量や細胞内局在には影響を与えないことが明らかとなった。以上の結果から、FN はエンドソーム内で pDNA と TLR9 の結合を阻害することで、pDNA による Mφからの TNF-α産生を抑制する可能性が示唆された。

第II章 プラスミドDNA/カチオン性リポソーム複合体による I 型インターフェロン産生

近年、lipoplex として効率的に細胞内に取り込まれた DNA により、DNA 中の CpG モチーフの有無によらず I 型 IFN が産生されること、この反応に関与する因子として細胞質内で二本鎖 DNA を認識する Z-DNA binding protein 1 (ZBP1) が提唱された。

I 型 IFN は lipoplex による肺での遺伝子発現を強く抑制することが報告されており、炎症性サイトカインと同様に、その制御が重要である。そこでまず、IFN- β を指標に RAW264.7 への lipoplex 添加による I 型 IFN 産生について CpG モチーフを全く含まない pDNA である pCpG- Δ Luc と種々のカチオン性リポソームとの lipoplex を用いて検討した。その結果、確かに CpG モチーフ非依存的に IFN- β 、TNF- α が産生されること、その産生量は lipoplex を構成するリポソームの種類に依存することが明らかとなった。また、サイトカイン産生量は、lipoplex により誘導された ZBP1 mRNA 量と相関することも見出され、細胞質に効率的に分布する lipoplex が高いサイトカイン産生を示すことが明らかとなった。

次に、lipoplex をマウス静脈内に投与し、全身レベルでの I 型 IFN 産生について検討した。その結果、細胞レベルで認められた CpG モチーフ非依存的な IFN- β 産生は認められず、CpG モチーフと TLR9 に依存して IFN- β が産生されることが示された。また血清中に検出される IFN- β は、IL-6 や TNF- α と同様に組織 M ϕ などの貪食細胞において誘導されたものであること、特に肺に集積した単球の関与が示唆された。以上より、lipoplex をマウス静脈内へ投与した際に誘導される I 型 IFN は、炎症性サイトカインとは異なり CpG-TLR9 経路を介してのみ産生されることが示された。

以上、申請者は、naked pDNA および lipoplex に対する免疫応答に関して、細胞レベル、マウス個体レベルの両面から検討を行ない、pDNA による血中への炎症性サイトカイン産生に脾臓が関与していることを明らかにし、また FN がサイトカイン産生に抑制的に働くことを見出した。さらに、細胞レベルで認められた lipoplex による CpG モチーフ非依存的な I 型 IFN 産生は、リポソーム間で大きく異なること、またマウス個体レベルでは全く認められず、CpG モチーフ依存的に起こる I 型 IFN 産生には肺が関与することを明らかにした。本研究で得られた知見は、pDNA を用いた治療における有効性及び安全性の改善実現に向けて有益な情報を提供するものとする。

(論文審査結果の要旨)

プラスミド DNA (pDNA) は安全性、生産性の観点から遺伝子治療を行なう上で有用な非ウイルスベクターである。しかしながら、細菌由来の DNA に特徴的な非メチル化 CpG 配列 (CpG モチーフ) が、マクロファージ (Mφ) や樹状細胞等の免疫担当細胞に Toll-like receptor-9 (TLR9) を介して認識され、腫瘍壊死因子-α (TNF-α) やインターロイキン-6 (IL-6) などの炎症性サイトカイン産生を惹起することが知られている。これらのサイトカインは、副作用のみならず遺伝子発現の抑制をも引き起こすため、より安全で有効な遺伝子治療の実現を目的として、pDNA によるサイトカイン産生を制御する試みが多数行なわれている。しかしながら、培養細胞における結果が、生体内に pDNA を投与した際に惹起される免疫応答を反映しないことも多く、pDNA に対する免疫応答の厳密な制御には、細胞レベルでの詳細な解析に加えて、個体に pDNA を投与した際の全身レベルでの評価が必須である。そこで本研究では、pDNA に対する免疫応答メカニズムの解明とその制御を目的に、pDNA 及びそのカチオン性リポソーム複合体 lipoplex によるサイトカイン産生について、炎症性サイトカイン及び、近年二本鎖 DNA による誘導現象が注目されている I 型インターフェロン (IFN) 誘導に関して、細胞及び個体レベルの両面から検討を行なった。

第 1 章 pDNA による初代培養マクロファージからの炎症性サイトカイン産生

細胞レベルでの免疫応答は、培養細胞株や一種類の初代培養細胞を用いて議論されることが多く、これが pDNA 全身投与時の免疫応答との乖離の一因と推察される。そこで、腹腔 Mφに加えて、マウスの主要な臓器より脾臓 Mφ、肝クッパー細胞、腎メサンギウム細胞などを単離し、TLR9 発現量と naked pDNA および lipoplex に対する細胞活性化について評価した。その結果、腹腔 Mφとは異なり、肝クッパー細胞を含む肝非実質細胞および脾臓 Mφにおいて、高い TLR9 の発現が認められるとともに顕著な TNF-α産生が観察された。

一方、汎用されるマウス Mφ様培養細胞株 RAW264.7 では、初代培養細胞と比較して TLR9 発現は低いにも関わらず、pDNA 添加による TNF-α産生量は著しく高いことが示された。腹腔 Mφと RAW264.7 との比較検討から、この差は pDNA の細胞内取り込みでは説明できないことが示された。そこで、DNA 結合ドメインを有する細胞外マトリクスであるフィブロネクチン (FN) の関与について検討したところ、腹腔 Mφが大量の FN を細胞内外に発現していることが明らかとなった。そこで、FN を RAW264.7 に添加したところ、pDNA による TNF-α産生は FN 濃度依存的に抑制された。その一方で、FN は生理的二価カチオン濃度条件下では pDNA と結合せず、また pDNA の細胞内取り込み量や細胞内局在には影響を与えないことが明らかとなった。以上の結果から、FN はエンドソーム内で pDNA と TLR9 の結合を阻害することで、pDNA による Mφからの TNF-α産生を抑制する可能性が示唆された。

第 II 章 プラスミド DNA/カチオン性リポソーム複合体による I 型インターフェロン産生

近年、lipoplex として効率的に細胞内に取り込まれた DNA により、DNA 中の CpG モチーフの有無によらず I 型インターフェロン (IFN) が産生されること、この反応に関与する因子として細胞質内で二本鎖 DNA を認識する Z-DNA binding protein 1 (ZBP1) が提唱された。I 型 IFN は lipoplex による肺での遺伝子発現を強く抑制することが報告されており、炎症性サイトカインと同様に、その制御が重要である。そこでまず、IFN- β を指標に RAW264.7 への lipoplex 添加による I 型 IFN 産生について CpG モチーフを全く含まない pDNA である pCpG- Δ Luc と種々のカチオン性リポソームとの lipoplex を用いて検討した。その結果、確かに CpG モチーフ非依存的に IFN- β 、TNF- α が産生されること、その産生量は lipoplex を構成するリポソームの種類に依存することが明らかとなった。また、サイトカイン産生量は、lipoplex により誘導された ZBP1 mRNA 量と相関することも見出され、細胞質に効率的に分布する lipoplex が高いサイトカイン産生を示すことが明らかとなった。

次に、lipoplex をマウス静脈内に投与し、全身レベルでの I 型 IFN 産生について検討した。その結果、細胞レベルで認められた CpG モチーフ非依存的な IFN- β 産生は認められず、CpG モチーフと TLR9 に依存して IFN- β が産生されることが示された。また血清中に検出される IFN- β は、IL-6 や TNF- α と同様に組織 M ϕ などの貪食細胞において誘導されたものであること、特に肺に集積した単球の関与が示唆された。以上より、lipoplex をマウス静脈内へ投与した際に誘導される I 型 IFN は、炎症性サイトカインとは異なり CpG-TLR9 経路を介してのみ産生されることが示された。

以上、申請者は、naked pDNA および lipoplex に対する免疫応答に関して、細胞レベル、マウス個体レベルの両面から検討を行ない、pDNA による血中への炎症性サイトカイン産生に脾臓が関与していることを明らかにし、また FN がサイトカイン産生に抑制的に働くことを見出した。さらに、細胞レベルで認められた lipoplex による CpG モチーフ非依存的な I 型 IFN 産生は、リポソーム間で大きく異なること、またマウス個体レベルでは全く認められず、CpG モチーフ依存的に起こる I 型 IFN 産生には肺が関与することを明らかにした。本研究で得られた知見は、pDNA を用いた治療における有効性及び安全性の改善実現に向けて有益な情報を提供するものと考えられる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成 21 年 2 月 20 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。