

氏名	やす だ けい 安 田 圭
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 526 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 医 療 薬 学 専 攻
学位論文題目	Plasmid DNA uptake and subsequent cellular activation mechanisms in cultured mouse macrophages (培養マウスマクロファージにおけるプラスミド DNA の取り込みおよび活性化の機構に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 高 倉 喜 信 教 授 橋 田 充 教 授 乾 賢 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

プラスミド DNA (pDNA) は、ウイルス性ベクターと比較して調製が簡便で安全性の高いベクターとして遺伝子治療や DNA ワクチンとしての利用が期待されている。しかしながら、メチル化されていない CpG モチーフと呼ばれる細菌由来の DNA に特徴的な配列が存在するため、生体投与後マクロファージなどの免疫担当細胞が活性化し、その結果生じる炎症性サイトカインの誘導などが治療効果に重大な影響を及ぼすことが報告されている。pDNA を用いた治療を最適化するためには、これら免疫担当細胞における pDNA 取り込みならびに活性化の機構を明らかにする必要がある。当研究室では既に、マクロファージの pDNA 取り込みにおける特異的機構の存在を報告したが、その詳細については明らかではない。そこで著者は、pDNA の培養マクロファージにおける取り込み機構をフィブロネクチンとの相互作用に焦点をあてて検討すると共に、pDNA および遺伝子治療で汎用されるカチオン性リポソーム複合体による活性化に関して検討した。

#### I. 培養マウスマクロファージにおけるプラスミド DNA の取り込みに関する検討

細胞外マトリックスの構成成分であるフィブロネクチンには DNA 結合領域があることが知られている。そこで、pDNA のマクロファージ取り込みにおけるフィブロネクチンの関与について、フィブロネクチンと pDNA とを混合し、両者の結合性を検討した。その結果両者が結合すること、またこの結合は特定のポリアニオンの共存により阻害されることが示された。ここで得られた傾向は、初代培養の常在性腹腔マクロファージにおける pDNA の結合実験で得られたものと同様であった。次に、常在性マクロファージ、滲出性マクロファージおよび COS-7 細胞での pDNA の結合量と細胞表面に存在するフィブロネクチンの量との関係について検討したところ、両者の間には相関傾向が認められた。以上の結果より、pDNA のフィブロネクチンへの結合がマクロファージによる取り込みに少なくとも一部関与している可能性が示された。

#### II. 培養マウスマクロファージにおけるプラスミド DNA による炎症性サイトカイン放出

次に、pDNA によるマクロファージ活性化機構を検討した。CpG モチーフは細胞内に存在する Toll-like receptor-9 (TLR-9) に認識されて活性化を引き起こすことが知られている。しかし、活性化の評価には、ほとんどの場合一本鎖で 20mer 前後のヌクレアーゼ耐性であるホスホロチオエート体オリゴデオキシヌクレオシド (S-ODN) が用いられ、構造的特徴が大きく異なる pDNA に関する情報は乏しい。そこで、マウス腹腔マクロファージおよびマウスマクロファージ培養細胞株を用い、細胞から放出される腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) およびインターロイキン 6 などのサイトカインを指標に pDNA による活性化を評価した。まず RT-PCR により腹腔マクロファージ、培養細胞における TLR-9 の mRNA の発現を確認した。また S-ODN の添加によって TNF- $\alpha$  が産生されたことより、腹腔マクロファージにおいて CpG モチーフによる活性化が誘導されることが確認された。しかし pDNA 添加時には、培養細胞株が TNF- $\alpha$  を産生したのに対し、腹腔マクロファージでは全く TNF- $\alpha$  の放出が認められなかった。細胞内移行量が少ないことにより TLR-9 に認識されない可能性を考え、各細胞での pDNA 取り込み量を検討したところ、腹腔マクロファージは培養細胞株よりもむしろ効率よく pDNA を取り込むことが明らかとなった。次に DNA の形状が影響している可能性を検討するため、超音波処理により低

分子化あるいは熱処理で一本鎖にした pDNA を用いた実験を行った。しかし腹腔マクロファージでは TNF- $\alpha$  は誘導されなかった。また、TLR-9 に認識される以前に pDNA が分解している可能性を考え、pDNA 分解活性を比較したが、両細胞でほとんど違いは見られなかった。そこで、蛍光標識した pDNA および S-ODN を用いて、取り込み後の細胞内での局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、同時に取り込ませた二種類の DNA の大部分は腹腔マクロファージにおいて別々の細胞内部位に存在しており、pDNA が S-ODN とは異なる細胞内動態を示すことが TLR-9 を介する活性化が誘導されない一因となっている可能性が示唆された。

### Ⅲ. プラスミド DNA/カチオン性リポソーム複合体による炎症性サイトカインの放出およびその機構

さらに、遺伝子キャリアーとして用いられるカチオン性リポソームと種々の DNA との複合体を調製し、マクロファージの活性化を評価した。CpG モチーフを含む pDNA および *E. coli* DNA との複合体により、有意なサイトカイン誘導が認められた。ところが、CpG モチーフを含まない牛胸腺 DNA および CpG モチーフ中のシトシン基をメチル化することによって活性を失わせた pDNA の場合にも、同様の活性化が起こることが示され、カチオン性リポソームと複合体化することにより、CpG モチーフ非依存的な活性化が惹起されることが明らかとなった。さらに、サイトカラシン B およびモネンシンを共存させたところ、サイトカインの分泌量は有意に減少し、この活性化現象には複合体のエンドサイトーシスとそれに引き続いて起こるエンドソーム酸性化が必要であることが示唆された。

以上、著者は従来情報の乏しかったマクロファージにおける pDNA の細胞取り込み機構と pDNA あるいはカチオン性リポソーム複合体による活性化機構を検討し、基礎的情報を得た。これらの知見は、炎症性サイトカインにより効果が抑制される遺伝子治療、逆に炎症性サイトカインにより効果の増強される DNA ワクチンなどの pDNA を用いた治療法において有用な情報となるものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

プラスミド DNA (pDNA) は、ウイルス性ベクターと比較して調製が簡便で安全性の高いベクターとして遺伝子治療や DNA ワクチンとしての利用が期待されている。しかしながら、メチル化されていない CpG モチーフと呼ばれる細菌由来の DNA に特徴的な配列が存在するため、生体投与後マクロファージなどの免疫担当細胞が活性化し、その結果生じる炎症性サイトカインの誘導などが治療効果に重大な影響を及ぼすことが報告されている。pDNA を用いた治療を最適化するためには、これら免疫担当細胞における pDNA 取り込みならびに活性化の機構を明らかにする必要がある。当研究室では既に、マクロファージの pDNA 取り込みにおける特異的機構の存在を報告したが、その詳細については明らかではない。そこで著者は、pDNA の培養マクロファージにおける取り込み機構をフィブロネクチンとの相互作用に焦点をあてて検討すると共に、pDNA および遺伝子治療で汎用されるカチオン性リポソーム複合体による活性化に関して検討した。

細胞外マトリックスの構成成分であるフィブロネクチンには DNA 結合領域があることが知られている。そこで、最初に pDNA のマクロファージ取り込みにおけるフィブロネクチンの関与について、フィブロネクチンと pDNA とを混合し、両者の結合性を検討した。その結果両者が結合すること、またこの結合は特定のポリアニオンの共存により阻害されることが示された。ここで得られた傾向は、初代培養の常在性腹腔マクロファージにおける pDNA の結合実験で得られたものと同様であった。次に、常在性マクロファージ、滲出性マクロファージおよび COS-7 細胞での pDNA の結合量と細胞表面に存在するフィブロネクチンの量との関係について検討したところ、両者の間には相関傾向が認められた。以上の結果より、pDNA のフィブロネクチンへの結合がマクロファージによる取り込みに少なくとも一部関与している可能性が示された。

次に、pDNA によるマクロファージ活性化機構を検討した。CpG モチーフは細胞内に存在する Toll-like receptor-9 (TLR-9) に認識されて活性化を引き起こすことが知られている。しかし、活性化の評価には、ほとんどの場合一本鎖で 20mer 前後のヌクレアーゼ耐性であるホスホロチオエート体オリゴデオキシヌクレオシド (S-ODN) が用いられ、構造的特徴が大きく異なる pDNA に関する情報は乏しい。そこで、マウス腹腔マクロファージおよびマウスマクロファージ培養細胞株を用い、細胞から放出される腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) およびインターロイキン 6 などのサイトカインを指標に pDNA による活性化を評価した。まず RT-PCR により腹腔マクロファージ、培養細胞における TLR-9 の mRNA の発現を確認した。また S-ODN の添加によって TNF- $\alpha$  が産生されたことより、腹腔マクロファージにおいて CpG モチーフに

よる活性化が誘導されることが確認された。しかし pDNA 添加時には、培養細胞株が TNF- $\alpha$  を産生したのに対し、腹腔マクロファージでは全く TNF- $\alpha$  の放出が認められなかった。細胞内移行量が少ないことにより TLR-9 に認識されない可能性を考え、各細胞での pDNA 取り込み量を検討したところ、腹腔マクロファージは培養細胞株よりもむしろ効率よく pDNA を取り込むことが明らかとなった。次に DNA の形状が影響している可能性を検討するため、超音波処理により低分子化あるいは熱処理で一本鎖にした pDNA を用いた実験を行った。しかし腹腔マクロファージでは TNF- $\alpha$  は誘導されなかった。また、TLR-9 に認識される以前に pDNA が分解している可能性を考え、pDNA 分解活性を比較したが、両細胞でほとんど違いは見られなかった。そこで、蛍光標識した pDNA および S-ODN を用いて、取り込み後の細胞内での局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、同時に取り込ませた二種類の DNA の大部分は腹腔マクロファージにおいて別々の細胞内部位に存在しており、pDNA が S-ODN とは異なる細胞内動態を示すことが TLR-9 を介する活性化が誘導されない一因となっている可能性が示唆された。

さらに、遺伝子キャリアーとして用いられるカチオン性リポソームと種々の DNA との複合体を調製し、マクロファージの活性化を評価した。CpG モチーフを含む pDNA および E.coli DNA との複合体により、有意なサイトカイン誘導が認められた。ところが、CpG モチーフを含まない牛胸腺 DNA および CpG モチーフ中のシトシン基をメチル化することによって活性を失わせた pDNA の場合にも、同様の活性化が起こることが示され、カチオン性リポソームと複合体化することにより、CpG モチーフ非依存的な活性化が惹起されることが明らかとなった。さらに、サイトカラシン B およびモネンシンを共存させたところ、サイトカインの分泌量は有意に減少し、この活性化現象には複合体のエンドサイトーシスとそれに引き続いて起こるエンドソーム酸性化が必要であることが示唆された。

以上、著者は従来情報の乏しかったマクロファージにおける pDNA の細胞取り込み機構と pDNA あるいはカチオン性リポソーム複合体による活性化機構を検討し、基礎的情報を得た。これらの知見は、炎症性サイトカインにより効果が抑制される遺伝子治療、逆に炎症性サイトカインにより効果の増強される DNA ワクチンなどの pDNA を用いた治療法において有用な情報とな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15年2月27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。