

京都大学	博士（薬学）	氏名	尹雅蕾
論文題目	Analysis of transgene expression profile-dependent induction of transgene-specific immune response （導入遺伝子発現プロファイル依存的な発現産物特異的免疫応答の解析）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>治療用タンパク質をコードした遺伝子を投与する遺伝子治療においては、発現する治療タンパク質に対する免疫応答が副作用の惹起や遺伝子発現細胞の除去による遺伝子発現の消失など、治療上の大きな妨げとなる。また、ルシフェラーゼなどのレポータータンパク質は、遺伝子デリバリーシステムの開発研究において汎用されるが、レポータータンパク質に対する免疫応答はレポーター活性を指標とする定量的評価を困難にする原因となる。一方、DNAワクチンの場合のように、発現タンパク質に対する免疫応答を誘導することを主作用とする治療法の開発も期待されている。発現タンパク質特異的な免疫応答の誘導には、タンパク質の発現プロファイルが大きな影響を及ぼすと考えられるが、その詳細については不明である。申請者の所属する研究室ではこれまでに、大容量のプラスミドDNA水溶液を急速に静脈内投与することで、肝臓において非常に高レベルの遺伝子発現が得られるハイドロダイナミクス法（HD法）に着目し、これを利用した遺伝子治療法の開発を行ってきた。その中で、目的タンパク質をコードするプラスミドベクターを適宜設計することで、遺伝子発現期間を大きく制御可能であることが見出されてきた。そこで本研究では、HD法を利用してマウスに遺伝子を導入したときの発現プロファイルが、導入されたタンパク質に対する特異的な免疫応答の誘導に及ぼす影響について解析した。</p> <p>第1章 遺伝子発現の持続性が発現産物特異的免疫応答の誘導に及ぼす影響の解明</p> <p><i>Gussia</i> luciferase (gLuc)をコードするプラスミドDNAであるpROSA-gLucを用いてマウスに遺伝子導入したところ、長期間にわたり安定な血中gLuc活性が認められた。そこで、レポータータンパク質として汎用されるホタルルシフェラーゼ（fLuc）を長期間発現するプラスミドDNAであるpCpG-fLucをpROSA-gLucと同時に投与したところ、血清中gLuc活性は単独投与群と比較して投与7日後から減少しはじめ、14日後には千分の1以下となった。一方、短期発現型pCMV-fLucを同時投与した群における血清中gLuc活性は、pROSA-gLuc単独投与時とほぼ同様の挙動を示した。これまでの検討から、同時に投与されたプラスミドDNAは同一の細胞内へと送達されると考えられる。従って、以上の結果から、gLucに対しては免疫反応がほとんど誘導されないこと、その一方で、fLucが持続的に発現することでgLuc発現が抑制されることが推察された。そこで、fLucに対する特異的免疫応答を評価するた</p>			

めに、血清中抗fLuc抗体量、および遺伝子導入マウスから回収した脾臓細胞からのfLuc特異的なinterferon (IFN)- $\gamma$ 産生量を測定した。その結果、pCpG-fLucの投与により、fLuc特異的な免疫応答の誘導が確認された。また、pCpG-fLuc導入マウスの肝臓切片には、CD8陽性細胞の浸潤が認められた。一方、短期間発現型pCMV-fLucを投与したマウスにおいては、fLuc特異的な免疫反応はほとんど検出されなかった。以上より、抗原性のあるfLucを持続的に発現させた場合には、fLuc特異的な免疫応答が誘導され、これにより遺伝子発現細胞が除去され、遺伝子発現が劇的に低下することが示された。

## 第2章 導入遺伝子発現産物特異的免疫応答の誘導に及ぼす細胞当たりの遺伝子発現レベルの重要性

タンパク質の発現プロファイルが免疫応答に及ぼす影響をより詳細に検討するために、分泌性タンパク質である*Cypridina* Luciferase (cLuc) をモデル抗原タンパク質として新たに選択し、長期発現型プラスミドpROSA-cLucを構築した。30 $\mu$ gのpROSA-cLucをpROSA-gLucと同時投与したところ、遺伝子導入1~2週間後に血清中gLuc活性が急激に低下したことからcLucに対する免疫応答が示唆された。一方、10 $\mu$ gのpROSA-cLucをpROSA-gLucとともに1日おきに合計3回投与したところ、30 $\mu$ g投与時とほぼ同等の血清中初期cLuc活性が得られたものの、その後の低下は観察されなかった。次に、pROSA-cLucとpROSA-gLucの同時投与後にgLucおよびcLuc発現が低下した後、10 $\mu$ gのpROSA-cLucをpROSA-gLucとともに再度同時投与したところ、血清中cLuc活性だけが速やかに低下した。HD法による遺伝子導入では、別々に投与したプラスミドDNAは同一の細胞には導入されにくいことが報告されている。従って、以上の結果から、発現タンパク質に特異的な免疫応答の誘導には、タンパク質の総発現量ではなく、細胞当たりの発現量が重要である可能性が示された。この結果は、主な遺伝子導入細胞である肝細胞が抗原提示細胞として機能することを示唆するものと考えられる。

以上、申請者は遺伝子導入後に発現するタンパク質の発現プロファイルが免疫応答の誘導に及ぼす影響を解析し、持続的な遺伝子発現によって発現タンパク質特異的な免疫応答を誘導され、これにより遺伝子発現細胞が除去されることを明らかにした。また、タンパク質の総発現量ではなく、細胞当たりの発現量が発現タンパク質特異的な免疫応答の誘導に重要であることを見出した。本研究で得られた知見は、遺伝子導入を基盤とする疾患治療システムの開発に有益な情報を提供するものとする。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、肝臓において非常に高レベルの遺伝子発現が得られるハイドロダイナミクス法 (HD法) を利用してマウスに遺伝子を導入したときの発現プロファイルが、導入されたタンパク質に対する特異的な免疫応答の誘導に及ぼす影響について解析した。

### 第1章 遺伝子発現の持続性が発現産物特異的免疫応答の誘導に及ぼす影響の解明

*Gaussia luciferase* (gLuc) をコードするプラスミドDNAであるpROSA-gLucを用いてマウスに遺伝子導入したところ、長期間にわたり安定な血中gLuc活性が認められた。そこで、レポータータンパク質として汎用されるホタルルシフェラーゼ (fLuc) の長期間発現型プラスミドDNA、pCpG-fLucをpROSA-gLucと同時に投与したところ血清中gLuc活性は単独投与群と比較して投与7日後から急激に減少したが、短期発現型pCMV-fLucを同時投与した群においてはそのような現象は観察されなかった。これまでの検討から同時に投与されたプラスミドDNAは同一の細胞内へと送達されると考えられる。次に、fLuc特異的免疫応答を評価したところ、pCpG-fLucの投与によりfLuc特異的液性・細胞性両免疫応答の誘導が確認された。短期間発現型pCMV-fLucを投与したマウスにおいては、fLuc特異的な免疫反応はほとんど検出されなかった。以上、抗原性のあるfLucを持続的に発現させた場合には、fLuc特異的な免疫応答が誘導され、これにより遺伝子発現細胞が除去され、遺伝子発現が劇的に低下することが示された。

### 第2章 導入遺伝子発現産物特異的免疫応答の誘導に及ぼす細胞当たりの遺伝子発現レベルの重要性

分泌性タンパク質である*Cypridina Luciferase* (cLuc) をモデル抗原タンパク質として新たに選択し長期発現型プラスミドpROSA-cLucを構築した。30 $\mu$ gのpROSA-cLucをpROSA-gLucと同時に投与したところ、遺伝子導入約1週間後に血清中gLuc活性が低下したことからcLucに対する免疫応答が示唆された。一方、10 $\mu$ gのpROSA-cLucをpROSA-gLucとともに1日おきに合計3回投与したところ、30 $\mu$ g投与時とほぼ同等の血清中初期cLuc活性が得られたものの、その後の低下は観察されなかった。HD法による遺伝子導入では、別々に投与したプラスミドDNAは同一の細胞には導入されにくいことが報告されている。従って、発現タンパク質に特異的な免疫応答の誘導には、タンパク質の総発現量ではなく細胞当たりの発現量が重要である可能性が示された。

以上、申請者は、2章にわたり遺伝子導入を基盤とする疾患治療システムの開発に有益な情報結果を得た。よって本論文は博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認める。さらに、平成26年8月25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。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、(当分の間) 当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降

〔注〕

1. （記述例1）を参考に、論文審査の結果の要旨の結句には学位論文の審査についての認定を明記するとともに、試問の結果の要旨を付け加えること。
2. 論文の公表方法について、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断され、かつその旨を「論文審査の結果の要旨」に記載する場合は、（記述例2）を参考に記述すること。
3. 論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表する。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、欄外の「要旨公表可能日」欄に、公表可能とする日付を記入すること。（ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内となる。）