

霊長類のBvirusワクチンに関する研究

恵美宣彦 (名古屋大・医・一内)

研究の目的は、霊長類へのワクチン用マテリアルの開発とワクチン後の免疫能の解析である。このような新しいワクチンベクターを作成することは広い応用性があり霊長類の生体防御機構を理解する上でも意味がある。私たちは、生体免疫能を賦活する方法としてNakedDNA法、non-virus法を検討している。導入法と基本となる発現ベクターの作製を今年度に行った。

遺伝子導入法としては、非ウイルスベクターとしてはカチオニック・リポソームに代表される化学物質が用いられる。カチオニック・リポソームは正に荷電した脂質二重膜の小胞で、静電的な結合を利用してDNAと複合体を作ることによってDNAを細胞に導入する。私たちはDOTAPを標準的リピットとして用いた。

生体への遺伝子導入法として最も単純な方法はnaked DNA法とよばれるもので、プラスミドDNAを直接in vivoで臓器や組織に注入する方法である。私達も同様な方法でDNA投与の実験をマウスでおこない、副作用としておこる抗double strand DNA, single strand DNA抗体の測定をおこなった。病態と関係あると思われる前者はほとんど検出できなかったが、後者は高値を示すものもあった。

DNAワクチンは蛋白ワクチンと比較して、内因性と外因性の両方を介した抗原プロセスとT細胞への抗原提示が可能で、HLA-class I, class IIの2つのpathwayを介した免疫を誘導できる可能性を秘めている。私たちも、マウスの系でヒト腫瘍variable region (VH) をcodeする遺伝子を組み込んだnaked DNA vaccineによりanti VH抗体の誘導とCTLの誘導を確認している。遺伝子が細胞内で発現した場合の抗原提示の経路は、細胞内でプロテオソームにて分解されたペプチドがMHC class I, II分子のくぼみにはめ込まれて細胞表面に提示され、特異的なT細胞レセプターを持つCD4, 8細胞を活性化するとされる。最近、DNAそのものによるadjuvant効果についての研究が発表された。哺乳細胞のDNAに比べて細菌のDNAにはCpGモチーフが20倍多く含まれているがそれ自体に免疫刺激作用があることがわかってきており、中でもCpGを中心とした6塩基対がimmunostimulatory sequence (ISS) として重要であることが見いだされた。Naked DNA法による遺伝子免疫の際に、DNAの中にこのISSが含まれるかどうかで細胞性免疫の強さや抗体の産生量が大きく異なるのである。私たちもこの点から、ISSを含んだワクチンベクターの作製を行った。

サル肝臓におけるTFPIの発現調節機構

日根智恵美、円城寺慶一、小亀浩市、加藤久雄 (国立循環器病センター研究所)

Kunitz 型プロテアーゼインヒビターの一つであるTissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)は血液中および血管内壁に存在し、微量ながら効果的な抗血栓作用を有する。TFPIは主に血管内皮細胞で産生され、肝臓で発現しないことが種々の動物を用いた解析から報告されている。しかし我々は、サルにおいては他の動物と異なりTFPIが肝臓で多く発現することを見出し、これまでにサルとヒトの比較から、その発現機構の違いが遺伝子5'上流域の転写調節に由来することを明らかにしている。そこで今回、その調節領域を特定するための解析を行った。

サルおよびヒトTFPI遺伝子5'上流域約1.4 kbの配列を比較すると、92.6%と高い相関性があったが、その領域内に肝臓での発現に関与する転写因子、Hepatocyte Nuclear Factor-1 (HNF-1)の結合モチーフがサルにのみ存在していた。これらの遺伝子5'上流域のサル肝細胞における転写活性をレポータージーンアッセイにより調べたところ、サル遺伝子の方が約2倍強い活性を持っていた。変異体を用いた解析より、サルとヒトの転写活性の違いには、サルにのみ存在するHNF-1結合モチーフの配列は関与せず、転写開始点近傍の-138から+28の領域が重要であることがわかった。さらに変異体による解析を進めた結果、その領域内にはサルとヒトの転写活性の違いに関与する部位が4箇所存在しており、これらの部位がサル肝臓におけるTFPIの発現に重要であると考えられた。