

氏 名	よし なが たか はる 吉 永 貴 治
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 581 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 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 科 学 専 攻
学位論文題目	マウス樹状細胞におけるプラスミド DNA の取り込みおよびその後の活性化機構に関する研究

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 はウイルス性ベクターに比較して安全性が高く生産性にも優れていることから遺伝子治療や DNA ワクチンへの応用が有望視されている。しかしながら、細菌由来 DNA に特徴的な CpG motif と呼ばれる配列が、免疫担当細胞に認識されることで炎症性サイトカインが産生され、これがプラスミド DNA 投与により得られる治療効果に影響を及ぼす可能性が指摘されている。著者の所属する研究室では、マクロファージを対象にプラスミド DNA に対する炎症性サイトカイン産生について検討を行ってきたが、近年、こうしたサイトカイン産生における樹状細胞の役割が注目されている。樹状細胞は高い貪食能および抗原提示能を有することから、免疫系の活性化に不可欠な一次免疫応答の開始において最も重要な役割を果たすことが知られている。従って、プラスミド DNA を用いた治療を最適化するには、樹状細胞におけるプラスミド DNA の取り込み機構や活性化に関する情報が不可欠と考えられるが、その詳細に関しては未だ不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、培養樹状細胞におけるプラスミド DNA の取り込みおよびそれに引き続き起こる細胞活性化の機構解明を目的として、プラスミド DNA およびそのカチオン性リポソーム複合体を用いた系統的な検討を行った。

I. 樹状細胞におけるプラスミド DNA の取り込み機構に関する検討

マウス骨髄より単離・精製した初代培養樹状細胞、あるいは C57BL/6 マウス由来樹状細胞株である DC2.4 細胞を用い、放射標識したプラスミド DNA の取り込み特性を検討するとともに、プラスミド DNA の分解についてもトリクロロ酢酸沈殿法により評価した。その結果、プラスミド DNA は 37°C において樹状細胞に経時的に取り込まれたあと細胞内で速やかに分解を受け、分解産物が細胞外に放出されることが明らかとなった。この現象の温度依存性も確認された。また、プラスミド DNA の取り込みは、poly [C]、デキストラン、EDTA 共存下では影響を受けなかったが、poly [I]、デキストラン硫酸、ヘパリンなど特定のポリアニオン共存により有意に減少した。分解に関しても同様の結果が得られた。以上の結果より、樹状細胞におけるプラスミド DNA の取り込みにはマクロファージの場合と同様、ポリアニオンに対する特異的認識機構が関与していることが示唆された。

II. 樹状細胞およびマクロファージにおけるプラスミド DNA の取り込み特性の比較

樹状細胞によるプラスミド DNA の取り込み機構をより詳細に検討することを目的に、プラスミド DNA 取り込みに及ぼす細胞外 pH の影響について初代培養樹状細胞およびマクロファージを用いて評価した。その結果、樹状細胞においてはプラスミド DNA の細胞表面への結合および取り込みは pH の影響を受けなかったのに対し、マウス腹腔由来マクロファージにおいては細胞外 pH の低下により結合および取り込み量が増大することが明らかとなった。次に、樹状細胞、マクロファージいずれの細胞においても DNA 結合ドメインを有する fibronectin の存在が確認されたことから、プラスミド DNA 結合における関与について検討した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて各細胞における fibronectin の局在を観察したところ、マクロファージには極めて大量の fibronectin が存在することが示された。そこで、プラスミド DNA と fibronectin との結合に及ぼす pH の影響について検討したところ、pH が低下することでプラスミド DNA の結合性が有意に増大したことが

ら、プラスミド DNA のマクロファージにおける取り込みには fibronectin の関与が示唆された。別途、種々のエンドサイトーシス阻害剤を用いた検討から、樹状細胞およびマクロファージいずれの細胞においてもプラスミド DNA の分解には内化後のエンドソームの酸性化が必要であることが示された。しかしながら樹状細胞におけるプラスミド DNA の分解はクラスリン依存型エンドサイトーシス阻害剤により有意に低下したのに対し、マクロファージでは有意な影響は認められなかった。以上の結果より、プラスミド DNA の樹状細胞およびマクロファージによる認識は見かけ上ポリアニオン特異性の点で類似してはいるものの、異なる機構を介して結合および内化が起こる可能性が示された。

Ⅲ. プラスミド DNA およびプラスミド DNN カチオン性リポソーム複合体による樹状細胞の活性化に関する検討

プラスミド DNA/カチオン性リポソーム複合体は効率的な遺伝子導入を目的として遺伝子治療で汎用されているが、プラスミド DNA 単独の場合とは異なり静電的相互作用に基づき吸着性エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが知られている。著者の所属する研究室ではこれまでに、マクロファージの系で細胞活性化に関する検討を行い、初代培養細胞と細胞株においてプラスミド DNA に対する反応性が異なること、カチオン性リポソーム複合体に関しては CpG motif が豊富に存在する細菌由来 DNA のみならず CpG motif を僅かしか含まないウシ胸腺由来 DNA を用いた場合でも Toll-like receptor 9 (TLR9) 依存的機構と非依存的機構の両方を介して活性化が誘導されることなどを見出しているが、樹状細胞に関しては未だ不明な点も多い。そこで、各種炎症性サイトカインの産生を指標に DNA およびそのカチオン性リポソーム複合体による活性化を初代培養樹状細胞および細胞株 DC2.4 細胞を用いて検討した。その結果、マクロファージの場合とは異なりいずれの樹状細胞の場合にも、サイトカイン産生は DNA 単独およびカチオン性リポソーム複合体いずれについても細菌由来 DNA を用いた場合にのみ見られることが明らかとなり、樹状細胞においては DNA の投与形態に関わらず活性化は主に CpG motif と TLR9 の相互作用を介したものであることが示唆された。

以上、著者は、樹状細胞におけるプラスミド DNA の取り込みおよびその後の活性化機構に関する検討を行い、ポリアニオンに特異的な取り込み機構が関与すること、さらには取り込みおよび活性化に関し樹状細胞とマクロファージとは異なる機構が関与していることを明らかにした。これらの知見はプラスミド DNA を用いた遺伝子治療および DNA ワクチン療法に対し有用な基礎情報を提供す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 はウイルス性ベクターに比較して安全性が高く生産性にも優れていることから遺伝子治療や DNA ワクチンへの応用が有望視されている。しかしながら、細菌由来 DNA に特徴的な CpG motif と呼ばれる配列が、免疫担当細胞に認識されることで炎症性サイトカインが産生され、これがプラスミド DNA 投与により得られる治療効果に影響を及ぼす可能性が指摘されている。著者の所属する研究室では、マクロファージを対象にプラスミド DNA に対する炎症性サイトカイン産生について検討を行ってきたが、近年、こうしたサイトカイン産生における樹状細胞の役割が注目されている。樹状細胞は高い貪食能および抗原提示能を有することから、免疫系の活性化に不可欠な一次免疫応答の開始において最も重要な役割を果たすことが知られている。従って、プラスミド DNA を用いた治療を最適化するには、樹状細胞におけるプラスミド DNA の取り込み機構や活性化に関する情報が不可欠と考えられるが、その詳細に関しては未だ不明な点が多いのが現状である。そこで筆者は、培養樹状細胞におけるプラスミド DNA の取り込みおよびそれに引き続き起こる細胞活性化の機構解明を目的として、プラスミド DNA およびそのカチオン性リポソーム複合体を用いた系統的な検討を行った。

マウス骨髄より単離・精製した初代培養樹状細胞、あるいは C57BL/6 マウス由来樹状細胞株である DC2.4 細胞を用い、放射標識したプラスミド DNA の取り込み特性を検討するとともに、プラスミド DNA の分解についてもトリクロロ酢酸沈殿法により評価した。その結果、プラスミド DNA は 37°C において樹状細胞に経時的に取り込まれたあと細胞内で速やかに分解を受け、分解産物が細胞外に放出されることが明らかとなった。この現象の温度依存性も確認された。また、プラスミド DNA の取り込みは、poly [C]、デキストラン、EDTA 共存下では影響を受けなかったが、poly [I]、デキストラン硫酸、ヘパリンなど特定のポリアニオン共存により有意に減少した。分解に関しても同様の結果が得られた。以上の結果より、樹状細胞におけるプラスミド DNA の取り込みにはマクロファージの場合と同様、ポリアニオンに対する特異的認識機構が関与していることが示唆された。

樹状細胞によるプラスミド DNA の取り込み機構をより詳細に検討することを目的に、プラスミド DNA 取り込みに及ぼす細胞外 pH の影響について初代培養樹状細胞およびマクロファージを用いて評価した。その結果、樹状細胞においてはプラスミド DNA の細胞表面への結合および取り込みは pH の影響を受けなかったのに対し、マウス腹腔由来マクロファージにおいては細胞外 pH の低下により結合および取り込み量が増大することが明らかとなった。次に、樹状細胞、マクロファージいずれの細胞においても DNA 結合ドメインを有する fibronectin の存在が確認されたことから、プラスミド DNA 結合における関与について検討した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて各細胞における fibronectin の局在を観察したところ、マクロファージには極めて大量の fibronectin が存在することが示された。そこで、プラスミド DNA と fibronectin との結合に及ぼす pH の影響について検討したところ、pH が低下することでプラスミド DNA の結合性が有意に増大したことから、プラスミド DNA のマクロファージにおける取り込みには fibronectin の関与が示唆された。別途、種々のエンドサイトーシス阻害剤を用いた検討から、樹状細胞およびマクロファージいずれの細胞においてもプラスミド DNA の分解には内在化後のエンドソームの酸性化が必要であることが示された。しかしながら樹状細胞におけるプラスミド DNA の分解はクラスリン依存型エンドサイトーシス阻害剤により有意に低下したのに対し、マクロファージでは有意な影響は認められなかった。以上の結果より、プラスミド DNA の樹状細胞およびマクロファージによる認識は見かけ上ポリアニオン特異性の点で類似してはいるものの、異なる機構を介して結合および内在化が起こる可能性が示された。

プラスミド DNA/カチオン性リポソーム複合体は効率的な遺伝子導入を目的として遺伝子治療で汎用されているが、プラスミド DNA 単独の場合とは異なり静電的相互作用に基づき吸着性エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが知られている。著者の所属する研究室ではこれまでに、マクロファージの系で細胞活性化に関する検討を行い、初代培養細胞と細胞株においてプラスミド DNA に対する反応性が異なること、カチオン性リポソーム複合体に関しては CpG motif が豊富に存在する細菌由来 DNA のみならず CpG motif を僅かしか含まないウシ胸腺由来 DNA を用いた場合でも Toll-like receptor 9 (TLR9) 依存的機構と非依存的機構の両方を介して活性化が誘導されることなどを見出しているが、樹状細胞に関しては未だ不明な点も多い。そこで、各種炎症性サイトカインの産生を指標に DNA およびそのカチオン性リポソーム複合体による活性化を初代培養樹状細胞および細胞株 DC2.4 細胞を用いて検討した。その結果、マクロファージの場合とは異なりいずれの樹状細胞の場合にも、サイトカイン産生は DNA 単独およびカチオン性リポソーム複合体いずれについても細菌由来 DNA を用いた場合にのみ見られることが明らかとなり、樹状細胞においては DNA の投与形態に関わらず活性化は主に CpG motif と TLR9 の相互作用を介したものであることが示唆された。

以上、著者は、樹状細胞におけるプラスミド DNA の取り込みおよびその後の活性化機構に関する検討を行い、ポリアニオンに特異的な取り込み機構が関与すること、さらには取り込みおよび活性化に関し樹状細胞とマクロファージとは異なる機構が関与していることを明らかにした。これらの知見はプラスミド DNA を用いた遺伝子治療および DNA ワクチン療法に対し有用な基礎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17年3月7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。