

1. ウイルス感染による宿主自然免疫応答の解析と 感染制御への応用

阿部 隆之

大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野

バキュロウイルスは、環状の二本鎖 DNA を遺伝子に持っている昆虫を宿主とするウイルスであり、現在、大腸菌発現系と同様に様々な組換え蛋白質の発現系システムとして広く汎用されている。その一方で、近年、複製はしないが、広範囲な哺乳動物細胞にも感染できることが示され、新しい遺伝子導入ベクターとしての有用性が期待されている。これまでに、筆者らは、バキュロウイルスのウイルスベクターワクチンとしての評価を検討したところ、バキュロウイルス自身に哺乳動物細胞に自然免疫応答を誘発できることを見出した。近年同定された、自然免疫認識分子である Toll 様受容体は、様々な病原微生物由来の構成因子を認識し、炎症性サイトカインやインターフェロンを誘発して生体防御反応に寄与することが知られている。様々な Toll 様受容体及びそのシグナルアダプター分子である MyD88 を欠損した免疫細胞内では、バキュロウイルス感染に伴う炎症性サイトカインの産生が著しく減少することが示されたが、インターフェロンの産生は正常であることが確認された。Toll 様受容体非依存的にインターフェロンを産生する分子として RNA ヘリケースである RIG-I 及び MDA5 が同定され、様々な RNA 及び DNA ウイルス感染に対するインターフェロンの発現制御に関与していることが報告されている。しかしながら、バキュロウイルスによるインターフェロンの産生はこれら RNA ヘリケースにも非依存的であることが示され、既報のシグナル経路とは異なる機序にてインターフェロンの産生が制御されている可能性が示唆された。さらに、野生型のバキュロウイルス粒子あるいは、その精製ウイルスゲノム DNA と外来抗原のマウスへの共感染により、特異的な細胞性免疫応答の促進が付与されることも報告されている。本稿では、バキュロウイルスのアジュバント活性を伏せ持った新規ワクチンベクターとしての有用性及び、哺乳動物細胞内における自然免疫誘導シグナルの探索ツールとしての可能性について解説したい。

はじめに

バキュロウイルスは鱗翅目、膜翅目、そして双翅目などの昆虫を宿主とするウイルスで、約 130kb 程の環状二本鎖 DNA を遺伝子として持っている。その中で感染細胞の核内に多角体と呼ばれる封入体を、全細胞蛋白質の 50%

に達するほど大量に作る一群のウイルスが、核多角体病ウイルス (Nuclear polyhedrosis virus: NPV) である。特に、夜蛾科のバキュロウイルス *Autographa californica* NPV (AcNPV) の強力な多角体プロモーターを利用した組換えウイルスは発現効率が高く、しかも、発現産物が翻訳後修飾されて生物学的活性を保持した形で得られることから、分子生物学の研究に広く応用されている^{1,2)}。一方、バキュロウイルスが昆虫細胞のみならず、広範な哺乳動物細胞にも複製することなく効率よく外来遺伝子を導入できることが明らかとなり、新しい遺伝子導入ベクターとして脚光を浴びている³⁻⁷⁾。バキュロウイルスの哺乳動物細胞への感染機構については、その感染受容体の同定も含めて不明な点が多いが、とりわけ肝細胞に効率良く感染することが従来より報告されている。近年では、感染初期過程におけるリン脂質 (とりわけホスファチジルイノシトール)⁶⁾ や脂

連絡先

〒 565-0871
大阪府吹田市山田丘 3-1
大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野
TEL: 06-6879-8340
FAX: 06-6879-8269
E-mail: Tabe@med.miami.edu

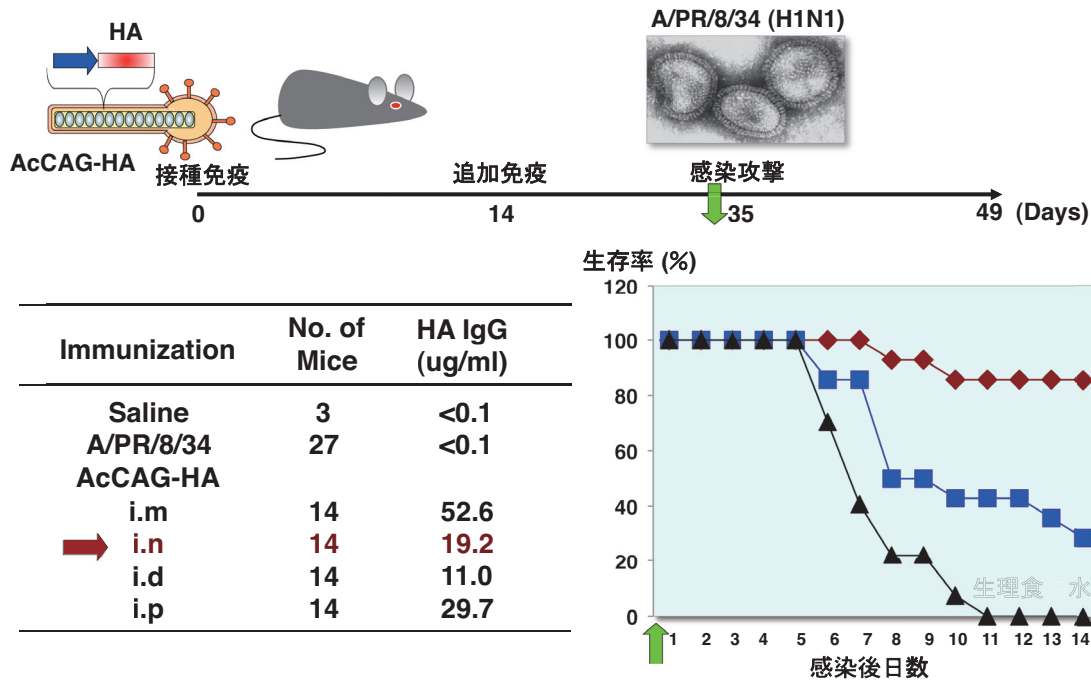


図1 HA 抗原発現組換えバキュロウイルス接種免疫マウスのインフルエンザウイルスに対する感染防御効果

HA 抗原発現組換えバキュロウイルス (AcCAG-HA) をマウスの鼻腔内、皮内、腹腔内及び筋中内へ接種後、2 週間後に同量の追加免疫を行った。ブーストから3 週間後に、致死量の A 型インフルエンザウイルス (A/PR/8/34) の鼻腔内接種による感染攻撃試験を行った。鼻腔内接種群 (◆)、筋中内接種群 (■) とコントロールとして生理食塩水 (▲) を接種したマウスの感染後、14 日後までの生存率を示した (図1 右図)。各接種群における、血中の HA 抗体価を ELISA 法で決定した (図1 左図)。文献¹¹⁾より改変して掲載。

質ラフトの重要性が報告されている⁸⁾。さらに、侵入過程においてはクラスリン依存性エンドサイトーシス及びマクロピノサイトーシス経路の利用等、多岐な感染経路を利用していることが示唆されている⁸⁾。一方で、AcNPV は細胞傷害を誘導することなく効率よく外来遺伝子を導入できることから、哺乳動物細胞に対する免疫応答は低いものと考えられてきた。しかしながら、筆者らも含めいくつかの研究グループから、AcNPV を哺乳動物細胞やマウスに接種すると、一過的な炎症性誘導に伴う抗ウイルス状態を惹起できることが明らかにされた⁹⁻¹¹⁾。本稿ではバキュロウイルスの感染によって哺乳動物細胞に惹起される生体防御シグナルについて、筆者らの成績を中心に解説したい。

1. バキュロウイルスのワクチンベクターへの応用

これまでのウイルスベクターにはランダムな遺伝子の組み込みによる癌遺伝子の活性化や、ウイルスベクター自身の蛋白発現に伴う有害な免疫反応の誘導及び固有の病原性発現の可能性等の安全面でいくつか問題点が指摘されている (もちろん、本誌ウイルスでも度々特集されているように、現在では特異的な細胞種への感染指向性を有するターゲットベクターの応用や、非増殖型ウイルスベクター等の開発によりその安全性面は飛躍的に改善されてい

る)。一方、バキュロウイルスは、1) 大きな外来遺伝子を搭載できる、2) 各種ウイルス遺伝子は哺乳動物細胞内では発現されないため有害な免疫応答を惹起しない、3) 哺乳動物に固有の病原性を示さない、4) 哺乳動物にはバキュロウイルスに対する中和抗体が存在しない、5) 宿主の染色体への組み込みがほとんどない等の従来のウイルスベクターにはない利点を有しており、これらの項目が感染宿主域外のバキュロウイルスをワクチンベクターとして応用する理由でもある。問題点としては、補体血液成分にて容易に不活性化されることが挙げられるが、補体抵抗性遺伝子 (Decay-accelerating factor : DAF) をバキュロウイルスエンベロープ蛋白質 (gp64) 上に発現させたシュードタイプウイルスの作製により改善されている¹²⁾。

そこで、筆者らはバキュロウイルスのワクチンベクターとしての可能性を実験動物で評価した。A 型インフルエンザウイルス (A/PR/8/34) の HA (Hemagglutinin) 遺伝子を CAG プロモーター下に組み込んだ組換えバキュロウイルス (AcCAG-HA) を作製し、マウスの鼻腔内 (i.n)、腹腔内 (i.p)、皮内 (i.d)、あるいは筋中内 (i.m) に接種して、2 週間後に同量のウイルスで追加免疫後、3 週間後に致死量の A/PR/8/34 で攻撃試験を行った¹¹⁾。AcCAG-HA を接種後、経時的に ELISA 法にて血清中の抗 HA 抗

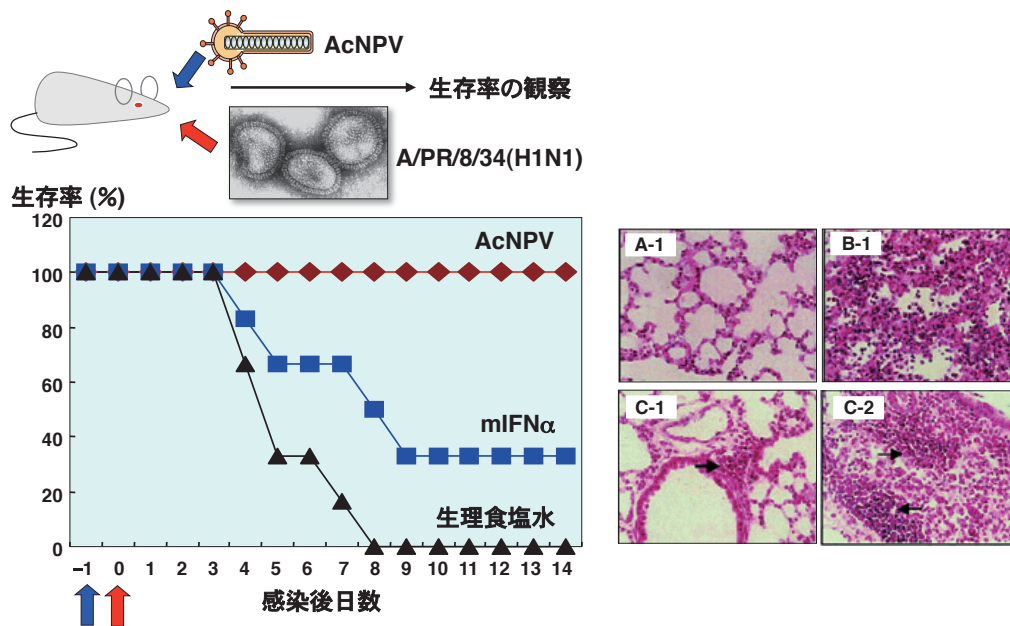


図2 野生型バキュロウイルス接種マウスのインフルエンザウイルスに対する感染防御効果

6週齢のBalb/cマウスの鼻腔内に 10^8 PFUの野生型バキュロウイルス(AcNPV)を接種し、その24時間後に致死量のA型インフルエンザウイルス(A/PR/8/34)にて感染攻撃試験を行った。AcNPV接種群(◆)、マウスインターフェロン(mIFN α) (■)とコントロールとして生理食塩水(▲)を接種したマウスの感染後、14日後までの生存率を示した(図2左図)。AcNPVを経鼻接種された群のマウスは全匹生存が確認された。感染攻撃試験7日後における、マウス肺組織のHE染色像(図2右図)。AcNPVを事前に接種されたマウスの肺組織では、正常な肺胞壁像が維持されており(C-1)、広範な肺胞気道上皮傷害に伴う肺胞上皮の変性、壊死及び脱落の軽減が認められた。さらに、無処置(A-1)及びインフルエンザウイルス感染(B-1)に比べ、AcNPVの接種群では局所的な炎症に伴うリンパ球浸潤が認められた(C-2)。文献¹¹⁾より改変して掲載。

体を測定したところ、腹腔内と筋中内にAcCAG-HAを接種した群で高い抗HA抗体価が検出されたが、攻撃試験では鼻腔内接種群にのみ感染防御効果が認められた(図1)。これらの結果から、バキュロウイルスのワクチンベクターとしての有用性が実証された。実際には、組換えバキュロウイルス接種マウスにおける記憶免疫応答の付与のみであれば、著者らの報告に先行して青木らが報告している。青木らは、シュドレービスウイルスgBエンベロープを発現する組換えバキュロウイルスのマウスへの筋中内接種により、gB特異的抗体の産生を確認している¹³⁾。また後に、Facciabeneらは、C型肝炎ウイルスE2エンベロープ蛋白質を発現する組換えシュドタイプバキュロウイルスの筋中内接種により、特異抗体の産生と細胞性免疫応答の誘導を報告しているが¹⁴⁾、感染攻撃試験の効果を伴った成果は筆者らが初めての報告である。ところが全く予期せぬことに、野生型のAcNPVを鼻腔内に接種した対照群においても、AcCAG-HAを鼻腔内に接種した群と同等の感染防御効果が確認された。バキュロウイルスgp64エンベロープ蛋白質の免疫原性による交叉反応性の可能性も考慮してみたが、詳細は明らかになっていない。これらのことから、インフルエンザウイルスに対する記憶免疫応答以外の感染

防御機構の存在が示唆された。そこで、バキュロウイルスによる非特異的な感染防御免疫の誘導をより詳細に理解するため、AcNPVをマウスの経鼻に接種し、24時間後に致死量のインフルエンザウイルス(A/PR/8/34)で感染攻撃したところ、AcNPVを経鼻接種されたマウスは全例生存し、肺胞壁の壊死、変性及び脱落等の軽減も観察された(図2)。AcNPVを接種されたマウスの肺上皮では局所的なリンパ球及び炎症性細胞浸潤が強く観察されたことから¹¹⁾、鼻粘膜、上気道そして肺上皮にマクロファージや樹状細胞(Dendritic cell:DC)などの貪食細胞が一過的に浸潤したことにより、インフルエンザウイルスの感染拡大が阻止されたものと思われる。さらに、亜型のA/Guizhou(H3N2)及びB/Ibarakiの感染攻撃に対する防御効果も観察されたことから¹¹⁾、バキュロウイルスの接種に伴う非特異的な感染防御効果の付与が示唆された。これらの成績から、バキュロウイルス自身に自然免疫を誘導できる“アジュバント活性”を保持している可能性が示唆された。

2. バキュロウイルスの哺乳動物細胞における宿主応答機序の解析

野生型のAcNPVをマウスの鼻腔内に接種することによ

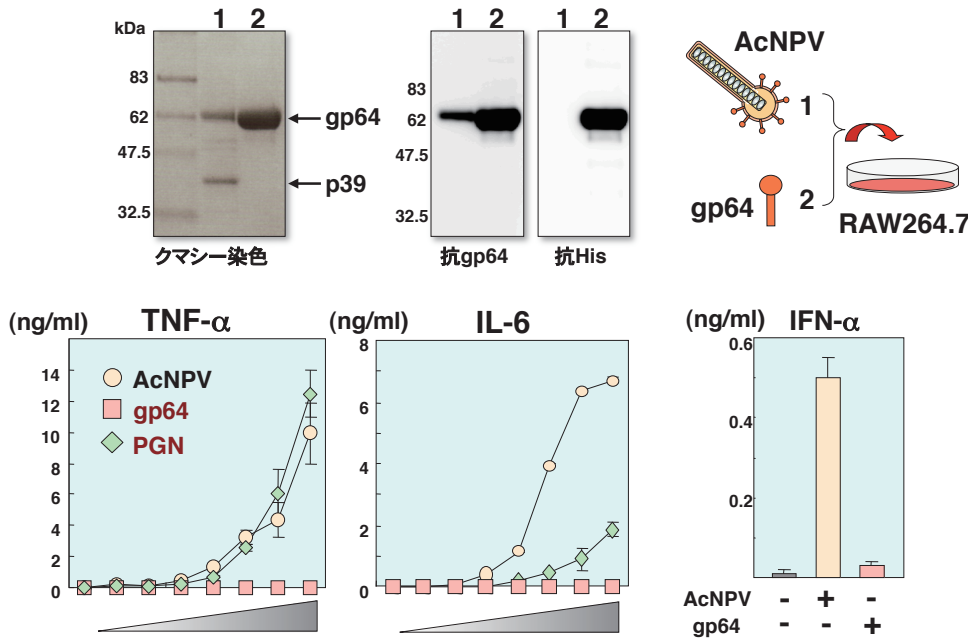


図3 バキュロウイルスエンベロップ蛋白質のマクロファージ細胞における自然免疫誘導の影響

His タグを付加したバキュロウイルスのエンベロップ蛋白質 (gp64) を昆虫細胞で発現精製し、クマシー染色ならびに抗gp64 及び抗 His 抗体で免疫染色した。精製 gp64 蛋白質をマウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) に添加後、培養上清中への IFN の産生を ELISA 法で測定した。バキュロウイルス接種群では TNF- α 及び IL-6 などの炎症性サイトカインや IFN の産生が認められたが、精製 gp64 蛋白質接種群ではサイトカインの産生は認められなかった。ペプチドグリカン (PGN) は TLR2 のリガンドであり、炎症性サイトカインを産生する。

り、インフルエンザウイルスの感染攻撃に対して抵抗性が賦与されることが明らかとなったが、AcNPV の哺乳動物細胞での宿主応答の解析はあまりされてこなかった。これまでに、初代ラット肝細胞にバキュロウイルスを接種すると TNF- α 、IL-1 α 及び IL-1 β などの炎症性サイトカインが誘導されることが報告されている¹⁰⁾。また、Gronowski らは AcNPV の感染細胞から精製したエンベロップ蛋白質画分をマウスの腹腔内に接種することで、マウス脳心筋炎ウイルスの致死感染から防御できることを報告している⁹⁾。我々もバキュロウイルスのエンベロップ蛋白質 (gp64) を精製し、マウスのマクロファージ細胞株 (RAW264.7)、腹腔マクロファージ、脾臓由来の CD11c 陽性 DC、そして線維芽細胞等でサイトカイン産生能を評価したが、感染防御に重要なインターフェロン (IFN) の誘導は認められなかった (図3)^{15, 16)}。Gronowski らが実験に用いた蛋白質画分には、エンベロップ蛋白質以外のウイルス因子の混入が疑われることから、AcNPV による自然免疫の誘導には、他のウイルス構成因子の関与が示唆された。

AcNPV による宿主応答機序を解析するため、自然免疫認識受容体である Toll-like receptor (TLR) 及びそのシグナル伝達に必須のアダプター分子である MyD88 遺伝子の欠損マウスを用いて解析を行った。TLR は外界から侵入

してきた病原微生物特有の分子構造を認識し、NF- κ B 及び IRF 等の転写因子の活性化を介して、炎症性サイトカインや I 型 IFN を一過的に産生して宿主を病原体から防御する自然免疫の要であることが知られている^{17, 18)}。各種 TLR 遺伝子や MyD88 遺伝子の欠損マウスの腹腔マクロファージや CD11c 陽性 DC に AcNPV を接種し、培養上清中のサイトカインを測定したところ、MyD88 や TLR9 遺伝子の欠損マウス由来の免疫細胞では、IL-12 の産生が野生型に比べて著しく低下していた (図4)^{15, 16)}。TLR9 は細菌由来の非メチル化 CpG モチーフ配列を有する DNA と反応することが報告されており、そのような非メチル化 CpG モチーフ配列を保持したウイルスや合成オリゴ DNA は、マクロファージ、DC、および B 細胞に対して TLR9 依存的に炎症性反応の誘導や Th1 反応を誘導することが報告されている¹⁹⁾。バキュロウイルスゲノム中の活性型 CpG モチーフ配列を調べてみると、同じく TLR9 を活性化できる単純ヘルペスウイルスや大腸菌由来のゲノム DNA と同等の頻度で CpG モチーフ配列が存在することが明らかとなった¹⁵⁾。実際に AcNPV 粒子よりウイルス DNA を精製し、マクロファージ細胞でのサイトカイン産生を検討したところ、炎症性サイトカイン及び IFN の産生が認められた¹⁵⁾。また、TLR9 を認識する非

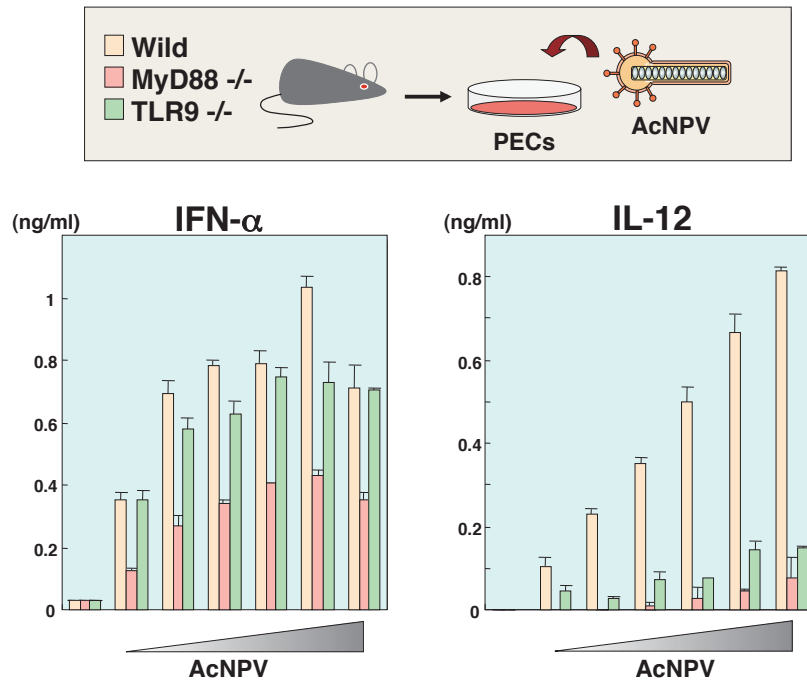


図4 MyD88及びTLR9遺伝子欠損マウス由来マクロファージ細胞におけるバキュロウイルスによるサイトカイン産生

野生型, MyD88, あるいはTLR9遺伝子欠損マウスより腹腔マクロファージ(PEC)を分離し, AcNPVの接種によるIL-12やIFNの産生をELISA法で測定した。IL-12の産生はMyD88やTLR9のシグナル経路に依存しているが, IFNの産生はMyD88には部分的に関与するがTLR9には非依存的であることが示された。

メチル化CpGモチーフを有する合成DNAによる免疫担当細胞の活性化は, クロロキンなどのエンドソーム内の酸性化を阻害する薬剤で阻止されることが報告されており^{20, 21}, AcNPVによるマクロファージ細胞からのIL-12の誘導もクロロキンで阻害された。これらの成績は, 細菌の構成壁を認識するTLR2やTLR4は細胞表面に発現しているのに対して, 微生物由来の核酸成分を認識するTLRは主に細胞質内腔器官に局在しているためであり, これらのTLRを活性化させるには細胞に感染, あるいは貪食された核酸成分が, TLRを発現している細胞質内腔に提示されなくてはならない。以上の結果から, バキュロウイルスによるマクロファージやDCの活性化は, 感染過程でエンドソームとウイルスの膜融合, あるいは貪食後, ファゴソームから放出された(あるいは漏れ出た)ウイルスゲノムが, 細胞質内腔のTLR9と反応しているものと思われる。

3. バキュロウイルスによるTLR非依存的なIFNの活性化機構

バキュロウイルスによる免疫担当細胞からの炎症性サイトカインの産生には, ウイルスのDNA成分と宿主のTLRシグナル伝達経路が関与していることが明らかとなった。しかしながら, 生体防御に中心的な役割を果たすI型IFNの誘導は, TLR9/MyD88に依存しないことが示された(図

4)。加えて, バキュロウイルスによるIFNの産生は, クロロキン処理の影響を受けないことから, エンドソームやファゴソームなどの細胞質内腔器官外でのシグナル伝達経路に依存していることが予測された¹⁶。最近のウイルス感染に対する自然免疫応答の解析からも, 多くのRNA及びDNAウイルスによるI型IFNの誘導は, TLR非依存的な経路により制御されていることが明らかになっている。ウイルス感染に対する自然免疫応答のリガンドとして良く汎用されており, 同じくDNAウイルスであり, ヒトに病原性を示す単純ヘルペスウイルスやアデノウイルス, ワクシニアウイルスなども, TLR非依存的なIFNの誘導経路の存在が示唆されている²²⁻²⁵。一方で, 水疱性口内炎ウイルスやインフルエンザウイルス, センダイウイルスなどのRNAウイルス感染に対するTLR非依存的なI型IFNの応答は, ウイルス由来の二重鎖RNAを認識するRNAヘリケースであるRIG-I (retinoic acid-inducible gene-I)やMDA5 (melanoma differentiation associated gene 5)により制御されており, ウイルスにより認識される分子が異なることが報告されている²⁶。RIG-IやMDA5は, IPS-1 (MAVS, VISA, Cardifとしても報告されている)と呼ばれるアダプター分子を介して, NF- κ BやIRFの活性を誘導する²⁷。RIG-I, MDA5及びIPS-1遺伝子の欠損マウスの免疫担当細胞や線維芽細胞を用いた解析から, バキュロ

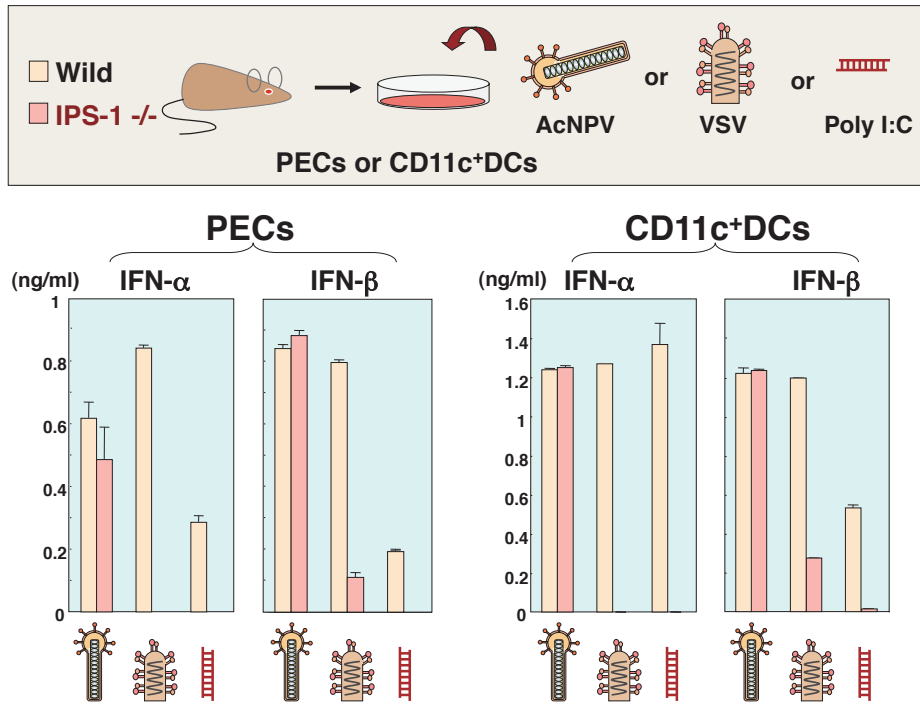


図5 IPS-1ノックアウトマウス由来の免疫細胞におけるIFNの産生誘導

野生型及びIPS-1遺伝子欠損マウスより腹腔マクロファージ(PEC)及びCD11c陽性DCを分離し、AcNPV、水疱性口内炎ウイルス(VSV)及び合成二重鎖RNA(PolyI:C)刺激による培養上清中のIFNの産生をELISA法で定量した。IPS-1欠損細胞ではVSV及びPolyI:CによるIFNの産生が顕著に減少するが、AcNPVでは野生型の細胞と同レベルを維持していた。

ウイルスによるI型IFNの産生には、これらの分子群の関与は認められなかった(図5)¹⁶⁾。これらの成績は、哺乳動物細胞内では複製することのないバキュロウイルスの特性を反映していることを示唆するものである。RIG-I/IPS-1経路を介したI型IFNの産生誘導には、その下流に位置するTBK1、そして、I型IFNの転写誘導因子であるIRF3やIRF7が重要な役割を担うことが報告されている。筆者らの研究から、バキュロウイルスによるI型IFNの誘導は、腹腔マクロファージやCD11c陽性DCなどではIRF7優位に制御されているが、線維芽細胞ではIRF3が重要であるとの知見が得られている¹⁶⁾。さらに、バキュロウイルスを接種したIRF3遺伝子欠損マウス由来の線維芽細胞では、野生型に比べて、水疱性口内炎ウイルスの感染に対する抗ウイルス活性応答の低下が認められる(図6)。唯一、I型IFNの産生がTLRにより完全に制御されている形質様樹状細胞(plasmacytoid DC:pDC)だけが、TLR9/MyD88/IRF7依存的にI型IFNを産生していた。以上の成績から、バキュロウイルスによるI型IFNの誘導は、細胞種によってTLRの依存性が異なることが明らかとなった。

4. バキュロウイルスのIFN誘導に関与するDNAセンサー

ISD (IFN-stimulatory DNA) と呼ばれる45、または90

塩基対程の長さの合成二重鎖DNA、あるいはB-DNAと呼ばれる右巻きの二重らせん構造を有する合成二重鎖DNAを導入した場合にも、TLR非依存的なI型IFNの産生が誘導されることが報告されている^{28, 29)}。これらの現象は、細胞質内でのRNA認識機構と同様に、自己または非自己のDNA成分を認識してI型IFNを誘導する分子機構が存在することを示唆するものであり、その分子の同定と作用機作の報告が近年相次いでいる。特に、石川らによって報告された5回膜貫通型のER局在蛋白質であるSTING (Stimulator of IFN gene) は、様々なウイルス及び細菌由来のDNAに対するIFN応答に重要であることが報告されている。加えて、AcNPVによるIFNの産生にもSTINGが重要な役割を示すことが明らかにされている³⁰⁾。この報告からも、バキュロウイルスによる自然免疫応答の誘導には、ウイルスエンベロープ蛋白質よりもむしろウイルスDNA成分に依存していることが支持された。しかしながら現時点では、上述の人工的なDNAリガンドも含め、STINGの活性化に関与するDNA成分に対するコンセンサスな配列、構造などはRNAの認識機構ほど明らかになっていない。加えて、ウイルス由来のゲノムDNA (RNA) はヌクレオキャプシッドと複合体を形成している場合が多く、人工合成されたISD及びB-DNAとは異なりむき出しの状態では細胞質内で放出される可能性は低

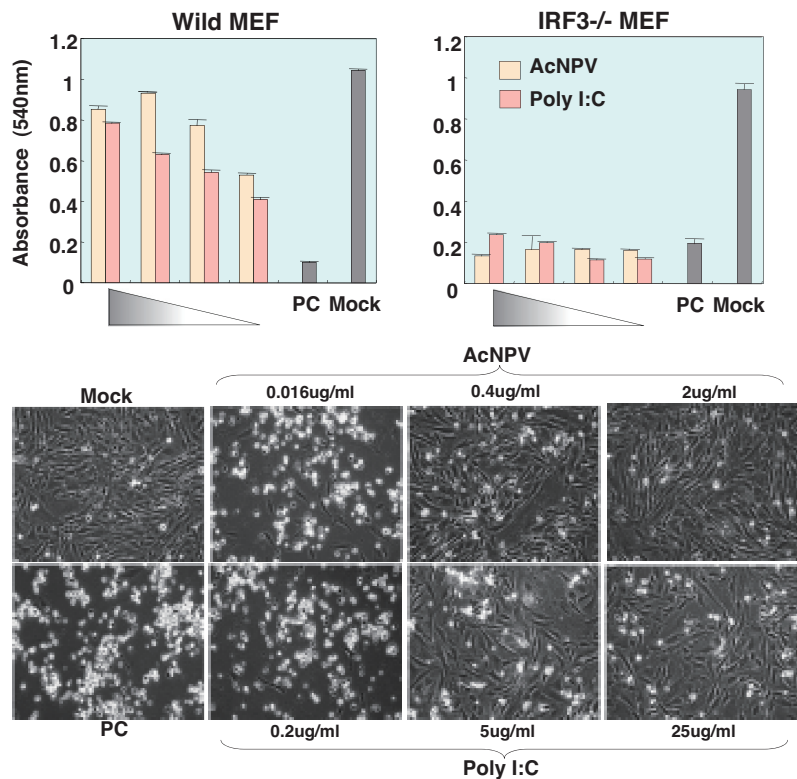


図6 線維芽細胞における IRF3 依存的なバキュロウイルスによる抗ウイルス活性の誘導

AcNPV 及び PolyI:C を濃度依存的に処理後、VSV 感染に対する抗ウイルス活性の影響をバイオアッセイにて評価した。

VSV 感染に対する細胞生存率を、クリスタルバイオレット染色による吸収度測定より決定した (上図)。VSV 感染に対する細胞傷害度を顕微鏡下において観察した (下図)。Mock: 無処置, PC:VSV 感染

いと考えられる。これらの DNA 成分が、STING などの DNA センサーに直接感知され得るのか？或は、ウイルス由来の DNA 成分の認識はより複雑な過程を要求されるのか？などの問いは今後の課題であると思われる。

5. バキュロウイルスのアジュバント活性

筆者らの解析や DNA センサーである STING の報告から、バキュロウイルスによる免疫賦活化にはウイルス DNA が重要な役割を演じていることが示された。DNA による免疫賦活化現象は、徳永博士らの BCG 抽出成分中の非メチル化 DNA 成分による免疫細胞の活性化機序と類似することから^{31, 32)}、ウイルス感染症のみならず、癌に対する治療にも応用できるものと思われる。また、AcNPV を接種した肝転移腫瘍モデルマウスにおいて、腫瘍の縮退効果やマウスの延命効果が確認されており³³⁾、これらの抗腫瘍活性には、IFN- γ や Th1 サイトカインの一種である IL-12 の産生に依存した NK 細胞の活性化の関与が示唆された。実際に、バキュロウイルス DNA を添加した OVA 抗原をマウスに免疫することにより、OVA 特異的な体液性免疫や細胞性免疫応答の誘導が促進されることが報告されており³⁴⁾、バキュロウイルス DNA がアジュバント活性

を保持していることを支持している。ウイルス DNA のみならず上述の合成二重鎖 DNA は、自然免疫応答を強く活性化するアジュバントのような特性を有するため、TLR や STING はアジュバント受容体、或はアジュバントを感知するセンサーとも考えられる。これらの自然免疫認識分子の活性化に伴う IFN や炎症性サイトカイン、ケモカインの産生により、単球や活性化リンパ球などの炎症性細胞の浸潤が促進される。これら一連の反応は、感染局所における感染巣の拡大阻止にも寄与している。AcNPV の鼻腔内接種による致死的なインフルエンザウイルス感染に対する抵抗性の賦与は、鼻粘膜や気管支上皮における一過的な TLR 依存的な炎症性応答及び TLR 非依存的 (STING 依存的な) I 型 IFN の産生応答の活性化に起因するものと思われる (図 7)。

おわりに

バキュロウイルスベクターによる遺伝子導入効率及び自然免疫の誘導活性を向上させるため、哺乳動物細胞への感染効率の高いウイルスエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプウイルスの応用が考えられる。水疱性口内炎ウイルスのエンベロープ蛋白質を被ったシュードタイプバキュ

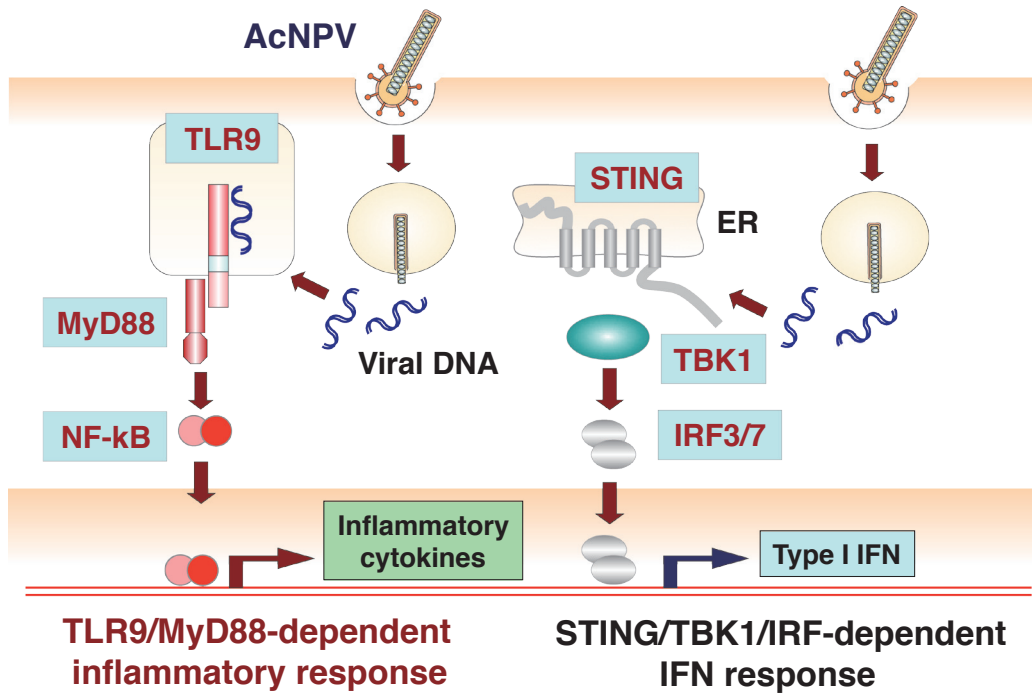


図7 バキュロウイルスの免疫細胞における自然免疫活性化

バキュロウイルスの感染または貪食後、エンドソームとの膜融合を介して細胞質内腔に放出されたウイルス DNA ゲノムが、細胞質内腔に局在している TLR9 を介して炎症性サイトカインが誘導される。一方で、細胞質内ウイルス二重鎖 RNA 認識分子である RIG-I 及び MDA5 への反応性はなく、STING などの細胞質内 DNA 認識分子によって I 型インターフェロンの産生が制御されている可能性が示唆された。

ロウイルスは、哺乳動物細胞やマウスへの遺伝子導入効率が飛躍的に向上していた^{6, 7, 35)}。さらに、バキュロウイルスの粒子表面上に、他のウイルス及び外来抗原を共発現させたキメラシュードタイプバキュロウイルスは、飛躍的にその免疫原性が向上することが多数報告されている³⁶⁾。今後、ターゲティング可能なりガンドを被ったシュードタイプバキュロウイルスを用いることで³⁷⁾、より効果的かつ特異的に自然免疫を誘導できるものと思われる。今回の成績は、バキュロウイルスが遺伝子導入ベクターとしてだけでなく、接種経路によってはアジュバント活性を併せ持った新しいワクチンベクターとしての可能性を示唆するものであり、他のウイルスベクターにはない利点であると思われる。

最後に、本受賞研究内容には、C 型肝炎ウイルスに対する宿主自然免疫応答の解析とその制御法の内容も含まれていましたが、本稿ではその内容を省かせて頂いており、バキュロウイルスに対する各論的な内容になっていることをお詫び致します。

謝辞

本研究は、千葉工業大学工学部生命科学環境学科 高久洋先生の研究室で始まり、その後の大部分の成果を大阪大

学微生物研究所分子ウイルス分野 松浦善治先生の御指導のもと、多くの共同研究者ならびに分子ウイルス分野の諸子の協力のもとに行われたものであり、この場を借りて深く感謝いたします。また、自然免疫認識分子に関する貴重な遺伝子改変マウスを多数供与して頂きました、大阪大学免疫学フロンティア研究センターの審良静男先生に感謝いたします。また、杉浦奨励賞にご推薦くださいました松浦善治先生、ならびに選考委員の先生方に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Matsuura, Y., R. D. Possee, H. A. Overton, and D. H. Bishop. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J Gen Virol* 68:1233-50, 1987.
- 2) Luckock, V. A., and M. D. Summers. Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* 167:56-71, 1988.
- 3) Hofmann, C., V. Sandig, G. Jennings, M. Rudolph, P. Schlag, and M. Strauss. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10099-103, 1995.
- 4) Boyce, F. M., and N. L. Bucher. Baculovirus-mediated

- gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2348-52, 1996.
- 5) Shoji, I., H. Aizaki, H. Tani, K. Ishii, T. Chiba, I. Saito, T. Miyamura, and Y. Matsuura. Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J Gen Virol* 78:2657-64, 1997.
 - 6) Tani, H., M. Nishijima, H. Ushijima, T. Miyamura, and Y. Matsuura. Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology* 279:343-53, 2001..
 - 7) Tani, H., C. K. Limn, C. C. Yap, M. Onishi, M. Nozaki, Y. Nishimune, N. Okahashi, Y. Kitagawa, R. Watanabe, R. Mochizuki, K. Moriishi, and Y. Matsuura. In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. *J Virol* 77:9799-808, 2003.
 - 8) Kataoka, C., Y. Kaname, S. Taguwa, T. Abe, T. Fukuhara, H. Tani, K. Moriishi, and Y. Matsuura. Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells. *J Virol* 86:2610-20, 2012..
 - 9) Gronowski, A. M., D. M. Hilbert, K. C. Sheehan, G. Garotta, and R. D. Schreiber. Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *J Virol* 73:9944-51, 1999.
 - 10) Beck, N. B., J. S. Sidhu, and C. J. Omiecinski. Baculovirus vectors repress phenobarbital-mediated gene induction and stimulate cytokine expression in primary cultures of rat hepatocytes. *Gene Ther* 7:1274-83, 2000.
 - 11) Abe, T., H. Takahashi, H. Hamazaki, N. Miyano-Kurosaki, Y. Matsuura, and H. Takaku. Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J Immunol* 171:1133-9, 2003.
 - 12) Kaname, Y., H. Tani, C. Kataoka, M. Shiokawa, S. Taguwa, T. Abe, K. Moriishi, T. Kinoshita, and Y. Matsuura. Acquisition of complement resistance through incorporation of CD55/decay-accelerating factor into viral particles bearing baculovirus GP64. *J Virol* 84:3210-9, 2010.
 - 13) Aoki, H., Y. Sakoda, K. Jukuroki, A. Takada, H. Kida, and A. Fukusho. Induction of antibodies in mice by a recombinant baculovirus expressing pseudorabies virus glycoprotein B in mammalian cells. *Vet Microbiol* 68:197-207, 1999.
 - 14) Facciabene, A., L. Aurisicchio, and N. La Monica. Baculovirus vectors elicit antigen-specific immune responses in mice. *J Virol* 78:8663-72, 2004.
 - 15) Abe, T., H. Hemmi, H. Miyamoto, K. Moriishi, S. Tamura, H. Takaku, S. Akira, and Y. Matsuura. Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J Virol* 79:2847-58, 2005.
 - 16) Abe, T., Y. Kaname, X. Wen, H. Tani, K. Moriishi, S. Uematsu, O. Takeuchi, K. J. Ishii, T. Kawai, S. Akira, and Y. Matsuura. Baculovirus induces type I interferon production through toll-like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner. *J Virol* 83:7629-40, 2009.
 - 17) Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2:675-80, 2001.
 - 18) Kawai, T., and S. Akira. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 7:131-7, 2006.
 - 19) Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-5, 2000.
 - 20) Hacker, H., H. Mischak, T. Miethke, S. Liptay, R. Schmid, T. Sparwasser, K. Heeg, G. B. Lipford, and H. Wagner. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *Embo J* 17:6230-40, 1998.
 - 21) Chuang, T. H., J. Lee, L. Kline, J. C. Mathison, and R. J. Ulevitch. Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *J Leukoc Biol* 71:538-44, 2002.
 - 22) Waibler, Z., M. Anzaghe, H. Ludwig, S. Akira, S. Weiss, G. Sutter, and U. Kalinke. Modified vaccinia virus Ankara induces Toll-like receptor-independent type I interferon responses. *J Virol* 81:12102-10, 2007.
 - 23) Zhu, J., X. Huang, and Y. Yang. Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. *J Virol* 81:3170-80, 2007.
 - 24) Hochrein, H., B. Schlatter, M. O'Keeffe, C. Wagner, F. Schmitz, M. Schiemann, S. Bauer, M. Suter, and H. Wagner. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11416-21, 2004.
 - 25) Nociari, M., O. Ocheretina, J. W. Schoggins, and E. Falck-Pedersen. Sensing infection by adenovirus: Toll-like receptor-independent viral DNA recognition signals activation of the interferon regulatory factor 3 master regulator. *J Virol* 81:4145-57, 2007.
 - 26) Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita, and S. Akira. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441:101-5, 2006.
 - 27) Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K. J. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6:981-8, 2005.
 - 28) Ishii, K. J., C. Coban, H. Kato, K. Takahashi, Y. Torii, F. Takeshita, H. Ludwig, G. Sutter, K. Suzuki, H. Hemmi, S. Sato, M. Yamamoto, S. Uematsu, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 7:40-8, 2006.
 - 29) Stetson, D. B., and R. Medzhitov. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24:93-103, 2006.
 - 30) Ishikawa, H., Z. Ma, and G. N. Barber. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-

- dependent innate immunity. *Nature* 461:788-92, 2009.
- 31) Tokunaga, T., H. Yamamoto, S. Shimada, H. Abe, T. Fukuda, Y. Fujisawa, Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka, T. Sudo, and et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 72:955-62, 1984.
- 32) Tokunaga, T., T. Yamamoto, and S. Yamamoto. How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn J Infect Dis* 52:1-11, 1999.
- 33) Kitajima, M., T. Abe, N. Miyano-Kurosaki, M. Taniguchi, T. Nakayama, and H. Takaku. Induction of natural killer cell-dependent antitumor immunity by the *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. *Mol Ther* 16:261-8, 2008.
- 34) Hervas-Stubbs, S., P. Rueda, L. Lopez, and C. Leclerc. Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN. *J Immunol* 178:2361-9, 2007.
- 35) Barsoum, J., R. Brown, M. McKee, and F. M. Boyce. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Hum Gene Ther* 8:2011-8, 1997.
- 36) Abe, T., and Y. Matsuura. Host innate immune responses induced by baculovirus in mammals. *Curr Gene Ther* 10:226-31, 2010.
- 37) Kitagawa, Y., H. Tani, C. K. Limn, T. M. Matsunaga, K. Moriishi, and Y. Matsuura. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J Virol* 79:3639-52, 2005.

Application and analysis of host innate immune response for the infection control and prevention

Takayuki ABE, PhD.

Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University, Yamada-oka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan

Present address ; Department of Medicine, University of Miami School of Medicine, Miami, FL 33136, USA

E-mail : Tabe@med.miami.edu

The baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) has been widely used not only to achieve a high level of foreign gene expression in insect cells but also for efficient gene transduction into mammalian cells without any replication. In addition to the efficient gene delivery, baculovirus has been shown to induce host innate immune responses in various mammalian cells and in mice. The baculovirus has abundant CpG motifs in the viral genome and is capable of inducing pro-inflammatory cytokines and interferons (IFNs) through Toll-like receptor (TLR)-dependent and -independent signaling pathways in a cell-type-specific manner. The cytoplasmic helicase proteins RIG-I (retinoic-acid-inducible protein I) and MDA5 (melanoma-differentiation-associated gene 5) have been identified as viral dsRNA detectors and the adaptor IPS-1 (IFN- β promoter stimulator-1) interacts with RIG-I and MDA5 to facilitate type-I IFN production mediated interferon regulatory factor 3 (IRF3) and 7 (IRF7). These helicases and IPS-1, however, were not essential for the type-I IFN and inflammatory cytokine responses to baculovirus. The baculovirus also has a strong adjuvant activity, and recombinant baculoviruses encoding neutralization epitopes elicit protective immunity in mice. This review deals with the current status of our knowledge of the induction of host innate immune responses by baculovirus and discusses the future prospects for baculovirus vectors.