

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04638

研究課題名(和文) 遺伝子発現と生体応答の包括的制御による治療係数の高いサイトカイン遺伝子治療法開発

研究課題名(英文) Development of cytokine gene therapy with high therapeutic index by systemic regulation of transgene expression and biological response.

研究代表者

高倉 喜信 (Takakura, Yoshinobu)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30171432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：インターフェロン- γ (IFN γ) は多様かつ強力な生物活性を有するサイトカインである。本研究では効果的なIFN γ 遺伝子治療法の開発を目的として検討を行った。まず、持続的なIFN γ 遺伝子持続発現を可能とするMxプロモーター駆動性ベクターpMx-IFN γ の開発に成功した。pMx-IFN γ による持続的IFN γ 発現はがん・多発性硬化症(MS)の疾患モデルマウスにおいて高い治療効果を示した。また、Galectin-9 (gal9) とIFN γ を融合したIFN γ -gal9融合タンパク質を設計し、IFN γ のMS治療効果増強と副作用低減にも成功した。以上、治療係数の高いIFN γ 遺伝子治療法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Interferon- γ (IFN γ) is a cytokine with pleiotropic and potent bioactivity. In this study, effective IFN γ gene therapy was developed. First, a plasmid vector named as pMx-IFN γ , which is driven by Mx promoter, was developed to achieve sustained IFN γ transgene expression. Sustained IFN γ expression from pMx-IFN γ was effective in treating cancer and multiple sclerosis (MS) in model mice. Moreover, by designing a fusion protein of galectin-9 (gal9) and IFN γ named as IFN γ -gal9, it was succeeded in improving therapeutic effect of IFN γ on MS and reducing adverse effect of IFN γ . In conclusion, IFN γ gene therapy with high therapeutic index was successfully developed.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：遺伝子治療 サイトカイン プラスミドDNA

1. 研究開始当初の背景

インターフェロン (IFN) は、強力かつ多彩な生理機能を有する分泌性タンパク質であり、これまでに医薬品として利用されてきた。これら IFN 医薬品の開発の過程で、その効果を最大限に引き出すには体内動態の制御が必須であり、これを実現するドラッグデリバリーシステム (DDS) の重要性が指摘されてきた。例えば IFN に polyethylene glycol (PEG) を修飾した PEG 化 IFN は、PEG 化による生体内半減期の延長によって治療効果が大幅に改善されている。その反面、PEG に起因する立体障害による受容体との親和性低下により活性が 10 分の 1 以下に低下することも知られている。治療用のタンパク質をコードした遺伝子の導入により治療を行う遺伝子治療は、原理的には活性を低下させることなく持続的なタンパク質の供給を可能にする治療法である。従来の医薬品では治療が困難な難治性疾患の治療法になりえると期待され、その開発研究が世界中で進められてきており、IFN 遺伝子治療法についてもその研究・開発が行われている。我々は早くから IFN 遺伝子治療法の開発に着手し、これまで発現ベクターおよびタンパク質のデザインによる発現制御法を開発するとともに、生体応答の制御による治療効果の最適化に取り組んできた。

治療用タンパク質の遺伝子デリバリーにおいては、遺伝子 (cDNA) をコードするプラスミド DNA の改変によって遺伝子発現プロファイルの制御が可能である。しかしながら、その遺伝子発現過程の制御が不十分であるために持続的な遺伝子発現が得られず、治療効果が得られない場合も多い。我々は、発現持続化による IFN 遺伝子治療効果増強に取り組み、プラスミドベクターの CpG モチーフ数の削減とプロモーターの最適化による血中 IFN 濃度の持続化に成功し、担癌マウス・アトピー性皮膚炎モデルマウスなどの疾患モデルにおいて高い治療効果を得た。最近では難治性疾患である IFN 抵抗性 C 型肝炎に着目し、抵抗性 C 型肝炎ウイルスに感染したヒト肝細胞キメラマウスにおいて、持続的に IFN を発現させることで、一過性の IFN 発現では治療が困難な慢性 C 型肝炎に対して高い治療効果が得られることを報告した。以上の結果は、治療における発現持続性の重要性を示すものであるが、本研究ではさらに有効性が高く副作用の少ない治療の実現を目的として、より持続性に優れたベクターを開発するとともに、コードされる IFN タンパク質に機能性を付与することで、より安全性の高い IFN 遺伝子治療法の実現が可能ではないかと考えた。IFN 遺伝子治療においては、IFN に機能性を有するタンパク質・ペプチドを融合した新規 IFN 誘導体をデザインし、その cDNA を組み込むことで機能性を付与したサイトカインを得ることも可能である。これまでに、機能性タンパク質の融合による IFN の

体内動態の制御を試みてきた。その中で、血清アルブミンあるいは血清アルブミン結合ペプチド融合 IFN を設計し、IFN の生体内半減期の延長に成功した。また、遺伝子導入部位に特異的な IFN の作用を得ることによる全身性副作用の低減を目的として、細胞外スーパーオキシドディスムターゼのヘパリン結合ドメイン (HBD) を融合することで、IFN を遺伝子導入細胞近傍に留めること、これによる局所濃度の増大と血中濃度の低下により遺伝子導入部位特異的な治療効果を得るとともに、全身への IFN の移行の抑制による副作用の低減が可能であることを見出している。以上のような背景から、そのタンパク質構造をデザインすることで標的部位の環境に反応して特異的な生物活性の発揮を可能とすることによって、さらにその有効性・安全性の向上の可能性について検討を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子発現と生体応答の包括的制御による治療係数の高い IFN 遺伝子治療法の実現を目的として、従来の方法では十分な遺伝子発現の持続化が困難であった IFN について持続発現を可能とするベクターの構築と、IFN を機能性を有するタンパク質と融合した新規融合タンパク質を設計し、多発性硬化症 (MS) の治療効果の増強と副作用の減弱について検討することとした。

IFN 持続発現ベクターの構築

IFN は遺伝子発現抑制作用を有するためにその持続発現は困難であった。そこで本研究では、IFN に応答してそのプロモーター活性が増強される Mx プロモーターに着目し、Mx プロモーターの下流に IFN 遺伝子をコードしたプラスミドベクター pMx-IFN を構築した。すなわち、pMx-IFN を遺伝子導入後に発現する IFN が遺伝子導入細胞に存在する受容体、IFN 受容体 (IFNAR) に結合することで Mx プロモーターが活性化し、オートクライン機構により下流の IFN が発現することで持続的な IFN 発現が可能となると期待した (図 1)。

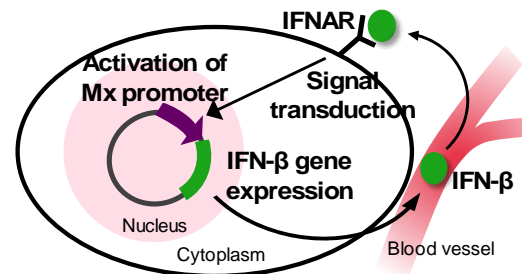


図1 Mxプロモータを利用した持続的なIFNβ発現の模式図

新規 IFN 融合タンパク質の設計

MS は再発と寛解を繰り返す中枢性脱髄疾患であり、再発予防薬のひとつである IFN

はMS治療に貢献してきた。一般に、IFNの臨床使用ではIFNの生物活性による副作用が継続治療の妨げとなる。MS発症への関与が示唆されている活性化Th1細胞上に特異的に発現しているT cell immunoglobulins and mucin domain-3 (Tim-3)は、そのリガンドであるGalectin-9 (gal-9)と結合することでTim-3/gal-9シグナルを介したTh1細胞の活性化を抑制する。そこで本研究では、生物活性の制御によるMS治療効果の増強と副作用低減を目的として、IFNにgal-9を融合したIFN-gal-9融合タンパク質を設計した。

3. 研究の方法

IFN- 持続発現ベクターの構築

プラスミドベクター: マウスIFNをpCpGベクターに組み込んだ、pCpG-IFNを構築した。pCpG-IFNのプロモーターをMxプロモーターに置換したpMx-IFNを構築した。IFNの代わりにルシフェラーゼを組み込んだpMx-Lucを構築した。**IFN 応答性の評価:** Mxプロモーター駆動性のルシフェラーゼ発現プラスミドベクター (pMx-Luc) を遺伝子導入したマウスメラノーマ細胞株B16-BL6細胞に対し、IFNを種々の濃度で添加し、一定時間経過後にルシフェラーゼ活性を測定することでMxプロモーターのIFN 応答性を評価した。マウス: balb/c マウスを用いた。マウス結腸癌細胞株 colon26 細胞をマウス皮内に移植することで担癌モデルマウスを作製した。**ハイドロダイナミクス法を利用したマウスへの遺伝子導入:** プラスミドベクターあるいはsiRNAをマウス体重の約10%に相当する大容量の生理食塩水溶液として、尾静脈内へ急速投与した(ハイドロダイナミクス法)。遺伝子導入後に経時的に採血し、ELISA法により血中IFN濃度推移を評価した。**免疫蛍光染色による腫瘍組織中における血管新生の検出:** ハイドロダイナミクス法を用いて各pDNAを遺伝子導入、一定時間後に腫瘍組織を回収した。回収した腫瘍組織の凍結切片を作製し、血管内皮細胞マーカー分子であるCD31に対する特異的抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。染色した切片は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。**抗腫瘍効果の評価:** 担癌モデルマウスに対して各プラスミドベクターを投与後、経時的に腫瘍体積を測定することで抗腫瘍効果を判定した。

新規IFN融合タンパク質の設計

プラスミドベクター: pMx-IFNを用いた。IFNの代わりにルシフェラーゼを組み込んだpMx-Lucを用いた。IFNとgal-9を長さの異なるGSリンカーを介して融合したIFN-gal-9融合タンパク質を4種類設計し、これをpMxベクターに組み込んだプラスミドベクターを構築した(図2)。IFN生物活性の評価: COS7細胞に天然型IFNあるいはIFN誘導体を発現するプラスミドDNAをトラン

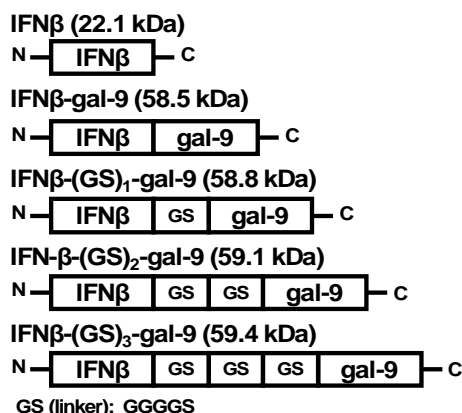


図2 各種IFNβ-gal-9融合タンパク質の模式図

スフェクションした後、培養上清を回収し、回収されたIFNの量をELISA法により定量した。Mxプロモーター駆動性のルシフェラーゼ発現プラスミドベクター (pMx-Luc) を遺伝子導入したマウスメラノーマ細胞株B16-BL6細胞に対し、各種IFNを種々の濃度で添加し、一定時間経過後にルシフェラーゼ活性を測定することで各IFNの生物活性を評価した。**マウス:** C57/bl6 マウスを用いた。C57/bl6 マウスに Myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55 (MOG35-55)を投与することで実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルマウスを作製し、MSのモデルマウスとして用いた。**T細胞に対する各IFN誘導体の抑制効果の評価:** EAEモデルマウスの脾臓細胞を回収し、抗原とともに各種IFN誘導体を添加した。一定時間経過後の細胞数をWST法により測定することで細胞増殖抑制効果を、培養上清中のIFN濃度をELISA法により測定することでT細胞の活性化抑制能を評価した。別途、抗IFN受容体抗体を添加時に同様の実験を行い、IFN生物活性阻害時のT細胞抑制能を評価した。**血液脳関門 (BBB) のバリア能の評価:** EAEモデルマウスに各プラスミドベクターを遺伝子導入後、一定時間経過後にエバンスブルー溶液を投与した。投与後、脳および脊髄を回収し観察した後、組織中エバンスブルー量を定量し、BBBを通過したエバンスブルー量を見積もることでBBBのバリア能を評価した。**MS治療効果および副作用の評価:** EAEモデルマウスに対して各プラスミドベクターを投与後、足の引きずり動作等の運動障害について経時的に評価し臨床スコアを算出することで治療効果を評価した。副作用の指標として、血液中の白血球数を経時的に評価した。

4. 研究成果

IFN 持続発現ベクターの構築

ルシフェラーゼ活性を指標としたレポーターアッセイによりMxプロモーターのIFN 応答性を評価したところ、Mxプロモーターは10pg/ml以上のIFNの添加によりIFN濃度依存的に活性化することを確認した。そ

ここでマウスにハイドロダイナミクス法により遺伝子導入を行い、血中 IFN 濃度を経時的に測定したところ、IFN においては持続的な発現が得られた pCpG ベクターを用いても持続的な IFN 発現は得られなかった。一方で、pMX-IFN を投与したマウスにおいて一月にわたり 100pg/ml 以上の IFN 血中濃度が維持されたことから、Mx プロモーターを利用することで持続的な IFN 発現が得られることが明らかとなった。また、siRNA により IFN 受容体をノックダウンしたマウスにおいて、pMX-IFN 遺伝子導入時の IFN 血中濃度が 10 倍以上低下したことから、pMX-IFN からの遺伝子発現は、設計したとおりオートクライン機構を利用していることを確認した。担癌モデルマウスを用いた検討において、pMX-IFN の遺伝子導入により腫瘍組織中の血管新生が抑制された。また腫瘍組織の増殖速度も有意に低下した。以上、Mx プロモーターを利用した IFN 発現ベクター、pMX-IFN を開発し、IFN の遺伝子発現の持続化に成功するとともに、持続的な IFN 発現により高い抗腫瘍効果が得られることを明らかにした。

新規 IFN 融合タンパク質の設計

設計した IFN 融合タンパク質が非標的細胞に及ぼす活性の程度をレポーターアッセイにより評価した。非標的細胞として、マウスメラノーマ細胞株である B16BL6 細胞を選択し検討した結果、IFN と比較して IFN-gal-9 融合タンパク質の活性は有意に低下していたことから、非標的細胞に作用しにくいことが明らかとなった。次の標的細胞として EAE モデルマウスの脾細胞中の T 細胞への影響について検討を行った。その結果、IFN-gal-9 融合タンパク質添加後の細胞生存率は 1000pg/mL 以上の濃度で有意に低下し、IFN の添加時と比較しても有意に低下することを明らかとした。また、培養上清中の IFN 濃度も同様に 1000pg/mL の IFN 濃度において有意に低下し、特に特にリンカーを 1 つないし 2 つ含む IFN-gal-9 融合タンパク質の群において IFN よりも強力な効果が得られた。続けて、IFN-gal-9 融合タンパク質中の gal-9 の効果を評価することを目的として、IFN 受容体に対する抗体を同時に添加した際の、効果を検証した。その結果、抗 IFN 受容体抗体を加えた場合においても IFN-(GS)₂-gal-9 融合タンパク質では細胞生存率の有意な低下が認められた。培養上清中の IFN 濃度も IFN と比較して、IFN-gal-9 融合タンパク質群では低下する傾向を認めた。以上の結果から、EAE マウスを利用した治療効果の検証には、T 細胞を標的とした実験において最も高い効果を示した IFN-(GS)₂-gal-9 を用いて検討することとした。EAE マウスに遺伝子導入し、経日的に臨床スコアを評価するとともに血中 IFN 濃度および IFN の副作用のひとつである血球減少の

指標として、白血球数を測定した。その結果、IFN 治療群及び IFN-gal-9 融合タンパク質治療群ではコントロール群と比較してスコアが有意に改善し、IFN-gal-9 融合タンパク質治療群のスコアは IFN 治療群よりも良い傾向にあった。これは gal-9 を IFN に融合することで治療効果が増強されたためと考えられる。白血球数推移については、大幅に血球が減少した IFN 治療群とは異なり、IFN-gal-9 融合タンパク質治療群では血球がほとんど減少しなかったことから、IFN-gal-9 融合タンパク質とすることで、治 IFN に起因する副作用の低減を可能となることを明らかとした。EAE に伴う BBB の破綻の程度を評価したところ、コントロール群では脳と特に脊髄において BBB の破綻を示すエバンスブルーの漏出による青色が観察されたが、IFN 及び IFN-gal-9 融合タンパク質治療群ではエバンスブルーの漏出はほとんど見られず、定量結果においても脊髄に漏出したエバンスブルーは IFN 及び IFN-gal-9 融合タンパク質治療群ではコントロール群と比較して有意に減少した。以上より、治療によって EAE の病態悪化に伴う BBB の破綻を抑制可能であることが示された。

以上、IFN-gal-9 融合タンパク質を設計することで、IFN の MS 治療効果の増強と副作用の低減を可能とした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Hamana A, Takahashi Y, Tanioka A, Nishikawa M, Takakura Y. Safe and effective interferon-beta gene therapy for the treatment of multiple sclerosis by regulating biological activity through the design of interferon-beta-galactin-9 fusion proteins. *Int J Pharm.* vol 536, 2017, pp. 310-317. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.12.010

Hamana A, Takahashi Y, Tanioka A, Nishikawa M, Takakura Y. Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice by Interferon-Beta Gene Therapy, Using a Long-Term Expression Plasmid Vector. *Mol Pharm.* vol 14, 2017, pp. 1212-1217. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b01093

Hamana A, Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Interferon-Inducible Mx Promoter-Driven, Long-Term Transgene Expression System of Interferon for Cancer Gene Therapy. *Hum Gene Ther.* vol 27, 2016, pp. 936-945. doi: 10.1089/hum.2016.023

〔学会発表〕(計 7 件)

谷岡あかね、高橋有己、濱名温志、西川元也、高倉喜信 青色光受容体 VIVID を利用したインターフェロンの活性制御 . 第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2017 年 10 月 14 日、兵庫医療大学 (兵庫県・神戸市)

濱名温志、高橋有己、内田宅郎、西川元也、今村道雄、茶山一彰、高倉喜信 インターフェロン持続発現プラスミドを利用した直接作用型抗ウイルス薬耐性 C 型肝炎ウイルス感染に対するインターフェロン遺伝子治療 . 第 33 回日本 DDS 学会学術集会、2017 年 7 月 6 日-7 日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

濱名温志、高橋有己、谷岡あかね、西川元也、高倉喜信 持続的インターフェロン 遺伝子発現による多発性硬化症の再発予防 . 日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 25 日-27 日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

Atsushi Hamana, Yuki Takahashi, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura Sustained expression system of interferon-beta by using interferon-inducible Mx promoter for interferon-beta gene therapy. Globalization of Pharmaceutics Education Network 2016 (GPEN2016)、2016 年 11 月 9 日-12 日、カンサス大学 (米国・カンサス州)

濱名温志、高橋有己、西川元也、高倉喜信 インターフェロン- 持続発現ベクターの開発とがん遺伝子治療への適用 . 日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日-29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

濱名温志、高橋有己、西川元也、高倉喜信 インターフェロン 持続発現プラスミドベクターの構築とがん遺伝子治療への適用 . 日本核酸医薬学会第 1 回年会、2015 年 11 月 30 日-12 月 2 日、京都テルサ (京都府・京都市)

濱名温志、高橋有己、西川元也、高倉喜信 インターフェロン応答性 Mx プロモーターを利用したインターフェロン 持続発現プラスミドベクターの開発 . 第 31 回 日本 DDS 学会学術集会、2015 年 7 月 2 日-3 日、京王プラザホテル (東京都・新宿区)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高倉 喜信 (TAKAKURA, Yoshinobu)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号 : 3 0 1 7 1 4 3 2

(2) 研究分担者

高橋 有己 (TAKAHASHI, Yuki)
京都大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号 : 0 0 5 4 7 8 7 0