

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月18日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390009

研究課題名（和文） 治療用タンパク・siRNA発現の時空間制御のためのプラスミドデザインとデリバリー

研究課題名（英文） Design and delivery of plasmid vector for spatiotemporal control of the expression of therapeutic protein and siRNA

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：30171432

研究成果の概要（和文）：

本研究では、インターフェロン- $\gamma$  を治療用タンパク質として選択し、これを用いた遺伝子治療の開発を行った。IFN- $\gamma$  の遺伝子発現ベクターのプロモータを選択することで IFN- $\gamma$  遺伝子発現の時間的制御が可能であり、IFN- $\gamma$  を動態制御能を有するタンパク質との融合タンパク質とすることで IFN- $\gamma$  の空間的制御が可能であった。また、IFN- $\gamma$  の時空間分布の制御は、治療効果の増大と副作用の低減に有用であった。

研究成果の概要（英文）：

Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) was selected as a therapeutic protein and several IFN- $\gamma$  gene therapy systems were developed. Selection of proper promoters of IFN- $\gamma$ -expressing vectors resulted in the regulation of the time profile of IFN- $\gamma$  transgene expression. A fusion of IFN- $\gamma$  with a protein that regulates the tissue distribution resulted in the spatiotemporal control of IFN- $\gamma$  after in vivo gene transfer. This control led to an increase in the therapeutic effect of IFN- $\gamma$ -based gene therapy on metastatic tumor with reduction in adverse effects.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー、遺伝子治療、RNA干渉、プラスミドDNA

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、生命活動における主要な機能分子であり、個体のホメオスタシス維持に中心的役割を果たす。ホメオスタシスが破綻し復元できない場合、何らかの治療が必要となり、医薬品投与による疾患治療が検討される。ホメオスタシス異常には、機能タンパク質が欠損・不足する場合と、不要なタンパク質発現が増大する場合があり、前者はタンパク質補充、後者はタンパク質阻害・発現抑制

が有効な治療手段となる。

タンパク質補充による疾患治療に関しては、バイオテクノロジー技術の急速な進歩により、現在までに多くの医薬品が開発されてきた。しかしながら、内因性のタンパク質発現と比較して、体外から投与されるタンパク質医薬品の場合、その効果を最大限引き出すには体内動態制御が必要であり、これを実現するドラッグデリバリーシステム（DDS）の必要性が指摘されてきた。研究代表者らは早

くからこの問題に取り組み、タンパク質の構造・物性と体内動態との関連を明らかにすることで、分子構造修飾によるタンパク質の体内動態制御指針を確立し、疾患治療モデルでの有用性を証明した。タンパク質は、必要時に遺伝子から転写・翻訳され、細胞内の特定オルガネラに輸送、あるいは細胞外に分泌され、機能すべき場に移行して活性を発現する。遺伝子欠損に対する画期的治療法として提唱された遺伝子治療の試みにおいては、遺伝子 (cDNA) の形で細胞に導入されたタンパク質が、転写・翻訳の過程を経て発現することで治療効果が得られる。遺伝子治療は、低分子医薬品やタンパク質医薬品では治療が不可能な遺伝性疾患に対しても有効な治療法になるとの期待から、その開発研究が世界中で爆発的に進められてきた。

これまでに、様々な遺伝子導入方法が開発されるとともに、治療対象も従来の遺伝性疾患に限らず、癌やウイルス感染、生活習慣病関連疾患にまで広がっている。その反面、様々な問題点も指摘されるなど、「夢の治療法」とはほど遠い現実も明らかとなってきた。その最大の問題は遺伝子デリバリー過程にあると考えられる。*In vivo* 遺伝子導入によりタンパク質発現を得ることは容易であるが、治療上必要とされる遺伝子発現プロファイルを満たすことは、特に細胞内タンパク質補充の場合などは非常に困難である。申請者らは、この遺伝子デリバリーの可能性と限界を早くから整理し、「遺伝子の形でのタンパク質デリバリー」に焦点を絞り、遺伝子治療の開発研究に取り組んできた。タンパク質の遺伝子デリバリーでは、mRNA への転写、タンパク質への翻訳過程が存在することから、タンパク質自体をデリバリーする方法とは異なり、発現プロファイルの制御が可能である。

申請者らは、発現の持続化によるインターフェロン (IFN) 遺伝子治療効果の増強に取り組み、IFN 発現プラスミドベクターから CpG モチーフを除去することで、血中 IFN 濃度の持続化及び癌治療効果の増強に成功した。ここでは、同量のプラスミドベクターを投与した場合でも、IFN 発現量はベクターの種類によって最大で 60 倍も異なることが示された。この結果は、遺伝子発現過程の制御により、遺伝子治療の有効性を著しく増大できる可能性を示すものである。

## 2. 研究の目的

これまでの研究からプラスミドベクターを利用した治療用タンパク質デリバリーによる疾患治療法において治療用タンパク質の遺伝子発現のプロファイルの制御と治療用タンパク質の体内動態の制御、すなわち治療用タンパク質の時空間プロファイルの制御によって治療効果を大幅に増大可能である

ことは明らかとした。そこで本研究では、プラスミドベクターを利用した効果的な疾患治療法の開発を目的に、(1) 長期持続型 IFN- $\gamma$  発現 pDNA のアトピー性皮膚炎治療への適用、(2) ベクターデザイン、(3) タンパク質デザインに焦点を当て、治療用タンパク質発現の時空間制御による疾患治療システムの最適化を試みるとともにその治療効果について実証を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 長期持続型 IFN- $\gamma$  発現 pDNA のアトピー性皮膚炎治療への適用

pDNA の構築: 持続的な遺伝子発現が可能である pDNA 骨格 pCpG-mcs (InvivoGen) にマウス IFN- $\gamma$  cDNA を組み込み pCpG-muIFN- $\gamma$  を構築した。マウス: ICR マウスおよびアトピー性皮膚炎モデルマウス NC/Nga 雄性マウス (6 週齢) を用いた。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: naked pDNA をマウスの体重の約 8 % 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)。血中サイトカイン濃度の測定: 経時的にマウス尾静脈より採血し、血清中サイトカイン濃度を ELISA 法により測定した。mRNA の測定: マウス脾臓から採取した total RNA を用いて cDNA を調整し、mRNA 量を real-time PCR 法により測定した。皮膚炎発症抑制効果の評価: 皮膚の状態に対するスコア評価、搔破回数の測定、経皮水分蒸散量 (TEWL) の測定、および、皮膚病変部の組織学的評価を行うことで評価した。

(2) 安定な遺伝子発現を可能とするプラスミドベクターの開発

pDNA: pCpG-mcs にヒト IFN- $\gamma$  cDNA を挿入することで pCpG-huIFN- $\gamma$  を構築した。このベクターをプロトタイプとして、CMV, SV40, ROSA26 プロモーターと CMV, SV40 エンハンサーあるいはエンハンサー無しを組み合わせることで、計 11 種類の huIFN- $\gamma$  発現ベクターを構築した。別途、ROSA26 プロモーターの下流にマウス IFN- $\gamma$  を挿入した pROSA-muIFN- $\gamma$  を構築した。ハイドロダイナミクス法を利用した遺伝子導入と発現評価: 構築した各 huIFN- $\gamma$  発現ベクターを ICR マウスにハイドロダイナミクス法により投与した。得られる遺伝子発現については経時的に採血をおこない、血中 huIFN- $\gamma$  濃度を ELISA 法を用いて測定することで評価した。安定した IFN- $\gamma$  遺伝子発現による副作用低減の評価: ICR マウスに pCpG-muIFN- $\gamma$  あるいは pROSA-huIFN- $\gamma$  をハイドロダイナミクス法により投与後に経時的にマウス尾静脈より採血し血中 muIFN- $\gamma$  濃度を測定するとともに、副作用の指標として体重を経時的に測定した。

(3) 血中滞留型 IFN- $\gamma$  発現 pDNA の構築  
pDNA: FN- $\gamma$  の C 末端、あるいは N 末端に mouse serum albumin (MSA) を連結した融合タンパク質をコードする遺伝子を pcDNA3.1 (Invitrogen) に組み込むことで pCMV-IFN- $\gamma$ -MSA あるいは pCMV-MSA-IFN- $\gamma$  を構築した。培養細胞: COS7 細胞に遺伝子導入後培養上清を回収し下記の解析を行った。IFN- $\gamma$  融合タンパク質の解析: 各種 IFN- $\gamma$  融合タンパク質の分子量についてはウェスタンブロッティング法を用いて評価した。生物活性については IFN- $\gamma$  活性依存的にルシフェラーゼを発現するプラスミド DNA を利用したレポーターアッセイ法を用いて評価した。マウスおよび遺伝子導入法: ICR マウスおよび Balb/c マウスを用いた。遺伝子導入法としてハイドロダイナミクス法を用いた。血中滞留性および抗腫瘍効果の評価: ICR マウスへ遺伝子導入後に、経時的に血中 IFN- $\gamma$  を ELISA 法により測定することで血中滞留性の評価を行った。Balb/c マウス尾静脈よりマウス結腸癌細胞株 CT-26 を移植することで肺転移モデルを作製し、癌細胞移植 3 日後に各種 IFN- $\gamma$  発現 pDNA を投与し、癌細胞移植 14 日後の肺結節数を計測することで抗腫瘍効果を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 長期持続型 IFN- $\gamma$  発現 pDNA のアトピー性皮膚炎への適用

アトピー性皮膚炎モデルマウスに pCpG-muIFN- $\gamma$  を投与した後の血清中 IFN- $\gamma$  濃度を経時的に測定したところ、長期にわたり高い血清中 IFN- $\gamma$  濃度が検出された。このとき Th1 サイトカインである IL-12 の血清中濃度は有意な上昇が認められた一方、Th2 応答により産生が亢進する IgE は有意に抑制されていた。また、脾臓中 mRNA 発現を測定した結果、未処置群と比較して pCpG-muIFN- $\gamma$  投与群では Th2 サイトカインおよび TARC 発現の低下が認められ、IFN- $\gamma$  発現の持続による Th バランスの正常化が示唆された。皮膚炎発症抑制効果は、pCpG-muIFN- $\gamma$  投与群では皮膚炎の発症及び進行が顕著に抑制され、併せて搔破回数の減少および TEWL も有意に抑制された。また、組織学的評価より pCpG-muIFN- $\gamma$  投与群では表皮組織の肥厚ならびにリンパ球や好中球、マスト細胞の浸潤といった所見が認められなかった。短期発現型 IFN- $\gamma$  発現ベクターを遺伝子投与ではこのような治療効果は得られなかったことから IFN- $\gamma$  の遺伝子発現の持続化は慢性疾患に対する IFN- $\gamma$  の治療効果の増強に有用であることが示された。

(2) 安定な遺伝子発現を可能とするプラスミドベクターの開発

プロモーター/エンハンサーの異なる 11 種類

の huIFN- $\gamma$  遺伝子発現 pDNA をマウスに遺伝子導入後に経時的に各 pDNA からの遺伝子発現プロファイルを評価した。その結果 ROSA26 プロモーターを組み込んだ pDNA を用いることで、エンハンサーの有無や種類に寄らずに非常に安定した遺伝子発現が得られることが明らかとなった。そこで、この ROSA26 プロモーターを利用したマウス IFN- $\gamma$  発現 pDNA、pROSA-muIFN- $\gamma$  を投与し、血中 IFN- $\gamma$  濃度推移と体重変化を、従来の持続型発現ベクターである pCpG-muIFN- $\gamma$  を対照群として評価した。その結果、pROSA-muIFN- $\gamma$  を用いることで、pCpG-muIFN- $\gamma$  と比較して安定した遺伝子導入発現が得られた。さらに、pCpG-muIFN- $\gamma$  投与群では遺伝子導入直後の高い IFN- $\gamma$  濃度に起因した体重減所が見られたが、pROSA-muIFN- $\gamma$  投与群では体重減少はほとんど起こらなかった一方で、治療効果が期待できるレベルの IFN- $\gamma$  を持続的に発現させることができた。この結果は、IFN- $\gamma$  の遺伝子発現の制御により、より効果的かつ安全な IFN- $\gamma$  遺伝子治療が可能となることを示すものとする。

(3) 血中滞留型 IFN- $\gamma$  の構築

構築した pCMV-IFN- $\gamma$ -MSA および pCMV-MSA-IFN- $\gamma$  を COS-7 細胞に遺伝子導入した後、培養上清を回収しタンパク質の活性を評価した。その結果、MSA 融合 IFN- $\gamma$  タンパク質の IFN- $\gamma$  生物活性は、天然型 IFN- $\gamma$  の 200 分の 1 程度にまで活性が著しく低下した。また、各タンパク質をマウスへ静注した場合の血中プロファイルから、MSA の融合化により IFN- $\gamma$  タンパク質の血中滞留性が向上することが確認された。ハイドロダイナミクス法により各 pDNA をマウスに投与したところ、IFN- $\gamma$ -MSA 融合タンパク質発現 pDNA の投与により、持続的な血中濃度推移が得られた。薬動的解析の結果、IFN- $\gamma$ -MSA の血中濃度-時間曲線下面積は、IFN- $\gamma$  と比較して約 20 倍に増大したものの、生物活性の低下を考慮した IFN- $\gamma$  活性-時間曲線下面積は、MSA の融合化により約 10 分の 1 にまで低下した。一方、マウス結腸癌 CT26 細胞のマウス肺転移に対する効果を評価したところ、IFN- $\gamma$ -MSA 遺伝子導入は IFN- $\gamma$  遺伝子導入と同程度の抑制効果を示した。このことから、MSA との融合は、IFN- $\gamma$  活性を大幅に減弱するものの、体内動態の制御により高い抗腫瘍効果を得ることのできる有用な方法論になり得ることが示された。この結果は、IFN- $\gamma$  の体内動態の改善が、IFN- $\gamma$  の治療効果の改善に有用な方法となりえることを示すものとする。

以上の検討から、IFN- $\gamma$  遺伝子発現を持続化することで、従来の短期発現では治療効果

が困難であった慢性疾患の治療が可能となることを明らかとした。また、IFN- $\gamma$  遺伝子発現の時空間プロファイルを制御可能な方法の開発に成功するとともに、IFN- $\gamma$  遺伝子発現の時空間プロファイルの制御が IFN- $\gamma$  遺伝子治療の有効性・安全性を改善するうえで非常に有用な方法論となりえることを実証した。今後、さらなるか事前によって臨床に用いられる IFN- $\gamma$  遺伝子治療法が開発が進むことが期待される。

#### 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 15 件)

- ① Miyakawa N, Nishikawa M, Takahashi Y, Ando M, Misaka M, Watanabe Y, Takakura Y. Prolonged circulation half-life of interferon  $\gamma$  activity by gene delivery of interferon  $\gamma$  -serum albumin fusion protein in mice. *J Pharm Sci.* 2011; 100: 2350-2357. 査読有, DOI: 10.1002/jps.22473.
- ② Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Watanabe Y, Takakura Y. Constant and steady transgene expression of interferon- $\gamma$  by optimization of plasmid construct for safe and effective interferon- $\gamma$  gene therapy. *J Gene Med.* 2012;14:288-295. 査読有, DOI: 10.1002/jgm.2616.
- ③ Yoshida H, Nishikawa M, Kiyota T, Toyota H, Takakura Y. Increase in CpG DNA-induced inflammatory responses by DNA oxidation in macrophages and mice. *Free Radic Biol Med.* 2011;51:424-431. 査読有, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.035.
- ④ Yoshida H, Nishikawa M, Kiyota T, Uno S, Toyota H, Takahashi R, Narita M, Takakura Y. 5'-Phosphate oligodeoxynucleotides enhance the phosphodiester-CpG DNA-induced inflammatory response in macrophages. *Eur J Immunol.* 2011;41:425-436. 査読有, DOI: 10.1002/eji.201040396.
- ⑤ Takahashi Y, Nishikawa M, Takiguchi N, Suehara T, Takakura Y. Saturation of transgene protein synthesis from mRNA in cells producing a large number of transgene mRNA. *Biotechnol Bioeng.* 2011; 108: 2380-2389. 査読有, DOI: 10.1002/bit.23179.
- ⑥ Zang L, Nishikawa M, Machida K, Ando M, Takahashi Y, Watanabe Y, Takakura Y. Inhibition of nuclear delivery of plasmid DNA and transcription by interferon  $\gamma$ : hurdles to be overcome for sustained gene therapy. *Gene Ther.* 2011; 18:891-897. 査読有, DOI: 10.1038/gt.2011.35.
- ⑦ Guan X, Nishikawa M, Takemoto S, Ohno Y, Yata T, Takakura Y. Injection site-dependent induction of immune response by DNA vaccine: comparison of skin and spleen as a target for vaccination. *J Gene Med.* 2010;12:301-309. 査読有, DOI: 10.1002/jgm.1432.
- ⑧ Yamaoka A, Guan X, Takemoto S, Nishikawa M, Takakura Y. Development of a novel Hsp70-based DNA vaccine as a multifunctional antigen delivery system. *J Control Release.* 2010;142:411-415. 査読有, DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.11.005.
- ⑨ Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K, Ikoma A, Kabashima K, Toyota H, Takahashi Y, Takahashi R, Watanabe Y, Takakura Y. Sustained exogenous expression of therapeutic levels of IFN-gamma ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice via Th1 polarization. *J Immunol.* 2010; 184: 2729-2735. 査読有, DOI: 10.4049/jimmunol.0900215.
- ⑩ Takahashi Y, Vikman E, Nishikawa M, Ando M, Watanabe Y, Takakura Y. Persistent interferon transgene expression by RNA interference-mediated silencing of interferon receptors. *J Gene Med.* 2010; 12:739-746. 査読有, DOI:10.1002/jgm.1493.
- ⑪ Nishikawa M, Otsuki T, Ota A, Guan X, Takemoto S, Takahashi Y, Takakura Y. Induction of Tumor-specific Immune Response by Gene Transfer of Hsp70-cell-penetrating Peptide Fusion Protein to Tumors in Mice. *Mol Ther.* 2010; 18:421-428. 査読有, DOI:10.1038/mt.2009.203.
- ⑫ Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Nonviral vector-mediated RNA interference: its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61:760-766. 査読有, DOI: 10.1016/j.addr.2009.04.006.
- ⑬ Takemoto S, Nishikawa M, Otsuki T,

Yamaoka A, Maeda K, Ota A, Takakura Y. Enhanced generation of cytotoxic T lymphocytes by increased cytosolic delivery of MHC class I epitope fused to mouse heat shock protein 70 via polyhistidine conjugation. J Control Release. 2009;135:11-18. 査読有, DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.11.024.

- ⑭ Takahashi Y, Yamaoka K, Nishikawa M, Takakura Y. Quantitative and temporal analysis of gene silencing in tumor cells induced by small interfering RNA or short hairpin RNA expressed from plasmid vectors. J Pharm Sci. 2009;98:74-80. 査読有, DOI: 10.1002/jps.21398.
- ⑮ Isaji K, Kawase A, Matono M, Guan X, Nishikawa M, Takakura Y. Enhanced CTL response by controlled intracellular trafficking of antigen in dendritic cells following DNA vaccination. J Control Release. 2009;135:227-233. 査読有, DOI:10.1016/j.jconrel.2009.01.026.

[学会発表] (計6件)

- ① 高倉喜信. 核酸を基盤としたナノメダイシンのデザインとデリバリー 第20回 DDSカンファレンス 2011年9月16日 静岡県コンベンションアーツセンター (静岡県)
- ② Takahashi Y, Matsui Y, Nishikawa M, Takakura Y. Kinetic comparison of gene silencing profile of siRNA and shRNA-expressing plasmid DNA in vivo 7th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society 2011年9月9日 The Royal Library (Copenhagen, Denmark)
- ③ 戎浦規文, 高橋有己, 西川元也, 高倉喜信. 抗原タンパク質の発現プロファイル依存的な抗原特異的免疫応答の解析 第21アンチセンスシンポジウム+第11回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム 合同シンポジウム 2011年9月2日 大阪大学コンベンションセンター (大阪府)
- ④ Miyakawa N, Nishikawa M, Takahashi Y, Watanabe Y, Takakura Y. Design and gene delivery of mouse interferon  $\gamma$  genetically fused with mouse serum albumin. 2010 Pharmaceutical Sciences World Congress 2010年11月16日 Morial convention center (New Orleans, USA)
- ⑤ Zang L, Nishikawa M, Machida K, Ando M, Takahashi Y, Takakura Y. Interferon

$\gamma$ -mediated inhibition of nuclear entry of plasmid vector and mRNA transcription from the vector: an obstacle for repeated injections of interferon  $\gamma$ -expressing plasmid vector. Pharmaceutical Sciences World Congress 2010年11月16日 Morial convention center (New Orleans, USA)

- ⑥ 高橋有己, 西川元也, 高倉喜信. Contradictory effects of gene silencing of b-catenin in melanoma cells on proliferation and metastasis (b-catenin 遺伝子発現抑制によるがん細胞増殖抑制効果と転移促進) 2009年10月3日 第68回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜 (神奈川県)

## 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: 30171432

### (2) 研究分担者

西川 元也 (Nishikawa Makiya)  
京都大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号: 40273437

### (3) 連携研究者

なし