

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15日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790034

研究課題名（和文）細胞表面接着型インターフェロンを利用した標的特異的作用型遺伝子治療システムの開発

研究課題名（英文）Development of target-specific gene therapy system by using cell surface adhesive interferon.

研究代表者

高橋 有己（TAKAHASHI YUKI）

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00547870

研究成果の概要（和文）：

本研究では細胞表面に高い接着能を持つ IFN- γ 誘導体を新たにデザインし、遺伝子導入部位での IFN- γ 濃度を選択的に高めるシステムを開発した。開発した IFN- γ 誘導体は、細胞表面に接着可能であり、その遺伝子導入を行った臓器において選択的に生物活性を得ることが可能であった。また、本システムは従来の IFN- γ 遺伝子治療システムと同等かそれ以上の治療効果を癌モデルマウスで発揮した一方で、従来の IFN- γ 遺伝子治療システムにおいて認められた体重減少などの副作用を大幅に軽減することが可能であった。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we developed IFN- γ derivative that can adhere on cellular surface in order to selectively increase IFN- γ concentration at gene delivery site. Developed IFN- γ was demonstrated to be able to adhere on the cell surface and selective biological activity obtained by gene delivery of the developed IFN- γ derivative was specific in the gene-delivered organ. We found that the developed system was effective in reducing adverse side effect without reducing antitumor effect at target tissue compared to the normal IFN- γ gene therapy system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

Type II インターフェロン（IFN）に分類される IFN- γ は抗ウイルス活性、抗腫瘍活性、免疫調節作用など種々の生理活性を持つタンパク質であり、癌・ウイルス感染などの種々の疾患に対する治療薬として期待され、腎癌などに対しては既に臨床応用されている。しかしながら、IFN- γ の生体内半減期は約7時間と短いことから連日投与が必要とさ

れる。同様に短い生体内半減期を持つ Type I IFN である IFN- α の場合には、ポリエチレングリコール（PEG）で修飾した PEG-IFN- α が開発され、これにより投与回数を1週間に1回にまで削減することが可能となっている。しかしながら、PEG 修飾に代表されるタンパク質への化学修飾は IFN の生物活性を大きく低下させることが懸念され、実際に PEG-IFN- α 2b では天然体と比較して 7%程度にまで生

物活性が低下することが報告されている。

IFN- γ を遺伝子の形で投与する IFN- γ 遺伝子治療は、IFN- γ の生物活性を損なうことなく持続的な IFN- γ 治療を可能とする方法として期待されている。申請者の所属する研究室では早くから IFN- γ 遺伝子治療に着目し、大容量のプラスミド DNA (pDNA) 水溶液を急速に静脈内投与することで肝臓においてウイルスベクターに匹敵する高レベルの遺伝子発現を得られる方法 (ハイドロダイナミクス法) を用いた IFN 遺伝子治療法の開発について研究を行ってきた。その中で、実験的肝転移モデルマウスにおいてハイドロダイナミクス法を用いてマウス IFN- γ 発現 pDNA を投与することで、癌細胞増殖を効率的に抑制可能であることを報告した (Mol. Ther., 2002; 6: 737-44)。この結果は、IFN- γ 発現 pDNA の投与による有効な癌治療の可能性を示すものではあるが、このときの IFN- γ 発現は一過性であることも明らかとなり、単なる遺伝子導入では持続的 IFN- γ 治療が困難であることも明らかとなった。遺伝子発現が一過性である理由に関しては、プロモータの不活化やプラスミド中に多数存在する CpG モチーフのメチル化、免疫による遺伝子発現細胞の除去など様々な可能性が指摘されている。申請者らはこの問題に対してプラスミドベクターの物理化学的特性の改変による解決を試み、PCR を利用した短縮化発現ユニット (J. Pharm. Sci., 2007; 96: 2251-61) や CpG モチーフを削減した pDNA の開発を行なった。その結果、CpG モチーフ数を約 25%程度にまで削減したプラスミドベクターを用いることで遺伝子導入後の血中 IFN- γ 濃度の持続化、さらには肺転移に対する高い治療効果を得た (Int. J. Cancer, 2007; 121: 401-6; J. Gene Med., 2009; 11: 435-43)。以上、IFN- γ を遺伝子発現を持続的に発現させる遺伝子治療システムの開発に成功し、持続化することで治療効果を増強できることを明らかとした。その一方で、IFN- γ 持続発現型 pDNA を高い投与量で投与した際には、全身循環中に高濃度の IFN- γ が長時間滞留することによるものと推察される致死的な作用も観察された。以上の結果から、癌を標的とした腫瘍組織への遺伝子導入、あるいはウイルス性肝炎に対する肝臓への遺伝子導入において、遺伝子導入部位近傍の IFN- γ 濃度を選択的に増大し、全身循環中の IFN- γ 濃度を低く抑えることができれば、副作用の軽減および治療効果の増強が実現可能であると考えに至った。

2. 研究の目的

以上の背景から本研究では遺伝子導入において、遺伝子導入部位近傍の IFN- γ 濃度を選択的に増大し、全身循環中の IFN- γ 濃度を低く抑えるために、遺伝子導入された細胞で

産生・分泌後、細胞表面に留まる機能を賦与した IFN- γ 誘導体の利用を試みることにした。この IFN- γ 誘導体の遺伝子導入により、全身循環への IFN- γ の移行を抑制しつつ遺伝子導入細胞近傍での IFN- γ 濃度を選択的に増大できるものと考えた。IFN- γ は標的細胞膜上に存在する IFN- γ 受容体に結合することでその生理活性を示すため、IFN- γ を分泌させずに単に細胞内に留めるアプローチでは IFN- γ を組織に滞留させることはできても生物活性は期待できない。そこで本研究では、細胞内で産生される IFN- γ をいったん細胞外へと分泌させた後に細胞表面に留めることによって、組織への滞留性と生物活性の発揮との両立を目指した。細胞外への滞留化は、細胞外マトリクスに親和性を有するペプチドとの融合タンパク質とすることによって実現を試みた。

3. 研究の方法

pDNA の構築

細胞外マトリクスへの親和性ペプチドとして、6 個のアミノ酸 RKKRRR からなる extracellular superoxide dismutase 由来のヘパラン硫酸結合ドメイン (HBD) を選択し、IFN- γ の C 末端に融合した。このとき、HBD の繰り返し数が細胞外マトリクスとの親和性に影響を与えることが報告されていることから、IFN- γ に融合する HBD 数が 1 から 3 までの 3 種類の融合タンパク質 IFN- γ -(HBD)₁₋₃ をデザインした。それぞれをコードする cDNA を持続発現型ベクターである、pCpG-mcs ベクター (Invivogen 社) に組み込むことで、各融合タンパク質発現 pDNA を構築した。対照ベクターとして、天然型 IFN- γ を pCpG-mcs ベクターに組み込んだプラスミド DNA を用いた。

IFN- γ 発現量の定量

構築した pDNA を培養細胞に導入し、上清中および細胞画分の各融合 IFN- γ タンパク質の量を ELISA 法により測定し、上清画分/細胞各分の比を算出することで細胞表面への滞留性を評価した。

生物活性の評価

COS7 細胞に天然型 IFN- γ あるいは各 HBD 融合 IFN- γ を発現するプラスミド DNA をトランスフェクションした後、発現する天然型 IFN- γ あるいは各 HBD 融合 IFN- γ を回収し、ELISA 法により回収された IFN- γ の量を定量した。IFN-gamma activated site (GAS) 駆動性のルシフェラーゼ発現 pDNA (pGAS-Luc) を遺伝子導入した B16-BL6 細胞に対し、回収した天然型 IFN- γ あるいは各 HBD 融合 IFN- γ を種々の濃度で添加した。一定時間経過後に細胞画分のルシフェラーゼ活性を測定することで融合 IFN- γ の生物活性を評価した。

細胞表面滞留性の視覚的評価

IFN- γ 、あるいは HBD 融合 IFN- γ の遺伝子

を導入した細胞に対して、非処理あるいは細胞膜透過処理を行った後に抗 IFN- γ 抗体を用いて免疫蛍光染色法を行うことで、融合 IFN- γ の細胞表面滞留性を評価した。

マウスへの遺伝子導入と生物活性および体内動態の評価

ハイドロダイナミクス法を用いてマウス肝臓に天然型 IFN- γ あるいは HBD 融合 IFN- γ を遺伝子導入した後、肝臓での IFN- γ の mRNA の定量を行うことで各 IFN- γ 誘導体の遺伝子発現レベルを評価するとともに、肝臓中の IFN- γ 生物活性を IFN- γ の標的遺伝子である SOCS1 の mRNA 量を測定することで評価した。また、各 IFN- γ 発現 pDNA を遺伝子導入後経時的に採血を行い、血中 IFN- γ 濃度推移を評価した。また、HBD 融合 IFN- γ 発現 pDNA を遺伝子導入したマウスに対して、HBD と細胞外マトリクスの相互作用を阻害可能な化合物であるヘパリンを静脈内投与し、血中に遊離する IFN- γ 量を測定することで HBD 融合 IFN- γ の細胞外マトリクスとの結合性を評価した。

抗腫瘍効果と有害事象の評価

静脈内に移植することで肝転移巣を形成する M5076 を用い、肝転移モデルマウスを作製した。肝転移モデルマウスに対して各種 IFN- γ 発現 pDNA を投与、一定期間経過後の肝臓中結節数を評価することで抗腫瘍効果を判定した。このとき、体重および摂食量を経時的に測定することで、IFN- γ が全身で非特異的に作用することによる有害作用を評価した。

4. 研究成果

HBD 融合化による細胞表面接着化と IFN- γ 生物活性

天然型 IFN- γ あるいは HBD 融合 IFN- γ を遺伝子導入した後、その発現タンパク質の量を EILSA 法により測定したところ、HBD 融合 IFN- γ タンパク質の発現は天然型 IFN- γ と比較してその発現効率が HBD 数に依存して低下する傾向が観察された。一方で、HBD の融合により IFN- γ は細胞表面接着能を持つこと、細胞表面への接着能は HBD 数に依存して増大することが ELISA 法によって上清・細胞画分における IFN- γ タンパク量を測定することで明らかとなった。HBD を有する IFN- γ は細胞表面へ接着することを免疫蛍光染色法によっても確認した (図 1)。また、HBD 融合 IFN- γ が天然型 IFN- γ と比較して 80%程

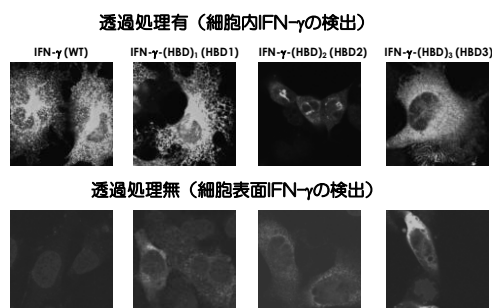


図1. IFN- γ の免疫蛍光染色による検出

度に低下するものの、IFN- γ 生物活性を保持していることを、GAS 駆動性ルシフェラーゼ発現 pDNA を用いたレポーターアッセイによって確認した。

HBD 融合化による in vivo 生物活性と体内動態の変化

ハイドロダイナミクス法を用いてマウスに遺伝子導入後の肝臓における IFN- γ および SOCS1 の mRNA 量を測定したところ、HBD 融合 IFN- γ は HBD 数に依存して遺伝子発現効率が低下していた (図 2 左)。また HBD の融合数に依存して IFN- γ により誘導される遺伝子である SOCS1 の肝臓における mRNA 発現誘導も低下したことから、HBD の融合数に応じて遺伝子導入部位における生物活性が低下す

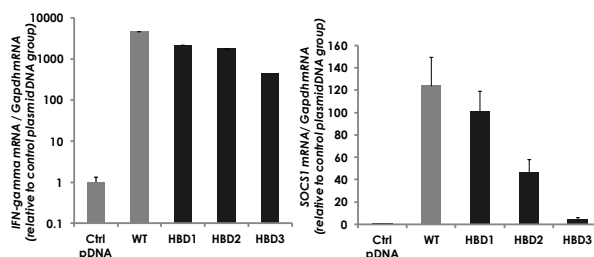


図2. 肝臓における IFN- γ (左) および SOCS1 (右) mRNA 発現

ることが明らかとなった (図 2 右)。また、ELISA 法により天然型 IFN- γ あるいは HBD 融合 IFN- γ を遺伝子導入した後の血中 IFN- γ 濃度を測定したところ、HBD 数の増加に伴い血中 IFN- γ 濃度が大きく低下していくことが明らかとなった。特に HBD 数の繰り返し数が 1 つのもの血中濃度は天然型 IFN- γ より多少低い程度であったのに対して、HBD 数の繰り返し数が 2 つのもの血中 IFN- γ 濃度は大きく低下していたことから、HBD による細胞外マトリクスとの相互作用を得るには HBD を 2 つ以上繰り返すことが望ましいと推察された。ここで、HBD を 2 回繰り返した IFN- γ -(HBD)₂ が遺伝子発現効率、肝臓における生物活性の発揮と細胞表面接着能の観点から有用性が高いと考えられたため、以下の検討では HBD 融合タンパク質として IFN- γ -(HBD)₂ を用いた。IFN- γ -(HBD)₂ 発現 pDNA を投与することで、同量の天然型 IFN- γ 発現 pDNA を投与時の約 40% の IFN- γ 生物活性が肝臓において認められた。この時、IFN- γ -(HBD)₂ 発現 pDNA 投与群の血清中 IFN- γ 濃度は天然型 IFN- γ 発現 pDNA 投与群の 100 分の 1 以下であった。また、IFN- γ -(HBD)₂ 発現 pDNA 投与マウスに対してヘパリンを静脈内投与したところ、ヘパリン投与により血清中 IFN- γ 濃度が 30 倍程度上昇したことから、HBD 融合 IFN- γ が細胞外マトリクスと相互作用することで血中濃度が低く抑えられているものと考えられた。一方で、天然型 IFN- γ 発現 pDNA 投与マウスにおいてはヘパリン投与により血清中 IFN- γ 濃度はほとんど変動しな

かった。

HBD 融合 IFN- γ 遺伝子導入による抗腫瘍効果と有害事象の発現

M5076 細胞を移植することで作製した肝転移腫瘍モデルマウスに対して、0.5 μ g の天然型 IFN- γ 発現 pDNA あるいは 10 μ g の IFN- γ -(HBD)₂ 発現 pDNA を投与することによる抗腫瘍効果と体重推移を評価した。天然型 IFN- γ 発現 pDNA 投与群では抗腫瘍効果が得られた一方で、対照群と比較すると大きく体重が減少していた。IFN- γ -(HBD)₂ 発現 pDNA 発現 pDNA を投与した群では、対照群と比較して体重減少はしなかった一方で、天然型 IFN- γ と同等以上の抗腫瘍効果が得られた (図 3)。

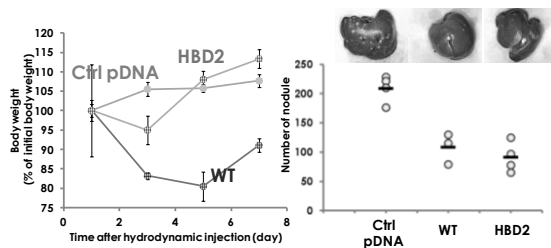


図3. 遺伝子投与後の体重変化 (左) と肝転移腫瘍に対する効果 (右)

本研究では、IFN- γ を HBD との融合タンパク質とすることによりその生物活性をほとんど減少させることなくその体内動態を制御することに成功した。また、HBD の融合数を増加することで細胞外マトリクスへの親和性が増大したが、生物活性は融合数依存的に低下したことから、2 個の HBD を融合した IFN- γ -(HBD)₂ が最適な融合 IFN- γ と結論された。HBD 融合 IFN- γ 発現 pDNA の投与で遺伝子導入臓器である肝臓において IFN- γ 生物活性が得られたことから、HBD 融合 IFN- γ の細胞外マトリクスとの相互作用は可逆的であり、マトリクスに結合した HBD 融合 IFN- γ タンパク質は IFN- γ 受容体とも結合可能と推察された。また、HBD 融合 IFN- γ は *in vivo* における癌細胞の増殖を天然型 IFN- γ と同様に抑制可能である一方で、有害事象が観察されなかったことから、HBD 融合 IFN- γ の有用性が証明された。また、このときの HBD 融合 IFN- γ 投与群の血中 IFN- γ 濃度は天然型と比較して非常に低かったことから、癌細胞の肝転移の抑制には血中 IFN- γ 濃度ではなく肝臓における IFN- γ 生物活性が重要であることが示唆された。

以上の結果は HBD 融合化の有用性を示すものであり、細胞外の受容体に結合することで生物活性を発揮する他のサイトカインの動態制御にも HBD の利用が有用であることを示すものであり、より安全かつ有効なサイトカイン遺伝子治療法の開発に有用な方法論となりえるものと考えられる。

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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 安藤 満、高橋有己、西川元也、高倉喜信 “機能性ペプチド融合による IFN- γ 時空間制御” 日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 31 日、北海道大学 (北海道)
- ② 高橋有己、安藤 満、西川元也、渡部好彦、高倉喜信 “細胞表面接着型インターフェロンを利用した標的的特異的作用型遺伝子治療システムの開発” 第 61 回日本薬学会近畿支部総会、2011 年 10 月 22 日、神戸学院大学 (兵庫県)
- ③ Mitsuru Ando, Yuki Takahashi, Hanae Mukumoto, Makiya Nishikawa, Yoshihiko Watanabe and Yoshinobu Takakura. “Design and hydrodynamic gene transfer of ‘sticky’ IFN γ for liver-directed gene therapy.” American Society of Gene & Cell Therapy 14th Annual Meeting 2011 年 5 月 19 日、Washington State Convention Center (Seattle, USA)
- ④ Mitsuru Ando, Yuki Takahashi, Hanae Mukumoto, Makiya Nishikawa, Yoshihiko Watanabe, Yoshinobu Takakura “Design and gene delivery of ‘sticky’ interferon γ to increase the effect/side-effect ratio for liver-directed interferon- γ gene therapy” 2010 年 11 月 17 日、Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, USA)
- ⑤ 高橋有己、西川元也、渡部好彦、高倉喜信 “体内動態制御によるインターフェロン遺伝子治療の最適化” 第 26 回日本 DDS 学会、2010 年 6 月 17 日、大阪国際交流センター (大阪府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 有己 (TAKAHASHI YUKI)
京都大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：00547870

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし