

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390008

研究課題名(和文) 転写・翻訳/体内動態/細胞応答の三元制御に基づくサイトカイン遺伝子治療の最適化

研究課題名(英文) Optimization of cytokine gene therapy based on the regulation of transcription/translation, pharmacokinetics, and cellular response.

研究代表者

高倉 喜信 (Takakura, Yoshinobu)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30171432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、効果的なインターフェロン- β (IFN- β) 癌遺伝子治療法の開発を目的として、その治療効果を妨げる要因として、IFN- β により誘導される免疫抑制分子IDO1と腫瘍組織関連マクロファージ(TAM)に着目し検討を行った。TAMはIFN- β の抗腫瘍効果を妨げる要因であり、これを除去することでIFN- β の癌治療効果が増強されることを見出した。一方、IDO1はIFN- β の抗腫瘍効果にほぼ影響しなかった。一連の研究の過程において、抗原性の高いタンパク質を持続発現させると、発現タンパク質に特異的な免疫応答が誘導され、それにより遺伝子発現細胞が除去されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The goal of the present study was the development of effective cancer therapy by gene transfer of interferon - β (IFN- β). For this goal, it was hypothesized that IDO-1, an IFN- β -induced immunosuppressive molecule, and tumor-associated macrophage (TAM) might hinder anti-tumor effect of IFN- β . Base on this hypothesis, the role of these factors in the IFN- β cancer gene therapy was investigated. We found that TAM reduced the anti-tumor effect of IFN- β and depletion of TAM restored it. On the other hand, IDO-1 hardly affected the anti-tumor effect of IFN- β . In the process of these investigations, we also found that persistent transgene expression of antigenic protein induced the transgene-specific immune response, which removed the transgene-expressing cells.

研究分野：生物薬剤学

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 IDO-1 腫瘍組織関連マクロファージ 抗原特異的免疫応答

1. 研究開始当初の背景

インターフェロン (IFN)- β は II 型インターフェロンに分類されるサイトカインであり、抗ウイルス作用、細胞増殖抑制作用、免疫調節作用など種々の生理活性を有することから、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、悪性リンパ腫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- β の生体内半減期は数時間程度であり、治療に際しては連日の投与が必要とされる。IFN- β において実証されたように、ポリエチレングリコール等を用いて化学修飾することで、その生体内半減期は延長可能ではあるが、立体障害に起因した受容体との相互作用の低下によってその生物活性は大きく低下することが懸念される。

治療用のタンパク質をコードした遺伝子の投与により治療を行う遺伝子治療は、活性を低下させることなく治療用タンパク質の持続的供給を可能とする治療法として期待される。我々の研究グループはこれまでに、IFN- β 発現プラスミドベクターから遺伝子発現の抑制因子である CpG モチーフを除去したプラスミドベクターを構築し、これをマウスに投与することで 1 年以上に渡る長期の IFN- β の供給に成功した。また、持続発現型の IFN- β 発現ベクターの投与によって、短期の IFN- β 発現を示す従来型のベクターと比較して高い抗腫瘍効果が得られることも報告してきた。これは、治療用タンパク質をコードしたプラスミドベクターの最適化によって、遺伝子発現プロファイルの制御が可能であることを示す結果であることに加えて、遺伝子発現の持続化が治療効果の改善に有用な手法となりえることを示す結果でもあると考えられる。

上述の一連の研究の過程において、癌細胞の種類によっては持続的に IFN- β を発現させても十分な治療効果が得られない場合が認められた。IFN- β による抗腫瘍効果は、癌細胞に対する IFN- β の直接作用および体内の免疫系の制御による間接作用によるものであるため、種々の要因により影響を受けると考えられた。そこで、IFN- β により誘導されるトリプトファン代謝に関係した酵素 indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO-1)、免疫抑制作用や癌細胞増殖促進作用を有する腫瘍組織中のマクロファージ、腫瘍組織関連マクロファージ (tumor associated macrophage: TAM) に注目した。IDO-1 はトリプトファンをキヌレニンに変換する酵素であり、免疫を抑制する作用が報告されていた。またマクロファージは炎症を促進する M1 マクロファージと、炎症を抑制する M2 マクロファージとに大別されるが、TAM は M2 マクロファージであり、腫瘍組織においては免疫抑制的な環境の形成を促進するとともに、癌細胞の生存や増殖・転移等を促進に関与することが示唆されていた。

また、本研究を遂行する過程において、

IFN- β 遺伝子導入群の対照群として準備したホタルルシフェラーゼ (fLuc) 発現プラスミドベクターの投与群において、fLuc に対する免疫応答の誘導と、免疫応答による遺伝子発現細胞の除去に起因すると推察される遺伝子発現レベルの低下を観察した。遺伝子治療において、発現タンパク質に対する免疫応答は副作用の惹起や遺伝子発現細胞の除去とそれによる遺伝子発現レベルの低下を誘発するために、その治療上の大きな妨げとなる。導入遺伝子にコードされたタンパク質に特異的な免疫応答の誘導にはタンパク質の発現プロファイルが大きな影響を及ぼすと考えられるがその詳細は不明であった。

2. 研究の目的

これまでの研究において、ある種の癌細胞を皮下あるいは皮内に移植することで作製した固形腫瘍モデルマウスにおいては、持続的に IFN- β を作用させても十分な抗腫瘍効果が得られない場合があることを見出していた。この結果については、腫瘍環境において IFN- β の作用を抑制する分子あるいは細胞によって、腫瘍組織が IFN- β の抗腫瘍効果に対する抵抗性を獲得した可能性が考えられた。そこで本研究では、(1) IDO-1、(2) TAM に注目し、これらの分子・細胞が IFN- β の抗腫瘍効果に及ぼす影響について検討するとともに、これらの要因を制御することによる IFN- β の抗腫瘍効果の増強の可能性について検討することとした。また、(3) 遺伝子発現プロファイルが発現タンパク質に対する免疫応答の誘導に及ぼす影響について解析した。

3. 研究の方法

(1) IDO-1 が IFN- β の抗腫瘍効果におよぼす影響の検討

プラスミドベクター：これまでの検討で開発に成功したマウス IFN- β を持続的に発現するプラスミドベクター、pCpG-IFN- β を用いた。マウス：ICR マウス、C57BL/6 マウスおよび IDO-1 knockout (IDO-1 KO) マウスを用いた。マウス肺癌細胞株 Lewis lung carcinoma (LLC) 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をマウス体重の約 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)。トリプトファン・キヌレニン濃度の測定：トリプトファンおよびキヌレニン濃度は HPLC により測定した。mRNA の測定：マウスの臓器および腫瘍組織から採取した 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。

(2) TAM が IFN- β の抗腫瘍効果におよぼす影響の検討

プラスミドベクター: pCpG-IFN- を用いた。マウス: C57BL/6 マウスおよび BALB/c マウスを用いた。マウス結腸癌細胞株 colon26 細胞あるいはマウスメラノーマ細胞 B16BL6 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。マウスへの遺伝子導入: ハイドロダイナミクス法によりマウスに遺伝子導入した。クロドロネート封入リポソーム (CL) の作製: マクロファージ除去を目的に、phosphatidylcholine と cholesterol、を用いてリポソームを作製し、これにクロドロネートを封入することで CL を調製した。また、CL の血中滞留性の改善による TAM の効果的な除去を目的として、平均分子量約 2000 の polyethylene glycol (PEG) を含む脂質、DSPE-PEG で表面修飾した CL (PEG-CL) も併せて調製した。別途、リポソーム調製時にローダミン標識脂質 (rhodamine-DHPE) を添加することで蛍光標識を施した。

(3) 導入遺伝子特異的免疫応答の誘導に及ぼす遺伝子発現プロファイル影響の検討

プラスミドベクター: *Gaussia luciferase* (gLuc) をコードするプラスミドベクター、pROSA-gLuc、fLuc を長期間発現するプラスミドベクターである pCpG-fLuc、fLuc の短期発現型プラスミドベクターである pCMV-fLuc を用いた。マウス: ICR マウス、C57BL/6 マウスを用いて実験を行った。マウスへの遺伝子導入: ハイドロダイナミクス法によりマウスに遺伝子導入した。抗 fLuc 免疫応答の評価: ELISA 法により血中 fLuc 抗体濃度を測定することで fLuc 特異的液性免疫の誘導を評価した。また、免疫したマウスから回収した脾臓細胞に fLuc を添加したときに産生される IFN- 量を指標に、fLuc 特異的細胞性免疫応答を評価した。肝臓の組織形態学的評価および浸潤細胞の評価: マウス肝臓のパラフィン切片を HE 染色し、顕微鏡観察により肝臓の組織形態学的評価を行った。別途、肝臓の凍結切片を抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体を用いて免疫染色した後、蛍光顕微鏡で観察することで浸潤細胞を評価した。

4. 研究成果

(1) IDO-1 が IFN- の抗腫瘍効果に及ぼす影響

IFN- 遺伝子導入により、検討した全ての臓器において IDO1 の mRNA 発現レベルが大幅に上昇した。なかでも、ハイドロダイナミクス法による遺伝子導入時のおもな遺伝子発現臓器である肝臓において特に高く誘導された。また、IFN- 遺伝子導入したマウスにおいて血中トリプトファンレベルが低下し、トリプトファンの代謝産物であるキヌレニンレベルが上昇したが、これは IDO1 の遺伝子発現の誘導によって IDO1 の活性レベルが上昇した結果と考えられた。次に、LLC 細胞を野生型マウスあるいは IDO1 KO マウスに移植することで担がんモデルマウスを作製し

た。IFN- 遺伝子導入を行ったところ野生型および IDO1 KO マウスいずれの担がんマウスにおいてもほぼ同等の抗腫瘍効果が得られた。興味深いことに、IFN- 遺伝子導入によって IDO1 KO マウスの LLC 腫瘍組織中において IDO1 の mRNA 発現レベルが上昇したが、これは LLC がん細胞における IDO1 の遺伝子発現誘導を示す結果と考えられる。以上の結果から、IFN- 遺伝子導入によって IDO1 の遺伝子発現は誘導されるが、IFN- の抗腫瘍効果にはほぼ影響を及ぼさない可能性が示された。

(2) TAM が IFN- の抗腫瘍効果におよぼす影響

colon26 あるいは B16BL6 をマウス皮内に移植して作製した固形腫瘍組織における TAM の存在を評価したところ、colon26 においては多数の TAM が確認された一方で、B16BL6 では TAM は非常に少なかった。それぞれの担癌マウスに対して IFN- 遺伝子を導入したところ、colon26 に対しては抗腫瘍効果がほとんど認められなかったのに対し、B16BL6 に対しては高い抗腫瘍効果が認められた。この結果から、TAM の IFN- 抵抗性への関与が推察された。そこで以降の検討では、多数の TAM の存在し、IFN- に対して抵抗性を示す colon26 担癌マウスを用いた。colon26 担癌マウスに蛍光標識 PEG-CL を静脈内投与したところ、PEG-CL は高い血中滞留性と腫瘍移行性を示し、TAM を効率的に除去可能であった。PEG-CL を静脈内投与することで、腫瘍増殖は有意に抑制されたことから、TAM が腫瘍の増殖に促進的に作用する可能性が示された。また、PEG-CL 投与群においては、IFN- 遺伝子導入により腫瘍増殖が有意に抑制された。この結果は、PEG-CL による TAM の除去によって IFN- の抗腫瘍効果が増強されたものと考えられた。以上の結果は、TAM が IFN- の抗腫瘍効果に抑制的に機能していることを示すとともに、PEG-CL 投与による TAM の除去は IFN- の抗腫瘍効果を改善する手段となりうることを示すものとも考えられる。

(3) 導入遺伝子特異的免疫応答の誘導に及ぼす遺伝子発現プロファイル影響

gLuc をコードするプラスミドベクターである pROSA-gLuc を用いてマウスに遺伝子導入したところ、長期間にわたり安定な血中 gLuc 活性が認められた。そこで、fLuc を長期間発現するプラスミドベクター、pCpG-fLuc を pROSA-gLuc と同時に投与したところ、血清中 gLuc 活性は単独投与群と比較して投与 7 日後から減少しはじめ、14 日後には千分の 1 以下となった。一方、短期発現型 pCMV-fLuc を同時投与した群における血清中 gLuc 活性は、pROSA-gLuc 単独投与時とほぼ同様の挙動を示した。これまでの検討から、同時に投与されたプラスミドベクターは同一の細胞内へと送達されると考えられる。従

って、gLuc に対しては免疫反応がほとんど誘導されないこと、その一方で、fLuc の持続的発現による fLuc 特異的免疫応答が gLuc 発現の低下に関与することが推察された。そこで、fLuc 特異的な免疫応答の誘導について評価したところ、pCpG-fLuc の投与によって、fLuc 特異的な液性・細胞性免疫応答の誘導が確認された。また、pCpG-fLuc 導入マウスの肝臓切片には、単核球細胞の浸潤が観察され、その多くは CD8 陽性細胞であった。一方、短期間発現型 pCMV-fLuc を投与したマウスにおいては、fLuc 特異的な免疫反応はほとんど検出されなかった。以上より、抗原性を有するタンパク質を持続的に発現させた場合には、発現タンパク質特異的な免疫応答が誘導され、これにより遺伝子発現細胞が除去され、遺伝子発現が劇的に低下することが示された。

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 8 件)(全て査読有)

Watcharanurak K, Zang L, Nishikawa M, Yoshinaga K, Yamamoto Y, Takahashi Y, Ando M, Saito K, Watanabe Y, Takakura Y. Effects of upregulated indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 by interferon gene transfer on interferon-mediated antitumor activity. *Gene Ther.* vol 21, 2014, pp. 794-801. doi: 10.1038/gt.2014.54.

Yin Y, Takahashi Y, Ebisuura N, Nishikawa M, Takakura Y. Removal of transgene-expressing cells by a specific immune response induced by sustained transgene expression. *J Gene Med.* 2014, vol. 16, pp. 97-106. doi: 10.1002/jgm.2763.

Kiyota T, Takahashi Y, Watcharanurak K, Nishikawa M, Ohara S, Ando M, Watanabe Y, Takakura Y. Enhancement of anticancer effect of interferon-gene transfer against interferon-resistant tumor by depletion of tumor-associated macrophages. *Mol Pharm.* vol. 11, 2014, pp. 1542-1529. doi: 10.1021/mp4007216.

Mukumoto H, Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, Takakura Y. Expression profile-dependent improvement of insulin sensitivity by gene delivery of interleukin-6 in a mouse model of type II diabetes. *Mol Pharm.* vol. 10, 2013, pp. 3812-3821. doi: 10.1021/mp400288e.

Watcharanurak K, Nishikawa M, Takahashi Y, Kabashima K, Takahashi R, Takakura Y. Regulation of

immunological balance by sustained interferon-gene transfer or acute phase of atopic dermatitis in mice. *Gene Ther.* vol. 20, 2013, pp. 538-544. doi:10.1038/gt.2012.69.

Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. [Control of spatiotemporal distribution of interferon by genetically fusing functional peptides]. *Yakugaku Zasshi.* vol. 132, 2012, pp. 1399-1406. doi: 10.1248/yakushi.12-00235-4.

Watcharanurak K, Nishikawa M, Takahashi Y, Takakura Y. Controlling the kinetics of interferon transgene expression for improved gene therapy. *J Drug Target.* vol. 20, 2012, pp. 764-769. doi: 10.3109/1061186X.2012.716848.

Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Watanabe Y, Takakura Y. Constant and steady transgene expression of interferon- by optimization of plasmid construct for safe and effective interferon-gene therapy. *J Gene Med.* vol. 14, 2012, pp. 288-295. doi: 10.1002/jgm.2616.

[学会発表](計 10 件)

Yalei Yin, Norifumi Ebisuura, Yuki Takahashi, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura. Immunological removal of transgene-expressing cells after in vivo gene transfer. 日本薬剤学会第 29 年会、2014 年 5 月 22 日、大宮ソニックシティビル(埼玉県、さいたま市)。

Kanitta Watcharanurak, Lei Zang, Makiya Nishikawa, Kayo Yoshinaga, Yuki Takahashi, Yasuko Yamamoto, Kuniaki Saito, Yuki Murakami, Yoshinobu Takakura. Upregulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 by interferon gene transfer and its effects on tumor growth in mice. 第 29 回日本 DDS 学会学術集会、2013 年 7 月 4 日、京都テルサ(京都府、京都市)。
Yalei Yin, Norifumi Ebisuura, Yuki Takahashi, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura, Removal of transgene-expressing cells by transgene-specific immune response induced by sustained transgene expression. 第 29 回日本 DDS 学会学術集会、2013 年 7 月 4 日、京都テルサ(京都府、京都市)。

安藤 満、高橋有己、西川元也、渡部好彦、高倉喜信。ヘパラン硫酸結合ドメインの融合による細胞表面付着型インターフェロンの開発と遺伝子デリバリー

ーによる疾患治療．第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2012 年 11 月 15 日、京都大学（京都府、京都市）、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・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・大会、2012 年 10 月 20 日、武庫川女子大学（兵庫県、神戸市）．

高倉喜信、高橋有己、西川元也．遺伝子・核酸医薬のデザインとデリバリーの最適化．アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012、2012 年 9 月 25 日、仙台市民会館（宮城県、仙台市）．

高橋有己、松井由梨子、西川元也、高倉喜信．マウスにおける RNA 干渉効果の定量的解析法の開発．第 28 回日本 DDS 学会学術集会、2012 年 7 月 4 日、札幌コンベンションセンター（北海道、札幌市）．高橋有己、西川元也、高倉喜信．体内動態と生体応答の制御に基づくインターフェロン癌遺伝子治療法の開発．日本薬剤学会第 27 年会、2012 年 5 月 26 日、神戸国際会議場（兵庫県、神戸市）．

Kanitta Watcharanurak, Lei Zang, Makiya Nishikawa, Kayo Yoshinaga, Mitsuru Ando, Yuki Takahashi, Yoshihiko Watanabe, Yasuko Yamamoto, Kuniaki Saito, Yoshinobu Takakura. Effects of highly upregulated indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 on anti-tumor activity of interferon gene transfer in tumor-bearing mice.

日本薬剤学会第 27 年会、2012 年 5 月 24 日、神戸国際会議場（兵庫県、神戸市）．

Yalei Yin, Norifumi Ebisuura, Yuki Takahashi, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura. Immunological removal of transgene-expressing cells after in vivo gene transfer. 日本薬剤学会第 27 年会、2012 年 5 月 24 日、神戸国際会議場（兵庫県、神戸市）．

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

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：4 0 2 7 3 4 3 7

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：0 0 5 4 7 8 7 0