

ないが、それは感染性を示す(図4)。油滴の周りに非構造タンパク質が集まってくるのは、この周りにウイルスRNAの複製複合体が構築されていることを示唆しており、膜成分も油滴の周りに集合しているのが観察される。

油滴と会合できないHCV コアタンパク質を産生する

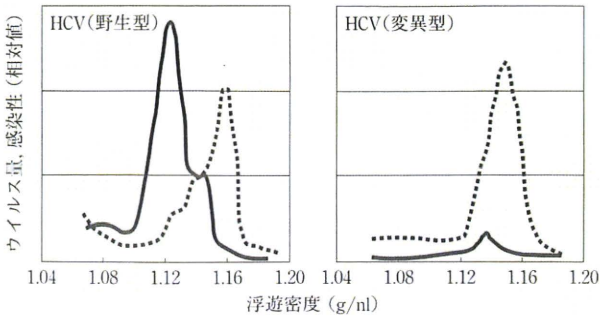


図4 ■ 細胞上清に産生されるウイルス粒子の性状と感染性
HCVが複製する細胞から放出されるウイルス粒子の性状を、ショ糖密度勾配遠心で調べた(左)。また、ウイルスタンパク質が油滴に会合できない変異ウイルスが複製している細胞から産生されるウイルスの性状を右図に示した。破線はウイルス粒子の量をウイルスコアタンパク質で測定した値。実線は感染性を示す。

変異ゲノムを作製して、それを細胞に導入した場合、油滴周辺にコアの局在が見られなくなるが、同時に非構造タンパク質の油滴への局在も観察されなくなる⁽⁸⁾。この条件では細胞培養上清にはウイルス粒子の産生が見られない。このことは、コアが他のウイルスタンパク質を油滴周辺に引き寄せる働きをしていることを示している。さらに、ウイルス粒子が産生されない理由としては、粒子産生に油滴周辺の環境が必要である可能性、あるいは変異コアでは粒子の形態形成が起こらない可能性が考えられる。

上の2つの可能性のいずれが正しいかを調べるために、非構造タンパク質(特にNS5Aに注目した)に変異を入れて、コアが油滴と会合できても非構造タンパク質が会合できない状態にした場合にウイルス粒子産生がどうなるかを調べた。その結果、この状態ではウイルス粒子の産生は見られたが、粒子の浮遊密度は1.15であり、感染性を示さなかった⁽⁸⁾(図4)。

これら一連の実験から、油滴は感染性HCVウイルス粒子産生に重要な働きをしているといえる。それでは、油滴は感染性ウイルス粒子産生にどのような役割を担っているのだろうか? 考えられることとして、①感染性

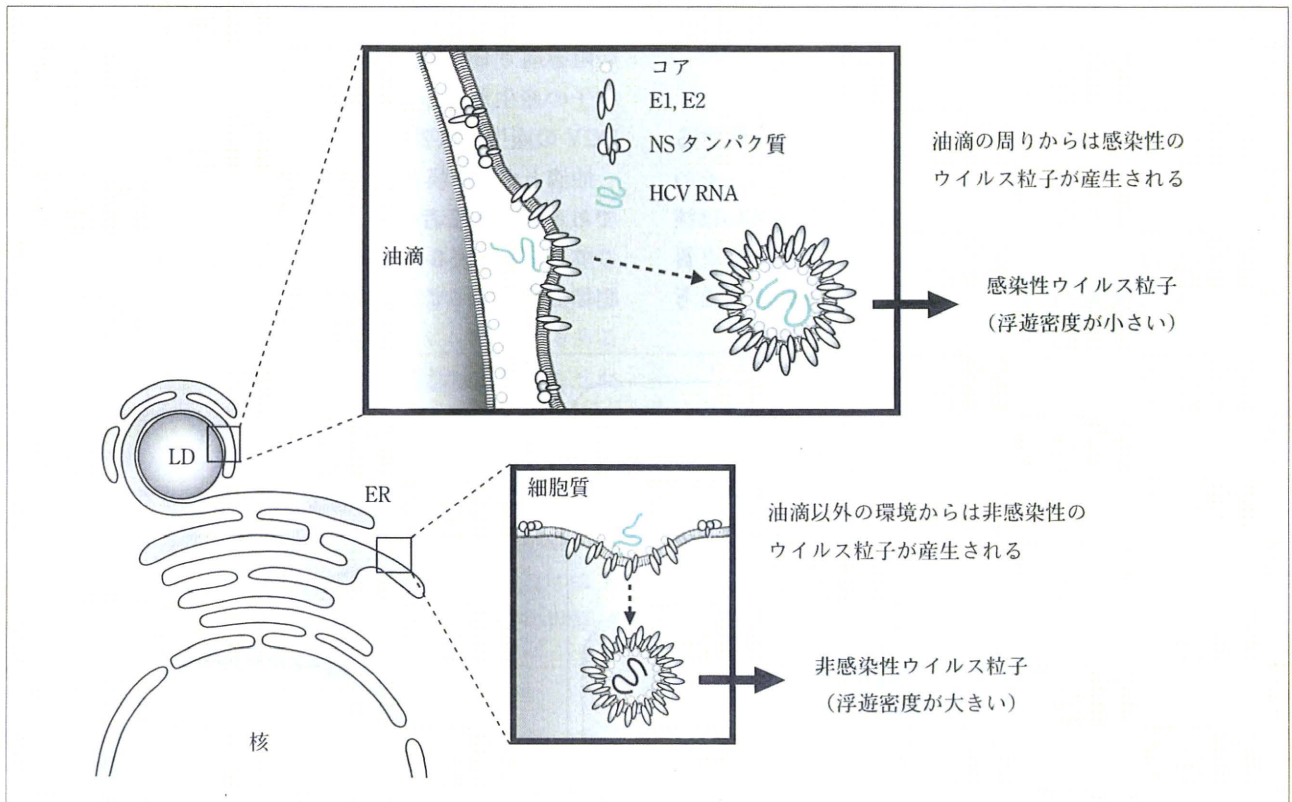


図5 ■ HCVは油滴とその周辺の環境を利用して感染性ウイルス粒子を産生する(モデル)
上の図は油滴環境から産生される粒子で、この場合、感染性を示し浮遊密度は小さい。一方、油滴との接触がない環境からもウイルス粒子の産生は見られる(下の図)が、この場合には感染性はなく、密度が大きい。

ウイルス粒子が構築される「場」を提供する、②ウイルス粒子に感染に必要な「付加的要因」を賦与する、③形成された感染性ウイルスに対して細胞内の運搬の役割を果たす、などが考えられる。これらの可能性の中で、①については、油滴の周りにウイルス様粒子が電顕的に観察されるので、粒子形成に油滴とその周辺環境が重要な働きをしている可能性がある。しかし、図5のモデルに示したように、筆者らは非感染性ウイルス粒子は油滴周辺以外からも放出されると考えているので、粒子形成自身には油滴が必須ではない可能性を考えている。②については、感染性粒子の浮遊密度は非感染性粒子に比べ0.03小さいので、油滴の周りから産生される粒子は、何か油性に富む成分を取り込んでいる可能性が考えられよう。もちろん、ウイルス粒子中のタンパク質と核酸の含有割合に差があり、それが浮遊密度の違いに反映されている可能性も考えられる。あるいは、感染性粒子のパッキング状態が非感染性粒子に比べ緩いため、浮遊密度が小さくなる可能性も考えられる。③の可能性については、油滴がマイクロチューブルと会合し細胞質内でダイナミックな運動をすることが知られているので、ウイルス粒子の輸送に油滴が積極的に関与している可能性は十分考えられるが、その詳細は不明である。

感染性 HCV が産生されるモデル

患者血流中の HCV を密度勾配遠心により解析すると、密度が異なるヘテロな集団として観察される。その原因としてはウイルスを構成するタンパク質あるいは核酸の組成の違いも考えられるが、むしろリポタンパク質やその他の血液成分と HCV が会合するためだろうと考

えられる。事実、HCV が VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein), HDL (high density lipoprotein) などのリポタンパク質と会合して複合体として血流中に存在することが知られている。そのほかにも、ウイルス自身の抗体、リウマチ因子あるいは異常血漿タンパク質などと会合した粒子の存在が示されている。これらの血液成分との会合が HCV の複製サイクルにとってどれほど意味があるかについては、解明されなければならない点が多いが、最近になり VLDL との会合はウイルス粒子産生において粒子の分泌や感染性の賦与などに重要な働きをもつことが示されている⁽¹²⁻¹⁴⁾。

VLDL は脂質として主にトリグリセリドを脂質構成成分とし、それがアポリポタンパク質 A および B (ApoA, ApoB) に保持された形で存在する。VLDL の合成は、MTP (microsomal triglyceride transfer protein) により油滴からトリグリセリドが取り出され、小胞体ルーメン内で ApoB と会合し、まず VLDL 前駆体が形成される。その後、さらにトリグリセリドが追加され、同時に ApoE も取り込まれて成熟した VLDL がつくられる。HCV を産生する細胞では、この VLDL が同じく小胞体ルーメン内に存在する HCV と会合して細胞の外に放出されると考えられる。VLDL 合成に重要な MTP の阻害剤で HCV 感染細胞を処理すると感染性ウイルス粒子の産生が見られなくなることから、VLDL 産生が HCV の産生に重要であることが示された⁽¹³⁾。

油滴と小胞体膜との会合が感染性ウイルス粒子に重要であるという筆者らの観察結果を VLDL 産生と結びつけてみると、図6に示すモデルが考えられる。油滴が小胞体と会合することにより VLDL の産生の効率が増え

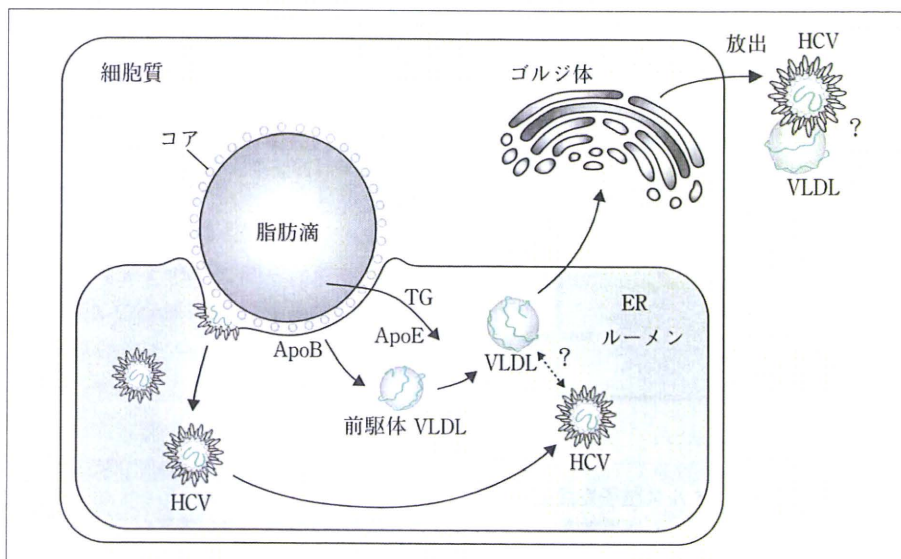


図6 ■ 感染性ウイルス粒子産生における油滴の役割 (モデル)

脂肪滴 (油滴) と接触している小胞体ルーメン内では VLDL が産生されやすくなっていると考えられる。前駆体 VLDL あるいは VLDL が小胞体内に出芽した HCV 粒子と会合して、複合状態で細胞の外に産生されると考えられる。

ると考えられる。おそらく油滴と会合している小胞体ルーメン内では、局所的に VLDL の密度が高くなっており、HCV と VLDL が会合する機会が増え、その結果 LDL-HCV 複合体を形成して細胞の外に放出されると考えられる。

HCV の感染は LDL 受容体 (LDLR) を介して行なわれるという報告がある⁽¹⁵⁾。LDL-HCV 複合体が細胞表面の LDLR と会合して感染が成立する機構は、少なくとも HCV 感染機構のひとつであると考えられる。

HCV 感染細胞における細胞の代謝異常と肝疾患との関連

HCV 感染と慢性肝炎および肝硬変・肝がんの発症の関係について、その分子基盤には不明な点が多い。慢性肝炎は肝細胞の持続的な破壊と再生の結果であると考えられている。持続的な破壊に中心的に働くのは免疫監視に働く細胞障害性 T 細胞であると考えられる。一方、HCV 感染者にはインシュリン伝達シグナルが阻害される結果、糖尿病を合併したり、脂肪が異常に蓄積しその結果脂肪肝などを呈するなど、代謝異常がよく見られ、これらの異常が肝疾患を増悪させるともいわれている⁽¹⁶⁾。HCV は自らが増殖するために宿主の脂質代謝を活性化させるが、そのことが宿主に代謝異常をもたらす肝疾患を誘発していると考えられる。

抗 HCV 剤の創薬研究に向けて

C 型慢性肝炎患者にインターフェロンとリバビリンの併用療法を行なうと、約半数の患者からウイルスを除くことができる。ヒトにがんをひき起こすウイルスを効率よく排除するのは困難であるが、HCV は例外的であるといえる。ウイルスタンパク質の酵素活性を標的とした薬剤が開発されているので、近い将来その中から効果の高い薬が出てくることが期待される。一方、HCV は複製するとき変異しやすいことを考えると、ウイルスタンパク質を標的とした薬では耐性ウイルスの出現が危惧され、事実そのような報告が出ている。その点、ウイルス複製に必須の宿主因子を標的とした薬は、耐性の問題は克服できる可能性が高い。

おわりに

HCV は持続感染して数十年にわたり慢性肝炎をひき起こし、その後、肝硬変、肝がんを発症させる。感染および疾患の進行を予防することは大変重要である。その

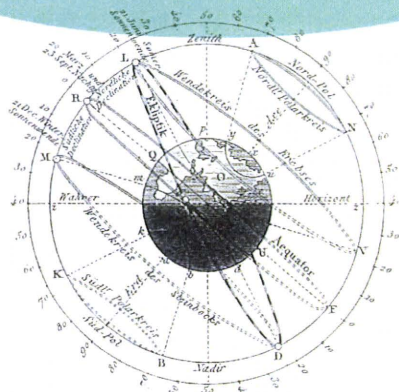
ためにはウイルス複製の分子機構を解明して、そこから得られる知見を予防策の確立に生かしてゆくことが大切である。

本稿では HCV の生活環の中でどのようにして感染性粒子が産生されるかについて特に脂肪滴との関連で述べた。ウイルスは細胞内を自分が複製しやすい環境に変化させる。自然免疫機構を変化させ宿主からの攻撃を防ぐ機構もそのひとつである。また、RNA ウイルスの多くはゲノムの複製を宿主の膜環境を利用して行なう。HCV の場合も同様で、ウイルスタンパク質による自然免疫からの逃避機構や、本稿で触れたように HCV ゲノム複製複合体の存在を生化学的に示した。さらに、HCV が油滴を利用して感染性ウイルスを産生するという、これまで知られていなかった新しいウイルス産生の機構を明らかにした。今後、さらに詳細な複製機構を明らかにすることにより、ウイルスと宿主の相互作用が浮かび上がってくると同時に、これまで不明であった細胞の仕組みが明らかにされるものと期待される。また、効果的な抗ウイルス薬の開発にも貢献すると思う。

文献

- 1) L. Cocquerel, C. Voisset & J. Dubuisson: *J. Gen. Virol.*, **87**, 1075 (2006).
- 2) H. Aizaki, K. J. Lee, V. M. Sung, H. Ishiko & M. M. Lai: *Virology*, **324**, 450 (2004).
- 3) D. Moradpour, M. J. Evans, R. Gosert, Z. Yuan, H. E. Blum, S. P. Goff, B. D. Lindenbach & C. M. Rice: *J. Virol.*, **78**, 7400 (2004).
- 4) Y. Miyanari, M. Hijikata, M. Yamaji, M. Hosaka, H. Takahashi & K. Shimotohno: *J. Biol. Chem.*, **278**, 50301 (2003).
- 5) V. Lohman, F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilann & R. Bartenchalger: *Science*, **285**, 110 (1999).
- 6) R. Gosert, D. Egger, V. Lohmann, R. Bartenschlager, H. E. Blum, K. Bienz & D. Moradpour: *J. Virol.*, **77**, 5487 (2003).
- 7) D. Egger, B. Wölk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour & K. Bienz: *J. Virol.*, **76**, 5974 (2002).
- 8) Y. Miyanari, K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata & K. Shimotohno: *Nature Cell Biol.*, **9**, 1089 (2007).
- 9) G. Barba *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1200 (1997).
- 10) R. G. Hope & J. McLauchlan: *J. Gen. Virol.*, **81**, 1913 (2000).
- 11) T. Wakita *et al.*: *Nature Med.*, **11**, 791 (2005).
- 12) S. U. Nielsen, M. F. Bassendine, A. D. Burt, C. Martin, W. Pumeechockchai & G. L. Toms.: *J. Virol.*, **80**, 2418 (2006).
- 13) H. Huang, F. Sun, D. M. Owen, W. Li, Y. Chen, M. Gale, Jr. & J. Ye: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5848 (2007).
- 14) P. Gastaminza, G. Cheng, S. Wieland, J. Zhong, W. Liao & F. V. Chisari: *J. Virol.*, **82**, 2120 (2008).
- 15) S. Molina *et al.*: *J. Hepatol.*, **46**, 411 (2007).
- 16) V. Agnello, G. Ábel, M. Elfahal, G. B. Knight & Q.-X. Zhang: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **196**, 12766 (1999).

【解説】



放射線の生物影響リスクの評価

岩崎利泰*1, 緒方裕光*2, 馬替純二*1

近年の人類の長寿化において放射線治療やX線診断など、放射線を用いた医療診断技術の発達が計り知れない貢献をしていることは言うまでもない。一方で、放射線は生物に対して様々な影響を及ぼすことが知られている。特に我が国では、世界で唯一の原爆被爆国である特異性から、ともすると放射線に対して不合理な恐怖心をもつ傾向があることが否めない。放射線の恩恵を享受するためには、その生物影響について正確な知識を社会で共有することが重要な課題となる。ここでは、放射線のリスク評価と放射線防護の観点から生物学的・疫学的な研究の現状と問題点を概説する。

低線量放射線の生物影響の分子生物学

生体分子の中で、DNAは放射線が生体の維持に影響を与える最も大きな標的である。自己複製能力は生命体にとって本質的な特徴であり、とりわけ正確なDNA複製は生命体の維持に必須の要件となる。DNAの損傷は速やかかつ正確に修復されなければならない。DNA損傷に対して最初に応答する生物反応は、タンパク質のリン酸化反応である。ATM (ataxia telangiectasia mu-

tated, 末梢血管拡張性運動失調症の原因遺伝子産物)によるタンパク質リン酸化反応はその後の生体応答カスケードを動かすための初発の反応であり、リン酸化修飾によりNBS (Nijmegen breakage syndrome, ナイミーヘン染色体不安定性症候群の原因遺伝子産物)などのDNA修復複合体の構成成分やp53などの転写因子の機能を直接、間接に変化させる。その結果、細胞は増殖を停止し、その間に活性化された修復複合体はDNA損傷の修復を試みる。あるいは、アポトーシスと呼ばれる自殺機構や細胞老化が誘導され、損傷細胞は生体から除かれる。ATMの活性化はDNA二重鎖切断に特徴的な応答であるが、ATMは二重鎖切断そのものを認識するのではなく、切断によって生じたクロマチン構造の変化を認識して活性化することが示唆されている。30億以上もの塩基対からなる染色体DNA鎖のわずか数個所に断裂が生じてクロマチン構造の大きな変化が生ずると考えられ、それゆえ、ATMは細胞内に数個のエネルギー付与しか生じない数mGy程度の放射線にも応答して活性化することが示されている⁽¹⁾。

放射線の生体影響の多くは、その直接的な作用よりも、むしろ生体内に存在する水分子との相互作用により生じた活性酸素によるところが大きいことが知られている。生体では放射線に限らず様々な過程で活性酸素が生

Risk Estimation in Biological Effect of Radiation
Toshiyasu IWASAKI, Hiromitsu OGATA, Junji MAGAE,
*1財団法人電力中央研究所放射線安全研究センター、*2国立保健医療科学院

3D細胞培養系を用いた患者血液由来HCV培養

土方 誠^{*1,*2} アリ・ハッサン・フセイン^{*1} 下遠野 邦 忠^{*3,*4}

索引用語：C型肝炎ウイルス，不死化肝細胞，感染，自然免疫，立体培養

1 はじめに

C型肝炎ウイルス(HCV)は1989年に輸血後非A非B型慢性肝炎の主要な原因ウイルスとして発見された。それまで長い間輸血後非A非B型慢性肝炎の原因ウイルスを同定する努力がなされてきていたが、従来の古典的なウイルス学的手法では実現されなかった。そこでこのウイルスは分子生物学的手法によってまずそのゲノムRNAに対するcDNAがクローニングされ、疫学的な検証によって疾患の原因ウイルスであることが確認された。cDNAを発現させたウイルス抗原を用いることにより輸血用血液に存在するウイルスに対する抗体の検査が可能になり、輸血による感染予防が可能になった。しかしながら、現在世界人口の約3%にも及ぶ既感染者が存在すると推定されており、感染者は慢性肝炎から肝硬変そして肝癌へと進行する可能性が高いので大きな社会問題となっている。インター

フェロンとリバビリンを用いた最新の治療法はインターフェロンによる治療が開始された初期のころに比較して格段に治療効果があがっているものの、著効率は50%程度でしかないために、新たな抗HCV治療薬の開発が切望されている。抗HCV薬剤開発が期待されたほど進まなかった理由のひとつは培養細胞を用いた効率の高いHCV増殖系が存在しなかったため、ウイルス学的な研究が困難であったことにある。しかしながら、近年多くの研究者の努力によって効率の高いHCV増殖系が開発が進み、それまで得られなかったHCVの生活環に関する情報が得られ始めている。本稿では培養細胞を用いたHCV増殖系を概説し、われわれが新たに開発を進めている患者血液由来のHCVが感染増殖する細胞培養系について紹介する。

2 培養細胞を用いたHCVの増殖系

先に述べたように、HCVはウイルス遺伝

Makoto HUIKATA *et al*: Proliferation of blood-borne HCV in the 3D cell culture system

*¹ 京都大学ウイルス研究所 [〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53]

*² 京都大学大学院生命科学研究所 *³ 慶応義塾大学医学部総合医学科学研究センター

*⁴ 千葉工業大学附属研究所

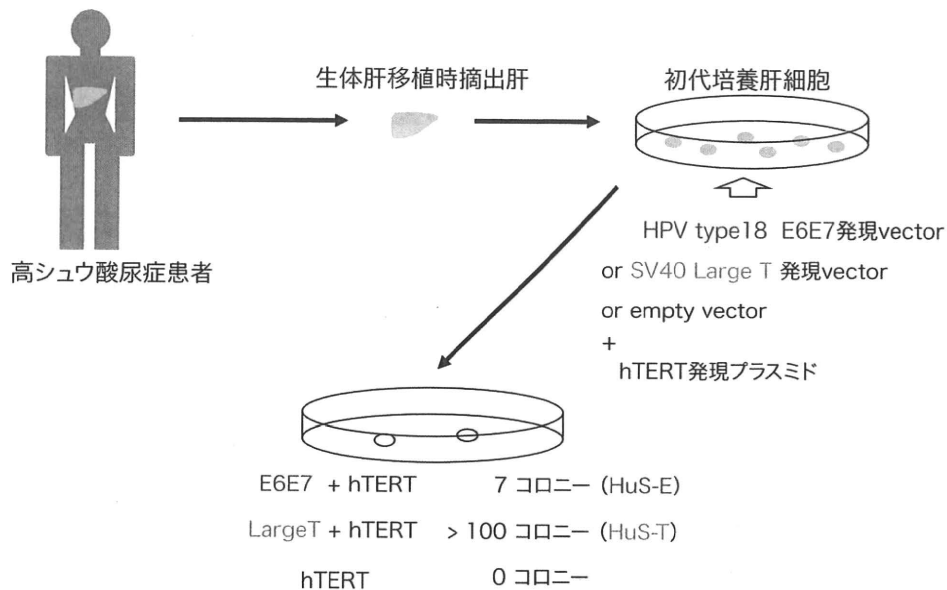


図1 新たなヒト不死化肝細胞の樹立

生体肝移植患者からの摘出肝を用いて作成した初代培養肝細胞にヒトパピローマウイルス(HPV) E6E7遺伝子あるいはシミアンウイルス40 (SV40) T抗原遺伝子の発現ベクターをヒトテロメラーゼ(hTERT)遺伝子発現ベクターと共に導入し、増殖しコロニーを形成する細胞株を得た。E6E7あるいはSV40T抗原導入によって得られた不死化細胞をそれぞれHuS-EそしてHuS-Tと命名した。

子のクローニングからみいだされたウイルスであったため、ウイルス学の研究に必須である培養細胞を用いた効率の良い感染増殖実験系が存在しなかった。多くの研究者によって培養細胞を用いたウイルス増殖系の樹立が試みられてきたが、最近になるまで効率の良い感染増殖系は得られなかった。しかし、1999年にドイツのグループによって培養細胞内で部分RNAゲノムが複製し、維持されるといういわゆる、レプリコン複製細胞実験系が開発されたことでウイルス増殖反応の一部であるRNAゲノム複製に関する実質的な研究が可能になった¹⁾。しかしながら、この実験系にゲノム長のRNAを用いた場合でも感染性の粒子産生がみられなかった。2005年に当時東京都神経科学総合研究所の脇田らによって、劇症肝炎患者由来の血液からクローン化されたHCV遺伝子(JFH-1)を用いて感染性組

換え体HCVの産生系が開発された²⁾。この実験系ではJFH-1ゲノムRNAを試験管内で合成し、これを肝癌由来細胞であるHuH-7細胞に導入することで、感染性を有するHCV粒子が産生されるというものである。この感染性粒子をHuH-7の亜株であるHuH-7.5細胞やHuH-7.5.1細胞に感染させると、これらの細胞への感染が認められる³⁾。この組換え体HCV産生系は感染と増殖、感染性粒子産生などの基礎研究に有用な実験系である。しかし、患者血液に由来するHCVを感染源として用いてHuH-7細胞に感染させても効率良く感染、複製することはなく、また感染性粒子の産生も認められない⁴⁾。

3 新たなヒト不死化肝細胞の樹立

これまで患者血液に由来するHCVの感染増殖実験に用いられてきたのはヒト肝癌由来

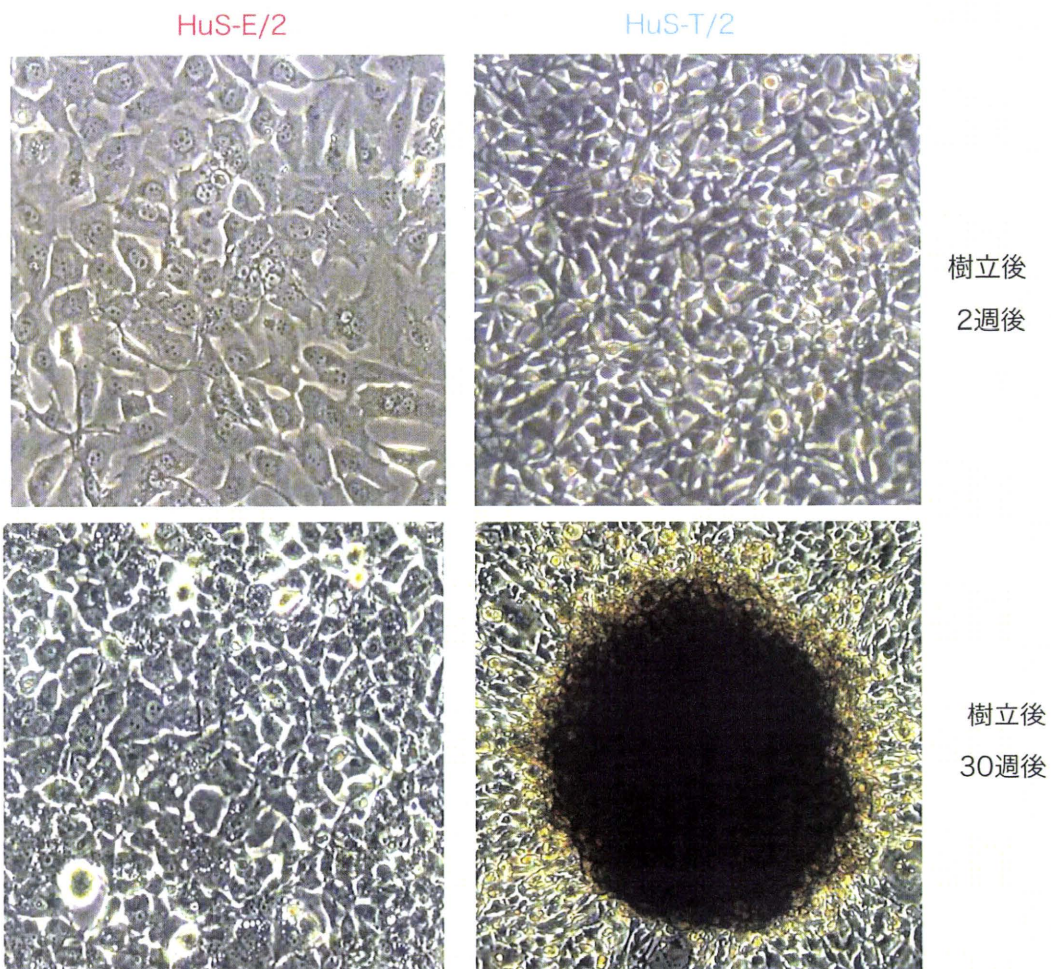


図2 新たなヒト不死化肝細胞の形態

細胞樹立2週後と30週後におけるHuS-E/2細胞とHuS-T/2細胞の形態を比較した。HuS-T/2細胞は樹立後2週間で大きさが小型になり、30週後には細胞塊を形成することがわかる。HuS-E/2細胞はHuS-T/2細胞ほど大きな変化は認められない。

細胞あるいはヒト不死化肝細胞である。上記JFH-1の感染増殖実験にはこのような細胞が用いられている。日本に広く蔓延していて、感染後慢性化する確率が高く、またインターフェロン治療に抵抗性を示すことの多い遺伝子型1bに属するHCVはどのように肝細胞に感染し増殖するのか、また感染後に細胞内でどのようなウイルスと細胞の相互作用が起こるのか、上記組換え体HCVの実験系からは確実な情報を得ることはできない。そこで本

来HCVが感染し増殖する宿主細胞であるヒト肝細胞の性質をできるだけ維持しているヒト不死化肝細胞の作成を試みた。これまで多くのヒト不死化肝細胞株が樹立されているがそのほとんどはサルウイルスであるシミアンウイルス40 (SV40)のT抗原を細胞の不死化させるために使用している。T抗原による細胞不死化機構についてはこれまでに良く研究されていて、癌抑制遺伝子であるretinoblastoma (RB) 遺伝子産物とp53遺伝子産物

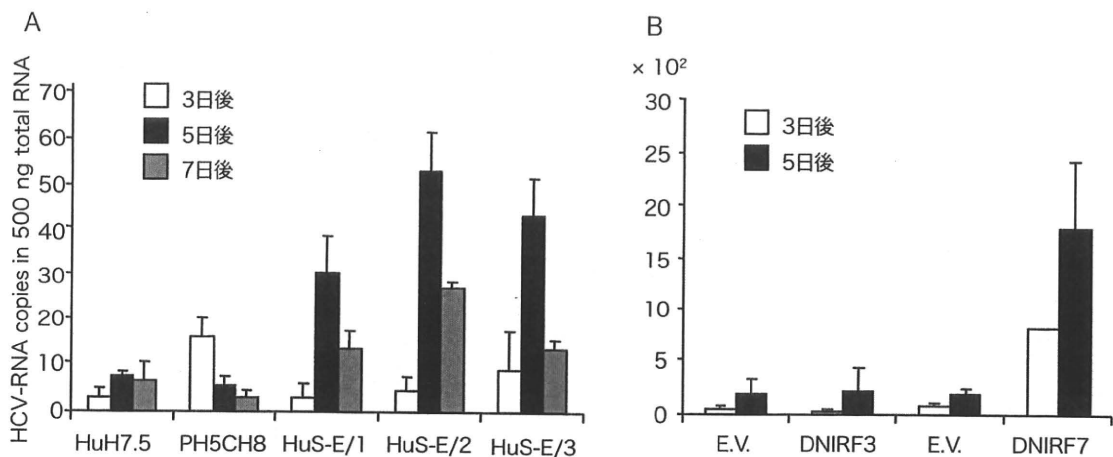


図3 HuS-E細胞の血清由来HCV (遺伝子型1b)の感染増殖性

HuS-E細胞の3種の細胞株と他の肝由来細胞PH5CH8細胞そしてHuH7.5細胞における血清由来HCVの感染増殖性と比較した(A)。またHuS-E/2細胞にドミナントネガティブ変異体IRF3(DNIRF3)あるいはIRF7(DNIRF7)発現プラスミドを導入したものにおける血清由来HCVの感染増殖性を比較した(B)。E.V.は空の発現ベクター導入細胞を示す。感染実験は細胞数 1×10^5 に対してHCVゲノムRNAコピー数が 1×10^5 コピーを含む量の血清を培地に加えて行った。血清添加後、細胞を良く洗浄し、経時的に細胞から全RNAを単離し、HCV-RNAをリアルタイムRT-PCR法で定量した。

の機能抑制を引き起こすことが知られている。ただ染色体への結合による染色体不安定化の機能も報告されていることからこのT抗原によって不死化された細胞はその形質が不安定になる可能性が考えられた。そこでわれわれはT抗原の代わりにヒトパピローウイルスのE6E7遺伝子をヒト肝細胞の不死化のために用いることにした。このE6E7遺伝子はT抗原同様にそれぞれp53とRBの機能を抑制するが、各種組織由来の細胞で比較的良く元の組織の形質を保存したまま不死化することが可能であると報告されていたからである^{5,6)}。そこでまず京都大学医学部付属病院の移植外科との共同研究を行い、生体肝移植患者からの摘出肝から初代培養肝細胞を得て、これにE6E7発現プラスミドならびにヒトテロメラーゼ遺伝子発現プラスミドを導入し、その不死化を試みた⁴⁾。図1に示すよう

に同時T抗原発現ベクターを用いた不死化実験も同時に行ったが、得られた不死化細胞のコロニー数はT抗原の100コロニー以上に比べて、E6E7では7コロニーとその効率は著しく低かった。しかしながら、1カ月ほど培養を続けるとT抗原で不死化した細胞は形態が一定でなく大きさも小さくなり、明らかに初代培養肝細胞とは異なり、形態的变化が明らかになった(図2)。一方、E6E7で不死化した細胞(HuS-E細胞と命名)は30日後でも初代培養肝細胞と同様の形態を示した。このことは肝細胞特異的発現を示すことが知られている遺伝子群に関してその発現を検証した場合でも同様だった。E6E7で不死化した細胞はT抗原で不死化した細胞(HuS-T細胞と命名)に比べて長期間の培養後にも初代培養肝細胞と同様の発現パターンを示していることが分かった⁴⁾。そこでこの細胞と患者血清

を用いたHCV感染実験を行い、そのHCV感染増殖性について検討した。図3Aに示すように血清を細胞の培養液に加えて1日後、細胞を洗浄後新たな培地で3日、5日、7日間培養した。その後、細胞から全RNAを回収してその中のHCV-RNA定量し、その経時変化を検討した。HuS-E細胞は株間で多少の相違はあるが、他の肝由来細胞株と比較して数倍から5倍程度安定した感染増殖が認められた⁴⁾。その中でも一番感染増殖能が高かったHuS-E/2細胞株をそれ以降主にHCV感染増殖研究のために使用することにした。

4 自然免疫系修飾によるHCVの感染増殖効率の改良

上記のようにHuS-E/2細胞は初代培養肝細胞に比較的類似した形質をもつ細胞であることから、この細胞は自然免疫機能も正常に機能していると考えられる。そこで細胞内のインターフェロン(IFN)シグナリング経路の中で重要な機能を持つ転写因子であるインターフェロン調節因子(interferon regulatory factor, IRF) 3と7の機能を抑制した時にHCVの増殖が亢進するかどうかを検討した⁴⁾。そのためにまずそれぞれの転写因子に対するドミナント・ネガティブ型(DN)分子を作成し、これをHuS-E/2細胞中で一過性に発現させてから血清由来HCVを感染させた。各DN分子はそれぞれの分子の転写活性化領域を欠失させたものを用いた。この分子を発現する細胞では内在性の野生型分子と二量体を形成し、その転写活性化能を抑制すると考えられる。図3Bに結果を示すようにIRF3のDN分子はHCV感染に対して期待した効果を示さなかったが、IRF7のDN分子を発現させると著しくHCVの感染増殖が亢進した。IRF7に対するsiRNAを用いて本タン

パク質の発現を抑制した場合にも、IRF7のDN分子を用いた時と同様の効果が観察された。以上から血清由来HCVの培養細胞への感染は自然免疫系を誘導し、それによってHCVの増殖が抑制されることがわかった。またその抑制機能にはIRF7が重要な役割を担っていることが示唆された。

5 3D細胞培養系によるHCV感染性粒子産生

HuS-E/2細胞は別の細胞を用いて解析された血清由来HCVの感染増殖系に比べて、その効率は安定して高いことがわかった。しかしながら、培養上清中にはHCV RNAが全く検出されず、上清中に感染性HCVは認められなかった。HCVのヒトにおける主たる感染標的細胞はもちろん肝細胞であると考えられる。肝臓は他の組織と同様に極めて機能的に構成された組織であり、肝細胞はその中で立体的に整然と配置されている。したがって、そのように立体的に配置された肝細胞が本来の形質を持ち、そのことがHCVの感染、特に感染性粒子産生に極めて重要な役割を果たしていることが想像される。実際にRadial-Flow Bioreactor (RFB)と呼ばれる人口肝臓のモデルシステムに肝癌由来細胞であるFLC4細胞を充填し、これを3次元(3D)培養することで血しょう由来のHCVが感染増殖し、システムを循環する培養液中にHCV RNAが検出されることが報告されている⁷⁾。また、既にチンパンジーを用いて感染性HCV産生能が確認されている遺伝子型1aのHCV RNAゲノムをこのRFB培養した培養細胞に導入することによってその培養液中に、別に準備したRFB培養細胞へ2次感染することが可能な感染性粒子が産生されることが示されている⁷⁾。またRFBを用いた3D培養で

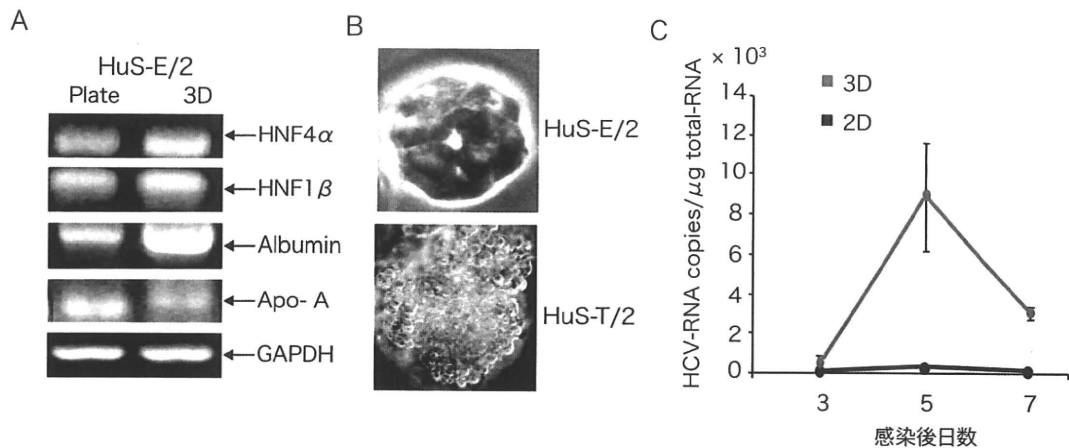


図4 TGPを用いた3D培養HuS-E/2細胞の血清由来HCV (遺伝子型1b)の感染増殖性
TGPを用いて3D培養したHuS-E/2細胞における肝臓特異的発現遺伝子の発現を通常の2D培養したものと同様にRT-PCR法によって比較した(A)。TGPを用いて3D培養したHuS-E/2細胞とHuS-T/2細胞の形態を比較した(B)。TGPを用いて3D培養したHuS-E/2細胞と2D培養したものにおける血清由来HCVの感染増殖性と比較した(C)。感染の解析は図3と同様に行った。

は感染性粒子産生が認められなかった上記ゲノム長のレプリコン複製細胞を培養することで感染性HCVの産生が認められるようになっている⁸⁾。同様の現象はRFBだけでなく温度可逆性ゲル化ポリマー (Thermoreversible gelation polymer; TGP) を用いてポリマーゲル中で細胞培養をした場合にも観察されている⁸⁾。これらの結果は3D培養が培養細胞からのHCV粒子産生に非常に有用であることを示している。

6 簡便な3D細胞培養系を用いた血清由来HCV感染増殖系の構築

われわれは上記のように通常の培養ディッシュを用いた2次元(2D)培養においても比較的効率良い血清由来HCVの感染増殖が観察されたHuS-E/2細胞を3D培養することで感染性粒子の産生が可能になると考えた。まず特殊な装置を必要とせず、小規模の細胞培養系であり、ウイルスが感染した細胞の解析にも使用可能と考えられた上記TGP培養系

を用いて3D培養を行った。図4Aに示すように肝臓特異的に発現しているアルブミン遺伝子などの発現をRT-PCR法を用いて解析したところ、3D培養した場合に2D培養した時に比較して著しくその発現が誘導されることがわかった。また、HuS-E/2細胞はTGP培養系で培養していくと図4Bで示すようにシスト様の構造を形成し、ランダムに細胞増殖をして細胞塊を形成しているHuS-T2細胞(同じ初代培養肝細胞をSV40-T抗原で不死化して得た細胞)とは全くことなる形態を示した。そこでこの3D培養しているHuS-E2細胞に患者血清を加えて、その細胞内のHCV-RNA量の変化を経時的に追うことでその感染と増殖を検討した。図4Cに示すように同じ細胞を2D培養した場合に比較して感染5日後ではHCV-RNA量が100倍近く増加することがわかった。このことは3D培養によってこの細胞が血清由来HCVの感染増殖に適した状態に変化していることを示している。しかしながら、TGP培養系では以下の理由により

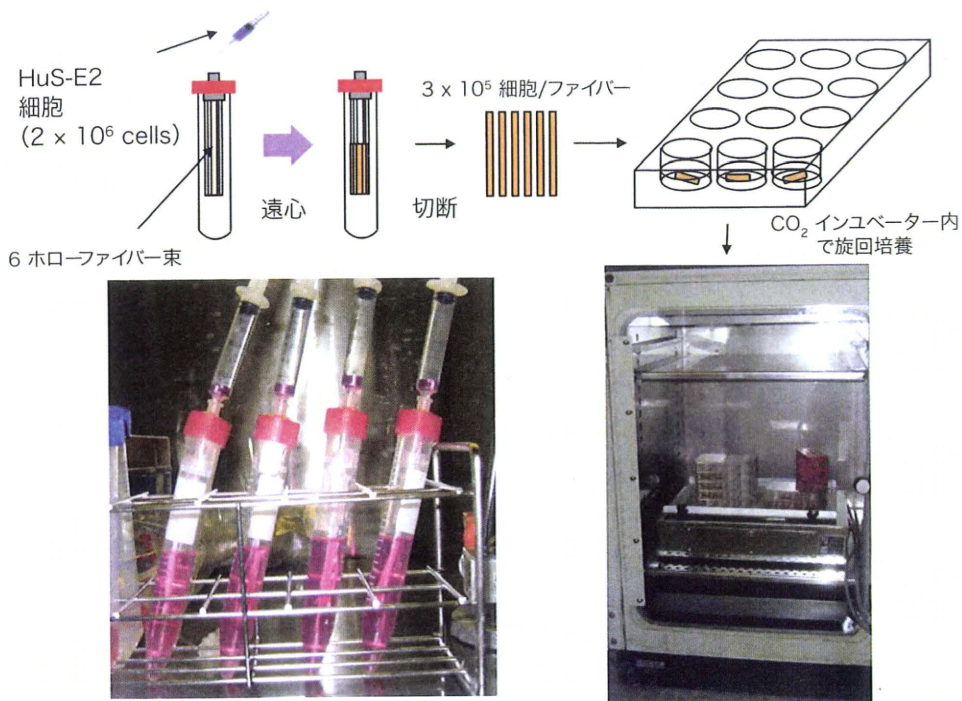


図5 ホローファイバーモジュール(東洋紡)を用いたHuS-E/2細胞の3D培養系

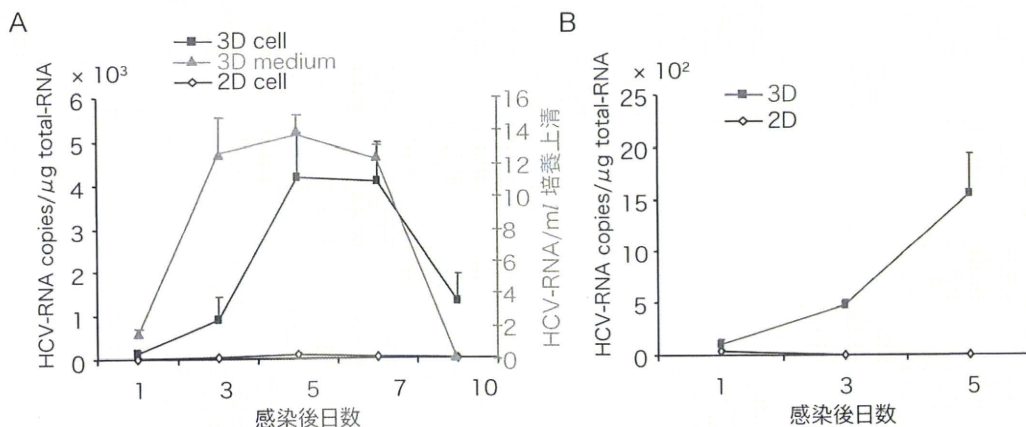


図6 HFを用いた3D培養HuS-E/2細胞の血清由来HCV(遺伝子型1b)の感染増殖性
 HFを用いて3D培養したHuS-E/2細胞と2D培養したものにおける血清由来HCVの感染増殖性と比較した(A)。HCV感染後、経時的に細胞内(cell)と培養上清中(medium)のHCV RNAを定量した。2D培養した細胞の培養上清にはHCV RNAは全く検出されなかった。(A)において2Dおよび3D培養したHuS-E/2細胞に感染後5日と7日におけるそれぞれの培養上清を回収し濃縮して、別にHFを用いて3D培養したHuS-E/2細胞の培地に添加し、その2次感染能を解析した(B)。

感染性粒子の解析が容易ではないためにこの系を用いたさらなる解析は困難であった。

TGPは培養状態ではゲル化していて4度以下の低温化ではゾル化する。しかしながらその

ゾルは粘稠であるため、細胞や培養液の回収は低温条件下でTGPを氷冷した緩衝液などで大幅に希釈してから行う必要がある。このように取り扱いがなかなか難しいため、感染性粒子が培地中に産生されているか否かを検討しようと試みたが単純な方法では再現性のある結果が得られなかったのである。

次に中空糸ホローファイバー (HF) による3D培養法をHuSE/2細胞に応用した。このシステムは人工肝臓作成のため、開発されたシステムのひとつである⁹⁾。遠心チューブの中にセルロースアセテート製のHF束がセットされたモジュール構造をしており、培養細胞は懸濁液として遠心チューブ上部からモジュールへ注入する。そのうち、遠心力によりHF中に培養細胞を詰めることでHF内腔にオルガノイドを形成させる(図5)。そのうちHFを切断し、その断片を12ウェル培養用マルチプレートのウェル内でヒト肝細胞用無血清培地を用いて旋回させながら培養する(図5)。通常一つのウェルに2本で一束のHFが培養でき、細胞数は培養開始時には 3×10^5 の5乗程度である。そこでこの系で培養したHuSE/2細胞を用いて血清由来HCVの感染増殖を検討した。図6Aに示してあるように血清で処理したのち、3日、5日、7日と細胞内のHCV-RNA量は著しく増加し、この細胞では効率良く血清由来HCVが感染し増殖することが明らかとなった。またHF培養系は無血清培地と細胞を含むHFが簡単に分離できるため、細胞のみならず培養上清の単離や解析が容易である。そこで培養液中に存在するHCV-RNA量を測定したところ、ほぼ細胞内のHCV RNAと同様のパターンで経時的に増加していることがわかった(図6A)。このことからこの培養系では患者血清由来の感染性HCV粒子が培養液中に産生されているこ

とが推定されたため、このHCV-RNAを含む培養上清を回収し濃縮したのち、新たに用意したHF培養HuSE/2細胞の培地に加え、その感染性を検討した。上記同様に経時的に細胞内のHCV-RNA量を定量すると処理後3日、5日後に明らかな増加が認められた(図6B)。このことは用いた培養上清に感染性粒子が産生されていたことを強く示唆するものである。以上の結果からHFを用いたHuSE/2細胞の3D培養系は患者血清由来のHCVが感染し、増殖し、感染性粒子を放出するというHCVの生活環を再現する簡便な3D細胞培養系として利用することが可能であると考えられた。

7 おわりに

現在、種々の条件で血清由来のHCVの感染増殖、そして感染性ウイルスの産生についてさらなる解析を進めている。この系が種々の患者血清由来のHCVの感染増殖を再現することができれば、これまで明らかにならなかった多様な患者由来のHCVと細胞の相互作用に関する研究を進めることが可能になり、また、新たな抗HCV薬開発にも有用であることは間違いない。また将来的に出現が予想されている薬剤耐性株や異なるHCV株毎に適した治療法の選択などに利用されることが期待できる。

文献

- 1) Lohmann V, Korner F, Koch J et al : Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line, *Science* 285 : 110-113, 1999
- 2) Wakita T, Pietschmann T, Kato T et al : Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11 : 791-796, 2005
- 3) Zhong J, Gastaminza P, Cheng G et al : Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad*

- Sci USA 102 : 9294–9299 2005
- 4) Aly HH, Watashi K, Hijikata M et al : Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol* 46 : 26–36, 2007
 - 5) Harms W, Rothamel T, Miller K et al : Characterization of human myocardial fibroblasts immortalized by HPV16 E6/E7 genes, *Exp. Cell Res* 268 : 252–261 2001
 - 6) Hung SC, Yang DM, Chang CF et al : Immortalization without neoplastic transformation of human mesenchymal stem cells by transduction with HPV16 E6/E7 genes, *Int J Cancer* 110 : 313–319, 2004
 - 7) Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M et al : Production and release of infectious hepatitis C virus from human liver cell cultures in the three-dimensional radial-flow bioreactor. *Virology* 314 : 16–25, 2003
 - 8) Murakami K, Ishii K, Ishihara Y et al : Production and infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351 : 381–392, 2006
 - 9) Funatsu K, Ijima H, Nakazawa K et al : Hybrid artificial liver using hepatocyte organoid culture. *Artif Organs* 25 : 194–200, 2001

*

*

*

RESEARCH ARTICLE

Prolonged Circulation Half-life of Interferon γ Activity by Gene Delivery of Interferon γ -Serum Albumin Fusion Protein in Mice

NORIKO MIYAKAWA,¹ MAKIYA NISHIKAWA,¹ YUKI TAKAHASHI,¹ MITSURU ANDO,¹ MASAYUKI MISAKA,¹ YOSHIHIKO WATANABE,² YOSHINOBU TAKAKURA¹

¹Department of Biopharmaceutics and Drug Metabolism

²Department of Molecular Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

Received 20 August 2010; revised 11 November 2010; accepted 7 December 2010

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jps.22473

ABSTRACT: Gene delivery of mouse interferon (IFN) γ has been shown to inhibit metastatic tumor growth and onset of atopic dermatitis in mouse models. In this study, we tried to increase the circulation half-life of IFN γ after its gene delivery by designing a novel fusion protein of IFN γ with mouse serum albumin (MSA). Western blot analysis confirmed that IFN γ -MSA was expressed as a fusion protein, but hardly formed dimer as IFN γ did. The biological activity of IFN γ -MSA, which was examined using a plasmid expressing luciferase under the control of gamma-activated sequence elements, was about 200-fold lower than the activity of IFN γ . Intravenous injection of the proteins into mice confirmed that the circulation half-life of IFN γ was significantly prolonged by the modification. A hydrodynamic injection of a plasmid expressing IFN γ -MSA resulted in a sustained concentration in mouse serum; it resulted in about sixfold greater area under the concentration-time curve and about threefold longer mean residence time of IFN γ activity than those of IFN γ . Gene delivery of IFN γ -MSA inhibited tumor metastasis to a similar level to that of IFN γ despite the reduced activity of IFN γ -MSA. These results indicate that gene delivery of IFN γ -MSA is a promising approach to prolong the circulation half-life of IFN γ activity. © 2011 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association J Pharm Sci

Keywords: albumin; fusion protein; gene delivery; plasmid DNA; hydrodynamic injection; pharmacokinetics; clearance; moment analysis; dimerization

INTRODUCTION

Interferon (IFN) γ plays a variety of roles in the immune systems. Despite the potent biological activities of IFN γ , its clinical application is limited to treatment of kidney carcinoma and adult T-cell leukemia and to reduction in the frequency and severity level of serious infection associated with chronic granulomatous disease (CGD) in Japan; in the United States, it was approved only for the treatment of CGD and malignant osteopetrosis by FDA.¹ This limited application of IFN γ is mainly because of the short *in vivo* half-life of the protein, which forces patients to receive frequent subcutaneous injections and to suffer from the adverse effects exacerbated by frequent dosing.²

It was reported that IFN γ disappears from the systemic circulation with a half-life of less than 3 min after intravenous injection into mice.³ Its half-life in humans is about 4.5 h after intramuscular injection.⁴

Although a number of technologies have been developed to prolong the short *in vivo* half-life of cytokines or other protein drugs, a few systems have been designed or intended to use for IFN γ .⁵ The most studied system to extend the half-life of protein drugs is controlled release formulations. Fujioka et al.^{6,7} developed mini-pellets that continuously release IFN α for more than 1 week after subcutaneous implantation. Another approach is the conjugation of polyethylene glycol to IFN α or IFN β . This pegylation protects the IFNs from proteolytic degradation and reduces their renal clearance and antigenicity.⁸ In clinical practice, two types of pegylated human IFN α are used as a standard therapy for hepatitis C virus-infected patients in combination with an antiviral drug ribavirin.⁹ A drawback of pegylation is the

Correspondence to: Yoshinobu Takakura (Telephone: +81-75-753-4615; Fax: +81-75-753-4614; E-mail: takakura@pharm.kyoto-u.ac.jp)

Journal of Pharmaceutical Sciences

© 2011 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association

possible variations in the chemical structure as well as the biological activities.

Gene delivery, by which a protein of interest is expressed from a vector within the body, has been studied for more than the last two decades as an alternative strategy to improve the pharmacokinetic properties of protein drugs. We have been studying plasmid-based delivery of IFN γ genes and reported that gene delivery of IFN γ is effective in inhibiting the metastatic growth of tumor cells^{10,11} and in preventing atopic dermatitis in NC/Nga mice, a model mice of human atopic dermatitis.¹² In these previous studies, sustained expression of IFN γ was successfully achieved by modifying the properties of the plasmids.

Controlling the structural properties of IFN γ will provide additional possibilities to increase its therapeutic potency of gene delivery of IFN γ through the changes in the biological activity and pharmacokinetic characteristics. Gene delivery of fusion proteins has been examined for some proteins in animal experiments, but little attention has been paid to the pharmacokinetic characteristics of such fusion proteins adequately, even though it is one of the most important parameters determining therapeutic effects. Therefore, in the present study, we tried to prolong the circulation half-life of mouse IFN γ after *in vivo* gene delivery using nonviral plasmid vectors. To achieve this goal, serum albumin was selected as a partner for the protein because it has a long circulation half-life and is little immunogenic.¹³ We constructed plasmids encoding a fusion protein of IFN γ and mouse serum albumin (MSA) and examined whether the conjugation increases the retention time of IFN γ activity after *in vivo* gene transfer to mice. Pharmacokinetic parameters, such as the area under the serum concentration–time curve (AUC) and the mean residence time (MRT), were calculated using a moment analysis method and used for quantitative evaluation.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Mice

An African green monkey kidney fibroblast cell line, COS-7, was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, Virginia). A mouse melanoma cell line,

B16-BL6, was obtained from Cancer Chemotherapy Center of the Japanese Foundation for Cancer Research (Tokyo, Japan). COS-7 and B16-BL6 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Nissui, Tokyo, Japan) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Japan Bioserum, Hiroshima, Japan) and penicillin/streptomycin/ L-glutamine (PSG) (Invitrogen, Carlsbad, California). A mouse colon carcinoma cell line,

CT-26, was cultured in RPMI1640 supplemented with 10% FBS and PSG. Male 4-week-old Institute of Cancer Research (ICR) mice, approximately 20 g in weight, were purchased from Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan) and maintained on a standard food and water diet under conventional housing conditions. All animal experiments were approved by the Animal Experimentation Committee of the Graduate School of Pharmaceutical Science, Kyoto University.

Plasmid DNA

pcDNA3.1 was purchased from Invitrogen. pCMV-Luc, a firefly luciferase-expressing plasmid DNA, was constructed as described previously.¹⁴ phRL-TK, a renilla luciferase-expressing plasmid DNA under the control of herpes simplex virus thymidine kinase (TK) promoter, was purchased from Promega (Madison, Wisconsin). pC3MSAmH, a plasmid DNA encoding mouse prepro-albumin, was kindly donated by Dr. W. P. Sheffield, McMaster University, Canada.¹⁵ IFN γ -expressing plasmid DNA, pCMV-Mu γ was constructed by inserting a mouse IFN γ cDNA fragment into the multicloning site of pcDNA3.1. pCMV-Mu γ -MSA, a plasmid encoding the IFN γ -MSA fusion protein, was constructed as follows. An MSA cDNA fragment excluding the secretion signal sequence was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from pC3MSAmH. The fragment was inserted into the C-terminal end of IFN γ cDNA in the pCMV-Mu γ . The stop codon of IFN γ cDNA was deleted and oligonucleotides coding six amino acids (Gly–Gly–Gly–Ser–Gly–Arg) were inserted between IFN γ cDNA and MSA cDNA as a linker. The sequence of the linker was selected according to a previous report.^{16,17} To measure the biological activity of IFN γ -MSA, gamma-activated sequence (GAS)-dependent signal transduction was used. Namely, four copies of GAS element (5'-AGTGATTTCTCGGAAAGAGAG-3') were inserted into multicloning site of pLuc-MCS (Stratagene, La Jolla, California). Each plasmid DNA was amplified in *Escherichia coli* (DH5 α ; TOYOBO, Osaka, Japan) and purified using the JETSTAR plasmid purification kit (GENOMED, Löhne, Germany).

In Vitro Transfection

Cells were seeded at 2×10^5 cells on six-well culture plates and incubated overnight. Transfection of each plasmid DNA was performed using Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to a procedure of the manufacturer's instructions. In brief, 1 μ g of plasmid DNA was mixed with 3 μ L of Lipofectamine2000 in Opti-MEM at a final concentration of 2 μ g plasmid DNA (i.e., 0.48 and 0.40 pmol of pCMV-Mu γ and pCMV-Mu γ -MSA, respectively) per milliliter and the complex obtained was added to cells. At 4 h after the addition, cells were washed with fresh medium and further incubated for a predetermined period.¹⁸ To

study the expression profile of IFN γ and IFN γ -MSA in COS-7 cells, the culture media of COS-7 cells transfected with pCMV-Mu γ or pCMV-Mu γ -MSA were harvested and centrifuged at $430 \times g$ for 3 min to remove detached cells and cellular debris.

Western Blotting

The supernatants of COS-7 cells transfected with pCMV-Mu γ or pCMV-Mu γ -MSA were collected at 48 h after the transfection. The supernatants were untreated or reduced by the addition of dithiothreitol (0.1 M) and heat treatment at 95°C for 4 min to disrupt disulfide bonds and to dissociate homodimers if they exist. The samples were subjected to 12.5% (IFN γ) or 8% (IFN γ -MSA) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis in reducing or nonreducing conditions and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membrane electrophoretically. After blocking with 5% skim milk, the membrane was probed with goat anti-mouse IFN γ polyclonal antibody (R&D System, Inc., Minneapolis, Minnesota) overnight at 4°C and then allowed to react with anti-goat IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase (Santa Cruz, Inc., Santa Cruz, California) for 1 h at room temperature. The bands were detected by LAS-3000 (Fuji Film, Tokyo, Japan).

Measurement of Biological Activity of IFN γ and IFN γ -MSA

B16-BL6 cells were cotransfected with pGAS-Luc (1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and phRL-TK (0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After 4 h transfection, culture medium was replaced with fresh medium containing serial dilutions of conditioned media of COS-7 cells transfected with pCMV-Mu γ or pCMV-Mu γ -MSA. After 24 h incubation, cells were lysed with a lysis buffer (0.1 M Tris, 0.05% Triton-X-100, 2 mM EDTA, pH 7.8), and the lysates were mixed with reagents of Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Then, firefly and renilla luciferase activities were measured in a luminometer (Lumat LB 9507; EG&G Bethold, Bad Wildbad, Germany), and the ratio of firefly luciferase activity to renilla luciferase activity was calculated. Here, firefly luciferase activity was used as an indicator of IFN γ -driven transcription and renilla luciferase activity was used for normalization of the transfection efficiency and cell number.¹⁸ The ratio was normalized to give x -fold values relative to those of group culture without neither IFN γ nor IFN γ -MSA, and half maximum effective concentration (EC50) of IFN γ and IFN γ -MSA was calculated.

In Vivo Gene Transfer

For gene transfer to mouse liver, mice received a hydrodynamic injection via the tail vein of plasmid DNA dissolved in 1.6 mL saline within 5 s.¹⁹ The doses of plasmids were 0.04, 0.2, or 1 pmol/mouse. At pre-

determined period, blood was collected from the tail vein, and the blood samples were incubated at 4°C for 2 h and centrifuged at $8000 \times g$ for 20 min to obtain serum. This method of gene transfer hardly induced the expression of endogenous IFN γ .¹⁰

Measurement of Concentration of IFN γ and IFN γ -MSA

The concentration of IFN γ and IFN γ -MSA in the supernatant of COS-7 cells or mouse serum was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercial kit (Ready-SET-Go! MuIFN- γ ELISA, eBioscience, San Diego, California). The values estimated by ELISA were used for the calculation of remaining activities, even though the reactivity of the antibody to IFN γ -MSA could be affected by the conjugation. This assumption does not affect the profiles of biological activities of IFN γ and IFN γ -MSA after *in vivo* gene transfer.

Clearance of IFN γ and IFN γ -MSA Proteins After Intravenous Injection into Mice

To obtain IFN γ and IFN γ -MSA proteins, mice were injected with pCMV-Mu γ or pCMV-Mu γ -MSA as described above at a dose of 20 $\mu\text{g}/\text{mouse}$. At 12 h after injection, blood was collected from the inferior vena cava, and the serum was obtained in the same manner as described above. The serum samples containing IFN γ or IFN γ -MSA were diluted with saline and were injected to different mice into the tail vein at a volume of 100 μL without further purification. Blood was periodically sampled from interior vena cava. The dose of IFN γ or IFN γ -MSA was set at 8.5 μg IFN γ per kilogram, which was estimated by ELISA.

Experimental Pulmonary Metastasis

CT-26 cells were trypsinized and suspended in Hanks' balanced salt solution (HBSS). Cell suspensions containing 1×10^5 CT-26 cells in 200 μL of HBSS were injected into the tail vein of syngeneic BALB/c mice to establish experimental pulmonary metastasis. At 3 days after inoculation of tumor cells, each plasmid DNA was injected into the tail vein by the hydrodynamic injection method at a dose of 0.7 pmol/mouse. pCMV-Luc was used as a control vector. At 14 days after inoculation of tumor cells, mice were sacrificed, and the number of metastatic colonies on the lung surface was counted.¹¹

Data Analysis

The AUC and MRT were calculated for each animal by integration to infinite time.²⁰ Differences were statistically evaluated by Student's *t*-test, and the level of statistical significance was set at a *p* value below 0.05.

RESULTS

Expression of IFN γ -MSA in Cultured Cells

Figure 1a shows the Western blot analysis of IFN γ and IFN γ -MSA, both of which were expressed in COS-7 cells. The culture medium of cells transfected with pCMV-IFN γ showed two bands of 15–20 kDa polypeptides under reducing conditions with heat denaturation (lane1), which correspond to a monomeric IFN γ with different degrees of N-glycosylation.²¹ The bands of high-molecular weight products (>35 kDa) were considered to be of aggregated products generated in the process of heat treatment. Under nonreducing conditions without heat denaturation, the samples from the pCMV-Mu γ -transfected cells had bands of 30–40 kDa (lane2), indicating that IFN γ is in the dimeric form under such conditions. Samples from the pCMV-Mu γ -MSA-transfected cells had bands of about 80–100 kDa under both reducing and nonreducing conditions (lanes 3 and 4). The size corresponded to the summation of the size of IFN γ (15–18 kDa)²¹ and MSA (approximately 70 kDa),¹⁵ indicating that the fusion protein IFN γ -MSA is expressed from the plasmid. However, few bands with the size of the dimers (170–180 kDa) were detected even in the samples under nonheated and nonreducing conditions, suggesting that the dimerization of the IFN γ -MSA is almost completely blocked.

Figure 1b shows the time course of IFN γ and IFN γ -MSA concentration in culture media of COS-7 cells transfected with pCMV-Mu γ or pCMV-Mu γ -MSA, respectively. The level of IFN γ -MSA was lower than that of IFN γ for the first 2 days, then increased to a similar level to that of IFN γ in the steady state. There are no significant differences in the stability of IFN γ and IFN γ -MSA proteins in the culture medium (data not shown). These results suggest that the fusion of MSA influences the process of the synthesis and/or secretion of the protein.

Measurement of Biological Activity of IFN γ -MSA

After binding to IFN γ receptors, IFN γ promotes the expression of IFN γ -responsive genes through recruiting transcription factors that bind to the GAS element of target genes.²² Therefore, the biological activity of IFN γ was measured using a GAS-dependent expression of firefly luciferase in B16-BL6 cells. The amounts of IFN γ and IFN γ -MSA added to cells were determined by ELISA. As shown in Figure 2, the addition of IFN γ -MSA to cells increased the luciferase activity, indicating that the fusion protein retains biological activity of IFN γ . The analysis of the profiles of IFN γ - or IFN γ -MSA-dependent increase in the luciferase activity resulted in the EC₅₀ values of 30 and 5,920 pg/mL (estimated by ELISA) for IFN γ and

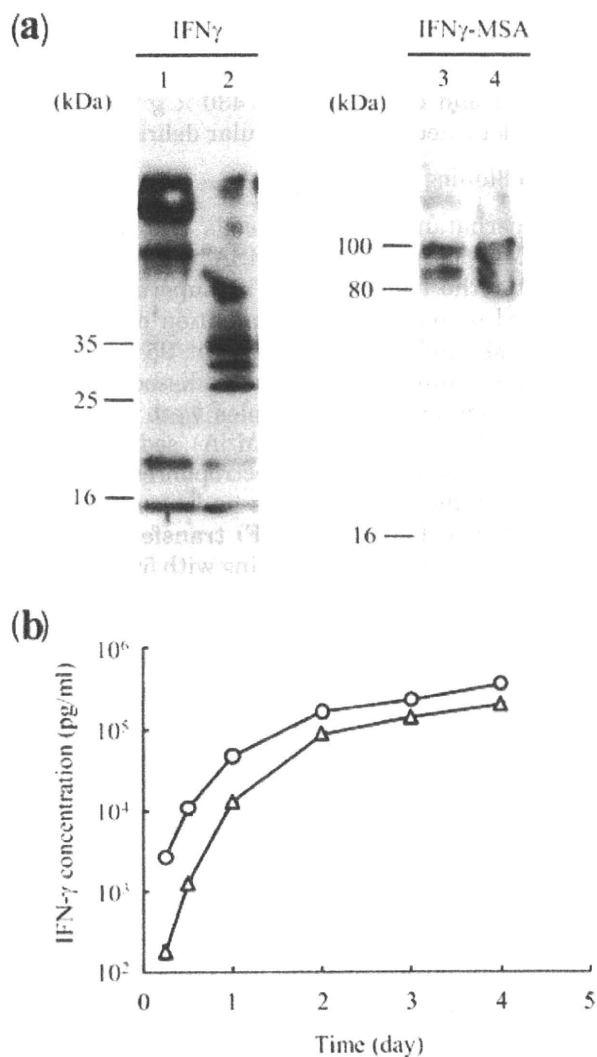


Figure 1. Expression of IFN γ and IFN γ -MSA in cultured cells. (a) Western blotting of IFN γ and IFN γ -MSA. Western blotting was performed to confirm the molecular weight of IFN γ (lanes 1 and 2) and IFN γ -MSA (lanes 3 and 4). The culture media of COS-7 cells transfected with pCMV-Mu γ and pCMV-Mu γ -MSA were subjected to 12.5% (IFN γ) or 8% (IFN γ -MSA) sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF transfer membrane electrophoretically. IFN γ and IFN γ -MSA were detected with anti-mouse IFN γ polyclonal antibody. Dithiothreitol (0.1 M) was used as a reducing agent to disrupt disulfide bonds. Lanes 1 and 3 were heat denatured under reducing conditions, whereas lanes 2 and 4 were not denatured. (b) Time course of the concentration of IFN γ (open circles) and IFN γ -MSA (open triangles) in the culture medium of COS-7 cells after transfection of pCMV-Mu γ and pCMV-Mu γ -MSA (2 μ g/mL). At the indicated time periods after transfection, the supernatants were collected and the concentration of IFN γ and IFN γ -MSA was measured by ELISA using anti-mouse IFN γ antibody. The results are expressed as the mean \pm SE of three independent determinations.

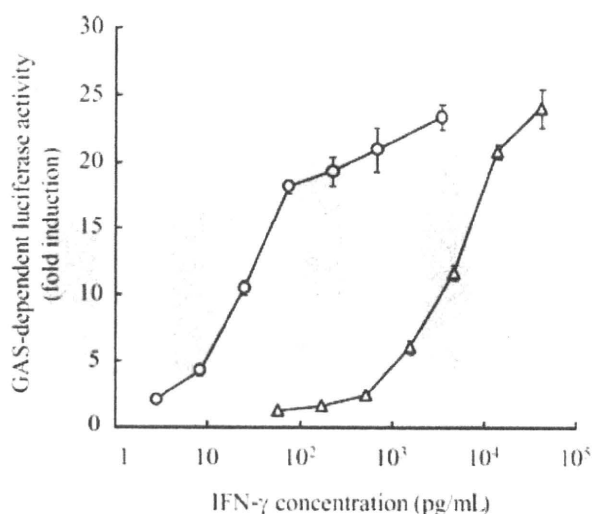


Figure 2. Biological activity of IFN γ and IFN γ -MSA. B16-BL6 cells transfected with pGAS-Luc and phRL-TK were incubated with serial dilutions of IFN γ (open circles) or IFN γ -MSA (open triangles) for a further 24 h. pGAS-Luc, plasmid DNA expressing firefly luciferase, was used to assess the degree of activation of GAS signaling pathway. phRL-TK, plasmid DNA expressing renilla luciferase, was used for normalizing the transfection efficiency and cell numbers. The ratio was normalized to give *x*-fold values relative to those of untreated group and half maximum effective concentration (EC50) of IFN γ and IFN γ -MSA was calculated. The results were expressed as the mean \pm SE of four independent determinations.

IFN γ -MSA, respectively, indicating that IFN γ -MSA has approximately 200-fold lower potency than unmodified IFN γ . The activity of IFN γ expressed in COS-7 cells was almost comparable to that of a commercially available recombinant IFN γ (data not shown).

Blood Clearance of IFN γ and IFN γ -MSA Proteins After Intravenous Injection

To confirm whether the increase in the molecular weight gives any changes in the blood clearance of IFN γ , IFN γ and IFN γ -MSA proteins expressed in and collected from different mice were injected into the tail vein of mice. Figure 3 shows the time course of the concentrations of IFN γ and IFN γ -MSA in the serum after injection of IFN γ and IFN γ -MSA at a dose of 8.5 μ g IFN γ /kg bodyweight (estimated by ELISA). The disappearance of IFN γ -MSA from the circulation was much slower than that of IFN γ . The profiles were evaluated by moment analysis to obtain AUC and MRT (Table 1). The AUC of IFN γ -MSA (508 ng·h/mL) was significantly greater than that of IFN γ (51.7 ng·h/mL). The MRT values of IFN γ and IFN γ -MSA were calculated to be 0.937 h and 4.04 h, indicating that albumin fusion resulted in about four-fold increase in the MRT.

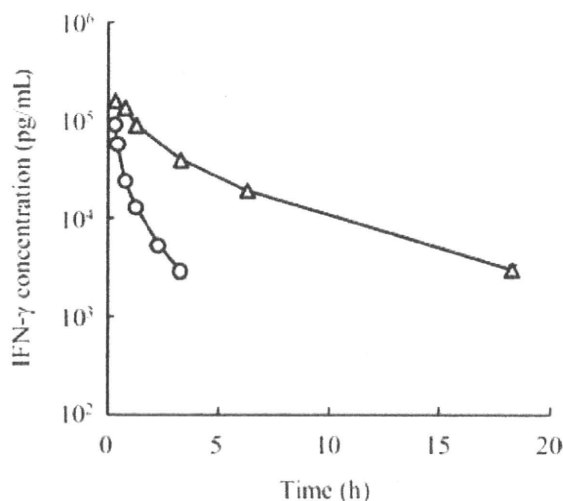


Figure 3. Clearance of IFN γ and IFN γ -MSA proteins from the serum after intravenous injection into mice. The concentrations of IFN γ (open circles) and IFN γ -MSA (open triangles) were measured by ELISA using anti-mouse IFN γ antibody and expressed as a percent of dose. The results were expressed as the mean \pm SE of four mice.

Table 1. AUC and MRT of Serum IFN γ and IFN γ -MSA after Intravenous Injection into Mice

Protein	IFN γ	IFN γ -MSA
AUC (ng·h/mL)	51.7 \pm 2.2	508 \pm 5*
MRT (h)	0.937 \pm 0.020	4.04 \pm 0.08*

*Statistically significant (*p* < 0.05) compared with IFN γ . The AUC and MRT were calculated by integration to infinite time, and the mean \pm SE values are expressed. AUC, concentration-time curve; MRT, mean residence time.

Time Course of Serum Concentration of IFN γ and IFN γ -MSA After *in Vivo* Gene Transfer

Figure 4 shows the time course of the concentrations of IFN γ and IFN γ -MSA in the serum after hydrodynamic injection of pCMV-Mu γ and pCMV-Mu γ -MSA at a dose of 0.04, 0.2 or 1 pmol/mouse. In mice receiving pCMV-Mu γ , the serum concentration of IFN γ decreased below the detection limit (15 pg/mL) by 3 to 4 days after gene transfer regardless of the dose of the plasmid DNA. In contrast, serum concentration of IFN γ -MSA was observed for at least 14 days after gene transfer. There were little differences in the *C*_{max} (peak plasma concentration) between the proteins, but the *T*_{max} (time of maximum serum concentration) values were different; the *T*_{max} after the injection of pCMV-Mu γ -MSA was 24 h, whereas that of pCMV-Mu γ was 6 or 12 h. Again, the profiles were subjected to moment analysis. Table 2 summarizes the AUC and MRT of IFN γ and IFN γ -MSA after hydrodynamic injection of pCMV-Mu γ and pCMV-Mu γ -MSA at varying doses. The AUC values of IFN γ and IFN γ -MSA increased with increasing dose. At any dose, a hydrodynamic injection of pCMV-Mu γ -MSA produced

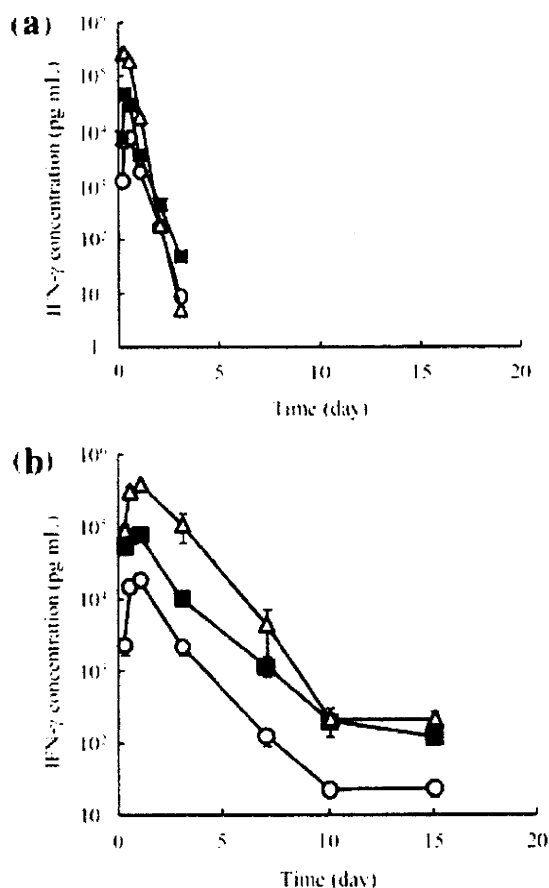


Figure 4. Time course of the concentration of IFN γ and IFN γ -MSA in the serum after hydrodynamic injection of pCMV-Mu γ or pCMV-Mu γ -MSA. Each plasmid DNA was dosed at 0.04 pmol (open circles), 0.2 pmol (solid squares) and 1.0 pmol (open triangles), respectively. The concentrations of (a) IFN γ and (b) IFN γ -MSA were measured by ELISA using anti-mouse IFN γ antibody. The results were expressed as the mean \pm SE of three mice.

about sixfold greater AUC than that of pCMV-Mu γ . The MRT of IFN γ -MSA was significantly longer than that of IFN γ .

Effects of IFN γ and IFN γ -MSA Gene Transfer on Pulmonary Metastasis of Tumor Cells

Figure 5 shows the number of metastatic colonies on the lung surface measured at 14 days after inoculation of CT-26 cells into the tail vein of mice. A hydrodynamic injection of pCMV-Mu γ or pCMV-Mu γ -MSA significantly reduced the number of colonies to 70 and 65% of that in the no treatment group, respectively. No significant reduction was observed in the mice injected with pCMV-Luc, a control plasmid, indicating that the reduction is due to the activity of IFN γ or IFN γ -MSA.

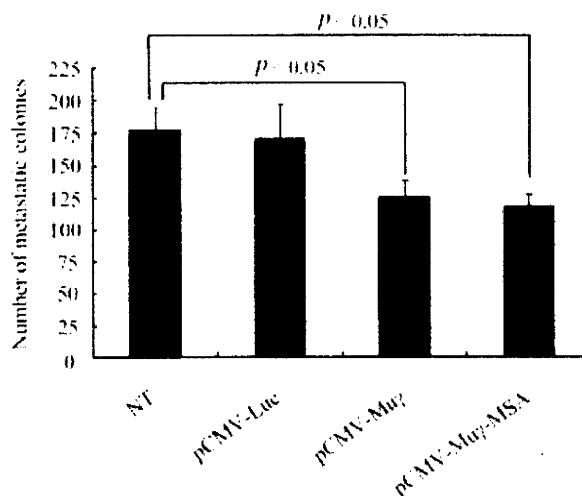


Figure 5. Effects of IFN γ and IFN γ -MSA gene transfer on pulmonary metastasis of CT-26 tumor cells in mice. Pulmonary metastasis was induced by inoculation of 1×10^5 CT-26 cells into a tail vein (day 0). On day 3, pCMV-Mu γ , pCMV-Mu γ -MSA or pCMV-Luc was injected into mice by the hydrodynamic injection at a dose of 0.7 pmol/mouse. At 14 days after tumor inoculation, mice were sacrificed and the number of metastatic colonies on the lung surface was counted. The results are expressed as the mean \pm SE of five mice.

DISCUSSION

Advances in biotechnology have markedly increased the number of biological pharmaceuticals in the market. IFN γ is one of such pharmaceuticals that is now used for CGD and malignant osteopetrosis.¹ Type I IFNs, such as IFN α and IFN β , have a variety of products used in the clinical practice,⁵ but few attempts such as chemical conjugation have been made to reduce the clearance of IFN γ from the body. This may be because of the fact that, unlike the type I IFNs, IFN γ is a homodimeric protein.^{23,24} In the case of human IFN α , pegylated derivatives⁹ or a fusion protein with serum albumin²⁵ has been developed as products with a long circulation half-life. However, these modifications were known to be a trade-off between the increased circulation and the biological activity. Thus, these two factors should be simultaneously studied to conclude whether any modification is effective in increasing the therapeutic potency of biological pharmaceuticals, including IFN γ .

A major route of elimination of IFN γ is glomerular filtration.^{26,27} Because this process is size-dependent and the molecular weight of IFN γ (about 30–36 kDa in dimeric form) is smaller than the threshold of the filtration, increasing the molecular size of IFN γ can be a rational approach to increasing its therapeutic potency. There are at least two approaches to achieve this. One is chemical conjugation, in which a variety of natural or synthetic polymers are covalently bound

Table 2. Pharmacokinetic Parameters of Serum IFN γ and IFN γ -MSA after Hydrodynamic Injection of pCMV-Mu γ and pCMV-Mu γ -MSA into Mice

	pCMV-Mu γ			pCMV-Mu γ -MSA		
	0.04 (pmol)	0.2 (pmol)	1.0 (pmol)	0.04 (pmol)	0.2 (pmol)	1.0 (pmol)
C_{max} (ng/mL)	7.63 \pm 0.08	46.6 \pm 3.2	269 \pm 11	18.9 \pm 0.9*	80.9 \pm 4.2	361 \pm 23
T_{max} (day)	0.5	0.25	0.25	1	1	1
AUC (ng·day/mL)	5.82 \pm 0.08	24.3 \pm 1.3	168 \pm 6	37.2 \pm 2.2*	180 \pm 3*	1,010 \pm 120*
MRT (day)	0.606 \pm 0.006	0.492 \pm 0.006	0.393 \pm 0.001	1.43 \pm 0.03*	1.45 \pm 0.03*	1.64 \pm 0.11*

*Statistically significant ($p < 0.05$) compared with pCMV-Mu γ .

The C_{max} and T_{max} values were obtained from actual data recorded after hydrodynamic injection of pCMV-Mu γ and pCMV-Mu γ -MSA at a dose of 0.04, 0.2, 1.0 pmol/mouse, respectively. The AUC and MRT were calculated by integration to infinite time, and the mean \pm SE values are expressed.

AUC, concentration-time curve; MRT, mean residence time.

to specific amino groups of proteins. The other is to design fusion proteins, in which peptides or proteins are genetically fused to the N- or C-terminus of proteins. The latter is better as far as the homogeneity of protein derivatives is concerned. In the present study, we selected MSA as a modifier of mouse IFN γ because of the following reasons. First, serum albumin is the most abundant serum protein in mice, humans, and other animals. Second, its structural, biochemical, and physiological properties have been extensively studied.¹³ Third, it is hardly filtered through the glomerulus and has a long circulation half-life. Last but not least, it has been used to obtain fusion proteins, including IFN α and insulin,²⁸ with no significant adverse reactions. Then, the site for conjugation, the N- or C-terminal of IFN γ , could be another parameter that affects the outcomes. We selected the C-terminal for the site according to the preliminary results obtained using MSA fusion protein conjugated to the N- or C-terminus of IFN γ (unpublished results). The reduced biological activity by fusion of MSA to IFN γ may indicate that the large size of MSA interferes with the dimerization and/or the interaction of IFN γ to its receptors. Thus, smaller proteins could be better modifiers than MSA if other properties, including but not limited to the biological, pharmacokinetic and immunological ones, are appropriate.

Western blot analysis clearly revealed that the IFN γ -MSA fusion protein does not form homodimers. Dimerization of IFN γ occurs through noncovalent interactions with two monomers being in an antiparallel orientation.^{23,24} A possible explanation for the loss of dimerization is that the fusion of MSA increases the steric hindrance for dimerization. In the present study, the biological activity of IFN γ and IFN γ -MSA was measured using an in-house GAS-dependent luciferase assay. Previous studies revealed that the activity of albuferon (recombinant human IFN α -2b-human serum albumin fusion protein) is approximately 1/10 of that of IFN α -2b²⁸ because the steric hindrance induced by fusion to albumin disrupts the interaction with its receptor. The experimental result from GAS reporter assay showed that

the IFN γ -MSA has about 1/200 activity of IFN γ . The difficulty in the dimerization of IFN γ -MSA would at least partly explain the low biological activity of the fusion protein because it has been suggested that monovalent IFN γ is much less active than divalent counterpart.^{29,30}

An intravenous injection of IFN γ or IFN γ -MSA clearly showed that the fusion of MSA is effective in increasing the circulation time of IFN γ , which resulted in about fourfold increase in the half-life of the elimination phase and the MRT. Because of the low dose, the tissue distribution of these proteins was difficult to be measured in the present study, so the difference in the tissue distribution needs further investigations. In accordance with the altered distribution properties of IFN γ -MSA, its serum concentration after hydrodynamic injection of pCMV-Mu γ -MSA was more prolonged than that after injection of pCMV-Mu γ . These results clearly show that the gene delivery of IFN γ -MSA is an effective approach to improving the pharmacokinetic properties of IFN γ .

In a previous study, we reported that IFN γ gene transfer is effective in inhibiting the pulmonary metastasis of mouse colon carcinoma CT-26 cells.¹¹ Similar results were obtained in the present study when the pCMV-Mu γ was injected to a mouse model of pulmonary metastasis of CT-26 cells (Fig. 5). Although the activity of IFN γ -MSA was about 1/200 of that of IFN γ , gene delivery of IFN γ -MSA resulted in the inhibition of the metastasis to a level similar to that obtained with that of IFN γ . These results strongly suggest that prolonged circulation half-life of IFN γ is quite effective in increasing its therapeutic potency.

In conclusion, these results indicate that gene delivery of IFN γ genetically fused with albumin could modulate the disposition of IFN γ , which was effective in inhibiting tumor metastasis despite extensive reduction of its biological activity. To further increase the potency of IFN-based therapy, the reduction of biological activity of modified IFN γ needs to be minimized.