

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

（分担）研究報告書（平成23～25年度）

創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた

肝炎ウイルス制御に関する研究

HCV感染モデルマウスに対するインターフェロン- γ 遺伝子治療効果の検討と 肝臓特異的インターフェロン- γ 治療法の開発

分担研究者 高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 インターフェロン- α (IFN- α)抵抗性HCVを感染させたヒト肝細胞キメラマウスに対して、持続的にIFN- γ を発現するIFN- γ 発現plasmid DNA (pDNA)あるいは一過性にIFN- γ を発現するIFN- γ 発現pDNAをハイドロダイナミクス法を用いて遺伝子導入した。持続性のIFN- γ 発現pDNAの遺伝子導入により血清中HCV RNA量は検出限界以下となりその効果は持続した。一方で、一過性発現の場合には4匹中1匹においてのみ血清中HCV RNA量が減少したが、血中HCVのリバウンドが観察された。持続的なIFN- γ 発現による肝障害の可能性について検討したところ、投与後初期に一過性に血清ALTの上昇が認められたが観察終了時にはもとのレベルに回復していた。またマウスの肝臓切片を観察したところ肝細胞への傷害はほとんど認められなかった。以上の結果はIFN- γ 遺伝子の持続的供給によって安全かつ有効なHCV治療が可能となることを示すものと考えられる。

併せて、IFN- γ の肝臓特異的な作用発現を目的として、マウスIFN- γ とヘパリン硫酸結合ドメイン (heparin binding domain; HBD)との融合タンパク質を設計し、これを発現するpDNAを構築し、その動態制御能について評価した。また、IFN- γ に肝臓指向性を持つことが知られているアポリポrotein A-I (ApoA-I)と融合することで効率的なIFN- γ の肝臓デリバリーに関する検討も行った。

A . 研究目的

これまでに例数は少ないものの、長期のIFN- γ 遺伝子発現を可能とするpDNA、pCpG-IFN- γ を投与し、持続的にIFN- γ を作用させることでHCV感染キメラマウスにおいて高い抗HCV効果が得られる可能性が

あることを報告していた。そこで、本研究では検体数を増やすことで持続的なIFN- γ 遺伝子発現のC型肝炎に対するin vivoにおける治療有効性を検証した。併せて、IFN- γ 遺伝子発現の持続性がC型肝炎に対する治療効果に及ぼす影響について評価するため

に一過性のIFN- γ 発現を示すIFN- γ 発現pDNA (pCMV-IFN- γ) をHCV感染キメラマウスに遺伝子導入した。また、持続的なIFN- γ 遺伝子発現による肝臓への傷害が懸念されたことから、pCpG-IFN- γ を投与された個体において肝傷害性について評価した。

また、肝臓特異的なIFN- γ の作用発現による治療有効性の向上を目的に、以下の2つのアプローチについて検討した。肝臓を遺伝子導入部位とし、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を目指し、細胞外マトリクスであるヘパラン硫酸糖に結合親和性を持つことが知られている

extracellular superoxide dismutase由来C末端ヘパラン硫酸結合ドメイン (HBD)をIFN- γ のC末端に融合することで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。また、肝硬変などの併発により肝臓への遺伝子導入が困難な場合を想定して、肝臓以外の部位に肝臓指向性IFN- γ を遺伝子導入することによる、遺伝子治療法の開発に着手した。IFN- γ を肝臓指向性が高い高比重リポタンパク質(HDL)の主要な構成タンパク質であるApoA-Iとの融合タンパク質とし、肝臓指向性IFN- γ をデザインした。

B . 研究方法

1. 持続型IFN- γ 発現pDNAを用いた抗HCV効果の検討

pDNA : 持続的な遺伝子発現が可能であるpDNA骨格(pCpG-mcs: InvivoGen)にヒトIFN- γ cDNAを挿入したpCpG-huIFN- γ を用いた。pCpG-IFN- γ およびpCMV-IFN- γ を用いた。別途GFPを発現するpDNA

(pEGFP-N1)を用いた。ヒト肝細胞キメラマウス: uPA-SCIDマウスにヒト肝細胞を移植することで作製した高置換キメラマウスを用いた。血中ヒト血清アルブミン濃度を測定することでヒト肝細胞置換率を確認した。HCV感染モデル: 高置換キメラマウスにI型IFN抵抗性を示すHCV genotype 1bを感染させることで治療抵抗性C型肝炎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と遺伝子発現の評価: naked pDNAをマウス体重の約10%に相当する容量の生理食塩水に溶解し、マウス尾静脈内に急速投与した。血中IFN- γ 濃度はELISA法により測定した。pEGFP-N1を投与した個体については肝臓の凍結切片を作製した。抗HCV効果の評価: 経時的に採血し、real-time PCR法にて血中HCV RNA量を測定した。また、遺伝子導入から8週間後に肝臓を回収し、nested PCR法を用いて肝臓中HCV RNAの検出を行った。肝傷害性の評価: 採血を行った後、和光純薬?社のキットを用いてALT活性を測定した。別途、肝臓の切片を作製後にHE染色、あるいは抗ヒトアルブミン抗体を用いた免疫組織染色を行った。

2. 細胞表面付着型IFN- γ 発現pDNAの構築

pDNA : HBDをIFN- γ のC末端に融合した。このとき、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、融合タンパク質発現pDNA (pCpG-muIFN- γ -(HBD)_n : n = 1~3)を構築した。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 発現量をELISA法により測定した。IFN- γ 生物活性の

評価：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細胞を用いて生物活性を評価した。細胞表面滞留性の評価：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各pDNAを遺伝子導入した。IFN- γ 血中濃度をELISA法により測定した。HBD融合IFN- γ 発現pDNAを遺伝子導入したマウスに対して、HBDとヘパリン硫酸の相互作用を阻害可能す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。抗腫瘍効果と有害作用の評価：M5076細胞を用いて肝転移モデルマウスを作製し、各IFN- γ 発現pDNAを投与し、肝臓中結節数を評価することで抗腫瘍効果を判定した。別途、体重を指標に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。

3. 肝臓指向性IFN- γ 発現pDNAの構築

pDNA：ApoA-IをマウスIFN- γ のC末端に融合することでApoA-I融合IFN- γ 発現pDNA

(pCpG-IFN- γ -ApoA-I) を構築した。ApoA-I融合IFN- γ のIFN- γ 活性評価：IFN- γ 依存的にホタルルシフェラーゼを発現する

pGAS-Lucを遺伝子導入したマウスメラノーマ細胞株B16-BL6細胞を用いてIFN- γ 活性を評価した。肝臓中IFN- γ 活性の評価：マウス下肢筋肉へ遺伝子導入した後、1日後に肝臓を回収し、IFN- γ の標的遺伝子であるSuppresser of Cytokine Signaling 1 (SOCS1)の

mRNA量を測定することでIFN- γ 活性を評価した。

C . 研究結果

HCV感染モデルマウスに対するIFN- γ 遺伝子治療効果治療効果の検討

まず、GFP発現pDNAを用いてヒト肝細胞およびマウス肝細胞の遺伝子発現に対する寄与について評価を行った。その結果、キメラマウスの肝臓中のヒト由来肝細胞およびマウス由来肝細胞の両者において遺伝子発現が得られたが、ヒト由来肝細胞においてより多数のGFP発現細胞が観察され、その発現も強かった。

HCV感染キメラマウスに対して短期発pCMV-IFN- γ 発現pDNAを投与した。遺伝子導入を行った4匹の個体の内、治療開始前の血中HCVレベルが最も低かった個体において、血中HCV RNA量の減少が認められたが、投与30日以降に再び血中HCV RNAが検出された。また、治療開始70日後に回収した肝臓中からもHCV RNAが検出された。他の3個体においては投与後早期から一過性に血中IFN- γ 濃度が得られたものの、血中HCVレベルの低下はほとんど認められなかった

pCpG-IFN- γ をHCV感染キメラマウスに投与した。その結果、遺伝子導入3日後よりウイルス価の減少が認められ、14日後以降は検出限界以下、もしくは、著しくウイルス価が減少することが明らかとなった。また、投与から8週間が経過後に肝臓を回収し、HCV RNA量を定量したところ検出されなかったことから、肝臓からのHCVの除去が示唆された。

pCpG-IFN- γ を遺伝子導入したマウスに

ついて、経時的に血中のALT量を測定することで肝障害を評価した。その結果、遺伝子投与3日後から7日後にかけて、血中ALTレベルが上昇したが、4週間後にはもとのレベルに回復していた。血中ALTレベルが上昇していた遺伝子導入3日後および経過観察を終了した導入8週間後に肝臓を回収後にHE染色切片を作製し傷害性の有無を判定したが、明確な傷害は認められなかった。

細胞表面接着型インターフェロン- γ の治療効果の検討

新規デザインしたHBD融合IFN- γ の生物活性と細胞表面付着能を培養細胞の系で評価した。その結果、HBD融合IFN- γ の細胞表面への付着能はHBD数の増加に伴い増加することを確認した。また、HBD融合IFN- γ が天然型IFN- γ と同程度のIFN- γ 生物活性を保持していることも確認した。次に、ハイドロダイナミクス法を用いてマウスに遺伝子導入したところ、培養細胞での結果と同様に、HBD数に依存した細胞表面への付着が増加する傾向が認められた。HBD融合IFN- γ 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。肝転移腫瘍モデルマウスにおいて抗腫瘍効果と有害作用の評価を行ったところ、天然型IFN- γ 発現pDNA投与群では抗腫瘍効果が得られたが同時に体重も減少した。一方、HBD融合IFN- γ 発現pDNAを投与した群では、体重減少することなく天然型IFN- γ と同等の抗腫瘍効果が得られた。

ApoA-I融合インターフェロン- γ の肝臓指向性の検討

ApoA-I融合IFN- γ の生物活性を評価した結果、天然型IFN- γ と比較して約31%の生物活性を保持していることが明らかとなった。マウス下肢筋肉にApoA-I融合IFN- γ 発現pDNAを遺伝子導入した後、ApoA-I融合IFN- γ の血清中濃度と肝臓中のSOCS1発現を測定することでApoA-I融合IFN- γ の肝臓指向性を評価した。その結果、ApoA-I融合IFN- γ -遺伝子を導入したマウスにおいて血清中IFN- γ 濃度は天然型IFN- γ 遺伝子を導入したマウスより低い、肝臓中でのSOCS1mRNA発現の誘導は同等かそれ以上であることが認められた。

D. 考察

本研究では、I型IFN抵抗性HCV感染キメラマウスを用いてIFN- γ 発現pDNAの治療有効性を検証した。

その結果、持続的にIFN- γ を発現することで著しくウイルス価が減少する、あるいは、検出限界以下に至ることが明らかとなった。また、一度ウイルス価が検出限界まで低下したマウスにおいて、観察終了までの8週に渡り再燃が認められなかった。一方で、短期IFN- γ 発現pDNAの投与による抗HCV効果は非常に弱く、有意な抗HCV効果が得られた固体においてもHCVの再発も観察された。これらの結果は、I型IFN抵抗性HCVに対する持続的なIFN- γ 遺伝子治療の有用性を示すものと考えられる。

GFPを用いた遺伝子導入効率の検討において、ヒト由来肝細胞およびマウス由来肝細胞の両者において遺伝子発現が得られた

が、これは本法を用いることでヒト由来肝細胞へも遺伝子導入が可能であることを示す結果である。また、特にヒト由来肝細胞において良好な遺伝子発現が得られたことから、本遺伝子導入法の有用性が示された。また、IFN- γ を持続的に肝臓で発現させることによる、肝臓への傷害性が懸念され、血中のALTレベルの一過性の上昇が認められたが、時間経過とともに回復したことから、その程度は小さいものと考えられる。また、組織観察の結果からは明確な肝障害を示す像は得られなかったことから、IFN- γ 遺伝子治療の安全性は高いと考えられる。

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保持しつつその体内動態を制御できることが明らかとなった。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。

ApoA-I融合IFN- γ は天然型IFN- γ と比較して、その生物活性は若干低下するものの、その血中濃度で比較すると天然型IFN- γ より効率的に肝臓で生物活性を得られる可能性が示された。この結果はIFN- γ とApoA-Iを融合することで効率的なIFN- γ の肝臓デリバリーが達成可能になることを示すものとする。

E . 結論

IFN- γ を作用させることで高い抗HCV効果が得られるが、特に持続的なIFN- γ の作用が望ましいこと、また持続的なIFN- γ の作用によっても標的組織である肝臓への傷害性は小さいことが明らかとなった。以上の結果はI型IFN抵抗性HCVに対するIFN- γ 遺伝子治療の有用性を示すものと考えられる。また、HBD融合IFN- γ およびApoA-I融合IFN- γ の利用により肝臓特異的なIFN- γ 作用が誘導され、これらが肝炎治療のための有用なアプローチになる可能性が示された。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. Long-Term Elimination of Hepatitis C Virus from Human Hepatocyte Chimeric Mice After Interferon- γ Gene Transfer. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2013. in press.
2. Uno S, Nishikawa M, Mohri K, Umeki Y, Matsuzaki N, Takahashi Y, Fujita H, Kadowaki N, Takakura Y. Efficient delivery of immunostimulatory DNA to mouse and human immune cells through the construction of polypod-like structured DNA. *Nanomedicine*. 2013. in press.
3. 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.*, 2013. 10(10):3812-3821
4. Miyakawa N, Nishikawa M, Takahashi Y, Ando M, Misaka M, Watanabe Y, Takakura Y. Gene delivery of albumin binding peptide-interferon γ fusion protein with improved pharmacokinetic properties and sustained biological activity. *J Pharm Sci.*, 2013. 102(9):3110-3118
5. Watcharanurak K, Nishikawa M, Takahashi Y, Takakura Y. "Controlling the kinetics of interferon transgene expression for improved gene therapy." *J Drug Target.*, 2012. 20(9): 764-769
6. Watcharanurak K, Nishikawa M, Takahashi Y, Kabashima K, Takahashi R, Takakura Y. Regulation of immunological balance by sustained interferon- γ gene transfer for acute phase of atopic dermatitis in mice. *Gene Ther.*, 2013. 20(5):538-544
7. Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Watanabe Y, Takakura Y. Constant and steady transgene expression of interferon- γ by optimization of plasmid construct for safe and effective interferon- γ gene therapy. *J Gene Med.*, 2012. 14(4):288-295
8. Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Development of safe and effective nonviral gene therapy by eliminating CpG motifs

from plasmid DNA vector. *Front Biosci (Schol Ed)*., 2012. 4:133-141

9. 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(10):2380-2389

2. 学会発表

1. 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." 14th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy May, 2011, Seattle, WA, USA
2. 三坂真之、宮川典子、西川元也、高橋有己、安藤 満、渡部好彦、高倉喜信. "血中滞留化と活性保持を両立するインターフェロン誘導体の開発" 日本薬剤学会第26年会、東京、2011年 5月
3. Kanitta Watcharanurak, Makiya Nishikawa, Yuki Takahashi, Kenji Kabashima, Rei Takahashi and Yoshinobu Takakura. "Regulation of immunological balance by sustained interferon- γ gene transfer for atopic dermatitis in mice." 第27回日本DDS学会学術集会、東京、2011年 6月
4. 高倉喜信、安藤 満、高橋有己、西川元也 "各種肝疾患治療を目指したインターフェロン体内動態の時空制御の試み" 第7回広島肝炎プロジェクト研究センターシンポジウム、広島、2011年7月
5. Yoshinobu Takakura. "Optimization of interferon- γ cancer gene therapy by regulating transgene expression profile or controlling the tissue distribution of transgene product" 38th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society(National Harbor, Maryland USA), July 30 - August 3 (2011)
6. 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回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、大阪、

2011年9月

7. Yuki Takahashi, Yuriko Matsui, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura. “Kinetic comparison of gene silencing profile of siRNA and shRNA-expressing plasmid DNA in vivo.” 7th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (September 8-10, Copenhagen, Denmark)
8. Yuki Takahashi, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura. “Depletion of tumor-associated macrophages can enhance the anticancer effect of interferon- γ gene therapy”第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月
9. 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、神戸、2011年10月
10. 高倉喜信. “ウイルス性肝炎および肝がん治療を目的としたインターフェロン遺伝子デリバリー” 日本薬学会第132年会、札幌、2012年3月
11. 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、札幌、2012年3月
12. Takahashi Y, Ando M, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. “Long-term elimination of human hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice after single administration of plasmid DNA expressing human interferon- γ ” 15th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (May 16-19, Philadelphia, PA, USA)
13. 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、神戸、2012年5月
14. 安藤 満、高橋有己、山下拓真、西川元也、高倉喜信 “肝炎・肝がん治療を目的としたインターフェロン遺伝子治療の最適化” 第8回広島肝炎プロジェクト研究センターシンポジウム、広島、2012年7月
15. 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 γ の開発と遺伝子デリバリーによる疾患治療” 第34回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、京都、2012年11月
16. Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. “Complete elimination of hepatitis C virus by sustained nonviral gene delivery of human interferon- γ in human hepatocyte chimeric mice” Globalization of Pharmaceuticals Education Network Meeting 2012 Nov, 2012, Melbourne, Australia
17. Watcharanurak K, Zang L, Nishikawa M, Yoshinaga K, Takahashi Y, Yamamoto Y, Saito K, Murakami Y, Takakura Y. “Upregulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 by interferon γ gene transfer and its effects on tumor growth in mice” 第29回 日本DDS学会、京都、2013年7月
18. 安藤満、高橋有己、西川元也、平賀信彦、今村道雄、茶山一彰、高倉喜信 “ヒト肝細胞キメラマウスを用いたインターフェロン γ 遺伝子導入による治療抵抗性慢性C型肝炎治療” 第29回 日本DDS学会、京都、2013年7月
19. Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Takakura Y. “Long-term exposure of interferon γ overcame interferon α -resistance of hepatitis C in human hepatocyte chimeric mice” 5th Asian Arden Conference, Nagoya, Japan, August, 2013

H . 知的所有権の取得状況

特になし