

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	宮川 典子
論文題目	有効なインターフェロン遺伝子治療のための体内動態改善型インターフェロン融合タンパク質の設計と遺伝子デリバリーに関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>医薬品として用いられるタンパク質には、消失半減期が短いなどの体内動態特性に問題を有するものが多いため、血中滞留性を増大させたポリエチレングリコール修飾製剤や徐放性製剤が開発されている。目的タンパク質を遺伝子の形で投与する <i>in vivo</i> 遺伝子治療は、タンパク質を持続的に供給可能であることから、タンパク質を利用した疾患治療の新しい戦略として期待される。当研究室ではこれまでに、抗ウイルス作用や抗腫瘍作用などを有する多機能性サイトカインであるインターフェロン <math>\gamma</math> (IFN<math>\gamma</math>) を対象とした検討において、マウス IFN<math>\gamma</math> をコードしたプラスミド DNA からの遺伝子発現を持続化することで、治療効果が改善可能であることを報告してきた。遺伝子デリバリーにおいては融合タンパク質の利用も容易であり、IFN<math>\gamma</math> の体内動態制御を目的として設計した融合タンパク質を用いることで治療効果の更なる増強が期待できる。そこで本研究では、遺伝子導入後の IFN<math>\gamma</math> の体内動態制御による治療効果の改善を目的に、血中滞留型 IFN<math>\gamma</math> 融合タンパク質を設計し、その遺伝子導入による IFN<math>\gamma</math> 動態制御ならびに治療効果について検討した。</p>			
第 I 章 インターフェロン-アルブミン融合タンパク質の遺伝子導入による血中滞留化および抗腫瘍効果の増強			
<p>分子量増大による IFN<math>\gamma</math> の血中滞留化の実現を目的に、血中滞留性に優れ、強い生理活性を示さないマウス血清アルブミン (MSA) をキャリアとして選択し、IFN<math>\gamma</math>-MSA 融合タンパク質を発現するプラスミド DNA を構築した。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ところ、IFN<math>\gamma</math>-MSA 融合タンパク質発現プラスミド DNA を投与した場合には、天然型 IFN<math>\gamma</math> 発現プラスミド DNA と比較して血中濃度の持続化が認められた。その反面、IFN<math>\gamma</math>-MSA 融合タンパク質の生物活性は天然型の約 200 分の 1 にまで低下したことから、同じモル数のプラスミド DNA を投与した場合には、IFN<math>\gamma</math> 活性-時間曲線下面積は MSA 融合化により約 10 分の 1 程度にまで低下することが示された。しかしながら、肺転移モデルマウスを用いて評価した抗腫瘍効果は、IFN<math>\gamma</math>-MSA と天然型 IFN<math>\gamma</math> でほぼ同程度であった。以上の結果から、IFN<math>\gamma</math> の MSA との融合化は、IFN<math>\gamma</math> 活性を大幅に減弱するものの、血中滞留化を介して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。</p>			
第 II 章 血中滞留化と活性保持を両立するペプチド結合インターフェロン誘導体の開発			

IFN $\gamma$  はホモ二量体を形成し、IFN $\gamma$  受容体に結合することで活性を示すとされる。前章で開発した IFN $\gamma$ -MSA 融合タンパク質は、分子量の増大による血中滞留化は実現されたものの、二量体の形成効率が著しく低下しており、これが活性低下の原因と推察された。そこで、MSA 融合による立体障害の回避を目的に、2 分子の IFN $\gamma$  をリンカーで連結した single-chain IFN $\gamma$  (scIFN $\gamma$ )を設計し、その C 末端に 1 分子の MSA を融合した新規融合タンパク質 scIFN $\gamma$ -MSA を構築した。培養細胞で評価した scIFN $\gamma$ -MSA の IFN $\gamma$  活性は、IFN $\gamma$ -MSA よりも高いものの、依然として IFN $\gamma$  の 100 分の 1 程度であった。従って、MSA を利用した IFN $\gamma$  の血中滞留化においては、MSA 融合化による立体障害により活性低下を回避できないものと考えられた。

そこで新たなアプローチとして、血清アルブミンに高い親和性を有するアルブミン親和性ペプチド (ABP)に着目し、20 アミノ酸残基の ABP を IFN $\gamma$  に融合した IFN $\gamma$ -ABP 融合タンパク質(IFN $\gamma$ -ABP)を設計した。IFN $\gamma$ -ABP の IFN $\gamma$  活性は、IFN $\gamma$  の約 80%程度と高く保持されていた。そこで、IFN $\gamma$ -ABP 発現プラスミド DNA を用いてマウスに遺伝子導入したところ、MSA 融合タンパク質ほどではないものの IFN $\gamma$  と比較して血中滞留性が改善した。以上の結果から、MSA の約 3.5%の分子量の ABP を利用することで、立体障害を回避しつつ、生体内のアルブミンと結合することによると推察される血中滞留化が可能であることを実証した。

以上、申請者は、血清アルブミンをキャリアとして利用することによる IFN $\gamma$  の血中滞留性の改善に取り組み、MSA または ABP を融合することで血中滞留化が可能であることを明らかにした。また、IFN $\gamma$  活性を保持するには、分子量の小さい ABP が適していることも見出した。本研究で得られた知見は、有効な IFN $\gamma$  遺伝子治療の実現に向けて、有益な情報を提供するものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

医薬品として用いられるタンパク質には、消失半減期が短いなどの体内動態特性に問題を有するものが多いため、血中滞留性を増大させたポリエチレングリコール修飾製剤や徐放性製剤が開発されている。目的タンパク質を遺伝子の形で投与する *in vivo* 遺伝子治療は、タンパク質を持続的に供給可能であることから、タンパク質を利用した疾患治療の新しい戦略として期待される。当研究室ではこれまでに、抗ウイルス作用や抗腫瘍作用などを有する多機能性サイトカインであるインターフェロン  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) を対象とした検討において、マウス IFN $\gamma$  をコードしたプラスミド DNA からの遺伝子発現を持続化することで、治療効果が改善可能であることを報告してきた。遺伝子デリバリーにおいては融合タンパク質の利用も容易であり、IFN $\gamma$  の体内動態制御を目的として設計した融合タンパク質を用いることで治療効果の更なる増強が期待できる。そこで本研究では、遺伝子導入後の IFN $\gamma$  の体内動態制御による治療効果の改善を目的に、血中滞留型 IFN $\gamma$  融合タンパク質を設計し、その遺伝子導入による IFN $\gamma$  動態制御ならびに治療効果について検討した。

## 第 I 章 インターフェロン $\gamma$ -アルブミン融合タンパク質の遺伝子導入による血中滞留化および抗腫瘍効果の増強

分子量増大による IFN $\gamma$  の血中滞留化の実現を目的に、血中滞留性に優れ、強い生理活性を示さないマウス血清アルブミン (MSA) をキャリアとして選択し、IFN $\gamma$ -MSA 融合タンパク質を発現するプラスミド DNA を構築した。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ところ、IFN $\gamma$ -MSA 融合タンパク質発現プラスミド DNA を投与した場合には、天然型 IFN $\gamma$  発現プラスミド DNA と比較して血中濃度の持続化が認められた。その反面、IFN $\gamma$ -MSA 融合タンパク質の生物活性は天然型の約 200 分の 1 にまで低下したことから、同じモル数のプラスミド DNA を投与した場合には、IFN $\gamma$  活性-時間曲線下面積は MSA 融合化により約 10 分の 1 程度にまで低下することが示された。しかしながら、肺転移モデルマウスを用いて評価した抗腫瘍効果は、IFN $\gamma$ -MSA と天然型 IFN $\gamma$  でほぼ同程度であった。以上の結果から、IFN $\gamma$  の MSA との融合化は、IFN $\gamma$  活性を大幅に減弱するものの、血中滞留化を介して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。

## 第 II 章 血中滞留化と活性保持を両立するペプチド結合インターフェロン誘導体の開発

IFN $\gamma$  はホモ二量体を形成し、IFN $\gamma$  受容体に結合することで活性を示すとされる。前章で開発した IFN $\gamma$ -MSA 融合タンパク質は、分子量の増大による血中滞留化は実現されたものの、二量体の形成効率が著しく低下しており、これが活性低下の原因と推察された。そこで、MSA 融合による立体障害の回避を目的に、2 分子の

IFN $\gamma$  をリンカーで連結した single-chain IFN $\gamma$  (scIFN $\gamma$ )を設計し、その C 末端に 1 分子の MSA を融合した新規融合タンパク質 scIFN $\gamma$ -MSA を構築した。培養細胞で評価した scIFN $\gamma$ -MSA の IFN $\gamma$  活性は、IFN $\gamma$ -MSA よりも高いものの、依然として IFN $\gamma$  の 100 分の 1 程度であった。従って、MSA を利用した IFN $\gamma$  の血中滞留化においては、MSA 融合化による立体障害により活性低下を回避できないものと考えられた。

そこで新たなアプローチとして、血清アルブミンに高い親和性を有するアルブミン親和性ペプチド (ABP)に着目し、20 アミノ酸残基の ABP を IFN $\gamma$  に融合した IFN $\gamma$ -ABP 融合タンパク質(IFN $\gamma$ -ABP)を設計した。IFN $\gamma$ -ABP の IFN $\gamma$  活性は、IFN $\gamma$  の約 80%程度と高く保持されていた。そこで、IFN $\gamma$ -ABP 発現プラスミド DNA を用いてマウスに遺伝子導入したところ、MSA 融合タンパク質ほどではないものの IFN $\gamma$  と比較して血中滞留性が改善した。以上の結果から、MSA の約 3.5%の分子量の ABP を利用することで、立体障害を回避しつつ、生体内のアルブミンと結合することによると推察される血中滞留化が可能であることを実証した。

以上、申請者は、血清アルブミンをキャリアとして利用することによる IFN $\gamma$  の血中滞留性の改善に取り組み、MSA または ABP を融合することで血中滞留化が可能であることを明らかにした。また、IFN $\gamma$  活性を保持するには、分子量の小さい ABP が適していることも見出した。本研究で得られた知見は、有効な IFN $\gamma$  遺伝子治療の実現に向けて、有益な情報を提供するものとする。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものとする。

さらに、平成 23 年 2 月 21 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降