

( 続紙 1 )

| 京都大学   | 博士 (薬学)   | 氏名 | 臧 蕾 |
|--|---|----|-----|
| 論文題目   | Optimization of interferon $\gamma$ gene delivery/expression system towards realization of interferon $\gamma$ gene therapy<br>(インターフェロン $\gamma$ 遺伝子治療実現に向けた遺伝子デリバリー・発現システムの最適化) |    |     |
| (論文内容の要旨)  |   |    |     |
| <p>インターフェロン (IFN) <math>\gamma</math>は、抗ウイルス作用や細胞増殖抑制作用、免疫調節作用などの生理活性を有することから、C 型肝炎や種々の癌、さらにはアレルギー疾患治療への適用が期待されている。IFN-<math>\gamma</math>の血中半減期は短いことから、これら慢性疾患への適用には IFN-<math>\gamma</math>を長期にわたって供給可能な投与方法・デバイスの開発が必須である。申請者の所属する研究室ではこれまでに、IFN-<math>\gamma</math>遺伝子導入により結腸癌細胞の肺や肝臓への転移抑制に有効であることを明らかにしている。しかしながら、遺伝子導入後の血中 IFN-<math>\gamma</math>濃度は比較的速やかに低下したことから、遺伝子発現の持続化による有効性の改善が期待される。そこで本研究では、IFN-<math>\gamma</math>遺伝子治療実現を目的に、IFN-<math>\gamma</math>遺伝子デリバリー・発現システムの最適化を試みた。</p> |   |    |     |
| <b>第 1 章 長期遺伝子発現を可能にするプラスミドベクターの開発</b>   |   |    |     |
| <p>プラスミド DNA (pDNA) からの遺伝子発現が一過性である原因の一つとして、pDNA 配列中の非メチル化 CpG 配列 (CpG モチーフ) の存在が指摘されている。そこで、CpG モチーフ数の異なる pDNA を構築し、非常に効率的な遺伝子導入法であるヒドロダイナミクス法を用いてマウスに投与したときの遺伝子発現プロファイルを評価した。その結果、CpG モチーフ数と遺伝子発現期間には逆相関が認められ、最も CpG モチーフ数が少ない pCpG-Mu<math>\gamma</math>の投与により、長期にわたり持続的な遺伝子発現が得られた。肺転移モデルマウスへの投与の結果、この持続的な IFN-<math>\gamma</math>発現が結腸癌細胞の肺転移抑制に有効であることも明らかとなった。</p>  |   |    |     |
| <p>そこで、CpG モチーフ削減による持続的遺伝子発現のメカニズムについて解明を試みた。CpG モチーフを多く含む pCMV-Luc について、ヒドロダイナミクス法で投与後のマウス肝臓中での CpG モチーフ中シトシンのメチル化を評価した結果、プロモータ領域においてのみ投与 14 日目以降で一部がメチル化されることが示された。投与後数日中には遺伝子発現が低下することを考慮すると、この CpG モチーフのメチル化は遺伝子発現低下よりも遅く起きること、従って CpG モチーフを多く含む pDNA からの遺伝子発現の低下の原因ではないものと推察された。以上より、CpG モチーフの削減は、CpG モチーフのメチル化抑制以外のメカニズムにより遺伝子発現の持続化に繋がることが明らかとなった。</p>  |   |    |     |
| <b>第 2 章 IFN-<math>\gamma</math>による外来性遺伝子発現抑制機構の解明</b>   |   |    |     |
| <p>持続型ベクターからの IFN-<math>\gamma</math>発現も経時的には減少することから、長期にわたる治療には繰り返し投与も必要と考えられる。しかしながら、二度目に投与した IFN-<math>\gamma</math>発現 pDNA からの遺伝子発現は著しく抑制されることが見出された。そこで、この IFN-<math>\gamma</math>による遺伝子発現抑制機構を明らかにすることを試みた。IFN-<math>\gamma</math>発現 pDNA を投与したマウスでは、その後</p>   |   |    |     |

に投与した pDNA からの遺伝子発現が顕著に抑制された。一方で、IFN- $\gamma$ 発現 pDNA と同時あるいは事前に投与した pDNA からの遺伝子発現はほとんど抑制されなかった。そこで IFN- $\gamma$ が pDNA の核デリバリー、転写、翻訳の過程に及ぼす影響を解析したところ、IFN- $\gamma$ によりレポーターpDNA の核移行量は mock 群の約 10%、mRNA とタンパク質量は約 1%にまで低下した。以上より、IFN- $\gamma$ は、外来性遺伝子の核へのデリバリーと転写を抑制すること、これが繰り返し投与したときの低い IFN- $\gamma$ 発現の要因であることが推察された。

### 第3章 IFN- $\gamma$ 遺伝子導入の抗腫瘍効果に及ぼす indoleamine 2, 3-dioxygenase の発現亢進の影響

Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) は IFN- $\gamma$ により誘導されるタンパク質であり、トリプトファン分解酵素であることに加えて、免疫反応を抑制する作用を有する。固形腫瘍担癌マウスへの持続型 IFN- $\gamma$ 発現 pDNA の遺伝子導入では、十分な治療効果が認められなかったことから、IFN- $\gamma$ 遺伝子導入による薬理作用における IDO の関与について検討した。マウスへの IFN- $\gamma$ 遺伝子導入により、肝臓、脾臓、肺、腎臓で IDO 発現が著明に亢進することが明らかとなった。また、担癌マウスでは、腫瘍中でも IDO mRNA レベルの増大が認められた。これに対応して、血中トリプトファン濃度の低下、その代謝産物であるキヌレニン濃度の上昇が認められたことから、IFN- $\gamma$ 遺伝子導入時には、IDO 活性が著明に亢進し、これが IFN- $\gamma$ の抗腫瘍効果に対して影響を及ぼす可能性が考えられた。

以上、申請者は、IFN- $\gamma$ 遺伝子デリバリー・発現システムの最適化を目的に、持続的IFN- $\gamma$ 発現ベクターの開発に成功し、結腸癌の肺転移抑制効果の増強に成功した。また、IFN- $\gamma$ が導入遺伝子発現に対して抑制作用を有すること、一方で、内因性の免疫抑制作用を有するIDO発現を著明に亢進することを見出し、効果的なIFN- $\gamma$ 遺伝子治療の実現にはこうした点に対する配慮も重要であることを提示した。本研究で得られた知見は、IFN- $\gamma$ 遺伝子治療システムの開発に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)

インターフェロン (IFN)  $\gamma$ は、抗ウイルス作用や細胞増殖抑制作用、免疫調節作用などの生理活性を有することから、C 型肝炎や種々の癌、さらにはアレルギー疾患治療への適用が期待されている。IFN- $\gamma$ の血中半減期は短いことから、これら慢性疾患への適用には IFN- $\gamma$ を長期にわたって供給可能な投与方法・デバイスの開発が必須である。申請者の所属する研究室ではこれまでに、IFN- $\gamma$ 遺伝子導入により結腸癌細胞の肺や肝臓への転移抑制に有効であることを明らかにしている。しかしながら、遺伝子導入後の血中 IFN- $\gamma$ 濃度は比較的速やかに低下したことから、遺伝子発現の持続化による有効性の改善が期待される。そこで本研究では、IFN- $\gamma$ 遺伝子治療実現を目的に、IFN- $\gamma$ 遺伝子デリバリー・発現システムの最適化を試みた。

### 第 1 章 長期遺伝子発現を可能にするプラスミドベクターの開発

プラスミド DNA (pDNA) からの遺伝子発現が一過性である原因の一つとして、pDNA 配列中の非メチル化 CpG 配列 (CpG モチーフ) の存在が指摘されている。そこで、CpG モチーフ数の異なる pDNA を構築し、非常に効率的な遺伝子導入法であるハイドロダイナミクス法を用いてマウスに投与したときの遺伝子発現プロファイルを評価した。その結果、CpG モチーフ数と遺伝子発現期間には逆相関が認められ、最も CpG モチーフ数が少ない pCpG-Mur $\gamma$ の投与により、長期にわたり持続的な遺伝子発現が得られた。肺転移モデルマウスへの投与の結果、この持続的な IFN- $\gamma$ 発現が結腸癌細胞の肺転移抑制に有効であることも明らかとなった。

そこで、CpG モチーフ削減による持続的遺伝子発現のメカニズムについて解明を試みた。CpG モチーフを多く含む pCMV-Luc について、ハイドロダイナミクス法で投与後のマウス肝臓中での CpG モチーフ中シトシンのメチル化を評価した結果、プロモータ領域においてのみ投与 14 日目以降で一部がメチル化されることが示された。投与後数日中には遺伝子発現が低下することを考慮すると、この CpG モチーフのメチル化は遺伝子発現低下よりも遅く起きること、従って CpG モチーフを多く含む pDNA からの遺伝子発現の低下の原因ではないものと推察された。以上より、CpG モチーフの削減は、CpG モチーフのメチル化抑制以外のメカニズムにより遺伝子発現の持続化に繋がることが明らかとなった。

### 第 2 章 IFN- $\gamma$ による外来性遺伝子発現抑制機構の解明

持続型ベクターからの IFN- $\gamma$ 発現も経時的には減少することから、長期にわたる治療には繰り返し投与も必要と考えられる。しかしながら、二度目に投与した IFN- $\gamma$ 発現 pDNA からの遺伝子発現は著しく抑制されることが見出された。そこで、この IFN- $\gamma$ による遺伝子発現抑制機構を明らかにすることを試みた。IFN- $\gamma$ 発現 pDNA を投与したマウスでは、その後に投与した pDNA からの遺伝子発現が顕著に抑制された。一方で、IFN- $\gamma$ 発現 pDNA と同時あるいは事前に投与した pDNA からの遺伝子発現はほとんど抑制されなかった。そこで IFN- $\gamma$ が pDNA の核デリバリー、転写、翻訳の過程に及ぼす影響を解析したところ、IFN- $\gamma$ によりレポーター-pDNA の核移行量は mock 群の約 10%、mRNA とタンパク質量は約 1%にまで低下した。以上

より、IFN- $\gamma$ は、外来性遺伝子の核へのデリバリーと転写を抑制すること、これが繰り返し投与したときの低いIFN- $\gamma$ 発現の要因であることが推察された。

### 第3章 IFN- $\gamma$ 遺伝子導入の抗腫瘍効果に及ぼす indoleamine 2, 3-dioxygenase の発現亢進の影響

Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) は IFN- $\gamma$ により誘導されるタンパク質であり、トリプトファン分解酵素であることに加えて、免疫反応を抑制する作用を有する。固形腫瘍担癌マウスへの持続型 IFN- $\gamma$ 発現 pDNA の遺伝子導入では、十分な治療効果が認められなかったことから、IFN- $\gamma$ 遺伝子導入による薬理作用における IDO の関与について検討した。マウスへの IFN- $\gamma$ 遺伝子導入により、肝臓、脾臓、肺、腎臓で IDO 発現が著明に亢進することが明らかとなった。また、担癌マウスでは、腫瘍中でも IDO mRNA レベルの増大が認められた。これに対応して、血中トリプトファン濃度の低下、その代謝産物であるキヌレニン濃度の上昇が認められたことから、IFN- $\gamma$ 遺伝子導入時には、IDO 活性が著明に亢進し、これが IFN- $\gamma$ の抗腫瘍効果に対して影響を及ぼす可能性が考えられた。

以上、申請者は、IFN- $\gamma$ 遺伝子デリバリー・発現システムの最適化を目的に、持続的IFN- $\gamma$ 発現ベクターの開発に成功し、結腸癌の肺転移抑制効果の増強に成功した。また、IFN- $\gamma$ が導入遺伝子発現に対して抑制作用を有すること、一方で、内因性の免疫抑制作用を有するIDO発現を著明に亢進することを見出し、効果的なIFN- $\gamma$ 遺伝子治療の実現にはこうした点に対する配慮も重要であることを提示した。本研究で得られた知見は、IFN- $\gamma$ 遺伝子治療システムの開発に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認める。

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