

(別紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	Watcharanurak Kanitta
論文題目	Gene therapy of atopic dermatitis and cancer by sustained expression of interferon- γ in mice (マウスにおける持続的なインターフェロン- γ 発現によるアトピー性皮膚炎および癌の遺伝子治療)		
(論文内容の要旨)			
<p>Interferon (IFN)-γ, a cytokine with antiviral, immunomodulatory, and antiproliferative activities, has been extensively studied as a treatment for many diseases, such as viral infections, allergic diseases and cancer. However, a major limitation in clinical use of IFN-γ-based therapy is the short <i>in vivo</i> half-life of IFN-γ. Therefore, IFN-γ gene transfer has been considered to be a promising method to overcome this limitation because, theoretically, it should be able to extend the duration of action of the short-lived cytokine. Previous studies in my laboratory have shown that removal of unmethylated cytosine-phosphate-guanine (CpG) dinucleotides from plasmid DNA results in the prolongation of transgene expression. A single injection of pCpG-Muγ, a CpG depleted plasmid DNA encoding murine IFN-γ, via tail vein using hydrodynamic injection method resulted in prolonged therapeutic serum concentrations of IFN-γ over 1 month. This sustained transgene expression of IFN-γ could be used as a new therapeutic strategy for chronic diseases, but no such attempts have been made thus far. In this thesis, I aimed to investigate the beneficial effects of sustained exogenous expression of IFN-γ in treating atopic dermatitis and cancer in mouse models. Results are described in the following two chapters.</p> <p>Chapter I. Improvement of atopic dermatitis by sustained exogenous expression of interferon-γ in NC/Nga mice via Th1 polarization.</p> <p>Atopic dermatitis is a chronic inflammatory skin disorder characterized by T helper (Th) 2-dominant immunity. Therefore, any treatment that normalizes the Th1/Th2 balance can be useful for the treatment of this disease. IFN-γ, a potent Th1 cytokine with immunomodulatory activity, is suggested to suppress Th2 immune responses. In this chapter, I aimed to investigate whether sustained expression of IFN-γ influences the Th1/Th2 balance under Th2-dominant conditions in Nishiki-nezumi Cinnamon/Nagoya (NC/Nga) mice, a mouse model of human atopic dermatitis, and is beneficial in preventing and treating the disease.</p> <p>Section 1. Sustained expression of interferon-γ ameliorates the development of atopic dermatitis.</p> <p>To examine whether the sustained supply of IFN-γ is effective in preventing the onset of atopic dermatitis, pCpG-Muγ or pCMV-Muγ, a conventional short-term expression plasmid, was injected into the tail vein of NC/Nga mice without dermatitis. A single hydrodynamic injection of pCpG-Muγ at a dose of 0.05 pmol/mouse resulted in a sustained concentration of IFN-γ in the serum, and the concentration was maintained at more than 300 pg/ml over 80 days. This was associated with an increase in the serum concentration of interleukin (IL)-12, reduced production of immunoglobulin (Ig) E, and inhibition of mRNA expression of IL-4, -5, -13, and thymus and activation-regulated chemokine in the spleen. These immunological changes were not clearly observed in mice receiving two injections of 4.68 pmol pCMV-Muγ, because of the transient nature of the expression from the vector. The mice receiving pCpG-Muγ showed a significant reduction in the severity of skin lesions and in the intensity of their scratching behavior. Furthermore, high transepidermal water loss, epidermal thickening, and infiltration of lymphocytes and eosinophils, all of which were obvious in the untreated mice, were</p>			

significantly inhibited. These results indicate that an extraordinary sustained IFN- γ expression induces favorable immunological changes toward Th1-dominant state, which resulted in ameliorating the development of the disease.

Section 2. Sustained interferon- γ expression improves symptoms of acute phase of atopic dermatitis.

In this section, I aimed to investigate whether the sustained IFN- γ gene transfer is also beneficial in treating atopic dermatitis. NC/Nga mice with early dermatitis were transfected with pCpG-Mu γ by a hydrodynamic tail vein injection at a dose of 0.05 or 0.2 pmol per mouse. The skin lesions improved only in mice receiving the high dose of pCpG-Mu γ . IFN- γ gene transfer resulted in a high mRNA expression of IFN- γ and IL-12 and regulatory T cell (Treg) related cytokines, such as IL-10 and transforming growth factor- β , in the spleen, whereas it reduced the IL-4 mRNA expression, and serum levels of IgG1 and IgE. In addition, the gene transfer markedly inhibited the epidermal thickening, infiltration of inflammatory cells into the skin, the occurrence of dry skin and pruritus. No exacerbating effects on the Th1-mediated contact dermatitis were observed after IFN- γ gene transfer. Taken together, these results indicate that sustained IFN- γ gene transfer induced polarized Th1 immunity under Th2-dominant conditions in NC/Nga mice, leading to an improvement in the symptoms of acute atopic dermatitis without adverse side effects.

Chapter II. Effects of highly upregulated indoleamine 2,3-dioxygenase 1 on anti-tumor activity of interferon- γ gene transfer in tumor-bearing mice.

IFN- γ elicits anti-tumor activity, but it also induces the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1), a tryptophan-metabolizing enzyme involved in the induction of tumor immune tolerance. In this chapter, I demonstrated that IFN- γ gene transfer greatly increased the mRNA expression of IDO1 in many tissues. This upregulation was associated with reduced tryptophan levels and increased kynurenine levels in serum, indicating that IFN- γ gene transfer increased the IDO activity. Then Lewis lung carcinoma (LLC) tumor-bearing wild-type and IDO1 knockout (IDO1 KO) mice were used to investigate the effects of IDO1 on the antitumor activity of IFN- γ . IFN- γ gene transfer significantly retarded the tumor growth in both mouse strains without significant difference in tumor size, although the IDO1 activity was increased only in the wild-type mice. Interestingly, IDO1 mRNA expression in the LLC tumor of IDO1 KO mice tended to increase by IFN- γ gene transfer, suggesting that the IDO1 expression in LLC cells was upregulated. Taken together, these results imply that IFN- γ gene transfer-mediated IDO1 upregulation hardly affect the antitumor activity of IFN- γ .

In conclusion, I demonstrated that sustained expression of therapeutic levels of IFN- γ was effective in preventing the onset of atopic dermatitis and improving the symptoms of the disease via Th1 polarization in the atopic dermatitis model. In addition, I also found that the sustained IFN- γ expression greatly upregulated IDO1, but this immune modulatory protein hardly affected the tumor growth in LLC tumor-bearing mice. Thus, this study provides evidence that IFN- γ gene transfer can be a useful treatment for the diseases.

(論文審査の結果の要旨)

インターフェロン(IFN)- γ は抗ウイルス作用、免疫調節作用、癌細胞増殖作用など多様な生理活性を有するサイトカインであり、ウイルス感染やがん等の種々の疾患に対する治療薬としての開発が盛んに行われている。IFN- γ の生体内半減期は短いため、持続的な IFN- γ 供給を可能とする IFN- γ 遺伝子治療は、IFN- γ を用いた治療法の開発において非常に有用な手段となりえる。申請者が所属する研究室において、CpG モチーフを削減したプラスミドベクター (pCpG ベクター) を用いることで持続的な遺伝子発現を得られ、IFN- γ をコードした pCpG ベクター (pCpG-IFN- γ) を遺伝子導入することで、一月以上に渡って治療に有効なレベルの IFN- γ 血中濃度が得られることを報告している。持続的な IFN- γ 発現は慢性疾患に対する有効な新規治療法となりえると考えられるが、そのような報告は無い。本学位論文ではアトピー性皮膚炎モデルマウスおよび担がんモデルマウスを用いて、pCpG ベクターを用いた持続的な IFN- γ 発現による治療効果について、以下 2 章に渡って検討を行った。

第 I 章 Improvement of atopic dermatitis by sustained exogenous expression of interferon- γ in NC/Nga mice via Th1 polarization

(持続的なインターフェロン- γ 発現による Th1 への極性化に基づく NC/Nga マウスにおけるアトピー性皮膚炎症状の改善)

アトピー性皮膚炎は慢性の炎症性皮膚疾患であり、免疫の Th バランスが Th2 優位となることで発症する。従って、免疫調節作用を有する Th1 型サイトカインである IFN- γ はアトピー性皮膚炎に対する治療手段となりえる。本章ではアトピー性皮膚炎モデルマウス、Nishiki-nezumi Cinnamon/Nagoya (NC/Nga) mice を用いて持続的な IFN- γ 遺伝子発現による、アトピー性皮膚炎の発症の予防効果と治療効果について検証した。

第 I 節 Sustained expression of interferon- γ ameliorates the development of atopic dermatitis

(持続的なインターフェロン- γ 発現によるアトピー性皮膚炎症状進行の寛解)

本節ではアトピー性皮膚炎発症に対する予防効果を評価するために、アトピー性皮膚炎を発症する前の NC/Nga マウスに対し、ハイドロダイナミクス法を用いて pCpG-IFN- γ 、あるいは一過性の IFN- γ 発現が得られる pCMV-IFN- γ を投与した。その結果、0.05 pmol の pCpG-IFN- γ の投与によって、80 日以上に渡って 300 pg/ml の血中 IFN- γ 濃度が得られた。また、血中 interleukin (IL)-12 濃度の上昇と、血中 immunoglobulin (Ig) E レベルの低下、IL-4, -5, -13 などの Th2 型サイトカインの脾臓中の mRNA 発現レベルの低下などの免疫系の Th バランスの Th1 へのシフトが観察された。4.68 pmol の pCMV-IFN- γ を投与したマウスにおいては IFN- γ 発現が一過性であったため、このような変化は観察されなかった。また、pCpG-IFN- γ を投与したマウスにおいて、皮膚炎症状の有意な緩和とひっかき行動の減少が観察された。これらの結果から、非常に持続的な IFN- γ 発現は、免疫系の Th バランスを Th1 優位に傾けることによって、アトピー性皮膚炎症状の発症を抑制可能であることが示された。

第 II 節 Sustained interferon- γ expression improves symptoms of acute phase of atopic dermatitis

(持続的なインターフェロン- γ 発現による急性期のアトピー性皮膚炎症状の改善)

本節においては、持続的な IFN- γ 発現によるアトピー性皮膚炎の治療効果について検討した。アトピー性皮膚炎を発症した NC/Nga マウスに対して、0.05 pmol あるいは 0.2 pmol の pCpG-IFN- γ を投与した。その結果、高用量の pCpG-IFN- γ を投与したマウスにおいてのみ、皮膚炎症状からの回復が認められた。IFN- γ 遺伝子導入によって脾臓において、IFN- γ 、IL-12 や regulatory T 細胞に関係したサイトカインである IL-10 および transforming growth factor- β の mRNA 発現レベルが上昇した。一方、脾臓中の IL-4 の mRNA 発現レベルは低下し血中の IgG1 および IgE レベルが減少した。また、IFN- γ の遺伝子導入による Th1 型の皮膚炎である接触性皮膚炎の増悪は起こらなかった。以上の結果から、持続的な IFN- γ 遺伝子発現によって、副作用を惹起することなく、Th2 型の疾患であるアトピー性皮膚炎を治療可能であることが示された。

第 II 章 Effects of highly upregulated indoleamine 2,3-dioxygenase 1 on anti-tumor activity of interferon- γ gene transfer in tumor-bearing mice

(Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 の強力な発現誘導が担癌モデルマウスにおけるインターフェロン- γ 遺伝子導入による抗腫瘍効果 に及ぼす影響の検討)

IFN- γ は抗腫瘍効果を有するサイトカインであるが、トリプトファン代謝酵素である indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) の発現を誘導することが知られている。IDO1 は抗腫瘍免疫の抑制作用を示すことが知られていることから、本章では IFN- γ 遺伝子導入による抗腫瘍効果における IDO1 の関与について評価した。IFN- γ 遺伝子導入によって種々の臓器において IDO1 の mRNA 発現レベルが大きく上昇した。また、IFN- γ 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ことを示す結果と考えられた。次に、Lewis lung carcinoma (LLC) を野生型のマウスあるいは IDO1 knockout (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- γ 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モデル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- γ 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- γ 遺伝子導入によって IDO1 の遺伝子発現は誘導されるが、IFN- γ 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。

以上、申請者は、2 章にわたり IFN γ 遺伝子治療の実現に向けて有用な情報を提供する結果を得た。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。また、平成 25 年 8 月 26 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。なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、(当面の間) 当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降