

京都大学	博士（薬学）	氏名	濱名 温志
論文題目	Development of a promising interferon gene therapy strategy by vector design (ベクター設計に基づくインターフェロン遺伝子治療戦略の確立に関する研究)		
<p>インターフェロン（IFN）は細胞増殖抑制作用や抗ウイルス作用、免疫調節作用を有する多機能なサイトカインであり、がんやウイルス性肝炎、多発性硬化症（MS）といった難治性疾患の治療へ適用されている。しかしながらIFNの生体内消失半減期が短いため頻回投与が必要である点や、IFNの強力な生物活性に起因する副作用の発現が臨床使用において問題となっている。そこで申請者は、これら問題の解決を可能とするIFN遺伝子治療戦略の確立を目的として、IFN発現ベクターの設計によるIFNの持続供給システムの構築とIFN活性制御方法を開発し、各疾患モデルマウスを用いてその有効性を検証した。</p> <p>第一章 Mxプロモーターを利用したIFN-β持続発現ベクターの開発</p> <p>遺伝子治療の手法を用いた持続的なIFN-β供給は有用と考えられるが、IFN-βは遺伝子発現抑制作用を有するため、既存のプラスミドベクターを利用したIFN-β遺伝子の持続発現は困難であった。申請者は、IFN応答性プロモーターであるMxプロモーターの利用によるIFN-β発現の持続化を試みた。Mxプロモーターの下流にマウスIFN-βをコードするプラスミドベクター（pMx-IFN-β）を構築し、ハイドロダイナミクス法によりマウスへ導入後の血中IFN-β濃度推移をELISA法にて測定した。その結果、1ヶ月以上の持続的なIFN-β発現が得られ、Mxプロモーターの利用によりIFN-β発現の持続化に成功した。また、担癌モデルマウスにおいて、持続的なIFN-β発現により腫瘍増殖が有意に抑制されることも明らかとした。</p> <p>第二章 IFN持続発現ベクターを利用した直接作用型抗ウイルス薬耐性C型肝炎ウイルス感染に対するIFN遺伝子治療</p> <p>直接作用型抗ウイルス薬（DAA）の登場によりC型肝炎の治療成績は劇的に改善した。一方で、DAAに耐性を示すC型肝炎ウイルス（HCV）の出現が報告され治療上の問題となっている。申請者は、DAA耐性HCV感染マウスに対してIFN-α₂、IFN-γ、IFN-λ₁の持続発現ベクターの導入によるDAA耐性HCVに対するIFN遺伝子治療の可能性を検証した。各種IFN発現ベクターを導入後、経時的に血中HCV RNAレベルを測定することで抗ウイルス効果を判定した。その結果、IFN-α₂では血中HCV RNAレベルはほとんど変化しなかった。一方、IFN-γ及びIFN-λ₁の場合には血中HCV RNAレベルが低下したことから、IFN-γ及びIFN-λ₁を用いた遺伝子治療がDAA耐性HCVに有効であることを見出した。</p>			

第三章 IFN-β発現の持続化と活性制御による安全かつ効果的な多発性硬化症の長期再発予防法の開発

第一節 実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスに対するIFN-β持続発現ベクターを利用したIFN-β遺伝子治療効果の評価

MSは再発と寛解を繰り返す中枢性脱髄疾患であり、再発予防薬のひとつであるIFN-βはMS治療に貢献してきた。本章本節では、第一章で開発したIFN-β持続発現ベクター投与によるMS再発予防治療を試みた。MSモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）マウスにIFN-β持続発現ベクターをハイドロダイナミクス法により遺伝子導入後、経口的にELISA法による血中IFN-β濃度と臨床スコアを評価した。その結果、遺伝子導入後1ヶ月間、IFN-βは血中から検出され、IFN-β遺伝子治療がEAEマウスの臨床スコアを有意に改善可能であることを示した。

第二節 IFN-β融合タンパク質の設計に基づく多発性硬化症IFN-β遺伝子治療の最適化

一般に、IFN-βの臨床使用ではIFN-βの生物活性による副作用が継続治療の妨げとなる。MS発症への関与が示唆されている活性化T_H1細胞上に特異的に発現しているT cell immunoglobulins and mucin domain-3（Tim-3）は、そのリガンドであるGalectin-9（gal-9）と結合することでTim-3/gal-9シグナルを介したT_H1細胞の活性化を抑制する。申請者は生物活性の制御によるMS治療効果の増強と副作用低減を目的として、IFN-βにgal-9を融合したIFN-β-gal-9融合タンパク質を設計した。*In vitro* 実験において、IFN-β-gal-9融合タンパク質はIFN-βと比較して非標的細胞への生物活性は低い一方で、標的細胞であるT細胞へは同等以上の作用を示すことを見出した。さらにEAEマウスにおいて、設計したIFN-β-gal-9融合タンパク質はIFN-βよりも強力な治療効果を示し、その副作用低減にも成功した。

以上、申請者は、IFN持続発現ベクターのデザインにより、IFN発現の持続化とその生物活性の制御に成功するとともに、各難治性疾患治療における有用性を実証した。本研究で開発した遺伝子発現持続化の方法および活性制御法は、種々の難治性疾患に対するインターフェロン遺伝子治療戦略の確立に向けた有用な指針になりえ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) は細胞増殖抑制作用や抗ウイルス作用、免疫調節作用を有する多機能なサイトカインであり、がんやウイルス性肝炎、多発性硬化症 (MS) といった難治性疾患の治療へ適用されている。しかしながらIFNの生体内消失半減期が短いために頻回投与が必要である点や、IFNの強力な生物活性に起因する副作用の発現が臨床使用において問題となっている。そこで申請者は、これら問題の解決を可能とするIFN遺伝子治療戦略の確立を目的として、IFN発現ベクターの設計によるIFNの持続供給システムの構築とIFN活性制御方法を開発し、各疾患モデルマウスを用いてその有効性を検証し、以下の新知見を得た。

まず、IFN応答性プロモーターであるMxプロモーターの下流にマウスIFN- β をコードするプラスミドベクター (pMx-IFN- β) を構築し評価した結果、1ヶ月以上の持続的なIFN- β 発現が得られると共に担癌モデルマウスにおいて腫瘍増殖が有意に抑制されることも明らかとした。また、直接作用型抗ウイルス薬 (DAA) に耐性を示すC型肝炎ウイルス (HCV) を感染させたマウスに対してIFN- α_2 、IFN- γ 、IFN- λ_1 の持続発現ベクターの導入による効果を評価した結果、IFN- γ 及びIFN- λ_1 を用いた遺伝子治療がDAA耐性HCVに有効であることを見出した。さらに、多発性硬化症 (MS) 長期再発予防法の開発を目的にpMx-IFN- β および新たに設計したIFN- β にGalectin-9 (gal-9) を融合したIFN- β -gal-9融合タンパク質をコードするベクターを用いて、MSモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウスにおける効果を検討した結果、優れた治療効果を示すことを明らかにした。本研究で開発した遺伝子発現持続化の方法および活性制御法は、種々の難治性疾患に対するインターフェロン遺伝子治療戦略の確立に向けた有用な指針になりえるものと考えられる。

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。また、平成30年2月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。