

京都大学	博士（薬学）	氏名	安藤 満
論文題目	Development of liver-directed interferon- γ gene therapy system based on the spatiotemporal regulation of interferon- γ （インターフェロン γ の時空間制御に基づく肝指向性インターフェロン γ 遺伝子治療システムの開発に関する研究）		
（論文内容の要旨） インターフェロン（IFN）γ は、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、免疫調節作用を有するため、肝臓やウイルス性肝炎等の難治性肝疾患への適応が期待されている。しかしながら、IFNγ は生体からの消失が速いことや、肝臓以外で非特異的に作用することで発現する有害事象が、肝疾患治療への適用における問題となっている。こうした問題の解決には、IFNγ を持続供給可能であり、ベクターにコードされた IFNγ の構造を改変することでその体内動態を制御可能である遺伝子治療法が有効と考えられる。申請者が所属する研究室のこれまでの検討において、CpG 配列を含まない pCpG プラスミドを用いたマウスへの遺伝子導入により、IFNγ の長期発現が得られている。そこで本研究では、まず、難治性肝疾患として治療抵抗性 C 型肝炎を選択し、pCpG プラスミドを利用した IFNγ 遺伝子治療を試みた。次いで、より安全かつ有効な IFNγ 遺伝子治療システムの開発を目的に、プラスミドからの発現パターン（時間的）制御と誘導体設計による IFNγ の体内動態（空間的）制御を行い、肝疾患モデルマウスでの治療効果と有害事象を指標にその有用性を検証した。			
第 I 章 C 型肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞キメラマウスに対する IFNγ 遺伝子治療 ヒト肝細胞キメラマウスに C 型肝炎ウイルス（HCV）を感染させた C 型肝炎モデルマウスに対して、肝臓への高効率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 IFNγ をコードした pCpG プラスミドを遺伝子導入した。その結果、キメラマウス肝臓中のヒト肝細胞への遺伝子導入が可能であり、7 週間にわたる持続的な IFNγ 血中濃度が得られた。また、持続的発現プラスミドを投与したマウスにおいては、血清中の HCV RNA が消失すると共に治療開始 7 週間後の時点で肝臓中にも HCV RNA が検出されなかったことから、持続的な IFNγ 発現が治療抵抗性 C 型肝炎治療に有効であることが示された。			
第 II 章 プラスミド骨格中遺伝子発現調節領域の最適化による IFNγ 遺伝子発現プロファイルの制御 pCpG プラスミドを用いた遺伝子導入においては、血清中 IFNγ 濃度が導入直後に一過性に非常に高くなり、この高濃度の IFNγ に起因すると推察される体重減少が認められた。そこで、この発現ピークを解消するために、プラスミドベクターの遺伝子発現調節領域であるエンハンサとプロモータの最適化を試みた。その結果、ROSA26 プロモータを用いることで、変動幅の小さい長期遺伝子発現が得られるこ			

とを見出した。そこで、新たに構築した ROSA26 プロモータを含む IFN γ 発現プラスミドをマウスに投与したところ、従来の pCpG プラスミドと比較して導入初期の体重減少などの低減に成功した。以上、IFN γ の遺伝子発現プロファイルの最適化が、IFN γ 遺伝子治療の有用性・安全性の改善に有用であることを明らかにした。

第 III 章 ヘパラン硫酸結合ドメインの融合による IFN γ の肝臓滞留化

治療標的組織へ IFN γ を遺伝子導入した後、発現する IFN γ を発現部位近傍に滞留させることができれば、標的組織での IFN γ 作用を維持しつつ他部位における有害事象の発現を抑制可能と考えられる。そこで、細胞表面に存在するヘパラン硫酸に結合親和性を持つヘパリン結合ドメイン(HBD)を IFN γ に融合した IFN γ -HBD を設計し、これを発現するプラスミドを構築した。マウス肝臓への遺伝子導入の結果、HBD の融合により、肝臓における高い IFN γ 活性と低い血清中 IFN γ 濃度が達成された。また、肝転移腫瘍モデルマウスを用いた検討において、IFN γ 発現プラスミドと同程度以上の治療効果が得られるとともに、体重減少などの有害事象の発現を抑制可能であった。

第 IV 章 アポリポタンパク質の融合による IFN γ の肝臓ターゲティング

高密度リポタンパク (HDL) は、肝臓で産生され、末梢組織のコレステロールを肝臓へ逆転送することからも、HDL を利用することで肝臓特異的なデリバリーが可能であると考えられる。そこで、肝細胞に発現するクラス B タイプ I スカベンジャーレセプターのリガンドである HDL に含まれるアポリポプロテイン A-I (ApoAI) を選択し、IFN γ -ApoAI 融合タンパク質を設計した。IFN γ -ApoAI 発現プラスミドをマウス下肢筋肉に遺伝子導入したところ、IFN γ -ApoAI は肝臓へ特異的に分布したことから、ApoAI の融合による IFN γ の肝臓ターゲティングが実証された。

以上、申請者は、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた検討から、IFN γ の持続的遺伝子発現が治療抵抗性 C 型肝炎の治療に有効であることを見出した。また、遺伝子発現調節領域の最適化と IFN γ 誘導体設計による IFN γ の時空間制御を実現し、肝転移腫瘍に対する治療効果の改善と有害事象の発現の回避に成功した。本研究で得られた知見は、ウイルス性肝炎や肝癌をはじめとする様々な難治性肝疾患に対する安全かつ有効な IFN γ 遺伝子治療の実現に向けて有用な情報を提供するものとする。

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、難治性肝疾患として治療抵抗性 C 型肝炎を選択し、pCpG プラスミドを利用したインターフェロン (IFN) γ 遺伝子治療を試みた。また、より安全かつ有効な IFN γ 遺伝子治療システムの開発を目的に、プラスミドからの発現パターン (時間的) 制御と誘導体設計による IFN γ の体内動態 (空間的) 制御を行い、肝疾患モデルマウスでの治療効果と有害事象を指標にその有用性を検証した。

第 I 章 C 型肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞キメラマウスに対する IFN γ 遺伝子治療

ヒト肝細胞キメラマウスに C 型肝炎ウイルス (HCV) を感染させた C 型肝炎モデルマウスに対して、IFN γ をコードした pCpG プラスミドを遺伝子導入した。その結果、7 週間にわたる持続的な IFN γ 血中濃度が得られ、血清中の HCV RNA が消失すると共に治療開始 7 週間後の時点で肝臓中にも HCV RNA が検出されなかったことから、持続的な IFN γ 発現の治療抵抗性 C 型肝炎治療への有効性が示された。

第 II 章 プラスミド骨格中遺伝子発現調節領域の最適化による IFN γ 遺伝子発現プロファイルの制御

プラスミドベクターの遺伝子発現調節領域であるエンハンサとプロモータの最適化を試み、ROSA26 プロモータを用いることで、変動幅の小さい長期遺伝子発現が得られることを見出した。新たに構築した ROSA26 プロモータを含む IFN γ 発現プラスミドをマウスに投与したところ、従来の pCpG プラスミドと比較して導入初期の体重減少などの低減に成功し、IFN γ の遺伝子発現プロファイルの最適化が、IFN γ 遺伝子治療の有用性・安全性の改善に有用であることを明らかにした。

第 III 章 ヘパラン硫酸結合ドメインの融合による IFN γ の肝臓滞留化

細胞表面に存在するヘパラン硫酸に結合親和性を持つヘパリン結合ドメイン (HBD) を IFN γ に融合した IFN γ -HBD を設計した。マウス肝臓への遺伝子導入の結果、HBD の融合により、肝臓における高い IFN γ 活性と低い血清中 IFN γ 濃度が達成された。肝転移腫瘍モデルマウスを用いた検討において、IFN γ 発現プラスミドと同程度以上の治療効果が得られるとともに、体重減少などの有害事象の発現を抑制可能であった。

第 IV 章 アポリポタンパク質の融合による IFN γ の肝臓ターゲティング

肝細胞に発現するクラス B タイプ I スカベンジャーレセプターのリガンドである高密度リポタンパク (HDL) に含まれるアポリポタンパク A-I (ApoAI) を選択した。IFN γ -ApoAI 融合タンパク質を設計し、IFN γ -ApoAI 発現プラスミドをマウス下肢筋肉に遺伝子導入した結果、IFN γ -ApoAI は肝臓へ特異的に分布したことから、ApoAI の融合による IFN γ の肝臓ターゲティングが実証された。

以上、申請者は、IV 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。

さらに、平成 25 年 2 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。

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