

発現タンパク質の時空間制御による遺伝子治療効果の最適化

西川元也,* 高橋有己, 高倉喜信

Optimization of Gene Therapy Effect by Spatiotemporal Control of Expressed Proteins

Makiya NISHIKAWA,* Yuki TAKAHASHI, and Yoshinobu TAKAKURA

Department of Biopharmaceutics and Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshidashimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received July 20, 2010)

Therapeutic effects of *in vivo* gene therapy, which aims to treat diseases by administering therapeutic genes to patients, are obtained *via* proteins expressed from the gene administered. Therefore, to optimize the therapeutic effects of such therapy, it is important to control not only the tissue distribution of gene vectors but also that of proteins expressed from the vector. Studies using protein pharmaceuticals have clearly demonstrated that the therapeutic effect depends largely on the spatiotemporal distribution of proteins, such as area under the curve and mean residence time. These results strongly suggest that precise control of the spatiotemporal distribution of proteins increases the efficacy of *in vivo* gene therapy. Based on these considerations, we tried to increase the therapeutic effect of plasmid DNA-based gene therapy by controlling the profile of proteins expressed from vectors. To increase the residence time of proteins, we developed plasmids with few CpG motifs and achieved sustained expression of proteins at therapeutic levels for as long as several months. Sustained expression of murine interferon γ was highly effective in inhibiting metastatic tumor growth and atopic dermatitis in mouse models. Thus, designing plasmid vectors is a promising approach not only to controlling the spatiotemporal distribution of proteins, but also to increasing the therapeutic potency of *in vivo* gene therapy.

Key words—gene therapy; plasmid DNA; interferon; hydrodynamic injection; sustained expression

1. はじめに

体外から遺伝子を投与することで疾患治療を図る *in vivo* 遺伝子治療では、投与された遺伝子から産生されるタンパク質の機能を介して治療効果が得られる。遺伝子治療の最適化を目的としたこれまでの多くの検討においては、治療遺伝子をいかに効率よく標的細胞に送達するかが最重要課題とされ、選択的かつ効率的な遺伝子デリバリーシステムの開発を目的に精力的な研究が行われてきた。これは、Duchenne 型筋ジストロフィーへの *dystrophin* あるいは嚢胞性線維症への *CFTR* 遺伝子導入など、細胞内・膜タンパク質の補充を目的とする治療においては特に重要な課題である。

われわれはこれまでに、有効な *in vivo* 遺伝子治療の実現には、①遺伝子導入・発現の細胞選択性及

び②遺伝子発現細胞数、③遺伝子発現効率、④遺伝子発現期間の4つのパラメータに関して検討する必要がある、それぞれの重要性は対象疾患並びに治療タンパク質に依存することを報告してきた (Fig. 1).¹⁻³⁾ このうち①と②を増大するには遺伝子ベクターの体内動態制御が必須である。筋ジストロフィーに対する遺伝子治療を目的とした基礎研究において、筋肉注射と比較して、プラスミド DNA を血管内に投与することで多くの筋細胞での遺伝子導入・発現が可能であった。^{4,5)} また、アデノ随伴ウイルスベクターを高投与量で投与した場合にも、全身の筋細胞での遺伝子発現が達成されている。⁶⁾ こうした例で明らかのように、遺伝子導入ベクターのデリバリー技術に進展がないわけではない。しかしながら、細胞内タンパク質補充を目的とする検討に関しては、依然として臨床応用に近づいているとはいえない。安全性に優れるプラスミドベクターを利用するハイドロダイナミクス法による遺伝子導入法では、非常に高いレベルの遺伝子発現が得られるため、投与デバイスの開発を含めた臨床研究が進めら

京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

*e-mail: makiya@pharm.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウム S19 で発表したものを中心に記述したものである。

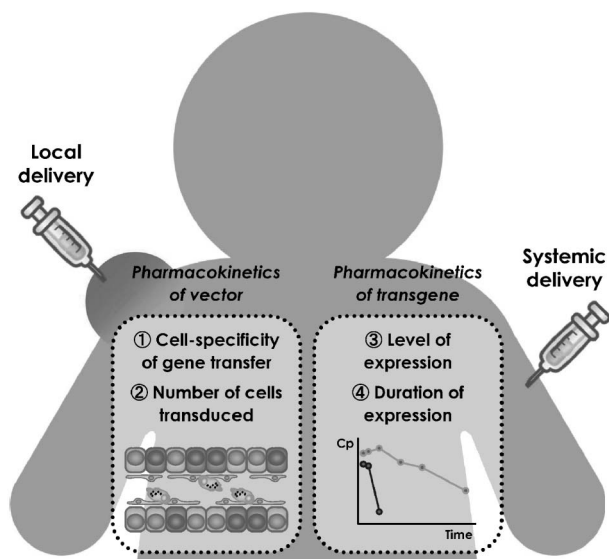


Fig. 1. Processes of Nonviral Gene Transfer and Characteristics Determining the Therapeutic Effects

Gene vectors are administered locally or systemically. The therapeutic effects of *in vivo* gene transfer are determined by the pharmacokinetics of vector and transgene product.

れているが、この場合にも導入細胞の割合は肝細胞の数十%程度に留まるのが現状である。^{7,8)}

治療タンパク質が導入・発現細胞から分泌される場合には、①細胞選択性や②発現細胞数の重要度は大きく低下し、③発現効率と④発現期間が治療効果を左右する重要なパラメータとなる。これは遺伝子導入ベクターのデリバリー制御に限らず、発現タンパク質の体内動態制御によっても改善可能である。したがって、分泌タンパク質を利用した遺伝子治療においては、ベクターの体内動態制御の重要性が低くなり、これにより治療上有効な遺伝子治療システムの開発が容易と考えられる。³⁾ われわれは、インターフェロン (IFN) cDNA をコードするプラスミドベクターを利用した *in vivo* 遺伝子導入による各種疾患治療の検討において、IFN の体内動態最適化による治療効果の増強を目的に検討を行ってきた。本稿では、マウス IFN- γ に焦点を当てて、マウスに遺伝子導入後の体内動態制御並びに治療効果増強について、がん及びアトピー性皮膚炎を対象に行ったわれわれの検討結果を紹介する。

2. *in vivo* 遺伝子導入法の有効性評価に関する問題点とその克服

プラスミド DNA を利用する非ウイルスベクターは、安全性の高さが最大の利点とされる。一方、改

善すべきは低い遺伝子発現効率と、短い遺伝子発現期間である。本来、プラスミド DNA は酵素安定性並びに膜透過性が非常に低いために、遺伝子発現には必須となる細胞質への移行はほとんど起きない。したがって、この過程を多少なりとも改善できれば遺伝子発現は飛躍的に増大する。基礎研究に汎用されるホタルルシフェラーゼ発現プラスミド DNA を例に挙げると、培養細胞への添加や、マウスへの通常の静脈内投与ではブランクレベルの発光しか得られない。この発現レベルを 100–1000 倍程度増大させるのは容易である。ここで重要なのは遺伝子発現がどの程度増大したかだけでなく、有効なレベルに達したか否かである。これまでに、膨大な数の遺伝子デリバリー・発現改善に関する論文が報告されているが、多くの検討ではレポーター遺伝子での議論に終始しており、有効性の議論は不可能である。このことも有効な遺伝子治療システムの開発を阻む大きな要因と考える。

発現タンパク質によって惹起される生体反応はその濃度に依存する。これまでに多くの遺伝子導入法が開発され、遺伝子発現が改善可能であると報告されている。Figure 2 は、ホタルルシフェラーゼをコードするプラスミド DNA を種々の投与方法で投与したときの肝臓中ルシフェラーゼ活性を、マウス 1 匹当たりのプラスミド投与量に対してプロットしたものである。³⁾ 肝臓への直接注射やエレクトロポレーションの利用、さらには各種肝細胞特異的非ウイルスベクターとの複合体を利用した遺伝子導入法は、ルシフェラーゼ活性が検出可能であることから、単にプラスミド単独を血管内投与した場合と比較していずれの場合にも遺伝子発現は増大している。しかしながら、これらと比較してハイドロダイナミクス法による遺伝子発現レベルは文字通り桁違いに高い。Liu らのハイドロダイナミクス法に関する最初の報告⁷⁾では、投与条件に関する詳細な検討結果が示されており、この最も単純な遺伝子導入法は、最も効率的な非ウイルス型遺伝子導入法である反面、その効率は投与条件に劇的に依存することも明示されていた。特に投与速度は、わずかな違いであってもルシフェラーゼ活性が一桁変わるほどに遺伝子発現効率に影響を及ぼす。ハイドロダイナミクス法の場合には、各種モデルマウスでの検討で治療効果が報告されている。^{9,10)} それ以外の導入方法で

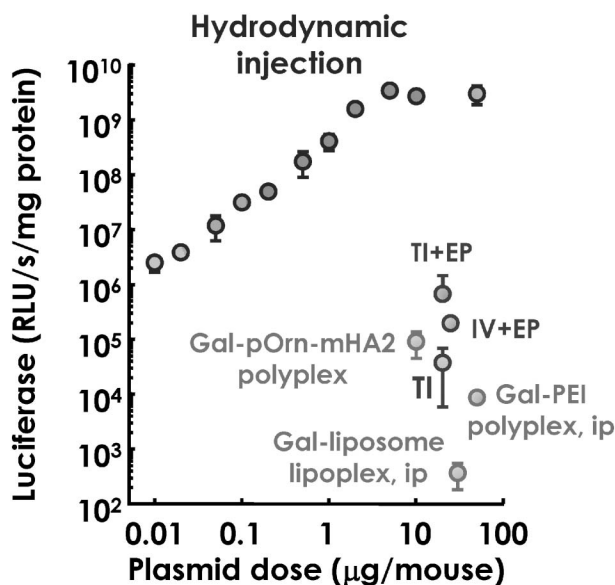


Fig. 2. Comparison of the Level of Expression by Several Nonviral Gene Transfer Methods

Firefly luciferase activity in mouse liver after nonviral gene transfer was plotted against the dose of plasmid expressing firefly luciferase (pCMV-Luc). TI, tissue injection of naked plasmid into the liver; EP, electroporation; IV, intravenous injection of naked plasmid; ip, intraportal injection; Gal-pOrn-mHA2 polyplex, galactosylated poly-ornithine-fusogenic peptide/plasmid complex; Gal-PEI polyplex, galactosylated polyethylenimine/plasmid complex; Gal-liposome lipoplex, galactosylated cationic liposome/plasmid complex.

は治療実験に関する報告は少なく、その主な原因は発現レベルの低さにあると考えられる。

3. プロモータ及びエンハンサの選択によるマウス IFN- γ 発現プロファイルの最適化

臨床においては I 型 IFN である IFN- α 製剤が C 型肝炎に対する治療薬として用いられており、中でも血中滞留性を著しく増大したポリエチレングリコール (PEG) 修飾製剤が抗ウイルス薬リバビリンとの併用の形で標準治療法とされる。PEG 修飾 IFN- α 製剤は、患者の QOL 改善だけでなく、治療効果的にも従来の IFN- α 製剤よりも有効であることが報告されている。¹¹⁾ II 型 IFN である IFN- γ は、IFN- α 製剤を利用した治療に抵抗性を示す C 型肝炎患者に対する有効性が報告されていることから、その血中滞留化による治療効果増強が期待される。IFN- γ も I 型 IFN 同様、血中半減期が短いことから、構造修飾による血中滞留化、あるいは遺伝子導入による持続化が、治療効果増強に有効と考えられる。

われわれの研究グループは十年以上に、マウス IFN 遺伝子導入によるがん治療研究を開始し、腫

瘍局所への遺伝子導入によるがん治療の可能性を世界に先駆けて実証した。¹²⁾ また Liu らの報告に触発されてハイドロダイナミクスのメカニズム解明を進める¹³⁻¹⁵⁾ とともに、結腸がん肝転移モデルでの治療実験を行い、肝臓への IFN- γ 遺伝子導入が肝転移抑制に有効であることを報告した。¹⁶⁾ この検討では IFN 遺伝子治療の可能性が見出された反面、非常に重大な問題も明らかとなった。それはほかの多くの報告同様、遺伝子発現が非常に短期間であり、血中濃度は投与後 6 時間後付近でピークを迎え、24 時間後にはほぼブランクレベルに戻ってしまうことであった。¹⁶⁾ これはタンパク質製剤を皮下注射した場合とあまり大きくは変わらず、遺伝子で投与することのメリットはあまりないと言って過言ではない。

導入遺伝子からの遺伝子発現に関しては依然として未解明な部分が多いが、実験結果の積み重ねからいくつかの経験則が導き出されている。骨格筋は、他の臓器や組織での遺伝子発現よりも顕著に持続的であることや、ウイルス由来プロモータは概して発現期間が短いことなどである。Kay らのグループは細菌由来の配列がプラスミドからの遺伝子発現を抑制すると報告している。¹⁷⁾ 一方、Genzyme 社の Yew らは、ウイルス DNA や細菌 DNA に特徴的な非メチル化 CG 配列 (CpG モチーフ) が遺伝子発現低下の要因であるとし、CpG モチーフ数を削減したプラスミドを開発することでこれを実験的に証明した。¹⁸⁾

われわれは Genzyme 社との共同研究も含め、プラスミド中の CpG モチーフが遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかについて検討を行ってきた。^{19,20)} Table 1 に示す種々のプラスミド DNA を用いた検討の結果、興味深い知見が得られた。プラスミド中の CpG モチーフ数に関しては、数が減るにつれて遺伝子発現は持続する傾向が認められた。中でもプロモータ領域の CpG モチーフの重要性が見出された反面、cDNA 領域の CpG モチーフは遺伝子発現にほとんど影響を与えないことも明らかとなった。Figure 3 には、各種 IFN- γ 発現プラスミド DNA をマウスにハイドロダイナミクス法により投与したときの血清中 IFN- γ 濃度の経時変化を示す。図から明らかなように、pGZB-muy や pCpG-muy などの CpG モチーフ数の少ないプラスミドを用いることで持続的な発現が得られた。

Table 1. Properties of Plasmid DNA with Different Numbers of CpG Motifs

Plasmid	Size (kbp)	Number of CpG*	Promoter	Enhancer	cDNA
pCMV-Luc	7.1	846	CMV	CMV	Luciferase
pCMV-Luc (CMV-syn)	6.8	772	CMV-syn	CMV-syn	Luciferase
pGZB-Luc	4.5	282	CMV-syn	CMV-syn	Luciferase
pCpG-Luc	4.7	194	EF1	CMV	Luciferase
pCpG-Luc (CMV-syn)	4.6	194	CMV-syn	CMV-syn	Luciferase
pCpG-ΔLuc	3.6	0	EF1	CMV	Modified luciferase gene fused to Sh ble gene
pCMV-muγ	6.4	686	CMV	CMV	Mouse IFNγ
pGZB-muγ	3.3	116	CMV-syn	CMV-syn	Mouse IFNγ
pCpG-muγ	3.5	20	EF1	CMV	Mouse IFNγ

* Numbers of CpG dinucleotides in plasmid DNA were indicated. CMV, human cytomegalovirus; EF1, human elongation factor 1; -syn, synthetic.

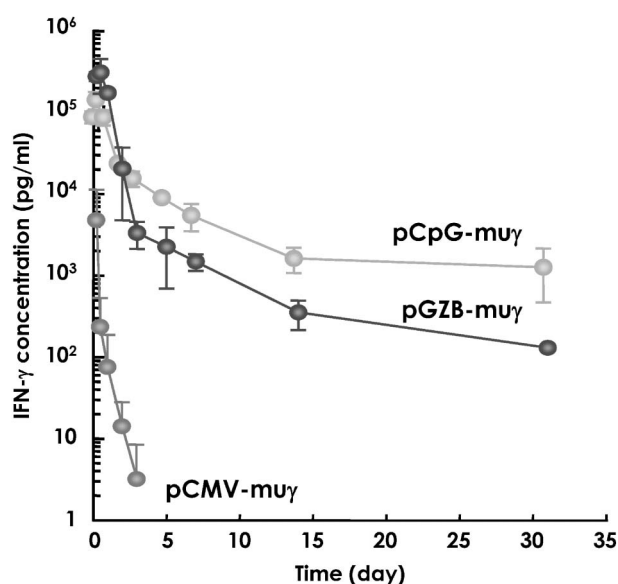


Fig. 3. Time-course of Serum Concentration of IFN-γ after Hydrodynamic Injection of Plasmid DNA Encoding IFN-γ cDNA

pCMV-muγ, pGZB-muγ or pCpG-muγ was injected into Institute of Cancer Research (ICR) mice at a dose of 0.2 pmol/mouse. At indicated periods after injection, blood was collected from the tail vein. The blood samples were incubated at 4°C to allow clotting and then centrifuged to obtain serum. The concentration of IFN-γ was analyzed by ELISA. The results are expressed as the means ± S.D. of three mice.

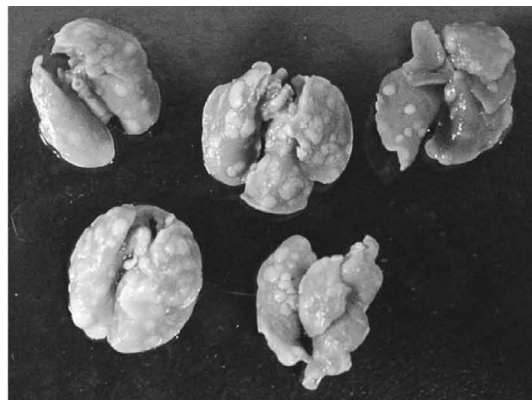
CpGモチーフと遺伝子発現抑制との関連については、炎症性サイトカイン産生の関与やメチル化酵素によるプロモータ活性の低下などが指摘されてきた。カチオン性リポソーム複合体や高分子ミセル複合体の投与では、CpG DNAがToll様レセプター9に認識されることで炎症性サイトカインが産生されることが報告されている。ハイドロダイナミクス法では炎症性サイトカイン産生が非常に少ない。^{16,21)} われわれは、炎症性サイトカイン産生を誘

導した場合にも、各種プラスミドからの遺伝子発現はほとんど影響されないことを見出し、少なくともハイドロダイナミクス法による遺伝子導入時には炎症性サイトカインによる発現抑制は起きないことを証明した。²⁰⁾ そうするとメチル化による発現抑制の可能性が考えられるが、CpGモチーフのメチル化が遺伝子発現低下に直接関与することはないことを示唆する検討結果を得ている。詳細についてはさらなる検討が必要と考える。

4. 転移性がんに対するIFN-γ発現プロファイルの最適化

IFN-γは、腎がん又は慢性肉芽腫症に伴う重症感染に対する治療薬として承認され、臨床で用いられている。動物モデルでは、免疫活性化を通じて種々の腫瘍に対して治療効果が認められることから、腎がんに限らず幅広い腫瘍に対する適用の可能性がある。

マウスを用いた検討では、CMVプロモータでドライブされたIFN-γは結腸がんの肝転移を有意に抑制した。¹⁶⁾ その一方で肺転移には無効であった。これは、主なIFN-γ発現臓器である肝臓とは異なり、遠隔臓器である肺では有効なレベルのIFN-γ活性が得られなかったことによると考えられた。そこでpGZB-muγ又はpCpG-muγを用いたところ、これら持続発現型プラスミドの投与により結腸がんの肺転移は有意に抑制可能であった。^{19,20)} Figure 4には、肺転移モデルマウスの肺組織像を示すが、生理食塩水投与群やpCMV-muγ投与群と比較して、pGZB-muγ投与群で肺表面の転移結節数は明らかに少ない。また、pCMV-muγ投与による担がんマウスの延命効果も認められた。



Saline (Control)



pCMV-muy



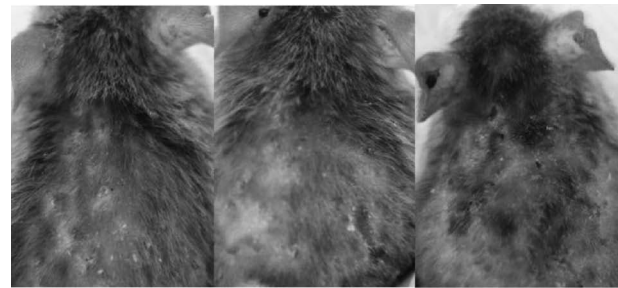
pGZB-muy

Fig. 4. Effect of IFN- γ Gene Transfer on the Pulmonary Metastasis of CT-26 Cells in Mice

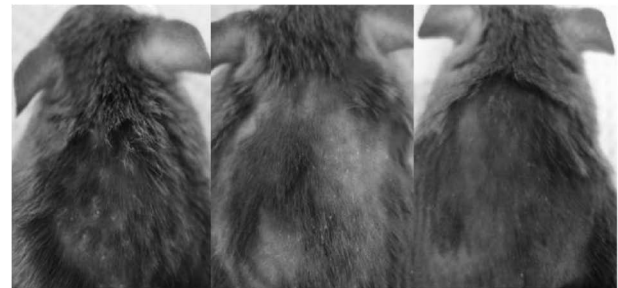
Mice were inoculated with 1×10^5 CT-26 cells by a tail vein injection. On days 1 and 14, mice were injected intravenously with saline (control), pCMV-muy or pGZB-muy at a dose of $3 \mu\text{g}/\text{mouse}$ by hydrodynamic injection. On day 19, mice were killed and the lungs were excised from tumor-bearing mice.

5. IFN- γ 持続発現型プラスミドを利用した遺伝子導入によるアトピー性皮膚炎治療

近年、先進国を中心に患者数の多いアレルギー疾



Untreated



pCpG-muy

Fig. 5. Images of the Back Skin of NC/Nga Mice

Photographs were taken at 35 days after hydrodynamic injection of pCpG-muy at a dose of $0.14 \mu\text{g}/\text{mouse}$.

患では、免疫反応の中心的役割を担う T 細胞のバランスが崩れ、アレルゲンに対する Th2 優位な免疫応答により血中 IgE 値が上昇し、炎症反応が惹起される。Th1 サイトカインである IFN- γ は、ナイーブ T 細胞の Th1 細胞への分化促進と Th2 細胞への分化抑制、Th2 細胞からのサイトカイン産生を抑制する機能を持つことから、アレルギー疾患治療への適用が期待されている。²²⁾ 実際、アトピー性皮膚炎など一部の疾患に対しては、サイトカインタンパク質を利用した治療が欧米を中心に行われているがその効果は十分でない。その一因として、タンパク質製剤の体内からの速い消失が挙げられる。そこでわれわれは、持続 IFN- γ 発現型 pCpG-muy を利用した *in vivo* 遺伝子導入によるアトピー性皮膚炎治療の可能性についてマウスを用いて検討した。²³⁾

アトピー性皮膚炎は「増悪、寛解を繰り返す掻痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因を持つ」と定義される。ヒトアトピー性皮膚炎に類似の症状を示すことが見いだされた NC/Nga マウスは、通常的环境下で飼育すると 7-8 週齡より皮膚炎を発症する。通常的环境下で飼育した未発症の NC/Nga マウスに pCpG-muy をハ

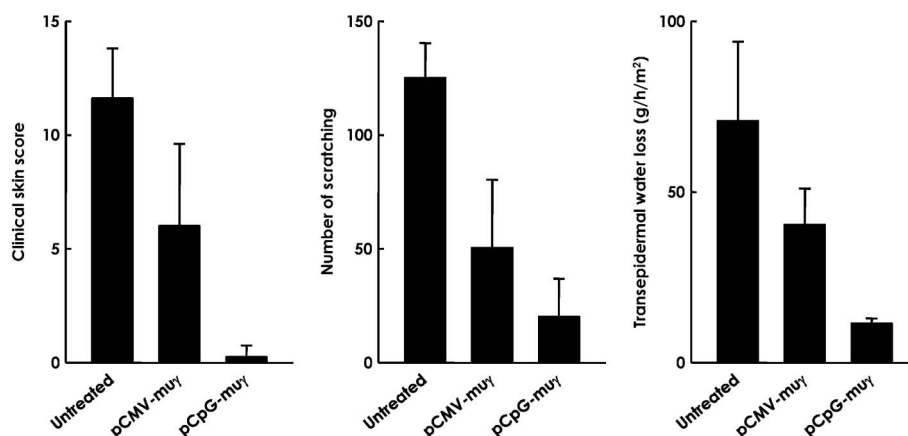


Fig. 6. Effect of FN- γ Gene Transfer on Clinical Skin Score, Scratching and Transepidermal Water Loss of NC/Nga Mice

NC/Nga mice were untreated or injected with pCMV-muy (two 20 μ g injections) or pCpG-muy (0.14 μ g). Clinical features of dermatitis were scored at 88 days after the start of treatment. Scratching behavior of mice was automatically evaluated using SCLABA-Real at day 35. Transepidermal water loss of the back skin was measured at day 84. The results are expressed as the mean \pm S.D. of at least three mice.

イドロダイナミクス法で投与したところ、約3カ月の観察期間中、アトピー性皮膚炎の発症が顕著に抑制された (Fig. 5)。皮疹の臨床スコア、掻破回数、経皮水分蒸散量などのパラメータにも、著明な抑制効果が認められた (Fig. 6)。短期発現型 pCMV-muy 投与群ではその効果は小さいことから、IFN- γ を持続的に発現させることがアトピー性皮膚炎治療には重要であると考えられる。

6. おわりに

薬物の体内動態の精密制御による疾患治療の最適化を目指すドラッグデリバリーシステムでは、膜透過を介する吸収過程や各臓器・組織への分布過程、システムから薬物の放出過程などの制御が図られる。遺伝子治療で投与される遺伝子 (cDNA) はそのままの形では効果を発揮せず、mRNA に転写されタンパク質に翻訳されて初めて生理活性を示すことから、プロドラッグあるいは薬物リザーバ的な役割と捉えることもできる。したがって、DDS 的発想では、遺伝子デリバリーに加えて、タンパク質の発現過程 (親薬物への変換あるいはリザーバからの薬物放出) の制御、さらにはタンパク質の体内動態制御・標的指向化による治療最適化が考えられる。本稿では主にタンパク質発現過程の制御を取り上げたが、発現タンパク質の体内動態制御も治療効果最適化に向けた魅力的な研究対象と考える。

REFERENCES

- 1) Nishikawa M., Huang L., *Hum. Gene Ther.*, **12**, 861–870 (2001).
- 2) Nishikawa M., Hashida M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 275–283 (2002).
- 3) Nishikawa M., Takakura Y., Hashida M., *Cancer Sci.*, **99**, 856–862 (2008).
- 4) Liu F., Nishikawa M., Clemens P. R., Huang L., *Mol. Ther.*, **4**, 45–51 (2001).
- 5) Liang K. W., Nishikawa M., Liu F., Sun B., Ye Q., Huang L., *Gene Ther.*, **11**, 901–908 (2004).
- 6) Gregorevic P., Blankinship M. J., Allen J. M., Chamberlain J. S., *Mol Ther.*, **16**, 657–664 (2008).
- 7) Liu F., Song Y., Liu D., *Gene Ther.*, **6**, 1258–1266 (1999).
- 8) Suda T., Suda K., Liu D., *Mol. Ther.*, **16**, 1098–1104 (2008).
- 9) Kobayashi N., Nishikawa M., Takakura Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 713–731 (2005).
- 10) Suda T., Liu D., *Mol Ther.*, **15**, 2063–2069 (2007).
- 11) Bukowski R. M., Tendler C., Cutler D., Rose E., Laughlin M. M., Statkevich P., *Cancer*, **95**, 389–396 (2002).
- 12) Nomura T., Yasuda K., Yamada T., Okamoto S., Mahato R. I., Watanabe Y., Takakura Y., Hashida M., *Gene Ther.*, **6**, 121–129 (1999).
- 13) Kobayashi N., Kuramoto T., Yamaoka K., Hashida M., Takakura Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **297**, 853–860 (2001).
- 14) Kobayashi N., Nishikawa M., Hirata K.,

1) Nishikawa M., Huang L., *Hum. Gene Ther.*,

- Takakura Y., *J. Gene Med.*, **6**, 584–592 (2004).
- 15) Nishikawa M., Nakayama A., Takahashi Y., Fukuhara Y., Takakura Y., *Hum. Gene Ther.*, **19**, 1009–1020 (2008).
- 16) Kobayashi N., Kuramoto T., Chen S., Watanabe Y., Takakura Y., *Mol. Ther.*, **6**, 737–744 (2002).
- 17) Chen Z. Y., He C. Y., Meuse L., Kay M. A., *Gene Ther.*, **11**, 856–864 (2004).
- 18) Yew N. S., Zhao H., Przybylska M., Wu I. H., Tousignant J. D., Scheule R. K., Cheng S. H., *Mol. Ther.*, **5**, 731–738 (2002).
- 19) Kawano H., Nishikawa M., Mitsui M., Takahashi Y., Kako K., Yamaoka K., Watanabe Y., Takakura Y., *Int. J. Cancer.*, **121**, 401–406 (2007).
- 20) Mitsui M., Nishikawa M., Zang L., Ando M., Hattori K., Takahashi Y., Watanabe Y., Takakura Y., *J. Gene Med.*, **11**, 435–443 (2009).
- 21) Kako K., Nishikawa M., Yoshida H., Takakura Y., *J. Pharm. Sci.*, **97**, 3074–3083 (2008).
- 22) Grassegger A., Höpfl R., *Clin. Exp. Dermatol.*, **29**, 584–588 (2004).
- 23) Hattori K., Nishikawa M., Watcharanurak K., Ikoma A., Kabashima K., Toyota H., Takahashi Y., Takahashi R., Watanabe Y., Takakura Y., *J. Immunol.*, **184**, 2729–2735 (2010).