

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

神野 正人

論文題目

in vivo 低電圧電気穿孔法を用いたハムスター口腔パ
ピローマウイルス腫瘍モデルにおける癌化抑制 DNA
ワクチンの基礎的研究

I. 緒言

DNA ワクチンはプラスミド DNA (naked pDNA) と呼ばれる細菌由来の環状 DNA に抗原を発現する遺伝子を組み込んだもので、生体に投与するとその抗原に特異的な免疫反応を誘導する。また、製法が簡便でコストも抑えられるため、感染症やアレルギー疾患やがんなどに対する新たなワクチンとして、臨床応用が進んでいる。ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染は子宮頸癌およびその前癌病変の最大のリスクファクターと言われており、口腔癌や頭頸部癌においても HPV が関与していると報告されている。しかし、HPV には種特異性があり、ヒト以外の動物に感染しないことから、*in vivo* での感染実験を行い、ウイルスによる癌化と DNA ワクチン接種の関係を直接証明することは不可能である。このため、HPV 感染の病態に非常に類似しているハムスター口腔パピローマウイルス腫瘍モデル (HOPV 腫瘍モデル) を本研究で用いた。これは、発癌物質である 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) を用いて 6~8 週という短期間にハムスターの口腔粘膜に扁平上皮癌を誘発できる腫瘍モデルである。また、HOPV ゲノムの主要遺伝子である L1 領域の naked pDNA を HOPV 腫瘍モデルに接種したときに癌化抑制効果があることが報告されている。

DNA ワクチンの癌化抑制効果を高めるには、いかに DNA ワクチンを標的細胞内に取り込ませ、持続的にタンパクを発現させるかが重要であり、DNA ワクチンのデリバリーシステムの検討が必要である。近年、デリバリ

ーシステムの一つとしてパルス状高電圧を利用した電気穿孔法が開発され、薬剤や DNA を生体細胞に高率に取り込ませることが報告されている。

そこで本研究では、種々の *in vivo* 低電圧パルス状電圧負荷による DNA ワクチンの癌化抑制効果を HOPV 腫瘍モデルを用いて検索し、DNA ワクチンのデリバリーシステムとしての *in vivo* 低電圧電気穿孔法の有用性について検討した。

II. 実験方法および材料

1. DNA ワクチンの作成

HOPV のゲノムより L1 領域を PCR で増幅してクローニングし、EcoR I で切り出しを行った。その後、pVAX1 ベクターを用いて大腸菌にて増殖させ、L1 遺伝子の pDNA を回収して naked pDNA ワクチン(pHOPV-L1) とし、100 μ g を 100 μ l 生理食塩水に溶かして使用した。

2. DNA ワクチンの接種方法と電気穿孔処置および HOPV 腫瘍モデル

実験には 3 週齢の雄性ゴールデンハムスター 80 匹を用いた。未処置群(N)には pVAX1 のみ 100 μ g を 100 μ l 生理食塩水に溶かして接種した。ワクチン投与単独群(V)では pHOPV-L1 100 μ g を 100 μ l 生理食塩水に溶かして接種した。電気穿孔単独群 (E50, E100, E200) では、pVAX1 を接種した後に電気穿孔処置を行った。pVAX1 および pHOPV-L1 の接種は、動物の

左側大腿四頭筋に行った。ワクチン投与電気穿孔群 (VE50, VE100, VE200) では pHOPV-L1 を接種した後に電気穿孔処置を行った。電気穿孔処置は、ピンセット型電極を用いて低電圧のパルス状電圧(50、100、200 V/cm)を 8 回、20 ms、1 Hz で負荷した。これらの処置後に以下の発癌処置を行った。DMBA を 0.5%アセトン溶液として週 3 回、8 週間、舌に塗布した後、舌尖部を 2 mm 切除して DMBA を 13 日間毎日塗布した。処置の終了 1 日後に動物を麻酔下で屠殺し、処置部の癌化抑制についての検討を行った。また、すべての実験動物は、実験期間中、1 週間ごとに体重を計測した。

3. 癌化抑制の検討

全ての動物は発癌処置後、舌組織を病理組織学的に検索した。また、舌切除時および実験終了時のパラフィン切片より DNA を抽出し、HOPV の L1 領域および対照として β -actin を検索して real-time PCR での HOPV-L1/ β -actin の値を求め、HOPV の感染状況について検討した。本研究における動物の使用は、愛知学院大学歯学部動物実験指針に従って行った (承認番号 DE20067)。

III. 結果

1. 病理組織学的検索による癌化抑制の検討

N 群および E50、E100、E200 群ではすべての動物の舌に癌化が認められ、体重は減少傾向を示した。病理組織学的には、高分化型の扁平上

皮膚癌が認められた。V群では、10匹中4匹に癌化抑制が認められたが、N群およびE50、E100、E200群との間に有意差は認められなかった。癌化しなかった動物では体重の増加がみられ、病理組織学的には、舌尖部切除後の創傷治癒が進んだ上皮および線維性結合組織の増生が認められた。VE50、VE100、VE200群では、各々10匹中の5、7および9匹の動物に癌化抑制がみられ、V群との比較では有意差が認められなかったものの、N群およびE50、E100、E200群との比較においては有意差が認められた。また、癌化しなかった動物では体重の増加がみられ、組織学的にも異常は認められなかった。しかし、V群およびVE50、VE100、VE200群の癌化した動物では一時的な体重増加は認められたが、最終的には減少傾向を示し、病理組織学的にはN群の動物と同様な扁平上皮癌であった。以上の結果から、DNAワクチン投与と*in vivo*低電圧電気穿孔法を行ったVE50、VE100、VE200群で癌化抑制効果が認められ、また、その電圧においては、200V、100V、50Vの順に抑制効果が高いことが判明した。

2. HOPV 感染について

N群およびE群では発癌処置後からHOPVが増加していた。V群およびVE50、VE100、VE200群の癌化を認めた動物ではHOPVが増加していたが、癌化が認められなかった動物ではほとんど変化はみられな

かった。

IV. 考 察

DNA ワクチンは、設計・製造の容易さ、特異抗体や細胞傷害性 T 細胞の誘導能、優れた熱安定性・保存性など、従来のワクチンに比べていくつもの有利な点を有する。また、DNA ワクチンは細胞性免疫と体液性免疫の両方を誘導できる。DNA ワクチンの本体であるプラスミド DNA は、一般的に注射器による筋肉内注射法または遺伝子銃を用いた皮下接種法によって生体へ導入される。筋肉内注射法の場合、筋細胞や筋肉組織中の抗原提示細胞にプラスミド DNA が取り込まれ、生合成されたタンパクは適当な長さに分解されてから MHC クラス I 分子に提示されて CD8 陽性 T 細胞を活性化する。DNA ワクチンの効果を高めるには、いかに DNA ワクチンを細胞内に取り込ませ、持続的にタンパクを発現させるかが重要である。本研究では、HOPV 腫瘍モデルに pHOPV-L1 を DNA ワクチンとして筋肉内に接種する際に *in vivo* 低電圧電気穿孔法を用いた結果、電気穿孔法を行わなかったワクチン投与単独群と比較して癌化抑制した個体数の増加がみられた。また、癌化抑制効果は 200 V、100 V、50 V の順に高かった。さらに、real-time PCR での HOPV-L1/ β -actin の値は、低電圧電気穿孔法を用いた DNA ワクチン投与群の癌化しなかった動物では低かった。特に、50 V/cm から

DNA ワクチンの癌化抑制効果が高められることが判明した。これらの結果より、生体に熱傷等の副作用を起こさない低電圧の *in vivo* 電気穿孔法は安全性も高く、ヒトの HPV 感染における DNA ワクチンの使用において *in vivo* 低電圧電気穿孔法はデリバリーシステムの一つとして効果が期待できることが考えられた。今後の課題として、DNA ワクチンの投与方法は非常に重要であり、その感染ウイルスの種類と病変を考慮して行うことが必要と思われた。また、さらなる HOPV DNA ワクチンのデリバリーシステムの検討を行い、その他の HOPV 主要遺伝子を用いた DNA ワクチンの創製と使用方法の検討が必要であることが示唆された。

V.まとめ

本研究の結果より、DNA ワクチンのデリバリーシステムとして *in vivo* 低電圧電気穿孔法は有用であり、また、安全性の高いことが判明した。今後は、感染予防のためだけでなく、HOPV の主要遺伝子の E6、E7 を用いた癌治療用の DNA ワクチンの開発が必要であると考えられた。また、ヒトでの HPV 感染に対する DNA ワクチンの臨床応用に貢献できることが示唆された。