

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	甲 ⑦ 第 号	論文提出者名	神野 正人
論文審査 委員氏名	主査 前田 初彦 副査 千田 彰 栗田 賢一 河合 達志		
論文題名	<i>in vivo</i> 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		

インターネットの利用による公表用

DNA ワクチンは細菌由来の環状 DNA (プラスミド DNA , naked pDNA) に抗原を発現する遺伝子を組み込んだもので、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、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であり、口腔癌や頭頸部癌においても HPV が関与していることが報告されている。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、ウイルスによる癌化と DNA ワクチン接種の関係について感染実験を用いて直接証明することは不可能である。また、DNA ワクチンの癌化抑制効果を高めるには、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ためのデリバリーシステムの検討が必要である。近年、その方法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。

本研究ではハムスターの口腔粘膜に扁平上皮癌を誘発できるハムスター口腔パピローマウイルス (HOPV) 腫瘍モデルを用い、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癌化抑制効果について、HOPV 腫瘍モデルを用いて検討したものである。

本実験では、HOPV のゲノムより L1 領域をクローニングした後、pVAX1 ベクターを用いて大腸菌にて増殖させ、回収した L1 遺伝子の pDNA を naked

pDNA ワクチン(pHOPV-L1)として使用している。

実験動物には雄性ゴールデンハムスターを用い、未処置群(N)には pVAX1のみ、ワクチン投与単独群(V)では pHOPV-L1 を接種している。電気穿孔単独群(E50, E100, E200)では pVAX1 を接種した後に、また、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、それぞれ、低電圧(50, 100, 200V/cm)のパルス状電圧による電気穿孔処置を行っている。これらの処置後に舌尖部に発癌処置を行い、発癌処置後には舌組織の病理組織学的検索および HOPV の感染状況について検索し、癌化抑制についての検討を行っている。

これらの実験の結果、以下の所見を得たとしている。

N群およびE50、E100、E200群ではすべての動物の舌に癌化がみられ、病理組織学的には分化型の扁平上皮癌が認められた。V群では、10匹中4匹に癌化抑制がみられた。これらの動物では、病理組織学的に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、N群およびE50、E100、E200群との比較では有意差が認められている。また、癌化しなかった動物では、組織学的に異常はみられなかった。しかし、V群およびVE50、VE100、VE200群の癌化した動物では、病理組織学的に扁平上皮癌が認められた。また、N群およびE群では発癌処置後からHOPVが増加しており、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。

以上の結果から、DNA ワクチンのデリバリーシステムとして *in vivo* 低電圧電気穿孔法を用いることにより、癌化抑制効果が高められたとしている。

本研究では、HOPV 腫瘍モデルに DNA ワクチンを接種する際に *in vivo* 低電圧電気穿孔法を用いた結果、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認められている。また、その癌化抑制効果は 200 V、100 V、50 V の順に高いとしている。これらの結果より、*in vivo* 低電圧電気穿孔法は安全性も高く、ヒトの HPV 感染に対する DNA ワクチンのデリバリーシステムの一つとしての可能性を示唆している。

以上のことから本論文では、DNA ワクチンのデリバリーシステムの一つとして *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と結論づけている。

本研究は、DNA ワクチンのデリバリーシステムの一つとして *in vivo* 低電圧電気穿孔法が有用であり、また、DNA ワクチンの効果が高まることにより臨床応用の可能性を示唆するものであり、口腔病理学、歯科保存学、口腔外科学、歯科理工学および関連諸学科に寄与するところが大きい。よって本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。