

# 学位論文内容の要約

愛知学院大学

乙 第 号	論文提出者 神野 正人
論文題目  <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	

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。

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)として使用した。

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 を接種した。電気穿孔単独群 (E50, E100, E200) では、pVAX1 を接種した後に、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、低電圧のパルス状電圧による電気穿孔処置を行った。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て癌化抑制についての検討を行った。

これらの実験の結果、以下の所見を得た。

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、病理組織学的には分化型の扁平上皮癌がみられた。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、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が、N 群および E50、E100、E200 群との比較では有意差が認められた。また、癌化しなかった動物では、組織学的にも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、病理組織学的には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 ワクチン投与と低電圧電気穿孔法の併用により癌化抑制効果が認められた。

本研究では、HOPV 腫瘍モデルに DNA ワクチンを接種する際に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みられた。また、癌化抑制効果は 200 V、100 V、50 V の順に高くなっていた。これらの結果より、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 ワクチンの使用におけるデリバリーシステムの一つとして効果が期待できる。また、今後の課題として、癌治療用の DNA ワクチンの開発が必要であるとも考えられ、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。

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。