

受理年月日	受理番号

## 帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成29年 5月 31日

採択番号	6		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川義文
研究課題名	環境応答性脂質様物質からなる DNA 搭載ナノ粒子の 原虫予防ワクチンへの応用		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	あきた ひでたか 秋田 英万	千葉大学大学院薬学研究院薬物学研究室・教授	
研究分担者			
	にしかわ よしふみ 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・	
研究期間	平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月 31日		
目的・趣旨	<p>DNA ワクチンは、抗原をコードする DNA を用いて、抗原特異的免疫を誘導するワクチン技術である。本技術では、抗原が細胞質に発現する事から、MHC Class-I 分子による抗原提示を介した、細胞性免疫の誘導に優れる。細胞性免疫は従来の不活化ワクチンでは誘導が困難であり、ウイルス・原虫感染やがん等に有効な免疫である事から、DNA ワクチンは従来ワクチンでは予防・治療が困難な疾病に対する次世代ワクチンとして期待されている。一方、DNA はその高い水溶性から、細胞膜等の生体膜を突破する事が困難であることから、DNA ワクチンの開発には、効率的に DNA を導入可能なキャリアが必要不可欠である。本研究では、当研究室で独自に開発された、環境応答性脂質様物質 (ss-cleavable Proton-Activated Lipid-like Material: ssPalm) を用いた、効率的な DNA ワクチンキャリアを創製し、原虫 (トキソプラズマ) に対するワクチンへの応用を試みた。</p>		
研究経過の概要	<p>ssPalm は親水性ユニットと疎水性ユニットからなる分子であり、疎水性ユニットの種類に応じて、体内動態や送達可能な核酸の種類が異なる事が明らかとなっていた。そのため、初めに皮下投与型 DNA キャリアとして有用な ssPalm を、In Vivo Imaging System (IVIS) を用いたルシフェラーゼ遺伝子導入能、及びモデル抗原であるオボアルブミン (OVA) を用いた抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte: CTL) 活性により評価した。その後、DNA ワクチンキャリアとして最も有効であった ssPalm を用いて、予防的抗腫瘍効果を評価すると同時に、トキソプラズマに対する予防的効果の検証をおこなった。トキソプラズマ (<i>Toxoplasma gondii</i>) は、様々な哺乳類や鳥類に感染しトキソプラズマ症を引き起こす細胞内寄生虫である。分担研究者である西川准教授により同定されたトキソプラズマ感染に対するワクチン抗原である TgPF を用いて、本抗原をコードする pDNA を ssPalm からなるナノ粒子により導入した際の、抗原虫感染の評価を、生存率を指標に評価をおこなった。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>ssPalm には、脂溶性足場としてミリスチン酸を持つ ssPalmM、ビタミン A (レチノイン酸) 骨格を持つ ssPalmA、ビタミン E (<math>\alpha</math>-トコフェロール) 骨格を持つ ssPalmE が開発されてきた。これらから構成される pDNA 内封脂質ナノ粒子 (Lipid Nano Particle: LNP) の中で、最も効率的な DNA ワクチンキャリアとなる LNP を明らかとするため、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼを用いて評価をおこなった。ルシフェラーゼ遺伝子をコードする pDNA を各種 ssPalm からなる LNP に封入し、マウス皮下へ投与後、24 時間後に基質であるルシフェリンを投与した際の、発光強度を指標にルシフェラーゼ活性を評価した。その結果、ビタミン E 骨格を持つ ssPalmE-LNP において、最も高いルシフェラーゼ活性が認められた。本活性は pDNA の単体投与、及び市販の遺伝子導入試薬である Lipofectamine2000 との複合体として投与した場合と比較しても高かった。</p> <p>次に、in vivo における細胞性免疫誘導能を評価するため、モデル抗原である OVA をコードする pDNA (pDNA-OVA) を各種 ssPalm からなる LNP に封入し、マウス皮下へ投与した。投与から 7 日後に、OVA 特異的細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte: CTL) 活性を、in vivo CTL assay により評価した。本評価法は、OVA 抗原ペプチドを人為的に提示させた脾臓細胞を、マウスへ投与した際の減少率を元に算出する方法である。その結果、ルシフェラーゼ活性と同様に、ssPalmE-LNP により pDNA-OVA を導入されたマウスにおいて、最も高い CTL 活性が認められた。以上の結果より、ssPalmE-LNP は、生体内における抗原タンパク質の発現を伴う、強力な CTL 活性が誘起することが明らかとなった。</p> <p>ssPalmE-LNP の DNA ワクチンとしての有用性を評価するため、腫瘍に対する予防的効果、及び原虫感染に対する予防効果の検証を行った。腫瘍に対する評価は、OVA を発現するリンパ腫である E.G7-OVA を用いておこなった。OVA-pDNA を ssPalmE-LNP によりマウスへ免疫し、その 7 日後に E.G7-OVA をマウス脇腹へと皮下移植し、その後の腫瘍体積を経時的に測定した。その結果、OVA-pDNA 単体投与群では腫瘍の成長が抑制されなかった一方で、ssPalmE-LNP 投与群においては腫瘍移植後 12 日目まで有意に腫瘍成長が抑制されることが明らかとなった。また、ssPalmE-LNP 投与群のマウス 5 匹中 4 匹において、腫瘍移植から 24 日の時点まで腫瘍の成長が完全に抑制された。</p> <p>次にトキソプラズマ (PLK 株) 感染に対する予防効果の検証をおこなった。トキソプラズマ由来の抗原である TgPF をコードした pDNA (TgPF-pDNA) を ssPalmE-LNP によりマウスへ免疫した。免疫は 2 週間毎に 3 回行った。3 回目の ssPalmE-LNP の投与から 2 週間後、トキソプラズマ (PLK 株) をマウスへ皮下投与することで感染させ、感染後 30 日までの生存率を評価した。その結果、DDW 投与群では生存率が 12.5%、トキソプラズマ由来の遺伝子を含まない non-coding-pDNA を内封した ssPalmE-LNP 投与群では 30%であったのに対し、TgPF-pDNA を内封した ssPalmE-LNP 投与群では 87.5%であった。この結果から、TgPF-pDNA 内封 ssPalmE-LNP の投与によりトキソプラズマ感染後の生存率が有意に上昇することが明らかとなった。以上の結果より、ssPalmE-LNP は、腫瘍や原虫感染を予防可能な DNA ワクチンキャリアである事が明らかとなった。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>現時点で研究成果の発表は行っていないが、論文投稿前の必要な最終データを取得している。</p>

(様式1-3)

受理年月日	受理番号