

平成30年6月11日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11031

研究課題名(和文) 癌抑制DNAワクチン包埋CPHナノ粒子の経口腔粘膜デリバリーシステムの基礎的研究

研究課題名(英文) Fundamental study on delivery system of DNA vaccine-embedded CPH nanoparticles for cancer prevention using oral mucosa

研究代表者

前田 初彦 (MAEDA, HATSUHIKO)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：30175591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：パピローマウイルス感染による口腔領域の癌化をDNAワクチン接種により抑制するため、DNA抗原包埋疎水性プルランナノ粒子(CPHナノ粒子)とテープストリッピング法による経口腔粘膜のデリバリーシステムを検討した。その結果、DNAワクチン包埋CPHナノ粒子のテープストリッピング法による経口腔粘膜のデリバリーシステムは癌化抑制に有用であることが示唆され、HPV関連口腔癌の予防に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The delivery system of DNA vaccine-embedded hydrophobic pullulan nanoparticles (CPH nanoparticles) with tape stripping method using oral mucosa for cancer prevention, that associated papillomavirus infection, was studied. As a result, it was suggested that DNA vaccine-embedded CPH nanoparticles with tape stripping method was useful for cancer prevention. Therefore, it contributes to the papillomavirus-induced oral cancer prevention.

研究分野：医歯薬学・歯学・形態系基礎歯学

キーワード：DNAワクチン パピローマウイルス ナノスフェア CPHナノ粒子 テープストリッピング法 ドラッグデリバリー 口腔 癌抑制効果

1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス (HPV) が種々の前癌ならびに癌病変に検出されることから、HPV 感染と発癌との関連が多く注目を集めている。しかし、HPV には種特異性があり、HPV は動物に感染しないことから、HPV についての *in vivo*での感染実験を用いた癌化の証明は不可能である。我々は、dimethyl benzanthracene (DMBA) を用いて短期間でハムスターの舌粘膜に上皮性異形成、扁平上皮癌を誘発できる実験系を確立した¹⁾。この方法により誘発された上皮性異形成にパピローマウイルス共通抗原が検出され²⁾、さらに電子顕微鏡的にもこの病変内にパピローマウイルス様粒子が検出され、我々は、この病変から新しいハムスター口腔パピローマウイルス (HOPV) を分子クローニングすることに成功した³⁾。この分子クローニングされたウイルスゲノムの塩基配列の解析決定を行い、この発癌モデルにおける HOPV の関与について解析した。HOPV は、HPV 感染の病態に非常に類似していることから、この発癌モデルは、パピローマウイルス感染による発癌過程における HOPV の役割を短期間で解析するうえで有用なモデルであることが判明し、この癌化過程で HOPV が重要な働きをしていることが明らかになった。そこで、HOPV の各主要遺伝子を増幅して発現プラスミドに挿入し、naked pDNA を作製し DNA ワクチンとした。これらの naked pDNA を上記の発癌モデルに接種して、その効果を検索したところ、HOPV のゲノムの主要遺伝子、特に L1 領域の naked pDNA を接種したときに癌抑制効果があることが示唆された⁴⁾。また、DNA 複合体 (pDNA / mBSA、プルラン複合体) を用いてパピローマウイルスが関与する癌化抑制に有効な DNA ワクチンを検討した結果、naked pDNA よりも DNA 複合体の DNA ワクチンの方が癌抑制効果が高く、細胞への取り込みが良好なことや骨格筋 (大腿四頭筋) への投与が効果的なことも示唆された。また、デリバリーシステムとして電気穿孔法の併用が有用であることが判明した。さらに、デリバリーシステムとして、分解性高分子からなるナノサイズのキャリアー (PLGA ナノ粒子) を DNA ワクチンのキャリアーとして用いて持続的に遺伝子発現させ、pDNA をナノ粒子に封入し表面に正電荷を持たせて組織親和性を持たせることやその放出を制御することが可能となり、効率のよいデリバリーシステムとなり得ることをすでに報告した。

がんや新興の感染症などの重大疾患では、効果的でしかも安全と簡便さを兼ね備えたワクチン法及び抗原デリバリーシステムの開発が急務の課題となっている。口腔粘膜にはその粘膜及び真皮層に、がんや病原体への免疫監視に必須な T 細胞を介した免疫応答を強力に惹起できる樹状細胞と呼ばれている抗原提示細胞が高密度で常在しているため、エピトープをコードした DNA や RNA 抗原

のワクチンデリバリーのための最適組織であり、近年がんや感染症を始め種々の新規ワクチン法での応用が期待されている。

天然多糖のプルランをコレステロールで化学修飾することで疎水性を付加させた CHP は、生理的条件下でナノメートルサイズの球状粒子となり、内部に様々な DNA・RNA 抗原や抗原ペプチド及びタンパク質を包埋できる。CHP 自体はランゲルハンス細胞 (LC) などの樹状細胞に補食されやすく、CHP は樹状細胞による効率的なクロスプレゼンテーションを促すため、特異的なキラー T 細胞 (CTL) を大量に誘導することが可能である。DNA 抗原を包埋した CHP をテープストリッピングした口腔粘膜に塗布すれば、タイトジャンクションに突起を伸ばした口腔粘膜 LC に効率的に取り込まれ、LC は活性化及びリンパ管輸送の後に、リンパ節内で爆発的に特異的 CTL を誘導する可能性がある。また、テープストリッピング法は、粘着テープによる角化層の除去を行うことで抗原ペプチドや抗原タンパクなどを表皮内に到達させるための方法で、角化層を一部剥離するだけであり、二次感染はほとんど無く安全性が高い、簡便な方法である。

2. 研究の目的

独自の HOPV の発癌動物モデルを用いて、パピローマウイルス感染による癌化を CPH ナノ粒子のテープストリッピング法を用いた経口腔粘膜抗原デリバリーシステムにより抑制し、DNA 抗原の樹状細胞の取り込みおよび、それら CTL の動態を解析してより効率のよい抗原デリバリーシステムを開発することを目的としている。

DNA ワクチンの安全性と簡便性および効率化を目指した CPH ナノ粒子とテープストリッピング法を用いた経口腔粘膜抗原デリバリーシステムの研究はなく、本研究は、ヒトのパピローマウイルス感染での癌化予防および治療の研究におおいに貢献すると考えられ、本研究結果を基にして、さらにヒトでの癌予防とワクチン治療に大きく寄与すると考えられる。

そこで本研究では、安全で簡便な効果の高い臨床応用を見据えた CPH ナノ粒子とテープストリッピング法を利用した DNA ワクチンの最適なデリバリーシステムを開発した。これには、デバイスとしての DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子とテープストリッピング法による経口腔粘膜のデリバリーシステムを用いて検討を行った。

3. 研究の方法

ハムスター発癌モデルを用いて、効果的な臨床応用を考えた DNA 抗原包埋 CPH ナノ粒子とテープストリッピング法による経口腔粘膜のデリバリーシステムをを検討した。これには、CPH ナノ粒子に HOPV の L1 領域の主要遺伝子の naked pDNA を包埋して、DNA ワクチン

のデバイスとして使用した。また、この DNA 抗原包埋 CPH ナノ粒子をテープストリッピングした口腔粘膜に塗布して、細胞取り込みと共に癌化抑制効果を検索した。また、HPV 感染の実態を研究解析した現在までの研究結果をふまえて、ハムスター発癌モデルとヒトパピローマウイルス関連癌由来の細胞を用いて以下の方法で解析した。

(1) DNA ワクチンの作成

クローニングした HOPV のゲノムの主要遺伝子 L1 を用いて、これらを発現プラスミドに組み込み、naked pDNA による DNA ワクチンを作製した。

作成方法は、下記に示した。HOPV の L1 領域のオープンリーディングフレームを下記のプライマーを用いて増幅して、TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, CA, USA) を用いてクローニングした。これらのプライマーは、各遺伝子の開始コドン (太文字 ATG) を含むだけでなく、EcoRI サイト (小文字 Ccggaattccg) を 5' 側に付加した。

HOPV-L1 (EcoRI site: Ccggaattccg)

5' CcggaattccgGATGTGGATGCAACCATCAGGCAAGC T 3'

5' CcggaattccgTAAGAGGCGTAAAAAGTAAATGTCAA T3'

HPV-L1 (EcoRI site: Ccggaattccg)

5' CcggaattccgCCAGATCTATGTCTCTTTGGCTGCC TAGTGAGGC 3'

5' CcggaattccgCCAGATCTTTACAGCTTACGTTTTT TGCCTTTAG 3'

その後、EcoRI で切断して pVAX1 (Invitrogen, CA, USA) vector を用いて大腸菌にて増殖させた。これらのプラスミド DNA を QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) で精製して DNA ワクチンとした。また、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, New Jersey, USA) を用いて ABI PRISM[™] 3100 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, New Jersey, USA) により DNA の塩基配列を確認した。DNA ワクチンは、100 μ g を 100 μ l 生理食塩水に溶かして使用した。

(2) DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子とテープストリッピング法による経口腔粘膜のデリバリーシステムの口腔粘膜での動態の解析

作成した L1 naked pDNA を CPH ナノ粒子に包埋し表面に正電荷を持たせて DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子とした。実験動物 (雄性ゴールデンハムスター) の頬粘膜でテープストリッピング法により角化層を一部除去して、作成した DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子を塗布した。今までの研究結果を参考にして、塗布量は、100 μ g / 100 μ l 生理食塩水として行った。細胞内取り込みに関して、トレーサーは、蛍光ナノクリスタル (Qdot[®], Invitrogen, CA, USA) を用いて DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子を標識した。

(3) DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子とテープストリッピング法による経口腔粘膜のデリバリーシステムの癌化抑制の解析

① DNA ワクチン接種と発癌処置および癌化抑制の解析

実験動物 (3 週齢雄性ゴールデンハムスター) は、免疫群 10 匹と非免疫群 10 匹にわけた。免疫群には L1 遺伝子の naked pDNA (100 μ g/100 μ l) DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子を 2 回、3 週の間をおいてそれぞれ接種した。ワクチン接種の方法は、実験動物の頬粘膜を、テープストリッピング法により角化層を一部除去して、作成した DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子を塗布した。その後、発癌処置を行った。非免疫群には、ベクターのみの包埋 CPH ナノ粒子を同様に接種した。発癌処置は、8 週間、DMBA を週 3 回の割合で舌尖に塗布した。その後、舌尖を 2mm 切除する創傷を加えて、さらに 2 週間、連日舌尖に DMBA 塗布を行った。その後、病理組織学および分子生物学的に癌抑制効果を解析した。

② ヒトパピローマウイルス (HPV) 関連癌由来の細胞 (CaSki) における癌化抑制の解析

HPV の主要遺伝子である L1 naked pDNA を包埋して、DNA ワクチンのデバイスとして使用して、HPV 関連癌由来の細胞 (CaSki) における癌化抑制の解析を行った。実験動物 (C.B-17/lcr-scid/scidJcl) を免疫群 (10 匹) と非免疫群 (10 匹) にわけ、①と同様に免疫群には 2 回の DNA ワクチン接種を 3 週の間をおいて行なった。接種方法は、実験動物の頬粘膜をテープストリッピング法により角化層を一部除去後、DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子を塗布した。その後、ヒトパピローマウイルス関連癌由来の細胞 (CaSki) をマウスに背部皮下に移植して癌化抑制を解析した。

4. 研究成果

(1) DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子とテープストリッピング法による経口腔粘膜のデリバリーシステムの口腔粘膜での動態の解析

DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子の口腔粘膜細胞内の取り込みを蛍光ナノクリスタルにて解析した結果、塗布後 2 時間で口腔粘膜上皮内の樹状細胞 (ランゲルハンス細胞) や口腔粘膜上皮下のマクロファージ等および筋細胞に蛍光が認められ、それらの細胞内の取り込みが確認できた (図 1)。

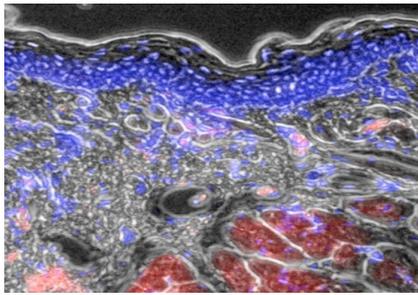


図1 DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子の口腔粘膜細胞内の取り込み。一部の口腔粘膜上皮内の樹状細胞(ランゲルハンス細胞)や口腔粘膜上皮下の細胞(マクロファージ等)および筋細胞に取り込みが認められる(赤色)。

(2) DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子とテープストリッピング法による経口腔粘膜のデリバリーシステムの癌化抑制の解析

研究の方法の(3)の①のごとく DNA ワクチン接種と発癌処置を行った結果、非免疫群では全ての実験動物の舌組織に上皮性異形成や扁平上皮癌の形成が認められた。免疫群では、3匹の実験動物には、上皮性異形成や扁平上皮癌はみられず、正常な創傷治癒が起きていた。

以上の結果から、ハムスター口腔パピローマウイルス(HOPV)の発癌モデルを用いた DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子とテープストリッピング法による経口腔粘膜のデリバリーシステムにより癌化抑制が確認された。

(3) ヒトパピローマウイルス(HPV)関連癌由来の細胞(CaSki)における癌化抑制の解析

研究の方法の(3)の②のごとく DNA ワクチン接種と発癌処置を行った結果、免疫群では非免疫群に比べて移植腫瘍の増大の抑制傾向が認められた。

(4)まとめ

DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子とテープストリッピング法による経口腔粘膜のデリバリーシステムを用いることにより、口腔粘膜上皮のランゲルハンス細胞およびマクロファージ等に DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子が取り込まれていることが判明した。

この結果を基に、DNA ワクチン包埋 CPH ナノ粒子とテープストリッピング法による経口腔粘膜のデリバリーシステムの癌化抑制の解析を HOPV の発癌モデルを用いて行った。CPH ナノ粒子に HOPV の主要遺伝子である L1 naked pDNA を包埋して、DNA ワクチンのデバイスとして使用した。その結果、免疫群では非免疫群に比べて高い癌化抑制が認められた。さらに、HPV の主要遺伝子である L1 naked pDNA を包埋して、DNA ワクチンのデバイスとして使用して、HPV 関連癌由来の細胞(CaSki)における癌化抑制の解析を行った。この結果、免疫群では非免疫群に比べて

移植腫瘍の増大の抑制傾向が認められた。

以上の結果より、DNA ワクチンのテープストリッピング法による経口腔粘膜のデリバリーシステムは癌化抑制に有用であることが示唆された。本研究は、HPV 感染での癌化予防の治療に大いに貢献すると考えられる。

さらに、口腔粘膜にはその粘膜及び真皮層に、がんや病原体への免疫監視に必須な T 細胞を介した免疫応答を強力に惹起できる樹状細胞(ランゲルハンス細胞)と呼ばれる抗原提示細胞が高密度で常在しているため、エピトープをコードした DNA や RNA 抗原のワクチンデリバリーのための最適組織と考えられた。また、テープストリッピング法は簡便で安全に口腔粘膜の角化層を除去でき、CPH ナノ粒子は樹状細胞に捕食されやすく、この組み合わせによる口腔粘膜デリバリーシステムは効果が期待できる。このシステムは、がんや感染症を始め種々の新規ワクチン法での応用が期待される。

<引用文献>

- ① Maeda H, Kameyama Y, Effect of excisional wounding on DMBA-induced hamster tongue carcinogenesis, J Oral Pathology, 1986, 15, 21-27
- ② Maeda H, Kameyama Y, Nakane S, Takehana S, Sato E, Epithelial dysplasia produced by carcinogen pretreatment and subsequent wounding, Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology, 1989, 68, 50-56
- ③ Iwasaki T, Maeda H, Kameyama Y, Moriyama M, Kanai T, Kurata T, Presence of a novel hamster oral papillomavirus in dysplastic lesion of hamster lingual mucosa induced by application of dimethylbenzanthracene and excisional wounding: molecular cloning and complete nucleotide sequence, J General Virology, 1997, 78, 1087-1093
- ④ Maeda H, Kubo K, Sugita Y, Miyamoto Y, Komatsu S, Takeuchi S, Umebayashi T, Morikawa S, Kameyama Y, DNA vaccines against hamster oral papillomavirus associated oral cancer. J Int Med Res, 2005, 33, 647-653

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Masato Jinno, Madoka Isomura, Nobuaki Sato, Yasuyoshi Torii, Waka Yoshida, Yoshihiko Sugita, Katsutoshi Kubo, Hatsuhiko Maeda, Enhancement of DNA Vaccine Potency Against Hamster Oral

Papillomavirus-Associated Oral Cancer by Electroporation in vivo, Journal of Hard Tissue Biology, 査読有、26(2)、2017、127-134
DOI: <https://doi.org/10.2485/jhtb.26.127>
②前田初彦、口腔領域におけるヒトパピローマウイルス感染 -ヒトパピローマウイルスの最新知見-愛知学院大学歯学会誌、査読有、55(4)、2017、301-309

[学会発表] (計 2 件)

① Hatsuhiko Maeda、HPV and Oral and Oropharyngeal Cancer、11th IADR World Congress on Preventive Dentistry (WCPD)、2017

② Hatsuhiko Maeda、Human papilloma viruses in Oral Carcinoma and Oral Potentially Malignant Disorders -Trends and Innovations on Oral Cancer-、Jazan International Dental Conference、2017

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 初彦 (MAEDA Hatsuhiko)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：30175591

(2) 研究分担者

久保 勝俊 (KUBO Katsutoshi)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号：6032964

(3) 連携研究者

杉田 好彦 (SUGITA Yoshihiko)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号：20367618

(4) 連携研究者

佐藤 恵美子 (SATO Emiko)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号：60111001

(5) 連携研究者

吉田 和加 (YOSHIDA Waka)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号：10513210