

令和元年6月10日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08415

研究課題名(和文) 経鼻投与型リポソームワクチンを用いた新規非侵襲性子宮頸がんワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of a nasal therapeutic vaccine to cervical cancer using liposomes

研究代表者

新槇 幸彦 (Aramaki, Yukihiko)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90138959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸がんはヒトパピローマウイルス(HPV)の持続感染を病因とするものが多いと考えられている。そこで当教室の正電荷リポソームを用いた経鼻投与型粘膜ワクチンシステムによるがん治療ワクチンの開発を目指した。その結果、正電荷リポソームと抗原蛋白質の経鼻投与により、抗原特異的血清IgG2cの亢進と免疫マウスリンパ球の抗原特異的IFN-g産生誘導が見られた。これらのことから、正電荷リポソームを用いた経鼻投与型粘膜ワクチンシステムは細胞傷害性T細胞(CTL)活性を誘導可能であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸がんを克服するためにはHPVの持続感染リスクを低減する予防ワクチン、あるいは発症後にがんを除去する治療ワクチンが考えられる。しかしながら、子宮頸がんに対する治療ワクチンは上市されていない。本研究の成果は、子宮頸がんワクチンなどに対する経鼻投与型の治療用ワクチンに繋がることが期待される。このことにより、女性の死因の一因である子宮頸がんの克服に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human papillomavirus (HPV) is well recognized as an essential cause of cervical cancer. In this study, we attempted to develop a therapeutic vaccine against cancer using the nasal liposomal vaccine system. We have found that intranasal administration of the antigenic proteins with cationic liposomes exerted antigen-specific immune responses, namely antigen-specific serum IgG2c productions and CTL reactions. These results implied that the nasal vaccine system using the cationic liposomes might be useful for the induction of antigen-specific CTL reactions in mice.

研究分野：薬剤学

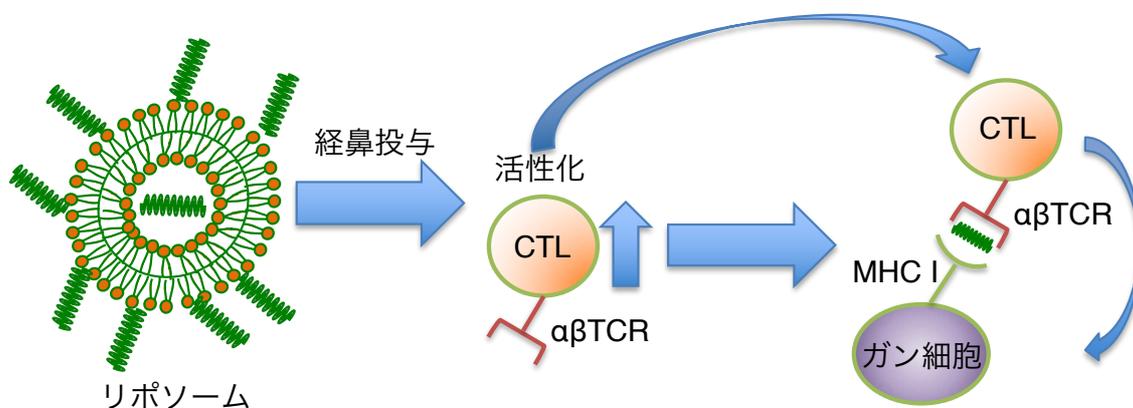
キーワード：粘膜ワクチン がんワクチン リポソーム 子宮頸がん ヒトパピローマウイルス

1. 研究開始当初の背景

子宮頸がんはヒトパピローマウイルス (HPV) の持続感染を病因とするものが多く、発症原因の9割以上を占めると考えられている。すなわち、子宮頸がんはガンの中でも病因が明らかであると言え、ワクチンによる予防または治療が可能なガン的一种と思われる。既存の子宮頸がんワクチンはHPVの持続感染リスクを低減する注射型のHPVワクチンが予防ワクチンとして臨床応用されている。しかしながら、これら既存のワクチンはHPVの感染を予防することにより子宮頸がんのリスクを下げるものであり、子宮頸がん発症後の治療ワクチンは未だに臨床応用に至っていない。これは、子宮頸がんの病巣部である子宮粘膜において細胞傷害性T細胞 (CTL) 活性を安全かつ効果的に誘導する技術・方法論の欠如による。

2. 研究の目的

当教室では最近、正電荷脂質である DOTAP と DC-chol を構成成分とする DOTAP/DC-chol リポソームが粘膜アジュバントおよび抗原蛋白質の粘膜樹状細胞への送達キャリアとして機能することを見だし、抗原特異的抗体産生を粘膜と全身の両面で誘導する系を確立した。そこで申請者は、このシステムと HPV の発癌に関与するタンパク質である E6/E7 を組み合わせることにより、抗原特異的 CTL 活性誘導を介した経鼻投与型子宮頸がんワクチンの開発を目的に研究を着想した。



3. 研究の方法

(1) 正電荷リポソームの作製

本研究に粘膜アジュバントとして用いた正電荷リポソームを下記のように作製した。まず正電荷脂質である 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) および 3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbonyl]cholesterol (DC-chol) をクロロホルムに溶解した。これら脂質の組成比を 1 : 1 (molar ratio) になるように混合し、エバポレーターを用いて溶媒を除去し lipid film を得た。これに PBS を加えたのち vortexing 法により正電荷リポソーム (DOTAP/DC-chol リポソーム) を調製し、100 nm のメンブレンを用い extruder により整粒した。粒子径およびζ電位は、NICOMP 380ZLS を用いて測定した。

(2) リコンビナント HPV 由来抗原の発現プラスミド構築

抗原として用いるリコンビナント蛋白質の作製を行った。HPV16 由来 E6/E7 の遺伝子は、Addgene より購入した。まず、これら遺伝子産物の発癌活性を消失させた変異体をインバース PCR あるいは Multi site-directed mutagenesis 法にて作製した。作製した変異遺伝子を大腸菌発現ベクターである pCold ベクターをベースとして改造した各種可溶化タグを有するプラスミドベクターへ Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) 法を用いてクローニングした。

(3) リコンビナント HPV 由来抗原の作製

(2) で作製した発現プラスミドを *E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* SHuffle またはシャペロン共発現大腸菌へ形質転換した。スクリーニングにより目的抗原が可溶性蛋白質として得られているかを SDS-PAGE およびウェスタンブロット法により確認した。得られた可溶性リコンビナント蛋白質は His タグを利用した TALON metal affinity resin によるアフィニティカラム精製、ゲル濾過後、エンドトキシン除去カラムを通した抗原サンプルを実験に使用した。

(4) 免疫スケジュールとサンプル回収

7 週齢の BALB/cCrSlc または C57BL/6J 雌性マウスに作製したリコンビナント HPV 由来抗原またはオボアルブミン (OVA) と DOTAP/DC-chol リポソームを週 1 回経鼻投与した。これを Days 0、7 および 14 の 3 週に渡りおこない、最終投与日の 1 週間後 (Day 21) に血清、

粘膜洗浄液(鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液および腔洗浄液)またはリンパ球を採取した。

(5) 抗原特異的抗体産生の検討

抗原特異的抗体価 (エンドポイントタイター) は、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)法にて検討した。リコンビナント HPV 由来抗原または OVA を ELISA プレートに固相化後、BSA-PBST にてブロッキングした。PBST で洗浄後、血清もしくは粘膜洗浄液サンプルを添加、インキュベート後洗浄し、HRP 標識抗体(anti-mouse IgG-HRP、anti-mouse IgG1-HRP、anti-mouse IgG2a-HRP、anti-mouse IgG2c-HRP および anti-mouse IgA-HRP)で処理し、TMB を用いて発色させ、1N リン酸にて反応停止後、吸光度を測定した。得られたシグモイド曲線からエンドポイントタイターを算出した。

(6) 免疫マウスリンパ球の CTL 活性評価

DOTAP/DC-chol リポソームとリコンビナント HPV 由来抗原または OVA の経鼻投与により CTL 活性が誘導されるかを、① 免疫マウス血清中の抗原特異的 IgG2c/IgG1 および② 免疫マウスより調製したリンパ球を H-2K^b OVA peptide で 2 次刺激した際の IFN- γ 産生を指標に検討した。

4. 研究成果

(1) DOTAP/DC-chol リポソームとモデル抗原 OVA の経鼻投与による CTL 活性誘導能の評価
DOTAP/DC-chol リポソームを経鼻投与型粘膜ワクチンとして用いた際に、抗原特異的 CTL 活性を誘導可能か検討した。その結果、DOTAP/DC-chol リポソームを併用した投与群において、Th1 応答により産生される OVA 特異的 IgG2a または IgG2c が亢進することが明らかとなった。さらに、DOTAP/DC-chol リポソームと OVA を経鼻投与したマウスから得られたリンパ球を *in vitro*で H-2K^b OVA peptide で 2 次刺激したところ Th1 サイトカインである IFN- γ の産生亢進が見られた。

(2) 可溶性 HPV 抗原の作製

子宮頸がんワクチンシステムの抗原として用いる可溶性リコンビナント蛋白質の大腸菌発現系を構築することを目的とした。E6、E7 または E6/E7 遺伝子に発癌活性を消失させる変異を導入後、pCold vector および各種可溶性タグを導入した pCold vector ヘクローニングし、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* SHuffle またはシャペロン共発現系を用いて発現誘導をおこなった。その結果、いくつかの発現ベクターおよびホストで可溶性抗原を得ることができた。その中で、比較的発現量が良好であったものから TALON metal affinity resin によるアフィニティ精製、ゲル濾過クロマトグラフィーとエンドトキシン除去カラムによって可溶性抗原を得た。

(3) DOTAP/DC-chol リポソームと HPV 抗原の経鼻投与による誘導される抗原特異的免疫応答の検討

まず、得られた可溶性 HPV 抗原を DOTAP/DC-chol リポソームと BALB/cCrSlc または C57BL/6J マウスに経鼻投与し、粘膜サンプルおよび血清中の HPV 抗原特異的抗体産生を評価した。その結果、鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液、腔洗浄液および血清中の HPV 抗原特異的 IgA および IgG 産生の亢進がみられた。C57BL/6J マウスにおいては、抗原特異的血清 IgG2c が有意に産生亢進していた。

以上、本研究により正電荷リポソームを用いた経鼻投与型ワクチンシステムによって抗原特異的 CTL 活性が誘導可能であることが判明した。これら CTL 活性の亢進はモデル抗原 OVA に対してだけでなく、HPV 抗原に対しても誘導可能であった。今後は、本システムの担癌モデルマウスに対する治療効果を検証することで新しい子宮頸がんに対する治療ワクチンの開発に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- ① Tada R, Yamanaka D, Ogasawara M, Saito M, Ohno N, Kiyono H, Kunisawa J, Aramaki Y. Polymeric Caffeic Acid Is a Safer Mucosal Adjuvant That Augments Antigen-Specific Mucosal and Systemic Immune Responses in Mice. *Mol Pharm.* 2018;15(9):4226-4234. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00648. 査読有
- ② Tada R, Suzuki H, Takahashi S, Negishi Y, Kiyono H, Kunisawa J, Aramaki Y. Nasal vaccination with pneumococcal surface protein A in combination with cationic liposomes consisting of DOTAP and DC-chol confers antigen-mediated protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infections in mice. *Int*

Immunopharmacol. 2018;61:385-393. doi: 10.1016/j.intimp.2018.06.027. 査読有

- ③ Tada R, Hidaka A, Kiyono H, Kunisawa J, Aramaki Y. Intranasal administration of cationic liposomes enhanced granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression and this expression is dispensable for mucosal adjuvant activity. BMC Res Notes. 2018;11(1):472. doi: 10.1186/s13104-018-3591-3. 査読有
- ④ Takahashi S, Tada R, Negishi Y, Aramaki Y. Mechanisms of enhanced antigen delivery to murine dendritic cells by the cationic liposomes. Open J Immunol. 2017;7(4):85-101. doi: 10.4236/oji.2017.74007. 査読有
- ⑤ Tada R, Muto S, Iwata T, Hidaka A, Kiyono H, Kunisawa J, Aramaki Y. Attachment of class B CpG ODN onto DOTAP/DC-chol liposome in nasal vaccine formulations augments antigen-specific immune responses in mice. BMC Res Notes. 2017;10(1):68. doi: 10.1186/s13104-017-2380-8. 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 滝瑠瑛、多田 壘、大島亮洋、棚澤佑哉、近江珠怜、根岸洋一、清野宏、國澤純、新槇幸彦、傷害関連分子パターンの正電荷リポソームの有する粘膜アジュバント活性に対する関与、第 62 回 日本薬学会 関東支部大会、東京都中野区、9/15、2018
- ② 永井柚帆、多田 壘、小笠原樹、齊藤桃子、山中大輔、櫻井康博、根岸洋一、國澤純、大野尚仁、新槇幸彦、酵素重合化カフェ酸を利用した新規粘膜ワクチンシステムの開発、第 62 回 日本薬学会 関東支部大会、東京都中野区、9/15、2018
- ③ Aramaki Y, Tada R, Honjo E, Iwase N, Kiyono H, Kunisawa J. IL-6 acts as a key cytokine in the enhancement of mucosal immunity following intranasal administration of antigen with cationic liposomes. Virus-Like Particle & Nano-Particle Vaccines VLPNPV 2016. Leiden, The Netherlands, 6/22, 2016.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.ps.toyaku.ac.jp/yakubutsusotatsu/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：多田 壘

ローマ字氏名：TADA, Rui
所属研究機関名：東京薬科大学
部局名：薬学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：70635888

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。