

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293034

研究課題名(和文) 顧みられない熱帯病に対する予防および治療を目的とした革新的技術の開発

研究課題名(英文) Development of the novel technique intended to the prophylaxis and treatment of neglected tropical diseases

研究代表者

佐々木 均 (SASAKI, Hitoshi)

長崎大学・病院(医学系)・教授

研究者番号：00170689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：顧みられない熱帯病(NTD)に対するワクチン開発を行った。まず、ワクチンに適したベクターの構築を試みた。その結果、pDNA、dendrigrift poly-L-lysine (DGL)と -polyglutamic acid (-PGA) の混合比と調製手順を最適化することで脾臓標的型遺伝子ベクターを開発することに成功した。このベクターをマラリアDNAワクチンに応用した結果、高い免疫誘導効果を示し、感染マウスの生存期間を延長させた。さらに、住血吸虫症のDNAワクチンに応用した結果、Th1の免疫反応が優位になり、肝臓のegg burdenを著しく減少させた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed the novel DNA vaccines against the neglected tropical diseases (NTD). At first, we tried to construct the DNA vector suitable for DNA vaccine. We successfully prepared the spleen-targeted gene vector by optimization of the mix ratio of pDNA, dendrigrift poly-L-lysine (DGL), and -polyglutamic acid (-PGA) and the preparation process. We applied the vector to malaria DNA vaccines. Malaria DNA nano-vaccine showed high immune induction and prolonged survival rate of malaria-infected mice. Furthermore, we applied the vector to schistosomiasis DNA vaccine. As results, schistosomiasis DNA nano-vaccine induced dominant Th1 cellular immune response and markedly reduced the egg burden in the liver.

研究分野：医療薬剤学、製剤学

キーワード：遺伝子ベクター 顧みられない熱帯病 マラリア 住血吸虫症 シャーガス病

## 1. 研究開始当初の背景

世界保健機関 WHO によると世界で 27 億人の貧困層のうち 10 億人超の人々が顧みられない熱帯病 (NTD) による健康被害を被っている。NTD は地球規模の保健医療問題であり、有効で使用可能な予防ワクチンや治療薬の開発が待ち望まれており、世界的な取り組み、とりわけ先進国による医薬品の研究開発が喫緊の課題である。

長崎大学は熱帯医学研究所を中心に、NTD の基礎および臨床疫学研究を長年にわたり行い、国内の寄生虫疾患の撲滅やフィリピンやベトナムなど東南アジア地域の寄生虫対策に資する研究業績を多数あげてきている。しかし世界的にみれば、NTD に対する予防治療法の研究開発は未だ不十分であり、新たなイノベーションを導入したより高い付加価値を持つ医薬品ワクチンの開発と実用化を今後さらに加速させる必要がある。申請者はこれまでに、様々な電荷を持った高分子を疎水的または静電的に自己組織化させることで、安全性が高く、脾臓、肝臓、肺への指向性を有する画期的なナノデバイスの構築に成功した (特願 2012-501869、PCT/JP2011/054195)。マウスでのマラリア *Plasmodium yoelii* を用いた感染実験においては、脾臓指向性ナノデバイスを用いて調製した MSP-1DNA ナノワクチンでは、ナノデバイスなしの DNA ワクチンに比してマウスの防御免疫活性が著しく増強され、生存率の増強やサイトカイン産生能の上昇が認められた。

NTD はその病原寄生虫の特徴的な挙動や形態のために異なる病態を呈する。一方、医薬品はその動態を精密に制御することで効果を著しく増強でき、副作用を軽減し臨床的アウトカムを飛躍的に改善することができる。したがって、NTD の予防や治療には、一律な治療法の研究だけでは不十分であり、寄生体の生活史や挙動を考慮に入れた、適正な医薬品やワクチンを標的化させる技術との融合が必要である。

## 2. 研究の目的

各 NTD の専門家を研究分担者とし、日本独自の革新的技術としてのナノデバイスを用いた新規ワクチン、予防法、治療法を開発を前臨床段階まで進めることを目的とした。本研究は臨床開発へつなげることを念頭に置いており、革新的な治療予防法の作出により NTD の世界的な制御対策におけるブレイクスルーを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) pDNA として firefly luciferase をコードした pCMV-Luc を用いた。pDNA、dendrigrapt poly-L-lysine (DGL)、 $\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) を様々な電荷比で混合し、pDNA-DGL- $\gamma$ -PGA 複合体 ( $\gamma$ -PGA 複合体) を調製した。調製した複合体の粒子径や表面電荷などの物理化学的性質を測定し、また、安

定性を電気泳動などで調べた。マウスメラノーマ細胞株 B16-F10 細胞を用いて、 $\gamma$ -PGA 複合体の遺伝子導入効率および細胞毒性を調べた。また、複合体の分解性についても評価した。さらに、in vivo での遺伝子発現を評価するために、 $\gamma$ -PGA 複合体をマウスへ静脈内投与した。投与後 6 時間に各臓器を摘出し、組織中のルシフェラーゼ活性を測定した。

(2) マウスマラリア原虫 *P. yoelii* GPI8p transamidase-related protein をコードした pVR1020-TAM (pyTAM) を用いて、マラリア DNA ナノワクチン (pyTAM-DGL- $\gamma$ -PGA 複合体) を調製した。マウスにマラリア DNA ナノワクチンを 3 週間隔で 3 回投与した。最終投与から 2 週間後に血液中の免疫グロブリンおよび脾細胞からのサイトカイン分泌について測定した。また、最終投与から 2 週間後にマラリア原虫を投与し、生存率と寄生虫血症を評価した。

(3) 住血吸虫症の DNA ワクチンとして Sj Glutathione S-Transferase (SjGST) をコードした pVR1020-SjGST を用いた。pVR1020-SjGST、polyethyleneimine (PEI)、 $\gamma$ -PGA を組み合わせ住血吸虫症 DNA ナノワクチン (pVR1020-SjGST-PEI- $\gamma$ -PGA 複合体) を調製した。マウスに住血吸虫症 DNA ナノワクチンを 2 週間おきに 3 回投与した。最終免疫から 2 週間後に血液中の免疫グロブリンおよび脾細胞からのサイトカイン分泌について測定した。また、細胞性あるいは液性免疫について解析した。さらに、最終投与から 2 週間後に日本住血吸虫の感染型セルカリアを皮感染させ、6 週間後に門脈還流を行い、回収される虫体数から防御能を評価した。

(4) シャーガス病に対する DNA ワクチン候補のスクリーニングを行った。まず、シャーガス病ワクチンの系統的レビューにより抗原の候補となるペプチドを精査し、候補を絞り込んだ。これらの情報をもとに、さらに寄生生物の各成長ステージで発現する遺伝子についてデータベーススクリーニングを行った。

## 4. 研究成果

pDNA、DGL、 $\gamma$ -PGA の電荷比と調製プロセスを最適化することで 100 nm 以下の安定なアニオン性複合体 ( $\gamma$ -PGA 複合体) を構築できた。基礎的な遺伝子導入効率および細胞毒性を評価した。その結果、 $\gamma$ -PGA 複合体は細胞毒性を示すことなく、高い遺伝子発現を示した。また、蛍光色素を内包した  $\gamma$ -PGA 複合体を用いて細胞内分解性を評価したところ、複合体は細胞内で分解していることが観察された。 $\gamma$ -PGA 複合体をマウスに静脈内投与した結果、脾臓において高い遺伝子発現が見られた (図 1)。したがって、脾臓指向性を有する  $\gamma$ -PGA 複合体はワクチンへ応用できる

可能性が示された。

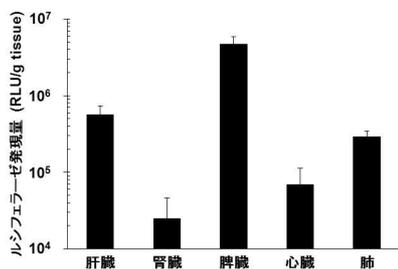


図1  $\gamma$ -PGA複合体を尾静脈内投与後の各臓器における遺伝子発現

そこで、 $\gamma$ -PGA 複合体をマラリア DNA ワクチンへ応用することを試みた。pyTAM を用いて、マラリア DNA ナノワクチンを調製した結果、マラリア DNA ナノワクチンは 100 nm 以下の安定なアニオン性微粒子を形成した。DNA ワクチンのみをマウスへ投与しても、抗体価の誘導はほとんど認められなかった。一方、マラリア DNA ナノワクチンを投与した結果、非常に高い抗体価の誘導が認められた。また、免疫誘導したマウスへマラリア原虫を感染した結果、未処理のマウスおよび効果のないブランク DNA ナノワクチンを投与したマウスは全て死亡したのに対し、マラリア DNA ナノワクチンを投与したマウスの生存率は高く、強い感染制御効果が認められた(図2)。

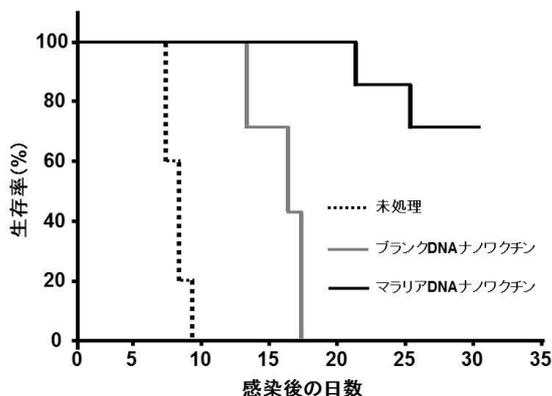


図2 マラリアDNAナノワクチンで免疫誘導したマウスへマラリア原虫を感染後の生存率

次に  $\gamma$ -PGA 複合体を住血吸虫症 DNA ワクチンへ応用することを試みた。S. japonicum glutathione S-transferase (SjGST) をコードした住血吸虫症 DNA ワクチンを用いて、住血吸虫症 DNA ナノワクチン (pVR1020-SjGST-polyethyleneimine (PEI)- $\gamma$ -PGA 複合体) を構築した。住血吸虫症 DNA ナノワクチンは、住血吸虫症に特異的な免疫誘導を惹起した。住血吸虫症 DNA ナノワクチンはブランク DNA ナノワクチンと比較して、IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性 T 細胞の割合を増加させ、IL-4 産生 CD4 陽性 T 細胞の割合を減少させた(図3)。したがって、住血吸虫症 DNA ナノワクチンにより Th2 の反応が減少し、Th1 の免疫反応が優位になることが示唆された。また、住血吸虫症 DNA ナノワクチンは肝臓の egg

burden を著しく減少させた。

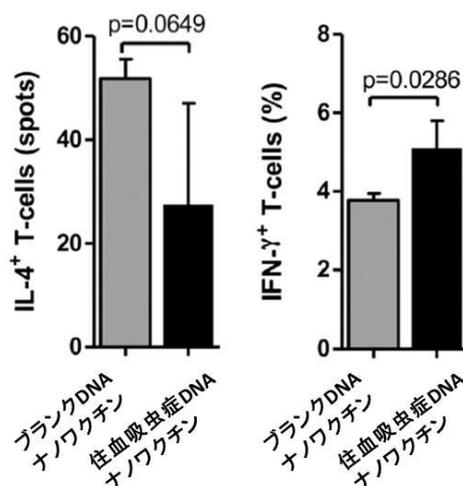


図3 免疫誘導後の細胞性免疫と液性免疫

シャーガス病に対する DNA ワクチン候補のスクリーニングを行った。その結果、ASP2、TCG1、TC52、Transialidase、TCG2、Cruzipain、TCG4、および TC24 の 8 つの遺伝子を同定した。そこで、これらの遺伝子を VR1020 に組み込み、DNA ワクチンを必要量調製した。TCG1、TCG4、および TC24 の 3 つの遺伝子をそれぞれ組み込んだ DNA ワクチン (pVR1020-TCG1、pVR1020-TCG4、pVR1020-TC24) が既に調製済みであり、その他の遺伝子についても現在調製中である。さらに、調製済みの 3 種の DNA ワクチンと DGL、および  $\gamma$ -PGA を様々な混合比で静電的に組合せ、最適な条件を見出した。自己組織化された安定なナノワクチンを、C57BL/6 系マウスに 2 週間おきに腹腔内投与し、現在、免疫誘導を行っている。

以上のように、我々は本研究によって、生体適合性脾臓標的型遺伝子ベクターをマラリア DNA ワクチンおよび住血吸虫症 DNA ワクチンへ応用することで、高い免疫誘導効果を示す画期的なマラリア DNA ナノワクチンおよび住血吸虫症 DNA ナノワクチンを開発することに成功した。これらの結果は、NTD に対するワクチン開発において有益な基礎的情報であると考えられる。今後は、シャーガス病に対する DNA ナノワクチンも開発し、有効性を評価して行く予定である。

#### 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 10 件)

Hashizume J, Higuchi N, Sato K, Kodama Y, Matsunaga N, Sakamoto T, Yamaguchi K, Nakamura T, Kitahara T, Sasaki H: Evaluation of Antiemetic Therapy for Hepatic Transcatheter Arterial Infusion Chemotherapy with Cisplatin. Biol Pharm Bull. 39(4): 611-4 (2016). DOI:

10.1248/bpb.b15-00603. 査読有

Kurosaki T, Nakasone C, Kodama Y, Egashira K, Harasawa H, Muro T, Nakagawa H, Kitahara T, Higuchi N, Nakamura T, Sasaki H: Splenic gene delivery system using self-assembling nano-complex with phosphatidylserine analog. *Biol Pharm Bull.* 38(1): 23-9 (2015). DOI: 10.1248/bpb.b14-00478. 査読有

Kodama Y, Yatsugi Y, Kitahara T, Kurosaki T, Egashira K, Nakashima M, Muro T, Nakagawa H, Higuchi N, Nakamura T, Sasaki H: Quaternary complexes modified from pDNA and poly-L-lysine complexes to enhance pH-buffering effect and suppress cytotoxicity. *J Pharm Sci.* 104(4): 1470-7 (2015). DOI: 10.1002/jps.24364. 査読有

Mbanefo EC, Kumagai T, Kodama Y, Kurosaki T, Furushima-Shimogawara R, Cherif MS, Mizukami S, Kikuchi M, Huy NT, Ohta N, Sasaki H, Hirayama K: Immunogenicity and anti-fecundity effect of nanoparticle coated glutathione S-transferase (SjGST) DNA vaccine against murine *Schistosoma japonicum* infection. *Parasitol Int.* 64(4): 24-31 (2015). DOI: 10.1016/j.parint.2015.01.005. 査読有

Kodama Y, Ohkubo C, Kurosaki T, Egashira K, Sato K, Fumoto S, Nishida K, Higuchi N, Kitahara T, Nakamura T, Sasaki H: Secure and effective gene delivery system of plasmid DNA coated by polynucleotide. *J Drug Target.* 23(1): 43-51 (2015). DOI: 10.3109/1061186X.2014.950665. 査読有

Sano K, Iwamiya Y, Kurosaki T, Ogawa M, Magata Y, Sasaki H, Ohshima T, Maeda M, Mukai T: Radiolabeled  $\gamma$ -polyglutamic acid complex as a nano-platform for sentinel lymph node imaging. *J Control Release.* 194: 310-5 (2014). doi: 10.1016/j.jconrel.2014.08.025. 査読有

Kodama Y, Shiokawa Y, Nakamura T, Kurosaki T, Aki K, Nakagawa H, Muro T, Kitahara T, Higuchi N, Sasaki H: Novel siRNA delivery system using a ternary polymer complex with strong silencing effect and no cytotoxicity. *Biol Pharm Bull.* 37(8): 1274-81 (2014). DOI: <http://doi.org/10.1248/bpb.b14-00058>. 査読有

Kurosaki T, Kawakami S, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Sasaki H, Yamashita F, Hashida M: Kidney-selective gene transfection using anionic bubble lipopolyplexes with renal ultrasound irradiation in mice. *Nanomedicine.* 10(8): 1829-38 (2014). doi: 10.1016/j.nano.2014.06.009. 査読有

Kodama Y, Nakamura T, Kurosaki T, Egashira K, Mine T, Nakagawa H, Muro T, Kitahara T, Higuchi N, Sasaki H: Biodegradable nanoparticles composed of dendrigraft poly-L-lysine for gene delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 87(3): 472-9 (2014). doi: 10.1016/j.ejpb.2014.04.013. 査読有

Kurosaki T, Kawanabe S, Kodama Y, Fumoto S, Nishida K, Nakagawa H, Higuchi N, Nakamura T, Kitahara T, Sasaki H: Hepatic gene delivery system electrostatically assembled with glycyrrhizin. *Mol Pharm.* 11(5): 1369-77 (2014). doi: 10.1021/mp400398f. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

三枝 由香莉、兒玉 幸修、岩永 真理恵、北原 隆志、佐々木 均: グリコサミノグリカンで被膜した生体分解型遺伝子ベクターの開発、日本薬剤学会第 31 年会、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)、2016 年 5 月 19 日 ~ 21 日

小林 瑞希、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均: 関節リウマチ治療を目的としたメトトレキサートを構成成分とする遺伝子ベクターの開発、日本薬剤学会第 31 年会、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)、2016 年 5 月 19 日 ~ 21 日

根岸 智奈美、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均: ポリアミノ酸で構築した生体分解型マリアナノワクチンの開発、日本薬剤学会第 31 年会、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)、2016 年 5 月 19 日 ~ 21 日

佐々木 均: 医療現場からの創薬 臨床指向の多機能型 DDS 開発、医療薬学フォーラム 2015/第 23 回クリニカルファーマシーシンポジウム、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)、2015 年 7 月 5 日

徳永 彩子、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均: 生体分解型 DNA ナノワクチンによる悪性黒色腫の増殖抑制、第 31 回日本 DDS 学会学術集会、京王プラザホテル(東京都・新宿区)、2015 年 7 月 2 日 ~ 3 日

上田 由貴、兒玉 幸修、三枝 由香莉、北原 隆志、佐々木 均: pH 緩衝能の増大と毒性軽減を目的とした四重複合体の開発と有用性評価、日本薬剤学会第 30 年会、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)、2015 年 5 月 21 日 ~ 23 日

徳永 彩子、兒玉 幸修、樋口 則英、北原 隆志、佐々木 均: Dendrigraft poly-L-lysine を基材とした遺伝子ベクターの有用性評価、日本薬剤学会第 30 年会、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)、2015 年 5 月 21 日 ~ 23 日

野田 稜、兒玉 幸修、黒崎 友亮、中村 忠博、北原 隆志、佐々木 均: アニオン性 dendriplex を用いた遺伝子デリバリーシステムの開発、日本薬剤学会第 30 年会、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)、2015

年 5 月 21 日～23 日

永原 忠幸、兒玉 幸修、北原 隆志、中嶋 幹郎、佐々木 均：アニオン性三重複合体の眼疾患用遺伝子ベクターとしての有用性評価、日本薬剤学会第 30 年会、長崎ブリックホール（長崎県・長崎市）2015 年 5 月 21 日～23 日

花村 啓紀、兒玉 幸修、北原 隆志、中嶋 幹郎、佐々木 均：抗原提示細胞標的化ナノ粒子を用いた新規がんワクチンの開発、日本薬剤学会第 30 年会、長崎ブリックホール（長崎県・長崎市）2015 年 5 月 21 日～23 日

藏本 悠、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均：Dendrigrft poly-L-lysine を構成成分とした生分解型 siRNA ベクターの構築、日本薬剤学会第 29 年会、大宮ソニックシティ（埼玉県・さいたま市）2014 年 5 月 20 日～22 日

西垣 和香、兒玉 幸修、北原 隆志、佐々木 均：医療用医薬品を用いた GMP 基準の新規遺伝子ベクターの開発、日本薬剤学会第 29 年会、大宮ソニックシティ（埼玉県・さいたま市）2014 年 5 月 20 日～22 日

Yukinobu Kodama, Yumi Yamashita, Takashi Kitahara, Hitoshi Sasaki: Secure and effective gene vector of polyamidoamine dendrimer pharmaceutically modified with anionic polymer, 5th Pharmaceutical Sciences World Congress,メルボルン（オーストラリア）2014 年 4 月 13 日～16 日

Hitoshi Sasaki, Yukinobu Kodama, Tamami Morishita, Takashi Kitahara: Nanoparticles electrostatically coated with folic acid for effective and safe gene delivery, 5th Pharmaceutical Sciences World Congress,メルボルン（オーストラリア）2014 年 4 月 13 日～16 日

〔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  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
佐々木 均 (SASAKI, Hitoshi)  
長崎大学・病院（医学系）・教授  
研究者番号：00170689

(2) 研究分担者  
平山 謙二 (HIRAYAMA, Kenji)  
長崎大学・熱帯医学研究所・教授  
研究者番号：60189868

濱野 真二郎 (HAMANO, Shinjiro)  
長崎大学・熱帯医学研究所・教授  
研究者番号：70294915

太田 伸生 (OHTA, Nobuo)  
東京医科歯科大学・医歯薬学総合研究科・  
教授  
研究者番号：10143611

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし