

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592166

研究課題名(和文) 癌化抑制 DNA ワクチンの最適化を目指した抗原デリバリーシステムの基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research of the antigen delivery system that it aimed at the optimization of the DNA vaccine for cancer prevention

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

研究成果の概要(和文)：多くの口腔粘膜疾患がヒトパピローマウイルス(HPV)感染と関係している。そこで、この感染をDNAワクチンを用いて口腔粘膜疾患を予防することを目的として、最良のデリバリーシステムを検討した。その結果、PLGA ナノスフェアをキャリアーとして用いて低電圧の *in vivo* 低電圧電気穿孔法を行うと安全性が高く癌化抑制に良好なことが示唆され、HPV 関連口腔粘膜疾患の予防に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Many oral mucous diseases are related to human papillomavirus (HPV). Recently it has become clear that more potent methods for DNA vaccine delivery need to be developed to enhance the efficacy of DNA vaccines. In this study, the best antigen delivery system was examined for the purpose of preventing HPV infection by using the DNA vaccine. The results showed that the immunization with PLGA nanosphere DNA vaccines followed by EP *in vivo* delayed carcinoma development of papillomavirus-associated oral cancer. Both of *in vivo* electroporation and PLGA nanosphere are potent methods for DNA vaccine delivery, therefore, it contributes to the papillomavirus-induced oral cancer prevention.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：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、ドラッグデリバリー、癌抑制効果、口腔、扁平上皮癌、naked pDNA

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。この方法により誘発された上皮性異形成(前癌病

変) にパピローマウイルス共通抗原が検出され、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、パピローマウイルス感染の関与が示唆されていたが、ハムスター固有のパピローマウイルスはまだ知られていなかった。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、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。上記の研究の Southern blot hybridization による解析では、ハムスターの正常口腔粘膜にはウイルスゲノムは検出されなかったが、誘発されたすべての前癌病変および癌病変では検出することができた。また、*in situ* hybridization を用いた解析および PCR による解析でも、これら病変に同様にウイルスゲノムの存在を確認した。これらの結果は 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。この結果より、ワクチン接種が癌抑制に有用であることが示唆された。そこで、HOPV のゲノムのうち、ウイルス粒子の主要構造蛋白をコードする遺伝子 L1 を培養細胞 (SF9) に発現させ、ウイルス様粒子を産生し、密度勾配法により精製して免疫用の抗原を作製した。これにより HOPV の免疫を獲得したハムスターでは、発癌処置を加えても発癌に至らず、化学発癌剤と創傷だけでは発癌せず、HOPV が重要な役割を示すことが判明した。そこで、上記の結果をふまえて 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、E6、E7 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。また、DNA ワクチンの接種方法および naked pDNA だけでなく 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 ワクチンが癌抑制が強く、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、多価性 DNA ワクチンの効果も高いことが示唆された。さらに、デリバリーシステムとして高電圧電気穿孔法の併用が有用であることが判明した。現在までに、他の研究ではハムスターのパピローマウイルス (HOPV) は

見つかっておらず、本研究が HOPV に関する最初の DNA ワクチンの包括的研究である。この新しく同定された HOPV の感染と発癌および DNA ワクチンによる癌化抑制を検索した研究は、現在までのところ国内および外国において、我々の研究以外、全くみられない。

現在の DNA ワクチンにおける問題点は、いかにして標的細胞である樹状細胞などの抗原提示細胞に導入して、効率良く遺伝子発現を行うことができるかである。しかしながら、未だに DNA ワクチンの最良のデリバリーシステムが確立されていないのが現状である。

本研究は、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 DNA ワクチン接種により抑制し、naked pDNA および DNA 複合体の細胞取り込みおよびそれら細胞の動態を解析してより効率のよいデリバリーシステムを開発するところに特色がある。また、デリバリーシステムとして低電圧電気穿孔法 (*in vivo*) を用いることも DNA ワクチンの投与としては、本研究が最初である。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薬物キャリアー (PLGA ナノスフェア) 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、パピローマウイルス関連癌抑制に用いることも世界初の試みである。PLGA ナノスフェアを用いることにより、pDNA をナノスフェアに封入し表面に正電荷を持たせることができ、組織親和性を持たせることが可能となる。またさらに、その放出を制御することも可能と考えられ、効率のよいデリバリーシステムとなる。

このように、DNA ワクチンの最適化を目指した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、本研究結果を元にして、さらにヒトでの口腔癌予防と治療に大きく寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

これまでにパピローマウイルスの癌化に関する基礎的研究および DNA ワクチンの創製と基礎的研究はほぼ完了しており、本研究では、さらに効果的な臨床応用を考えた DNA ワクチンの最適なデリバリーシステムを検討した。これには、キャリアーとしての PLGA ナノスフェアと *in vivo* 低電圧電気穿孔法を用いて検討した。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、口腔領域の癌発生等の予防を視野にいれながら、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ことを解析した。

(1)この発癌モデルを用いて、DNA ワクチンの最適なデリバリーシステムを解析検討した。投与方法としては、骨格筋(大腿四頭筋)への投与を行い、これに加えて *in vivo* 低電圧電気穿孔法を用いて、種々の電圧の効果について基礎的な研究を行なった。また、DNA ワクチンのキャリアーとして PLGA ナノスフェアを用いて、HOPV の L1 領域などの主要遺伝子の naked pDNA の細胞取り込みを詳細に解析した。さらに、DNA ワクチンのキャリアーとして PLGA ナノスフェアと *in vivo* 低電圧電気穿孔法を組み合わせ、その効果を解析した。

(2)ヒトでの口腔領域の癌発生等の予防を視野にいれ、上記の実験結果をふまえて、ヒトパピローマウイルス関連癌由来の細胞 (CaSki) を用いて、上記の実験と同様に癌抑制効果を検討した。DNA ワクチンとしては、HPV の L1 領域などの主要遺伝子の naked pDNA の細胞取り込みを詳細に解析した。さらに、これらのヒトパピローマウイルス関連癌における DNA ワクチンの安全性についても検討した。

また、ヒトパピローマウイルス関連癌を用いて DNA ワクチンを検討することは、臨床応用において必要不可欠なものであり、HOPV 発癌モデルの実験結果を基にヒトパピローマウイルス関連癌における DNA ワクチンの最適なデリバリーシステムおよび安全性を解析検討することは、臨床における DNA ワクチンによる癌化抑制の第一歩を踏み出すこととなる。

本研究の目的は、HOPV 発癌モデルとヒトパピローマウイルス関連癌を用いて、キャリアーとしての PLGA ナノスフェアと *in vivo* 低電圧電気穿孔法の癌抑制効果と安全性を検討することにある。これにより、口腔癌および子宮頸部癌などのヒトパピローマウイルス関連癌の予防と治療に大きく寄与することが示唆される。

3. 研究の方法

我々は、dimethyl benzantracene (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。この発癌モデルを用いて、効果的な臨床応用を考えた DNA ワクチンの最適なデリバリーシステムを検討する。これには、キャリアーとしての PLGA ナノスフェアと *in vivo* 低電圧電気穿孔法を用いて検討する。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、口腔領域の癌発生等の予防を視野にいれながら、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ことを解析する。

研究計画・方法

(1)DNA ワクチンの最適なデリバリーシステムの解析 (*in vivo* 低電圧電気穿孔法)

① DNA ワクチンの作成

クローニングしたハムスター口腔パピローマウイルス (HOPV) のゲノムの主要遺伝子 (L1、E6、E7) 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、L2、E6、E7 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 **Ccggattccg**) を 5' 側に付加した。

HOPV-L1 (EcoRI site: **Ccggattccg**)

5' **Ccggattccg**GATGTGGAT**GCAACCATCAGGCAAGC**T 3' (nt 5642-5671)

5' **Ccggattccg**TAAGAGGCGTAAAAAGTAAATGTCAA T3' (nt 7130-7159)

HOPV-E6 (EcoRI site: **Ccggattccg**)

5' **Ccggattccg**CAGCTACAT**GGCGTTCCCCATTGAGT**TG 3' (nt 164-192)

5' **Ccggattccg**ACCCCTCATTATAGCAGGAAGCACT 3' (nt 568-593)

HOPV-E7 (EcoRI site: **Ccggattccg**)

5' **Ccggattccg**CTGCTATA**ATGAGGGTCCCTGAGAAT**CCT 3' (nt 506-534)

5' **Ccggattccg**CACGTTAACGATGGCCGATAAAGGTA C3' (nt 957-983)

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 μg を 100 μl 生理食塩水に溶かして使用した。

② DNA ワクチン接種と発癌処置

実験動物 (3 週齢雄性ゴールデンハムスター) は、免疫群 90 匹 (各群 10 匹) と非免疫群 30 匹 (各群 10 匹) にわけた。免疫群には L1、E6、E7 遺伝子の naked pDNA (100 μg/100 μl) を 2 回、3 週の間においてそれぞれ接種した。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。DNAワクチンの接種方法としては、筋肉内注射（左側大腿四頭筋）を用いた。

③ DNAワクチンのDDS方法の解析(電気穿孔法)

DNAワクチンとしてHOPV-L1を用いて、②と同様にワクチン接種を行い、*in vivo* 低電圧電気穿孔法(50V、100V、150V)を行った。実験には、3週齢の雄性ゴールデンハムスター120匹を用い、動物を未処置群、ワクチン投与単独群、電気穿孔単独群およびワクチン投与電気穿孔群(50V、100V、150V)の6群に分けた。未処置群では、動物の左側大腿筋にpVAX1のみを、100 μ gを100 μ l生理食塩水に溶かして接種した。ワクチン投与単独群では、同様にHOPV-L1(100 μ g)を接種した。電気穿孔単独群では、pVAX1(100 μ g)を接種して電気穿孔を行った。ワクチン投与電気穿孔群(50V、100V、150V)では、同様にHOPV-L1(100 μ g)を接種して、電気穿孔処置を行った。電気穿孔処置は、ワクチンもしくはpVAX1接種3分後にネンプター麻酔下でピンセット型電極を用いて Square electroporator (CUY21、Japan)で低電圧のパルス状電圧(50V、100V、150V/cm)を8回、20ms、1Hzで各群に負荷した。これらの処置後、dimethyl benzanthracene(DMBA)を週3回、8週間塗布した後、舌尖2mmを切除してDMBAを毎日13日間塗布した。この発癌処置後、癌化抑制についての検討を行った。

(2)DNAワクチンの最適なデリバリーシステムの解析(PLGA ナノスフェア)

DNAワクチンとしてHOPV-L1を用いて(1)と同様に、実験を行い、解析を行った。PLGAナノスフェアにDNAワクチンを封入して表面に正電荷を持たせて、PLGAナノスフェア-DNAワクチンとした。

(3)ヒトパピローマウイルス関連癌でのDNAワクチンの最適なデリバリーシステムの解析

ヒトパピローマウイルス関連癌由来の細胞(CaSki)におけるDNAワクチンの最適なデリバリーシステムの解析を行った。

① DNAワクチンの作成

ヒトパピローマウイルス(HPV 16)のゲノムの主要遺伝子(L1)を用いて、これ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。

5' CcggaaattccgCCAGATCTATGTCTCTTTGGCTGCC TAGTGAGGC 3'

5' CcggaaattccgCCAGATCTTTACAGCTTACGTTTTT TGCGTTTAG 3'

② DNAワクチン接種と発癌処置

実験動物(BALB/cAJcl-nu/nu)を、免疫群と非免疫群にわけ、免疫群には2回のDNAワクチン接種を3週の間をおいて行い、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た。DNAワクチンの投与方法として骨格筋(大腿四頭筋)への投与を行った。また、DNAワクチン投与時に*in vivo*低電圧電気穿孔法を同時に行った。

4. 研究成果

(1)ハムスターHOPV発癌モデルを用いてHOPVの主要遺伝子を用いたDNAワクチンの*in vivo*低電圧電気穿孔法(50V、100V、150V)における最適なデリバリーシステムとしての解析を行った。この結果、主要遺伝子のL1を使用することが最も効果が高く、また、*in vivo*低電圧電気穿孔法のいずれの電圧を使用しても、その癌抑制効果が高まることが判明した。このことより、より低電圧の*in vivo*低電圧電気穿孔法(50V)が安全性が高く癌化抑制に良好なことが示唆された。

(2)(1)の結果を基に、ハムスターHOPV発癌モデルを用いてHOPVの主要遺伝子L1を用いたDNAワクチンの*in vivo*低電圧電気穿孔法とキャリアーとしてのPLGAナノスフェアを用いて最適なデリバリーシステムとしての解析を行った。この結果、PLGAナノスフェアをキャリアーとして用い、さらに*in vivo*低電圧電気穿孔法を行うとその癌抑制効果が高まることが判明した。

(3)(1)、(2)の結果を基に、ヒトパピローマウイルス関連癌由来の細胞(CaSki)におけるDNAワクチンの最適なデリバリーシステムの解析を行った。この結果、PLGAナノスフェアをキャリアーとして用い、さらに*in vivo*低電圧電気穿孔法を行うとその癌抑制効果が高まることが判明した。

以上の結果より、より低電圧の*in vivo*低電圧電気穿孔法が安全性が高く癌化抑制に良好なことが示唆され、また、PLGAナノスフェアをキャリアーとして用いることはHPV関連の口腔粘膜疾患の予防と治療における最適なデリバリーシステムとして有用であると考えられた。

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. S Syrjänen, G Lodi, I von Bültzingslöwen, A Aliko, P Arduino, G Campisi, S Challacombe, G Ficarra, C Flaitz, HM Zhou, H Maeda, C Miller, M Jontell: Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. Oral Diseases, 17(Suppl. 1): 査読有, 58-72, 2011.
2. 前田初彦: ヒトパピローマウイルス (HPV) と口腔粘膜疾患, 日本口腔外科学会雑誌, 査読有, 56(8): 464-470, 2010.

[学会発表] (計 7 件)

1. Maeda H, Kubo K, Yoshida W, Torii R, Sato E, Jinno M, Takayama M, Wada A: Enhancement of DNA vaccine potency against hamster oral papillomavirus-associated oral cancer by in vivo electroporation. The 6th Asian Science Seminar in TAIWAN (台湾), 2010. 11. 20.
2. Maeda H, Yoshida W, Kubo K, Sugita Y, Sato E, Suzumura Y, Torii R, Wada A, Komatsu S, Ito K, Saito T, Umebayashi T, Jinno M, Takayama M, Honda Y.: Enhancement of DNA Vaccine Potency by In Vivo Electroporation. The 10th EAOM (Biennial Conference of the European Association of Oral Medicine) (London), 2010. 9. 24-25.
3. 前田初彦: 癌化抑制 DNA ワクチンの最適化を目指した抗原デリバリーシステム. 第 9 回バイオテクノロジー国際会議(東京), 2010. 7. 1.
4. 前田初彦: 口腔領域の HPV 感染. 第 32 回大阪 STI 研究会・第 1 回日本性感染症学会関西支部学術集会 (大阪), 2010. 6. 26.
5. 前田初彦, 久保勝俊, 杉田好彦, 佐藤恵美子, 吉田和加, 和田 昭, 高山光平, 神野正人: 癌化抑制 DNA ワクチンの DDS としての低電圧電気穿孔法の最適化を目指した基礎的研究. 第 28 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 (東京), 2010. 1. 29.
6. 前田初彦, 神野正人, 高山光平, 小森敦夫, 本田由馬, 芳山昌典, 和田 昭, 吉田和加, 杉田好彦, 四ツ柳智久: DNA ワクチンの癌化抑制効果における電気穿孔法の DDS としての有用性について. 第 24 回日本 DDS 学会 (東京), 2008. 6. 29-30.
7. Maeda H, Sugita Y, Kubo K, Sato E, Suzumura Y, Jinno M, Takayama K, Honda Y and Komori A: In vivo

electroporation enhances the DNA vaccine potency against hamster oral papillomavirus-associated oral cancer. 14th International Congress, International Association of Oral Pathologists (San Francisco, California, USA), 2008. 6. 23.

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

()

研究者番号: