

5. シャーガス病に対する革新的なワクチン・治療薬の開発

佐々木 均

Key words : シャーガス病, ナノデバイス,
DNA ワクチン

長崎大学病院 薬剤部

緒 言

顧みられない熱帯病 (Neglected Tropical Diseases : NTDs) は熱帯地域, 貧困層を中心に蔓延している寄生虫, 細菌感染症である。NTDs は地球規模の保健医療問題であり, 国家を超えた取り組みが不可欠であるが, 未だにワクチンや治療薬が開発されていない疾患もあり, その新規開発が強く望まれている。

NTDs の多くは寄生虫病であり, 種や臓器に対し寄生形態を変化させて体内に潜み, 致命的なものから慢性的な病害を与えるものまで多様な病態を呈する。そのため, 感受性の高い形態に対し, 臓器特異的な薬物標的化やワクチン療法を行うことが必要である。現在, 様々なワクチンや治療薬開発の研究が行われているが, 未だ臨床応用に至っておらず, 革新的な治療および予防戦略の開発が急務である。

我々はこれまでに様々な電荷を持つ高分子を静電的および疎水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)。さらに脾臓指向性ナノデバイスは脾臓の中でも抗原提示細胞が極めて豊富な辺縁体に選択的に蓄積していることを確認したり, そこで脾臓指向性ナノデバイスをマラリアワクチンに応用した結果, マウスのマラリア感染による死亡を完全に抑制することに成功した²⁾。

NTDs の中でもシャーガス病は特に診断や治療が困難であり, 革新的かつ強力な疾病管理が必要な疾患である。現在, ニフルチモックスとベンズニダゾールのみが治療薬として用いられているが, 感染直後しか効果がなく, 副作用が大きいこと, さらに耐性種が出現していることが問題となっている。また, 臨床応用されているワクチンも存在せず, 治療法および予防法は未だ不十分である。

そこで本研究では, この革新的技術で開発したナノデバイスを用いたシャーガス病の新たなワクチン開発を目指した。

方法、結果および考察

1. 生体分解型ナノデバイスの開発

シャーガス病には臨床応用されているワクチンが存在しないため, 早急なワクチン開発が望まれている。ワクチンとして DNA ワクチンが期待されているが, 生体での安定性や細胞透過性に乏しく, 臨床応用には遺伝子ベクターの開発が必須である。また, 遺伝子ベクターを臨床応用するためには, 生体適合性に優れた生体分解成分で開発する必要がある。生体分解性ペプチド構造を有する poly-L-arginine や poly-L-lysine (PLL), protamine などが期待されているが, 遺伝子導入効率が低く, 臨床応用には至っていない。我々は, 新規カチオン性高分子である Dendrigraft poly-L-lysine (DGL) に着目した。DGL は lysine のみで構築されており, デンドリマー構造を有することから, 遺伝子ベクターとしての有用性が期待できる。さらに, DGL は水に易溶で熱に安定であり, 非免疫原性で生体適合性に優れている。そこで, 我々は DGL を構成成分とする遺伝子ベクターの構築を試みた。pDNA として firefly luciferase をコードした pCMV-Luc を用いた。pDNA と DGL を様々な電荷比で混合し, カチオン性の pDNA-DGL 複合体 (DGL 複合体) を調製した。また, コントロールとして pDNA-PLL 複合体 (PLL 複合体) を作製した。電荷比と調製プロセスを最適化することで安定なナノサイズの複合体を構築することができた。マウスメラノーマ細胞 B16-F10 を用いて, 各複合体の

遺伝子導入効率を評価した結果、DGL 複合体は PLL 複合体と比較して有意に高い遺伝子発現を示した。各複合体の緩衝能を評価した結果、DGL 複合体は PLL 複合体と比較して高い緩衝能を示した。一方、YOYO-1 で標識した pDNA を内包した DGL 複合体と PLL 複合体を作製し、細胞取り込みを評価した結果、各複合体の細胞取り込みは同程度であった。したがって、DGL 複合体の高い遺伝子発現には、高い緩衝能が寄与していると考えられた。また、蛍光色素を内包した DGL 複合体を用いて細胞内分解性を評価した結果、DGL は細胞内で分解していることが観察された。一方で DGL 複合体はカチオン性を示すため、PLL 複合体と同様に細胞毒性および血液毒性を示した。我々はすでにカチオン性複合体を γ -polyglutamic acid (γ -PGA) で被膜することで、高い遺伝子発現効果を維持し、毒性を軽減できることを報告している。そこで、DGL 複合体を γ -PGA で被膜した三重複合体 (γ -PGA 複合体) を構築した。 γ -PGA 複合体は DGL 複合体に匹敵する遺伝子発現を示し、DGL 複合体で観察された毒性を改善した。 γ -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)。

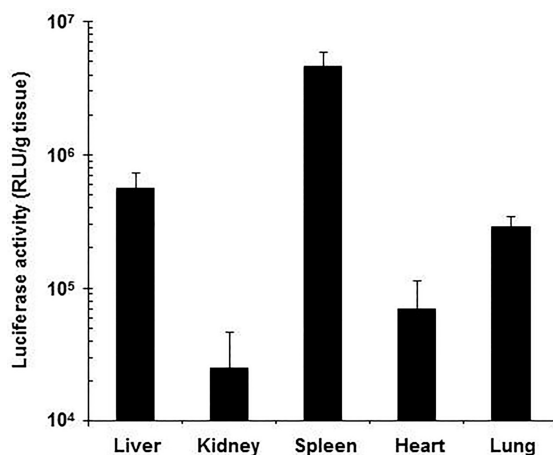


図 1. *In vivo* における pDNA-DGL- γ -PGA 複合体の遺伝子発現効果。

pDNA-DGL- γ -PGA 複合体をマウスに尾静脈内投与 6 時間後、脾臓で高い遺伝子発現を示した。

以上の結果より、DGL および γ -PGA を用いた脾臓指向性を有する生体分解型遺伝子ベクターの開発に成功した。

2. マラリアワクチンへの応用

新規生体分解型遺伝子ベクターのナノワクチンとしての有効性を確認するために、我々がすでに効果を確認しているマラリアワクチンへ応用した。マラリア DNA ワクチンのモデルには、マウスマラリア原虫 *P. yoelii* GPI8p transamidase-related protein をコードした pVR1020-TAM (pyTAM) を用いた。pyTAM と DGL、および γ -PGA を最適な混合比で静電的に自己組織化させ、安定なナノワクチン (pyTAM-DGL- γ -PGA 複合体) の開発に成功した。

C57BL/6 系マウスに PBS (control)、何もコードしていないプラスミド (pVR1020) を内包した複合体 (pVR1020-DGL- γ -PGA 複合体) あるいは pyTAM-DGL- γ -PGA 複合体を 2 週間おきに計 3 回腹腔内投与して免疫誘導を行った。ポジティブコントロールとして、我々が開発した非分解型の pyTAM-polyethylenimine (PEI)- γ -PGA 複合体を用いた。最終免疫から 2 週間後に 1×10^6 の *P. yoelii* 17XL-parasitized red blood cells (pRBCs) を腹腔内投与し、寄生虫血および生存を経日的に観察した。その結果、pVR1020-DGL- γ -PGA 複合体を投与したマウスでは control と同様に寄生虫血が増加し、生存率は 10% 程度だった。これに対し、pyTAM-DGL- γ -PGA 複合体を投与したマウスでは、pyTAM-PEI- γ -PGA 複合体と同様に、寄生虫血の一時的な増加が見られたものの、すぐに消失し、70% 以上の高い生存率を示した (図 2)。

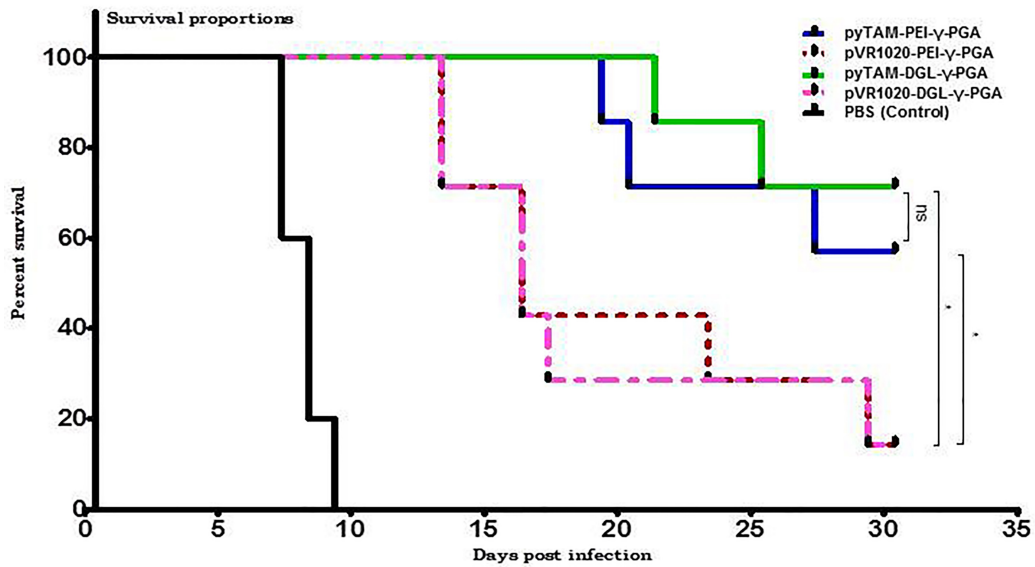


図2. マラリア感染モデルの生存期間に及ぼす pyTAM-DGL- γ -PGA 複合体の延命効果.

pyTAM-DGL- γ -PGA 複合体を投与したマウスの生存期間は control と比較して有意に延長した. * $p < 0.05$, Kaplan-Meier test.

次に, pyTAM-DGL- γ -PGA 複合体の免疫誘導効果を評価するために, 最終免疫から2週間後の血清中抗原特異的 IgG および IgG サブタイプを測定した. pyTAM-DGL- γ -PGA 複合体では, pVR1020-DGL- γ -PGA 複合体と比較して, 総 IgG 値, IgG1 値, IgG2a 値, および IgG2b 値の有意な上昇が認められた (図3). また, 脾臓樹状細胞のサブセット集団に対する影響を明らかにするために, 最終免疫から2週間後にマウスの脾臓を摘出し, 形質細胞様樹状細胞および従来型樹状細胞を評価した. その結果, pyTAM-DGL- γ -PGA 複合体が投与されたマウスの従来型樹状細胞は, pVR1020-DGL- γ -PGA 複合体と比較して, 有意に増加した.

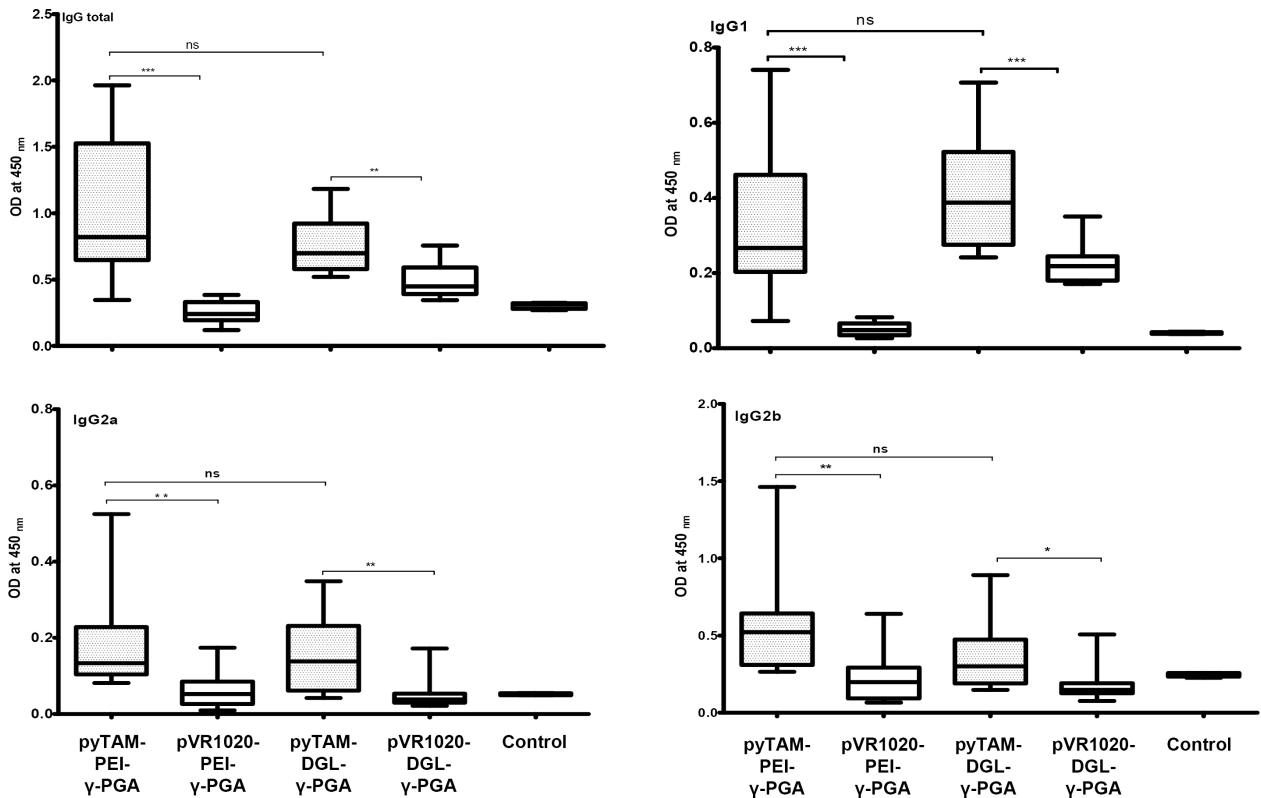


図3. pyTAM-DGL- γ -PGA 複合体による IgG 誘導効果.

pyTAM-DGL- γ -PGA 複合体は、pVR1020-DGL- γ -PGA 複合体と比較して、総 IgG 値、IgG1 値、IgG2a 値、および IgG2b 値の有意な上昇が認められた。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Mann Whitney test.

以上の結果より、我々が開発した生体分解型ナノデバイスを用いて構築した新規マラリア DNA ナノワクチンは、マラリアに特異的な免疫誘導を惹起し、マラリア感染による死亡および寄生虫血の増加を著しく抑制できることが示された。

3. シャーガス病に対する DNA ワクチンの開発

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。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 ワクチンを必要量作製した。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 γ -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、臨床応用を見据えた生体分解型ベクターの開発に成功した。また、本ベクターをマラリア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 ナノワクチンを開発できた。現在は新規に開発したシャーガス病に対する DNA ナノワクチンの効果を確認しているところである。この技術はワクチンだけでなく、シャーガス病を標的とした siRNA のデリバリーにも応用可能であり、現在、研究を進展させている。

文 献

- 1) Kurosaki, T., Kodama, Y., Muro, T., Higuchi, N., Nakamura, T., Kitahara, T., Miyakoda, M., Yui, K. & Sasaki, H. : Secure splenic delivery of plasmid DNA and its application to DNA vaccine. *Biol. Pharm. Bull.*, **36** : 1800-1806, 2013.
- 2) Cherif, M. S., Shuaibu, M. N., Kurosaki, T., Helegbe, G. K., Kikuchi, M., Yanagi, T., Tsuboi, T., Sasaki, H. & Hirayama, K. : Immunogenicity of novel nanoparticle-coated MSP-1 C-terminus malaria DNA vaccine using different routes of administration. *Vaccine*, **29** : 9038-9050, 2011.