

学位論文題名

Enhancing Effect of Vaxfectin in the Ability of a Japanese Encephalitis DNA Vaccine to Induce Neutralizing Antibody in Mice

マウスにおける日本脳炎 DNA ワクチンの中和抗体誘導能に与える
Vaxfectin の増強効果

学位論文内容の要旨

日本脳炎は媒介蚊により感染するウイルス脳炎であり、東アジアから南アジアに至る流行地域では年間 5 万人の患者発生が報告されている。マウス脳由来の日本脳炎ウイルス (JEV) 不活化ワクチンによって、日本、韓国あるいは台湾では過去日本脳炎のコントロールに成功してきたが、この不活化ワクチンは、大量のマウスを使う製造過程やコールド・チェーンを必要とする運搬にコストがかかる上、複数回の免疫が推奨されるため、経済的な問題を抱えており、その解決策として、プラスミドをベクターとして遺伝子を導入する DNA 免疫の系が注目されている。DNA ワクチンは低コストで大量生産できる上、熱に安定で凍結乾燥が可能なため、熱帯諸国への導入が期待できる。

JEV の DNA ワクチン開発にあたって、我々はこれまで中山株の prM、E、あるいは NS1 領域を pcDNA3 に組み込んだりコンビナントウイルスを用いてその免疫原性を比較し、prM と E の同時発現がもっとも高い中和抗体誘導能および防御効果を示すことから、prM/E 遺伝子を組み込んだ DNA ワクチン、pcJEME を開発し、マウスやブタに長期にわたる中和抗体の誘導を、またマウスに致死量のウイルス攻撃からの防御をもたらすことを証明してきた。In vitro の発現実験により、prM/E 遺伝子は細胞外粒子の合成と分泌をもたらし、これが中和抗体の誘導に重要であることがわかっている。しかしながら DNA ワクチンは、CTL の誘導には優れ、高い防御能を示すものの、蛋白ワクチンに比べて中和抗体誘導能は低いと考えられてきた。

DNA ワクチンの抗体産生能を高めるために、過去さまざまな試みが行われてきた。その方法の 1 つに、アジュバントとしてトランスフェクション試薬である Vaxfectin を用いた報告がある。Vaxfectin は、ヌクレアーゼからプラスミドを保護するとともに細胞内への DNA 導入を促進することにより免疫応答を増強すると考えられており、合成が容易な上に低用量で効果があり、臨床実験でも副作用の報告がない。これまでに、インフルエンザウイルスの NP、結核菌の Ag85A、Ag85B、また PstS-3 を発現するプラスミド DNA と Vaxfectin との複合体をマウスやウサギに免疫することにより、中和抗体の産生増強が認められている。

今回我々は、pcJEME の免疫にあたって Vaxfectin を併用することにより、DNA 単独での免疫と比較して、免疫原性および中和抗体誘導能の増強効果について検討した。Vaxfectin は cationic lipid (VC1052) と neutral lipid (DPyPE) の formulation である。DNA との混合モル比は DNA:Vaxfectin=4:1 とし、PBS(-) にて各希釈段階を調製した。1 群 6~10

頭の4週齢の雄 BALB/c および ICR マウスに、5~100 μ g 相当の DNA 含有混合液を1頭当り 100 μ l ずつ大腿部に筋肉注射した。免疫は3週間隔で3回行い、各免疫から2週間後に全頭より採血して血清をプールし、90% plaque reduction assay にて中和抗体価を測定した。

100 または 10 μ g の pcJEME を単独あるいは Vaxfectin との混合で BALB/c に投与した結果、10 μ g pcJEME 単独投与群では3回免疫後も中和抗体の誘導は認められなかったのに対し、10 μ g pcJEME+Vaxfectin 混合投与群では 1:80 の抗体価を示した。また、100 μ g pcJEME 単独投与群では、3回免疫後の抗体価は 1:40 で、Vaxfectin の併用により同レベルの中和抗体を誘導するのに必要な DNA 量が 1/10 に削減できることが示され、BALB/c における Vaxfectin による pcJEME の中和抗体誘導能の増強が認められた。一方、100 μ g pcJEME+Vaxfectin 混合投与群では3回免疫後の抗体価は 1:10 であったが、高濃度の DNA と Vaxfectin とを混合した結果、凝集塊が形成され、これが DNA の細胞内導入を妨げている可能性が示唆された。対照群の 100 μ g pcDNA3+Vaxfectin 混合投与群では抗体価は検出されなかった。

異なる系統のマウスを用いて Vaxfectin の有効性を確認するために行った ICR の実験では、pcJEME の最高用量を 50 μ g とし、5 μ g との2用量について、単独あるいは Vaxfectin と混合して投与した。50 μ g pcJEME 単独投与群では3回免疫後の抗体価は 1:20 であったが、50 μ g pcJEME+Vaxfectin 混合投与群では 1:160 の抗体価を示した。また、5 μ g pcJEME 単独投与群では抗体価は検出されなかったが、5 μ g pcJEME+Vaxfectin 混合投与群では 1:20 を示し、これは 50 μ g pcJEME 単独投与群と同レベルであることから、Vaxfectin は ICR においても pcJEME の中和抗体誘導能を増強することが示された。なお、対照の 50 μ g pcDNA3+Vaxfectin 混合投与群では、抗体価は検出されなかった。

DNA ワクチンにより誘導される免疫のタイプが、Vaxfectin による誘導増強によって変化するか否かを調べる目的で、前述の pcJEME 50 μ g による ICR の免疫実験で得られた血清を対象に、Th タイプの免疫応答の指標として IgG1 および IgG2a 抗体の量を ELISA により測定した。比較対照として現行の蛋白ワクチンである JEVAX を使い、ヒトでの投与量の 1/64 量を ICR に3週間隔で3回、腹腔内投与した。DNA ワクチンは Th1 タイプの免疫応答(IgG1<IgG2a)をより強く誘導し、蛋白ワクチンは IgG1 および IgG2a いずれの抗体も誘導することが知られている。実験の結果、50 μ g pcJEME+Vaxfectin 混合投与群では IgG2a 抗体価は IgG1 抗体価に比べて高く、50 μ g pcJEME 単独投与群と同様の isotype プロフィールを示した。JEVAX 投与群では IgG1、IgG2a 抗体とも検出されたが、IgG1 抗体価は IgG2a 抗体価に比べて4倍高い値を示した。さらに、最終免疫から3週間後に全群のマウスについて 10⁸PFU の JEV Beijing P3 株を腹腔内接種し、3週間後に血清中の IgG1 および IgG2a のレベルを調べたところ、いずれも抗体価の上昇はみられたが、IgG1 と IgG2a のバランスに変化は認められなかった。

BALB/c および ICR を用いて行った実験の結果、Vaxfectin は JEV の DNA ワクチン候補である pcJEME の中和抗体誘導能を8倍以上増強することが示された。我々のこれまでのマウス実験モデルでは、1:10 という低値であっても検出できるレベルの中和抗体の誘導があれば、致死量のウイルス攻撃から防御できることが観察されている。DNA 単独投与では抗体が検出できない低用量の DNA でも、Vaxfectin を併用することで、防御能を付与するレベルの抗体を誘導することができる。とくに日本脳炎のように、疾病予防に液性免疫が重要な役割を果たす感染症に対しては、DNA ワクチンのアジュバントとして Vaxfectin はきわめて有用であると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 瀬 谷 司

副 査 教 授 志 田 壽 利

学 位 論 文 題 名

Enhancing Effect of Vaxfectin in the Ability of a Japanese Encephalitis DNA Vaccine to Induce Neutralizing Antibody in Mice

マウスにおける日本脳炎 DNA ワクチンの中和抗体誘導能に与える
Vaxfectin の増強効果

日本脳炎ウイルス (JEV) は媒介蚊により感染するウイルス脳炎であり、コストの問題を抱える現行の不活化ワクチンに代わって、プラスミドをベクターとして遺伝子を導入する DNA 免疫の系が注目されている。一方、DNA ワクチンは、CTL の誘導には優れ、高い防御能を示すものの、蛋白ワクチンに比べて中和抗体誘導能は低いと考えられてきた。そこで JE の prM/E 遺伝子を組み込んだ DNA ワクチン、pcJEME を対象に中和抗体誘導能を増強する目的で、アジュバントとしてトランスフェクション試薬の 1 つである Vaxfectin (cationic lipid : neutral lipid=1:1) を用い、BALB/c 及び ICR マウスの系で検討した。免疫は筋肉注射を 3 週間隔で 3 回行い、各免疫から 2 週間後に全頭より採血して血清をプールし、90% plaque reduction assay により中和抗体価を測定した。

BALB/c の実験において、10 μ g pcJEME 単独投与群では 3 回免疫後も中和抗体の誘導は認められなかったのに対し、10 μ g pcJEME+Vaxfectin 混合投与群では 1:80 の抗体価を示した。また、100 μ g pcJEME 単独投与群では、3 回免疫後の抗体価は 1:40 で、Vaxfectin の併用により同レベルの中和抗体を誘導するのに必要な DNA 量が 1/10 に削減できることが示され、BALB/c における Vaxfectin による pcJEME の中和抗体誘導能の増強が認められた。また ICR の実験において、50 μ g pcJEME 単独投与群では 3 回免疫後の抗体価は 1:20 であったが、50 μ g pcJEME+Vaxfectin 混合投与群では 1:160 の抗体価を示した。5 μ g pcJEME 単独投与群では抗体価は検出されなかったが、5 μ g pcJEME+Vaxfectin 混合投与群では 1:20 を示し、これは 50 μ g pcJEME 単独投与群と同レベルであることから、Vaxfectin は ICR においても pcJEME の中和抗体誘導能を増強することが示された。また、DNA ワクチンにより誘導される免疫のタイプが Vaxfectin による誘導増強によって変化

するか否かを調べる目的で、ELISA により血清中の IgG1 及び IgG2a 抗体価を測定した結果、Vaxfectin は一般的な DNA ワクチンの特徴である Th1 優位の IgG isotype profile を変化させない

口頭発表に際し、副査の瀬谷 司教授より、1) Vaxfectin と他のアジュバントとの比較実験の有無、2) Vaxfectin による DNA ワクチンの免疫応答増強のメカニズム、また 3) DNA - Vaxfectin complexes に対する樹状細胞の作用について、続いて副査の志田壽利教授より、1) Vaxfectin による CTL 誘導増強の可能性、2) 防御に与える Vaxfectin の効果、3) ELISA による IgG 抗体価と中和抗体価との差異について質問があった。また、主査である長嶋和郎教授からは、1) (+)鎖 RNA に対する innate immunity の可能性、及び 2) Vaxfectin の実用化に向けての展望について質問があった。さらに、フロアの澤 洋文助教授からは、1) JE 流行地域と媒介蚊の生息地域との関連性、及び 2) JEV と他のフラビウイルスとの交差性について質問があった。発表者はこれらの質問に対して自らの実験結果と文献的考察を基にほぼ的確な回答を行った。

本研究は、マウス実験系において Vaxfectin が DNA ワクチンのアジュバントとしてきわめて有用であることを明らかにしたもので、今後の実用化に向けて期待される結果と考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。