

遺伝子銃による生体への遺伝子導入：原虫感染症に対する DNA ワクチン及びサイトカイン遺伝子治療への応用

酒井 徹, 姫野 國 祐

徳島大学医学部寄生虫学教室

(平成11年9月24日受付)

はじめに

分子生物学の発展に伴い生体へ遺伝子を導入・発現させることにより目的の遺伝子機能を *in vivo* で解明する又は遺伝子導入技術を臨床治療に応用する研究が生命科学の分野を問わず現在行われている。生体への遺伝子導入の手法としてはウイルスベクターやリポソームを用いる方法があるが、ベクターの病原性、毒性あるいは煩雑な操作が必要などの点で改良すべき問題点も残っている。上記以外に生体への簡便な遺伝子導入法として遺伝子銃を用いる手法があり、その概要及び応用例について解説したい。

1. 遺伝子銃による遺伝子導入の概要

遺伝子銃とは金粒子やタングステンなどの重金属パーティクル（微小粒子）にプラスミドなどの遺伝子を附着させ、その遺伝子／パーティクル複合体をヘリウムガスにより高速に加速し生体の組織あるいは細胞に直接導入するものである。その基本原理があたかもけん銃に類似しているため遺伝子を打ち込む銃として遺伝子銃と呼ばれている。従来この遺伝子導入法は細胞壁があり遺伝子の導入が困難な植物細胞の形質転換法として用いられてきた¹⁾。しかしながらその遺伝子導入の簡便性及び高い導入効率から動物個体への遺伝子導入技術の一手法となってきた。遺伝子銃システムは複数の遺伝子導入が可能でありさらに常圧下での打ち込みが可能であることから動物個体の特定臓器への遺伝子導入が可能である^{2,3)}。そのためこの遺伝子銃による遺伝子導入システムは DNA ワクチンや遺伝子治療をはじめとする様々な分野に応用されている。

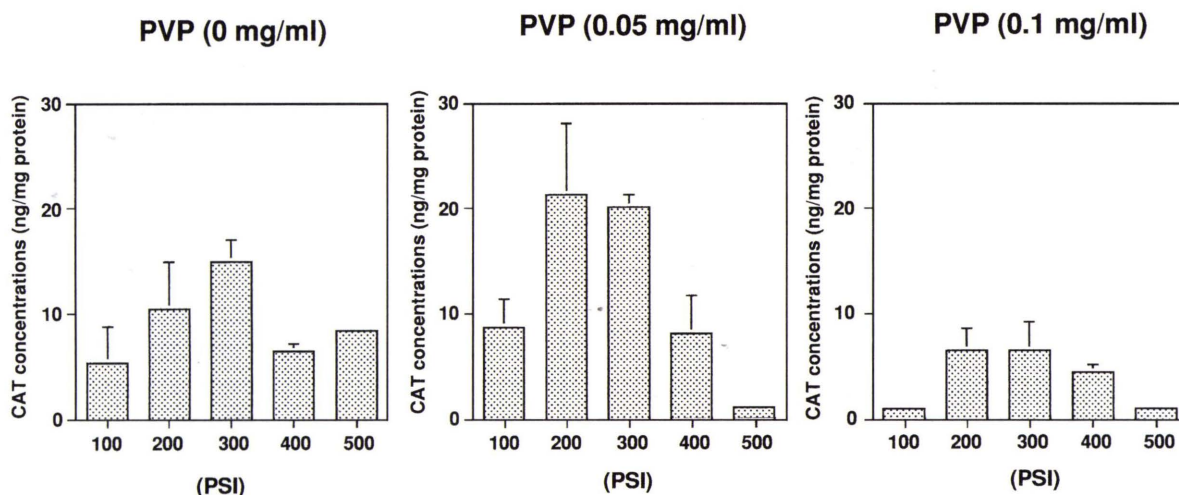
2. 遺伝子銃を用いたマウスへの遺伝子導入

遺伝子銃による遺伝子導入効率は遺伝子／パーティクル複合体を加速するヘリウムガス圧、コーティング時の PVP (Polyvinylpyrrolidone) 濃度、導入に用いるパーティクル及び DNA の量などにより左右される。我々は Helios Gene Gun を用い主にマウス皮膚へ遺伝子導入を行っており、マウス皮膚への遺伝子導入至適条件について検討した結果について示す (図1)。ヘリウムガス圧及び PVP 濃度について様々な条件を設定してその条件下で Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 発現プラスミドをマウス皮膚に遺伝子導入を行った。PVP 濃度についてはヘリウム圧にかかわらず 0 又は 0.05mg/ml で CAT 遺伝子の発現が 0.1mg/ml に比べ高い傾向が認められた。ヘリウムガス圧については 200psi 及び 300psi で CAT 遺伝子の発現が高かった。また DNA をコーティングした金粒子を導入した皮膚を組織学的に検討してみると金粒子は皮膚上皮及び真皮に局在していた (図2)。

3. DNA ワクチンへの応用

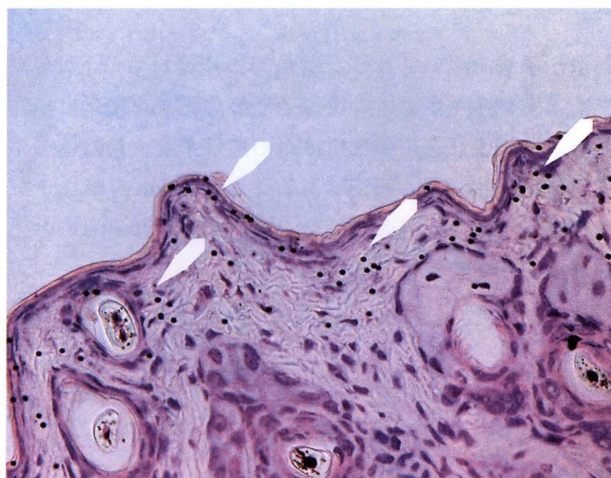
DNA ワクチンとは病原体抗原遺伝子を動物細胞内で発現できる発現プラスミドに組換えその構築した DNA を直接宿主に導入することにより病原体抗原に対する免疫応答を惹起させ感染抵抗性を獲得させるものである。従来の免疫方法に比べ DNA ワクチンの持つ特徴及び利点としては (1) 抗原ワクチンでは誘導が困難な細胞傷害性 T 細胞 (CD8⁺T 細胞) の誘導ができる (2) DNA を接種するため弱毒病原体株接種で時として認められる副作用がない (3) 抗原ワクチンに比べ精製・調製が簡便であり熱に対しても抵抗性である (4) 他の遺伝子と

図1 マウス皮膚への遺伝子導入条件の検討



PVP 濃度及びヘリウム圧がマウス皮膚への遺伝子導入効率にあたる影響について検討を行った。遺伝子銃を用い CAT 発現プラスミドを様々な条件下で遺伝子導入を行い24時間後の CAT 遺伝子の発現を測定した。

図2 マウス皮膚への遺伝子導入後の金粒子の局在



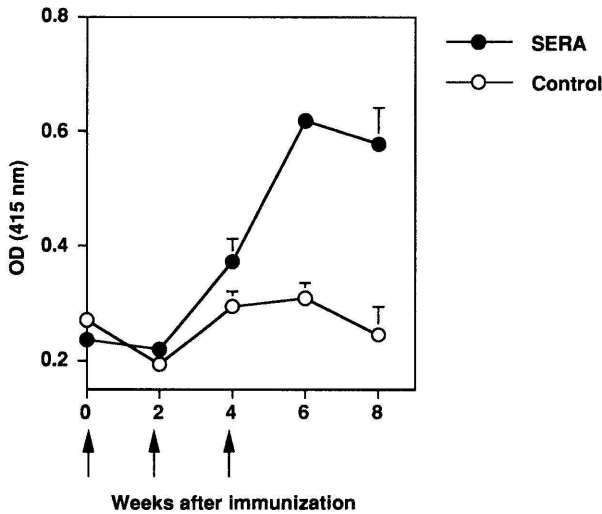
遺伝子銃を用いマウス皮膚への遺伝子導入後、皮膚における金粒子/プラスミド複合体の局在を組織学的に検討を行った。金粒子は皮膚表皮及び真皮層に局在している。

の共導入あるいはワクチンベクターの工夫（宿主細胞で発現させる抗原を分泌型あるいは細胞内に留まらせる）ことで宿主免疫応答を増強及そして任意の MHC class II/MHC class I 依存型免疫応答の制御が可能などがあげられる。現在 DNA ワクチンにおける遺伝子導入法としては発現プラスミドを生理食塩水などに溶解し直接筋肉接種を行う方法と遺伝子銃を用いる方法が主に用いられている。遺伝子銃を用いると筋肉接種法に比べ約 1/100 から 1/1,000 程度のプラスミドで同程度の免疫応答を

誘導できるとされている⁴⁾。近年、DNA ワクチンに関する研究が報告されつつあり、ウイルス^{5,6)}、細菌^{7,8)}及び原虫感染症⁹⁻¹¹⁾での有効性が動物実験で明らかにされている。

原虫感染のなかでもマラリア感染は世界中で 8 億人以上が罹患さらに年間 200 万人以上がその感染のために死亡している地球上第 1 級の感染症である。現在、宿主防御免疫からのエスケープ機構が巧みなマラリア感染に対する有効なワクチンは皆無である。我々はマラリアワクチン開発の基礎研究として赤血球期のマラリア原虫に発現し有力なワクチン候補抗原の一つであるセリンリピート抗原 (SERA) 遺伝子¹²⁻¹⁴⁾を用いマウスに DNA 免疫の実験を行った。遺伝子銃を用い SERA DNA 免疫をすることにより免疫マウス血清中に SERA 特異的抗体が出現した (図 3)。また SERA DNA 免疫による免疫応答を増強そして制御する目的で interferon- γ (IFN- γ), interleukin (IL)-4, IL-12 及び GM-CSF といったサイトカイン遺伝子を共導入した場合の影響について検討を行った。いずれのサイトカイン遺伝子を共導入した場合も SERA 特異的抗体価の上昇が認められた。さらに 1 型ヘルパー T 細胞 (Th 1) の免疫応答の指標である IgG 2 a レベルは特に IFN- γ 及び IL-12 遺伝子共導入で高いことからこれらのサイトカイン遺伝子は DNA 免疫による免疫応答を Th 1 型に制御したことを示唆している (図 4)¹⁵⁾。これらの結果よりサイトカイン遺伝子共導入は DNA ワクチンによる免疫誘導を増強及び制御す

図3 SERA DNA 免疫による特異抗体の誘導



遺伝子銃を用いてSERA 発現プラスミドを2週間間隔で3回マウス皮膚に導入し経時的にSERA 特異的抗体をELISAを用い測定した。

る手法の一つである事が示された。

4. サイトカイン遺伝子治療への応用

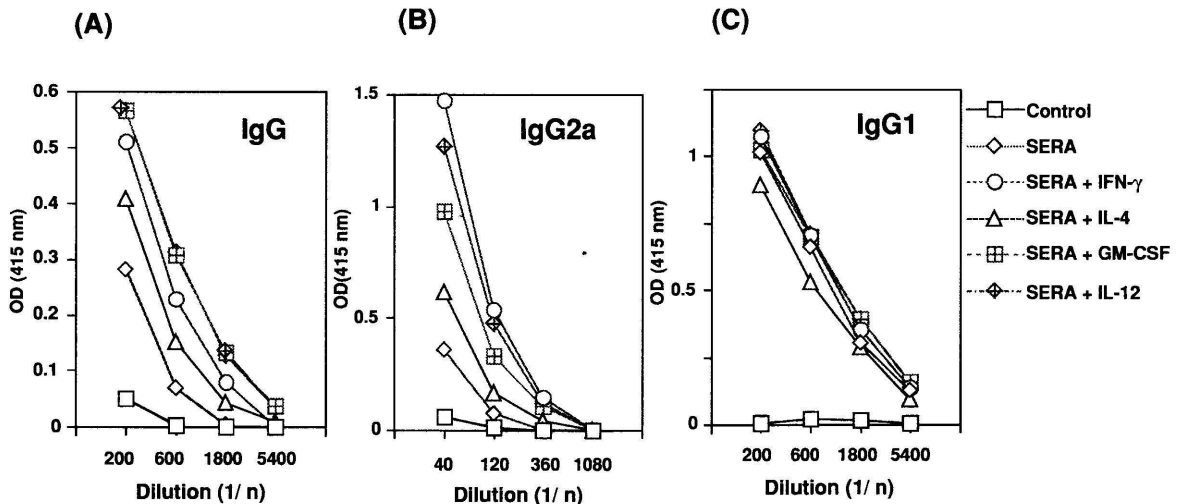
IL-12はTh1細胞の分化誘導, リンパ球の細胞傷害活性及びNK細胞活性増強など様々な作用をもつ生理活性物質である。これまでの研究でIL-12は様々な感染症

及び腫瘍に対し治療効果があることが実験動物レベルで明らかになっている¹⁶⁾。Yangらは遺伝子銃を用いIL-12遺伝子をマウスに導入し悪性腫瘍に対する治療実験を行った。それによると腫瘍細胞をマウスに接種したのちIL-12遺伝子を導入することにより腫瘍の増殖が抑制され, またある種の腫瘍株においては腫瘍の消失が認められた^{17,18)}。我々はIL-12発現プラスミドを遺伝子銃によりマウスに導入し原虫感染症に対する抵抗性が增强するか検討を行った。遺伝子銃によりIL-12発現プラスミドを導入することにより皮膚導入局所にIL-12蛋白の発現が認められた(図5)。シャーガス病の病原体であるクルーズトリパノソーマを感染させたマウスにIL-12発現プラスミドを導入した結果, 感染後血中に出現するクルーズトリパノソーマの数がコントロールに比べ有為に減少しており原虫感染症に対する治療効果が認められた¹⁹⁾(図6)。

5. まとめ

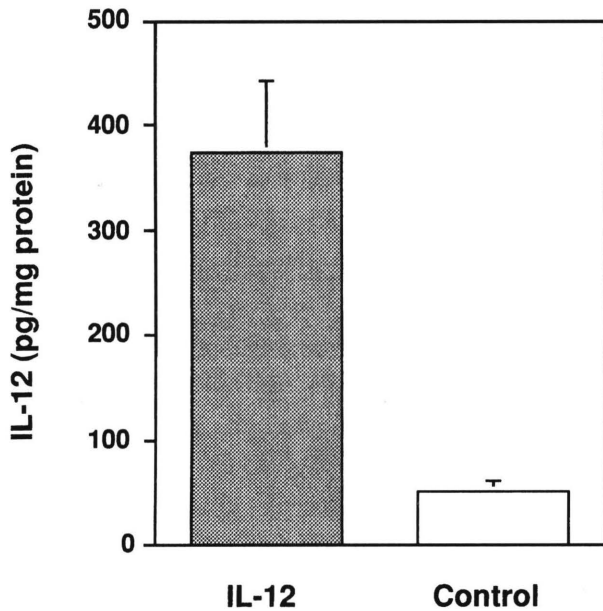
遺伝子銃を用いて行った原虫感染症に対するDNAワクチン及びサイトカイン遺伝子治療の結果を簡単に紹介した。遺伝子銃を用いた生体への遺伝子導入法は他の手法に比べ煩雑でなく簡便であることからDNAワクチン又は遺伝子治療以外の分野にも広く応用されるものと思われる。

図4 DNA免疫により誘導される特異抗体におけるサイトカイン遺伝子の影響



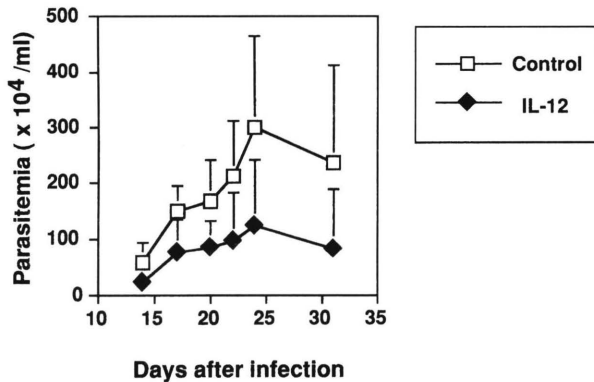
SERA 発現プラスミドとサイトカイン (IFN- γ , IL-4, GM-CSF 又は IL-12) 発現プラスミドを共導入することによりSERA 特異的IgGレベルの上昇が認められた (A)。さらにIFN- γ 又はIL-12遺伝子の共導入によりTh1型免疫応答の指標である特異的IgG2aレベルの上昇が著明に認められた (B)。

図5 皮膚組織へのIL-12遺伝子導入によるIL-12蛋白の発現



遺伝子銃によりIL-12発現プラスミドをマウス皮膚に導入24時間後、導入部におけるIL-12p70蛋白の発現をELISAにより測定をした。

図6 IL-12遺伝子導入によるクルーズトリパノソーマ感染防御効果



クルーズトリパノソーマ感染マウスに遺伝子銃を用いIL-12発現プラスミドを導入し、経時的に血中に出現するクルーズトリパノソーマの数を測定した。IL-12遺伝子群は原虫数の低下が認められ、IL-12遺伝子導入により感染抵抗性が増強した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、共同研究者である大阪大学微生物病研究所堀井俊宏博士、大阪大学医学部宮崎純一博士、新田能朗博士及びご協力いただいた徳島大学医学部寄生虫学教室の方々に感謝いたします。

文 献

- Birch, R. G., and Franks, T.: Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 18 : 453-469, 1991
- Yang, N.-S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., et al.: In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 : 9568-9572, 1990
- Cheng, L., Ziegelhoffer, R. P., and Yang, N.-S.: In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 4455-4459, 1993
- Pertemer, T. M., Roberts, T. R., and Haynes, J. R.: Influenza virus nucleoprotein specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J. Virol.*, 70 : 6119-6125, 1996
- Fynan, E. F., Webster, R. G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., et al.: DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 : 11478-11482, 1993
- Yokoyama, M., Zhang, J., and Whitton, J. L.: DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Virol.*, 69 : 2684-2688, 1995
- Barry, M. A., Lai, W. C., and Johnston S. A.: Protection against *Mycoplasma* infection using expression-library immunization. *Nature*, 377 : 632-635, 1995
- Tascon, R. E., Colston, M. J., Ragno, S., Stavropoulos, E., et al.: Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat. Med.*, 2 : 888-892, 1996
- Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P., and Hoffman, S. L.: Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 : 9866-9870, 1994
- Xu, D., and Liew, F. Y.: Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology*, 84 : 173-176, 1995
- Gurunathan, S., Sacks D. L., Brown, D. R., Reiner, S. L., et al.: Vaccination with DNA encoding the

- immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.*, 186 : 1137-1147, 1997
12. Inselburg, J., Bathurst, I. C., Kansopon, J., Barchfeld, G. L., et al. : Protective immunity induced by in Aotus monkeys by a recombinant SERA protein of *Plasmodium falciparum* : Adjuvant effects on induction of protective immunity. *Infect. Immun.*, 61 : 2041-2047, 1993
 13. Inselburg, J., Bathurst, I. C., Kansopon, J., Barr, P. J., et al. : Protective immunity induced in Aotus monkeys by a recombinant SERA protein of *Plasmodium falciparum* : Further studies using SERA 1 and MF 75.2 adjuvant. *Infect. Immun.*, 61 : 2048-2052, 1993
 14. Suzue, K., Ito, M., Matsumoto, Y., Tanioka, Y., et al. : Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant serine repeat antigen (SERA) of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Int.*, 46 : 17-25, 1997
 15. Sakai, T., Horii, T., Hisaeda, H., Zhang, M., et al. : DNA immunization with *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen : Regulation of humoral immune response by coinoculation of cytokine expression plasmid. *Parasitol. Int.*, 48 : 27-33, 1999
 16. Trinchieri, G. : Interleukin-12 : A cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv. Immunol.*, 70 : 83-243, 1998
 17. Rakhmilevich, A. L., Turner, J., Ford, M. J., McCabe, D., et al. : Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 6291-6296, 1996
 18. Rakhmilevich, A. L., Janssen, K., Turner, J., Culp, J., et al. : Cytokine gene therapy of cancer using gene gun technology : Superior antitumor activity of interleukin-12. *Hum. Gene Ther.*, 8 : 1303-1311, 1997
 19. Sakai, T., Hisaeda, H., Ishikawa, H., Nakano, Y. et al. : Gene gun-mediated delivery of IL-12 expression plasmid protects from infections with intracellular protozoan parasites, *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* in mice. (in print)

Gene gun approaches for DNA vaccine and cytokine gene therapy in protozoan parasite infection

Tohru Sakai, and Kunisuke Himeno

Department of Parasitology and Immunology, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima

SUMMARY

The particle-mediated method for gene delivery with a gene gun utilizes a shock wave to accelerate DNA-coated gold particles into target cells or tissues. This gene delivery method is effective in various somatic tissues in vitro and in vivo. We have, herein, applied this gene delivery system to DNA vaccine and cytokine gene therapy for protozoan parasite infections. We used cDNA encoding 47 kDa of *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen (SERA) that is a vaccine candidate antigen and did SERA DNA immunization with mice using gene gun. Significant SERA-specific antibodies (Abs) were observed by SERA DNA immunization. Furthermore, these Ab responses were enhanced and regulated by coinoculation of cytokine expression plasmid. For other application, we examined the effects of in vivo IL-12 gene treatment on the course of infection with obligate protozoa, *Trypanosoma cruzi*. Transfer with IL-12 expression plasmid in vivo regulated systemic immune responses and furthermore this treatment controlled the progression of experimental trypanosomiasis. Therefore, this gene gun approach may be a useful for DNA vaccine and gene therapy in a wide spectrum of diseases other than the protozoan parasite infection.

Key words : DNA vaccine, gene therapy, gene gun, cytokine gene, protozoan parasite