

MIF-DNAワクチンを用いたイヌアトピー性皮膚炎の治療技術の開発

川本 恵子 [帯広畜産大学/准教授]

水江 由佳 [札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリー/主任研究員]

小野寺 伸 [北海道大学大学院医学研究科/特任講師]

小山 芳一 [北海道情報大学/教授]

西平 順 [北海道情報大学/教授]

背景・目的

我々は、癌や難病の増悪因子であるマクロファージ遊走阻止因子(MIF)ワクチンをプラスミドDNAの形で用いた能動抗体療法の着想に至り、これにより、抗MIF抗体を生体内に確実に惹起し、関節リウマチ、閉経後骨粗鬆症、敗血症、アトピー性皮膚炎(AD)などの疾患モデルマウスで疾患の発症や重篤性を抑えることに成功した。特にADでは、予防効果のみならず、発症後でも寛解治療に導くという治療効果を実証している。そこで本研究開発では、イヌに対するMIF-DNAワクチンを確立し、これによりイヌADを寛解治療に導く全く新規の治療法を確立することを目的とする。また精度の高い評価手法を合わせて確立し、ペット医療や産業動物医療における実用化を目指す。

内容・方法

我々は、帯広畜産大学と国内の実験動物会社が開発を行っているアトピー性皮膚炎(AD)を自然発症するADモデルイヌを用い、*in vivo* エレクトロポレーションによるMIF DNA ワクチン投入技術を確認する。MIF DNA ワクチンを用いた新規遺伝子療法の実用化に向けたデータ取得及び体制を検討し、臨床症状に変化が見られるかその効果と安全性を試験する。また、これまで、MIF研究においては、大腸菌由来の組換え型MIFを用いてきたが、そのBioactivityの低さやエンドトキシンの大量コンタミが大きな問題であった。そこで、バキュロウイルスを用いた生産系で天然型とほぼ同様の翻訳後修飾が起り、高い確率で天然型と同等の活性を有するタンパク質を得られるカイコの生体内タンパク質発現の技術を用いて組換え体イヌMIFを作製する。これを用い、MIF DNA ワクチン投与イヌの血中抗MIF抗体の抗体価モニタリングツールを確立する。さらに、用途確認ができた組換え体イヌMIFや抗体ならびにモニタリングツール等についての事業化を検討する。

結果・成果

(1) イヌ用MIF-DNAワクチンの開発

通常自己タンパク質には免疫寛容が成立しているので抗体は誘導されない。これを克服するため、ヘルパーTエпитープとして異種の抗原ペプチド(ジステンパー

ウイルス由来ペプチド(p35))をイヌMIF cDNAの配列の一部と置換し、イヌに対して抗原性が高まった変異イヌMIFのcDNAを作出した。これを発現プラスミドpCAGGSのプロモーター下流に挿入、イヌMIF-DNAワクチンとし、大量調製した。

(2) ワクチン評価用アトピー性皮膚炎疾患モデルイヌの作出

約3000頭の実験動物用ビーグル犬を常時飼育している動物会社において、AD様皮膚炎症状を自然発症している個体を調査し、1歳前後の犬のうち約1割で痒みや湿疹を伴う皮膚炎が自然発症することが認められた。そこで、ADの類症鑑別として皮膚炎発症犬のうち、ノミやダニなどの外部寄生虫が検出されたものについては除外し、皮膚炎症状について定期的にモニタリングしたところ、皮膚炎自然発症犬の約5割でADに特徴的な病変が観察された(図1)。これらのイヌの血清IgE値について測定したところ、健常犬と比較して、皮膚炎発症犬ではハウスダストや黄色ブドウ球菌、マラセチアに対して健常犬に比べ高い値を示す傾向にあった。病変部皮膚の病理所見を調べたところ、錯角化、角化亢進、表皮の肥厚、真皮への炎症性細胞の浸潤、好酸球およびマスト細胞数の増加、などADに特徴的な病理所見が観察された。これらの所見から、ビーグル犬飼育施設における自然発症皮膚炎の多くがAD様皮膚炎を示すことが明らかとなり、MIF-DNAワクチンの評価に使用できると判断した。



図1 実験動物飼育社会における皮膚炎発症イヌの所見

(3) 抗イヌMIF抗体の評価

組換え体イヌMIF(rcMIF)の作製は、片倉工業(株)(Kaiko express)へ外注して行った。Bgl IIを付加させたプライマーとT7 ReversプライマーでcMIF遺伝子を増幅し、pM03(Bgl II/XhoI)ベクターに挿入し遺伝子組み換えトランスファーベクターを構築し、cMIF遺伝子が正しく挿入されていることを確認した(図2)。次いで、ウイルス液を調製し、

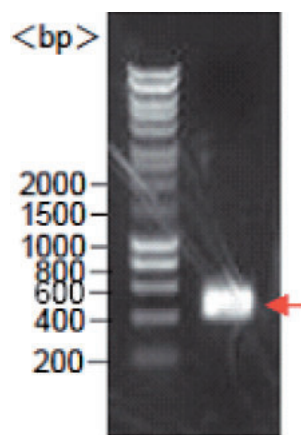


図2 cMIF PCR product

ウイルス感染後、cMIF 発現蛹磨碎液上清をニッケルカラムにて精製、SDS-PAGE で分離し、特異的抗体を用いたウエスタンブロッティングにより目的タンパク質の発現確認を行い、250mM Imidazole での cMIF 溶出を確認した(図3)。今回のニッケルカラム精製での精製純度は、36~76%であった。また、札幌 IDL 社製抗 MIF モノクローナル抗体をリガンドとするアフィニティカラムによる cMIF 発現蛹磨碎液上清からの精製も試みた(図4)。

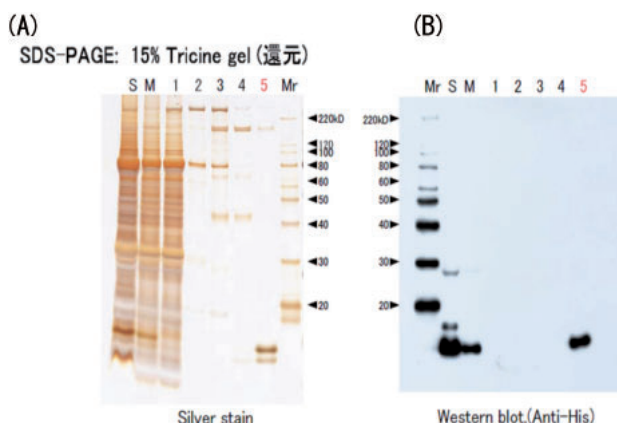


図3 カイコ中に発現された MIF の SDS-PAGE(A)およびウエスタンブロッティング(B)

S; cMIF 発現蛹磨碎液上清

M; 脱塩希釈 (50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 20mM Imidazole, pH8.0)

1; 20mM Imidazole 溶出, 2; 20mM Imidazole 溶出, 3; 50mM Imidazole 溶出, 4; 80mM Imidazole 溶出, 5; 250mM Imidazole 溶出

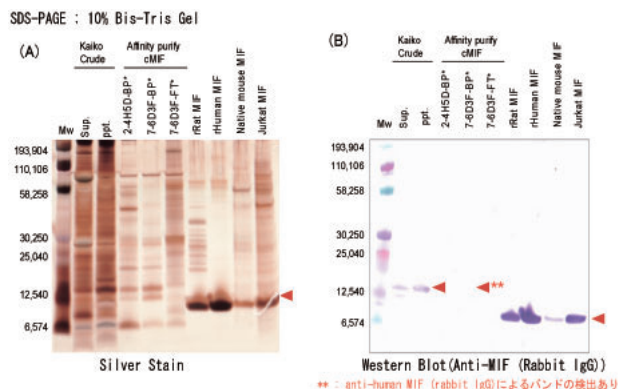


図4 札幌 I.D.L.社製抗 MIF モノクローナル抗体をリガンドとするアフィニティカラムを用いて蛹磨碎液上清から精製した rcMIF の SDS-PAGE(A)およびウエスタンブロッティング(B)

* 2-4H5D-BP; 2-4H5D(mouse IgG1)-binding protein
* 7-6D3F-BP; 7-6D3F(anti-canine MIF mouse IgG1)-binding protein

抗 MIF 抗体リガンドアフィニティカラムで精製した rcMIF を固相抗原とし、MIF-DNA ワクチンにより生体内に惹起された抗 MIF 抗体イヌ IgG 抗体価の測定系を構築した。検討には、平成20年度地域イノベーション

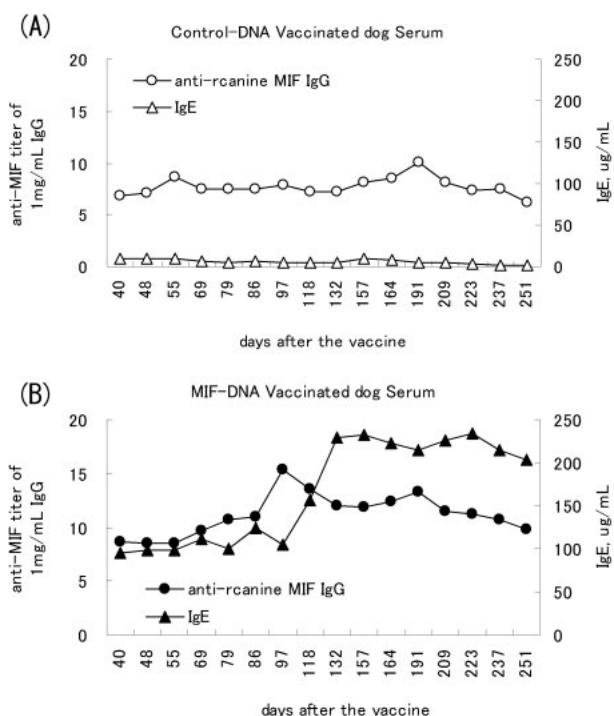


図5 ワクチン投与イヌ血清における抗 MIF 抗体価と総 IgE レベルの比較

(A) コントロール DNA ワクチン投与イヌの血清,

(B) MIF-DNA ワクチン投与イヌ血清

プロジェクトにおいてワクチン投与試験を実施したワクチン投与後経時的に採血したイヌ血清を用いた。各抗血清の IgG 濃度を 1mg/mL とした場合の抗 MIF 抗体価で算出し比較を行い、同時に各抗血清の総 IgE 量を測定し、抗 MIF 抗体価の推移と比較した。

(4) MIF DNA ワクチンの犬への投与方法の検討

対照群(3頭)と処置群(ワクチン投与群、5頭)を用意し、投与前日から絶食させた。AD 様皮膚炎を発症しているイヌ(ビーグル、♂、11-15カ月齢)をミダゾラムとペントバルビタールにより麻酔し、下腿部後部(またはふくらはぎ部)の毛をバリカンで除去した後、消毒用アルコールで投与部位を消毒した。インシュリン投与用シリッジ(27ゲージ)に生理食塩水に溶解した DNA 溶液を 100μl (DNA 量 200μg、0.04% トリパンブルー)採取し、あらかじめ剃毛した部分に DNA 溶液を筋注した。続いて、円形6本針スティック電極(CUY 600-6、ネッパージン社)を用い、電流 150 mA、パルス幅 50 msec の標準設定にて1カ所あたり6回連続、同様処置を合計4カ所、*in vivo* エレクトロポレーションによるワクチン導入を行った。電極を刺した部分に皮膚損傷の有無などは観察されなかった。以上の結果から、ワクチン導入自体は数分で完了し、方法は簡単で、また投与による外科的侵襲もほとんどないことから、一般的な処置施設を持つ民間病院で導入可能な安全性の高いものであると考えられた。

(5) ワクチン投与による抗体価獲得、臨床的有効性の評価

処置群および対照群のイヌ血清中の抗 MIF 抗体価お

よび臨床症状を定期的にモニタリングし、本導入法の有効性、及び有害事象の有無について検討し、MIF-DNA ワクチンの有用性について検証した。上記(3)で樹立した ELISA を用いて、MIF に対する血中抗体価および総 IgE 値を調べた。本検討ではワクチン投与による血中抗 MIF 抗体の誘導は明らかではなかった。その一方で、投与後8週目の時点でワクチン投与群において AD 様皮膚炎の改善傾向が認められた(図6)。掻痒、湿疹などの症状は落ち着き、ひっかき行動も少なくなった。しかし、このような皮膚炎改善効果は約2カ月ほど持続したが、その後3頭のイヌで皮膚炎症状はほとんど消失したが、2頭で再発した。観察期間中に重篤な副作用は観察されず、MIF-DNA ワクチンにより皮膚炎に対する一定の改善傾向が認められた。MIF-DNA ワクチンの作用機序とその効果をいかに持続させるかが今後の課題である。

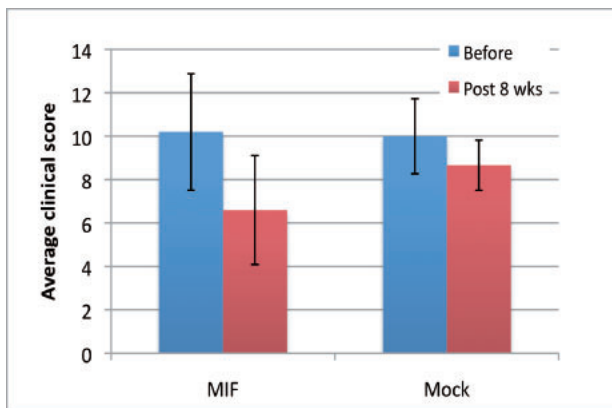


図6 投与前および投与8週後の平均臨床スコアの比較

今後の展望

MIF-DNA ワクチンの作用についてさらなる詳細な検討が必要である。治療効果が認められたが、抗 MIF 抗体価の顕著な上昇は観察されず、その作用機序について基礎研究により明らかにする必要がある。安全性も含め作用機序が解明できた後の事業化スケジュールとしては、北海道大学、北海道情報大学により開発された犬用 MIF-DNA ワクチンの製造技術を GMP レベルの施設を有する札幌 IDL へ移転し、製造方法ならびに貯蔵方法(保存安定性)を確立する。可能であれば、北海道内の開業獣医と共同研究を行う連携型組織を立ち上げ、臨床試験(治験)を実施したい。この際の資金として外部資金の獲得を積極的に目指す。その後1-2年で農林水産省へ動物用医薬品の承認申請を行い、承認を取得する。その後、ペットを対象とした DNA ワクチン製剤の販売を開始する。投薬治療や減感作療法、アレルギー抗原除去食、などの民間療法(代替療法)などの治療法に変わるものであり、MIF-DNA ワクチンは、ペット産業において大きな市場が獲得できる。