

---

## Summary: A live attenuated markerless prophylactic vaccine for leishmaniasis using CRISPR gene editing

Leishmaniasis, which is widely distributed over the world, shows various symptoms. The development of vaccines against it is sought urgent global issues due to the emergence of resistant strains to existing drugs, serious side effects, and the lack of drugs that clear *Leishmania* at cutaneous and mucocutaneous regions. Live attenuated vaccines are one of the promising methods, but they involve various risks associated with persistent infection of vaccine strains. In this study, we applied the CRISPR-Cas9 system to create a *centrin*-deficient *Leishmania major* (*LmCen*<sup>-/-</sup>) that lacks only the centrin gene, which is essential for proliferation and persistent infection of *L. major* amastigotes in mammalian cells. The safety of *LmCen*<sup>-/-</sup> was confirmed by gradually decreasing its number even in severely complex immune-deficient animals such as IFN- $\gamma$ -deficient and Rag2-deficient mice without forming any regions. *LmCen*<sup>-/-</sup> has been detected in wild-type mice and hamsters for more than 2 months while reducing its number, and it also provides protection against homologous and heterologous *L. major* that causes cutaneous leishmaniasis and cross-protection against *L. donovani* that causes visceral leishmaniasis. Furthermore, it provides sufficient protection against challenge infections mediated by sandflies, indicating to be a promising vaccine candidate. Currently, we are proceeding with the production and evaluation of GMP-level products.

---

## 要約：CRISPR-Cas9を用いた遺伝子編集弱毒生リーシュマニア予防ワクチン（薬剤耐性マーカーフリー）の創出と評価

世界中に広く分布するリーシュマニア症は多彩な病態を呈する。既存の薬剤に対する耐性原虫の出現、重篤な副作用、皮膚や粘膜で奏功する薬剤の欠落により、ワクチンの開発が希求される状況にある。弱毒生ワクチンは有望な方法の1つであるが、ワクチン株の持続感染に付随する様々なリスクを包含する。本研究では、リーシュマニアの宿主内増殖ひいては持続感染に不可欠な遺伝子である *centrin* 遺伝子のみを欠損させた *Leishmania major* (*LmCen*<sup>-/-</sup>) を CRISPR-Cas9 システムを応用して創出した。*LmCen*<sup>-/-</sup> は IFN- $\gamma$  欠損マウスや Rag2 欠損マウスのような重症複合免疫不全動物でも病態を形成することなく徐々にその数を減ずるなど、その安全性が確認された。野生型マウスやハムスターでもその数を減じながら2ヶ月以上は検出可能であり、*L. major* による皮膚型リーシュマニアに加え、*L. donovani* によって引き起こされる内臓型リーシュマニア症に対しても交差防御を附与出来た。さらにサシチョウバエを介したチャレンジ感染に対しても十分な防御を附与できるなど、有望なワクチン候補であることが示された。現在、GMPレベルの製品生産とその評価を進めている。

(訳 濱野真二郎 / Trans. Shinjiro Hamano)