

平成 1 0 年 度

厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)

C型肝炎に対するDNAワクチン治療の研究

研 究 報 告 書

主任研究者 森 山 貴 志

C型肝炎に対するDNAワクチン治療の研究

主任研究者名 森山貴志 自治医科大学

研究要旨 マウスでC型肝炎ウイルス・コア蛋白特異的CTLを誘導できることを確認した。DNAワクチンによりヘルパーT細胞が誘導されたことから、そのin vivoでの機能を確認できた。CTL、ヘルパーT細胞とも既に報告されているレベルまでの強さを誘導することはできなかった。

分担研究者 八木田秀雄
順天堂大学
助教授

A. 研究目的

一般のウイルス感染の予防は、ワクチン接種により中和抗体を誘導して行うがC型肝炎ウイルスは変異しやすいため、ワクチンはできていない。

中和抗体以外に細胞障害性Tリンパ球(CTL)により、ウイルス感染予防が可能であることが最近、CTLを誘導する新しい方法として抗原をコードする遺伝子そのものを用いる方法が注目されている。この方法がC型肝炎ウイルスに対しても可能かどうかを基礎的に検討する。

B. 研究方法

DNAワクチンとして各種プロモーターと組み合わせたプラスミドを使用した。アジュバントDNAとしてIL-2, GM-CSF等をコードするプラスミドを用いた。DNAワクチンを1回もしくは2回筋注し、最後の免疫から1週後にマウスをsacrificeして、脾細胞を取り出した。ヘルパーT細胞の誘導を試みる時は、in vitroで抗原刺激を1~2回行った。in vitroにおけるCTLの誘導はCTL epitopeに相当する合成ペプチドで刺激し1週間培養し、Europium release assayを用いて細胞障害性を検討した。

C. 研究結果

DNAワクチンを単独で1回筋注した後、免疫脾細胞をin vitroで1回刺激を行ったが有意の増殖を得られなかった。in vitroでの刺激を1回行った後、さらに2回目の刺激を行なったところ、コア蛋白特異的な増殖が観察された。

DNAワクチンによるCTL誘導能を比較検討するため、positive controlとして、組換えワクシニア・ウイルスを用いて以前に行った実験では、effector to target ratio (E/T) = 20で35%の特異的キラー活性が得られている。それに対してDNAワクチンの実験ではCTL assay時のE/Tを100~200と非常

に高く設定したにもかかわらず、強いCTL応答は誘導できなかった。例えば、pMAMneoで1回免疫した場合、E/T=140でもわずか9%の特異的キリングしか見られなかった。

次に免疫応答を強めると考えられているIL-2, GM-CSF等と組み合わせて実験を行っているが、現在までの所、大きな改善は得られていない。DNAワクチンを筋注しただけでは、再現性をもって強いCTLを誘導することはできなかった。

D. 考察

HCV coreに対するマウスのDNAワクチンでは、海外からin vitro1回刺激でHCVコア蛋白特異的な増殖が報告されている。本研究では、in vitro2回刺激では有意の増殖が見られたが、1回では得られなかった。この系がin vivoで働いていることは確認されたが、その程度は、既報のものと比べて弱いと言わざるを得ない。マウスで従来から用いられている組換えワクシニアウイルスによるCTLの誘導ではCTLを誘導できたが、DNAワクチンでは困難であったことよりin vitroの誘導系は有効に働いており、やはりin vivoにおける免疫原性がDNAワクチンでは問題があると考えられる。一般的には、抗原の発現量を増やした方が免疫原性は高まるので、プロモーターを変えて発現量を高めて検討を行う。またワクシニアウイルスを感染させた際には種々のサイトカインが誘導され、免疫応答が高まっていると考えられるので、その状態をsurrogateしうるアジュバントとしてのDNAワクチンを各種組み合わせで検討していく。

E. 結論

マウスでC型肝炎ウイルス・コア蛋白特異的CTLを誘導できることを確認した。DNAワクチンによりヘルパーT細胞が誘導されたことから、そのin vivoでの機能を確認できた。CTL、ヘルパーT細胞とも既に報告されているレベルまでの強さを誘導することはできなかった。

C型肝炎に対するDNAワクチン治療の研究

分担研究者 八木田秀雄 順天堂大学

研究要旨 免疫応答を制御する種々の分子を解析し、コードする遺伝子を主任研究者の森山に供給した。DNAワクチンがうまく行かない理由として、C型肝炎ウイルス・コア蛋白がdeath domainに働いて宿主の免疫応答を抑制している可能性を指摘し、ミニジーンを作製を助言した。

主任研究者 森山貴志
自治医科大学
講師

て実験を行っているが、大きな改善は得られていない。

A. 研究目的

分担研究者は生体の免疫応答制御機構を研究しているが、その経験に即して主任研究者のC型肝炎ウイルスに対するDNAワクチンの研究に対して、プラスミドや抗体等を供与し、同時に基礎免疫学の最新情報に基づき、助言を行う。

B. 研究方法

DNAワクチンの免疫応答能を高めることが期待されるサイトカイン(IL-2, IL-4)やcostimulatory molecule (CD80, CD86, CD30 ligand, CD40 ligand, 4-1 BB ligand)のDNAを供与する。

C. 研究結果

C型肝炎ウイルスコア蛋白をコードするDNAワクチン単独では、十分なCTLを誘導できなかったため、免疫応答を高めることが期待できる上述のプラスミドを供与した。

主任研究者は、DNAワクチンの目的に合わせて、これらを適当なベクターに組み替えたり、大量に精製して実験に用いる。

現在までにpreliminaryにIL-2, CD86, CD40 ligand等と組み合わせ

D. 考察

分担研究者は主任研究者からHCV coreに対するマウスのDNAワクチンでは、既報の結果と較べて弱い結果しか得られないと相談を受けた。そこで、免疫応答を高めることが期待できるアジュバントDNAを供与して、種々の組み合わせで検討してもらっている最中である。

一方、文献的に検討した結果、C型肝炎ウイルス・コア蛋白は生体内で発現すると宿主の免疫応答を抑制するとの報告が最近なされた。その機序として、細胞の持つdeath domainと相互作用を起こして細胞死を引き起こすことによる可能性が示されている。そこでdeath domainと相互作用を起こすと考えられるコア蛋白部分を除いたミニジーンを作製してDNAワクチンとして使用することを主任研究者に助言した。

E. 結論

マウスでC型肝炎ウイルス・コア蛋白に対する免疫応答を高めることが期待できるアジュバントDNAを供与した。