

平成11年度厚生科学研究費補助金研究報告書

(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 (H10-医薬-019)

平成12年3月

研究代表者 森 山 貴 志
(自治医科大学医学部講師)
研究分担者 八 木 田 秀 雄
(順天堂大学医学部助教授)

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 マウスにおいてDNAワクチンを用いて、C型肝炎ウイルス・コア蛋白特異的CTLを誘導することはできなかった。

分担研究者名 八木田秀雄
順天堂大学
助教授

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスは非経口的に感染し、免疫能が正常の成人であっても高率に慢性化する。感染者の約20%は慢性肝炎、肝硬変を発症するものと考えられる。更に、肝硬変患者の半数以上で肝細胞癌が発症する。C型肝炎に対する治療はインターフェロンの登場により患者の一部で治療に導くことが可能となったが、有効率は、当初、期待されたほどではなく半数以上の患者に対して、いまだに有効な治療法がない現状である。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く、現在の所、感染を終息させる中和抗体の存在は証明されていない。

中和抗体の誘導以外にCTL（細胞障害性Tリンパ球）を誘導することにより、ウイルス感染予防が可能であることが示されている。CTLを誘導するためには、標的抗原を内因性に発現させることが必要であるが抗原蛋白を接種するだけでは、生体内で外因性にT細胞に提示されるため、CTLは誘導されないのが通常である。

最近、CTLを誘導する新しい方法として当該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。同時にヘルパーT細胞は、抗体やCTL

の誘導に大きな役割を果たすのでCTLの解析と併せてその解析も行う。

B. 研究方法

DNAワクチンとしてpMAMneo, pEFBOS, pcDNA3, VR1012, HBxの各種プロモーターにC型肝炎ウイルス・コア蛋白をコードするsequenceを組み込んだプラスミドを使用した。アジュバントDNAとしてIL-2, GM-CSF, CD40L, CD86, IL-7, CD30L, 4-1 BBLをコードするプラスミドを用いた。

C型肝炎ウイルス・コア蛋白をコードする各プラスミドを100~400 µg/mouse、1回もしくは2週のintervalにおいて2-3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。

DNAワクチンの効果を高めるために投与方法に関して、以下に述べる方法も試みた。筋注したプラスミドが筋肉細胞へ取り込まれるのを容易にする目的で、筋肉再生を引き起こすbupivacaine, cardiotoxinの併用を行った。また各プラスミドをリポソームとミックスし、マウスに静注した。

DNAワクチンのpositive controlとしてB型肝炎ウイルス表面抗原(HBs)をコードするプラスミドを用いた。

CTLを誘導する方法としては、免疫した脾細胞をCTL epitopeに相当する合成ペプチドで1週間刺激した後、Europium release assayを用いて細胞障害性を検討した。

なお全ての実験は、自治医科大学の動物取り扱い規約に準じて行われた。

C. 研究結果

方法のところで述べた全てのプラスミドを用いて、実験を行ったが既報のようなデータは再現できなかった。

上記プラスミドと組み合わせて免疫応答を強めると考えられている分子をコードするプラスミドをいわばアジュバントとして併用してCTL応答を検討した。IL-2, GM-CSF, CD40L, CD86, IL-7, CD30L, 4-1 BBLを単独または2～5種類併用して実験を行ったが、現在までの所、大きな改善は得られていない。

投与方法も上述のごとく試みたが有効には働かなかった。

次にDNAワクチンのpositive controlとすべくHBsをコードするプラスミドで免疫した。培養した細胞は、標的となるペプチドをまぶした細胞も内因性にHBs抗原を発現しているトランスフェクタントも特異的に殺傷した。

D. 考察

以上より、DNAワクチンを用いて、HCVコア蛋白特異的なCTLを誘導できないのは、マウスの筋注等の単純なテクニカル・エラーによるのではないと思われる。

実際、GM-CSFをアジュバントとして用いると、報告されているとおり、著明な脾腫と脾細胞数の増加が観察されており、他のプラスミドを用いると筋注したものがin vivoで発現して、それぞれ抗原として働いたり、生理活性が観察されているわけである。

また、C型肝炎ウイルスを発見した米国カイロン社はワクチンの開発にも意欲的に取り組んでいるが、講演でチンパンジーではDNAワクチンがうまくいかなかったと語っている。マウスにおいても従来報告されているC型肝炎ウイルス・コア蛋白特異的CTLを誘導することは再現できなかったとする論文を発表しており、C型肝炎におけるDNAワクチンを実現するためには、効果を高める工夫が必要と考えられる。

E. 結論

DNAワクチンにより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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Honda, A., Arai, Y., Hirota, N., Sato, K., Ikegaki, J., Koizumi, T., Hatano, M., Kohara, M., Moriyama, T., Imawari, M., Shimotohno, K., and Tokuhisa, T. Hepatitis C virus structural proteins induce liver cell injury in transgenic mice. *J. Med. Virol.* 59: 281-289, 1999

2. Honda, A., M. Hatano, M. Kohara, Y. Arai, T. Hartatik, T. Moriyama, M. Imawari, K. Koike, O. Yokosuka, K. Shimotohno, and T. Tokuhisa. 2000. HCV-core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis in mice. *J. Hepatol.*

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。組換えワクシニアウイルスにC型肝炎ウイルスの各領域を導入した場合にコア領域だけが、免疫抑制に働くという文献を主任研究員に知らせ、助言を行った。

主任研究者 森山貴志
自治医科大学
講師

costimulatory molecule(CD80, CD86, CD30 ligand, CD40 ligand, 4-1 BB ligand と組み合わせ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IL-2, IL-4 や

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。

組換えワクシニアウイルスにC型肝炎ウイルスの各領域を導入した場合にコア領域だけが、免疫抑制に働くという文献を主任研究員に知らせ、助言を行った。

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。

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 マウスにおいてDNAワクチンを用いて、C型肝炎ウイルス・コア蛋白特異的CTLを誘導することはできなかった。

分担研究者名 八木田秀雄
順天堂大学
助教授

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスは非経口的に感染し、免疫能が正常の成人であっても高率に慢性化する。感染者の約20%は慢性肝炎、肝硬変を発症するものと考えられる。更に、肝硬変患者の半数以上で肝細胞癌が発症する。C型肝炎に対する治療はインターフェロンの登場により患者の一部で治癒に導くことが可能となったが、有効率は、当初、期待されたほどではなく半数以上の患者に対して、いまだに有効な治療法がない現状である。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く、現在の所、感染を終息させる中和抗体の存在は証明されていない。

中和抗体の誘導以外にCTL（細胞障害性Tリンパ球）を誘導することにより、ウイルス感染予防が可能であることが示されている。CTLを誘導するためには、標的抗原を内因性に発現させることが必要であるが抗原蛋白を接種するだけでは、生体内で外因性にT細胞に提示されるため、CTLは誘導されないのが通常である。

最近、CTLを誘導する新しい方法として当該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。同時にヘルパーT細胞は、抗体や

CTLの誘導に大きな役割を果たすのでCTLの解析と併せてその解析も行う。

B. 研究方法

DNAワクチンとしてpMAMneo, pEFBOS, pcDNA3, VR1012, HBxの各種プロモーターにC型肝炎ウイルス・コア蛋白をコードするsequenceを組み込んだプラスミドを使用した。アジュバントDNAとしてIL-2, GM-CSF, CD40L, CD86, IL-7, CD30L, 4-1 BBLをコードするプラスミドを用いた。

C型肝炎ウイルス・コア蛋白をコードする各プラスミドを100~400 μ g/mouse、1回もしくは2週のintervalにおいて2-3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。

DNAワクチンの効果を高めるために投与方法に関して、以下に述べる方法も試みた。筋注したプラスミドが筋肉細胞へ取り込まれるのを容易にする目的で、筋肉再生を引き起こすbupivacaine, cardiotoxinの併用を行った。また各プラスミドをリポソームとミックスし、マウスに静注した。

DNAワクチンのpositive controlとしてB型肝炎ウイルス表面抗原(HBs)をコードするプラスミドを用いた。

CTLを誘導する方法としては、免疫した脾細胞をCTL epitopeに相当する合成ペプチドで1週間刺激した後、Europium release assayを用いて細胞障害性を検討した。in vitroにおけるCTLの誘導法は、すでにワクシニア

ウイルス(WR strain)にHCV coreをコードする領域を組み込んで作製した組換えワクシニアウイルスを用いて免疫した脾細胞に用いて確認した方法である。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回行い、 $[^3\text{H}]$ -thymidine uptakeにより抗原特異的な増殖を測定した。

なお全ての実験は、自治医科大学の動物取り扱い規約に準じて行われた。

C. 研究結果

方法のところで述べた全てのプラスミドを用いて、実験を行ったが既報のようなデータは再現できなかった。以下にいくつかの結果を提示する。pMAMneoプロモーターの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HCVコア蛋白とともに培養して、 $[^3\text{H}]$ uptakeを測定したが有意な増殖は見られなかった。in vitroでの刺激を1回行った後、さらに2回目の刺激を行い $[^3\text{H}]$ uptakeを測定したところ、今度はstimulation index 17とHCVコア蛋白特異的な増殖が観察された。pcDNA3, pEFBOSをプロモーターとするプラスミドでも同様の実験を行ったが、やはりin vitroでの刺激を1回行っただけでは有意の増殖を得られなかった。in vivoでの免疫を2~3回行った後、in vitroでの刺激を1回行い、 $[^3\text{H}]$ uptakeを測定したが有意の増殖を得られなかった。

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でもわずかに9%の特異的キリングしか見られなかった。

次に上記プラスミドと組み合わせて

免疫応答を強めると考えられている分子をコードするプラスミドをいわばアジュバントとして併用してCTL応答を検討した。IL-2, GM-CSF, CD40L, CD86, IL-7, CD30L, 4-1 BBLを単独または2~5種類併用して実験を行ったが、現在までの所、大きな改善は得られていない。

投与方法も上述のごとく試みたが有効には働かなかった。

更にDNAワクチンのpositive controlとすべくHBsをコードするプラスミドで免疫した。培養した細胞は、標的となるペプチドをまぶした細胞も内因性にHBs抗原を発現しているトランスフェクタントも特異的に殺傷した。

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、既報のものと較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。

またHBsに対するDNAワクチンは、我々のところでもうまく働いており、DNAワクチンを用いて、HCVコア蛋白特異的なCTLを誘導できないのはマウスの筋注等の単純なテクニカル・エラーによるのではないと思われる。

実際、GM-CSFをアジュバントとして用いると、報告されているとおり、著明な脾腫と脾細胞数の増加が観察されている。HCVコア蛋白以外のものをコードするプラスミドを用いると筋注したものがin vivoで発現して、それぞれ抗原として働いたり、生理活性が

観察されているわけである。

また、C型肝炎ウイルスを発見した米国カイロン社はワクチンの開発にも意欲的に取り組んでいるが、講演でチンパンジーではDNAワクチンがうまくいかなかったと語っている。マウスにおいても従来報告されているC型肝炎ウイルス・コア蛋白特異的CTLを誘導することは再現できなかったとする論文を発表しており、C型肝炎におけるDNAワクチンを実現するためには、効果を高める工夫が必要と考えられる。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Honda, A., Arai, Y., Hirota, N., Sato, K., Ikegaki, J., Koizumi, T., Hatano, M., Kohara, M., Moriyama, T., Imawari, M., Shimotohno, K., and Tokuhisa, T. Hepatitis C virus structural proteins induce liver cell injury in transgenic mice. J. Med. Virol. 59: 281-289, 1999

2. Honda, A., M. Hatano, M. Kohara, Y. Arai, T. Hartatik, T. Moriyama, M. Imawari, K. Koike, O. Yokosuka, K. Shimotohno, and T. Tokuhisa. 2000. HCV-core protein accelerates recovery from the insensitivity of liver cells to Fas-mediated apoptosis in mice. J. Hepatol.