

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591475

研究課題名(和文) 抗原タンパク表層ディスプレイ型ビフィズス菌を用いた慢性肝炎経口治療ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of a novel oral therapeutic HCV vaccine using bifidobacterium displaying antigen

研究代表者

白川 利朗 (Shirakawa, Toshiro)

神戸大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：70335446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：現在、世界中で約1億7千万人のHCVキャリアーが存在し、インターフェロンや抗ウイルス薬によりC型慢性肝炎の治療成績は向上したものの、その根治率は未だ満足のいくものではない。HCVウイルスの排除にはHCV非構造タンパクNS3に対する細胞性免疫が大きな役割を果たしていることが報告されている。今回、我々は、プロバイオティクスであるビフィズス菌の表層に、HCVのNS3タンパクのCD4およびCD8エпитープを複数含んだポリペプチドをディスプレイした新しいC型慢性肝炎経口ワクチンを作製し、マウスを用いた動物実験により、本ワクチンがNS3特異的細胞性免疫を誘導できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：More than 170 million people worldwide are chronic HCV (Hepatitis C virus) carriers. A combination of pegylated interferon-alpha with ribavirin, the standard treatment for HCV infection, has been effective in fewer than 50 percent of patients infected with HCV genotype 1. A strong T cell response against the nonstructural protein 3 (NS3) is important for recovery from acute HCV infection, and an early multi-specific CD4 helper and CD8 cytotoxic T cell response is critical for HCV clearance. In the present study, we successfully constructed a genetically modified Bifidobacterium longum displaying recombinant HCV-NS3 peptides containing some CD4 and CD8 epitopes located in the HCV-NS3 region as an oral vaccine against chronic HCV infection. The oral administration of this vaccine could induce NS3-specific immune responses in mice through intestinal mucosal immunity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：慢性C型肝炎 経口ワクチン ビフィズス菌

1. 研究開始当初の背景

現在、世界では約1億7千万人のC型肝炎ウイルス(HCV)キャリアーが存在していると推測され、我が国での感染者数も100万~200万人にのぼる。また日本では、肝炎ウイルスの持続感染による慢性肝炎さらには肝硬変を発生母地として生じる肝細胞癌の80%弱がHCV抗体陽性との報告もある。C型慢性肝炎の治療にはインターフェロンを中心とした抗ウイルス療法が行われ、近年では、インターフェロンのペグ化によるドラッグデリバリーの改善や抗ウイルス薬(リバビリン)の併用療法の確立などで治療成績が向上しているが、日本ではインターフェロンが効きにくい1b遺伝子型が約70%を占め、その根治率は約50%にとどまる。現在、C型慢性肝炎の治療成績を向上させる新規抗ウイルス薬や治療ワクチンの開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

(1) 新興再興感染症の脅威や薬剤耐性病原体に対する治療戦略としてのワクチンの役割は年々大きくなっている。1986年にリコンビナントB型肝炎ワクチンが実用化されて以来、遺伝子工学を応用したワクチン開発が盛んに行われており、抗原遺伝子または抗原タンパクを有効に運んで提示するベクター、プラットフォームの開発も進んでいる。現在までに我々は局所と全身性免疫の両方を効果的に誘導する経口粘膜ワクチンのプラットフォームとして、抗原タンパク表層ディスプレイ・ビフィズス菌を開発した。

(2) HCVの非構造タンパクNS3(nonstructural protein 3)は宿主タンパクとの相互作用により、HCVの増殖、持続感染に関与している。ヒト臨床検体やチンパンジーを用いた実験などにより、HCVの制御と排除にNS3特異的細胞性免疫が重要な役割を果たすことが判明している。今回の研究ではこのNS3を表層ディスプレイするビフィズス菌をC型慢性肝炎に対する経口治療ワクチンとして開発することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) NS3表層ディスプレイ型ビフィズス菌の作製

HCV-1b型MKC1a株NS3領域由来のエピトープ遺伝子を*B. longum*特有のトランスポーターであるガラクト-N-ビオース(GNB)/二糖ラクト-N-ビオース(LNB)結合膜蛋白(GLBP)の遺伝子のC末端に融合させた。これを*B. longum*-*E. coli*シャトルベクターに組み込み、電気穿孔法により*B. longum*に遺伝子導入を行うことで、GLBPを分子アンカーとしNS3合成蛋白を表層発現する*B. longum*を作製した。CD4エピトープを2種、CD8エピトープを3種含むものを*B. longum* 2164、CD4エピトープを2種、CD8エピトープを5種含む

ものを*B. longum* 2165と命名した。さらにGLBPのみを発現する*B. longum* (*B. longum* 2012)を作製した。

(2) 抗原タンパク発現の局在(表層ディスプレイ)確認

遺伝子組み換えビフィズス菌のNS3の発現はWestern Blotting法にて、局在について細胞免疫染色にて確認する。HCVのNS3抗体は市販されているものを使用する。

(3) マウス実験モデルによるNS3特異的抗体の誘導とTh1反応誘導の確認

マウス実験モデルによる免疫誘導の確認のため、 2.5×10^7 cfuの遺伝子組み換えビフィズス菌を週3回、4週間にわたりBALB/Cマウスに経口投与する。マウス脾臓よりリンパ球を抽出しNS3タンパクと共培養しIFN- γ の産生をELISA法にて定量する。

4. 研究成果

(1) NS3タンパク発現の確認

Western Blotting法

GLBP-NS3融合タンパクの分子量は*B. longum* 2164で66 kDa、*B. longum* 2165で69 kDaである。Western Blotting法の結果を図1に示す。

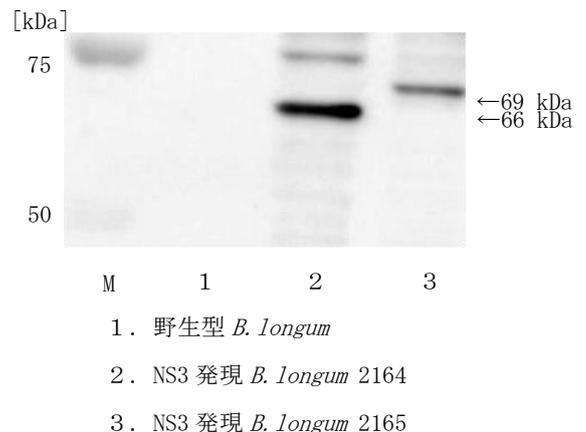


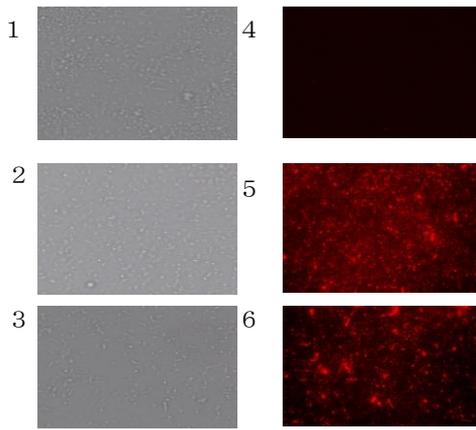
図1 ウェスタンブロットング法によるNS3蛋白の検出

いずれも目的の位置にバンドを確認することができ、設計通りの分子量のタンパクを発現していることが確認できた。

細胞免疫染色

野生型*B. longum* 245と比較して*B. longum* 2164および*B. longum* 2165は強い蛍光を確認することができ、ビフィズス菌表層に目的のNS3蛋白が発現していることが分かった

免疫染色法の結果を図2に示す。



1, 4 : 野生型 *B. longum* 245
 2, 5 : NS3 発現 *B. longum* 2164
 3, 6 : NS3 発現 *B. longum* 2165
 1-3 : 明視野 (400 倍)
 4-6 : 蛍光顕微鏡下 (400 倍)

図 2 免疫染色法による NS3 蛋白表層発現の確認

(2) HCV-NS3 抗原特異的抗体の検出

局所的な粘膜免疫の誘導を確認するため、糞便に含まれる NS3 抗原特異的 IgA 抗体を ELISA 法により検出した。その結果を図 3 に示す。28 日目に採取した糞便について、*B. longum* 2165 投与群は PBS, *B. longum* 245, *B. longum* 2012 投与群と比較して有意に高い吸光度を示した ($p < 0.05$)。一方、*B. longum* 2164 もわずかに高い値を示したものの、有意差は認められなかった。

全身性の免疫応答の誘導を確認するため、血清に含まれる NS3 抗原特異的 IgG 抗体を ELISA 法により検出した。その結果を図 4 に示す。*B. longum* 2164 および *B. longum* 2165 とともに経日的に IgG 抗体量が上昇し、14, 28 日目において PBS, *B. longum* 245, *B. longum* 2012 投与群比較し有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。

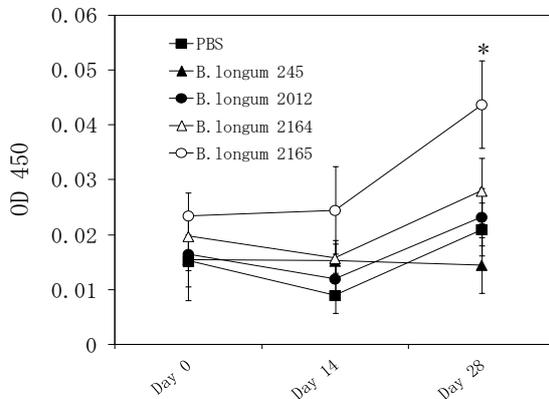


図 3 糞便中の NS3 特異的 IgA *; $p < 0.05$

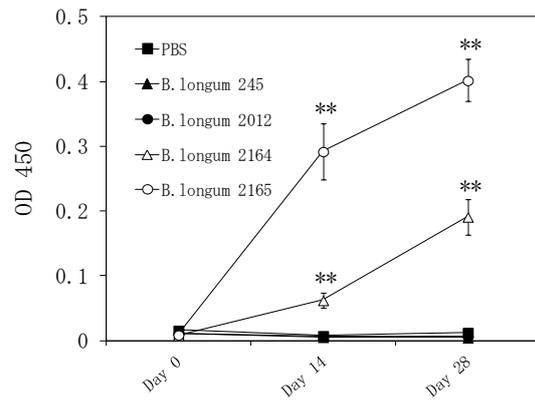


図 4 血清中の NS3 特異的 IgG **; $p < 0.01$

(3) 脾臓細胞のサイトカイン産生の確認

解剖により摘出した脾臓細胞を GST-NS3 ペプチドで刺激しながら培養し、 $IFN-\gamma$ の産生量を測定、比較した。結果を図 5 に示す。*B. longum* 2165 投与群は抗原刺激により $IFN-\gamma$ 産生量が増加し、同じ条件で培養した非刺激対照群と比較して有意な差が認められた ($p < 0.01$)。*B. longum* 2164 においては有意な差は見られなかったが、 $IFN-\gamma$ 産生量は増加した。

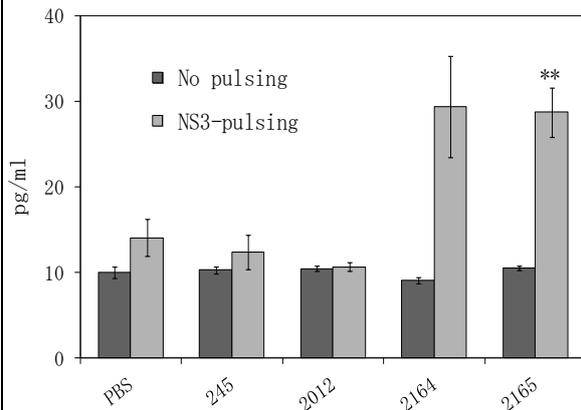


図 5 $IFN-\gamma$ 産生量 **; $p < 0.01$

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Takei S, Omoto C, Kitagawa K, Morishita N, Katayama T, Shigemura K, Fujisawa M, Kawabata M, Hotta H, Shirakawa T. Oral administration of genetically modified Bifidobacterium displaying HCV-NS3 multi-epitope fusion protein could induce an HCV-NS3-specific systemic immune response in mice. Vaccine, 査読あり、2014;32(25):3066-74. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.03.022

〔学会発表〕（計1件）

①大本 知佳、北川 孝一、竹井 咲希、森下 直矢、片山 高嶺、堀田 博、川端 真人、白川 利朗、ORAL ADMINISTRATION OF GENETICALLY MODIFIED BIFIDOBACTERIUM DISPLAYING HCV-NS3 MULTI-EPITOPE FUSION PROTEIN CAN INDUCE THE HCV-NS3 SPECIFIC SYSTEMIC IMMUNE、第19回日本遺伝子治療学会学術総会、2013年7月4日、岡山

〔図書〕（計1件）

①白川 利朗、第6節経口ワクチン、ワクチン開発における最新動向、2013年10月17日、187-196、株式会社情報機構

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：免疫原性ポリペプチド表層発現ビフィズス菌

発明者：白川 利朗、堀田 博、片山 高嶺

権利者：神戸大学

種類：特許

番号：PCT/JP2014/053560

出願年月日：2014年2月14日

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

〔医学研究科〕堀田博教授、白川利朗准教授らがC型肝炎の経口治療ワクチン候補を開発しました

2014年3月20日、

http://www.kobe-u.ac.jp/NEWS/research/t2014_03_20_02.html

〔科学技術振興機構（JST）〕2014年03月20日善玉ビフィズス菌を利用したC型肝炎の経口治療ワクチン候補の開発に成功〔成果〕.

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140320/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白川 利朗 (Shirakawa, Toshiro)

神戸大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：70335446

(2) 研究分担者

堀田 博 (Hotta, Haku)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：40116249

(3) 連携研究者

片山 高嶺 (Katayama, Takane)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：70346104