

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461503

研究課題名(和文)新規経口ワクチンを用いたC型慢性肝炎治療法の開発研究

研究課題名(英文)Development of novel HCV treatment using oral vaccine

研究代表者

白川 利朗 (SHIRAKAWA, TOSHIRO)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号：70335446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000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が、その根治率は未だ満足のいくものではない。現在までに我々は、ビフィズス菌の表層にHCVのNS3タンパク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、マウス実験モデルにて細胞性免疫の誘導を確認している。今回の研究では本ワクチンを用いた新規C型慢性肝炎治療法の開発研究として、NS3タンパク発現マウス腫瘍モデルを用いてインターフェロン併用療法との相乗効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：Currently, there are about 170 million HCV (hepatitis C virus) carriers worldwide. Although the treatment outcomes for chronic HCV infection have been improved with interferon and antiviral drugs, the curative rate is still not satisfactory. Recently, we have generated a novel oral HCV vaccine displaying HCV-NS3 protein on the cell surface of bifidobacteria and confirmed that it could induce the HCV-specific cellular immunity in a mouse experimental model. In this study, we have developed novel combinational oral vaccine therapy for HCV infection and confirmed its synergistic effect with interferon using a mouse syngeneic tumor model expressing NS3 protein.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：経口ワクチン 慢性C型肝炎 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HCVが約70%を占め、その根治率は約50%にとどまる。最近承認されたプロテアーゼ阻害剤(テラプレビル)を併用しても根治率は約70%である。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。現在までに我々は、プロバイオティクスであるビフィズス菌の表層にHCV NS3タンパクをディスプレイした新しい慢性C型肝炎治療のための経口HCVワクチンを作製し、マウス実験モデルにてNS3特異的なIgG抗体およびTh1反応の誘導を確認している。今回の研究では本経口HCVワクチンを用いた新規慢性C型肝炎治療法の開発研究として、NS3タンパク発現マウス腫瘍モデルを用いて、本ワクチンによる治療効果やインターフェロン併用療法の相乗効果等を確認する。

### 2. 研究の目的

(1) 現在、C型肝炎のマウス実験モデルは存在しないが、本治療ワクチンの有効性の確認手法として、マウスリンパ腫細胞EL4にHCVのNS3/4A遺伝子を安定導入し、マウス皮下に移植し本ワクチン投与による腫瘍増殖抑制効果を検討することによりNS3特異的細胞性免疫誘導の効果をj確認する。

(2) 遺伝子組換え生物(LMO)拡散防止の観点から、加熱殺菌したワクチンについても本マウスモデルで有効性を検討し、加熱条件等を設定する。

(3) 本マウスモデルを用いてインターフェロン併用の相乗効果も確認し、臨床応用に向けた新規治療プロトコルのProof of Principleを確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) NS3発現EL4細胞株の樹立

pBApo-CMV NeoベクターにNS3/4A遺伝子をインサート後、マウスリンパ腫EL4細胞にリポフェクション法にて安定導入し、G418にて遺伝子導入細胞の選択培養を繰り返し、NS3タンパクの発現をウェスタンブロッティングおよび免疫細胞染色にて確認する。

#### (2) 加熱殺菌条件の設定

本経口ワクチンである遺伝子組換えビフィズス菌を65℃で、4~7分間加熱し、様々な濃度で培地に塗布し、菌の発育を観察し、加熱により組換え菌を完全に不活化できる条件を確定する。また、その不活化条件では抗原タンパクは変性しないことを、ウェスタンブロッティングおよび免疫細胞染色にて確認する。

#### (3) 不活化ワクチンおよびインターフェロンαの併用による細胞性免疫の誘導と、NS3発現腫瘍増殖抑制効果の確認

NS3発現EL4細胞を皮下移植したマウスに不活化経口ワクチンの経口投与と同時に、peg-IFN-α2a(30μg/kg)を3日おきに計4回皮下注射し、その腫瘍増殖抑制効果によって併用による相乗効果を検討する。またNS3特異的なTh1反応を確認するために併用療法後の脾臓細胞を摘出培養し、NS3タンパクで刺激し、インターフェロンγの分泌をELISA法にて測定する。

### 4. 研究成果

#### (1) NS3発現EL4細胞株の樹立

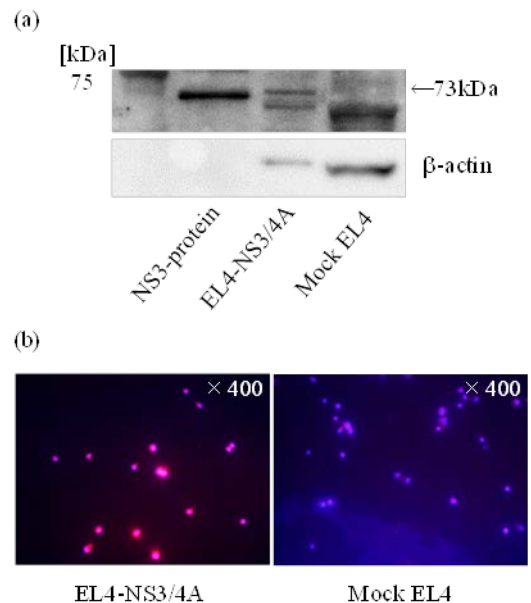


図1、NS3タンパクの発現

(a) ウェスタンブロッティングにて、NS3タンパクの発現がNS3/4A遺伝子を導入した、EL4-NS3/4A細胞でのみ、タンパク量に相当する位置で確認された。(b) EL4-NS3/4A細胞のみが抗NS3抗体で標識された。

以上の結果より、NS3発現EL4細胞株の樹立に成功した。

(2) 加熱殺菌条件の設定

	Dilution (fold)							
	1	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	—	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
Non heated	0	0	0	0	—	279 ± 19	21 ± 2	2.3 ± 1.4
4 min	+	0	0	0	—	0	0	0
5 min	0	0	0	0	—	0	0	0
6 min	0	0	0	0	—	0	0	0
7 min	0	0	0	0	—	0	0	0

テーブル 1. 加熱後培養のコロニー数  
65°C、5分で完全に不活化されたとして、65°C 5分を加熱不活化条件とした。

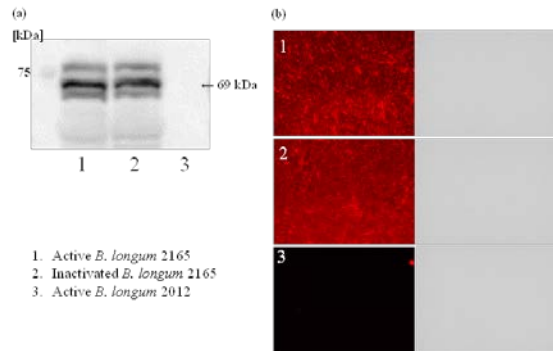


図 2. NS3 タンパクの保持  
(a) ウェスタンブロッティングにて、NS3 タンパクの発現が生ワクチン (Active)、不活化ワクチン (Inactive) 双方で確認された。(b) 生ワクチン (Active)、不活化ワクチン (Inactive) 双方が抗 NS3 抗体で標識された。以上の、結果より、65°C 5分で生ワクチンは完全に不活化されるが、NS3 タンパクは変性していないことが確認された。

(3) 不活化ワクチンおよびインターフェロンαの併用による細胞性免疫の誘導と、NS3 発現腫瘍増殖抑制効果の確認

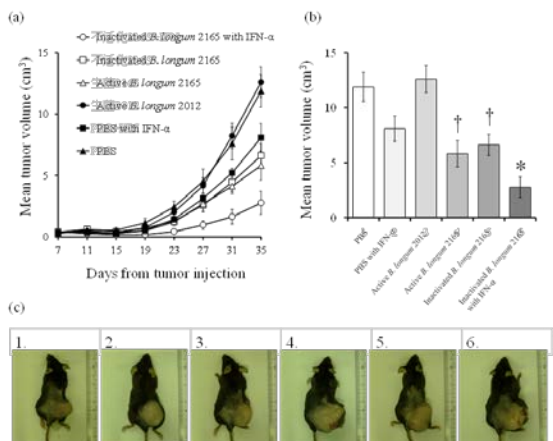


図 3. 不活化ワクチンおよびインターフェロンα併用による NS3 発現腫瘍増殖抑制効果  
(a) 腫瘍増殖抑制効果では、生ワクチン (Active)、不活化ワクチン (Inactive) で同様の抗腫瘍効果を確認、インターフェロンα併用による相乗効果を確認した。

(b) 35日後において、生ワクチン (Active)、不活化ワクチン (Inactive) 双方で有意な腫瘍増殖抑制効果を確認、インターフェロンαにてさらに有意な腫瘍増殖抑制効果を確認した。

(c) マウス腫瘍の肉眼写真。

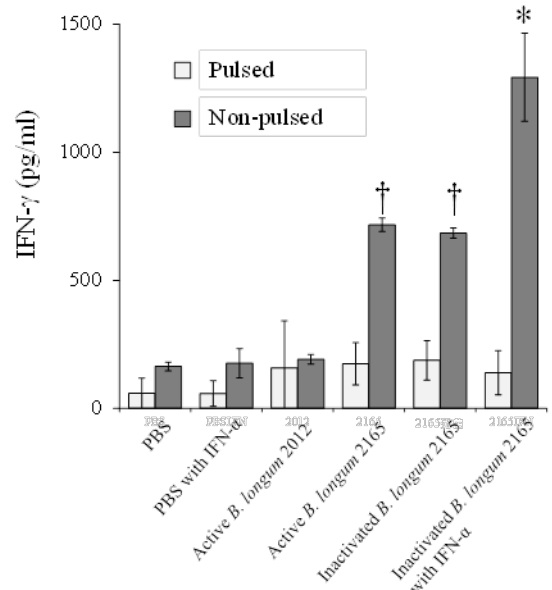


図 4. 脾臓細胞のインターフェロンγの分泌 ELISA による定量。  
生ワクチン (Active) あるいは、不活化ワクチン (Inactive) を経口投与したマウスの脾臓細胞を培養し、NS3 タンパクで刺激したところ、双方で、インターフェロンγ分泌の有意な増加を確認した。またインターフェロンαの併用によりさらにインターフェロンγの分泌が増加した。以上の結果より、生ワクチン (Active) あるいは、不活化ワクチン (Inactive) どちらでも、NS3 タンパク特異的な Th1 反応を誘導することが可能で、インターフェロンαにより反応を増強できることが判明した。

これらの結果より、本経口 HCV ワクチンは 65°C 5分で加熱不活化しても、有効性を保持し、インターフェロンαの併用で、強力な HCV 特異的細胞性免疫を誘導できることがわかった。本経口 HCV ワクチンとインターフェロンαの併用療法は次世代の慢性 C 型肝炎治療法として実用化できる可能性が非常に高いことが判明した。

## 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)

Koichi Kitagawa, Chika Omoto, Tsugumi Oda, Ayame Araki, Hiroki Saito, Katsumi Shigemura, Takane Katayama, Hak Hotta, and Toshiro Shirakawa

Oral Combination Vaccine, Comprising Bifidobacterium Displaying Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 3 and Interferon- $\alpha$ , Induces Strong Cellular Immunity Specific to Nonstructural Protein 3 in Mice, *Viral immunology*, 査読有、Vol 30, 2017, 196-203

[学会発表] (計3件)

① Koichi Kitagawa, Tsugumi Oda, Hiroki Saito, Ayame Araki, Reina Gono, Katsumi Shigemura, Takane Katayama, Masato Fujisawa, Toshiro Shirakawa  
Development of the Novel Oral Tumor Vaccine Using Bifidobacterium longum Displaying Wilms' Tumor 1 Protein, 第19回米国遺伝子治療学会 (国際学会)、2016年5月5日、ワシントンDC (米国)

② Koichi Kitagawa, Hiroki Ishikawa, Tsugumi Oda, Hiroki Saito, Naoya Morishita, Kouske Shimamoto, Norihisa Nishida, Yoichi Matsuura, Hak Hotta, Toshiro Shirakawa  
Development of Combination Therapy of Bifidobacterium-Based Oral Vaccine Displaying HCV-NS3 with Interferon- $\alpha$ 、第18回米国遺伝子治療学会 (国際学会)、2015年5月15日、ニューオーリンズ (米国)

③ Koichi Kitagawa, Chika Omoto, Hiroki Ishikawa, Tsugumi Oda, Naoya Morishita, Hak Hotta, Toshiro Shirakawa  
Development of Combination Therapy of Bifidobacterium Displaying HCV-NS3 Oral Vaccine with Interferon-Alpha、第20回日本遺伝子治療学会、2014年8月7日、東京

[その他]

ホームページ等

白川研究室ホームページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/biolgx/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白川 利朗 (SHIRAKAWA, Toshiro)  
神戸大学・大学院科学技術イノベーション研究科・教授  
研究者番号: 7 0 3 3 5 4 4 6

### (2) 研究分担者

堀田 博 (HOTTA, Haku)  
神戸大学・大学院保健学研究科・特命教授  
研究者番号: 4 0 1 1 6 2 4 9

### (3) 連携研究者

片山 高嶺 (KATAYAMA, Takane)  
京都大学・大学院生命科学研究所・教授  
研究者番号: 7 0 3 4 6 1 0 4