

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19790497
研究課題名（和文） 経皮 TLR リガンド免疫法を用いた肝炎ウイルスに対するワクチン開発
研究課題名（英文） Vaccine development against hepatitis virus by transcutaneous peptide immunization with TLR7 ligand.
研究代表者
古市 好宏（FURUICHI YOSHIHIRO）
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：70384998

研究成果の概要：開発途上国を含めた世界中の国に普及が可能な経済的で効果的な新しい肝炎ウイルスワクチンの開発を目的として、針を使わない経皮免疫法の開発を検討した。細胞性免疫応答の主体である細胞傷害性 T 細胞(CTL)の誘導を目的としたワクチンを開発するために TLR7 リガンドであるイミキモド(Imiquimod)をアジュバントとして用い CTL エピトープペプチドを経皮的に投与して免疫応答を誘導した。ヘルパーエピトープを加えてさらにワクチンの効果を増強することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学（肝臓）

キーワード：CTL, Th, ワクチン, TLR 7, 経皮免疫, イミキモド, トランスジェニックウイルス, 肝炎

1. 研究開始当初の背景

現在我が国には数百万人の肝炎ウイルスキャリアの存在が推定され、その結果、肝硬変や肝細胞癌による年間死亡者数は約 3 万人と算定される。B 型肝炎ウイルス(HBV)や C 型肝炎ウイルス(HCV)の持続感染による慢性肝炎

の増加は、戦後の社会的あるいは医療事情に起因していることを考えると、社会全体がこの肝臓に対して特別な関心と撲滅のための努力をしなければならない。肝臓のリスクを軽減するためには、ウイルス性肝炎に対する治療が重要であり、従来の抗ウイルス療法に加

えてより一層効果的で信頼性の高い新しい治療法の開発が必要である。

HCVに対しては、インターフェロン+リバビリン治療によってウイルスを排除することが可能になったが、HBVに対して、抗ウイルス薬によるウイルス複製の抑制や、HBIG(抗HBs人免疫グロブリン)の投与による肝炎発症の予防が実践されてはいるが、ウイルスを完全に排除することは不可能である。また、抗ウイルス薬を長期間投与した場合、変異株の出現し、肝炎が再燃するリスクが高まる。そこで抗ウイルス剤によってウイルスの複製が抑制され、ウイルス量がコントロールされている時期に、免疫応答を誘導することにより、ウイルスを排除または制御する治療法の開発が望まれている。

免疫応答の成立には自然免疫系から獲得免疫系への連携が重要であることが明らかになってきた。TLRを介した免疫応答は、直接的な抗ウイルス作用を発揮することに加えて、抗原提示細胞である樹状細胞の機能や分化に大きな影響を与えて、細胞性免疫応答を制御していることが明らかになってきた。皮膚にはランゲルハンス細胞と呼ばれる樹状細胞の一種や、皮膚樹状細胞、プラズマ細胞様樹状細胞などが存在する。皮膚に存在する樹状細胞は、抗原刺激に対して速やかに抗原を獲得し、リンパ組織へと移動して、免疫応答を開始することが知られている。TLR7リガンドであるイミキモドを皮膚に塗布すると、TLR7を発現しているプラズマ細胞様樹状細胞が活性化され、血中から皮膚に浸潤し、皮内の他の樹状細胞を活性化する。このとき、HBs抗原やCTLエピトープペプチドを皮膚に塗布しておくと、これらの抗原がランゲルハンス細胞などの樹状細胞に取り込まれ、リンパ組織へと移走した樹状細胞により、抗原特異的な免疫応答が誘発される本研究では、最先端の免疫応答の

制御に関わる知見を加えて、新しい肝炎ウイルスに対するワクチン開発を試みた。

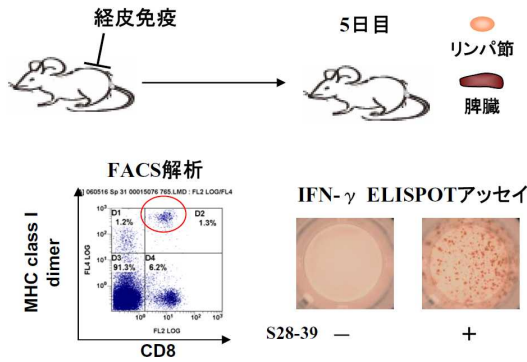
2. 研究の目的

我が国だけでなく、開発途上国を含めた世界中の国に普及が可能な経済的で効果的な新しい肝炎ウイルスワクチンの開発を目的として本研究を提案したい。肝炎ウイルス特異的な免疫応答を誘導するために、非常に安定なペプチドを抗原に用いて、針を使わない経皮免疫法を試みる。抗体だけでなく細胞性免疫応答の主体である細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導を目的としたワクチンを開発する。TLR7リガンドであるイミキモド(Aldara; 3M Pharmaceuticals)をアジュバントとして用いて、HBs抗原またはエピトープペプチドを経皮的に投与して免疫応答を誘導し、予防ワクチンとしてだけでなく、肝炎ウイルスの排除につながる治療ワクチンを開発したい。

3. 研究の方法

(1)CTL TCR トランスジェニックマウスを用いた経皮免疫法の確立 経皮免疫法の評価には、個体レベルの実験が不可欠であるため、免疫応答が詳細に解析されているマウスメラノーマ細胞に対するCTLの誘導をワクチンモデルに用いる。gp100抗原を特異的に認識するCTL由来のT細胞受容体(TCR)を持ったTCR transgenic mice (Pmel-1マウス)のリンパ球(5×10^6 個)をC57BL/6マウスの尾静脈から投与してresponderを作成し、hgp100ペプチドワクチンの条件検討を行う。経皮免疫法には、アジュバントにTLR7リガンドであるイミキモドを用いる。イミキモド50mgと50 μ gのhgp100ペプチド(hgp10025-33, KVPRNQDWL)を混和した後、マウスの背部の皮膚に塗布して免疫する。さらに免疫応答を増強するために、ヘルパーエピトープペプチド-peptide-25(Ag85B240-254,

FQDAYNAAGGHNAVF)を加える。

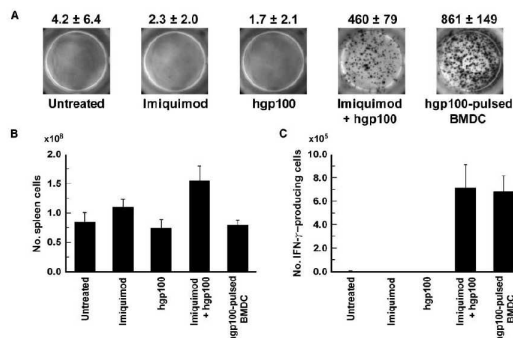


(2)HBV に対する CTL ワクチンの開発 HBV に対する免疫応答では、コアタンパクに対する強い CTL が誘導できることが知られている。そこでマウスモデルを用いて、コアタンパクに対する CTL の誘導を検討した。Kb 拘束性 HBcCTL ペプチド (MGLKFRQL) と I-Ab 拘束性 HBcTh ペプチド (VSFGVWIRTPPAYRPPNAPIL) を各 50mg のイミキモドと混和して経皮ワクチンを作成し C57BL/6 マウスを免疫した。

(3)CTL 誘導の検出 マウスの脾細胞を単離し、 1×10^5 /well の細胞を抗原ペプチド存在下に 26 時間培養した後、抗原特異的な IFN- γ 産生を ELISPOT 法で検出した。

4. 研究成果

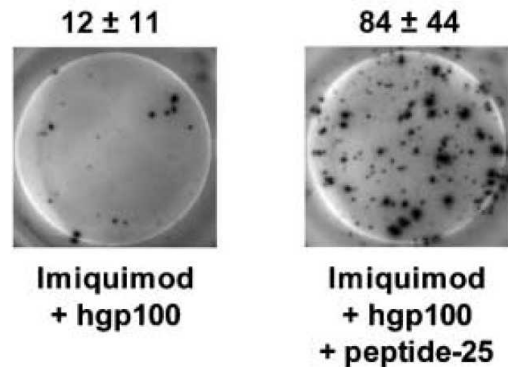
(1)TLR7 リガンドを用いた経皮免疫法の確立 経皮免疫法は、皮膚にワクチンを塗布するだけの非常に簡便で負担の少ない免疫法であ



るが、図に示す通り、効率よく CTL を誘導す

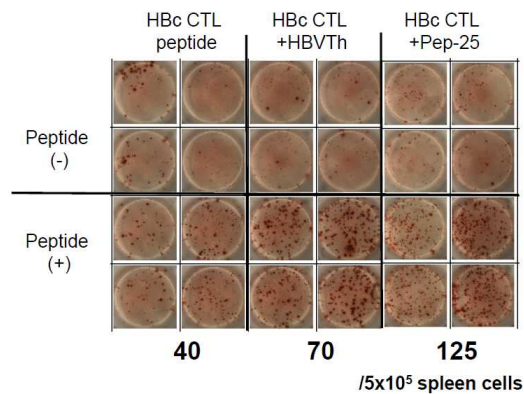
ることができた。脾細胞 1×10^6 個当たり 400 以上のスポットを検出した。イミキモド単独、ペプチド単独では IFN- γ 産生スポットは認められないが、イミキモドとペプチドを混和したワクチン投与を受けたマウスでは強い CTL の誘導が認められた。経皮免疫の効率は樹状細胞ワクチンに匹敵するものであった。

(2)ヘルパーエпитープによる CTL ワクチンの増強効果



予防ワクチンに比較して、慢性感染状態における治療ワクチンの開発は非常に困難である。そこでさらに経皮ワクチンの効率を高めるために、結核菌 antigen 85B 由来の非常に強いヘルパーエピトープである Peptide-25 を加えてマウスを免疫した。脾細胞 1×10^5 個当たり 12 ± 11 のスポットを検出した。ヘルパーエピトープペプチドである peptide-25 の添加によって 84 ± 44 スポットに増加した。CTL ペプチド単独に加えて、peptide-25 を加えることでその効果は7倍に増強した。

(3)HBV に対する経皮ワクチンの開発 HBV コアタンパクに対する CTL の誘導が、感染防御に重要であることから、HBc CTL エピトープペプチドを用いた経皮免疫を検討した。



CTL 反応を増強するために用いるヘルパーエピトープには同じ HBc 抗原に対する Th ペプチドと peptide-25 を用いた。腫瘍抗原に対する経皮免疫応答によって確立したプロトコルを用いた。イミキモド 50mg に HBcCTL ペプチドを 50 μ g とさらにヘルパーペプチドを (HBcTh または peptide-25) 50 μ g 混和してマウスの皮膚に塗布して免疫した。図に示すように経皮免疫法によって HBc 特異的な CTL の誘導に成功した。HBcTh または peptide-25 の添加によりその効果はさらに増強させることができた。

B C G 接種を受けている日本人は結核菌に対する細胞性免疫応答が強く、Ag85B に対するヘルパー T 細胞が存在する。肝炎患者では、肝炎ウイルス抗原に対する免疫応答は抑制されているが、結核・B C G に対する免疫応答の抑制は認められないことから、HBc よりむしろ結核菌に対する Th エピトープである peptide-25 を利用することは、CTL の誘導に有利に働くことが期待できる。抗ウイルス薬の開発と抗HBs人免疫グロブリン(HBIG)の利用によって、B 型肝炎ウイルス感染症に対する治療が劇的に変化した。これらの方法では、ウイルスの増殖を抑制することはできるが、生体からのウイルスの完全排除には至っていない。本研究の成果によって、能動的に肝炎ウイルスに対する細胞性免疫応

答を誘導できれば、肝臓からウイルスを排除することが可能になると期待される。現在の治療だけでは完全に患者を治すことができない医療の現場に、新たに治療ワクチンなどの免疫治療を提供することが可能になる。抗ウイルス薬との併用により肝炎ウイルスの持続感染状態を断ち切り、将来の肝がん発症への進展を予防する方策を開発しうる点で期待される。

本研究で用いる経皮免疫法は、針を使わず皮膚に抗原を塗布するだけで免疫応答を誘導することが可能である。使用する薬剤イミキモド (Imiquimod) は非常に安定で特別な保存法を必要としない。開発途上国での使用や新生児や幼児への使用が必要な肝炎ウイルス感染対策において、針を用いない免疫法の普及は、社会医学や公衆衛生学的にも大きな利点が考えられる。

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)

Hosoi A, Takeda Y, Furuichi Y, Kurachi M, Kimura K, Maekawa R, Takatsu K, Kakimi K. Memory Th1 cells augment tumor-specific CTL following transcutaneous peptide immunization. *Cancer Res* 2008; 68: 3941-3949. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. Furuichi Y, Ichimura S, Metoki R, Taira J, Sugimoto K, Yamada M, Imai Y, Nakamura I, Moriyasu F
Esophageal varices recur less frequently in elderly than in younger patients:
Digestive Disease Week (AASLD)
(2008.5.17-2007.5.22)
San Diego, USA

2. Furuichi Y, Kawai T, Ichimura S, Metoki R, Taira J, Sugimoto K, Yamada M, Imai Y, Nakamura I, Moriyasu F
Usefulness of transnasal endoscopy with FICE for diagnosis of recurrent esophageal

varices
Digestive Disease Week (ASGE)
(2008.5.17-2007.5.22)
San Diego, USA

3. Furuichi Y, Ichimura S, Metoki R, Taira J, Sugimoto K, Yamada M, Imai Y, Nakamura I, Moriyasu F
Real-time analysis of the hepatic vein arrival times of ultrasound contrast agents reveals hepatic hemodynamic changes induced by the treatment of gastric varices
Digestive Disease Week (AGA)
(2008.5.17-2007.5.22)

4. Furuichi Y, Ichimura S, Miyata Y, Metoki R, Sano T, Murashima E, Taira J, Yamada M, Imai Y, Nakamura I, Moriyasu F
The features of liver cirrhosis in elderly patients-esophageal varices recur less frequently in elderly than in younger patients
16th United European Gastroenterology Week UEGW 2008 (2008.10.18-2008.10.22)
Vienna , Austria

5. Furuichi Y, Ichimura S, Miyata Y, Metoki R, Sano T, Murashima E, Taira J, Imai Y, Yamada M, Nakamura I, Kawai T, Moriyasu F
The treatment of gastric varices in patients with liver cirrhosis normalizes intrahepatic hemodynamics -from real-time analysis of the hepatic vein arrival time by contrast enhanced ultrasonography
16th United European Gastroenterology Week UEGW 2008 (2008.10.18-2008.10.22)
Vienna , Austria

6. Furuichi Y ,Kawai T, Ichimura S, Miyata Y, Metoki R, Sano T, Murashima E, Taira J, Yamada M, Imai Y, Nakamura I, Moriyasu F
Usefulness of transnasal endoscopy with fice for diagnosis of recurrent esophageal varices
16th United European Gastroenterology Week UEGW 2008 (2008.10.18-2008.10.22)
Vienna , Austria

7. Ichimura S, Furuichi Y, Metoki R, Sugimoto K, Taira J, Yamada M, Imai Y, Nakamura I, Moriyasu F
Diagnosis of portal vein thrombosis with contrast ultrasonography using maximum

intensity projection technique,micro flow imaging (MFI)

8. Metoki R, Furuichi Y, Ichimura S, Sano T, Murashima E, Taira J, Sugimoto K, Yanagisawa K, Yamada M, Imai Y, Nakamura I, Moriyasu F
Three-dimensional CT(3D-CT) following contrast medium injection via a peripheral vein of the lower limb improves diagnostic capability of Budd-Chiari Syndrome
Digestive Disease Week (AGA)
(2008.5.17-2007.5.22)
San Diego, USA

9. Ichimura S, Furuichi Y, Miyata Y, Metoki R, Sano T, Murashima E, Taira J, Yamada M, Imai Y, Nakamura I, Moriyasu F, Kawai T
Endoscopy with fice is useful in early diagnosis of recurrent esophageal varices
16th United European Gastroenterology Week UEGW 2008 (2008.10.18-2008.10.22)
Vienna , Austria

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古市 好宏 (FURUICHI YOSHIHIRO)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：70384998

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

