

基因疫苗

陶秋華

本院生物醫學科學研究所助研究員

前言

疫苗的發明，是醫療史上最重大的成就之一。雖然在十六、七世紀的中國和印度，已經發現從天花病人結痂製成的粉末，可以預防天花的感染。但是現代疫苗技術的建立，則需等到十九世紀末的 Louis Pasteur，他所發明的減毒疫苗、死毒疫苗等技術，至今仍是製造疫苗的標準，並且也開啓了微生物學和免疫學的研究大門。有了這些疫苗技術，我們曾經一度以爲人類終將戰勝所有的微生物，但後來發現有更多的致病微生物，無法用減毒或死毒法製造有效的疫苗，例如引起瘧疾的 *Plasmodium*，台灣地區最近流行的登革熱，或現在令人聞之色變造成愛滋病的 human immunodeficiency virus (HIV) 等，都沒有疫苗預防。因此利用現代分子生物學及免疫學技術，發展新的疫苗技術是目前重要的研究課題。

基因疫苗簡介

基因疫苗的最基本組成就是質體(plasmid)DNA，通常含有一種或多種的抗原基因。當質體DNA注射入動物體內後，其所帶的抗原基因，即在細胞內表達抗原蛋白。目前用的質體DNA都源自於細菌性質體，因此其結構通常帶有一段核酸序列以控制質體DNA在細菌中的選殖和合成，同時有一段啓動子(promoters)，以控制抗原基因在真核細胞的表現。基因疫苗的發明，要歸功於基因治療技術的研發。Felgner 和 Wolff 等人領導的

研發小組，在八〇年代末，致力於研究利用脂質體(liposome)提高動物基因轉殖效率，結果意外的發現質體DNA注射到肌肉後，即能表現其所載的基因，不需輔以其它輔助劑。利用這個技術，Merck 藥廠的 Liu 於 1993 年發表了基因疫苗的首例報告。因爲這種疫苗技術方法簡單，治療效果顯著，短時間內即蔚爲一股研究熱潮。目前研究結果發現，基因疫苗可以引發高效價的抗體反應，更值得注意的是，同時伴有細胞性免疫反應，包括輔助 T 細胞(helper T cells)和殺手 T 細胞(cytotoxic T cells)。在人體內殺手 T 細胞利用其細胞表面受器(T cell receptors)，專司負責發現並清除受病毒感染的細胞，同時對癌細胞的治療也有顯著的效果。因此如何引發具專一性的殺手 T 細胞，一直是最近預防性和治療性疫苗研發的重點。而用傳統的死毒疫苗或重組蛋白疫苗免疫，通常無法獲得有效的殺手 T 細胞反應。

基因疫苗的作用原理

基因疫苗之所以能有效的引發殺手 T 細胞反應，主要和它的抗原呈現方式(antigen presentation)有關。一般傳統的死毒疫苗或重組蛋白疫苗，病毒抗原是由體外注射入人體，經抗原呈現細胞(antigen-presenting cells)吞噬後，被分解的抗原片段經由第二型組織抗原(major histocompatibility complex [MHC] class II)呈現。如此的抗原呈現方式，引發的主要是輔助 T 細胞，免疫反應則以產生抗體爲主。基因疫苗和這些傳統疫苗最大的差別，在於注射入動物體內的是質體 DNA，當質體 DNA 進入細胞後，其所帶的病毒基因才由人體細胞製造。以這種觀點而言，基因疫苗和活病毒感染有更多的相似性，因爲病毒也是在進

入體細胞後，才由細胞大量製造病毒蛋白。這種內生性蛋白(endogenous proteins)，有部分會經酵素分解成蛋白片段，經由第一型組織抗原(MHC class I)呈現後，可以活化殺手 T 細胞。除此之外，有些被質體 DNA 轉殖的細胞因死亡而破壞後，所釋放的病毒抗原，也可經由抗原呈現細胞吞噬而引發抗體反應，這就解釋了為什麼基因疫苗能同時引發抗體反應和殺手 T 細胞反應。

基因疫苗研究心得

筆者在加入生醫所前，在國外從事有關癌症疫苗的研究工作。1993年回國後，讀到Liu發表的報告，因為結果十分驚人，且科學數據完整不容置疑，意識到這個技術可能是疫苗研發的重要突破，因此與當時剛加入實驗室的博士班研究生周彥宏，設計了一系列的實驗，利用B型肝炎病毒當動物模型，探討發展B型肝炎基因疫苗的可行性。並陸續進行其他基因疫苗的研究工作，以下所記即為一些比較重要的研究成果：

1. B 型肝炎基因疫苗

我們製造了表現 B 型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的質體 DNA。當小鼠接受 B 型肝炎基因疫苗注射後，第二週即出現專一性抗體及殺手T細胞反應，此免疫效價可以維持十個月以上。同樣的，我們也證實基因疫苗可以在接種後的兔子和豬引發高效價的專一性抗體。我們也發現當合併細胞激素(cytokine)基因"interleukin-2 (IL-2)"於 B 型肝炎病毒質體 DNA，不但能提高抗體效價，而且可以減低注射劑量達100倍。目前使用的B型肝炎蛋白疫苗雖然證明十分有效，但是也有5-15%的人對它不起反應，這種不反應現象和特定的組

織抗原蛋白有關，有些品係的小鼠對B型肝炎蛋白疫苗也有這種不反應現象。我們初步的實驗證明，基因疫苗，尤其是同時表達B型肝炎病毒表面抗原和IL-2的基因疫苗，可以在這些不反應小鼠(B10.M)引發高效價的保護性抗體，這個方法是否能進一步運用在不反應的病人身上，值得深入探討。在免疫反應發生過程中，CD4輔助T細胞受抗原刺激後，會分化為第一型(Th1)或第二型(Th2)輔助T細胞，產生不同的細胞激素，第一型輔助T細胞以產生細胞性免疫反應為主，包括殺手T細胞反應；第二型輔助T細胞則主要幫忙產生抗體。因此一個免疫反應產生的輔助T細胞種類，會影響到許多傳染疾病和自體免疫病的病情。我們發現當基因疫苗和細胞激素基因同時注射，對免疫反應是走向第一型或第二型輔助T細胞，有重大的影響。當B型肝炎基因疫苗和IL-12或Interferon- γ 基因一起注射到小鼠體內，主要產生第一型輔助T細胞，第二型輔助T細胞的反應則受到抑制。相反的，和IL-4基因一起注射，第二型輔助T細胞反應增強，第一型輔助T細胞反應受到抑制。如果同時注射IL-2或GM-CSF基因，第一型輔助T細胞反應增強，但第二型輔助T細胞反應則變化不大。我們也同時證明IL-12或IFN- γ 基因會增強殺手T細胞反應，而IL-4基因則抑制此反應。這些結果說明了基因疫苗所引發的輔助T細胞種類，以及這些輔助T細胞所控制的抗體和殺手T細胞反應，都可以藉由同時注射細胞激素基因來調控，提供了一個改進基因疫苗效果的方法。

2. 日本腦炎基因疫苗

因為B型肝炎病毒除了黑猩猩外並無其它合適的動物模型，無法得知基因疫苗引發的免

疫反應是否具有抵抗病毒感染的效果。爲了了解基因疫苗是否能產生保護性免疫，我們和衛生署預防醫學研究所合作，投入日本腦炎基因疫苗的研發。日本腦炎是台灣本土性疾病，每年夏天台灣地區飼養的豬隻(日本腦炎病毒最重要的中間宿主)，大都呈現日本腦炎病毒感染陽性反應，再藉由病媒蚊傳染給人，除了疫苗外，很難有效的控制這種傳播方式。而現有的日本腦炎疫苗，是由鼠腦製備的死毒疫苗，有許多不易克服的缺點，例如疫苗殘餘的鼠腦成份，有可能在人體引發副作用。爲了解日本腦炎病毒不同基因作爲 DNA 疫苗之可行性，我們分別構築可表現日本腦炎病毒不同蛋白之質體 pC (表現殼蛋白)，pM15E (表現套蛋白)，pNS1-2a，pNS3，pNS5 (分別表現不同部分之非結構蛋白)。將這些質體以肌肉注射或基因槍免疫小鼠，再以致死劑量之日本腦炎病毒攻毒，發現只有表達套蛋白的基因疫苗有明顯的保護效果，效力和目前使用的死毒疫苗差不多，但表達日本腦炎病毒其他基因的基因疫苗則無明顯的保護效果。我們也利用各種基因缺陷小鼠(knockout mice)，探討基因疫苗引發的保護機制。初步結果顯示，由抗體主導之體液性免疫扮演主要防衛的角色；而細胞性免疫，相對的保護效果則較差。

結 論

發展基因疫苗，無論抗原基因的種類爲何，有一些基因疫苗中所用的關鍵性技術是相同的，因此如何掌握這些關鍵性技術，實爲發展基因疫苗計劃中最重要的一環。綜合前述基因疫苗已發展現況，以及未來展望，筆者認爲應重點研發下面這些項目：1.研發質體 DNA；2.研發高效率基因轉殖技術；3.研發

可合併基因疫苗使用的免疫促進劑；4.研發基因疫苗安全性評估各相關技術。未來的研究若能更深入掌握基因疫苗作用機制，研發合併輔助劑以增強其免疫效果，探討基因疫苗可能引致的副作用，並且發展解決的辦法，基因疫苗有可能在醫用或畜用疫苗上取得重大突破。另一項基因疫苗可能有的重大貢獻，是對那些已經感染疾病的患者，例如 HIV 引起的後天免疫缺乏症、B 型肝炎病毒的慢性帶原者，人類乳突狀病毒(human papillomavirus)引起的子宮頸癌等，利用基因疫苗技術發展出的治療性疫苗，可能提供這些患者治癒的機會。因此選擇一些台灣地區常發生的重大疾病爲標的，研發基因疫苗相關的基礎和臨床技術，同時配合工業界，發展基因疫苗生產所需的相關技術及其先導工廠的設立，預期將會對台灣地區醫藥衛生提供重大貢獻，並藉此提升國家醫療科技水準，及奠定生物科技工業的基礎。



陶秘華

學經歷：

國立臺灣大學醫事技術系學士(1983)

美國哥倫比亞大學微

生物及免疫學碩士(1987)、博士(1990)

美國加州大學分子生物研究所助理(1988-1990)

美國史丹佛大學 Medicine/Oncology 博士後研究(1990-1993)

中央研究院生物醫學科學研究所助研究員(1993- 迄今)