

登革熱疫苗近期發展： T 細胞反應對疫苗保護力的研究

蕭郁儒 潘建雄

國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

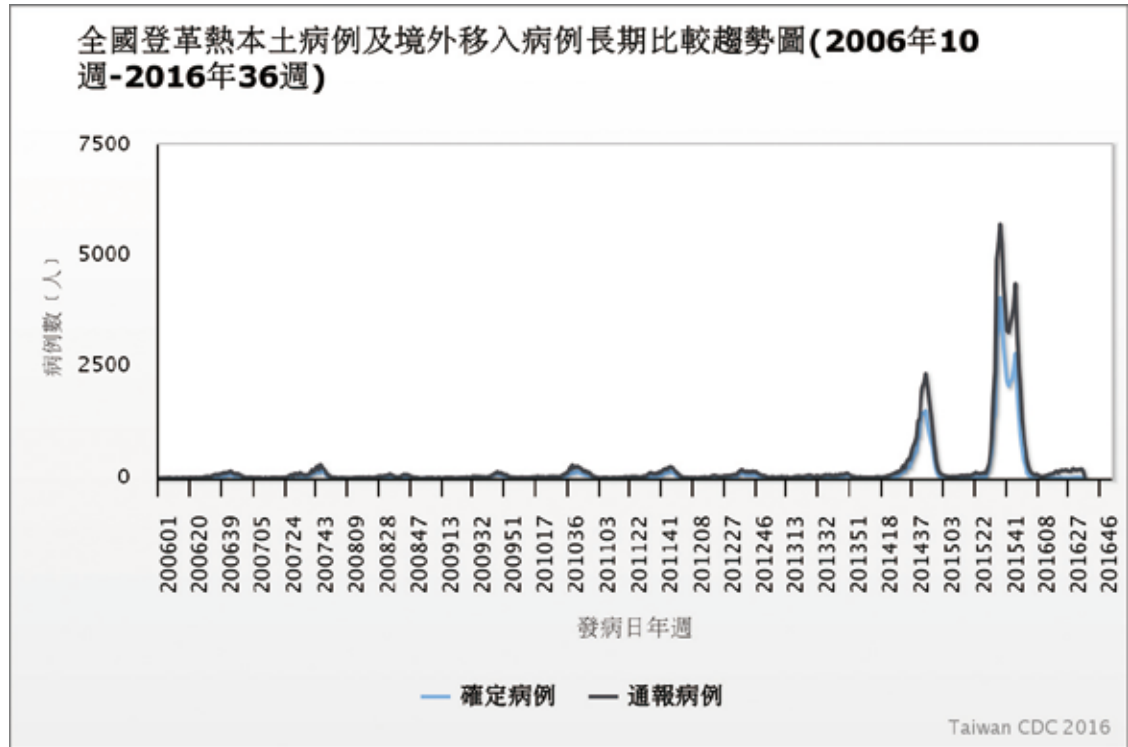
前 言

登革熱 (Dengue fever)，是藉由蚊子傳播登革病毒所引起的急性傳染病。全球登革熱的好發地區，主要集中在熱帶、亞熱帶等有埃及斑蚊和白線斑蚊分布的國家，隨著地球暖化現象及交通工具發達國際交流頻繁 [1]，目前全世界有 128 個國家的 39 億人面臨登革熱的威脅 [2]，估計每年約有 4 到 5 億人感染，並造成每年約有 21,000 人死亡 [3]，成為嚴重的公共衛生問題。而台灣在光復前曾發生過 3 次全島性登革熱大流行，光復後數十年內雖未再爆發，直到 1981 年在屏東縣出現第二型登革熱流行，1987 年時高屏地區爆發了第一型登革熱感染；於 1995 年開始在台中、台北也出現病例。直至 2014 年時爆發十多年以來最嚴重的一次登革熱大流行，超過一萬五千多的病例數

[4]，到了 2015 年確診病例更是攀升至四萬人 (圖一)，顯示出登革熱疫情在台灣趨向嚴重的可能性。目前唯一可靠的疫情防治方法為杜絕病媒蚊孳生，建議民眾應加強自身的防蚊措施，並積極清除積水容器，待安全有效的登革熱疫苗核准上市後雙管齊下，才能有效地控制登革熱疫情。

簡 介

臺灣主要傳播登革熱的病媒蚊為埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 及白線斑蚊 (*Aedes albopictus*)。登革病毒 (Dengue virus) 屬於黃病毒科 (Flaviviridae) 黃病毒屬 (Flavivirus)。病毒顆粒為直徑約 50 nm 的球型，遺傳物質為長約 11 kb 之單股正鏈 RNA ((+ssRNA)，可轉譯出三個結構蛋白，包括核蛋白 (capsid, C)、膜 (前膜) 蛋白 (membrane, prM/M)、外套膜蛋白



圖一 全國登革熱本土病例及境外移入病例比較趨勢圖，來源：衛生福利部疾病管制署

(envelope, E)；以及七個非結構蛋白(NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) [5]。依據不同的血清型病毒，分為 I、II、III、IV 四種型別；2013 年 Nikos Vasilakis 博士提出有第五型的存在，但目前研究仍以四型為主。每一型血清型病毒都具有感染致病的能力，若患者感染其中一型的登革病毒，只會對那一型的病毒具有終身免疫，但對於其他型的登革病毒僅具有 2 至 9 個月短暫的免疫力，若再感染到不同型的登革病毒，則有潛在致命的危險，包括登革出血熱 (Dengue hemorrhagic fever, DHF) 和登革休克症候群 (Dengue shock syndrome,

DSS) [6]。其致病機轉尚不明瞭，但其抗體依賴性增強反應 (Antibody-dependent enhancement, ADE)，或是抗體和 T 細胞反應產生的抗原原罪效應 (Antigenic sin) [7]，均被認為可能是導致重症登革熱的原因。所謂抗體依賴性增強反應是指宿主被某一型登革病毒感染後，體內雖然有針對此型的中和抗體，但對其它血清型病毒中和能力不足，在下次感染不同血清型之登革病毒時，反而增強病毒的感染；而抗原原罪效應則是第一次感染登革病毒引起的 T 細胞反應，對第二次感染不同型別的病毒時，因兩者抗原存在的差異，導致 T 細胞不完全活

表一 全國登革熱本土病例及境外移入病例比較趨勢圖

Vaccine type	Manufacturer	Candidate vaccine	Candidate vaccine description	Clinical trial phase	Protective efficacy of vaccine
Attenuated chimera vaccine	(1) Sanofi-Pasteur	CYD-TVD	Recombinant DENV vaccine with yellow fever 17D vaccine strain as backbone and substitution of preM and E protein genes with each of the four DENV serotype	PIII	56.5–60.8 %
	(2) US-CDC/Inviragen/Takeda Pharmaceuticals	DENVax	Recombinant DENV vaccine with DENV-2 as backbone and substitution of preM and E protein genes of DENV-1, DENV-3, and DENV-4	PII	- ¹
	(3) NIAID	TetraVax-DV	Attenuated tetravalent formulation with a deletion of 30 nucleotides from 3' UTR of DENV-1, DENV-3 (or chimeric DENV-3/DENV-4), DENV-4, and a chimeric DENV-2/DENV-4	PII	-
Attenuated vaccine	Mahidol University/Kaketsuken	-	Attenuated vaccine strains by serial passages in PDK cells	PII	-
Inactivated vaccine	WRAIR, GSK	TDENV-PIV	Whole purified inactivated vaccine	PI	-
Subunit vaccine	Merck (Hawaiian Biotech)	DENV-V180	Truncated DENV E protein	PI	-
DNA vaccine	U.S. Army Medical Research and Materiel Command/WRAIR	TVDV	Plasmids encoding the prM/E genes of each DENV serotype	PI	-

¹Indicates no data

來源：Trop Med Health. 2016 [19]

化，造成保護力降低，進而導致嚴重的病癥。因此，一個理想的登革熱疫苗，應該要達到對四種血清型病毒的平衡型免疫反應，以利對抗所有血清型的登革病毒。

登革熱疫苗現今發展

登革熱疫苗從 1940 年代即展開研究，首先由 Sabin 與 Schlesinger 等人以鼠腦培育出單價減毒性的夏威夷株登革熱疫苗[8]。1970 年代開始，開始以組織培養的方式馴化病毒；隨著科學研究技術進步，近幾年開始以重組 DNA 的技術進行病毒基因置換，更讓登革熱疫苗的研究有了突破性的發展。

理想的登革熱疫苗，除了其產生的免疫力要足夠、維持的時間夠長、最好能達到終身免疫之外，最重要的是要考量到能夠同時對抗所有血清型病毒，產生相等的保護力並避免生成不良的免疫反應。目前有多種疫苗正在研發中(表一)，包含了活性減毒疫苗 (live attenuated vaccine)、嵌合活性減毒疫苗 (chimeric live attenuated vaccine)、去活化疫苗 (inactivated purified vaccine)、重組蛋白疫苗 (recombinant protein vaccine)、DNA 疫苗 (DNA vaccine) 以及次單位疫苗 (subunit vaccine) [9]。

活性減毒疫苗

活性減毒疫苗是將病毒經一系

表二

Virus	Species	Location	Amino Acid Sequence	Reference
Dengue virus 2	BALB/c	274-304	SGNLLFTGHLKCLRMDKLQLKGMYSYSMCTG	Virology(1994) [24]
Dengue virus 2	BALB/c	295-307	KGMSYSMCTGKFK	Mol Immunol(1993) [25]
Dengue virus 2	BALB/c	302-333	CTGKFKIVKEIAETQHGTVIRVQYEGDGSPC	Virology(1994) [24]
Dengue virus 2	BALB/c	333-351	CKIPFEIMDLEKRHLVLRGL	Virology(1994)[24]
Dengue virus 2	BALB/c	337-359	FEIMDLEKRHLVLRGLITVNPVIT	Mol Immunol(1993)[25]
Dengue virus 2	BALB/c	352-368	ITVNPVITTEKDSVPVIE	J Virol(1992)[26]
Dengue virus 2	BALB/c	352-368	ITVNPVITTEKDSVPVIE	Virology(1994)[27]
Dengue virus 2	BALB/c	361-388	KDSPVIEAEPFPGDSYIIIGVEPGQLK	Virology(1994)[24]
Dengue virus 2	BALB/c	388-400	KLNWFKKGSSIGQ	Virology(1994)[24]
Dengue virus 1	BALB/c	349-363	GRLITANPIVTDKEK	PLOS one (2015)[18]
Dengue virus 2	BALB/c	349-363	GRLITVNPVITTEKDS	PLOS one (2015)[18]
Dengue virus 3	BALB/c	349-363	GRLITANPVVTKKEE	PLOS one (2015)[18]
Dengue virus 4	BALB/c	313-327	AETQHGTTVVKVKEYE	PLOS one (2015)[18]

來源：Immune Epitope Database and Analysis Resource http://www.iedb.org/home_v2.php http://www.iedb.org/home_v2.php

列培養使病毒致病性下降，但仍可引起足夠的保護性免疫反應，以利作為疫苗使用。但這種方式的病毒株可能因為過度減毒而失去引發免疫反應的作用，或是減毒不夠造成接種者引發病理反應。之前有研究團隊發展四價登革熱活性減毒候選疫苗，並進行臨床一、二期試驗，雖然其疫苗安全且具免疫性，但並非所有受試者對四種血清型都有效用，且產生的免疫反應不相等，更甚有些受試者無法產生足夠的血清免疫反應，故無法進入第三期臨床試驗[10]。目前還有使用點

突變的技術，針對病毒基因做修改使毒性減弱；現今正在進行的研究為DENV1-4 四株減毒突變病毒株混合製成的四價活性減毒疫苗 (TetraVax-DV)，即是將四種血清型病毒基因 3 端非轉譯區剔除 30 個核苷酸造成病毒毒性弱化。第一階段臨床試驗顯示所有血清型中血清陽性率可達 90%，但會產生皮疹等副作用。其中 TV003 對四種血清型病毒能產生較一致的血清陽性反應，繼續第二階段的評估 [11]。另外最近也發展出 TV005，正在進行和 TV003 的比較中[12]。

嵌合活性減毒疫苗

嵌合活性減毒疫苗目前最先進的產品，為賽諾菲 (sanofi) 公司所研發的四價登革熱疫苗 (CYD-TDV)，以已獲藥證的黃熱病毒 17D (YFV-17D) 疫苗為骨幹，分別帶有四種血清型登革病毒的結構蛋白質 (前驅膜蛋白及套膜蛋白，prM/E)，已經完成第三期臨床試驗。但該疫苗對第二型血清型病毒產生的保護力不佳[4]。這是目前進展最快的登革熱疫苗，命名為 Dengvaxia[®]，分別在 2015 年 12 月及 2016 年初於墨西哥、巴西、薩爾瓦多及菲律賓取得上市許可，於 2016 年 6 月中美洲哥斯大黎加亦核准此疫苗上市。但基於安全性考量，目前只許可於 9~45 歲年齡層使用[13]。另外正在進行研究的還有 DENVax 疫苗，是由武田製藥 (Takeda Pharmaceuticals) 研發的四型嵌合登革熱疫苗，以減毒的 DENV-2 型病毒為骨幹，將其他三型病毒的 prM/E 基因置換於該病毒中。第一期臨床試驗顯示安全性，但其免疫力偏向 DENV-2 的抗體反應。目前已進入第二期臨床試驗[14]。

去活化疫苗

去活化疫苗不僅相對較安全，且較容易引發平均的免疫反應。但缺乏針對非結構蛋白的免疫原性，而且需搭配佐劑強化免疫反應。目前正在進行臨床二期研究去活化疫苗，

是由葛蘭素史克 (GlaxoSmith-Kline, GSK) 開發的 TDEN-PIV，其疫苗株以 VERO 細胞進行增殖，去活化後加入 AS03B 或 AS01E 佐劑，目前正在美國、波多黎各及泰國進行第二期臨床試驗[15]。

次單位疫苗

近年由於分生技術發展進步，使得重組蛋白、DNA、以及次單位疫苗也紛紛運用在疫苗的研究上。一般以登革病毒的套膜蛋白 (Envelope proteins, E) 最常被用來當作免疫原。目前進展最快的是由美國海軍醫學研究中心 (U.S Navy Medical Research Center) 進行的 DENV-1 單價 DNA 登革熱疫苗，正在進行第一期試驗，但得到的中和性抗體反應不理想，現已轉由與 Vical 公司合作，使用該公司專為 DNA 抗原所設計的佐劑 (Vaxfectin[®]) 重新進行臨床一期試驗[16]。

而國內研究中，國家衛生研究院研究團隊為發展四價次單位疫苗，製備四種血清型登革病毒的外套膜蛋白第三區塊 (envelope protein domain III, ED3)。研究顯示重組 ED3 在小鼠模式中可以有效引起對抗四型血清型病毒的中和抗體產生[20]，在非人的靈長類動物模式則是有針對第二型登革病毒的中和性抗體產生[21]。另外也有研究指出重組 ED3 蛋白若接上脂蛋白 (lipoprotein) 可比 ED3 蛋白混合鋁鹽佐劑更能有效引發中和性抗體的

產生[22]。另外成大研究團隊致力於非結構蛋白一 (nonstructural protein, NS1) 登革熱快速診斷及疫苗的研究，但目前都只在臨床前實驗階段，仍需更進一步的研究和評估[17]。而在國際合作上，台灣與美國在老年族群的登革熱疫苗研發，正在進行臨床試驗的合作[23]。

T 細胞免疫反應

在對抗登革病毒感染的研究中，中和反應是很重要的一環。雖然病人體內抗體反應主要是針對外套膜區塊或膜蛋白，但有研究認為登革病毒套膜蛋白的第三區塊 (ED3) 才是引起血清特異性中和抗體生成的主要目標。研究顯示，若以嵌合 ED3 之 DNA 或重組 ED3 次單位疫苗，在老鼠和非人類的靈長類動物模式中免疫，可以促進保護性抗體生成，以對抗登革病毒，並且可以降低抗體依賴性增強反應的風險。然而 ED3 並不具有完整外套膜蛋白的免疫力，有些以 ED3 為基礎的登革熱疫苗需要靠其他佐劑輔助。

而影響抗體反應的因素中，最重要的就是 CD4⁺ T 細胞的免疫反應。因為四型血清型抗原之胺基酸序列差異並不大，若宿主接種四價登革熱疫苗，則 T 細胞針對不同型血清型的反應會變得更複雜：T 細胞抗原表位上不同的胺基酸序列會影響 T 細胞抗原受體和主要組織相容性複合體 (major

histocompatibility complex, MHC) 的親和力，也會影響 T 細胞是否為血清依賴型或是交叉反應型。因此在研發四價登革熱疫苗上，須徹底了解 CD4⁺ T 細胞的反應。先前的 CD4⁺ T 細胞研究大部分是針對感染之後的結果，尤其是 DENV2 或是全基因規模的研究，但這些研究結果只能了解感染病毒所促進的 T 細胞反應，卻不能反映出接種四價登革疫苗之後 T 細胞的免疫能力，特別是在 ED3 區域，我們最近針對 ED3 T 細胞反應研究，發現 ED3 存在有兩種 CD4⁺ T 細胞抗原表位，一個是位於第一、二、三型病毒上的 E₃₄₉₋₃₆₃，另一個是只在第四型登革病毒上的 E₃₁₃₋₃₂₇ (表二)。在初期免疫之後，兩種抗原表位特異性之 T 細胞都會增加；但經過追加免疫，由於抗原表位互相競爭導致第四型病毒特異 T 細胞的 INF- γ 反應降低，但另一 E₃₄₉₋₃₆₃ 則不會，表示第四型病毒抗原表位對於其他血清型來說較無優勢。因為具有免疫優勢之 T 細胞會透過組織相容性複合物和肽組成的複合物相互競爭或其他機制，來抑制其他較無優勢的抗原表位，造成 T 細胞反應集中在具免疫優勢的 T 細胞抗原表位上。此種現象在其他種病毒感染也被發現過，且其機制和保護作用有關。但是在登革熱疫苗研究中，這種不同血清型存在的免疫優勢，有可能會造成免疫四價疫苗後血清特異性 INF- γ 反應的不平衡，因此我們的研究結果顯示，四價登革熱疫苗所引起

的 T 細胞反應對疫苗保護效力的影響需要更審慎的評估[18]。

未來展望

今年 (2016) 三月在台南已出現第一例本土病例，比去年提早了兩個月[4]。隨著疫情延燒病例逐年攀升，要如何預作防範和準備，除環境清理注意防疫策略之外，疫苗的發展也是不可或缺的一環，不僅可以趨緩蔓延全球的疫情，亦能減少因登革熱帶來的龐大醫療資源及社會成本的耗損。目前雖有登革熱疫苗進入臨床試驗，亦有在部分國家上市者，但其安全性及有效性仍待考量評估，因此發展安全有效的疫苗仍然是刻不容緩的主要目標。

參考文獻

1. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, et al: Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol* 2014;22:138-46.
2. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, et al: Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:1760.
3. Thomas SJ, Endy TP: Vaccines for the prevention of dengue: development update. *Hum Vaccin* 2011;7:674-84.
4. 朱雅婷、萬書昶、林以行等：登革熱的台灣經驗：從流行病學及臨床到基礎科學的新視野：科技部台灣重要新興感染症研究計畫成果報告。科技部台灣重要新興感染症研究計畫辦公室。2016:183-92。
5. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, et al: Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:S7-16.

6. Kyle JL, Harris E: Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol* 2008;62:71-92.
7. Wahala WM, Silva AM: The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses* 2011;3:2374-95.
8. Sabin AB, Schlesinger RW: Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science* 1945;101:640-2.
9. 衛生福利部疾病管制署：登革熱疫苗研發進展。疫情報導 2014;31:186-95。
10. Lindow JC, Durbin AP, Whitehead SS, et al: Vaccination of volunteers with low-dose, live-attenuated, dengue viruses leads to serotype-specific immunologic and virologic profiles. *Vaccine* 2013;31:3347-52.
11. Beaumier CM, Gillespie PM, Hotez PJ, et al: New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. *Transl Res* 2013;162:144-55.
12. Whitehead SS: Development of TV003/TV005, a single dose, highly immunogenic live attenuated dengue vaccine; what makes this vaccine different from the Sanofi-Pasteur CYD™ vaccine? *Expert Rev Vaccines* 2016;15:509-17.
13. Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, et al: Efficacy and long-Term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. *N Engl J Med* 2015;373:1195-206.
14. Osorio LE, Velez ID, Thomson C, et al: Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent dengue vaccine (DENVax) in flavivirus-naive healthy adults in Colombia: a randomised, placebo-controlled, phase 1 study. *Lancet Infect Dis* 2014;14:830-8.
15. Yauch LE, Shresta S: Dengue virus vaccine development. *Adv Virus Res* 2014;88:315-72.
16. Li XF, Deng YQ, Yang HQ, et al: A chimeric dengue virus vaccine using Japanese encephalitis virus vaccine strain SA14-14-2 as backbone is immunogenic and protective against either parental virus in mice and nonhuman primates. *J Virol* 2013;87:13964-705.
17. Chen MC, Lin CF, Lei HY, et al: Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. *J Immunol* 2009;183:1797-803.
18. Chen HW, Hu HM, Wu SH, et al: The

- immunodominance change and protection of CD4+ T-cell responses elicited by an envelope protein domain III-based tetravalent dengue vaccine in mice. *PLoS ONE* 2015;10:e0145717.
19. Moi ML, Takasaki T, Kurane I, et al: Human antibody response to dengue virus: implications for dengue vaccine design. *Trop Med Health* 2016;14:44:1.
 20. Leng CH, Liu SJ, Tsai JP, et al: A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. *Microbes Infect* 2009;11:288-95.
 21. Chen HW, Liu SJ, Li YS, et al: A consensus envelope protein domain III can induce neutralizing antibody responses against serotype 2 of dengue virus in non-human primates. *Arch Virol* 2013;158:1523-31.
 22. Chen HW, Liu SJ, Liu HH, et al: A novel technology for the production of a heterologous lipoprotein immunogen in high yield has implications for the field of vaccine design. *Vaccine* 2009;27:1400-9.
 23. 衛生福利部疾病管制署 (2016 年, 6 月 7 日): 台美合作研發全球首款老年族群登革熱疫苗。摘自 www.cdc.gov.tw/professional/info.aspx?treeid=cf7f90dcbcd5718d&nowtreeid=f94e6af8daa9fc01&tid=CB9434C4FE5DB0BA
 24. Roehrig JT, Risi PA, Brubaker JR, et al: T-helper cell epitopes on the E-glycoprotein of dengue 2 Jamaica virus. *Virology* 1994;198:31-8.
 25. Leclerc C, Dériaud E, Megret F, et al: Identification of helper T cell epitopes of dengue virus E-protein. *Mol Immunol* 1993;30:613-25.
 26. Roehrig JT, Johnson AJ, Hunt AR, et al: Enhancement of the antibody response to flavivirus B-cell epitopes by using homologous or heterologous T-cell epitopes. *J Virol* 1992;66:3385-90.
 27. Roehrig JT, Risi PA, Brubaker JR, et al: T-helper cell epitopes on the E-glycoprotein of dengue 2 Jamaica virus. *Virology* 1994;198:31-8.
 28. Nascimento EJ, Mailliard RB, Khan AM, et al: Identification of conserved and HLA promiscuous DENV3 T-cell epitopes. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e2497.