

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

細胞性免疫誘導能を持つペプチド結合リポソームを
応用したウイルスワクチンの創製

平成 18 年度 総括研究年度終了報告書

主任研究者 内田 哲也

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

I.	総括研究年度終了報告	
	細胞性免疫誘導能を持つペプチド結合リポソームを応用したウイルスワクチンの創製……	1
	内田 哲也	
II.	分担研究年度終了報告	
	1. C型ワクチンの創製に関する研究……	4
	赤塚 俊隆	
	2. SARSコロナウイルス (SARS-CoV) 由来CTLエピトープを用いたSARSワクチンの開発……	11
	松井 政則	
	3. 鳥インフルエンザウイルス関連抗原を用いたインフルエンザワクチンの開発……	18
	梶野 喜一	
	4. リポソーム結合抗原の生体内における移動経路に関する研究……	22
	石川 昌	
	5. 抗原ペプチドとリポソームとの最適結合方法の検討……	26
	種市 麻衣子	
	6. リン脂質の合成およびリポソーム試作検討……	30
	小田 洋	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表……	31
IV.	研究成果の刊行物・別刷……	33

I. 総括研究年度終了報告

厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
平成 18 年度総括研究年度終了報告

細胞性免疫誘導能を持つペプチド結合リポソームを応用した
ウイルスワクチンの創製

主任研究者 内田 哲也 国立感染症研究所血液・安全性研究部主任研究官

研究要旨 本年度は、我々が開発した抗原特異的細胞性免疫（CTL）を誘導することが可能なリポソーム処方を用いて、(1) 高病原性鳥インフルエンザワクチンの開発、(2) SARS ワクチンの開発、(3) C 型肝炎ワクチンの開発、に向けた検討を行った。その結果、リポソーム結合ペプチドが顕著に抗原特異的 CTL を誘導することが上記 3 種類全てのウイルス由来ペプチドにおいて確かめられた。現在、鳥インフルエンザ、SARS、C 型肝炎の各ウイルスについて、イムノドミナントな CTL エピトープの同定作業を進めており、この作業の結果得られた各ウイルスワクチンの創製に最適な CTL エピトープを用いて感染実験に臨む予定である。

分担研究者

赤塚 俊隆（埼玉医科大学微生物学教室教授）
松井 政則（埼玉医科大学微生物学教室助教授）
梶野 喜一（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター助教授）
石川 昌（東京大学大学院分子予防医学教室助教授）
種市麻衣子（国立感染症研究所血液・安全性研究部主任研究官）
小田 洋（日本油脂株式会社 DDS 研究所チームリーダー）

A. 研究目的

現行のウイルスワクチンはウイルス抗原に対する抗体の産生（液性免疫）を誘導することを目的としている。抗体はウイルス粒子の表面抗原に対するものであるため、表面抗原が変異するとワクチンが有効に働かないという欠点があ

る。これに対し、ウイルスに対する細胞性免疫を誘導するワクチンが開発されれば、より変異しにくいウイルスの内部構造蛋白および調節性蛋白由来のエピトープを標的とした細胞性免疫の誘導が可能となり、ウイルスの変異の影響を受けることなく単一のワクチンで複数のウイルス亜種に対する免疫を誘導することが期待される。

従来のワクチンにアジュバントとして用いられてきたアルミニウムアジュバントは液性免疫の誘導には適しているが細胞性免疫を誘導しにくいという欠点があった。我々は近年、細胞性免疫誘導能の高いリポソーム処方を開発した。本研究ではこのリポソーム処方を細胞性免疫（CTL）誘導型ウイルスワクチンの創製に応用し、現在開発が待たれている高病原性鳥インフルエンザワクチン、SARS ワクチン、C 型肝炎ワクチンを開発することを目的とする。

B. 研究方法

a. イムノドミナントエピトープの同定：高病原性鳥インフルエンザ、SARS、C型肝炎の各ウイルスについて、細胞性免疫の標的とするに適したイムノドミナントエピトープの同定を行う。各ウイルスにつき、ヒト主要組織適合抗原 (MHC) クラス I に結合する抗原ペプチドを検索システムを用いて選び、それに基づいて合成したペプチドのクラス I への結合親和性を測定した。クラス I への結合親和性の高いペプチドにつき、リポソーム結合物を作製して *in vitro* (試験管内) および *in vivo* (生体内) での抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導能を検討した。これらの検討を通じて本研究の目的に最も適した抗原ペプチドを決定する。

b. リポソーム結合抗原の生体内における移動経路の検討：本研究において使用するリポソームの薬剤送達能を最適化することを目的として、リポソーム処方と免疫誘導との関連に関する検討、およびリポソーム結合抗原の生体内における移動経路に関する病理学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究に使用する実験動物は、各研究施設における実験動物管理規定に沿って飼育され、使用される。また、埼玉医科大学における研究に使用したヒト由来株化細胞は既に埼玉医科大学倫理委員会から以下のように承認を受けて凍結保存してあるヒトリンパ球を利用した。

申請番号：335

課題名：C型肝炎症例に対する瀉血療法で廃棄される血液を用いたウイルス学的・免疫学的基礎研究

倫理委員会承認年月日：平成16年6月8日 (訂正書類受理：平成16年7月13日)

研究期間：承認時から平成20年3月末まで

C. 研究結果

(1) 高病原性鳥インフルエンザワクチンの開発：H5N1 型鳥インフルエンザウイルス株 A/Hong Kong/483/97 の nucleoprotein (NP) から MHC class I 分子に結合するペプチド 2 種類を結合モチーフ予測システムを用いて選び出し、合成した。リポソームに結合したペプチドの効果を *in vivo* CTL assay により判定したところ、リポソームと結合したペプチドは何れも CTL 活性化を誘導した。

(2) SARS ワクチンの開発：既知の SARS スパイク由来のペプチド結合リポソームをマウスに免疫することにより効率よく SARS 特異的 CTL を誘導することが可能であることを確認した上で、エピトープ予測ソフトを用い、SARS ウイルスの pp1a 領域から 30 種、NP から 8 種の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを予測し、合成ペプチドを作製した。そして、HLA-A2 への結合親和性を測定したところ、計 38 種のペプチドのうち 29 種類が極めて高い結合アフィニティを示し、予測が良好でエピトープの可能性が高いことがわかった。これらの予測エピトープをコードする人工遺伝子を PCR により作製し、これらを発現するプラスミド、組換えアデノウイルス及びワクシニアウイルスを作製した。

(3) HCV ワクチンの開発：リポソームワクチンのウイルスワクチンとしての有効性を、マウスの LCMV 感染実験をモデルとして検討した。LCMV GP₃₃₋₄₁ ペプチド結合リポソームをマウスに免疫したところ、有意な CTL の誘導が認められた。更に LCMV チャレンジ実験で、ウイルス感染をほぼ完璧にブロックできた。以上の結果を踏まえ、現在 HCV ワクチンの創製に向けた CTL エピトープの同定を進めている。

(4) ペプチドのキャリアーとしてのリポソーム処方の開発：今年度はリポソームの薬剤送達 (DDS)

能力をさらに向上させることを目的として、リポソーム上にリンパ節指向型のペプチド (homing peptide) を結合させて生体内での動態を追跡した。その結果、homing peptide を表面に結合したリポソームは高効率にリンパ節に集積し、かつリポソーム結合抗原に対する免疫誘導が顕著に増強されることが観察された。

(5) リポソーム結合抗原の生体内移動経路に関する検討：2種類の脂質組成の異なるリポソーム、飽和脂肪酸リポソームおよび不飽和脂肪酸リポソームを用いて、リポソーム結合抗原経口投与後の生体内における移動経路を検討したところ、OVA-飽和脂肪酸リポソームの経口投与によってはリポソーム抗原のパイエル板 SED 領域への取り込みに加え、粘膜固有層への取り込みが認められたが、OVA-不飽和脂肪酸リポソーム投与によっては SED 領域における自家蛍光との明らかな差や粘膜固有層への取り込みは認められなかった。これは OVA-不飽和脂肪酸リポソームを結札した腸管に直接投与しても同様であった。このことから、経口免疫においては不飽和脂肪酸リポソームよりも飽和脂肪酸リポソームの方が適していることが示唆された。

以上、本年度の検討の結果、我々が開発したリポソーム処方にウイルス由来ペプチドを結合させることにより有意な CTL 誘導が行われること、および、LCMV を用いたマウスのウイルス感染モデルにおいて、リポソーム結合ペプチドによってウイルス感染抵抗性が誘導されることが確認された。

有効な細胞性免疫 (CTL) 誘導型ウイルスワクチンを創製するためには、先ず各ウイルスについてイムノドミナントな CTL エピトープを同定することが必須である。また、CTL エピトープがイムノドミナントである前提条件として、そのエピトープがヒトの MHC クラス I に対して高

親和性でなければならない。本年度、クラス I 結合ペプチド予測システムを用いて候補となるペプチドを検索した結果、分担研究報告 15 頁の表-1 に示すように、今後検討するに値する高親和性のペプチドが多数見つかった。これらのペプチドをひとつずつ合成し、リポソームとの結合物を作製し、各々の CTL 誘導能について検討する作業は、非常に時間、手間および費用のかかる作業であるが、この作業を通じて各ウイルスワクチンの創製に最適なイムノドミナントエピトープを選定し、感染実験に臨むべく、現在鳥インフルエンザ、SARS、C 型肝炎の各ウイルスについて、CTL エピトープの同定作業を進めている。

D. 健康危険情報
なし

E. 研究発表
1. 論文発表
別紙参照

2. 学会発表
各分担研究報告書参照

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 (1 件)
発明の名称：「T細胞活性化剤」
出願番号：特願 2006-21720
提出日：平成 18 年 8 月 9 日
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

Ⅱ. 分担研究年度終了報告

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究年度終了報告

1. C型肝炎ワクチンの創製に関する研究

分担研究者 赤塚俊隆 埼玉医科大学 微生物学教室 教授
協力研究者 高木 徹 埼玉医科大学 微生物学教室 実験助手

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）は動物感染実験がチンパンジー以外では不可能であるので、本研究においては HCV と同様な急性感染と持続感染を起こしうるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）を用いたマウス感染実験によって基礎的検討を行い、その一方で慢性 C型肝炎患者リンパ球を用いた *in vitro* 実験でヒトへの応用を検討した。細胞免疫反応が詳しく解析されている LCMV を用い、そのドミナントエピトープを表面結合したリポソームワクチンをマウスに免疫した。1回の接種のみで十分なインターフェロン γ 産生 CD8 陽性 T細胞が誘導され、ウイルスのチャレンジ実験で感染を完全にブロックすることが出来た。投与量を 12.5 μ l（ペプチド 3.75 μ g 相当）まで減らしても十分な効果が見られ、経済性、安全性にも優れていることが証明された。さらに、慢性 C型肝炎患者リンパ球を用いて HLA-A24 拘束性の候補エピトープペプチド 7 種との反応を検討した。*in vitro* 刺激の際に抑制性シグナル経路として最近注目されている PD-1/PD-L1 を抗 PD-L1 抗体でブロックすると、6つのペプチドについて著名な細胞傷害性 T細胞の誘導が見られた。本年度の検討の結果、ワクチンの成分としてのペプチドが選定できただけでなく、治療ワクチンとしてはこの抗 PD-L1 抗体のような PD-1/PD-L1 経路を遮断する機能も付加することにより、実用化の可能性が開けることが示された。

A. 研究目的

C型肝炎は世界に 1.7 億人のキャリアが存在するといわれ、その多くは医療水準の低い開発途上国の人々である。そこでは先進国と異なり、輸血のスクリーニングだけで感染を防ぐことは困難で、有効な予防ワクチンが必要とされている。一方先進国では持続感染者が肝硬変・肝がんで死亡するケースが目立っており、わが国でも 200 万人近い感染者がおり、抗ウイルス薬に加えて有効な治療法が待ち望まれている。本研

究では予防・治療両面からワクチン開発に取り組んだ。ワクチンの有効性を確認するために LCMV によるマウス感染実験をモデルとして選んだ。これは血液感染のみならず気道感染もするので、本研究班での鳥インフルエンザと SARS ウイルスのワクチン開発にとっても重要なデータとなる。

B. 研究方法

1. LCMV の dominant epitope は Table 1 に示すよ

うに C57BL/6 マウスでは3つ知られている。本研究ではこのうち2つのペプチド（GP33 と NP396）を用いて C57BL/6 の免疫を行った。BALB/c の epitope, NP118 は C57BL/6 マウスでは全く認識されないことが知られているので、これを陰性対照として用いた。いずれもリポソーム表面に結合させた。マウスの免疫反応はワクチンを CpG と共に接種後2週目に脾臓を摘出し、脾細胞をペプチドと共に培養後、IFN- γ 産生細胞を ELISPOT で、細胞傷害活性をペプチドパルスした EL-4 細胞を標的とした ^{51}Cr -release assay で測定した。免疫の陽性コントロールとして LCMV 感染後8日以上経過して回復したマウスと、GP33 発現組換えワクシニアウイルスによる免疫を行ったマウスを用いた。

ウイルス感染実験は LCMV Armstrong 株 2×10^6 pfu を腹腔に接種して行った。感染マウスのウイルス量は感染4日後に脾臓を摘出し、そのホモジネートを Vero 細胞に接種し、4日後にプラーク数を定量して算出した。

2. 慢性C型肝炎患者の瀉血療法の際に廃棄される血液約 400ml からリンパ球を分離し、凍結保存した。その一部を解凍し GM-CSF と IL-4 の存在下で培養して分化誘導した樹状細胞を抗原提示細胞とし、そこに同じ患者リンパ球と共に抗原ペプチド、IL-7, IL-15, IL-2 を加えて 14 日間培養した。誘導されたキラーT 細胞活性を、抗原ペプチドを pulse した C1R-A24 (HLA-A24 遺伝子を transfect して発現させた C1R 細胞) を標的として ^{51}Cr -release assay で測定した。

(倫理面への配慮)

マウスは、埼玉医大・実験動物管理運営規定に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。アデノウイルス、ワクシニアウイルスを扱う場合は BSL2 の施設で実験を行った。

また、ヒト由来株化細胞は埼玉医科大学倫理委員会から以下のように承認を受けて凍結保存してあるヒトリンパ球を使用する。

申請番号：335

課題名：C型肝炎症例に対する瀉血療法で廃棄される血液を用いたウイルス学的・免疫学的基礎研究

倫理委員会承認年月日：平成16年6月8日（訂正書類受理：平成16年7月13日）

研究機関：承認時から平成20年3月末まで

C. 研究結果

1. Liposome-GP33 100 μl を C57BL/6 マウスに皮下注 (s.c.) または筋注 (i.m.) して効果を比較した。ELISPOT (図 1A)、CTL assay (図 1B) 共に筋注の方が強い反応が得られたので、以降の実験は筋注で行った。免疫を2週毎に繰り返して1回、2回、および3回免疫したマウスで ELISPOT を比較してみると、2回目の免疫で効果が增强されるのが分かった。3回目でもわずかに增强したがその差に有意性はなかった (図 2)。免疫量を 200 μl から半分ずつ減らして比較した時、12.5 μl まで減らしても ELISPOT assay の結果に差は認められなかった (図 3)。用いるエピトープとして a) : GP33 単独、b) : もう一つの dominant epitope NP396、c) : 両者をリポソーム表面に結合したもの、d) : a) と b) を混合したもの、を免疫した4群を比較した (図 4)。投与されたペプチド量は全て同じであるが、b) の NP396 ではやや反応が低く、両者を結合した c) では各々を単独で使用した場合より若干高く、2種類のワクチンを混合したものが最良であった。Liposome-GP33 を免疫したマウスに LCMV を接種し、その感染防御効果を判定した。比較する陽性対照として、LCMV 感染後2週目の免疫が成立した群、GP33 ペプチドを発現する組換えワクシニアウイルス

接種群、陰性対照として C57BL/6 では認識されない NP118 を表面結合した liposome を接種した群を用いた。図 5 のように陰性対照では脾臓 1 グラム中に 107 pfu 以上のウイルスが検出されたが、陽性対照も Liposome-GP33 を免疫したマウスも共に全く検出されなかった（検出限界：40 pfu/g）。

2. 日本人に多い（50%以上を占める）HLA-A24 が認識する HCV のエピトープを同定し、ワクチン成分とするために、これまでに患者リンパ球での反応性が報告された HLA-A24 結合モチーフを持つアミノ酸配列 7 種のペプチドを合成し、実際に患者リンパ球と反応するか、テストを行った。HCV の慢性感染では HCV 特異的 T 細胞は機能抑制状態になっていて、ペプチドによる刺激を行ってもなかなか陽性反応は得られない。昨年 R.Ahmed らにより、その原因として PD-1/PD-L1 の抑制性シグナルが関与していることが示唆された。そこでその経路をブロックするために抗 PD-L1 抗体をこのペプチドによる刺激培養に加えたところ、1 回だけの刺激で 6 種のペプチドについて陽性反応が得られた（図 6）。

LCMV については細胞免疫反応が世界中で詳しく調べられており、ドミナントエピトープも表 1 に示されているように確立されているので、ここから C57BL/6 マウス用に 2 つ（GP33, NP396）を選んだ。図 4 の結果で見るとそれぞれのエピトープペプチドを結合したリポソームワクチンを混合して使用した場合が一番効果的であったが、GP33 のみのものとの差はあまりない。これを 1 回筋注するだけで ELISPOT と CTL assay で抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の反応が得られ（図 1）、ウイルス感染を完璧に抑えることがわかった（図 5）。このわずか 9 個のアミノ酸から成るペプチドでウイルス感染を予防できる意義は非常に大きい。変異が高頻度に生じる HCV、HIV、

インフルエンザウイルスなどの場合、従来の中和抗体誘導型ワクチンで対処するのは非常に困難であるが、CTL エピトープは多くの場合ウイルスの株の間で配列が保存されている。このエピトープに対する反応を誘導するだけでウイルス感染が予防できるということは、変異の大きいウイルスに対してより有効なワクチンとなることが期待される。

我々のリポソームワクチンは、1 回の免疫だけで十分な予防効果があること（図 5）、ELISPOT で見る限り 12.5 μ l (3.7 μ g) のペプチドを含む)まで減らしても効果は変わらないこと（図 3）、筋注で行えること（図 1）などの結果が得られている。従来のペプチドワクチンではマウスあたり数十 μ g を複数回投与するのが一般的であることを考えると我々のリポソームワクチンの有効性および安全性ははるかに高いと考えられる。

ヒトの C 型肝炎への応用可能性を検討するために行った HLA-A24 の患者リンパ球を用いた実験結果により、LCMV の GP33, NP396 に相当し、日本人の半数以上で認識されるようなエピトープが見つかる可能性が得られた。今年度の LCMV を用いた基礎実験の結果から、リポソーム結合ペプチドをヒトの感染症治療に応用できる条件が整ってきたということが言える。

以上、本年度の検討の結果、単一のエピトープペプチドを表面結合したリポソームワクチンを 1 回筋注しただけで、ウイルス感染を完全にブロックする免疫反応が成立することが証明された。現在 C 型肝炎治療に応用するための HLA-A24 拘束性エピトープの同定を進めている。

D. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

a. 守屋修、赤塚俊隆、松井政則

T-bet^{-/-}マウスでの HSV 潜伏感染の誘導について
日本ウイルス学会 名古屋 2006 年 11 月 19-21 日

b. 高山俊輔、大野悟史、磯田明宏、守屋修、林秀徳、善本隆之、赤塚俊隆、松井政則

組み換えワクシニアウイルスを用いた、IL-12 関連サイトカイン IL-23 のウイルス感染防御機構の機能解析 第 36 回日本免疫学会 大阪 2006 年 12 月 11-13 日

c. 大野悟史、磯田明宏、高山俊輔、守屋修、林秀徳、善本隆之、赤塚俊隆、松井政則

IL-6/IL-12 ファミリーサイトカイン IL-27 の、ウイルス感染防御における免疫反応に及ぼす影響
第 36 回日本免疫学会 大阪 2006 年 12 月 11-13 日

d. 守屋修、赤塚俊隆、松井政則

HLA-A*0201 トランスジェニックマウスでの HSV-2 特異的 CTL 反応 第 36 回日本免疫学会
大阪 2006 年 12 月 11-13 日

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

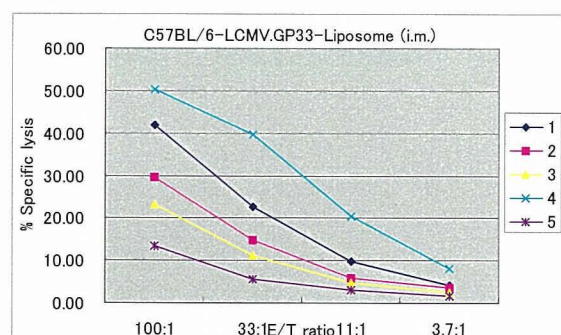
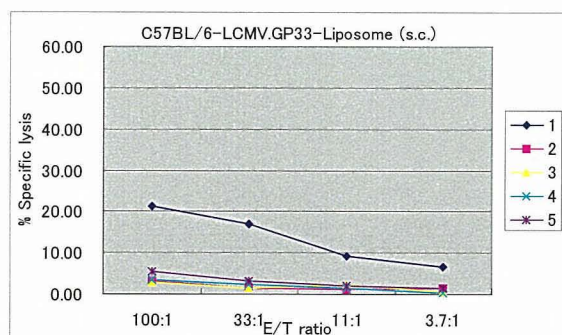
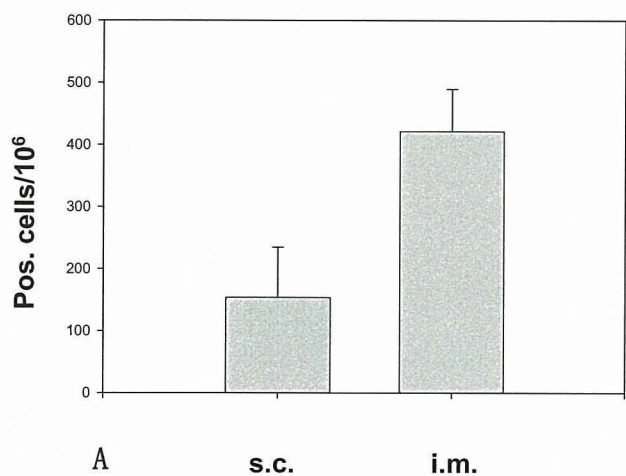
3. その他

該当なし。

Mouse strain	MHC molecule	Protein	Position	Amino acid sequence ^a
C57BL/6	Db	GP	33-41	KAVYNFATC
	Db	NP	396-404	FQPQNGQFI
	Db	GP	276-286	SGVENPGGYCL
	Db	GP	92-101	CSANNSHHYI
	Kb	NP	205-212	YTVKYPNI
	Kb	GP	33-43	KAVYNFATCGI
BALB/c	Ld	NP	118-126	RPQASGVYM
	Kd	GP	99-108	HYOSMGTSGL
	Kd	GP	283-291	GYCLTKWMI
	Kd	NP	314-322	PYIACRTSI

^aImmunodominant epitopes are shown in boldface.

表1 LCMV T Cell Epitopes



B

図1 免疫経路 5匹ずつ2群のC56BL/6マウスに100 μ l の liposome-GP33を皮下(s.c.)または筋肉内(i.m.)に接種し比較した。(A) ELISPOT (IFN- γ) assay と (B) CTL assay。Bでは5匹の結果(1-5)をそれぞれ色分けして示した。

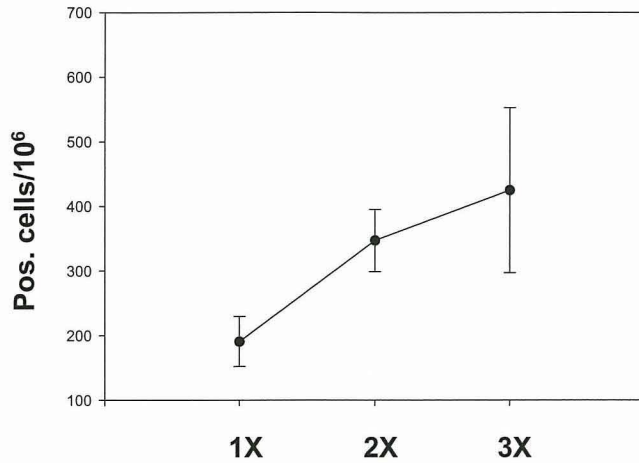


図2 ブースト効果 各群5匹のマウスに100 μ lのliposome-GP33を2週ごとに1回(1X)、2回(2X)、または3回(3X)筋注で免疫し、最終免疫後2週目にELISPOT assayを行った。

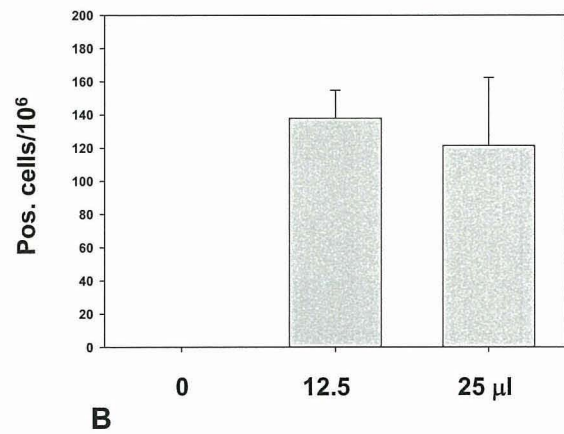
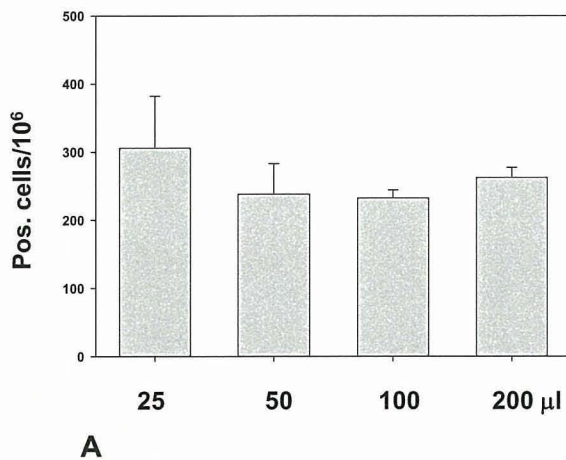
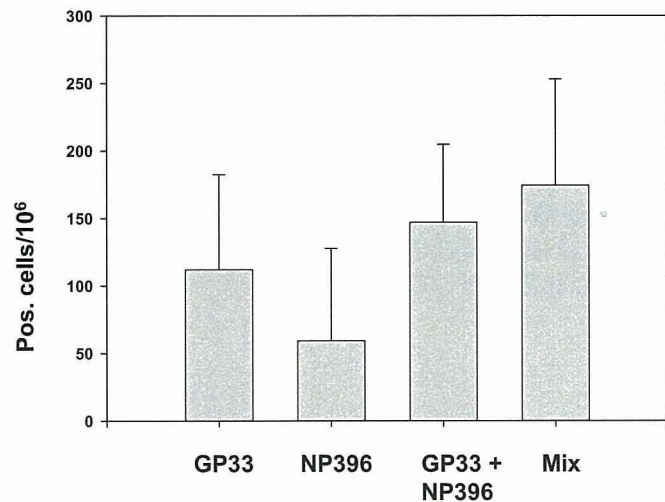


図3 免疫量の比較 各群4匹ずつのマウスにliposome-GP33を0 - 200 μ l筋注し、2週後にELISPOT assay (IFN- γ) を行い比較した。

図4 エピトープの比較 各群4匹ずつのマウスにGP33結合リポソーム(GP33)、NP396結合リポソーム(NP396)、GP33とNP396の両者を結合したリポソーム(GP33+NP396)、GP33-リポソームとNP396-リポソームを混合したもの(Mix)をそれぞれ50 μ lずつ筋注し、2週後にELISPOT assay (IFN- γ)を行い比較した。



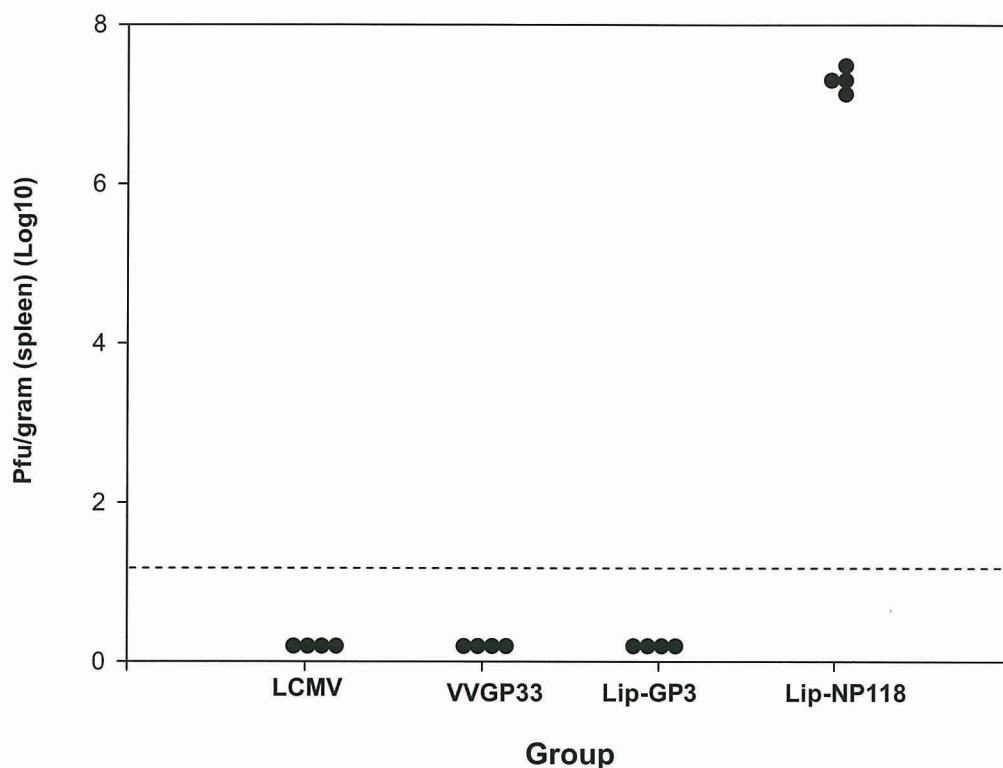


図5 チャレンジ実験 各群4匹のC57BL/6マウスに免疫し、2週後に 2×10^6 pfu のLCMVを腹腔内接種により感染させ、その4日後に脾臓を摘出してウイルス量をVero細胞のfocus assayにより測定した。(LCMV): LCMV感染による免疫、(VVGP33): GP33発現組換えワクシニアウイルスの感染(2×10^6 pfu i.p.)による免疫、(Lip-GP33): Liposome-GP33 100 μ lの筋注、(Lip-NP118): C57BL/6では認識されないエピトープ、NP118を結合したリポソーム100 μ lの筋注。破線は検出限界(4×10 pfu/gram)を示す。

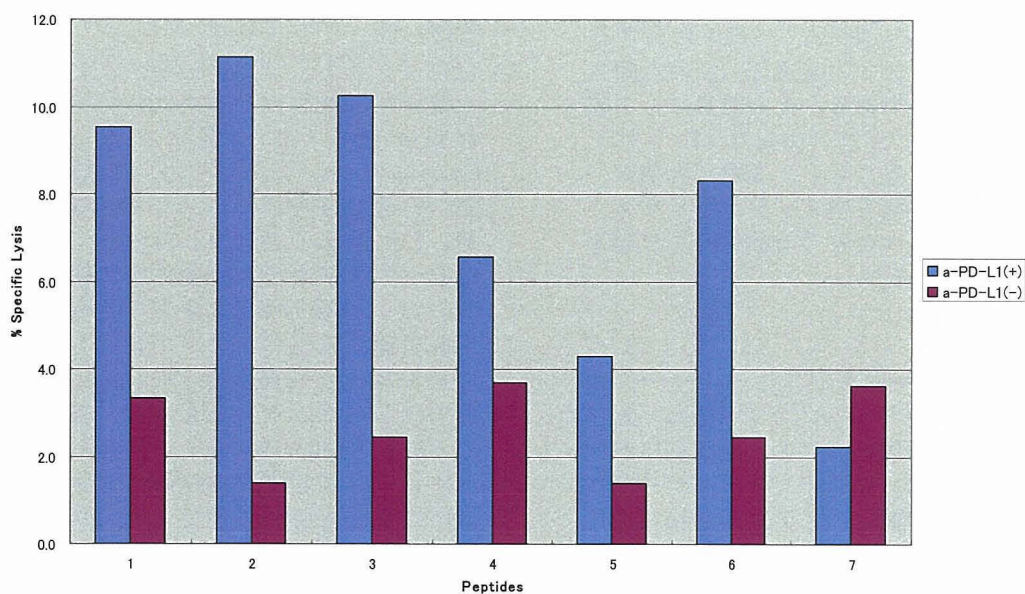


図6 HCV HLA-A24拘束性CTL epitopeの同定 慢性C型肝炎患者リンパ球を7種の候補ペプチドで刺激し、細胞傷害活性を測定した。刺激培養は抗PD-L1存在下(青色)、非存在下(赤色)の2つに分けて行った。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究年度終了報告

2. SARS コロナウイルス（SARS-CoV）由来 CTL エピトープを用いた SARS
ワクチンの開発

分担研究者 松井政則 埼玉医科大学 微生物学教室 助教授
協力研究者 大野悟史 城西大学 薬学部 大学院

研究要旨 ペプチド結合リポソームを使って、重症急性呼吸器症候群(SARS)に対する安全で有効なワクチンの実用化に向けた開発研究を行なった。SARS コロナウイルス由来の CTL エピトープを多数同定し、それを安全性の高いリポソームに結合させて免疫原として用い、HLA-A*0201 トランスジェニックマウスに SARS ウイルス特異的 CTL を効率よく誘導する免疫法を検討する。平成 18 年度は、SARS ウイルス由来 CTL エピトープの同定を試みた。多くのエピトープを見つけるために、大きな ppla 領域と Nucleocapsid 領域に的を絞った。まず、これらの領域のエピトープをコンピューターで予測した。そして、予測したエピトープに相当するペプチドを合成し、HLA-A*0201 分子への結合親和性を測定した。一方、この作業と併行して、予測したエピトープをコードする遺伝子を作製して発現ベクターに組み込み、これらを発現する組み換えアデノウイルスとワクシニアウイルスを作製した。アデノウイルスはマウスの免疫に、ワクシニアウイルスはチャレンジ実験に使用する。作製したアデノウイルスをマウスに免疫し、エピトープに特異的な CTL の誘導を CTL assay および Intracellular cytokine assay (ICS) で検討し、Nucleocapsid 領域で、ドミナントエピトープ 2 つを含む 4 つのエピトープを同定した。ppla 領域については現在進行中である。一方、既に同定されている 3 種類の SARS-Spike 由来エピトープを使って、ペプチド結合リポソームがマウスに SARS 特異的 CTL を誘導できることを確認した。

A. 研究目的

本研究プロジェクトの最終目的は、ペプチド結合リポソームを使って、SARS に対する安全で有効なワクチンの実用化に向けた開発研究を行なうことである。そのために、平成 18 年度は、SARS ウイルス由来の CTL エピトープを多数同定することと、実験に必要な、発現プラスミド、組み換えアデノウイルス、ワクシニアウイルスなどの実験材料を作製することを目的とした。

B. 研究方法

1. コンピューターによる CTL エピトープの予測：SARS ウイルスの ppla 及び Nucleocapsid 領域のアミノ酸配列において、HLA-A*0201 結合ペプチドモチーフに従い、9-10 個のアミノ酸からなる CTL エピトープをコンピューター (BIMAS & SYFPEITHI software) で予測した。

2. ペプチドを合成：予測したエピトープに相当するペプチドの合成を Operon 社に依頼した。
3. 合成ペプチドの HLA-A*0201 分子への結合親和性の測定：HLA-A*0201 分子への結合親和性を T2 細胞による peptide binding assay で測定した。T2 細胞は、HLA-A2 遺伝子を持つヒト B 細胞株であるが、TAP 遺伝子が欠損しており、内在性自己ペプチドを粗面小胞体内に輸送して HLA-A2 に結合させることができないため、細胞表面に自己ペプチドが結合した安定な HLA-A2 分子を発現できない。しかし、外部からペプチドを加えると、細胞表面の不安定な HLA-A2 分子に結合し、安定化する。さまざまな濃度のペプチドを細胞に加え、どの程度安定した HLA-A2 分子が検出できるかを、抗 HLA-A2 モノクローナル抗体で染色しフローサイトメト

- リーで測定して、結合親和性を計算した。
4. 予測したエピトープをコードする遺伝子の作製：それぞれ 20 塩基ずつオーバーラップした 90-100 塩基からなる Long Oligo nucleotide を、ppla 用には 16 種類、Nucleocapsid 用には 5 種類合成し、PCR を使って DNA を伸長させて、コンピューターで予測した 30 個の ppla 由来エピトープ、または 8 個の Nucleocapsid 由来エピトープをコードする multiepitope minigene を作製した。そして、この minigene の塩基配列を DNA sequencing で調べて、PCR で作製した遺伝子にミスがないことを確認した。
 5. 発現プラスミドの作製：作製した ppla 及び Nucleocapsid の minigene を、発現ベクター p3xFLAG-CMV-10 (Invitrogen) に組み込んだ (p3xFLAG-SARS-N, p3xFLAG-SARS-ppla)。p3xFLAG-CMV-10 は、CMV プロモーターにより、3xFLAG タグが N 末端に結合した融合タンパク質を発現する。作製した p3xFLAG-SARS-N, p3xFLAG-SARS-ppla は、lipofectamine により 293T 細胞にトランスフェクションし、抗 3xFLAG 抗体を使用して Western blotting を行いタンパク質の発現を確認した。
 6. 組み換えアデノウイルスの作製：p3xFLAG-SARS-N 及び p3xFLAG-SARS-ppla から、3xFLAG タグが N 末端に結合した ppla 及び Nucleocapsid の minigene を PCR で増幅し、DNA sequencing で塩基配列を確認して、アデノウイルスのゲノムを含んだコスミドベクター、pAxCawtit (TAKARA Adenovirus Expression Vector kit) に挿入した。そして、293T 細胞にトランスフェクションしてウイルスを産生させ、組み換えアデノウイルス (replication defective) を作製した。また、ウイルスを 293T 細胞に感染させ、抗 3xFLAG 抗体を使用して Western blotting を行い細胞内でのタンパク質の発現を確認した。
 7. 組み換えワクシニアウイルスの作製：アデノウイルスの場合と同様、3xFLAG タグが結合した ppla 及び Nucleocapsid の minigene を PCR で増幅し、塩基配列確認後、ワクシニアウイルスの挿入ベクター、pNZ68K2 に挿入した。そして、この組み換えプラスミドと野生ワクシニアウイルス (WR 株) の相同組み換えにより、組み換えワクシニアウイルスを作製した。ウイルスを 293T 細胞に感染させ、抗 3xFLAG 抗体を使用して Western blotting を行い細胞内のタンパク質発現を確認した。
 8. SARS ウイルス由来 CTL エピトープの同定：Nucleocapsid 領域の予想エピトープを発現する組み換えアデノウイルスを HLA-A*0201 トランスジェニックマウスに免疫し (5×10^8 pfu/mouse)、以下のアッセイで SARS ウイルス特異的 CTL を検出した。これらの結果から、エピトープを決定し、その中でも抗原性の強いドミナントエピトープを定めた。
 - a. CTL の細胞傷害活性の測定：免疫 2 週後に、マウスから脾細胞を調整し、SARS ウイルス由来の各々の合成ペプチドで *in vitro* 抗原刺激して、それぞれのエピトープに特異的な CTL 活性を ^{51}Cr -release assay で調べた。
 - b. 細胞内サイトカイン陽性 CTL の測定：免疫 7 日後に、マウス脾細胞を各々のペプチドで抗原刺激した。その後、細胞表面を FITC-抗 CD8 抗体、細胞内部を PE-抗 IFN- γ 抗体で染め、それぞれのエピトープに特異的に反応する CD8 陽性・細胞内 IFN- γ 陽性細胞数を、フローサイトメトリーで測定した。
 9. ペプチド結合リポソームによる CTL の誘導：既に同定されている 3 種類の SARS-Spike 由来エピトープを使って、ペプチド結合リポソームを作製した。それをマウスに免疫し、SARS-Spike 特異的 CTL が誘導できるかどうかを CTL アッセイで検討した。

(倫理面への配慮)

マウスは、埼玉医大・実験動物管理運営規定に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。アデノウイルス、ワクシニアウイルスを扱う場合は BSL2 の施設で実験を行った。

C. 研究結果

1. CTL エピトープをコンピューターで予測した。2 種類のエピトープ予測ソフト (BIMAS & SYFPEITHI) を用いて、エピトープの可能性の高い score の良いものから 9-10 個のアミノ酸配列を、ppla から 30 種類 (9 mer)、Nucleocapsid (9 及

- び 10 mer)から 8 種類選んだ (Table 1)。そして、それに相当する合成ペプチドを作製した。
2. 予測したエピトープの結合親和性を測定した。合成したペプチドの HLA-A*0201 への結合親和性を、T2 細胞を用いた peptide binding assay で測定した。ppla から選んだ 30 種類のうち 24 種類、及び Nucleocapsid から選んだ 8 種類のうち 5 種類の結合親和性が高く (BL₅₀ が 100 μM 以下)、エピトープの予想が適切であることがわかった (Table 1)。
 3. ppla 及び Nucleocapsid 領域の予想エピトープをコードする multiepitope minigene を PCR で作製し、その遺伝子を組み込んだ発現プラスミド、組み換えアデノウイルス、組み換えワクシニアウイルスを作製した。タンパク質の発現は、抗 3xFLAG 抗体を用いた Western blotting で確認した。
 4. SARS ウイルス由来 CTL エピトープを同定した。作製した Nucleocapsid の予想エピトープを発現する組み換えアデノウイルスを HLA-A*0201 トランスジェニックマウスの腹腔に免疫した。そして、抗原特異的に誘導される、細胞内 IFN-γ 陽性 CD8 陽性細胞の検出、および CTL の細胞傷害活性の測定を行い、Nucleocapsid のエピトープを同定した (Table 2 及び Fig. 1)。8 種類の予測エピトープのうち、3 種類 (N-222, N-223, N-227) のペプチドは、IFN-γ 陽性 CD8 陽性細胞の誘導も細胞傷害活性の誘導も良好であった。N-317 は、IFN-γ 陽性 CD8 陽性細胞の誘導は良好であったが、細胞傷害活性は誘導されなかった。この中で、N-223 と N-227 は、IFN-γ 陽性 CD8 陽性細胞が誘導され、かつ細胞傷害活性も誘導されたことから、ドミナントエピトープであると結論した。

以上、今年度は、Nucleocapsid についてエピトープを同定した。ICS と CTL assay の結果 (Table 2) から、8 種類の予測エピトープのうち、3 種類 (N-222, N-223, N-227) はエピトープと考えられた。また N-331 もエピトープ特異的に有意に IFN-γ 陽性 CD8 細胞が誘導されることから、エピトープと考えられた。これらの中で、N-223 と N-227 は、IFN-γ 陽性細胞および killing 活性の誘導に優れ、ドミナントエピトープであることが示唆され

た。また、クラス I 結合親和性はドミナントエピトープの必要条件であるが十分条件ではないことが確認された。このように、感染患者のリンパ球、ウイルスやウイルス DNA などが手に入り難い SARS のような場合でも、コンピューターによるエピトープ予測、minigene および組み換えウイルスの作製、HLA トランスジェニックマウスの使用などで、CTL エピトープを同定できることが証明された。今後、同様の手法を用いて ppla のエピトープ同定を行う予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

- a. Komori, H., T. Nakatsura, S. Senju, Y. Ikuta, K. Yokomine, Y. Yoshitake, Y. Motomura, T. Beppu, M. Matsui, T. Torigoe, N. Sato, H. Baba, and Y. Nishimura.
Identification of HLA-A2- or -A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma.
Clin. Cancer Res. 12: 2689-2697, 2006.
- b. Ohno, S., O. Moriya, T. Yoshimoto, H. Hayashi, T. Akatsuka, and M. Matsui.
Immunogenic variation between multiple HLA-A*0201-restricted, hepatitis C virus-derived epitopes for cytotoxic T lymphocytes.
Viral Immunol. 19: 458-467, 2006.
- c. M. Matsui.
Roles of the novel IL-12-associated cytokine, IL-23 in the regulation of T cell-mediated immunity. (Review Article)
Hepatol. Res. (in press) 2007.

2. 学会発表

- a. Masanori Matsui (Invited)
Roles of the novel IL-12-associated cytokines, IL-23 and IL-27 in the regulation of T-cell mediated immunity against viral infection
The 5th JSH Single Topic Conference: "Liver and Immune Disorder: New insights from pathogenesis to treatment"
Nagasaki, 2006 9/29-30

- b. 守屋修、赤塚俊隆、松井政則
T-bet^{-/-}マウスでの HSV-2 潜伏感染の誘導について
日本ウイルス学会 名古屋 2006 年 11 月 19-21 日
- c. 高山俊輔、大野悟史、磯田明宏、守屋修、林秀徳、善本隆之、赤塚俊隆、松井政則
組み換えワクシニアウイルスを用いた、IL-12 関連サイトカイン IL-23 のウイルス感染防御機構の機能解析
第 36 回日本免疫学会 大阪 2006 12 月 11-13 日
- d. 大野悟史、磯田明宏、高山俊輔、守屋修、林秀徳、善本隆之、赤塚俊隆、松井政則
IL-6/IL-12 ファミリーサイトカイン IL-27 の、ウイルス感染防御における免疫反応に及ぼす影響
第 36 回日本免疫学会 大阪 2006 12 月 11-13 日
- e. 守屋修、赤塚俊隆、松井政則
HLA-A*0201 トランスジェニックマウスでの HSV-2 特異的 CTL 反応
第 36 回日本免疫学会 大阪 2006 12 月 11-13 日
- f. Chen Yu-Zhen, Senju Satoru, Liu Gang, Matsui Masanori, Nishimura Yasuharu.
Analysis of HLA class I-restricted CTL epitopes derived from SARS Corona virus.
第 36 回日本免疫学会 大阪 2006 12 月 11-13 日

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- 1. 特許取得
新しく同定した SARS-ppla、nucleocapsid 領域のエピトープに関し、特許出願予定。
- 2. 実用新案登録
該当なし。
- 3. その他
該当なし。

Table 1. Binding of SARS-pp1a, and nucleocapsid-derived peptides to HLA-A*0201 molecules

Name	Sequence	BL ₅₀ (μM)		Name	Sequence	BL ₅₀ (μM)	
pp1a-15	QLSLPVLQV	75.7	High	pp1a-3560	CLDAGINYV	47.1	High
pp1a-103	TLNEDLLEI	3.1	High	pp1a-3564	WLMWFIISI	100.4	Medium
pp1a-445	FLITGVFDI	19.2	High	pp1a-3616	TLLCVLAAL	31.8	High
pp1a-634	SLQVCVQTV	59.8	High	pp1a-3687	VLAALVCYI	22.8	High
pp1a-651	YLSSVLLAL	8.4	High	pp1a-3709	VLAWLYAAV	6.4	High
pp1a-1121	AMWLLLLSI	40.3	High	pp1a-3730	MLLTFLTSL	25.7	High
pp1a-1139	ILLLDQVLV	4.9	High	pp1a-3745	FLLPSLATV	153.7	Medium
pp1a-1288	LLCVLAALV	65.1	High	pp1a-3816	SMWALVISV	68.1	High
pp1a-1652	ALSGVFCGV	6.7	High	pp1a-3848	LLFITGNTL	102.5	Medium
pp1a-2187	FLNRFTTTL	3.0	High	pp1a-4071	VLLSVLQQQL	8.3	High
pp1a-2207	FLTSLILV	323.0	Low	pp1a-4219	VLGSLAATV	53.3	High
pp1a-2340	TLMNVITLV	2432.8	Low	N-113	YLGTGPEASL	25.7	High
pp1a-2546	FLARAIQV	7.6	High	N-159	VLQLPQGTTL	235.3	Medium
pp1a-2754	KLNIKLLGI	96.7	High	N-222	LLLLDRLNQL	52.6	High
pp1a-2755	ALWEIQQVV	187.2	Medium	N-223	LLLLDRLNQL	46.1	High
pp1a-2758	TLGVLPVPHV	97.3	High	N-227	RLNQLESKV	165.1	Medium
pp1a-2990	KLSAGVEFL	6.2	High	N-317	GMSRIGMEV	72.8	High
pp1a-3444	ILLAPLLSA	53.0	High	N-331	WLTYHGAIKL	90.4	High
pp1a-3459	MLSRALKKV	39.6	High	N-352	ILLNKHIDA	140.5	Medium

Data of peptide-binding assays are shown as BL₅₀ indicating a concentration of each peptide that yields the half-maximal MFI of T2 cells pulsed with a control peptide, NS3-1585.

BL₅₀ in peptide-binding assay. High, less than 100 μM; medium, 100-200 μM; Low, more than 20 μM

Table 2. Detection of cytolytic activities and quantitation of IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells in response to each peptide derived from SARS-virus-derived nucleocapsid

Name	ICS ^a		Lysis ^b		Affinity ^c
	Ad-SARS-N	Ad-WT	(+)	(-)	
N-113	0.3	0.1	10.2	2.0	High
N-159	0.2	0.1	6.2	0.5	Medium
N-222	0.9	0.1	14.8	2.4	High
N-223	1.8	0.1	13.4	1.0	High
N-227	2.8	0.1	12.6	0.0	Medium
N-317	1.6	0.2	5.2	1.5	High
N-331	0.4	0.2	7.5	1.0	High
N-352	0.2	0.1	0.8	2.7	Medium

^aICS, intracellular cytokine staining; spleen cells of mice immunized with Adenovirus expressing SARS nucleocapsid-derived putative epitopes (Ad-SARS-N) or wild-type adenovirus (Ad-WT), were stimulated *in vitro* with each peptide for 5 hours. ICS was then performed by staining for the cell surface CD8 molecule and the antigen-induced intracellular IFN- γ in spleen cells. Data indicate percentages of intracellular IFN- γ positive cells in CD8⁺ cells.

^bSpleen cells of immunized mice were stimulated *in vitro* with each peptide, and CTL assays were performed. Data are shown as percent specific lysis of target cells with (+) or without (-) each peptide at an E:T ratio of 150.

^cBL₅₀ in peptide-binding assay. High, less than 100 μ M; medium, 100-200 μ M; Low, more than 20 μ M