

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

ペプチド抗体によるSARS(重症急性呼吸器症候群)診断の迅速化
(H16-新興一般-040)

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 伊東 恭悟

平成19年(2007)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

ペプチド抗体によるSARS(重症急性呼吸器症候群)診断の迅速化:
SARS患者血清中抗体が認識するペプチドの同定

1-6 伊東恭悟

II. 分担研究報告

1. リコンビナントタンパク質によるSARS抗体測定法のための基礎検討

7-9 笹月健彦

2. SARS(重症急性呼吸器症候群)由来分子のT細胞エピトープの解析

10-13 七條茂樹

3. リコンビナントタンパク質によるSARS診断法の基礎検討

14-16 切替照雄

4. 中国人急性期感染者血清中ペプチド抗体の測定およびT細胞エピトープの検討

17-20 小松誠和

(資料) 図1 SARS-CoV由来リコンビナントタンパク質に対するウサギ抗S791抗体の反応性
21

(資料) 図2 SARS-CoV急性期感染患者血清中のS791に対する抗体 21

(資料) 表1 SARS-CoV急性期感染患者血清中の抗N161-pep IgG 22

(資料) 表2 リアルタイムPCRの結果 23

(資料) 表3 遺伝子発現のデータベース検索結果 24-25

(資料) 表4 T細胞のペプチド刺激によるIFN- γ 産生 26

(資料) 図3 前立腺がん患者末梢血からK532-74ペプチド刺激で誘導されたCTL活性 26

(資料) 図4 健常人末梢血からK532-74ペプチド刺激で誘導されたCTL活性 27

(資料) 図5 前立腺がん患者末梢血からK532-74ペプチド刺激で誘導されたCTL活性 27

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 28-28

IV. 研究成果の刊行物・別冊

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

ペプチド抗体による SARS（重症急性呼吸器症候群）診断の迅速化に関する研究

主任研究者 伊東 恭悟 久留米大学医学部教授

研究要旨：【研究目的】本研究は、1) 昨年度までに同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立、2) 患者抗体が認識する T 細胞エピトープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用を検討することを目的として研究を行った。【実験結果】1) 迅速診断開発:①昨年度開発した S791 ペプチドに対する抗体のイムノクロマトを用いた迅速検出法により SARS 初期感染患者血清では約 80%が陽性だったが、残りの 20%はルミネックスで高値のものも含めて検出できなかった。そこで、本年度は切替らがりコンビナントタンパク質の作成に成功したことから、これらの抗原のイムノクロマトへの応用可能性についても検討した。その結果、強い交差反応性が認められたこと、難溶解性のため測定系の構築が困難であることが判明した。②昨年度までの本研究で同定した 3 種類のペプチドのうち、N161 と S791 に対する抗体を中国人 SARS-CoV 急性期感染患者血清で測定し (Dr. Yan との共同研究) N161 は 42%のよう成立にとどまったが、S791 は測定した検体すべてが陽性だった。2) T 細胞エピトープの同定:③HLA 拘束性ペプチド候補 340 種類の合成ペプチドに対する血清中の各ペプチドに対する抗体価を測定し、非感染者および感染者に反応の認められる 12 種類のペプチドを選択し、このうち 9 種類のペプチドが CTL 誘導能を有することが分かった。④本年度は申請時に一部計画変更し、感染者および非感染者ともに抗体価の高い K532-74 ペプチドに焦点を当てて解析した。このペプチドは非感染者末梢血を刺激することにより細胞傷害活性を有する T 細胞 (CTL) を誘導できることが分かった。【考察】SARS 急性期患者血清を入手し、診断キットの精度を検証する予定だったが、新たな感染の拡大が無かったため新規測定は行わなかった。しかし、S791 に対する抗体が感染後 6 ヶ月採血血清では陽性率が約 50%だったのが、本年度の中国との共同研究で急性期患者血清では高率 (14 例中 14 例、100%) に検出できることが分かった。また、SARS-CoV 遺伝子がコードするペプチドの一つが、非感染者末梢血リンパ球から細胞傷害性 T 細胞を誘導し、非感染細胞を傷害することを明らかにした。また、稀ではあるものの正常細胞に対する傷害活性を示す CTL の誘導も確認した。このことから、感染者の一部で重篤な肺炎へ移行する機序の解析に重要な可能性が示唆された。

分担研究者

笹月 健彦 国立国際医療センター総長
七條 茂樹 久留米大学医学部助教授
切替 照雄 国立国際医療センター研究所部長
小松 誠和 久留米大学医学部講師

血液 (担当：伊東、七條、小松)

ペプチド刺激による細胞傷害性 T 細胞の誘導実験に用いる非感染者末梢血はインフォームドコンセントを採った上で採血した。

A. 研究目的

本研究は、1) 昨年度同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立、2) 患者抗体が認識する T 細胞エピトープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用を検討することを目的として研究を行った。

ペプチド (担当：伊東、笹月)

SARS-CoV のゲノム遺伝子配列 (Accession AY278488.2) からウイルス遺伝子がコードするタンパク由来ペプチド (HLA-A2 および-A24 拘束性) 由来の 9~10mer ペプチドをそれぞれ 227 および 113 種類 (合計 340 種類)、純度 70%以上で合成したペプチドでスクリーニングした結果得られたものの中から、本年度は K532-74 ペプチドに特

B. 材料および研究方法

化し純度 90%以上で再合成した。抗体の反応性、特異性などの確認および非感染者末梢血からの CTL 誘導実験を行った。

リコンビナントタンパク質(担当：切替)

切替分担研究者が作成したもの (S1-N, MW37kD; S1-C, MW35kD; S791, MW30kD; S2, MW30kD) を、本研究にも用いた。

ウサギ抗ペプチド抗体 (担当：七條、小松)

リコンビナントタンパク質の解析には、昨年度作成したウサギ抗 S791 抗血清を用いた。作成法は、S791 ペプチドを KLH(キャリアータンパク : Imject Immunogen EDC Conjugation Kit with mcKLH, Rockford, IL) に結合させてウサギに免疫した。すなわち、①2mg mcKLH を 200 μ L の脱イオン水に溶かす。②2mg のペプチドを Conjugation Buffer (0.1M MES, 0.9M NaCl, 0.02% NaN₃, pH4.7) に溶かす。③500 μ L のペプチド溶液を 200 μ g キャリアータンパク溶液に加える。④EDC 1vial を 1mL の脱イオン水に溶かし、この溶液 50 μ L をキャリアー・ペプチド溶液に直ちに加える。⑤室温で 2 時間静置する。⑥透析により、NaN₃ および Conjugation Buffer を除く。⑦280nm における吸光度を測定してペプチド-KLH 複合体の濃度を定める。また、ウサギへの免疫は、①MPL + TDM Emulsion, R700 [アジュバント : RIBI Adjuvant system (RAS) (RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT)] に、KLH(キャリアータンパク)-ペプチド複合体溶液を 2mL 入れ、37°C 恒温槽で暖めて乳濁液を作成した。②100 μ L ずつ、背中 6 カ所に毎週、10 回以上皮内注射する。③免疫ウサギ耳朶より抗体測定のために採血した。

抗体の測定(担当：七條、小松、伊東：中国の研究室との共同研究)

感染初期患者血清での N161 と S791 に対する抗体の測定を ELISA で行った。測定条件は 30 μ g/well peptide で ELISA ミクロプレートに固相化し、血清試料は 100 倍希釈、二次抗体はホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG を 2000 倍希釈で用いて測定した。

K532-74 刺激で誘導した CTL の解析(担当：七條、小松、伊東)

①末梢血単核球からの CTL 誘導：陰性及び陽性コントロールのペプチド(最終濃度：10 μ g/mL)とともに、健常人 8 名および前立腺がん患者 9 名の

末梢血から分離した単核球細胞 (1 x 10⁵/well) を 96 穴マイクロプレートに入れ、5%CO₂ インキュベーター内で培養する。培養には 45%AIM-V, MEM non essential amino acid solution、7.5 x 10⁴ units/mL IL-2, 40mg/Amp/mL ゲンタマイシンを含む 45%RPMI 1640, および 10%FCS の組成の培養液を用いた。

2 倍濃度のペプチドが入った上記培養液で 3 日おきに培養上精の半量を交換する操作を 4~5 回繰り返し替えて培養を継続し、13 日目にペプチドを入れない培養液で上記操作を行う。

②CTL 活性測定のエフェクター細胞の調整：IL-2 添加培養液を無添加 10%FCS/RPMI 1640 倍溶液に交換し、以下の実験に用いる。

③活性化リンパ球測定：CTL 活性は IFN- γ 産生を指標に検出する。産生 IFN- γ 濃度測定は ELISA 法で行う。HLA-A2 拘束性ペプチドで刺激して誘導した CTL の標的細胞としては前立腺がん細胞株 PC93 およびこの細胞に HLA-A2 遺伝子を導入して樹立した PC93-A2 細胞株を用いた。対照として HLA-A2 陽性の末梢血由来 PHA 芽球化細胞を用いた。各ペプチドの終濃度が 40 μ g/mL になるようにそれぞれの標的細胞 (2x10⁵ cells/mL, 50 μ L/well) とともに 96 穴平底プレートに加え、2 時間、37°C で培養後、エフェクター細胞を加えた。37°C、18 時間培養後、上精中の IFN- γ を測定する。さらに、細胞傷害活性は標的細胞を ⁵¹Cr で標識し、定法により測定した。

遺伝子解析：ペプチド配列のホモロジー検索、および遺伝子の発現情報は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のホームページ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) により解析した。

リアルタイムPCR：遺伝子発現はABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて遺伝子を増幅して行った (Heid CA, 等. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996, 6, 986-994.)。全量が 12.5 μ l になるように、目的の cDNA と 1X TaqMan Master mix (Applied Biosystems、および 1.25 μ l のプライマーおよびプローブを混ぜてリアルタイムPCRを行った。プライマーと TaqMan プローブは Applied Biosystems (Assay ID#: Hs00229692) より購入した。PCR は 50°C で 2 min、95°C で 10 min、40 サイクル、および アニーリングは 60°C で 1 分間の条件で行った。RNAs の抽出は RNA-Bee RNA isolation

reagent (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX) で説明書どおり行った。正常脳組織由来のトータル RNAはSawaday Technology (Tokyo, Japan)より購入した。mRNA のcomplimentary DNA (cDNA) はそれぞれ5 µg のトータル RNAよりSuperScript Preamplification System (Invitrogen) を用いて説明書に準じて行った。

(倫理面への配慮)

- 1) 本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当しない。
- 2) 本研究で用いた SARS-CoV 非感染者からの採血は久留米大学の倫理審査委員会で承認を得たのち、本研究者 (医師) が研究協力者とともに被験者に対して十分な説明を行った上で、文書での自由意志による同意 (インフォームド・コンセント) を得て実施した。
- 3) 血清中の抗体の解析を目的として採血する場合は、本研究分担者ら及び他の研究協力医が直接患者に充分時間をとってその目的を説明し、理解と同意の得られた場合に限り採血して研究に供した。

C. 研究結果

- 1) 昨年度同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の3種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立

リコンビナントタンパク質を用いた SARS 迅速診断法開発のための基礎検討:

リコンビナントタンパク質 (S1-N, MW37kD; S1-C, MW35kD; S791, MW30kD; S2, MW30kD) は切替分担研究者が作成したものを、本研究にも用いた。ウサギ抗 S791 ペプチド抗体は、昨年度の本研究で作製したものを用いた。各ペプチドを段階希釈しナイロン膜にスポットして固定し、S791-805 ペプチドで免疫したウサギ抗血清、その後ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG を反応させた後、ECL で検出した。陰性コントロールとしては別のペプチドを免疫して得られた抗血清を用いた。

S791 リコンビナントタンパク質 (アミノ酸 791-1071) は高濃度でのみスポットが検出された (図 1)。しかしながら、本来認識しないと考えられる S1 リコンビナントタンパク質 (アミノ酸 1-331) が強く認識されたこと、およびいずれのリコンビナントタンパク質も水系溶媒に難溶性であるため、イムノクロマト用のゴールド、あるいはプラスチックビーズに固相化するのが困難で

あることが分かった。

中国における SARS-CoV 初期感染者血清中抗体の測定

中国における感染者血清中の S791 および N161 ペプチドに対する抗体を ELISA で測定した (Dr. Xiyun Yan; Chinese Academy of Science, Institute of Biophysics との共同研究)。健常人の平均値 (0.011) の3倍の値 (0.033) をカットオフ値にすると、S791 に対する抗体は、急性期患者血清で高率 (14 例中 14 例: 100%) に検出された (図 2) が、N161 に対する抗体は 42.4% (184 例中 81 例) と、感染 6 ヶ月後血清とほぼ同じ結果が得られた (表 1)。

- 2) 患者抗体が認識する T 細胞エピートープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用の検討

K532-74 ペプチドとホモロジーを有するペプチドを含む遺伝子

そこで、K532-74 ペプチド配列と相同性のあるペプチドを有する自己抗原を検索したところ hypothetical protein Ca019.1430 [Candida albicans SC5314] (XP_711557.1) と 10 アミノ酸中 7 アミノ酸 (FYFTNDV) が一致した。Candida albicans は酵母の形態をした二倍体無性生殖真菌でヒトに対して日和見感染を起こすことが知られている。過剰増殖するとカンジダ症の原因となるものの、通常は無害で、約 80% のヒトの口や胃腸壁に存在する。その他、NADH-ubiquinone oxidoreductase chain G [Helicobacter pylori HPAG1] (ABF85277.1) (YLTYFTND 一致)、SRGAP3 protein [Homo sapiens] (AAH39300.1) (FYFTN***DV 一致)、KIAA1864 protein [Homo sapiens] (BAB47493.1) (FYF*NDV 一致)、SLC38A3 [Homo sapiens] (CAG33251.1) (YLTFY**N*V 一致)、SLC38A5 protein [Homo sapiens] (AAH27721.1) (YLTFY 一致)、JAK1 protein [Homo sapiens] (AAH62431.1) (FYFTN 一致)、Sorting nexin 13 [Homo sapiens] (AAH45667.1) (YLTFY 一致)、Titin [Homo sapiens] (CAD12456.1) (YFTN*V 一致) などが一部相同性のあることが分かった。

K532-74 ペプチドとホモロジーを有するペプチドを含む遺伝子発現の定量実験

これらの遺伝子のうち、SLC38A3、SRGAP3、Sorting nexin 13、JAK1 についてはリアルタイム PCR で正常脳組織および 3 種類の脳腫瘍由来細胞

株の RNA の発現量を調べた。もちいた total RNA の量は、すべて 40ng/reaction を用いた。normal Brain RNA は clontech より購入した。Standard は Plasmid を使用。Olasmid は、PCR rproduct を pGEM-T easy kit (promega) でクローニングして作った。real-time PCR は、TAKARA の Syber Green のシステムを使用した。その結果 SLC38A3:SRGAP3:正常組織と癌細胞では、正常組織の方に発現が高く、Sorting nexin 13:正常組織と癌細胞では、発現差はあまりない事がわかった(表 2)。

ちなみにハウスキーピング遺伝子の NADH 以外のこれらの遺伝子の発現はデータベース上での検索の結果以下のようにになっていた。すなわち、KIAA1864 が脳、筋肉、精巣、germ cell tumor などごく一部の組織、SLC38A3 が膀胱、脳、結合組織、眼、心臓、腎臓など限られた組織に発現している以外は、ユビキタスに発現する(表 3)。

Expression profile suggested by analysis of EST counts.

1. Hs. 207538- JAK1: Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)
2. Hs. 535451- HYDIN: Hydrocephalus inducing homolog (mouse)
4. Hs. 76460- SLC38A3: Solute carrier family 38, member 3
5. Hs. 585343- SNX13: Sorting nexin 13
6. Hs. 571101- SRGAP3: SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3

K532-74 ペプチドの T 細胞活性化能

そこで、K532-74 ペプチドで SARS-CoV 非感染者末梢血リンパ球を刺激し、T 細胞活性化能があるかどうか検討した。

K532-74 で健常人末梢血リンパ球を刺激したところ、SARS 感染がないにもかかわらず前立腺がん 9 例中 6 例 (50FIU 以上を陽性とした) で T 細胞が活性化され IFN- γ 産生が認められた(表 4)。

K532-74 ペプチドの細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導能

前立腺患者末梢血リンパ球を K532-74 ペプチドで刺激し誘導された細胞傷害活性の典型例を以下の図に示した。前立腺がん細胞株 PC93 (HLA-A2 陰性) および同種細胞に HLA-A2 遺伝子を導入したステイブル・トランスフェクタント細胞株 PC93-A2 を標的細胞としてクロム遊離反応試験を行ったところ有意にトランスフェクタント細胞

が傷害されたことにより、K532-74 ペプチドを認識する CTL が、SARS-CoV 非感染細胞を傷害することが分かった(図 3)。

健常人末梢リンパ球を用いた同様の実験において、8 例中 5 例で HLA-A2 陽性リンパ芽球および HLA-A2 陰性 PC93 に比べて HLA-A2 陽性 PC93 A2 に対する細胞傷害活性が有意に高い CTL が誘導された(図 4)。

別の前立腺患者末梢血からは、やはり同じく HLA-A2 拘束性に細胞傷害活性を有する CTL 活性が証明されたが、別の陰性コントロールに用いた HLA-A2 陽性 PHA 刺激リンパが球化細胞に対しても傷害活性が認められた(図 5)。自己抗原由来のペプチドで刺激して誘導された多くの細胞傷害性 T 細胞ががん細胞を MHC 拘束性に傷害することをこれまで報告してきたが、これらの CTL は通常抗原を発現している正常細胞に対する細胞傷害活性は無い。この現象の機序に関しては、おそらく正常細胞での発現量のがん細胞よりも低いために T 細胞が認識するに至らない (T 細胞は 100 個以上細胞表面に提示されないと活性化されない) ためだと考えられる。あるいは、正常細胞が攻撃から免れる何らかの別の機序があるのかもしれない。

しかしながら、これらの経験に反し、SARS-CoV 由来のペプチドで刺激して誘導された CTL ががん細胞のみならず正常細胞に対しても傷害活性が認められたことは、SARS-CoV 感染者の一部で重篤な自己免疫様肺炎と関連する可能性が考えられた。

D. 考察

はじめに、昨年度までに同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立を目的に研究を行った。

ルミネックス法による感染後 6 ヶ月後に採血した血清中の 3 種類のペプチドに対する抗体は、それぞれ S791 が 51%、M207 が 60%、および N161 が 41%であることを初年度に報告した。そこで本年度、感染初期における抗体の産生を中国人の患者血清で測定した(共同研究)ところ、S791 に対する抗体は 14 例中 14 例が陽性であることが確認された。N161 に対する抗体は約 42%と、6 ヶ月後採血のベトナム人患者の結果とほぼ同じだった。すなわち、エピトープによって患者の免疫応答の違いが確認されたことから、これらの抗体の産生と患者の発症時の病態や回復過程などと関連を解

析することは重要だと考えられた。

イムノクロマト法による迅速診断に関して、ペプチド抗原は簡単に合成できる低分子であることから、高純度な抗原を大量に合成できる、精製に融合タンパク質の場合のようにバクテリアなどの混入がない、あるいは高分子タンパク質で起こる高次構造の変化(変性)などを考慮する必要が無いと高い技術が必要ない、などの利点がある。また、イムノクロマト法は特殊な設備が無いところでも迅速に測定できるという長所がある。しかしながら、感染初期の血清を用いた S791 に対する抗体検査においても 80%の陽性率であり、20%は擬陽性と判定される。従って、単独のエピトープ抗原での検査は不十分である可能性が示唆された。一方、同じペプチドを用いたルミネックスによる測定では高い測定値を示すにもかかわらず、本法では検出されなかった場合もあり、その理由は現時点では不明である。従って、複数のエピトープペプチドを組み合わせた抗原を用いる、スパーサーを介する結合、キャリアーに結合させた後固相化するなどの検討が必要と思われる。

本年度は、分担研究者の切替が別の研究班の研究成果として SARS-CoV 断片のいくつかのリコンビナントタンパク質を作成することに成功したことから、これらのタンパク抗原を用いたイムノクロマト法の作製の可能性を探る研究を試みた。しかしながら、抗 S791 ウサギ抗血清を用いた実験で、全く異なる領域のリコンビナントタンパク質 (S1, 1-331) と強い交差反応が見られたこと、およびいずれも水系緩衝液に難溶性だったことから測定系のビーズへの固相化が解決せず、本年度内での開発ができなかった。

ルミネックスによるフローメトリー法およびイムノクロマト法は、ともにプラスチックあるいはゴールドなどの固相に抗原物質を共有結合させることにより作成したビーズを用いる。特にペプチドを抗原として用いる場合は立体障害、安定性、などに気をつけなければならないことが分かった。診断のための検査法としては、ウイルス遺伝子の検出や特異抗体を用いたウイルスの検出、あるいはリコンビナントタンパクを用いた抗体の測定法など考えられるが、いずれも開発に時間がかかると同時に設備、コストなどの問題もある。本法は遺伝子配列が分かった時点でペプチドを網羅的に合成し、フローメトリー法で一挙にエピトープペプチドを同定することができることから、今後、新興・再興感染症の検査法を開発する際に応用可能であると考えられる。また、MHC 拘

束性ペプチドによって誘導した T 細胞の解析を行うことにより、ペプチドワクチンの開発あるいは SARS-CoV 感染に特徴的な自己免疫性肺炎の病態解明の手段としたい。

次に、患者抗体が認識する T 細胞エピトープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用を検討することを目的として研究を行った。

昨年度の本研究で、健常人および SARS-CoV 感染者の両者の血清中に、HLA-A2 拘束性ペプチド K532-74 (YLTFyFTNDV, CDS1 にコードされる HLA-A2 拘束性ペプチド) を認識する IgG 抗体が高頻度に存在することが分かった。このペプチドのアミノ酸配列はウイルス由来であり、もともと非感染者では免疫応答が起こるはずがない。一方、SARS-CoV 感染者の一部は一定期間後重篤な肺の炎症のため致死率の高いことが知られている。そして、この肺炎に対しては免疫抑制性のステロイド剤が効果のあることが報告されている。このことから、我々は SARS ウイルス感染がきっかけとなり、自己免疫応答が起こり交差性の抗体および T 細胞の誘導が起こるためではないかという仮説を立てた。

T 細胞エピトープ同定を目的に、HLA-A2 および A24 結合性ペプチド 340 種類のうち、血清抗体が認識する 12 種類のペプチドを同定した。そのうち 9 種類のペプチドで日本人健常人末梢血からの T 細胞誘導が確認された。これらのペプチドの中には他の微生物とのシーケンスホモロジーを有するペプチドがあることが判明した。SARS 由来断片ペプチドに対する抗体や CTL 前駆細胞の存在意義の解析、さらに、感染患者末梢血からの CTL 誘導能を有するペプチドの同定を行う必要がある。

これらの誘導された T 細胞の解析はまだ十分ではないが、HLA-A2 結合性の SARS 由来ペプチド (K532-74) により誘導された CTL の細胞傷害活性の一例では、HLA-A2 を持っていない前立腺がん細胞株に対しては細胞傷害活性を示さないのに対して、HLA-A2 を発現させた同じ細胞株に対しては有意な細胞傷害活性を示した。このことは、SARS 由来ペプチドで誘導した CTL が、おそらく相同性の高いペプチド配列を持つ分子を細胞が持っている可能性を示唆している。さらに、HLA-A2 陽性の PHA 刺激正常細胞に対してもまた傷害活性を有していることが分かった。このことは、SARS 患者の一部で重篤な自己免疫性の肺炎症状を起こすメカニズムと関連している可能性があるの

ではないかと考え、今後慎重に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. 論文発表 (英文査読誌掲載論文)

なし

1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)

なし

1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)

なし

1-4. 論文発表 (著書)

なし

2. 学会発表

2-1. 海外学会発表 (口頭・ポスター発表)

なし

2-2. 国内学会発表 (口頭・ポスター発表)

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

リコンビナントタンパク質による SARS 抗体測定法のための基礎検討

分担研究者 笹月 健彦 国立国際医療センター総長

研究要旨：【研究目的】本研究は、昨年度同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立を目的として研究を行った。【実験結果】迅速診断開発：昨年度開発した S791 ペプチドに対する抗体のイムノクロマトを用いた迅速検出法により SARS 初期感染患者血清では約 80%が陽性だったが、残りの 20%はルミネックスで高値のものも含めて検出できなかった。そこで、本年度は切替らがリコンビナントタンパク質の作成に成功したことから、これらの抗原のイムノクロマトへの応用可能性についても検討した。しかし、強い交差反応性が認められたこと、難溶解性のため測定系の構築が困難であることが判明した。さらに、中国との共同研究により中国人急性期感染者の結成での測定を行った。【考察】本年度は、SARS 急性期患者血清を入手し、診断キットの精度を検証する予定だったが、新たな感染の拡大が無かったため新規測定は行わなかった。しかし、S791 に対する抗体が本年度の中国との共同研究で急性期患者血清では高率に検出できることが分かった。さらに、検出感度を上げるべくリコンビナントタンパク質を用いて測定形の改良のための基礎検討を行ったが、特異性の問題およびビーズへの固相化の技術的問題があることが分かった。

A. 研究目的

本研究は、1) 昨年度同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立、2) 患者抗体が認識する T 細胞エпитープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用を検討することを目的として研究を行った。

B. 材料および研究方法

血液

ペプチド刺激による細胞傷害性 T 細胞の誘導実験に用いる非感染者末梢血はインフォームドコンセントを採った上で採血した。

ペプチド

SARS-CoV のゲノム遺伝子配列 (Accession AY278488.2) からウイルス遺伝子がコードするタンパク由来ペプチド (HLA-A2 および-A24 拘束性) 由来の 9~10mer ペプチドをそれぞれ 227 および 113 種類 (合計 340 種類)、純度 70%以上で合成したペプチドでスクリーニングした結果得られたものの中から、本年度は K532-74 ペプチドに特化し純度 90%以上で再合成した。抗体の反応性、特異性などの確認および非感染者末梢血からの

CTL 誘導実験を行った。

リコンビナントタンパク質

切替分担研究者が作成したもの (S1-N, MW37kD; S1-C, MW35kD; S791, MW30kD; S2, MW30kD) を、本研究にも用いた。

ウサギ抗ペプチド抗体

リコンビナントタンパク質の解析には、昨年度作成したウサギ抗 S791 抗血清を用いた。作成法は、S791 ペプチドを KLH(キャリアタンパク: Imject Immunogen EDC Conjugation Kit with mcKLH, Rockford, IL) に結合させてウサギに免疫した。すなわち、①2mg mcKLH を 200 μ L の脱イオン水に溶かす。②2mg のペプチドを Conjugation Buffer (0.1M MES, 0.9M NaCl, 0.02% Na₂S₂O₅, pH4.7) に溶かす。③500 μ L のペプチド溶液を 200 μ g キャリアタンパク溶液に加える。④EDC 1vial を 1mL の脱イオン水に溶かし、この溶液 50 μ L をキャリア・ペプチド溶液に直ちに加える。⑤室温で 2 時間静置する。⑥透析により、Na₂S₂O₅ および Conjugation Buffer を除く。⑦280nm における吸光度を測定してペプチド-KLH 複合体の濃度を決める。また、ウサギへの免疫は、①MPL + TDM Emulsion, R700 [アジュバント: RIBI Adjuvant

system (RAS) (RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT)]に、KLH(キャリアタンパク)–ペプチド複合体溶液を2mL入れ、37°C恒温槽で暖めて乳濁液を作成した。②100μLずつ、背中6カ所に毎週、10回以上皮内注射する。③免疫ウサギ耳朶より抗体測定のために採血した。

ウエスタンブロット解析：各種リコンビナントタンパク質はSDS-ゲル電気泳動で分離し、ナイロン膜に転写した後ウサギ抗血清を一次抗体、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG血清を二次抗体として抗原を検出した。検出は化学発光で行った。また、ドットブロット解析も電気泳動以外は同様に行った。

抗体の測定 (中国の研究室との共同研究)

感染初期患者血清でのN161とS791に対する抗体の測定をELISAで行った。測定条件は30 μg/well peptideでELISAマイクロプレートを固相化し、血清試料は100倍希釈、二次抗体はホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgGを2000倍希釈で用いて測定した。

C. 研究結果

1) 昨年度同定したSARSウイルス構成タンパク質由来の3種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立

リコンビナントタンパク質を用いたSARS迅速診断法開発のための基礎検討：

リコンビナントタンパク質(S1-N, MW37kD; S1-C, MW35kD; S791, MW30kD; S2, MW30kD)は切替分担研究者が作成したものを、本研究にも用いた。ウサギ抗S791ペプチド抗体は、昨年度の本研究で作製したものを用いた。各ペプチドを段階希釈しナイロン膜にスポットして固定し、S791-805ペプチドで免疫したウサギ抗血清、その後ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGを反応させた後、ECLで検出した。陰性コントロールとしては別のペプチドを免疫して得られた抗血清を用いた。

S791リコンビナントタンパク質は高濃度でのみスポットが検出された(図1)。しかしながら、本来認識しないと考えられるS1リコンビナントタンパク質が強く認識されたこと、およびいずれのリコンビナントタンパク質も水系溶媒に難溶性であるため、イムノクロマト用のゴールド、あるいはプラスチックビーズに固相化するのが困難であることが分かった。

中国におけるSARS-CoV初期感染者血清中抗体の

測定

中国における感染者血清中のS791およびN161ペプチドに対する抗体をELISAで測定した(Dr. Xiyun Yan; Chinese Academy of Science, Institute of Biophysicsとの共同研究)。健常人の平均値(0.011)の3倍の値(0.033)をカットオフ値にすると、S791に対する抗体は、急性期患者血清で高率(16例中16例：100%)に検出された(図2)が、N161に対する抗体は42.4%(184例中81例)と、感染6ヵ月後血清とほぼ同じ結果が得られた(表1)。

D. 考察

2003年に中国を中心に、世界的に広まったSARS-CoVの感染は、その後急速に沈静化された。しかしながら、トリインフルエンザの脅威など、新興・再興感染症に対する備えはいまだ十分ではないと考えられる。

このような状況下、昨年度同定したSARSウイルス構成タンパク質由来の3種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立を目的に研究を行った。本年度は、新たな患者が発生した場合、血清を入手して本研究で開発したルミネックス法およびイムノクロマト法での測定を行い、精度の確認を行う予定であったが、幸い感染拡大は発生しなかったため新規測定は行わなかった。

ルミネックス法による感染後6ヶ月後に採血した血清中の3種類のペプチドに対する抗体は、それぞれS791が51%、M207が60%、およびN161が41%であることを初年度に報告した。そこで本年度、感染初期における抗体の産生を中国人の患者血清で測定した(共同研究)ところ、S791に対する抗体は14例中14例が陽性であることが確認された。N161に対する抗体は約42%と、6ヵ月後採血のベトナム人患者の結果とほぼ同じだった。すなわち、エピトープによって患者の免疫応答の違いが確認されたことから、これらの抗体の産生と患者の発症時の病態や回復過程などに関連を解析することは重要だと考えられた。

イムノクロマト法による迅速診断に関して、ペプチド抗原は簡単に合成できる低分子であることから、高純度な抗原を大量に合成できる、精製に融合タンパク質の場合のようにバクテリアなどの混入がない、あるいは高分子タンパク質で起こる高次構造の変化(変性)などを考慮する必要が無い場合高い技術が必要ない、などの利点がある。また、イムノクロマト法は特殊な設備が無い

ところでも迅速に測定できるという長所がある。しかしながら、感染初期の血清を用いた S791 に対する抗体検査においても 80%の陽性率であり、20%は擬陽性と判定される。従って、単独のエピトープ抗原での検査は不十分である可能性が示唆された。一方、同じペプチドを用いたルミネックスによる測定では高い測定値を示すにもかかわらず、本法では検出されたに場合もあり、その理由は現時点では不明である。従って、複数のエピトープペプチドを組み合わせた抗原を用いる、スパーサーを介する結合、キャリアーに結合させた後固相化するなどの検討が必要と思われる。

本年度は、分担研究者の切替が別の研究班の研究成果として SARS-CoV 断片のいくつかのリコンビナントタンパク質を作成することに成功したことから、これらのタンパク抗原を用いたイムノクロマト法の作製の可能性を探る研究を試みた。しかしながら、抗 S791 ウサギ抗血清を用いた実験で、全く異なる領域のリコンビナントタンパク質 (S1, 1-331) と強い交差反応が見られたこと、およびいずれも水系緩衝液に難溶性だったことから測定系のビーズへの固相化が解決せず、本年度内での開発ができなかった。S1-N, S791 リコンビナントタンパク質以外に S1-C, S2 リコンビナントタンパク質の生成にも成功しており、それぞれのリコンビナントタンパク質を免疫した抗体もすでに作成している。さらに、これらの抗体を用いたウエスタンブロット解析(データは示していない)で、それぞれ特異的に検出されることを確認している。また、治療目的でヒト型中和抗体の開発も行っており、これらの抗体を用いた抗原ウイルスの測定系の開発も、本研究における基礎検討を踏まえて開発できる可能性が示された。

ルミネックスによるフローメトリー法およびイムノクロマト法は、ともにプラスチックあるいはゴールドなどの固相に抗原物質を共有結合させることにより作成したビーズを用いる。特にペプチドを抗原として用いる場合は立体障害、安定性、などに気をつけなければならないことが分かった。診断のための検査法としては、ウイルス遺伝子の検出や特異抗体を用いたウイルスの検出、あるいはリコンビナントタンパクを用いた抗体の測定法など考えられるが、いずれも開発に時間がかかると同時に設備、コストなどの問題もある。本法は遺伝子配列が分かった時点でペプチドを網羅的に合成し、フローメトリー法で一挙にエピトープペプチドを同定することができることから、今後、新興・再興感染症の検査法を開発する

際に応用可能であると考えられる。また、MHC 拘束性ペプチドによって誘導した T 細胞の解析を行うことにより、ペプチドワクチンの開発あるいは SARS-CoV 感染に特徴的な自己免疫性肺炎の病態解明の手段としたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. 論文発表 (英文査読誌掲載論文)
なし

1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)
なし

1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)
なし

1-4. 論文発表 (著書)
なし

2. 学会発表

2-1. 海外学会発表 (口頭・ポスター発表)
なし

2-2. 国内学会発表 (口頭・ポスター発表)
なし

I. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

SARS（重症急性呼吸器症候群）由来分子の T 細胞エピトープの解析

分担研究者 七條 茂樹 久留米大学医学部助教授

研究要旨：【研究目的】本研究は、患者抗体が認識する T 細胞エピトープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用を検討することを目的として行った。【実験結果】 T 細胞エピトープの同定：昨年度までの本研究で HLA 拘束性ペプチド候補 340 種類の合成ペプチドに対する血清中の各ペプチドに対する抗体価を測定し、非感染者および感染者に反応の認められる 12 種類のペプチドを選択し、このうち 9 種類のペプチドが CTL 誘導能を有することが分かった。そこで本年度は、申請時に一部計画変更し、感染者および非感染者ともに抗体価の高い K532-74 ペプチドに焦点を当てて解析した。このペプチドは非感染者末梢血を刺激することにより細胞傷害活性を有する T 細胞 (CTL) を誘導できることが分かった。その理由として、SARS 以外の微生物に対する免疫応答、あるいは自己抗原に対する免疫応答がすでに起こっており、これらに対する交差反応性の抗体あるいは CTL 活性を見ている可能性が示唆された。そこで、タンパク質データベースで検索したところ、日和見感染などの原因真菌やヒトでユビキタスに発現している自己抗原分子と相同性のあることが分かった。また、実際リアルタイム PCR でこれらの遺伝子の正常脳組織や脳腫瘍細胞株で発現が検出された。【考察】、SARS-CoV 遺伝子がコードするペプチドの一つが、非感染者末梢血リンパ球から細胞傷害性 T 細胞を誘導し、非感染細胞を傷害することを明らかにした。また、稀ではあるものの正常細胞に対する傷害活性を示す CTL の誘導も確認した。このことから、感染者の一部で重篤な肺炎へ移行する機序の一つとして、その可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究は、1) 昨年度までに同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立、2) 患者抗体が認識する T 細胞エピトープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用を検討することを目的として行い、主に 2) の「ペプチドによって誘導される細胞傷害性 T 細胞の解析」を中心に分担した。

B. 材料および研究方法

血液

ペプチド刺激による細胞傷害性 T 細胞の誘導実験に用いる非感染者末梢血はインフォームドコンセントを採った上で採血した。

ペプチド

SARS-CoV のゲノム遺伝子配列 (Accession AY278488.2) からウイルス遺伝子がコードするタ

ンパク由来ペプチド (HLA-A2 および A24 拘束性) 由来の 9~10mer ペプチドをそれぞれ 227 および 113 種類 (合計 340 種類)、純度 70%以上で合成したペプチドでスクリーニングした結果得られたものの中から、本年度は K532-74 ペプチドに特化し純度 90%以上で再合成した。抗体の反応性、特異性などの確認および非感染者末梢血からの CTL 誘導実験を行った。

K532-74 刺激で誘導した CTL の解析

①末梢血単核球からの CTL 誘導：陰性及び陽性コントロールのペプチド (最終濃度：10 μ g/mL) とともに、健康人 8 名および前立腺がん患者 9 名の末梢血から分離した単核球細胞 (1 x 10⁶/well) を 96 穴マイクロプレートに入れ、5%CO₂ インキュベーター内で培養する。培養には 45%AIM-V、MEM non essential amino acid solution、7.5 x 10⁴ units/mL IL-2、40mg/Amp/mL ゲンタマイシンを含む 45%RPMI 1640、および 10%FCS の組成の培養液を用いた。

2倍濃度のペプチドが入った上記培養液で3日おきに培養上精の半量を交換する操作を4~5回繰り返して培養を継続し、13日目にペプチドを入れない培養液で上記操作を行う。

②CTL 活性測定のエフェクター細胞の調整：IL-2 添加培養液を無添加 10%FCS/RPMI 1640 倍溶液に交換し、以下の実験に用いる。

③活性化リンパ球測定：CTL 活性は IFN- γ 産生を指標に検出する。産生 IFN- γ 濃度測定は ELISA 法で行う。HLA-A2 拘束性ペプチドで刺激して誘導した CTL の標的細胞としては前立腺がん細胞株 PC93 およびこの細胞に HLA-A2 遺伝子を導入して樹立した PC93-A2 細胞株を用いた。対照として HLA-A2 陽性の末梢血由来 PHA が休眠細胞を用いた。各ペプチドの終濃度が 40 μ g/mL になるようにそれぞれの標的細胞 (2 \times 10⁵ cells/mL, 50 μ L/well) とともに 96 穴平底プレートに加え、2 時間、37 $^{\circ}$ C で培養後、エフェクター細胞を加えた。37 $^{\circ}$ C、18 時間培養後、上精中の IFN- γ を測定する。さらに、細胞傷害活性は標的細胞を ⁵¹Cr で標識し、定法により測定した。

遺伝子解析：ペプチド配列のホモロジー検索、および遺伝子の発現情報は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のホームページ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) により解析した。

リアルタイムPCR：遺伝子発現はABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて遺伝子を増幅して行った (Heid CA, 等. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996, 6, 986-994.)。全量が 12.5 μ l になるように、目的の cDNA と 1X TaqMan Master mix (Applied Biosystems、および 1.25 μ l のプライマーおよびプローブを混ぜてリアルタイムPCRを行った。プライマーと TaqMan プローブは Applied Biosystems (Assay ID#: Hs00229692) より購入した。PCR は 50 $^{\circ}$ C で 2 min、95 $^{\circ}$ C で 10 min、40 サイクル、およびアニーリングは 60 $^{\circ}$ C で 1 分間の条件で行った。RNAs の抽出は RNA-Bee RNA isolation reagent (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX) で説明書どおり行った。正常脳組織由来のトータル RNA は Sawaday Technology (Tokyo, Japan) より購入した。mRNA の complimentary DNA (cDNA) はそれぞれ 5 μ g のトータル RNA より SuperScript Preamplification System (Invitrogen) を用いて説明書に準じて行った。

(倫理面への配慮)

- 1) 本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当しない。
- 2) 本研究で用いた SARS-CoV 非感染者からの採血は久留米大学の倫理審査委員会で承認を得たのち、本研究 (医師) が研究協力者とともに被験者に対して十分な説明を行った上で、文書での自由意志による同意 (インフォームド・コンセント) を得て実施した。
- 3) 血清中の抗体の解析を目的として採血する場合は、本研究分担者ら及び他の研究協力医が直接患者に充分時間をとってその目的を説明し、理解と同意の得られた場合に限って採血して研究に供した。

C. 研究結果

患者抗体が認識する T 細胞エピートープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用の検討

K532-74 ペプチドとホモロジーを有するペプチドを含む遺伝子

そこで、K532-74 ペプチド配列と相同性のあるペプチドを有する自己抗原を検索したところ hypothetical protein Ca019.1430 [Candida albicans SC5314] (XP_711557.1) と 10 アミノ酸中 7 アミノ酸 (FYFTNDV) が一致した。Candida albicans は酵母の形態をした二倍体無性生殖真菌でヒトに対して日和見感染を起こすことが知られている。過剰増殖するとカンジダ症の原因となるものの、通常は無害で、約 80% のヒトの口や胃腸壁に存在する。その他、NADH-ubiquinone oxidoreductase chain G [Helicobacter pylori HPAG1] (ABF85277.1) (YLT*YFTND 一致)、SRGAP3 protein [Homo sapiens] (AAH39300.1) (FYFTN***DV 一致)、KIAA1864 protein [Homo sapiens] (BAB47493.1) (FYF*NDV 一致)、SLC38A3 [Homo sapiens] (CAG33251.1) (YLTFY**N*V 一致)、SLC38A5 protein [Homo sapiens] (AAH27721.1) (YLTFY 一致)、JAK1 protein [Homo sapiens] (AAH62431.1) (FYFTN 一致)、Sorting nexin 13 [Homo sapiens] (AAH45667.1) (YLTFY 一致)、Titin [Homo sapiens] (CAD12456.1) (YFTN*V 一致) などが一部相同性のあることが分かった。

K532-74 ペプチドとホモロジーを有するペプチドを含む遺伝子発現の定量実験

これらの遺伝子のうち、SLC38A3、SRGAP3、

Sorting nexin 13、JAK1 についてはリアルタイム PCR で正常脳組織および 3 種類の脳腫瘍由来細胞株の RNA の発現量を調べた。もちいた total RNA の量は、すべて 40ng/reaction を用いた。normal Brain RNA は clontech より購入した。Standard は Plasmid を使用。Olasmid は、PCR rproduct を pGEM-T easy kit (promega) へクローニングして作った。real-time PCR は、TAKARA の Syber Green のシステムを使用した。その結果 SLC38A3:SRGAP3:正常組織と癌細胞では、正常組織の方に発現が高く、Sorting nexin 13:正常組織と癌細胞では、発現差はあまりない事がわかった(表 2)。

ちなみにハウスキーピング遺伝子の NADH 以外のこれらの遺伝子の発現はデータベース上での検索の結果以下ようになっていた。

Expression profile suggested by analysis of EST counts.

1. Hs. 207538- JAK1: Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)
2. Hs. 535451- HYDIN: Hydrocephalus inducing homolog (mouse)
4. Hs. 76460- SLC38A3: Solute carrier family 38, member 3
5. Hs. 585343- SNX13: Sorting nexin 13
6. Hs. 571101- SRGAP3: SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3

すなわち、KIAA1864 が脳、筋肉、精巣、germ cell tumor などごく一部の組織、SLC38A3 が膀胱、脳、結合組織、眼、心臓、腎臓など限られた組織に発現している以外は、ユビキタスに発現する(表 3)。

K532-74 ペプチドの T 細胞活性化能

そこで、K532-74 ペプチドで SARS-CoV 非感染者末梢血リンパ球を刺激し、T 細胞活性化能があるかどうか検討した。

K532-74 で健常人末梢血リンパ球を刺激したところ、SARS 感染がないにもかかわらず前立腺がん 9 例中 6 例 (50FIU 以上を陽性とした) で T 細胞が活性化され IFN- γ 産生が認められた(表 4)。

K532-74 ペプチドの細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導能

前立腺患者末梢血リンパ球を K532-74 ペプチドで刺激し誘導された細胞傷害活性の典型例を以下の図に示した。前立腺がん細胞株 PC93 (HLA-A2 陰性) および同種細胞に HLA-A2 遺伝子を導入したステイブル・トランスフェクタント細胞株 PC93-A2 を標的細胞としてクロム遊離反応試験を

行ったところ有意にトランスフェクタント細胞が傷害されたことにより、K532-74 ペプチドを認識する CTL が、SARS-CoV 非感染細胞を傷害することが分かった(図 3)。

健常人末梢リンパ球を用いた同様の実験において、8 例中 5 例で HLA-A2 陽性リンパ球および HLA-A2 陰性 PC93 に比べて HLA-A2 陽性 PC93 A2 に対する細胞傷害活性が有意に高い CTL が誘導された(図 4)。

別の前立腺患者末梢血からは、やはり同じく HLA-A2 拘束性に細胞傷害活性を有する CTL 活性が証明されたが、正常細胞のコントロールに用いた HLA-A2 陽性 PHA 刺激リンパが球化細胞に対しても傷害活性が認められた(図 5)。自己抗原由来のペプチドで刺激して誘導された多くの細胞傷害性 T 細胞ががん細胞を MHC 拘束性に傷害することをこれまで報告してきたが、これらの CTL は通常抗原を発現している正常細胞に対する細胞傷害活性は無い。この現象の機序に関しては、おそらく正常細胞での発現量のがん細胞よりも低いために T 細胞が認識するに至らない (T 細胞は 100 個以上細胞表面に提示されないと活性化されない) ためだと考えられる。あるいは、正常細胞が攻撃から免れる何らかの別の機序があるのかもしれない。

しかしながら、これらの経験に反し、SARS-CoV 由来のペプチドで刺激して誘導された CTL ががん細胞のみならず正常細胞に対しても傷害活性が認められたことは、SARS-CoV 感染者の一部で重篤な自己免疫様肺炎と関連する可能性が考えられた。

D. 考察

患者抗体が認識する T 細胞エピートープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用を検討することを目的として研究を行った。

昨年度の本研究で、健常人および SARS-CoV 感染者の両者の血清中に、HLA-A2 拘束性ペプチド K532-74 (YLTFyFTNDV、CDS1 にコードされる HLA-A2 拘束性ペプチド) を認識する IgG 抗体が高頻度に存在することが分かった。このペプチドのアミノ酸配列はウイルス由来であり、もともと非感染者では免疫応答が起こるはずがない。一方、SARS-CoV 感染者の一部は一定期間後重篤な肺炎の炎症のため致死率の高いことが知られている。そして、この肺炎に対しては免疫抑制性のステロイド剤が効果のあることが報告されている。このことから、我々は SARS ウイルス感染がきっかけと

なり、自己免疫応答が起こり交差性の抗体および T 細胞の誘導が起こるためではないかという仮説を立てた。

T 細胞エピトープ同定を目的に、HLA-A2 および -A24 結合性ペプチド 340 種類のうち、血清抗体が認識する 12 種類のペプチドを同定した。そのうち 9 種類のペプチドで日本人健常人末梢血からの T 細胞誘導が確認された。そこで、NCBI のデータベースで検索したところ、これらのペプチドの中には他の微生物あるいはヒトのシーケンスホモロジーを有するペプチドがあることが判明した。このうちのいくつかの遺伝子についてリアルタイム PCR で確認したところ、本研究で相同性があった遺伝子はユビキタスに発現が分布していることが分かった。また、微生物で相同性があった真菌も広く環境中に存在し、日和見感染の原因になっていることから健常人の体内ではすでに免疫応答が起こっている可能性がある。今後 SARS 由来断片ペプチドに対する抗体や CTL 前駆細胞の存在意義の解析、さらに、感染患者末梢血からの CTL 誘導能を有するペプチドの同定を行う必要がある。

これらの誘導された T 細胞の解析はまだ十分ではないが、HLA-A2 結合性の SARS 由来ペプチド (No. 74) により誘導された CTL の細胞傷害活性の一例では、HLA-A2 を持っていない前立腺がん細胞株に対しては細胞傷害活性を示さないのに対して、HLA-A2 を発現させた同じ細胞株に対しては有意な細胞傷害活性を示した。このことは、SARS 由来ペプチドで誘導した CTL が、おそらく相同性の高いペプチド配列を持つ分子を細胞が持っている可能性を示唆している。さらに、HLA-A2 陽性の PHA 刺激正常細胞に対してもまた傷害活性を有していることが分かった。このことは、SARS 患者の一部で重篤な自己免疫性の肺炎症状を起こすメカニズムと関連している可能性があるのではないかと考え、今後慎重に検討する必要がある。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. 論文発表 (英文査読誌掲載論文)
なし

1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)
なし

1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)
なし

1-4. 論文発表 (著書)
なし

2. 学会発表

2-1. 海外学会発表 (口頭・ポスター発表)
なし

2-2. 国内学会発表 (口頭・ポスター発表)
なし

J. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

リコンビナントタンパク質による SARS 診断法の基礎検討

分担研究者 切替 照雄 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨：【研究目的】本研究は、昨年度同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立を目的として行った。【実験結果】迅速診断開発：昨年度開発した S791 ペプチドに対する抗体のイムノクロマトを用いた迅速検出法により SARS 初期感染患者血清では約 80% が陽性だったが、残りの 20% はルミネックスで高値のものも含めて検出できなかった。そこで、本年度はリコンビナントタンパク質の作成に成功したことから、これらの抗原のイムノクロマトへの応用可能性についても検討した。しかし、強い交差反応性が認められたこと、難溶解性のため測定系の構築が困難であることが判明し開発を断念した。昨年度までの本研究で同定した 3 種類のペプチドのうち、N161 と S791 に対する抗体を中国人 SARS-CoV 初期感染患者血清で測定し (Dr. Yan との共同研究) N161 は 42% のよう成立にとどまったが、S791 は測定した検体すべてが陽性だった。【考察】S791 リコンビナントタンパク質は S1 リコンビナントと交差反応するエピトープが含まれる可能性があったこと、および水系溶媒に難溶性であったことから、今後他のリコンビナントタンパク質を用いて測定系の開発を行いたい。また、現在特異抗体の作成を行っていることから、抗体を用いたウイルスの測定形の開発も可能だと思われる。

A. 研究目的

本研究は、1) 昨年度同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立、2) 患者抗体が認識する T 細胞エピトープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用を検討することを目的として行い、主に 1) 迅速診断法の「高感度化のための基礎検討」を分担した。

B. 材料および研究方法

リコンビナントタンパク質

中和抗体作製プロジェクトのために作成したもの (S1-N, MW37kD; S1-C, MW35kD; S791, MW30kD; S2, MW30kD) を、本研究にも用いた。

ウサギ抗ペプチド抗体

リコンビナントタンパク質の解析には、昨年度作成したウサギ抗 S791 抗血清を用いた。作成法は、S791 ペプチドを KLH(キャリアタンパク: Imject Immunogen EDC Conjugation Kit with mcKLH, Rockford, IL) に結合させてウサギに免疫した。すなわち、①2mg mcKLH を 200 μ L の脱イオン水に溶かす。②2mg のペプチドを Conjugation

Buffer (0.1M MES, 0.9M NaCl, 0.02% Na₂S₂O₃, pH4.7) に溶かす。③500 μ L のペプチド溶液を 200 μ g キャリアタンパク溶液に加える。④EDC 1vial を 1mL の脱イオン水に溶かし、この溶液 50 μ L をキャリア・ペプチド溶液に直ちに加える。⑤室温で 2 時間静置する。⑥透析により、Na₂S₂O₃ および Conjugation Buffer を除く。⑦280nm における吸光度を測定してペプチド-KLH 複合体の濃度を決める。また、ウサギへの免疫は、①MPL + TDM Emulsion, R700 [アジュバント: RIBI Adjuvant system (RAS) (RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT)] に、KLH(キャリアタンパク)-ペプチド複合体溶液を 2mL 入れ、37°C 恒温槽で暖めて乳濁液を作成した。②100 μ L ずつ、背中 6 カ所に毎週、10 回以上皮内注射する。③免疫ウサギ耳朶より抗体測定のために採血した。

ウエスタンブロット解析: 各種リコンビナントタンパク質は SDS-ゲル電気泳動で分離し、ナイロン膜に転写した後ウサギ抗血清を一次抗体、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 血清を二次抗体として抗原を検出した。検出は化学発光で行った。また、ドットブロット解析も電気泳動以外は同様に行った。

抗体の測定

感染初期患者血清での N161 と S791 に対する抗体の測定を ELISA で行った。測定条件は 30 µg/well peptide で ELISA ミクロプレートを固相化し、血清試料は 100 倍希釈、二次抗体はホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG を 2000 倍希釈で用いて測定した。

(倫理面への配慮)

- 1) 本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当しない。
- 2) 血清中の抗体の解析を目的として採血する場合は、本研究分担者ら及び他の研究協力医が直接患者に充分時間をとってその目的を説明し、理解と同意の得られた場合に限り採血して研究に供した。

C. 研究結果

昨年度同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立

リコンビナントタンパク質を用いた SARS 迅速診断法開発のための基礎検討:

リコンビナントタンパク質 (S1-N, MW37kD; S1-C, MW35kD; S791, MW30kD; S2, MW30kD) は切替分担研究者が作成したものを、本研究にも用いた。ウサギ抗 S791 ペプチド抗体は、昨年度の本研究で作製したものを用いた。各ペプチドを段階希釈しナイロン膜にスポットして固定し、S791-805 ペプチドで免疫したウサギ抗血清、その後ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG を反応させた後、ECL で検出した。陰性コントロールとしては別のペプチドを免疫して得られた抗血清を用いた。

S791 リコンビナントタンパク質は高濃度でのみスポットが検出された(図 1)。しかしながら、本来認識しないと考えられる S1 リコンビナントタンパク質が強く認識されたこと、およびいずれのリコンビナントタンパク質も水系溶媒に難溶性であるため、イムノクロマト用のゴールド、あるいはプラスチックビーズに固相化するのが困難であることが分かった。

中国における SARS-CoV 初期感染者血清中抗体の測定

中国における感染者血清中の S791 および N161 ペプチドに対する抗体を ELISA で測定した(Dr.

Xiyun Yan; Chinese Academy of Science, Institute of Biophysics との共同研究)。健常人の平均値(0.011)の 3 倍の値(0.033)をカットオフ値にすると、S791 に対する抗体は、急性期患者血清で高率(14 例中 14 例: 100%)に検出された(図 2)が、N161 に対する抗体は 42.4%(184 例中 81 例)と、感染 6 ヶ月後血清とほぼ同じ結果が得られた(表 1)。

D. 考察

昨年度までに同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立を目的に研究を行った。

ルミネックス法による感染後 6 ヶ月後に採血した血清中の 3 種類のペプチドに対する抗体は、それぞれ S791 が 51%、M207 が 60%、および N161 が 41%であることを初年度に報告した。そこで本年度、感染初期における抗体の産生を中国人の患者血清で測定した(共同研究)ところ、S791 に対する抗体は 14 例中 14 例が陽性であることが確認された。N161 に対する抗体は約 42%と、6 ヶ月後採血のベトナム人患者の結果とほぼ同じだった。すなわち、エピトープによって患者の免疫応答の違いが確認されたことから、これらの抗体の産生と患者の発症時の病態や回復過程などと関連を解析することは重要だと考えられた。

イムノクロマト法による迅速診断に関して、ペプチド抗原は簡単に合成できる低分子であることから、高純度な抗原を大量に合成できる、精製に融合タンパク質の場合のようにバクテリアなどの混入がない、あるいは高分子タンパク質で起こる高次構造の変化(変性)などを考慮する必要が無いため高い技術が必要ない、などの利点がある。また、イムノクロマト法は特殊な設備が無いところでも迅速に測定できるという長所がある。しかしながら、感染初期の血清を用いた S791 に対する抗体検査においても 80%の陽性率であり、20%は擬陽性と判定される。従って、単独のエピトープ抗原での検査は不十分である可能性が示唆された。一方、同じペプチドを用いたルミネックスによる測定では高い測定値を示すにもかかわらず、本法では検出されなかった場合もあり、その理由は現時点では不明である。従って、複数のエピトープペプチドを組み合わせた抗原を用いる、スペーサーを介する結合、キャリアーに結合させた後固相化するなどの検討が必要と思われる。

本年度は、切替分担研究者が別の研究班の研究成果として SARS-CoV 断片のいくつかのリコンビナントタンパク質を作成することに成功したことから、これらのタンパク抗原を用いたイムノクロマト法の作製の可能性を探る研究を試みた。しかしながら、抗 S791 ウサギ抗血清を用いた実験で、全く異なる領域のリコンビナントタンパク質 (S1, 1-331) と強い交差反応が見られたこと、およびいずれも水系緩衝液に難溶性だったことから測定系のビーズへの固相化が解決せず、本年度内での開発ができなかった。

S1-N、S791 リコンビナントタンパク質以外に S1-C、S2 リコンビナントタンパク質の生成にも成功しており、それぞれのリコンビナントタンパク質を免疫した抗体もすでに作成している。さらに、これらの抗体を用いたウエスタンブロット解析(データは示していない)で、それぞれ特異的に検出されることを確認している。また、治療目的でヒト型中和抗体の開発も行っており、これらの抗体を用いた抗原ウイルスの測定系の開発も、本研究における基礎検討を踏まえて開発できる可能性が示された。

ルミネックスによるフローメトリー法およびイムノクロマト法は、ともにプラスチックあるいはゴールドなどの固相に抗原物質を共有結合させることにより作成したビーズを用いる。特にペプチドを抗原として用いる場合は立体障害、安定性、などに気をつけなければならないことが分かった。診断のための検査法としては、ウイルス遺伝子の検出や特異抗体を用いたウイルスの検出、あるいはリコンビナントタンパクを用いた抗体の測定法など考えられるが、いずれも開発に時間がかかると同時に設備、コストなどの問題もある。本法は遺伝子配列が分かった時点でペプチドを網羅的に合成し、フローメトリー法で一挙にエピトープペプチドを同定することができることから、今後、新興・再興感染症の検査法を開発する際に応用可能であると考えられる。また、MHC 拘

束性ペプチドによって誘導した T 細胞の解析を行うことにより、ペプチドワクチンの開発あるいは SARS-CoV 感染に特徴的な自己免疫性肺炎の病態解明の手段としたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. 論文発表 (英文査読誌掲載論文)
なし

1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)
なし

1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)
なし

1-4. 論文発表 (著書)
なし

2. 学会発表

2-1. 海外学会発表 (口頭・ポスター発表)
なし

2-2. 国内学会発表 (口頭・ポスター発表)
なし

K. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

中国人急性期感染者血清中ペプチド抗体の測定およびT細胞エピトープの検討

分担研究者 小松 誠和 久留米大学医学部講師

研究要旨：【研究目的】本研究は、1) 昨年度同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立、2) 患者抗体が認識する T 細胞エピトープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用を検討することを目的として研究を行った。【実験結果】1) 迅速診断開発：昨年度までの本研究で同定した 3 種類のペプチドのうち、N161 と S791 に対する抗体を中国人 SARS-CoV 初期感染患者血清で測定し (Dr. Yan との共同研究) N161 は 42% のよう成立にとどまったが、S791 は測定した検体すべてが陽性だった。2) T 細胞エピトープの同定：非感染者および感染者に抗体の認められる 12 種類のペプチドを選択し、このうち 9 種類のペプチドが CTL 誘導能を有することが分かった。本年度は申請時に一部計画変更し、感染者および非感染者ともに抗体価の高い K532-74 ペプチドに焦点を当てて解析した。このペプチドは非感染者末梢血を刺激することにより細胞傷害活性を有する T 細胞 (CTL) を誘導できることが分かった。【考察】S791 に対する抗体が感染後 6 ヶ月採血血清では陽性率が約 50% だったのが、本年度の中国との共同研究で急性期患者血清では高率に検出できることが分かった。また、SARS-CoV 遺伝子がコードするペプチドの一つが、非感染者末梢血リンパ球から細胞傷害性 T 細胞を誘導し、非感染細胞を傷害することを明らかにした。また、稀ではあるものの正常細胞に対する傷害活性を示す CTL の誘導も確認した。このことから、感染者の一部で重篤な肺炎へ移行する機序の解析に重要な可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究は、1) 昨年度同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立、2) 患者抗体が認識する T 細胞エピトープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用を検討することを目的として研究を行った。

B. 材料および研究方法

血液

ペプチド刺激による細胞傷害性 T 細胞の誘導実験に用いる非感染者末梢血はインフォームドコンセントを採った上で採血した。

ペプチド

SARS-CoV のゲノム遺伝子配列 (Accession AY278488. 2) からウイルス遺伝子がコードするタンパク由来ペプチド (HLA-A2 および-A24 拘束性) 由来の 9~10mer ペプチドをそれぞれ 227 および 113 種類 (合計 340 種類)、純度 70% 以上で合成したペプチドでスクリーニングした結果得られ

たものの中から、本年度は K532-74 ペプチドに特化し純度 90% 以上で再合成した。抗体の反応性、特異性などの確認および非感染者末梢血からの CTL 誘導実験を行った。

K532-74 刺激で誘導した CTL の解析

①末梢血単核球からの CTL 誘導：陰性及び陽性コントロールのペプチド (最終濃度：10 μ g/mL) とともに、健常人 8 名および前立腺がん患者 9 名の末梢血から分離した単核球細胞 (1 x 10⁵/well) を 96 穴マイクロプレートに入れ、5%CO₂ インキュベーター内で培養する。培養には 45%AIM-V, MEM non essential amino acid solution, 7.5 x 10⁴ units/mL IL-2, 40mg/Amp/mL ゲンタマイシンを含む 45%RPMI 1640, および 10%FCS の組成の培養液を用いた。

2 倍濃度のペプチドが入った上記培養液で 3 日おきに培養上精の半量を交換する操作を 4~5 回繰り返し替えて培養を継続し、13 日目にペプチドを入れない培養液で上記操作を行う。

②CTL 活性測定のエフェクター細胞の調整：IL-2 添加培養液を無添加 10%FCS/RPMI 1640 倍溶

液に交換し、以下の実験に用いる。

③活性化リンパ球測定: CTL 活性は IFN- γ 産生を指標に検出する。産生 IFN- γ 濃度測定は ELISA 法で行う。HLA-A2 拘束性ペプチドで刺激して誘導した CTL の標的細胞としては前立腺がん細胞株 PC93 およびこの細胞に HLA-A2 遺伝子を導入して樹立した PC93-A2 細胞株を用いた。対照として HLA-A2 陽性の末梢血由来 PHA 芽球化細胞を用いた。各ペプチドの終濃度が 40 μ g/mL になるようにそれぞれの標的細胞 (2 \times 10⁵ cells/mL, 50 μ L/well) とともに 96 穴平底プレートに加え、2 時間、37 $^{\circ}$ C で培養後、エフェクター細胞を加えた。37 $^{\circ}$ C、18 時間培養後、上清中の IFN- γ を測定する。さらに、細胞傷害活性は標的細胞を ⁵¹Cr で標識し、定法により測定した。

(倫理面への配慮)

- 1) 本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当しない。
- 2) 本研究で用いた SARS-CoV 非感染者からの採血は久留米大学の倫理審査委員会で承認を得たのち、本研究者 (医師) が研究協力者とともに被験者に対して十分な説明を行った上で、文書での自由意志による同意 (インフォームド・コンセント) を得て実施した。
- 3) 血清中の抗体の解析を目的として採血する場合は、本研究分担者ら及び他の研究協力医が直接患者に充分時間をとってその目的を説明し、理解と同意の得られた場合に限って採血して研究に供した。

C. 研究結果

- 1) 昨年度同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立

中国における SARS-CoV 初期感染者血清中抗体の測定

中国における感染者血清中の S791 および N161 ペプチドに対する抗体を ELISA で測定した (Dr. Xiyun Yan; Chinese Academy of Science, Institute of Biophysics との共同研究)。健康人の平均値 (0.011) の 3 倍の値 (0.033) をカットオフ値にすると、S791 に対する抗体は、急性期患者血清で高率 (14 例中 14 例: 100%) に検出された (図 2) が、N161 に対する抗体は 42.4% (184 例中 81 例) と、感染 6 ヶ月後血清とほぼ同じ結果が得られた (表 1)。

- 2) 患者抗体が認識する T 細胞エピトープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用の検討

K532-74 ペプチドとホモロジーを有するペプチドを含む遺伝子

K532-74 ペプチド配列と相同性のあるペプチドを有する自己抗原を検索したところ hypothetical protein Ca019.1430 [Candida albicans SC5314] と 10 アミノ酸中 7 アミノ酸 (FYFTNDV) が一致した。その他、NADH-ubiquinone oxidoreductase chain G、SRGAP3 protein、KIAA1864 protein、SLC38A3、SLC38A5 protein、JAK1 protein、Sorting nexin 13、Titin などが一部相同性のあることが分かった。

K532-74 ペプチドの T 細胞活性化能

そこで、K532-74 ペプチドで SARS-CoV 非感染者末梢血リンパ球を刺激し、T 細胞活性化能があるかどうか検討した。

K532-74 で健康人末梢血リンパ球を刺激したところ、SARS 感染がないにもかかわらず前立腺がん 9 例中 6 例 (50FIU 以上を陽性とした) で T 細胞が活性化され IFN- γ 産生が認められた (表 4)。

K532-74 ペプチドの細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導能

前立腺患者末梢血リンパ球を K532-74 ペプチドで刺激し誘導された細胞傷害活性の典型例を以下の図に示した。前立腺がん細胞株 PC93 (HLA-A2 陰性) および同種細胞に HLA-A2 遺伝子を導入したステイブル・トランスフェクタント細胞株 PC93-A2 を標的細胞としてクロム遊離反応試験を行ったところ有意にトランスフェクタント細胞が傷害されたことにより、K532-74 ペプチドを認識する CTL が、SARS-CoV 非感染細胞を傷害することが分かった (図 3)。

健康人末梢リンパ球を用いた同様の実験において、8 例中 5 例で HLA-A2 陽性リンパ芽球および HLA-A2 陰性 PC93 に比べて HLA-A2 陽性 PC93 A2 に対する細胞傷害活性が有意に高い CTL が誘導された (図 4)。

別の前立腺患者末梢血からは、やはり同じく HLA-A2 拘束性に細胞傷害活性を有する CTL 活性が証明されたが、別の陰性コントロールに用いた HLA-A2 陽性 PHA 刺激リンパ球が球化細胞に対しても傷害活性が認められた (図 5)。自己抗原由来のペ