

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 内田 哲也

平成 20 (2008) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 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コロナウイルス及びH5N1型鳥インフルエンザウイルス由来HLA-A*0201拘束性
CTLエピトープの同定とペプチド結合リポソームによるCTLの誘導…… 13
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…… 25
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…… 29
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…… 35
種市 麻衣子
6. リン脂質の安全性の検討およびリポソーム作製…… 40
小田 洋

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…… 42

IV. 研究成果の刊行物・別刷…… 44

I. 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
平成 19 年度総括研究報告書

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、CTL 誘導型ウイルスワクチンの創製に用いるイムノドミナントな CTL エピトープの同定作業を高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）およびSARS コロナウイルスについて行った。その結果、H5N1 の内部構造タンパク由来で高効率に CTL を誘導するペプチドが 10 種類以上同定され、そのうち複数のものがヒトインフルエンザウイルス H1N1 および H3N2 に共通に含まれることがわかった。このことから、ヒトインフルエンザと鳥インフルエンザに対して共通に有効なワクチンの創製が可能になることが期待された。SARS コロナウイルスについてもイムノドミナントな CTL エピトープが複数同定された。また、C 型肝炎ワクチンについても組み換えワクシニアウイルスを用いたチャレンジ実験でリポソーム結合ペプチドによる感染予防効果が確認されたことから、HCV ワクチンの創製が可能であることが示唆された。

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准教授）
梶野 喜一（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター准教授）
石川 昌（東京大学大学院分子予防医学教室准教授）
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（日油株式会社 DDS 研究所処方グループ グループリーダー）

に対するものであるため、表面抗原の異なるウイルス亜種が出現するとワクチンが有効に働かなくなるという欠点がある。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、より保存された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

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

(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の検討、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。

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を構成するタンパクをコードする遺伝子 8 分節のうち、表面の HA および NA を除いた 6 分節につき、検索ソフト

を用いて HLA-A2 および HLA-A24 拘束性の CTL エピトープ候補を選択した。これらの候補につき、class I 結合親和性、CTL 誘導能でスクリーニングを行った結果、現時点で HLA-A2 拘束性のものが 5 種類、HLA-A24 拘束性のものが 10 種類の計 15 種類の CTL エピトープが見い出され、これらのうち 8 種類のペプチドは特に強力に CTL を誘導した (特許出願準備中)。また、全 15 種類のうち 8 種類の CTL エピトープはヒトインフルエンザウイルス H1N1 および H3N2 に共通のものであった。

(2) SARS ワクチンの開発：(1) と同様の手順により SARS コロナウイルス由来の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープの同定を試みた。変異の少ない内部構造タンパク質 (NP) と調節性タンパク質 (pp1a) 領域内で検索を行った結果、5 種類の強い CTL 誘導活性を有するエピトープを見出した (特許出願準備中)。

(3) HCV ワクチンの開発：マウスの LCMV 感染モデルを用いた検討の結果、1. 極めて微量のペプチド結合リポソームにより完全な感染防御効果が得られ、2. 慢性持続感染を引き起こすウイルスにも有効であり、3. 経鼻投与によりウイルスの気道感染も防御できることがわかった。以上の結果を踏まえ、HCV 由来エピトープとリポソームとの結合物を作製して HLA 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスに免役した結果、ワクシニアウイルスを用いたチャレンジ実験において感染予防効果が確認された。

(4) ペプチド-リポソームによる CTL 誘導の必要条件の検討：CTL の誘導に CD4 陽性 T 細胞によるヘルプが必須であるか否かについて検討を行った。その結果、CTL エピトープペプチドを結合したリポソームで免疫することにより CTL が誘導され、このことは CD4 陽性 T 細胞に対する抗体を投与して CD4 陽性 T 細胞を除去したマウスにおいても再現されたことから、CD4 陽性 T 細胞による

ルプは CTL の誘導を増強するものの必須ではないことが示唆された。

D. 考察

今年度新たに同定された H5N1 鳥インフルエンザウイルス由来 CTL エピトープの多くがヒトインフルエンザウイルス H1N1 および H3N2 と共通のものであったことから、本研究において CTL 誘導型インフルエンザワクチンが開発されれば鳥インフルエンザだけでなくヒトインフルエンザの予防にも有効であることが期待された。

鳥インフルエンザウイルスと同様の手法で SARS ウイルス由来の CTL エピトープの同定作業が行われ、CTL 誘導型リポソームワクチンの創製に利用可能なエピトープが複数得られた。

マウスの LCMV 感染モデル系を用いた検討により、リポソーム結合ペプチドが高効率に CTL を誘導してウイルス感染抵抗性を誘導することが確かめられた。特に、慢性持続感染を惹起するウイルスに対する有効性も確認されたことから、C 型肝炎に対する治療型ワクチンの創製への応用も期待された。

CTL 誘導型リポソームワクチンのデザインを決定する上で重要な、ヘルパーエピトープの必要性の有無に関して、リポソーム結合ペプチドは CTL エピトープのみで高効率に CTL を誘導することが CD4 陽性 T 細胞を除去したマウスにおいても確認されたことから、このワクチンにおいてヘルパーエピトープは必ずしも必要ではないことが示唆された。このことはワクチンの構成をより簡略なものに出来ることを意味する。

E. 結論

本年度の検討により CTL 誘導型ワクチンの創製に必須であるイムノドミナントな CTL エピトープが多数同定された。来年度はこれらのエピト-

プを用いて候補ワクチンを作製し、ヒト MHC を発現したマウスを用いて感染実験を実施し、本研究において開発したワクチンの有効性を検証する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得（特許出願準備中 2 件）

a) SARS コロナウイルスの細胞傷害性 T 細胞エピトープペプチド及びその用途

b) H5N1 型鳥インフルエンザウイルスの細胞傷害性 T 細胞エピトープペプチドと細胞傷害性 T 細胞誘導能を持つペプチド結合リポソーム

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

II. 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

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（埼玉医大・微生物学 教授）

協力研究者： 高木 徹（埼玉医大・微生物学 助手）

研究要旨 慢性持続感染を引き起こす C型肝炎ウイルス(HCV)のモデルとして、LCMV を用いたマウス感染実験での基礎検討を行った。昨年度はドミナント CTL 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による免疫で、ウイルス感染を完全に防御できる免疫能が得られることを示したが、今年度は更にその有効性を検討した。その結果、投与量は 0.4 μ l（ペプチド 280 ng 相当）という極めて微量でも完全な感染防御効果が得られること、チャレンジするウイルスとして、慢性持続感染を引き起こし、感染防御もより難しい変異株 clone 13 を用いた場合でも感染防御が可能であること、経鼻投与により粘膜免疫が誘導され、ウイルスの気道感染も防御できることなどが分かった。これらの結果は、本ワクチンが、HCV、HIV 等の持続感染を引き起こすウイルスや、気道感染するインフルエンザウイルス等に対する、経済性・安全性に富む有効なワクチンとして期待ができることを示唆する。更には CTL minimal epitope ペプチドのみによる免疫でも、有意なメモリー T 細胞の誘導が見られることも示され、本ワクチンが極めて優れた CTL 誘導能を持つことが明らかとなった。HCV エピトープに関しては、昨年度は患者リンパ球を用いた実験で、HLA-A24 拘束性の候補エピトープペプチド 7 種のうち 6 種で反応が見られることが示されたが、今年度はそれら 7 種の HLA-A24 拘束性エピトープペプチド全てと、すでに確立されている HLA-A2 拘束性ドミナントエピトープペプチド 1 種についてリポソームワクチンを作成し、それぞれの HLA 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスに免疫実験を行った。その結果、患者リンパ球で反応が確認された 6 種の HLA-A24 エピトープのうちの 2 種と 1 つの HLA-A2 エピトープにおいて、IFN- γ 産生細胞の誘導が確認され、HLA-A2 エピトープ C7A2 については、当該エピトープを発現する組換えワクシニアウイルスを用いたチャレンジ実験で感染予防効果が確認された。以上から HCV ワクチンとしても効果が充分期待された。

A. 研究目的

わが国における慢性 C型肝炎は大きな社会問題となっており、慢性感染者の救済が急務となっている。しかし HCV を実験動物に感染させることは、チンパンジーを例外として不可能であ

るため、予防・治療ワクチンの開発は他のウイルスに比べて困難である。今までの研究、特に CTL 誘導型ワクチンの研究には、組換えワクシニアウイルスのように、マウスに感染して感染細胞に HCV タンパクを発現させるウイルスによ

る感染実験が代用とされてきた。しかしこれらのウイルスは急性感染のみを引き起こすので、感染予防効果の判定は可能であるが、持続感染患者用の治療ワクチン開発には不適當である。そこで本研究では、マウスでの細胞免疫反応が詳しく研究されていて、急性感染だけでなく慢性持続感染を引き起こす変異株も存在する LCMV をモデルとして選んだ。しかもこのウイルスは HCV や HIV でみられるような血液感染だけでなく、本研究班のもう一方の大きな課題であるインフルエンザウイルスなどのように気道感染も引き起こすので、そのモデルともなりうる。今年度は急性血液感染および気道感染に対する予防効果の判定、メモリーT細胞誘導能の検討を中心に取り組んだ。その結果に基づき、HCV エピトープについてもワクチンを作成し、免疫誘導能を検討すると共に、治療ワクチンとしての開発の準備も進めている。

B. 研究方法

用いたペプチドとマウスは昨年度と同様である。免疫法として昨年度の方法に加え、鼻腔免疫（ワクチン 20 μ l を CpG-ODN5002 5 μ g と共に鼻腔内にピペットチップを用いて注入）も行った。通常の判定は免疫後1週目に行い、メモリーT細胞誘導能の検討には免疫後18週まで経過を追って検討した。免疫効果の判定法として、昨年度の1) ELISPOT、2) ^{51}Cr -release assay、3) LCMV Armstrong 株でのチャレンジ実験に加え、今年度は4) Intracellular cytokine (IFN- γ) staining、5) In vivo CTL assay、6) CD8/H-2D b · GP33 tetramer/CD62L の 3 color staining も行った。

ウイルス感染実験は、昨年度と同様に LCMV Armstrong 株 2×10^6 pfu を腹腔に接種する実験に加え、今年度は同ウイルスを同量鼻腔内に

投与する実験も行った。感染の判定は脾臓だけでなく血清中のウイルス量も定量して行った。持続感染する変異株 clone 13 によるチャレンジ実験は、 2×10^6 pfu を静注し、接種後8日目に脾臓と血清中のウイルス量を定量して行った。HCV ワクチン実験では HLA-A2 transgenic, H-2 knockout マウス (HHD マウス) をリポソームワクチンで免疫し、HCV core タンパク発現組換えワクシニアウイルス (VVcore) 1×10^6 pfu を腹腔に接種、5日後に卵巣を摘出し、そのホモジネートを BS-C-1 細胞に接種し、2日後にプラーク数を定量して算出した。

(倫理面への配慮)

マウスは、埼玉医大・実験動物管理運営規程に基づき飼育され、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。LCMV、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) 昨年度報告した liposome-GP33 により誘導される CTL 反応について、その特異性の確認を行った。1つは intracellular cytokine staining で、抗原ペプチドに反応して IFN- γ を産生するのが CD8 陽性であることがわかる示された(図 1A) (Lip-NP118 は陰性コントロール)。もう1つの実験では、組換えワクシニアウイルスで GP33 エピトープを内在性に発現させた標的細胞に対しても、CTL が認識し殺すことを確認した(図 1B)。

2) 免疫マウスのチャレンジ実験を、LCMV Armstrong 株 (図 2A) だけでなく、その変異株で持続感染を引き起こす clone 13 でも行った(図 2B)。clone 13 はメモリーT細胞を機能不全に陥らせるので HCV と同様に慢性感染を引き起こし、Armstrong 株に比べてワクチンによる

感染予防も難しいことが知られているが、liposome-GP33による免疫(Lip-GP33)ではLCMV Armstrong株感染による免疫(LCMV)と同様にこのウイルスによる感染が完全にブロックされ、陰性コントロールワクチン(Lip-NP118)接種ではウイルスが持続感染し、感染8日後も検出されることが示された。

3) Liposome-GP33が粘膜免疫も誘導できるかについて、鼻腔内に接種して検討した。鼻腔免疫(i.n.)では筋注(i.m.)よりも反応が低かったが(図3A)、両群でLCMVを鼻腔に接種してチャレンジしたとき、いずれも完全に感染をブロックした(図3B)。

4) 昨年度は免疫量を200 μ lから半分ずつ減らして比較し、12.5 μ lまで減らしてもELISPOT assayの結果に差は認められないという結果を得たが、今回更に量を減らしてELISPOT assay(図4A)とウイルスチャレンジ実験(図4B)を行った。0.4 μ l(ペプチド280 ng相当)という極めて微量でもELISPOT反応が認められ、完全な感染防御も得られた。更に少ない0.08 μ l(ペプチド56 ng相当)でもなおELISPOT反応が認められ、4匹中3匹で完全なウイルス感染防御が認められた。

5) 免疫後の反応を1週ごとに4週まで続けて測定し、更に18週後にも測定して免疫反応の推移を検討した。ELISPOTでは2週後から反応が低下したが18週後でもわずかにIFN- γ 産生細胞が認められた(図5A)。ウイルスチャレンジ実験ではELISPOT値が低下していても4週まではウイルスが検出されなかった(図5B)。18週後ではウイルスが検出されたが、陰性コントロール群(Lip-NP118)と比較すると、約4 logのtiter reductionが見られた。

6) 5)の免疫後18週で認められた免疫反応が、エフェクター細胞の残存なのか、メモリー

が成立してメモリーT細胞が存在するためなのかを検討するために、追加免疫実験と、細胞表面マーカーの検討を行った。ELISPOTで見える限り、免疫18週後の値は追加免疫で上昇するものの、初回免疫でみられた値の上昇と比較すると大差はなかった(図6A)。しかし細胞表面マーカーについては、免疫後18週ではCD62Lの発現が90%近くの細胞で認められ、エフェクターからメモリー細胞に移行していることが考えられた(図6B)。さらに、追加免疫実験によりtetramer陽性細胞が有意に増加し、CD62Lの発現も再び低下し、エフェクター細胞の表現型をとることが認められた。これらの結果はGP33というCTLエピトープペプチドのみによる免疫でエフェクター細胞の誘導だけでなく、メモリーT細胞も誘導できることを示す。LCMV感染では終生免疫が成立するが、その状態にあるマウス(図6B*)と比較するとわずかに反応が低いものの、それに近い状態にあることが分かる。7)以上のLCMVでの実験結果に基づき、HCVのCTLエピトープペプチドを表面結合したワクチンの検討を行った。HLA-A2拘束性ドミナントエピトープとして既に我々が発表したC7A2を用いたりポソームワクチンを作成し、HLA-A2を発現するトランスジェニックマウスに免疫した。⁵¹Cr-release assayでCTLの誘導が確認され(図7A)、ELISPOTでも有意な反応が得られた(図7B)。免疫マウスに当該HCVエピトープを発現する組換えワクシニアウイルスをチャレンジしたところ、4 log近いtiter reductionが認められた(図7C)。組換えワクシニアウイルスでのこの効果は、上記2)に記したLCMVのチャレンジを完全にブロックした免疫反応に匹敵することを、liposome-GP33免疫マウスにGP33発現組換えワクシニアウイルスをチャレンジした実験結果で確認した。

8) 昨年度患者リンパ球で反応が認められた HLA-A24 拘束性 CTL エピトープ 6 種 (#1-#6) を含む 7 種の候補エピトープ全てについてペプチド表面結合リポソームワクチンを作成し、HLA-A24 transgenic mice に免疫した。免疫マウスの脾細胞の ELISPOT assay で、#3 と #4 が反応を示した (図 8)。

D. 考察

昨年度の検討により抗原表面結合型リポソームワクチンを用いると、CTL エピトープペプチドのみの免疫でも CTL が誘導され感染を防御できることが示されたが、今年度の研究では以下の点でその効率が非常に良いことが分かった。すなわち、1) 持続感染型変異株ウイルスの感染も防御できる、2) 粘膜免疫も誘導する、3) ナノグラムオーダーの極微量の抗原量で十分な効果が得られる、そして 4) メモリー T 細胞も誘導できる。異なるエピトープにおいても同様の免疫効果が得られることは昨年度示されており、今年度は HCV エピトープについても感染防御効果が確認された。HCV ワクチンとして臨床実験に進める基礎データが得られつつあるが、予防ワクチンとしてだけでなく治療ワクチンとしての応用の道も追及すべきであると考えている。特にわが国では慢性感染者の救済が急務であるので、来年度は LCMV clone 13 による持続感染マウスの治療実験を行う。

E. 結論

抗原表面結合型リポソームワクチンは、従来の CTL 誘導型ワクチンよりもはるかに効率が良い免疫誘導能を持つことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

a. Akira Takagi, Masanori Matsui, Satoshi Ohno, Hongying Duan, Osamu Moriya, Nobuharu Kobayashi, Hiroshi Oda, Masahito Mori, Hiroyuki Yamamura, Maiko Taneichi, Tetsuya Uchida, and Toshitaka Akatsuka
Highly Effective Anti-Viral CD8⁺ T-Cell Response Induced by Peptides Coupled to the Surface of Liposomes.

Journal: Journal of Immunology (投稿準備中)

2. 学会発表

a. Highly efficient anti-viral CD8⁺ T-cell induction by peptides coupled to the surface of liposomes. Akira Takagi, Masanori Matsui, Satoshi Ohno, Hongying Duan, Osamu Moriya, Nobuharu Kobayashi, Hiroshi Oda, Masahito Mori, Hiroyuki Yamamura, Maiko Taneichi, Tetsuya Uchida, Toshitaka Akatsuka. 14th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Glasgow, Scotland UK, Sep. 9-13, 2007.

b. ペプチド表面結合リポソームによる抗ウイルス CD8⁺T 細胞反応の効率的な誘導. 赤塚俊隆、高木 徹、松井政則、守屋 修、種市麻衣子、内田哲也. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、Oct 21-23, 2007.

c. TAKAGI Akira, MATSUI Masanori, OHNO Satoshi, DUAN Hongying, MORIYA Osamu, TANEICHI Maiko, UCHIDA Tetsuya, AKATSUKA Toshitaka ペプチド表面結合リポソームによる抗ウイルス CD8⁺T 細胞の誘導 / Highly efficient anti-viral CD8⁺ T-cell induction by peptides coupled to the surface of liposomes. 第 37 回日本免疫学会総会、東京、Nov, 2007.

G. 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

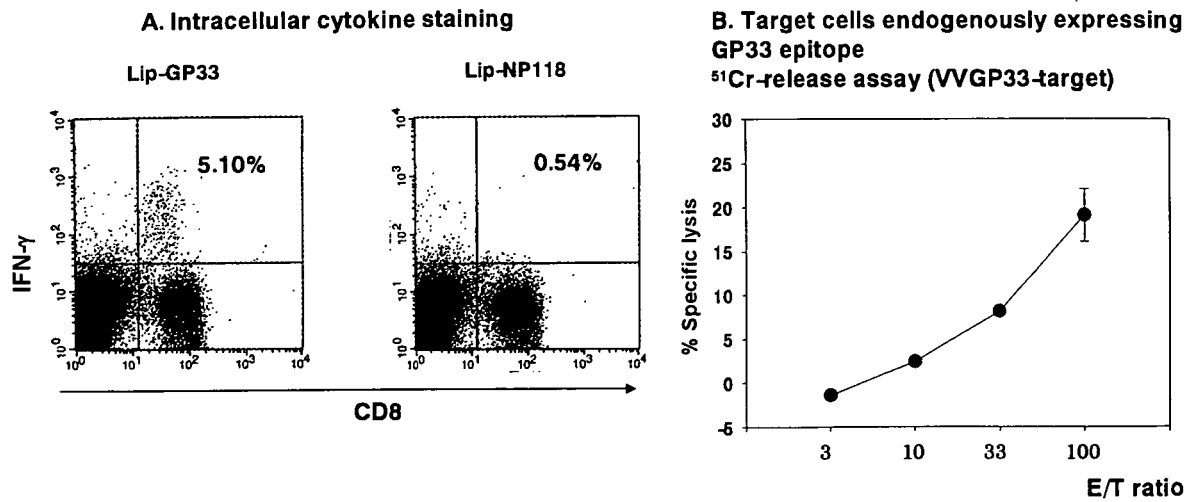


図1 CD8+T細胞反応 C57BL/6マウスに20 μ lのliposome-GP33を免疫し、1週後の脾細胞のCD8+ T細胞反応を調べた。(A) Intracellular cytokine staining (IFN- γ)、(B) VV-GP33を感染させたEL-4を標的細胞とした⁵¹Cr-release assay

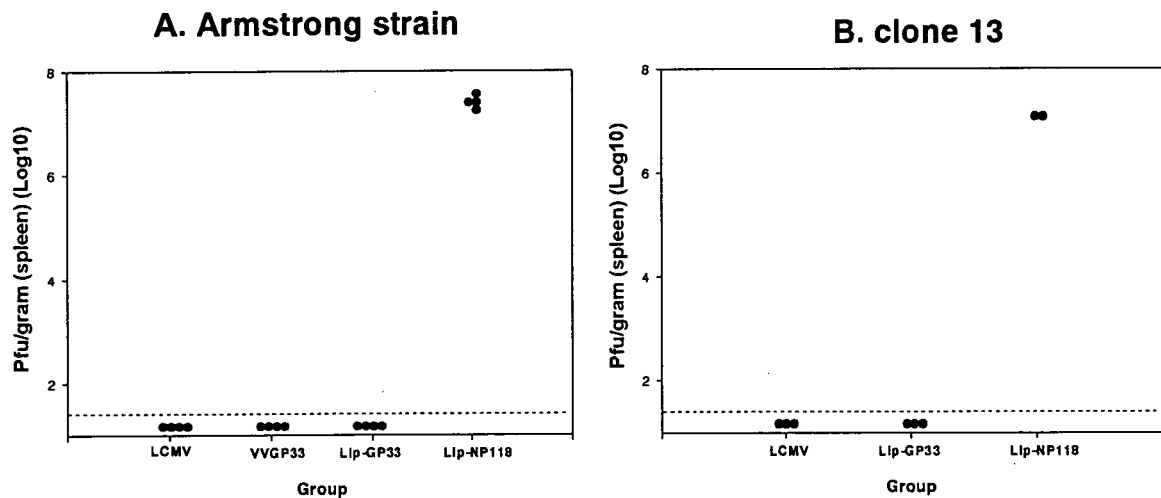


図2 LCMVチャレンジ実験 C57BL/6マウスに20 μ lのliposome-GP33を免疫し、7日後にLCMV Armstrong株を 2×10^5 pfu腹腔に接種(A)、またはclone 13を 2×10^6 pfu静注(B)し、それぞれ4日、8日後に脾臓を摘出してウイルスを定量した。

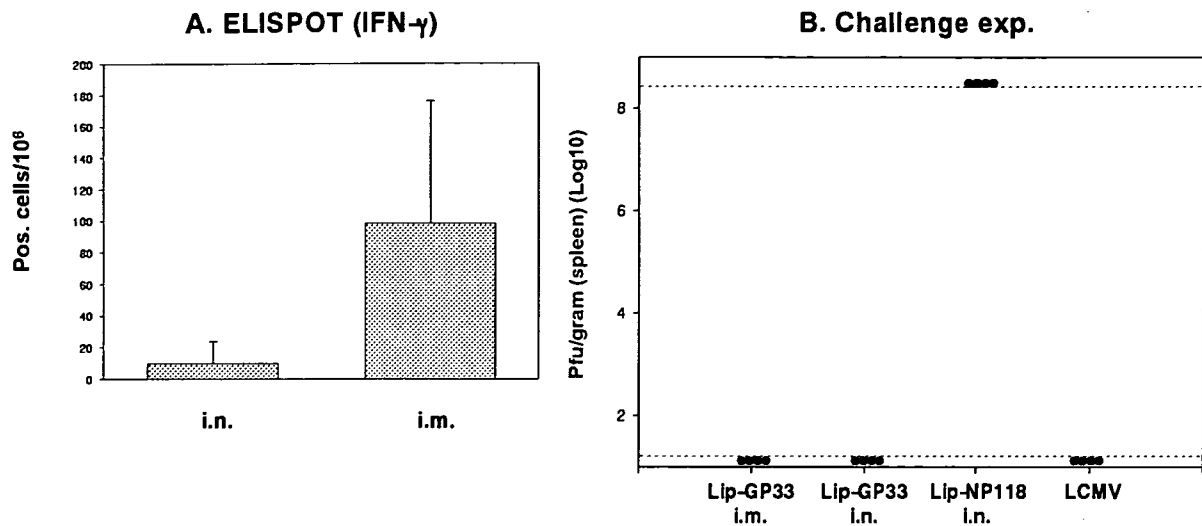


図3 鼻腔免疫 C57BL/6マウスに20 μ lのliposome-GP33を筋肉内(i.m.)または鼻腔内(i.n.)に投与した。(A)7日後の脾臓細胞のELISPOT(IFN- γ) assay。(B)7日後にLCMV Armstrong株を 2×10^5 pfu 鼻腔内に接種し、4日後に脾臓のウイルス量を定量。

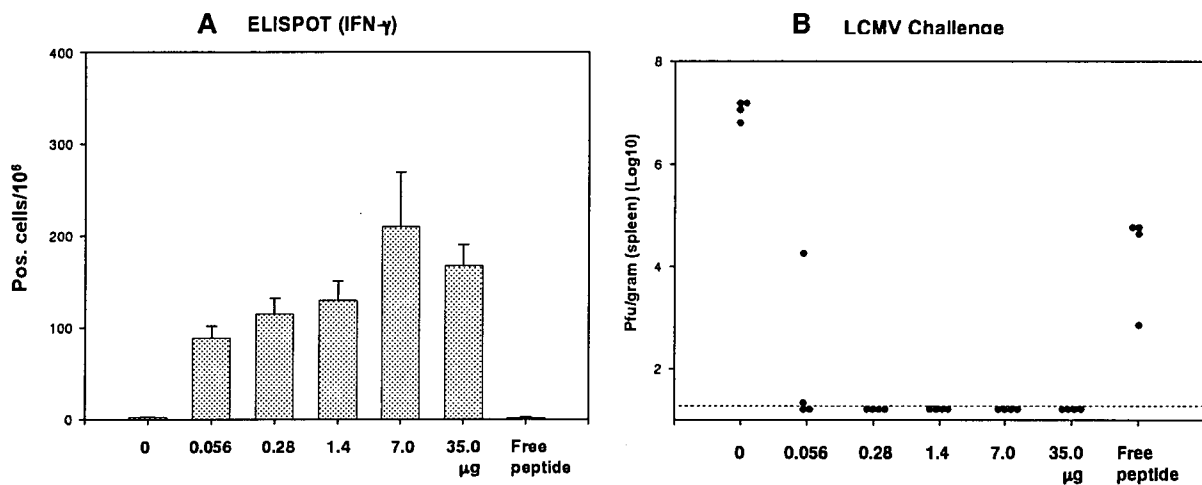


図4 Dose response C57BL/6マウスに投与するliposome-GP33を50 μ l(ペプチド35 μ g相当)から5分の1ずつ減らして実験を行った。(A)免疫7日後の脾臓細胞のELISPOT(IFN- γ) assay。(B)7日後にLCMV Armstrong株を 2×10^5 pfu 腹腔内に接種し、4日後に脾臓のウイルス量を定量した。

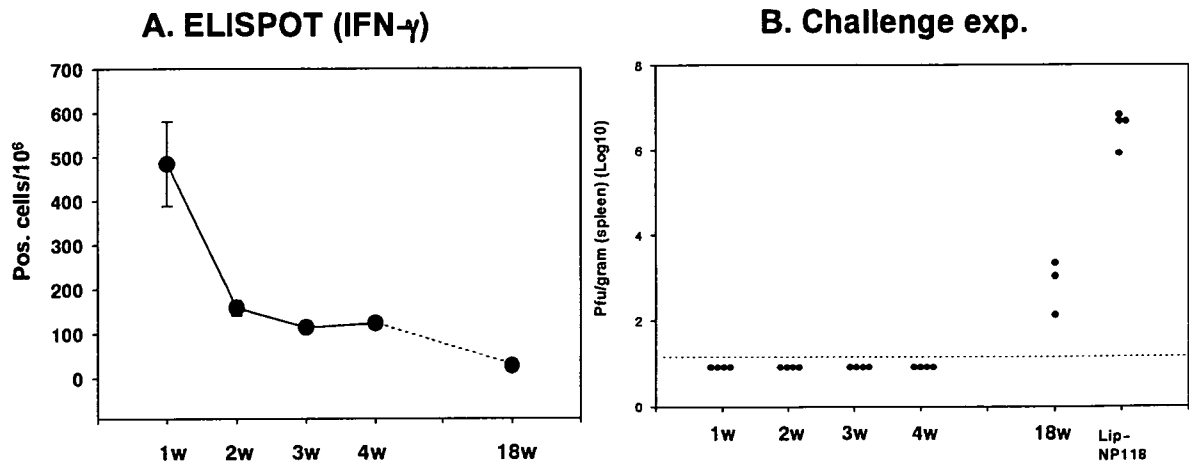


図5 Time course experiment C57BL/6マウスにliposome-GP33をCpG 5 μ gと共に20 μ l筋注射し、1-4週後と18週後にELISPOT (A) とウイルスチャレンジ実験 (B)で免疫反応を測定した。

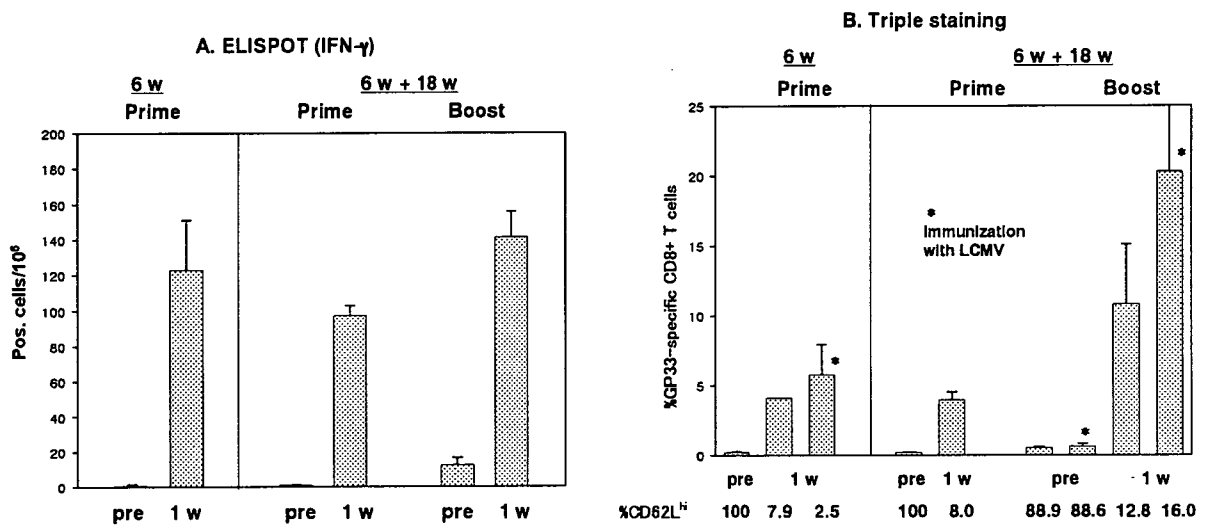
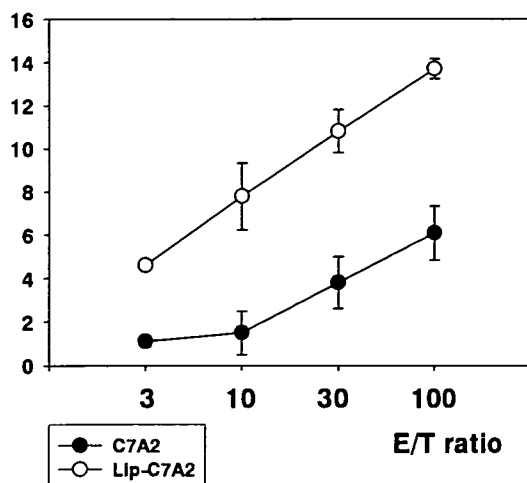
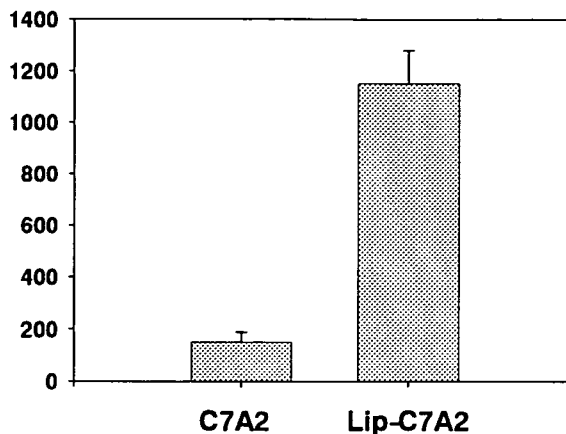


図6 Memory T cells 生後6週のマウスにliposome-GP33をCpG 5 μ gと共に20 μ l筋注射し、その免疫前と免疫1週後に脾臓を摘出してELISPOT (IFN- γ)(A) とCD8/Tetramer/CD62LのFACS (B)で免疫反応を測定した。(6w Prime: pre and 1w)。同様に免疫したマウスについて免疫後18週後に脾臓を摘出して同様に測定を行った(6w+18w, Boost pre)。同じ群のマウスにlip-GP33を追加免疫し同様な測定を行った(6w+18w Boost 1w)。週令による影響を見るために同じ週令の未免疫マウスでも同様に追加免疫前後の測定を行った(6w+18w, Prime pre and 1w)。*はlip-GP33でなくLCMV感染による免疫マウスの群を示す。

A. ⁵¹Cr-release assay



B. ELISPOT (IFN- γ)



C. Challenge exp.

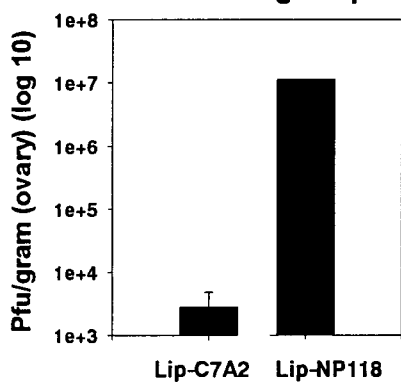


図7 HLA-A2拘束性HCVエピートープ(C7A2) 生後6週のH-2 knockout, HLA-A2 transgenic mice (HHDマウス) にliposome-C7A2をCpG 5 μ gと共に50 μ l筋注し、その週後に脾臓を摘出して⁵¹Cr-release assay(A) とELISPOT (IFN- γ) assay (B)で免疫反応を測定した。同量のfree peptideによる免疫も行って比較した(C7A2)。ウイルスチャレンジ実験は、HCV coreタンパクを発現する組換えワクシニアウイルス(VVcore)1 x 10⁶ pfuを腹腔に接種、5日後に卵巣を摘出し、そのホモジネートをBS-C-1細胞に接種し、2日後にプラーク数を定量して行った(C)。

ELISPOT (IFN- γ)

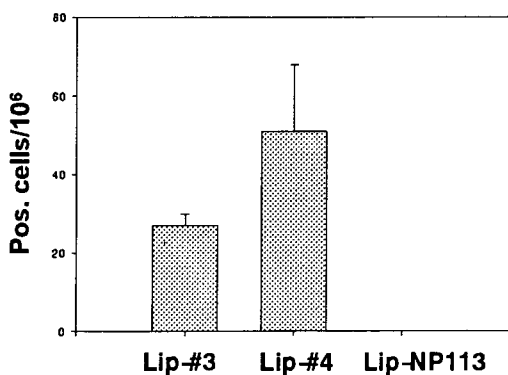


図8 HLA-A24拘束性HCVエピートープ 7種の候補ペプチド(#1-#7)を表面結合したリポソームワクチンをそれぞれ、生後6週のH-2 knockout, HLA-A24 transgenic mice にCpG 5 μ gと共に20 μ l筋注し、その1週後に脾臓を摘出してELISPOT (IFN- γ) assayを行った。Liposome-NP118を陰性コントロールとして用いた。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担報告書

SARS-コロナウイルス及び H5N1 型鳥インフルエンザウイルス由来 HLA-A*0201 拘束性 CTL
エピトープの同定とペプチド結合リポソームによる CTL の誘導

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

研究要旨

我々は、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導能を持つペプチド結合リポソームを利用して、重症急性呼吸器症候群(SARS)と高病原性鳥インフルエンザに対する CTL 誘導型ワクチンの開発を試みている。本年度は、SARS コロナウイルス (SARS-CoV) 及び H5N1 型鳥インフルエンザウイルス (H5N1-FluV) 由来の新しい HLA-A*0201 (HLA-A2) 拘束性 CTL エピトープを多数同定し、その中から反応性の高いドミナントエピトープを見つけた。SARS-CoV では、変異の少ない内部構造タンパク及び調節性タンパク質である、Nucleocapsid と pp1a 領域内で探した。一方、H5N1-FluV では、変異の多い haemagglutinin (HA) と neuraminidase (NA) 領域は避けて、conservative な matrix protein (M1), ion-channel protein (M2), nucleoprotein (NP), 3つの polymerase proteins (PA, PB1, PB2), non-structural protein (NS) からエピトープを探した。HLA-A2 は世界で最も頻度が高いアレルであり、これらのエピトープは利用価値が高いと考えられる。そして、同定したドミナントエピトープを結合したペプチド結合リポソームを作製し、HLA-A2 トランスジェニック (HLA-A2-Tg) マウスに免疫して、ウイルス特異的 CTL の誘導をさまざまなアッセイで詳細に検討した結果、ペプチド結合リポソームの CTL 誘導型ワクチンとしての有用性をしめしたが示された。

A. 研究目的

ウイルスに対する免疫防御反応は、体液性免疫と細胞性免疫が両輪として働く必要があるため、有効なワクチンを開発するには、体液性免疫のみでなく細胞性免疫を誘導することが重要である。細胞性免疫でウイルス防御に最も重要な役割を果たしているのは、CTL である。従って、ウイルスワクチンを開発する際に、ウイルス特異的 CTL をいかに効率良く誘導するかが重要な鍵である。我々は、SARS と高病原性鳥インフルエンザに対する CTL 誘導型ワクチンの開発を最終目標に、SARS-CoV 及び H5N1-FluV 由来の新しい HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを同定し、その中から反応性の高いドミナントエピトープを探し出すことを第一の研究目的とした。SARS-CoV では、まだエピトープがみつかっておらず変異の少ない、内部タンパク、調節性タンパク質である、Nucleocapsid と pp1a 領域内で探すことにした。特に、pp1a は極めて大きなタンパク質 (4382 aa) であるため、ドミ

ナントエピトープが見つかる可能性が高い。また、ウイルス構造タンパク質より先に合成される調節性タンパク質であるため、それを免疫反応のターゲットとすれば、感染初期でウイルスを攻撃できると思われる。一方、H5N1-FluV では、変異の少ない M1, M2, NP, PA, PB1, PB2, NS からエピトープを探すことにした。また、そのエピトープを結合させたペプチド結合リポソームを作製し HLA-A2-Tg マウスに免疫して、ウイルス特異的 CTL の誘導を詳細に検討することを第二の研究目的とした。

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-CoV の pp1a 及び Nucleocapsid 領域、及び H5N1-FluV の M1, M2, NP, NS, PA, PB1, PB2 領域のアミノ酸配列において、HLA-A2 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 2 種類のコンピュータープロ

グラム (BIMAS & SYFPEITHI) で予測した。

- 2) ペプチド合成：予測したエピトープに相当するペプチドの合成をオベロン社、インビトロジェン社に依頼した。
- 3) 合成ペプチドの HLA-A2 分子への結合親和性の測定：HLA-A2 分子への結合親和性を、TAP 欠損細胞株、T2 を使った peptide binding assay で測定した。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) 組み換えアデノウイルス、ワクシニアウイルスの作製：90-100 塩基からなる合成ヌクレオチドを組み合わせて PCR で伸長させ、予測エピトープをコードする multiepitope minigene を作製した。この遺伝子を組み込んで、予測エピトープを発現するアデノウイルスおよびワクシニアウイルスを作製した。
- 5) CTL エピトープの同定：SARS ヌクレオカプシド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-A2-Tg マウスに免疫し、以下のアッセイで誘導される CTL を検出した。SARS pp1a 及び H5N1 由来の CTL エピトープの同定では、それぞれの予測エピトープのペプチドでパルスした脾細胞をマウスに免疫し、同様のアッセイで 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) 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。
 - b) 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-CoV 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 (*in vitro* CTL assay) で調べた。また、免疫 7 日後に、異なる濃度の CFSE で染色した、ペプチドでパルスした脾細胞とパルスしていない脾細胞を、免疫したマウスに細胞移入し、フローサイトメトリーで CTL 活性を *in vivo* CTL assay で調べた。

- 6) ペプチド結合リポソームによる CTL の誘導：同定したエピトープをリポソーム表面に結合させて、ペプチド結合リポソームを作製した。そして、各々のペプチド結合リポソームと、ヘルパーエピトープを結合させたりポソーム及び CpG を混ぜて HLA-A2-Tg マウスの footpad に免疫した。細胞内サイトカイン陽性 CTL の測定と *in vivo* CTL assay により、SARS-CoV 特異的 CTL、H5N1-FluV 特異的 CTL が誘導できるかどうかを検討した。
- 7) ウイルスチャレンジ：同定した SARS-CoV Nucleocapsid 由来エピトープを結合したペプチド結合リポソームで HLA-A2-Tg マウスを免疫した。その 2 週後に、ヌクレオカプシド由来エピトープを発現する組み換えワクシニアウイルスを注射し、5 日後にマウス卵巣に存在するウイルス量を測定して、ウイルスの排除にペプチド結合リポソームが有効か否かを調べた。

(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) SARS-CoV, Nucleocapsid

a) CTL エピトープの予測と同定：

Nucleocapsid のアミノ酸配列から 9-10 個のアミノ酸からなる CTL エピトープを 8 つ予測し (表 1)、それらのエピトープを発現する組み換えアデノウイルスで HLA-A2-Tg マウスを免疫した。その後、脾細胞を調整し、① フローサイトメトリーによる細胞内 IFN γ 陽性 CTL の測定、② *in vitro* CTL assay、③ *in vivo* CTL assay、で CTL 誘導能を検討した (表 2)。

その結果、4つのペプチド(N-3, N-4, N-5, N-6)がエピトープであると考えられた(表2)。そのうち、N-4, N-5, N-6が強力にCTLを誘導した(表2)。

b) ペプチド結合リポソームによるCTLの誘導: エピトープとして同定した4つのペプチド(N-3, N-4, N-5, N-6)をリポソームに結合させ(Lip-N-3, Lip-N-4, Lip-N-5, Lip-N-6)、それぞれのペプチド結合リポソームをHLA-A2-Tgマウスに免疫した。そして、脾細胞を調整して細胞内IFN- γ 陽性CTLの測定を行なった(図1A)。その結果、組換えアデノウイルスで免疫した場合とは異なる実験結果が得られた。ペプチド結合リポソームで免疫した場合、組換えアデノウイルスで免疫した場合と同様に、N-4とN-5は効率よくCTLを誘導した(図1A:c~f)が、N-3とN-6は、アデノウイルスで免疫した場合と異なり、リポソームではCTLをうまく誘導できなかった(図1A:a, b, g, h)。

N-3のアミノ酸配列は、N-4のアミノ酸配列のN末端にL(ロイシン)を足したものであるため、交差反応の可能性が考えられた。そこで、Lip-N-3とLip-N-4をそれぞれHLA-A2-Tgマウスに免疫してその脾細胞を調整し、N-3とN-4の2つのペプチドでそれぞれ抗原刺激して、誘導されるIFN- γ +CD8+細胞を測定した(図1B)。Lip-N-4で免疫したマウスの脾細胞では(図1B:d~f)N-3で抗原刺激しても(図1B:e)、N-4で刺激した場合(図1B:f)と同様に、IFN- γ +CD8+細胞を誘導することがわかった。従って、Lip-N-4によって誘導されたN-4特異的CTLが、cross-reactiveにN-3を認識したと考えた。一方、Lip-N-3でマウスを免疫した場合は(図1B:a~c)、N-3(図1B:b)およびN-4(図1B:b)共に、IFN- γ +CD8+細胞を誘導することができなかった。以上から、N-3はエピトープではないと結論した。即ち、組換えアデノウイルスで免疫した場合、抗原提示された、真のエピトープであるN-4によって誘導されたN-4特異的CTLがN-3を認識(cross-reactivity)したため、ICSで矛盾した結果が現れたと思われる。

c) ウイルスチャレンジ: 最もCTL誘導の効率が良かったペプチド結合リポソーム、Lip-N-4でHHDマウスを免疫して2週間後

に、Nucleocapsidのmulti-epitope minigeneを組み込んだワクシニアウイルスを注射し、5日後にマウスに存在するウイルス量を測定した(図2)。コントロールに比べて有意にウイルス量が減少しており、Lip-N-4による免疫が有効で十分なSARS-CoV特異的CTLを誘導しウイルスを排除したと考えられる。今後、他のペプチド結合リポソームについてもウイルスチャレンジ実験を行なう予定である。

2) SARS-CoV, pp1a

a) CTLエピトープの予測と同定: 4,382個のアミノ酸からなるpp1aのアミノ酸配列から9-10個のアミノ酸からなるCTLエピトープを30種類、BIMASとSYFPEITHIで予測し、その合成ペプチドを作製した。それらのHLA-A2分子への結合親和性をT2細胞を使って測定したところ、ほとんどのペプチドで高い結合親和性を示し、予測が良好であることがわかった(表3)。そして、ナイーブなHLA-A2-Tgマウスの脾細胞に、予測した30種類のpp1a由来エピトープのペプチドをパルスして、X線照射後、HLA-A2-Tgマウスの静脈に移入した。免疫したマウス脾細胞を調整して、各々のペプチドでin vitro刺激をして、フローサイトメトリーで細胞内IFN- γ 陽性CTLの誘導を測定した(表3)。その結果、30種類のうち9種類のペプチド(p#10, p#11, p#12, p#13, p#15, p#17, p#18, p#23, p#24)がペプチド特異的にCTLを誘導したため(表3)、それらをエピトープと決定した。

b) ペプチド結合リポソームによるCTLの誘導: 同定した9種類のエピトープのペプチドを、リポソームに結合させて、ペプチド結合リポソームを作製した。ペプチド結合リポソームを、HLA-A2-Tgマウスに免疫して、1週間後に免疫したマウスの脾細胞を調整し、in vitroで各々のペプチドで刺激して、細胞内IFN- γ 陽性CTLの誘導を測定した(図3)。9種類のほとんどのペプチド結合リポソームはCTLを誘導したが、その中の5種類(p#10, p#12, p#15, p#17, p#24)(図3 b, f, j, l, r)は極めて強力にCTLを誘導した。これらのペプチドはドミナントエピトープと考えている。

次に、ペプチド結合リポソームにより、CTL killing活性が誘導されるかどうかを検討した。強く細胞内IFN- γ 陽性CTLを誘導したペ

チド結合リポソーム (Lip-p#10, p#12, p#15, p#17, p#24) で HLA-A2-Tg マウスを免疫し、1 週間後に *in vivo* CTL assay を行なった(図 4)。その結果、5 つとも強い CTL killing 活性を誘導することがわかった。特に、Lip-p#24 (図 4 j) は、極めて強力で細胞内 IFN- γ 陽性 CTL および、killing 活性を誘導した。

3) H5N1-FluV

a) CTL エピトープの予測と同定: 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 9-10 個のアミノ酸配列を、M1 から 6 種類、M2 から 4 種類、NP から 3 種類、NS1 から 2 種類、PA から 12 種類、PB1 から 13 種類、PB2 から 7 種類 (計 47 種類) 選択し、その合成ペプチドを作製した。それらの HLA-A2 分子への結合親和性を、T2 細胞を使って測定したところ、ほとんどのペプチドで高い結合親和性を示し、予測が良好であることがわかった (表 4)。次に、ナイーブな HLA-A2-Tg マウスの脾細胞に、47 種類の予測エピトープのペプチドをパルスして、X 線照射後、HLA-A2-Tg マウスの静脈に移入した。免疫したマウス脾細胞を調整して、各々のペプチドで *in vitro* 刺激をして、フローサイトメトリーで細胞内 IFN- γ 陽性 CTL の誘導を測定した。(表 4)。その結果、47 種類のうち 5 種類のペプチド (flu#1, flu#6, flu#9, flu#14, flu#37) がペプチド特異的に CTL を誘導したので (表 4)、エピトープとした。

b) ペプチド結合リポソームによる CTL の誘導: 同定した 5 種類のエピトープのペプチドをリポソームに結合させて、ペプチド結合リポソーム (Lip-flu#1, -flu#6, -flu#9, -flu#14, -flu#37) を作製した。ペプチド結合リポソームを、HLA-A2-Tg マウスに免疫して、1 週間後に免疫したマウスの脾細胞を調整し、*in vitro* で各々のペプチドで刺激して、細胞内 IFN- γ 陽性 CTL の誘導を測定した(図 5)。3 種類のペプチド結合リポソームが CTL を誘導した (図 5:b, h, j) が、その中の 2 種類 (Lip-flu#1, -flu#14) (図 5:b, h) は極めて強力で CTL を誘導したので、この 2 つをドミナントエピトープと決定した。

そして、この 2 種類のペプチド結合リポソ

ームによる、CTL killing 活性を測定した(図 6)。その結果、2 種類共に極めて強い CTL 活性を誘導することがわかり、ワクチンの有望な候補と考えられた。

D. 考察

本年度は、SARS-CoV 及び H5N1-FluV 由来の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを多数同定した。それらのエピトープのうちのいくつかは、強力で IFN- γ 産生 CTL を誘導するドミナントエピトープであった。また、我々は、SARS-CoV 及び H5N1-FluV がコードするタンパク質のうち、変異の少ないタンパク質から、保存された CTL エピトープを探すことを試みた。その結果、H5N1-FluV において同定したエピトープの多くは、さまざまな H5N1 株に共通であった。さらに、同定した多くのエピトープは、H3N2 や H1N1 にも共通のエピトープであった。そのうち 2 種類のエピトープは、極めて強力で CTL を誘導したことから、これらのエピトープを用いてインフルエンザウイルスの複数の亜種に対して有効なワクチンを創製することが期待された。

E. 結論

我々は、SARS と H5N1 型鳥インフルエンザに対する、ペプチド結合リポソームを利用した CTL 誘導型ワクチンを開発するために、SARS-CoV 及び H5N1-FluV 由来の新しい HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを多数同定した。そして、その中から反応性の高いドミナントエピトープをみつけた見いだした。また、同定したドミナントエピトープを結合したペプチド結合リポソームで HLA-A2-Tg マウスを免疫することにより、ウイルス特異的 CTL を効率よく誘導した。以上の結果から、ペプチド結合リポソームは、これらのウイルス感染症に対する有望なワクチン候補となりうると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kohyama, S., S. Ohno, A. Isoda, O. Moriya, M. L. Belladonna, H. Hayashi, Y. Iwakura, T. Yoshimoto, T. Akatsuka, and M. Matsui.
IL-23 enhances host defense against vaccinia virus infection via a