

2008/2006A

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 20 年度 総括研究報告書

研究代表者 内田 哲也

平成 21 (2009) 年 3 月

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 20 年度 総括研究報告書

研究代表者 内田 哲也

平成 21 (2009) 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ボ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型肝炎ワクチンの創製に関する研究…… 5
赤塚 俊隆
2. 高病原性鳥インフルエンザウイルス関連抗原ペプチドを用いた
インフルエンザワクチンの開発…… 12
松井 政則
3. 高病原性鳥インフルエンザウイルス関連抗原ペプチドを用いた
インフルエンザワクチンの開発…… 20
梶野 喜一
4. リボソームワクチンの投与経路とCTL誘導との関係の検討…… 24
垣内 史堂
5. 抗原ペプチドとリボソームとの最適結合方法の検討…… 27
種市 麻衣子

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…… 32

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ボソームを応用した ウイルスワクチンの創製

研究代表者 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、昨年度同定した高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）の内部構造タンパク由来 CTL エピトープペプチドを用いて、リボソーム結合ペプチドによるインフルエンザウイルス感染抵抗性誘導の可否についてヒト HLA を遺伝子導入したマウスを用いたウイルス感染実験によって検討を行った。その結果、非免疫対照群においては H5N1、H1N1（A ソ連型）インフルエンザウイルスの経鼻感染後、顕著な体重減少の後に死亡したのに対して、リボソーム結合ペプチド免疫マウスは無徴候で生存した。さらにウイルスの肺における増殖も顕著に抑制したことから、CTL 誘導型リボソームワクチンによってウイルス感染抵抗性を誘導することが可能であること、単一のワクチン処方が H5N1、H1N1、H3N2（A 香港型）等、ウイルス亜型に有効であること、が明らかとなった。

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）
垣内 史堂（東邦大学医学部免疫学講座教授）
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）
横山 晶一（日油株式会社 DDS 研究所処方グループ グループリーダー）

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ボソーム処方を開発した。本研究ではこのリボ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

(1) インフルエンザウイルス感染実験：高病原性鳥インフルエンザ (H5N1 型) ウイルスの内部構造タンパクの中から検索・同定された CTL エピトープのうち、ヒトインフルエンザウイルス H1N1 型 (A ソ連型) および H3N2 型 (A 香港型) にも共通に含まれるものを選んでリポソームに結合し、ワクチンを作製した。このワクチンを HLA-A2 あるいは HLA-A24 の MHC class I を遺伝子導入したマウス (A2 あるいは A24 トランスジェニックマウス) に接種し、1 週間後に致死量の H5N1 あるいは H1N1 ウイルスを経鼻感染させて経過を観察した。マウスに対して致死性の無い H3N2 型 (A 香港型) についてはウイルスの経鼻感染後にマウスの肺を回収し、ウイルス価を測定した。

(2) リポソーム結合抗原の生体内における移動経路の検討：本研究においては、リポソーム結合抗原が外来性抗原であるにもかかわらず抗原提供細胞において内在性抗原と同様の経路で処理され、その結果、細胞性免疫が誘導されることを利用している。しかし、この間の機序の詳細は未だ明らかではない。この機序を解明することはリポソームワクチンを臨床応用するにあたって必須であると考えられることから、本年度はリポソーム結合抗原の抗原提供細胞内における動態の解析を行った。

(3) リポソーム結合抗原による CD8 陽性メモリー T 細胞誘導の検討：リポソーム結合抗原をワクチンとして臨床応用するための条件として、従来の抗体誘導型ワクチン同様、細胞性免疫 (CTL) 誘導型ワクチンにおいても免疫メモリーを誘導することが必須である。リポソーム結合抗原によって抗原特異的に CD8 陽性メモリー T 細胞を誘導することが可能か否かを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究に使用した実験動物は、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、使用された。

C. 研究結果

(1) インフルエンザウイルス感染実験：H5N1 型鳥インフルエンザウイルス (HK483 株)、H1N1 型ヒトインフルエンザウイルス (PR8 株) を 20LD₅₀、経鼻感染させると、非免疫対照群では顕著な体重減少の後に死亡したが、リポソーム結合ペプチド免疫群では A2 トランスジェニックマウス、A24 トランスジェニックマウスとも無徴候で生存した。H5N1 型、H1N1 型、および H3N2 型 (A 香港型 Aichi 株) ウイルスの肺における増殖を検討したところ、免疫群では非免疫群と比較してウイルス増殖が顕著に抑制された。ウイルス感染 2 週間後のリポソーム結合ペプチド免疫マウスの肺からはウイルスは検出されなかった。

(2) リポソーム結合抗原の生体内における移動経路の検討：抗原提供細胞としてマクロファージ細胞株を用い、培養中に抗原を蛍光標識したリポソーム結合抗原を添加してマクロファージにおける細胞内動態を観察した。通常、外来性抗原はマクロファージに貪食されるが、リポソーム結合抗原はマクロファージに対して貪食阻害剤を作用させても変わらずに細胞内に取り込まれた。一方、マクロファージが細胞外の物質を細胞内に取り込むもうひとつの方法である「ピノサイトーシス」に対する阻害剤によってマクロファージによるリポソーム結合抗原の取り込みは著しく減少した。このことから、我々が開発したリポソームは抗原提供細胞によるピノサイトーシスを利用してリポソーム結合抗原を細胞内に取り込ませ、その結果細胞性免疫が誘導されることが示唆された。

(3) リボソーム結合抗原による CD8 陽性メモリー T 細胞誘導の検討：卵白アルブミン (OVA) 由来の CTL エピトープ、OVA₂₅₇₋₂₆₄ を結合したリボソームをマウスに免疫することによって誘導される CTL は免疫 20 週後においても検出され、20 週における累加免疫によって顕著な CTL 応答の増強が見られたことから、リボソーム結合ペプチドの免疫によって抗原特異的 CD8 陽性メモリー T 細胞が誘導されることが示唆された。また、同様の結果は CD4 陽性 T 細胞を除去したマウスにおいても得られたことから、リボソーム結合ペプチドによって抗原特異的 CD8 陽性メモリー T 細胞を誘導する際に CD4 陽性 T 細胞は必須ではないことが明らかとなった。

D. 考察

インフルエンザウイルス由来の CTL エピトープを用いたリボソームワクチンを用いたウイルス感染実験の結果、従来の抗体誘導型ワクチンとは異なり、細胞性免疫 (CTL) 誘導型ワクチンによってウイルス感染抵抗性が誘導可能であることが示唆された。インフルエンザウイルス亜型に共通して存在する CTL エピトープを利用してワクチンを創製することにより、ウイルス亜型に共通して有効性を発揮するワクチンを創製することが可能であると考えられた。

リボソーム結合ペプチドは CD4 陽性 T 細胞非存在下で CD8 陽性メモリー T 細胞を誘導することが確かめられた。ここで得られた結果はこれまでの、CD8 陽性メモリー T 細胞の誘導に CD4 陽性 T 細胞が必須である、という数多くの報告に対して新しい知見を提供する。効率よく免疫誘導を行い得る条件下においては、CD8 陽性メモリー T 細胞の誘導に CD4 陽性 T 細胞は必ずしも必須ではない、と考えられた。

我々が開発したリボソーム結合抗原によって

高効率に細胞性免疫が誘導される機序について、リボソーム結合抗原が抗原提供細胞に取り込まれる方法が通常の外来抗原の場合と著しく異なることが原因であることを示唆する結果が得られた。このことにより、リボソーム結合抗原はウイルスが細胞に侵入した場合に近似した細胞内動態を辿り、MHC class I を介して CD8 陽性 T 細胞に呈示された結果 CTL が誘導されると考えられた。

E. 結論

本年度の検討の結果 CTL 誘導型ワクチンによってインフルエンザウイルス感染抵抗性を誘導することが可能であることが明らかとなった。同様の手法は表面抗原の変異しやすい他のウイルス (HIV、HCV、SARS 等) による疾患を予防するワクチンの創製にも応用可能であると考えられた。

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 (特許出願済 2 件)

a) 発明の名称：

「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」

出願番号：特願 2008-304965

出願日：2008年11月28日（金）
発明者：内田哲也（国立感染研）、松井政
則（埼玉医大）、小田洋（日油）

b) 発明の名称：

「鳥インフルエンザウイルスワクチン」
出願番号：特願 2008-303444
出願日：2008年11月28日（金）
発明者：内田哲也、種市麻衣子（国立感染
研）、梶野喜一（北海道大学）、松井政
則（埼玉医大）、小田洋（日油）

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（分担研究課題名）

研究分担者： 赤塚俊隆（埼玉医大・微生物学）

研究協力者： 高木 徹（埼玉医大・微生物学）

研究要旨 HLA-A2 と HLA-A24 で認識される HCV のドミナントエピトープの候補ペプチド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を用いて免疫実験を行った結果、HLA-A2 拘束性ペプチド計 3 種類については組換えワクシニアウイルスの感染を完全に防御する効果が確認できたことから臨床応用可能であると考えられた。一方 HLA-A24 拘束性ペプチドについては 4 種のペプチドにおいて IFN- γ 産生細胞の誘導が確認されたものの、そのいずれについても組換えワクシニアウイルスの感染防御効果は認められなかったため、新たに HLA-A24 拘束性の CTL エピトープを同定することが必要であると考えられた。さらに、マウスの LCMV 持続感染系をモデルとして検討を行った結果、リポソームワクチンによる良好な治療効果が得られた。以上の結果から HLA-A2 陽性者を対象として臨床試験に進めることのできる HCV ワクチンが 3 種類得られ、同様のワクチンを HIV の持続感染者の治療にも応用できる可能性も示された。

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。また先進途上国や薬物常用者が多い一部の先進国では輸血のスクリーニングで感染が予防できる状況ではないため、感染予防ワクチンの開発が必要とされている。したがって HCV ワクチンの開発は、予防ワクチンおよび治療ワクチンの両面を視野に入れて行う必要があるといえる。

現在のところマウスを用いた HCV 感染実験モデルは存在しないが、それに代わるものとして、HCV タンパクを発現する組換えワクシニアウイルスを用いて感染実験を行い、そこで感染予防効果が認められたものが臨床試験へと進められている。先行している CTL ワクチンの臨床試験では、感染

を完全に抑えることは出来ないが、感染後の症状を軽減し、慢性化を抑える効果が認められているものもある。ペプチド表面結合リポソームワクチンは従来の CTL ワクチンと比べて格段に効率が良いことは、昨年度までの我々の研究で明らかとなったので、HCV エピトープペプチドを用いた本ワクチンで組換えワクシニアウイルスの感染防御が示されれば、その臨床的効果が大きい期待できる。

CTL ワクチンで持続感染を治療する試みは、これまでなかなか成功例がなかった。しかし抑制性補助因子 PD-1 の作用を抗体でブロックすることにより、持続感染ウイルスを排除できる可能性が R. Ahmed らによって示されて以来、治療ワクチン開発の可能性が高まりつつある (Ha SJ, Mueller

SN, Wherry EJ et al. Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 2008;205:543-555.)。同様に CTL に対して抑制性に働くサイトカイン、IL-10 を抗体でブロックして CTL ワクチンの治療効果を高めることができるといふ報告も続いている (Brooks DG, Lee AM, Elsaesser H, McGavern DB, Oldstone MBA. IL-10 blockade facilitates DNA vaccine-induced T cell responses and enhances clearance of persistent virus infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 2008;205:533-541.)。しかし彼らの方法では非常に大量の抗体を3日ごとに5回投与する必要があり、現実的ではない。我々のリボソームワクチンにおいては抗原ペプチドだけでなく、種々の分子を同時にリボソーム表面に結合することが可能であり、これらブロック抗体をペプチドと共に表面結合すれば、抗原ペプチドを認識する CTL だけに特異的に抗体を作用させることが出来ると考えた。そこで今年度は抗 PD-L1 抗体で PD-1 抑制経路を遮断する方法を試みた。

B. 研究方法

今年度の研究に用いた HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを表1に示す。我々はこれまでに報告されたエピトープ24種につき、MHC分子への結合親和性、CTL誘導活性、IFN- γ 産生CD8陽性T細胞誘導能によりI-Vの5つのタイプに分類したが、その中から13種を選んでペプチドを合成し、リボソーム表面に結合した。HLA-A24のエピトープについては、これまでに報告されたものの中から7種を選んだ(表2)。

上述のペプチドを結合したリボソームをHLA-A2トランスジェニック、H-2ノックアウトマ

ウス(HHDマウス)、またはHLA-A24トランスジェニック、H-2ノックアウトマウス(A24Tgマウス)に免疫した。免疫後7日で脾臓を摘出してELISPOT(IFN- γ) assayおよびHCVタンパク発現組換えワクシニアウイルス 2×10^6 pfuを腹腔に接種するチャレンジ実験を行った。チャレンジ実験ではウイルス接種5日後に卵巣を摘出して、ウイルス増殖を検討した。

治療型ワクチンの検討にはC57BL/6マウスを用い、LCMV変異株clone 13を 2×10^6 pfu静注し、接種後3週目に採血して血中ウイルス量が 1×10^4 pfu/ml以上のマウスを選んで使用した。CTLエピトープGP33またはNP396ペプチドと抗PD-L1抗体を5:1の比率で混合後リボソームに結合したワクチンと、ペプチドのみをリボソームに結合したものをを用いた。ウイルス接種後4週目から2週毎に計3回ワクチンを皮下接種し、その前後で採血して血中ウイルス量とリンパ球の機能測定を行った。

(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。実験は埼玉医大・動物実験委員会での計画書の承認(受付番号20-M-20、承認番号020)と組換えDNA実験委員会での承認(承認番号634)のもとに行われた。LCMV、ワクシニアウイルスを扱う実験はBSL2の施設で行った。

C. 研究結果

1)表2のHLA-A24エピトープペプチド7種のうち#3と#4については、免疫マウスのELISPOT assayで陽性であったことを昨年度報告したが、その数値がやはり昨年度報告したLCMVワクチンに比べて低かったので、Lip-#4の投与量を変えてDose-responseをELISPOTで検討した。図1に示

すように 10 μ l (7 mg of peptide) が至適量であった。以後の免疫は全て 20 μ l で行い、2-4 週後に同量をブーストし、1 週後に ELISPOT assay を行ったところ、非免疫対照群と比較して 4 つのペプチドで有意差が認められた。

2) 表 1 の HLA-A2 エピトープペプチド 13 種のうち、ワクチンとして有効と思われるものを選び、ワクシニアウイルスによるチャレンジ実験によって、ELISPOT および CTL assay を行った。図 3 および表 1 に示すように、3 種のペプチドで明瞭な感染防御効果が認められた。

3) 上記 HCV ワクチンを慢性感染患者の治療に応用する可能性を検討することを目的として、持続感染モデルとして LCMV 変異株 clone 13 を使用した。clone 13 はマウスに感染後数ヶ月以上にわたって増殖を続けることが知られており、そのメカニズムとして PD-1、IL-10 等の抑制性シグナルが感染マウスで亢進していることが報告されている。同様なメカニズムがヒトの HCV や HIV 感染症においても報告されており、LCMV 感染モデルはヒトの慢性持続性感染症のモデルとして多用されている。これらの抑制性シグナルを抗体で中和すると CTL ワクチンによる治療が成功するという報告もあるが、それをそのまま臨床応用することは不可能である。抗 PD-L1 抗体を抗原ペプチドと共にリボソーム表面に結合したものを投与することにより抗原提示細胞でのみ抑制経路を特異的にブロックすることが期待された。LCMV clone 13 を持続感染したマウスの脾細胞を試験管内で抗体結合ワクチンによって刺激し、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞数を測定した。図 4 に示すように、Lip-GP33 単独で刺激した場合に比べ有意な ($p=0,0003$) 増強効果が認められ、培養液中に抗体を加えた場合と同様の効果が得られた。次に持続感染マウスの治療実験を行った。表 3、図 5 に示すように未治療群ではウイルスが 8 週目まで持

続して検出されたが、抗体結合ワクチン投与群では 8 週目に全てウイルスが血中から消失した。10 週目に抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞数を測定したところ抗体結合ワクチン投与群で最も高い比率で陽性細胞が認められた。10 週目の腎臓において、未治療群とワクチン単独投与群の一部でウイルスが検出されたが、抗体結合ワクチン投与群では検出されなかった (表 3)。

4) CTL エピトープペプチドのみでメモリー T 細胞が誘導維持できるかについて検討を行った。Lip-GP33 を CD4 ノックアウトマウスに免疫し、正常マウスとメモリー T 細胞の誘導・維持を比較した。図 6A に示すように、免疫 1 週後のエフェクター T 細胞の誘導は両群で差が認められなかった。12 週後に recall response を検討したところ、どちらの群においても 20 倍以上の反応が認められ、メモリー T 細胞が同様に誘導・維持されていると考えられた。正常マウスについては tetramer と CD62L staining を行ってメモリー T 細胞の誘導を更に確認した (図 6B)。両群の免疫マウスに LCMV を感染させたところ、ウイルス増殖の著名な抑制が認められた。

D. 考察

HLA-A2 拘束性の HCV エピトープのうち 3 種類においてリボソーム結合ワクチンとして十分な感染防御効果を発揮することが確認できた。今回感染防御効果が認められた CTL エピトープペプチドについては HLA-A2 陽性者に対して臨床応用する可能性が高いと考えられる。

一方 HLA-A24 については既知の CTL エピトープを用いて検討した結果、有意な感染防御効果が認められなかったが、今後 A24 拘束性 CTL エピトープの同定を行う予定である。

リボソームに抗 PD-L1 抗体を結合することにより顕著な免疫増強効果がみられた。今後、抗体の

効果が同時に結合した抗原ペプチドに特異的に作用していることが確認されれば、臨床応用の可能性は非常に高いと思われる。

CTL epitope peptide のみをリポソームに結合したワクチンが CD4 ノックアウトマウスにおいてもメモリー T 細胞を誘導することが確認できたことから、本ワクチンに CD4 T 細胞エピトープを加える必要性がなくなり、臨床応用がより容易になったといえる。しかも CD4 T 細胞が傷害される HIV 感染症においても全く同様に効果を発揮することが期待された。

E. 結論

HLA-A2 陽性者に効果を発揮することが期待できるペプチド結合型リポソームワクチンが得られた。さらに、LCMV 感染モデルにおいて治療ワクチンとしての応用可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1) Highly efficient anti-viral CD8⁺ effector and memory T cell induction without T cell help by peptides coupled to the surface of liposomes. Akira Takagi, Masanori Matsui, Osamu Moriya, Nobuharu Kobayashi, Hiroshi Oda, Masahito Mori, Akiharu Kobayashi, Maiko Taneichi, Tetsuya Uchida, Toshitaka Akatsuka, *Frontiers in Immunological Memory*. Newport Beach, CA, September 26-27, 2008.

2) Memory CD8 T cell induction without CD4 T cell help by peptides coupled to

the surface of liposomes. Akira Takagi, Masanori Matsui, Osamu Moriya, Nobuharu Kobayashi, Maiko Taneichi, Tetsuya Uchida, Toshitaka Akatsuka, *15th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses*. San Antonio, Texas, Oct. 5-9, 2008.

3) 高木徹、松井政則、守屋修、小林信春、種市麻衣子、内田哲也、赤塚俊隆。ペプチド表面結合リポソームは CD4 ヘルプなしに抗ウイルス CD8⁺メモリー T 細胞を誘導する。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、Oct 26-28, 2008.

4) 高木徹、松井政則、赤塚俊隆、種市麻衣子、内田哲也。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。第 12 回日本ワクチン学会学術集会、熊本、Nov 8-9, 2008.

5) 高木徹、大野悟史、守屋修、松井政則、種市麻衣子、内田哲也、赤塚俊隆。ペプチド表面結合リポソームは CD4 ヘルプなしに抗ウイルス CD8⁺メモリー T 細胞を誘導する。第 38 回日本免疫学会総会、京都、Dec 1-3, 2008.

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

表1

	Name	Sequence	CTL	ICS	Type	Protection
1	Core 35-44	YLLPRRGPRL	ND	0.22	IV	++
2	Core 132-140	DLMGYIPLV	40.7	6.81	I	++
3	Core 178-187	LLALLSCLTV	7.5	ND	V	ND
4	E1 257-266	QLRRHIDLLV	62.1	0.05	III	+
5	E2 686-694	ALSTGLIHL	50.1	2.35	I	-
6	E2 726-734	LLFLLADA	63.3	0.11	III	++
7	NS3 1073-1081	CINGVCWTV	23.6	0.10	I	-
8	NS3 1585-1593	YLVAYQATV	38.6	0.02	II	-
9	NS4 1671-1680	VLAALAAAYCL	75.6	0.16	I	ND
10	NS4 1807-1816	LLFNILGGWV	53.6	0.06	II	ND
11	NS4 1851-1859	ILAGYGAGV	20.5	ND	II	ND
12	NS4 1920-1928	WMNRLIAFA	35.3	0.29	I	ND
13	NS5 1992-2000	VLSDFKTWL	8.9	0.71	IV	ND

表2

No.	Protein	aa	Reporter	ELISPOT	Protection
#1	NS3	1031-1039	Kurikohchi,K.	+	ND
#2	NS3	1296-1304	Simosegawa,T.	-	-
#3	Core	129-137	Simosegawa,T.	-	-
#4	NS3	1100-1108	Hayashi,N.	+	-
#5	E2	711-710	Ithoh,K.	-	-
#6	NS2	885-893	Ithoh,K.	+	-
#7	NS4B	1716-1724	Ithoh,K.	+	ND

图1

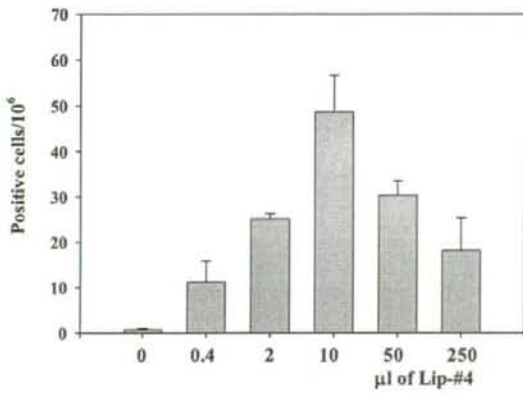


图2

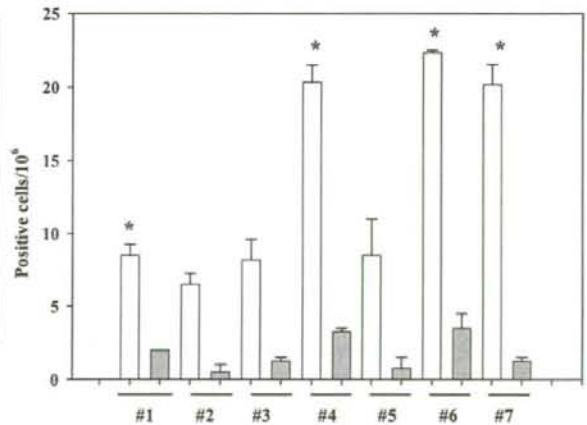


图3

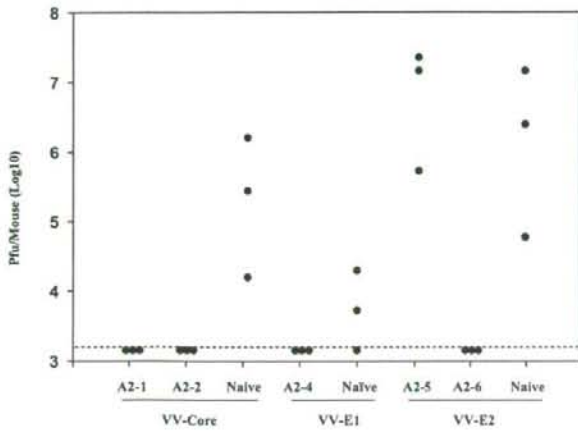


图4

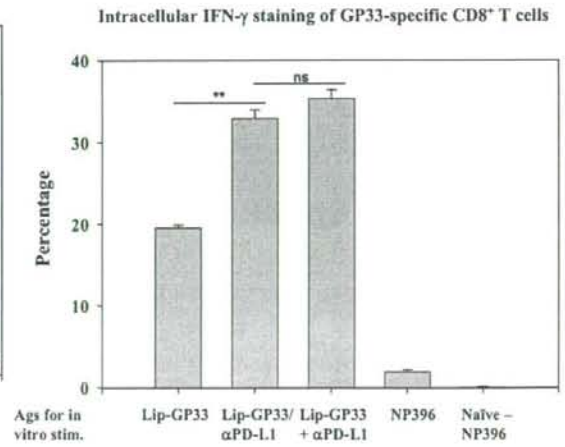


表3

	Mouse	4w	6w	8w	IFN- γ (+)/GP33-specific CD8 T cells	LCMV in the kidney (pfu/g)
Group I (Untreated)	1	9.50E+04	3.90E+04	6.00E+03	1.31%	440
	2	1.40E+04	1.30E+05	1.70E+04	6.28%	25,000
Group II (Lip-pep)	1	8.50E+04	1.60E+03	<50	12.60%	<40
	2	1.60E+04	3.40E+04	7.00E+03	9.79%	260
	3	9.50E+04	1.80E+04	1.40E+03	10.93%	<40
Group III (Lip-pep/ α PD-L1)	1	1.30E+05	3.30E+04	<50	6.27%	<40
	2	9.00E+04	5.00E+01	<50	21.90%	<40
	3	6.50E+04	3.50E+02	<50	26.00%	<40

图5

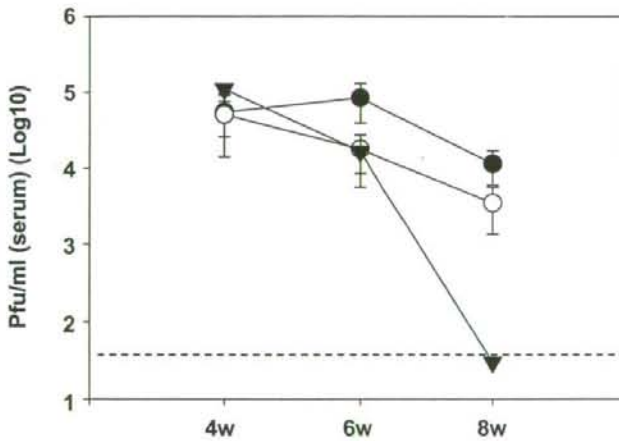
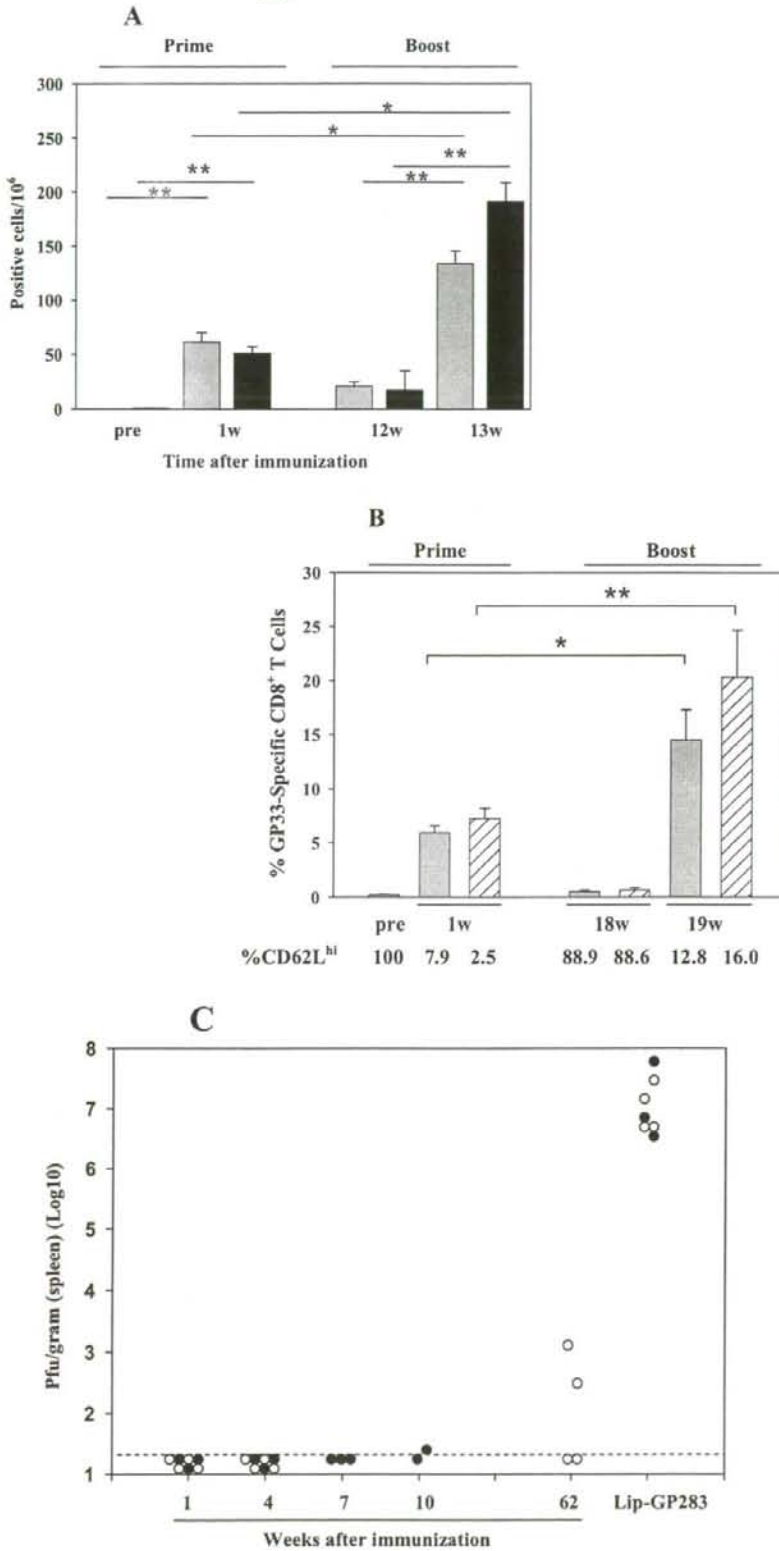


图6



厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

高病原性鳥インフルエンザウイルス関連抗原ペプチドを用いた
インフルエンザワクチンの開発

研究分担者 松井政則 埼玉医科大学 微生物学教室 准教授
研究協力者 高山俊輔 城西大学 薬学部 大学院
須田達也 埼玉医科大学 専攻生

研究要旨

我々は昨年度までに、SARS コロナウイルス及び A/H5N1 亜型鳥インフルエンザウイルス由来の HLA-A*0201 (HLA-A2) 拘束性 CTL エピトープを多数同定し、その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てマウスに免疫し、ペプチド特異的 CTL を誘導することに成功した。本年度は、同様の手法を用いてインフルエンザワクチンの開発に向けた検討を行った。ペプチド結合リポソームによるウイルス特異的 CTL の誘導を検討し、H1N1, H3N2, H5N1 亜型ウイルスを使ってウイルスチャレンジ実験を行なった。その結果、我々のペプチド結合リポソームは、HLA-A2 トランスジェニックマウスにおいて、極めて効率よく CTL を誘導し、3 種類の亜型ウイルスの感染を効率よく抑えることがわかった。このように、我々のペプチド結合リポソームが、どの亜型ウイルスにも効果があるユニバーサルワクチンに発展する可能性が示された。

A. 研究目的

CTL は、ウイルス粒子上の表面タンパクのみでなく、種々の亜型間で保存された内部タンパクも抗原として認識するので、H1N1, H3N2, H5N1 などの様々な亜型に有効なワクチンが開発可能と思われる。我々は、昨年度までに、変異の多い HA と NA を除いて、変異の少ない内部タンパク、調節性タンパクである M1, M2, NP, PA, PB1, PB2, NS から HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを同定することに成功した。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 トランスジェニックマウスに免疫して、ウイルス特異的 CTL が誘導されることを示した。本年度は、このペプチド結合リポソームによるウイルス特異的 CTL の誘導を詳細に検討すること、及びペプチド結合リポソームで免疫したマウスが、さまざまな亜型インフルエンザウイルスに対して感染抵抗性を示すかどうかを調べることを目的とした検討を行った。

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

H5N1 インフルエンザウイルスの 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 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) 合成ペプチドの HLA-A2 分子への結合親和性の測定

予測したエピトープに相当するペプチドを合成し、HLA-A2 分子に対する結合親和性を、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。

3) CTL エピトープの同定

予測したエピトープに相当するペプチドでパルスした脾細胞を同系のマウスに静脈投与した。7 日後に脾細胞を回収し、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。

- 4) 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に結合させ、ペプチド結合リポソームを作製し、CpG と混和して HLA-A2 トランスジェニックマウスの皮下に免疫した。細胞内サイトカイン陽性 CTL の測定と *in vivo* CTL assay により、インフルエンザウイルス特異的 CTL が誘導できるかどうかを検討した。
 - a) 細胞内サイトカイン陽性 CTL の測定：
免疫 7 日後に、マウス脾細胞をペプチドで抗原刺激した。その後、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) *in vivo* CTL assay：
免疫 7 日後に、異なる濃度の CFSE で染色し、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、免疫マウスに細胞移入し、ペプチドでパルスした脾細胞が特異的に破壊されるか否かをフローサイトメトリーで測定した。
- 5) ウイルスチャレンジ
マウスをペプチド結合リポソームで免疫し、1 週後に、H1N1 (A/PR/8/34), H3N2 (A/Aichi/2/68) ウイルスを鼻から感染させ、4 日後に肺のウイルス量を測定した。また、免疫 1 週後に、致死量の H1N1 (A/PR/8/34) または、H5N1 (A/HK/483/97) ウイルスを感染させ、体重変化、生存率を測定した。

(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。H1N1, H3N2 ウイルスを使用した実験は、BSL2 施設 (埼玉医大) で、H5N1 ウイルスの実験は、BSL3 施設 (北大) で行なった。

C. 研究結果

- 1) H5N1 亜型インフルエンザウイルス由来 CTL エピトープの同定
2 種類のエピトープ予測ソフト (BIMAS & SYFPEITHI) を用いて、9 個のアミノ酸からなる配列を、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。次に、ナイーブな HLA-A2 トランスジェニックマウスの脾細胞に、47 種類の予測エピトープに相当するペプチドをパルスして X 線照射後、別の HLA-A2 トランスジェニックマウスの静脈に移入した。免疫マウスの脾細胞を回収して、ペプチドで *in vitro* 刺激し、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。その結果、47 種類のうち 9 種類のペプチド (M1-1, M1-6, M2-1, Ms-3, NS1-1, PB1-2, PB1-3, PB1-10, PB2-1)) がペプチド特異的に CTL を誘導した (Fig. 1)。

- 2) ペプチド結合リポソームによる CTL の誘導
上述のように同定された 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た。このペプチド結合リポソームを CpG と共に HLA-A2 トランスジェニックマウスの皮下に免疫し、ペプチド特異的 CTL が誘導されるか否かを検討した。

免疫 1 週間後に脾細胞を調整し、ペプチドで刺激して、ペプチド特異的に誘導される CD8 陽性 IFN- γ 陽性 CTL の検出を試みた (Fig. 2)。その結果、M1-1, M2-3, NS1-1, PB1-2, PB1-3 の 5 つで強力に CTL が誘導された (Fig. 2)。特に、M1-1, NS1-1, PB1-2 で極めて強く CTL が誘導された。一方、残りの M2-1, PB1-10 は 2 回免疫すると、有意に CTL を誘導することができたが、M1-6, PB1-2 は 2 度免疫後もほとんど CTL は誘導されなかった (Fig. 2)。なお、同じペプチド量のペプチド溶液と CpG を混合して免疫しても、まったく CTL は誘導されなかった。M1-1 結合リポソームは特に抗原性が強かったので、通常の免疫量 (100 μ l) よりも低い様々な濃度で免疫して効果を調べたところ、0.1 μ l (1000 倍希釈) の投与量でも、有意に CTL が誘導できた (Fig. 3)。従って、M1-1 結合リポソームは極めて効率良く CTL を誘導することが明らかとなった。

次に、IFN- γ 産生 T 細胞を誘導した 7 つのペプチド結合リポソームでマウスを免疫して、*in vivo* CTL アッセイで、CTL による killing 活性を調べた (Fig. 4)。その結果、3 つのペプチド結合リポソーム、M1-1, NS1-1, PB1-2 で極めて良好にペプチド特異的な細胞障害活性がみられた (Fig. 4)。

- 3) ペプチド結合リポソームによるメモリー CTL の誘導

HLA-A2 トランスジェニックマウスに、1週間隔で3回、M1-1, NS1-1, PB1-2のペプチド結合リポソームを皮下注射して免疫した。3回目の免疫から60日後にその脾臓細胞を調整し、それぞれのペプチドで抗原刺激して、CD8陽性IFN- γ 陽性CTLの数を測定した(Fig. 5)。その結果、M1-1できわめて高い頻度のメモリーCD8T細胞が誘導された(28.9%) (Fig. 5)。一方、NS1-1, PB1-2においても有意にメモリーCD8T細胞が検出された(Fig. 5)。なお、このアッセイでは、わずか5時間のin vitro抗原刺激しか行っていないので、抗原に対してCTLがin vitroで増殖したとは考えにくく、Fig. 5に示された値は、マウスの脾臓におけるペプチド特異的CD8T細胞の数である。

4) インフルエンザウイルス感染抵抗性の誘導
インフルエンザウイルスによるチャレンジ実験を行なった。HLA-A2 トランスジェニックマウスにM1-1, NS1-1, PB1-2を結合したリポソームとCpGの混合物を皮下投与して、1週間後にH1N1, H3N2ウイルスを経鼻感染させて、4日後に肺のウイルス量を測定した(Fig. 6)。その結果、ペプチド結合リポソームとCpGで免疫した場合、空のリポソームとCpGで免疫した場合よりも、有意にウイルス量を抑えることができた(Fig. 6)。

同様に、マウスにM1-1, NS1-1, PB1-2結合リポソームとCpGを皮下投与した後、致死量のH5N1, H1N1ウイルスを感染させ、体重変化を計測した(Fig. 7)。2種類のウイルス共に、非免疫対照群では顕著な体重減少の後に、死亡したが、ペプチド結合リポソーム投与群では体重変化がほとんどみられず、ウイルス感染後2週間経過後無徴候でも生存した(Fig. 7)。

D. 考察

H5N1 インフルエンザウイルスの内部構造タンパク由来のHLA-A*0201拘束性CTLエピトープが多数同定された。これらのCTLエピトープペプチドとリポソームとの結合物は高効率に抗原特異的CTLを誘導した。溶液状のペプチドによってはCTLが誘導できなかったことから、インフルエンザウイルスに特異的なCTLの誘導にペプチドとリポソームとの結合が必須であると考えられた。

E. 結論

以上の結果から、我々の同定したCTLエピトープからなるペプチド結合リポソームは、H5N1ウイルスをはじめとするA型インフルエンザウ

イルス感染を抑える、効果の高いワクチンになりうる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohno, S., S. Kohyama, M. Taneichi, O. Moriya, H. Hayashi, H. Oda, M. Mori, A. Kobayashi, T. Akatsuka, T. Uchida, and M. Matsui.
Synthetic peptides coupled to the surface of liposomes effectively induce SARS coronavirus-specific cytotoxic T lymphocytes and viral clearance in HLA-A*0201 transgenic mice.
Vaccine (2009) in press.
- 2) 松井 政則、高山 俊輔、内田 哲也
特集I:感染症に対するワクチンの開発とその免疫理論
SARSワクチンの開発
臨床免疫・アレルギー科 第50巻 第5号511-517, 2008

2. 学会発表

- 1) Analysis of the topology of the microsomal epoxide hydrolase on the cell surface with monoclonal antibodies with different epitope specificities.
Duan, H., K. Yoshimura, N. Kobayashi, A. Takagi, M. Matsui, S. Ohno, K. Sugiyama, C. Morisseau, B. D. Hammock, and T. Akatsuka.
ASPET meeting in San Diego, USA April 5-9, 2008
- 2) Highly efficient anti-viral CD8⁺ effector and memory T cell induction without T cell help by peptides coupled to the surface of liposomes.
Takagi, A., M. Matsui, O. Moriya, N. Kobayashi, T. Akatsuka: Department of Microbiology, Saitama Medical University, Moroyama-cho, Iruma-gun, Saitama, Japan.
Oda, H., M. Mori, A. Kobayashi: Drug Delivery System Development Division, Nippon Oil and Fat Corporation, Tokyo 150-6019 Japan
Taneichi, M., T. Uchida: Department of Safety Research on Blood and Biological products, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011

Japan

Fronteers in Immunology
Conference(Frontiers in Immunological
Memory)

Newport Beach, USA September 26-27, 2008

- 3) ペプチド表面結合リポソームはCD4ヘルプなしに抗ウイルスCD8⁺メモリーT細胞を誘導する

高木徹、松井政則、守屋修、赤塚俊隆、小林信春 (埼玉医大・微生物学)

種市麻衣子、内田哲也 (国立感染症研究所・安全性研究部)

第56回 日本ウイルス学会 2008年10月26日

- 4) 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

高木徹、松井政則、赤塚俊隆 (埼玉医大・微生物学)

種市麻衣子、内田哲也 (国立感染症研究所・安全性研究部)

日本ワクチン学会 2008年11月8日

- 5) Memory CD8 T cell induction without CD4 T cell help by peptides coupled to the surface of liposomes.

Takagi, A., M. Matsui, O. Moriya, N. Kobayashi, H. Oda, M. Mori, H. Yamamura, M. Taneichi, T. Uchida, and T. Akatsuka. The 15th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses San Antonio, Texas, USA October 5-9, 2008

- 6) Memory CD8⁺ T cell induction without CD4⁺ T cell help by peptides coupled to the surface of liposomes.

Takagi, A., S. Ohno, O. Moriya, M. Matsui, T. Akatsuka (埼玉医大); Taneichi, M., T. Uchida (国立感染症研)

第38回 日本免疫学会 2008年12月1日

- 7) Phospholipase A₂ may promote membrane-raft budding and fission

Shinozaki, R., T. Nakano, I. Inoue, M. Matsui, T. Akatsuka, K. Tanaka, M. Akita, S. Hokari, S. Katayama, and T. Komoda. 日本生化学会 2008年12月19日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) 発明の名称:鳥インフルエンザウイルスワクチン
出願番号:特願 2008-303444 出願日:2008年11月28日(金)
発明者:内田哲也、種市麻衣子(国立感染症研)、梶野喜一(北海道大学)、松井政則(埼玉医大)、小田洋(日油)
- 2). 発明の名称: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
出願番号:特願 2008-304965 出願日:2008年11月28日(金)
発明者:内田哲也(国立感染症研)、松井政則(埼玉医大)、小田洋(日油)

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し