

2009 (2033A)

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

細胞性免疫誘導型リポソームワクチンの創製に  
関する研究

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 内田 哲也

平成 22 (2010) 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

細胞性免疫誘導型リポソームワクチンの創製に  
関する研究

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 内田 哲也

平成 22 (2010) 年 3 月

## 目 次

I.	総括研究報告	
	細胞性免疫誘導型リポソームワクチンの創製に関する研究……………	1
	内田 哲也	
II.	分担研究報告	
	1. CTL誘導型インフルエンザワクチンの臨床応用に向けた検討……………	5
	高田 礼人	
	2. CTL誘導型C型肝炎ワクチンの臨床応用に向けた検討……………	10
	赤塚 俊隆	
	3. CTL誘導型エボラ出血熱ワクチンの臨床応用に向けた検討……………	18
	松井 政則	
	4. 臨床応用に適したアジュバントの開発……………	24
	石井 健	
	5. リポソーム結合抗原の生体内・細胞内動態の解析……………	30
	垣内 史堂	
	6. CTL誘導におけるリポソームの性能評価……………	34
	種市 麻衣子	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表……………	40
IV.	研究成果の刊行物・別刷……………	43

# I. 総括研究報告

## 細胞性免疫誘導型リポソームワクチンの創製に関する研究

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** 細胞性免疫誘導型インフルエンザワクチンの実用化に向け、ペプチド-リポソーム結合条件の最適化、アジュバントの検索、インフルエンザウイルスタンパク質の抗原性・機能解析等を行った。また、インフルエンザワクチン開発と同様の手法を用いてエボラワクチンの候補となりうる CTL エピトープの検索・同定を行った。C型肝炎ワクチンに関しては治療型ワクチンとしての応用も念頭に置き、免疫原性を高めるためのエピトープの改変および HCV 感染に伴う免疫抑制の解除の方策を検討した。さらに、本ワクチンの臨床応用に適したアジュバントの開発、インフルエンザワクチンの作用機序の解析、リポソームワクチンによる細胞性免疫誘導機序の解析、等を行った。

### 分担研究者

喜田 宏（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターセンター長、教授）  
高田 礼人（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター副センター長、教授）  
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）  
石井 健（大阪大学微生物病研究所准教授）  
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）  
野崎 周英（財団法人化学及血清療法研究所試作研究部部長）

ンを用いて、表面抗原を変異させて抗体による免疫応答から逃れるタイプのウイルスに対するワクチンを創製することを目的とする。

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、ウイルス抗原に特異的な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内部のタンパク由来の CTL 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。

### A. 研究目的

本研究は我々がこれまでに開発した、細胞性免疫を誘導することの出来るリポソームワクチ

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。本研究では現在開発が待たれているインフルエンザワクチン、C型肝炎ワクチン、およびエボラワクチンの開発に向けた検討を行う。

## B. 研究方法

(1) CTL 誘導型インフルエンザワクチンの臨床応用に向けた検討：ワクチンの実用化に向けた検討として、ペプチド-リポソーム結合条件の最適化、アジュバントの検索、インフルエンザウイルスタンパク質の抗原性・機能解析およびエピトープの探索を行った。

(2) C型肝炎ワクチンの創製に関する研究：C型肝炎ワクチンの用いる HCV 由来 CTL エピトープの改変、および HCV 感染によって誘導される免疫抑制を解除する方策につき検討を行った。

(3) エボラウイルスに対する CTL 誘導型ワクチンの開発：エボラウイルス由来 CTL エピトープを検索してエボラワクチンの候補となりうるリポソーム結合ペプチド 94 種類を作製し、各々につき抗原特異的 CTL の誘導効果を検討した。

(4) 臨床応用に適したアジュバントの開発：ヒト型 CpGODN の K タイプおよび D タイプにつきラージスケールでの作製を試みた。アジュバントの作用機序を解明する一環としてインフルエンザワクチンによるウイルス感染抵抗性誘導の機序を解析した。

(5) 抗原提供細胞によるリポソーム結合抗原の取り込みに関する検討：我々が開発したリポソームワクチンが細胞性免疫を誘導する機序を解明することを目的として、抗原提供細胞がリポソーム結合抗原を貪食・消化し、抗原エピトープを T 細胞に呈示する過程について種々の阻害剤を用い、共焦点顕微鏡解析、FACS 解析を行った。

(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) CTL 誘導型インフルエンザワクチンの臨床応用に向けた検討：抗原ペプチドのリポソームへの結合効率を最適化する量比が得られた。またインフルエンザウイルスの RNA をアジュバントとして利用する可能性を示唆する結果が得られた（国立感染研・種市）。インフルエンザウイルス HA 分子上の抗体のエピトープが同定された（北海道大学・高田）。

(2) C型肝炎ワクチンの創製に関する研究：HCV core 領域由来の CTL エピトープの一部につきアミノ酸置換を行った結果、免疫増強効果および免疫寛容の成立した宿主における CTL 誘導が確認された。また、HCV 感染に伴う免疫抑制をリポソームに結合した抗体が解除し、免疫抑制のかかったマウスに CTL を誘導することに成功した（埼玉医大・赤塚）。

(3) エボラウイルスに対する CTL 誘導型ワクチンの開発：作製した 94 種類のエボラワクチン候補物質のうち 24 種類が高効率に抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導することが確認され、エボラワクチンとしての可能性が期待された（埼玉医大・松井）。

(4) 臨床応用に適したアジュバントの開発：K タイプのヒト型 CpGODN につき、安定して GMP 準抛のロットが回収出来たことから、これを用いた前臨床試験の実施が可能であると考えられた。また、インフルエンザワクチンによるウイルス感染抵抗性の誘導においてインフルエンザウイルス RNA による Toll 様受容体-7 を介した樹状細胞の活性化の重要性を示唆する結果が得られた（阪大微研・石井）。

(5) 抗原提供細胞によるリポソーム結合抗原の取

り込みに関する検討：我々が開発したリポソーム結合抗原は通常とは異なる経路で抗原提供細胞の細胞質に送達され、消化を受けることを示唆する結果が得られた（東邦大医・垣内）。

#### D. 考察

ペプチド-リポソーム結合条件を検討した結果、高効率にペプチドをリポソーム表面に結合させることの出来る量比が求められた。アミノ酸分析によるリポソーム結合抗原の定量の結果と免疫応答との容量反応関係を検討した結果、マウスあたり 8.5ng というきわめて微量の抗原によって顕著に CTL が誘導されることが確かめられ、リポソーム結合抗原の免疫効率の高さが示唆された。本年度得られたこれらの結果を踏まえ、来年度以降はインフルエンザワクチンの前臨床試験に向けて、リード化合物の設定、容量反応関係の解析、臨床治験における効果の確認マーカー（指標）の設定等を行う。

また、インフルエンザワクチンと同様のコンセプトによりエボラワクチンの創製が期待出来るワクチン候補物質が今年度得られたことから、今後は実験動物を用いた感染実験の実施に向けた検討を行う。

C型肝炎ワクチンに関しても、我が国において特に望まれる治療型ワクチンへの応用が期待されるワクチン抗原、抗体結合リポソームの処方が今年度得られた。

インフルエンザウイルスの RNA がインフルエンザワクチンによる感染抵抗性誘導の機序と深くかかわっていることが明らかとなり、CpGODN はこれを代替する作用を有することが示唆された。この知見は今後細胞性免疫誘導型ワクチンの構成を検討する上できわめて有用であると考えられる。

#### E. 結論

CTL 誘導型インフルエンザワクチンの実用化に向け、抗原（ペプチド）-リポソーム結合条件の検討、臨床応用可能なアジュバントの開発、インフルエンザワクチンの作用機序の解析、等が行われた。同様のコンセプトによりエボラワクチンの候補物質が作製され、C型肝炎ワクチンについても、治療用としての応用可能性が期待されるワクチン処方が開発された。

#### 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）
  - 1) 鳥インフルエンザワクチン（国際特許）  
出願番号：PCT/JP2009/70053  
出願日：2009年11月27日  
発明者：内田哲也、種市麻衣子（国立感染症研）、松井政則（埼玉医大）、梶野喜一（北海道大学）、小田洋（日油）
  - 2) 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  
（国際特許）  
出願番号：PCT/JP2009/70043  
出願日：2009年11月27日  
内田哲也、種市麻衣子（国立感染症研）、松井政則（埼玉医大）、小田洋（日油）

3) 鳥インフルエンザウイルスワクチン (国内特  
許、追加出願)

出願日：2009年12月21日

発明者：内田哲也、種市麻衣子 (国立感染  
研)、松井政則 (埼玉医大)、梶野喜一 (北  
海道大学)、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

CTL誘導型インフルエンザワクチンの臨床応用に向けた検討

研究分担者 高田礼人 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター  
教授  
研究協力者 吉田玲子 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター  
博士研究員  
宮本洋子 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター  
技術補佐員

**研究要旨**

インフルエンザウイルスおよびフィロウイルスを用いて、ウイルス蛋白質の抗原性・機能解析およびエピトープの探索を行った。H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させたサル血清および合成ペプチドを用いて、ヘマグルチニン分子上に抗体のエピトープを同定した。同様に、エボラウイルスを感染させたサル血清および合成ペプチドを用いて、表面糖蛋白質分子上に抗体のエピトープを同定した。さらに、マールブルグウイルスの表面糖蛋白質に対するモノクローナル抗体を作出し、中和活性および感染性増強活性を解析した結果、ウイルス株間でそれぞれの抗体誘導能に差が認められることが判明した。

**A. 研究目的**

インフルエンザウイルス

インフルエンザ A ウイルスには様々な亜型が存在する。亜型とは表面糖蛋白質ヘマグルチニン(HA)(16 種類)およびノイラミニダーゼ(9 種類)の抗原性によって決定される血清型であり、抗血清を用いた通常の中和試験において異なる亜型間で交差反応しないことを指標に分類されている。よって、亜型間交差反応性の中和抗体は殆ど存在しないと考えられてきた。一方、抗原性が類似しているウイルス内部蛋白質に対する細胞障害性 T 細胞を誘導すれば、亜型の異なるウイルスに対する交差感染防御が成立することが知られている。本研究は、亜型間交差感染防御免疫に着目し、共通エピトープの探索と免疫方法の検討を目的とする。

フィロウイルス

フィロウイルス科はマールブルグウイルス属およびエボラウイルス属からなる。現在のところ、マールブルグウイルスは一属一種のみが知られているのに対し、エボラウイルス

属は 5 種 (Zaire、Sudan、Cote d'Ivoire、bundibugyo および Reston) に分類されている。これらのウイルスは進化系統的に「種」として分類されるだけでなく、ウイルス表面糖蛋白質の抗原性も異なっており、血清中に誘導される抗体の交差反応性も非常に低い事が分かっている。また、フィロウイルスに対する抗体の中にはウイルスの感染性を増強する抗体が存在するため、感染防御免疫における細胞障害性 T 細胞の重要性が指摘されている。本研究は、フィロウイルス種間交差反応性抗体および細胞障害性 T 細胞のエピトープの探索を目的とする。

**B. 研究方法および結果**

H5N1 インフルエンザウイルスヘマグルチニンのエピトープ解析

ベトナムでヒトから分離された H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルス株 A/Vietnam/1194/04 (VN1194) および北海道で野鳥から分離された非病原性 H5 ウイルス由来の HA を持つ H5N1 亜型のワクチン株

A/duck/Hokkaido/Vac-1/2004 (Vac-1) の HA のアミノ酸配列を基にペプチドを合成した。実験的に Vac-1 をワクチンとして皮下または鼻腔内に接種した後に VN1194 で攻撃したサル血清を用いて、ELISA を行い血清中の抗体が反応するペプチドの検索を行った結果、HA1 領域に Vietnam1194 と Vac-1 に共通のエピトープが同定された ( PVNDLCYPGDFNDYEELKHL 、 FNDYEELKHLISRINHFEDI および GNFIAPYAYKIVKKGSTI) (図1)。しかし、個体差が認められ、これらのペプチドに反応したのは調べた6匹中、数匹であった。

#### H1N1 インフルエンザウイルスヘマグルチニンのエピトープ解析

新型 H1N1 インフルエンザウイルス (Sw1 H1N1) の HA 遺伝子は、北米型ブタインフルエンザウイルスに由来する。この HA 遺伝子は、1918年にヒトにスペイン風邪のパンデミックを引き起こした H1N1 ウイルス (Spa H1N1) の HA 遺伝子と共通の祖先から分岐したと考えられている。一般に、ブタインフルエンザウイルスの HA 遺伝子はヒトのウイルスと比較して進化速度が遅いことから、Sw1 H1N1 HA は Spa H1N1 HA と類似した抗原構造を保持している可能性がある。そこで、ホモロジーモデリング法を用いて、Sw1 H1N1、Spa H1N1 および最近の季節性 H1N1 ウイルスの HA の抗原構造を比較した。

H1 HA は、4つの異なる抗原領域 (Sa、Sb、Ca、Cb) を持つことが知られている。その結果、季節性 H1N1 ウイルスではすべての抗原領域にアミノ酸変異が認められたのに対し、Sw1 H1N1 HA の抗原構造は Spa H1N1 に非常に似ていることが分かった (図2)。特に、Sa および Sb 領域に変異の蓄積は見られなかった。この結果は、今後ヒトの抗体圧力によって、Sw1 H1N1 の Sa および Sb 領域にアミノ酸変異が蓄積する可能性を示唆している。さらに、今後起こりうるアミノ酸置換を、過去の変異パターンから予測し、それらの変異が、すでに一部の新型 H1N1 ウイルスで見ついていることを確認した。

#### エボラウイルスの種間共通エピトープのスクリーニング

エボラウイルスの表面糖蛋白質のアミノ酸

配列をもつ合成ペプチドを抗原に、マウス血清および感染サル血清中の抗体が反応するエピトープを ELISA で探索した結果、数箇所のエピトープを同定した。しかし、いずれも中和抗体の認識するエピトープではなかった。今後、エボラウイルスの表面糖蛋白質の結晶構造をもとに、中和エピトープとなり得る位置に存在し、かつ種間で共通のアミノ酸配列をもつ合成ペプチドを作出し、それらに対する抗血清の中和活性を解析する予定である。

#### フィロウイルスの表面糖蛋白質に対する抗体の性状解析

病原性の異なる二種類のマールブルグウイルス、Angola 株および Musoke 株の表面糖蛋白質を持つウイルス様粒子をそれぞれマウスに接種して抗血清を作成し、豚水疱性口炎ウイルスの G 蛋白質を Angola 株および Musoke 株 GP に置換したシュードタイプウイルスを用いて、中和活性および感染性増強活性を解析した結果、マールブルグウイルス株間でも交差中和反応性が限られていることが判明した。さらに、各株の GP に対するモノクローナル抗体を作出し、誘導される抗体の性状を比較した結果、Angola 株および Musoke 株 GP の間で中和抗体クローンの誘導能に差は見られないが、Angola 株 GP は感染増強抗体クローンをより多く誘導することが明らかとなった。また、感染増強抗体の認識するエピトープは GP のムチン様領域に多く存在することが分かった。面白い事に、エボラウイルスの一部の株に反応するモノクローナル抗体も得られた。中和抗体のエピトープに関しては、現在解析中である。

#### C. 考察

インフルエンザウイルスに対する抗血清の中和活性は亜型間で殆ど交差反応しないが、これまでの研究で、亜型間交差中和活性を示すモノクローナル抗体の存在が明らかになっている。これらの抗体は多くの亜型で共通する HA 分子上の中和エピトープを認識する。しかし、自然感染においてこれらのような抗体は殆ど産生されないと思われる。したがって、亜型間交差反応性細胞障害性 T 細胞応答の誘導とともに、交差反応性抗体を強く誘導できる方法を開発すれば、様々な亜型のウイ

ルスに対して効果的な感染防御免疫を賦与できる可能性がある。

現在までに、エボラウイルスに対するワクチン開発が様々な手法で実験的に試みられている。現在、有望なワクチン候補として期待されているのは、アデノウイルスまたはブタ水胞性口炎ウイルスにエボラウイルスの遺伝子の一部を人工的に組込んだ遺伝子組換えウイルスワクチンである。これらに共通するのは、細胞障害性T細胞応答を誘導できる生ワクチンであることである。一方、これまでに、ウイルスに対する抗体を患者に投与する受動免疫法が試みられてきたが、その効果は限られている。血清中にはウイルスの感染性を中和する抗体の他に、感染性を増強する抗体が存在するため、このような血清で治療を行った場合には、病気を悪化させる可能性も考えられる。一方、ウイルスの感染性を中和するモノクローナル抗体のみを投与する事によって予防・治療効果がある事が、マウスおよびモルモットを使った実験で報告されている。しかし、霊長類での感染防御効果は十分に検討されていない。また、受動免疫法を考える場合、フィロウイルス種間共通中和エピトープの存在の有無が重要な要素となるだろう。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Igarashi, M., Ito, K., Yoshida, R., Tomabechi, D., Kida, H., and Takada, A. (2010) Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. PLoS ONE 5(1): e8553.

##### 2. 学会発表

1) Different efficiency of C-type lectin-mediated entry between filoviruses.

Takada, A.

43rd Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program, Philadelphia, USA., July 22, 2009

2) ホモロジーモデリング法による新型 H1N1 インフルエンザウイルスのヘマグルチニンの抗原構造の解析

五十嵐学, 伊藤公人, 吉田玲子, 喜

田宏, 高田礼人

第 56 回 日本ウイルス学会 2009 年 10 月 26 日

3) インフルエンザウイルスのヘマグルチニンの MDS 解析と変異予測への応用

伊藤公人, 五十嵐学, 村上悌治, 喜田宏, 高田礼人

第 56 回 日本ウイルス学会 2009 年 10 月 26 日

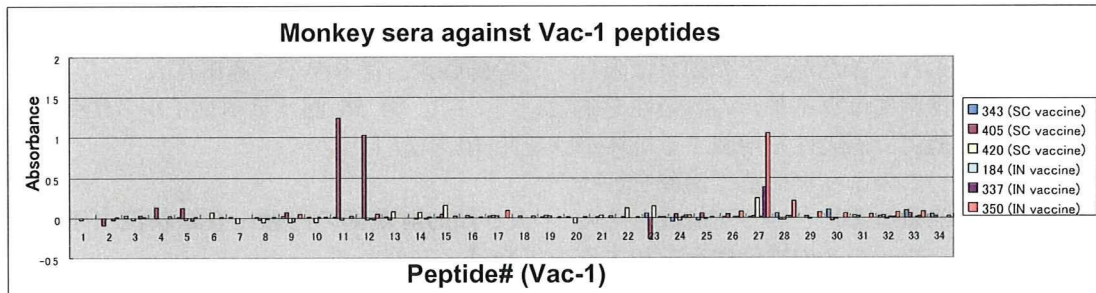
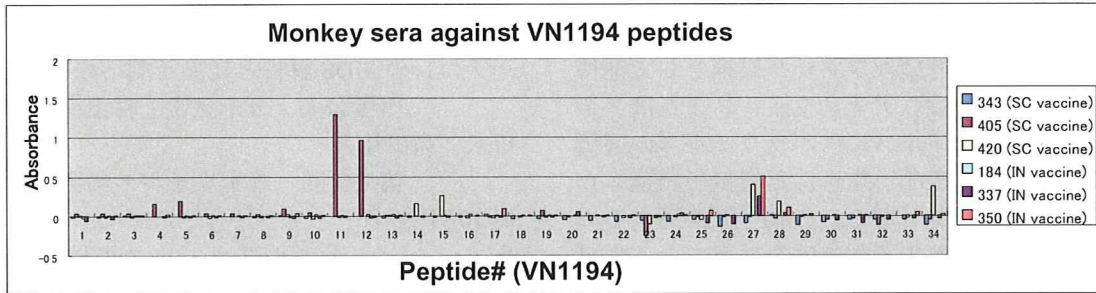
4) マールブルグウイルスの抗体依存性感染増強現象の解析

中山絵里, 苫米地大輔, 岸田典子, 松野啓太, 宮本洋子, 高田礼人

第 56 回 日本ウイルス学会 2009 年 10 月 27 日

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当無し



	VN1194	Vac-1
Peptide 11	PVNDLCYPGDFNDYEELKHL	PINGLCYPGDFNDYEELKHL
Peptide 12	FNDYEELKHLLSRINHFEKI	FNDYEELKHLLSSTNHFEKI
Peptide 27	GNFIAPEYAYKIVKKG DSTI	GNFIAPEYAYKIAKKG DSAI

図1 H5HA上のエピトープ

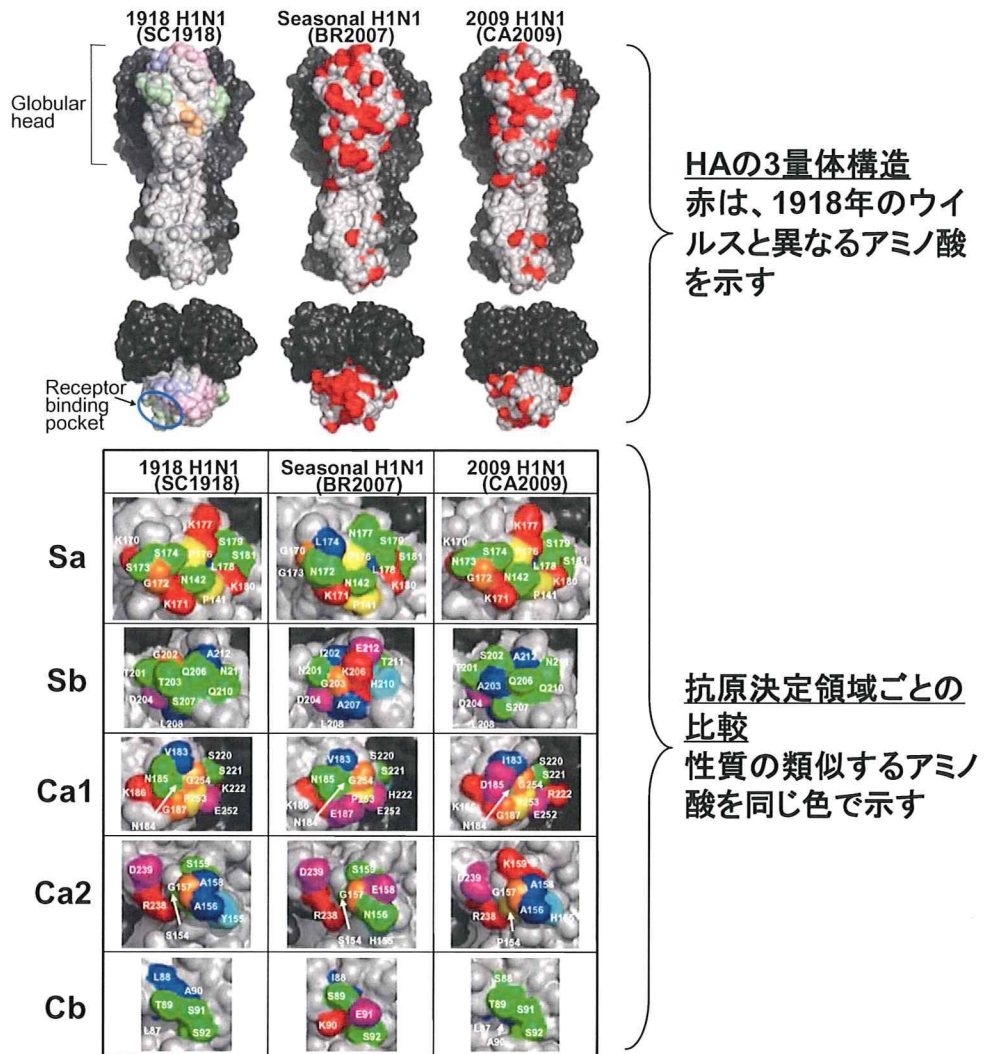


図2 H1N1 HA上の抗原決定領域の構造比較

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）

分担研究者： 赤塚俊隆（埼玉医大・微生物学・教授）  
協力研究者： 守屋 修（埼玉医大・微生物学・准教授）  
協力研究者： 小林信春（埼玉医大・微生物学・講師）  
協力研究者： 高木 徹（埼玉医大・微生物学・助手）

**研究要旨** C型肝炎ウイルス（HCV）に対する感染防御効果を示すリポソームワクチンの構成成分として、これまでにウイルス構造タンパク領域について同定できたエピトープのうち、core領域のエピトープペプチドの1つについてアミノ酸置換を行い、免疫効果の増強に成功した。このエピトープペプチドのワクチンは、野生型の配列を持つワクチンと比較して、CTL誘導活性やIFN- $\gamma$ 産生誘導能がより優れているだけでなく、組換えワクシニアウイルスに対する感染防御効果も高い。しかもcoreタンパクに対して免疫寛容が成立しているトランスジェニックマウスでもCTLを誘導することが確認され、HCVタンパクに対する免疫が抑制され慢性持続感染に陥っている慢性肝炎患者の治療にも使える可能性が示唆された。一方今回は非構造タンパク領域からNS3について新たなエピトープを検索し、有効な感染防御効果を示すエピトープが2つ同定できた。最後にこれらのワクチンを慢性C型肝炎の治療にも応用するため、免疫抑制経路PD-1/PD-L1をブロックする抗体もリポソームに結合したワクチンを検討した。その結果、HCV coreタンパクにより免疫抑制がかかっているマウスでも、その抑制作用を受けずにCTLを誘導できることが証明された。

**A. 研究目的**

これまでの研究で、C型肝炎ウイルス（HCV）に対する感染防御効果を示すリポソームワクチンの構成成分として、HLA-A2拘束性エピトープがウイルス構造タンパク領域（core、E1、E2）から計4つ同定できた。しかしHCVの免疫原性は他のウイルスと比較して低いとされており、われわれのリポソームワクチンにおいても、モデルとして最初に検討したLCMウイルスのリポソームワクチンと比較するとその反応は低く、組換えワクシニアウイルスに対する感染防御効果も結果にバラつきがみられ、改良の余地が残されていた。またわが国では慢性感染者の救済が急務となっている現状があり、本研究では治療ワクチンとしての応用も視野に入れて行う必要がある。HCVが

持続感染しやすいメカニズムの1つとして、そのcoreタンパクが重要な働きをしていることを示唆する多くの報告があり、core遺伝子を発現するトランスジェニックマウスではCTL反応が抑制されてウイルス感染が持続しやすいこと、そしてその背景にはT細胞表面に抑制性の受容体であるPD-1が発現し、そのリガンドであるPD-L1も肝臓中で発現が増強していることが知られている。今回われわれはcore遺伝子トランスジェニックマウスを東大・感染症内科の小池和彦教授から分与を受け、治療ワクチンの実験に使用することができた。

**B. 研究方法**

- 1) ペプチド合成：Operon社に合成を委託した。
- 2) HLA-A2 binding assay：T2細胞（ $3 \times 10^5$ /well）を

96 穴プレート中で 10 mg/ml の  $\beta$ 2-microglobulin11 と異なる濃度のペプチドと共に 1 晩インキュベートし、洗浄後抗 HLA-A2.1 抗体 BB7.2 と FITC 標識抗マウス IgG と反応させた。洗浄後フローサイトメトリーで HLA-A2.1 の発現を測定し、以下の計算式により fluorescence index (FI) を算出した。(mean fluorescence with peptide - mean fluorescence without peptide)/mean fluorescence without peptide。各々の値から BB7.2 非添加での fluorescence のバックグラウンドを差し引いて計算した。

### 3) CTL assay

a) In vivo CTL assay : 免疫後 7 日目にペプチドシリスの有無と異なる濃度の CFSE ラベルで 2 種類に分かれる脾細胞を静注し、翌日移入した脾細胞の障害性をフローサイトメトリーで測定した。

b) Ex vivo CTL assay : 免疫後 7 日目に脾細胞を分離し、ペプチドシリスした脾細胞と共に 6 日間培養後、 $^{51}\text{Cr}$  標識したペプチドシリス標的細胞 RMA-HHD に対する障害活性を測定した。

4) ELISPOT : 免疫後 7 日目に脾細胞を分離し、BD Bioscience の測定キットを用い、ペプチドシリスした脾細胞と共に 2 日間培養後、産生された IFN- $\gamma$  を検出した。

5) ワクシニアウイルスチャレンジ実験 : 免疫後 7 日目に HCV タンパクを発現する組換えワクシニアウイルス (W-core または W-NS3) を  $2 \times 10^6$  PFU i. p. 投与し、5 日後に脾臓に存在するウイルス量を BSC-1 細胞を用いたブランク形成法で定量した。

6) マウス : HLA-A2 Tg マウスは Dr. F. A. Lemonnier から供与を受けた HHD を繁殖させ用いた。Core トランスジェニックマウスは東京大学・感染症内科・小池和彦教授から供与を受けたものを繁殖させ、HHD とかけあわせた F1 マウスを実験に用いた。コントロールとして C57BL/6 と HHD の F1 マウスを用いた。

#### (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。

## C. 研究結果

### 1) エピトープペプチドのアミノ酸置換実験

HCV core 領域に存在する HLA-A2 拘束性エピトープの 1 つについて、9 つのアミノ酸をそれぞれ Alanine で置換する実験を行った。Wild type (WT) を含む 10 のペプチドの HLA-A2 との affinity を図 1A に示す。これらのペプチドを IFA と共に HLA-A2 transgenic mice に免疫し、CTL assay を行った実験結果のうち、WT と 1A, 8A の 3 つのペプチドの結果を図 1B に示す。いずれも HLA-A2 との affinity に大差はないが、1A では CTL 誘導能が殆ど失われ、一方 8A では増強が認められリポソームワクチンの成分としても有効であると期待された。しかしこれら 3 種のペプチドをそれぞれリポソーム表面に結合してみると in vivo CTL assay (図 2A) でも ELISPOT (IFN- $\gamma$ ) assay (図 2B) でも、Lip-8A より Lip-1A の方が強い免疫原性を示した。Core タンパクを発現する組換えワクシニアウイルス (W-core) によるチャレンジ実験でも同様に、Lip-1A が最も優れた効果を示した (図 2C)。

このようにリポソームは IFA とは異なるアジュバント効果を示すことが分かったが、更にそれを慢性 C 型肝炎の治療にも応用する可能性を探るために、core タンパクを発現し、core に対する免疫寛容が成立しているトランスジェニックマウス (Core Tg) に免疫してみた。その結果、野生型マウス (WT) に比較すると低いものの、Lip-1A では Core Tg においても有意な反応が ELISPOT (IFN- $\gamma$ ) assay (図 3A) で認められた。免疫後 W-core でチャレンジしてみると Lip-1A 免疫マウスで有意な感染防御効果が認められた (図 3B)。このことから、HCV に対する免疫反応が抑制されている慢性 C 型肝炎患者に Lip-1A を投与すれば、ウイルスの増殖を抑えられることが期待された。

### 2) 新規 NS3 エピトープの同定

これまでの研究では、リポソーム結合により有効な抗 HCV 効果を示すエピトープは構造領域 (Core, E1, E2) のみしか見つけられなかった。しかし構造領域と比較して非構造領域の方がウイルス増殖の初期において必須な機能を果たしており、ウイルス株の間でアミノ酸配列もよく保存されていて、CTL ワクチンの構成成分としてより適



している。HCV と同じフラビウイルス科に属するデング、日本脳炎、黄熱病などのウイルスでは非構造領域の中でも NS3 領域に特に多くのドミナントエピトープが見つかっている。そこで HCV でもリポソーム結合に使用できるエピトープを新たに NS3 領域から探索する価値があると考えられた。そして予備的な実験として、C57BL/6 などの H-2b ハプロタイプのマウスの CTL エピトープである NS3603-611 ペプチドを試したところ、非常に優れた感染防御効果を示すことが分かった (図4)。

そこでまず HCV-1a 株の NS3 のアミノ酸置換の HLA-A2 結合モチーフを 2 種のコンピュータープログラムで解析し、どちらかのスコアが高いものから順に 25 種類の候補を選んだ (表1)。このうち 6 種は既にエピトープとして報告されているが、残りの 19 種は未報告である。このうち水に不溶性の #22 を除き、24 種のペプチドを 4 つのグループに分けて混合し、それぞれをリポソームに結合した。得られた 4 種のリポソームワクチンをそれぞれ HLA-A2 Tg マウスに免疫し、NS3 タンパク発現細胞交換ワクチンアウイルス (W-NS3) でチャレンジしてみると、図5A に示すように、II と III のグループの中に強い抗 HCV 作用を発揮するものが存在することが分かった。各グループのどれが該当するペプチドであるのかを決定するため、免疫マウスの ELISPOT と CTL assay を、各々のペプチドについて行った (図5B-E)。表2にあるように、それらの結果に基づいて 6 つの最終候補を選んだ。そして今度はそれぞれを再合成後、単独でリポソームに結合させた。それを HLA-A2 Tg マウスに免疫し、ELISPOT (図6A) と CTL assay (図6B)、そして W-NS3 でのチャレンジ実験を行った (図6C)。その結果、#3 が最も強力な抗 HCV 効果を示し、#13 がそれに次ぐ成績を示すことが判明した。

### 3) リポソームを利用した抑制性シグナル PD-1/PD-L1 経路の抗原特異的遮断法の検討

我々は前年度までの研究で、LCM ウイルス clone13 株によるマウスの持続感染モデルを用い、リポソーム表面に抗原ペプチドと共に抗 PD-L1 抗体を結合することにより、抗原特異的に抑制性シグナルをブロック出来ることを示した。今回同様な効果を慢性 C 型肝炎でもあげられる可能性を証明するために、1) で用いたのと同じ core Tg

マウスを用いた。Lip-GP33 を Core Tg と WT マウスに免疫して比較すると、脾臓中のリンパ球では大差がなかったが、肝臓中のリンパ球の反応を見ると Tg で有意に低下していることが ELISPOT (図7A) と CTL assay (図7B) の両実験で示された。両者のマウスに LCMV Armstrong 株を感染させて免疫した実験でも同様であった (図7C)。これらの結果はこれまで報告されているように、Core Tg マウスでは PD-L1 が肝臓中に高発現しているためだと思われる。この状況下での抗体結合リポソームの効力をテストするために、図7A, B と同じ実験を抗体結合リポソームも加えて行い比較した。昨年度検討した抗体結合リポソームは、抗原ペプチド 5 mg と抗体 1 mg の比率で結合させていたが、今回の実験で用いたものは、抗原ペプチド 1 mg と抗体 5 mg の比率で作成してあった。抗原量が相対的に少なかったためか、GP33 に対する反応は抗体結合リポソームで低下していた。しかしこれを Core Tg マウスに免疫して脾臓中のリンパ球を調べてみると、WT マウスよりむしろ反応が有意に高いという興味ある結果を得た (図8A (ELISPOT)、8B (CTL assay))。抗 PD-L1 抗体もリポソーム表面に結合することにより、Core Tg マウスの肝臓にある PD-L1 を高発現している抗原提示細胞にワクチンが選択的に結合し、抑制経路を遮断するだけでなく、むしろより効率的に抗原提示が行われると考えられた。これを確認するために Lip-NP396 についても抗体結合リポソームとの比較を行った (図8C (ELISPOT))。ここでは (5:1) と (1:5) の 2 種の結合比率のリポソームを比較した。すると予想通り (1:5) では反応が低く、(5:1) では Core Tg マウスで反応増加が認められた。以上から抗体結合リポソームが肝臓中で PD-L1 の発現が亢進する慢性 C 型肝炎での治療に効果を発揮する可能性が示唆された。

## D. 考察

HCV に対する CTL 反応は、HBV など他のウイルス感染と比較すると弱く、われわれがこれまでの研究で感染防御効果を示したエピトープペプチドも、LCMV のそれと比較するとはるかに弱く、その結果のばらつきも大きく再現性に乏しかった。今回 core 領域エピトープのアミノ酸置換と、NS3 領域の新規エピトープ探索の 2 つのアプローチ

により、より優れた抗原ペプチドを手にすることができた。慢性C型肝炎の治療への応用についても、core Tg マウスを用いた実験で、その可能性が高いことが証明できた。次のステップは、今回得られたワクチンが、他の形態のHCV ワクチンと比較して優れていることを証明することと、core Tg マウスでウイルス持続感染系を確立し、そこでの治療成績を示すことであると思われる。

## E. 結論

組換えワクシニアウイルスでのチャレンジ実験で優れた成績を示すエピトープペプチドがcore とNS3 領域で見いだされた。Core Tg マウスでの免疫効果から、慢性C型肝炎の治療にも応用出来る可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Akira Takagi, Masanori Matsui, Satoshi Ohno, Hongying Duan, Osamu Moriya, Nobuharu Kobayashi, Hiroshi Oda, Masahito Mori, Akiharu Kobayashi, Maiko Taneichi, Tetsuya Uchida, Toshitaka Akatsuka. Highly Efficient Antiviral CD8+ T-Cell Induction by Peptides Coupled to the Surfaces of Liposomes. *Clinical Vaccine Immunology* 16(10): 1383-1392, 2009.

### 2. 学会発表

該当なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

### 1. 特許取得

Core 領域のエピトープ1A とNS3 領域で新規に同定したエピトープ#3、#13 について、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

表1 HLA-A2結合モチーフをもつHCV-1a NS3領域の候補配列

No.	BIMAS	SYFPEITHI	Report	Pool
#1	735.9	29	+	I
#2	294.5	23		II
#3	231.1	23		II
#4	78.8	21	+	I
#5	69.6	23		II
#6	54.4	13		II
#7	29.1	25	+	I
#8	27.6	-		II
#9	27.6	17		III
#10	26.2	21		II
#11	25.0	19		III
#12	23.2	22		III
#13	23.1	20		III
#14	21.4	26		III
#15	10.5	21		III
#16	7.8	20		IV
#17	7.5	16		IV
#18	7.1	18		IV
#19	6.9	19		IV
#20	319.9	24	+	I
#21	118.2	26	+	I
#22	83.5	28		
#23	21.4	26		IV
#24	17.4	16		IV
#25		3	+	I

2種のコンピュータープログラム (BIMASとSYFPEITHI) での予測値、+ : エピトープとしてすでに報告があるもの、I-IV : リポソーム結合の際に混合した4つのグループ、#22は不溶性のためリポソーム結合から除外した。

表2 各ペプチドを用いたELISPOT (IFN-γ) assayとCTL assayの結果

Group	Pep #	ELISPOT-1	ELISPOT-2	CTL-1	CTL-2
I	#1	6	4	5.1	4.1
	#4	8	9	4.9	2.2
	#7	1	21.5	3.1	1.4
	#20	0	3	N.D.	-1.4
	#21	22	17.5	4.2	-0.4
	#25	14	16	0.6	9.5
II	#2	15	225	N.D.	-8.7
	#3	Pos.	735	18.2	42.8
	#5	4	18	-15.4	-5.5
	#6	12	0	-13.0	-11.2
	#8	19	1	-9.8	34.2
	#10	5	10.5	-5.5	N.D.
III	#9	5	7	1.3	0.1
	#11	20	1.5	2.4	3.1
	#12	16	1.5	2.0	5.4
	#13	560	67	64.3	34.1
	#14	44	6	24.2	38.4
IV	#15	6	9	1.3	12.8
	#16	5	2.5	13.6	-20.8
	#17	440	8.5	21.8	18.4
	#18	10	8.5	8.9	-17.2
	#19	130	8	24.1	0.6
	#23	Pos.	245	42.3	15.8
	#24	14	-1	22.5	20.0

ELISPOTは $1 \times 10^6$ の脾細胞あたりの陽性細胞数、CTL assayはE/T ratio = 50:1での% specific lysisの値を示す。

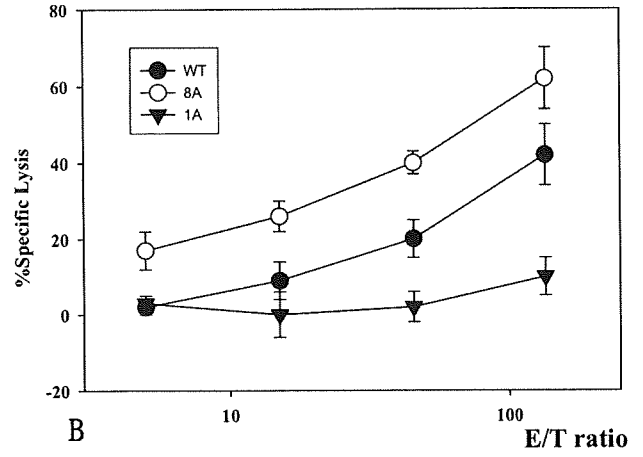
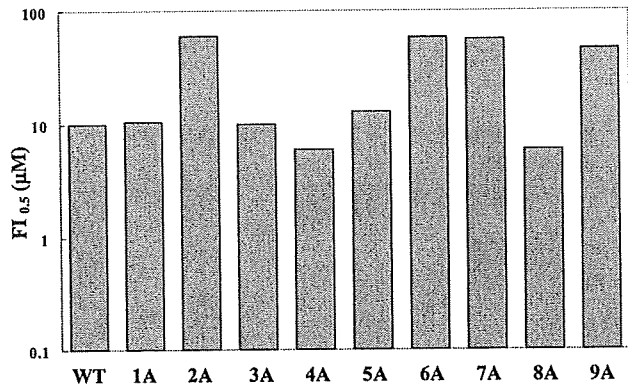


図1 A 各アミノ酸をAlaで置換したcore領域エピトープペプチドのHLA-A2 binding B WT, 1A, 8Aの免疫原性 各ペプチド50 mgをIFAと共に免疫し (s.c.)、1週後に脾細胞のCTL assayをWTペプチドでパルスした標的細胞に対して行った。

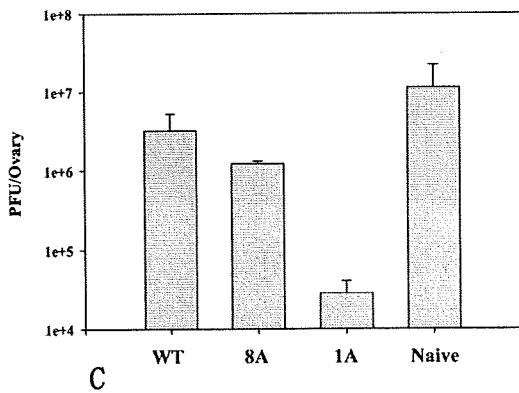
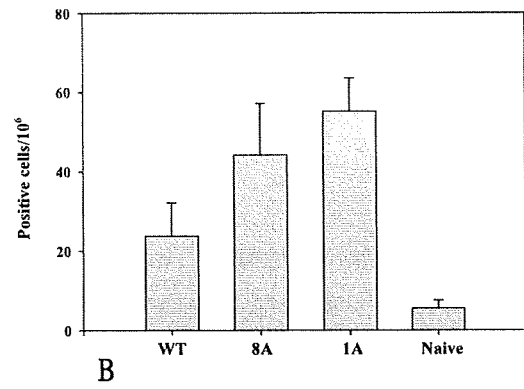
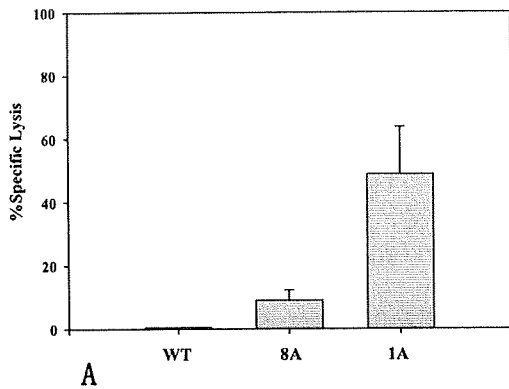


図2 WT, 1A, 8A免疫マウスのIn vivo CTL assay (A)、ELISPOT (IFN-g) assay (B)およびCoreタンパク発現組換えワクシニアウイルスによるチャレンジ実験 (C)

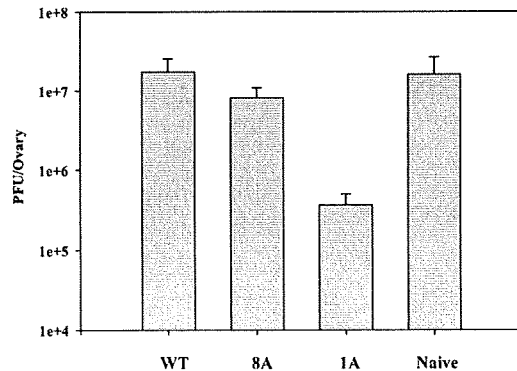
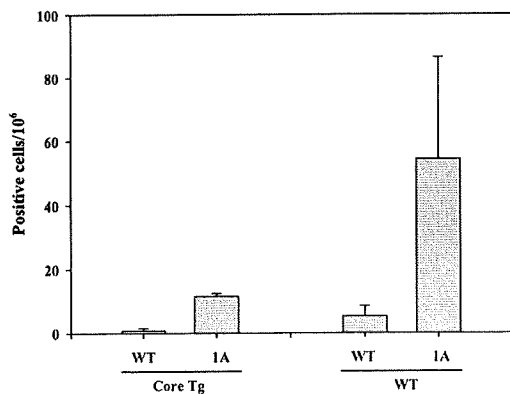


図3 A Lip-WTとLip-1AでCore TgマウスとWTマウスを免疫したマウスのELISPOT (IFN-g) assay、 B Lip-WT, Lip-1A, Lip-8Aで免疫したCore TgマウスのVV-coreによるチャレンジ実験

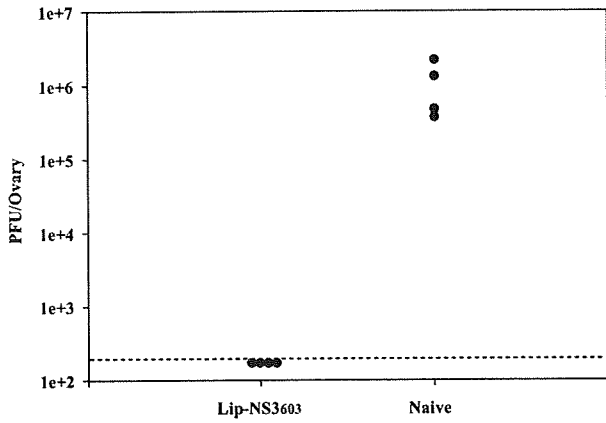


図4 Lip-NS3603-611で免疫したC57BL/6マウスとナイーブマウスに対するNS3発現組換えワクシニアウイルス (VV-NS3) によるチャレンジ実験

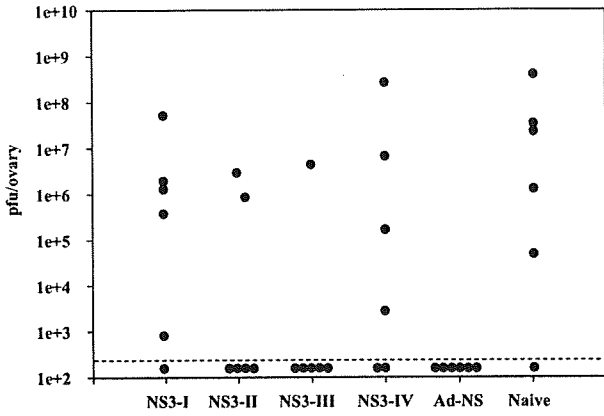
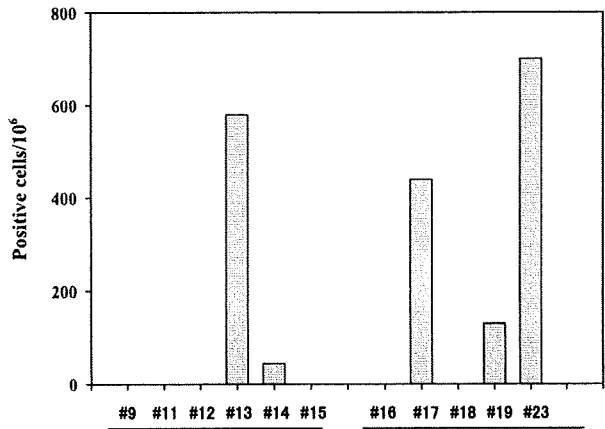
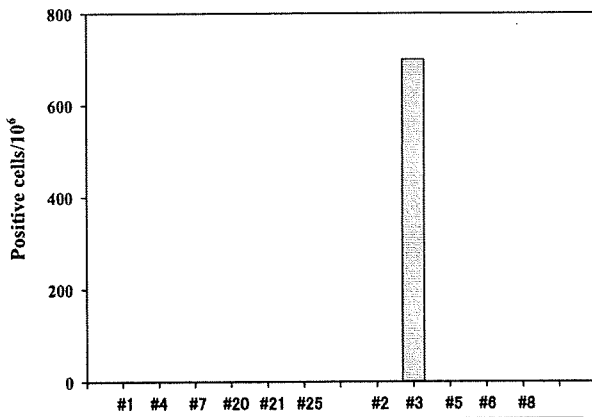


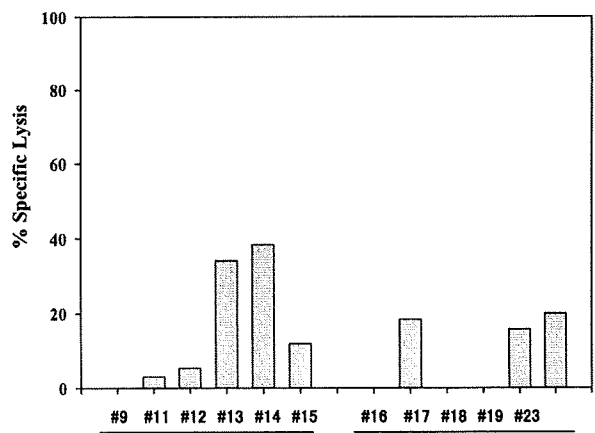
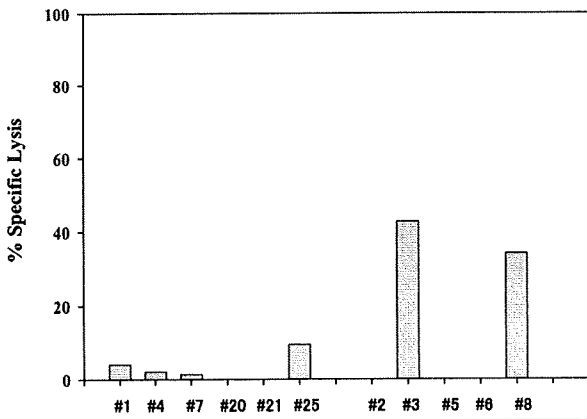
図5 4つのLip-NS3ペプチドグループ (I-IV) によるHLA-A2 Tgマウスの免疫結果  
 A: VV-NS3でのチャレンジ実験、Ad-NS: 組換えアデノウイルスで免疫した陽性コントロール、B, C: 各ペプチドを用いたELISPOT (IFN- $\gamma$ ) assay、D, E: 各ペプチドを用いたCTL assay

A



B

C



D

E