

図6 6つの最終候補NS3ペプチド結合リポソームによる免疫実験 A: ELISPOT (IFN- γ) assay、B: CTL assay、C: VV-NS3でのチャレンジ実験、AdNS: 組換えアデノウイルスで免疫した陽性コントロール

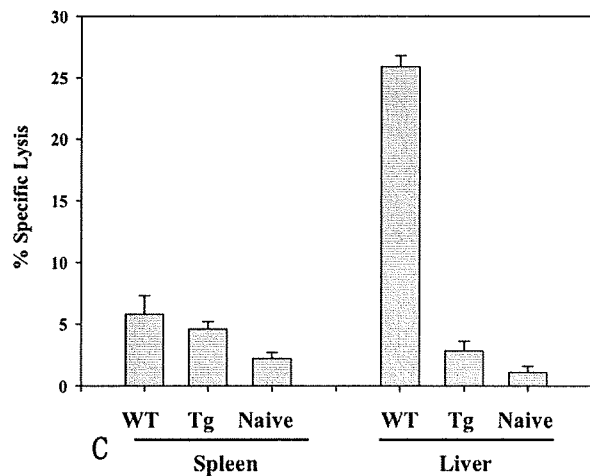
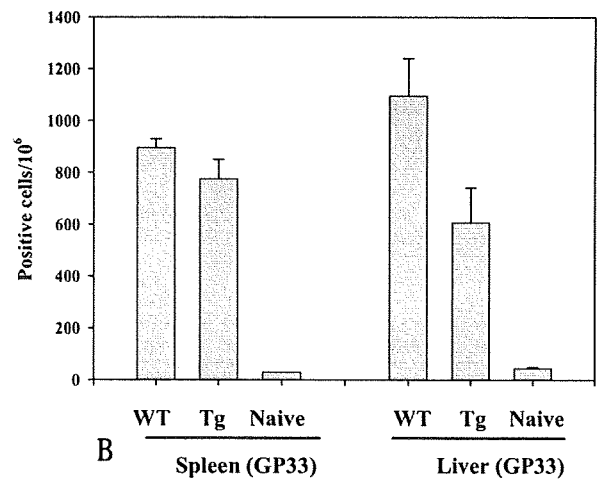
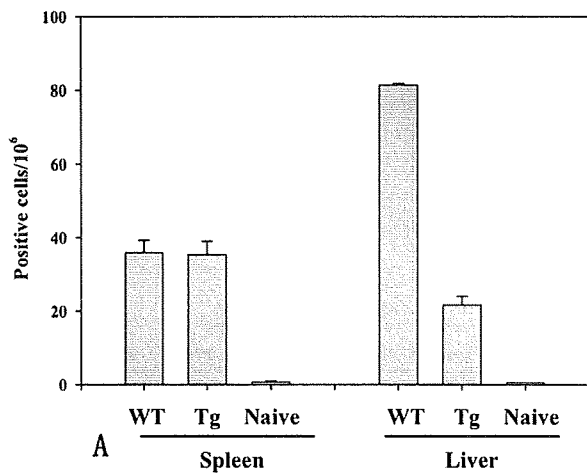


図7 Core TgマウスとWTマウスの脾臓と肝臓におけるCTL誘導の比較 A: Lip-GP33で免疫し、ELISPOT (IFN- γ) assayを脾臓と肝臓中のリンパ球について行った、B: Lip-GP33で免疫し、CTL assayを脾臓と肝臓中のリンパ球について行った、C: LCMV Armstrongで免疫し、GP33に対するELISPOT (IFN- γ) assayを脾臓と肝臓中のリンパ球について行った。

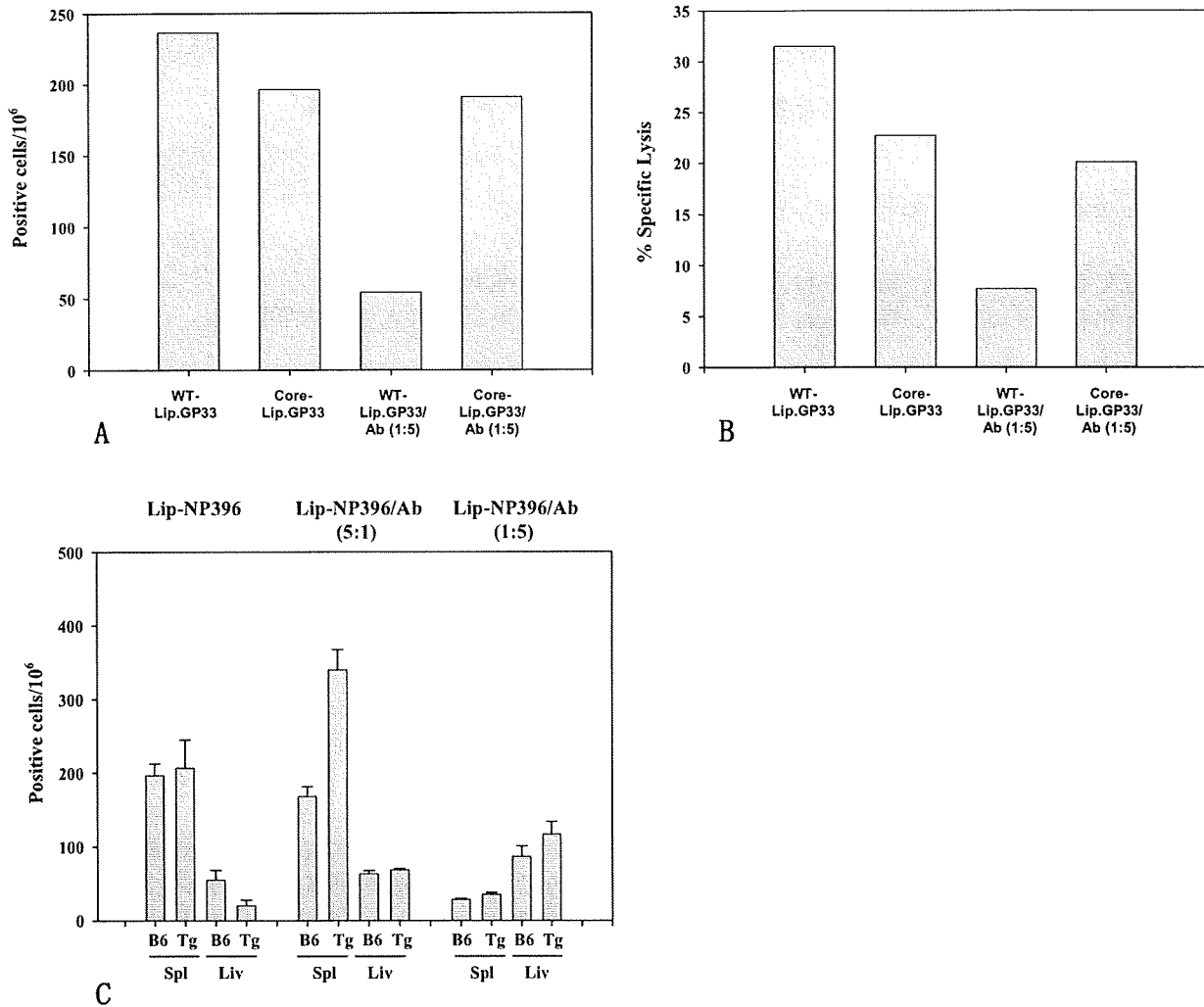


図8 Core TgマウスとWTマウスの脾臓と肝臓における抗体結合リポソームによるCTL誘導 A: Lip-GP33またはLip-GP33/aPD-L1で免疫し、CTL assay assay を、脾臓と肝臓中のリンパ球について行った、 B: Lip-GP33またはLip-GP33/aPD-L1で免疫し、ELISPOT (IFN- γ) assayを脾臓と肝臓中のリンパ球について行った、 C: Lip-NP396、Lip-NP396/aPD-L1 (5:1の結合比率)またはLip-NP396/aPD-L1 (1:5の結合比率)で免疫し、ELISPOT (IFN- γ) assay を、脾臓と肝臓中のリンパ球について行った。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

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

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 須田達也 埼玉医科大学 特別研究学生（東京薬科大学 大学院生）

研究要旨

我々は、今までに、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で、マウスにウイルス特異的 CTL を効率よく誘導することに成功した。本研究では、エボラ出血熱の原因であるエボラウイルスについて、ペプチド結合リポソームを用いた CTL 誘導型ワクチンの開発を目標に、エボラウイルス由来 CTL エピトープを多数同定し、ペプチド結合リポソームによるエボラウイルス特異的 CTL の誘導を検討する。本年度は、まず、コンピュータープログラムにより、HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープを 94 種類予測した。そして、これらのエピトープのペプチドを合成し、そのペプチドでパルスした脾細胞で HLA-A2 トランスジェニックマウスを免疫して、ペプチド特異的に誘導される IFN- γ +CD8⁺T 細胞の数を測定した。その結果、24 種類のペプチドがペプチド特異的に IFN- γ +CD8⁺T 細胞を誘導することがわかった。さらに、それら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、マウスに免疫して、ペプチド特異的に IFN- γ +CD8⁺T 細胞が誘導されるかどうかを検討した。その結果、14 種類のペプチド結合リポソームが有意にペプチド特異的 IFN- γ +CD8⁺T 細胞を誘導した。特に、4 種類のペプチド結合リポソームで極めて強く誘導された事により、ペプチド結合リポソームが、エボラウイルスに対する効果の高いワクチンになりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

現在、エボラ出血熱に対する効果的な予防・治療法はなく、ワクチンの開発は急務である。生き延びた感染者に、エボラウイルス特異的 CTL やウイルスに対する中和抗体が存在することは証明されており、通常のウイルス感染と同様に、体液性免疫及び細胞性免疫がウイルス排除に関与すると考えられる。しかし、サルを用いた実験において、ウイルス中和抗体だけでは、エボラウイルスをコントロールすることは不十分であることが報告された。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ためには、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。しかし、エボラ出血熱における細胞性免疫の研究はほとんど行われておらず、エボラウイルスの CTL エピトープは、わずかしかわかっていない。本研究の目的は、エボラウイルスに対して、ペプチド結合リポソームを用いた CTL 誘導型ワクチンを開発することである。そのために、本年度は、エボラウイルスに対する HLA-A2 拘束性の CTL エピトープを多数同定し、その

エピトープを結合させたペプチド結合リポソームが、ペプチド特異的 IFN- γ +CD8⁺T 細胞を効率よく誘導できるかどうかを検討した。

B. 研究方法

- 1) HLA-A2 トランスジェニックマウス
マウス MHC クラス I と β 2-マイクログロブリン (β 2-m) をノックアウトしたマウスに、ヒト MHC クラス I の一つである HLA-A2 とヒト β 2-m 遺伝子をいれたトランスジェニックマウスを使用した。
- 2) コンピューターによる CTL エピトープの予測
エボラウイルス（ザイル型）を構成する 7 つのタンパク質 (NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24, L) 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、2 種類のコンピュータープログラム、「BIMAS」と「SYFPEITHI」で、9 個のアミノ酸からなる 94 種類の CTL エピトープを予測した。これらのエピトープに相当するペプチドは、人工合成（オペロン社）された。
- 3) HLA-A2 分子への結合アフィニティの

れた。

3) HLA-A2 分子への結合アフィニティの測定

それぞれのペプチドの HLA-A2 分子に対する結合アフィニティを、HLA-A2 遺伝子を導入・発現させた TAP 欠損細胞株、RMA-S-HHD 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、結合アフィニティを計算した。

4) 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 HLA-A2 トランスジェニックマウス脾細胞を、マウスに静脈注射して免疫した。免疫7日後に、脾細胞を調整し、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 IFN- γ +CD8⁺T 細胞数を、フローサイトメトリーで測定した。

5) 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 CpG を混ぜて HLA-A2 トランスジェニックマウスの footpad に免疫した。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、フローサイトメトリーで、誘導されたエピトープ特異的 IFN- γ +CD8⁺T 細胞数を測定した。

(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。

C. 研究結果

1) CTL エピトープの予測

エボラウイルス (ザイール型) を構成する7つのタンパク質 (NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24, L) のアミノ酸配列から、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個のアミノ酸配列を、NP から13種類、VP35 から10種類、VP40 から4種類、GP から10種類、VP30 から3種類、VP24 から9種類、L から45種類 (計94種類) 選択し、その合成ペプチドを作製し

た。

2) HLA-A2 分子への結合アフィニティの測定

予測したペプチドの HLA-A2 分子への結合アフィニティを、RMA-S-HHD 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アフィニティを示し、予測が良好であることがわかった (表1)。その中でも、極めて結合アフィニティが高い (BL50 <100 μ M) ペプチドが25種類存在した。

3) 予測したエピトープによる

IFN- γ +CD8⁺T 細胞の誘導

ナイーブな HLA-A2 トランスジェニックマウスの脾細胞に、94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て免疫した。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、フローサイトメトリーで細胞内 IFN- γ +CD8⁺T 細胞の誘導を測定した。その結果、94種類のうち24種類のペプチド (NP, 3種類; VP35, 1種類; VP40, 0種類; GP, 4種類; VP30, 3種類; VP24, 1種類; L, 12種類) がペプチド特異的に IFN- γ +CD8⁺T 細胞を誘導した (図1)。

4) ペプチド結合リポソームによる IFN- γ +CD8⁺T 細胞の誘導

24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。そして、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 (footpad) に免疫した。免疫1週間後、脾細胞を調整してそれぞれのペプチドで刺激し、ペプチド特異的に IFN- γ +CD8⁺T 細胞が誘導されるかどうかを検討した。その結果、14種類のペプチド結合リポソーム (NP-6, NP-7, VP45-2, GP-3, GP-4, GP-7, GP-10, VP30-2, L-10, L-12, L-19, L-22, L-29, L-39) で、有意にペプチド特異的 IFN- γ +CD8⁺T 細胞が誘導された (図2)。特に、GP-25, L-293, L-209, L-771 を結合させたリポソームは極めて強い誘導能を示した (図2)。

D. 考察

エボラウイルスを構成するタンパク質から、多くの CTL エピトープが同定された。これらのエピトープとリポソームの結合物は、効率よくペプチド特異的に IFN- γ +CD8⁺T 細胞を誘導した。従って、有効なワクチンとなりうるかもしれない。今

後は、これらのペプチド結合リポソームによって誘導された CTL が、十分なペプチド特異的 killing 活性をもつこと、及び、内在性抗原を認識することを検討する予定である。

E. 結論

エボラウイルスから予測した CTL エピトープを結合したリポソームは、強力にペプチド特異的 IFN- γ +CD8⁺T 細胞を誘導した。従って、エボラウイルスに対して、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* 27:3912-3920, 2009.
- 2) Kohyama, S., S. Ohno, T. Suda, M. Taneichi, S. Yokoyama, M. Mori, A. Kobayashi, H. Hayashi, T. Uchida, and M. Matsui.
Efficient induction of cytotoxic T lymphocytes specific for severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from a non-structural polyprotein 1a. *Antiviral Res.* 84:168-177, 2009.
- 3) Matsui, M., S. Kohyama, T. Suda, S. Yokoyama, M. Mori, A. Kobayashi, M. Taneichi, and T. Uchida.
A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A*0201 transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391:1494-1499, 2010.
- 4) Takagi, A., M. Matsui, S. Ohno, H. Duan, O. Moriya, N. Kobayashi, H. Oda, M. Mori, A. Kobayashi, M. Taneichi, T. Uchida, and T. Akatsuka
Highly efficient anti-viral CD8⁺T cell induction by peptides coupled to the surface of liposomes. *Clin. Vaccine Immunol.* 16:1383-1392, 2009.

- 5) Hu, P., H.-D. Hu, M. Chen, M.-L. Peng, L. Tang, K.-F. Tang, M. Matsui, M. L. Belladonna, T. Yoshimoto, D.-Z. Zhang, R. Xiang, and H. Ren
Expression of Interlukins-23 and 27 leads to successful gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Mol. Immunol.* 46: 1654-1662, 2009.
 - 6) Nakano, T., I. Inoue, S. Shinozaki, M. Matsui, T. Akatsuka, S. Takahashi, K. Tanaka, M. Akita, M. Seo, S. Hokari, S. Katayama, and T. Komoda.
A possible role of lysophospholipids produced by calcium-independent phospholipase A2 in membrane-raft budding and fission. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes* 1788:2222-2228, 2009.
 - 7) Chen Y.-Z., G. Liu, S. Senju, Q. Wang, A. Irie, M. Haruta M. Matsui, F. Yasui, M. Kohara, and Y. Nishimura
Identification of SARS-CoV spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitope by using a new muramyl dipeptide-derivative adjuvant *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* (in press) 2010.
- ### 2. 学会発表
- 1) SARS コロナウイルスの polyprotein 1a 由来 HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープの同定と、そのペプチドを結合したリポソームによる細胞傷害性 T 細胞の誘導
高山俊輔、須田達也、種市麻衣子、赤塚俊隆、内田哲也、松井政則
第 13 回日本ワクチン学会 札幌
2009 年 9 月
 - 2) Efficient induction of SARS coronavirus-specific CTLs by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from nucleocapsid and a non-structural polyprotein 1a
Shunsuke Kohyama, Tatsuya Suda, Maiko Taneichi, Tetsuya Uchida, and Masanori Matsui
第 39 回 日本免疫学会 大阪 2009 年 12 月
 - 3) Identification of HLA-A24-restricted CTL epitopes of SARS-CoV protein
Chen Yu-Zhen, Gang Liu, Satoru Senju, Qidi Wang, Atsushi Irie, Miwa Haruta Masanori Matsui, Fumihiko Yasui, Michinori Kohara,

and Yasuharu Nishimura

第 39 回 日本免疫学会 大阪 2009
年 12 月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

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

該当無し

3. その他

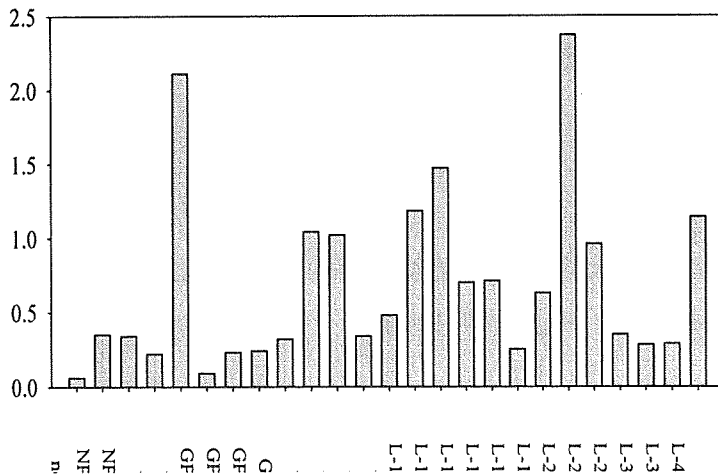
該当無し

表1 エボラウイルスから予測した CTL エピトープの
HLA-A*0201 分子への結合アフィニティの測定

peptide	BL50(μ M)		peptide	BL50(μ M)		peptide	BL50(μ M)	
NP-1	66.3	High	GP-6	150.1	Medium	L-16	388.1	Low
NP-2	85.5	High	GP-7	72.5	High	L-17	69.2	High
NP-3	352.7	Low	GP-8	128.3	Medium	L-18	95.7	High
NP-4	178.9	Medium	GP-9	3561.7	Low	L-19	91.8	High
NP-5	251.5	Low	GP-10	138.0	Medium	L-20	149.7	Medium
NP-6	116.4	Medium	VP30-1	349.9	Low	L-21	189.9	Medium
NP-7	129.9	Medium	VP30-2	113.2	Medium	L-22	195.2	Medium
NP-8	410.9	Low	VP30-3	633.1	Low	L-23	76.5	High
NP-9	90.3	High	VP24-1	78.7	High	L-24	108.6	Medium
NP-10	144.1	Medium	VP24-2	191.5	Medium	L-25	238.1	Low
NP-11	127.3	Medium	VP24-3	142.5	Medium	L-26	1295.0	Low
NP-12	196.7	Medium	VP24-4	168.0	Medium	L-27	231.3	Low
NP-13	93.4	High	VP24-5	ND	ND	L-28	5590.3	Low
VP35-1	311.2	Low	VP24-6	233.6	Low	L-29	98.4	High
VP35-2	53.6	High	VP24-7	219.2	Low	L-30	540.6	Low
VP35-3	139.4	Low	VP24-8	1055.5	Low	L-31	93.0	High
VP35-4	ND	ND	VP24-9	340.9	Low	L-32	113.4	Medium
VP35-5	112.4	Medium	L-1	178.6	Medium	L-33	224.5	Low
VP35-6	90.7	High	L-2	122.7	Medium	L-34	157.9	Medium
VP35-7	600.3	Low	L-3	100.2	Medium	L-35	84.2	High
VP35-8	106.3	Medium	L-4	89.7	High	L-36	116.5	Medium
VP35-9	84.7	High	L-5	45.3	High	L-37	162.2	Medium
VP35-10	15.7	High	L-6	63.5	High	L-38	100.2	Medium
VP40-1	139.0	Medium	L-7	ND	ND	L-39	93.1	High
VP40-2	322.7	Low	L-8	214.0	Low	L-40	218.9	Low
VP40-3	223.7	Low	L-9	57.3	High	L-41	63.4	High
VP40-4	ND	ND	L-10	106.7	Medium	L-42	99.5	High
GP-1	145.6	Medium	L-11	191.5	Medium	L-43	161.1	Medium
GP-2	126.1	Medium	L-12	113.3	Medium	L-44	118.0	Medium
GP-3	152.4	Medium	L-13	101.2	Medium	L-45	51.5	High
GP-4	55.0	High	L-14	3570.0	Low			
GP-5	3500.7	Low	L-15	ND	ND			

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

BL₅₀ in peptide-binding assay. High, less than 100 μ M; medium, 100-200 μ M; Low, more than 20 μ M; ND: not detected.



数 (割合) をフローサイトメトリーで測定した。図には、IFN-γ+CD8+T 細胞を有意に誘導した 24 種類のペプチドの結果を示す。

図 1 Peptide-pulsed Spleen cells による IFN-γ+CD8+ T 細胞の誘導

マウスの脾細胞に、94 種類のペプチドをそれぞれパルスして、X 線照射して、別のマウスの静脈に細胞移入して免疫した。1 週間後、その脾細胞を調整して、各々のペプチドで刺激し、誘導される

IFN-γ+CD8+T 細胞

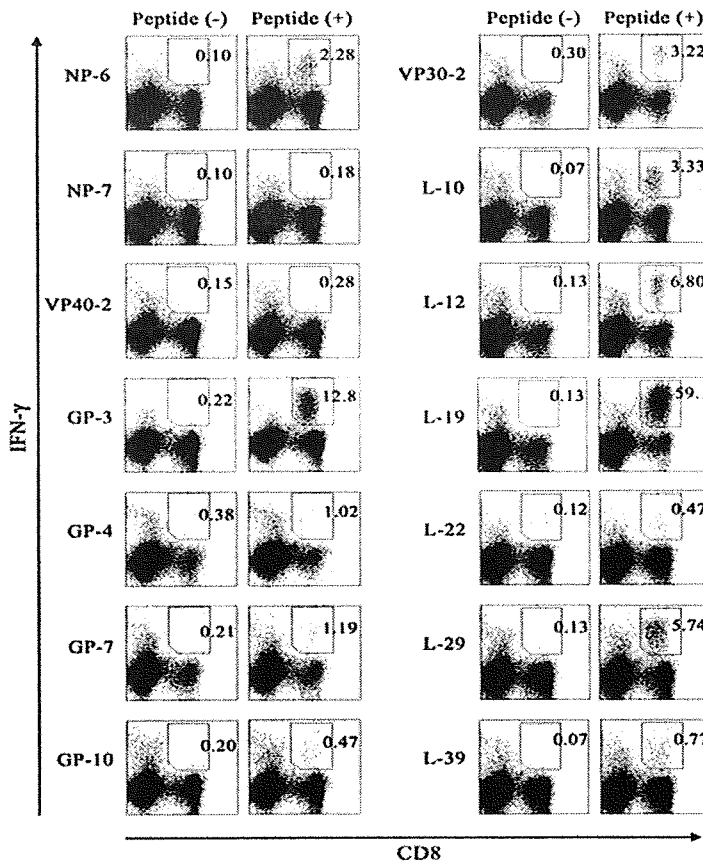


図 2 ペプチド結合リポソームによる IFN-γ+CD8+ T 細胞の誘導

24 種類のペプチド結合リポソームをそれぞれ CpG と共にマウスに免疫して、ペプチド特異的に誘導される

IFN-γ+CD8+ T 細胞の検出を試みた。図のように、14 種類のペプチド結合リポソームで、有意に IFN-γ+CD8+ T 細胞を誘導した。数字は、CD8+細胞中の IFN-γ+細胞の割合である

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

臨床応用に適したアジュバントの開発

研究分担者 石井健 大阪大学 微生物病研究所 准教授
研究協力者 青枝大貴 同上 特任助教

研究要旨

ヒト型 CpGODN のうち K タイプの CpG ODN に関してラージスケールでの ODN 作成を行ったところ、K 3 は安定して GMP 準抛のロットが回収できた。アジュバント機能は以前と同様に強く、今後この GMP 準抛のロットで前臨床試験を行うことが可能とおもわれた。D タイプの CpGODN (D 3 5) のほうは凝集が見られる場合があり、溶液、合成方法の改善が必要と判断された。

また、ワクチン、アジュバントの作用機序解明としてインフルエンザワクチンの機序解明を進め、全粒子ワクチン、スプリットワクチンの免疫原性の差が、インフルエンザ RNA の有無によること、その形質細胞様樹状細胞による TLR7 を介した認識により I 型 IFN の産生がおこり、このカスケードがその免疫原性に必須であることを示した。具体的な結果を下記に示す。

A. 研究目的

ワクチンによってウイルスに対する細胞性免疫を誘導するためには、宿主の抗原提供細胞上に存在する Toll 様受容体 (TLR) に結合するリガンドをアジュバントとしてワクチンに添加することが必須である。本研究の目的に合致したリガンドの開発を行う。

B. 研究方法

1) ヒト型 TLR 9 リガンド CpGODN の開発

ワクチンに対する CpGODN (K 3)

アジュバントの GMP 準抛ロット作製を行うとともに、K 3 のアジュバント効果のうち、メモリー効果の検討を長期観察により検討した。また、いくつかのマウスのストレインで前臨床試験に向けた最適化実験を開始した。

2) インフルエンザワクチンの作用機序解明

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、抗特異的な細胞を生体から除去する抗体を使いインフルエンザの免疫原性、およびそのトリガーとなる自然免疫反応を解析した。また、自然免疫関連 KO マウスを用いて同様の実験を行った。

(倫理面への配慮)

使用された実験動物は、大阪大学微生物病研究所動物実験委員会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。

C. 研究結果

1) ヒト型 TLR9 リガンド CpG ODN の開発

GMP ロットの作製を(株)ジーンデザインと共同で行ったところ、K3 は安定して GMP 準抛のロットが回収できた。アジュバント機能は以前と同様に強く、今後この GMP 準抛のロットで前臨床試験を行うことが可能とおもわれた。D35 のほうは凝集が見られる場合があり、溶液、合成方法の改善が必要と判断された。

K3 のアジュバント効果を抗体価を計測したところ K3 アジュバントのグループは 10 倍程度の優位に高い抗体価を誘導し、かつ維持した。したがって、K3 はワクチン免疫原性のメモリー効果も見られることが示唆された。

2) インフルエンザワクチンの作用機序解明

詳細な解析の結果、形質細胞様樹状細胞 (pDC) という特殊な細胞を除去した際に、イ

ンフルエンザ全粒子ワクチンによる肺の自然免疫反応および、その後の抗体誘導能が有意に減少した(図)。このデータはさらに、ワクチン抗原を暴露させた pDC をナイーブマウスに移入する実験でも証明された。

また、液性因子の探索を各種自然免疫関連遺伝子 KO マウスで検討したところ、IFN- $\alpha\beta$ R KO マウスにてインフルエンザ全粒子ワクチンの免疫原性が有意に減少していた。そこで WT や KO マウスの形質細胞様樹状細胞を上記と同様、ナイーブマウスに移入する実験を全粒子ワクチンの実験系で検討したところ、形質細胞様樹状細胞からインフルエンザ全粒子ワクチンの自然免疫活性化によって産生される I 型 IFN がこのワクチンの免疫原性に寄与していることが示唆された。

D. 考察

2009 年度内で、各種動物実験の系で K タイプ (K3) の CpG ODN がモデル抗原ワクチンの自然免疫アジュバントとして免疫原性を増強することを証明 (Proof of concept) することが出来たと考えている。今後 GMP ロットの作製、CMC を含めた前臨床試験に向けて準備することとした。

上記結果に基づき、TLR9 リガンドである CpG ODN の作用機序も検討した結果、pDC に TLR9 が発現しており、IFN- $\alpha\beta$ R KO でも CpG ODN のアジュバント効果が消失したことから、スプリットワクチンに対する TLR9 リガンドのアジュバントは全粒子ワクチンに匹敵する効果と特異性を確保できると考えている。

E. 結論

以上の結果から、我々の開発したヒト型 TLR9 リガンド CpG ODN の K3 はヒトでのインフルエンザワクチンのアジュバントとして開発を進める上でのエビデンスを提供できたと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Cevayir Coban, Yoshikatsu Igari^{1,4}, Masanori Yagi², Thornik Reimer³, Shohei Koyama¹, Taiki Aoshi², Keiichi Ohata⁴, Toshihiro Tsukui⁴, Fumihiko Takeshita⁵, **Kazuo Sakurai**⁶, Takahisa Ikegami⁷, Atsushi Nakagawa⁷, Toshihiro Horii², Gabriel Nuñez³, **Ken J. Ishii**^{1,2,*} and Shizuo Akira^{1,*} (*Corresponding author) “Immunogenicity of Whole Parasite Vaccines Against Plasmodium falciparum Involves Malarial Hemozoin and Host TLR9” *Cell Host Microbe*, 2010 In press
2. Kobiyama K, Takeshita F, Jounai N, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, **Ishii KJ**, Kawai T, Sasaki S, Hirano H, Ishii N, Okuda K, Suzuki K.
“Extra-chromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA.” *J Virol*. 2009 Nov 11. In press
3. Reimer T, Shaw MH, Franchi L, Coban C, **Ishii KJ**, Akira S, Horii T, Rodriguez A, Nuñez G. “Experimental Cerebral Malaria Progresses Independently of the Nlrp3 Inflammasome.” *Eur J Immunol*. 2009 Nov 30. In press
4. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, **Ishii K**, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. “Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response.” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 19. In press
5. McWhirter SM, Barbalat R, Monroe KM, Fontana MF, Hyodo M, Joncker NT, **Ishii KJ**, Akira S, Colonna M, Chen ZJ, Fitzgerald KA, Hayakawa Y, Vance RE. A host type-I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. *J Exp Med*. 2009 206(9):1899-911.
6. Koyama S, Coban C, Aoshi T, Horii T, Akira S, **Ishii KJ***. “Innate immune control of nucleic acid-based vaccine immunogenicity.” *Expert Rev Vaccines*. 2009 8(8):1099-107. (*Corresponding author)

7. Oma K, Zhao J, Ezoe H, Akeda Y, Koyama S, **Ishii KJ**, Kataoka K, Oishi K. "Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-like receptor agonist induces specific antibodies and enhances bacterial clearance in the airways of mice." *Vaccine*. 2009 27(24):3181-8.
8. Abe T, Kaname Y, Wen X, Tani H, Moriishi K, Uematsu S, Takeuchi O, **Ishii KJ**, Kawai T, Akira S, Matsuura Y. "Baculovirus induces type I interferon production through toll-like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner." *J Virol*. 2009 83(15):7629-40.
9. Kobiyama K, Takeshita F, **Ishii KJ**, Koyama S, Aoshi T, Akira S, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Yamanaka Y, Hirano H, Suzuki K, Okuda K. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant. *J Immunol*. 2009 Feb 1;182(3):1593-601.
10. **石井健**、堀井俊宏 「日本の新規ワクチン開発戦略」 感染炎症免疫 Vol.39-2 p2-11, 2009
11. 青枝大貴、**石井健** 「DNA ワクチンの基礎と作用機序」 ファルマシア Vol.45 No.6 2009
12. 小山正平、審良静男、**石井健** 「細胞内 DNA 受容体」 *Medical Science Digest* 2009 年 1 月号
2. 学会発表
招待講演のみ (国内 7件、国際 3件)
1. **Ishii KJ** "Innate immune control of influenza vaccine immunogenicity" Symposist, 39th annual meeting for Japanese Society for Immunology (JSI), Osaka Dec. 2009
2. **Ishii KJ** "Innate immune control of influenza vaccine immunogenicity" A distinguished speaker, National University of Singapore, Nov. 2009
3. **Ishii KJ** "Innate immune control of influenza vaccine immunogenicity" Symposist, 59th Annual meeting for Japanese Society of Allergology, Akita, Japan Oct. 2009
4. **Ishii KJ** "Innate immune control of vaccine immunogenicity" Symposist, 82th Annual meeting for Japanese Biochemical Society, Kobe, Japan Oct. 2009
5. **Ishii, KJ** "Innate immune control of influenza vaccine immunogenicity" Invited speaker, 3rd Vaccine global congress, Singapore, Oct 2009
6. **Ishii KJ** "Innate immune control of influenza vaccine immunogenicity" Japan-France Vaccine Research forum, Osaka, Japan Oct. 2009
7. **Ishii KJ** "Immune recognition and signaling essential for Flu vaccines" Symposist,

Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Hyogo Pref. Japan, Sep. 2009

3. その他

8. Ishii KJ “Innate immune recognition of nucleic acids” Lecturer, Bogazici University, Istanbul, Turkey, Aug. 2009

該当無し

9. Ishii KJ “Innate immune control of influenza vaccine immunogenicity” Symposist, 20th Japanese Society for Host Defense Research (JSHDR) meeting, Tokyo, July 2009

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

1) 特許の名称：「Zc3ch12 機能抑制物質および自然免疫賦活剤を用いた

新規アジュバント」出願番号：特願 2009-46990 出願人：国立大学法人大阪大学、発明者：審良静男、竹内理、松下一史、石井 健

2) 特許の名称：「新規マラリアワクチン及びアジュバント」出願番号：特願 2009-1

11967 出願人：国立大学法人大阪大学 発明者：堀井俊宏；石井健；東岸任弘

3) 特許の名称：「新規アジュバント」出願番号：PCT/JP2008/69919（特願 2007-285737）

出願人：国立大学法人大阪大学、日本全薬工業 発明者：審良静男、石井 健、チョバン ジェヴァイア、津久井利広

2. 実用新案登録

該当無し

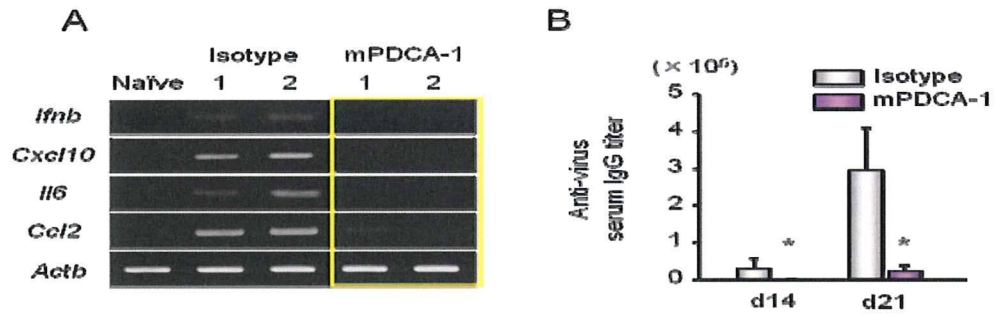
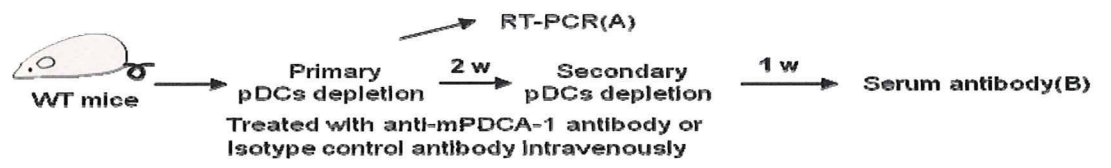


図:インフルエンザ全粒子ワクチンの自然免疫アジュバント活性、免疫原性は形質細胞様樹状細胞 (pDC) によってコントロールされる。

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

リポソーム結合抗原の生体内・細胞内動態の解析

研究分担者 垣内 史堂 東邦大学医学部免疫学講座 教授
研究協力者 田中ゆり子 東邦大学医学部免疫学講座 助教

研究要旨 リポソーム結合抗原は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MHCクラス-Iを介してCD8陽性T細胞にクロス・プレゼントされた結果、細胞性免疫が誘導される。本年度における検討により、リポソーム結合抗原の取り込みは抗原貪食の阻害剤による影響は受けないが、ピノサイトーシス阻害剤によって顕著に抑制されること、および、ピノサイトーシス阻害剤は抗原提供細胞によるCD4陽性およびCD8陽性T細胞への抗原呈示を抑制することが明らかとなった。また、細胞性免疫を誘導する不飽和脂肪酸リポソームに結合した抗原は、マクロファージによる能動的な抗原の取り込みが起こらない4℃条件下においても細胞内に取り込まれることが明らかとなった。このことから、不飽和脂肪酸リポソームに結合した抗原が抗原提供細胞においてクロス・プレゼントされ、細胞性免疫を誘導する理由として、リポソーム結合抗原は抗原提供細胞による抗原認識・取り込みの機序が一般の外来性抗原とは異なり、抗原提供細胞による能動的取り込みによらず細胞質中に入り込むためであることが示唆された。

A. 研究目的

現行のワクチンにはアジュバントとして水酸化アルミニウムが用いられているが、アルミニウムアジュバントは抗体産生（液性免疫）をよく誘導するものの細胞障害性T細胞（CTL：細胞性免疫）は誘導しにくいことが知られている。ウイルス感染を予防することを目的とするワクチンの中には従来のワクチンのように抗体産生を誘導するよりも細胞性免疫を誘導する事がより効果的であると考えられる場合があり、細胞性免疫を誘導することの出来るワクチン処方王永く求められてきた。我々が開発したリポソームワクチンはこの要請に応えうるものであるが、その作用機序、何故リポソーム結合抗原が細胞性免疫を誘導することが出来るか、については未だ不明の点が多い。そこで、本年度はこの機序の解明に焦点を当てて検討を行った。

B. 研究方法

マクロファージ細胞株におけるリポソーム結合抗原の細胞内動態

株化マクロファージ（clone #39）の培養中に蛍光色素 Alexa₄₈₈ 標識 OVA を結合したリポソームを添加し、4℃および 37℃条件下で一定時間培養した後、マクロファージを回収して FACS 解析を行った。

抗原提供細胞として CD11c⁺細胞を用いた、CD4 または CD8 陽性 T 細胞による抗原特異的 IFN- γ 産生

Dimethylamiloride (DMA) または cytocharasin B で処理した CD11c⁺細胞にリポソーム結合抗原をパルスし、その後、OVA 溶液で免疫したマウスの脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞または CD8 陽性 T 細胞と共培養を行った。一定時間培養の後培養上清を回収し、培養上清中の IFN- γ 産生を測定した。

（倫理面への配慮）

使用された実験動物は、東邦大学動物実験委員会規定に基づき飼育され、日本実験動物学会が定めた、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。

C. 研究結果

マクロファージ細胞株におけるリポソーム結合抗原の細胞内動態

蛍光標識した OVA (Alexa-OVA) を結合した、不飽和脂肪酸からなるリポソーム結合抗原 (図 1-a) は飽和脂肪酸からなるリポソーム結合抗原 (図 1-b) よりも効率よく抗原提供細胞に取り込まれ、更にこの取り込みは 4°C においても減少はしたものの認められた。

抗原提供細胞として CD11c⁺細胞を用いた、CD4 または CD8 陽性 T 細胞による抗原特異的 IFN- γ 産生

Dimethylamyloride (DMA) または cytocharasin B で処理した CD11c⁺細胞に不飽和脂肪酸リポソーム結合抗原をパルスし、その後、OVA 溶液で免疫したマウスの脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞または CD8 陽性 T 細胞と共培養を行った。CD4 陽性 T 細胞 (図 2-a)、CD8 陽性 T 細胞 (図 2-b) 共に、DMA 処理により抗原提供細胞による活性化が抑制されていた。cytocharasin B 処理は T 細胞活性化に影響を与えなかった。

D. 考察

本研究班におけるこれまでの検討により、リポソーム結合抗原による細胞性免疫誘導能がウイルスワクチンに応用できることが明らかとなっている。リポソーム結合抗原による細胞性免疫の誘導機序として、マクロファージの抗原貪食に対する阻害剤である cytocharasin B はリポソーム結合抗原の取り込みを抑制せず、ピノサイトーシス阻害剤である DMA によって取り込みが顕著に抑制されることが明らかとなった。さらに、この取り込みの抑制が CD4 及び CD8 陽性 T 細胞活性化の抑制とも一致しており、4°C 条件下においてもリポソーム結合抗原は抗原提供細胞の細胞質内に送達されることが明らかとなった。以上のことから、リポソーム結合抗原は通常の外来抗原とは異なる経路によって抗原提供細胞に取り込まれ、外来抗原のクロス・プレゼンテーションが誘導された結果、MHC class I を介して CD8 陽性 T 細胞に抗原呈示されていることが示唆された。

E. 結論

リポソーム結合抗原による細胞性免疫の誘導が

抗原提供細胞におけるリポソーム結合抗原の特異な細胞内動態に起因することを示唆する結果が得られた。

F. 研究発表

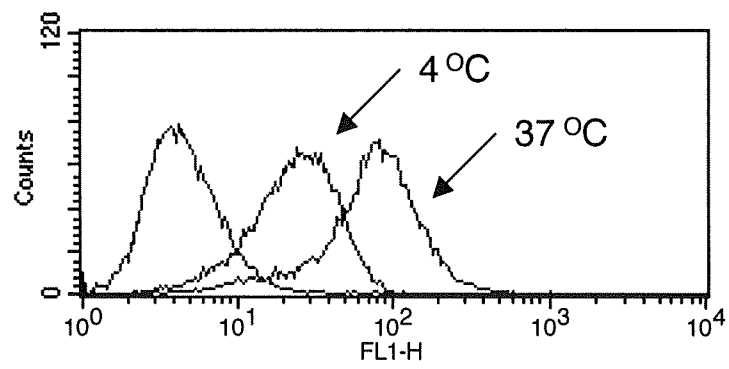
1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当無し

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

Fig.1

a. 不飽和脂肪酸リポソーム



b. 飽和脂肪酸リポソーム

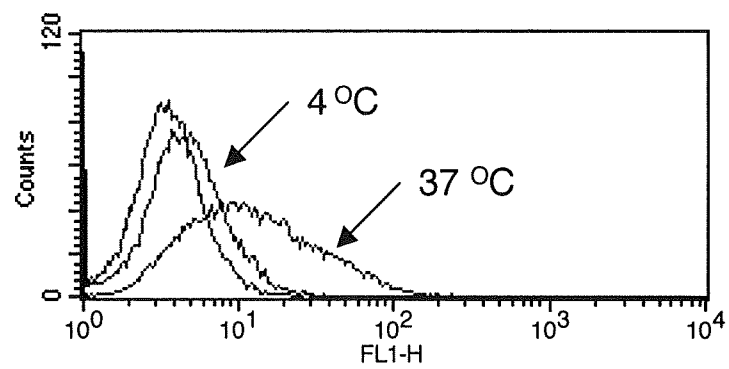
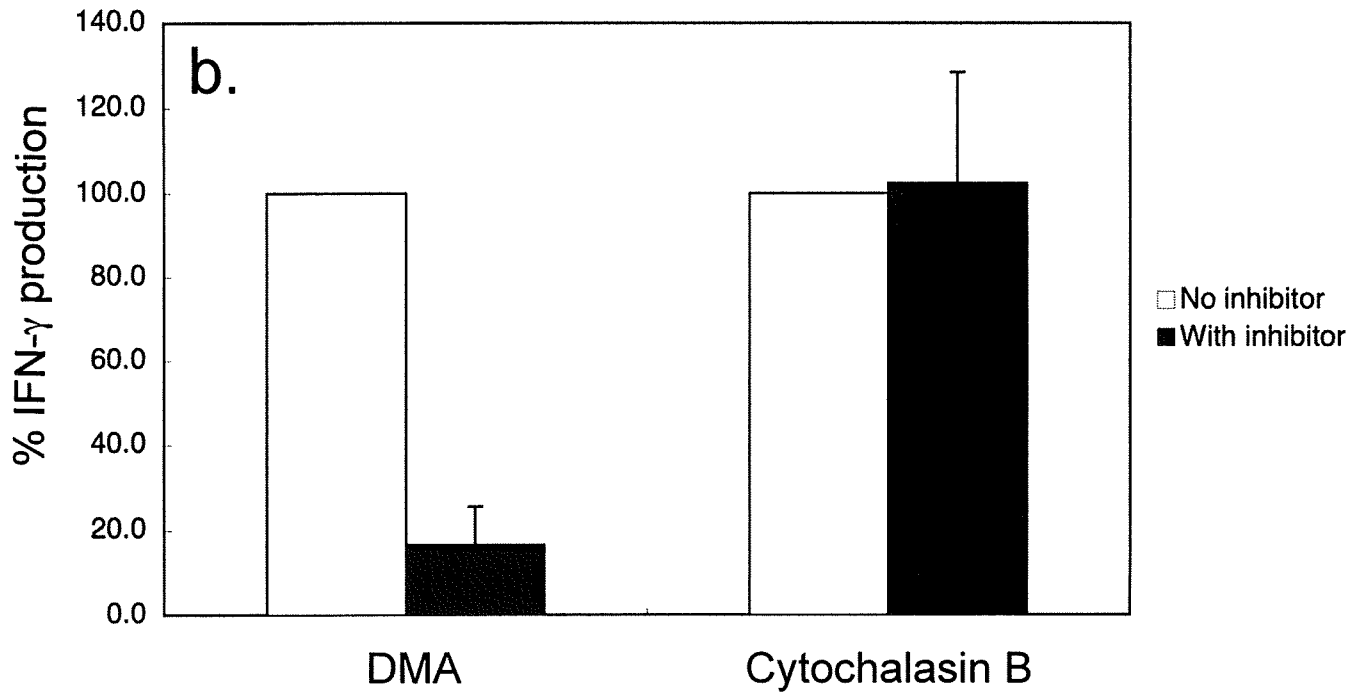
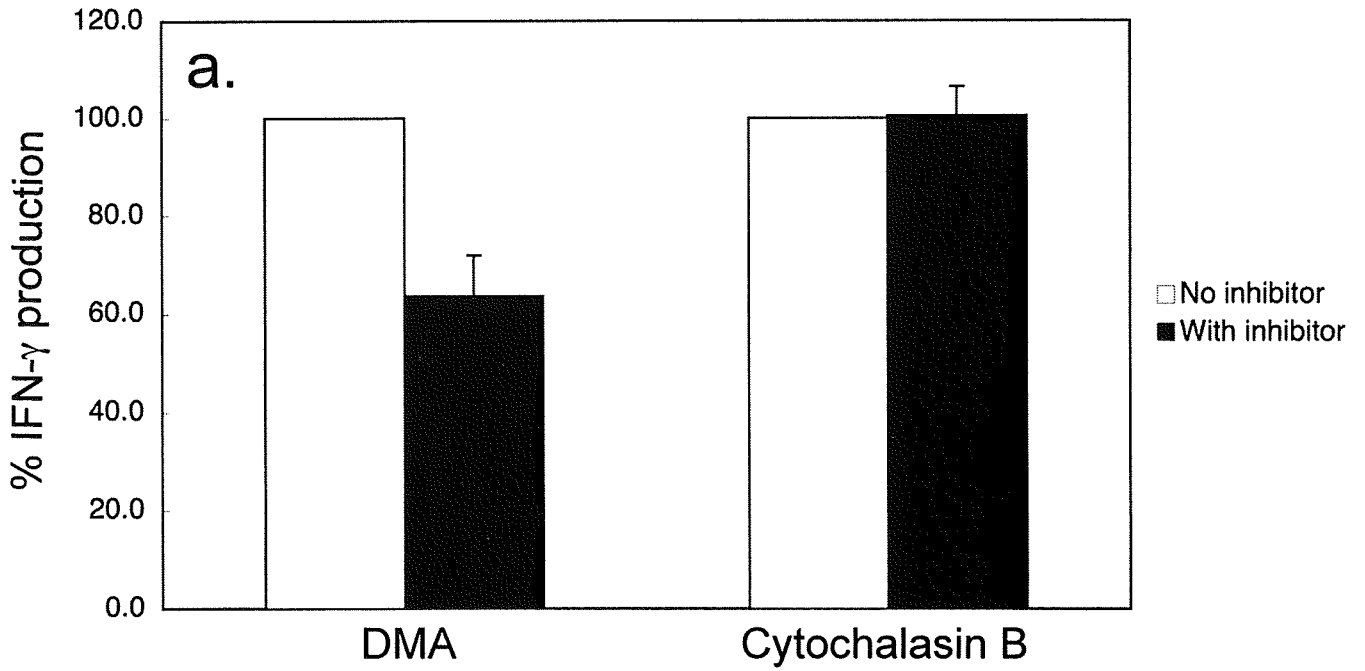


Fig.2



CTL 誘導におけるリポソームの性能評価

研究分担者 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

研究要旨

CTL 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を行った。一定量のリポソームに対し異なる量のペプチドを用いて結合操作を行い、アミノ酸分析によってペプチド回収量およびリポソームへのペプチド結合量を比較検討した。この結果、脂質量 90mg のリポソームに対して 0.5~1mg のペプチドを結合したときに最も結合効率が高いことがわかった。また、CTL 誘導型リポソームワクチンに添加するアジュバントの選択肢を広げることを目的として、インフルエンザウイルス前粒子の添加による CTL 誘導の可否を検討したところ、CTL エピトープペプチドおよびインフルエンザウイルス前粒子をリポソーム表面に結合して免疫することにより、ペプチドに特異的な CTL が顕著に誘導されることが確かめられた。このことから、ウイルス全粒子がオリゴ DNA (CpG) に代わるアジュバントとして使用可能であることが示唆された。

A. 研究目的

ペプチド・リポソーム結合条件の最適化

抗原（ペプチドおよびタンパク）-リポソーム結合物による抗原特異的 CTL 誘導を利用した CTL 誘導型ワクチンの実用化においては、最も効率的に抗原がリポソームに結合し、かつ高効率に免疫を誘導する条件を決定することが必須である。そこで、今年度は抗原-リポソーム結合条件を最適化することを目的として、一定量のリポソーム量に対して異なる量のペプチドを添加して結合操作を行い、アミノ酸分析によるリポソームへのペプチドの結合量の測定、および各結合条件における CTL 誘導について検討を行った。

CTL 誘導にむけたアジュバントの検索

これまでの検討においては、ペプチド・リポソーム結合物の溶液にアジュバントとしてオリゴ DNA (CpG) を添加し、HLA トランスジェニックマウスに免疫した結果、所定の成績が得られているが、CpG は現在までのところワクチンに添加した実績が無い。CpG のアジュバント効果は生体の自然免疫系による病原体の認識機構を利用したものであることが知られている。そこで、今年度は CTL 誘導型ワクチンにおけるアジュバントの選択肢を広げることを目的として、ウイルス全粒子をアジュバントとして使用することの可否について検討を行った。

B. 研究方法および結果

ペプチド-リポソーム結合条件の最適化

90 mg のリポソームに対して、4 種類の容量：5mg、1mg、0.5mg、0.1 mg の卵白アルブミン (OVA) 由来ペプチドを添加して結合操作を行った。結合後、リポソーム非結合画分をカラムを用いた分子ふるいによって取り除き、リポソーム結合画分についてアミノ酸分析を行った。表-1 に示す様に、ペプチドを 1 mg 使用してリポソームに結合した時に回収率が最も高かった。ペプチド結合リポソームでマウスを免疫したところ、図-1 に示すように、いずれの結合条件においてもほぼ 100%近い CTL 誘導が観察された。リポソームとの結合に用いた OVA 由来ペプチドの最少量：0.1 mg において、ペプチド-リポソーム溶液に含まれるペプチドの最終濃度は 1.7 µg/ml であったが (表-1)、これをマウスあたり 5 µl (8.5ng) 投与した群においても 97.5%と高い値の抗原特異的 killing が観察された (図-1)。

CTL 誘導にむけたアジュバントの検索

不活化したインフルエンザウイルス全粒子を CTL エピトープペプチドとともにリポソームに化学結合させた。図-2 に、(不活化インフルエンザウイルス全粒子+ペプチド) -リポソームの電子顕微鏡像を示す。この (ペプチド+ウイルス全粒子) -リポソーム結合物をマウスに免疫したところ、表-2 に示すように、アジュバントとして CpG を用いた時と同様、顕著な CTL 誘導が観察された。

C. 考察

CTL エピトープペプチドのリポソームに対

する結合効率には脂質量 90 mg のリポソームに対し 1mg のペプチドを添加したときに最大になることが OVA 由来ペプチドおよびインフルエンザウイルス由来ペプチドで確かめられた。今回検討を行った中で最少量の免疫量：OVA 由来ペプチド 8.5ng においても顕著な CTL 誘導が観察されたことから、リポソーム結合ペプチドの免疫効率の高さが示された。

CTL エピトープペプチドとともにウイルス全粒子をリポソームに結合することにより、CpG をアジュバントとして使用した場合と同様、顕著な CTL 誘導が行われることが確かめられた。ウイルス全粒子に含まれている RNA が宿主の Toll 様受容体を介して自然免疫系を活性化し、その結果 CTL が誘導されたものと考えられた。

D. 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 27:3912-3920, 2009.

- 2) Kohyama, S., S. Ohno, T. Suda, M. Taneichi, S. Yokoyama, M. Mori, A. Kobayashi, H. Hayashi, T. Uchida, and