

2010/10/5A

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 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 内田 哲也

平成 23 (2011) 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 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 内田 哲也

平成 23 (2011) 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……………	25
	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……………	29
	田中 ゆり子	
	6. CTL誘導におけるリポソームの性能評価……………	33
	種市 麻衣子	
	7. インフルエンザウイルス抗原に対するCTL応答のヒトにおける解析……………	37
	斎藤 三郎	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表……………	39
IV.	研究成果の刊行物・別刷……………	41

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 22 年度総括研究報告書

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、製剤設計、製造法の確立を目的とした検討を行った。正常ヒト由来 PBMC を用いて、我々がこれまでに同定したインフルエンザウイルス内部タンパク由来の CTL エピトープに対して反応性であることを確認した。これまでに発見された A 型インフルエンザウイルス亜種 2,700 余を用い、ウイルスを構成するタンパクのアミノ酸組成のうちで高度に保存された領域を探索した。この探索によって得られた情報を用いて、永く有効性を維持することの出来るワクチンを創製することが期待された。また、インフルエンザワクチン開発と同様の手法を用い、エボラワクチンおよび C 型肝炎ワクチンの候補となり得る CTL エピトープが同定された。C 型肝炎ワクチン開発においては、新たに CTL 誘導効率の高い CTL エピトープが同定された。さらに、インフルエンザワクチンの作用機序の解析、本ワクチンの臨床応用に適したアジュバントの開発、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が行われた。

研究分担者

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 (独立行政法人医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクトリーダー)
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)
田中ゆり子 (東邦大学医学部免疫学講座助教)
斎藤 三郎 (東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所准教授)
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)

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。

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および実用化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：インフルエンザワクチンの実用化に向け、アミノ酸分析を用いたリポソームへのペプチドの結合量の定量を結合条件および使用ペプチドを変えて行った。また、これまでに地球上で発見された A 型インフルエンザウイルス亜種 2700 余につき、ウイルスを構成するタンパクのアミノ酸配列の多様性を検討した。

(2) CTL 誘導型 C 型肝炎ワクチンの臨床応用に向けた検討：CTL 誘導型 C 型肝炎ワクチンに用いる HCV 由来 CTL エピトープの検索、および有効性に関する検討を行った。

(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：前年度同定した HLA-A2 拘束性エボラウイルス・ザイール型由来 CTL エピトープにつき、このエピトープペプチドによる CTL 誘導およびペプチド特異的 killing 活性を検討した。また、HLA-A24 拘束性 CTL エピトープについても新たに検索・同定を行った。

(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。また、ワクチンアジュバントの作用機序解明として、リポソームワクチン抗原特異的 CD8 T 細胞誘導の機序を解析した。

(5) リポソーム結合抗原の生体内・細胞内動態の解析：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共焦点顕微鏡および FACS を用いて解析を行った。

(6) インフルエンザウイルス抗原に対する CTL 応答のヒトにおける解析：HLA-A2 あるいは A24 陽性のヒト末梢血由来単核球の培養中に、我々がこれまでに同定したインフルエンザウイルス由来 CTL エピトープペプチドを添加し、CD8 T 細胞の反応性を検討した。

(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) 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ペプチド：リポソーム量比の検討、使用した抗原の最大量をリポソーム表面に結合させるための抗原-リポソーム反応条件（温度、反応時間）の検討、リポソームへのアミノ酸の最大結合量の検討等をアミノ酸分析を用いて行った。（国立感染研・種市）。また、これまでに発見された A 型インフルエンザウイルス亜種 2,700 余を用いてアミノ酸配列の多様性を検討

した結果、インフルエンザウイルスの内部タンパク質にアミノ酸組成が高度に保存された領域が複数見いだされた（北海道大学・高田）。

(2) CTL 誘導型 C 型肝炎ワクチンの臨床応用に向けた検討：本年度新たに同定した HCV-NS3 由来の CTL エピトープはアミノ酸配列の異なる変異株に対する交叉反応性に優れ、免疫誘導効率が極めて高く、かつ長期にわたる免疫記憶の誘導に優れていることがわかった（埼玉医大・赤塚）。

(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：昨年度同定した HLA-A2 拘束性 CTL エピトープによって誘導される CTL が顕著な killing 活性を有し、内在性抗原を認識することが確かめられた。また、本年度新たに 11 種類の HLA-A24 拘束性 CTL エピトープが同定され、そのうち 7 種類でリポソーム結合物が有意に抗原特異的 CD8 T 細胞を誘導した（埼玉医大・松井）。

(4) 臨床応用に適したアジュバントの開発：ヒト型 CpGODN のうち K タイプの CpGODN につき、ラージスケールでの作製を行ったところ、K3 は安定して GMP 準拠のロットが回収出来た。また、リポソームワクチンによる CD8T 細胞誘導の機序に関して、TLR9 を介した自然免疫系の活性化が関与していることを示唆する結果が得られた（基盤研・石井）。

(5) リポソーム結合抗原の生体内・細胞内動態の解析：我々が開発したリポソーム結合抗原は生体の抗原提供細胞において、通常の外来抗原のように phagocytosis によってばかりでなく pinocytosis によっても細胞内に取り込まれ、その結果 MHC class-I を介して CD8 陽性 T 細胞に抗原呈示されることを示唆する結果が得られた。

（東邦大医・田中）。

(6) インフルエンザウイルス抗原に対する CTL 応答のヒトにおける解析：献血由来ヒト末梢血単核球の培養中に我々がこれまでに同定した HLA-A2

および A24 拘束性の CTL エピトープペプチドを添加し、IFN- γ -ELISpot アッセイを行ったところ、複数の donor において有意な反応が見られた（感染研・種市）。また、慈恵医大の教職員・学生の有志より得られたヒト末梢血単核球を用い、T 細胞の増殖を検討することによっても同様の結果が得られた（慈恵医大・斎藤）。

D. 考察

インフルエンザワクチンの実用化に向け、製剤設計、製造法の確立を目的とした条件検討を行った。また、我々がこれまでに同定した CTL エピトープペプチドが試験管内でヒト由来 PBMC を活性化する能力を有することが確認されたことから、ワクチン抗原としての妥当性が示唆された。本年度行われた、インフルエンザ内部タンパクにおけるアミノ酸配列の高度保存領域に関する解析の結果をワクチンに使用する CTL エピトープの選択に反映させることにより、普遍的に有効性を発揮するインフルエンザワクチンの創製が可能になると考えられる。

本年度新たに同定された HCV-NS3 由来の CTL エピトープは、高効率に CTL を誘導し、かつ免疫記憶も長期に亘って維持された。この CTL エピトープペプチドとリポソームとの結合物は予防型および治療型 HCV ワクチンの候補物質として期待される。

インフルエンザワクチンと同様の手法でエボラワクチンの創製に向けた検討が行われた。昨年度の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープに加え、本年度は HLA-A24 拘束性 CTL エピトープが同定された。さらに、これらの CTL エピトープとリポソームとの結合物による CTL 誘導の性能評価に必須である、エボラウイルス由来タンパクを発現した細胞株が樹立された。来年度はこの細胞株を用いてエボラワクチンの創製に適した CTL エピトープの選定

を行う。

該当なし

リポソーム結合抗原によって CTL が誘導される作用機序につき、抗原提供細胞および *in vivo* レベルでの解析が行われた。我々が開発したリポソーム結合抗原は抗原提供細胞において一般的な外来抗原とは異なる経路をたどり、MHC class-I を介して CD8 T 細胞に呈示されることが確かめられた。また、*in vivo* においては、リポソーム結合抗原による CTL 誘導に TLR9 を介した自然免疫系が関与していることを示唆する結果が得られた。

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た検討、リポソームワクチンによる CTL 誘導機序の解析、HCV ワクチンおよびエボラワクチンの創製に向けた検討を行った。

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

各研究分担報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

各研究分担報告書参照

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

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

H5 亜型のインフルエンザウイルスをホルマリンで不活化し、リポソームワクチン、コレラ菌毒素 B サブユニット混合ワクチン、フロイント完全アジュバント (FCA) 混合ワクチンを作成した。それらのワクチンを接種した 6 週令のマウス (Balb/c) の抗体応答を比較した結果、アジュバント効果は、鼻腔内接種群では、リポソーム < CTB、皮下接種群では、リポソーム < FCA であった。H5 亜型以外の亜型のヘマグルチニンに結合する抗体は殆ど誘導できなかつた。また、アミノ酸配列の多様性を示す尺度として、各アミノ酸位置におけるエントロピーを計算する手法を用い、高度保存領域の探索を行った。その結果、インフルエンザウイルスの内部蛋白質に、エントロピーの低いアミノ酸配列が連続している領域が複数見出された。それらはアミノ酸配列が高度に保存されている領域である。このような領域と一致するエピトープを選択すれば、より多くのインフルエンザウイルスに対する免疫をカバーできるエピトープワクチンとして有効である可能性が示唆された。

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

リポソームワクチンの経鼻投与と皮下接種の亜型間交差反応性抗体誘導能の比較

発育鶏卵で増殖させたインフルエンザウイルス、A/rgVietnam Δ HA/1194/2004 (H5N1)をホルマリンで不活化し、リポソームワクチン、コレラ菌毒素Bサブユニット混合ワクチン、フロイント完全アジュバント混合ワクチンを作成した。6週令のマウス(Balb/c)を用い、不活化ウイルス単独、リポソームワクチンまたはコレラ菌毒素Bサブユニット(CTB)混合ワクチンを鼻腔内に、不活化ウイルス単独、リポソームワクチンまたはフロイント完全アジュバント(FCA)混合ワクチンを皮下に、2週間隔で3回接種し、血清と呼吸器分泌液中のIgGおよびIgA抗体量を測定した。アジュバント効果は、鼻腔内接種群では、リポソーム<CTB、皮下接種群では、リポソーム<CTBであった。H5亜型以外のヘマグルチニンに結合する抗体は殆ど誘導できなかつた。

インフルエンザウイルス蛋白質アミノ酸配列中のコンセンサスシーケンス探索

アミノ酸配列の多様性を示す尺度として、各アミノ酸位置におけるエントロピーを計算する手法を採用した。Influenza Virus Resource at the National Center for Biotechnology Information からダウンロードした、動物種の由来が異なるインフルエンザウイルス (Avian 1468株、Canine 4株、Environment 38株、Equine 57株、Human 869株、Mink 3株、Pika 2株、Raccoon dog 1株、Seal 1株、Swine 324株、Tiger 1株、Unknown 3株、Whale 2株)のアミノ酸配列を用いた。インフルエンザウイルスの内部蛋白質に、エントロピーの低いアミノ酸配列が連続している領域が複数見出された。すなわち、それらは高度にアミノ酸配列が高度に保存されている領域である。このような領域と一致するエピトープを選択すれば、より多くのインフルエンザウイルスに対する免疫をカバーできるエピトープワクチンとして有効である可能性が高い (図1)。

エボラウイルス蛋白質の CTL エピトープ探索

エボラウイルスに対する細胞障害性T細胞のエピトープ探索を目的とした、標的細胞作製のためのエボラウイルス蛋白質の発現系作出を実施した。エボラウイルスの構造蛋

白質 (GP、VP40、VP30、NP および L) について、これらの蛋白質単独あるいは GFP 蛋白質と融合蛋白質を発現するプラスミドを構築し、発現を確認した (図2)。

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 株の表面糖蛋白質に対するモノクローナル抗体を作出した。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、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。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

ある亜型のインフルエンザウイルスワクチンに対して誘導される抗体は、異なるHA亜型のインフルエンザウイルスに対して殆ど交差反応しない。しかし、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される。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遺伝子組換えウイルスワクチンに共通するのは、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から、本研究が安全で簡便なCTL誘導型のワクチン開発につながることを期待される。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。CTL および抗体応答、いずれを誘導する場合でも、フィロウイルス種間共通エピソード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. Ogawa, H., Miyamoto, H., Ebihara, H., Ito, K., Morikawa, S., Feldmann, H., and Takada, A. (2011) Detection of all known filovirus species by reverse transcription-polymerase chain reaction using a primer set specific for the viral nucleoprotein gene. *J. Virol. Methods* 171(1): 310-313.
2. Nakayama E, Yokoyama A, Miyamoto H, Igarashi M, Kishida N, Matsuno K, Marzi A, Feldmann H, Ito K, Saijo M, Takada A. (2010) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of filovirus species-specific antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* 17(11): 1723-1728.
3. Matsuno, K., Nakayama, E., Noyori, O., Marzi, A., Ebihara, H., Irimura, T., Feldmann, H., and Takada, A. (2010) C-type lectins do not act as functional receptors for filovirus entry into cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403:144-148.
4. Matsuno, K., Kishida, N., Usami, K., Igarashi, M., Yoshida, R., Nakayama, E., Shimojima, M., Feldmann, H., Irimura, T., Kawaoka, Y., and Takada, A. (2010) Different potential of C-type lectin-mediated entry between Marburg virus strains. *J. Virol.* 84(10): 5140-5147
5. Sakoda, Y., Sugar, S., Batchluun, D., Erdene-Ochir, T.O., Okamatsu, M., Isoda, N., Soda, K., Takakuwa, H., Tsuda, Y.,

Yamamoto, N., Kishida, N., Matsuno, K., Nakayama, E., Kajihara, M., Yokoyama, A., Takada, A., Sodnomdarjaa, R., and Kida, H. (2010) Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus strains isolated from migratory waterfowl in Mongolia on the way back from the southern Asia to their northern territory. *Virology* 406(1): 88-94.

6. Okamatsu, M., Tanaka, T., Yamamoto, N., Sakoda, Y., Sasaki, T., Tsuda, Y., Isoda, N., Kokumai, N., Takada, A., Umemura, T., and Kida, H. (2010) Antigenic, genetic, and pathogenic characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from dead whooper swans (*Cygnus cygnus*) found in northern Japan in 2008. *Virus Genes* 41(3): 351-357.
7. Yang, J., Yoshida, R., Kariya, Y., Zhang, X., Hashiguchi, S., Nakashima, T., Suda, Y., Takada, A., Ito, Y., and Sugimura, K. (2010) Characterization of human single-chain antibodies against highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: Mimotope and Neutralizing Activity. *J Biochem.* 148(4): 507-515.
8. Iwai, A., Shiozaki, T., Kawai, T., Akira, S., Kawaoka, Y., Takada, A., Kida, H., and Miyazaki, T. (2010) Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon {beta} promoter stimulator 1. *J. Biol. Chem.* 285(42): 32064-32074.
9. Uchida, Y., Kanehira, K., Mase, M., Takemae, N., Watanabe, C., Usui, T., Fujimoto, Y., Ito, T., Igarashi, M., Ito, K., Takada, A., Sakoda, Y., Okamatsu, M., Yamamoto, Y., Nakamura, K., Kida, H., Hiromoto, Y., Tsuda, T., and Saito, T. (2011) Genetic characterization and susceptibility on poultry and mammal of H7N6 subtype avian influenza virus isolated in Japan in 2009. *Vet. Microbiol.* 147(1-2): 1-10.

2. 学会発表

1. Matsuno K, Takada A. Different potential of

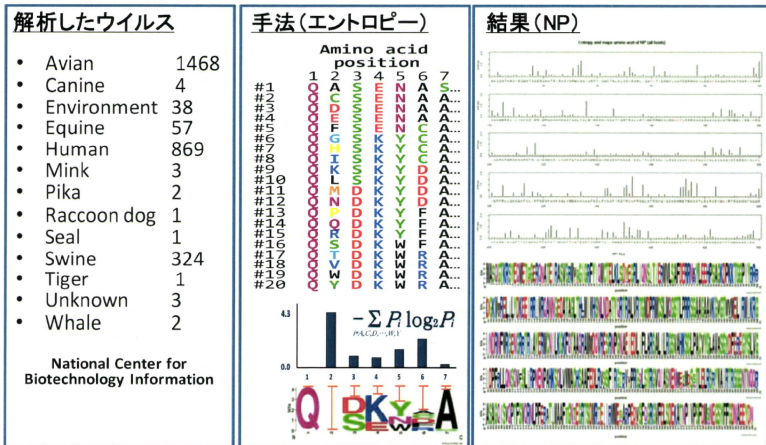
C-type lectin-mediated entry between Marburg viruses. 5th International Symposium on Filoviruses, April 18-21, 2010, Tokyo, Japan.

2. Matsuno K, Feldmann H, Irimura T, Takada A. Different potential of C-type lectin-mediated entry among filoviruses. International conference on Negative Strand Viruses, June 20-25, 2010, Brugge, Belgium.
3. Igarashi M, Ito K, Kida H, Takada A. Prediction of antigenic structure of hemagglutinin of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. International conference on Negative Strand Viruses, June 20-25, 2010, Brugge, Belgium.
4. 高田礼人「人獣共通感染症としてのインフルエンザ」 第 20 回日本数理生物学会大会 平成 22 年 9 月 15 日 北海道大学 札幌
5. 高田礼人「ウイルスの病原性と宿主体—人獣共通感染症としてのインフルエンザ—」 第 75 回日本民族衛生学会 平成 22 年 9 月 25 日 北海道大学 札幌
6. 高田礼人「フィロウイルスの細胞侵入機構」 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 平成 22 年 11 月 9 日 あわぎんホール 徳島 (口頭)
7. 吉田玲子、苔米地大輔、五十嵐学、宮本洋子、加瀬哲男、喜田宏、高田礼人「パンデミックインフルエンザ A ウイルス (H1N1) ヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体の性状解析」 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 平成 22 年 11 月 8 日 あわぎんホール 徳島 (口頭)
8. 中山絵里、横山文香、宮本洋子、五十嵐学、岸田典子、松野啓太、Andrea Marzi、Heinz Feldmann、伊藤公人、西條政幸、高田礼人「フィロウイルス種特異抗体検出 ELISA 法の開発」 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 平成 22 年 11 月 8 日 あわぎんホール 徳島 (口頭)
9. 五十嵐学、高田礼人、喜田宏、伊藤 公人「H3N2 インフルエンザウイルス HA に付加された糖鎖は周辺エピソードを覆い隠していたか? ~糖鎖付加部位周辺アミノ酸残基の多様性変化の解析~」 第 58 回日

本ウイルス学会学術集会 平成 22 年 11 月 8 日 あわぎんホール 徳島 (口頭)

E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当無し



エントロピーの低いアミノ酸(多様度が低い)が連続する箇所がコンセンサ領域と言える

図1 インフルエンザウイルス蛋白質アミノ酸配列中のコンセンサシーケンス探索

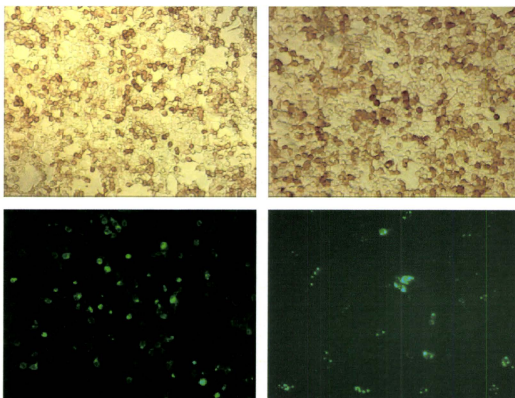


図2 293T細胞におけるGP(左)、NP(右)およびGFPの発現

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・教授）

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、昨年度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を2つ同定したが、本年度はさらに1つ加わり合計3つのエピトープを同定でき、その有効性の検討を行い、特許出願も行った。3つの中でも特に#3のペプチドを結合したリポソームワクチンについて詳しく検討を行った結果、1）ペプチド配列の元となった HCV-1a 株のみならず、1つアミノ酸が異なる HCV-1b 株の抗原ペプチドとも交叉反応し、少なくともデータベースに登録されている HCV 株の約85%をカバーできること、2）効率が非常に高く、ペプチド量0.28 µg の1回投与で有意な反応が得られること、3）長期のメモリーT細胞が誘導でき、投与後12週でも十分なブースト効果が認められることが分かった。さらにこのエピトープ#3の特徴として、リポソーム結合ペプチドでは十分なCTL反応が誘導されるが、#3を発現する組み換えウイルス感染では#3特異的CTLはまったく誘導されないことが分かった。この非常に特異な性質から、慢性C型肝炎の治療ワクチンとして応用できる可能性が期待された。

A. 研究目的

これまでの検討の結果、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 拘束性エピトープを4種類同定した。しかし HCV の免疫応答は他のウイルスと比較して低いとされており、実際今年度の研究で、同じ HCV の NS3 領域についてマウスが H-2 依存性で認識するエピトープに対する反応、と上記のヒトHLA-A2 拘束性エピトープに対する反応を、両者のMECを共有するF1マウスで比較検討することにより、それが確認された。そこで本研究では従来のエピトープ同定の方法に加え、リポソームと結合することによって高い免疫原性を獲得するペプチドをスクリーニングし、選定した。

B. 研究方法

- 1) ペプチド合成：Operon社に合成を委託した。
- 2) CTL assay（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、⁵¹Cr 標識したペプチドパルス標的細胞 RMA-S/HLA に対する障害活性を測定した。
- 3) 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-γを検出した。
- 4) ワクシニアウイルスチャレンジ実験：免疫後7日目に HCV NS3 遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルス（VV-NS3）を 2×10^6 PFU i.p. 投与し、5日後に脾臓で存在するウイルス量を BSC-1 細胞を用いたプラーク形成法で定量した。
- 5) 組換えウイルス免疫実験：VV-NS3 または HCV NS3-5A 遺伝子を発現するアデノウイルス（AdNS）を 1×10^7 PFU

i. p. 投与し、7日後に他の免疫マウスとともに免疫効果を比較判定した。

5) マウス: HLA-A2 Tg マウスは Dr. F. A. Lemonnier から供与を受けた HHD マウスを繁殖させ用いた。

(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 22-M-120、承認番号 385)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) マウスとヒトが認識する HCV CTL エピトープの免疫原性の比較

これまでの研究で、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として構造領域 (Core, E1, E2) で見出したものが存在するが、いずれもそのエピトープ領域のタンパクを発現する組換えワクシニアウイルスのチャレンジ実験での成績が十分なものとはいえなかった。その原因として、HCV 自体がヒトでの感染を繰り返すうちに免疫原性が低いものへと淘汰され進化してきた可能性が考えられる。それを検証するため、同じマウス個体における HCV への CTL 反応が、マウスが認識するエピトープとヒトが認識するエピトープの間で差がないか検討した。ヒトの MHC クラス I (HLA-A2) を発現するトランスジェニックマウス (HHD) とマウスの MHC クラス I (H-2d) を発現する C57BL/6 マウスを掛け合わせた F1 マウスは、同じ個体での両者の MHC に依存した CTL 反応を測定比較できる。このマウスを HCV の NS3 遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルス (W-NS3、図 1 左) または組換えアデノウイルス (AdNS3、図 2 右) で免疫し、1w 後に脾臓を摘出し、HCV の NS3 領域にある HLA-A2 のエピトープ (aa. 1073-1131, 1585-1593)、H-2d のエピトープ (aa. 1630-1637)、および陽性対照として HLA-A24 のエピトープ (aa. 1031-1039) のペプチドに対する CD8⁺T 細胞反応を、ELISPOT (IFN- γ) で比較した。その結果、いずれのウイルスで免疫しても、マウスのエピトープに対する

反応は、ヒトのエピトープに対する反応よりも有意に高かった。

以上より、ヒトの HLA-A2 や HLA-A24 に拘束される HCV CTL エピトープペプチドをリポソームに結合しても十分な反応が得られなかったことが説明できる。マウスの H-2d 拘束性エピトープペプチド (aa. 1630-1637) をリポソームに結合し、HLA-A2 のエピトープ (aa. 1073-1131, 1585-1593) ペプチドを結合したリポソームとの免疫反応の強さを比較したところ、やはりマウスのエピトープの方がはるかに高い反応が見られた (図 2)。この免疫マウスに HCV タンパク発現組換えワクシニアウイルスでチャレンジすると、その感染が完全にブロックされることも確認できた (データ省略)。

2) 新規 NS3 エピトープの同定

以上の研究結果から、従来報告された CTL エピトープ以外に、マウスのエピトープと同程度かそれ以上の免疫原性を示すものを検索・同定する必要性が生じた。そこで昨年度報告したように、まず HCV-1a 株の NS3 のアミノ酸配列の HLA-A2 結合モチーフを 2 種のコンピュータ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)。そして不溶性の #2 を除く 24 種類を 6 つずつ I - IV の 4 つの群にプールし、それぞれをリポソーム結合して HHD マウスに免疫した。免疫マウスの脾臓細胞の各ペプチドに対する反応性を CTL assay (51Cr-release assay) と ELISPOT (IFN- γ) assay で調べることにより、#3 と #13 が選抜された。今年度はさらに #19 にも活性があることが半明し、W-NS3 でのチャレンジ実験での成績 (図 3) で示されるように、結局 3 つが CTL エピトープであることが確定し、特許出願も行った。

3) エピトープ #3 についての検討

新規同定エピトープのうち、#3 について更に検討を進めた。

a) 免疫原性の検討: 図 2 の実験と同様に、ペプチド結合リポソームワクチンとしてマウスのエピトープペプチド (aa. 1630-1637) との免疫原性の比較を行ったところ、それと遜色ない結果が示された (図 4)。

b) 免疫効率の検討: HHD マウスに免疫する #3 結合リ

ポソーム (Lip-#3) の量を 50 μ l から 1/5 ずつ減らし、それぞれの量のペプチド結合ワクチンに対する CD8+T 細胞反応を、ELISPOT (IFN- γ) で比較したところ、280 ng という微量のペプチドの 1 回免疫だけで有意な反応が得られることが分かった (リポソームに結合したペプチド量を最大 700 μ g/ml と想定して計算したが、実際に結合されたペプチドはそれより少ない可能性がある) (図5)。

c) メモリー誘導の検討: Lip-#3 20 μ l で 1 回免疫後、メモリー T 細胞が誘導・維持できるか、ELISPOT (IFN- γ) で検討を行った。免疫後 1w の値に比べて 8w、12w では反応が低下し、エフェクター T 細胞数が急激に低下していくことが分かるが、8w、12w で同じ量の Lip-#3 でブーストし、1w 後の recall response を見てみると、どちらの時点においても有意な反応が認められた (図6)。

d) ウイルス株間での交叉反応の検討: #3 を始めとして、同定したエピトープの配列は HCV-1a 株のアミノ酸配列に基づいていた。データベースに登録された HCV のアミノ酸配列を見ると、4 番目が HCV-1a 株のアミノ酸配列と同じであり、5 番目は HCV-1b 株のアミノ酸配列と同じであった。HCV-1b 株では 9 つのアミノ酸のうち 2 番目が M ではなく L となっている (#3-2L)。そこで #3-2L のペプチドを合成し、リポソーム結合 (Lip-#3-2L) も行い、Lip-#3 と Lip-#3-2L それぞれで免疫したマウスについて、2 つの配列間の交叉反応性を検討した (図7)。その結果、Lip-#3 免疫により、#3、#3-2L どちらのペプチドでシミュレーションした標的細胞に対しても同程度の高い傷害活性が誘導できることが分かった。一方 Lip-#3-2L による免疫では、どちらの標的細胞に対しても弱い傷害活性しか誘導できなかった。このことから Lip-#3 をワクチンと使用すれば少なくとも世界中の HCV の約 85% までカバーできると推測された。残りの約 15% の HCV が持つ配列に対する交叉反応性も今後検討する予定である。

e) ウイルス感染による免疫原性の検討: Lip-#3 による免疫では、#3 に対する CTL 反応が効率よく誘導できるが、一方組換えワクシニアウイルスや組換えアデノウイルスを感染させ免疫したマウスでは、#3 に対する反応がほとんど誘導されないことが半明した (組換えアデノウイルスでの結果のみ図 8 に示す)。ウイルス感染では

#3 に対する反応の priming のみならず、Lip-#3 免疫で #3 に対する反応を誘導したマウスにおける boost 効果も示さないことが分かった (データ省略)。もし HCV 感染患者でも同様に #3 に対する CTL 反応がみられず、Lip-#3 により CTL 反応が誘導できるのであれば、それは慢性 C 型肝炎の治療ワクチンとして効果を発揮することが期待でき、さらなる検討が必要とされる。

D. 考察

HCV の発見当初から、このウイルスに対する CTL 反応は、HBV など他のウイルス感染と比較すると弱く、従来 CTL エピトープとして報告されたペプチドをリポソームに結合しても、その抗ウイルス効果は、最初にモデルとして検討したマウスの LCM ウイルスのエピトープペプチドと比較すると極めて弱いものであった。今回同じ HCV の NS3 領域のエピトープについて、マウスとヒトの MHC クラス I の両方を発現するマウスの同一個体について検討した結果、ヒトのエピトープの方が免疫原性が低いことが証明された。このことから HCV はヒトで感染・継代されるうち、免疫原性が低い変異株が優位に選択され進化してきたものと推察される。

このことからワクチンの成分として有用なエピトープを見つけることは困難であると思われた。一方ペプチド表面結合リポソームは、従来のペプチドワクチンやその他の CTL 誘導型ワクチンと比べてはるかに高い CTL 誘導能を発揮することを、これまでの研究で示してきた (*Clin Vaccine Immunol.* 16, 1383-1392 (2009))。そこで我々は今回、HLA-A2 結合モチーフを持つ候補ペプチドをまずリポソームに結合し、それで免疫したマウスの CTL 反応を調べることにより、ワクチン成分として適したものを選ぶ方法を選択した。

その結果同定できた 3 つのエピトープは、いずれも組換えワクシニアウイルスによるチャレンジを効果的に阻止する反応を誘導できた。その 1 つである #3 は、免疫効率、メモリー誘導能共に優れ、HCV-1b の配列にも交叉反応を誘導し、HCV の 85% 以上に有効であることが半明した。以上から #3 が HCV ワクチンの成分として非常に期待できることが示されたが、一方組換えウイルスによる免疫で

は#3 に対する反応が認められなかったことは、非常に意外であった。このような免疫原性がなく抗原性のみを示す CTL エピトープの報告は極めて珍しく、おそらく初めてかもしれない。だとするとこれもペプチド表面結合リポソームの持つ特異な性質の1つと考えられる。

この性質は慢性感染症や癌の治療ワクチンへの応用に極めて重要である。なぜならそのような絶えず CTL が抗原に遭遇し刺激を受ける状況では、メモリーT細胞の機能を抑制するいくつかの経路が作動し、結果として病原微生物や癌細胞を排除するまでの CTL 反応が誘導・維持できず、ワクチン投与によりそれを増強する手立ても同様に抑制されてしまうことになる。今まで治療ワクチンの試みが成功しなかった原因として、以上のようなメカニズムが解明されてきており、それを乗り越える手立てが必要とされているが、#3 のようなエピトープは、おそらく慢性感染症や癌の患者でも影響をうけることがなく、#3 特異的 CTL はナイーブ細胞のままとどまっていると予想される。それが事実であれば、そのような患者に Lip-#3 をうまく使用すれば、効果的なエフェクターT細胞が誘導できて、治療につながるかもしれない。今後#3 に対する免疫反応の詳細な解析、慢性感染モデルマウスにおける Lip-#3 による治療効果の判定、#3 と同様なエピトープの同定などを進める必要があると考えられる。

E. 結論

強力な抗ウイルス作用を効率よく誘導する HCV CTL エピトープが3つ同定できた。その1つである#3 は、そのワクチン成分としての有用性を裏付けるデータが数多く得られた。

F. 関連領域の研究

我々は HCV 感染において、肝細胞中の解毒酵素 microsomal epoxide hydrolase (mEH) が、その抗原性と細胞内局在を変化させ、感染潜伏期間中に血清中に出現し、抗体反応もみられることなどを示してきた (*J. Med. Virol.* **15**, 357-371 (1985), *J. Med. Virol.* **20**, 33-42 (1986), *J. Med. Virol.* **20**, 43-56 (1986), *Journal of Autoimmunity* **28**, 7-18 (2007))。今回 mEH の種々の部

分のエピトープに対するモノクローナル抗体を作成し、その抗原特異性から5つ (Type I to V) に分類した。この抗体を2つずつ組み合わせた antibody sandwich assay による抗原検出法を検討した結果、膜結合型 mEH を特異的に検出できる測定系2種と、可溶性線状型 mEH を特異的に検出する測定系1種の、計3種の測定系を樹立することができた。それを用いて各種細胞の培養液を検討した結果、肝がん細胞と glioblastoma 細胞の1部で mEH が膜結合性を失い、培養液中に検出されること、培養液中の mEH は細胞中の膜結合型と同様に複数の分子が会合したコンプレックスから成るが、その抗原構造が正常細胞中のものとは異なることが、2種の膜結合型 mEH 特異的抗原検出系の結果を合わせることにより解明された。HCV 感染中に血中に出現する mEH も同様な形をとっているものと推察された。mEH の異所性発現はその機能の異常につながり、慢性肝炎や肝がんにおいて、解毒機能や発ガン物質の代謝・排出、過酸化物質の代謝などが阻害されることと関連すると考えられた。またこのアッセイ系は、癌の早期診断に利用出来ることが期待された (投稿中)。

論文1に記載した5種のモノクローナル抗体を用い、種々の細胞における mEH の発現形態の比較検討を行った。その結果、分離肝細胞、培養肝細胞、肝癌細胞株、末梢血リンパ球、リンパ腫由来細胞株、glioblastoma 細胞株など、それぞれの間で非常に大きな発現形態の違いがあることが半明した。mEH は ER の膜上に存在し、他の解毒酵素と密接に共同作業を行ったり、細胞膜上では胆汁酸のトランスポート系の一役を担っていたりと、多彩な機能を発揮していることが知られている。今回の治験は、機能に関して従来知られていた mEH の多様性をはるかに超える発現形態の多様性が存在することを示し、mEH が種々の細胞で、まだ未知なさまざまな機能を果たしていることが示唆された。また肝がんや glioblastoma 細胞でも独特な mEH の存在形態が見つかり、発がんに関わるとされる mEH の役割を知る上で重要な所見であると考えられた (投稿中)。

5種のモノクローナル抗体を用いた検討をウイルス感染細胞について行なってみると、A型肝炎ウイルスやセングダイウイルスによる感染により mEH の膜表面での発現

が非常に増強され、mEHの機能にも大きな変化が生ずることが判明した。その1つとして発がん誘起物質DMBAの代謝が亢進し、おそらくその代謝産物であるDMBA-3,4-diol-1,2-epoxideの蓄積によると思われる細胞傷害が引き起こされることが分かった。この知見は、慢性ウイルス感染で肝がんが発生するメカニズムにmEHが関与している可能性があることを示唆した。そして重要なことは、ウイルス感染がmEHの存在形態に変化を及ぼすメカニズムとして、ウイルスのRNAゲノムがToll-like receptor 3 (TLR3)やRIG-Iなどの受容体に認識され細胞内にシグナルが伝達される経路が関係していることが分かったことである(投稿準備中)。このことは本ワクチン研究においても考慮に入れる必要がある。TLR3やRIG-Iなどのinnate immunityの受容体はワクチンのアジュバントの作用点でもあり、アジュバントのもつ作用、副作用に、こういった解毒酵素が関係してくる可能性があるかもしれない。似たような現象として、ウイルスRNAがinnate immunityの受容体を介してCYP3A11の発現に影響を及ぼし、アスピリンの代謝が妨げられるという報告がある(*The Journal of Experimental Medicine* **203**, 2589-2602 (2006).)。これはインフルエンザ患者にアスピリンを投与したときに起こるReye症候群の発病メカニズムを説明できるものとして注目されており、今後同様に、innate immunityと解毒酵素の発現異常との関係が明らかになる可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1) Toshitaka Akatsuka, Akira Takagi, Osamu Moriya, Nobuharu Kobayashi, Masanori Matsui, Maiko Taneichi, Tetsuya Uchida, A non-immunogenic hepatitis C virus peptide coupled to the surface of liposomes induces an efficient anti-viral CD8 T cell response. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Yokohama, Sep. 10-14, 2010

2) 赤塚俊隆, 高木徹, 守屋修, 小林信春, 松井政則, 種市麻衣子, 内田哲也, 非免疫原性HCV由来ペプチドによる抗ウイルスCD8⁺T細胞反応の誘導 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, Nov 7-9, 2010.

3) 赤塚俊隆, 高木徹, 守屋修, 小林信春, 松井政則, 種市麻衣子, 内田哲也, 非免疫原性HCV由来ペプチドによる抗ウイルスCD8⁺T細胞反応の誘導 第14回日本ワクチン学会学術集会, 東京, Dec 11-12, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願

発明の名称: 「C型肝炎ウイルスリポソームワクチン」

出願番号: 特願2010-201160

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

SEQ ID	Position	Sequence	BIMAS	SYFPEITHI	Report	Pool
#1	1288	GSPITYSTY	83.5	28	+	I
#2	1627	RLGAVQNEV	69.6	23		II
#3	1542	YMNTPLPV	231.1	23		II
#4	1131	YLVTRHADV	319.9	24	+	I
#5	1547	GLPVCQDHL	10.5	21		II
#6	1313	IICDECHST	7.1	18		I
#7	1617	TLHGPTPLL	21.4	26	+	I
#8	1606	QMMKCLIRL	294.5	23		II
#9	1464	FSLDPTFTI	27.6	17		III
#10	1610	CLIRLKPTL	21.4	26		II
#11	1253	VLNPSVAAT	29.1	25		III
#12	1450	SVIDCNTCV	25.0	19		III
#13	1510	GMPDSSVLC	54.4	13		III
#14	1420	GLDVSVIPT	6.9	19		III
#15	1560	GVFTGLTHI	7.8	20		III
#16	1250	KVLVLNPSV	78.8	21		IV
#17	1648	CMSADLEV	23.2	22		IV
#18	1178	GLFRAAVCT	27.6	18		IV
#19	1645	IMTCMSADL	26.2	21		IV
#20	1406	KLVALGINA	17.4	16	+	I
#21	1169	LLCPAGHAV	118.2	26	+	I
#22	1342	RLVWLATAT	7.5	16		不溶
#23	1069	FLATCINGV	735.9	29		IV
#24	1176	AVGLFRAAV	23.1	20		IV
#25	1039	LLGCITSL	83.5	28	+	I

HCVのヒトとマウスでの免疫原性の比較

- ELISPOT (IFN- γ)

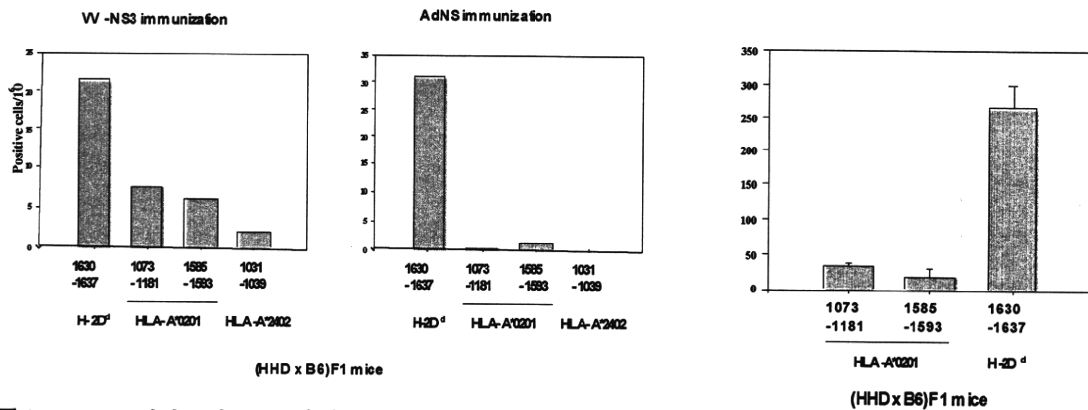


図1 HCVのヒトとマウスでの免疫原性の比較 ELISPOT (IFN- γ) ヒトのMHCクラスI (HLA-A2)を発現するトランスジェニックマウス (HHD) とマウスのMHCクラス (H-2d)を発現する C57BL/6 マウスを掛け合わせた F1マウスは、同じ固体での両者の MHCに依存したCTL反応を測定比較できる。このマウスを HCVのNS3遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルス (VV-NS3: 左) または組換えアデノウイルス (AdNS: 右) で免疫し、1 w後に脾臓を摘出し、HLA-A2のエピトープ (aa. 1073-1131, 1585-1593)、H-2dのエピトープ (aa. 1630-1637)、および陰性対照として HLA-A24のエピトープ (aa. 1031-1039) のペプチドに対する CD8⁺T細胞反応を、ELISPOT (IFN- γ) で比較した。

図2 リボソーム結合したヒトとマウスのCTLエピトープの免疫原性 ELISPOT (IFN- γ) HHDマウス (HLA-A2) と C57BL/6 マウス (H-2d) をかけあわせた F1 マウスを、図 1で検討した HLA-A2のエピトープ (aa. 1073-1131, 1585-1593)、および H-2dのエピトープ (aa. 1630-1637) のペプチドをそれぞれ結合したリボソームで免疫し、1 w後に脾臓を摘出し、それぞれの対応するペプチドに対する CD8⁺T細胞反応を、ELISPOT (IFN- γ) で比較した。