

図3 HCV NS3遺伝子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 エピトープ同定過程で選択された6種の候補ペプチドそれぞれを結合したリポソームワクチンでHHDマウス(♀)を免疫し、1w後にVV-NS3を接種、5d後に卵巣を摘出してそのホモジネートのウイルス量を定量した。陰性対照としてナイーブマウス、陽性対照としてNS3遺伝子発現組換えアデノウイルス(AdNS)で免疫したマウスを用いた。

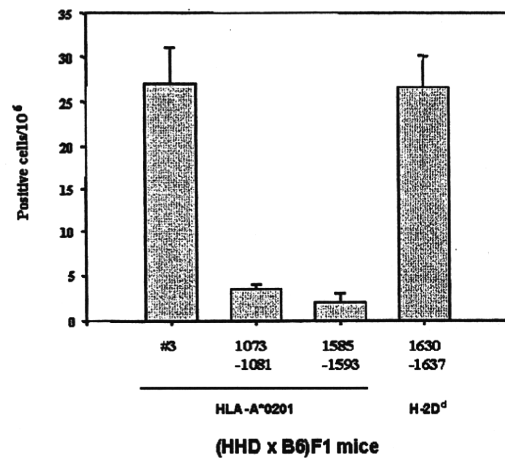


図4 リポソーム結合したヒトとマウスのCTLエピトープの免疫原性-ELISPOT (IFN- γ) 図2と同様に、HHDマウス(HLA-A2)とC57BL/6マウス(H-2d)をかけあわせたF1マウスを、図1で検討したHLA-A2のエピトープ(aa. 1073-1131, 1585-1593)、およびH-2dのエピトープ(aa. 1630-1637)のペプチド、および新規同定ペプチド#3(aa. 1542-1550)をそれぞれ結合したリポソームで免疫し、1w後に脾臓を摘出し、それぞれの対応するペプチドに対するCD8⁺T細胞反応を、ELISPOT(IFN- γ)で比較した。

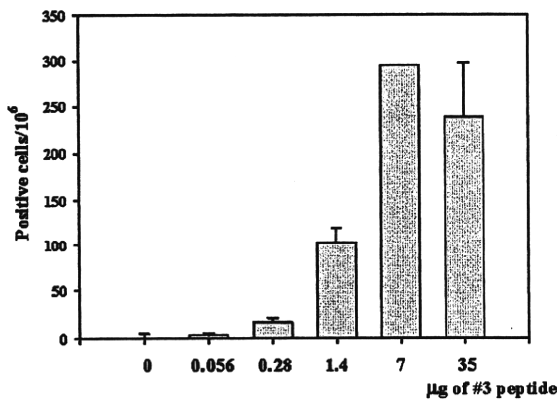


図5 Lip-#3の免疫効率 HHDマウスに免疫するLip-#3の量を50 μ lから1/5ずつ減らし、1w後に脾臓を摘出し、それぞれの量のペプチド結合ワクチンに対するCD8⁺T細胞反応を、ELISPOT(IFN- γ)で比較した。リポソームに結合したペプチド量を700 μ g/mlと推定し、ペプチド量で表示してある。

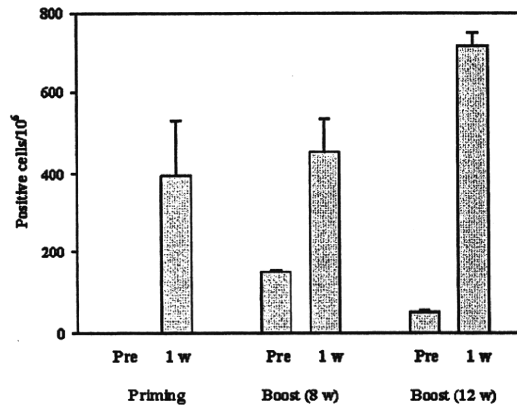
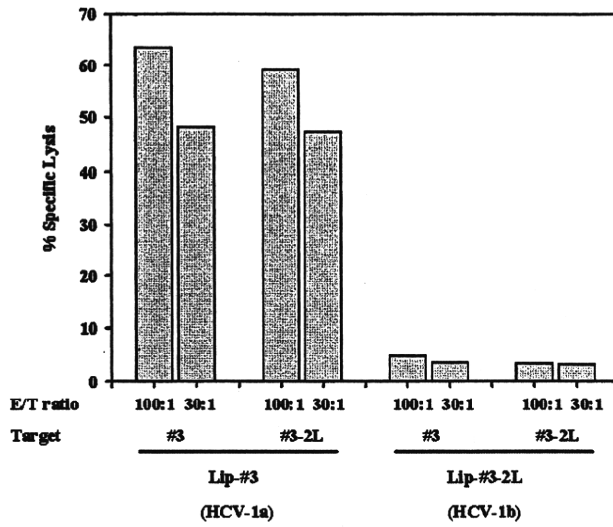


図6 Lip-#3によるメモリー誘導 HHDマウスにLip-#3を20 μ l接種(s.c.)し、1w、8w、12w後に脾臓を摘出し、#3に対するCD8⁺T細胞反応を、ELISPOT(IFN- γ)で比較した(Primingの1w、Boost(8w)とBoost(12w)のPre)。免疫後8wと12wの時点でそれぞれLip-#3でboostし、その1w後にrecall responseを測定した(Boost(8w)とBoost(12w)の1w)。



a.a.	遺伝子型	配列	名称
1542-	1a	YMNTPLGPV	#3
1550	1b	YLNTPLGPV	#3-2L

2つの配列で分離株の約85%がカバーされる。

図7 Lip-#3とLip-#3-Lによる交差反応性CTL誘導
HHDマウスにLip-#3またはLip-#3-2Lを20 μl接種 (s.c.) し、1w後に脾臓を摘出し、対応するペプチドでin vitro stimulationを行い、6d後に#3または#3-2LでパルスしたRMA-S/HHDを標的細胞として⁵¹Cr-release assayを行った。

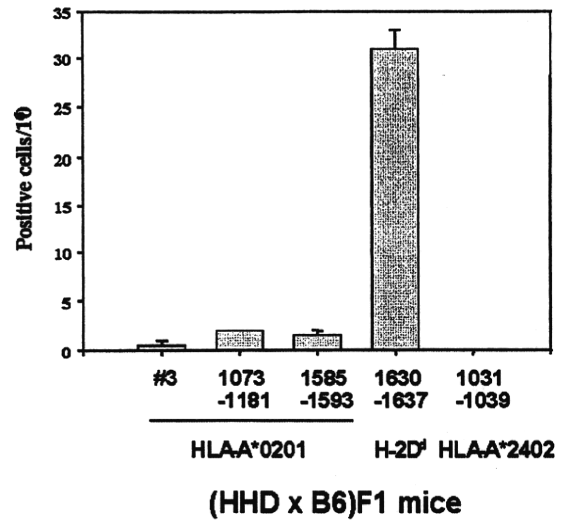


図8 HCV NS3遺伝子発現組換えアデノウイルス (AdNS)免疫マウスにおける#3との反応性 図1での実験と同様に、HHDマウス (HLA-A2) と C57BL/6マウス (H-2d) をかけあわせたF1マウスにAdNSを接種して免疫し、1w後に脾細胞を摘出し、#3に対する反応を、他のHLA-A2拘束性エピートープ (aa. 1073-1131, 1585-1593)、およびH-2dのエピートープ (aa. 1630-1637) と ELISPOT (IFN-γ) で比較した。

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

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 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

ペプチド結合リポソームを用いた CTL 誘導型エボラワクチンの開発に向けた検討を行った。昨年度同定した 14 種類の HLA-A2 拘束性エボラウイルス由来 CTL エピトープを結合したリポソームによって誘導される CTL が、ペプチド特異的 killing 活性を示し、内在性抗原を認識することが確認されたことから、これらのペプチド結合リポソームがエボラウイルス感染防御効果の高いワクチンとなりうることを示唆された。本年度は、HLA-A24 拘束性の CTL エピトープを同定した。コンピュータプログラムを用いた検索により、CTL エピトープを 87 種類選択した。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-A24 トランスジェニックマウスを免疫し、抗原特異的 CD8⁺T 細胞の誘導を検討した結果、11 種類のペプチドが高効率に抗原特異的 CD8⁺T 細胞を誘導した。それら 11 種類のペプチドをリポソームに結合させ、HLA-A24 トランスジェニックマウスに免疫して抗原特異的 CD8⁺T 細胞の誘導を検討した結果、7 種類のペプチド結合リポソームが有意に抗原特異的 CD8⁺T 細胞を誘導した。以上、昨年度および本年度の検討により、エボラワクチンのワクチン抗原となりうる HLA-A2 および HLA-A24 拘束性のエボラウイルス由来 CTL エピトープが同定され、エボラワクチン候補物質が作製された。

A. 研究目的

本研究はペプチド結合リポソームを用いた CTL 誘導型エボラワクチンを開発することを目的としている。昨年度の本研究において複数の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを同定し、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することを報告した。本年度は、そ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 killing 活性を有し、内在性抗原を認識するかどうかを検討した。また、新たに HLA-A24 拘束性の CTL エピトープの同定を行った。

B. 研究方法

・マウス：HLA-A2、-A24 トランスジェニックマウスを使用した。

・コンピュータプログラムを用いた CTL エピトープの検索：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）のアミノ酸配列において、HLA-A24 結合ペプチドモチーフに従い、2 種類のコンピュータプログラム、「BIMAS」および「SYFPEITHI」を用い、9 個及び 10 個のアミノ酸からなる CTL エピトープを予測した。

・合成ペプチドによる IFN- γ CD8⁺T 細胞の誘導：正常マウスの脾細胞を調整し、予測したエピトープからなる合成ペプチドでパルスした細胞を同系の naive マウスに免疫し、7 日

後に脾細胞を回収して各々のペプチドで抗原刺激した後、細胞表面を FITC-抗 CD8 抗体、細胞内部を PE-抗 IFN- γ 抗体で染色し、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を用いて測定した。

・ペプチド結合リポソームによる CTL の誘導：IFN- γ CD8⁺T 細胞を誘導したペプチドをリポソーム表面に結合させ、CpG 存在下で HLA-A2 トランスジェニック（HHD）マウスの皮下に免疫した。免疫 7 日後に、以下の方法によりインフルエンザウイルス特異的 CTL の誘導を検討した。

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 抗体で染色し、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。

b) CD107 陽性細胞の測定：ペプチド結合リポソームで 3 回免疫したマウスより脾細胞を回収し、各々のペプチドで抗原刺激すると同時に FITC-抗 CD107 抗体を加え、細胞表面上の CD107 分子を染色した。細胞表面を PE-Cy5-抗 CD8 抗体、細胞内部を PE-抗 IFN- γ 抗体で染色し、それぞれのエピトープに特異的に反応する IFN- γ CD107⁺CD8⁺T 細胞をフローサイトメトリーで測定した。

c) *in vivo* CTL assay：naive マウスの脾臓

を用いて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調整し、それぞれを異なる濃度の CFSE で染色した。その2つの細胞群を同数混ぜて、ペプチド結合リポソームで免疫したマウスに細胞移入し、ペプチドでパルスした脾細胞の溶解をフローサイトメトリーを用いて解析した。

・エボラウイルス構成タンパク質を発現する細胞株の樹立：分担研究者の北大・高田教授によってクローニングされたエボラウイルスを構成する NP, GP, VP40, VP30, L 遺伝子を発現ベクター pAcGFP1-Hyg-N1 に組み込んだプラスミドを、HLA-A2 を発現するヒト B 細胞株、C1R-A2 にトランスフェクションし、エボラウイルス構成タンパク質が発現した細胞を GFP の検出により選択した。

・ ^{51}Cr 遊離試験：ペプチド結合リポソームを CpG 存在下で HHD マウスの皮下に3回免疫し、最終免疫2週後に脾細胞を回収して、それぞれのペプチドで1週間抗原刺激し、エフェクター細胞とした。C1R-A2 トランスフェクタントは、 ^{51}Cr で標識して標的細胞とした。エフェクター細胞と標的細胞を比率を変えて混和し、遊離した ^{51}Cr 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) HLA-A2 拘束性 CTL エピトープによって誘導される CTL の killing 活性の測定：昨年度同定された14種類の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを結合したペプチド結合リポソームで抗原特異的 CTL が高効率に誘導されることが以下の検討により確認された。

a) $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD107}^+\text{CD8}^+$ T 細胞の測定：14種類のペプチド結合リポソームすべてにおいて $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD107}^+\text{CD8}^+$ T 細胞が検出された(図-1)。このことから、誘導されたペプチド特異的 CTL は killing 活性を持つことが示唆された。

b) *In vivo* killing 活性の測定：14種類のエボラウイルス由来ペプチドを結合させたペプチド結合リポソームすべてにおいて killing 活性が検出された(図-2)。特に、L-209, L-293 を結合したリポソームでは、100%の killing 活性がみられた。

2) エボラウイルス構成タンパク質を発現する標的細胞の作製：エボラウイルスを構成するタンパク質、NP, VP40, GP, VP30, L を発現する細胞株が樹立された(図-3)。

3) ペプチド結合リポソームによって誘導さ

れた CTL による内在性抗原の認識：L タンパク質を発現する C1R-A2-L 細胞を標的細胞として使用し、CTL アッセイを行った結果、L-209, L-293, L-771 結合リポソームによって誘導された CTL は、C1R-A2-L 細胞を特異的に認識・溶解した(図-4)。

4) HLA-A24 拘束性 CTL エピトープの同定：エボラウイルス(ザイール株)を構成する7つのタンパク質(NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24, L)から選択した、87種類の CTL エピトープを用いて以下の検討を行った。

a) CTL エピトープによる $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD8}^+$ T 細胞の誘導：87種類のうち27種類のペプチド(NP, 1種類; VP40, 1種類; GP, 2種類; L, 23種類)が抗原特異的に $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD8}^+$ T 細胞を誘導した(図-5)。その中で、特に強く $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD8}^+$ T 細胞を誘導するペプチドが11種類存在した。

b) ペプチド-リポソームによる $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD8}^+$ T 細胞の誘導：上記11種類のうち7種類のペプチド結合リポソームにおいて、有意にペプチド特異的 $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD8}^+$ T 細胞が誘導された(図-6)。特に L-1943 結合リポソームは極めて強い $\text{IFN-}\gamma^+\text{CD8}^+$ T 細胞誘導能を示した。

D. 考察

昨年度同定された、14種類のエボラウイルス由来 HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを結合したリポソームによって誘導された CTL は、ペプチド特異的な killing 活性を有することが示された。エボラウイルスには、病原性の異なる5種(ザイール、スーダン、レストン、コートジボアールおよびブンディブギョ)が存在する。本研究では、もっとも致死率の高いザイール株のアミノ酸配列をもとに、CTL エピトープを同定したが、NP-401, GP-160, L-771 は、上記5種類のエボラウイルスに共通のエピトープであった(表1)。従って、これら3つのペプチド結合リポソームは、どのエボラウイルスに対しても、防御効果を示すことが期待された。また、3種類のペプチド結合リポソーム(L-209, L-293, L-771)によって誘導された CTL は、 ^{51}Cr 遊離試験で内在性抗原 L タンパク質を認識した。従って、これら3つは真のエピトープであると考えられた。

E. 結論

エボラワクチンのワクチン抗原となりうる HLA-A2 および HLA-A24 拘束性のエボラウイルス由来 CTL エピトープが同定され、エボラワクチン候補物質が作製された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 松井政則、禾泰壽、山岸敏之、赤塚俊隆、内田哲也
ペプチド結合リポソームを用いた、エボラウイルスに対する CTL 誘導型ワクチンの開発
埼玉医科大学雑誌 第 37 巻、第 1 号
15-20, 2010
- 2) 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. 23(1):165-177, 2010.
- 3) Morishima, N., I. Mizoguchi, M. Okumura, Y. Chiba, M. Xu, M. Shimizu, M. Matsui, J. Mizuguchi, and T. Yoshimoto.
A pivotal role for interleukin-27 in CD8+ T cell functions and generation of cytotoxic T lymphocytes.
J. Biomed. Biotechnol. 2010: Article ID605483:1-10, 2010.
- 4) Pickens, S. R., N. D. Chamberlain, M. V. Volin, A. M. Mandelin II, H. Agrawal, M. Matsui, T. Yoshimoto, and S. Shahrara.
Local expression of IL-27 ameliorates collagen induced arthritis
Arthritis Rheum. (in press) 2010.

2. 学会発表

- 1) A non-immunogenic hepatitis C virus peptide coupled to the surface of liposomes induces an efficient anti-viral CD8 T cell response. Akira Takagi, Osamu Moriya, Nobuharu Kobayashi, Masanori Matsui, Toshitaka Akatsuka, Maiko Taneichi, Tetsuya Uchida.
The 17th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses
Yokohama, Japan September 10-14, 2010.
- 2) CTL 誘導型アデノウイルスワクチンの免疫ルートがインフルエンザウイルスに対する感染防御に与える影響：須田達也、川野雅章、禾泰壽、大野尚仁、赤塚俊隆、

松井政則 第 84 回東京医科大学・東京薬科大学・免疫アレルギー研究会 東京
2010 年 11 月

- 3) 細胞傷害性 T 細胞誘導型ペプチド結合リポソームワクチンによるインフルエンザウイルス感染防御効果の解析：松井政則、須田達也、高山俊輔、種市麻衣子、赤塚俊隆、内田哲也 第 14 回日本ワクチン学会 東京 2010 年 12 月
- 4) エボラウイルス由来 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：須田達也、高山俊輔、種市麻衣子、大野尚仁、赤塚俊隆、内田哲也、松井政則 第 14 回日本ワクチン学会 東京 2010 年 12 月
- 5) 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：高木徹、守屋修、小林信春、松井政則、赤塚俊隆、種市麻衣子、内田哲也 第 14 回日本ワクチン学会 東京 2010 年 12 月
- 6) 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：高木徹、守屋修、小林信春、松井政則、赤塚俊隆、種市麻衣子、内田哲也 第 58 回日本ウイルス学会 徳島 2010 年 11 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) 「エボラウイルスリポソームワクチン」
出願番号：特願 2010-231918
出願日：2010 年 10 月 14 日
発明者：松井政則（埼玉医大）、内田哲也、種市麻衣子（国立感染研）、横山晶一、桑原愛（日油株式会社）

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

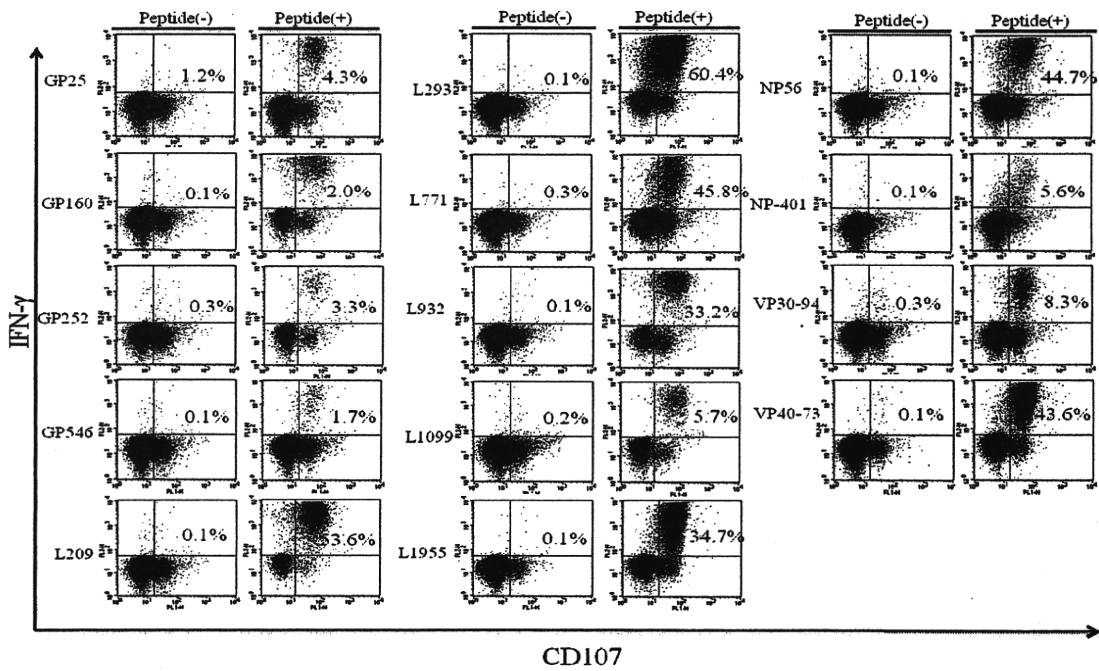


図1 HLA-A2 拘束性ペプチド結合リポソームによる IFN- γ CD107⁺ CD8⁺ T 細胞の誘導
 14 種類のペプチド結合リポソームをそれぞれ CpG と共に 3 回免疫した HLA-A2 トランスジェニックマウスにおいて、ペプチド特異的に IFN- γ CD107⁺ CD8⁺ T 細胞が誘導された。CD8⁺細胞に gate をかけ、数字は、CD8⁺細胞中の IFN- γ CD107⁺細胞の割合である。

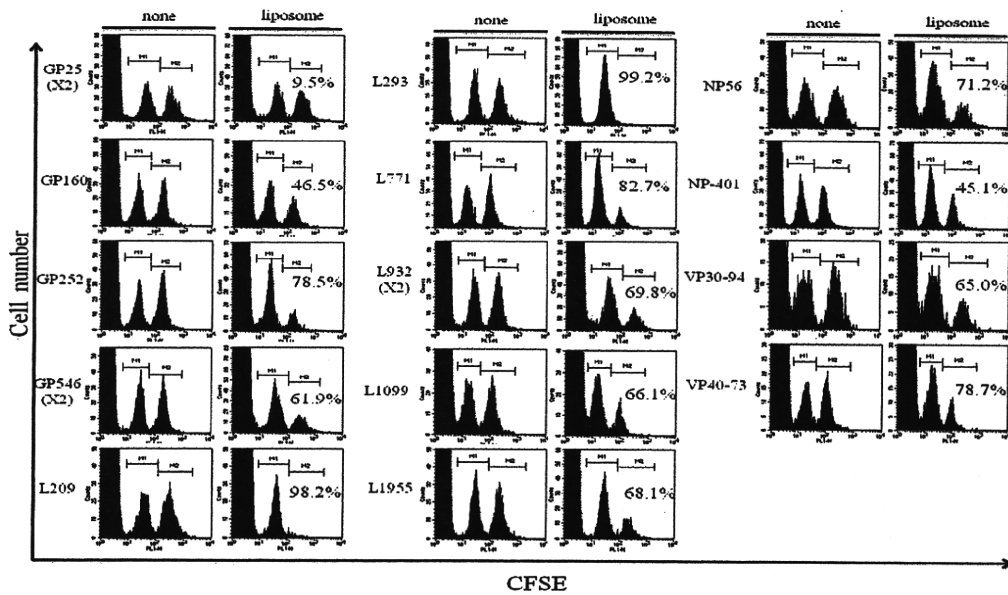


図2 マウス体内における CTL のペプチド特異的 killing 活性の測定
 14 種類のペプチド結合リポソームと CpG を HLA-A2 マウスに免疫した。1 週間後に、in vivo CTL assay を行い、ペプチド特異的な killing 活性を測定した。数字は、% Specific Lysis を示す。

	zaire	Sudan	Reston	Cote d'Ivoire	Bundibugyo
NP-56	IIQAFEAGV	-----	V-----I	-----	-----
NP-401	RLAKLTEAI	-----	-----	-----	-----
VP40-73	FILEAMVNV	-----T---	-----T---	-----	-----
GP-25	ILFQRTFSI	----KA--M	-----AI-M	---HKV---	---HKV-P-
GP-160	FLYDRLAST	-----	-----	-----	-----
GP-252	FLLQLNETI	--F---D--	--V-----L	--VL-----	--V-----
GP-546	GLMHNQDGL	-----NA-	-V-----N--	-I-E--N--	-I----N--
VP30-94	SLTDRELLL	-----	--N-H----	-----	-----
L-209	AMDWYQASV	ST----PNI	-T-----PTL	-K---HE--	-K---H--I
L-293	KIIFLEPL	----Y----	----Y----	-V-----	-V-----
L-771	RVAASLAKV	-----	-----	-----	-----
L-932	GLFQLKTYL	-----H--	-----RV--	-----	-----R---
L-1099	ALTQITCTV	-IQP-K---	--QK-S---	-----	--IKVS---
L-1955	VLKAVVLKV	T--V-I---	---V-----	A--V-----	---I-III--

表1 エボラウイルス5株（ザイール、スーダン、レストン、コートジボアール、ブンディブギョ）における、14種類のHLA-A2拘束性CTLエピートープアミノ酸配列の相同性。（-）は、同一のアミノ酸を表す。

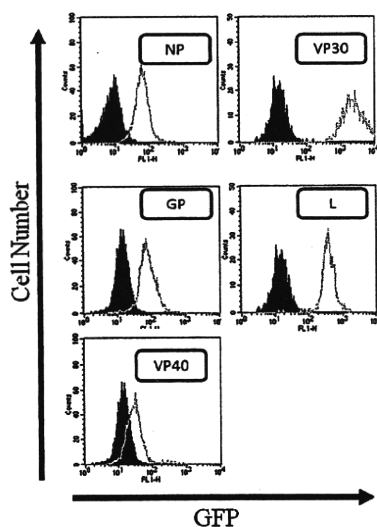


図3 エボラウイルス構成タンパク質を発現する細胞株の樹立

pAcGFP1-Hyg-N1 に組み込まれた NP, GP, VP40, VP30, L 遺伝子を C1R-A2 細胞にトランスフェクションし、タンパク質の発現を GFP で検出した。

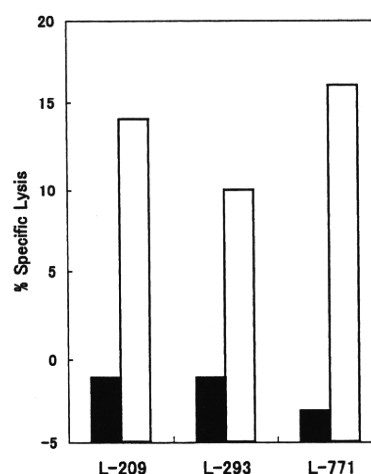


図4 誘導されたCTLによる、内在性抗原の認識

L-209, L-293, L-771 のペプチド結合リポソームを免疫したマウスの脾細胞を、各々のペプチドで抗原刺激し、L タンパク質を発現する C1R-A2-L (□) と発現していない C1R-A2 (■) を標的細胞として、⁵¹Cr 遊離試験を行った。

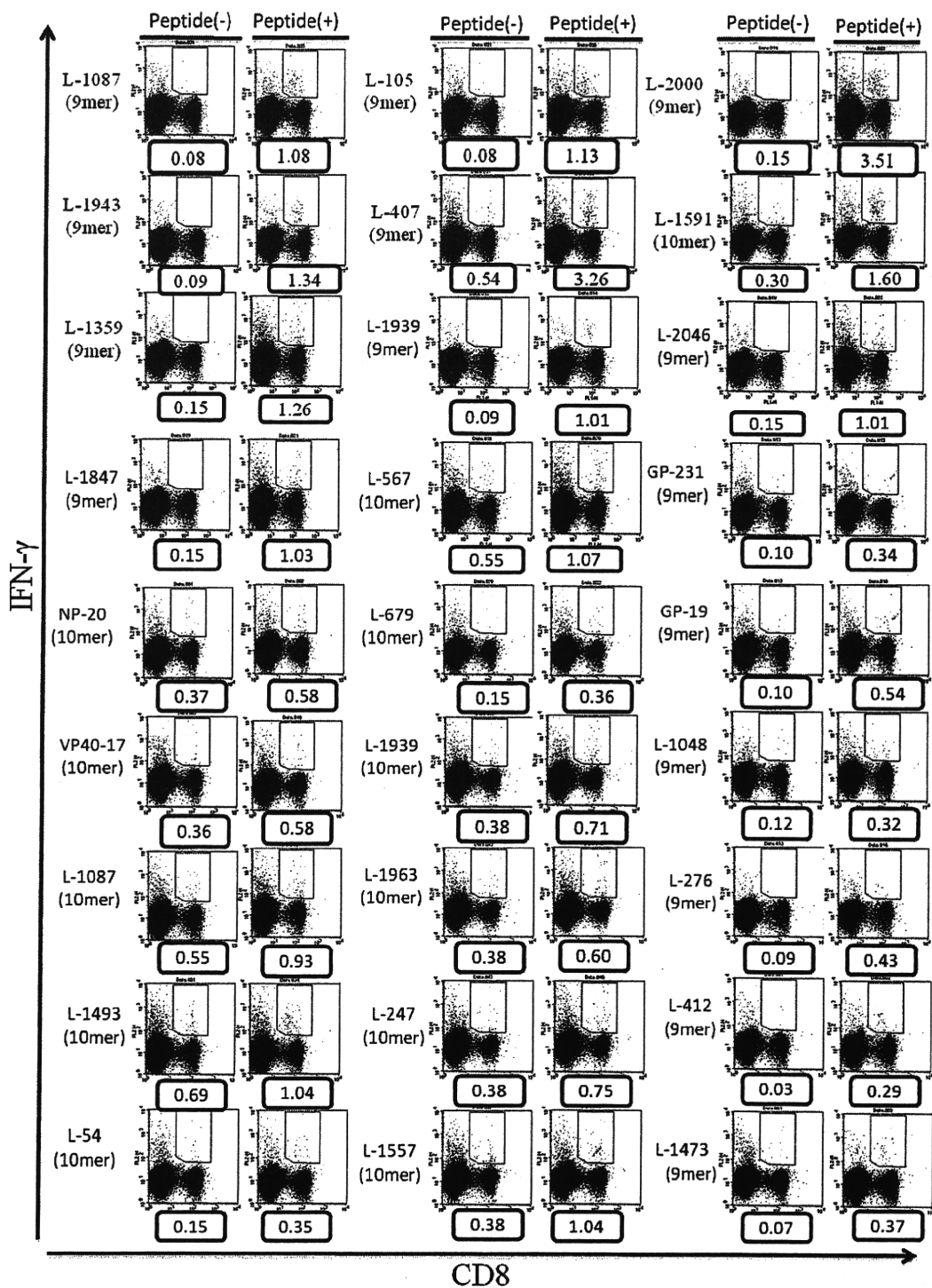


図5 予測した HLA-A24 拘束性エボラウイルス由来 CTL エピトープでパルスした脾細胞による IFN- γ ⁺CD8⁺ T 細胞の誘導

HLA-A24 トランスジェニックマウスの脾細胞に、87 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 27 種類のペプチドの結果を示した。数字は、CD8⁺細胞中の IFN- γ ⁺細胞の割合である。

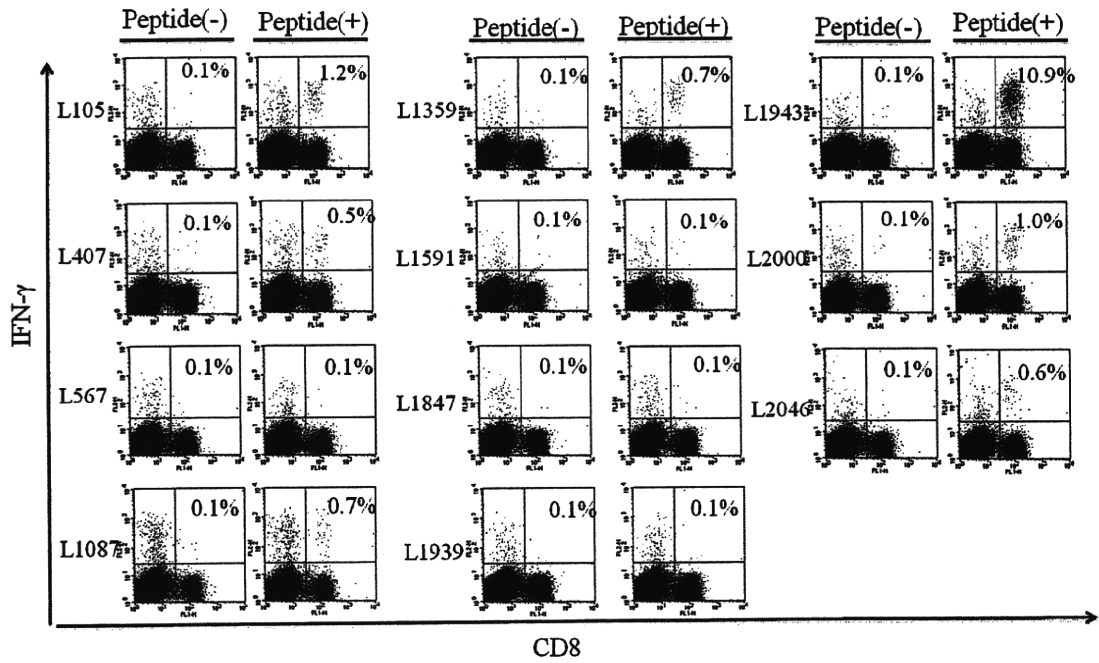


図6 HLA-A24 拘束性ペプチド結合リポソームによって誘導された、IFN- γ CD8⁺ T細胞

IFN- γ CD8⁺ T細胞を効率よく誘導した11種類のHLA-A24拘束性ペプチドを使って、ペプチド結合リポソームを作製した。そのペプチド結合リポソームとCpGをHLA-A24トランスジェニックマウスに免疫し、誘導されるIFN- γ CD8⁺ T細胞数(割合)をフローサイトメトリーで測定した。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 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー
研究協力者 青枝大貴 同上 主任研究員

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 準拠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 準拠のロットで前臨床試験を行うことが可能とおもわれた。また、D タイプの CpGODN (D 3 5) が凝集しやすく GMP 準拠が難しかった点については、長さや配列を工夫した次世代 D-ODN のスクリーニングを開始した。

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による CD8T 細胞誘導の機序解明を進め、リポソームワクチンによる CD8T 細胞誘導には、K3-CpGODN による TLR9 を介した I 型 IFN 産生が重要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 TLR9 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 準拠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) リポソームワクチンの作用機序解明

CpG-ODN をアジュバントして加えたりポソームワクチンで、様々な自然免疫レセプターを欠損したマウスを免疫し、リポソームワクチンによる CD8T 細胞誘導が、どのような自然免疫反応に依存するのかを、抗原特異的なサイトカイン産生、CTL 活性、テトラマーによる抗原特異的 CD8T 細胞の検出、により検討した。

(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) リポソームワクチンの作用機序解明

種々の自然免疫レセプター欠損マウスを横断的にスクリーニングした結果、リポソームワクチンによるCD8T細胞誘導は、リポソームワクチンに添加しているCpG-ODNによるTLR9を介したI型IFN産生に依存していることが明らかとなった。リポソームワクチン単独での免疫では、CD8T細胞誘導は検出できず、CpGアジュバントによるI型IFN産生がリポソームワクチンによるCD8T細胞誘導に重要であることが示唆された。また、リポソーム自身による活性化が予想されるNLRを介したイン

フラマゾーム活性化経路については、それらのノックアウトマウスでCD8T細胞の誘導は減弱していないことから、リポソームワクチンによるCD8T細胞誘導には必須でないことが示唆された。

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- α β 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. Jounai N, Kobiyama K, Shiina M, Ogata

- K, Ishii KJ, Takeshita F. "NLRP4 Negatively Regulates Autophagic Processes through an Association with Beclin1". *J Immunol.* 2011 ;186(3):1645-55.
2. Kobiyama K, Jounai N, Ishii KJ, Horii T, Suzuki K, Ryo A, Takeshita F. "Modulation of intracellular signaling using protein-transduction technology" *Crit Rev Immunol.* 2010;30(5):395-421.
 3. Yamaguchi T, Kawabata K, Kouyama E, Ishii KJ, Katayama K, Suzuki T, Kurachi S, Sakurai F, Akira S, Mizuguchi H. "Induction of type I interferon by adenovirus-encoded small RNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 ;107(40):17286-91.
 4. Coban C, Horii T, Akira S, Ishii KJ. "TLR9 and endogenous adjuvants of the whole blood-stage malaria vaccine." *Expert Rev Vaccines.* 2010 ;9(7):775-84.
 5. Horii T, Shirai H, Jie L, Ishii KJ, Palacpac NQ, Tougan T, Hato M, Ohta N, Bobogare A, Arakaki N, Matsumoto Y, Namazue J, Ishikawa T, Ueda S, Takahashi M. "Evidences of protection against blood-stage infection of *Plasmodium falciparum* by the novel protein vaccine SE36." *Parasitol Int.* 2010 ;59(3):380-6
 6. Coban C, Yagi M, Ohata K, Igari Y, Tsukui T, Horii T, Ishii KJ, Akira S. "The Malarial Metabolite Hemozoin and Its Potential Use as a Vaccine Adjuvant." *Allergol Int.* 2010 ;59(2).
 7. S. Koyama, T. Aoshi, T. Tanimoto, Y. Kumagai, K. Kobiyama, T. Tougan, K. Sakurai, C. Coban, T. Horii, S. Akira, K. J. Ishii. "Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes." *Sci. Transl. Med.* 2; 25ra24 (2010).
 8. 青枝大貴、石井健 「ワクチンを考えるうえで必要な免疫の知識」 *臨床検査* 54 巻 11 号 Page1220-1229(2010)
 9. 小檜山康司、石井健 「DNA センサーとその生理的意義」 *細胞工学* 29 巻 10 号 Page1004-1013(2010)
 10. 小檜山康司、石井健 「自然免疫とワクチン開発」 *医学のあゆみ* 234 巻 5 号 Page608-614(2010)
 11. 小山正平、石井健 「ワクチンアジュバントの必要性和安全性」 *医学のあゆみ* 234 巻 3 号 Page217-221(2010)
 12. 小檜山康司、石井健 「アジュバントに

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

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

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 2009-111967 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

3. その他

該当無し

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 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。昨年度は、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を受けないが、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、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を報告した。本年度は共焦点レーザー顕微鏡を用いて、取り込まれた抗原と細胞内小器官との局在関係について解析を行った。その結果、取り込まれた抗原の一部がLAMP-1 (lysosomal associated membrane protein-1) 発現コンパートメントと共局在していることが明らかとなった。

A. 研究目的

従来のワクチンは主としてウイルスの表面抗原に対する抗体の産生、いわゆる「液性免疫」を誘導し、宿主の細胞へのウイルス感染を阻止することを目標としているが、インフルエンザウイルス、エイズウイルスといった表面抗原が高頻度に変異するウイルスに対しては抗体による感染防御効果は限定的である。細胞障害性T細胞(CTL)による「細胞性免疫」はウイルスの表面抗原だけでなく、変異の起こりにくいウイルスの内部構造の抗原も標的としているため、現行のワクチンの欠点を補うことが可能である。我々が開発したリポソームワクチンはこの要請に応えるものであるが、その細胞内動態については未だ不明の点が多い。そこで、本年度は細胞内での局在に焦点を当てて検討を行った。

B. 研究方法

株化マクロファージ(clone #39)の培養中に、消化を受けると蛍光を発するDQ-OVAを結合したリポソームを添加し、一定時間培養した後、マクロファージを回収して共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析を行った。

株化マクロファージはリポソーム結合抗原との培養前に特異的抗体を用いて、MHC class I、EEA1 (early endosomal antigen 1)、LAMP-1発現コンパートメントの蛍光標識を行った。MHC-class IIの蛍光標識は、蛍光標識DM-DsRedを発現した株化マクロファージを

用いた。

C. 研究結果

不飽和脂肪酸からなるリポソーム結合抗原は飽和脂肪酸からなるリポソーム結合抗原よりも効率よく抗原提供細胞に取り込まれ、消化される(図1-A)。消化を受けた抗原(緑)とclass I、またはclass II(赤)との共局在(黄)は、飽和脂肪酸からなるリポソーム結合抗原ではほとんどclass IIとの共局在を示すのに対し、不飽和脂肪酸からなるリポソーム結合抗原はclass Iとの共局在も認められることが統計的にも明らかとなった(図1-B)。

更に細胞内に取り込まれた不飽和脂肪酸からなるリポソーム結合抗原と細胞内小器官の共局在について検討したところ、抗原の一部がLAMP-1発現コンパートメントと共局在していることが明らかとなった。EEA-1発現コンパートメントとの共局在はLAMP-1発現コンパートメントとの共局在に比較して有意に低かった(図2-A, B)。

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。昨年度までの検討で、リポソーム結合抗原の取り込みは、ピノサイトーシス阻害剤であるDMAによって顕著に抑制、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いること、4℃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。今年度の検討では、取り込まれた抗原の一部は LAMP-1 発現コンパートメントと共局在することが明らかとなり、CD4 T 細胞活性化の経路にはライソゾームが関与し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

- 1) Tanaka, Y., M. Taneichi, M. Kasai, T. Kakiuchi and T. Uchida.
Liposome-coupled antigens are internalized by antigen-presenting cells via pinocytosis and cross-presented to CD8⁺ T cell. PLoS ONE 5(12): e15225

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

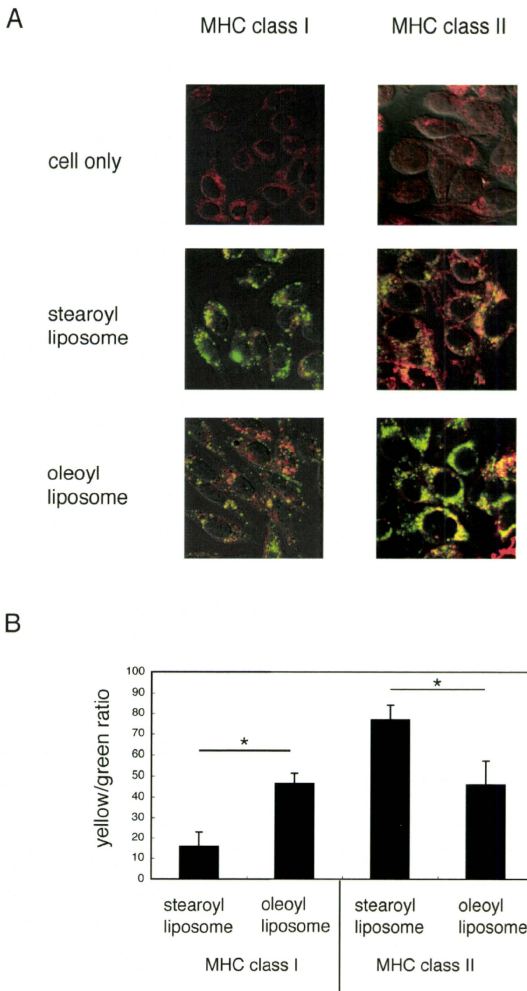
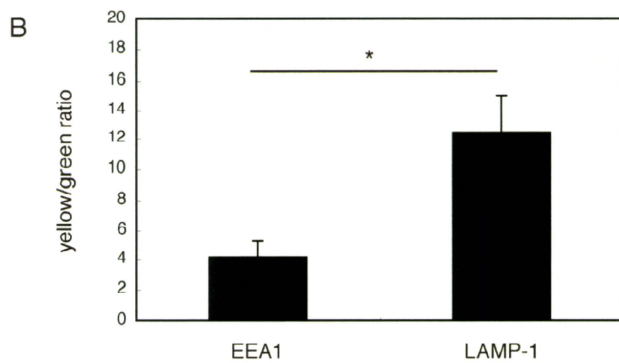
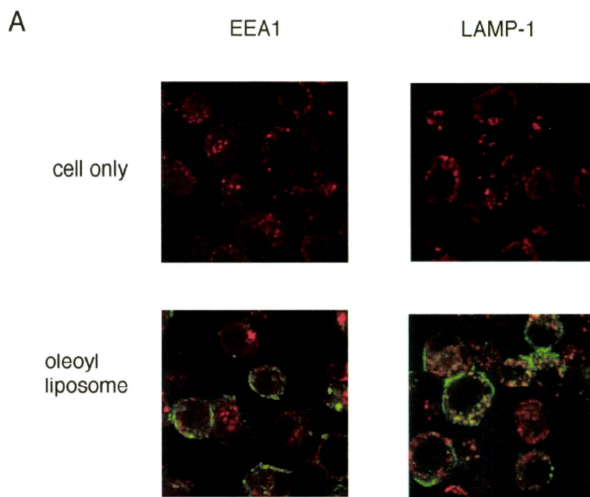


Fig. 2



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、昨年度に続き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い、ペプチド-リポソーム結合条件の最適化を行った。この検討により、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、および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が求められた。また、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内部タンパク由来 CTL エピトープペプチドを添加し、CD8 T 細胞の反応性を ELISpot assay により検討した結果、複数の donor において CTL エピトープに対する顕著な反応が見られ、これまでに同定された CTL エピトープがワクチン抗原として有効であることが示唆された。

A. 研究目的

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、製剤設計、製造方法の確立、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、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について検討を行った。また、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 CTL エピトープのワクチン抗原としての妥当性を判断することを目的として、ヒト由来 T 細胞の CTL エピトープに対する反応性を検討した。

B. 研究方法および結果

(1) ペプチド-リポソーム結合条件の最適化: 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、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について検討を行った。

a. リポソームと反応させるペプチド量を最大

量 : 5 mg/coupling から最少量 : 0.1 mg/coupling まで変え、各々の条件におけるペプチドの結合量をアミノ酸分析によって求めたところ、ペプチドのリポソームへの結合効率はペプチド 1mg/coupling において最大となったが、ペプチドのリポソームへの結合絶対量は 5 mg/coupling において最大であった。

b. ペプチドとリポソームとの反応時間を 2 時間から 3 日まで変え、各々の反応時間におけるペプチドの結合量をアミノ酸分析によって求めたところ、反応時間 : 6 時間でリポソームへのペプチドの結合量がプラトーとなり、それ以上反応時間を延長しても結合量は増加しなかった。

(2) ヒト由来 T 細胞の CTL エピトープに対する反応性の検討 : HLA-A2 あるいは A24 陽性 donor 由来の末梢血単核球 (PBMC) の培養中に我々がこれまでに同定した HLA-A2 あるいは A24 拘束性の CTL エピトープペプチドを添加し、CD8 T 細胞の反応を IFN- γ -ELISpot assay を用いて検討した結果、図-1 に示す通り、複数の donor において我々が同定した CTL エピトープに対する反応性が認められた。

C. 考察

来年度も引き続きインフルエンザワクチンの実用化に向けた、製剤設計、製造方法の確立を目的とした検討を行う。我々がこれまでに同定した HLA-A2 および A24 拘束性の CTL エピトープに対するヒト PBMC の反応性が確認されたことから、これらの CTL エピトープをワクチン抗原として使用することの妥当性が

示された。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Maiko Taneichi](#), Yuriko Tanaka, Terutaka Kakiuchi, Tetsuya Uchida. (2010) Liposome-coupled peptides induce long-lived memory CD8⁺ T cells without CD4⁺ T cells. PLoS ONE 5(11): e15091.
- 2) Yuriko Tanaka, [Maiko Taneichi](#), Michiyuki Kasai, Terutaka Kakiuchi, Tetsuya Uchida. (2010) Liposome-coupled antigens are internalized by antigen-presenting cells via pinocytosis and cross-presented to CD8⁺ T cells. PLoS ONE 5(12): e15225.

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 ant-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、[種子麻衣子](#)、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.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

1) 「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

出願日：2010 年 10 月 14 日

発明者：赤塚俊隆（埼玉医大）、内田哲也、種市麻衣子（国立感染症研）、横山晶一、桑原愛（日油株式会社）

2) 「エボラウイルスリポソームワクチン」

出願番号：特願 2010-231918

出願日：2010 年 10 月 14 日

発明者：松井政則（埼玉医大）、内田哲也、種市麻衣子（国立感染症研）、横山晶一、桑原愛（日油株式会社）

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し