

201111011A

厚生科学研究費補助金

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 23 年度 総括研究報告書

研究代表者 内田 哲也

平成 24 (2012) 年 3 月

厚生科学研究費補助金

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 23 年度 総括研究報告書

研究代表者 内田 哲也

平成 24 (2012) 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誘導におけるリポソームの性能評価.....	5
種市 麻衣子	
2. 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.....	12
高田 礼人	
3. インフルエンザウイルス由来タンパクの調整・供給.....	18
永田 恭介	
4. CTL誘導型C型肝炎ワクチンの臨床応用に向けた検討.....	23
赤塚 俊隆	
5. 臨床応用に適したアジュバントの開発.....	31
石井 健	
6. 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.....	37
松井 政則	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	41
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	42
----------------------	----

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）
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 我々が開発した細胞性免疫誘導型インフルエンザワクチンの有効性を予測・検証することを目的として、献血由来末梢血単核球（PBMC）を用いた検討を行った。その結果、関東1都2県（埼玉、千葉）における献血100例のうち88%がHLA-A2あるいはHLA-A24陽性であり、その多くがインフルエンザウイルス由来M1あるいはNPタンパクに対する免疫記憶を保有していることが明らかになった。また、HLA-A2およびHLA-A24トランスジェニックマウスを用いた検討により、免疫記憶を有する個体への2次免疫においてはアジュバントを必要とせず、ペプチド-リポソーム結合物のみにてCTL応答を増強しうることが確かめられた。これらのことから、我々がこれまでに開発した、HLA-A2およびA24拘束性CTLエピトープペプチドを用いたリポソームワクチンは我が国の人口の8割強においてインフルエンザウイルス感染防御能を誘導可能であることが示唆された。また、全人口に対して有効性を発揮し、グローバルに供給可能なインフルエンザワクチンの創製を目標として、インフルエンザウイルス由来M1およびNPタンパクの全長を合成し、リポソームに結合させて有効性を検討したところ、ペプチドワクチンと同等のインフルエンザウイルス感染防御効果を誘導可能であることが確かめられた。さらに、インフルエンザワクチンと同様のコンセプトによるC型肝炎ワクチンおよびエボラワクチンの創製に向けた検討が行われた。C型肝炎ワクチンにおいては新たに3種類の有効なCTLエピトープが見いだされ、予防・治療型リポソームワクチンとして期待されるワクチン候補が得られた。エボラワクチンにおいてはHLA-A2およびHLA-A24拘束性CTLエピトープの検索が終了し、リポソームと結合することにより高効率にCTLを誘導するエピトープが多数見いだされた。

研究分担者	赤塚 俊隆（埼玉医科大学微生物学教室、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）	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）
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）	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）
永田 恭介（筑波大学大学院人間総合研究科教授）	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）

松井 政則（埼玉医科大学微生物学教室准教授）

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：（感染研・種市、北大・高田）

a. 献血由来末梢血単核球（PBMC）を用いた検討：日本赤十字社東京血液センターの協力を得て末梢血単核球（PBMC）を 100 例収集し、HLA タイピングを行った後、インフルエンザウイルス由来 M1

および NP タンパクに対する反応性を Human ELISpot アッセイを用いて検討した。また、インフルエンザウイルス内部タンパク由来ペプチドライブラリを用いて新規 CTL エピトープの同定を試みた。

b. インフルエンザウイルス内部タンパクの全長を結合したリポソームによるインフルエンザウイルス感染抵抗性誘導の検討：分担研究者・永田により作製されたインフルエンザウイルス由来の合成 M1 および NP タンパクをリポソームに結合させ、HLA-A2 および HLA-A24 トランスジェニックマウス、C57BL/6 マウスに免疫してウイルス感染抵抗性の誘導につき検討した。

c. 2 次免疫におけるアジュバント要否の検討：予めアジュバント存在下で低容量のリポソーム結合ペプチドを 1 次免疫したマウスに 2 次免疫を行った場合、CTL の誘導にアジュバントが必須であるか否かについて検討した。

d. インフルエンザウイルス内部タンパクアミノ酸配列の保存性の検討：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、データベース上に存在する全てのヒト感染性 H1N1 および H3N2 ウイルスの塩基配列を用いて、各ウイルス蛋白質における保存性の高い領域を探索した。

(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。（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：前年度までに同定した HLA-A2 および A24 拘束性エボラウイルス由来 CTL エピトープにつき、このエピトープによる CTL 誘導およびペプチド特異的 killing 活性を検討した。（埼玉医大・松井）

(4) 臨床応用に適したアジュバントの開発：ワク

チンに対する CpGODN(K3)アジュバントの GMP 準拠ロット作製を行うとともに、K3 の生理活性評価を行った。D タイプの ODN については、かねてより GMP 準拠ロット作製の問題となっていた凝集体について、長さや配列を再度工夫した次世代 D-ODN スクリーニングを行い、凝集体形成と生理活性についての評価を行った。（基盤研・石井）

（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：

a. HLA タイピングを行った結果、88%が HLA-A2 あるいは HLA-A24 陽性であった。また、献血由来 PBMC の多くがインフルエンザウイルス由来 M1 あるいは NP タンパクに反応性であった。ペプチドライブラリを用いた検索の結果、NP、PA、PB1、PB2 の中から新規 CTL エピトープが同定された。

b. HLA-A2 および HLA-A24 トランスジェニックマウスだけでなく、C57BL/6 マウスにおいてもインフルエンザウイルス感染抵抗性が誘導された。

c. アジュバント存在下で低容量のリポソーム結合ペプチドを 1 次免疫したマウスに 2 次免疫を行ったところ、アジュバント非存在下においても顕著に CTL が誘導されることが確かめられた。

d. 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（高度にアミノ酸配列が保存されている領域）が複数見いだされた。このような領域に含まれるエピトープを選択することにより、より多くのインフルエンザウイルスに対して有効なワクチン

の創製が可能となるが、本研究において同定された殆どのエピトープは、高度に保存された領域に含まれることが明らかになった。

(2) CTL 誘導型 C 型肝炎ワクチンの臨床応用に向けた検討：ペプチド結合リポソームワクチンは従来のペプチドを用いた免疫法やウイルス感染などとは異なる免疫原性をペプチドに与えることを示唆する結果が得られた。この性質を用いて慢性ウイルス感染症の治療ワクチンの創製が可能になると考えられた。

(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：これまでに同定された 9 種類のエボラウイルス由来 HLA-A24 拘束性ペプチドを結合させたリポソームすべてにおいて、killing 活性の誘導が認められた。HLA-A2 拘束性 CTL エピトープのうち 2 種類、HLA-A24 拘束性 CTL エピトープのうち 7 種類のペプチドを結合したリポソームによって誘導された CTL が、内在性抗原を認識することが明らかとなり、ワクチン抗原として適していると考えられた。

(4) 臨床応用に適したアジュバントの開発：K3 からは安定して GMP 準拠のロットが回収できた。アジュバント機能はこれまでに作製したものと同様に強く、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であると考えられた。

D. 考察

献血由来 PBMC の HLA タイピングの結果、88%が HLA-A2 あるいは A24 陽性であったことから、インフルエンザウイルス感染防御能を誘導可能な HLA-A2 および A24 拘束性ペプチドワクチンは十分に厚生労働行政上および国民の保健・医療・福祉の向上への貢献が期待できるものと考えられた。本年度の検討の結果、これまでに同定された CTL エピトープの殆どが高度保存領域に含まれていることが確認されたことから、ワクチン抗原とし

て妥当であり、亜型の異なるウイルスに対する交差感染防御を誘導可能であることが示唆された。また、HLA 拘束性の克服を目標としてペプチドワクチンと並行して行われた、インフルエンザウイルス由来タンパクを結合したリポソームワクチンによってもペプチドワクチンと同等の感染防御効果が認められたことから、グローバルに有効なワクチンの創製が期待された。

アジュバント (CpG) については有効な免疫付与物質として多くの臨床応用の試みがなされている一方で、肝障害、自己免疫誘導、免疫抑制等の副反応も数多く報告されており、ワクチンへの添加による副反応の誘導を危惧する意見も多い。毎年繰り返されるインフルエンザ流行の中でウイルスの曝露を受ける機会が多いため、大多数が免疫記憶を保持していると考えられており、このことは今年度の我々の検討によっても裏付けられた。一方で、リポソームワクチンによる2次免疫においてはアジュバントを必要としないことが判明したことから、インフルエンザワクチンに関してはアジュバント非存在下においても一定の効果が得られるものと考えられた。

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の創製と同様の手法でエボラワクチンが開発された。本年度までに HLA-A2 および A24 拘束性の CTL エピトープの検索が終了し、抗原特異的 CTL を高効率に誘導することの出来るエピトープが多数同定された。

E. 結論

本年度までの検討により、CTL 誘導型インフル

エンザワクチンの基本的なワクチン構成が決定され、このワクチンによるウイルス感染防御効果が確認された。現行のインフルエンザスプリットワクチンは症状の重篤性を軽減する作用はあるものの感染防御効果に乏しい、という事が共通認識となっていることから、特に高病原性の新型インフルエンザウイルスに対する発生時対応の手段として CTL 誘導型インフルエンザワクチンを位置付け、実用化を急ぐべきであると考ええる。

また、同様のコンセプトにより並行して行われた C 型肝炎ワクチンおよびエボラワクチン開発においても、有望なワクチン候補物質が得られた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
別紙参照
2. 学会発表
各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
該当なし

Ⅱ. 分担研究報告

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

献血由来末梢血単核球（PBMC）100 例につき、HLA タイピングおよび ELISpot アッセイを行ったところ、88 例において HLA-A2 あるいは A24 陽性であり、過半数にインフルエンザウイルス由来タンパクに対する免疫記憶が認められた。インフルエンザウイルス内部タンパクのアミノ酸組成に基づいて作製したペプチドライブラリとヒト PBMC を用いた ELISpot アッセイによって、新規 CTL エピトープが同定された。インフルエンザウイルス由来タンパク M1 および NP の全長を合成し、リポソームに結合してマウスに免疫したところ、HLA-A2 および A24 トランスジェニックマウスおよび C57BL/6 マウスにおいてインフルエンザウイルス感染抵抗性が誘導された。HLA-A2 および A24 トランスジェニックマウスを用いた検討の結果、2 次免疫においてはアジュバント非存在下でリポソームワクチンによって CTL が誘導されたことから、インフルエンザウイルスに対する免疫記憶を保持する対象への免疫にはアジュバントが不要であると考えられた。

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

(1) 献血由来末梢血単核球を用いた HLA タイピングおよびインフルエンザウイルス由来タンパクに対する免疫記憶の検討：日本

赤十字社東京血液センターの協力を得て末梢血単核球 (PBMC) を 100 例収集し、HLA タイピングを行った後、インフルエンザウイルス由来タンパクに対する反応性を Human ELISpot アッセイを用いて検討した。

(2) ヒト PBMC およびインフルエンザウイルス内部タンパク由来ペプチドライブラリを用いた新規 CTL エピトープの同定：インフルエンザウイルス内部タンパク (M1, NP, PA, PB1, PB2) のアミノ酸配列をもとにペプチドライブラリを作製した (表 1)。このライブラリをヒト PBMC の培養中に添加し、Human ELISpot アッセイを用いて反応性を検討した。

(3) インフルエンザウイルス内部タンパクの全長を結合したリポソームによるインフルエンザウイルス感染抵抗性誘導の検討：分担研究者・永田により作製されたインフルエンザウイルス由来の合成 M1 および NP タンパクをリポソームに結合させ、HLA-A2 および HLA-A24 トランスジェニックマウス、C57BL/6 マウスに免疫した後、インフルエンザウイルス A/Aichi (H3N2) を経鼻感染させて肺におけるウイルス増殖を観察した。

(4) 2 次免疫におけるアジュバント要否の検討：これまで、naïve マウスに対する 1 次免疫においては CTL 誘導にアジュバントの添加が必要であることを示唆するデータが得られていたが、ヒトにおいてはインフルエンザウイルスの自然感染によって大多数が程度の差こそあれインフルエンザウイルス由来タンパクに対する免疫記憶を有することが報告され (J. Clin. Invest.

2008;118:3478)、我々の献血由来 PBMC を用いた検討においても確かめられている。そこで、予めアジュバント存在下で低容量のリポソーム結合ペプチドを 1 次免疫したマウスに 2 次免疫を行った場合、CTL の誘導にアジュバントが必須であるか否かを検討した。

C. 結果

(1) 献血由来末梢血単核球 (PBMC) を用いた HLA タイピングおよびインフルエンザウイルス由来タンパクに対する免疫記憶の検討：表 2 に HLA タイピングの結果を示す。全体の 88% が HLA-A2 あるいは HLA-A24 陽性であった。陰性の 12% は A31、A11 あるいは A26 陽性であった。また、献血由来 PBMC の多くがインフルエンザウイルス由来 M1 あるいは NP タンパクに反応性であった (図 1)。

(2) ヒト PBMC およびインフルエンザウイルス内部タンパク由来ペプチドライブラリを用いた新規 CTL エピトープの同定：表 1 に示したライブラリを用いて ELISpot アッセイにおける PBMC の反応性をもとに検索を行い、図 2 に示した手順で CTL エピトープを同定した結果、NP、PA、PB1、PB2 の中から新規 CTL エピトープが同定された。

(3) インフルエンザウイルス内部タンパクの全長を結合したリポソームによるインフルエンザウイルス感染抵抗性誘導の検討：M1 および NP タンパクを結合したリポソームでマウスを免疫し、感染実験を行ったところ、図 3 に示す様に、HLA-A2 および HLA-A24 トランスジェニックマウスだけでなく、C57BL/6 マウスにおいてもインフルエンザ

ウイルス感染抵抗性が誘導された。

(4) 2次免疫におけるアジュバント要否の検討：アジュバント存在下で低容量のリポソーム結合ペプチドを1次免疫したマウスに2次免疫を行ったところ、**図 4**に示すように、アジュバント非存在下で CTL が誘導されることが確かめられた。

D. 考察

献血由来 PBMC の HLA タイピングの結果、88%が HLA-A2 あるいは A24 陽性であったことから、インフルエンザウイルス感染防御能を誘導可能な HLA-A2 および A24 拘束性ペプチドワクチンは十分に厚生労働行政上および国民の保健・医療・福祉の向上への貢献が期待できるものと考えられた。また、HLA 拘束性の克服を目標として行われた、インフルエンザウイルス由来タンパクを結合したリポソームワクチンによってもペプチドワクチンと同等の感染防御効果が認められたことから、グローバルに有効なワクチンの創製が期待された。

アジュバント (CpG) については有効な免疫付与物質として多くの臨床応用の試みがなされている一方で、肝障害、自己免疫誘導、免疫抑制等の副反応も数多く報告されており、ワクチンへの添加による副反応の誘導を危惧する意見も多い (Science 2006;314:1936.)。インフルエンザに関しては、毎年繰り返される流行の中でウイルスの曝露を受けているため、大多数が免疫記憶を保持していると考えられている (J Clin Invest 2008;118:3478)。今年度の献血由来

PBMC を用いた検討の結果もそれを裏付けている。一方で、リポソームワクチンによる2次免疫においてはアジュバントを必要としない結果が得られたことから、インフルエンザに関してはアジュバントを使用しないワクチン構成としても良いと考えられた。

E. 結論

本年度までの検討の結果、CTL 誘導型インフルエンザワクチンによるウイルス感染防御効果が確かめられ、ペプチドワクチンについては基本的なワクチン構成が決定された。合成タンパクをワクチン抗原として使用した際の有効性も確認されたことから、今後グローバルに有効なワクチンとしてタンパク結合リポソームの最適化作業を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当無し

2. 学会発表

- 1) 種市麻衣子、内田哲也 「リポソーム結合抗原による液性免疫と細胞性免疫の誘導における TLR リガンド依存性の相違」第 40 回日本免疫学会、千葉、2011 年 11 月 27-29 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図1 献血由来PBMCにおけるM1, NPに対する反応性の例

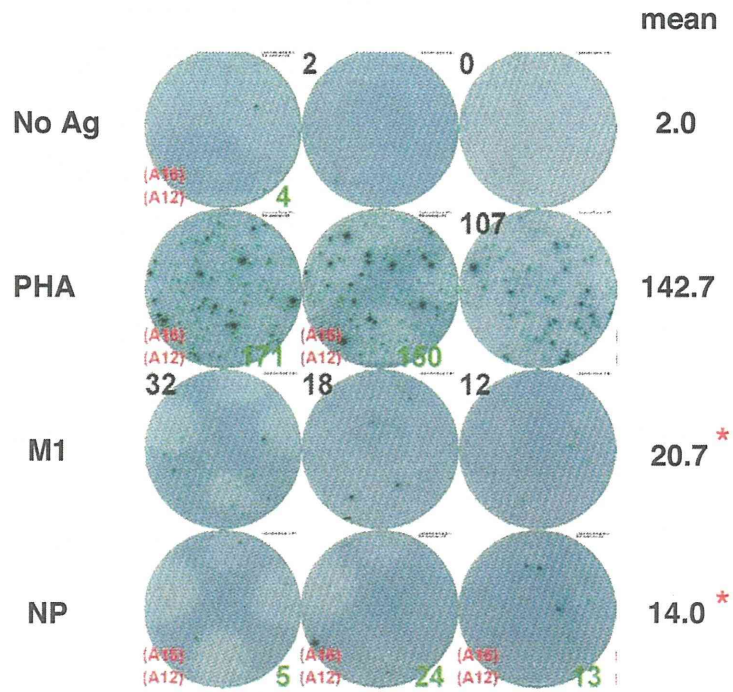


図2 ペプチドライブラリを用いた新規CTLエピトープの同定

NP (1-500)		NP (1-500)		Pool-3 (101-160)		Pool-3 (101-160)		NP 136-150	
Pool-1	1-60	Pool-1	1-60	101-115	101-115	136-144			
Pool-2	51-110	Pool-2	51-110	106-120	106-120	137-145			
Pool-3	101-160	Pool-3	101-160	111-125	111-125	138-146			
Pool-4	151-210	Pool-4	151-210	116-130	116-130	139-147			
Pool-5	201-255	Pool-5	201-255	121-135	121-135	140-148			
Pool-6	246-305	Pool-6	246-305	126-140	126-140	141-149			
Pool-7	296-355	Pool-7	296-355	131-145	131-145	142-150			
Pool-8	346-405	Pool-8	346-405	136-150	136-150				
Pool-9	396-455	Pool-9	396-455	141-155	141-155				
Pool-10	446-500	Pool-10	446-500	146-160	146-160				

図3 M1およびNPタンパク結合リポソームによるインフルエンザウイルス感染抵抗性の誘導

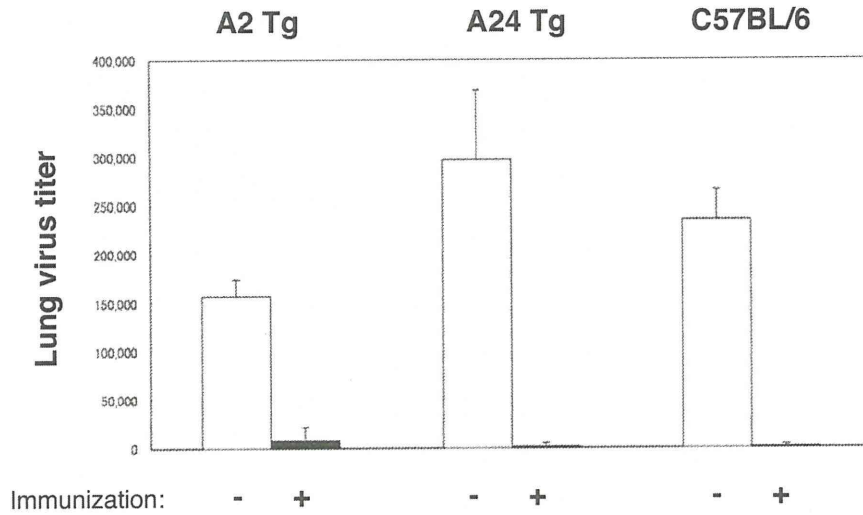
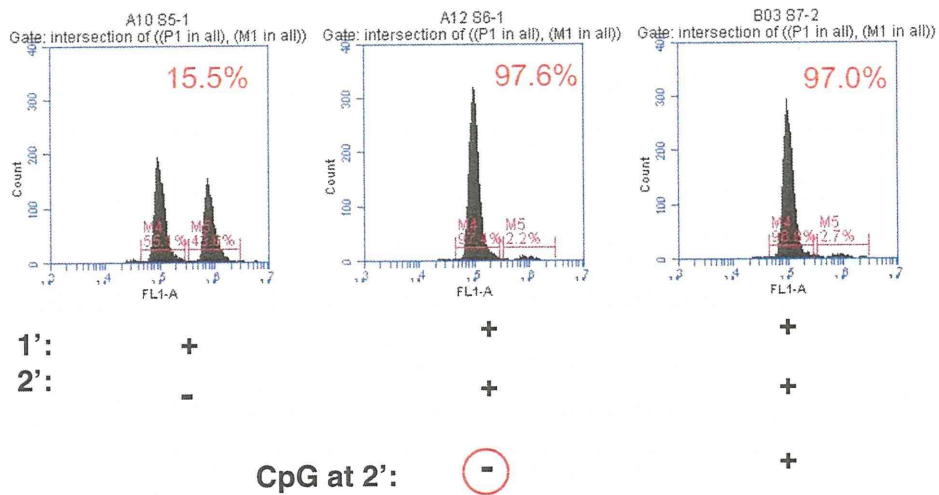


図4 アジュバント存在下および非存在下における2次免疫応答



2次免疫においてはアジュバントは不要

表1 インフルエンザウイルス内部タンパクのアミノ酸配列に基づいて作製したペプチドライブラリ

Segment	No. of amino acid	No. of peptide	No. of peptide pool
M1	1-255	49	5
NP	1-500	98	10
PA	1-716	142	14
PB1	1-757	150	15
PB2	1-759	150	15
NS1	1-230	44	5

表2 献血由来PBMCのHLAタイピング結果

HLA	表現数	表現頻度 (%) /100例
A24	64	64
A2	39	39
A24 and/or A2	88	88
Both negative	12	12
A31	27	27
A11	18	18
A26	15	15
A33	9	9
A30	1	1
A1	1	1

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 伊藤 公人 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 准教授

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 特任助教

研究要旨

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CTL誘導ワクチンに用いている合成ペプチドエピトープの配列を比較した結果、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

インフルエンザウイルス：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、データベース上に存在する全ての人のH1N1およびH3N2ウイルスの塩基配列を用いて、各ウイルス蛋白質における保存性の高い領域を探索した(図1)。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。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。本研究で調べた殆どのエピトープは、このように高度に保存された領域であった。しかし一方、NS1蛋白質のアミノ酸 128-136 番目のエピトープ (IILKANFSV) 内の 129 番目のアミノ酸のように、エントロピーの高いポジションも存在した (図 2)。NS 遺伝子は、スペイン風邪(H1N1)ーロシア風邪(H1N1)ーアジア風邪(H2N2)ー香港風邪(H3N2)ウイルスとして、およそ 100 年間あたり、2009 年以前に人に流行した全てのインフルエンザウイルスで受け継がれている。そこで、まずロシア風邪(H1N1)ーロシア風邪(H1N1)および香港風邪(H3N2)ウイルスの NS1 蛋白質のアミノ酸のエントロピーを別々に算出し、128-136 エピトープを比較した (図 3)。その結果、129 番目のアミノ酸は H1N1 ウイルスでは高度に保存されているが、H3N2 ウイルスではある程度多様性が存在することが明らかとなった。次に、スペイン風邪(H1N1)ーロシア風邪(H1N1)ーアジア風邪(H2N2)ー香港風邪(H3N2)と受け継がれている間に 128-136 番目のエピトープ (IILKANFSV) 内の 129 番目のアミノ酸に起きた変異を追跡した結果、スペイン風邪ウイルスとして出現した際には、I (イソロイシン) であり、アジア風邪(H2N2)に受け継がれた後 M (メチオニン) である変異体が出現し、香港風邪(H3N2)ウイルスとしては、メチオニンをもつウイルスが優勢になっていったことが判明した (図 4)。さらに、近年の香港風邪(H3N2)ウイルスの中には、129 番目のアミノ酸が T (スレオニン) に変異したものや、135 番目のアミノ酸が S (セリン) から N (アスパラギン) に変異したものが見つかっており、本エピトープに対する選択圧力の存在が示唆された。

フィロウイルス: フィロウイルスのエンベロープ糖蛋白質(GP)には、高度に糖鎖付加を受け空間的に非常に大きな領域を占める mucin-like region (MLR) が存在する。近年、GP がフィロウイルス感染細胞膜表面に発現すると、MLR が MHC class I 分子や Integrin $\beta 1$

等の宿主因子を立体的に覆い、リンパ球の活性化や細胞の接着に関わる機能を阻害する現象(立体的遮蔽効果)が報告された。この GP による立体的遮蔽効果は、細胞間のシグナル伝達を阻害する事で宿主応答を抑制し、フィロウイルスの病原性に関与している可能性が考えられる。本研究では、病原性の異なるフィロウイルスの種・株間で宿主因子に対する立体的遮蔽効果を比較し、病原性との相関を解析した。Integrin $\beta 1$ 分子では、エボラウイルス属のうち、ヒトに対してほとんど病原性を示さないと考えられている Reston 種に比べて、ヒトに対する病原性が最も高いとされる Zaire 種 GP 発現細胞において遮蔽効果が著しかった。さらに、マールブルグウイルス属のうち、流行発生時の致死率が最も高かった Angola 株の GP 発現細胞の方が Musoke 株 GP 発現細胞よりも遮蔽効果が高かった。MHC class I 分子では、調べた全てのウイルスの GP 発現細胞において、同程度の遮蔽効果が見られ、種・株間の違いは見られなかった。

C. 考察

抗原性が類似しているインフルエンザウイルス内部蛋白質の保存されたエピトープ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。一方、これまでの研究で、インフルエンザウイルス HA 亜型間交差中和活性を示すモノクローナル抗体の存在も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。一方、通常の中和試験で活性が認められない抗体でも、細胞内あるいは細胞表面でウイルス蛋白質の機能を阻害することによってウイルスの増殖を抑制できることが分かってきた。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、エボラウイルスに対する有望なワクチン候補として期待されているのは、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、ウイルスの感染性を中和するモノクローナル抗体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ートプの存在の有無が重要な要素となるだろう。また、GP による立体的遮蔽効果が、実際の感染細胞の MHC class I 分子の抗原提示にどの程度影響するのかに関して調べる必要があるかもしれない。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Simulundu, E., Ishii, A., Igarashi, M., Mweene, A.S., Suzuki, Y., Hang'ombe, B.M., Namangala, B., Moonga, L., Manzoor, R., Ito, K., Nakamura, I., Sawa, H., Sugimoto, C., Kida, H., Simukonda, C., Chansa, W., Chulu, J., and Takada, A. (2011) Characterization of influenza A viruses isolated from wild waterfowls in Zambia. *J. Gen. Virol.* 92(Pt 6):1416-1427.
- 2) Samad, R.A., Nomura, N., Tsuda, Y., Manzoor, R., Kajihara, M., Tomabeche, D., Sasaki, T., Kokumai, N., Ohgitani, T., Okamatsu, M., Takada, A., Sakoda, Y., and Kida, H. (2011) A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 influenza virus strain from the influenza virus library conferred protective immunity to chickens against the challenge with antigenically drifted highly pathogenic avian influenza virus. *Jpn. J. Vet. Res.* 59(1):23-29.
- 3) Nakayama, E., Tomabeche, D., Matsuno, K., Kishida, N., Yoshida, R., Feldmann, H., and Takada, A. (2011) Antibody-dependent enhancement of Marburg virus infection. *J. Infect. Dis. Suppl* 3:S978-985.
- 4) Falzarano, D., Feldmann, F., Grolla, A., Leung, A., Ebihara, H., Strong, J.E., Marzi, A., Takada, A., Jones, S., Gren, J., Geisbert, J., Jones, S.M., Geisbert, T.W.,

and Feldmann, H. (2011) Single Immunization With a Monovalent Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccine Protects Nonhuman Primates Against Heterologous Challenge With Bundibugyo ebolavirus. *J. Infect. Dis. Suppl* 3:S1082-1089.

- 5) Ichihashi, T., Yoshida, R., Sugimoto, C., Takada, A., and Kajino, K. (2011) Cross-protective peptide vaccine against influenza A viruses developed in HLA-A*2402 human immunity model. *PLoS ONE* 6(9):e24626.
- 6) Ito, K., Igarashi, M., Miyazaki, Y., Murakami, T., Iida, S., Kida, H., and Takada, A. (2011) Gnarled-trunk evolutionary model of influenza A virus hemagglutinin. *PLoS ONE* 6(10):e25953.
- 7) Sato, K., Iwai, A., Nakayama, Y., Morimoto, J., Takada, A., Maruyama, M., Kida, H., Uede, T., and Miyazaki, T. (2011) Osteopontin is critical to determine symptom severity of influenza through the regulation of NK cell population. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417(1):274-279.

2. 学会発表

- 1) Takada A. Antibody-dependent enhancement of Marburg virus infection. 45th Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program, June 22, 2011, Stanford, USA (oral)
- 2) Mweene A, Takada A, Sugimoto C, Sawa H, Simulundu E, Thomas Y, Hang'Ombe M, Namangala B, Nakagawa E, Ishii A, Ogawa H. Preparedness for the control of zoonoses in Zambia: the case of avian influenza. XV International Congress of Virology, September 11-16, 2011, Sapporo, Japan (oral)
- 3) Nakayama E, Yokoyama A, Miyamoto H, Igarashi M, Kishida N, Matsuno K, Marzi A, Feldmann H, Ito K, Saijo M, Takada A. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of filovirus species-specific antibodies. XV International Congress of Virology, September 11-16, 2011, Sapporo, Japan
- 4) Yoshida R, Tomabeche D, Igarashi M, Miyamoto M, Yokoyama A, Kase T, Kida H, Takada A. Characterization of monoclonal antibodies against the 2009 pandemic H1N1 influenza virus hemagglutinin. XV International Congress of Virology, September 11-16, 2011, Sapporo, Japan
- 5) Itoh Y, Arikata M, Maeda T, Shiina T,

- Ishigaki H, Takada A, Okamatsu M, Sakoda Y, Nakayama M, Kida H, Ogasawara K. Identification of pandemic influenza virus NP peptides bound to cynomolgus macaque MHC class I mafa-a1*5202 and stimulating CTL responses. XV International Congress of Virology, September 11-16, 2011, Sapporo, Japan
- 6) Kurosaki Y, Takada A, Yasuda J. Anti-tetherin activities of Zaire and Reston ebolavirus glycoprotein. XV International Congress of Virology, September 11-16, 2011, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (poster)
- 7) Simulundu E, Ishii A, Igarashi M, Mweene AS, Suzuki Y, Ogawa H, Nakagawa E, Hang'ombe BM, Namangala B, Moonga L, Manzoor R, Ito K, Nakamura I, Sawa H, Sugimoto C, Kida H, Simukonda C, Chansa W, Chulu J, Takada A. Characterization of influenza A viruses isolated from wild waterfowl in Zambia. Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infections -

2012, January 11-12, 2012, Kobe International Conference Center, Kobe, Japan (oral)

10) 高田礼人「エボラおよびマールブルグウイルス」第7回霊長類医学科学フォーラム、平成 23 年 11 月 18 日、文部科学省研究交流センター、つくば（口頭）

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当無し

(研究結果の図および表)

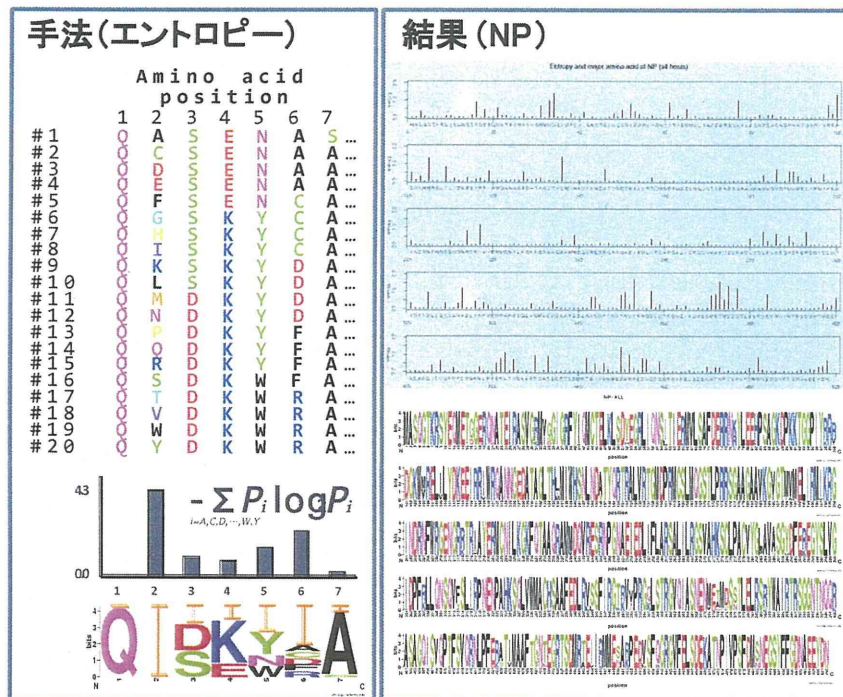


図1 インフルエンザウイルス 蛋白質アミノ酸配列中の保存領域探索