

NS1 human

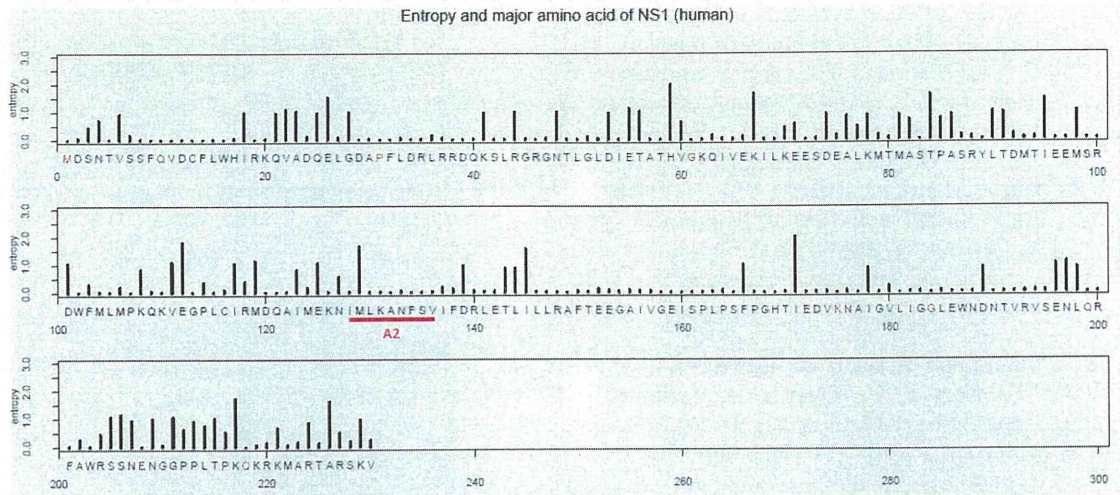
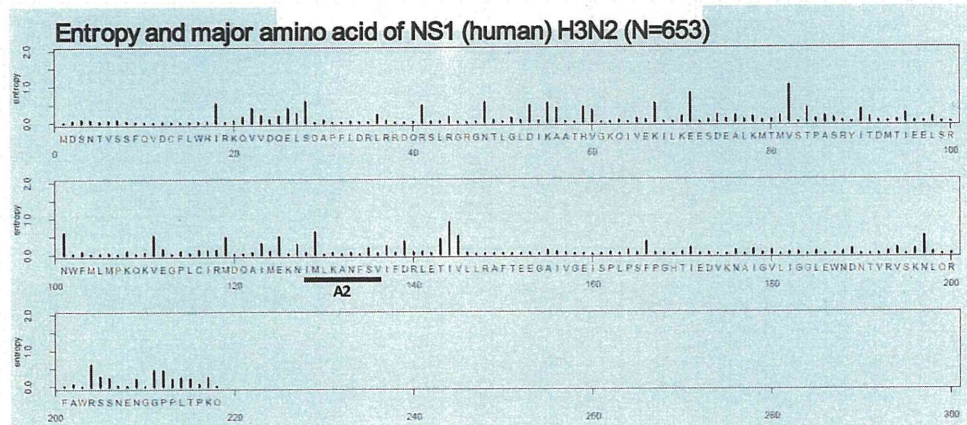
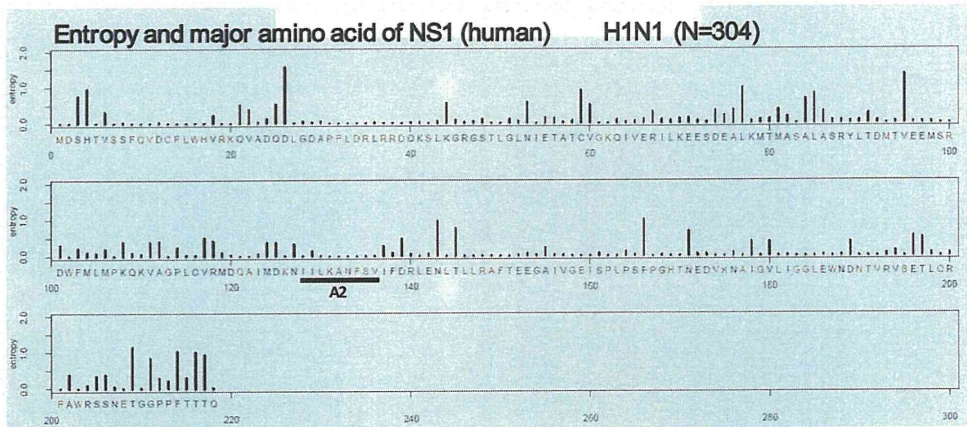


図2 インフルエンザウイルス NS1蛋白質のアミノ酸配列のエントロピー



赤字: エントロピー = 0

図3 NS1蛋白質アミノ酸配列中のエントロピーの比較

スペイン風邪ウイルス H1N1 1918年		
データ頻度	配列	出現年
1	IILKANFSV	

アジア風邪ウイルス H2N2 1957年-1967年		
データ頻度	配列	出現年
28	IILKANFSV	
22	IMLKANFSV	

香港風邪ウイルス H3N2 1968年-2011年		
データ頻度	配列	出現年
1	IILKANF NV	
33	IILKANFSV	
1	IMLKAHFSV	
2	IMLKAKFSV	
1	IMLKANFGV	
14	IMLKANF NV	1995-2010
2	IMLKANFSM	
551	IMLKANFSV	
1	IMLKS NFSV	
4	IMLRANFSV	
1	ITLKAKFSV	
39	ITLKANFSV	1993, 1999, 2005, 2008, 2009, 2010
1	LMLKANFSV	
2	VMLKANFSV	

スペイン風邪ウイルス～ロシア風邪ウイルス H1N1 1918-2008年		
データ頻度	配列	出現年
299	IILKANFSV	
2	IMLKANFSV	
3	ISLKANFSV	

図4 NS1のCTLエピトープ(128～136番目のアミノ酸配列)の変遷

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

インフルエンザウイルス由来タンパクの調製・供給

研究分担者 永田 恭介 筑波大学医学医療系・感染生物学 教授

研究要旨

本研究課題の目的は、インフルエンザウイルスのウイルス複製に関わるウイルス因子と宿主因子の同定と機能解析、および様々な亜型に交差性をもつペプチドワクチンの開発のための抗原ペプチド決定である。本年度は、子孫ウイルス RNP 複合体形成に関与するウイルス因子と宿主因子を同定し、ペプチドワクチン開発グループと協業するとともに、ペプチドワクチン開発に向けた抗原探索の一貫として、A 型および B 型に特有のキャップ構造認識機構を明らかにした。

A. 研究目的

様々なインフルエンザウイルス亜型に交差性の高いペプチドワクチンを開発することは、予防手段として大きな課題である。インフルエンザウイルスの複製にはウイルス因子と宿主因子が関与している。それらを同定・機能解析し、また相互作用機構を明らかにすることで、ウイルス因子の機能構造を明らかにすることができる。機能構造を理解した上で、ワクチンとして機能するペプチド部位を明らかにする。

B. 研究方法および結果

(1) 子孫ウイルス RNP 複合体の形成機構

新規に複製されたウイルスゲノムは、NP と結合して ribonucleoprotein (RNP) 複合体を形成する。本年度では、各種ウイルス因子を調製して実験系を組上げ、この過程を促進する宿主因子として、宿主のスプライシング因

子である RAF-2p48/UAP56 に着目し、ウイルスゲノム複製と協調して RAF-2p48 によって NP が複製反応と協調してウイルスゲノム上に配置されることを明らかにした（図 1）。

(2) ウイルスポリメラーゼのキャップ認識機構

インフルエンザウイルスの転写反応は、ウイルスポリメラーゼがキャップ構造を認識して、これをプライマーとして反応が開始される。A 型および B 型インフルエンザウイルス間でその認識機構を比較し、各型に共通したキャップ構造認識部位を同定した（図 2）。

C. 考察

(1) では、RAF-2p48 が分子シャペロンとして NP に作用することを明らかにした。UAP56 と NP の結合ドメインを詳細に明らかにし、宿主因子が結合しない抗原ペプチドとして機能しうる部位を決定する。また、(2) の解析結果より、A 型と B 型間で共通してキ

ヤップ構造認識に必須となる機能構造を同定した。従って、ウイルスポリメラーゼに特有の機能構造が同定できたことになり、新規ペプチドワクチン開発に資する基盤情報と、またキャップ構造認識を標的とした広範なウイルス株に作用する抗ウイルス薬を探索するための基盤情報を得ることができた。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tojino M, Mori M, Kasuya MC, Hatanaka K, Kawaguchi A, Nagata K, Shirai T, Mizuno M. Immobilization of fluorosaccharide recognized by influenza virus on polytetrafluoroethylene filter. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012; 22(2): 1251-4.
- 2) Numajiri-Haruki A, Naito T, Nishie T, Saito S, Nagata K. Interferon-inducible antiviral protein MxA enhances cell death triggered by endoplasmic reticulum stress. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2011; 31: 847-856.
- 3) Fukuoka M, Minakuchi M, Kawaguchi A, Nagata K, Kamatari YO, Kuwata K. Structure-based discovery of anti-influenza virus A compounds among medicines. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2011; 1820(2): 90-5.
- 4) Wakai C, Iwama M, Mizumoto K, Nagata K. Recognition of cap structure by influenza B virus RNA polymerase is less dependent on the methyl residue than recognition by influenza A virus polymerase. *J Virol.*, 2011; 85(15): 7504-12.
- 5) Kawaguchi A, Momose F, Nagata K. Replication-coupled and host factor-mediated

encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein. *J Virol.*, 2011; 85(13): 6197-204.

- 6) Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, Jo S, Kawaguchi A, Nagata K, Morikawa Y. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. *PLoS ONE*, 2011; 6(6): e21123.
- 7) Mori K, Haruyama T, Nagata K. Tamiflu-Resistant but HA-Mediated Cell-to-Cell Transmission through Apical Membranes of Cell-Associated Influenza Viruses. *PLoS ONE*, 2011; 6(11) e28178.

2. 学会発表

- 1) Komatsu T, Haruki H, Nagata K. Cellular and Viral Chromatin Protein Positively Regulate Adenovirus Gene Expression. Physicochemical Field for Genetic Activities. Awaji: 2011.1-24-26
- 2) 永田恭介. インフルエンザウイルスゲノム複製・転写の酵素機構. 日本薬学会第 131 年会. 静岡: 2011.3.28-31
- 3) 永田恭介. ウイルス複製の分子機構の解明からウイルス疾患制御へ. 日本薬学会第 131 年会. 静岡: 2011.3.28-31
- 4) 若井ちとせ、永田恭介. インフルエンザウイルスポリメラーゼを標的とした新規抗ウイルス薬の開発. 日本薬学会第 131 年会. 静岡: 2011.3.28-31
- 5) Oshiro Y, Yasue H, Hattori S, Chiba M, Naito T, Takeuchi K, Nagata K, and Ohkohchi N. In vitro infection and replication of hepatitis E virus in human hepatocytes. 46th Annual meeting of

- the European association for the study of the liver, Berlin, Germany: 2011.3.30-4.3.
- 6) 大城幸雄、服部眞次、内藤忠相、竹内薫、永田恭介、千葉満、安江博、大河内信弘. ヒト初代培養細胞へのブタ由来E型肝炎ウイルス感染実験. 第47回肝臓学会総会 東京: 2011.6.2-3
- 7) Wakai C, Mizumoto K, Nagata K. Influenza B virus RNA polymerase recognizes the Cap structure in a manner different from other cap-binding proteins. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌: 2011.9.11-16
- 8) Kawaguchi A, Matsumoto K, Nagata K. Identification of a novel cellular protein involved in influenza virus genome trafficking. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌: 2011.9.11-16
- 9) Komatsu T, Haruki H, Nagata K. POSITIVE REGULATION OF ADENOVIRUS GENE EXPRESSION BY CELLULAR AND VIRAL CHROMATIN PROTEINS. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌: 2011.9.11-16
- 10) Nishie T, Takeuchi K, Nagata K. Characterization of RNA binding activity of measles virus C protein. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌: 2011.9.11-16
- 11) Takeuchi K, Kato S, Nagata N, Suzuki T, Ami Y, Mori K, Tsunetsugu-Yokota Y, Nagata K. INFECTION OF CYNOMOLGUS MONKEYS WITH RECOMBINANT WILD-TYPE MEASLES VIRUS BEARING VACCINE H PROTEIN. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌: 2011.9.11-16
- 12) Turan K, Kawaguchi A, Harada Y, Nagata K. Comparison of avian and human influenza virus RNA polymerases in mammalian cells. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌: 2011.9.11-16
- 13) Kumakura M, Takizawa N, Nagata K. Roles of cytoskeletal filaments in cytoplasmic transport of influenza A virus vRNP. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌: 2011.9.11-16
- 14) Minakuchi M, Kawaguchi A, Nagata K. The template recognition mechanism of the influenza A virus RNA polymerase complex. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌: 2011.9.11-16
- 15) Mori K, Haruyama T, Nagata K. Tamiflu-resistant but HA-mediated Cell-to-cell Transmission through Apical Membranes of Cell-associated Influenza Viruses. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌: 2011.9.11-16
- 16) Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, Jo S, Kawaguchi A, Nagata K, Morikawa Y. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11a-positive recycling endosome. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌: 2011.9.11-16
- 17) Fukuoka M, Minakuchi M, Kawaguchi A, Nagata K, Kamatari Y.O, Kuwata K. Discovery of anti-influenza virus compounds from

medicines on the market. IUMS2011 Sapporo, XV International Congress of Virology. 札幌 : 2011.9.11-16

18) Kumakura M, Takizawa N, Nagata K. Roles of non-muscle myosin IIA in cytoplasmic transport of influenza A virus vRNP. The 2nd Leading Graduate Schools International Conference. Tsukuba: 2011.11.1-2

19) Mori K, Haruyama T, Nagata K. Tamiflu-resistant Cell-to-cell Transmission of Influenza Virus Mediated by HA. Leading Graduate Schools International Conference. Tsukuba: 2011.11.1-2

20) Wakai C, Mizumoto K, Nagata K. Recognition of the cap structure by influenza B virus RNA polymerase is less dependent on the methyl residue than by other cap-binding proteins. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜 : 2011.12.13-16

21) Osari S, Kawaguchi A, Nagata K. A novel function of NS1 influenza virus protein in virus growth. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜 : 2011.12.13-16

22) Kawaguchi A, Matsumoto K, Nagata K. Identification of a novel cellular RNA binding protein involved in intracellular trafficking of the influenza virus genome. 第 34 回日本分子生物学会年会. 横浜 : 2011.12.13-16

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

（研究結果の図および表）

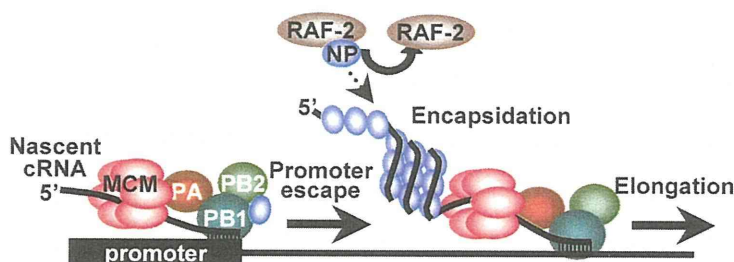


図 1. RAF-2p48 による子孫インフルエンザウイルス RNP 複合体形成の促進

ウイルスポリメラーゼ (PB1、PB2、PA) および MCM によって複製途中の新規合成鎖に、伸長反応と協調して RAF-2p48 によって NP がウイルスゲノム上に配置される。これによって、ゲノム複製反応の伸長反応も促進される。

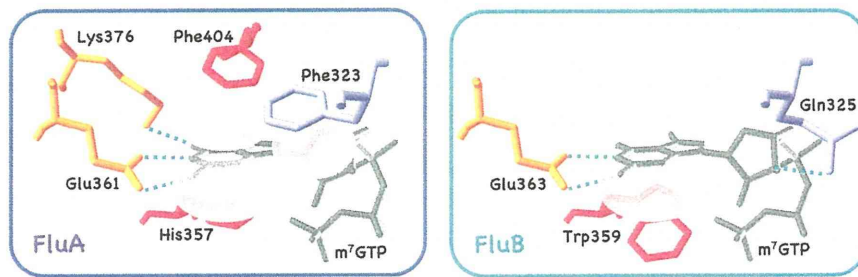


図2. A型およびB型インフルエンザウイルスのキャップ認識機構の差異

A型のインフルエンザウイルスポリメラーゼは、キャップ構造 (m^7GTP) を主に Phe323、His357、Phe404 によるスタッキング相互作用、および Glu361 と Lys376 による水素結合により認識する。一方、B型では、A型で必要な一部の残基が不要であり、A型よりもキャップ構造の認識特異性が低い。

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 C 型肝炎ワクチンの臨床応用に向けた検討

研究分担者 赤塚 俊隆 埼玉医科大学微生物学教室 教授

研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）CTL エピトープでリポソーム表面結合により免疫原性を発揮するものを新たに3つ同定した。それらのペプチドを結合したリポソームワクチンはいずれも組換えワクシニアウイルスを用いたチャレンジ実験にも成功し、その1つ（A2-14）は長期間のメモリー誘導効果を発揮することも証明された。このA2-14と前年度同定した#3はいずれもウイルス感染や通常の免疫法では免疫原性が非常に低いことが分かり、#3ではウイルス感染時にわずかに誘導されるCTLにおける抑制性シグナル受容体PD-1の発現も低いことも分かったことから、これらのエピトープペプチドは慢性肝炎の治療ワクチンの成分として適していることが予想された。そこでこれらのペプチドを抑制シグナル遮断抗体と共にリポソーム結合し、慢性感染モデルマウスの治療実験に用いたところ、予想通りに効果を発揮することが証明できた。

A. 研究目的

ペプチドをリポソーム表面に結合したワクチンは、従来の免疫法とは異なる免疫原性をペプチドに与えることがこれまでの研究から明らかとなり、前年度ではこのワクチン形体に適した新規エピトープを3つ同定することができた。今年度はこれまでHCV CTL epitopeとして既に報告されているものの中からこのリポソームワクチン成分として適しているものを新たに検索し、それらを加えたより強力なHCVワクチンを作製することを目的とした。またそのワクチンが慢性C型肝炎の治療にも使えるか否かを検証するシステムの構築を目指した。

B. 研究方法および結果

(1) 既知のHCV CTL エピトープの免疫原性：
既に報告された14種のエピトープペプチドをOperon社に委託して合成した（表1）。これに前回同定したNS3領域エピトープ#3ペプチドを加え、免疫法としてリポソーム表面に結合してその20 µlとCpG 5 µgをfootpadに注射する方法（L）と、ペプチド 50 µgをヘルパーT細胞エピトープHBVcore128-140ペプチド 50 µgと共に Freund の不完全アジュバント（IFA）で emulsify して皮下注射する方法（P）を比較した。HLA-A2 transgenic（HHD）マウスを免疫後9日目に一度追加免疫を

行い、14日後に ELISPOT (IFN- γ) で反応を比較したところ、A2-10、A2-11、A2-14 の 3 種は、#3 と同様にリポソーム結合法で非常に高い免疫原性を発揮し、アジュバントによる免疫法では非常に免疫原性が低いことが分かった (図 1)。

(2) 3 種のリポソームワクチンの感染防御効果： Lip-A2-10, Lip-A2-11, Lip-A2-14 で免疫した HHD マウスに、それぞれのエピトープを発現する組換えワクシニアウイルスをチャレンジしてその感染防御効果を判定した。3 つのワクチンはいずれも陽性コントロールの組換えアデノウイルスによる免疫と同様に感染防御効果を示し、免疫マウスの卵巣からはウイルスが検出されなかった (図 2)。

(3) Lip-A2-14 によるメモリー誘導： 昨年度報告した Lip-#3 と同様に、Lip-A2-14 がメモリー CTL を誘導し、免疫後 12 週の時点でも維持されていることが、免疫 HHD マウスの ELISPOT (IFN- γ) で証明された。図 3 で見られるように、免疫後 12 週でも有意な数の IFN- γ 産生細胞が維持され、追加免疫によるブースト効果も認められた。

(4) ウイルス感染時における A2-14 と #3 の免疫原性：

以上の実験結果から A2-14 と #3 はリポソーム結合により高い免疫原性を発揮し、ペプチドと IFA による免疫では免疫原性が低いことが判明したが、ウイルス感染時におけるこれらの免疫原性を調べるため、C57BL/6 と HHD マウスに HCV NS3-5A 発現組換えアデノウイルス (AdNS) を接種し免疫後に ELISPOT (IFN- γ) を行った結果、C57BL/6 マウスでは 1630-1637 エピトープに対する強い CTL 反応が誘導されるが、HHD では 1131-1139 エピト

ープがやや低い免疫原性を発揮し、A2-14 と #3 に対しては殆ど CTL 反応が誘導されないことが分かった (図 4A)。免疫原性が高いエピトープに特異的な CTL は抑制性シグナル受容体 PD-1 を発現して機能不全に陥り、その結果慢性持続感染が引き起こされると考えられているが、A2-14 や #3 に特異的な CTL はウイルス感染時にはそのような抑制は受けにくいと予想された。そこで AdNS で感染・免疫されたマウスの肝臓中の抗原特異的 CTL における PD-1 発現を、免疫原性が高い 1630-1637 と免疫原性が低い #3 に特異的な CD8⁺T 細胞について比較検討してみたところ、前者では PD-1 陽性細胞の比率が高く、が後者では PD-1 陽性細胞は少ないことが分かった (図 4B)。以上から A2-14 と #3 に特異的な CTL は HCV 感染では誘導されにくく、わずかに誘導された CTL では抑制シグナルの影響を受けることが少ないと考えられた。一方それらの CTL はリポソームワクチンにより容易に刺激・誘導されるので、同じエピトープが免疫方法により非常に異なる反応を示すことが示唆された。以上より Lip-A2-14 と Lip-#3 は慢性 C 型肝炎の治療ワクチンとして応用できる可能性があると考えられた。

(5) A2-14 または #3、および抗 PD-L1 抗体結合リポソームによる慢性感染モデルマウスの治療実験：

以上の仮説を実証するための慢性 C 型肝炎モデルとして、HCV の core 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いた。肝臓中の T 細胞や抗原提示細胞では免疫抑制シグナルの受容体 PD-1 とそのリガンド PD-L1 の発現が高く、免疫抑制がかかりやすいことが知られているが、HCV が肝臓中で感染・増殖すると、そのコア遺伝子の

作用により PD-1/PD-L1 の発現が更に高まることが知られている。マウスに非増殖型のアデノウイルスを静注すると、ウイルスは主に肝臓で感染・発現し、約 2 週の間ウイルス特異的 CTL の作用により感染細胞は排除される。しかし HCV core transgenic mice ではアデノウイルスが感染した細胞は排除されずに 3 週以上にわたって生存する。そこでこの core transgenic mice (C57BL/6, background) と HHD をかけ合わせた F1 マウスを用い、それに HCV NS3 タンパクを発現させる組換えアデノウイルスを静注・感染させ、長期間感染肝細胞を維持させた。このウイルスに組み込む遺伝子として、HCV NS3 遺伝子に 3 つの FLAG 配列を tandem につなげたものを用い、NS3 に FLAG エピトープが融合した形のタンパクを発現するようにした組換えアデノウイルス (AdNS3-3X FLAG) を作製した。このウイルスを用いることにより、感染細胞の生存を抗 FLAG モノクローナル抗体を用いた IP/Western により高感度に測定することができるようになった。またワクチンとしては、ペプチド表面結合リポソームに加え、抗 PD-L1 抗体 (MIH5) をペプチドと一緒に表面結合したりポソームも作製し、比較・検討した。すると #3 あるいは A2-14 ペプチドと共に MIH5 を同時に結合したワクチンで治療すると、治療開始 1 週後で肝臓から NS3 が検出されなくなることが判明した (図 5A)。一方抗体非結合リポソームや、免疫原性が高い 1630-1637 ペプチドを用いたリポソームワクチンでは治療効果は認められなかった (図 5B)。

C. 考察

ペプチド表面結合リポソームは従来のペプチド

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が判明した。この性質は慢性ウイルス感染症の治療ワクチンへの応用に有利であると思われる。ウイルスの持続感染の成立には抗原刺激が強く長く続く結果、免疫抑制経路のシグナルが作動することが大きな要因となっていると考えられ、その経路を抗 PD-L1 抗体投与によりブロックすることにより治療効果が得られることが報告されている。しかし通常用いられる方法では大量の抗体を投与する必要があり、また抗原非特異的に作用するため自己免疫反応などの副作用を引き起こす危険性を伴う。今回治療効果が確認された方法では用いる抗体量は約 30 分の 1 以下に抑えることができ、また同時に結合した抗原ペプチドに特異的な CTL のみを賦活化すると考えられ、またそれを示す実験結果も得られつつある。このことから本ワクチンは慢性 C 型肝炎の治療ワクチンとして近い将来臨床応用できる可能性が極めて高いと考えられる。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hongying Duan, Kazunori Yoshimura, Nobuharu Kobayashi, Kazuo Sugiyama, Jun-ichi Sawada, Yoshiro Saito, Christophe Morisseau, Bruce D. Hammock, Toshitaka Akatsuka. Development of monoclonal antibodies to human microsomal epoxide hydrolase and analysis of "preneoplastic antigen"-like molecules. *Toxicology and Applied Pharmacology*, doi: 10.1016/j.taap.2012.01.023., 2012.
- 2) Hongying Duan, Akira Takagi, Hidekazu Kayano,

Toxicology and Applied Pharmacology, doi:
10.1016/j.taap.2012.01.021, 2012.

2. 学会発表

- 1) Masaaki Kawano, Tatsuya Suda, Toshitaka Akatsuka, Hiroshi Handa, Masanori Matsui. Development of a novel platform for CTL-based influenza vaccine using virus-like particles of Simian Virus 40 第 59 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、Sep 11-16, 2011.
- 2) Osamu Moriya, Toshitaka Akatsuka. Exosomes released from dendritic cells are nanoscale and cell-free immunomodulators in viral infection. 第 40 回日本免疫学会総会、千葉、Nov 27-29, 2011.

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

該当無し

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

(研究結果の図および表)

表 1 HCV CTL epitopes

	Protein	Position	Sequence
1	Core	35-44	YLLPRRGPRRL
2	Core	132-140	DLMGYIPLV
3	Core	178-187	LLALLSCLTV
4	E1	257-266	QLRRHIDLLV
5	E2	686-694	ALSTGLIHL
6	E2	726-734	LLFLLLADA
7	NS3	1073-1081	CINGVCWTV
8	NS3	1585-1593	YLVAYQATV
9	NS4	1671-1680	VLAALAAAYCL
10	NS4	1807-1816	LLFNILGGWV
11	NS4	1851-1859	ILAGYGAGV
12	NS4	1920-1928	WMNRLIAFA
13	NS5	1992-2000	VLSDFKTWL
14	NS3	1406-1415	KLVALGINAV

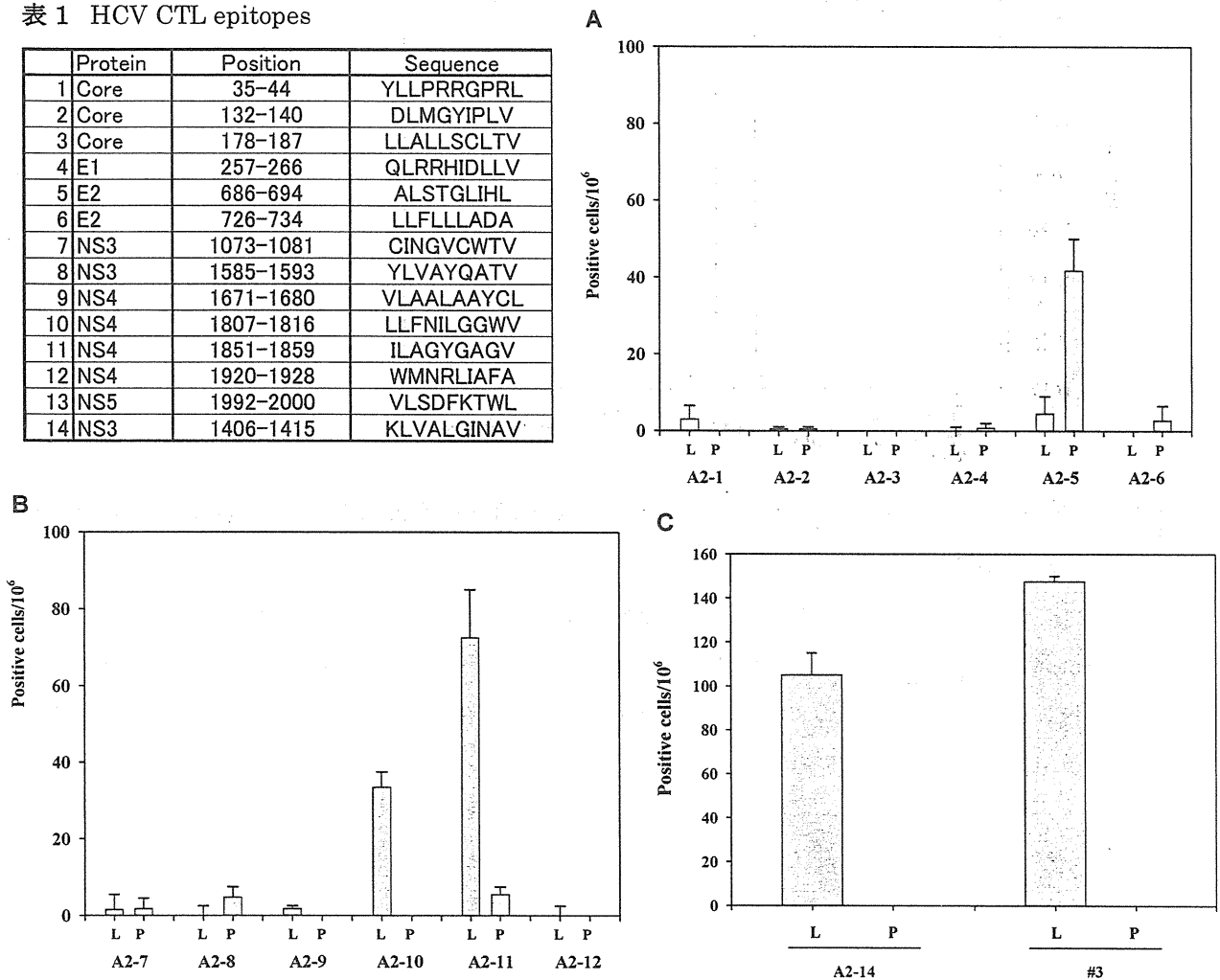


図 1 14 種の既知の HLA-A2 拘束性 HCV CTL epitope (A2-1~14)と前年度新規同定 epitope #3 のリポソーム結合ワクチン (L) とペプチド-アジュバントワクチン (P) の免疫原性の比較

HLA-A2 transgenic mice (HHD) (6 週令♀) を免疫後 9 日目に一度追加免疫を行い、14 日後に ELISPOT (IFN- γ) で反応を比較した (n=3)。

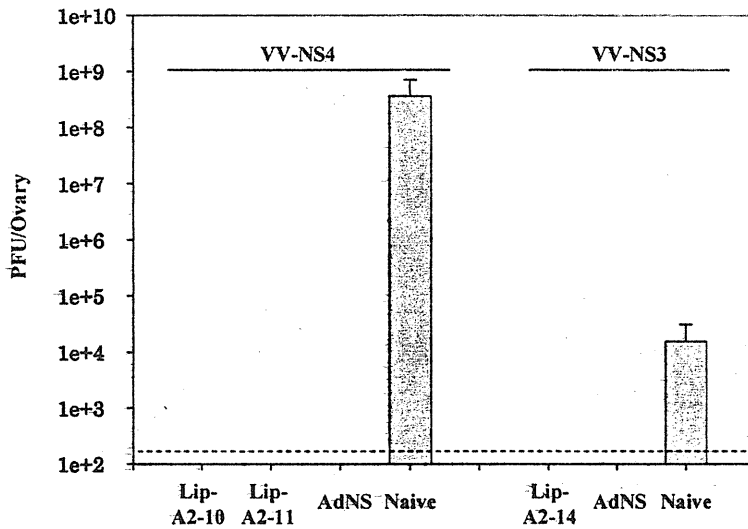


図2 3種のリポソームワクチン (Lip-A2-10, Lip-A2-11, Lip-A2-14) 免疫マウスのウイルスチャレンジ実験

HLA-A2 transgenic mice (HHD) (6週令♀)を免疫後9日目に一度追加免疫を行い、14日後にHCV NS4またはNS3を発現する組換えワクシニアウイルスを 2×10^6 PFU 接種し (i.p.)、5日後に卵巣を採取してそのホモジネートのウイルス量をBSC-1細胞を用いたプラークアッセイで測定した (検出限界は200 PFU/Ovary) (n=4)。

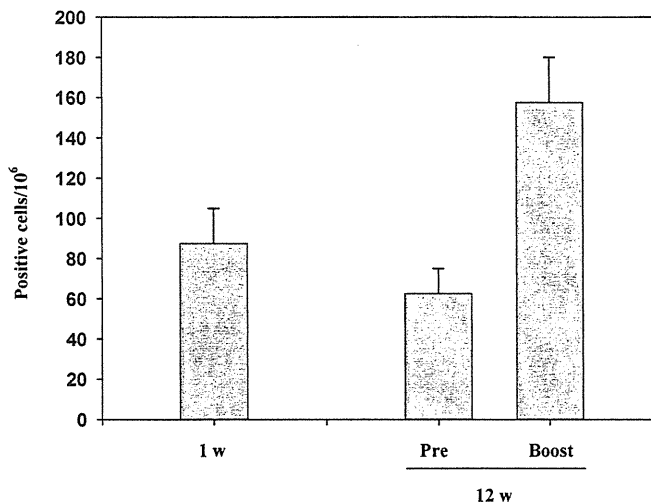


図3 Lip-A2-14によるメモリーCTL誘導

HLA-A2 transgenic mice (HHD) (6週令♀)をLip-A2-14で免疫し、1週と12週後にその脾細胞のELISPOT (IFN- γ)で反応を比較した。一部のマウスは免疫後11週で追加免疫を行い、その1週後にブースト効果を判定した (n=3)。

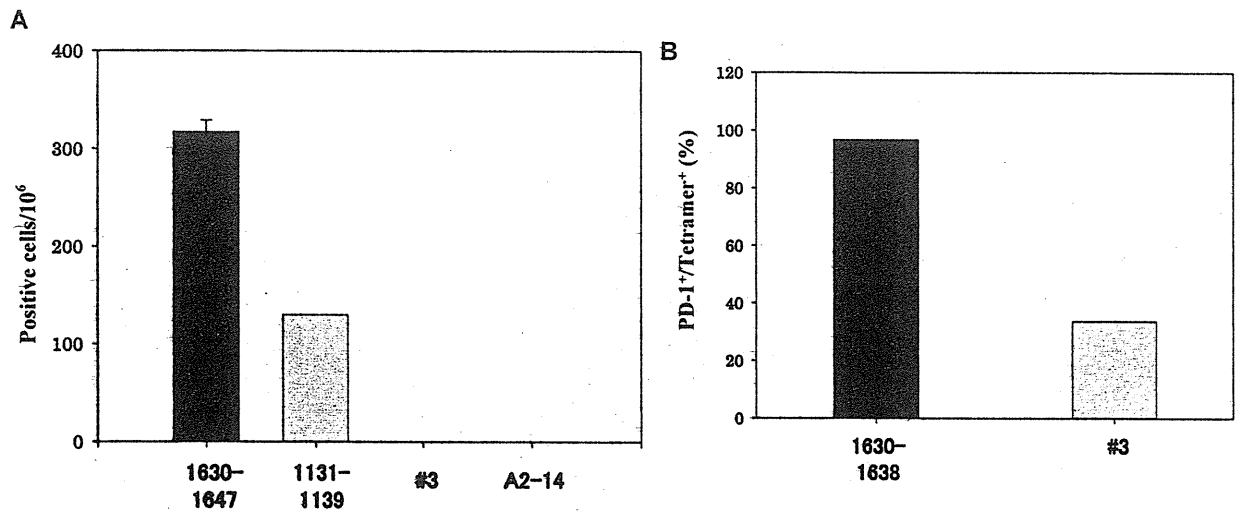


図4 ウイルス感染におけるA2-14と#3の免疫原性

A. C57BL/6とHHDマウス(6w♀)にHCV NS3-A5を発現する組換えアデノウイルス(AdNS)で免疫(5×10^7 PFU i.p.)後、脾細胞でのELISPOT(IFN- γ)をそれぞれのマウスのMHCクラスIに拘束性のエピトープ(C57BL/6:1630-1647;HHD:1131-1139,#3,A2-14)について行い、その免疫原性を比較した(n=3)。B. アデノウイルス(AdNS)で免疫したC57BL/6とHHDマウスの肝臓中のCD8⁺T細胞について、それぞれ1630-1647および#3に特異的なMHCテトラマー(PEラベル)と抗PD-1抗体(FITCラベル)で染色し、抗原特異的CD8⁺T細胞におけるPD-1発現陽性細胞の比率を測定した。

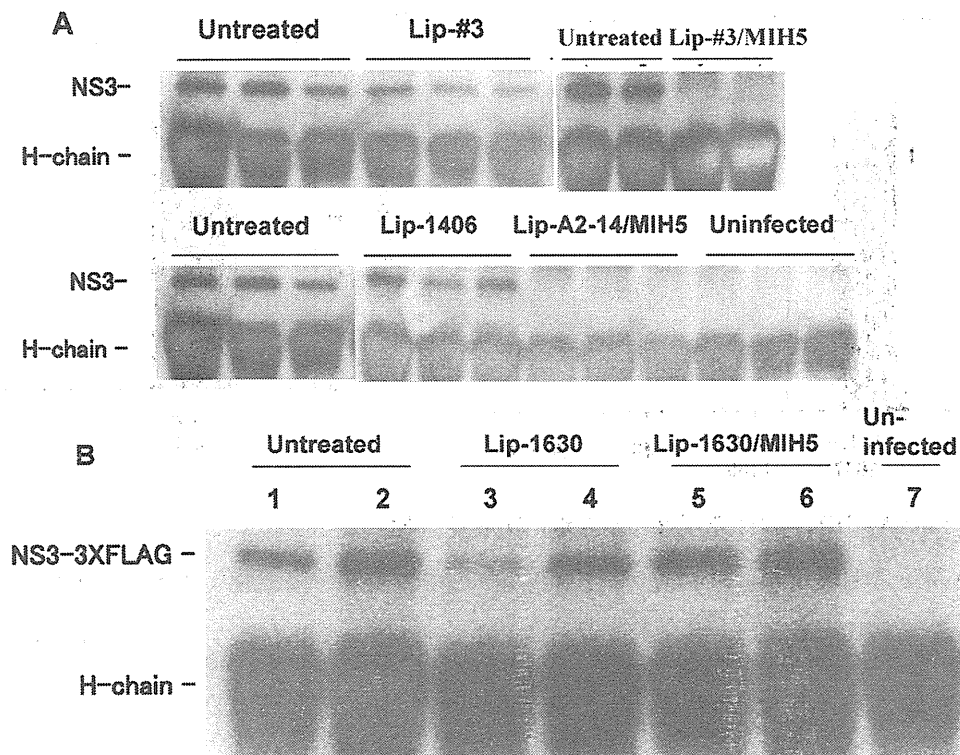


図5 AdNS3 感染マウスの免疫治療実験

HCV core transgenic (C57BL/6 background)と HHD (HLA-A2 transgenic)の F1 マウス (A) または HCV core transgenic マウス (B) に HCV NS3-3XFLAG を発現する組換えアデノウイルス (AdNS3-3XFLAG) で感染 (1×10^9 PFU i.v.) させ、7日目からリポソームワクチンを2日毎に4回投与し、14日目に肝臓を取って抗 FLAG 抗体を用いた IP/Western により NS3 のバンドを検出した。ワクチンとして #3、A2-14 または 1630-1647 ペプチドの単独結合 (Lip-#3, Lip-A2-14, Lip-1630)、およびそれぞれに抗 PD-L1 抗体 (MIH5) を同時に表面結合したもの (Lip-#3/MIH5, Lip-A2-14/MIH5, Lip-1630/MIH5) を CpG 10 μ g と共に footpad に注射した。

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

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 K3 タイプの CpG ODN に関しては、GMP 準拠ロットをラージスケールで安定して製造することが確立され、その生理活性も実験用ロットと同様に強かった。前臨床試験に必要な GMP 準拠ロットを安定的に供給可能となった。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行い、生理活性を保ちつつ CpGODN 凝集を示さない数個の有望な候補配列を実験的に見出すことが出来た。今後さらに解析を進める予定である。

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。

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。

B. 研究方法

1) ヒト型 TLR9 リガンド CpGODN の開発

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

リ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、医薬基盤研究所および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。D35 については、ODN 長さや配列を工夫した改変型のスクリーニングを *in vitro* での生理活性を指標に行った。また、個々の改変型 ODN についての凝集の有無を DNA マイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA) を用いて評価した。その結果、生理活性を残したまま凝集しにくい ODN を見出すことが出来た。今後それらのさらに詳細な解析を進める予定である。

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

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。また、GMP ロット作製が困難であった D タイプの ODN についても、スクリーニングによって GMP ロット作製が可能となりうる有望な候補を見出すことが出来た。K タイプと D タイプでは標的となる細胞や生体内での効果がやや異なるため、D タイプの GMP 化が可能になれば、病態やワクチン性状にあわせてより適したアジュバント選択が行えるようになると考えている。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 BR KO でも CpG ODN のアジュバント効果が消失したことから、リポソームワクチンに対する 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. Aoshi T, Koyama S, Kobiyama K, Akira S, Ishii KJ. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Current Opinion in Virology*. 1(4):226-232.(2012)
2. Yildiz Zeyrek F, Palacpac N, Yuksel F, Yagi M, Honjo K, Fujita Y, Arisue N, Takeo S, Tanabe K, Horii T, Tsuboi T, Ishii KJ, Coban C. Serologic markers in relation to parasite exposure history help to estimate transmission dynamics of *Plasmodium vivax*. *PLoS One*. 6(11):e28126 (2011)
3. Coban C, Kobiyama K, Aoshi T, Takeshita F, Horii T, Akira S, Ishii KJ. Novel Strategies to Improve DNA

Vaccine Immunogenicity. *Curr Gene Ther*. 11(6). (2011)

4. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, Lekeux P, Coban C, Akira S, Ishii KJ, Bureau F, Desmet CJ. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med*. 17(8):996-1002. (2011)
5. Palacpac NM, Arisue N, Tougan T, Ishii KJ, Horii T. Plasmodium falciparum serine repeat antigen 5 (SE36) as a malaria vaccine candidate. *Vaccine*. 29(35):5837-45. (2011)
6. Fujimoto K, Karuppuchamy T, Takemura N, Shimohigoshi M, Machida T, Haseda Y, Aoshi T, Ishii KJ, Akira S, Uematsu S. A New Subset of CD103⁺CD8 α ⁺ Dendritic Cells in the Small Intestine Expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and Induces Th1 Response and CTL Activity. *J Immunol*. 186(11):6287-95. (2011).
7. Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, Ohata K, Coban C, Akira S, Aritake K, Urade Y, Morimoto Y. Silica Crystals and Aluminum Salts Regulate the Production of Prostaglandin in Macrophages via NALP3 Inflammasome-Independent Mechanisms. *Immunity*. 22;34(4):514-26. (2011)

8. 青枝大貴、石井 健 「自然免疫と次世代ワクチン開発」 Drug Delivery System. 27 巻 1 号 19-27 (2012.01)

9. 青枝大貴、石井 健 「ワクチンアジュバント」日本臨床 69 巻 9 号 1547-1553 (2011.09)

10. 石井 健、青枝大貴、小檜山康司、鉄谷耕平、審良静男「アジュバント開発研究の新展開」(石井 健・山西弘一監修)シーエムシー出版 2011 年 8 月 24 日

11. 津久井利広、Coban, Cevayir, 八木正典、大畑敬一、猪狩義勝、福井真人、堀井俊宏、審良静男、石井 健 「マラリアヘモゾインに対する TLR 9 での反応と免疫増強効果」臨床免疫・アレルギー科 (2011) 55(1): 28-34

12. 青枝大貴、審良静男、石井 健「生体防御機構—Toll-like receptors ノックアウトマウス」マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック(秋山徹、奥山隆平、河府和義編) 2011 年 1 月 1 日発行 羊土社

13. 小山正平、石井 健「粘膜アジュバント」臨床粘膜免疫学(清野宏編) 2010 年 12 月 20 日発行 シナジー社

14. 鉄谷耕平、石井 健 「アジュヴァント小史」臨床とウイルス, 38(5): 367-378, 2010.

2. 学会発表

招待講演のみ (国内 11 件、国際 4 件)

1. Advances Immunology and Cancer Biology (Boğaziçi University Istanbul, Turkey)

講演「Mechanism, Manipulation and Application of Nucleic Acids as Vaccine Adjuvant」

2. KEYSTONE SYMPOSIA (Sheraton Hong Kong Hotel・China)

講演「Endo-and Exogenous Adjuvant for Influenza Vaccination」

3. 第 76 回日本インターフェロン・サイトカイン学会・第 19 回国際マクロファージ分子細胞生物学シンポジウム 2011 (全日空ゲートタワーホテル・大阪)

講演「Immune recognition of, and regulation by, vaccine adjuvants」

4. 第 7 回北海道癌免疫制御研究会 (北海道札幌パークホテル)

講演「アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政まで」

5. 第 52 回日本臨床ウイルス学会 (三重県総合文化センター・津市)

教育講演「ウイルス感染・ワクチンと固体の免疫応答」

6. 第 31 回ヒューマンサイエンス基礎研究講習会 (医薬基盤研究所 図書室)

講演「ワクチンアジュバントの分子メカニズムとその応用」

7. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011)

8. 第59回日本ウイルス学会学術集会(札幌コンベンションセンター)

講演「New mechanisms of vaccine adjuvant: innate immunity and beyond」

9. VACCINE FORUM SINGAPORE 2011 (シンガポール)

講演「Key innate immunity, delivery system and metabolism for future adjuvants」

10. 第84回日本生化学会(京都国際会館)
講演「細胞外核酸とその代謝産物による免疫制御機構とその生理的意義」

11. Bio JAPAN2011 (パシフィコ横浜) セミナー「ワクチンアジュバント開発研究の新たな展開 (New mechanisms of vaccine adjuvant; innate immunity and beyond)」

12. 北海道大学遺制研セミナー(北海道大学遺制研)
講演「アジュバント開発研究の新展開: 自然免疫から審査行政まで」

13. JST-CRDS 感染制御ワークショップ(東京 JST-CRDS)
講演「アジュバント開発、日本の強みを生かした感染症研究、審査制度・体制」

14. 第24回日本バイオセラピー学会学術集会総会
モーニングセミナー「癌幹細胞を標的とする免疫療法」

15. 第15回ワクチン学会(東京 日本教育会館)
シンポジウム～もうちょっと効くインフルエンザワクチンの開発に向けて～

講演「ワクチンアジュバント効果とバイオマーカーを探る」
イブニングセミナー「抗原ごとの最適アジュバント研究開発」

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