

博士論文

細胞傷害性 T 細胞(CTL)に対する
C 型肝炎ウイルス及び重症急性呼吸器症候群(SARS)
ウイルス由来ドミナントエピトープの決定と
ペプチド結合リポソームによる CTL の誘導

甲第39号

大野 悟史

博士論文

細胞傷害性 T 細胞(CTL)に対する
C 型肝炎ウイルス及び重症急性呼吸器症候群(SARS)
ウイルス由来ドミナントエピトープの決定と
ペプチド結合リポソームによる CTL の誘導

大野 悟史

目次

緒論	1
材料と方法	
1. マウス	13
2. 細胞	13
3. 合成ペプチド	14
4. Multiepitope minigene (N8E)の作製	15
5. HCV タンパク質を発現する組み換えウイルスと IL-12 発現プラスミド	16
6. Multiepitope minigene を発現する組み換えアデノウイルス (AdV)の作製	16
7. Multiepitope minigene を発現する組み換えワクシニアウイルス (VV)の作製	17
8. リポソーム	19
9. Peptide binding assay	20
10. Complex stability assay	21
11. マウスの免疫法	22
12. CTL assay	22
13. 細胞内 IFN- γ の測定(Intracellular cytokine staining: ICS)	23
14. in vivo CTL assay	23
15. Virus チャレンジ実験	24
実験結果	
第 I 章 HCV 由来 CTL ドミナントエピトープの同定とペプチド結合リポソームワクチンへの応用	
1. HLA-A*0201 関連 HCV 由来ペプチドの結合アフィニティの測定	25
2. HLA-A*0201 関連 HCV 由来ペプチドの結合安定性の測定	26
3. HCV 由来エピトープ特異的 CTL 活性の測定	28
4. HCV 由来エピトープ特異的細胞内 IFN- γ ⁺ CD8 ⁺ T 細胞の測定	28
5. HCV 由来ペプチドの type 分類	31
6. ペプチド結合リポソームによる HCV 特異的 CTL の誘導	35

第II章 SARS-CoV 特異的 CTL に対するエピトープの決定とペプチド結合リポソームによる CTL の誘導

1.	コンピューターによる SARS-CoV 由来 CTL エピトープの予測	37
2.	予測したエピトープをコードする遺伝子 (Multiepitope minigene) の作製	37
3.	AdV-SARS-N8E 投与による細胞内 IFN- γ + CD8 ⁺ 細胞の測定 (ICS)	39
4.	AdV-SARS-N8E 投与による CTL の細胞傷害活性の測定 (⁵¹ Cr-release assay)	41
5.	AdV-SARS-N8E 投与による CTL の細胞傷害活性の測定 (in vivo CTL assay)	42
6.	AdV-SARS-N8E 投与による実験結果に基づくエピトープの選定	42
7.	ペプチド結合リポソーム投与による細胞内 IFN- γ + CD8 ⁺ 細胞の測定 (ICS)	44
8.	N-222 と N223 の Cross-reactivity	45
9.	Lip-N-223 投与によるウイルス排除	46
	考察	49
	謝辞	55
	参考文献	56

緒論

外界から侵入してくるウイルスに対し生体内では、さまざまな免疫防御反応が引き起こされる。この免疫反応は自然免疫と獲得免疫（適応免疫）に分けることができる。Fig. 1 に一般的なウイルス感染後の宿主の防御機構の時間的推移の模式図を示す。外界よりウイルスが侵入すると感染直後から、初期抵抗性に重要な役割を果たす自然免疫反応が働く。自然免疫では、I型 interferon (IFN) である IFN- α や IFN- β の産生や発熱による免疫機能の活性化がおり、マクロファージや Natural Killer 細胞(NK 細胞)による非特異的な免疫防御反応が起こる。これらの免疫反応を誘導するシグナル伝達に、進化的に保存された、Toll-like receptor が極めて重要な役割をしている。しかし、通常、自然免疫だけでは完全にウイルスを排除することはできないため、自然免疫ののち、数日後に獲得免疫が誘導され抗原特異的の反応がおり、免疫記憶が残ってウイルス感染症に抵抗性を示す¹⁾。

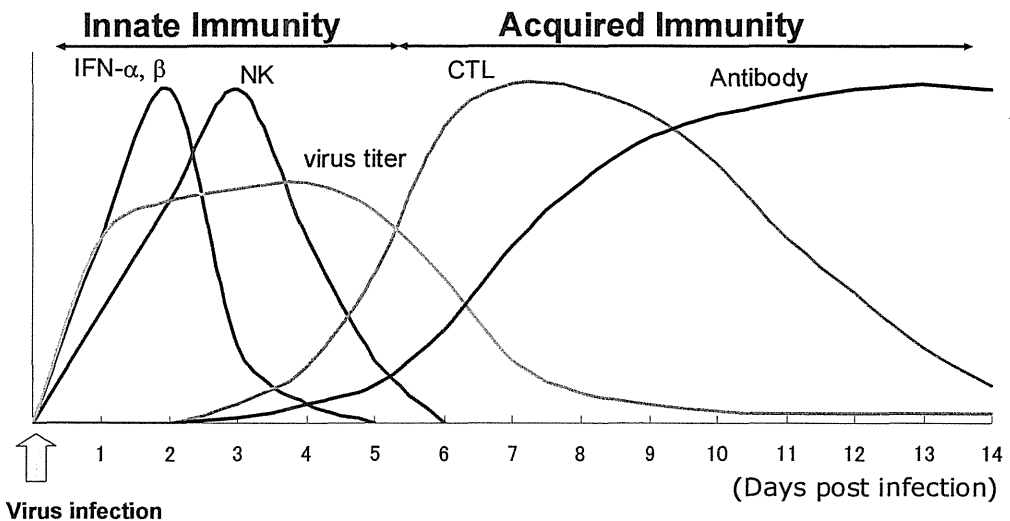


Fig.1 Immune host defense against virus infection

獲得免疫は、体液性免疫と細胞性免疫に分類される。体液性免疫では、主に B 細胞が関係し、中和抗体、オプソニン作用、補体活性化による免疫反応がおこる。一方、細胞性免疫では、T 細胞が関係し、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte : CTL)や CD4 陽性ヘルパーT (Th)細胞により免疫機能が維持されている。なかでも、CTL はウイルス感染症に対する免疫反応において重要な役割を果たす。CTL は、ウイルス感染細胞を特異的に認識し、パーフォリン、グランザイムを分泌することにより、ウイルス感染細胞をアポトーシスへと誘導する。また CTL は、IFN- γ 、Tumor Necrosis Factor (TNF)- α といった抗ウイルス性サイトカインを産生して効率的にウイルスを排除する。Fig. 1 で示されるように CTL 活性が上昇していくとともに、ウイルス力価が次第に下降する。このように、CTL はウイルス排除機構において重要な役割を担っている¹⁾²⁾。事実、チンパンジーの C 型肝炎ウイルス(Hepatitis C Virus : HCV)による感染実験から、感染後 HCV をクリアーしたチンパンジーでは、抗体の体液性免疫ではなく CTL を中心とした細胞性免疫が、HCV の排除に関わっていることが証明されている³⁾。

CTL の分化・誘導には I 型ヘルパーT (Th1)細胞が必要不可欠である。T 細胞は胸腺で分化したのち、血流から末梢リンパ組織を循環する。抗原に接触していない CD4⁺ T 細胞はナイーブ CD4⁺ T 細胞として存在しているが、生体内に抗原が侵入すると樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞 (antigen presenting cell : APC)により、抗原がナイーブ CD4⁺ T 細胞に提示される。その結果、未成熟のエフェクターT (Th0)細胞(Th0 細胞)へと分化・増殖する。そして Th0 細胞は、誘導されたサイトカインの種類、補助刺激因子等によって Th1、Th2 および Th17 細胞にそれぞれ分化する。

ワクチンの成否にかかわる要件は感染病原体の性質によって変化する。細胞

外病原体の場合、宿主の獲得免疫応答には抗体が重要な働きをする。また、ウイルスのように細胞内に入り込み増殖するような病原体の制御には、内在性抗原を認識する CD8⁺ CTL の反応が必須である。つまり、有効なウイルスワクチンを開発するには、ウイルス特異的 CTL の効率的な誘導が重要な鍵になる。しかし、現在臨床応用されているアルミニウムアジュバントなどのワクチンアジュバントは、体液性免疫(抗体産生)を増強するが、細胞性免疫は誘導しにくい。そこで著者は、CTL の誘導・活性化を目的としたワクチン開発に注目した。

CTL 誘導型ワクチンに着目する理由は主に 2 つある。1 つは、CTL が 9 つ前後のアミノ酸からなる短いペプチドを抗原として認識する⁴⁾ のに対し、抗体は通常 20-30 のアミノ酸からなるペプチドを認識する⁵⁾ ことである。RNA ウイルスは、ウイルス複製過程で変異が起きやすいため、長いペプチドを抗原とする抗体は変異の影響を受けやすく、短いペプチドを抗原とする CTL は変異の影響を受けづらい。2 つ目は、CTL と抗体の抗原認識機構の違いがあげられる。抗体(中和抗体)は、細胞外に存在するウイルスの、エンベロープやスパイクなどの外郭タンパク質を認識しウイルスを中和する。一方、CTL は、ウイルスが感染した細胞で作られるウイルス由来タンパク質すべてを内在性抗原として認識することが出来る。そのため、抗体に比べ CTL では、エピトープのレパートリーに広がりを持つ。また、CTL がウイルスの作製するすべてのタンパク質を抗原と認識できるため、ウイルスの生存に関わる変異しづらい内部の構造タンパク質や、非構造的調節性タンパク質をエピトープにできる。そして、ウイルスが細胞内にひそんで、宿主の防御反応から逃れている場合、抗体では細胞内のウイルスを中和できないのに対し、細胞内抗原を認識する CTL はウイルスを排除することができる。

CTL は、主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex, MHC) (ヒト

では human leukocyte antigen: HLA) クラス I 分子によって提示された、短いペプチドを抗原として認識し活性化される。MHC クラス I 分子は、約 340 個のアミノ酸からなる 45-kDa の重鎖 (heavy chain) と、MHC とは連鎖していない遺伝子産物で 100 個のアミノ酸からなる 12-kDa の β 2-microglobulin (β 2m) とが非共有結合した膜結合型タンパクである。MHC クラス I 分子の重鎖は、 α 1、 α 2 および α 3 の 3 つの細胞外ドメインからなり、 α 1 と α 2 ドメインからなる高次構造によって、抗原ペプチドが結合する大きな溝とペプチドのアミノ酸側鎖がはまり込む 6 つのポケットが形成される ^{6),7)} (Fig. 2)。 β 2m は、3 つのドメインと接触し、クラス I 重鎖のコンフォメーションに強い影響を与える。抗原ペプチドは MHC クラス I 分子に結合すると、MHC クラス I 分子を安定化させる。つまり、ペプチドは MHC クラス I 分子複合体構造の一部として不可欠なものであり、ペプチドが結合していない状態の MHC クラス I 分子(empty MHC class I molecule)は不安定である。このように、MHC クラス I 分子はどれも欠

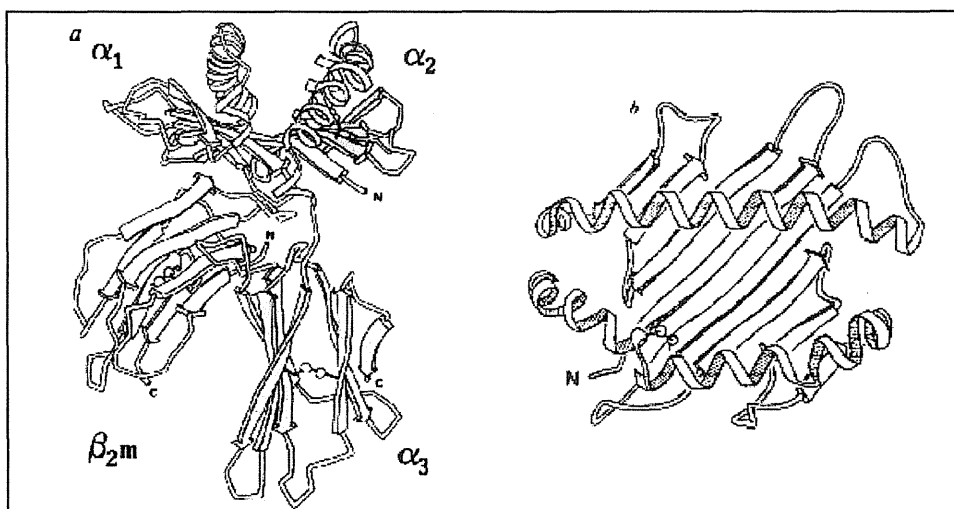


Fig. 2 Structure of HLA-A2 molecule ⁶⁾
a: From a lateral view b: From top to bottom

かすことのできない 3 分子で構成され、CTL 上の T 細胞レセプター (TCR) を介して CTL にウイルス由来ペプチドを抗原提示し、CTL を活性化する。活性化された CTL は、ウイルス感染細胞を直接破壊したり IFN- γ などのサイトカインを分泌したりして、ウイルスを体内から排除する。

Fig. 3 に示したように、ウイルスが細胞に感染すると、細胞内でウイルス遺伝子からウイルスタンパク質が作られ、プロテアソームによって分解される。プロテアソームは 28 個のサブユニットが連なってできており、1 つが 7 個のサブユニットからなる輪が 4 個集まってできた巨大な円筒状の複合体であり、そのサブユニットのタンパク分解活性部位が円筒の中心に並んでいる⁴⁾。プロテア

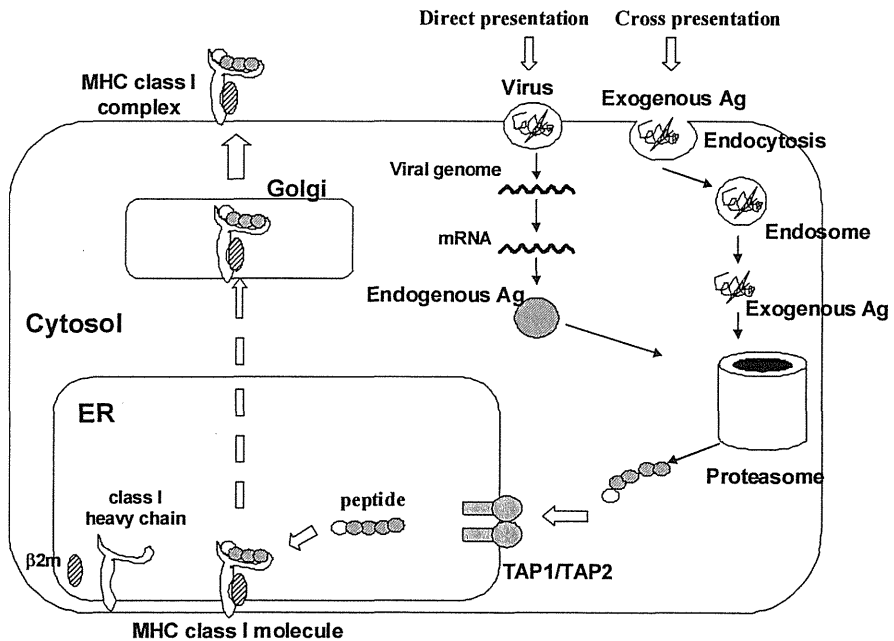


Fig. 3 Antigen processing pathway of MHC class I molecules
Direct presentation and cross presentation

ソームを通して分解されたペプチド断片は、抗原処理関連トランスポーター (transporters associated with antigen processing: TAP) とよばれる分子によ

て、粗面小胞体内に輸送される^{8,9)}。TAP は 2 種類のタンパク質 TAP1、TAP2 からなるヘテロ二量体で、小胞体膜を貫通し ATP 依存的にペプチドを輸送する。TAP1、TAP2 遺伝子は MHC 遺伝子領域に位置し、2 つの遺伝子どちらに変異が生じてても MHC クラス I 分子による抗原提示はできなくなる。この TAP の機能は、TAP 欠損細胞株を用いた研究によって見出された。TAP が欠損した細胞株では、ペプチド断片が細胞質から粗面小胞体に入れないため、クラス I 分子がペプチドと結合できず、不安定で、CTL にペプチドをうまく提示することができない。TAP を通り、粗面小胞体に入ってきたペプチドは MHC クラス I 分子と結合し、ゴルジ装置で maturation され細胞表面に出て行き、CTL に認識される。以上の過程は一般的に Direct presentation と呼ばれている。また、これとは別に、Cross presentation という抗原提示過程も存在する。Cross presentation は、エンドサイトーシスで細胞内にとりこまれた外来性抗原が、エンドソームから細胞質へと移行しプロテアソームで分解されたのち、TAP 依存性に粗面小胞体に輸送され、MHC クラス I 分子に結合して提示される経路である (Fig. 3)。

1991 年、Rammensee ら、Wiley らの 2 つの研究グループは、MHC クラス I 分子に結合している自己抗原ペプチドを分離し、そのアミノ酸解析を行った¹⁰⁾¹¹⁾。その結果、結合しているペプチドのアミノ酸配列には、それぞれの MHC アリールに特有のモチーフが存在することがわかった (ペプチドモチーフ) (Table 1)。これらのペプチドは、通常 8~10 個のアミノ酸からなる。例えば、HLA-A*0201 に結合するペプチドの多くは 2 番目にロイシンやメチオニン、9 番目にバリンやロイシンをもつ。このことから、ペプチドの 2 番目と 9 番目のアミノ酸は、ペプチドと HLA-A*0201 の結合において重要なアンカーの役割を果たすと考えられた。すなわち、それぞれの MHC クラス I 分子に対応するペ

ペプチドのアンカーが、特有のアミノ酸でないと、ペプチドはそのクラス I 分子に結合しない。しかしながら、MHC クラス I 分子への結合アフィニティだけで、ペプチドの免疫原性は説明できない。むしろ、MHC クラス I 分子 - ペプチド複合体の結合後の安定性が重要であるとの報告もある¹²⁾。

Table 1 Peptide motifs associated with MHC class I molecules

Isoform of HLA	Amino Acids at anchor positions									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HLA-A*0201		L/M							V/L	
HLA-A 3		L/V/M							K/Y/F	K
HLA-A 24		Y							I/L/F	
HLA-A 68.1		V/T							R/K	
HLA-B 7		P							L/F	
HLA-B 8			K		K/R				L	
HLA-B*2705		R							L/F	
HLA-B*3501		P							Y/F/M/L/I	
HLA-B*5101		A/P/G							F/I	
HLA-B 53		P								
H-2 Kb					F/Y			L/M/I/V		
H-2 Kd		Y/F							I/L/V	
H-2 Kk		E						I	I	
H-2 Db					N				M/I	
H-2 Dd		G	P						I/L/F	
H-2 Ld		P/S							F/L/M	

本研究では、リポソームを抗原導入のキャリアーとして用いた。リポソームは組み換えウイルスなどと比べ、生体の細胞膜構成成分からなるため、極めて毒性が低く、より安全性が高い。また、通常の抗原を内包したりポソーム(内包型リポソーム)ではなく、抗原をリポソーム表面に共有結合させた表面結合型リポソームを用いた。表面結合型リポソームは2つの特徴を持つ。1つは、アレルギー様の副反応の原因となる IgE 産生が起こらないことである。Naito らの報

告¹³⁾によると、卵白アルブミン(OVA)表面結合リポソームと、OVA に水酸化アルミニウムを吸着させたものをマウスの皮下に投与し比較した研究で、投与後の血清中には、ともに抗原特異的な IgG の産生は見られるが、OVA 表面結合リポソーム投与では抗原特異的な IgE の産生は見られなかった。2 つ目は、ペプチドタンパク抗原を内包するリポソームと比べて、表面結合型リポソームでは、はるかに効率的に CTL を誘導することである。Nagata ら¹⁴⁾が行った実験によると、OVA ペプチド内包型リポソームではほとんど CTL 活性を示さなかったのに対し、OVA ペプチド結合リポソームでは高い CTL 活性を示した。

本研究では、ウイルス感染に対する CTL 誘導型ワクチンを開発することを目標に第 I 章では HCV に、第 II 章では新興感染症である重症急性呼吸器症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome : SARS) の原因ウイルスである SARS-CoV に注目した。

第 I 章で焦点を当てた HCV は、フラビウイルス科に属し、従来正体が明らかではなかった非 A 非 B 型肝炎の主要な原因ウイルスとして、1988 年その実体が知られた¹⁵⁾。HCV はエンベロープを持つ、直径 55~65nm の球状粒子であり、内部に全長約 9.4 kb の 1 本のプラス鎖 RNA をゲノムとして持つ。Fig. 4 に示すように、HCV ゲノムは 3 種類の構造タンパク遺伝子 (Core, E1, E2) と、5 種類の非構造タンパク遺伝子 (NS2-NS5B) からなる。E1 と E2 遺伝子はエンベロープタンパク質を、Core 遺伝子はウイルス粒子内部コアタンパク質をコード

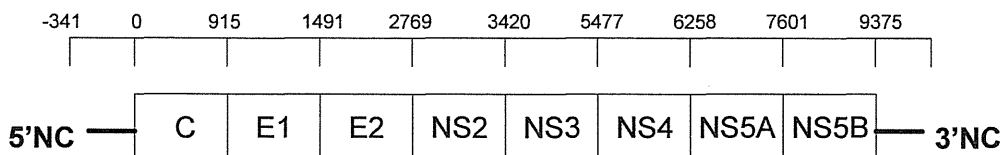


Fig. 4 Structure of HCV genome

する。非構造タンパク遺伝子は、セリンプロテアーゼや RNA ポリメラーゼなど、ウイルスの複製に必要なタンパク質をコードする。

WHO の調べによると、世界の総人口のおよそ 3%にあたる 1 億 7 千万人のヒトが HCV の慢性キャリアになっていると考えられている。日本では現在、HCV 感染者は 200 万人以上存在する。HCV に感染するとほどなくして急性感染症状が現れるが、その後ウイルスを体内から排除できるヒトはわずか 15%・20%に過ぎない。80%以上のヒトはウイルスを排除できずに慢性持続性肝炎に陥り¹⁶⁾、肝硬変そして肝癌に移行する¹⁷⁾。平成 14 年の統計では、日本における肝癌死亡者数は、肺癌、胃癌に続いて第 3 位と上昇したが、この肝癌患者の 8 割以上は HCV キャリアーから発生している。現在、HCV に対して一番効果の高いペグインターフェロンとリバビリン併用療法は、2 人に 1 人の割合でしか効力が得られない。したがって、我々人類にとって、C 型肝炎の予防・治療は重要な課題である。

今までに、HCV 由来の CTL に対する抗原エピトープは多数同定された。特に、世界で最もポピュラーなヒト MHC クラス I 分子である HLA-A*0201 に関連した HCV 由来エピトープは、20 種類以上報告されている。しかしながら、HCV は一般に抗原性が弱く、ワクチンにエピトープを抗原として使用する場合、抗原性の強いドミナントエピトープを使用する必要がある。

第 II 章で注目した SARS コロナウイルス(SARS-CoV)は、コロナウイルス科(Coronaviridae)に属し、SARS の原因ウイルスである。SARS-CoV はプラス鎖の非分節 RNA を遺伝子としてもち、主要なウイルスタンパク質を基本的に重複することなくコードしている。ウイルスゲノムは約 30K 塩基あり RNA ウィルスとしては最長のゲノムで、その 5'末端にはキャップ構造を、3'末端には poly(A)を有する¹⁸⁾ (Fig. 5)。

SARS は 2002 年の 11 月中旬に中国広東省で流行した「非典型肺炎」に端を発し、ベトナム、香港の医療従事者を中心に感染が拡大した。引き続きカナダ、シンガポールへ広がるに至って、世界保健機構(WHO)が‘Global Alert’を発して本格的な調査を開始し、2003 年 3 月 15 日には SARS と名づけられて、「世界規模の健康上の脅威」である原因不明の重症非定型肺炎として扱われることとなった^{19) 20)}。また、航空機の登場により、短時間で長距離の移動が可能になったことから、以後数ヶ月間で SARS はアメリカ、ヨーロッパ、アジアなどの

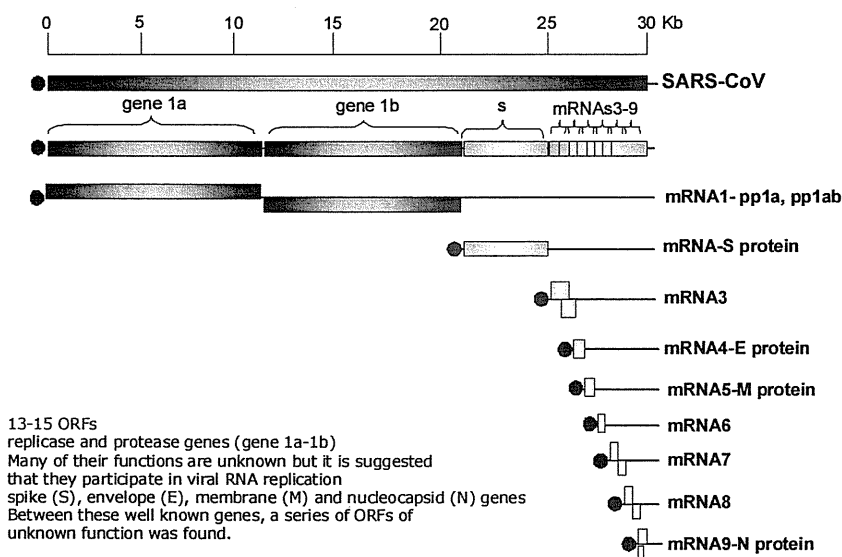


Fig. 5 SARS-CoV genome organization

29 の地域と国へ急速に広がりを見せた。実際には、2002 年 11 月～2003 年 7 月末日の間に中国を中心に 8,096 人の患者が報告され、このうち 774 人が死亡している²¹⁾。そういった事態に対して、WHO が中心となり各国支援のために専門家チームが派遣され、電子情報システムを駆使した研究協力による原因病原体の同定、古典的な「隔離と検疫」を用いた院内感染を中心とした集団発生の防止などが実施された。その結果、2003 年 4 月 16 日には新種のコロナウイ

ルスが SARS 起因病原体(SARS-CoV)であることが発表され、7月5日には感染経路の特定、確定診断の方法、特異的な治療法の確立などを待たずに、世界規模の集団発生に終息宣言が出されることとなった^{22) 23)}。SARS-CoV による SARS の致死率は約 10%とされており、臨床経過は極めて不良である。SARS-CoV は主に目、鼻、口などの粘膜から感染すると考えられており、その後、鼻腔、咽頭、肺などの呼吸器で増殖する。感染者のなかには下痢症状を伴う者がかなり多くみられ、ウイルスも便から検出され小腸、大腸での増殖が認められている²⁴⁾。SARS-CoV の増殖のピークは発症後 10 日頃で、重症化は 10 日以降にみられ、さらに死亡するまでには 19 日程度と隔たりがある。現時点では、SARS-CoV に新たに感染するヒトは出現していないが、誰がキャリアとなって、再度世界的な感染拡大となる可能性も否定できない。そのためにも、早急な治療薬の判明、診断薬、ワクチンの開発が望まれる。

SARS ウイルス由来の CTL エピトープは、Spike 領域由来 HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープ 4 種類のみが他グループによって同定されている。しかし、効率良く免疫するには複数のエピトープを同定する必要がある。

以上のことから、本研究では、リポソームを使った HCV と SARS 治療ワクチンの開発を、世界で最も人口が多い HLA-A*0201 を持つヒトをターゲットに行う研究の一端として、HLA-A*0201 に関連したドミナントエピトープの決定を行った。そのために、HLA-A*0201 トランスジェニックマウスというモデルマウスを使用した。このマウスは、ヒトの MHC 遺伝子である HLA-A*0201 を発現しているので、ヒトでの免疫実験の代用として、マウスでそれを手軽に行える利点がある。

HCV に関しては、すでに報告されている 24 種類の HLA-A*0201 関連 HCV 由来エピトープのペプチドを合成し、各ペプチドの HLA-A*0201 の結合アフィ

ニティと安定性を検討するとともに、免疫したトランスジェニックマウスでの CTL 誘導能を比較検討することによりドミナントエピトープの選択を行った。また、ペプチド結合リポソームにて CTL の誘導能も確認した。

SARS については、SARS-CoV の構造タンパク質であり、まだエピトープが同定されていないヌクレオカプシド(423 aa) に焦点を当て、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 9-10 個のアミノ酸配列を 8 種類選び、合成ペプチドを作製した。そして、予測したエピトープによって誘導された CTL との反応性を比較検討することによりエピトープを同定した。また、ペプチド結合リポソームの投与によって CTL を誘導することができ、ウイルスに対する抵抗性も確認できた。

材料と方法

1. マウス

フランス・パスツール研究所の Lemonnier 博士が作製した、反応性の高い HLA-A*0201 トランスジェニックマウスを使用した。このマウスは、マウス MHC クラス I 遺伝子である H-2D^b 遺伝子とマウスβ2m 遺伝子をダブルノックアウトしたマウスに、HHD 遺伝子をいれたトランスジェニックマウス(HHD マウス)²⁵⁾ である。HHD 遺伝子とは、MHC クラス I のα1 とα2 ドメインが HLA-A*0201 由来で、α3、transmembrane、cytoplasmic ドメインが H-2D^b からなるキメラ HLA-A*0201 遺伝子と、ヒトのβ2m 遺伝子を組み合わせた遺伝子である(Fig. 6)。5' 末端側から LS: Leader sequence; huβ2m: ヒトβ2m; A2 α 1: HLA-A*0201 α 1 domain; A2 α 2: HLA-A*0201 α 2 domain; Db α 3: H-2D^b α 3 domain; DbTM: H-2D^b, transmembrane domain; CP: H-2D^b cytoplasmic domain を表す。実験にはすべて、6-8 週齢のマウスを使用した。HHD マウスは、フランス・パスツール研究所・Lemonnier 博士より供与され、埼玉医科大学動物施設で飼育・繁殖されたものを用いた。

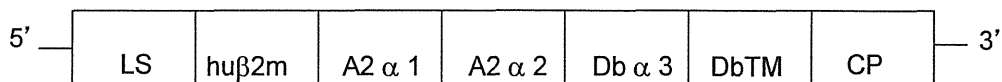


Fig. 6 Structure of the HHD gene

2. 細胞

本研究では、T2、RMA (H-2^b)、C143、293、293T、CV-1、BS-C-1、RMA-HHD を用いた。これらの細胞は、10%ウシ胎仔血清 (fetal calf serum: FCS) と 2 mM の L-glutamine を加えた RPMI 1640 (Sigma-Aldrich 社、St. Louis、MO) 培地

および DMEM (Sigma-Aldrich 社) 培地で培養した。T2²⁶⁾ は、TAP 1、TAP2 を欠損したヒト由来 B 細胞株である。また、RMA は、C57BL/6 マウス由来 lymphoma 細胞株である。組み換えワクシニアウイルス(VV)の実験で使用した C143 細胞はヒト骨肉腫由来の細胞で TK (チミジンキナーゼ)活性を欠損している。また、組み換えアデノウイルス(AdV)の実験で使用した 293 細胞はヒト胎児腎由来の細胞で AdV の E1 遺伝子を持つ細胞である。組み換えウイルスのタンパク発現をチェックした 293T 細胞もヒト胎児腎由来の細胞である。CV-1 と BS-C-1 はアフリカミドリザルの腎由来の細胞である。RMA に HHD 遺伝子をトランスフェクションし HHD 分子を発現させた細胞、RMA-HHD²⁷⁾ は、フランス・パスツール研究所・Lemonnier 博士より供与された。RMA-HHD は、上述の培地に G418 (Sigma-Aldrich 社) (500 µg/ml) を加えた培地で培養した。

3. 合成ペプチド

既知の HLA-A*0201 関連 HCV 由来ペプチド 24 種類を用いた(Table 2)。これらのペプチドは、Operon 社(Tokyo, Japan)によって、合成され、HPLC にて精製された。

SARS-CoV 由来ペプチドは、SARS-CoV のヌクレオカプシド領域において予測した。予測には、2 種類のエピトープ予測ソフト(BIMAS & SYFPEITHI)を用いた。BIMAS というエピトープ予測ソフトは、MHC クラス I とペプチドの dissociation rate を指標としエピトープを予測するソフトであり、その値が低いことがより抗原性の高いエピトープであることを意味している。また、SYFPEITHI は、ペプチドモチーフによりエピトープを予測するソフトであり、その値が高ければより抗原性の高いエピトープであることを意味している。その二つの予測ソフトで score の良いエピトープを 8 種類選び、それに相当する

ペプチドの合成を Operon 社に依頼した(Table 7)。

Table 2 A list of HLA-A*0201-associated, HCV-derived peptide

Name	Region	Residues	Sequence	ref
Core 35	Core	35-44	YLLPRRGPRL	27)
Core 132	Core	132-140	DLMGYIPLV	27)
Core 178	Core	178-187	LLALLSCLTV	27)
E1 220	E1	220-227	ILHTPGCV	28)
E1 257	E1	257-266	QLRRHIDLLV	29)
E1 363	E1	363-371	SMVGNWAKV	28)
E2 686	E2	686-694	ALSTGLIHL	27)
E2 726	E2	726-734	LLFLLLADA	30)
E2 728	E2	728-736	FLLLADARV	30)
NS3 1073	NS3	1073-1081	CINGVCWTV	31)
NS3 1131	NS3	1131-1139	YLVTRHADV	30)
NS3 1169	NS3	1169-1177	LLCPAGHAV	31)
NS3 1406	NS3	1406-1415	YLVAYQATV	31)
NS3 1585	NS3	1585-1593	YLVAYQATV	32)
NS4 1666	NS4	1666-1674	VLVGGVLAA	30)
NS4 1671	NS4	1671-1680	VLAALAAYCL	32)
NS4 1769	NS4	1769-1777	HMWNFISGI	30)
NS4 1789	NS4	1789-1797	SLMAFTAAV	31)
NS4 1807	NS4	1807-1816	LLFNILGGWV	27)
NS4 1851	NS4	1851-1859	ILAGYGAGV	27)
NS4 1920	NS4	1920-1928	WMNRLIAFA	30)
NS5 1992	NS5A	1992-2000	VLSDFKTWL	33)
NS5 2145	NS5A	2145-2154	LLREEVSFRV	33)
NS5 2252	NS5A	2252-2260	ILDSFDPLV	31)

4. Multiepitope Minigene (N8E)の作製

それぞれ 20 塩基ずつオーバーラップした 90-100 塩基からなる Long oligo nucleotide を使い、コンピューターで予測した 8 個の SARS ヌクレオカプシド由来エピトープをコードする N8E を PCR にて作製した。作製模式図を Fig. 7 に示した。作製した N8E は、pCR II ベクター(Invitrogen Life Technologies 社、Rockville、MD)に挿入し(pCR2-N8E)、その遺伝子配列をオートシーケンサー(CEQ8000: Beckman Coulter 社、Fullerton、Ca.)を用いて確認した。

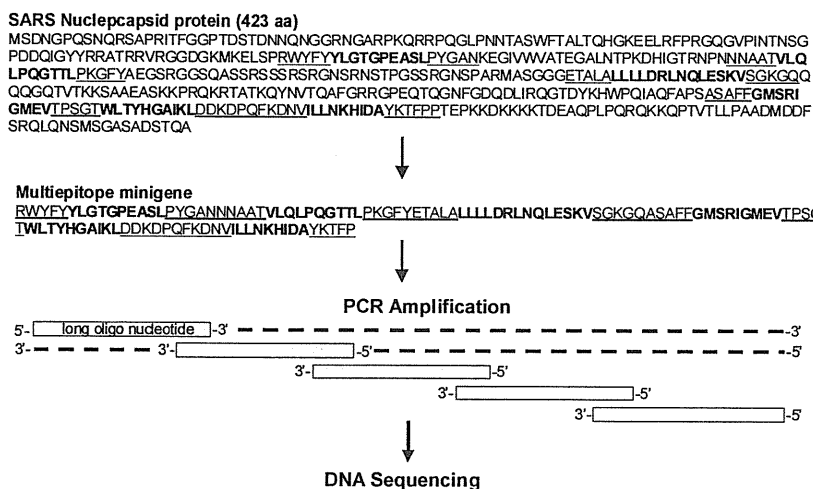


Fig. 7 Construction of a multipitope minigene encoding eight predicted epitopes derived from SARS-CoV nucleocapsid

Amino-acid sequences of predicted epitopes are indicated by boldface, and amino-acid sequences of flanking regions are underlined.

5. HCV タンパク質を発現する組み換えウイルスと IL-12 発現プラスミド

HCV の Core、E1、E2 タンパク質を発現する組み換えアデノウイルス、Ad-Core-E2 (Adex1SR3ST)および NS3、NS4、NS5A タンパク質を発現する組み換えアデノウイルス、Ad-NS3-5A (Adex1CA3269)を用いた³⁴⁾。コントロールとして、wild type の組み換えアデノウイルス、Ad-wt (Adex1W)も用いた。Adex1SR3ST、Adex1CA3269、Adex1W は国立感染症研究所・宮村 達男博士より供与された。IL-12 を発現分泌するプラスミド、p3XFLAG-IL-12³⁴⁾ は、東京医科大学・善本 隆之博士より供与された。

6. Multipitope Minigene を発現する組み換えアデノウイルス(AdV)の作製

pCR II -N8E を Not I (TOYOBO 社、Tokyo、Japan)と EcoR I (TOYOBO 社)で切断して、N8E 遺伝子を抽出した。その後、N8E 遺伝子を検出マーカーの

FLAG タンパク質を発現する遺伝子を持つ p3XFLAG-CMV-10 (p3XFLAG) (Sigma-Aldrich社)発現ベクターに Ligation high (TOYOBO社)を用いて挿入した(p3XFLAG-N8E)。作製した p3XFLAG-N8E から、PCRにより、FLAG タンパク質および N8E (3XFLAG-N8E)遺伝子を増幅した。増幅後、先ほどと同様に pCR II ベクターに挿入し(pCR II -3XFLAG-N8E)、遺伝子の配列を確認した。pCR II -3XFLAG-N8E を BamH I (TOYOBO社)と EcoR I (TOYOBO社)で切断し、3XFLAG-N8E を抽出後、Adenovirus Expression Vector Kit Dual Version (TAKARA、Tokyo、Japan)に従って AdV-SARS-N8E を作製した。作製の概略としては、DNA Blunting Kit (TAKARA)を用いて 3xFLAG-N8E 遺伝子末端を平滑化し、複製欠損株 AdV ゲノムを含むコスミドベクター(pAxCAwtit)に挿入した(pAxCAwtit-N8E) (Fig. 8-1)。pAxCAwtit-N8E は Gigapack III XL Packaging Extract (Stratagene社 Europe、Amsterdam、The Netherlands) を使用してラムダファージに組み込み、大腸菌に感染させた。その後、アンピシリン寒天プレートを用いて、アンピシリン耐性菌株を選び、それから pAxCAwtit-N8E 遺伝子を少量精製した。組み込まれた N8E 遺伝子の方向を確認したのち、pAxCAwtit-N8E 遺伝子を大量精製し、293 細胞にトランスフェクションし、AdV-SARS-N8E を作製した(Fig. 8-2)。作製した AdV-SARS-N8E は AdV ゲノム内の複製領域である E1 領域を欠損しているため、通常の細胞での感染では、挿入遺伝子のタンパク発現はおこるが、ウイルスは複製増殖できない。しかし、E1 領域を発現する 293 細胞では増殖可能である。

7. Multi-epitope Minigene を発現する組み換えワクシニアウイルス(VV)の作製

組換え AdV の作製過程と同様に p3xFLAG-N8E を抽出し、VV 用 pNZ68K2 ベクターに挿入した(pNZ68K2-N8E)。pNZ68K2-N8E はチミジンキナーゼ(TK)

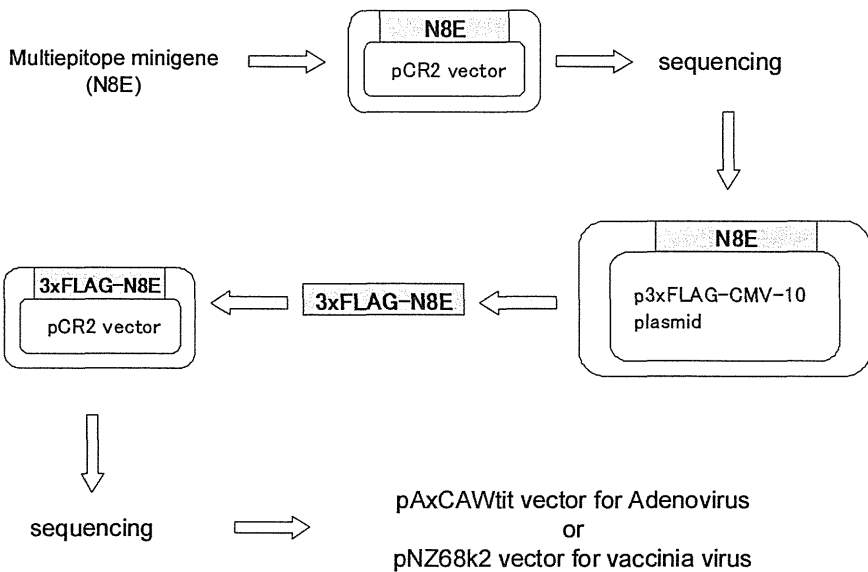


Fig. 8-1 Cloning of multiepitope minigene (N8E) into a cosmid vector for adenovirus and a plasmid vector for vaccinia virus

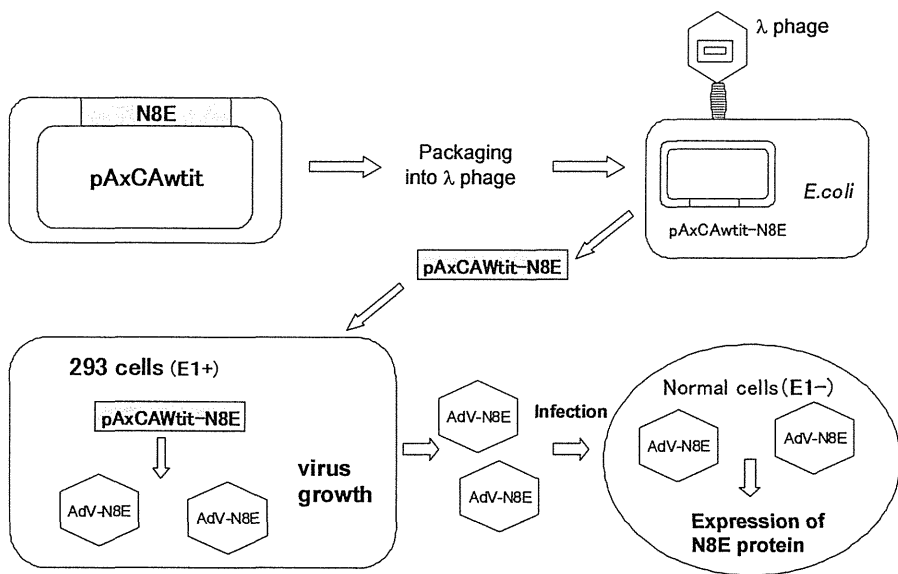


Fig. 8-2 Generation of AdV-SARS-N8E

遺伝子を欠損した状態となっている。そこで、C143 細胞を用いて、TK 遺伝子を有する野性型 VV (VV-WT)と相同組み換えをおこない、プロモデオキシウリジン(BrdU)で選別し、VV-SARS-N8E を作製した。BrdU は TK 遺伝子によりリン酸化されウイルスゲノムに取り込まれるが、これはウイルスにとって毒性であるため、VV-WT は増殖できない。しかし、相同組み換えにより作製された TK 遺伝子欠損 VV-N8E は C143 細胞内で増殖できる(Fig. 9)。

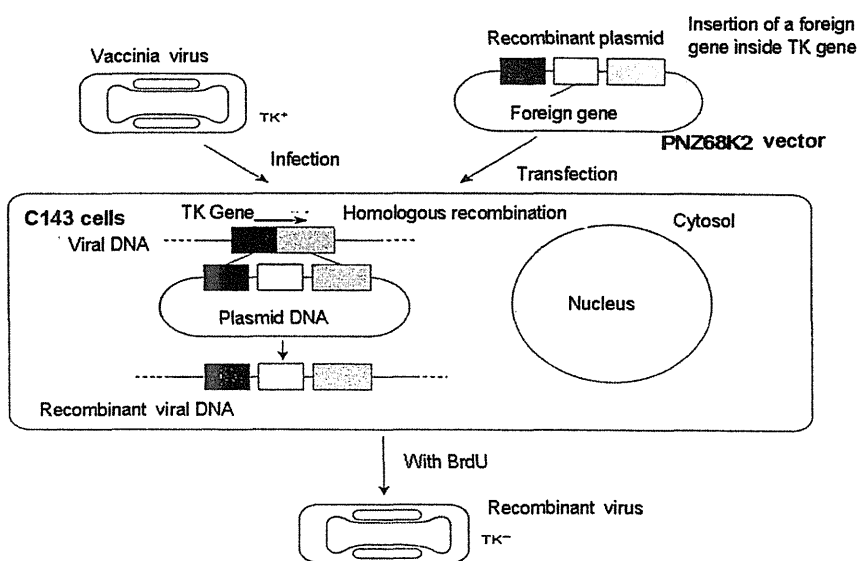


Fig. 9 Generation of VV-SARS-N8E

8. リポソーム

本研究では、Dioleoyl phosphatidyl choline (DOPC)、Dioleoyl phosphatidyl ethanolamine (DOPE)、Dioleoyl phosphatidyl glycerol (DOPG)、Cholesterol が 4:3:2:7 のモル比からなるリポソームを使用した³⁵⁾。また、本研究では、ペプチドをリポソーム表面に結合させたリポソームを使用した。ペプチドの結合には Disuccinimidyl suberate (DSS)を用いた³⁶⁾。ペプチドとリポソームの結合模

式図を Fig. 10 に示す。リポソームは国立感染症研究所・内田 哲也博士に作製を依頼した。

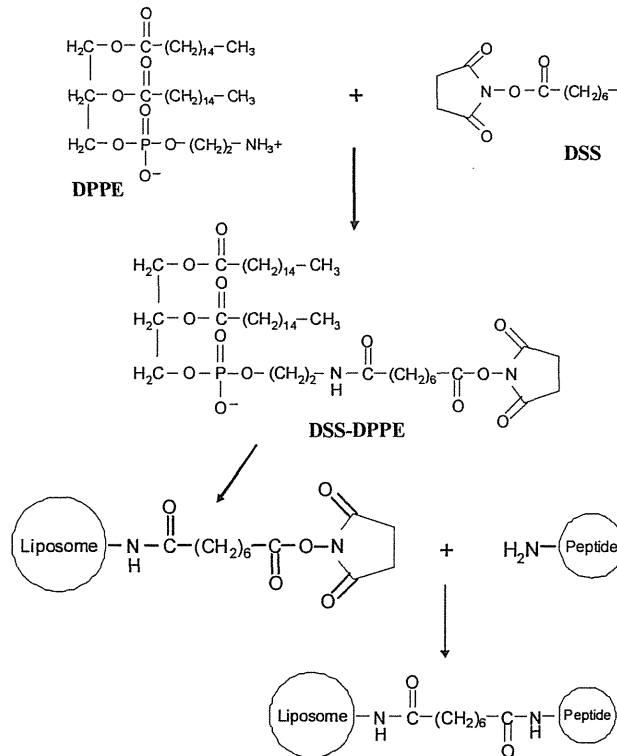


Fig. 10 Coupling of a peptide with liposome via DSS

9. Peptide binding assay ¹²⁾

T2細胞を phosphate-buffered saline (PBS)で2回洗浄し、無血清培地(AIM V) (Invitrogen 社) で $6.3 \times 10^5/\text{mL}$ となるように再懸濁した。各々のペプチドは、最終濃度が 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μM となるように AIM V 培地で希釈した。次に、96 well U plate の各ウェルに、 1×10^5 個の T2 細胞を分注し、さまざまな濃度のペプチド、およびヒト $\beta 2\text{m}$ (Sigma-Aldrich 社) を最終濃度 1 μM

になるように加え、37°Cの CO₂ incubator で overnight インキュベートした。細胞を遠心分離し、HLA-A*0201 特異的モノクローナル抗体(BB7.2)³⁷⁾ と反応させ、ついで、Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated sheep anti-mouse IgG 抗体(Sigma-Aldrich 社)で再び反応させた。その後、フローサイトメトリー (FACScan: BD Bioscience Immunocytometry Systems 社、Mountain View、CA)で、染色された細胞表面上の HLA-A*0201 分子の発現量を測定した。測定値は the half-maximum binding level (BL50) 値にて評価した。BL50 値は、ペプチド NS3 1585-93 をコントロールとして用いた binding assay の最大値の 50% (half-maximum) を示す各々のペプチドの濃度と定義した。

10. Complex stability assay¹²⁾

T2 細胞を PBS で 2 回洗浄し、AIM V 培地で 1 x 10⁶ cells/mL となるように再懸濁した。これに、最終濃度 100 μM になるようにペプチド、および最終濃度 1 μM になるようにヒトβ2m を加えて 15 mL チューブに入れ、37°Cの CO₂ incubator で overnight インキュベートした。遠心分離して上清を捨て、brefeldin A (BFA) (Sigma Aldrich 社)を 10 μg/ml 含む RPMI1640 +10%FCS に再懸濁し、37°Cの CO₂ incubator でさらに 45 分インキュベートした。(BFA は、ゴルジ装置の働きを抑え、細胞内部から細胞表面上に新しく MHC クラス I 分子が出てくることを防止する。) その 0 hr、0.5 hr、1 hr、3 hr、6 hr、12 hr、24 hr 後にそれぞれ 1.5×10⁵ 個の T2 細胞を取り出し、BB7.2 と FITC-conjugated sheep anti-mouse IgG 抗体と反応させた。細胞表面上の HLA-A*0201 分子複合体の発現量をフローサイトメトリーで測定した。測定値は、半減期として評価した。半減期は、それぞれの peptide の最大値の 50% (half maximum)を示す反応時間とした。

11. マウスの免疫法

2週間隔で2回、IL-12 発現 DNA プラスミド(30 μ g)をマウスに筋肉注射した。さらに 2 週間後、組み換えアデノウイルス (Adex1SR3ST、Adex1CA3269、Adex1W) を 5×10^7 plaque-forming unit (PFU) /mouse で腹腔内注射した。また、AdV-SARS-N8E、VV-SARS-N8E は 5×10^8 PFU/mouse 腹腔内に投与した。

HCV 由来ペプチドを結合させたリポソームは、単独で HHD マウスに筋注射した。また、SARS 由来ペプチドを結合させたリポソーム(25 μ L)は、B 型肝炎の Core 領域エピトープ(ヘルパーエピトープ)を結合させたリポソーム(25 μ L)および CpG (Hokkaido System Science 社、Sapporo, Japan) (5 μ L)を混ぜて、HHD マウスの footpad に免疫した。

12. CTL assay ³⁴⁾

組み換えアデノウイルス (Adex1SR3ST、Adex1CA3269、Adex1W、AdV-SARS-N8E)投与後 2~3 週間経過したマウスの脾臓細胞を調製し、10 μ M のペプチドでパルスして放射線照射(30 gray)した同系のマウス脾細胞とともに 1 週間培養した。その後、その脾細胞を CTL アッセイにおける effector 細胞とした。Target 細胞としては、 1×10^6 個の RMA-HHD 細胞に、10 μ M のペプチドを 1 時間パルスし、その後、100 μ Ci の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ で 30 分間ラベルしたものをを用いた。Effector 細胞と Target 細胞を様々な比率で 96 well U plate の各ウェルで混合し、4 時間 37 $^\circ\text{C}$ でインキュベーションし、培養上清に遊離した ^{51}Cr を測った。測定結果は次の式で計算した。

$$\% \text{ specific lysis} = \frac{(\text{cpm}_{\text{sample}} - \text{cpm}_{\text{spontaneous}})}{(\text{cpm}_{\text{maximum}} - \text{cpm}_{\text{spontaneous}})} \times 100$$

cpm は、count per minute を表し、 $\text{cpm}_{\text{spontaneous}}$ は effector のない状態での cpm を、 $\text{cpm}_{\text{maximum}}$ は target 細胞を 5% Triton X-100 で lysis したときの cpm を示

している。測定は3回以上行いその典型的な値を示した。

13. 細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺細胞数の測定(Intracellular cytokine staining : ICS) ³⁴⁾

免疫したマウスより得た脾臓細胞を、96 well U plate の各ウェルに 2×10^6 cells/well 加えて、 $1 \mu\text{L}/\text{mL}$ の BFA と $10 \mu\text{M}$ のペプチドと共に、 37°C で5時間インキュベーションした。その後、細胞表面の Fc レセプターをブロックする目的で、CD16/CD32 モノクローナル抗体 (BD biosciences Pharmingen 社, San Diego CA) を $1 \mu\text{g}/\text{well}$ となるように入れ、 4°C 、10分インキュベーションした。そして、FITC-conjugated rat anti-mouse CD8 α モノクローナル抗体 (BD biosciences Pharmingen 社)を反応させた。次に、Cytotfix/Cytoperm kit (BD biosciences Pharmingen 社) を用いて細胞を固定し、細胞の透過性を良くした。最後に細胞内の IFN- γ を Phycoerythrin (PE)-conjugated rat anti-mouse IFN- γ モノクローナル抗体 (BD biosciences Pharmingen 社) を反応させた。細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺細胞数測定にはフローサイトメトリーを用いた。

14. in vivo CTL assay ¹⁴⁾

マウスを免疫して1週間後、in vivo CTL assay を行った。 $5 \mu\text{M}$ の carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)でラベルしそれぞれのペプチドをパルスした脾細胞と、 $0.5 \mu\text{M}$ の CFSE でラベルしペプチドをパルスしない脾細胞を等量ずつ混ぜ、免疫したマウスに静脈注射した。投与12時間後、CFSEでラベルした細胞の viability をフローサイトメトリーで測定した。% killing は以下の式で計算した。

% killing = $[1 - \{(\text{number of cells in control mice (CFSE low)}) / (\text{number of cells in control mice (CFSE high)})\}] / \{(\text{number of cells in immunized mice (CFSE$

low))/(number of cells in immunized mice (CFSE high))}] x 100

15. Virus チャレンジ実験³⁸⁾

ペプチド結合リポソームを、CpG とヘルパーエпитープを結合したリポソームとともにマウス footpad に投与し、11 日後再度同様に投与した。1 回目投与の 2 週間後、VV-WT あるいは VV-SARS-N8E を 1×10^6 PFU/mouse で腹腔内に投与した。VV 投与 5 日後、マウスの両卵巣を摘出した。摘出した卵巣は、ホモジナイズし、1% FCS、1 mM MgCl₂ を含む PBS 0.5 mL に懸濁後、3 回の凍結融解を行い、ウイルス液とした。ウイルス液は $10^1 \sim 10^3$ 倍希釈して、コンフルエントとなった BS-C-1 細胞に 48 時間感染させ、0.1% クリスタルバイオレットで染色後、プラーク数を測定し、Virus titer とした。

実験結果

第 I 章 HCV 由来 CTL ドミナントエピトープの同定と ペプチド結合リポソームワクチンへの応用

1. HLA-A*0201 関連 HCV 由来ペプチドの結合アフィニティの測定

HLA-A*0201 に対する HCV 由来ペプチド 24 種類の結合アフィニティを、T2 細胞を用いて peptide binding assay¹²⁾で調べた。T2 細胞は TAP を欠くため、内在性抗原ペプチドが細胞質から小胞体内に入ることができず、ペプチドが結合した MHC クラス I 複合体が細胞表面に発現されない。その代わりに、T2 細胞にはペプチドが結合していない、不安定な empty MHC class I 分子が細胞表面に存在する。T2 細胞に外部から合成ペプチドを加えると、ペプチドがこの empty MHC class I に結合し、安定な MHC クラス I 複合体となる。一次抗体に用いた抗 HLA-A*0201 抗体(BB7.2)は conformation sensitive で、ペプチドの結合した安定な HLA-A*0201 複合体のみを認識する。ペプチドの結合力の強いものは低濃度でも多くの HLA-A*0201 複合体を形成させるため、フローサイトメトリーで BB7.2 の認識する HLA-A*0201 複合体の量を測定すれば、HLA-A*0201 に対するペプチドの結合アフィニティがわかる。

peptide binding assay の結果を Table 3 に示す。BL50 値は、コントロールのペプチド NS3 1585 を用いた binding assay の最大値の 50% (half maximum) を示す各々のペプチドの濃度であり、より低い BL50 値を示すペプチドが、結合アフィニティの強いペプチドである。

結果より、ほとんどの peptide は比較的強い HLA-A*0201 との結合アフィニ

ティを示したが、特に HLA-A*0201 との結合アフィニティが強いペプチドは Core-132、Core-178、NS4-1666、NS4-1769、NS5-2252 であった。逆に、低い結合アフィニティを示したものは E1-257 と E2-726 であった。

Table 3 Binding affinity of HCV-derived epitopes to HLA-A*0201 molecules

Peptide	BL50 (μ M) ^{a*}	Peptide	BL50 (μ M)
Core 35	42.5 \pm 3.8	NS3 1406	76.7 \pm 15.4
Core132	27.5 \pm 3.6	NS3 1585	49.6 \pm 0.9
Core 178	23.0 \pm 2.3	NS4 1666	27.0 \pm 7.3
E1 220	166.6 \pm 34.0	NS4 1671	104.3
E1 257	416.4	NS4 1769	28.3 \pm 6.9
E1 363	130.7 \pm 26.1	NS4 1789	45.3 \pm 2.5
E2 686	156.9 \pm 7.8	NS4 1807	172.5
E2 726	607.7	NS4 1851	68.8 \pm 23.8
E2 728	204.5	NS4 1920	57.1 \pm 9.1
NS3 1073	66.9 \pm 17.0	NS5 1992	37.8 \pm 2.5
NS3 1131	60.3 \pm 6.3	NS5 2145	51.2 \pm 14.3
NS3 1169	60.0	NS5 2252	19.8 \pm 6.9

Twenty-four kinds of HCV-derived peptides that had been identified as CTL epitopes were analyzed for their binding affinity to HLA-A*0201 molecules using TAP-defective T2 cell line. Peptides were serially diluted at various concentrations for the assay.

^{a*}Data are shown as BL50, indicating a concentration of each peptide that yields the half-maximal Mean fluorescence intensity (MFI) of T2 cells pulsed with NS3 1585 as a control peptide.

2. HLA-A*0201 関連 HCV 由来ペプチドの結合安定性の測定

Peptide binding assay で高い結合アフィニティを示した 16 種類のペプチドを選んで、ペプチドと MHC クラス I との結合安定性を、T2 細胞を用いた complex stability assay ¹²⁾ で検討した。ペプチドの MHC クラス I 分子への結

結合安定性が高ければ、細胞表面上に提示されている抗原の濃度が高くなり、CTLと抗原提示細胞の反応が起こりやすくなると考えられる。今回の実験では T2 細胞を用い、細胞表面上の HLA-A*0201 分子に合成ペプチドを結合させ、経時的に HLA-A*0201 複合体の量を測定した。ペプチドの結合安定性が高ければ高いほど、時間が経っても細胞表面上により多くの HLA-A*0201 複合体の存在が確認できることになる。

Table 4 Stability of HLA-A*0201 molecules combined with HCV-derived peptides

Peptide	Stability	Peptide	Stability
core 35	> 24 hr	NS4 1666	2.9±0.3 hr
core 132	3.6±0.4 hr	NS4 1769	13.4±1.7 hr
core 178	17.7±2.7 hr	NS4 1789	> 24 hr
NS3 1073	8.1±0.5 hr	NS4 1851	4.8±1.1 hr
NS3 1131	5.5±0.5 hr	NS4 1920	2.7±0.2 hr
NS3 1169	9.7±1.8 hr	NS5 1992	10.2±0.9 hr
NS3 1406	> 24 hr	NS5 2145	2.5±0.1 hr
NS3 1585	> 24 hr	NS5 2252	11.9±3.6 hr

Sixteen peptides that showed high binding affinity in the peptide binding assay were evaluated for their half-lives (hours) as peptide-class I complexes at 37°C by complex stability assay using T2 cells.

Table 4 に示されるように、Core-35、NS3-1406、NS3-1585、NS4-1789 の 4 種類のペプチドで半減期が 24 時間以上の高い値を示した。一方、NS4-1666、NS4-1920、NS5-2145 の 3 種のペプチドでそれぞれ 2.9、2.7、2.5 時間と低い値を示した。しかし、結合安定性と結合アフィニティ間で相関性が低いことが分かった。

3. HCV 由来エピトープ特異的 CTL 活性の測定

^{51}Cr リリース法を用いた CTL アッセイによって、各々のペプチドが誘導する CTL の killing 活性を調べた。

HHD マウスに HCV の Core、E1、E2 タンパク質を発現する組み換えアデノウイルス Adex1SR3ST あるいは、HCV の NS3、NS4、NS5A を発現する Adex1CA3269 を腹腔内に投与した。2 週間後、脾細胞を調製しそれぞれのペプチドで刺激した。1 週間後、それらの脾細胞に Target 細胞である ^{51}Cr でラベルした RMA-HHD 細胞を、様々な Effector: Target Ratio (E:T Ratio) で混合し、おのおののペプチドを加えて CTL assay を行った(Fig. 11)。その結果、Core-132、E1-257、E1-363、E2-686、E2-726、NS3-1406、NS3-1585、NS4-1666、NS4-1671、NS4-1769、NS4-1789、NS4-1807、NS4-1920 の 13 種類のペプチドで高い CTL 活性が得られた。このうち 11 種類は高い結合アフィニティを示し相関性が得られた(Table 3)。しかし、E1-257 と E2-726 は低い結合アフィニティであるにもかかわらず、高い CTL 活性を示した(Table 3)。一方で、Core-35、E1-220、E2-728、NS3-1131、NS5-2145 の 5 種類のペプチドは低い CTL 活性を示したが、このうち、E2-728 を除く 4 種類では、高ないしは 中程度の結合アフィニティを示した(Table 3)。これらのことより、エピトープと MHC クラス I の結合アフィニティは、CTL エピトープの免疫原性を調べるうえで重要だが、それだけの結果では免疫原性を判断できないことが示唆された。

4. HCV 由来エピトープ特異的細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 細胞の測定

HCV 由来ペプチドの免疫原性を調べるために、ペプチド刺激によって活性化

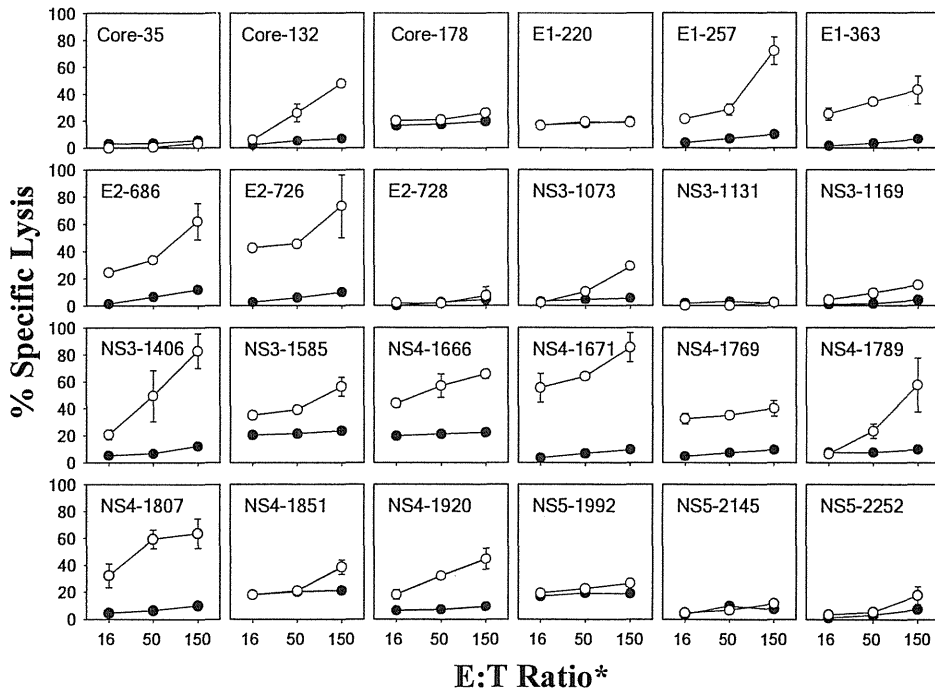


Fig. 11 CTL activities specific for 24 HCV-derived peptides.

Mice were injected with p3XFLAG-IL-12, and then immunized *i.p.* with 5×10^7 PFU of either Adex1SR3ST or Adex1CA3269. At 2-3 weeks after the immunization, spleen cells of Adex1SR3ST-immunized mice and Adex1CA3269-immunized mice were prepared and stimulated *in vitro* for 1 week with each peptide derived from HCV structural proteins (Core, E1 and E2), and non-structural proteins (NS3, NS4 and NS5), respectively. After 1 week, ^{51}Cr -release assays were performed at various E:T ratios with RMA-IHHD cells pulsed with (○) or without (●) a relevant peptide as targets. The data are representative of one of three independent experiments and are shown as the mean \pm SEM of triplicate wells. * Effector:Target ratio (E:T ratio)

された細胞内 IFN- γ 陽性の CD8 $^{+}$ T 細胞数をフローサイトメトリーで測定した。Adex1SR3ST、Adex1CA3269、Adex1W をそれぞれ投与したマウス脾細胞中の CD8 陽性細胞のうち、細胞内 IFN- γ 陽性細胞の割合を Table 5 に示し、細胞内 IFN- γ 産生誘導活性の高かった 2 つのペプチドに関して、フローサイトメトリーの結果を示した(Fig 12)。Core-132 (6.83 %)と E2-686 (2.36 %)の二つのペプチドで、細胞内 IFN- γ^{+} CD8 $^{+}$ T 細胞を効率よく誘導することができた。Core-132 と E2-686 は、ともに結合アフィニティが high あるいは medium の

値を示し(Table 3)、CTL 活性においても高い値を示した(Fig. 11)。また、Core-35 (0.22%)、NS3-1073 (0.11%)、NS4-1671 (0.17%)、NS4-1920 (0.31%)、NS5-1992 (0.74%)の 5 つのペプチドでも、少量ではあるが細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 細胞を誘導することが出来た。残りのペプチドでは、細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 細胞を誘導することはできなかった。

Table 5 Quantitation of IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells in response to each peptide derived from HCV

Peptide	% of IFN- γ (+) in CD8 (+) cells		Peptide	% of IFN- γ (+) in CD8 (+) cells	
	<i>Mi</i>	<i>Mc</i>		<i>Mi</i>	<i>Mc</i>
Core 35	0.22	0.00	NS3 1406	0.02	0.02
Core132	6.83	0.01	NS3 1585	0.02	0.02
Core 178	0.00	0.03	NS4 1666	0.05	0.02
E1 220	0.04	0.01	NS4 1671	0.17	0.05
E1 257	0.08	0.03	NS4 1769	0.07	0.01
E1 363	0.08	0.03	NS4 1789	0.02	0.05
E2 686	2.36	0.02	NS4 1807	0.08	0.00
E2 726	0.04	0.00	NS4 1851	0.00	0.01
E2 728	0.00	0.04	NS4 1920	0.31	0.04
NS3 1073	0.11	0.02	NS5 1992	0.74	0.02
NS3 1131	0.05	0.02	NS5 2145	0.05	0.03
NS3 1169	0.00	0.09	NS5 2252	0.08	0.02

Spleen cells of mice immunized with Adex1SR3ST or Adex1CA3269 (*Mi*), or control mice injected with Adex1w (*Mc*) were stimulated *in vitro* with each peptide for 5 hours. Intracellular cytokine staining was then performed by staining for the antigen-induced intracellular IFN- γ and the cell surface CD8 molecule in spleen cells. Data indicate percentages of intracellular IFN- γ positive cells in CD8⁺ cells.

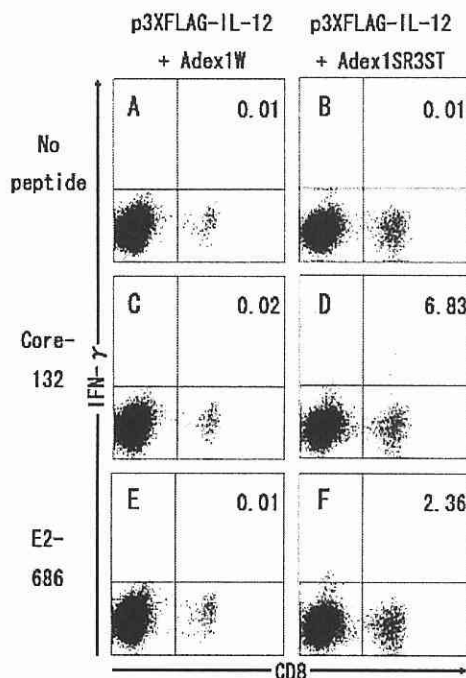


Fig. 12 Intracellular IFN- γ staining of CD8⁺ T cells in response to HCV-derived peptides

Mice were injected with p3XFLAG-IL-12 and immunized *i.p.* with 5×10^7 PFU of either Adex1w (A, C and E) or Adex1SR3ST (B, D and F). One week later, spleen cells were prepared and cultured with or without (A and B) either Core-132 (C and D) or E2-686 (E and F) for 5 hours. After stimulation, cells were stained for their surface expression of CD8 (x axis) and intracellular IFN- γ (y axis). The values shown indicate the percentages of CD8⁺ cells that are positive for intracellular IFN- γ .

5、HCV由来ペプチドの type 分類

これまでの実験のまとめとして、peptide binding assay (Table 3)、CTL assay (Fig. 11)、ICS (Table 5 and Fig. 12)の実験結果をもとに、24種類のペプチドを6種類のtypeに分類し(Table 6)、どれがドミナントエピトープに相当するかを検討した。complex stability assay に関しては、他の assay との相関が見られなかったため、今回の判定基準から除外した。タイプの分類は次に示す条件で行った。

Type I : 結合アフィニティ、CTL 活性、ICS の三つの実験においてよい反応が得られ、ワクチンの成分として望ましいペプチド。

Type II : 3つのアッセイのうち、ICS のみが Low を示したペプチド。

Type III : 結合アフィニティの値が低く結合力が弱い、CTL を強く活性化させるペプチド。

Type IV : 結合アフィニティ・ICS の反応はよいが、CTL 活性が低いペプチド。

Type V : 結合アフィニティの値のみが高いペプチド。

Type VI : 結合アフィニティ、CTL 活性、ICS のすべての値が低く、抗原性の低いペプチド。

Type I に分類された Core-132、NS4-1920、NS3-1073、NS4-1671、E2-686 の 5 つのペプチドを、本研究で求めていた『ドミナントエピトープ』と判断した。また、Type II、Type III に分類された 10 個のペプチドは高い CTL 活性化能があることが分かった。Type IV に分類された 2 つのペプチドに関しては、反応の得られづらい ICS において高値を示したことより、効率よく CTL を誘導できるエピトープと言える。

Table 6 Classification of HCV-derived, twenty-four CTL epitopes based on the current data

Type I antigens^a

<i>Peptide</i>	<i>Affinity^b</i> (<i>high/medium</i>)	<i>Lysis^c</i> (<i>high/medium</i>)	<i>ICS^d</i> (<i>high/medium</i>)	<i>Stability^e</i>
Core-132	27.5	40.7	6.81	3.6
NS4-1920	57.1	35.3	0.29	2.7
NS3-1073	66.9	23.6	0.1	8.1
NS4-1671	104.3	75.6	0.16	NT
E2-686	156.9	50.1	2.35	NT

Type II antigens

<i>Peptide</i>	<i>Affinity</i> (<i>high/medium</i>)	<i>Lysis</i> (<i>high/medium</i>)	<i>ICS</i> (<i>low/ND</i>)	<i>Stability</i>
NS4-1666	27.0	51.2	0.05	2.9
NS4-1769	28.3	30.7	0.03	13.4
NS4-1789	45.3	47.6	ND	24<
NS3-1585	49.6	38.6	0.02	24<
NS4-1851	68.8	20.5	ND	4.8
NS3-1406	76.7	70.6	ND	24<
E1-363	130.7	36.6	0.06	NT
NS4-1807	172.5	53.6	0.06	NT

Type III antigens

<i>Peptide</i>	<i>Affinity</i> (<i>low</i>)	<i>Lysis</i> (<i>high</i>)	<i>ICS</i> (<i>low/ND</i>)	<i>Stability</i>
E1-257	416.4	62.1	0.05	NT
E2-726	607.7	63.3	ND	NT

Table 6 (Continued)

Type IV antigens

<i>Peptide</i>	<i>Affinity</i> (<i>high</i>)	<i>Lysis</i> (<i>low/ND</i>)	<i>ICS</i> (<i>medium</i>)	<i>Stability</i>
NS5-1992	37.8	8.9	0.71	10.2
Core-35	42.5	ND	0.22	24<

Type V antigens

<i>Peptide</i>	<i>Affinity</i> (<i>high/medium</i>)	<i>Lysis</i> (<i>low/ND</i>)	<i>ICS</i> (<i>low/ND</i>)	<i>Stability</i>
NS5-2252	19.8	10.3	0.06	11.9
Core-178	23.0	7.5	ND	17.7
NS5-2145	51.2	ND	ND	2.5
NS3-1169	60.0	11.2	ND	9.7
NS3-1131	60.3	ND	0.02	5.5
E1-220	166.6	ND	0.02	NT

Type VI antigen

<i>Peptide</i>	<i>Affinity</i> (<i>low</i>)	<i>Lysis</i> (<i>ND</i>)	<i>ICS</i> (<i>ND</i>)	<i>Stability</i>
E2-728	204.5	ND	ND	NT

^aType I: High or Medium in the affinity, High or Medium in the lysis, and High or Medium in the ICS; Type II: High or Medium in the affinity, High or Medium in the lysis, and Low in the ICS; Type III: Low in the affinity, and High in the lysis; Type IV: High in the affinity, Low in the lysis, and Medium in the ICS; Type V: High or Medium in the affinity, Low in the Lysis, and Low in the ICS; Type VI: Low in the affinity, the lysis, and ICS

^bBL50 in peptide binding assays. High, less than 100 μ M; Medium, 100-200 μ M; Low, more than 200 μ M.

^cPercentage of specific lysis of target cells pulsed with each peptide minus percentage of specific lysis of target cells pulsed with no peptide at an E:T ratio of 150 in CTL assays. High, more than 30%; Medium, 10-30%; Low, less than 10%.

^dPercentage of intracellular IFN- γ positive cells in CD8⁺ T cells in mice immunized with Adex1SR3ST or Adex1CA3269 minus that in control mice injected with Adex1w. High, more than 1.0%; Medium, 0.1-1.0%; Low, less than 0.1%.

^eData of complex stability assays. Very High, more than 24 h; High, 10-24 h; Medium, 5-10 h; Low, less than 5 h; NT, not tested. ; ND, not detected.

6、ペプチド結合リポソームによる HCV 特異的 CTL の誘導

24個のHCV由来ペプチドのうちType Iに分類された2つのペプチドを含む、細胞内IFN- γ ⁺ CD8⁺ T細胞を多く誘導した3個のペプチド(Core-132、E2-686、NS5-1992)を選び出し、それをリポソーム表面上に結合させた。そして、ペプチド結合リポソームをマウスに投与し、HCV特異的なCTLの誘導を試みた。ペプチド結合リポソームをマウスに筋肉内投与し、2週間後⁵¹Cr release assayでCTLの細胞傷害活性を測定した。その結果、3つのペプチド結合リポソームを投与して行ったCTL assayの結果は、E:T ratioが150のときに26.5% (Core-132)、16.4% (E2-686)、13.9% (NS5-1992)と有意に細胞傷害活性を示した(Fig. 13)。

以上のように、既知のHCVエピトープの中からドミナントエピトープを探し出し、それをリポソームに結合してマウスに投与することによりHCV特異的CTLの誘導に成功した。

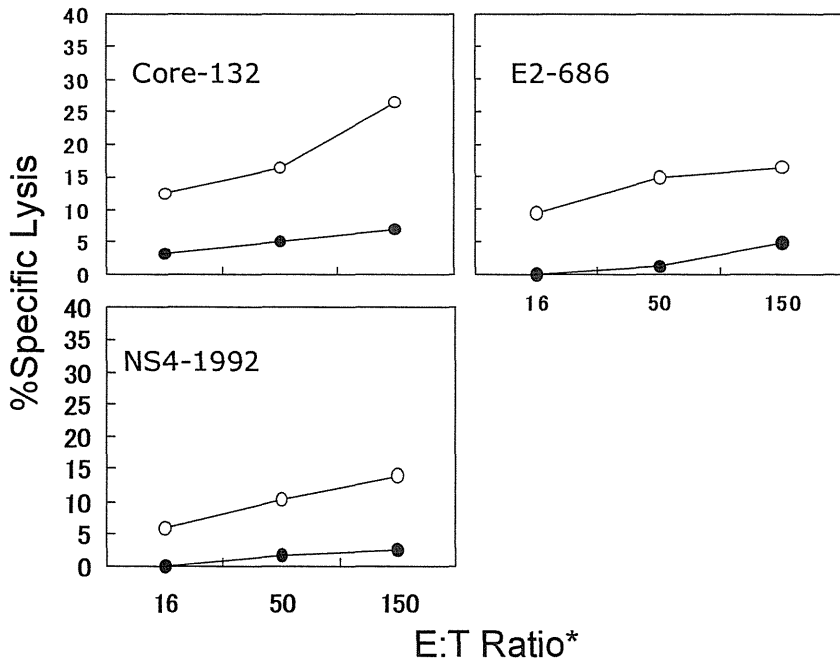


Fig. 13 CTL activities in spleen cells of mice immunized with liposomes coupled with HCV-derived peptides

Mice were immunized intramuscularly with liposomes coupled with HCV-derived peptides. Two to three weeks later, spleen cells of the mice were prepared and stimulated *in vitro* with each peptide. After one week, ^{51}Cr -release assays were performed at various E:T ratios with RMA-HHD cells pulsed with (○) or without (●) a relevant peptide as targets. * Effector:Target ratio (E:T ratio)

第II章 SARS-CoV 特異的 CTL に対するエピトープの決定と ペプチド結合リポソームによる CTL の誘導

1. コンピューターによる SARS-CoV 由来 CTL エピトープの予測

SARS-CoV については CTL エピトープがわずかしか同定されていない。そのため、HCV のように既知のエピトープの中からドミナントエピトープを探し出すということができない。そこで著者は、SARS ウイルスのヌクレオカプシド領域のアミノ酸配列において、9-10 個のアミノ酸からなる CTL エピトープを 2 種類のコンピュータープログラム(BIMAS & SYFPEITHI software)で予測した。そして、エピトープの可能性の高いものを 8 種類選び(Table 7)それに相当するペプチドを合成した。

予測したエピトープが実際に HLA-A*0201 と結合することを確かめるため、T2 細胞を用いて peptide binding assay を行った(Table 7)。予測した 8 種類のエピトープのうち N-113、N-222、N-223、N-317、N-331 で高い結合アフィニティ(BL 50 が 100 μ M 以下)が得られた。このことから、エピトープの予測が適切であることが分かった。

2. 予測したエピトープをコードする遺伝子(multiepitope minigene)の作製

著者は HCV と同様に SARS-CoV も、組み換えウイルスを使ってエピトープの同定を試みた。しかし、SARS-CoV は HCV とは違い、すでにできた組み換えウイルスはなく、自分で作製する必要があった。また、ウイルスに組み込む SARS-CoV の遺伝子や、SARS-CoV 自体の入手も困難であった。そこで、ヌク

Table 7 Prediction of SARS-CoV nucleocapsid derived CTL epitopes on computer softwares and binding affinities of their peptides to HLA-A*0201 molecules

Name	Position	Sequence	SYFPEITHI ^a	BIMAS ^b	BL50(μ M) ^c
N-113	113-122	YLGTGPEASL	98.3	26	25.7 \pm 11.2
N-159	159-168	VLQLPQGTTL	309.1	29	235.3 \pm 68.7
N-222	222-231	LLLLDRLNQL	69.6	24	52.6 \pm 10.5
N-223	223-231	LLLDRLNQL	98.3	20	46.1 \pm 4.9
N-227	227-235	RLNQLESKV	36.3	23	165.1 \pm 36.6
N-317	317-325	GMSRIGMEV	1267.1	30	72.8 \pm 37.7
N-331	331-340	WLTYHGAIKL	50.2	21	90.4 \pm 39.2
N-352	352-360	ILLNKHIDA	31.2	19	140.5 \pm 44.6

^{a,b} Eight CTL epitopes derived from SARS-CoV nucleocapsid were predicted using two kinds of computer softwares, SYFPEITHI and BIMAS.

^c Predicted CTL epitopes were evaluated for their binding affinity to HLA-A*0201 molecules using T2 cells. Data are shown as BL50, indicating a concentration of each peptide that yields the half-maximal MFI of T2 cells pulsed with NS3 1585 as a control peptide.

レオカプシド由来予測エピトープのアミノ酸配列をコードする人工遺伝子 (Multiepitope Minigene) を作製し、それを組み込んだ組み換えアデノウイルス及びワクシニアウイルスを作製することを試みた。

まず、予測した 8 つのエピトープと、それぞれの N 末端、C 末端に隣接する 5 つずつのアミノ酸をコードする遺伝子 (Multiepitope Minigene) を、90~100 塩基からなる long oligonucleotides と PCR を使って作製した (Fig.14 A)。エピトープに隣接する 5 つずつのアミノ酸を加えたのは、antigen processing を考えてのことである。そしてその minigene を組み込んで、予測したエピトープを発現する組み換えアデノウイルス (AdV-SARS-N8E)、ワクシニアウイルス

(VV-SARS-N8E)を作製した。作製した組み換えウイルスタンパク質の発現は、ウイルスを293T細胞に感染させ、その細胞を溶解し、western blotにて調べた。その結果矢印で示されるように、タンパク質発現が確認できた(Fig.14 B)。

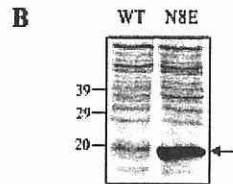
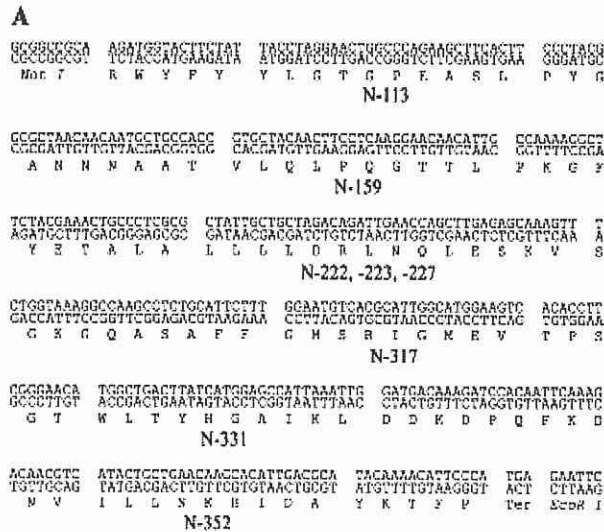


Fig. 14 (A) Nucleotide and amino acid sequences of multiepitope minigene encoding eight predicted CTL epitopes derived from SARS-CoV nucleocapsid

(B) Expression of a protein involving eight predicted CTL epitopes.

293T cells were infected with either wild-type AdV (WT) or AdV-SARS-N8E (N8E). After 2 days, cell lysates were prepared, separated on a 12% SDS-PAGE gel and subjected to Western blotting analysis using the anti-FLAG antibody.

3. AdV-SARS-N8E 投与による IFN- γ CD8⁺細胞の測定

SARS-CoV ヌクレオカプシド由来 CTL エピトープの同定のために、

AdV-SARS-N8E で HHD マウスを免疫し IFN- γ ⁺ CD8⁺ 細胞の測定を行った。AdV-SARS-N8E を 5×10^8 PFU/mouse で HHD マウスに腹腔内投与し 7 日後、マウス脾細胞を各々のペプチドで抗原刺激した。その後、FITC-抗 CD8 抗体と PE-抗 IFN- γ 抗体を反応させ、それぞれのエピトープに特異的に反応する細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺ 細胞数をフローサイトメトリーで測定した。

Fig. 15 に示されるように、予測した 8 つのエピトープの中で N-222、N-223、N-227、N317 が SARS-CoV 特異的細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺ 細胞を誘導することができた。また、N-222 で誘導できた IFN- γ ⁺ CD8⁺ 細胞数が一番少なく、N-227 で一番多い結果となった。

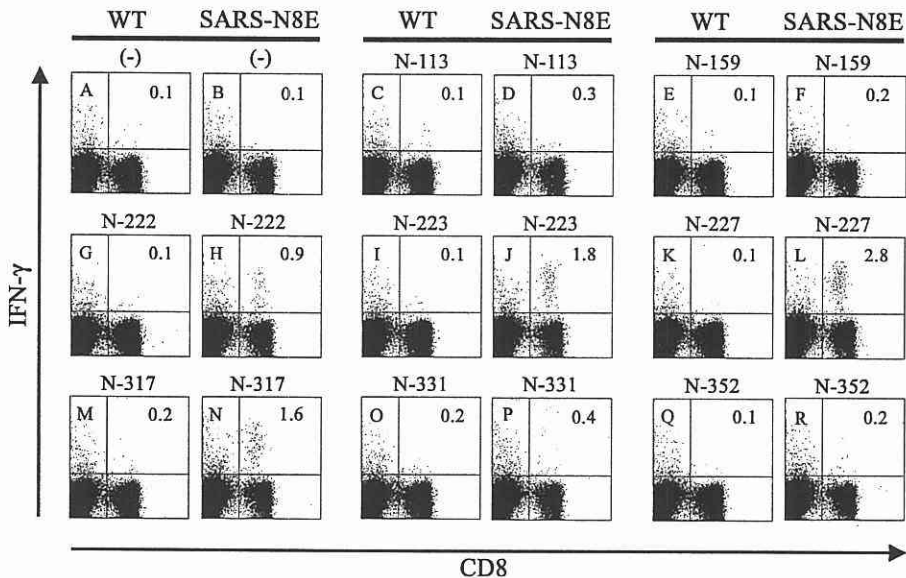


Fig. 15 Intracellular IFN- γ staining of CD8⁺ T cells in response to predicted CTL epitopes derived from SARS-CoV nucleocapsid.

Mice were immunized *i.p.* with 5×10^8 PFU of either wild-type AdV (WT) or AdV-SARS-N8E (SARS-N8E). One week later, spleen cells were prepared and stimulated with each of predicted CTL peptides including N-113, N-159, N-222, N-223, N-227, N-317, N-331 and N-352 for 5 hours. After stimulation, cells were stained for their surface expression of CD8 (x axis) and intracellular IFN- γ (y axis). The values shown indicate the percentages of CD8⁺ cells that are positive for intracellular IFN- γ .

4. AdV-SARS-N8E 投与による CTL の細胞傷害活性(^{51}Cr release assay)

AdV-SARS-N8E (5×10^8 PFU/mouse)で免疫を行った 2 週間後にマウス脾細胞を調製し、*in vitro*において SARS-CoV 由来の各々の合成ペプチドで刺激した。そして、刺激した脾細胞をエフェクター細胞とし、 ^{51}Cr でラベルした RMA-HHD 細胞をターゲット細胞として、様々な比率(E:T ratio)で混ぜて培養し、培養上清中の ^{51}Cr を測定することにより CTL 活性を測定した(Fig. 16)。N-222、N-223、N-227、N317 の刺激によって CTL の細胞傷害活性が認められた。これは、 $\text{IFN-}\gamma^+$ CD8^+ 細胞を誘導したエピトープと一致する結果となった。

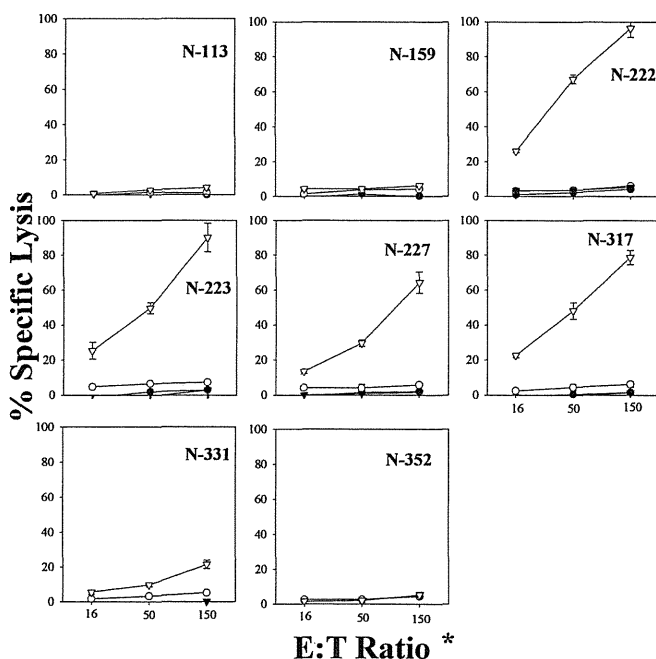


Fig. 16 *in vitro* CTL activities specific for SARS-CoV-derived epitopes in mice immunized with AdV-SARS-N8E.

Mice were immunized *i.p.* with 5×10^8 PFU of either AdV-SARS-N8E (○) or wild-type AdV (●). Two weeks later, spleen cells of the mice were prepared and stimulated *in vitro* with each of predicted CTL peptides including N-113, N-159, N-222, N-223, N-227, N-317, N-331 and N-352 for one week. ^{51}Cr -release assays were then performed at various E:T ratios with RMA-HHD cells pulsed with a relevant peptide as targets. * Effector:Target ratio (E:T ratio)

5. AdV-SARS-N8E 投与による CTL の細胞傷害活性 (in vivo CTL assay)

in vivo の実験系で CTL の細胞傷害活性を測定した。AdV-SARS-N8E を 5×10^8 PFU/mouse で HHD マウスに腹腔内投与し、1 週間後 in vivo CTL assay を行った。5 μ M の CFSE でラベルしそれぞれのペプチドでパルスした細胞と、0.5 μ M の CFSE でラベルしペプチドをパルスしていない細胞を等量ずつ混ぜ、AdV で免疫したマウスに静注した。投与 12 時間後、CFSE でラベルした細胞の数をフローサイトメトリーで測定した。予測した 8 種類のペプチドすべてで実験を行ったが、Fig. 17 には細胞傷害活性を認めたペプチドの結果のみを示した。この実験でも、ICS (Fig. 15)、 ^{51}Cr -release assay (Fig. 16)の結果と同様に N-222、N-223、N-227、N-317 で刺激した場合において細胞傷害活性が認められた。

6. AdV-SARS-N8E 投与による実験結果に基づくエピトープの選定

AdV-SARS-N8E を HHD マウスに投与して行った、ICS、 ^{51}Cr -release assay、in vivo CTL assay の 3 つの実験結果を Table 8 にまとめた。Table 8 より、4 つのペプチド(N-222、N-223、N-227、N-317)で効率よく CTL が誘導でき、高い傷害活性が認められたため、これら 4 つのペプチドをエピトープとした。そのうち、特に N-223、N-227、N-317 が強力に CTL を誘導した。

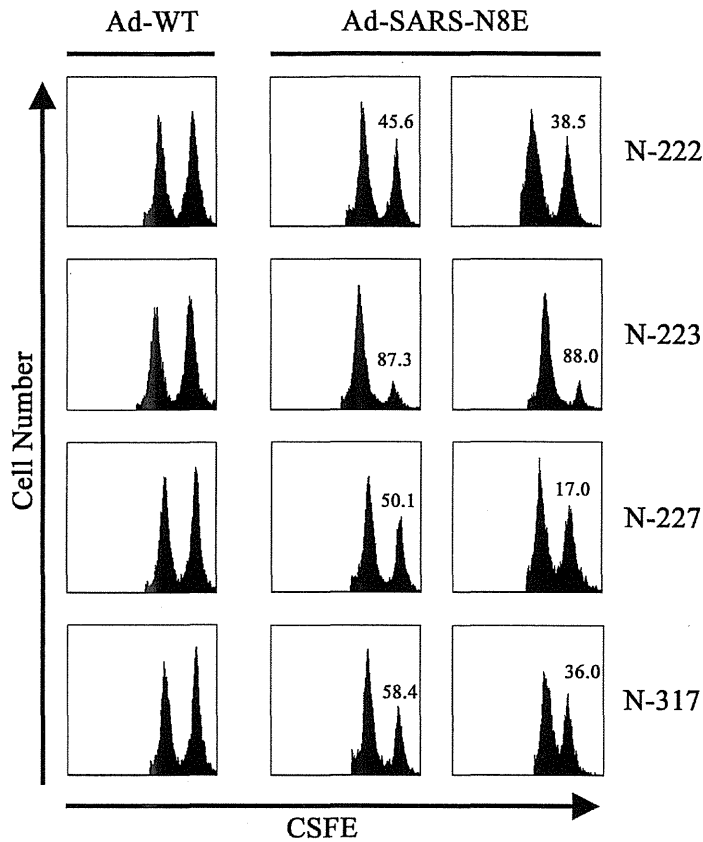


Fig. 17 *in vivo* CTL activities in mice immunized with AdV-SARS-N8E.

Mice were immunized *i.p.* with 5×10^8 PFU of either wild-type AdV (Ad-WT) or AdV-SARS-N8E. After one week, *in vivo* CTL assays were then performed. In brief, peptide (N-222, N-223, N-227 or N-317)-pulsed target cells and non-pulsed target cells were labeled with 5 μ M and 0.5 μ M of CSFE, respectively. Equal number of the two types of targets were then mixed and injected *i.v.* into the immunized mice. After 12 hours, numbers of peptide-pulsed and non-pulsed target cells in spleen cells of the immunized mice were examined by flow cytometry. Values in figures indicate % killing showing percentages of peptide-pulsed target cells with high CSFE in total numbers of peptide-pulsed and non-pulsed target cells.

Table 8 Summary of results in ICS, *in vitro* CTL assay, *in vivo* CTL assay, and peptide binding assay with mice immunized with AdV-SARS-N8E.

<i>peptide</i>	<i>ICS (%)^a</i>	<i>In vitro CTL assay (%)^b</i>	<i>In vivo CTL assay (%)</i>	<i>Affinity^c</i>
N-113	0.3	4.1	3.9	High
N-159	0.2	4.4	4.4	Medium
N-222	0.9	96.3	45.6	High
N-223	1.8	90.1	87.3	High
N-227	2.8	64.3	50.1	Medium
N-317	1.6	78.8	58.4	High
N-331	0.4	22.5	0.6	High
N-352	0.2	5.2	3.0	Medium

^a Values of percentages of intracellular IFN- γ ⁺ cells in CD8⁺ T cells.

^b Values of % specific lysis at an E:T ratio of 150.

^c Values of BL50 in peptide binding assays

7. ペプチド結合リポソーム投与による細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺ 細胞の測定

次に、AdV-SARS-N8E 投与の実験によりエピトープとして同定した 4 つのペプチド(N-222、N-223、N-227、N-317)を、リポソームに結合させた(lip-N-222、lip-N-223、lip-N-227、lip-N-317)。そして、それぞれのペプチド結合リポソームと、ヘルパーエピトープを結合させたリポソームおよび CpG を混ぜて、HHD マウスを免疫した。1 週間後、脾細胞を調製して細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 細胞の測定を行った。その結果、Fig. 18 より、lip-N-223 (Fig. 18 J)あるいは、lip-N-227 (Fig. 18 K)で免疫したとき、細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺ T 細胞を誘導することができ

た。一方、lip-N-222 と lip-N-317 で免疫したときは CTL を誘導することができなかつた。この結果は、組換えアデノウイルスで免疫を行った場合とは異なる結果であつた。

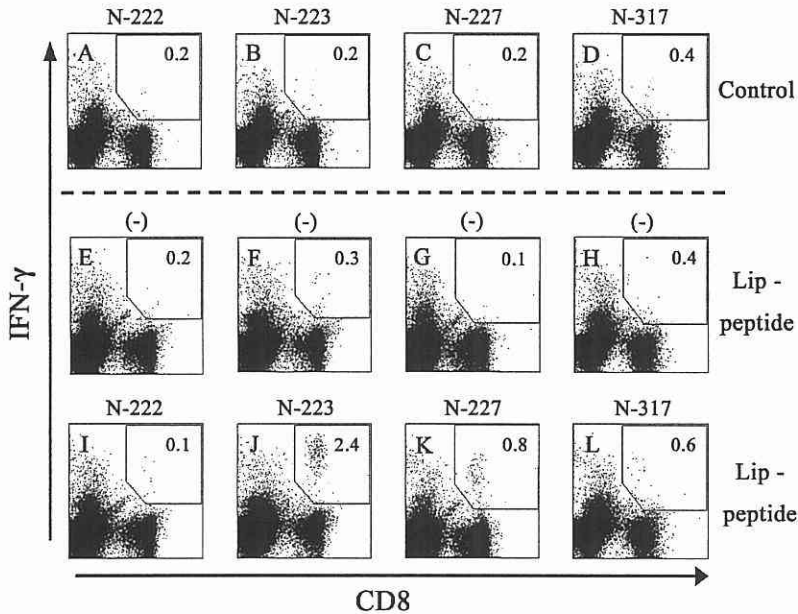


Fig. 18 Induction of IFN- γ ⁺ CD8⁺ T cells in mice by immunization with surface-linked liposomal peptides derived from SARS-CoV nucleocapsid.

Mice were immunized with each liposomal peptide derived from SARS-CoV nucleocapsid together with liposomal helper peptide and CpG. One week later, spleen cells of the mice were prepared, and stimulated with each relevant peptide (N-222, N-223, N-227, N-317) for 5 hours. Cells were then stained for their surface expression of CD8 (x axis) and intracellular IFN- γ (y axis). Values shown indicate the percentages of CD8⁺ cells that are positive for intracellular IFN- γ .

8. N-222 と N223 の Cross-reactivity

Fig. 19 に示したように、N-222 のアミノ酸配列は、N-223 のアミノ酸配列の N 末端に L(ロイシン)を付加したもので、ほかの配列はまったく同じである。従つて、N-222 に関して、アデノウイルスによる免疫とペプチド結合リポソームによる免疫で異なる ICS の結果が得られた理由は、N-222 と N-223 が交差反応

を起こしているからではないかと考えた。この仮説を証明するために、Lip-N-222 と Lip-N-223 をそれぞれ HHD マウスに免疫してその脾細胞を調

N-222 : LLLLDRLNQL

N-223 : LLLDRLNQL

Fig. 19 Amino acid sequences of N-222 and N-223 peptides.

製し、N-222 と N-223 の2つのペプチドでそれぞれ抗原刺激して、誘導される IFN- γ ⁺ CD8⁺細胞を測定した。その結果(Fig. 20)、Lip-N-223 で免疫したマウスの脾細胞では(Fig. 20 G-I)、N-222 で抗原刺激したとき 1.8 % (Fig. 20 H)でも、N-223 で刺激した場合 2.4% (Fig. 20 I)と同様に、IFN- γ ⁺ CD8⁺ 細胞を誘導することがわかった。従って、Lip-N-223 によって誘導された N-223 特異的 CTL が、cross-reactive に N-222 を認識したと考えた。一方、Lip-N-222 でマウスを免疫した場合は(Fig. 20 D-F)、N-222 (Fig. 20E)および N-223 (Fig. 20 F)共に、IFN- γ ⁺ CD8⁺ 細胞を誘導することができなかった。以上から、N-222 はエピトープではないと結論した。すなわち、組み換えアデノウイルスで免疫した場合、抗原提示された、真のエピトープである N-223 によって誘導された N-223 特異的 CTL が N-222 を認識(cross-reactivity)したため、ICS で矛盾した結果が現れたと思われる。

9. Lip-N-223 投与によるウイルス排除

最も効率よく CTL を誘導したペプチド結合リポソーム、lip-N-223 で HHD マウスを免疫して2週間後に、ヌクレオカプシドの Multiepitope Minigene を組み込んだワクシニアウイルスを注射して、5日後にマウスに存在するウイルス

量を測定した(Fig. 21)。3 回行った実験のうち 2 回で、ウイルスが完全に排除され、また残る 1 回でもコントロールに比べて有意にウイルス量が減少しており、Lip-N223 による免疫が有効で十分な SARS-CoV 特異的 CTL を誘導しウイルスを排除したと考えられる。

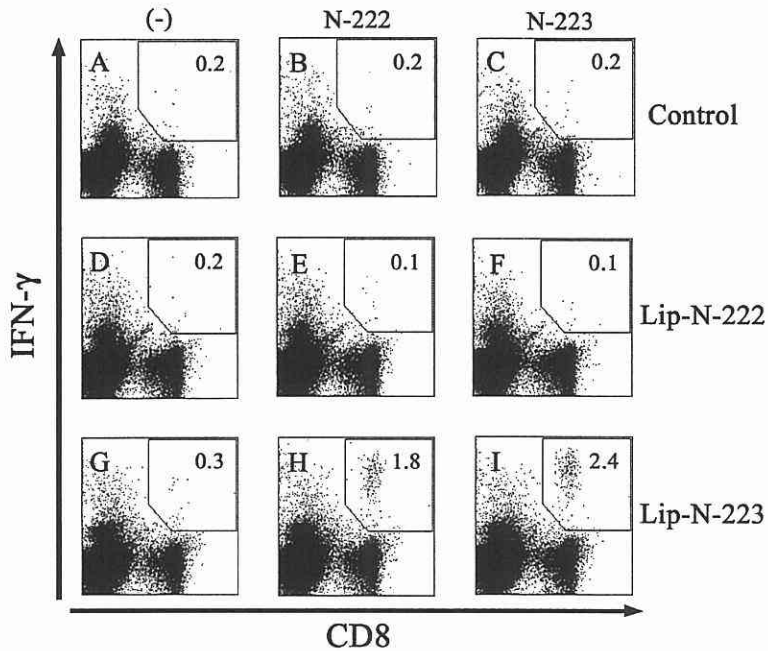


Fig. 20 Spleen cells of mice immunized with surface-linked liposomal N-223 peptide recognize N-222 peptide as well as N-223 peptide.

Mice were immunized with either liposomal N-222 (Lip-222) or liposomal N-223 (Lip-223) along with liposomal helper peptide and CpG. One week later, spleen cells of mice were stimulated with either N-222 or N-223 peptide, and stained for their surface expression of CD8 (x axis) and intracellular IFN- γ (y axis). Values shown indicate the percentages of CD8⁺ cells that are positive for intracellular IFN- γ .

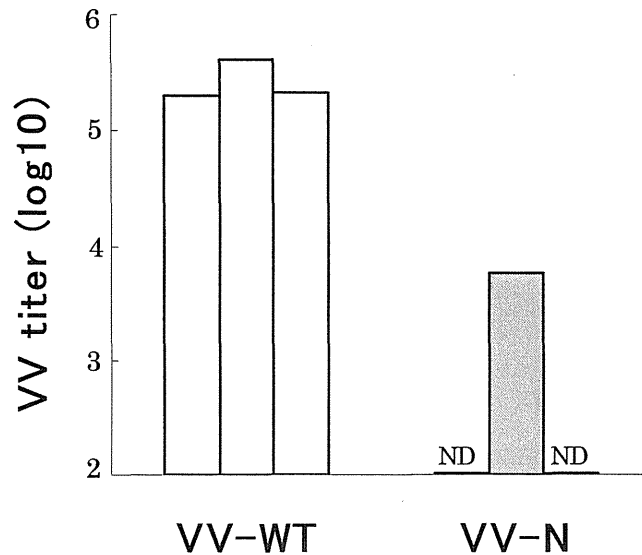


Fig. 21 Resistance to infection with vaccinia virus expressing N-223 peptide in mice immunized with liposomal N-223 peptide.

Mice were immunized twice with liposomal N-223 peptide along with liposomal helper peptide and CpG. Two weeks after the last immunization, mice were challenged with 1×10^6 PFU of either wild-type vaccinia virus (VV-WT) or vaccinia virus expressing predicted CTL epitopes derived from SARS-CoV nucleocapsid (VV-N) including N-223. Mice were then sacrificed 5 days after challenge, and viral titers in ovaries were measured by standard plaque assays. All titrations were performed in duplicates, and PFU per mouse is shown in the figure. ND: not detected

考察

ウイルス感染症に対して、今まで種々のワクチンが開発され、感染防御に大きく貢献した。典型的な成功例として、天然痘があげられる。天然痘は、天然痘ウイルスによっておこる感染症で、死亡率が極めて高い。1798年にエドワード・ジェンナーが天然痘ワクチン(種痘法)を開発し、それ以降、急速に病気を抑えられるようになった。それを基に、WHO は天然痘根絶計画を実施したが、1977年に最後の患者がソマリアで発生して以来、地球上で全く感染者がみられなくなった。そして、3年を経過した1980年に、WHO は根絶宣言をだした。この根絶計画が成功した理由は、1) ヒト以外の宿主がないこと、2) 持続感染がみられないこと、3) ウイルスの変異が少ないこと、4) 免疫が生涯続くこと、などが挙げられる。しかしながら、HIV 感染症やウイルス性肝炎などの、難治性の慢性持続性ウイルス感染症や、SARS やトリインフルエンザに代表されるような新興感染症は、これらの条件を満たしていないため、従来のワクチン法では効力がなく、新規ワクチンの開発が世界的に望まれている。特にウイルス変異に関しては、抗体産生を主体とするワクチンだけでは太刀打ちできず、より変異に強い CTL を誘導するワクチンに注目が集まっている。

本研究では、HCV と SARS-CoV の2種のウイルスに注目し、CTL 誘導型のペプチド結合リポソームを応用したワクチンの創製を最終目標として実験を行った。CTL は、短いペプチドが APC により抗原提示されることで誘導されるが、ペプチド単体を生体に投与するのでは CTL を誘導することはできない。CTL を誘導するには、なんらかのアジュバントを加える必要である。本研究で用いたリポソームは、そのアジュバント効果があることが証明されている³⁹⁾。また、エピトープであるペプチド自体は免疫原性が極めて弱いため、免疫原性が高い

エピトープであるドミナントエピトープを探して使用することが極めて重要なことである。

ドミナントエピトープの条件は、1) 活性の高い CTL (high avidity CTL) を誘導できること(質的)、および、2) そのエピトープ特異的 CTL を多数誘導できること(量的)、であると考えられる。本実験で行った、peptide binding assay と complex stability assay は、それぞれ、ペプチドが MHC クラス I 分子に結合するアフィニティ(association rate) と peptide-MHC class I complex の安定性(dissociation rate)を測定する。高いアフィニティとスタビリティは理論的に、抗原性の高いドミナントエピトープには必須の条件である。また、CTL assay では、誘導された CTL の、エピトープ特異的な killing 活性の強さを検出する。したがって、ドミナントエピトープ判定の中核となる。さらに、細胞内 IFN- γ 産生 CD8⁺ T 細胞数の測定では、エピトープ特異的に活性化されて IFN- γ を産生・分泌する CTL の数を算定できる。また、CTL から分泌される IFN- γ は、体内でのウイルス排除において重要な役割を果たすと考えられている。以上より、本実験で行った 4 つの実験(peptide binding assay、complex stability assay、CTL assay、細胞内 IFN- γ 産生 CD8⁺ T 細胞数の測定)で高い値を示すエピトープは本研究で求めているドミナントエピトープであると言える。

本研究では、既知の HCV 由来 CTL エピトープ 24 種類を、Affinity、CTL assay、ICS の実験結果より 6 つの type に分類した。24 種類のペプチドのうち I・IIIに分類された 15 個のペプチドで high あるいは medium の CTL 活性を示した。しかし、IV~VIに分類された残り 9 つのペプチドは、HCV 由来のエピトープとして公式に論文上で認められたものであるにもかかわらず、CTL 反応を誘導することができなかった。一方、高い CTL 活性誘導能を示した 15 個のペプチドのうち、I と II に分類された 13 個のペプチドで MHC クラス I とのアフ

ィニティが高いことが分かった。また、CTL 活性を示さなかったIV~VIの 9 個のペプチドのうち、IVとVに分類した 8 つは、高い結合アフィニティを示した。これらの結果より、ペプチドの免疫原性を決めるうえで、ペプチドと MHC クラス I が強く結合することは重要だが、それだけの結果で免疫原性を判断するには不十分であることが示唆された。

本実験では、結合安定性と免疫原性との相関はみられなかった。結合アフィニティの高いエピトープのみを調べたので、低い値といえども、どのエピトープもある程度の安定性があるのかもしれない。24 種のエピトープのうち、高い CTL 活性を示したエピトープと、それぞれのエピトープによって誘導された細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺ 細胞の割合の結果は、必ずしも相関を示さなかった。IFN- γ を産生する HCV 特異的 CTL が、HCV のクリアランスに重要である⁴⁰⁾ ことを考えると、これら両方の結果が良い、type I のエピトープがドミナントエピトープと考えることができる。

本研究では、SARS ウイルスのヌクレオカプシド領域において、3 つのエピトープの同定に成功した。これら 3 つのエピトープは、in vivo/vitro CTL assay で高い活性を示し、細胞内 IFN- γ ⁺ CD8⁺ 細胞誘導活性も高かった。また、MHC クラス I との結合アフィニティも高くドミナントエピトープであると考えられる。しかし、ワクチンとして効率良く免疫するには、より多くのエピトープで免疫しなくてはならず、ヌクレオカプシドとは別の SARS-CoV タンパク質領域においてさらなる SARS-CoV 由来エピトープの同定が必要であると考えている。

一般に、ウイルスの CTL エピトープを同定するには、ウイルス感染患者の末梢血リンパ球とその対象となるウイルスが必要である。しかし、SARS の場合、ウイルス感染患者血液や SARS-CoV の入手が不可能であった。また、SARS-CoV はもちろん、ウイルス由来 DNA ですら、Biosafety Level (BSL) 3 という安全

性の高い施設で実験を行わなければならない。そこで、本研究では、SARS-CoVのエピトープ同定において、Multiepitope Minigene を発現する組み換えアデノウイルスとヒトの MHC である HLA-A*0201 を発現する反応性の高い HHD マウスを使用した。すなわち、このウイルスを感染させた HHD マウスのリンパ球を、感染患者の末梢血リンパ球の代替として用いた。これにより、本来 BSL 3 で行わなくてはならない実験も、BSL 2 の施設で実験を行うことができるようになった。本研究では、この組み換えウイルスを使用し SARS-CoV のエピトープを 3 つ同定することに成功した。このことにより、Multiepitope Minigene を発現する組み換えウイルスと HHD マウスを用いたエピトープ決定法は、新規の感染症で病原性の高いウイルスのエピトープを決定する、安全かつ有効な新しい方法と考えられる。しかし、最終的には、SARS-CoV そのものを使用して、同定したエピトープでウイルス排除が行われるのか、実験を行うべきである。

本研究で使用したペプチド結合リポソームは、安全性が高く、また IgE の産生を誘導しないという特徴を兼ね備えており、将来有望なワクチン候補である。しかし、ペプチド結合リポソームの単独投与では、弱い CTL 誘導しかみられなかった。そこで、TLR-9 のリガンドである CpG をアジュバントとして用いて、CTL の誘導に成功した。このように、有効な獲得免疫反応を誘導するには、TLR を刺激するなどの自然免疫を活性化することが大事であることがわかった。CpG が TLR-9 に認識されると、樹状細胞が活性化され、そこから産生される IL-12、IFN- γ などにより Th1 反応が誘導される。しかし、CpG は、実際の臨床では毒性の関係で使用ができず、ほかの安全な TLR リガンドを探し出す必要がある。Nagata ら¹⁴が行った、様々なアジュバント存在下でのペプチド結合リポソームの CTL 活性化能力を検討した実験では、Poly (I:C) (TLR3-リガンド)

、CpG、Flagellin の 3 つで CTL を誘導することに報告しているが、特にアジュバントとして最良の結果を示したのは CpG であった。本研究ではアジュバントとして CpG を用いさらに、Th 細胞を活性化するヘルパーエпитープ由来のペプチドを結合したリポソームを用いることにより効率よく CTL を誘導することができた。このヘルパーエピトープは、Hepatitis B virus (HBV) の Core タンパク質に存在する、マウスの MHC class II 分子である H-2K^b 拘束性のエピトープである。したがって、実際に臨床でペプチド結合ワクチンを使用する場合は、ヒトの有効なヘルパーエピトープを探す必要がある。ワクチンの投与方法についても検討を行った。腹腔内、筋注、静注、皮下注など様々な部分にリポソームを投与し、CTL の誘導能を比べた。筋肉内に投与した場合も CTL は誘導できたが、footpad 投与が最も効率よく CTL を誘導した。

今回の研究で、ペプチド結合リポソームを用いる場合、あるペプチドではエピトープであっても CTL が誘導されないことがわかった。N-317 は、アデノウイルスで抗原提示され CTL を誘導するためエピトープであるが、これを結合したリポソームは CTL を誘導できなかった (Fig. 18)。これは、今後のペプチド結合リポソームのワクチン実用化に向けて、きわめて重要な問題である。ペプチド結合リポソームは Cross presentation によって抗原提示される。Cross presentation の場合、あるエピトープの場合は、短いペプチドでは抗原提示効率が低く、その N 末端の数個のアミノ酸が必要であることがわかっている⁴¹⁾。N-317 において、ペプチド結合リポソームと組み換えアデノウイルスとで CTL の誘導能に差が見られたのは、このことが原因なのではないかと考えている。Cross presentation のメカニズムはまだはっきりとはわかっていないが、Direct presentation のメカニズムと比較しながらそれを解明していくことは、ペプチド結合リポソームを実用化するための重要な課題である。

本研究では、最も CTL 誘導能の高かった Lip-N-223 を用いてウイルスチャレンジ実験を行った。本実験では、3 回行ったウイルスチャレンジにおいて 2 回で完全にウイルスは排除され、残る 1 回でもウイルスは減少していた。このウイルスチャレンジ実験で免疫した抗原は、CTL 誘導能を持つ 9 つのアミノ酸からなる短いペプチドであるため、その後チャレンジしたワクシニアウイルスの排除に、ワクシニアウイルスの中和抗体が関与しているとは考え難い。このチャレンジ実験の結果により、将来、ペプチド結合リポソームを予防ワクチンに利用できる可能性を示すことができた。今後、何らかの方法で治療ワクチンの可能性を調べる必要があるとともに、ワクチン後のメモリーCTL についても検討すべきである。また、本研究で用いたウイルスは Multiepitope Minigene を発現する組み換えワクシニアウイルスであるため、将来、病原ウイルスそのものを用いて実験する必要がある。

本研究では、ドミナントエピトープを見出しペプチド結合リポソームの CTL 誘導の有効性を示した。また、ペプチド結合リポソームでマウスを免疫することにより、ウイルスを排除することに成功した。このことは C 型肝炎および SARS に対する、実用可能な CTL 誘導型リポソームワクチンの創製に大きな前進をもたらしたとともに、ほかの未解決な感染症にも応用できる可能性を示したと考えられ、将来に期待のもてるものと思われる。

謝辞

本博士論文作成にあたり、多大なるご指導をいただきました城西大学薬学部教授 林 秀徳先生に深く感謝致します。

本研究、博士論文作成にあたり、実際にご指導いただいた、埼玉医科大学微生物学教室准教授 松井 政則先生に深く感謝の意を表します。また、お忙しいなか、懇切丁寧にご指導いただきました、埼玉医科大学微生物学教室教授 赤塚 俊隆先生、准教授 守屋 修先生をはじめとする、微生物学教室の諸先生方に深く感謝致します。

博士論文作成、博士論文発表にあたり、多大なる協力をいただいた城西大学薬学部臨床生化学教室の皆様にお礼を申し上げます。

本研究に際し使用した、HHD マウスを供与していただいたフランス・パスツール研究所 Lemonnier 博士、組み換えアデノウイルスを供与していただいた国立感染症研究所 宮村博士、IL-12 発現プラスミドを供与していただいた東京医科大学 善本博士、ペプチド結合リポソームを作製していただいた国立感染症研究所 内田 哲也博士に感謝致します。

本論文の作成、提出に際し、有益なご指導とご鞭撻を承りました城西大学薬学部教授 近藤 誠一先生、同教授 日比野 康英先生に心より感謝致します。

参考文献

- 1) A. Charles, Jr. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. J. Shlomchik and T. Sasazuki, 免疫生物学-免疫系の正常と病理, 南光堂, 5, (2003).
- 2) 市村宏, 臨床と微生物, 27, 3-10, (2000).
- 3) S. Cooper, A. L. Erickson, E. J. Adams, J. Kansopon, A. J. Weiner, D. Y. Chien, M. Houghton, P. Parham and C. M. Walker, *Immunity*, 10, 439-449 (1999).
- 4) 松井 政則, 臨床免疫, 30, 938-946 (1998).
- 5) D. R. Milich, *Adv. Immunol.*, 45, 195-282 (1989).
- 6) P. J. Bjorkman, M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger and D. C. Wiley, *Nature*, 329, 506-512 (1987).
- 7) M. A. Saper, P. J. Bjorkman and D. C. Wiley, *J. Mol. Biol.*, 219, 277-319 (1991).
- 8) J. Trowsdale, I. Hanson, I. Mockridge, S. Beck, A. Townsend and A. Kelly, *Nature*, 348, 741-744 (1990).
- 9) M. Attaya, S. Jameson, C. K. Martinez, E. Hermel, C. Aldrich, J. Forman, K. F. Lindahl, M. J. Bevan and J. J. Monaco, *Nature*, 355, 647-649 (1992).
- 10) K. Falk, O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung and H. G. Rammensee, *Nature*, 351, 290-296 (1991).
- 11) T. S. Jardetzky, W. S. Lane, R. A. Robinson, D. R. Madden and D. C. Wiley, *Nature*, 353, 326-329 (1991).
- 12) R. R. Pogue, J. Eron, J. A. Frelinger and M. Matsui, *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA*, **92**, 8166-8170 (1995).
- 13) S. Naito, A. Horino, M. Nakayama, Y. Nakano, T. Nagai, J. Mizuguchi, K. Komuro and T. Uchida., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **109**, 223-228 (1996).
 - 14) T. Nagata , T. Toyota , H. Ishigaki , T. Ichihashi , K. Kajino , Y. Kashima , Y. Itoh , M. Mori , H. Oda , H. Yamamura , M. Taneichi , T. Uchida and K. Ogasawara , *Vaccine.*, **25**, 4914-4921 (2007).
 - 15) Q.-I. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley and M. Houghton, *Science*, **244**, 359-362 (1989).
 - 16) M. J. Alter, H. S. Margolis, K. Krawczynski, F. N. Judson, A. Mares, W. J. Alexander, J. K. Miller, M. A. Gerber and R. E. Sampliner, *N. Engl. J. Med.*, **327**, 1899-1905 (1992).
 - 17) I. Saito, T. Miyamura, A. Ohbayashi, H. Harada, T. Katayama, S. Kikuchi, Y. Watanabe, S. Koi, M. Onji and Y. Ohta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6547-6549 (1990).
 - 18) V. Thiel , KA. Ivanov , A. Putics , T. Hertzig , B. Schelle , S. Bayer , B. Weissbrich , E. J. Snijder , H. Rabenau , H. W. Doerr , A. E. Gorbalenya and J. Ziebuhr . *J Gen Virol.*, **84**, 2305-2315 (2003).
 - 19) World Health Organization Issues: Communicable Disease Surveillance and Response: Severe acute respiratory syndrome (SARS) : Status of the outbreak and lessons for the immediate future. WHO, Geneva, 20 May 2003.
 - 20) World Health Organization Issues: Emergency travel advisory, WHO, Geneva, 15 March 2003.

- 21) World Health Organization issues: Epidemic and Pandemic Alert and Response: Severe acute respiratory syndrome(SARS): WHO, Geneva, 21 April 2004
- 22) World Health Organization issues: Communicable Disease Surveillance and Response: Consensus document on the epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS). WHO, Geneva, 23, May 2003.
- 23) 重松美加 岡部信彦 *臨床と微生物*, 31, 59-64 (2004)
- 24) W. K. Leung, K. To, P. K. S. Chan, H. L. Y. Chan, A. K. L. Wu, N. Lee, K. Y. Yuen and J. J. Y. Sung, *Gastroenterology*, 125, 1011-1017 (2003).
- 25) S. Pascolo, N. Bervas, J. M. Ure, A. G. Smith, F. A. Lemonnier and B. Perarnau, *J. Exp. Med.*, 185, 2043-2051 (1997).
- 26) R. D. Salter, D. N. Howell and P. Cresswell, *Immunogenetics*, 21, 235-246 (1995).
- 27) M. Battegay, J. Fikes, A. M. Di Bisceglie, P. A. Wentworth, A. Sette, E. Celis, W. M. Ching, A. Grakoui, C. M. Rice, K Kurokohchi, J. A. Berzofsky, J. H. Hoofnagle, S. M. Feinstone and T. Akatsuka, *J. Virol.*, 69, 2462-2470 (1995).
- 28) N. H. Grüner, T. J. Gerlach, M. C. Jung, H. M. Diepolder, C. A. Schirren, W. W. Schraut, R. Hoffmann, R. Zachoval, T. Santantonio, M. Cucchiarini, A. Cerny and G. R. Pape, *J. Infect. Dis.*, 181, 1528-1536 (2000).
- 29) M. Shirai, T. Arichi, M. Nishioka, T. Nomura, K. Ikeda, K. Kawanishi, V. H. Engelhard, S. M. Feinstone and J. A. Berzofsky, *J. Immunol.*, 154, 2733-2742 (1995).

- 30) P. Scognamiglio, D. Accapezzato, M. Antonio Casciaro, A. Cacciani, M. Artini, G. Bruno, M. L. Chircu, J. Sidney, S. Southwood, S. Abrignani, A. Sette and V. Barnaba, *J. Immunol.*, **162**, 6681-6689 (1999).
- 31) A. Cerny, J. G. McHutchison, C. Pasquinelli, M. E. Brown, M. A. Brothers, B. Grabscheid, P. Fowler, M. Houghton and F. V. Chisari, *J. Clin. Invest.*, **95**, 521-530 (1995).
- 32) P. A. Wentworth, A. Sette, E. Celis, J. Sidney, S. Southwood, C. Crimi, S. Stitely, E. Keogh, N. C. Wong, B. Livingston, D. Alazard, A. Vitiello, H. M. Grey, F. V. Chisari, R. W. Chesnut and J. Fikes, *Int. Immunol.*, **8**, 651-659 (1996).
- 33) S. Urbani, J. Uggeri, Y. Matsuura, T. Miyamura, A. Penna, C. Boni and C. Ferrari, *Hepatology*, **33**, 1533-1543 (2001).
- 34) M. Matsui, O. Moriya, M. L. Belladonna, S. Kamiya, F. A. Lemonnier, T. Yoshimoto and T. Akatsuka, *J. Virol.*, **78**, 9093-9104 (2004).
- 35) Y. Nakano, M. Mori, S. Nishinohara, Y. Takita, S. Naito, H. Kato, M. Taneichi, K. Komoro and T. Uchida, *Bioconjug. Chem.*, **12**, 391-395 (2001).
- 36) Y. Nakano, M. Mori, S. Nishinohara, Y. Takita, S. Naito, A. Horino, H. Kato, M. Taneichi, K. Komuro and T. Uchida. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **120**, 199-208 (1999).
- 37) P. Parham and F. M. Brodsky, *Hum. Immunol.*, **3**, 277-299 (1981).
- 38) M. Matsui, O. Moriya and T. Akatsuka, *Vaccine*, **21**, 1629-1639 (2003).
- 39) M. Taneichi, H. Ishida, K. Kajino, K. Ogasawara, Y. Tanaka, M. Kasai, M. Mori, M. Nishida, H. Yamamura, J. Mizuguchi and T. Uchida, *J.*

Immunol., 177: 2324–2330 (2006).

- 40) N. H. Grüner, L. Franziska, M.-C. Jung, H. Diepolder, T. Verlach, G. Lauer, B. Walker, J. Sullivan, R. Phillips, G. R. Paper and P. Klenerman, *J. Virol.*, 75, 5550-5558 (2001).
- 41) S. Le Gall, P. Stamegna and B. D. Walker, *J. Clin. Invest.*, 117, 3563-3575 (2007).

