

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

丸木記念特別賞受賞

臨床試験に向けた慢性C型肝炎治療ワクチン研究と
インフルエンザワクチンへの応用

研究代表者 赤塚 俊隆 (医学部 微生物学)

研究分担者 内田 哲也¹⁾, 持田 智²⁾, 小林 信春¹⁾,
堀内 大¹⁾, 高木 徹¹⁾

緒言

毎年ワクチン研究の論文が数多く発表されるが、そこから臨床試験まで進むケースはごく一握りにすぎない。マウス実験で効力が認められても、ヒトに応用するためには有効性、安全性、経済性全てを兼ね備え、かつ国と製薬メーカーの興味をひきつける必要がある。研究分担者・内田と我々の教室との連携で開発を進めてきた抗原表面結合型リポソームワクチンは、細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導効率が極めて高く、他のワクチンと比べてウイルス感染防御効果、がん治療効果など様々な利点があることが明らかとなり^{1,2)}、次世代ワクチンとして注目されるようになった。臨床応用を目指して開発が先行しているインフルエンザワクチンは、4年前「万能インフルエンザワクチン」としてマスコミが大きく取り上げ、ロイター通信が海外にも発信した。そして現在臨床試験に向け、国内外のワクチンメーカーと契約交渉を行う段階となっている。同時に並行して開発を進めたC型肝炎ウイルス(HCV)ワクチンも、感染予防効果のみならず、慢性感染者の治療ワクチンとしての効果がモデルマウスを用いた実験で確認され、患者の治療に向けた研究に進める段階を迎えた。

本研究では慢性C型肝炎治療ワクチンの完成に向け、3つの課題を検討した。すなわち、1) 非細胞障害メカニズムによる抗ウイルス作用機序の解明、2) 抗原をペプチドからタンパクに替え、ユニバーサルに使用可能なものにする、3) 治療効果発現のために遮断する免疫抑制経路として、PD-1/PD-L1経路に加え、Galectin-9/Tim-3経路を検討する、である。

材料と方法

HLA-A2トランスジェニックマウス

マウスMHCクラスIと β 2-microglobulin(β 2-m)をノックアウトしたマウス(C57BL/6 background)に、ヒトMHCクラスIの一つであるHLA-A*0201(HLA-A2)とヒト β 2-m遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(HHDマウス)³⁾を使用した。HHDマウスはフランス・パスツール研究所・Lemonnier博士より供与された。

免疫方法

3つの免疫方法で実験した。①抗原ペプチド50 μ gをヘルパーT細胞エピトープペプチドHBVcore128-140(NH2-TPPAYRPPNAPIL-COOH)⁴⁾100 μ gと共にフロイント不完全アジュバントと混合し、その懸濁液を皮下に注射した。②ペプチドを表面結合したリポソーム50 μ l(ペプチドを<35 μ g含む)をCpG5 μ gと共にfootpadに注射した。③HCV構造タンパクCore, E1, E2を発現する増殖欠損型組換えアデノウイルス(Adex1SR3ST)による免疫と、免疫マウスのCTL活性およびIFN- γ 産生反応の測定(Intracellular cytokine staining)については既に報告した⁵⁾。

組換えワクシニアウイルスによるチャレンジ実験

HCV Core, Core-E1, E2, NS3, NS4を発現する組換えワクシニアウイルスの作成は既に報告した^{5,6)}。免疫マウス♀にウイルスを 2×10^6 PFU i.p.でチャレンジし、5日後に卵巣を採取、そのホモジネートのウイルス量をBS-C-1細胞を用いたプラーク形成法により定量した。

IFN- γ ELISPOT assay

抗原ペプチドに特異的に反応してIFN- γ を産生する細胞の定量は、IFN- γ ELISPOT set(BD Pharmingen, San Diego, CA)を用いて行った。

1) 医学部 微生物学

2) 大学病院 消化器内科・肝臓内科

結果

非細胞障害メカニズムによる抗ウイルス作用機序の解明

抗原表面結合型リポソームワクチンの抗ウイルス効果を, lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) エピトープペプチドを用いて検討した際, リポソーム表面結合により抗原ペプチドが従来の報告とは異なる免疫原性を示すことが観察された²⁾. そこでHCVワクチンの開発研究にあたり, 14種類の既知のHCV CTL epitope (A2-1~14, 表1)について, ①フロイント不完全アジュバントを用いた免疫, ②リポソームワクチン, ③組換えアデノウイルス感染による免疫, の3つ免疫法におけるA) CTL活性誘導, とB) IFN- γ 産生誘導, の2つの免疫誘導効果を比較した. 結果を図1に示すが, ①と②の結果はそれぞれグレーと黒の棒グラフで, A: ⁵¹Cr-release assay, B: ELISPOT (IFN- γ) について示してある. ③は既に報告済⁵⁾の結果で, 各エピトープ部分を含むHCVタンパクを発現する組換えアデノウイルスを感染させたマウスにおけるA), B) の反応を, その強さの組み合わせによりI~Vの5種類(表1の注に説明)に分けて表示している.

それらをまとめて見てみると, 同じエピトープでも①, ②, ③の免疫法で反応が大きく異なることが分かる. 例えばA2-5は①と③の免疫法ではA, B共に反応が見られるのに対し, ②(リポソーム免疫)ではAのみが強く見られる. A2-7も①と③の免疫法でA, B共に反応が見られるが, こちらは②(リポソーム免疫)ではA, Bのいずれにおいても殆ど反応が認められなかった. A2-8は②と③が共通でA, B共に反応が見られるのに対し, ①ではAのみが強く認められた. 一方A2-11とA2-12は③の免疫法でA, B共に反応が見られるが, ①ではAのみが, そして②ではBのみが強く認められている.

以上の結果を図1Cの結果と比べると興味深い. 図1CではA2-1~14の全てのペプチドについて②の方法, すなわちリポソーム免疫を行ったマウスに対し, 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でチャレンジ実験を行った. 図ではそのうち, A2-5~A2-7, A2-8, A2-11, A2-12の5つの結果のみ示してある(他の9つのリポソームワクチンは, いずれも有意な防御効果が認められなかった). リポソーム結合したA2-8, A2-11, A2-12

表 1.

HCV-derived peptides used in this study.

Name	Restriction	Derivation	Residues	Sequence (Ref.)	Type ^a
A2-1	HLA-A*0201	Core	35-44	YLLPRRGPRLL	IV
A2-2	HLA-A*0201	Core	132-140	DLMGYIPLV	I
A2-3	HLA-A*0201	Core	178-187	LLALLSCLTV	V
A2-4	HLA-A*0201	E1	257-266	QLRRHIDLIV	III
A2-5	HLA-A*0201	E2	686-694	ALSTGLIHL	I
A2-6	HLA-A*0201	E2	726-734	LLFLLADA	III
A2-7	HLA-A*0201	NS3	1073-1081	CINGVCWTV	I
A2-8	HLA-A*0201	NS3	1406-1415	KLVALGINAV	II
A2-9	HLA-A*0201	NS3	1585-1593	YLVAYQATV	II
A2-10	HLA-A*0201	NS4A	1671-1680	VLAALAAYCL	I
A2-11	HLA-A*0201	NS4B	1807-1816	LLFNILGGWV	II
A2-12	HLA-A*0201	NS4B	1851-1859	ILAGYGAGV	II
A2-13	HLA-A*0201	NS4B	1920-1928	WMNRLIAFA	I
A2-14	HLA-A*0201	NS5A	1992-2000	VLSDFKTWL	IV

^aClassification of HCV-derived CTL epitopes determined in our previous study [5]. Type I: High or medium in the affinity, high or medium in the lysis, and high or medium in the intracellular cytokine staining (ICS) for IFN- γ . Type II: High or medium in the affinity, high or medium in the lysis, and low or ND in the ICS. Type III: Low in the affinity, and high in the lysis. Type IV: High in the affinity, low or ND in the lysis, and medium in the ICS. Type V: High or medium in the affinity, low or ND in the lysis, and low or ND in the ICS. Type VI: Low in the affinity, ND in the lysis and ICS. ND, not detected.

の3種できれいな完全防御が認められたが、いずれも共通して強いIFN- γ 産生誘導が認められており、CTL活性誘導が非常に低いA2-11, A2-12でも防御していることから、これらのリポソームワクチンの感染防御効果は細胞傷害活性誘導ではなく、IFN- γ 産生誘導などのNon-cytolytic mechanismによるものではないかと推測された。

この推測を確認するため、L-A2-12免疫マウス脾細胞をin vitroでA2-12ペプチドによる刺激を5回繰り返しcell lineを樹立した。この細胞株はペプチド

パルス標的細胞に対し、E/T ratio = 30 : 1で10.1%の傷害活性を有していたが、フローサイトメリーでCD8陽性細胞が99.4%を占め、その91.5%が抗原ペプチドに反応してIFN- γ を産生していた。そしてこの細胞株をTranswell plateに入れ、フィルターで隔てられた標的細胞に抗原ペプチド部分を発現する組換えワクシニアウイルスを感染させると、ウイルス増殖を2 log以上低下させることが認められた。すなわち直接の細胞障害作用なしに、標的細胞におけるウイルス増殖を押さえることが証明された(図2)。

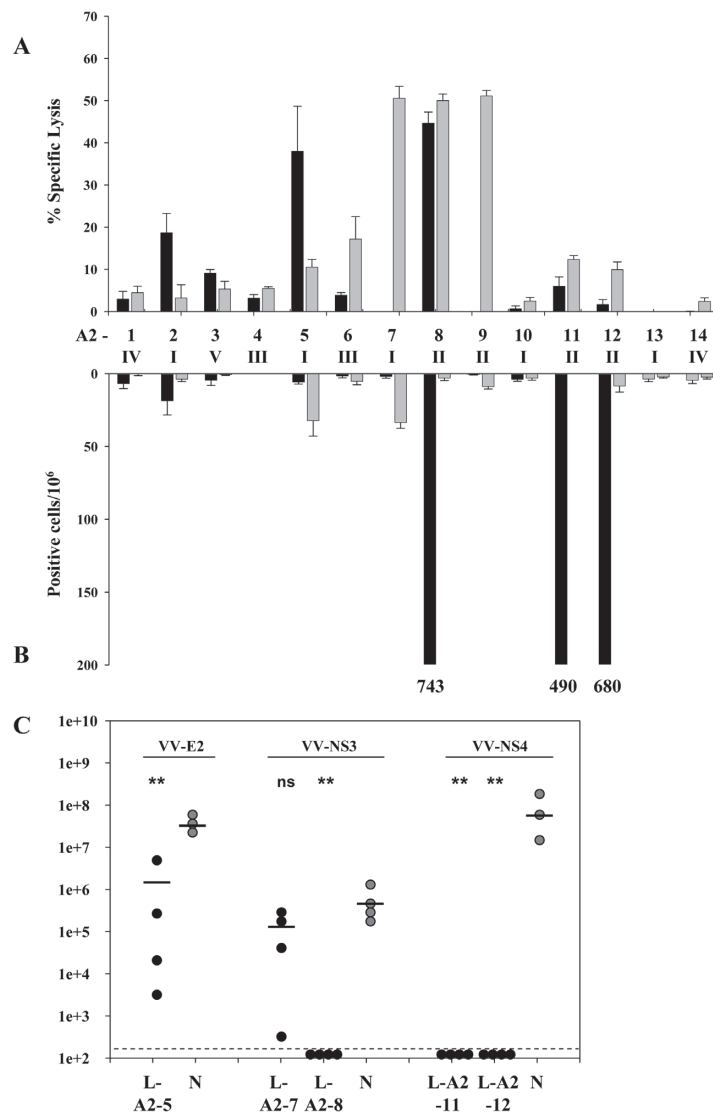


図1. 14種のHCV CTL epitope ペプチドのそれぞれについて、2種類の免疫法(①ペプチドをフロイント不完全アジュバントと混合して皮下注：灰色のバー；②ペプチドをリポソーム表面結合し、CpGと共に皮下注：黒色のバー)でHHDマウスを免疫し、反応を比較した。(A) ⁵¹Cr-release assay. E/T ratio = 50, (B) ELISPOT (IFN- γ) assay. 3番目の免疫法(③HCVタンパク発現組換えアデノウイルス感染)におけるCTL誘導とIFN- γ 誘導の結果の組み合わせはI~Vの5種類に分類して(A)と(B)の間に示してある(表1参照)。(C) ②のリポソーム免疫を行ったHHDマウスに、免疫したエпитープを含むHCVタンパクを発現する組換えワクシニアウイルスでチャレンジし、感染5日後の卵巣中のウイルス量を測定した。A2-5, 7, 8, 11, 12の5種類についてのみ示してある。点線は検出限界(200 PFU/ovary)を示している。

HCV NS3 タンパクの発現・精製

ワクチン成分としてエピトープペプチドを用いることは、その効力と特性を確実に発揮させるためには大きな利点となるが、ヒトへの応用を考えると、特定のHLAクラスIタイプにしか適用できず、他種類のペプチドを選定してワクチンを作製し、それを混合しなければ、ユニバーサルなものとはならない。それに対し抗原としてタンパク分子全体あるいはその一部を用いれば、そこに有効なエピトープが含まれていれば、それらが抗原提示経路でプロセスされてHLAクラスI分子に提示される可能性がある。実際抗原表面結合型リポソームワクチンは、Cross-presentationというメカニズムにより、通常はクラスII抗原提示経路に向かうタンパク分子を、クラスI経路へ送ってCD8⁺T細胞を誘導することが証明されている^{1,7)}。そこでHCVの非構造タンパクであるNS3 (aa. 1027-1658)のうちのhelicase domain (aa 1193-1658)からaa. 1243-1458の部分完全長HCV cDNAを鋳型としてPCRで増幅し、発現プラスミドpBEn-SBP-SET1aのクローニング部位に組み込んだ。大腸菌BL21を形質転換し、IPTGを加え発現誘導を行うと、誘導後1時間から抗体と反応する~30 Kバンドの出現が認められた(図3A, B)。この発現タンパクはStreptavidin binding peptideが融合しているので、Streptavidin-beadsと結合させて精製することができる。予備試験の結果、NS3タンパクは超音波処理により大腸菌から可溶性タンパクとして抽出可能で、Streptavidin-beadsと結合後、biotinを含む低塩濃度のバッファーで溶出されることが確認できた(図3C)。現在これを大量

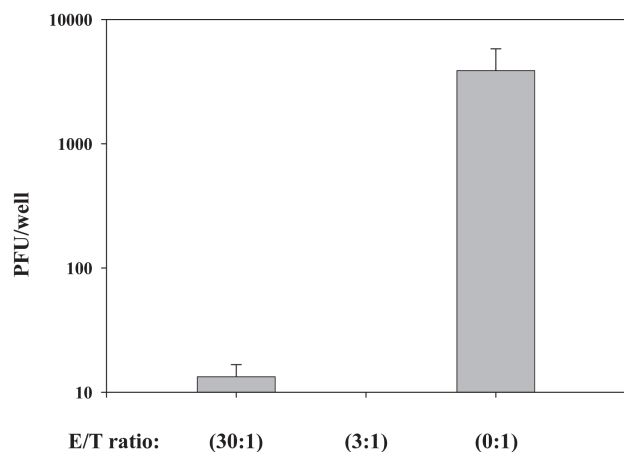


図2. リポソーム結合A2-12免疫マウス脾細胞由来A2-12特異的T細胞株によるVV-NS4増殖抑制効果。トランスウェルプレート上の各ウェルでHHD由来線維芽細胞株 1×10^5 個にVV-NS4を200 PFU感染させ、フィルターの上には抗原ペプチドで刺激したT細胞株 1×10^5 個を加え2日間培養し、線維芽細胞株のホモジネートのウイルス量をBS-C-1細胞を用いたプラーク形成法で測定した。

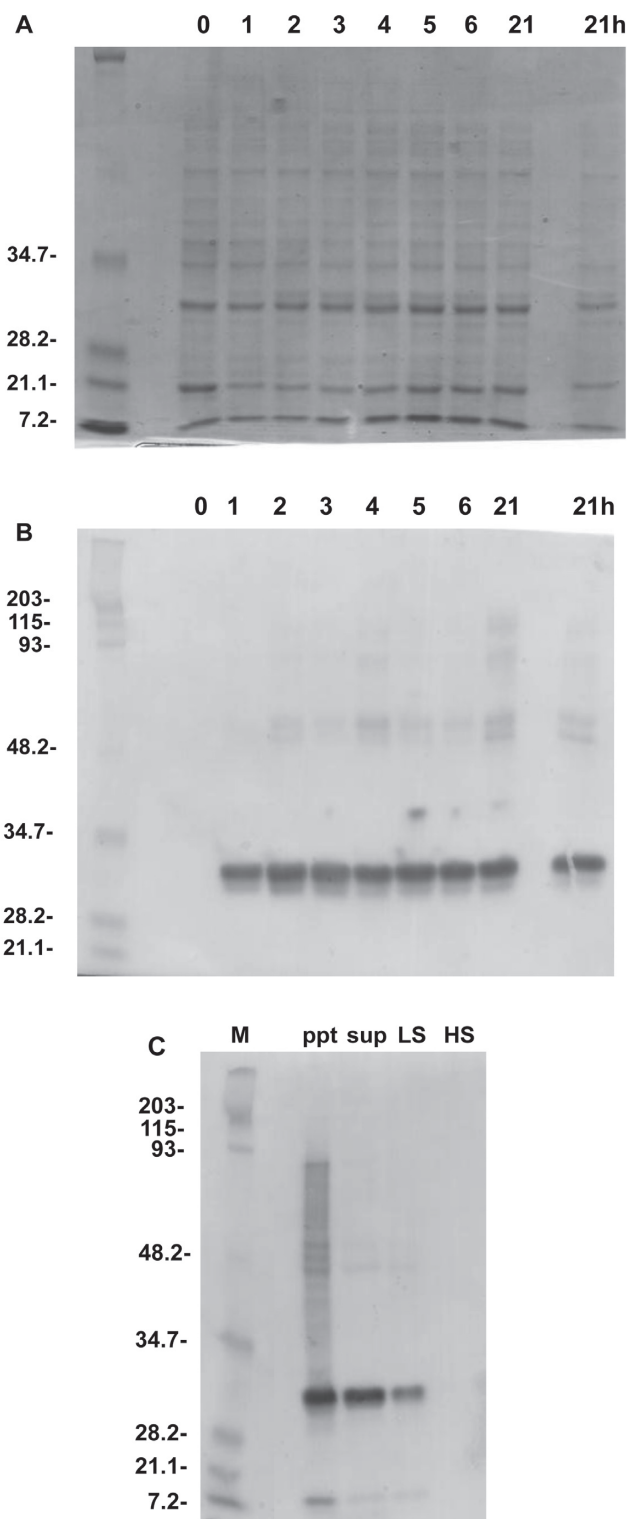


図3. HCV NS3 aa.1243-1458を組み込んだプラスミドで形質転換した大腸菌抽出液のSDS-PSGE (A) とWestern blotting (B)。上の数字はIPTG添加後の時間数。検出抗体は抗HCV NS3モノクローナル抗体, MAB8691を使用した。(C) 形質転換した大腸菌の遠心後の沈渣(ppt), 上清(suo), Streptavidin beadsへ結合後低塩濃度ビオチンバッファーで処理した溶出液(LS), 次に高塩濃度バッファーで処理した溶出液(HS)のWestern blotting。

調整し、リポソームに結合してそのワクチン効果の判定を行う準備を進めている。

Tim-3-hIlgの発現・精製

モデルマウスでの治療効果を示したC型慢性肝炎治療ワクチンは、リポソーム表面に抗原ペプチドと共に、免疫抑制経路の1つであるPD-1とPD-L1の相互作用をブロックする抗PD-L1抗体を結合することで効果をあげることができた。C型慢性肝炎を始めとする慢性ウイルス感染症ではこの経路の他にGalectin-9/Tim-3経路も関与していることが知られている^{8,9}。この経路を遮断するための因子として、Tim-3をヒトIgGタンパクのFc領域部分と融合した形でリンパ球細胞株に発現させ、Protein-Gで精製し、それをリポソームに結合させることにした。マウスTim-3 cDNAをPCRで増幅し、発現プラスミドpFUSE-hIgG1e3-Fc1のクローニング部位に組み込んだ。現在複数の組換えプラスミドをB細胞株NS-1にトランスフェクションしてTim-3-hIlgの発現を試みている。

考 察

CTL誘導型ワクチンは、ウイルスによってコードされるタンパク質であれば、ウイルス粒子の表面抗原のみならず、内部タンパクでも非構造タンパクでも抗原として認識してそこに免疫効果を及ぼし、感染防御あるいは感染細胞の排除を行うことが可能である。しかもその認識部位(エピトープ)は8-10個のアミノ酸から成るペプチドであることももうひとつの要因として、これが抗原変異の激しいインフルエンザウイルス、HIV、HCV、HBVなどにも有効に作用することができる。しかしその作用機序の1つが感染細胞を認識し攻撃するという細胞傷害活性であることから、ワクチンにより組織・臓器障害という副作用が生じるのではないかという懸念がつきまわっている。感染防御効果のもう1つの作用機序として抗原特異的T細胞から産生されるIFN- γ やTNF- α などのサイトカインによるウイルス増殖抑制(非細胞障害メカニズム: Non-cytolytic mechanism)も存在することが、LCMV、HBV、HCVなどの感染についてデータが示されている^{10,11}。しかしそのような非細胞障害メカニズムを主として誘導し、ウイルス感染を防御するようなワクチンはこれまでに報告がない。本研究では同じ抗原ペプチドでも、リポソーム表面結合により、他の免疫法とは異なるユニークな免疫原性が発揮されることを示したが、その1つとして、抗原ペプチドによっては非細胞障害メカニズムを主として誘導して抗ウイルス効果を発揮するものがあることが示唆された。現在この可能性を確認するため、抗IFN- γ 抗体を用いてワクチン効果をブロックする試験を、in vitro, in vivoの両面から行なっている。この

方法が確立されれば、特に慢性感染症の治療に応用する場合に大きな利点となることは間違いないと思われる。

本ワクチンを臨床応用に近づけるもう1つのステップとして取り組んだHCVタンパクの発現・精製は、リポソーム表面に結合させるという最終段階のステップで、界面活性剤の存在が阻害要因となるので、目的タンパクを界面活性剤の非存在下で抽出するか、精製後に除去しかつ可溶性を確保する必要がある。抗原成分として選んだHCV NS3タンパクは可溶性タンパクとして発現・精製することが非常に難しい。そこで本研究では、これまでも可溶性タンパクとして発現・精製の報告がある部分(aa.1243-1458)を選び、発現ベクターとしても可溶性発現に工夫が加えられているpBEn-SBP-SET1aを選んだ。その結果、発現大腸菌を超音波処理するのみで可溶性画分に目的タンパクが回収されることが確認できた(図3C)。今後精製を進めタンパク結合リポソームワクチンの効果判定を行うと共に、他のHCVタンパクの発現・精製を進めて行きたい。

参考文献

- 1) Taneichi M, Ishida H, Kajino K, et al. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8⁺ T cells and induce potent antitumor immunity. *J Immunol* 2006;177(4):2324-30.
- 2) Takagi A, Matsui M, Ohno S, et al. Highly efficient antiviral CD8⁺ T-cell induction by peptides coupled to the surfaces of liposomes. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16(10):1383-92.
- 3) Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta 2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta 2m double knockout mice. *J Exp Med* 1997;185(12):2043-51.
- 4) Milich DR, Hughes JL, McLachlan A, Thornton GB, Moriarty A. Hepatitis B synthetic immunogen comprised of nucleocapsid T-cell sites and an envelope B-cell epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(5):1610-4.
- 5) Ohno S, Moriya O, Yoshimoto T, Hayashi H, Akatsuka T, Matsui M. Immunogenic variation between multiple HLA-A*0201-restricted, Hepatitis C Virus-derived epitopes for cytotoxic T lymphocytes. *Viral Immunol* 2006;19(3):458-67.
- 6) Moriya O, Matsui M, Osorio M, et al. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes

in mice by immunization with dendritic cells treated with an anthrax toxin fusion protein. *Vaccine* 2001;20(5-6):789-96.

- 7) Tanaka Y, Taneichi M, Kasai M, Kakiuchi T, Uchida T. Liposome-coupled antigens are internalized by antigen-presenting cells via pinocytosis and cross-presented to CD8⁺ T cells. *PLoS One* 2010;5(12):e15225.
- 8) Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Virol* 2009;83(18):9122-30.
- 9) McMahan RH, Golden-Mason L, Nishimura MI, et al. Tim-3 expression on PD-1⁺ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J Clin Invest* 2010;120(12):4546-57.
- 10) Jo J, Aichele U, Kersting N, et al. Analysis of CD8(+) T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology* 2009;136(4):1391-401.
- 11) Guidotti LG, Borrow P, Hobbs MV, et al. Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(10):4589-94.

研究成果リスト

論文

- 1) Takagi A, Kobayashi N, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Coupling to the surface of liposomes alters the immunogenicity of hepatitis C virus-derived peptides and confers sterile immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;430(1):183-9.
- 2) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Tsutsumi T, Moriya K, Koike K, Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cells. Submitted for *Hepatology Research*.

学会発表

- 1) Takagi A, Kobayashi N, Horiuchi Y, Moriya O, Akatsuka T, Tsutsumi T, Koike K, Taneichi M, Uchida T. Successful immunotherapy of chronic HCV infection model mice with liposomes coupled with a non-immunogenic HCV peptide and anti-PD-L1 antibody, 19th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Oct 5-9, 2012, Venice, Italy
- 2) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Tsutsumi T, Koike K and Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cell, 19th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Oct 5-9, 2012, Venice, Italy
- 3) 高木徹, 堀内大, 小林信春, 守屋修, 赤塚俊隆, 堤武也, 小池和彦, 種市麻衣子, 内田哲也. 非免疫原性HCV由来ペプチドと抗PD-L1抗体結合リポソームワクチンによる慢性C型肝炎モデルマウスの免疫治療, 第60回日本ウイルス学会学術集会, 2012年11月13-15日, 大阪
- 4) 高木徹, 堀内大, 小林信春, 守屋修, 赤塚俊隆, 堤武也, 小池和彦, 種市麻衣子, 内田哲也. 低免疫原性HCV由来ペプチドと抗PD-L1抗体結合リポソームワクチンによる慢性C型肝炎モデルマウスの治療効果, 第16回日本ワクチン学会学術集会, 2012年11月17-18日, 横浜
- 5) Takagi A, Kobayashi N, Horiuchi Y, Moriya O, Akatsuka T, Tsutsumi T, Koike K, Taneichi M, Uchida T. Successful immunotherapy of chronic HCV infection model mice with liposomes coupled with a non-immunogenic HCV peptide and anti-PD-L1 antibody, 第41回日本免疫学会, 2012年12月5-7日, 神戸
- 6) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Tsutsumi T, Koike K and Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cell, 第41回日本免疫学会, 2012年12月5-7日, 神戸