

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

抗原表面結合型リポソームによるC型肝炎治療ワクチン開発

研究代表者 高木 徹 (医学部 微生物学)

緒 言

Hepatitis C virus (HCV) はフラビウイルス科に属するRNAウイルスであり、世界中に約1.5億人、日本では約200万人の感染者が存在するといわれる。感染するとその大半が慢性感染を起こし、経過とともに肝硬変、肝臓へと移行し死に至る¹⁾。主な治療薬としてリバビリンとインターフェロン療法や、近年では3剤療法であるDAAs (Direct Acting Antivirals) が使用されているが、リバビリン・インターフェロン療法において治療率は50%程度で高価で副作用もあることから、HCVワクチン開発が急がれている。

脂質組成を不飽和脂肪酸にしたリポソーム表面に結合させた抗原は、抗原提示細胞によりCTLにcross presentation されることが報告されている²⁾。また申請者はフロイントアジュバントを用いた免疫において免疫原性が低いエピトープペプチドでも、リポソーム表面に結合すると強力なCTLを誘導できることを見出した³⁾。更にリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) 由来のドミナントエピトープをリポソーム表面に結合し、マウスに免疫を行ったところ、非常に効果的な抗ウイルス反応を示すことを報告した⁴⁾。抗原を表面に結合したリポソームワクチンは様々な利点を有するが、特記すべきこととして、

- 1) わずか280 ngの抗原量とCpG 5 μ gの1回免疫でウイルス感染を完全に防御できること、
- 2) ワクチンによる感染予防が難しいLCMVの持続感染変異株cl.13も完璧に防御できること、
- 3) CD4ノックアウトマウスへの免疫により、CD4陽性T細胞によるヘルプの非存在下でも長期のメモリーを誘導できることが証明されたこと、

などが挙げられる⁴⁾。

これらのことから、本研究ではHCVに由来するHLA-A2拘束性のエピトープペプチド14種類を用い、表面結合型リポソームワクチン開発を試みた。

方法と材料

1. HLA-A2トランスジェニックマウス

H-2Db^{-/-} β 2m^{-/-} double knockout miceにhuman β 2m-HLA-A2.1 (α 1 α 2)-mouse H-2Db (α 3 transmembrane cytoplasmic) monochain 遺伝子を導入したHHDマウスを使用した。HHDマウスは仏・パスツール研究所・Lemonnier博士より供与された。

2. 免疫方法

リポソーム免疫ではリポソーム50 μ lにCpG 5 μ gをマウスにfoot padにて免疫し1週間後ブーストした。ペプチド免疫では抗原ペプチド50 μ gとヘルパーT細胞エピトープペプチドHBVcore128-140 100 μ gをインコンプリートフロイントアジュバンドと混ぜ皮下注射にて免疫を行った。組み換えウイルス免疫では、HCV-core, E1, E2またはNS3-5Aを発現する組み換えアデノウイルス (Ad-ST, Ad-NS) を5 x 10⁷ PFUを腹腔注射により免疫を行った。いずれも2週後にブーストし、その1週後に実験を行った。

3. IFN- γ ELISPOT assay

Mouse IFN- γ enzyme-linked immunospot (ELISPOT) set (BD Pharmingen, San Diego, CA)を用い、ナイーブマウスの脾細胞に対応したペプチドをパルスし40 GyのX線を照射したものを、免疫マウスの脾細胞と混ぜ2日間培養し測定した。

4. ⁵¹Cr Release assay

ナイーブマウスの脾細胞に対応したペプチドをパルスし40 GyのX線を照射したものを、免疫マウスの脾細胞と混ぜ7日間培養した。標的細胞 (RMA細胞にHHD遺伝子を導入したRMA-HHD) に対応したペプチドをパルスし⁵¹Crを取り込ませ、96well plateにエフェクター細胞とE:T/100:1の割合で入れ4時間培養し、その上清を γ カウンターにて測定した。

5. Vaccinia virus 感染実験

免疫マウスに2 x 10⁶ PFUの組み換えVaccinia virusを腹腔注射し5日後に卵巣を摘出し、凍結融解と超音波処理し段階希釈したウイルス液をBSC-1細胞に感染

させた。その2日後にクリスタルバイオレットにて細胞を染色しウイルス価を算出した。

6. Intracellular Cytokine Staining

免疫したマウスの脾細胞と対応するペプチド溶液、brefeldin A (Golgi plug) を混ぜ37℃, 5時間インキュベーションし標識抗体にてCD8陽性T細胞とIFN- γ を染色しFACS解析を行った。

7. Adoptive Transfer

マウスの尾静脈から 1×10^7 PFUの組み換えワクシニアウイルスを感染させた翌日に、試験管内で1回刺激を行ったeffector T細胞を 5×10^6 cells 移入し、4日後に血清ALTと肝臓中のウイルス量を測定した。

8. Transwell culture

HHDMマウス腎由来初代培養細胞を標的細胞とし、24-well plateに 1×10^5 ずつ入れて培養し、組み換えワクシニアウイルス (VV-NS4) をm.o.i = 0.1で感染させた。ペプチドA2-12で5回、刺激を繰り返したCTLを、A2-12でパルスし放射線照 (40 Gy) した正常脾細胞 (1×10^5) と共に、E:T比3:1 (3×10^5) と0:1の割合で入れ共培養した。Direct cultureでは標的細胞とCTLを直接共培養し、transwell culture ではpore size 0.4 μ m membrane 上にCTLと脾細胞をのせ標的細胞と触れないように培養した。上清に抗IFN- γ 抗体 (1 μ g/ml), 抗TNF- α 抗体 (1 μ g/ml) を入れブロッキング試験を行った。2日後に標的細胞をホモジナイズし、BSC-1細胞を用いてウイルス価を算定した。

結 果

1. リポソームワクチンと他の2種類の免疫方法との比較検討

14種類のHCV HLA-A2 epitope peptide (Table 1) について、①表面結合型リポソームワクチンによる免疫、②ペプチドをヘルパーT細胞エピトープペプチドと共にアジュバントに懸濁して免疫する方法、③組み換えアデノウイルス感染、の3つの免疫方法における免疫原性を比較した。免疫原性として、細胞傷害性の誘導とIFN- γ 産生T細胞誘導能を測定し、比較した。すると個々のエピトープについて、3種の免疫方法で全く異なる免疫原性が発揮されることがわかった (Fig. 1A, B)。

①のリポソームワクチンはウイルス感染防御において②のペプチドワクチンよりも優れていることは既に報告したが³⁾、この14種のリポソームワクチンで免疫したマウスに、それぞれのエピトープを発現する組み換えワクシニアウイルスでチャレンジしてみたところ、3つのワクチン (L-A2-8, L-A2-11, L-A2-12) が完全なウイルス感染防御効果を示すことが確認された (Fig. 1C)。この3つに共通して強いIFN- γ 反応誘導活性がみられ、特にL-A2-11とL-A2-12はCTL活性は殆ど誘導しないがウイルス感染を完全にブロックした。一方、L-A2-5はIFN- γ よりもCTL活性を誘導するが、有意なウイルス感染防御は認められなかった

Table 1. 合成したHLA-A2拘束性HCV由来ペプチド

Name	Restriction	Derivation	Residues	Sequence	Type
A2-1	HLA-A*0201	Core	35-44	YLLPRRGPR	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	QLRRHIDLLV	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

既知の14種類のHCV-CTLエピトープについて、①リポソーム免疫、②ペプチドをヘルパーT細胞エピトープペプチドと共にアジュバントに懸濁して免疫、③組み換えアデノウイルス免疫、の免疫方法の比較検討。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、⁵¹Cr-release assayとIFN- γ ELISPOT assayの結果を、その強さの組み合わせによりI-Vの5種類 (Fig.1参照) に分けて表示している

(Fig. 1C). 以上から3種のリボソームワクチンにより誘導されるウイルス感染防御能は、細胞傷害活性よりもIFN- γ などの抗ウイルス活性を持つサイトカイン誘導によるものであると推測されたので、以下の実験を行った。

2. Adoptive Transfer実験

L-A2-12で免疫したマウスのT細胞を、Fig. 1A, Bと同様に試験管内でペプチド刺激を1回行い、adoptive transferに用いた。マウスに組換えワクシニアウイルスを静注で感染させ、翌日T細胞をtransferし、その4日後に血清と肝臓を採取してウイルス量とALT値の測定を行った。肝臓中のウイルス量は、細胞移入によりウイルス増殖が有意に抑制されることが確認された

(Fig. 2A). 血清のALT値は、細胞を移入してもALT値の増加はほとんど認められなかった (Fig. 2B). このことは、L-A2-12免疫で誘導されるT細胞が、細胞傷害を引き起こさずにウイルス増殖を抑制する可能性を支持していた。

3. Transwell実験

T細胞の残りはペプチド刺激を4回以上繰り返してline 化し、in vitro 実験に用いた。この刺激過程で最初は非常に低かったCTL活性も増加し、実験直前には⁵¹Cr-release assayで74% (E/T ratio: 30 : 1) のkillingを示し、一方IFN- γ 産生はT細胞の92%で認められた。この細胞をtranswell plateに入れ、ワクシニアウイルスを感染させた標的細胞と直接接することなく、その

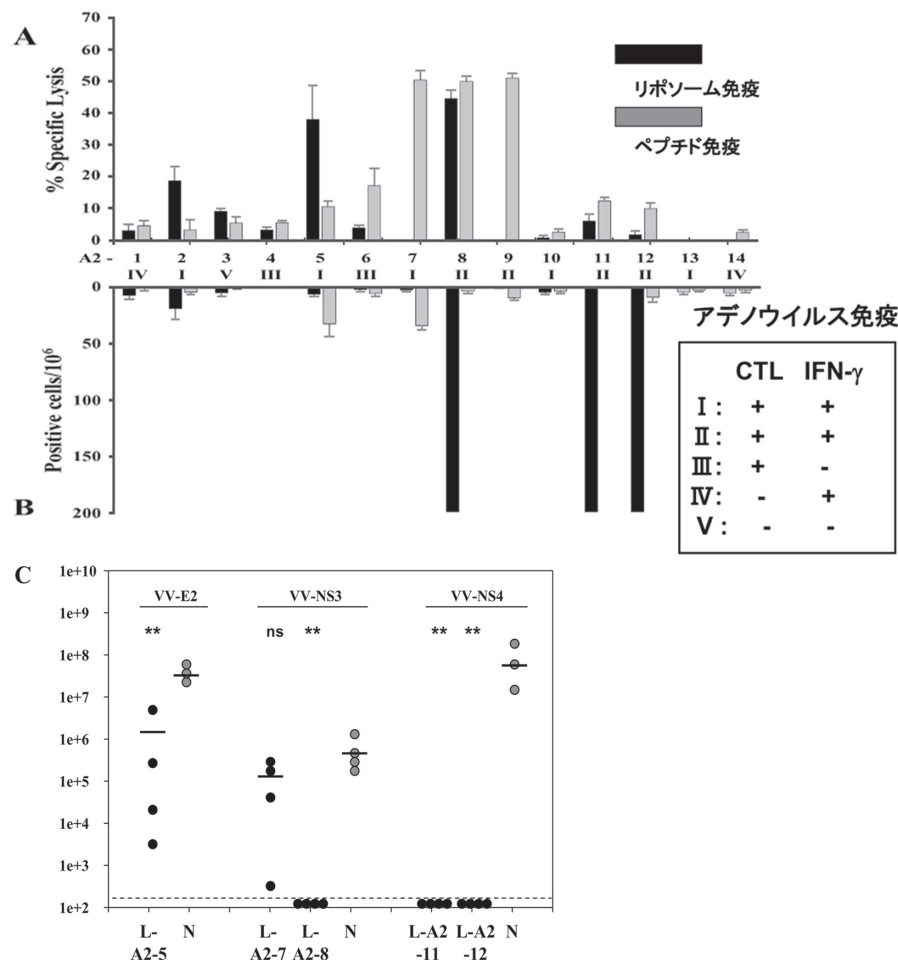


Fig. 1. Comparison of Liposome, IFA-peptide, and adenovirus immunizations. Each HLA-A2 Tg mouse received 50 μ l of liposome-peptide and 5 μ g of CpG (f.p.), 50 μ g of peptide and 100 μ g of HBV128-140 peptide emulsified in incomplete Freund's adjuvant (s.c.), or 5 $\times 10^7$ PFU of recombinant adenovirus expressing HCV structural or nonstructural proteins (Ad-ST or Ad-NS) (i.p.). The mouse was boosted after two weeks, and spleen cells were prepared seven days later for ⁵¹Cr release assays (A) and IFN- γ ELISPOT assay (B): The immunized and naïve mice were challenged at one week after the last immunization with 2 $\times 10^6$ PFU of VV-E2, VV-NS3 or VV-NS4 (i.p.) and the virus titers in the ovaries were quantitated by plaque assays on BS-C-1 cells at day 5 postchallenge (C).

増殖に及ぼす効果を2日後に判定した。培養液には抗IFN- γ あるいは抗TNF- α 抗体を入れてブロッキング試験を行った (Fig. 3)。Fig. 3Bは標的細胞と一緒にplateに入れて培養したもので, effectorを加えないwellでのウイルス量と比較してeffectorの存在によりその増殖が有意に抑制されている。2種の抗体でのブロッキングを行うと, effectorによるウイルス増殖抑制効果に対する影響は非常に低いことが分かった。Fig. 3Aの transwell plate 実験で, effectorを標的細胞と接触させることなく培養しても, やはりeffectorの存在によりウイルス増殖が有意に抑制されることが認められた。そしてそこに2種の抗体を加えると,

effectorによる抑制作用の大半がブロックされた。ブロッキングは特に抗IFN- γ 抗体による効果が大きかった。

考 察

HLA-A2拘束性HCV CTLエピトープについて検討した結果, リポソーム免疫, ペプチド免疫, ウイルス免疫でそれぞれ異なる免疫反応が誘導された。反応の違いを生じる原因は不明であるが, それぞれの抗原提示メカニズムの違いがその可能性の1つとして挙げられる。

今回リポソームワクチンが示した非細胞障害性

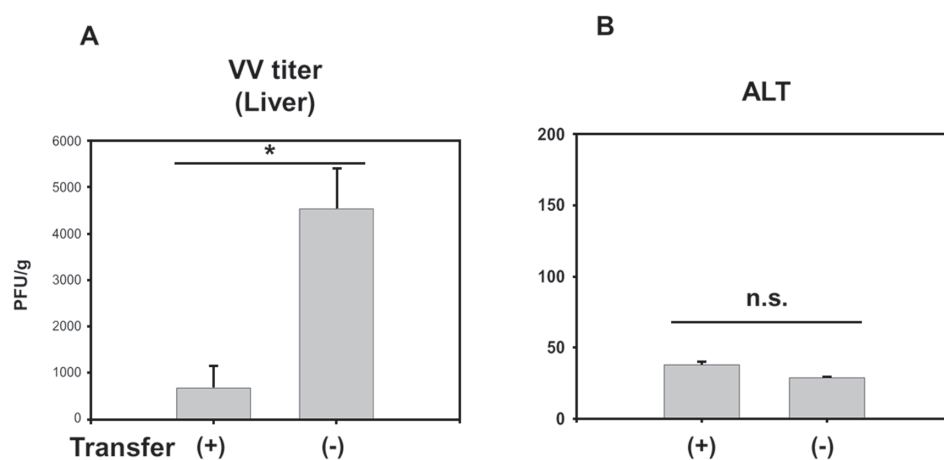


Fig. 2. Adoptive transfer experiments. Mice were infected with 5×10^6 PFU of recombinant vaccinia virus expressing HCV NS4 (VV-NS4) (i.v.) and the next day, received 1×10^7 of T cells (i.v.). Four days later, Serum and liver were taken from each mouse, and ALT concentration in serum and virus titer in liver were determined.

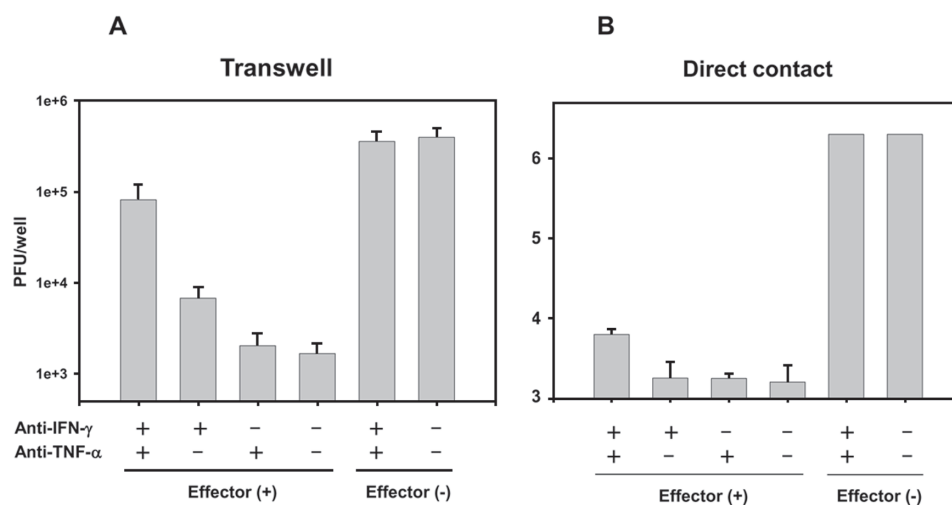


Fig. 3. T cells from mice immunized with L-A2-12 were cocultured with target cells (HHD-kidney cells) either in direct culture (B) or in the transwell system (A) at E/T ratio of 3:1 in the presence or absence of anti-IFN- γ or anti-TNF- α . Inhibition of recombinant vaccinia virus (VV-NS4) was determined by the plaque assays on BS-C-1 cells at day 2.

メカニズムによるウイルス増殖抑制メカニズムは、LCMV, HCV, HBVなどで報告されており、そのメカニズムの主体はIFN- γ などのサイトカインであるといわれている⁵⁾。このような非細胞傷害性メカニズムは、慢性感染症の防御において、細胞傷害による副作用を伴うことなくウイルスを排除できる。Lip.A2-12のようにこのメカニズムのみを選択的に誘導し抗ウイルス効果を発揮するワクチンは、慢性肝炎患者の肝障害を増強することなく治療効果を発揮する安全なワクチン開発につながるものとして期待できる。

Reference List

- 1) Saito I, Miyamura T, Ohbayashi A, Harada H, Katayama T, Kikuchi S, Watanabe Y, Koito S, Onji M, Ohta Y, Choo Q-L, Houghton M, Kuo G. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6547-9.
- 2) 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.
- 3) 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 2013;430(1):183-9.

- 4) Takagi A, Matsui M, Ohno S, Duan H, Moriya M, Kobayashi N, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Highly efficient antiviral CD8+ T-cell induction by peptides coupled to the surfaces of liposomes. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1383-92.
- 5) Guidotti LG, Borrow P, Brown A, McClary H, Koch R, Chisari FV. Noncytopathic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from the hepatocyte. *J Exp Med* 1999;189:1555-64.

研究成果リスト

- 1) 高木徹, 堀内大, 種市麻衣子, 内田哲也, 赤塚俊隆. リポソーム表面結合によるHCV由来ペプチドの免疫原性変化と非細胞傷害性抗ウイルス活性の誘導, 日本ウイルス学会, 平成25年11月, 神戸
- 2) 赤塚俊隆, 高木徹, 堀内大, 種市麻衣子, 内田哲也. リポソーム表面結合によるHCV由来ペプチドの免疫原性の変化と非細胞傷害性抗ウイルス活性の誘導, 日本ワクチン学会, 平成25年11月, 三重
- 3) Akatsuka T, Takagi A, Horiuchi Y, Taneichi M, Uchida T. Coupling to the surface of liposomes alters the immunogenicity of hepatitis C virus-derived peptides and confers non-cytolytic antiviral immunity, 日本免疫学会, 平成25年12月, 千葉