

学内グラント 報告書

平成22-23年度 学内グラント終了時報告書

インフルエンザウイルス特異的 CTL の誘導を増強する
プラットフォームの開発

研究代表者 川野 雅章 (医学部 免疫学)

研究分担者 松井 政則¹⁾, 禾 泰壽²⁾, 半田 宏³⁾

緒 言

遺伝子疾患の治療法として、体内での確・高効率で標的細胞に遺伝子を運搬できることから、遺伝子治療用組換えウイルスベクターが開発されているが、染色体上の組み込みによって遺伝子が傷害されることやウイルスタンパク質の抗原性や毒性などの危険性から実用化には至っていない。また、遺伝子や薬剤を運搬する目的で、リポソームなどの人工ベクターの開発も行われているが、ベクター構造が極めて不安定、また、標的細胞特異的な運搬が困難であることなど、こちらも多くの課題が残っている。筆者らは、ウイルスの利点である、標的細胞を認識・侵入し、細胞内に目的物を的確に運び込む機能を利用するため、simian virus 40 (SV40) ウイルス外殻タンパク質のみを医療材料として応用する研究を行ってきた。

ポリオーマウイルス科のSV40粒子は、主要外殻タンパク質VP1のみで構成され、5つのVP1で構築されるVP1五量体と呼ばれる構造体ユニットが72個集合化することで直径45 nmの球状粒子を形成する。一種類の外殻タンパク質から成る球状粒子として最も大きな構造で、VP1五量体の自己集合化能により球状粒子を、宿主因子を必要とすることなく構築することができる。また、SV40は1960年代のポリオワクチンの中に混入しており、当時ワクチンを接種された1,000万人以上のヒトで細胞毒性の報告は無く、従ってSV40 VP1はヒトに対して細胞毒性を有していないと考えられる。

SV40 VP1を医療材料として工学的に利用するためには、ウイルス粒子を精製するシステム、それを粒子構成単位であるVP1五量体に解離し、再び、ウイルス

粒子として試験管内で再構成する技術、DNAやタンパク質、薬剤、造影剤などを安定的に内包する技術、内包物を的確に体内の標的細胞に送り届ける技術の開発が必要である。これらの技術を構築するため、昆虫細胞内でVP1を発現させることでウイルス様粒子(VLP)を核内で多量に形成させた。さらに、粒子構成単位である、VP1五量体を得るために、感染細胞を溶解してVLPを精製後、VLPの解離物をゲルろ過法で高度にVP1五量体を精製する系を確立した^{1,2)}。そして、試験管内で粒子を再構成する技術を確立するために、VP1五量体の自己集合化によりウイルス様粒子やチューブ状構造体を形成する条件を決定してきた³⁾。我々は粒子形成を誘導する因子を探索し、SV40の非主要構造タンパク質VP2/3あるいはdsDNAが粒子形成を誘導することを発見した⁴⁻⁶⁾。さらに、内包物を標的細胞に届けるため、外来タンパク質を粒子内部に内包する技術を確立するとともに⁷⁾、粒子表面を修飾することで特定の細胞を標的として目的物質を運び込む技術も構築した^{8,9)}。

本研究では、医療材料として応用開発研究をしてきたSV40粒子に関する技術を、インフルエンザウイルス特異的細胞傷害性T細胞(Cytotoxic T lymphocyte: CTL)の誘導を増強するプラットフォームの開発に応用することを目的とした。CTLはウイルスが感染した細胞や、がん細胞など、正常な機能を果たさなくなった細胞を探し出して破壊する機能を有する。作用機序としては、例えば、インフルエンザウイルスのmatrix protein 1 (M1) HLA-A2 CTLエピトープに対して攻撃するCTLは、表面のT細胞受容体(TCR)が、ウイルスに感染した体内の細胞でHLA-A2を介して結合しているM1のCTLエピトープを認識し、その細胞を破壊する。目的のCTLエピトープに対してCTLを誘導するために、様々なアジュバントが開発されているが、CTLを誘導する効率の悪さや副作用などの多くの

1) 医学部 微生物学

2) 医学部 分子生物学

3) 東京工業大学

問題を抱えている。インフルエンザウイルスCTLエпитープを運搬するプラットフォームとしてSV40 VLPを用いることで、ウイルス粒子自体に存在するアジュバント効果によって、CTLエпитープに対して強力にCTLを誘導することが期待される。

材料と方法

1. 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-マイクログロブリン(β 2-m)をノックアウトしたマウスに、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)¹⁰⁾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. M1 CTLエピトープを挿入したSV40 VP1の作製

A型インフルエンザウイルスのM1タンパク質に対するHLA-A2のCTLエピトープ(GILGFVFTL)を野生型SV40 VP1遺伝子を用いてVP1のDEループ領域(M1-DE-VP1)およびHIループ領域(M1-HI-VP1)にオーバーハングPCR法によって挿入し、バキュロウイルス発現用プラスミドベクター、pFastBac1に組込んだ。

3. M1-DE-VP1 およびM1-HI-VP1 タンパク質発現バキュロウイルスの作製

組込んだプラスミドベクターを大腸菌のDH10Bacに形質転換し、転換したDH10Bacから組換えバキュロウイルスゲノムを精製した。リポフェクチン試薬を用いて精製したバキュロウイルスゲノムをカイコのSf-9細胞に導入し、3日後に組換えバキュロウイルスを含む培養上清を回収した。このバキュロウイルスを再びSf-9細胞に感染させ、3日後に培養上清を回収することで、十分にウイルスタイターの上昇した組換えバキュロウイルスを調製した。

4. M1-DE-VP1およびM1-HI-VP1 タンパク質の調製

作製した組換えバキュロウイルスをSf-9細胞に感染させ、3日後に細胞を回収した。回収した細胞にソニケーション溶液(20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1% sodium deoxycholate)を加え、ソニケーションして細胞を破壊した。遠心機で15,000回転、5分、4℃で遠心し、上清を除いた後、再懸濁溶液(20 mM Tris-HCl (pH7.9), 50% OptiPrep)を加えて再びソニケーションを行い、ペレットを懸濁した。この懸濁溶液をM1-DE-VP1溶液、および、M1-HI-VP1溶液とした。

5. M1-DE-VP1 およびM1-HI-VP1 タンパク質によるCTLの誘導

インフルエンザウイルス特異的CTLが誘導できるかどうかを検討するために、M1-DE-VP1溶液、および、M1-HI-VP1溶液をHHDマウスの足蹠に免疫した。そして、免疫7日後、細胞内サイトカイン

陽性CTLの測定をするために、マウス脾細胞をGILGFVFTLペプチドで抗原刺激した。その後、細胞表面をFITC-抗CD8抗体、細胞内部をPE-抗IFN- γ 抗体で染め、それぞれのエピトープに特異的に反応するIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞数を、フローサイトメトリーで測定した。

(倫理面への配慮)

マウスは、埼玉医大・実験動物管理運営規定に基づき飼育され、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。

結 果

1. CTLエピトープを挿入したM1-DE-VP1 およびM1-HI-VP1 タンパク質の調製

オーバーハングPCR法で作製したM1-DE-VP1およびM1-HI-VP1を組込んだプラスミドから、組換えバキュロウイルスを作製し、Sf-9細胞に感染させた。感染3日後にSf-9細胞を回収、PBS(一)で洗浄した後、細胞をVP1超音波処理溶液で再懸濁し、超音波破碎した後、遠心して上清とペレットに分画し、上清を除いた。残ったペレットに50%Opti-Prep溶液(20 mM Tris-HCl (pH7.9), 50%Opti-Prep)を加えて、超音波処理することで再懸濁し、ペレット溶液とした。調製したペレット溶液をSDS-PAGEで泳動後、CBB染色によって染色することで精製度を確認した。確認した結果、M1-DE-VP1およびM1-HI-VP1由来の主要な50 kDaのタンパク質バンドが検出された。さらに下方には45, 40 kDaのタンパク質バンドが検出された。これらはVP1の分解産物である可能性が考えられた。この3バンド以外のタンパク質バンドはほとんど検出されなかったことから、M1-DE-VP1およびM1-HI-VP1タンパク質はこの方法で精製可能であることが示唆された。

2. CTLエピトープ挿入VP1によるIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞の誘導

M1-DE-VP1およびM1-HI-VP1タンパク質を、8週齢のHLA-A2トランスジェニックマウスに足蹠経路で免疫した。免疫1週間後、マウスから脾臓を摘出し、リンパ球を調製した。脾臓から回収したリンパ球中に、M1のCTLエピトープ配列(GILGFVFTL)に反応して誘導されるCTLが存在することを調べるために、ICS(Intra-cellular cytokine staining)解析を行った。脾臓リンパ球をM1のCTLエピトープペプチド(GILGFVFTL)と共に培養した後、FITC-抗CD8抗体、およびPE-抗IFN- γ 抗体で染色し、FACScan(BD)でドットプロット解析を行った。図に、ICSの2次元解析の結果を示した。

図に示すように、M1のCTLエピトープペプチドのインキュベーションによりCD8陽性・細胞内IFN- γ 陽性細胞が誘導された。このことから、M1-DE-VP1およ

びM1-HI-VP1タンパク質は、アジュバントがなくても、CTLを誘導できることが示唆された。

考 察

M1-DE-VP1およびM1-HI-VP1タンパク質の免疫によって、アジュバントを加えることなく、一回の免疫によってM1のHLA-A2 CTLエピトープに対するCTLが誘導された。これは、SV40 VP1タンパク質がCTLワクチンのプラットフォームとして応用可能であることを示唆している。

ウイルス構造タンパク質を用いたワクチンの開発は、B型肝炎ウイルスのコアタンパク質を組換え体ワクチン製剤として昆虫細胞から調製したことから始まり、このような組換え体ワクチンとしてはB型肝炎ウイルスの他に、ヒトパピローマウイルスのL1タンパク質が知られている。これらのワクチンは、ウイルス粒子の活性を失活させる中和抗体の産生を誘導するだけでなく、ウイルス粒子タンパク質に対するCTLも誘導することから、様々な抗原エピトープ

に対する中和抗体やCTLエピトープに対するCTLを誘導するプラットフォームとしてこれらのウイルス粒子タンパク質を用いる開発が行われてきた。これまでに様々なウイルス粒子、例えば、大腸菌ファージや、酵母ウイルス、植物ウイルス、動物ウイルスなどの、あらゆるウイルス粒子タンパク質を免疫増強プラットフォームに用いようとする研究が行われている。ウイルスに対する中和抗体が反応するエピトープや、CTLエピトープをこれらのプラットフォームに挿入または内包させることで、アジュバントを用いることなく中和抗体やCTLを誘導されることが示唆されている。しかしながら、これらのプラットフォームがエピトープに対する免疫反応を誘導する詳細な分子メカニズムは未だに十分には明らかになっておらず、ウイルスタンパク質プラットフォームを用いた免疫誘導剤の研究開発は発展途上にある。

今回我々は、SV40 VP1タンパク質のDEおよびHIループ領域にA型インフルエンザウイルスM1のHLA-A2 CTLエピトープを挿入したキメラタンパク質

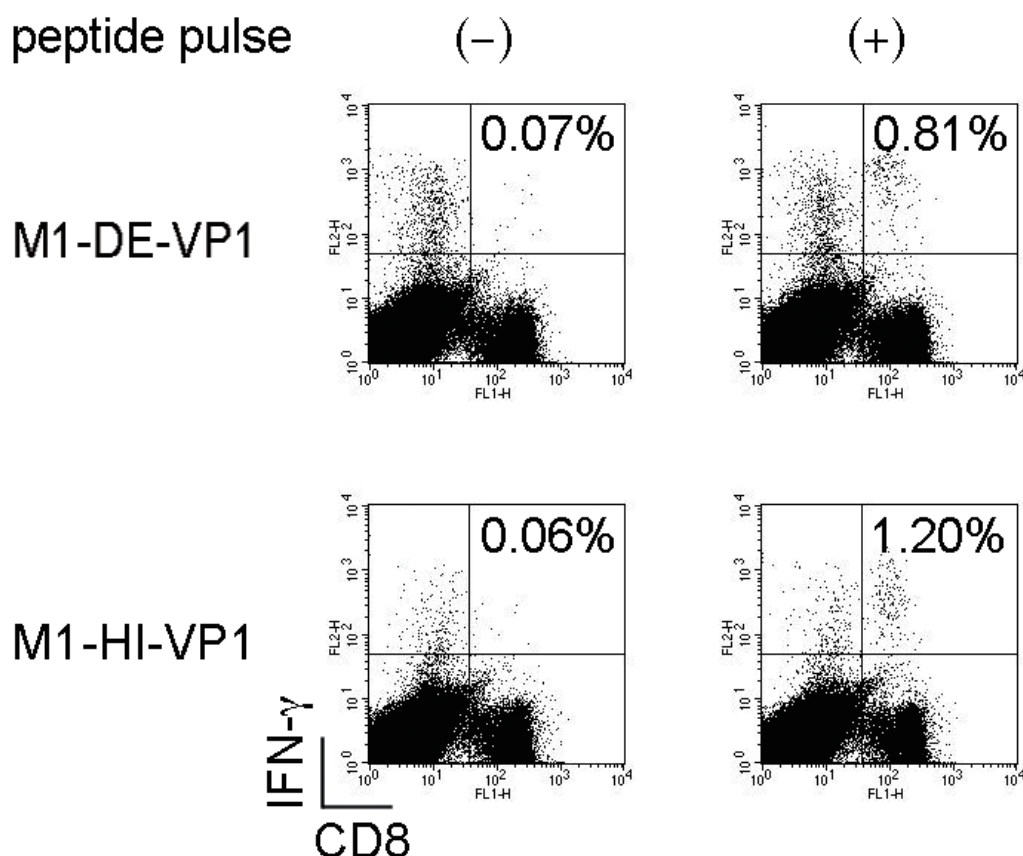


図. HLA-A2トランスジェニックマウスのICS解析. M1-DE-VP1 (上段) およびM1-HI-VP1タンパク質 (下段) をマウス足蹠部に免疫し、免疫1週間後に脾臓を摘出、リンパ球を調製した。調製したリンパ球をM1 CTLペプチド非存在下(左)、存在下(右)で5時間培養し、FITC-抗CD8抗体、及び、PE-抗IFN- γ 抗体で染色し、FACSで解析した。パネル右上の%はリンパ球全体に占めるCD8陽性・IFN- γ 陽性細胞の割合を示している。

を作製し, これを免疫することで目的のCTLエピートープに対するCTLを誘導できることを確認した. この実験においては, マウス1匹当たり50 μ gのキメラタンパク質を免疫しており, キメラタンパク質中に含まれるM1 CTLエピートープとしては, およそ500 ngとなる. 不完全フロインドアジュバントを用いてM1に対するCTLを誘導する場合, 50 μ gのM1 CTLペプチドを2回の免疫をすることで1%弱のCTLが誘導されるので, 不完全フロインドアジュバントを用いたM1ペプチドによるCTL誘導と同等かそれ以上のCTL誘導をペプチド量にして100分の1の量で行えるという計算になるので, M1-DE-VP1およびM1-HI-VP1タンパク質の免疫は極めて効率良くCTLを誘導していることになる. 今後は, このような効率の良いCTL誘導が行われる分子機構を明らかにして行く予定である. 今日, 病原性ウイルスや, がん抗原のCTLペプチドでCTLを誘導することが難しい理由は, ペプチドの体内での滞留性が悪い, ペプチドが速やかに体内で分解してしまう, ペプチドの抗原性を増大するためのアジュバントに強い副作用があるなどの理由によって, 効果的にCTLペプチドを使用することができないことにある. 我々の研究開発しているウイルスタンパク質プラットフォームは, 挿入したペプチドを安定化し, 体内滞留性を上昇させる効果が期待でき, またプラットフォーム自体に抗原性があるのでアジュバントを使わずに効率良くCTLを誘導できることから, 病原性ウイルスやがん抗原CTLペプチドワクチンの効果を増強し, 治療効果を増大させることが期待される.

引用文献

- 1) Kosukegawa A, Arisaka F, Takayama M, Yajima H, Kaidow A, Handa H. Purification and characterization of virus-like particles and pentamers produced by the expression of SV40 capsid proteins in insect cells. *Biochim Biophys Acta* 1996;1290:37-45.
- 2) Ishizu KI, Watanabe H, Han SI, Kanesashi SN, Hoque M, Yajima H, Kataoka K, Handa H. Roles of disulfide linkage and calcium ion-mediated interactions in assembly and disassembly of virus-like particles. *J Virol* 2001;75:61-72.
- 3) Kanesashi SN, Ishizu K, Kawano MA, Han SI, Tomita S, Watanabe H, Kataoka K, Handa H. Simian virus 40 VP1 capsid protein forms polymorphic assemblies in vitro. *J Gen Virol* 2003;84:1899-905.
- 4) Kawano MA, Inoue T, Tsukamoto H, Takaya T, Enomoto T, Takahashi RU, Yokoyama N, Yamamoto N, Nakanishi A, Imai T, Wada T, Kataoka K, Handa H. The VP2/VP3 minor capsid protein of simian virus 40 promotes the in vitro assembly of the major capsid protein VP1 into particles. *J Biol Chem* 2006;281:10164-73.
- 5) Tsukamoto H, Kawano MA, Inoue T, Enomoto T, Takahashi RU, Yokoyama N, Yamamoto N, Imai T, Kataoka K, Yamaguchi Y, Handa H. Evidence that SV40 VP1-DNA interactions contribute to the assembly of 40-nm spherical viral particles. *Genes to Cells* 2007;12:1267-79.
- 6) Enomoto T, Kukimoto I, Kawano MA, Yamaguchi Y, Berk AJ, Handa H. In vitro reconstitution of SV40 particles that are composed of VP1/2/3 capsid proteins and nucleosomal DNA and direct efficient gene transfer. *Virology* 2011;420:1-9.
- 7) Inoue T, Kawano MA, Takahashi RU, Tsukamoto H, Enomoto T, Imai T, Kataoka K, Handa H. Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with the minor capsid proteins VP2/3. *J Biotechnol* 2008;134:181-92.
- 8) Takahashi RU, Kanesashi SN, Inoue T, Enomoto T, Kawano MA, Tsukamoto H, Takeshita F, Imai T, Ochiya T, Kataoka K, Yamaguchi Y, Handa H. Presentation of functional foreign peptides on the surface of SV40 virus-like particles. *J Biotechnol* 2008;135:385-92.
- 9) Kitai Y, Fukuda H, Enomoto T, Asakawa Y, Suzuki T, Inouye S, Handa H. Cell selective targeting of a simian virus 40 virus-like particle conjugated to epidermal growth factor. *J Biotechnol* 2011;155:251-6.
- 10) Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Pèrarnau B. HLA-A2. 1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* 1997;185:2043-51.

研究成果リスト

論文

- 1) Soonsawad P, Xing L, Milla E, Espionza JM, Kawano M, Marko M, Hsieh C, Furukawa H, Kawasaki M, Weerachatanukul W, Srivastava R, Barnett SW, Srivastava IK, Cheng RH. Structural evidence of glycoprotein assembly in cellular membrane compartments prior to alphavirus budding. *J Virol* 2010;84:11145-51.
- 2) Shen PS, Enderlein D, Nelson CD, Carter WS, Kawano M, Xing L, Swenson RD, Olson NH, Baker TS, Cheng RH. The structure of avian polyomavirus reveals variably sized capsids, non-conserved inter-capsomere interactions, and a

possible location of the minor capsid protein VP4. Virology 2011;411:142-52.

- 3) Suda T, Kawano M, Nogi Y, Ohno N, Akatsuka T, Matsui M. The route of immunization with adenoviral vaccine influences the recruitment of cytotoxic T lymphocytes in the lung that provide potent protection from influenza A virus. Antiviral Res 2011;91:252-8.
- 4) Enomoto T, Kukimoto I, Kawano MA, Yamaguchi Y, Berk AJ, Handa H. In vitro reconstitution of SV40 particles that are composed of VP1/2/3 capsid proteins and nucleosomal DNA and direct efficient gene transfer. Virology 2011;420:1-9.
- 5) 半田宏, 川野雅章. ウイルスカプシドタンパク質を利用したDDS用医療材料の創製. Drug Delivery System 2011;26:230.

著 書

- 1) Kawano M, Xing L, Lam KS, Handa H, Miyamura T, Barnett S, Srivastava IK, Cheng RH. Development of Vaccines: From Discovery to Clinical Testing. John Wiley & Sons, Inc. 2011 part 5. design platform of nanocapsules for human therapeutics or vaccines, p.p. 125-41.

学会発表

- 1) Kawano M, Suda T, Akatsuka T, Handa H, Matsui M. Development of a novel platform for CTL-based

influenza vaccine using virus like particles of simian virus 40, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 2011, Sapporo

- 2) Kawano M, Suda T, Ohno N, Akatsuka T, Matsui M. The route of immunization with adenoviral vaccine influences the recruitment of cytotoxic T lymphocytes in the lung that provide potent protection from influenza A virus, 2011 Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, November 2011, Chiba

産業所有権

- 1) 発明の名称：ウイルス外殻構成タンパク質被覆構造体及びその製造方法, 国際公開番号：WO2011/030682 (公開日：2011/3/17), 発明者：半田宏, 土井浩司, 榎本輝也, 川野雅章
- 2) 発明の名称：細胞傷害性T細胞誘導剤, 特願2011-107874, 発明者：半田宏, 川野雅章, 松井政則
- 3) 発明の名称：生理的条件下でのウイルス粒子様構造体及びその形成方法, 特許4734608, 発明者：半田宏, 中西章, 川野雅章
- 4) 発明の名称：細胞傷害性T細胞誘導剤, 特願2011-191208, 発明者：半田宏, 川野雅章, 松井政則
- 5) 発明の名称：細胞傷害性T細胞誘導剤, PCT/JP2012/60910, 発明者：半田宏, 川野雅章, 松井政則