

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

ペプチド表面結合リポソームワクチン用
C型肝炎ウイルス CTL エピトープの同定

研究代表者 高木 徹 (医学部 微生物学)

緒言

Hepatitis C virus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。そして、多くの感染者は、年齢とともに肝硬変、肝臓の経過をたどり死亡する¹⁾。主な治療方法としてはPEG-IFNとリバビリン併用療法があるが、治癒率はわずか50%以下である。また、高価である上に副作用が強いことも知られている²⁾。従って、臨床においてHCVの予防・治療ワクチンの開発は急務である³⁾。

MHCクラスI拘束性CD8⁺Tリンパ球(CTLs)は、様々なウイルス感染の免疫制御に重要な役割を果たしている。HCV感染の場合、急性感染したチンパンジー⁴⁾とヒト^{5,6)}において自然治癒する場合は、強いHCV特異的CTL反応が存在することが知られている。従って、HCV特異的CTLsは、HCVを根絶するために重要だと考えられる。

不飽和脂肪酸からなるリポソームの表面に結合した抗原は、抗原提示細胞(APCs)によってCTLsにcross presentationされることが以前報告された⁷⁾。私は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免疫を行ったところ、免疫マウスで非常に効果的な抗ウイルス反応を示すことを報告した⁸⁾。すなわち、わずか280 ngのリポソームペプチドとCpG 5 µgの1回免疫で、変異株であるLCMV cl 13の感染を完璧に防御することに成功した。さらにCD4⁺T cellのヘルプがなくても、長期のメモリーCTLsが誘導できることを示した。このCTLベースのリポソームワクチンはSARSコロナウイルス⁹⁾のために開発され、マウスをheterosubtypicインフルエンザウイルスから防御するのにも十分効果的だった¹⁰⁾。

以上のことから、本研究では、HCVに対するHLA-A2拘束性エピトープペプチドを用いたワクチン

開発¹¹⁾に引き続き、HLA-A24拘束性のCTLエピトープを同定し、またその中でリポソーム結合に適したエピトープをみつけることにより、有効なHCVワクチンの開発につなげることを試みた。

方法と材料

1. HLA-A 24トランスジェニックマウス(A 24 Tgマウス)

マウスMHCクラスIとβ2ミクログロブリン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*2402(HLA-A24)とヒトβ2ミクログロブリン遺伝子とCD8分子をもつトランスジェニックマウスを使用した。A24Tg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

ペプチドプールリポソームの場合、リポソーム50 µlとCpG 5 µlをマウスのfootpadに免疫し、1週間後ブーストした。単独結合リポソームの場合、リポソーム20 µlとCpG 5 µlを同様にfootpadに免疫をし、1週間後ブーストをした。

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日間培養する。標的細胞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2×10⁶ 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. エピトープ予測

Hepatitis C virus 1a株の遺伝子配列に基づき、HCVを構成するタンパク質のNS3、NS4領域のアミノ酸配列においてHLA-A2、HLA-A24結合モチーフに従い2種類のコンピュータプログラム「BIMAS」「SYFPEITHI」で9個のアミノ酸から成る94種類のエピトープを予測した。HCV 1b株と比較して2つ以上アミノ酸が異なるエピトープは除外した。そのエピトープに相当するペプチドはオペロン社により合成された。

結果

1. エピトープの予測

Hepatitis C virus 1a株の遺伝子配列に基づき、HCVを構成するタンパク質のNS3、NS4領域のアミノ酸配列においてHLA-A2、HLA-A24結合モチーフに従い2種類のコンピュータプログラム「BIMAS」「SYFPEITHI」で9個のアミノ酸から成る94種類のエピトープを予測した。HCV 1b株と比較して2つ以上アミノ酸が異なるエピトープは除外した。HLA-A2 HCV NS4から24種類、HLA-A24 HCV NS3から45種類、NS4から25種類を予測しペプチドを合成し、溶解性により7-10個のペプチドプールにしリポソームに結合した (Table 1)。

2. プールペプチドリポソームのスクリーニング

a) IFN- γ ELISPOT 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、プールペプチドリポソーム免疫マウスの脾細胞と混ぜ2日間培養し測定したところ、グループ1、2、6、7でIFN- γ 産生細胞が認められた。中でもグループ1の4番目(1A#4)、グループ2の1番目(2B#1)のエピトープにおいて高いIFN- γ 産生が認められた(グループ1、2、6、7の結果をFig. 1に示す)。

b) Vaccinia virusチャレンジ実験 : プールペプチド結合リポソーム免疫マウスに 2×10^6 pfuの組み換えVaccinia virusを腹腔注射でチャレンジし5日後に卵巣を摘出しウイルス量を測定した。その結果グループ1、3、5、6においてウイルスの感染が防御された (Fig. 2)。

3. 単独ペプチド結合リポソーム

これまでのスクリーニングで結果の良好だった(1A#4)と(2B#1)のペプチドを合成し、単独でリポソーム表面に結合し免疫を行った。⁵¹Cr Release assayでは(1A#4)は活性は見られなかったが(2B#1)で強いCTL活性が認められた (Fig. 3)。IFN- γ ELISPOT assayでは2つのエピトープ共に良好な反応を示した (Fig. 4)。Vaccinia virusチャレンジ実験では(2B#1)が感染を防御した (Fig. 5)。

考察

HCV 1aを構成するタンパク質から2種類のリポソーム結合に適したエピトープが同定された。(2B#1)は既に同定・報告されているエピトープだが新規に同定した(1A#4)同様にリポソーム表面に結合させると、

Table 1. 合成したHCV由来ペプチド

NS3-A24 (45)	NS4-A24 (25)	NS4-A2 (24)
A: 10	A: 5	A: 5
B: 16	B: 4	B: 5
C: 14	C: 10	C: 3
D: 5	D: 6	D: 10

A:DWで溶解 B:<1N NaOH 10ul C:>1N NaOH 10ul D:不溶

1: A (10)	Group 1	6: A (5)	Group 6	8: A (5)	Group 8
2: B (8)	Group 2	B (4)		B (2)	
3: B (8)	Group 3	7: C (10)	Group 7	9: B (3)	Group 9
4: C (7)	Group 4			C (3)	
5: C (7)	Group 5				

計94種のペプチドを溶解性によりA : DWで溶解, B : <1N NaOH 10 μ lで溶解, C : >1N NaOH 10 μ lで溶解, 不溶の4つに分け, 溶解性の高い順から9つのグループに分けプールした。

効率良くIFN- γ を産生した。また(2B#1)においては強いCTL活性を示したが(1A#4)では確認されなかった。Vaccinia virusチャレンジ実験では(2B#1)のみが強いウイルス感染防御効果を示した。またVaccinia virusチャレンジ実験でグループ3, 4, 6, 7においても良好なウイルス防御が見られたため、これらのグループにもリポソーム結合に適した抗ウイルス効果を発揮するエピトープがあると考えられるため更に検討を繰り返している。

以上より現在の時点では(2B#1)がHCVに対して効果の高いワクチンになり得ることが示唆されている。

なお日本人のHLAの型は約30%がHLA-A2, 約50%がHLA-A24である。従って日本人の約80%はHLA-A2, A24のいずれかを所有している。我々の研究室ではHLA-A2の有効なエピトープを既に同定している(#3 YMNTPLPV)。そのエピトープと今回のHLA-A24のエピトープ合わせれば日本人の約80%に有効なワクチンになると考えられる。予防ワクチンとしてはまだ不十分であるがもし慢性肝炎の治療に使用できれば、十分に実用性を備えていると考えられる。この期待のもと現在、組み換えアデノウイルスを用い治療実験を行っている。

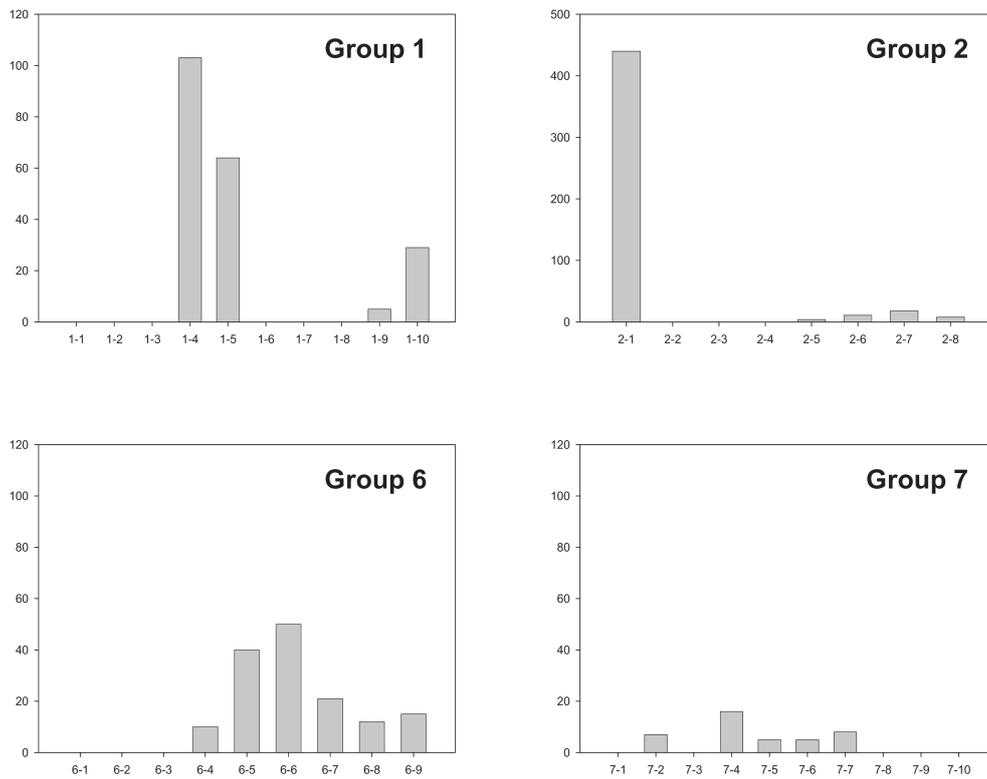


Fig. 1. Screening of pool Liposome 1-7. Each HLA-A24 Tg mouse received (f.p.) 50 μ l of pooled liposome containing 5 μ g of CpG. Spleen cells were prepared seven days after the last immunization for ELISPOT assays.

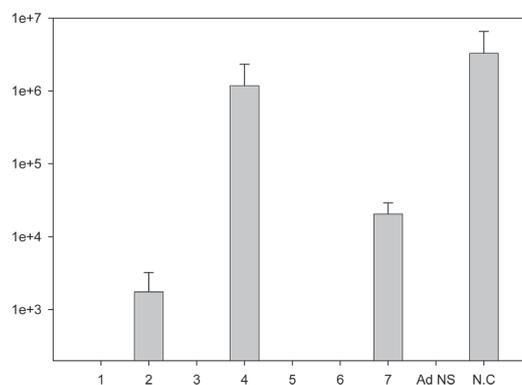


Fig. 2. Challenge experiments. The immunized and naïve mice were challenged at one week after the last immunization with 2×10^6 PFU of VV-NS3 or NS4 (i.p.) and the virus titers in the ovaries were quantitated by plaque assays on BS-C-1 cells at day 5 postchallenge. A dotted line represents the lower limit of detection (2×10^2 PFU/gram [spleen]).

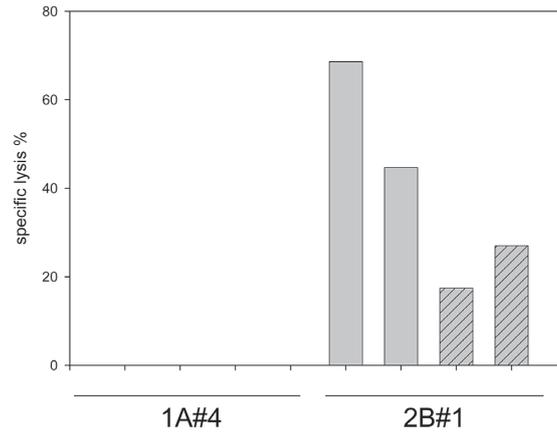


Fig. 3. ⁵¹Cr Release assay. Each HLA-A24 Tg mouse received (i.p.) 20 μ l of Lip-1A#4 or Lip-2B#1 diluted in 30 μ l of PBS containing 5 μ g of CpG. Spleen cells were prepared seven days after the last immunization for ⁵¹Cr release assays. E/T ratio was 100:1 (gray bars) and 30:1 (hatched bars). Data of two independent experiments are shown as two bars.

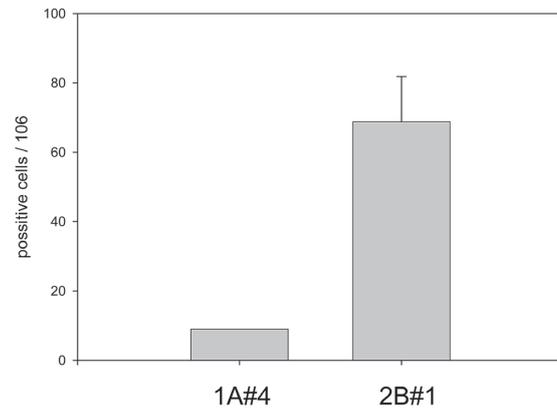


Fig. 4. ELISPOT (IFN- γ) assay. Each HLA-A24 Tg mouse received (i.p.) 20 μ l of Lip-1A#4 or Lip-2B#1 diluted in 30 μ l of PBS containing 5 μ g of CpG. Spleen cells were prepared seven days after the last immunization for ELISPOT assay.

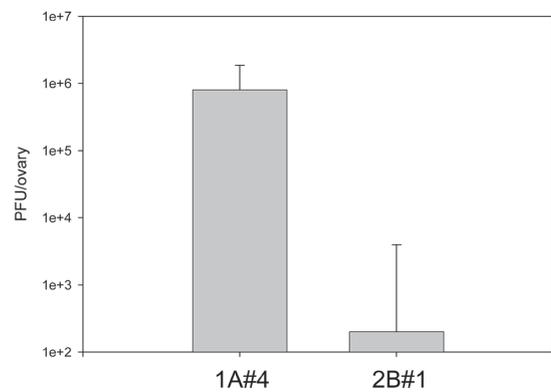


Fig. 5. Challenge experiment. The immunized and naïve mice were challenged at one week after the last immunization with 2×10^6 PFU of VV-NS3 or NS4 (i.p.) and the virus titers in the ovaries were quantitated by plaque assays on BS-C-1 cells at day 5 postchallenge. Mean values of virus titers of at least three mice/group are shown. A dotted line represents the lower limit of detection (2×10^2 PFU/gram [spleen]).

研究成果リスト

- 1) Takagi A, Kobayashi N, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Coupling to the surfaces of liposomes alters the immunogenicity of hepatitis C virus-derived peptides and confers sterile immunity. BBRC (2012) submitted.

Reference List

- 1) Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL and Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med* 2006;144:705-14.
- 2) Pawlotsky JM. Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication. *Hepatology* 2006;43: S207-20.
- 3) Callendret B, Walker C. A siege of hepatitis: Immune boost for viral hepatitis. *Nat Med* 2011;17:252-3.
- 4) Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999;10:439-49.
- 5) Gruner NH, Gerlach TJ, Jung M-C, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, Hoffmann R, Zachoval R, Santantonio T, Cucchiari M, Cerny A, Pape GR. Association of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis* 2000;181:1528-36.
- 6) Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Philips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful

- immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191:1499-512.
- 7) Taneichi M, Ishida H, Kajino K, Ogasawara K, Tanaka Y, Kasai M, Mori M, Nishida M, Yamamura H, Mizuguchi J, Uchida T. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8⁺ T cells and induce potent antitumor immunity. *J Immunol* 2006;177:2324-30.
- 8) Takagi A, Matsui M, Ohno S, Duan H, Moriya O, Kobayashi N, Oda H, Mori M, Kobayashi A, 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.
- 9) Ohno S, Kohyama S, Taneichi M, Moriya O, Hayashi H, Oda H, Mori M, Kobayashi A, Akatsuka T, Uchida T, Matsui M. Synthetic peptides coupled to the surface of liposomes effectively induce SARS coronavirus-specific cytotoxic T lymphocytes and viral clearance in HLA-A*0201 transgenic mice. *Vaccine* 2009;27:3912-20.
- 10) Matsui M, Kohyama S, Suda T, Yokoyama S, Mori M, Kobayashi A, Taneichi M, Uchida T. A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A*0201 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:1494-9.
- 11) Takagi A, Kobayashi N, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Coupling to the surfaces of liposomes alters the immunogenicity of hepatitis C virus-derived peptides and confers sterile immunity. BBRC (2012) submitted.