

## 報告書

平成14年度 丸木記念特別奨学研究費B 研究実績報告書

## C型肝炎ウイルス (HCV) に対するCTLワクチンの開発： HLA-A2 transgenic, H-2 class I knockout mouseを用いたHCV特異的 CTL誘導免疫法の研究

受賞者 松井 政則 (埼玉医科大学微生物学教室)

共同研究者 赤塚 俊隆\*

【緒言】C型肝炎ウイルス (HCV) 感染症において、細胞傷害性T細胞 (CTL) はウイルス除去に中心的な役割を担う。しかし、その抗原認識機構および活性化機構が複雑であるため、HCV特異的CTLを効率よく誘導するワクチンはまだない。我々は、HCVに対するCTLワクチンを開発する目的で、HCV特異的CTLを効率よく誘導する免疫方法をマウスで検討している。最近我々は、強力な抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) に、組み換えアデノウイルス (AdV) を用いてin vitroでHCV由来エピトープを発現させ、そのDCをマウスに免疫する方法が有効であることを示した (Vaccine 21: 211-220, 2002)。しかし、この方法は、DCを調整する費用と手間がかかる。そこで、DCを使わない方法として、DNAワクチンを試みることにした。DNAワクチンは、体液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導できる、簡便で安全な方法として注目を浴びている。しかし、免疫誘導効率が悪く、方法を改善する必要がある。最近、抗原蛋白を発現するDNAで一次免疫し、同じ抗原を発現する組み換えウイルスで二次免疫する、プライム・ブースト免疫法が開発された。この方法は、DNAワクチンの繰り返し免疫より効率がよく、HIV感染症では既に臨床実験が始まっている。我々は、さらに効率を向上させるため、HCVコア蛋白を発現するプラスミドとTh1細胞を誘導するIL-12発現プラスミドを混ぜて一次、二次免疫し、HCVコア蛋白を発現するAdVで三次免疫することで、効率よくHCVコア特異的CTLが誘導できることを報告した (Vaccine 21: 1629-1639, 2003)。以上の実験は通常のマウスを用いたため、マウスのHCV特異的CTL反応を調べたに過ぎない。我々は次の段階として、上述の免疫方法でヒトのHCV特異的CTLを効率よく誘導できるかどうかを調べたいと思った。最近、パスツール研究所・Lemonnier博士はマ

\*埼玉医科大学微生物学教室

ウスMHCクラスIと $\beta$ 2-マイクログロブリン ( $\beta$ 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とヒト $\beta$ 2-m遺伝子をいれたトランスジェニックマウスを作製した (HHDマウス)。このマウスは極めて免疫反応性が高く、普通のHLAクラスIトランスジェニックマウスでは難しい免疫原性の弱いHCV蛋白に対してもHLA-A2拘束性のCTL反応を誘導することができる。このマウスを用いて、本研究ではA) 新しいサイトカイン、IL-23, IL-27のDNAワクチンにおけるアジュバント効果について、及び、B) 既に報告された24種のHLA-A\*0201関連HCV由来エピトープの免疫原性について検討した。

A) 新しいサイトカイン、IL-23, IL-27のDNAワクチンにおけるアジュバント効果について (J. Virol. in press 2004)

【目的と意義】最近、IL-12と構造的・機能的に類似するサイトカイン、IL-23とIL-27が発見された。IL-23とIL-27はIL-12と同様に、細胞性免疫に重要なTh1細胞を誘導するが、Th1細胞のそれぞれ異なる分化段階に作用すると言われている。また、IL-12はCTL誘導に重要な働きをすることは多くの論文で示されたが、IL-23とIL-27についてはあまりわかっていない。我々は、上述のプライム・ブースト免疫法に適用して、IL-23およびIL-27がHCV特異的CTL誘導に対してアジュバント効果があるかどうかを検討した。

【材料と方法】1) マウス：上述のHHDマウスを使用した。2) 免疫：HCV蛋白発現プラスミドとIL-12, -23, -27発現プラスミドをそれぞれ混ぜて2回筋注し、その後、HCV蛋白を発現する組み換えアデノウイルスでブーストした。3) ペプチド：既知のHLA-A\*0201関連HCV由来ペプチド7種類を使用した。4) CTL活性：免疫2-3週間後、脾細胞をin vitroでペプチド刺激し、 $^{51}\text{Cr}$ 遊離試験で測定した。5) CD8(+)/細胞内IFN- $\gamma$ 陽性細

胞：免疫マウス脾細胞をペプチドと一緒に5時間培養し、フローサイトメトリーで測定した。6) ELISPOT：IFN- $\gamma$  産生細胞数をELISPOT法で測定した。

**【結果と考察】**HCV蛋白発現プラスミドのみで免疫したマウスに比べ、IL-12、-23, または-27発現プラスミドと一緒に投与したマウスで、HCV特異的CTLの誘導が増強された。また、IL-12, IL-23, IL-27を混ぜて投与することで、相乗的なアジュバント効果が見られた。さらに、IL-12、-23, または-27発現プラスミドのみを事前に二度投与 (pre-injection) して、HCV蛋白を発現する組み換えアデノウイルスで免疫すると、HCV特異的CTLの誘導が増強された。従って、IL-23, IL-27にIL-12同様HCV特異的CTL誘導においてアジュバント効果があることが示され、プライム・ブースト免疫法におけるIL-23, IL-27の有用性が示唆された。

B) 24種類のHLA-A\*0201関連HCV由来エピトープの免疫原性について

**【目的と意義】**HCVのCTLワクチン開発のために、今まで多くのHCV由来エピトープが同定された。特にHLA-A\*0201は世界的に最もポピュラーなアレルであるため、30種類近くのHLA-A\*0201関連HCV由来エピトープが見つかった。しかし、効率のよいワクチンにするためには、免疫原性の高いエピトープ、すなわちドミナントエピトープを使う必要がある。本研究では、HHDマウスを用いて、既に報告されている24種類のHLA-A\*0201関連HCV由来エピトープについ

て、CTLの反応性、及びIFN- $\gamma$  陽性細胞数より検討し、ドミナントエピトープを探した。

**【材料と方法】**1) マウス：HHDマウスを用いた。2) 免疫：マウス骨髄細胞をGM-CSFとLPSで培養しDCを調整した。そして、組み換えアデノウイルスをin vitroで感染させてHCV蛋白を発現させ、マウス腹腔内に注射した。3) ペプチド：既知のHCV由来ペプチド24種類(core, 3; E1, 3; E2, 3; NS3, 5; NS4, 7; NS5A, 3)を用いた。4) CTLアッセイ：免疫2-3週後、脾細胞をin vitroでペプチド刺激し、<sup>51</sup>Cr遊離試験でCTL活性を測定した。5) ELISPOT：免疫したマウス脾細胞を調整しペプチドで刺激して、IFN- $\gamma$  産生細胞数をELISPOT法で測定した。6) 細胞内IFN- $\gamma$ ：免疫したマウス脾細胞をペプチドと一緒に5時間培養して、CD8陽性細胞内IFN- $\gamma$  陽性細胞をフローサイトメトリーで測定した。

**【結果と考察】**24種類のペプチドのうち約半数が、高いCTL活性を示したが、反応性の極めて低いエピトープも数個存在した。これは、ELISPOTアッセイやFlow cytometryの結果とほぼ一致したが、なかには一致しないものも存在した。現在HHDテトラマーでさらに解析中である。HCV蛋白は生体で有害に働く場合があることが知られており、このように複数のドミナントエピトープを探しだしてHCV蛋白の代わりに抗原として利用できれば、効率よく安全なワクチンになりうると思われる。