

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19116

研究課題名(和文) 非天然アミノ酸を用いた新規T細胞誘導型ペプチドワクチン開発の基礎研究

研究課題名(英文) Induction of vaccine-elicited T cell responses by non-natural amino acids

研究代表者

本園 千尋 (Motozono, Chihiro)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10642910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、腫瘍ならびにウイルス感染症において、T細胞誘導型の治療ならびに予防ワクチンの開発が進められているが、どのようなT細胞応答を誘導すれば有効であるのか明らかではない。本研究により、抗ウイルスT細胞応答は野生型抗原によって規定されている可能性が明らかになった。このことは、適切な抗原の選択することがウイルス感染に対するワクチンを考える上で重要であること示唆しており、合理的なT細胞誘導型のワクチン開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Understanding functional characteristics of T-cell responses associated with effective elimination of pathogenic retroviruses or tumors is crucial for the development of vaccines. In this study, we demonstrated that the use of an appropriate epitope preferentially induces functional T cell responses in the early phase of acute retroviral infection that contribute to the effective antiviral protection, providing a better information for the development of vaccine.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 ウイルス感染 ペプチド免疫

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍ならびにウイルス感染症において、T細胞誘導型の治療ならびに予防ワクチンの開発が進められている。しかしながら、どのようなT細胞応答を誘導すれば有効であるのか、その分子機序は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究ではウイルスの感染防御に関わるT細胞応答の特性を明らかにすることで、機能的な抗ウイルスT細胞免疫応答を誘導する分子基盤の確立を目的とした。さらに、これらを基にして、T細胞の抗原認識に重要なアミノ酸を置換した改変ペプチドを用いて、機能的な抗ウイルスT細胞免疫応答が誘導出来るかについて検討を行なった。

3. 研究の方法

(1) ウイルス感染制御に関わる抗原ペプチドの同定

我々はマウスレトロウイルスであるフレンドウイルス(FV)感染におけるCD4陽性T細胞応答をモデルとして検証を行った。これまでに同定した様々なCD4抗原エピトープについてマウス個体にペプチド免疫し、ウイルス感染後の生存率について調べた。

(2) ペプチド-MHC 4量複合体(MHCテトラマー)を用いたT細胞の検出

昆虫細胞の発現系を用いてペプチド-MHC複合体タンパク質を調製した。MHCテトラマーを用いて、ウイルス感染後のT細胞応答を検出した。

(3) アラニン置換ペプチドに対するT細胞の交差反応性解析

抗原ペプチドの各アミノ酸部位をアラニンに置換した改変ペプチドを作成し、抗原刺激に伴うサイトカイン産生を指標として、T細胞の変異ペプチドに対する応答性を調べた。

(4) 改変ペプチドを用いた機能的T細胞の誘導に関する検討

T細胞の抗原認識に重要なアミノ酸を置換

した改変ペプチドを用いて、機能的な抗ウイルスT細胞免疫応答が誘導出来るか検討を行なった。

4. 研究成果

(1) i18ペプチド免疫操作によりFV感染に対して抵抗性を示す。

これまで同定した複数のCD4エピトープの内、i18ペプチド(peptide i)は唯一回の免疫操作でフレンドウイルス感染に対し強い抵抗性を示した。しかしながら、fnエピトープ(peptide fn)では50%しか抵抗性を示さなかった(図1)。比較対象としてCFAアジュバントのみを免疫した個体はFV感染後、50日以内にすべて死亡した。このことから、i18特異的CD4陽性T細胞がFV感染における感染制御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

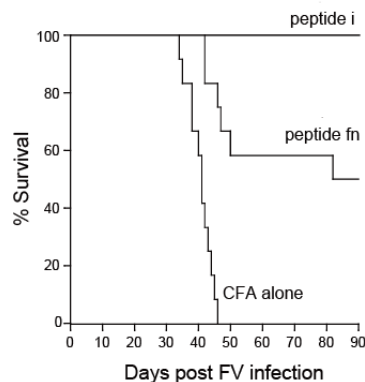


図1 ペプチド免疫した個体におけるウイルス感染後の生存率

(2) i18ペプチド特異的T細胞はFV感染早期に誘導される。

FV感染制御に寄与するCD4陽性T細胞の特性を明らかにするため、テトラマーを用いてFV感染後に誘導される抗原特異的T細胞を検出した。FV感染に対して強い感染防御能を与えるi18ペプチドは、fnペプチドに比べて、ウイルス感染後、早期に抗原特異的CD4陽性T細胞を誘導することが明らかになった(図2)。

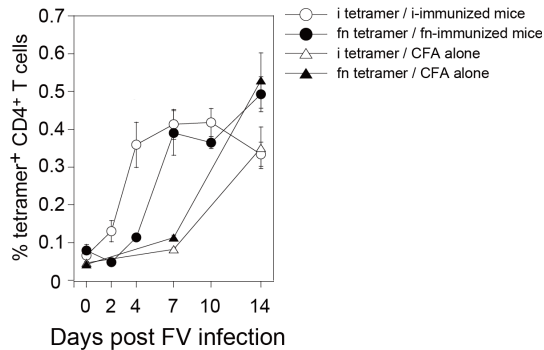


図2 FV感染後に誘導される抗原特異的T細胞の経時的解析

(3) T細胞の交差反応性

i18およびfnエピトープ特異的T細胞の抗原認識特性を明らかにするため、それぞれのアラニン置換した改変ペプチドに対する応答性を調べた。その結果、異なる個体間において、i18特異的T細胞の変異ペプチドに対する応答性は共通していたが、fn特異的T細胞では各変異ペプチドに対する応答性が個体間でそれぞれ異なっていた。このことから、ウイルス感染阻止に寄与するi18ペプチドは個体間で共通した抗原認識能を有するT細胞を誘導するのに対し、弱い感染防御能を与えるfnペプチドは抗原認識能が異なるfn特異的T細胞を誘導する可能性が明らかになった。

(4) 改変ペプチドを用いた機能的T細胞の誘導

上記のT細胞の変異ペプチドに対する応答性解析の過程で、fn特異的T細胞に強く認識されるアラニン置換ペプチドを同定した。そこで、感染防御能が弱いfnペプチドに着目し、改変ペプチドを用いて機能的なT細胞応答を誘導出来るか検討を行った。fnペプチドの一部をアラニンならびに非天然アミノ酸に置換した改変ペプチドを用い、抗原刺激に伴うサイトカイン産生を指標として、fn特異的T細胞に強く認識される改変ペプチドの探索を行なった。その結果、野生型に比べて強く認識される改変ペプチドを複数同定した。しかしながら、それらの改変ペプチドを免疫

したマウス個体におけるFV感染後の生存率に有意な上昇は認められなかった。このことは、ウイルス感染によって誘導されるT細胞の機能は、野生型の抗原によって規定されている可能性が示唆された。

(5) 結論

本研究では、ウイルス感染防御能が異なる抗原を同定し、それらをモデルとして、ウイルス感染制御に関わる抗原特異的T細胞応答の特性を解析した。その結果、T細胞の抗ウイルス機能は抗原によって大きく異なっていた。このことは野生型抗原によってT細胞の抗ウイルス機能が規定されている可能性を示唆している。本研究より、適切な抗原の選択することがウイルス感染に対するワクチンを考える上で重要であること示唆され、本研究の成果は合理的なT細胞誘導型のワクチン開発に繋がると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

S. Takamura, H. Yagi, Y. Hakata, C. Motozono, SR. McMaster, T. Masumoto, M. Fujisawa, T. Chikaishi, J. Komeda, J. Itoh, M. Umemura, A. Kyusai, M. Tomura, T. Nakayama, DL. Woodland, JE. Kohlmeier, M. Miyazawa.

Specific niches for lung-resident memory CD8+ T cells at the site of tissue regeneration enable CD69-independent maintenance. *J Exp Med.* 213(13): 3057-3073, 2016. 査読有、DOI: 10.1084/jem.20160938

C. Motozono*, JA. Pearson*, Evy De Leenheer, PJ. Rizkallah, K. Beck, A. Trimby, AK. Sewell**, FS. Wong** and DK. Cole**. *,** Contributed equally
Distortion of the MHC class I binding

groove to accommodate an insulin-derived 10-mer peptide. *J. Biol. Chem.*, 290(31): 18924-18933, 2015. 査読有

DOI: 10.1074/jbc.M114.622522

C. Motozono, JS. Bridgeman, DA. Price, AK. Sewell and T. Ueno. Clonotypically similar hybrid TCRs can exhibit markedly different surface expression, antigen specificity and cross-reactivity, *Clin. Exp. Immunol.*, 180(3): 560-70, 2015. 査読有、DOI: 10.1111/cei.12610

[学会発表](計3件)

C. Motozono, S. Tsuji-Kawahara, S. Takamura, M. Miyazawa. Vaccine-elicited preferential induction of polyfunctional Th cells is associated with protection against acute retroviral infection International congress of Immunology, August 21-26, 2016, Melbourne, Australia.

C. Motozono, S. Tsuji-Kawahara S. Takamura, H. Yagita, M. Miyazawa. Vaccine-elicited preferential induction of germinal center follicular helper T cells is associated with protection against retroviral infection.

第44回日本免疫学会学術集会. 2015年11月18-20日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

S. Tsuji-Kawahara, Y. Kawasaki, **C. Motozono**, S. Takamura, M. Miyazawa.

B cell-intrinsic TLR signaling is required to prevent the generation of recombinant viruses following retrovirus infection.

第44回日本免疫学会学術集会. 2015年11月18-20日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).

[その他]

ホームページ等

<http://www.eye.med.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

本園 千尋 (Motozono Chihiro)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号: 10642910