

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08822

研究課題名(和文)細胞内タンパク質分解に着目したデングウイルスワクチン開発のための基盤的研究

研究課題名(英文)Fundamental analysis based on protein processing for dengue vaccine development

研究代表者

水上 修作(Mizukami, Shusaku)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：00508971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、デング熱に効果的な細胞性免疫を誘導するウイルス由来ペプチドの同定を、ウイルス感染肝細胞・樹状細胞から回収されたペプチド配列の比較で目指すこととした。その際、既に情報を有していたその他の細胞等の調製とは異なり、実験に必要な大量の肝細胞の準備に足る実験系の構築に時間を要した。結果として、従来の樹立方法と異なり分化途中での凍結融解を含む新たな樹立方法を構築した。今回、デングウイルス感染実験とその後の解析に至らなかったため、自己資金等で計画を続行予定である。構築した新たな肝細胞株誘導法は、肝臓を標的とする多くの疾患の研究に有用である。そのため、幅広い研究に貢献できる成果が得られたと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初の目的であったデング熱に対して有効な細胞性免疫を誘導するペプチド配列(エピトープ)パターンの同定には、計画期間中に至ることが出来なかった。一方、副産物としてはあるが、iPS細胞からの新たな肝細胞株樹立方法を構築し、論文等による成果公表を準備中である。これは、デング熱のみならず肝臓が感染部位となる多くの感染症を含む疾患の研究に活用可能な技術であり、学術的意義と社会的な意義を有すると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to identify virus-derived peptide pattern that induce effective cellular immunity against dengue virus infection by comparing peptide sequences recovered from virus-infected hepatocytes and dendritic cells.

At that time, it took time to construct an experimental system sufficient for preparation of a large number of hepatocytes necessary for experiments, unlike other cells which information was already obtained. As a result, we constructed a new establishment method including freeze-thaw during the preparation, unlike the conventional method.

Infection and analysis of the results using dengue virus were not conducted by the end of the period, so this project will be continued with other budgets. The constructed new liver cell line induction method is useful for research on many liver diseases. Therefore, we believe that our study will contribute to wide range of researches.

研究分野：Immunology

キーワード：iPS cell dengue protein processing liver cells dendritic cells

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

デング熱はデングウイルスが引き起こす蚊媒介性の熱性疾患であり、温暖化などに伴い流行地域拡大・患者数増大が認められている。本邦でも毎年輸入感染例を認めており、近年では国内感染例も確認されている。病態は、不顕性から重症例まで幅広く、死に至ることもある。ワクチン開発は急務であり、多くの開発研究が行われているが、そのほとんどが液性免疫(中和抗体)誘導を念頭に置いたものであり、本研究開始時点で最も進んでいたものが Sanofi-Pasteur が開発した CYD-TDV であった。このワクチンは4種全ての血清型の組換えウイルスを含み、第3相臨床試験でも50%以上の奏効率を示した¹。その結果を受けて、フィリピン・メキシコなどで Dengvaxia として承認を受けたが、その後、フィリピン国内において、同ワクチンを接種後に初回のデングウイルス感染をした患者が接種を行わなかった者と比較して重篤な症状を示したとの報告がなされた²。この有害事象は、感染時に誘導されたウイルスに結合は出来るものの中和活性を持たない抗体がウイルスの細胞内への取り込みを促進した結果と考えられている。この事象により、フィリピンでの同ワクチンの使用は中止された。加えて、前述の臨床試験において、ワクチン接種後の血中抗体価と感染防御の相関が強くなかったことから、液性免疫と相対する細胞性免疫のデングウイルス感染防御における役割に関心が高まった。

2. 研究の目的

細胞性免疫における主要なエフェクター細胞である抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞(Cytotoxic T lymphocyte; CTL)がデング熱の重症化を防ぐことは、既にマウスモデルでの実験結果として報告されていた^{3,4,5}。ヒトのデング熱での関与については検討が十分ではなかったが、マウス同様に CTL が感染及び重症化予防に重要であると推測された。そこで、「ヒトでのデングウイルス感染において細胞性免疫がどの程度関与しているのか?」を解くべき学術的「問い」として、研究成果をより良いワクチンの開発に生かすべく研究計画を立案した。本研究では、前述の「問い」の *in vitro* 及び *in vivo* 実験を用いた説明、並びに、その過程での CTL を強く活性化しデングウイルス感染防御につながる抗原(ウイルス由来のペプチド配列)の選定を目的とした。

3. 研究の方法

細胞性免疫の主要なエフェクター細胞である抗原特異的 CTL は、ウイルスに感染した樹状細胞(dendritic cell; DC)などの抗原提示細胞(antigen presenting cell; APC)からのシグナルを受けたナイーブ CD8 陽性 T 細胞から分化誘導される。その分化誘導は、細胞内で分解されたウイルス由来タンパク質の一部(エピトープペプチド)が細胞膜上の主要組織適合抗原(major histocompatibility complex; MHC)クラス I と結合した複合体と T 細胞受容体が結合することにより引き起こされる。CTL は自らを誘導した APC 上に提示されていたものと同じ MHC クラス I + エピトープ複合体を提示した標的細胞に出会った際にのみ、その細胞を傷害可能である。デングウイルス感染時の免疫反応の強さに、MHC クラス I (ヒトでは human leukocyte antigen (HLA)-A, B, C)のアレルが影響することは既に報告されている⁶。MHC クラス I はアレルごとに親和性が高いペプチドのパターンが異なり、その配列はデータベース(<https://www.iedb.org/>)などで確認可能である。この親和性が CTL 活性に重要であることは知られているが、優れた CTL を誘導するエピトープの選定に重要なのは MHC クラス I との親和性だけではない。

前述の通り、CTL は「自らを誘導した DC 上に提示されていた MHC クラス I + エピトープ複合体

を提示した標的細胞に出会った際にも、その細胞を傷害可能である」(図1)。APC及び標的細胞に感染したウイルスを構成するタンパク質は細胞内の酵素により分解され、その一部がMHCクラスIと結合し、細胞膜表面に提示される。もし、APCと標的細胞内で分解により生成されるペプチドレパートリーが同一であれば、優れたエピトープ候補の選定は比較的容易である。MHCクラスIとの親和性が高く、エピトープ産生に関わる主要なタンパク質分解酵素であるプロテアソームの標準的な切断パターンにより過剰に分解されない配列を選べば良い。しかし、プロテアソームは、サイトカイン環境などにより構造を変え、その変化はタンパク質やペプチドの切断パターンに影響を及ぼす^{7,8}。そのため、APCと標的細胞では産生されるペプチドレパートリーは異なると予想された。

研究代表者は、実際にデングウイルスが感染したAPCと標的細胞からのMHCクラスIエピトープ回収、及び、配列確認を計画した。そのうえで、回収の後に各エピトープを、A)APC上にのみ、B)標的細胞上にのみ、C)両者に、提示されるものの3群に分け、各群のCTL誘導及びその活性検討により、どのようなエピトープが免疫誘導に適したペプチドなのかを検討することとした。研究開始前の仮説としては、C)のペプチドこそが、感染細胞を効率良く傷害可能なCTL(及び防御免疫)を誘導する優れた抗原であるとの結果が得られると予想した。

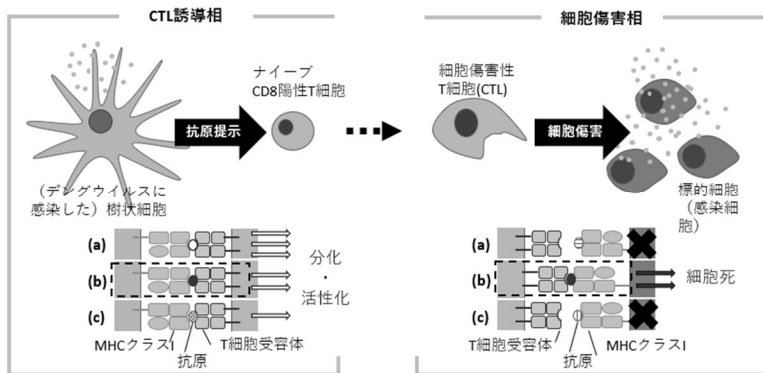


図1: デングウイルスに対する特異的CTL誘導と標的細胞傷害の模式図 (a)~(c)は、デングウイルス感染時の、CTLの活性化(左)、及び標的細胞傷害(右)における、MHCクラスIと抗原エピトープ及びT細胞受容体を模式的に示している(今回、MHCクラスIは1種類のみとした)。(b)のようにDCと標的細胞上のMHCとエピトープペプチドが同じ組み合わせの場合は、分化したCTLは標的細胞を傷害できる。一方、(a)、(c)のようにその組み合わせが異なると傷害は出来ない。

4. 研究成果

(1) 実験のデザイン・各種承認の取得:

本研究では、ヒト由来のDC(APC)・肝細胞に *in vitro* でデングウイルスを感染させ、MHCクラスI(ヒトの場合は、HLA-A, B, C)に結合したエピトープペプチドを解析する計画とした。エピトープの配列確認には質量分析装置(LC-MS)を使用することとしたが、この解析に足る十分な細胞数を可能な範囲で均一な条件で準備する必要があった。特にヒト肝細胞をドナーから直接採取することは現実的ではなく、細胞株の樹立が必須と考えられた。そのため、肝細胞株は新たに樹立したiPS細胞から分化誘導することとした。加えて、DC株も末梢血単核細胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMC)から樹立することとした。一方、抗原提示の強度を反応性で評価するためのT細胞は末梢血から十分な量を確保できると考え、実験の度に採血で得ることとした。これにより、同一ドナーから、肝細胞・DC・T細胞を得ることが可能となった。次いで、長崎大学熱帯医学研究所内の倫理委員会及び長崎大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会に、実験計画を提出し、ヒト試料の使用に関する承認を得た。

(2) 実験系の構築:

本研究には、肝細胞・DC・T細胞の準備と、肝細胞・DCへのデングウイルス感染系、感染細胞との共培養によるT細胞活性化評価系が必要であった。我々はDC株の樹立・分化誘導及びT細胞の回収・精製には既に経験を有しており、また、LC-MS解析、デングウイルス感染実験に関しても同様であった。そのため、実験系の樹立にあたっての課題は質的量的に十分な肝細胞の準備と考えられた。

(3) 細胞の調製及びその後の実験について：上記実験計画の承認の後に、選定されたドナーから末梢血を回収し、各細胞の準備に取り掛かった。DCとT細胞は調製法については早期に確認が出来た。末梢血を各種申請のうちに、京都大学iPS財団に送付して、iPS細胞を作製した。その後、完成したiPS細胞4クローンのうちの1つを用いて肝細胞への分化誘導を開始した。結果として分化誘導には成功したが、従来のプロトコールでは誘導に15日の連続培養を要したため、大量の肝細胞株を必要とする本計画には不向きと判断した。そのため、肝前駆細胞までの分化誘導後に凍結保存と融解後の分化継続を可能にする新たな実験系の構築を試み、成功した。これにより、肝細胞株の大量調整が現実的に可能になった。現在、十分量の肝細胞株の調製中である。また、この調製法については、論文での成果公表を準備中である。これらの準備に時間を要したため、研究期間中にデングウイルスを用いた感染実験と解析には至らなかった。しかしながら、必要な解析技術及び細胞等の準備に目途は立った。そのため、研究期間終了後にはなるが自己資金で予定されていた計画を継続し、完了する予定である。

(4) まとめ：

今回、予定されたスケジュール通りに研究計画が遂行できなかったことに対しては十分な反省が必要と考える。しかしながら、今回構築した新たな肝細胞株誘導法（一時凍結法）は、デング熱以外の肝臓を標的とする多くの疾患の研究にも有用である。そのため、結果として、幅広い研究に貢献できる成果が得られたと考えている。

<参考文献>

1. Capeding et al. Lancet.2014;S0140-6736(14): 61060-6.
2. Halstead et al. Vaccine. 2017;35(47):6355-6358.
3. Zellweger et al. J Virol. 2015;89(12):6494-505.
4. Zellweger et al. J Immunol.2014;193:4117-4124.
5. Yauch et al. J Immunol.2009;182(8):4865-73.
6. Mercado et al. PLoSOne. 2015;10(2):e0115619.
7. Akiyama et al. Science. 1994;265(5176): 1231-4.
8. Yamano et al. J Biol Chem.2008;283(42):28060-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特記事項無し。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	片上 幸美 (Katagami Yukimi) (60722296)	長崎大学・熱帯医学研究所・客員研究員 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関