

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590550

研究課題名(和文)新規ナノキャリアを用いた次世代インフルエンザユニバーサルワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of a novel vaccine carrier for the next-generation influenza universal vaccine

研究代表者

松井 政則 (MATSUI, Masanori)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50199741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：次世代インフルエンザユニバーサルワクチンの新規ナノキャリアを開発するために、すべての亜型インフルエンザウイルスに共通するCTLエピトープを導入した組換えSV40ウイルス様粒子(SV40-VLP)を作製した。これは、アジュバントを加えなくても、マウスに効率よくインフルエンザウイルス特異的CTLを誘導した。また、それで免疫後、亜型の異なる2種類のインフルエンザウイルスを感染させても、ウイルスの増殖を有意に抑制することが明らかになった。これらの結果は、SV40-VLPが、副作用を伴うアジュバントを加えなくても有効であることを示したものであり、たいへん意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Virus-like particles (VLPs) are a promising vaccine platform due to the safety and efficiency. However, it is still unclear whether polyomavirus-based VLPs are useful for this purpose. Here, we attempted to evaluate the potential of polyomavirus VLPs for the antiviral vaccine using simian virus 40 (SV40). We constructed chimeric SV40-VLPs carrying an HLA-A\*02:01-restricted, cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope derived from influenza A virus. HLA-A\*02:01-transgenic mice were then immunized with the chimeric SV40-VLPs. The chimeric SV40-VLPs effectively induced influenza-specific CTLs and heterosubtypic protection against influenza A viruses without the need of adjuvants. In addition, immunization with the chimeric SV40-VLPs generated long-lasting memory CTLs. We here propose that the chimeric SV40-VLPs harboring an epitope may be a promising CTL-based vaccine platform with self-adjuvant properties.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ワクチン 感染防御 ウイルス様粒子 SV40 ナノキャリア 細胞傷害性T細胞 HLA class I インフルエンザウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞性免疫の主役である細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、中和抗体と共にウイルス感染防御に重要な役割を果たしている。しかし、安全で効率よく CTL を誘導することは難しく、CTL 誘導型ワクチンは未だ開発されていない。

(2) インフルエンザの中和抗体は、インフルエンザウイルス粒子表面のヘマグルチニン (HA) やノイラミニダーゼ (NA) を認識するため、抗原性が異なるインフルエンザウイルスには効果はない。一方、CTL は、HA や NA の他に、多くのインフルエンザウイルスで保存されたウイルス内部タンパク質を抗原として認識するので、理論的には新型ウイルスなど多くのインフルエンザウイルスにユニバーサルな防御効果が期待できる。

(3) Simian Virus 40 (SV40) の外殻は、360 個の VP1 タンパク質で構成される。我々は、組換えバキュロウイルス発現系により高度に精製した VP1 が自己集合して、ウイルス様粒子 (SV40-VLP) を形成することを明らかにした。SV40-VLP は、多くの細胞に高い親和性を持ち、病原性・細胞毒性がないので、ワクチンのキャリアとして有望である。我々は、粒子の形状を破壊することなく外来アミノ酸配列を挿入できる部位 (HI ループ、DE ループ) を決定した。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、次世代インフルエンザユニバーサルワクチンの新規ナノキャリアとして SV40-VLP を世界に先駆けて検討し、臨床応用へと展開するための研究基盤を確立する事である。具体的には、A 型インフルエンザウイルスの亜型間で共通のエピトープを HI ループ、DE ループに導入して SV40-VLP を作製し、マウスに免疫してインフルエンザ特異的 CTL を誘導する。そして、種々の亜型ウイルスを感染させてユニバーサルな防御効果を解析する

## 3. 研究の方法

### (1) SV40-VLP の作製

CTL エピトープとして、インフルエンザウイルス内部抗原 M1 タンパク質に由来する HLA-A2 拘束性 CTL エピトープ、FMP58-66 (GILGFVFTL) を使用した。このエピトープは、多くのインフルエンザウイルスの亜型、株に共通であり、CTL 誘導能が高い。また、HLA-A2 は、世界で最も頻度が高い HLA 分子であり、有用性が高い。まず、SV40 VP1 遺伝子の HI ループ (FMP-HI-VLP) または DE ループ (FMP-DE-VLP) 部位に、FMP58-66 をコードする遺伝子を挿入した。そのキメラ VP1 遺伝子を組換えバキュロウイルスに組み込み、昆虫細胞に感染させて細胞内でタンパク質を発現させた。細胞内では、VP1 が自己集合し VLP が形成される (図 1)。精製した SV40-VLP の

球状粒子構造は、電子顕微鏡で確認した。

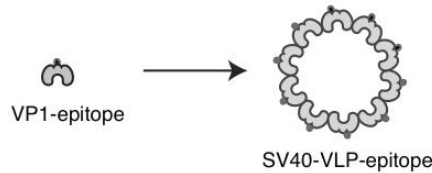


図 1 SV40-VLP の構造

### (2) 免疫法

HLA-A2 トランスジェニック HHD マウスに、腹腔、皮下、筋肉内、鼻腔内に、50  $\mu$ g の SV40-VLP (FMP-HI-VLP, FMP-DE-VLP) を投与して免疫した。コントロールとして、何も挿入していない野生型 SV40-VLP (WT-VLP) を投与した。免疫の際に、アジュバントは加えなかった。

### (3) IFN- $\gamma$ 陽性 CD8 陽性 T 細胞の検出

マウスを免疫して 1 週間後、脾細胞を調整し、FMP58-66 ペプチドで 1 週間抗原刺激を行った。その後、抗 IFN- $\gamma$  抗体、抗 CD8 抗体で染色し、抗原刺激で誘導された細胞内 IFN- $\gamma$  陽性 CD8 陽性 T 細胞をフローサイトメトリーで検出した。

### (4) in vivo CTL アッセイ

免疫していないマウスの脾細胞を調整して 2 つにわけ、片方を FMP58-66 ペプチドでパルスして 2.5  $\mu$ M CFSE でラベルし、もう片方をペプチドを加えずに 0.25  $\mu$ M CFSE でラベルした。そして、それらを同数ませ、免疫したマウスに静脈内へ細胞移入した。翌日、マウスから脾細胞を調整し、フローサイトメトリーで killing 活性を測定した。

### (5) 51Cr 遊離アッセイ

マウスを免疫して 2 週間後、脾細胞を調整し、FMP58-66 ペプチドで 1 週間抗原刺激を行った。その細胞を回収し、51Cr でラベルしペプチドでパルスした標的細胞で 51Cr の遊離試験を行い、CTL killing 活性を測定した。

### (6) ウイルスチャレンジ

免疫したマウスに、H1N1 (A/PR/8/34) または H3N2 (A/Aichi/2/68) ウイルスを鼻から感染させて 4 日後に、マウス肺のウイルス量を測定した。また、マウス免疫後、H1N1 (A/PR/8/34) を鼻から感染させて、体重変化、および生存率を測定した。

### (7) メモリー CTL 細胞の検出

マウスを免疫して、30 日後、脾細胞を FMP58-66 ペプチドで 1 週間抗原刺激して、51Cr 遊離アッセイを行い、メモリー CTL 細胞の存在を証明した。

## 4. 研究成果

(1) SV40-VLP を免疫したマウスにおける、インフルエンザ特異的 IFN- $\gamma$ 陽性 CD8 陽性 T 細胞の誘導

SV40-VLP で様々なルートで免疫した後、FMP 特異的 IFN- $\gamma$ 陽性 CD8 陽性 T 細胞が誘導されるかどうかを検討した。その結果、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻腔内投与すべてにおいて、IFN- $\gamma$ 陽性 CD8 陽性 T 細胞が誘導された。特筆すべきは、人工的アジュバントを加えなくても誘導できたことである。また、鼻腔投与でも誘導できたことから、SV40-VLP は、注射を使わなくても粘膜免疫で有意に CTL を誘導できることが明らかになった。

(2) SV40-VLP を免疫したマウスにおける、killing 活性の検出

SV40-VLP で免疫したマウスから脾細胞を調整し、CTL killing 活性を測定した。その結果、invitro の 51Cr 遊離アッセイ (図 2) においても、in vivo CTL アッセイにおいても、高い killing 活性が検出された。

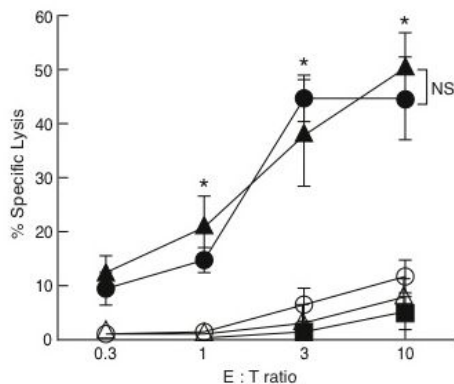


図 2 CTL killing 活性の検出：マウスは、アジュバントを加えずに WT-VLP (四角)、FMP-DE-VLP (丸) FMP-HI-VLP (三角) で免疫し、51Cr 遊離アッセイを行った。FMP58-66 でパルスした標的細胞 (black symbol)、パルスしていない標的細胞 (white symbol) を使用した。

(3) インフルエンザウイルスからの防御

SV40-VLP で免疫したマウスに、 $1 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub> の H1N1 インフルエンザウイルスを感染させ、体重変化を観察した。その結果、WT-VLP を投与したマウスでは、ウイルスチャレンジ 9 日後に 75% まで体重が減少した。一方、FMP-DE-VLP または FMP-HI-VLP で免疫したマウスでは、体重の減少はほとんどみられなかった (図 3)。従って、SV40-VLP の免疫によって、効果的なウイルス防御免疫を誘導することが明らかになった。さらに、H1N1 インフルエンザウイルスに加えて、亜型の異なる H3N2 ウイルスを感染実験に使用した。そして、感染 4 日後に、マウス肺をとりだし、存在するウイルス量を測定した。その結果、FMP-DE-VLP または FMP-HI-VLP で免疫したマウスで、WT-VLP を投与したマウスと比較して、有意にウイルス量が低下していることが証

明された (図 4)。以上から、FMP58-66 を挿入した SV40-VLP による免疫は、インフルエンザウイルスに対して、マウスに subheterotypic な防御免疫を誘導することが明らかになった。

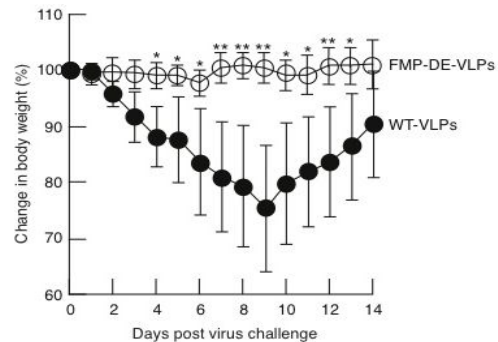


図 3 ウイルスチャレンジ後の体重変化

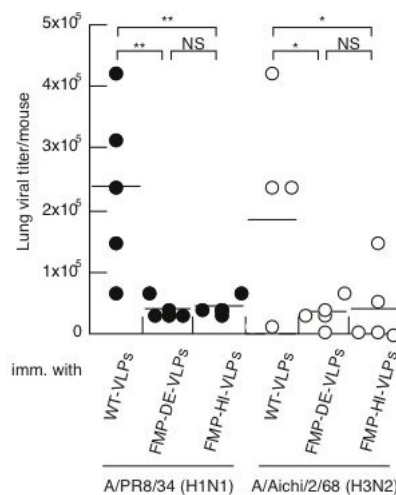


図 4 ウイルス感染後の肺ウイルス量

(4) DNase 処理の影響

以上のように、SV40-VLP は、人工的なアジュバントを加えなくても、インフルエンザ特異的な CTL を誘導でき、インフルエンザウイルスに対する防御免疫効果を誘導できることが明らかになった。これらの結果から、SV40-VLP 自身にセルフ・アジュバント効果があることが示唆された。しかしながら、SV40-VLP をバキュロウイルス発現系から精製する際にコンタミするバキュロウイルスの DNA がアジュバント作用を示している可能性が存在した。そこで、SV40-VLP 精製物を、DNaseI で処理して、マウスに免疫し、FMP 特異的 CTL を測定したところ、DNaseI で処理しない場合と同じくらいの CTL 活性を示した (図 5)。以上から、やはり SV40-VLP 自身にはセルフ・アジュバント効果があり、そのため、人工的アジュバントを加えなくても、CTL が誘導できることが証明できた。人工アジュバントを加えれば副作用があり、これに加えなくても SV40-VLP がワクチンとして使える事は、極めて意義のある結果である。

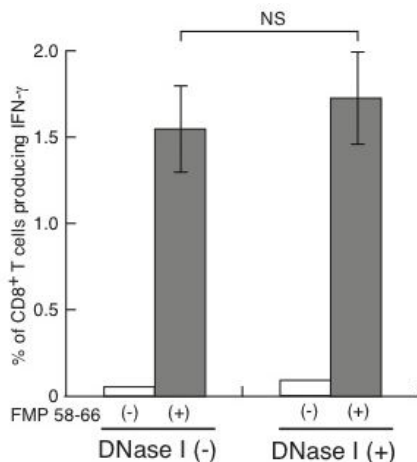


図5 DNase I 処理後でも、CTL 活性は不変

#### (5) メモリーCTL の誘導

最後に、SV40-VLP の免疫によって、体内にメモリーCTL が誘導されるかどうかを検討した。FMP-DE-VLP または FMP-HI-VLP でマウスを免疫して、30 日後にマウスの脾細胞を調整し、51Cr 遊離アッセイを行った。その結果、図6にみられるように、強い FMP 特異的 CTL が検出できた。従って、SV40-VLP は、long-term のメモリーCTL を誘導できることが明らかになった。

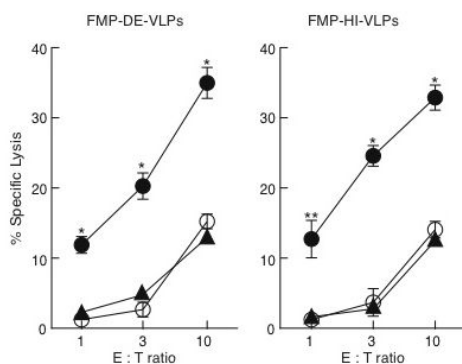


図6 メモリーFMP 特異的 CTL の検出

#### (6) 結語

以上の結果から、SV40-VLP が、さまざまな亜型インフルエンザ A ウイルスに対して、ユニバーサルに効くワクチンの新規キャリアになる可能性があることが示唆された。特筆すべきは、副作用を伴うアジュバントを加えなくても有効だったことである。今後、他の感染症やがんのワクチンキャリアにも使える証拠を示していきたい。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Kawano, M., K. Morikawa, T. Suda, N. Ohno, S. Matsushita, T. Akatsuka, H. Handa, and M. Matsui. Chimeric SV40

virus-like particles induce specific cytotoxicity and protective immunity against influenza A virus without the need of adjuvants. *Virology* 448: 159-167, 2014. 査読有

DOI:10.1016/j.virol.2013.10.010.

Kawano, M., M. Matsui, and H. Handa. SV40 virus-like particles as an effective delivery system and its application to a vaccine carrier. *Expert Rev. Vaccines* 12(2):199-210, 2013. DOI: 10.1586/erv.12.149. 査読有

Enomoto, T., M. Kawano, H. Fukuda, W. Sawada, T. Inoue, K. C. Haw, Y. Kita, S. Sakamoto, Y. Yamaguchi, T. Imai, M. Hatakeyama, S. Saito, A. Sandhu, M. Matsui, I. Aoki, and H. Handa. Viral protein-coating of magnetic nanoparticles using simian virus 40 VP1. *J. Biotechnol.* 167(1), 8-15, 2013. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.06.005 査読有

川野 雅章, 松井 政則, 禾 泰壽, 半田 宏, 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、埼玉医科大学雑誌、第 39 巻 第 1 号 9-13, 2012 査読無

〔学会発表〕(計 5 件)

川野雅章, 松井政則 他, Development of a CTL-based vaccine carrier with self-adjuvant properties using simian virus 40 virus-like particles. 第42回日本免疫学会、2013年12月11-13日、幕張メッセ(千葉)

川野雅章, 松井政則 他, 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、第11回RCGMフロンティアシンポジウム 埼玉医大 ゲノム医学研究センター 2013年11月22、23日

川野雅章, 松井政則 他, Chimeric VP1 of Simian Virus 40 induces IL-12 production from DC, facilitating CTL induction against an inserted CTL epitope within the VP1. 第41回日本免疫学会、神戸国際会議場(神戸) 2012年12月5-7日

川野雅章, 松井政則 他, 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. 第40回日本免疫学会、千葉 2011年11月27-29日

川野雅章, 松井政則 他, Development of a novel platform for CTL-based influenza vaccine using virus-like particles of Simian Virus 40. 第59回日本ウイルス学会、国際ウイルス学会、札幌、2011年9月11-16日

〔図書〕(計 1 件)

Kawano, M., M. Matsui, and H. Handa.SV40 virus-like particles as an effective delivery system and a vaccine platform. Future Medicine, Chapter 6: 86-101, 2014. E-Book

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：細胞傷害性 T 細胞誘導剤  
発明者：半田宏、川野雅章、松井政則  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2011-107874  
出願年月日：2011 年 5 月 13 日  
国内外の別： 国内

名称：細胞傷害性 T 細胞誘導剤  
発明者：半田宏、川野雅章、松井政則  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：PCT/JP2012/60910  
出願年月日：2012 年 4 月 24 日  
国内外の別： 国外

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

松井 政則 (MATSUI Masanori)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50199741

### (2)研究分担者

川野 雅章 (KAWANO Masaaki)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30447528

### (3)連携研究者

半田 宏 (HANDA Hiroshi)  
東京医科大学・医学部・特任教授  
研究者番号：80107432