

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659504

研究課題名 キラーT細胞誘導型マラリアワクチン

研究課題名 Killer T cell inducing peptide vaccine against malaria infection

研究代表者

梶野 喜一 (KAJINO KIICHI)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授

研究者番号：80322147

研究成果の概要（和文）：熱帯熱マラリア原虫由来の9アミノ酸からなるペプチドでキラーT細胞活性を強く誘導する6種類のペプチドをマウスのスクリーニングシステムによって同定した。それらのペプチドでヒト細胞性免疫モデルマウスをそれぞれ免疫した後マラリア原虫を感染させたところ、3種類のペプチドで対照群より貧血の程度・原虫血症の程度・死亡時期を遅延させる事が確認され、今後免疫法を改善する事で、新しいタイプのワクチンとして実用化する道が拓かれた。

研究成果の概要（英文）：

Six potent Cytotoxic T cell inducing 9mer peptide that derived from Plasmodium falciparum were indentified. Out of 6, immunization of HLA-A24 transgenic mice with 3 peptides partially protected mice from lethal malaria infection. This results suggest that CTL inducing malaria vaccine is promising new vaccine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症防御学

1. 研究開始当初の背景

毎年アジア・アフリカで多数の感染者や死者が出ているマラリアに対しては、他の感染症の様に有効なワクチンは存在せず、その開発も遅れている。現在マラリアの予防に使われているのは、キニーネ等の薬剤が中心であるが、薬剤耐性マラリアの出現が大きな問題になりつつある。これまで世界各国でマラリア原虫を標的としたワクチンが開発されているものの、in vivo および臨床試験での有効性が確認されたものは存在していない。しかし最近の研究で、肝臓感染ステージにおけ

るメロゾイトが発現する蛋白質に対する細胞性免疫によるマウス in vivo におけるマラリア感染防御が報告されており、キラーT細胞(CTL)誘導型のマラリアワクチンの実現性が高まっている。

感染を防御出来るだけの強力な抗原特異的細胞性免疫を誘導するには、従来は弱毒生ウイルスが用いられて来たが、新たな方法として組換えウイルスベクター、活性化樹状細胞が用いられる様になってきた。しかしながらワクチンという観点から考えた場合、ウイルスベクターは本来必要なCTL活性化誘導以

外にもそれ自身に対する中和抗体まで誘導してしまうという副反応が強く、また活性化樹状細胞はワクチン投与する人に細胞の型を合わせる必要があり、製造の手間とコストまで考えると現実的ではない。

我々は調製に手間がかからず安価に用意出来るワクチンを開発する過程で、リボソーム表面に抗原ペプチドを結合させたワクチンが強力な CTL 活性を誘導する結果を得た。この CTL 誘導型ワクチンがウイルス感染、特にその表面抗原の変化が激しい高病原性インフルエンザウイルス株の感染抑制効果を持つ事を、マウスの感染実験により実証した (PloS one, 6(9), e24626)。さらに、このワクチンの特徴として、リボソーム自体に抗原性は無く、ペプチドも 9mer と短いため、組換えウイルスベクターの様に中和抗体の誘導を気にする必要が無く、従って同じ組成のワクチンの複数回投与も可能である点で優れている。また、マラリアのゲノムデータベースなどの研究環境も整いつつあり、標的となりうるマラリア由来蛋白質も多くなっている。そこで我々はこのペプチド結合リボソームを使ったキラーT 細胞 (CTL) 活性を強く誘導するワクチンがマラリアに対しても応用が可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) 病原性原虫についてはゲノムレベルではもちろん、感染後の遺伝子発現に関しての解析は他の病原体程度には進んでおらず、ワクチンとしてのどこにターゲットを絞るかは難しいところである。その中であってマラリアは比較的解析が進んでいる方であるが、現在進行中の原虫ゲノム解析によりゲノム情報のみから発現蛋白等が予想出来るようになってきた。本研究ではそういった最先端研究の情報を元に、原虫ゲノムレベルから発現が予想される蛋白質を選択し、それをいち早くワクチンという形で実用化に結びつけるシステムを構築する事を目的とする。

(2) キラーT細胞を誘導するタイプのワクチンも今のところ弱毒生ワクチンしか存在しない。本研究ではワクチンによる副反応を最低限に抑えるため、CTL を誘導するための最少のコンポーネントでキラーT細胞を誘導するタイプのマラリアワクチンの開発を目的とする。

(3) 本研究はヒトに使用する為のワクチンを目指しており、CTL 活性化誘導もヒト免疫システムを想定して HLA-A 遺伝子導入マウスを用い、またヒトでの感染時と同じ環境を作り出すため、原虫スポロゾイトをハマダラ蚊内で分化させ、それを取り出してマウスに静脈内投与する事でマラリア原虫の肝細胞感染のステージでの CTL による感染防御の評価を行い、ヒトにすぐ使える CTL 誘導型マラリア

ワクチンの開発を目標とする。

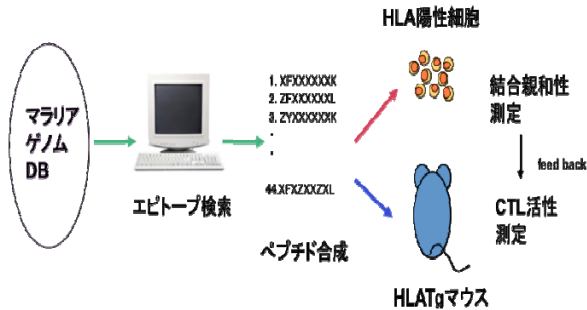
3. 研究の方法

(1) 予測プログラムによるエピトープ選別：ヒトクラス I-MHC の 1 つであり、日本人の約 6 割が保有する HLA-A24 に結合し、生体内で CTL 活性を誘導するマラリア由来の抗原決定基の探索を行った。マラリアゲノムデータベースから、熱帯熱マラリア *P. falciparum* とマウスマラリア *P. berghei* で共通し、かつ各原虫ステージ(特に肝細胞)における転写発現の高い RNA 由来のタンパク質(発現が予想されるものを含む)から HLA-A24 に結合する 9mer からなる CTL エピトープを、予測プログラムを使い候補ペプチドをデザインした。予測プログラムは (BIMAS, nHLAPred, SYFPEITHI, NetCTL) の 4 種類使い、それぞれ蛋白質から選抜されたペプチドから、総合でスコアリングの高いペプチドに関して 10~15 種類に絞り HLA-A2 結合ペプチド、HLA-A24 結合ペプチド、それぞれに関して 10~15 個のペプチドを選別する。選別されたペプチドは 10mg スケールで合成し、以降のアッセイに使用した。

(2) ペプチドの HLA 分子への結合親和性測定：I で選別されたペプチドの HLA-A24 への結合親和性を、RMS-A に HLA-A24 分子を遺伝子導入した細胞 (RMS-A24) を用いて測定した。具体的には、RMS-A24 細胞と様々な濃度 (10mM, 1mM, 0.1mM, 0.01mM, 0.001mM) のペプチドと共に 20 時間 26°C で培養し、洗浄後に 37°C で 2 時間培養する。さらに洗浄した後蛍光標識した HLA-A2 抗体でそれぞれの細胞を染色した後、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。低いペプチド濃度でより強い蛍光強度を示すものが親和性の強いペプチドであり、それぞれのペプチドに関して最大値の 50% 蛍光強度を示す時のペプチド濃度を求め、結合親和性の指標とする。

(3) In vivo におけるペプチドの免疫原性の測定：HLA 分子への結合親和性が高いペプチドで HLA 遺伝子導入マウスを免疫し、一定期間後にペプチドをパスルした標的細胞を免疫したマウスに移入して、翌日に標的細胞の減少率を測定することで、そのペプチドがどの程度の免疫原性を持つかを評価した。(2) で親和性があると判断されたペプチドは新規キャリアーミセルに架橋してペプチド結合ミセルを HLA 遺伝子導入マウスに Poly(I:C) とともに静脈内投与し、1 週間後に標的細胞をコントロール細胞と共に静脈内投与し、20 時間後に安楽殺して脾臓を取り出し、そこに含まれる細胞をフローサイトメーターにより解析した。免疫原性の高いペプチド程コントロール細胞に比較して減少率が大きく、その減少率を免疫原性の強さの指標としてペプチド間の順位付けを行った。

(4) マラリアの感染防御実験：最終的に強力な CTL 活性を示したペプチドで HLA-A24Tg マウスを免疫し、P. berghei 原虫のスポロゾイトを 5×10^3 個ずつ静脈内投与により感染させ、体重・血液検査値・原虫血症を経時的に観察した。



4. 研究成果

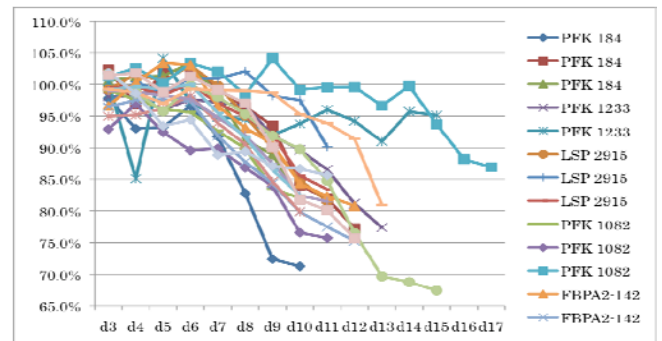
(1) 予測プログラムにより候補ペプチドを 30 種類選出／合成した。内訳は、下記表のとおり。このうち HLA-A24 分子に結合し、かつ in vivo で CTL 活性を誘導するものが 9 種類（下線を引いたもの）同定された。その中で、2 回免疫で 60%以上の in vivo CTL 活性を示すものが 6 種類（太字）同定された。

name	sequence
EF2-168	IYQTFARTI
EF2-451	QYIVKSGTI
HSP90-427	NYKKFYEQF
<u>HSP90-485</u>	IYYITGESI
HSP90-302	EYASFYKSL
ENLase-196	VYHTLKSEI
EF1a-55	KYAWVLDKL
KPb-933	EYFMNPLLL
KPb-866	TYRTNLLDI
60S-198	IYDAKVLDI
ETIF3-492	NYISIDYFI
<u>ETIF3-349</u>	AWLYCFHI
HSP70-230	VYDLGGGTF
<u>FBPA2-142</u>	EYYKAGARF
FBPA2-77	KFISGAILF
<u>14-3-3-188</u>	NYSVFFYEI
14-3-3-139	DYYRYISEF
HLCasE-88	DYVACQALI
PDSI-424	EWSGFPTIF

H3-54	RYQKSTDLL
FLN-976	EYLDPSFTV
<u>LSP-2915</u>	PYLYKLFEL
<u>PFK-184</u>	LYSKNYVTI
<u>PFK-1082</u>	VFMGLTHFF
<u>PFK-1233</u>	RYVECYANI
GBNP-78	YYIKSDCAI
NSGD-232	GYGLVYFVL
TRP-40	YFYPLDFTF
<u>CDC48-742</u>	KYEITRHHF
MFAAP-245	TYDNEFLTI

強い CTL 活性を示したこれら 6 種類のペプチドでマウスを免疫して感染の推移を計測した結果、3 種類のペプチドで感染による症状の発現が遅れるマウスが確認され、弱いながらも CTL ペプチドによる感染防御効果を示唆する結果が得られた。

この結果により、免疫するペプチドの量あるいは数を増加させたり、免疫法を改善する事により、ヒトに実用的な新しい種類のマラリアワクチンが開発される可能性が拓かれた。



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 1 件)
 Ichihashi, T., Satoh, T., Sugimoto, C., Kajino, K. (2013). Emulsified phosphatidylserine, simple and effective Peptide carrier for induction of potent epitope-specific T cell responses. PloS one, 8(3), e60068.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
- 取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶野 喜一 (KAJINO KIICHI)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセン
ター・准教授
研究者番号：80322147