

平成30年 5月28日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460560

研究課題名(和文) セルフ・アジュバント機能を持つ、革新的ワクチンプラットフォーム技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of an innovative vaccine platform with self-adjuvant function

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

研究成果の概要(和文)：SV40から作製したウイルス様粒子(VLP)に抗原エピトープを導入してマウスに免疫すると、人工的アジュバントを加えなくても効率よくエピトープ特異的細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導することができる。従って、VLP自体に自然免疫を活性化するセルフ・アジュバント活性が存在すると考えられる。本研究では、さまざまなアプローチを使って、このセルフ・アジュバント機能を解明することを試みた。そして、VLPの刺激で発現量に変化がみられる分子を明らかにした。また、VLPは粘膜免疫にも有効であった。さらに、さまざまなCTLエピトープでも、効率よくCTLが誘導できることを示した。

研究成果の概要(英文)：When mice were immunized with antigenic epitope-inserted virus like particles (VLP) prepared from SV40, epitope-specific cytotoxic T cells (CTL) can be induced efficiently without adding an artificial adjuvant. Therefore, the self-adjuvant activity that activates innate immunity is considered to exist in VLP itself. In this study, I attempted to elucidate the mechanism of this self-adjuvant function using various approaches. Then, we identified molecules that showed a change in expression level by stimulation of VLP. VLP was also effective for mucosal immunity. Furthermore, it was shown that CTL can be efficiently induced by various CTL epitopes. These data indicate that the chimeric SV40-VLPs harboring an epitope may be a promising CTL-based vaccine platform with self-adjuvant properties.

研究分野：免疫学

キーワード：ワクチン ウイルス様粒子 ナノキャリア アジュバント ドラッグデリバリー 細胞傷害性T細胞 HL A class I

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

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である。一般に、CTL など獲得免疫を誘導するには、最初に自然免疫を活性化しなければならない。そのため、多くの場合、ワクチンに免疫アジュバントを加えるが、アジュバントには副作用があり、ワクチンを開発する際に大きな障壁となっている。

(2) 我々は以前に、SV40 メジャーカプシド VP1 の集合体であるウイルス様粒子(VLP)をワクチンプラットフォームに利用することを試みた。具体的には、インフルエンザウイルス由来で、HLA-A2 拘束性 CTL エピトープ (FMP 58-66)を、VP1 に組み込み、VLP を作製した。これを HLA-A2 トランスジェニックマウスに免疫すると、FMP 特異的 CTL を効率よく誘導できることを報告した。特筆すべきは、その際にアジュバントを加える必要がなかったことである。即ち、SV40-VLP 自体に、自然免疫系を活性化するセルフ・アジュバント機能が存在すると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、申請者が開発した、SV40-VLP からなる CTL 誘導型ワクチンプラットフォームについて、未だ解明されていない基礎的な問題を解決してより進化させ、臨床応用へ発展させるための研究基盤を確立する事である。

(2) 具体的な研究項目は、1) SV40-VLP 自体が持つ、セルフ・アジュバント機構の解析、2) HLA 型に制約されないプラットフォームの構築、3) 粘膜ワクチンへの展開、4) 様々なウイルスワクチンへの応用、の 4 点であった。

3. 研究の方法

(1) マウス

仏パスツール研・Lemmonier 博士より供与された HLA-A2 および HLA-A24 トランスジェニックマウスを使用した。

(2) SV40-VLP の作製

ウイルス由来の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープとして、インフルエンザウイルス、HCV, HIV, HPV 由来の CTL エピトープを使用した。また、がん抗原として WT1, TRP2 由来の CTL エピトープも使用した。まず、SV40 VP1 遺伝子の HI ループまたは DE ループ部位に、これらの CTL エピトープ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。精製した SV40-VLP の球状粒

子構造は、電子顕微鏡で確認した。また、同様にして、インフルエンザウイルスのマトリックス蛋白または核蛋白をコードする遺伝子を組み込んだ VLP も作製した。

(3) 免疫法

マウスに、皮下、または鼻腔内に、50 µg の SV40-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 を投与した。免疫の際に、アジュバントは加えなかった。

(4) CTL 活性の測定

さまざまなリンパ球系細胞を VLP と混合し一定時間培養した後に、細胞表面の CD86 の発現をフローサイトメトリーで調べた。また、CTL killing 活性は、CD8+ T 細胞の CD107a の発現をフローサイトメトリーで測定した。

(5) 細胞内シグナル伝達経路の測定

SV40-VLP で刺激した B 細胞株において、cell lysate を作り、それぞれのシグナル経路に関わる抗リン酸化抗体とトータル抗体をペアで用いてウエスタンブロットを行った。

(6) VLP で誘導される分子の網羅的解析

SV40-VLP で刺激した細胞と刺激していない細胞で、mRNA を抽出して次世代シーケンサーを使って RNA シーケンスを行い、発現量に変化が有る遺伝子を探索した。

(7) CRISPR/Cas9 によるゲノム編集

Single guide RNA (sgRNA) のデザインには、CRISPRdirect ソフトウェアを使用した。sgRNA を組み込んだゲノム編集用ベクターとしては、Cas9 ヌクレアーゼと sgRNA を同時に発現するベクターを使用した。B 細胞株への DNA トランスフェクションは、electroporation を使用した。遺伝子導入した二日後、FACSaria で GFP 陽性細胞をソーティングし、limiting dilution でクローニングした。増殖したクローンからゲノム DNA を抽出し、T7 Endonuclease I assay を行い、標的のゲノム遺伝子が切断されているかどうか検討した。そして、Western blot にて、標的タンパク質が発現していないことを確認した。

4. 研究成果

(1) SV40-VLP 自体が持つ、セルフ・アジュバント機構の解析

VLP 刺激に反応する細胞について

セルフ・アジュバント機能をもつ VLP を添加することによって、各種の免疫担当細胞が活性化されているかどうか、自然免疫活性化の指標となる CD86 などの細胞表面分子の発現増強をフローサイトメトリーで調べることにより解析した。B 細胞、T 細胞、

マクロファージ、樹状細胞を使って検討したが、特にB細胞において顕著であることがわかった。

シグナル伝達経路の解析

SV40-VLPを作用させた細胞において、3つのシグナル伝達経路、i) MAPキナーゼシグナル伝達経路、ii) NF- κ Bシグナル伝達経路、iii) PI3キナーゼシグナル伝達経路の解析を行った。SV40-VLP刺激細胞からcell lysateを作り、それぞれのシグナル経路に関わる様々な抗リン酸化抗体とトータル抗体をペアで用いてウエスタンブロットを行い、それぞれのシグナル伝達経路が関わっていることを示した。

VLP刺激で誘導される分子の網羅的解析

SV40-VLPからのアジュバント・シグナルによって、細胞に発現誘導される自然免疫関連タンパク質分子の全体像を明らかにするため、次世代シーケンサーを使って、網羅的なトランスクリプトーム解析を行った。SV40-VLPで刺激した細胞と刺激していない細胞で、mRNAを抽出してRNAシーケンスを行い、発現量に変化がある遺伝子を探索したところ、いくつかの細胞表面分子やサイトカイン、抗原提示関連分子において発現量に変化がみられることが明らかになった。また、有意差がみられたいくつかの分子、液性因子が、VLP刺激によって細胞に発現誘導されていることを、Flow cytometryやELISAなどを用いて確認した。

当初予期していなかったことは、MHCクラスIの抗原提示関連分子が検出されたことであった。これらの分子は、抗原特異的CTLの誘導に極めて重要であり、VLPのセルフ・アジュバント機構に密接に関連している可能性が高いと考えられた。これらの分子をさらに解析するため、CRISPR/Cas9 systemを利用した。CRISPR/Cas9は、ゲノム遺伝子を特異的に切断してノックアウトできる遺伝子改変技術である。さまざまな試行錯誤を繰り返し、この技術とFACSによるsorting技術を使って、特定のゲノム遺伝子をノックアウトした細胞クローン株を作製する方法を確立した。

このゲノム編集実験系を使って、発現量に変化がみられた分子のゲノム遺伝子をノックアウトした細胞株の作製を試みた。すべての細胞株を作るにはまだ時間が必要であるが、いくつか細胞株が完成したので、その細胞にVLPを作用させ、細胞が活性化するかどうか活性化表面分子マーカーで調べた。今のところ、ポジティブな結果はでていない。今後、さらにノックアウト細胞株を作製し、VLPのセルフ・アジュバントに関わっている分子を同定する予定である。

(2) HLA型に制約されないプラットフォームの構築

インフルエンザウイルスのマトリックス蛋白または核蛋白をコードする遺伝子を組み込んだVLPを作製した。それを、HLA-A2またはHLA-A24トランスジェニックマウスに免疫し、インフルエンザ特異的CTLを誘導させた。このように、HLA型に制約されないプラットフォームに発展する可能性を示すことができた。

(3) 粘膜ワクチンへの展開

インフルエンザウイルス由来のエピトープまたは抗原タンパク質を組み込んだSV40-VLPを、マウスに経鼻摂取し、呼吸器粘膜にインフルエンザウイルス特異的CTLが誘導できることを明らかにした。

(4) 様々な抗原に対するワクチンへの応用

インフルエンザだけでなく、他のウイルス感染症にも応用できるように、HCV HIV HPV等のウイルス由来のCTLエピトープを組み込んだVLPを作製し、それぞれの抗原に特異的なCTLが誘導できることをHLA-A2トランスジェニックマウスを使って明らかにした。また、WT1やTRP2のがん抗原由来CTLエピトープを使っても、マウスに効率よくエピトープ特異的CTLが誘導できることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Takagi, A., Y. Horiuchi, and M. Matsui. Characterization of the flow cytometric assay for *ex vivo* monitoring of cytotoxicity mediated by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 492: 27-32, 2017. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.045.

Kawano, M., K. Doi, H. Fukuda, Y. Kita, K. Imai, T. Inoue, T. Enomoto, M. Matsui, M. Hatakeyama, Y. Yamaguchi, and H. Handa. SV40 VP1 major capsid protein in its self-assembled form allows VP1 pentamers to coat various types of artificial beads *in vitro* regardless of their sizes and shapes. *Biotechnol. Rep.* 5:105-111, 2015. 査読有

doi: 10.1016/j.btre.2014.12.008.

Matsui, M., M. Kawano, S. Matsushita, and T. Akatsuka. Introduction of a point mutation into an HLA class I single-chain trimer induces enhancement of CTL priming and antitumor immunity. *Molecular Therapy - Methods & Clinical*

Development (2014)1, 14027 査読有
doi: 10.1038/mtm.2014.27
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.

〔学会発表〕（計7件）

Kawano M., R. Takagi, K. Saika, M. Matsui, S. Matsushita. Dopamine fluctuates cytokine secretion in innate and adaptive immune responses 第46回日本免疫学会 仙台 2017年12月12-14日
Takagi A., N. Kobayashi, M. Matsui, Y. Horiuchi, T. Akatsuka. Development of universal HCV vaccine by coupling HCV NS3 protein to the surface of liposomes. 第44回日本免疫学会 札幌 2015年11月18-20日
Takagi, A., N. Kobayashi, M. Matsui, Y. Horiuchi, A. Kuma, and T. Akatsuka. T. Development of universal HCV vaccine by coupling HCV NS3 proteins to the surface of liposomes. 22nd International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. October 9-13, 2015. Strasbourg, France
松井政則、川野雅章、松下祥、赤塚俊隆 HLA-A2 mutant からなる Single-chain trimer によるペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導増強効果 第26回日本生体防御学会総会、東京、2015年7月10-12日
Matsui M., M. Kawano, S. Matsushita, and T. Akatsuka. Characterization of an HLA class I molecule with a point mutation that enhances the presentation of an exogenously loaded peptide but fails to present an endogenous peptide. 第43回日本免疫学会 2014年12月10-12日、京都
川野雅章、松下祥、赤塚俊隆、半田宏、松井政則 細胞傷害性 T 細胞誘導剤によるがん CTL エピトープに対する CTL の誘導 第18回日本がん免疫学会 2014年7月30日～8月1日 愛媛
松井政則、川野雅章、松下祥、赤塚俊隆 HLA-A2 mutant からなる Single-chain trimer による抗腫瘍免疫誘導の増強 第18回日本がん免疫学会 2014年7月30日～8月1日 愛媛

〔図書〕（計3件）

松井 政則、堀内 大、高木 徹 がんの免疫逃避における新規免疫抑制分子、DC-HIL の役割解明 埼玉医科大学雑誌 第44巻 第2号 77-79, 2018
Kawano, M., M. Matsui, and H. Handa. Development of technologies for the medical application of diagnosis and therapy using virus-like particles. *Pharmaceutica Nanotechnology (I-XXVII) Multi-Volume SET-ELSEVIER*. Edited by Alexandru Mihai GRUMEZESCU (in press) 2018.
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

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