

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860112

研究課題名(和文)抗ウイルス細胞傷害性T細胞誘導剤の作用機序の解明及びその応用

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of SV40 VP1 capsid protein to induce aimed cytotoxic T lymphocyte against viruses and its application for vaccine formulation.

研究代表者

川野 雅章 (KAWANO, Masaaki)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：30447528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：基本骨格としてサルを宿主とするポリオーマウイルス科のsimian virus 40 (SV40) のウイルス粒子を構成しているVP1タンパク質を用いて、抗ウイルス細胞傷害性T細胞 (CTL: cytotoxic T lymphocyte) 誘導剤を構築することができる。CTLエピトープをVP1に挿入し、これを免疫すると強力に目的のCTLを誘導することができるが、その機構は不明であった。本研究の結果、SV40 VP1が免疫応答を誘導する免疫担当細胞を同定し、その免疫活性化に必要な細胞表面受容体を同定することにも成功した。また、この成果を応用し、難治性ウイルスに対するワクチン製剤を構築した。

研究成果の概要(英文)：We have prepared chimeric simian virus 40 (SV40) VP1 protein harboring a foreign epitope to induce aimed cytotoxic T lymphocyte (CTL). Immunization of the protein successfully induced CTL against the inserted foreign epitope, in which the level of CTL induction was over 50 times higher than that induced by classical immunization method using incomplete Freund's adjuvant. During examining the CTL induction property of SV40 VP1, we found that SV40 VP1 significantly induced immune responses against specific immune cells through a specific receptor expressed on the immune cells. We also found that the level of specific chemotactic cytokine secretions induced by SV40 VP1 was higher than that induced by LPS. In addition, as an application of the property of SV40 VP1 that induces strong immune responses against aimed CTL epitope within the SV40 VP1, we have constructed a vaccine against a refractory virus infection using SV40 VP1.

研究分野：医歯薬学

キーワード：薬学 医療薬剤学 simian virus 40 カプシド cytotoxic T lymphocyte 免疫応答 ワクチン 粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

サルのポリオーマウイルスである simian virus 40 (SV40) のウイルス粒子を構成している VP1 アミノ酸配列に、目的とする細胞傷害性 T 細胞 (CTL: cytotoxic T lymphocyte) エピトープを挿入したものでウイルス粒子を構築し、これを免疫すると、目的とする CTL を自在に誘導できることが明らかになった。このことから、SV40 VP1 を、CTL ワクチンや、がんワクチンとして利用可能であることが我々の解析によって示唆された。

SV40 カプシドを構成している VP1 は、宿主細胞性因子を必要とせずに、それ単独で直径 45 nm の正二十面体構造のウイルス粒子を形成する能力を有している。SV40 VP1 は粒子を構築するために、まず、5 つの VP1 が VP1 五量体とよばれるサブユニットを形成し、この VP1 五量体が 72 個集合化してウイルス粒子を形成する。この粒子形成時に、VP1 五量体のウイルス粒子の内部を向く面に非主要構造タンパク質である VP2、または、VP2 のアミノ末端欠損体である VP3 が 1 つ結合する。SV40 のウイルスゲノムは、5,243 塩基対の 2 本鎖環状 DNA で、細胞性のヒストンで折り畳まれて凝集した状態で SV40 粒子に格納される。ウイルス粒子を形成する工程、および、VP2、VP3、ウイルスゲノムを内包する工程においては、上記に述べたように宿主因子を必要とせずに、ウイルス構成タンパク質の活性のみによってこれらの物質の内包が進行し、ウイルス粒子が形成される。

SV40 の自然界における宿主は、サルの腎臓細胞と考えられており、この宿主細胞への感染を実現するため、SV40 粒子は、サルの腎臓細胞の表面に存在する糖鎖のガングリオシド GM1 に結合し、それが引き金となって、宿主細胞にエンドサイトーシスが誘導され、レトログレード輸送経路を経て、カベオソーム、および、エンドソームとよばれる小胞を通過し、小胞体 (ER: endoplasmic reticulum) に侵入する。そこから、ER 膜を通過して、細胞質に侵入し、核膜口を通過して、ウイルスゲノムを核内に放出して、感染が成立する。ウイルスゲノムは細胞核内で複製、転写され、新しいウイルスゲノムが作られる。細胞質で VP1 タンパク質が合成され、それが細胞核に移行すると、VP1 タンパク質の自己集合化能でウイルスゲノムを内包しながらウイルス粒子を形成し、細胞外に脱出する。

宿主にとっては、ウイルスに感染することは、宿主細胞を乗っ取られ、宿主細胞の機能が失われるため、ウイルス感染を防御する機能を必要とする。このため宿主にはウイルス感染を感知する機構が備えられており、例えば、SV40 の属するポリオーマウイルスに近縁のパピローマウイルスに対しては、宿主の樹状細胞がパピローマウイルス粒子を異物と見做して免疫システムを活性化する機構が備えられている。しかしながら、ポリオー

マウイルス科のウイルスに対しては、宿主の樹状細胞の活性化を検出することができず、また、炎症性サイトカインの産生も誘導しないことから、ポリオーマウイルス科のウイルスに対しての宿主の免疫活性化能は非常に弱いと考えられていた。しかしながら、上記に述べたように、我々の解析によって、SV40 VP1 は目的の CTL を非常に強力に誘導することが可能で、その誘導能は古典的な不完全フロインドアジュバントを用いた CTL 誘導法の 50 倍以上の強力であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、抗ウイルス細胞傷害性 T 細胞誘導剤の作用機序の解明及びその応用、と題して、SV40 粒子に対するマウスリンパ球細胞の免疫応答を解析するためにまず、マウス脾臓リンパ球を調製し、そこに VP2 や VP3、ウイルスゲノムを含まない SV40 VP1 のみで構成されるウイルス粒子を作用させて、免疫活性化が誘導される免疫活性化マーカー、および、分泌誘導される細胞走化性因子を同定することを目的とした。また、これらの免疫活性化マーカー、および、細胞走化性因子の分泌を誘導する免疫細胞集団の同定することを目的とした。このような免疫誘導が SV40 VP1 粒子で誘導される機構を解析するために、その比較として他のポリオーマウイルス科のウイルス粒子も調製し、免疫活性化能の比較も行うことを目的とした。さらに、SV40 VP1 粒子による免疫活性化が誘導される分子機構を詳細に解明するため、免疫活性化のシグナル伝達経路の解析も行うことを目的とした。また、これらの免疫活性化の結果を踏まえて、難治性ウイルスに対するワクチン製剤の開発を SV40 VP1 粒子を基本骨格として行うことを目的とした。難治性ウイルスとしては、ヒト 2 型単純ヘルペスウイルス (HSV-2: herpes simplex virus 2) を選択した。HSV-2 は感染すると、ヒトの細胞核に潜伏感染するため、一度感染すると、個体からウイルスを完全に排除することが非常に難しいが、SV40 VP1 VLP の活性を利用して、HSV-2 に対する CTL や抗体を誘導することで、排除できる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、まずウイルス粒子の調製を行った。抗原としては、SV40 ウイルス粒子そのものに対する免疫反応を解析するために、SV40 粒子を構成している分子が VP1 のみで、内部に VP2, VP3, ウイルスゲノムを含まないウイルス様粒子 (VLP: virus-like particle) の調製を行った。この SV40 wild type VP1 VLP (SV40 VP1 VLP) の調製のため、SV40 ゲノムから SV40 VP1 遺伝子を取り出し、これをバキュロウイルス発現用プラスミドに組換え、このプラスミドをバキュロウイルスゲノムに組込んで、

組込みバキュロウイルスゲノムを構築した。このバキュロウイルスゲノムをカイコ培養細胞にトランスフェクションし、培養後、組込みバキュロウイルスを含む培養上清を回収した。さらに、このウイルス溶液をもう一度カイコ培養細胞と培養してウイルス力価を上昇させた。SV40 VP1 VLP を発現している細胞沈殿物を得るために、この組込みバキュロウイルス溶液を、再び培養細胞に感染させて、その細胞を回収した。この細胞沈殿物を 1% でオキシコール酸ナトリウムを含むトリス緩衝液で懸濁し、超音波破碎で細胞を破碎した後、不溶性画分を除いて、上清を 20-50%塩化セシウム密度勾配の上面に重層して超遠心した。超遠心した後、チューブの中央の白いタンパク質画分を注射器で回収し、その画分をさらに 37%塩化セシウムと混合して超遠心を行った。超遠心後、チューブの中央に現れる白いタンパク質バンドを再び注射器で回収し、この溶液を PBS(-)で透析して精製 SV40 VP1 VLP 画分とした。BK, JC, KI, WU, murine, merkel cell ポリオーマウイルスの VLP の調製は、各々の VP1 遺伝子を人工遺伝子で調製し、各々の VLP の調製は、SV40 VP1 VLP の調製方法と全く同じ方法で行った。

調製した VLP に対する免疫担当細胞の免疫反応を解析するために、各免疫担当細胞の調製を行った。マウス脾臓から脾臓リンパ球を調製し、そこからさらに、抗体結合磁気ビーズを用いて、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、CD19 陽性細胞、natural killer 細胞を調製した。骨髄由来樹状細胞は、マウス骨髄細胞を調製し、そこから顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を用いて、分化させることで調製した。また、腹腔マクロファージは、マウス腹腔に 3%チオグリコール培地を投入した後、腹腔からポリスチレンディッシュ結合性細胞を回収することで調製した。

調製した免疫細胞と種々の VLP を混合した後、24 時間培養した。次世代シーケンズを用いて mRNA の配列を網羅的に解析するため、培養後の細胞から total RNA を回収した。次世代シーケンズの解析結果から、有意差が得られたサイトカイン、および、ケモカインの発現を解析するために、培養上清を回収し、種々のサイトカイン、および、ケモカインの分泌を ELISA 法で検出した。また、次世代シーケンズで有意差が得られた CD マーカーの発現を蛍光標識してフローサイトメーターで解析した。また、これらの有意差を指標にして、上記の VLP と免疫細胞の混合培養中に SV40 VP1 VLP と相互作用する免疫細胞表面分子に対する競合阻害実験を行い、その有意差の変化を利用して、細胞表面分子の結合が VLP に対する免疫反応に与える影響を解析した。また、VLP に対して免疫応答を引き起こす免疫細胞内シグナル伝達経路を同定するために、VLP とマウスリンパ球との培養中に種々のシグナル伝達阻

害剤を加え、VLP によって有意差を引き起こす CD マーカーを指標にして、免疫反応シグナル伝達経路を解析した。また、SV40 VP1 VLP の免疫賦活能を用いて、HSV-2 に対するワクチン製剤を構築するために、SV40 VP1 の DE および HI ループと呼ばれる領域に HSV-2 に対する CTL エピトープ、および、抗体誘導エピトープを挿入したキメラ SV40 VP1 遺伝子を構築し、上記の SV40 VP1 VLP の調製と同様の方法で、キメラ SV40 VP1 VLP の発現細胞沈殿物を調製した。

4. 研究成果

SV40 VP1 VLP に対する免疫応答の解析では、ポリオーマウイルスの近縁のパピローマウイルスの VLP と異なり、SV40 VP1 VLP がプロフェッショナル抗原提示細胞として知られる樹状細胞の免疫活性化を SV40 VP1 VLP 特異的に誘導しないことから、SV40 VP1 VLP の免疫賦活能は非常に低いと考えられていた。従ってこれまでは、ワクチンのアジュバントとしての免疫賦活剤として SV40 VP1 VLP を使用することは有用でないと考えられていた。しかしながら、我々の解析により、外来の CTL エピトープを SV40 VP1 に挿入したもので免疫を行うと、古典的な不完全フロイドアジュバントの免疫法と比較して 50 倍以上効率的に目的の CTL を誘導できるという結果が示された (表 1)。この CTL 誘導は経鼻免疫でも誘導できることから、SV40 VP1 VLP を粘膜ワクチン製剤として用いることができる可能性も示唆された。この SV40 VP1 VLP による免疫活性化の分子機構を解明するため、SV40 VP1 VLP を各種免疫細胞に作用させて培養し、SV40 VP1 VLP 特異的な免疫応答の解析を行った。この解析により、これまでの報告の通り、樹状細胞のようなプロフェッショナル抗原提示細胞の免疫活性化の誘導は見られず、また、炎症性サイトカインの代表である IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β の放出も検出されなかった。しかしながら、次世代シーケンズによる mRNA の配列の網羅的な解析結果から、細胞走化性に関わる因子の発現が顕著に増加すると共に、免疫活性化 CD マーカーの発現上昇も確認された。この結果は、ELISA 法、および、蛍光免疫染色した後、フローサイトメーターで解析することで確認した。また、この SV40 VP1 VLP 特異的な免疫反応を誘導する免疫細胞群も同定した。この SV40 VP1 VLP 特異的な免疫反応が、免疫細胞表面に発現している SV40 VP1 VLP と相互作用する因子が関与していることも競合阻害実験によって裏付けた。また、種々のシグナル伝達阻害剤を解析することにより、特定のシグナル伝達経路群がこの SV40 VP1 VLP 特異的な免疫反応に関与していることも明らかにした。これらの免疫反応がポリオーマウイルス科の他の VLP と比較しても SV40 VP1 VLP 特異的なものであることが判明し、したがって、SV40

VP1 VLP をワクチン製剤における免疫賦活物質として用いる有用性が示された。この結果の応用として、SV40 VP1 VLP に HSV-2 の CTL エピトープ、および、抗体エピトープを挿入した複合体 SV40 VP1 VLP を調製、精製することにも成功した。今後は、さらに詳細に SV40 VP1 VLP 特異的な免疫応答シグナル伝達経路を解明すると共に、この活性化経路による効率の良い獲得免疫誘導の機構を明らかにして行く。また、この結果を応用して、さらに効率の良いワクチン製剤の開発に繋げて行く。

(表 1)

SV40 VP1 VLP を用いた抗原エピトープに対する免疫誘導 (免疫ルートは腹腔)
(外来エピトープは SV40 VP1 の DE または HI ループ領域に挿入)

Summary of induction of adaptive immune responses for aimed epitopes inserted within DE- or HI-loop region of SV40 VP1 (immunization route: intra-peritoneal)

Loop region Epitopes	SV40 VP1 DE loop	SV40 VP1 HI loop
Influenza virus CTL epitope (FMP:58-66) (GILGFVFTL)	(+)	(+)
Cancer CTL epitope (WT1WT) (RMFPNAPYL)	(+)	(+)
Bovine serum albumin antibody epitope (BSA Ab) (ATEEQLKTVMENFVAFVD)	(+)	(+)

(+): possible to induce adaptive responses

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 7 件)

- ① Takagi R, Kawano M, Nakamura K, Tsuchida T, Matsushita S. T-cell responses to tyrosinase-derived self-peptides in patients with leukoderma induced by rhododendrol: Implications for immunotherapy targeting melanoma. *Dermatology*, 査読有, 232:44-49, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1159/000441217>
- ② Kawano M, Takagi R, Kaneko A, Matsushita S. Berberine is a dopamine D1-, D2-like receptor antagonist and ameliorates experimentally induced colitis by suppressing innate and adaptive immune responses. *J Neuroimmunol*, 査読有, 289:43-55, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.20>

15.10.001

- ③ Kawano M, Doi K, Fukuda H, Kita Y, Imai K, Inoue T, Enomoto T, Matsui M, Hatakeyama M, Yamaguchi Y, Handa H. 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*, 査読有, 5:105-111, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2014.12.008>
 - ④ Takagi R, Kawano M, Matsushita S. Dopamine modulates Th17-mediated autoimmunity via dopamine receptors expressed on dendritic cells and naïve CD4 T cells. *Curr Trends Immunol*, 査読有, 15:9-17, 2014.
<http://www.researchtrends.net/tia/abstract.asp?tid=36&in=0&vn=15&aid=5548>
 - ⑤ Matui M, Kawano M, Matsushita S, Akatsuka T. Introduction of a point mutation into an HLA class I single-chain trimer induces enhancement of CTL priming and antitumor immunity. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 査読有, 14027, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1038/mtm.2014.27>
 - ⑥ Takagi R, Kawano M, Nakagome K, Hashimoto K, Higashi T, Ohbuchi K, Kaneko A, Matsushita S. Wogonin attenuates ovalbumin antigen-induced neutrophilic airway inflammation by inhibiting Th17 differentiation. *Int J Inflam*, 査読有, 571508, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/571508>
 - ⑦ 高木 理英, 川野 雅章, 金子 篤, 松下 祥, 黄連解毒湯の Th17 選択的な抑制作用と好中球性気道炎症モデルにおける改善作用、アレルギーの臨床、査読無、34 巻、2014、66-68
http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2014/10/201410_2.html
- [学会発表] (計 6 件)
- ① KAWANO Masaaki, HANDA Hiroshi, Medical application of a nanocapsule derived from a viral capsid protein, 5th World Congress on Virology Conference, hosted by the OMICS International, December 7-9th, 2015, Hilton Atlanta Airport Hotel, Atlanta, USA

- ② KAWANO Masaaki, TAKAGI Rie, KANEKO Atsushi, MATSUSHITA Sho, Berberine is a dopamine D1- and D2-like receptor antagonist and ameliorates experimentally induced colitis by suppressing innate and adaptive immune responses, The 44th Annual meeting of the Japanese society for immunology 2015, November 18-20th, 2015, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan
- ③ 川野 雅章、高木 理英、橋本 久実子、金子 篤、松下 祥、ドーパミンアンタゴニスト活性を有する薬剤の炎症反応抑制効果の解析、第 64 回日本アレルギー学会学術大会、2015 年 5 月 26 日～2015 年 5 月 28 日、グランドプリンスホテル新高輪、国際館パミール、東京
- ④ 川野 雅章、松下 祥、赤塚 俊隆、半田 宏、松井 政則、細胞傷害性 T 細胞誘導剤を用いたがん CTL エピトープ特異的 CTL の誘導、第 18 回日本がん免疫学会総会、2014 年 7 月 30 日～2014 年 8 月 1 日、ひめぎんホール、松山市
- ⑤ KAWANO Masaaki, HANDA Hiroshi, Medical application of functionalized SV40 virus-like particles, ICSS MEETING 2014, December 8-11th, 2014, Eaton Hotel, Kowloon, Hong Kong
- ⑥ MATSUI Masanori, KAWANO Masaaki, MATSUSHITA Sho, AKATSUKA Toshitaka, 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, The 43th Annual meeting of the Japanese society for immunology 2014, December 10-12th, 2014, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan

〔図書〕(計 1 件)

- ① 川野 雅章、半田 宏、マイクロ/ナノカプセルの調製、徐放性制御と応用事例 – 膜の選定、製膜法/表面の親疎水性コントロール – 第 3 章 医薬、生体試料での応用例 8 節 ウイルス外殻タンパク質から成るナノカプセルの医療応用 No. 1796、2014、510

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 3 件)

名称：免疫賦活剤およびその製造方法
 発明者：半田 宏、川野 雅章、加藤 昌彦
 権利者：シスメックス株式会社、埼玉医科大学、半田 宏
 種類：特許
 番号：特願 2015-255012
 出願年月日：2015 年 12 月 25 日
 国内外の別：国内

名称：免疫誘導剤およびその製造方法
 発明者：半田 宏、川野 雅章、加藤 昌彦
 権利者：シスメックス株式会社、埼玉医科大学、半田 宏
 種類：特許
 番号：特願 2015-234206
 出願年月日：2015 年 11 月 30 日
 国内外の別：国内

名称：免疫応答を誘導するための薬剤
 発明者：松下 祥、土田 哲也、中村 晃一郎、川野 雅章、高木 理英
 権利者：埼玉医科大学
 種類：特許
 番号：特願 2014-261988
 出願年月日：2014 年 12 月 25 日
 国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川野 雅章 (KAWANO, Masaaki)
 埼玉医科大学・医学部・講師
 研究者番号： 3 0 4 4 7 5 2 8