

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790169

研究課題名(和文)汎用抗ウイルス細胞傷害性T細胞誘導剤の開発

研究課題名(英文)development of the universal inducing agent for induction of antiviral cytotoxic T lymphocytes

研究代表者

川野 雅章(KAWANO, Masaaki)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：30447528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)は、ウイルスに感染した細胞や、がん細胞を体内から除去する機能を有する。我々は、免疫賦活物質を加えること無く目的とするCTLを誘導する細胞傷害性T細胞誘導剤を開発した。ウイルス粒子タンパク質であるsimian virus 40 VP1に目的のCTLペプチドを挿入し、組換え体として発現したものを免疫すると、リンパ球に目的のCTLペプチドに特異的に応答するCD8陽性の細胞が現れることを確認した。今回の研究成果が発展し、免疫によって細胞内に潜伏感染しているウイルスや、がん細胞を体内から除去する方法が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cytotoxic T lymphocyte (CTL) has a role to eliminate virus-infected cells or cancer cells from the body. We developed novel universal inducing agent for antiviral CTL production using VP1 capsid protein of simian virus 40 (SV40). CTL peptide of HLA-A\*02:01 against influenza A virus matrix protein 1 (M1), GILGFVFTL (FMP:58-66), was inserted into DE or HI loop region of VP1 which is exposed on the surface of the SV40 VP1 capsid. Purified FMP:58-66 inserted recombinant VP1 was immunized to HLA-A2 transgenic mice. As expected, lymphocyte of immunized mice contained CTL that responded against FMP:58-66 specifically. It indicated that VP1-based universal inducing agent could induce aimed CTL without need of adjuvant. By validating the molecular mechanism how VP1-based agent efficiently induce aimed CTL and the efficacy for cancer in vivo in experimental level more, VP1-based agent will be developed to eliminate virus infected cells or cancer cells from the human body for practical use.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬学 医療薬剤学 免疫学 ワクチン 細胞傷害性T細胞 SV40 ウイルス様粒子 VP1

## 1. 研究開始当初の背景

細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) は、体内のウイルスに感染した細胞や、がん細胞を見つけ出し、破壊して除去する機能を有する。体内の全ての細胞は、major histocompatibility complex class I (MHC class I) を介してタンパク質由来の 9 アミノ酸から成るペプチドを提示しており、MHC class I で提示されているウイルス由来や、がん抗原由来のタンパク質から分解された 9 アミノ酸のペプチド (CTL ペプチド) を認識し、攻撃する。従って、この 9 アミノ酸のペプチドを抗原として認識するように、ワクチンという形で免疫をすることで、目的の CTL を誘導できれば、自在にウイルス感染細胞や、がん細胞を体内から除去することが可能になる。この目的のために、CTL ペプチドと共に incomplete freund's adjuvant (IFA) などの免疫賦活物質を免疫することで、目的とする CTL ペプチドに対する CTL を誘導する方法が開発されている。しかしながら、目的の CTL が十分に誘導されないために、ウイルス感染細胞や、がん細胞を体内から除去するには未だに至っていない。これは、IFA などの免疫賦活物質の免疫活性が十分ではない、CTL ペプチドが体内で分解されやすい、また、非特異的吸着が大きい、などの理由から、目的の細胞に運搬され、免疫が十分に活性化された状態で、MHC class I で抗原提示される効率が非常に弱くなっているなどの可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

生理活性物質を体内の目的の器官・細胞に非常に効率的に運搬することができるものとしてウイルス粒子がある。ウイルス粒子はウイルスの遺伝情報であるウイルスゲノムを外部の環境から保護し、ゲノムの複製とウイルスの増殖に必要な宿主の特定の細胞へ、非常に正確に運搬する能力を有する。

ポリオーマウイルス科に属するサルを宿主とする simian virus 40 (SV40) 粒子は直径約 50 nm の正二十面体構造をしており、この構造は VP1 と呼ばれる 1 種類のタンパク質のみで構築されている。そのウイルス粒子の内側には裏打ちタンパク質の VP2 および VP3 が結合しており、さらにウイルス粒子中心には、ヒストンタンパク質によって凝集した約 5,000 塩基対の二本鎖環状ウイルスゲノム DNA が存在している。SV40 VP1 で構成されるウイルス粒子は、サルの腎臓細胞へ正確に到達し、その細胞表面に結合、細胞内に侵入、最終的には細胞のゲノムが収納されている細胞核まで正確にウイルスゲノムを運搬し、細胞の DNA 複製機構を乗っ取ることで、SV40 ウイルスゲノム DNA の増幅を達成する。VP1 は内包した物質を保護しながら的確に目的の細胞に届けるという優れた機能を有しているため、VP1 を用いて薬効のある物質を運搬するためのドラッグデリバリー

システムの開発が行われてきた。VP1 は組換え体として、昆虫細胞内で発現させると、VP1 のみで SV40 粒子と構造上同一のウイルス様粒子 (virus-like particle: VLP) を構築することが知られており、細胞抽出液から密度勾配遠心法によって VLP のみを精製することができる。精製した VLP は、カルシウムキレート剤とジスルフィド結合還元剤存在下で VLP を構成する VP1 五量体と呼ばれる VP1 タンパク質が 5 つ会合したサブユニットまで解離することが知られている。我々は VP1 五量体をゲル濾過クロマトグラフィ法によって高度に精製する方法を確立した。VP1 には他の因子の力を借りること無くウイルス粒子に自動的に集合化する能力があり、我々の解析によって、精製した VP1 五量体を、透析法を用いて高塩濃度の溶媒に置換すると VLP に集合化することが明らかとなっている。また、生理的な溶媒では VLP への集合化は誘導されないが、粒子裏打ちタンパク質である VP2 および VP3 を添加する、または、DNA を添加することで生理的な溶媒においても VLP への集合化が起きることが判明し、構築した VLP 内部に VP2 および VP3、また、DNA が内包されることも明らかとなった。我々はさらに、外来のタンパク質を VLP 内部に内包する方法、VLP の表面を化学的または遺伝的に修飾することで VLP の細胞指向性を変化させる技術も確立した。さらに、最近では VP1 五量体を用いて人工的粒子を被覆する技術の確立にも成功した。これらの一連の技術は、ドラッグデリバリーシステムへの応用展開が期待されている。しかしながら一方で、VP1 がウイルス由来であることから、免疫機構によってウイルスであると認識されることで、免疫が活性化される可能性が指摘されている。

我々は、SV40 VP1 のドラッグデリバリーへの医療応用における免疫源性の問題を克服しつつ、同時に CTL ペプチドを用いた免疫における弱点を克服するために、SV40 VP1 のドラッグデリバリーキャリアとしての機能を、CTL ペプチドを運搬するためのキャリアとして用いることで解決することを発案した。今回は、SV40 粒子表面に露出している DE ループおよび HI ループと呼ばれる領域に、目的の CTL ペプチドを挿入し、CTL ペプチドを運搬するデリバリーキャリアを構築した。ウイルス粒子はウイルスゲノムを的確に標的細胞内に運搬できることから、体内での非特異的吸着が抑制できると期待される。また、ウイルス粒子は自然免疫賦活物質であると考えられることから、IFA などの免疫賦活物質を加えなくても十分に免疫活性化を誘導できると期待され、また、CTL ペプチドを挿入することでペプチドの分解を防ぐことができると予想された。目的の CTL が誘導できれば、汎用抗ウイルス細胞傷害性 T 細胞誘導剤の基本骨格とするデリバリーキャリアとしての CTL ワクチンプラ

ットフォームとして、SV40 VP1 を用いることが非常に有用であると考えられる。

### 3. 研究の方法

ワクチンデリバリーキャリアのプラットフォームとしてのSV40 VP1の機能を確認するために、モデル系として、インフルエンザウイルス粒子の裏打ちタンパク質のマトリックスタンパク質 M1 の CTL エピトープ (FMP:58-66: GILGFVFTL) を SV40 VP1 の DE および HI ループに挿入した遺伝子を構築し、バキュロウイルス発現系を用いて、組換え体として発現させることで、インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス細胞傷害性 T 細胞誘導剤を構築した。構築した抗インフルエンザウイルス細胞傷害性 T 細胞誘導剤の CTL 誘導能を調べるために、ヒトで最も高頻度に保持されている MHC class I である HLA-A2 を有する HLA-A2 トランスジェニックマウスに、免疫賦活物質を加えずに、皮下、腹腔、筋肉、および、鼻腔免疫した。免疫したワクチンに対する CTL の誘導は免疫後 7 日後に検出できるため、免疫 7 日後に、脾臓からリンパ球を調製した。リンパ球の CTL が FMP:58-66 ペプチドに特異的に反応すれば、細胞傷害性 T 細胞誘導剤に対する CTL が誘導されたことになる。そこで、intra-cellular cytokine staining と呼ばれる方法での検出を行った。脾臓から調製したリンパ球に対して、FMP:58-66 ペプチドを混合し、5 時間培養した後、FITC-抗マウス CD8 抗体、および、PE-抗マウス IFN- $\gamma$  抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。さらに、FMP:58-66 ペプチド特異的に検出された CD8 陽性 IFN- $\gamma$  陽性細胞に細胞傷害活性があることを確認するために、 $^{51}\text{Cr}$  release assay を行った。免疫したマウスの脾臓からリンパ球を調製し、FMP:58-66 ペプチド特異的に増殖する細胞群を 7 日間培養した後、 $^{51}\text{Cr}$  を細胞内に取り込んでいる、MHC class I を介して FMP:58-66 ペプチドを提示していない細胞群、または、提示している細胞群と混合した。混合培養後 4 時間後に、培養液に溶出してきた  $^{51}\text{Cr}$  のカウントを測定し、細胞傷害活性効率を算出した。細胞が傷害されると、細胞膜が破壊されるため、細胞内から  $^{51}\text{Cr}$  が漏れ出すので、このカウントが大きくなると、細胞傷害活性があるということになる。また、in vivo CTL assay と呼ばれる、FMP:58-66 ペプチドに特異的に反応する CTL がマウス体内で細胞傷害活性を有することを調べる解析を行った。細胞傷害性 T 細胞誘導剤で免疫をしていないマウス、または、免疫をしたマウスに、尾静脈から CFSE で弱く染色した MHC class I を介して FMP:58-66 ペプチドを提示していない細胞群、および、CFSE で強く染めた提示している細胞群を 1:1 の割合で混合したものを導入した。導入 16 時間後に、マウスの脾臓からリンパ球を調製し、CFSE の強度を検出する

ことで、マウス体内での細胞の比率の変化を解析した。FMP:58-66 ペプチドに反応する CTL が誘導されていると、体内から CFSE で強く染めた FMP:58-66 ペプチドを提示している細胞群が除去されるため、割合が減少することが期待される。さらに、抗インフルエンザウイルス細胞傷害性 T 細胞誘導剤の導入・免疫による効能を解析するために、免疫をした 7 日後に、マウス径鼻より A 型インフルエンザウイルスを 100 TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infectious dose) で導入し、インフルエンザウイルス感染によるマウスの体重減少を毎日の体重測定により計測し、また、マウス肺でのインフルエンザウイルス量をインフルエンザウイルス感染 4 日後に、マウス肺を摘出、ホモジナイズ後、遠心し、上精に含まれるインフルエンザウイルス量を、MDCK 細胞を用いた limiting dilution 法の結果から Karber の式を用いて TCID<sub>50</sub> を算出した。細胞傷害性 T 細胞誘導剤への DNase I の添加による CTL 誘導能の変化、および、細胞傷害性 T 細胞誘導剤の導入・免疫による CTL の免疫記憶効果は intra-cellular cytokine staining によって解析した。

### 4. 研究成果

構築した抗インフルエンザウイルス細胞傷害性 T 細胞誘導剤で、HLA-A2 トランスジェニックマウスに皮下、腹腔、筋肉、および、鼻腔免疫すると、intra-cellular cytokine staining によって、期待通り、免疫後 7 日間で、マウス脾臓細胞に FMP:58-66 ペプチドに特異的に反応し、IFN- $\gamma$  を放出する CD8 陽性細胞群が誘導されることが明らかとなった (表 1)。この細胞群の誘導頻度を古典的な免疫方法である、FMP:58-66 ペプチドと IFA と two syringe 法で懸濁したもので免疫する方法と比較したところ、およそ 50 倍効率良くこの細胞群が細胞傷害性 T 細胞誘導剤による免疫で誘導できることが明らかになった。この細胞群が FMP:58-66 ペプチド特異的に細胞傷害性 T 細胞としての活性を有することを  $^{51}\text{Cr}$  release assay および in vivo CTL assay によって確認した。また、抗インフルエンザウイルス細胞傷害性 T 細胞誘導剤で免疫したマウスでは、インフルエンザウイルスの径鼻感染による肺でのウイルス増殖が抑制され、また、感染に伴う体重減少も抑制されることが明らかになった。このことから、SV40 VP1 を基本骨格とした、ワクチンデリバリープラットフォームとして、細胞傷害性 T 細胞誘導剤を構築することはウイルス感染を抑制することに有望であることが、実験レベルで明らかになった。このように強力な免疫賦活作用が、DNA の混入によるものでは無いことを確認するために、細胞傷害性 T 細胞誘導剤画分を DNase I 処理し、この処理した細胞傷害性 T 細胞誘導剤による導入・免疫を行った。その結果、処理した細胞傷害性 T 細胞誘導剤による導入・免疫でも CTL の誘

導率は減少しなかったことから、細胞傷害性 T 細胞誘導剤の骨格を形成している SV40 VP1 タンパク質自体に強力な免疫賦活作用があることが強く示唆された。このように強力な免疫賦活作用を有することから、目的とする CTL に対する長期免疫記憶が細胞傷害性 T 細胞誘導剤の導入・免疫によって誘導されると期待されるが、実際、intra-cellular cytokine staining によって、細胞傷害性 T 細胞で免疫した 30 日後でも FMP:58-66 ペプチド特異的に反応する CTL が確認できた。このことから、SV40 VP1 を基本骨格とする細胞傷害性 T 細胞誘導剤は、目的の CTL に対する長期免疫記憶も誘導可能であることが確認された。このことから、SV40 VP1 を基本骨格とする細胞傷害性 T 細胞誘導剤が CTL ワクチンとして非常に有用であることが示唆された。また、意外なことに、intra-cellular cytokine staining によって、SV40 VP1 を基本骨格とする細胞傷害性 T 細胞誘導剤は、鼻腔投与によっても目的の CTL を誘導することが明らかになった。注射器のような投与器を必要としない径鼻を介した投与方法は、患者への負担が少なく、医師による処置を必要としないことから、患者の quality of life 上げることに繋がるため、細胞傷害性 T 細胞を実用化することは、医療費の軽減にも貢献できると考えられるので、社会にも非常に貢献できるものと期待される。また、鼻腔免疫で CTL を誘導できることは、粘膜ワクチンとして SV40 VP1 ワクチンデリバリープラットフォームが優れていることを示唆しているため、SV40 VP1 の免疫賦活作用の今後の更なる詳細な解析による解明が期待される。

(表 1)

**SV40 VP1 ワクチンデリバリープラットフォームを用いた細胞傷害性 T 細胞誘導剤で目的の CTL ペプチドに対する CTL を誘導できることが判明した免疫ルート** (外来エピトープは SV40 VP1 の DE または HI ループ領域に挿入した)

**Summary of induction for aimed CTL using the chimeric SV40 VP1-based inducing agent** (foreign CTL peptides were inserted into the DE or HI loop of VP1)

immunization route	influenza virus CTL epitope FMP:58-66 (GILGFVFTL)	cancer CTL epitope WT1WT (RMFPNAPYL)
intra-nasal (i.n.): 径鼻	(+)	n/a
intra-muscular (i.m.): 筋肉	(+)	(+)
intra-peritoneal (i.p.): 腹腔	(+)	(+)
subcutaneous (s.c.): 皮下	(+)	n/a

(+): possible to induce response

n/a: not addressed

## 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 6 件)

- ① Chimeric SV40 virus-like particles induce specific cytotoxicity and protective immunity against influenza A virus without the need of adjuvants. Kawano M, Morikawa K, Suda T, Ohno N, Matsushita S, Akatsuka T, Handa H, Matsui M. *Virology*, 査読有り, 448:159-167, 2014. DOI: 10.1016/j.virol.2013.10.010.
- ② Viral protein-coating of magnetic nanoparticles using simian virus 40 VP1. Enomoto T §, Kawano M §, Fukuda H, Sawada W, Inoue T, Haw KC, Kita Y, Sakamoto S, Yamaguchi Y, Imai T, Hatakeyama M, Saito S, Sandhu A, Matsui M, Aoki I, Handa H. *J Biotechnol.*, 査読有り, 167:8-15, 2013. §These two authors contributed equally to this work. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.06.005.
- ③ SV40 virus-like particles as an effective delivery system and its application to a vaccine carrier. Kawano M, Matsui M, Handa H. *Expert Rev Vaccines*, 査読有り, 12:199-210, 2013. DOI: 10.1586/erv.12.149.
- ④ 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, 査読無し, 40 巻, 2013, 68
- ⑤ 川野 雅章, 半田 宏, ウイルスコンポーネントを用いた新規 DDS 担体, *Medical Science Digest*, 査読無し, 38 巻, 2012, 2-3
- ⑥ 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, 査読無し, 39 巻, 2012, 9-13

[学会発表] (計 3 件)

- ① KAWANO Masaaki, MORIKAWA Katsuma, SUDA Tatsuya, OHNO Naohito, MATSUSHITA Sho, AKATSUKA Toshitaka, HANDA

Hiroshi, MATSUI Masanori,  
Development of a CTL-based vaccine  
carrier with self-adjuvant properties  
using simian virus 40 virus-like  
particles, Annual meeting of the  
Japanese society for immunology 2013,  
December 11-13<sup>th</sup>, 2013, Makuhari  
Messe, Chiba, Japan

- ② 川野 雅章、松下 祥、赤塚 俊隆、半  
田 宏、松井 政則、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、2013 年 11 月 22 日～2013  
年 11 月 23 日、埼玉医科大学 日高キャン  
パス、創立 30 周年記念講堂
- ③ KAWANO Masaaki, SUDA Tatsuya,  
MATSUSHITA Sho, AKATSUKA  
Toshitaka, HANDA Hiroshi, MATSUI  
Masanori, Chimeric VP1 of simian  
virus 40 induces IL-12 production from  
DC, facilitating CTL induction against  
an inserted CTL epitope within the  
VP1, Annual meeting of the Japanese  
society for immunology 2012,  
December 5-7<sup>th</sup>, 2012, Kobe  
International Conference Center, Kobe  
International Exhibition Hall, Kobe  
Portopia Hotel, Hyogo, Japan

[図書] (計 1 件)

- ① Masaaki Kawano, Masanori Matsui,  
Hiroshi Handa, Future Medicine Ltd,  
Virus-like Particles in Vaccine  
Development, 2014, 137

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 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：LSIP  
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：外国

## 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・助教  
研究者番号：30447528