

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860771

研究課題名(和文) 臨床応用に向けた次世代治療ワクチンの開発研究

研究課題名(英文) Development study of next generation therapeutic vaccine for clinical application

研究代表者

高木 徹 (TAKAGI, AKIRA)

埼玉医科大学・医学部・助手

研究者番号：20536891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)： リポソームを用いた細胞傷害性T細胞誘導型ワクチンの開発を行った。成果としてワクチンの候補を1つ、またワクチンの評価方法として新しい細胞傷害性T細胞の測定法を確立した。ワクチン候補としてC型肝炎ウイルス由来ペプチドをリポソーム表面に結合しマウスに免疫すると、非常に高い細胞傷害性T細胞活性を誘導し、そのマーカーであるCD107aやIFN-gammaの産生が顕著に見られ、チャレンジ実験ではウイルスを完全に排除することができた。新しい測定法は従来の放射性同位元素を用いない方法で、非常に感度が高く、被曝の恐れがなく、マルチパラメータを測定できる方法であり、臨床応用に期待できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： We developed a cytotoxic T cell induced vaccine using liposomes. As a result, we have established one vaccine candidate and a new cytotoxic T cell assay method as a vaccine evaluation method. Immunization of mice with a peptide derived from hepatitis C virus as a candidate for vaccine bound to the surface of liposome induces extremely high cytotoxic T cell activity, marked production of CD 107a and IFN-gamma, which are the markers, In the challenge experiment we were able to completely eliminate the virus. A new measurement method is a method that does not use conventional radioactive isotope, it is a very sensitive method, there is no fear of exposure, it is a method that can measure multiparameter and it can be expected for clinical application.

研究分野：免疫学

キーワード：CTL ワクチン C型肝炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

CTLは中和抗体と異なり、一度ウイルス感染が成立しても、感染細胞を破壊するか、あるいは細胞内でのウイルス複製を抑制してウイルスを排除することができる。またそれが認識する抗原は、ウイルスの非構造領域タンパクのように、ウイルス増殖に必須な役割を果たし、そのため変異株間でもよく保存されていることが多い。従ってウイルス特異的CTLを誘導するワクチンは、エイズウイルス(HIV)やC型肝炎ウイルス(HCV)の場合のように、抗原変異を起こしながら慢性的に持続感染する感染症の治療に使えると期待される。

2. 研究の目的

(1) 応募者はこれまで細胞傷害性T細胞(CTL)誘導型C型肝炎ウイルス(HCV)ワクチン開発に取り組んできたが、その過程で非細胞傷害性を伴わずにウイルス増殖抑制効果を発揮するユニークなワクチンを見出した。おそらく世界初のものであり、特に治療ワクチンとして非常に有用であると期待できる。本研究の目的はC型肝炎治療ワクチンを完成型に近づけ、さらに多くの慢性感染症治療ワクチン開発につながる道を切り開くことである。

(2) これまで、細胞傷害性T細胞(CTL)の活性を測定するには、放射性同位元素である⁵¹Crを用いた方法が広く行われてきた。しかし安全性の観点から、近年それに代わる方法が登場した。これらをさらに発展させ、感度が高く、放射性同位元素を用いない安全性の高い測定系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

仏パスツール研・Lemmonier博士により供与されたHLA-A2およびHLA-A24トランスジェニックマウスを用いた。

(2) HCVワクチンの改良

これまでのNS3領域に限られた抗原ペプチド、HLA-A2.1(世界人口の約3割を占める)に限られた適用範囲から抗原領域と適用HLA型を拡大するため、以下の2つを行う。

：HCV全領域での抗原エピトープの同定
HCV Core, E1, E2, NS4, NS5領域のアミノ酸配列からHLA-A2.1結合モチーフをもつエピトープ候補をコンピュータ解析で選り、合成ペプチド(Operon O-PLUSで94種を同時合成)を5-7個ずつのプールに分け、それぞれリポソーム結合を行う。各プールリポソームで免疫したマウスのリンパ球を各ペプチドで刺激し、⁵¹Cr-release assayとELISPOT(IFN- γ)を行い、非細胞傷害性抗ウイルス活性をもつワクチン候補

を選ぶ。選択されたペプチドを単独合成、リポソーム結合し、モデルマウスで治療効果、肝障害の有無を判定する。

：HLA-A24について抗原エピトープの同定
HLA-A24は日本人の約半数が保有する。従ってHLA-A2に加えてHLA-A24拘束性抗原ペプチドが選択できると、日本人の患者の8割近くに有効なワクチンとなる。HLA-A24 Tg miceはHLA-A2.1 Tg miceと同様、パスツール研・Dr.Lemmonierから入手・繁殖しインフルエンザワクチン研究に使用しているので、HCV core Tg miceとのF1マウスを作製し、この手法を当てはめる。

：HCVタンパク結合ワクチンの開発

HCV-NS3遺伝子(5種類)を発現ベクターに組み込み、大腸菌に形質転換させIPTCで誘導を行う。その大腸菌をガラスビーズで破碎後、超音波処理を行う。タンパクを含む上清を、抗NS3モノクローナル抗体結合ビーズを用い、NS3タンパクを結合させる。溶出液を分取用電気泳動にかけタンパクを精製する。1mgのタンパクをリポソームに結合しワクチンとした。アジュバントを加えたワクチンと、加えないワクチンをマウスに免疫し、同様の実験を行った。

(3) 新しい細胞傷害性T細胞試験の確立

：抗原と免疫方法

インフルエンザウイルスのM1タンパクを発現する、組み替えアデノウイルスを、HLA-A2トランスジェニックマウスに腹腔投与した。

：CTL活性の測定

免疫後1週間のマウスの脾リンパ球をCTLとして扱い、標的細胞にはGFPを発現するC1R-A2細胞を用いた。標的細胞はM1タンパク由来ペプチドでパルスし、CTLとPropidium iodide(PI)を混ぜ、4時間後にPIに染まる死細胞をフローサイトメーターで測定した。用いたCTLは試験管内で抗原刺激を行ったものと、プライマリー細胞を用いた。またフローサイトメーターを使用するので、従来とは異なりマルチパラメータでの測定が可能となるため、同時にCD107a, IFN- γ 、免疫チェックポイント分子の測定を行う。

4. 研究成果

(1) HCVタンパク結合ワクチンの効果

ワクチン(Lip-NS3-2)免疫マウスにおいて、コントロールと比較して有意に細胞傷害活性やIFN- γ 、CD107aの産生が増加することが確認された。またNS3タンパクを発現する組み替えウイルスのチャレンジ実験においても、ウイルスを完全に排除することが確認された。続いてワクチン(Lip-NS3-5)免疫マウスにおいて同様の実

験を行ったところ、同様の結果が得られたが、細胞傷害活性がの測定ができなかった。さらにアジュバントを加えず免疫したマウスにおいても、優位に免疫誘導能が示された。

これらの結果からタンパク結合ワクチン(Lip-NS3-2, -5)は、アジュバントを加えなくても有意に免疫を誘導し、より安全性の高いワクチン開発につながることを示唆された。

(2) 新しい細胞傷害性 T 細胞試験の確立

確立した試験では、従来の細胞傷害性試験と相関し、非常に感度が高く、放射性同位元素を用いないため、安全な試験であることが示された。同時に他の分子マーカーの測定ができることが確認された。またプライマリー細胞でも活性が確認できることが確認された。

このように非常に感度良く、マルチパラメータで結果が出るので、テラーメイドのがん免疫治療に即時に情報を提供できる新しいCTL測定法に発展が考えられる。

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)

Takagi A., Y Horiuchi., M Matsui. Characterization of the flowcytometric 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

[学会発表](計5件)

A.Takagi, Y.Horiuchi, N.Kobayashi, M.Matsui, T.Akatsuka. Development of universal HCV vaccine by coupling HCV NS3 protein to the surface of liposomes. 第63回日本ウイルス学会学術集会 2015年11月24日

Akira Takagi, Nobuharu Kobayashi, Yutaka Horiuchi, Masanori Matsui, Toshitaka Akatsuka. Development of universal HCV vaccine by coupling HCV NS3 protein to the surface of liposomes. 第44回日本免疫学会学術集会 2015年11月18日

高木 徹、堀内 大、小林 信春、松井政則、赤塚 俊隆 リポソーム表面結合 HCV-NS3 タンパクによるユニバーサル HCV ワクチンの開発 第19回日本ワクチン学会学術集会 2015年11月15日

Akira TAKAGI, Nobuharu KOBAYASHI, Yutaka HORIUCHI, Ajit KUMER, Maiko TANEICHI, Tetsuya UCHIDA, Toshitaka AKATSUKA. 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. Strasberg, France. 2015年10月11日

Takagi.A, Kobayashi.N, Horiuchi.Y, Kobayashi.K, Asada.R, Ikebuchi.K, Kumar.A, Taneichi.M, Uchida.T, Akatsuka.T. Development of universal HCV vaccine by coupling HCV NS3 proteins to the surface of liposomes. 15th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases. Berlin, Germany 2015年6月28日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 徹 (TAKAGI Akira)
埼玉医科大学・医学部・助手
研究者番号: 20536891

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

赤塚 俊隆 (AKATSUKA Toshitaka)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30159321

内田 哲也 (UCHIDA Tetsuya)

埼玉医科大学・医学部・特任教授

研究者番号: 50176690