

新型インフルエンザ出現に備えたカセットセオリー
に基づくペプチドワクチンの作製

(研究課題番号 10557025)

平成10年度、平成11年度科学研究費補助金 [基盤研究(B)(2)]
研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 小笠原 一誠

(滋賀医科大学病理学第二講座)



はしがき

現在までにヒトの間で流行感染したインフルエンザウイルスは H1、H2、H3 サブタイプである。近い将来これ以外の新型インフルエンザウイルスが出現すると予想されている。その時我々は新型ウイルスに対する免疫を獲得していないので、新型ウイルスは世界的規模で流行すると推定される。1997 年には香港で、H5 サブタイプインフルエンザウイルスがヒトから分離された。もともと H5 サブタイプインフルエンザウイルスはトリでは強毒であることが知られていたもので、流行するかどうか注目された。幸い、ヒトからヒトへの感染はなく、大流行とはならなかった。しかし、このようにトリでは強毒と考えられている H5 や H7 サブタイプインフルエンザウイルスが遺伝子再集合によりヒトへの感染性を獲得し、ヒトに感染流行する可能性は常に残されている。このような新型インフルエンザウイルスによる経済的、人的損失は莫大なものになるとすでに試算されている。実際、免疫能が低下している人、特に老人、幼児が新型でないにしてもインフルエンザウイルスに感染すると重篤になることは、最近再確認され、社会問題となっている。先進国ではインフルエンザウイルス感染特に新型ウイルス出現に備えた対策が検討されているが、日本ではようやくインフルエンザウイルスに対するワクチンの必要性が再度認識されはじめたところである。いずれにしても、感染防御に有効で安全なワクチンの開発がインフルエンザ対策の主要戦略になることは間違いない。

従来のインフルエンザウイルスに対するワクチンは、有精卵の確保や製造過程での感染などの問題を抱えている。これに比べて、ペプチドワクチンは危険性がなく、変異の少ないエピトープを簡単に合成して利用できることから、種々のインフルエンザウイルスに有効なワクチンになると考えられる。また、長期保存が可能なため有精卵の確保の問題もなく、いつ新型ウイルスが出現してもすぐに対応できる。従って、新型インフルエンザウイルスに対しては、より実地的な対応をとれるとれると考えられる。そこで、我々は以前からペプチドワクチンの実用化に向けての基礎的実験を行ってきた。すなわち、我々が提唱したカセットセオリーの考え方に基づいて H3 インフルエンザウイルスに対するペプチドワクチンを作製した。このペプチドは、中和抗体の産生を増強し、マウスでのウイルス感染を抑制した。本研究の目的は、カセットセオリーの考え方に基づいて H5 に対するペプチドワクチンを作成することである。

成果

1) H5 に対する中和抗体を誘導するためのペプチドワクチンを作成したが、中和抗体の誘導には至らなかった。

カセットセオリーの考え方に基づいて H5 に対するペプチドワクチンを作成し、中和実験を行ったが成功しなかった。これは、カセットセオリーに基づいて作成されたペプチドに対する抗体のすべてが、オリジナルの蛋白と反応するわけではないことを示している。そこで、カセットセオリーの改良型として I-A^b 結合性コンポーネント (46F-/54A) の外側にジスルフィド結合で環状にしたペプチドを付加した合成ペプチドを作成した。予備的実験ではあるが、改良型ペプチドの環状部分は蛋白上でループアウトした部分を mimic できることが判明した。現在、改良型 H5 ペプチドによる感染抑制の実験を予定している。また、種々の蛋白に対する抗体の作成に応用できるので、ペプチドを投与することにより生体に不利益をもたらす物質を中和するのにも使用できる可能性がある。

2) CTL を誘導するペプチドを鼻腔より投与して H3 インフルエンザの感染を抑制することができた。

数年前まではペプチドを使用してペプチド特異的 CTL を誘導することはできなかった。我々はどこの施設でもできる癌細胞特異的 CTL の活性化方法を開発することを目的として、リポソームに封入した癌関連抗原 (TAA) ペプチドと抗 CD40 抗体とをマウス皮下に投与した。抗 CD40 抗体は抗原提示能が強い樹状細胞 (DC) を活性化し、DC 上の MHC 分子および副刺激を与える B7 分子を増強し、効率的に CTL を活性化する。その結果、リポソームに封入した TAA ペプチドと抗 CD40 抗体投与により、TAA ペプチド特異的 CTL を活性化することに成功した。また、先にリポソームに封入した TAA ペプチドと抗 CD40 抗体を投与し、腫瘍を移植すると完全に拒絶された。このことにより、容易にペプチド特異的 CTL を誘導できることが判明したので、マウス MHC クラス I 分子 (D^b) と結合することが判明しているインフルエンザウイルス由来のヌクレオプロテイン (NP) 366-374 を封入した多層性リポソーム (phosphatidylcholine : phosphatidylserine = 7 : 3) と抗 CD40 抗体をマウスの鼻腔より投与し、その後 H3

サブタイプインフルエンザウイルスである A/Aichi/2/68 を感染させ、肺内でのウイルス増殖抑制の程度を検討した。その結果、リポソーム封入ペプチドまたは抗 CD40 抗体の単独ではほとんど影響がなく、両者を同時に投与したときだけウイルス感染を抑制することが判明した。この効果は2ヶ月間持続した。CTL に認識される NP は変異が少なく、同一のペプチドワクチンが種々のサブタイプインフルエンザウイルスに有効である可能性が高い。現在、H5 インフルエンザウイルスの感染抑制を行っている。

最後になりましたが、本研究の大部分は免疫科学研究所病理部門で行ったもので、終始叱咤激励していただいた小野江先生に心より感謝いたします。また、北海道大学大学院獣医学研究科微生物学教室の喜田先生はじめ御指導・御助言を賜った諸先生にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

平成 12 年 3 月

小笠原 一誠

研究組織

研究代表者：小笠原 一誠（滋賀医大・教授）

分担研究者：小野江 和則（北海道大学・教授）

喜田 宏（北海道大学・教授）

研究経費

平成 10 年度： 8,100 千円

平成 11 年度： 2,600 千円

計 10,700 千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Namba, K., Ogasawara, K., Kitaichi, N., Matsuki, N., Takahashi, A., Sasamoto, Y., Kotake, S., Matsuda, H., Iwabuchi, K., Ohno, S. and Onoé, K. Identification of a peptide inducing EAU in I-A^k carrying mice. *Clin. Exp. Immunol.* 111, 442-449, 1998.
2. Takahashi, A., Ogasawara, K., Matsuki, N., Fujinaga, T., Nakaya, K., Ikuta, K., Auwanit, W., Honda, M., Fukui, Y., Sasazuki, T., Iwabuchi, K. and Onoé, K. Development of peptide vaccines inducing production of neutralizing antibodies against HIV-1 viruses in HLA-DQ6 mice. *Vaccine* 16, 1537-1543, 1998.
3. Iwabuchi, C., Iwabuchi, K., Nakagawa, K., Takayanagi, T., Nishihori, H., Tone, S., Ogasawara, K., Good, R.A. and Onoé, K. Intrathymic selection of NK1.1⁺αβ T cell antigen receptor (TCR)⁺ cells in transgenic mice bearing TCR specific for chicken ovalbumin and restricted to I-A^d. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 8199-8204, 1998.
4. Kojyo, T., Hatakeyama, S., Yamada, H., Iwabuchi, K., Kajino, K., Ogasawara, K., Onoé, K. and Fujimoto, S. Induction of endometriosis and adenomyosis by transvaginal pituitary transplantation in mice with and without natural killer cell activity. *Ame. J. Reprod. Immunol.* 40, 441-446, 1998.
5. Ogasawara, K. (Mini Review) Synthetic peptide vaccines effective in preventing virus infection. *Microbiol. Immunol.* 43, 915-923, 1999.
6. Kariyone, A., Yamamoto, S., Nagasaka-Kametaka, A., Harada, M., Takahashi, A., Ogasawara, K. and Takatsu K. Amino acid residues of T cell epitope of the α antigen of Mycobacteria critical for Vβ11⁺ Th1-cells. *Infect. Immun.* 67, 4312-4319, 1999.
7. Matsuki, N., Ogasawara, K., Takami, K., Namba, K., Takahashi, A., Fukui, Y., Sasazuki, T., Iwabuchi, K., Good, R.A. and Onoé, K. Prevention of infection of influenza virus in DQ6 mice, a human model, by a peptide vaccine prepared according to the cassette theory. *Vaccines* 17, 1161-1168, 1999.
8. Kitaichi, N., Kotake, S., Sasamoto, Y., Namba, K., Matsuda, A., Ogasawara, K., Onoé, K., Matsuda, H. and Nishihira, J. Prominent increase of macrophage migration inhibitory factor in the sera of patients with uveitis. *Inv. Opth. Vis.*

Science 40, 247-250, 1999.

9. Takahashi, A., Iwabuchi, K., Suzuki, M., Ogasawara, K., Nishihira, J. and Onoé, K. Antisense macrophage migration inhibitory factor (MIF) prevents anti-IgM mediated growth arrest and apoptosis of a murine B cell line by regulating cell cycle progression. *Microbiol. Immunol.* 43, 61-67, 1999.
10. Ato, M., Iwabuchi, K., Matsuki, N., Mukaida, N., Iwabuchi, C., Takahashi, A., Takayanagi, T., Dondog, E., Hatakeyama, S., Ishikura, H., Kato, M., Negishi, I., Nishihori, H., Ogasawara, K., Matsushima, K. and Onoé, K. Delayed clearance of zymosan-induced granuloma and depressed phagocytosis of macrophages with concomitant up-regulated kinase activities of src-family in a human monocyte chemoattractant protein-1 transgenic mouse. *Immunobiol.* 201, 432-449, 2000.
11. Kitaichi, N., Ogasawara, K., Iwabuchi, K., Nishihira, J., Namba, K., Onoé, K., Konishi, J., Kotake, S., Matsuda, H. and Onoé, K. Different influence of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in signal transduction pathway of various T cell subsets. *Immunobiol.* 201, 356-367, 2000.
12. Itoh, D., Ogasawara, K., Matsushita, K., Morohashi, T., Namba, K., Matsuki, N., Kitaichi, N., Inuyama, Y., Hosokawa, M., Nakayama, E., Iwabuchi and K., Onoé, K. Effective priming of cytotoxic T lymphocyte precursors by subcutaneous administration of peptide antigens in liposomes accompanied with anti-CD40 and anti-CTLA-4 antibodies. *Immunobiol.* (in press)
13. Itoh, D., Ogasawara, K., Iwabuchi, K., Inuyama, Y. and Onoé, K. Induction of CTL responses by simultaneous administration of liposomal peptide vaccine with anti-CD40 and anti-CTLA-4 mAb. *J. Immunol.* (in press)

(2) 口頭発表

1. 岩渕和也, 阿戸 学, 小笠原一誠, 小野江和則: TCR トランスジェニック マウス (Tgm)を用いた胸腺内 NK1.1⁺T細胞の分化・選択の研究. 第87回日本病理学会総会、1998. (広島)
2. 小笠原一誠, 岩渕和也, 阿戸 学, 梶原昌治, 小野江和則: ペプチドワクチン投与による DQ6 マウスでのインフルエンザ感染抑制. 第87回日本病理学会総会、1998. (広島)

3. 阿戸 学, 岩渕和也, 小笠原一誠, 梶原昌治, 石倉 浩, 小野江和則: ヒト単球走化活性化因子 (MCAF/MCP-1) トランスジェニックマウスにおける肝内肉芽腫反応の遷延化. 第 87 回日本病理学会総会、1998. (広島)
4. 阿戸 学, 岩渕和也, 小笠原一誠, 梶原昌治, 石倉 浩, 向田直史, 松島綱治, 小野江和則: 炎症惹起物質投与時のヒト単球走化活性化因子 (MCAF/MCP-1) トランスジェニックマウスにおける血中 MCAF/MCP-1 産生に及ぼす影響. 第 38 回日本リンパ網内系学会総会、1998. (熊本)
5. Iwabuchi, K., Ato, M., Ishimori, N., Watano, K., Fujii, S., Iwabuchi, C., Ogasawara, K., Kitabatake, A. and Onoé, K.: Altered macrophage functions in a murine cell line, J774A.1, over-expressing rat CSK. 第 7 回国際マクロファージ分子細胞生物学シンポジウム、1998. (山形)
6. Ishimori, N., Iwabuchi, K., Fujii, S., Watano, K., Ato, M., Ogasawara, K., Kitabatake, A. and Onoé, K.: Bone marrow-derived cells are involved in the development of atherosclerotic lesions. 第 7 回国際マクロファージ分子細胞生物学シンポジウム、1998. (山形)
7. Kitaichi, N., Namba, K., Kotake, S., Sasamoto, Y., Ogasawara, K., Matsuda, A., Matsuda, H., Nishihira, J. and Onoé, K.: Regulation of T cell activation and experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) with anti-macrophage migration inhibitory factor (MIF) antibodies. First Combined International Symposium on Ocular Immunology and Inflammation, 1998. (Florida)
8. Namba, K., Kotake, S., Sasamoto, Y., Kitaichi, N., Matsuda, H., Ogasawara, K. and Onoé, K. : EAU induced by self peptide derived from IRBP in mouse system. First Combined International Symposium on Ocular Immunology and Inflammation, 1998. (Florida)
9. 刀祢さおり, 岩渕千雅子, 岩渕和也, 荒浪利昌, 根岸 泉, 小笠原一誠, 小野江和則: ZAP-70 遺伝子欠損マウスにおける NK-T 細胞の分化機構の解析. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会、1998. (神戸)
10. 南場研一, 諸橋大樹, 小笠原一誠, 北市伸義, 伊藤大祐, 岩渕和也, 小野江和則: EAU 誘導ペプチド含有リポソーム投与によるアナジー誘導と EAU 発症抑制の試み. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会、1998. (神戸)
11. 岩渕和也, 岩渕千雅子, 小野江和之, 小西 純, 小笠原一誠, 小野江和則: NK-T 細胞の補体感受性亢進メカニズムの解析. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会、1998. (神戸)

12. 北市伸義, 小笠原一誠, 岩渕和也, 西平 順, 小竹 聡, 笹本洋一, 小野江和則: 内因性ぶどう膜炎患者血清中におけるマクロファージ遊走阻止因子の増加. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会、1998. (神戸)
13. 小西 純, 岩渕和也, 岩渕千雅子, 小野江和之, 中川憲一, 小笠原一誠, 小野江和則: NK-T 細胞欠損系 *aly/aly* マウスと β_2m ノックアウトマウス骨髄キメラにおける NK-T 細胞の分化能獲得. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会、1998. (神戸)
14. 水本昇克, 岩渕和也, 阿戸 学, 岩渕千雅子, 小笠原一誠, 小野江和則: ヒト単球走化活性化因子(MCAF/MCP-1)トランスジェニックマウスにおける接触過敏反応の検討. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会、1998. (神戸)
15. 綿野敬子, 岩渕和也, 藤井 聡, 石森直樹, 小笠原一誠, 小野江和則: マウス allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) cDNA のクローニングおよび、組織分布の解析. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会、1998. (神戸)
16. 岩渕千雅子, 岩渕和也, 刀祢さおり, 伊藤大祐, 根岸 泉, 小笠原一誠, 小野江和則: ZAP-70 ノックアウトマウスにおける NK および NK-T 細胞の機能解析. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会、1998. (神戸)
17. 石森直樹, 岩渕和也, 藤井 聡, 綿野敬子, 阿戸 学, 岩渕千雅子, 小笠原一誠, 小野江和則: 動脈硬化病巣進展における骨髄由来細胞の関与. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会、1998. (神戸)
18. 伊藤大祐, 岩渕和也, 小笠原一誠, 小野江和則: 抗 CD40 モノクローナル抗体及び抗 CTLA4 モノクローナル抗体と抗腫瘍ペプチドワクチン同時投与による CTL 誘導. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会、1998. (神戸)
19. 阿戸 学, 岩渕和也, 小笠原一誠, 向田直史, 松島綱治, 石倉 浩, 小野江和則: ヒト単球走化活性化因子 (MCAF/MCP-1)トランスジェニックマウスにおける LPS 感受性の解析. 第 28 回日本免疫学会総会・学術集会、1998. (神戸)
20. 北市伸義, 南場研一, 小笠原一誠, 岩渕和也, 小竹 聡, 笹本洋一, 小野江和則: マウスモデルにおける IRBP 由来 EAU 惹起ペプチドの同定と、Liposome 封入抗原前投与による EAU 発症抑制. 第 3 回北海道免疫談話会・学術集会、1998. (札幌)
21. 岩渕千雅子, 岩渕和也, 刀祢さおり, 伊藤大祐, 小笠原一誠, 土佐紀子, 上出利光, 小野江和則: NK および NK-T 細胞の分化における ZAP-70 の役

- 割. 第3回北海道免疫談話会・学術集会、1998. (札幌)
22. 小笠原 一誠：シンポジウム T細胞抗原認識の分子機構. 平成10年度日本生化学会北海道支部・日本生物物理学会北海道支部・北海道分子生物学研究会合同シンポジウム「構造生物学ー生体高分子の構造解明と生物ー」、1998. (札幌)
 23. 小笠原一誠, 伊藤大祐, 諸橋大樹, 北市伸義, 小野江和則：ペプチド特異的 CTL の活性化. 第2回日本ワクチン学会総会・学術集会、1998. (豊中)
 24. Ato, M., Iwabuchi, K., Mukaida, N., Ishikura, H., Ogasawara, K. and Onoé, K.: Altered macrophage functions in a human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) transgenic mouse. The 10th International Congress of Immunology, 1998. (NewDelhi)
 25. 小笠原 一誠；ペプチドワクチンによるインフルエンザウイルスに対する感染防御. 北海道道立衛生研究所講演会、1999. (札幌)
 26. 小笠原 一誠；ペプチドワクチンの可能性. 第3回日本ワクチン学会(教育講演)、1999. (名古屋)
 27. 小笠原 一誠：ペプチドワクチンの可能性について. 日本アフェレーシス学会(教育講演)、1999. (大津)
 28. 伊藤 大祐、小笠原 一誠、小野江 和則：抗 CD40 及び抗 CTLA-4 モノクローナル抗体と抗腫瘍ペプチドワクチン同時投与による CTL 誘導. 第三回基盤的癌免疫研究会総会、1999. (豊中)
 29. 岩淵和也, 岩淵千雅子, 刀裨さおり, 伊藤大祐, 小笠原一誠, 小野江和則：ZAP-70 ノックアウト (-/-) マウスを用いた NK および NK-T 細胞分化の解析. 第18回日本胸腺研究会、1999. (仙台)
 30. 北市伸義, 南場研一, 小竹 聡, 笹本洋一, 松田英彦, 小笠原一誠, 小野江和則：EAU 誘導ペプチド封入りポソーム前投与によるマウス EAU の発症抑制. 第103回日本眼科学会、1999. (千葉)
 31. 岩淵和也, 小笠原一誠, 阿戸 学, 小野江和則：ZAP-70 ノックアウトマウスを用いた NK1.1 陽性 T 細胞分化の研究. 第88回日本病理学会総会、1999. (東京)
 32. 小笠原一誠, 阿戸 学, 岩淵和也, 小野江和則：腫瘍関連ペプチド特異的 CTL の活性化. 第88回日本病理学会総会、1999. (東京)
 33. 阿戸 学, 岩淵和也, 小笠原一誠, 小野江和則：ヒト単球走化活性化因子

- (MCAF/MCP-1)トランスジェニックマウスにおける LPS 感受性亢進のメカニズム. 第 88 回日本病理学会総会、1999. (東京)
34. 阿戸 学, 岩渕和也, 小笠原一誠, 小野江和則: ヒト単球走化活性化因子 (MCAF/MCP-1)トランスジェニックマウスにおける LPS 投与後の各種サイトカインの動態. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会、1999. (京都)
 35. 北市伸義, 小笠原一誠, 岩渕和也, 西平 順, 小竹 聡, 小野江和則: T 細胞シグナル伝達系路におけるマクロファージ遊走阻止因子(MIF)の作用. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会、1999. (京都)
 36. 諸橋大樹, 小笠原一誠, 岩渕和也, 小野江和則: マイナーまたは MHC クラス I 抗原単独で誘導される GVHR. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会、1999. (京都)
 37. 岩渕千雅子, 岩渕和也, 小笠原一誠, 小野江和則: Class II 拘束性 TCR トランスジェニックマウス(Tgm)における胸腺内 NKT 細胞選択機構の解析. 第 29 回日本免疫学会総会・学術集会、1999. (京都)
 38. 岩渕和也, 岩渕千雅子, 刀裨さおり, 伊藤大祐, 根岸 泉, 小笠原一誠, 小野江和則: ZAP-70 KO マウス由来胸腺内 NK 様細胞からの NKT 細胞の誘導. 第 9 回 Kyoto T Cell Conference、1999. (京都)
 39. 北市伸義, 小竹 聡, 西平 順, 水江由佳, 小笠原一誠, 岩渕和也, 小野江和則: T 細胞および眼ぶどう膜炎に対するマクロファージ遊走阻止因子の作用. 第 26 回北海道免疫研究会、1999. (札幌)
 40. Mizumoto, N., Iwabuchi, K., Nanamura, H., Shibaki, A., Kawashima, T., Kobayashi, H., Iwabuchi, C., Ogasawara, K., Ohkawara, A. and Onoé, K.: Analysis of contact hypersensitivity response in human monocyte chemoattractant porein-1 transgenic mice. The 60th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 1999. (Chicago)
 41. Kitaichi, N., Namba, K., Ogasawara, K., Kotake, S., Sasamoto, Y., Matsuda, H. and Onoé, K.: Inhibition of EAU by pre-treatment for H-2A^k mice with liposomal peptide. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 1999. (Florida)

(3) 出版物

1. 中川憲一、小笠原 一誠：CD8 は安定な三分子複合体の形成を促進する。臨床免疫 30: 121-125,1998.
2. 小笠原 一誠：ペプチドワクチン。治療学 32: 44-48, 1998.
3. Ogasawara K. T-cell help exposed Trends Microbiol. 6, 305, 1998.
4. Ogasawara K. A disruptive influence Trends Microbiol. 6, 475, 1998.
5. 岩渕和也, 阿戸 学, 岩渕千雅子, 水本昇克, Enkh-Amar Dondog, 小笠原一誠, 小野江和則：MCAF/MCP-1 トランスジェニックマウスにおけるマクロファージ機能異常。日本リンパ網内系学会会誌 38: 219-225, 1998.
6. 岩渕和也, 岩渕千雅子, 根岸 泉, 刀祢さおり, 小笠原 一誠, 小野江 和則：ZAP-70 ノックアウトマウスにおける T 細胞、NKT 細胞分化。アレルギー科 8: 227-237, 1999.
7. Ogasawara K. A common receptor Trends Microbiol.7, 66, 1999.
8. Ogasawara K. Exogenous presentation Trends Microbiol.7, 274, 1999.
9. Ogasawara K. A nef-arious protein Trends Microbiol.7, 434, 1999.