

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
総括研究報告書

細胞性・体液性免疫を誘導するアジュバント設計と
感染症に対する新規予防・治療戦略の開拓

主任研究者 堤 康央 大阪大学薬学研究科助手

研究要旨

膜融合リポソームは、*in vitro* において直接封入抗原を細胞質中に導入し、MHC class I 抗原提示経路に送達することが可能であった。また *in vitro* における膜融合リポソームの抗原送達能を反映して、膜融合リポソームはフロイント完全アジュバントよりも強い細胞傷害性 T 細胞誘導能を示した。さらに膜融合リポソームは、細胞傷害性 T 細胞のみならず抗体産生の誘導能をも示した。本効果が、抗原を膜融合リポソーム中に封入した際においてのみ誘導されたことから、リポソームにセンダイウイルス由来のエンベロープ蛋白質を付与し、センダイウイルスの生体内挙動を模倣させること、すなわち抗原の生体内挙動を制御することが重要であることが示唆された。

分担研究者 中川晋作・大阪大学薬学研究科講師

A. 研究目的

近年猛威を奮っている新興・再興感染症に対する治療戦略として、ワクチン療法が特に注目されている。しかし、従来までの単なる抗原投与によるワクチン療法では、抗原が endocytosis 経路により endosome 内に取り込まれ、外来性抗原として認識されてしまい、体液性免疫しか誘導できないため、自己感染細胞を効率よく排除することは困難であった。そのため現在のワクチン戦略により、エイズなどの新興・再興感染症を予防・治療しようとする事は、現状が物語っているように殆ど不可能と言える。一方生体の自己病態細胞排除機構を担う細胞障害性 T 細胞を介した細胞性免疫は、抗原提示細胞質内に存在する抗原が内在性抗原として、MHC クラス I と共に提示されることで誘導される。従って新興・再興感染症の予防・治療を目的とした次世代ワクチン療法を開発するためには、まず細胞を傷つけることなく、100%の効率で細胞質中に抗原分子を直接導入でき、かつ抗原分子を内在性抗原として細胞に認識させ得るデバイスの開拓が要求されてくる。即ち体液性免疫のみならず、強力な細胞性免疫をも同時に誘導し得るアジュバントの設計が必須となってくる。この点最近我々が先駆けて開発した膜融合リポソームは、全ての細胞内に安全かつ効率よくいかなる物質でも直接導入できることから、最も理想的な細胞内物質導入法を考えた場合、現存する唯一のデバイスである。以上本研究は、膜融合リポソームをアジュバントとして粒子設計することで、種々感染症に対する次世代の予防・治療戦略を提示しようとするものである。

B. 研究方法

<動物・細胞>

C57BL/6 雄性マウス（6～8週令）は日本 SLC から購入した。EL4（東北大学加齢医学研究所・癌細胞保存施設より供与）は RP1640（10%牛胎児血清含有 RPMI-1640）で、primary spleen cell は 50 μ M 2-mercaptoethanol を含有する RP1640 で培養した。また OVA 発現遺伝子を導入した EL4 クローンである EG7（ATCC より購入）は 400 μ g/ml G418 を含有する RP1640 で培養した。

<FL の調整>

FL の調整は以下のように行った。すなわち卵黄レシチン、コレステロール、フォスファチジン酸が 4:5:1（モル比）の混合脂質を用いて、凍結融解法（10）で作製したリポソームと、予め紫外線照射（2000J/cm²）することによりウイルス RNA を断片化した SV を 37°C で 2 時間反応させた後、ショ糖密度勾配遠心法により未反応のリポソームと SV を除き、FL を精製した。本 FL に封入された各物質の内封量は 15000HAU/ml の FL あたり、OVA においては約 100 μ g/ml、ジフテリア毒素フラグメント A 鎖（DTA）においては約 4 μ g/ml であった。

<ジフテリア毒素フラグメント A 鎖（DTA）による細胞傷害性試験>

FL の細胞質内への物質送達能は、DTA をマーカー蛋白質として評価した。DTA は、単独では細胞質内に到達することができないが、数分子でも細胞質内に導入されると強い細胞傷害活性を有することから、キャリアーの細胞質内への物質送達能を評価できる優れたマーカー蛋白質である（11,12）。DTA 封入 FL（DTA-FL）、DTA 封入リポソーム（DTA-lipo）または、なにも封入していない FL（Empty-FL）を EL4（終密度 1 x 10⁷ cells/ml）に加え、4.0C、30 分間 incubate した後、37°C、30 分間 incubate した。incubate 終了

後、EL4 を wash しさらに48時間培養した。細胞の viability は MTT 法により評価した。

<OVA 特異的 CTL の誘導>

CTL の誘導は、OVA をモデル抗原として検討した。C57BL/6 マウスに OVA とフロイト完全アジュバントの混合物 (OVA-CFA) を OVA 量で 100 μ g 免疫し、10 日後に脾細胞を回収した後、mitomycin C 処理をした EG7 と mixed lymphocyte tumor cell culture (MLTC) を行うことで CTL を sensitization した。5 日後、spleen cell を回収し、これを OVA 特異的 CTL として用いた。

<FL による細胞への抗原導入及び CTL assay>

OVA 封入 FL (OVA-FL)、OVA 封入リポソーム (OVA-lipo) または、Empty-FL を EL4 (終密度 1×10^7 cells/ml) に加え、4°C で 30 分間 incubate した後、37°C、30 分間 incubate することにより EL4 への抗原導入を行った。incubate 終了後、EL4 を wash しさらに2時間培養した。本細胞を Target 細胞として、先に作成した CTL を用い、これらに対する4時間の ^{51}Cr -release assay を行った (図3)。

<FACS 解析>

EL4、EG7 に対して、anti-MHC class I 抗体と anti-MHC class II 抗体を用い、FACS 解析を行った。

<OVA 特異的抗体産生の評価>

OVA 単独、OVA 封入未修飾リポソーム、OVA 封入膜融合リポソーム (7,500HAU)、または OVA 溶液と何も封入していない膜融合リポソーム (7,500HAU) との混合溶液を、ddY マウス、または C57BL/6 マウスの背部皮下に OVA 量で 50 μ g/mouse となるように単回免疫し、経日的に採血をした。各マウスの血清中 OVA 特異的抗体価は ELISA 法を用いて評価した。すなわち、96 well microplate に 0.02M Na₂CO₃-0.06M NaHCO₃ 緩衝液 (pH 9.6) で希釈した OVA 溶液 (10 μ g/ml) を 50 μ l/well となるように加え、4°C、over night で固相化した。1% (w/v) gelatin/0.02M Tris-0.04M saline 緩衝液 (pH 7.4; TBS) を用いて、室温で2時間ブロッキングした後、1mM EDTA-0.1% (w/v) gelatin-0.05% (v/v) Tween 20/TBS (EG-TTBS) で適当な倍率に希釈した血液試料を 50 μ l/well 反応させた。37°C、2時間反応させた後、EG-TTBS にて 1/1,000 希釈した HRP-a-mIgG1 を 50 μ l/well となるように加え、さらに 37°C、2時間反応させた。0.55mM TMBZ を含有する基質溶液 (0.015% H₂O₂-0.1M 酢酸緩衝液、pH 5.5) を 100 μ l/well 加えて発色反応を行い、2N H₂SO₄ を用いて反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450nm、副波長 655nm で吸光度を測定した。尚、plate から各液を除去する際には、0.05% (v/v) Tween 20/TBS (TTBS) 溶液による洗浄操作を3回行った。

<センダイウイルスに対する特異的抗体産生の評

価>

センダイウイルス (A540=10) を4倍量の Lysis 用緩衝液 (0.5M Tris-HCl、0.6M KCl、0.5% (v/v) Triton X-100、pH7.8) を加え、室温にて5分間処理した。本溶液を 0.02M Na₂CO₃-0.06M NaHCO₃ 緩衝液 (pH 9.6) で10倍希釈し、96 well microplate に 50 μ l/well となるように加え、4°C、over night で固相化した。各マウスの血清中センダイウイルス特異的抗体価は ELISA 法を用いて評価した。

<リンパ球増殖試験>

C57BL/6 マウスから回収した脾細胞を 96 well microplate に 1×10^5 cells/well となるように播種し、さらに何も封入していない膜融合リポソームをウイルス蛋白量で終濃度 0.15~45 μ g/ml となるように添加して培養した。細胞回収8時間前に、20kbq/well となるように 3H-Thymidine を添加し、回収した細胞の放射活性を測定することにより細胞増殖を評価した。

<FACS 解析>

C57BL/6 マウスから回収した脾細胞を 48 well plate に 3×10^6 cells/well となるように播種し、さらに何も封入していない膜融合リポソームをウイルス蛋白量で終濃度 15 μ g/ml となるように添加して培養した。72時間後に細胞を回収し、得られた細胞を各抗体を用いて染色し、FACS 解析を行った。

C. 研究結果と考察

免疫系は、自己・非自己を認識し、生体に侵入した病原体等の異物を排除することにより、生体の恒常性を維持しようとする生体防御機構である。免疫系において CD8+ cytotoxic T lymphocyte (CTL) は、様々なウイルスや寄生虫などに感染した病態細胞や腫瘍細胞を、正常な細胞と見分けて殺傷する作用を有することから、細胞性免疫の中心的な役割を担う非常に重要なエフェクター細胞の一つと考えられる。CD8+CTL は、MHC class I 分子を介してウイルス抗原や腫瘍拒絶抗原などを提示している細胞によって活性化され、抗原特異的な細胞傷害活性を示す。

一般に MHC class I 分子による抗原提示においては、正常自己抗原はもちろんのこと、感染によって複製されたウイルス蛋白質や、ガン化によって生じた突然変異蛋白質など、細胞質中に存在する内在性抗原が対象となってくる (図1)。内在性抗原は、非ライソゾーム系の酵素であるプロテアソームによってプロセッシングを受け、ペプチド断片となった後、TAP (transporter associated with antigen processing) とよばれる小胞体膜に局在する輸送蛋白質によって、細胞質から小胞体へと運ばれる。小胞体内でさらにプロセッシングを受け、9mer 程度となった抗原ペプチドは、MHC class I 分子と結合して細胞表面へ送達される (1,2)。このようにして MHC class I 分子上に提

示された自己、非自己（病態）抗原を見分けることにより、CD8+ CTL は病態細胞のみを排除している。一方で細胞外に存在する病原体由来の抗原、いわゆる外来性抗原は、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞にエンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれ、エンドソーム内で 16mer 程度の抗原ペプチドにまでプロセッシングされる（図 1）。そして CIIV (class II-containing vesicle) と呼ばれるコンパートメントに運ばれ、MHC class II 分子と結合した後に細胞表面で CD4+ helper T cell (Th) に認識されることにより、宿主の免疫機構を誘導するものと考えられている。

さて近年、AIDS をはじめとする emerging infection diseases や reemerging infection diseases の克服が学際的にも社会的にも重要課題となっており、予防は言うに及ばず、治療までも想定したワクチン開発が試みられている。しかしながら、これまでわずかな成功例を除いて、ワクチン開発の殆どは、安全性の点で致命的欠陥を有していた。そのため人工的に合成した安全性の高い抗原部位のみを、ワクチンとして用いようとするサブユニット/ペプチドワクチンが注目されるようになってきた。しかし、サブユニット/ペプチドワクチンは単独で投与しても、外来性抗原として認識されてしまうために、CTL の誘導は全く期待できない。従って、これらを安全性に優れ、かつ CTL をも効率よく誘導し得るワクチンとして設計していくためには、外来性抗原を MHC class I 抗原提示経路に送達し得る Delivery System の開発が必要不可欠となってくる。

これまでに我々は、リポソームにセンダイウイルス (SV) の膜融合能を付与した膜融合リポソーム (FL) の開発を行ってきた。FL は、in vitro、in vivo 双方において、遺伝子や蛋白質など、リポソーム内に封入できるものならいかなるものでも、細胞に傷害を与えることなく、効率よく細胞質中に直接導入することができる（図 2）。従って、FL を用いて封入抗原をエンドサイトーシス経路ではなく、直接細胞質中に導入することで、細胞に外来性抗原を内在性抗原として認識させ、MHC class I 分子を介した抗原提示が可能になるものと考えられる（図 1）。さらに FL は in vivo に直接適用した場合において、外来性抗原をに対する CTL を誘導できるワクチンベクター/アジュバントと成り得る可能性を秘めている。

本研究ではまず、FL を CTL 誘導可能なワクチンベクター/アジュバントとして開拓していくことを念頭に、まず FL によって細胞質内に導入された封入抗原が、in vitro で MHC class I 抗原提示経路に送達され得るかについて検討した。

FL に限らず、細胞質内への物質導入ベクターを評価していくためには、1) 単独では細胞質内には入ることができず、2) 細胞外では全く活性を示さない、3) 細胞質内に導入されれば非常に高い活性（毒性）を示す、4) 安定かつ効率よくベ

クターに組み込める（封入できる）などの条件を備えたマーカー物質が必須となる。この目的に最も適合する物質の 1 つとして、ジフテリア菌によって産生されるジフテリア毒素のフラグメント A 鎖 (DTA) がある。DTA は、数分子でも細胞質内に導入されると、蛋白質合成系のポリペプチド鎖延長因子である EF-2 を ADP-リボシル化することによって、蛋白質合成を阻害し、著名な細胞傷害活性を示す。また in vitro において、Intact なジフテリア毒素が毒素高感受性細胞である Vero 細胞を、わずか 100pg/ml の濃度で死滅させる一方で、DTA はその 10^6 倍である 100 μ g/ml の高濃度においても全く毒性を示さない。従って、DTA は FL の細胞質内への物質導入効率を評価するマーカーとしてきわめて優れているものと考えられる。この DTA を用いて細胞質内への物質運搬能を評価したところ、4 μ g DTA/ml の DTA-lipo を作用させても全く毒性が認められなかったのに対し、DTA-FL はそのわずか 1/100 の濃度においても細胞傷害活性を示し、0.4 μ g DTA/ml では殆どすべての細胞を傷害した（図 4）。また、Empty-FL には全く細胞傷害活性が認められなかったことから、DTA-FL の効果はセンダイウイルス由来の蛋白質によるものではないことも確認された（図 4）。従って、FL は DTA を効率よく細胞質内に送達した結果、EL4 に対して細胞傷害性を示したものと考えられた。

FL による MHC class I 抗原提示経路への外来性抗原分子の送達能は、OVA をモデル抗原とし、OVA 特異的に反応する CTL を用いることで評価した。OVA 特異的 CTL は、OVA-CFA を投与した C57BL/6 マウスの spleen cell を、MHC class I 分子とともに OVA peptide を提示している EG7 で、in vitro で sensitization することにより作成した。本方法で作成された CTL は、CD8+ であり、MHC class I 拘束性で OVA 特異的に細胞傷害性を示すことがすでに報告されている。また今回、Target 細胞として使用した、EL4 と EG7 について FACS 解析を行ったところ、双方とも MHC class I 陽性、MHC class II 陰性の細胞であった（図 5）。従って、FL を用いて OVA を細胞質内に導入された EL4 が、OVA 特異的 CTL に傷害されるか否かを検討することにより、FL による OVA の MHC class I 分子を介する抗原提示能を評価することが可能である（図 3）。その結果、OVA-FL 10 μ g OVA/ml を作用させた EL4 はポジティブコントロールである EG7 と同程度、CTL に傷害されたが、OVA-lipo についてはその 10 倍の濃度である 100 μ g OVA/ml を作用させても、無処理の EL4 と全く同程度の傷害しか認められなかった（図 6）。またこの傷害は、Empty-FL を作用させた際には全く認められなかったことから、抗原特異的な反応であり、FL を修飾しているセンダイウイルス由来の蛋白質による影響ではないことも確認された（図 6）。従って、FL は OVA を効

率よく細胞質内に送達した結果、OVA を MHC class I 抗原提示経路に送達したものと考えられた。一般に外来性抗原は、MHC class I ではなく、MHC class II を介して抗原提示されることが知られているが、本実験では FL を用いることにより、外来性抗原を効率よく細胞質内に導入できる結果、MHC class I 抗原提示経路に送達できることを明らかとした (図 4、6)。さらに我々は、OVA-FL を免疫したマウスでは、OVA-CFA を免疫したものよりもさらに強い OVA 特異的 CTL 活性が認められることをすでに確認している。

これまでも、外来性抗原の MHC class I を介する抗原提示を試みた研究がいくつか報告されている。しかしながら、そのどれもがエンドサイトーシス経路のため、これらのアプローチはペプチドワクチンには応用が困難であるという致命的な欠点を有している。細胞質内に導入された抗原は、非ライソゾーム系の酵素であるプロテアソームによってプロセッシングを受けるが、これまでの研究によるとプロテアソームは抗原蛋白質から正確に MHC class I 分子と結合し得る抗原ペプチドを切り出すことが判明している。これに対し、ライソゾーム系の酵素によるプロセッシングは、MHC class I 分子と結合し得る抗原ペプチドを正確に切り出すようなものではなく、ランダムな分解が行われるため、導入抗原のほとんどが unknown な分解をうけてしまう。そのため、エンドサイトーシス経路を経るようなアプローチを用いた場合、せっかく MHC class I 分子に結合し得るようなモチーフを持つペプチドワクチンを設計したとしても、その大部分が MHC class I 分子と結合する以前に分解されてしまうため、結局大量のペプチドを用いなければならなくなってしまう可能性が高い。また Rammensee らは、CTL を活性化するために必要とされる細胞質内 peptide の分子数は、わずか 200~500 分子であることを報告している。従って、ペプチドワクチンを考えた場合には、Intact なまま細胞質内に直接導入できるアプローチが有効であると考えられ、この点において FL は、これまでに報告されてきたどのアプローチよりも遥かに優れていると言える。現在我々は、FL をペプチドワクチンにも応用可能であるかを検討するために、FL による詳細な MHC class I 抗原提示経路を検索中であり、また封入抗原をペプチドにした際にも有効であるかなどを検討中である。エイズに代表されるように、現状では殆ど手の施しようのない新興・再興感染症に対する魅力的な次世代予防・治療戦略が待望されている。特に、これまで人類の尊い生命を最も救済してきた免疫ワクチン療法への期待は、安全性、有効性の面から過度なまでに大きい。従来までの創薬学・治療法に依存している今、その限界が指摘され始めている。この最大の原因は、従来ワクチン法では体液性免疫しか誘導できないことにあり、本問題は近年脚光を浴びている腫瘍ワクチンにおいても

本問題は解決されていない。従って、種々難治性感染症に対する我が国独自の予防・治療戦略を提示し、国際的かつ学際的に貢献していくためには、細胞を傷つけることなく細胞質中に抗原分子等を効率よく直接導入でき、抗原分子を内在性抗原として認識させ、体液性免疫 (抗体産生) と共に細胞性免疫をも同時に誘導し得る斬新なアジュバントの開発が必須となってくる。この点我々が開発に成功した膜融合リポソームは上記課題を全て可能とする唯一のキャリアーであるうえ、既に遺伝子治療の領域で安全性、有効性が保証された我が国独自のベクターとしての世界的地位を確立している。従って、我が国独自の細胞性免疫をも効率よく誘導し得るワクチンアジュバントの開発は、安全かつ効率の良い種々細胞内物質導入技術を確立している申請者らによってのみ達成可能であると考えられる。本研究では、FL を CTL 誘導のみならず、抗原特異的抗体産生をも誘導可能なワクチンベクター/アジュバントとして開拓していくこと目指した。

図 7 に、OVA 単独、OVA 封入未修飾リポソーム、OVA 封入膜融合リポソーム (7,500HAU) を、ddY マウスまたは C57BL/6 マウスの背部皮下に OVA 量で 50 μ g/mouse となるように単回免疫した際の、血中の抗 OVA IgG1 抗体価について検討した結果を示した。OVA 封入膜融合リポソームを用いて免疫した群では、CTL の結果と同様、両系マウスにおいて OVA 封入未修飾リポソームや OVA のみを投与した群に比べ、有意な OVA 特異的抗 OVA 抗体価の上昇が確認された。本結果は、リポソームに免疫原性の高いセンダイウイルスのエンベロープ蛋白質を修飾することにより、APC への取り込みが上昇したことによるものと考えられる。また一般にウイルス感染時には、種々のサイトカインが産生されることから、膜融合リポソームが immunomodulator として機能していることに起因する可能性も考えられる。そこで膜融合リポソームのアジュバントとしての機能を明らかにするために、OVA 封入膜融合リポソーム (7,500HAU) または OVA と何も封入していない膜融合リポソーム (7,500HAU) の混合溶液を免疫した際の抗体産生について検討を行った。その結果、単なる混合溶液を免疫した群においては、センダイウイルス由来の蛋白質に対する抗体価は、封入型を免疫した群と同様に誘導されている一方で、OVA に対する抗体産生は認められなかった (図 8)。以上の結果から、膜融合リポソームの体液性免疫誘導でのアジュバント効果における機能は、immunomodulator としての機能よりも、抗原の生体内挙動を制御する機能の効果の方が大きいことが示された。このようなメカニズムを有するアジュバントは Gluck らによっても報告されている。彼らはインフルエンザウイルスのエンベロープ蛋白質を組み込んだ再構成リポソーム (IRIV) に A 型肝炎ウイルスを吸着させたワクチ

ンを開発し、ヒトに投与したところ1年以上の間、高い抗原特異的な血中抗体価の持続が可能であったことを報告している。しかし本報告では、IRIV は抗原の生体内挙動を制御する機能の他に、immunomodulator としての機能も備えており、アジュバント効果の一端を担っていると考えられている。このことは、膜融合リポソームにも当てはまるかもしれない。そこで、膜融合リポソームのimmunomodulator としての機能について検討した。膜融合リポソームがリンパ球に対して、マイトジェンとして作用するか否かを、C57BL/6 マウスから回収した脾細胞を、何も封入していない膜融合リポソームと共培養したときの細胞増殖度を指標に検討した(表 1)。その結果、膜融合リポソームの蛋白質濃度に依存したリンパ球の増殖が観察され、培養開始 9 6 時間後に最大の増殖度を示した。次に膜融合リポソームが、どの細胞群に対し増殖促進作用を示しているのかについて検討した(図 9)。C57BL/6 マウスから回収した脾細胞と膜融合リポソームを 7 2 時間共培養した際の、細胞群の変化について FACS 解析を行ったところ、CD3+ 細胞の割合が 46%から 32%に減少し、B220+ 細胞の割合が 42%から 61%へ増加しているのが観察された。また slg+ 細胞についても検討した結果、B220+ 細胞と同様に 47.2%から 63.4%に増加しているのが観察された(data not shown)。Kizaka らは、センダイウイルスのHN 蛋白質とF 蛋白質がリンパ球に対して、マイトジェンとして作用することを報告している。また彼らは、エンベロープ蛋白質が主にB細胞増殖を促進するものの、その効果にはT細胞の存在が必要であることも報告している。本 FACS 解析からは膜融合リポソームがどの細胞群に対して直接作用したかを特定することができないが、Kizaka らの報告と併せて考えると、おそらく膜融合リポソームによって増殖しているのはB細胞だけではなく、T細胞も増殖していると考えられるが、結果的にB細胞の方がより増殖促進作用を受けたものと考えられる。このB細胞に対する増殖促進効果は、前節における膜融合リポソームによる抗体産生誘導増強の一端を担っているものと考えられる。またこのような膜融合リポソームの各リンパ球に対する増殖促進効果により、リンパ球への直接的な効果以外に、刺激を受けたリンパ球から産生されるサイトカインなどが、2次的に免疫系をさらに活性化している可能性も考えられる。以上の結果は、膜融合リポソームが単独でもリンパ球に対して増殖促進効果を有することを示しており、膜融合リポソームが in vivo において immunomodulator としても機能し得る可能性を示唆するものである。

D. 結論

サブユニット/ペプチドワクチンは、外来性抗原であるが故に細胞性免疫の誘導能に乏しいとい

う致命的欠点を有している。特に、ペプチドワクチンは MHC 分子に結合することのできる抗原エピトープのみを用いているため、エンドサイトーシス経路で取り込まれた際、エンドソーム内で未知の分解をごくわずかでも受けてしまった場合には、MHC class I 分子を介した抗原提示は著しく減少してしまうことになり、CTL を誘導するようなワクチン効果は殆ど期待できない。本章では、この問題を解決すべく、封入物質を効率よく細胞質中に直接導入することができる膜融合リポソームのワクチンへの応用を試みた。

センダイウイルスの膜融合能を利用し、物質を細胞質中に導入しようとする試みは、エンベロープ蛋白質を再構成したピロソームに始まり、超音波処理によりセンダイウイルスの膜に一時的に穴をあけ、物質をウイルス内部に封入する方法などが挙げられる。しかしながら、これらの方法はリポソーム内部に封入する物質に制限があることや、リポソームへの物質の封入効率が非常に低いこと、また再構成のピロソームについては、操作が煩雑であり、また膜融合能も安定しないといった欠点を有していた。そこでこれまでに我々は、これらの問題を解決するために物質の封入効率が高い REV を用いて、膜融合リポソームの作製を行ってきた。しかし、REV は作製時に封入物質が有機溶媒にさらされてしまうという欠点を有しており、ワクチンへの応用を考えた場合には、抗原が有機溶媒と接触することにより免疫原性が変化および低下してしまう可能性がある。そこでまず、本研究では逆相蒸発法に代わる封入効率の良いリポソーム作製法として、凍結融解法を用い、膜融合リポソームの作製を試みた。その結果、凍結融解法による LUV を用い、作製した膜融合リポソームの粒子あたりの封入量は、MLV を用いて作製したリポソームの約 30 倍であり、抗原を効率よく封入できることが明らかとなった。また、凍結融解法による LUV で作成した膜融合リポソームは、抗原を効率よく細胞質中に導入することが可能であった。尚、予試験的に Osmotic loading 法を用いて、センダイウイルスに直接抗原導入を試みたところ、MLV を用いて作成した膜融合リポソームと同レベルの封入効率のものしか得られなかったことを付記しておく(data not shown)。その結果を反映して、膜融合リポソームにより細胞質中に導入された抗原は、MHC class I 分子を介して抗原提示されることも判明した。さらに、膜融合リポソームによる抗原の MHC class I 抗原提示経路への送達は、膜融合リポソームの膜融合活性に依存しており、膜融合により直接抗原を細胞質内に導入するというプロセスが重要であることも確認された。in vivo におけるアジュバント効果についても、in vitro における結果を反映して、本リポソームが陰電荷脂質を構成脂質としていても関わらず、CFA をも上回る CTL 誘導能が確認された。このように外来性抗原を MHC

class I 分子を介して抗原提示させるアプローチは、抗原結合ラテックスビーズ、抗原を発現させた大腸菌、pH 感受性リポソームなど、このほかにも多くの報告があるものの、その殆どがエンドサイトーシス経路を経た抗原提示であるため、抗原としてペプチドを用いた際においては、エンドソーム内での未知の分解が懸念される。また *in vitro* において浸透圧法やエレクトロポレーション法を利用して、抗原を直接細胞質中に導入する方法も存在するが、これらの方法は生体内に投与する方法としては非現実的であり、いずれも冒頭で示した問題を解決し得るアプローチではない。現在のところ報告されているアジュバントの中で、抗原を直接細胞質中に導入し、MHC class I 抗原提示させ、CTL を誘導し得るものとしては、immune stimulating complex (ISCOM) がある。ISCOM は、コレステロールやフォスファチジルコリンなどのリン脂質と、サポニンの樹皮から精製した Quil A とのかご状のミセルであり、Quil A が抗原導入に関与している。しかし、ISCOM は良好な CTL 誘導能を有している一方で、Quil A 自身が強い副作用となって現れるという欠点を有していた。この問題を解決するために Wu らは、この Quil A をさらに精製し、アジュバント効果を保持しながら毒性の少ない QS-21 を開発した。しかし、これも前臨床試験において、副作用が問題となっているのが現状である。このような背景の中、膜融合リポソームは、現在のところ抗原を直接細胞質中に導入し、MHC class I 抗原提示させ、CTL を誘導し得るアジュバントとなり得る唯一の候補であると言えよう。今後は、ペプチドを用いた際の効果の検討や膜融合リポソーム自身の副作用の検討など、未解決な問題を抱えてはいるものの、センダイウイルスがヒトに対して病原性を示さないことや、膜融合リポソームが完全に不活化処理をしたセンダイウイルスを用いて作製していることなどから、副作用なく CTL を誘導できるアジュバントとして、その臨床応用が今後大いに期待されるところである。

さて、センダイウイルスやインフルエンザウイルスなどのウイルスのエンベロープ蛋白質は、高い免疫原性を有していることが知られているが、これらは効率よく APC に取り込まれていることに起因していると予想される。これは、センダイウイルスのエンベロープ蛋白質を有する膜融合リポソームが、通常のリポソームよりも APC に取り込まれやすく、体液性免疫をも増強し得る可能性を示唆している。事実、本研究において膜融合リポソームは、未修飾リポソームと比較して高い体液性免疫誘導能を示した。また、その効果は膜融合リポソームに封入されていることが必要不可欠であることから、本効果は、抗原の生体内挙動を膜融合リポソームによって制御することにより得られたことが示唆された。膜融合リポソームによる体液性免疫誘導増強の作用機序は明かではない

が、膜融合リポソームに封入することにより、本リポソームが陰電荷脂質を構成脂質としているにも関わらず、抗原が APC に取り込まれ、効率よく MHC class II 分子と共に抗原提示された結果、体液性免疫が誘導されたものと推測される。この際の抗原提示機構については少なくとも二つの可能性が考えられる。1 つ目は、従来から知られている Standard な経路による MHC class II 抗原提示が効率よく行われた結果、体液性免疫が誘導されるというものである。すなわち、膜融合リポソームの膜表面に存在するセンダイウイルス由来の HN 蛋白質は、細胞表面上のシアル酸を認識・結合することから、*in vivo* においても、膜融合リポソームが APC に積極的に結合し得ることが予想される。そのため、抗原封入膜融合リポソームが APC のファゴサイトーシスによる取り込みが上昇し、Standard な経路による MHC class II 抗原提示が効率よく行われた可能性が考えられる。一方、Standard な MHC class II 抗原提示経路によらない抗原提示の影響も考慮する必要がある。一般に、細胞質中に存在する内在性抗原は MHC class I 分子によって補足され、外来性抗原はライソソーム酵素によって分解されて MHC class II 分子によって補足されることで、抗原提示されると考えられている。しかし近年、MHC class II 分子を介する抗原提示は、外来性抗原のみならず、内在性抗原についても行われることが明らかとなってきた。この事実は、膜融合リポソームの「封入抗原を細胞質中に直接導入する」という機能が、効率よく内封抗原を MHC class II 抗原提示経路に送達した結果、体液性免疫誘導増強につながった可能性を示唆するものである。しかしながら、これら抗原提示経路については、未だ不明な点も多く、今後そのメカニズムを詳細に検討する必要がある。

最後に膜融合リポソームの immunomodulator としての機能を検討した。感染能を失ったセンダイウイルスやセンダイウイルスのエンベロープ蛋白質は、各種免疫担当細胞に対し、immunomodulator として作用し得ることが知られている。その事実を反映して、膜融合リポソームはリンパ球増殖促進作用があることが確認された。従って、膜融合リポソームのアジュバント効果には、自身の immunomodulator としての機能もその一端を担っている可能性が示唆された。

以上本研究では、膜融合リポソームの機能を用いて、生きたセンダイウイルスと同様の生体内挙動を抗原に持たせることにより、non-live vaccine でありながら、live vaccine に近い効果を誘導できる可能性が示唆された。さらにエンドサイトーシス経路ではなく、直接細胞内に物質導入が可能という膜融合リポソームの特性を用いることにより、細胞質内に存在する抗原が、どのようにプロセッシングされるか等の細胞内動態の解明や、また細胞質内や小胞体内でのペプチドのトリミング

を考慮した、最適な抗原ペプチドの構築などの検討も可能となる。従って膜融合リポソームは、単なるワクチン開発にとどまらず、ミクロレベルにおける生命現象をも追求可能とするものであり、生命科学の発展に大いに貢献するものであると確信している。

E. 研究発表

1. Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S., Nakanishi M., Tanaka K., and Mayumi T. : Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing cell-mediated immune response to soluble proteins., *J. Control. Release*, submitted.

2. Nakanishi T., Hayashi A., Kunisawa J., Tsutsumi Y., Tanaka K., Nakanishi M., Fujiwara H., Hamaoka T., and Mayumi T. : Fusogenic liposomes efficiently deliver exogenous antigen through the cytoplasm into the class I MHC processing pathway., submitted.

3. Hayashi A., Nakanishi T., Kunisawa J., Kondoh M., Imazu S., Tsutsumi Y., Tanaka K., Fujiwara H., Hamaoka T., and Mayumi T. : A novel vaccine delivery system using immunopotentiating fusogenic liposomes., in preparation.

図表

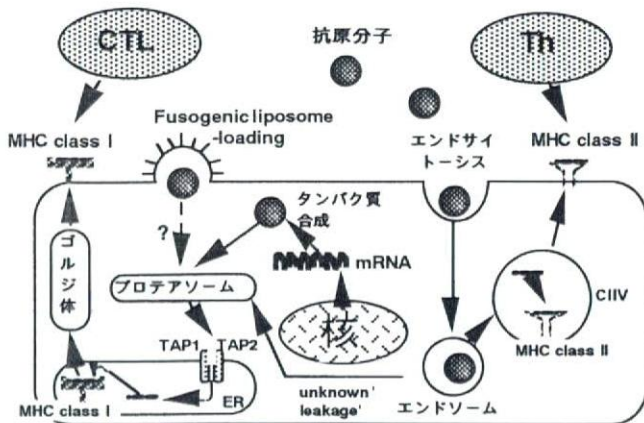


図1 MHC class I、II分子を介する抗原提示経路

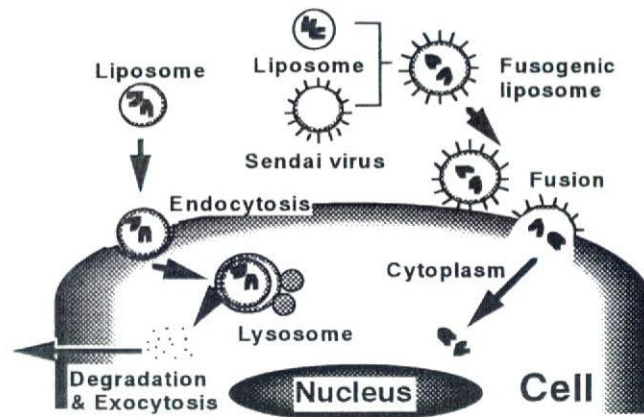


図2 FLによる薬物（封入物質）の細胞質内への送達

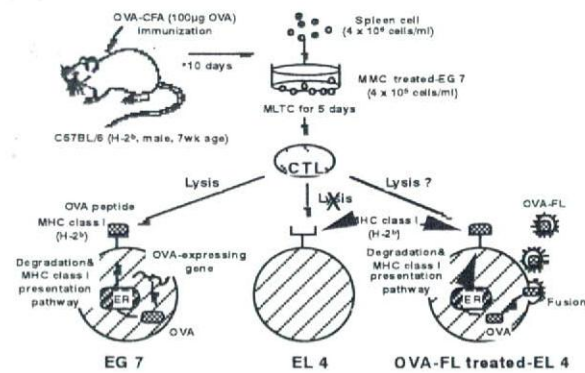


図3 FLによるMHC class I抗原提示経路への抗原分子送達能の評価法

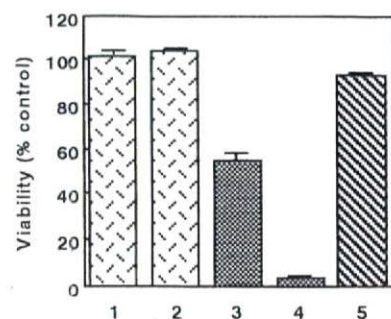


図4 DTA-FLのEL4に対する細胞傷害効果：各 sample を EL4 に加え、4°C、30 分間 incubate した。さらに 37°C、30 分間 incubate した後、EL4 を wash し、48 時間培養した。細胞の viability は MTT 法を用いて評価した。1; DTA-lipo (0.4 μg DTA/ml)、2: DTA-lipo (4 μg DTA/ml)、3: DTA-FL (0.04 μg DTA/ml, 150 HAU/ml)、4: DTA-FL (0.4 μg DTA/ml, 1500 HAU/ml)、5: Empty-FL (1500 HAU/ml)。

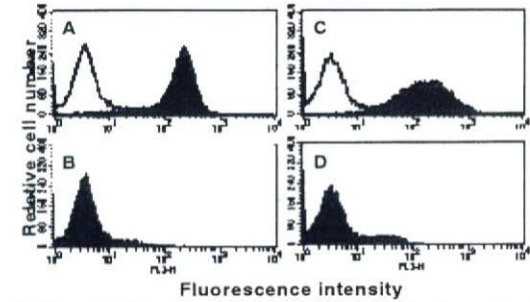


図5 EG7、EL4 における MHC class I、II 分子の発現:EG7(A,B)、EL4(C,D) に対して、anti-MHC class I 抗体 (A,C) と anti-MHC class II 抗体 (B,D) を用いて染色し、FACS 解析した。

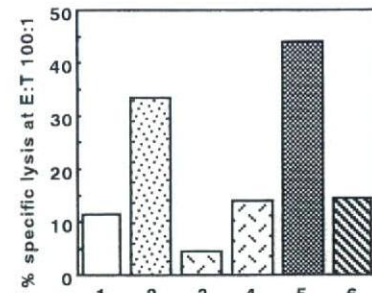


図6 FLによるMHC class I抗原提示経路への抗原分子送達：各 sample を EL4 に加え、4°C、30 分間 incubate した。さらに 37°C、30 分間 incubate した後、EL4 を wash し、2 時間培養した。本細胞を Target 細胞として、OVA 特異的 CTL を用いて 51Cr-release assay を行った。1: 無処理 EL4、2: OVA 遺伝子導入 EL4 (EG7)、3: OVA-lipo (10 μg OVA/ml)、4: OVA-lipo (100 μg OVA/ml)、5: OVA-FL (10 μg OVA/ml, 1500 HAU/ml)、6: Empty-FL (1500 HAU/ml)。

表

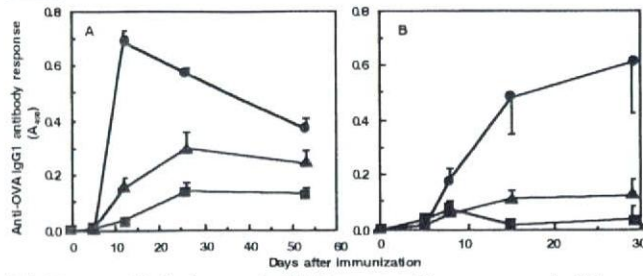


图 7 Priming of OVA-specific serum IgG1 responses by immunizing with variously formulated OVA. ddY mice (A) and C57BL/6 mice (B) were immunized with 50 μ g of OVA alone (■), OVA in fusogenic liposome (7,500HAU) (●) or simple LUV (▲) and serum samples were collected as described in Figure 11. Anti-OVA IgG1 in sera, which were diluted 1 : 2000 (ddY) or 1 : 100 (C57BL/6), were determined by ELISA. Results are mean \pm S.E. for 5 or 6 mice / group.

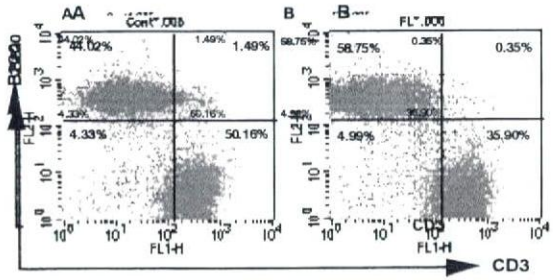


图 9 Flow cytometric analysis of murine spleen cells stimulated by fusogenic liposome. Spleen cells from C57BL/6 mice were cultured without (A) or with (B) fusogenic liposome at 15 μ g protein/ml for 72hrs. Cells were labeled with FITC-conjugated anti-CD3 antibody and PE-conjugated anti-B220 antibody and analysed by flow cytometry. The mean percentage of cells is given for each subpopulation.

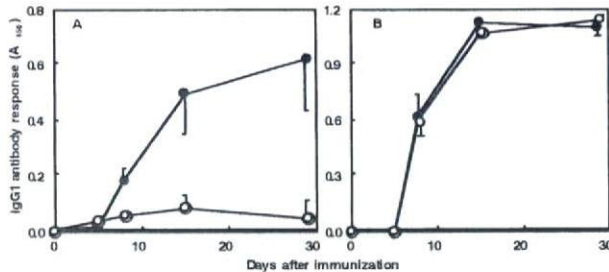


图 8 Priming of OVA and Sendai virus-specific serum IgG1 responses by immunizing with variously formulated OVA. C57BL/6 mice were immunized with 50 μ g of OVA in fusogenic liposome (7,500HAU) (●) or mixture of 50 μ g of free OVA and empty fusogenic liposome (7,500HAU) (○) and serum samples were collected as described in Figure 11. Anti-OVA (A) and anti-Sendai virus (B) IgG1 in sera, which were diluted 1 : 100, were determined by ELISA. Results are mean \pm S.E. for 5 or 6 mice / group.

表 1 Stimulation of murine spleen cells by fusogenic liposome.

Treatment	Protein conc. (μ g/ml)	³ H-thymidine uptake (cpm) ^a				
		24h	48h	72h	96h	120h
Non-treatment	-	528 \pm 41	1396 \pm 41	1231 \pm 41	1648 \pm 110	422 \pm 30
Fusogenic liposome	45	1488 \pm 5	4804 \pm 256	6834 \pm 131	7025 \pm 721	4286 \pm 357
	15	1408 \pm 15	4366 \pm 62	4113 \pm 176	5258 \pm 839	3401 \pm 414
	5	1331 \pm 111	3761 \pm 163	3896 \pm 190	4140 \pm 566	3212 \pm 91
	1.5	1239 \pm 32	3138 \pm 14	3081 \pm 174	3910 \pm 248	2142 \pm 324
	0.5	944 \pm 18	2917 \pm 115	2415 \pm 235	3316 \pm 417	1379 \pm 199
	0.15	930 \pm 53	2446 \pm 44	1978 \pm 87	2963 \pm 216	668 \pm 57

^a Results are mean \pm S.D. for triplicate.

細胞性・体液性免疫を誘導するアジュバント設計と 感染症に対する新規予防・治療戦略の開拓

主任研究者 堤 康央 大阪大学薬学研究科助手

研究要旨

膜融合リポソームは、*in vitro* において直接封入抗原を細胞質中に導入し、MHC class I 抗原提示経路に送達することが可能であった。また *in vitro* における膜融合リポソームの抗原送達能を反映して、膜融合リポソームはフロイント完全アジュバントよりも強い細胞傷害性T細胞誘導能を示した。

A. 研究目的

免疫系は、自己・非自己を認識し、生体に侵入した病原体等の異物を排除することにより、生体の恒常性を維持しようとする生体防御機構である。免疫系において CD8+ cytotoxic T lymphocyte (CTL) は、様々なウイルスや寄生虫などに感染した病態細胞や腫瘍細胞を、正常な細胞と見分けて殺傷する作用を有することから、細胞性免疫の中心的な役割を担う非常に重要なエフェクター細胞の1つと考えられる。CD8+ CTL は、MHC class I 分子を介してウイルス抗原や腫瘍拒絶抗原などを提示している細胞によって活性化され、抗原特異的な細胞傷害活性を示す。

一般に MHC class I 分子による抗原提示においては、正常自己抗原はもちろんのこと、感染によって複製されたウイルス蛋白質や、ガン化によって生じた突然変異蛋白質など、細胞質中に存在する内在性抗原が対象となってくる（図1）。内在性抗原は、非ライソゾーム系の酵素であるプロテアソームによってプロセッシングを受け、ペプチド断片となった後、TAP (transporter associated with antigen processing) とよばれる小胞体膜に局在する輸送蛋白質によって、細胞質から小胞体へと運ばれる。小胞体内でさらにプロセッシングを受け、9mer 程度となった抗原ペプチドは、MHC class I 分子と結合して細胞表面へ送達される（1,2）。このようにして MHC class I 分子上に提示された自己、非自己（病態）抗原を見分けることにより、CD8+ CTL は病態細胞のみを排除している。一方で細胞外に存在する病原体由来の抗原、いわゆる外来性抗原は、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞にエンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれ、エンドソーム内で 16mer 程度の抗原ペプチドにまでプロセッシングされる（図1）。そして CIIV (class II-containing vesicle) と呼ばれるコンパートメントに運ばれ、MHC class II 分子と結合した後に細胞表面で CD4+ helper T cell (Th) に認識されることにより、宿主の免疫機構を誘導するものと考えられている。

さて近年、AIDSをはじめとする emerging infection diseases や reemerging infection diseases の克服が学際的にも社会的にも重要課題となっており、予防は言うに及ばず、治療までも想定したワクチン開発が試みられている。しかしながら、これまでわずかな成功例を除いて、ワクチン開発の殆どは、安全性の点で致命的欠陥を有していた。そのため人工的に合成した安全性の高い抗原部位のみを、ワクチンとして用いようとするサブユニット/ペプチドワクチンが注目されるようになってきた。しかし、サブユニット/ペプチドワクチンは単独で投与しても、外来性抗原として認識されてしまうために、CTL の誘導は全く期待できない。従って、これらを安全性に優れ、かつ CTL をも効率よく誘導し得るワクチンとして設計していくためには、外来性抗原を MHC class I 抗原提示経路に送達し得る Delivery System の開発が必要不可欠となってくる。

これまでに我々は、リポソームにセンダイウイルス (SV) の膜融合能を付与した膜融合リポソーム (FL) の開発を行ってきた。FL は、*in vitro*、*in vivo* 双方において、遺伝子や蛋白質など、リポソーム内に封入できるものならいかなるものでも、細胞に傷害を与えることなく、効率よく細胞質中に直接導入することができる（図2）。従って、FL を用いて封入抗原をエンドサイトーシス経路ではなく、直接細胞質中に導入することで、細胞に外来性抗原を内在性抗原として認識させ、MHC class I 分子を介した抗原提示が可能になるものと考えられる（図1）。さらに FL は *in vivo* に直接適用した場合において、外来性抗原をに対する CTL を誘導できるワクチンベクター/アジュバントと成り得る可能性を秘めている。

本研究では、FL を CTL 誘導可能なワクチンベクター/アジュバントとして開拓していくことを念頭に、まず FL によって細胞質内に導入された封入抗原が、*in vitro* で MHC class I 抗原提示経路に送達され得るかについて検討した。

B. 研究方法

<動物・細胞>

C57BL/6 雄性マウス（6～8週令）は日本 SLC から購入した。EL4（東北大学加齢医学研究所・癌細胞保存施設より供与）は RP1640（10%牛胎児血清含有 RPMI-1640）で、primary spleen cell は 50 μ M 2-mercaptoethanol を含有する RP1640 で培養した。また OVA 発現遺伝子を導入した EL4 クローンである EG7（ATCC より購入）は 400 μ g/ml G418 を含有する RP1640 で培養した。

<FL の調整>

FL の調整は以下のように行った。すなわち卵黄レシチン、コレステロール、フォスファチジン酸が 4:5:1（モル比）の混合脂質を用いて、凍結融解法（10）で作製したリポソームと、予め紫外線照射（2000J/cm²）することによりウイルス RNA を断片化した SV を 37°C で 2 時間反応させた後、ショ糖密度勾配遠心法により未反応のリポソームと SV を除き、FL を精製した。本 FL に封入された各物質の内封量は 15000HAU/ml の FL あたり、OVA においては約 100 μ g/ml、ジフテリア毒素フラグメント A 鎖（DTA）においては約 4 μ g/ml であった。

<ジフテリア毒素フラグメント A 鎖（DTA）による細胞傷害性試験>

FL の細胞質内への物質送達能は、DTA をマーカー蛋白質として評価した。DTA は、単独では細胞質内に到達することができないが、数分子でも細胞質内に導入されると強い細胞傷害活性を有することから、キャリアーの細胞質内への物質送達能を評価できる優れたマーカー蛋白質である（11,12）。DTA 封入 FL（DTA-FL）、DTA 封入リポソーム（DTA-lipo）または、なにも封入していない FL（Empty-FL）を EL4（終密度 1×10^7 cells/ml）に加え、4°C、30 分間 incubate した後、37°C、30 分間 incubate した。incubate 終了後、EL4 を wash しさらに 48 時間培養した。細胞の viability は MTT 法により評価した。

<OVA 特異的 CTL の誘導>

CTL の誘導は、OVA をモデル抗原として検討した。C57BL/6 マウスに OVA とフロイト完全アジュバントの混合物（OVA-CFA）を OVA 量で 100 μ g 免疫し、10 日後に脾細胞を回収した後、mitomycin C 処理をした EG7 と mixed lymphocyte tumor cell culture（MLTC）を行うことで CTL を sensitization した。5 日後、spleen cell を回収し、これを OVA 特異的 CTL として用いた。

<FL による細胞への抗原導入及び CTL assay>

OVA 封入 FL（OVA-FL）、OVA 封入リポソーム（OVA-lipo）または、Empty-FL を EL4（終密度 1×10^7 cells/ml）に加え、4°C で 30 分間 incubate した後、37°C、30 分間 incubate することにより EL4 への抗原導入を行った。incubate 終了後、EL4 を wash しさらに 2 時間培養した。本細胞を Target 細胞として、先に作成した CTL

を用い、これらに対する 4 時間の ⁵¹Cr-release assay を行った（図 3）。

<FACS 解析>

EL4、EG7 に対して、anti-MHC class I 抗体と anti-MHC class II 抗体を用い、FACS 解析を行った。

C. 研究結果と考察

(1) FL の細胞質内への物質送達能の評価

FL に限らず、細胞質内への物質導入ベクターを評価していくためには、1) 単独では細胞質内には入ることができず、2) 細胞外では全く活性を示さない、3) 細胞質内に導入されれば非常に高い活性（毒性）を示す、4) 安定かつ効率よくベクターに組み込める（封入できる）などの条件を備えたマーカー物質が必須となる。この目的に最も適合する物質の 1 つとして、ジフテリア菌によって産生されるジフテリア毒素のフラグメント A 鎖（DTA）がある。DTA は、数分子でも細胞質内に導入されると、蛋白質合成系のポリペプチド鎖延長因子である EF-2 を ADP-リボシル化することによって、蛋白質合成を阻害し、著名な細胞傷害活性を示す。また in vitro において、Intact なジフテリア毒素が毒素高感受性細胞である Vero 細胞を、わずか 100pg/ml の濃度で死滅させる一方で、DTA はその 10⁸ 倍である 100 μ g/ml の高濃度においても全く毒性を示さない。従って、DTA は FL の細胞質内への物質導入効率を評価するマーカーとしてきわめて優れているものと考えられる。この DTA を用いて細胞質内への物質運搬能を評価したところ、4 μ g DTA/ml の DTA-lipo を作用させても全く毒性が認められなかったのに対し、DTA-FL はそのわずか 1/100 の濃度においても細胞傷害活性を示し、0.4 μ g DTA/ml では殆どすべての細胞を傷害した（図 4）。また、Empty-FL には全く細胞傷害活性が認められなかったことから、DTA-FL の効果はセンダイウイルス由来の蛋白質によるものではないことも確認された（図 4）。従って、FL は DTA を効率よく細胞質内に送達した結果、EL4 に対して細胞傷害性を示したものと考えられた。

(2) FL による MHC class I 抗原提示経路への外来性抗原分子の送達

FL による MHC class I 抗原提示経路への外来性抗原分子の送達能は、OVA をモデル抗原とし、OVA 特異的に反応する CTL を用いることで評価した。OVA 特異的 CTL は、OVA-CFA を投与した C57BL/6 マウスの spleen cell を、MHC class I 分子とともに OVA peptide を提示している EG7 で、in vitro で sensitization することにより作成した。本方法で作成された CTL は、CD8+ であり、MHC class I 拘束性で OVA 特異的に細胞傷害性を示すことがすでに報告されている。また今回、Target 細胞として使用した、EL4 と EG7 について FACS 解析を行ったところ、双方とも MHC

class I 陽性、MHC class II 陰性の細胞であった (図5)。従って、FL を用いて OVA を細胞質内に導入された EL4 が、OVA 特異的 CTL に傷害されるか否かを検討することにより、FL による OVA の MHC class I 分子を介する抗原提示能を評価することが可能である (図3)。その結果、OVA-FL 10 μ g OVA/ml を作用させた EL4 はポジティブコントロールである EG7 と同程度、CTL に傷害されたが、OVA-lipo についてはその 10 倍の濃度である 100 μ g OVA/ml を作用させても、無処理の EL4 と全く同程度の傷害しか認められなかった (図6)。またこの傷害は、Empty-FL を作用させた際には全く認められなかったことから、抗原特異的な反応であり、FL を修飾しているセンダイウイルス由来の蛋白質による影響ではないことも確認された (図6)。従って、FL は OVA を効率よく細胞質内に送達した結果、OVA を MHC class I 抗原提示経路に送達したものと考えられた。一般に外来性抗原は、MHC class I ではなく、MHC class II を介して抗原提示されることが知られているが、本実験では FL を用いることにより、外来性抗原を効率よく細胞質内に導入できる結果、MHC class I 抗原提示経路に送達できることを明らかにした (図4、6)。さらに我々は、OVA-FL を免疫したマウスでは、OVA-CFA を免疫したもののよりもさらに強い OVA 特異的 CTL 活性が認められることをすでに確認している。

これまでも、外来性抗原の MHC class I を介する抗原提示を試みた研究がいくつか報告されている。しかしながら、そのどれもがエンドサイトーシス経路のため、これらのアプローチはペプチドワクチンには応用が困難であるという致命的な欠点を有している。細胞質内に導入された抗原は、非ライソゾーム系の酵素であるプロテアソームによってプロセッシングを受けるが、これまでの研究によるとプロテアソームは抗原蛋白質から正確に MHC class I 分子と結合し得る抗原ペプチドを切り出すことが判明している。これに対し、ライソゾーム系の酵素によるプロセッシングは、MHC class I 分子と結合し得る抗原ペプチドを正確に切り出すようなものではなく、ランダムな分解が行われるため、導入抗原のほとんどが unknown な分解をうけてしまう。そのため、エンドサイトーシス経路を経るようなアプローチを用いた場合、せっかく MHC class I 分子に結合し得るようなモチーフを持つペプチドワクチンを設計したとしても、その大部分が MHC class I 分子と結合する以前に分解されてしまうため、結局大量のペプチドを用いなければならなくなってしまう可能性が高い。また Rammensee らは、CTL を活性化するために必要とされる細胞質内 peptide の分子数は、わずかに 200~500 分子であることを報告している。従って、ペプチドワクチンを考えた場合には、Intact なまま細胞質内に直接導入できるアプローチが有効であると考えられ、この点において FL

は、これまでに報告されてきたどのアプローチよりも遥かに優れていると言える。現在我々は、FL をペプチドワクチンにも応用可能であるかを検討するために、FL による詳細な MHC class I 抗原提示経路を検索中であり、また封入抗原をペプチドにした際にも有効であるかなどを検討中である。

D. 結論

近年の分子生物学の発展に伴い、様々な病原体の抗原エピートプが同定されてきており、またガンについても一部ではあるが、その抗原エピートプが徐々に同定されつつある。従って、安全性に優れたペプチドワクチンは、21世紀に向けて早期実現が切望されるものと考えられる。このような背景にも関わらず、ペプチドワクチンに対するアジュバント開発は、はるかに立ち後れているのが現状である。すなわち、FL に限らず、細胞性免疫を効果的に誘導できるアジュバントの開発・研究は、学際的にも社会的にも非常に緊急性が高く、意義深いものと考えられる。一方でエンドサイトーシス経路ではなく、直接細胞内に物質導入が可能という FL の特性を用いることにより、細胞質内に存在する抗原がどのようにプロセッシングされるか等の細胞内動態の解明や、また細胞質内や小胞体内でのペプチドのトリミングを考慮した最適な抗原ペプチドの構築などの検討も可能となる。従って FL は、単なるワクチン開発にとどまらず、ミクロレベルにおける生命現象をも追求可能とするものであり、生命科学の発展に大いに貢献するものであると確信している。FL のアジュバントとしての開発および作用機構の解明を通じて、近い将来、FL をアジュバントとして用いたサブユニット/ペプチドワクチン療法が多くの疾患を克服し得ることに期待したい。

E. 研究発表

1. Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S., Nakanishi M., Tanaka K., and Mayumi T. : Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing cell-mediated immune response to soluble proteins., *J. Control. Release*, submitted.

2. Nakanishi T., Hayashi A., Kunisawa J., Tsutsumi Y., Tanaka K., Nakanishi M., Fujiwara H., Hamaoka T., and Mayumi T. : Fusogenic liposomes efficiently deliver exogenous antigen through the cytoplasm into the class I MHC processing pathway., submitted.

3. Hayashi A., Nakanishi T., Kunisawa J., Kondoh M., Imazu S., Tsutsumi Y., Tanaka K., Fujiwara H., Hamaoka T., and Mayumi T. :

A novel vaccine delivery system using immunopotentiating fusogenic liposomes., in preparation.

図表

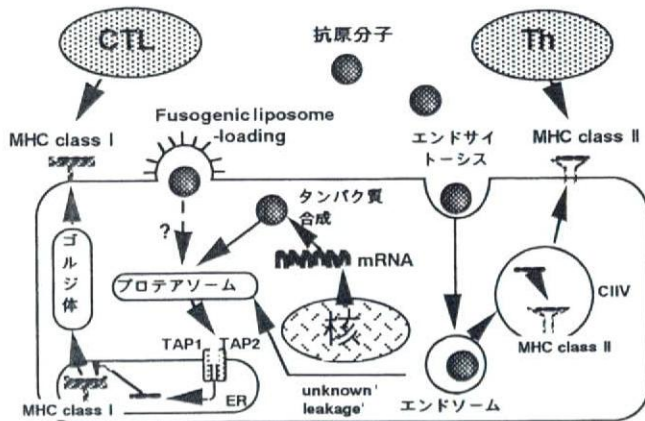


図1 MHC class I、II分子を介する抗原提示経路

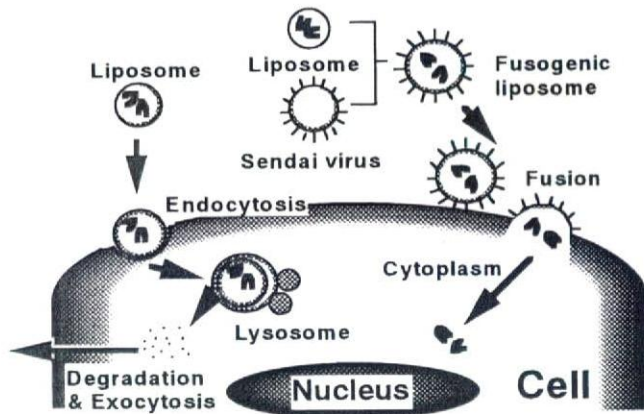


図2 FLによる薬物（封入物質）の細胞質内への送達

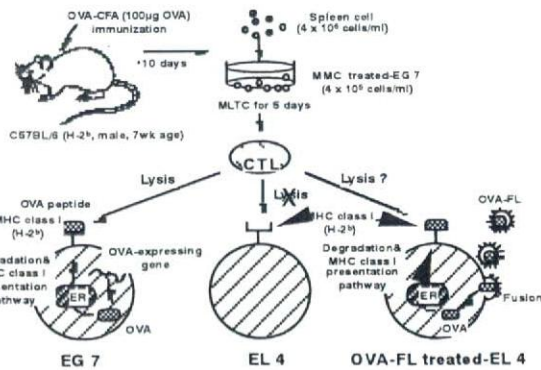


図3 FLによるMHC class I抗原提示経路への抗原分子送達能の評価法

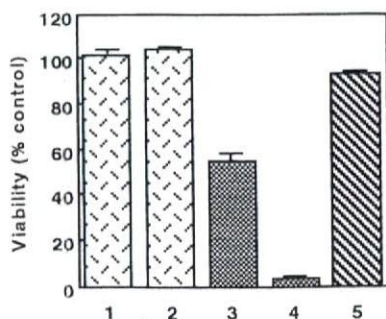


図4 DTA-FLのEL4に対する細胞傷害効果：各 sample を EL4 に加え、4°C、30 分間 incubate した。さらに 37°C、30 分間 incubate した後、EL4 を wash し、48 時間培養した。細胞の viability は MTT 法を用いて評価した。1: DTA-lipo (0.4 μg DTA/ml)、2: DTA-lipo (4 μg DTA/ml)、3: DTA-FL (0.04 μg DTA/ml, 150 HAU/ml)、4: DTA-FL (0.4 μg DTA/ml, 1500 HAU/ml)、5: Empty-FL (1500 HAU/ml)。

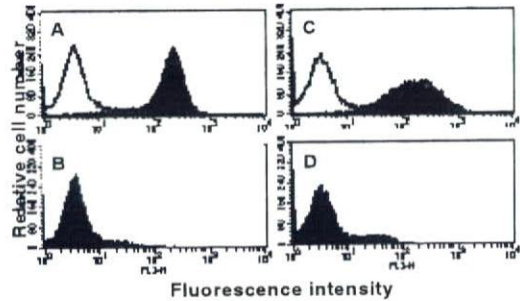


図5 EG7、EL4 における MHC class I、II 分子の発現:EG7(A,B)、EL4(C,D) に対して、anti-MHC class I 抗体 (A,C) と anti-MHC class II 抗体 (B,D) を用いて染色し、FACS 解析した。

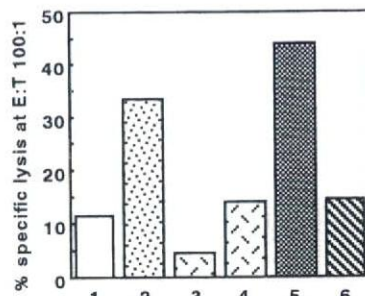


図6 FLによるMHC class I抗原提示経路への抗原分子送達：各 sample を EL4 に加え、4°C、30 分間 incubate した。さらに 37°C、30 分間 incubate した後、EL4 を wash し、2 時間培養した。本細胞を Target 細胞として、OVA 特異的 CTL を用いて 51Cr-release assay を行った。1: 無処理 EL4、2: OVA 遺伝子導入 EL4 (EG7)、3: OVA-lipo (10 μg OVA/ml)、4: OVA-lipo (100 μg OVA/ml)、5: OVA-FL (10 μg OVA/ml, 1500 HAU/ml)、6: Empty-FL (1500 HAU/ml)。

細胞性・体液性免疫を誘導するアジュバント設計と 感染症に対する新規予防・治療戦略の開拓

分担研究者 中川晋作 大阪大学薬学研究科講師

研究要旨

膜融合リポソームは、細胞傷害性T細胞のみならず抗体産生の誘導能をも示した。さらに本効果が、抗原を膜融合リポソーム中に封入した際においてのみ誘導されたことから、リポソームにセンダイウイルス由来のエンベロープ蛋白質を付与し、センダイウイルスの生体内挙動を模倣させること、すなわち抗原の生体内挙動を制御することが重要であることが示唆された。

A. 研究目的

エイズに代表されるように、現状では殆ど手の施しようのない新興・再興感染症に対する魅力的な次世代予防・治療戦略が待望されている。特に、これまで人類の尊い生命を最も救済してきた免疫ワクチン療法への期待は、安全性、有効性の面から過度なまでに大きいが、従来までの創薬学・治療法に依存している今、その限界が指摘され始めている。この最大の原因は、従来ワクチン法では体液性免疫しか誘導できないことにあり、本問題は近年脚光を浴びている腫瘍ワクチンにおいても本問題は解決されていない。従って、種々難治性感染症に対する我が国独自の予防・治療戦略を提示し、国際的かつ学際的に貢献していくためには、細胞を傷つけることなく細胞質中に抗原分子等を効率よく直接導入でき、抗原分子を内在性抗原として認識させ、体液性免疫（抗体産生）と共に細胞性免疫をも同時に誘導し得る斬新なアジュバントの開発が必須となってくる。この点我々が開発に成功した膜融合リポソームは上記課題を全て可能とする唯一のキャリアーであるうえ、既に遺伝子治療の領域で安全性、有効性が保証された我が国独自のベクターとしての世界的地位を確立している。従って、我が国独自の細胞性免疫をも効率よく誘導し得るワクチンアジュバントの開発は、安全かつ効率の良い種々細胞内物質導入技術を確立している申請者らによってのみ達成可能であると考えられる。本研究では、FLをCTL誘導のみならず、抗原特異的抗体産生をも誘導可能なワクチンベクター／アジュバントとして開拓していくこと目指した。

B. 研究方法

＜OVA 特異的抗体産生の評価＞

OVA 単独、OVA 封入未修飾リポソーム、OVA 封入膜融合リポソーム（7,500HAU）、または OVA 溶液と何も封入していない膜融合リポソーム

（7,500HAU）との混合溶液を、ddY マウス、または C57BL/6 マウスの背部皮下に OVA 量で 50 μ g/ mouse となるように単回免疫し、経日的に採血をした。各マウスの血清中 OVA 特異的抗体価は ELISA 法を用いて評価した。すなわち、96 well microplate に 0.02M Na₂CO₃- 0.06M NaHCO₃ 緩衝液（pH 9.6）で希釈した OVA 溶液（10 μ g/ ml）を 50 μ l/ well となるように加え、4 $^{\circ}$ C、over night で固相化した。1%（w/v）gelatin/ 0.02M Tris- 0.04M saline 緩衝液（pH 7.4；TBS）を用いて、室温で 2 時間ブロッキングした後、1mM EDTA- 0.1%（w/v）gelatin- 0.05%（v/v）Tween 20/ TBS（EG- TTBS）で適当な倍率に希釈した血液試料を 50 μ l/ well 反応させた。37 $^{\circ}$ C、2 時間反応させた後、EG- TTBS にて 1/ 1,000 希釈した HRP- a- mlgG1 を 50 μ l/ well となるように加え、さらに 37 $^{\circ}$ C、2 時間反応させた。0.55mM TMBZ を含有する基質溶液（0.015% H₂O₂- 0.1M 酢酸緩衝液、pH 5.5）を 100 μ l/ well 加えて発色反応を行い、2N H₂SO₄ を用いて反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450nm、副波長 655nm で吸光度を測定した。尚、plate から各液を除去する際には、0.05%（v/v）Tween 20/ TBS（TTBS）溶液による洗浄操作を 3 回行った。

＜センダイウイルスに対する特異的抗体産生の評価＞

センダイウイルス（A540=10）を 4 倍量の Lysis 用緩衝液（0.5M Tris- HCl、0.6M KCl、0.5%（v/v）Triton X- 100、pH7.8）を加え、室温にて 5 分間処理した。本溶液を 0.02M Na₂CO₃- 0.06M NaHCO₃ 緩衝液（pH 9.6）で 10 倍希釈し、96 well microplate に 50 μ l/ well となるように加え、4 $^{\circ}$ C、over night で固相化した。各マウスの血清中センダイウイルス特異的抗体価は ELISA 法を用いて評価した。

＜リンパ球増殖試験＞

C57BL/6 マウスから回収した脾細胞を 96 well microplate に 1×10^5 cells/well となるように播種し、さらに何も封入していない膜融合リポソームをウイルス蛋白量で終濃度 0.15~45 μ g/ml となるように添加して培養した。細胞回収 8 時間前に、20kbq/well となるように 3H- Thymidine を添加し、回収した細胞の放射活性を測定することにより細胞増殖を評価した。

<FACS 解析>

C57BL/6 マウスから回収した脾細胞を 48 well plate に 3×10^5 cells/well となるように播種し、さらに何も封入していない膜融合リポソームをウイルス蛋白量で終濃度 15 μ g/ml となるように添加して培養した。72 時間後に細胞を回収し、得られた細胞を各抗体を用いて染色し、FACS 解析を行った。

C. 研究結果と考察

図 1 に、OVA 単独、OVA 封入未修飾リポソーム、OVA 封入膜融合リポソーム (7,500HAU) を、ddY マウスまたは C57BL/6 マウスの背部皮下に OVA 量で 50 μ g/ mouse となるように単回免疫した際の、血中の抗 OVA IgG1 抗体価について検討した結果を示した。OVA 封入膜融合リポソームを用いて免疫した群では、CTL の結果と同様、両系マウスにおいて OVA 封入未修飾リポソームや OVA のみを投与した群に比べ、有意な OVA 特異的血中抗体価の上昇が確認された。本結果は、リポソームに免疫原性の高いセンダイウイルスのエンベロープ蛋白質を修飾することにより、APC への取り込みが上昇したことによるものと考えられる。また一般にウイルス感染時には、種々のサイトカインが産生されることから、膜融合リポソームが immunomodulator として機能していることに起因する可能性も考えられる。そこで膜融合リポソームのアジュバントとしての機能を明らかにするために、OVA 封入膜融合リポソーム (7,500HAU) または OVA と何も封入していない膜融合リポソーム (7,500HAU) の混合溶液を免疫した際の抗体産生について検討を行った。その結果、単なる混合溶液を免疫した群においては、センダイウイルス由来の蛋白質に対する抗体価は、封入型を免疫した群と同様に誘導されている一方で、OVA に対する抗体産生は認められなかった (図 2)。以上の結果から、膜融合リポソームの体液性免疫誘導でのアジュバント効果における機能は、immunomodulator としての機能よりも、抗原の生体内挙動を制御する機能の効果の方が大きいことが示された。このようなメカニズムを有するアジュバントは Gluck らによっても報告されている。彼らはインフルエンザウイルスのエンベロープ蛋白質を組み込んだ再構成リポソーム (IRIV) に A 型肝炎ウイルスを吸着させたワクチンを開発し、ヒトに投与したところ 1 年以上もの間、高い抗原特異的な血中抗体価の持続が可能であったことを

報告している。しかし本報告では、IRIV は抗原の生体内挙動を制御する機能の他に、immunomodulator としての機能も備えており、アジュバント効果の一端を担っていると考えられている。このことは、膜融合リポソームにも当てはまるかもしれない。そこで、膜融合リポソームの immunomodulator としての機能について検討した。膜融合リポソームがリンパ球に対して、マイトジェンとして作用するか否かを、C57BL/6 マウスから回収した脾細胞を、何も封入していない膜融合リポソームと共培養したときの細胞増殖度を指標に検討した (表 1)。その結果、膜融合リポソームの蛋白質濃度に依存したリンパ球の増殖が観察され、培養開始 96 時間後に最大の増殖度を示した。次に膜融合リポソームが、どの細胞群に対し増殖促進作用を示しているのかについて検討した (図 3)。C57BL/6 マウスから回収した脾細胞と膜融合リポソームを 72 時間共培養した際の、細胞群の変化について FACS 解析を行ったところ、CD3+ 細胞の割合が 46% から 32% に減少し、B220+ 細胞の割合が 42% から 61% へ増加しているのが観察された。また slg+ 細胞についても検討した結果、B220+ 細胞と同様に 47.2% から 63.4% に増加しているのが観察された (data not shown)。Kizaka らは、センダイウイルスの HN 蛋白質と F 蛋白質がリンパ球に対して、マイトジェンとして作用することを報告している。また彼らは、エンベロープ蛋白質が主に B 細胞増殖を促進するものの、その効果には T 細胞の存在が必要であることも報告している。本 FACS 解析からは膜融合リポソームがどの細胞群に対して直接作用したかを特定することができないが、Kizaka らの報告と併せて考えると、おそらく膜融合リポソームによって増殖しているのは B 細胞だけではなく、T 細胞も増殖していると考えられるが、結果的に B 細胞の方がより増殖促進作用を受けたものと考えられる。この B 細胞に対する増殖促進効果は、前節における膜融合リポソームによる抗体産生誘導増強の一端を担っているものと考えられる。またこのような膜融合リポソームの各リンパ球に対する増殖促進効果により、リンパ球への直接的な効果以外に、刺激を受けたリンパ球から産生されるサイトカインなどが、2 次的に免疫系をさらに活性化している可能性も考えられる。以上の結果は、膜融合リポソームが単独でもリンパ球に対して増殖促進効果を有することを示しており、膜融合リポソームが in vivo において immunomodulator としても機能し得る可能性を示唆するものである。

D. 結論

センダイウイルスやインフルエンザウイルスなどのウイルスのエンベロープ蛋白質は、高い免疫原性を有していることが知られているが、これらは効率よく APC に取り込まれていることに起因していると予想される。これは、センダイウイル

スのエンベロープ蛋白質を有する膜融合リポソームが、通常のリポソームよりも APC に取り込まれやすく、体液性免疫をも増強し得る可能性を示唆している。事実、本研究において膜融合リポソームは、未修飾リポソームと比較して高い体液性免疫誘導能を示した。また、その効果は膜融合リポソームに封入されていることが必要不可欠であることから、本効果は、抗原の生体内挙動を膜融合リポソームによって制御することにより得られたことが示唆された。膜融合リポソームによる体液性免疫誘導増強の作用機序は明かではないが、膜融合リポソームに封入することにより、本リポソームが陰電荷脂質を構成脂質としているにも関わらず、抗原が APC に取り込まれ、効率よく MHC class II 分子と共に抗原提示された結果、体液性免疫が誘導されたものと推測される。この際の抗原提示機構については少なくとも二つの可能性が考えられる。1 つ目は、従来から知られている Standard な経路による MHC class II 抗原提示が効率よく行われた結果、体液性免疫が誘導されるというものである。すなわち、膜融合リポソームの膜表面に存在するセンダイウイルス由来の HN 蛋白質は、細胞表面上のシアル酸を認識・結合することから、in vivo おいても、膜融合リポソームが APC に積極的に結合し得ることが予想される。そのため、抗原封入膜融合リポソームが APC のファゴサイトーシスによる取り込みが上昇し、Standard な経路による MHC class II 抗原提示が効率よく行われた可能性が考えられる。一方、Standard な MHC class II 抗原提示経路によらない抗原提示の影響も考慮する必要がある。一般に、細胞質中に存在する内在性抗原は MHC class I 分子によって補足され、外来性抗原はライソソーム酵素によって分解されて MHC class II 分子によって補足されることで、抗原提示されと考えられている。しかし近年、MHC class II 分子を介する抗原提示は、外来性抗原のみならず、内在性抗原についても行われることが明らかとなってきた。この事実は、膜融合リポソームの「封入抗原を細胞質中に直接導入する」という機能が、効率よく内封抗原を MHC class II 抗原提示経路に送達した結果、体液性免疫誘導増強につながった可能性を示唆するものである。しかしながら、これら抗原提示経路については、未だ不明な点も多く、今後そのメカニズムを詳細に検討する必要がある。最後に膜融合リポソームの immunomodulator としての機能を検討した。感染能を失ったセンダイウイルスやセンダイウイルスのエンベロープ蛋白質は、各種免疫担当細胞に対し、immunomodulator として作用し得ることが知られている。その事実を反映して、膜融合リポソームはリンパ球増殖促進作用があることが確認された。従って、膜融合リポソームのアジュバント効果には、自身の immunomodulator としての機能もその一端を担っている可能性が示唆された。

E. 研究発表

1. Nakanishi T., Kunisawa J., Hayashi A., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S., Nakanishi M., Tanaka K., and Mayumi T. : Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing cell-mediated immune response to soluble proteins., *J. Control. Release*, submitted.

图表

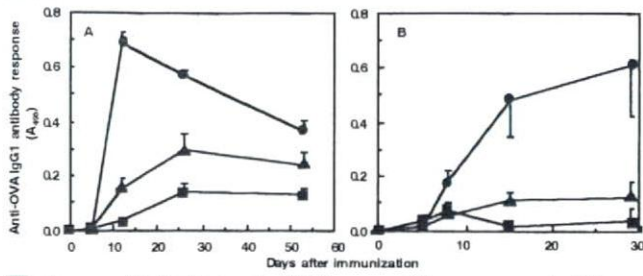


图 1 Priming of OVA-specific serum IgG1 responses by immunizing with variously formulated OVA. ddY mice (A) and C57BL/6 mice (B) were immunized with 50 μ g of OVA alone (■), OVA in fusogenic liposome (7,500HAU) (●) or simple LUV (▲) and serum samples were collected as described in Figure 11. Anti-OVA IgG1 in sera, which were diluted 1 : 2000 (ddY) or 1 : 100 (C57BL/6), were determined by ELISA. Results are mean \pm S.E. for 5 or 6 mice / group.

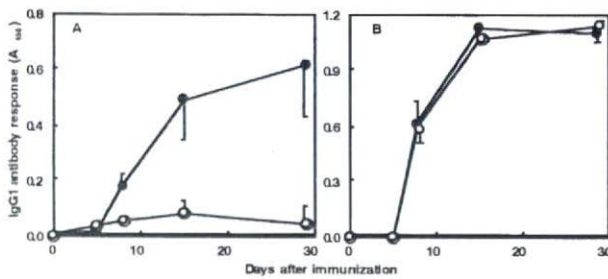


图 2 Priming of OVA and Sendai virus-specific serum IgG1 responses by immunizing with variously formulated OVA. C57BL/6 mice were immunized with 50 μ g of OVA in fusogenic liposome (7,500HAU) (●) or mixture of 50 μ g of free OVA and empty fusogenic liposome (7,500HAU) (○) and serum samples were collected as described in Figure 11. Anti-OVA (A) and anti-Sendai virus (B) IgG1 in sera, which were diluted 1 : 100, were determined by ELISA. Results are mean \pm S.E. for 5 or 6 mice / group.

表 1. Stimulation of murine spleen cells by fusogenic liposome.

Treatment	Protein conc. (μ g/ml)	³ H-thymidine uptake (cpm) ^a				
		24h	48h	72h	96h	120h
Non-treatment	-	528 \pm 41	1396 \pm 41	1231 \pm 41	1648 \pm 110	422 \pm 30
Fusogenic liposome	45	1488 \pm 5	4804 \pm 256	6834 \pm 131	7025 \pm 721	4286 \pm 357
	15	1406 \pm 15	4366 \pm 62	4113 \pm 176	5258 \pm 639	3401 \pm 414
	5	1331 \pm 111	3781 \pm 163	3896 \pm 190	4140 \pm 566	3212 \pm 91
	1.5	1239 \pm 32	3138 \pm 14	3081 \pm 174	3910 \pm 248	2142 \pm 324
	0.5	944 \pm 18	2917 \pm 115	2415 \pm 235	3316 \pm 417	1379 \pm 199
	0.15	930 \pm 53	2446 \pm 44	1978 \pm 87	2963 \pm 216	668 \pm 57

^a Results are mean \pm S.D. for triplicate.

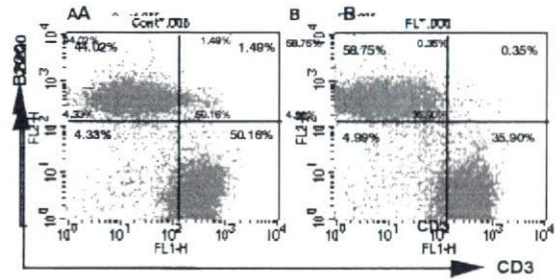


图 3 Flow cytometric analysis of murine spleen cells stimulated by fusogenic liposome. Spleen cells from C57BL/6 mice were cultured without (A) or with (B) fusogenic liposome at 15 μ g protein/ml for 72hrs. Cells were labeled with FITC-conjugated anti-CD3 antibody and PE-conjugated anti-B220 antibody and analysed by flow cytometry. The mean percentage of cells is given for each subpopulation.