

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

## リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究

所 属 国立感染症研究所 安全性研究部

研究者 内田 哲也

### 分担研究者

- |                   |       |
|-------------------|-------|
| (1) 日本油脂株式会社      | 森 真人  |
| (2) (財)化学及血清療法研究所 | 大隈 邦夫 |
| (3) 大鵬薬品工業株式会社    | 三宅 秀和 |

### 要旨

本年度はリポソーム結合抗原のアレルギー予防・治療への応用を目標として、抗原-リポソーム結合物による IgE 抗体産生の選択的抑制機序の検討、破傷風トキソイド-リポソーム免疫後のサルにおける抗破傷風抗体産生の検討、マクロファージによるリポソームの吞食の検討、抗原-リポソーム結合物経口投与マウスにおける抗体産生の検討、スギ花粉抗原(SBP)-リポソーム結合物投与マウスにおける抗 SBP 抗体産生の検討、等を行い、臨床応用の可能性が期待される結果を得た。

### 1. 研究目的

外来の抗原に対する生体の免疫反応のひとつであるアレルギー反応は喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症等のいわゆるアレルギー性疾患の他、ワクチン接種後の接種局所の発赤、腫脹、あるいは全身性のショック症状といった副反応の原因となっている。これらのアレルギー反応の一部に宿主が産生する抗原特異的 IgE 抗体が関与していることが知られており、IgE 抗体産生を抑制することがアレルギーの予防および治療において必須であると考えられている。しかしながら現在までのところ、IgE 抗体産生の調節機構については未だ不明の点が多く、IgE 抗体産生を抑制する手段は得られていない。我々はこれまでに、リポソーム表面に結合させた抗原が IgE 抗体産生の選択的無反応を誘導することを見いだした。さらに、リポソーム結合抗原を2次免疫に用いると IgG 抗体産生のみ増強して IgE 抗体産生には影響しないことが明らかになった。このことから、リポソーム表面結合抗原をアレルギー反応を惹起しないワクチンの創製にだけでなく、アレルギー治療薬としても応用する可能性が期待された。本研究では、これまでに行ってきた、アレルギー反応を惹起しにくいワクチンの創製を目的とした検討を継続するのに加え、リポソーム表面結合アレルゲンの減感作療法への応用を目的とした検討を行う。

### 2. 研究方法

**a.** 抗原-リポソーム結合物による IgE 抗体産生の選択的抑制機序の検討：前年度までの検討の結果は抗原-リポソーム結合物によって誘導される IgE 抗体産生の調節効果が T ヘルパーサブセットのバランスによるものではないことを示唆したが、T 細胞あるいは抗原提示細胞から産生される IL-10、あるいは CD8 陽性 T 細胞が関与している可能性も考えられた。そこで、IL-10 を中和することのできる抗 IL-10 モノクローナル抗体、あるいは CD8 陽性 T 細胞を除去することのできる抗 CD8 抗体をマウスに投与して検討を行った。また、卵白アルブミン(OVA)-リポソームあるいは OVA-alum を

免疫したマウスの脾臓由来 CD4 陽性細胞を T 細胞欠損マウスに移入して抗 OVA 抗体産生を検討した。

b. 破傷風トキソイド-リポソーム免疫後のサルにおける抗破傷風抗体産生の検討：カニクイザルに破傷風トキソイド(Ttd)-リポソーム結合物あるいはアルミニウム沈降破傷風トキソイド(Ttd-alum)を免疫し、抗破傷風抗体産生を検討した。

c. マクロファージによるリポソームの呑食の検討：前年度までの検討の結果、リポソームの脂質組成によって抗原結合リポソームによる抗原特異的 IgG 抗体産生の誘導能に顕著な差があり、リポソームの膜流動性とアジュバント効果の間に相関が認められた。リポソームを構成する脂質によってアジュバント効果が異なる原因として抗原提供細胞による認識されやすさの違いによることが考えられた。そこで本年度は、マクロファージの培養中に蛍光ラベルしたリポソームを添加し、経時的にマクロファージによるリポソームの取り込みを観察することによりリポソームの脂質組成と抗原提供細胞による認識されやすさとの関係を検討した。リポソームを蛍光(NBD-PE)ラベルし、マクロファージの培養中に添加した。培養開始後 0.5~24 時間経過後、マクロファージを回収して蛍光強度を測定した。また、脂質組成の異なる 2 種類のリポソームについて、マクロファージによる呑食を顕鏡下で観察した。

d. 抗原-リポソーム結合物経口投与マウスにおける抗体産生の検討：OVA-リポソームあるいは OVA 溶液を 2 週にわたって経口投与した後、OVA-alum で免疫を行って抗体産生を検討した。

e. スギ花粉抗原(SBP)-リポソーム結合物投与マウスにおける抗 SBP 抗体産生の検討：SBP-リポソーム結合物投与マウスにおける一次あるいは二次免疫応答を検討した。次に、マウス抗 SBP IgE 抗体を感作したラット皮内における Prausnitz-Küstner 反応の惹起を SBP-リポソームと SBP 溶液の間で比較検討した。また、抗 SBP IgE 抗体を産生するマウスに SBP-リポソームあるいは SBP 溶液を投与し、体温変動を観察した。

### 3. 研究成果

a. 抗原-リポソーム結合物による IgE 抗体産生の選択的抑制機序の検討：抗 IL-10 モノクローナル抗体の in vivo 投与による IL-10 の中和、および抗 CD8 モノクローナル抗体の in vivo 投与による CD8 陽性 T 細胞の除去によっても抗原-リポソーム結合物による IgE 抗体産生の選択的抑制が誘導されたことから、抗原-リポソーム結合物による IgE 抗体産生の抑制における IL-10 あるいは CD8 陽性細胞の関与は否定された。また、OVA-リポソームを免疫したマウスの脾臓由来 CD4 陽性細胞を T 細胞欠損マウスに移入し、このマウスを OVA-alum で免疫した時、抗 OVA IgE 抗体産生が誘導された。一方、OVA-alum を免疫したマウスの脾臓由来 CD4 陽性細胞を移入し、OVA-リポソームで免疫した時、抗 OVA IgE 抗体産生は誘導されなかった（表-1）。

表-1：OVA 免疫マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を移入した T 細胞欠損マウスにおける抗体産生

immunization of T-cell donor	immunization of recipient mice	Anti-OVA antibodies	
		IgG (µg/ml)	IgE ELISA titer
no	OVA-liposome	12.3 ± 8.7	N.D.
	OVA-alum	17.7 ± 5.2	N.D.
OVA-liposome	OVA-liposome	144.7 ± 24.3	N.D.
	OVA-alum	124.3 ± 12.8	105.6 ± 10.7
OVA-alum	OVA-liposome	178.0 ± 28.3	N.D.
	OVA-alum	246.8 ± 29.4	139.3 ± 12.3

b. 破傷風トキソイド-リポソーム免疫後のサルにおける抗破傷風抗体産生の検討：Ttd-リポソームを免疫したサルにおいて、抗 Ttd IgG 抗体産生は誘導されたが抗 Ttd IgE 抗体産生は誘導されなかった。一方、Ttd-alum を免疫したサルでは、抗 Ttd IgG および IgE 抗体産生が誘導された。Ttd-リポソーム免疫によって誘導された抗 Ttd IgG 抗体には破傷風毒素に対する顕著な中和活性が認められた。

c. マクロファージによるリポソームの呑食の検討：マクロファージ培養中に蛍光ラベルしたリポソームを添加し、経時的に回収してマクロファージの蛍光強度を検討したところ、培養開始 0.5 時間後には顕著な蛍光強度が検出され、培養時間とともに増加した。次に、上記の検討を脂質組成の異なる 2 種類のリポソーム、Oleoyl リポソームおよび original リポソームを用いて行った。蛍光ラベルしたリポソームとともに 2 時間培養したマクロファージの顕微鏡像を図-1 に示す。Oleoyl リポソームを培養中に添加したマクロファージでは original リポソームを添加したマクロファージあるいはリポソームを添加しないマクロファージと比較して細胞内に形成された小胞が顕著に大きく、また細胞の形状も異なっており、マクロファージが活性化していると考えられた。

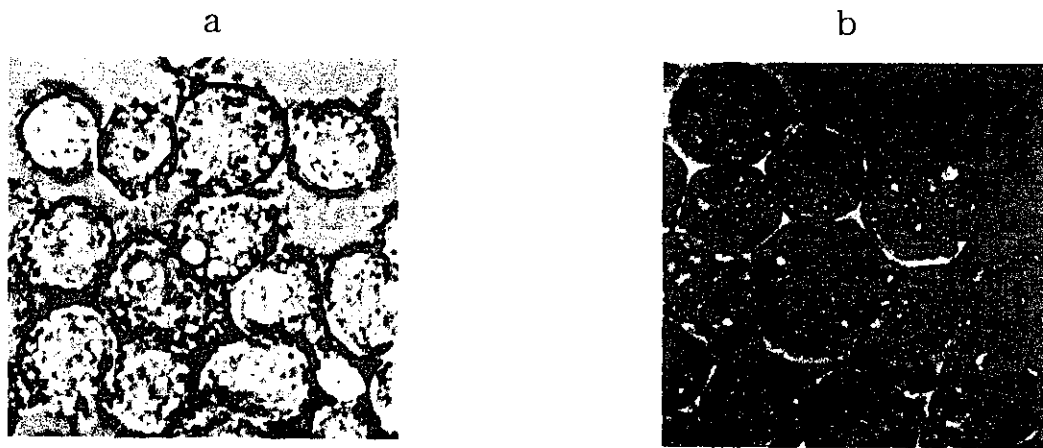


図-1：Oleoyl リポソーム(a)、あるいは original リポソーム(b)を添加して培養したマクロファージの顕微鏡像

d. 抗原-リポソーム結合物経口投与マウスにおける抗体産生の検討：マウスに OVA-リポソームあるいは同一抗原濃度の OVA 溶液を 2 週にわたって計 10 回、経口投与し、3 週目に OVA-alum を腹腔に免疫したところ、OVA 溶液経口投与群では抗 OVA IgG および IgE 抗体産生がともに抑制されたのに対して、OVA-リポソーム溶液経口投与群では抗 OVA IgE 抗体産生が抑制されて抗 OVA IgG 抗体産生は対照の経口非投与群と変わらなかった (図-2)。

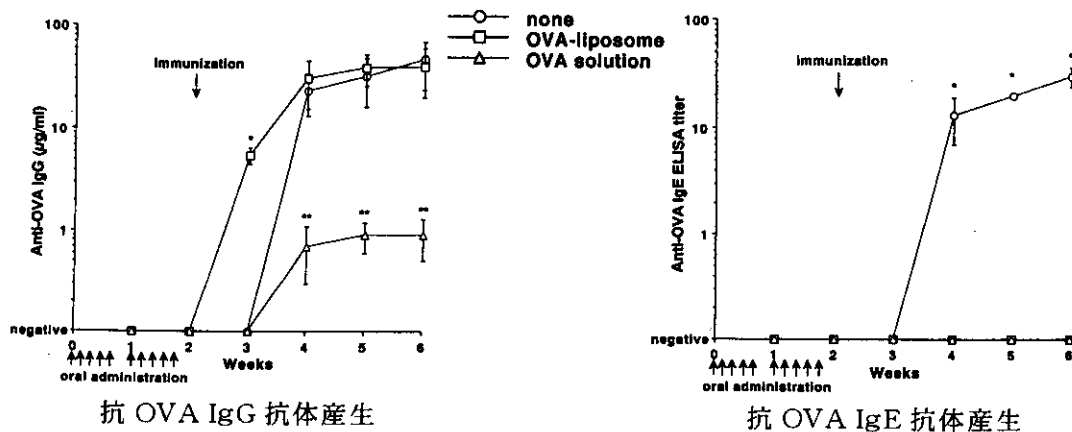


図-2：OVA-リポソームあるいは同一抗原濃度の OVA 溶液を経口投与したマウスにおける抗体産生

e. スギ花粉抗原(SBP)-リポソーム結合物投与マウスにおける抗SBP抗体産生の検討: これまでに種々の抗原を用いて行った検討の結果と同様、SBP-リポソームをマウスに一次免疫したときにも抗 SBP IgG 抗体産生が誘導されて抗 SBP IgE 抗体産生は誘導されなかった。また、一次免疫で抗 SBP IgG および IgE 抗体産生を誘導したマウスに SBP-リポソームを二次免疫すると、抗 SBP IgG 抗体産生のみ増強して抗 SBP IgE 抗体産生は増強しなかった。また、マウス抗 SBP IgE 抗体を感作したラットの皮内に SBP 溶液あるいは SBP とリポソームの混合液を注射すると Prausnitz-Küstner (PK) 反応が誘導されたが、SBP-リポソーム結合物を注射したときには PK 反応は誘導されなかった (図-3)。さらに、抗 SBP IgE 抗体産生を誘導したマウスに SBP 溶液を静脈すると注射直後から顕著な体温の低下が観察されたのに対して、同一抗原濃度の SBP-リポソームを静脈注射したときには体温変動は観察されなかった (図-4)。

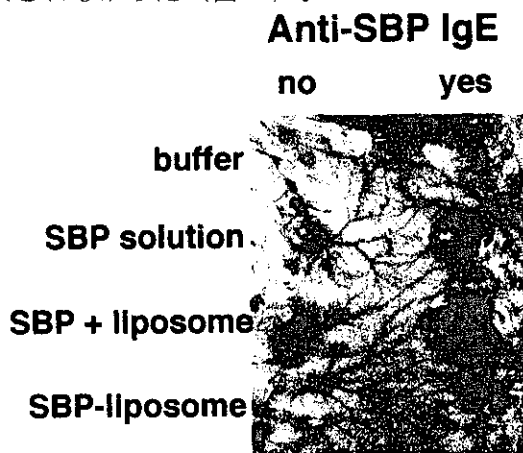


図-3: SBP 抗原による PK 反応の誘導

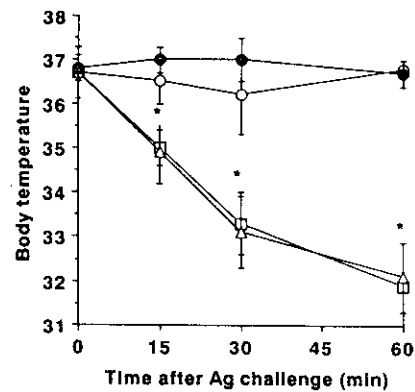


図-4: SBP 抗原投与マウスにおける体温変動

#### 4. 考察

これまでの検討結果に加えて、本年度の検討により抗原-リポソーム免疫マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を T 細胞欠損マウスに移入すると抗原特異的 IgE 抗体産生が誘導される結果が得られたことから、抗原-リポソームによって誘導される IgE 抗体産生の調節効果は T 細胞に非依存的であることが示唆された。従来、IgE 抗体産生の調節は主として T ヘルパー細胞サブセットのバランスによって調節されているとされており、本研究で得られた知見はきわめてユニークであるといえる。生体における IgE 抗体産生の調節機構に関する新しい知見を提供することが期待され、この検討は今後とも継続してゆく方針である。

破傷風トキソイド-リポソーム結合物をサルに投与したとき、マウスでの検討結果同様、抗原特異的 IgE 抗体産生の選択的抑制効果が観察され、破傷風トキソイド-リポソームで誘導された抗 Ttd IgG 抗体に破傷風毒素に対する顕著な中和活性が認められた。これらの結果から、破傷風トキソイド-リポソーム結合物を IgE 抗体産生を惹起しにくいワクチンとして応用する可能性が示唆された。

リポソームの脂質組成を変えることによって IgG 抗体産生の誘導能 (アジュバント能) が顕著に変化することがこれまでの検討によって明らかになっているが、いわゆるアジュバント能が生体の免疫機構のどの部分に作用しているのかは未だ明らかでない。そこで本研究ではアジュバント能の高い Oleoyl リポソームと、比較的lowめの original リポソームをマクロファージの培養中に添加し、マクロファージによる吞食を比較検討した。その結果、アジュバント能の高い Oleoyl リポソームを吞食したマクロファージでは細胞内に顕著な小胞が形成し、形態学的にも細胞が活性化しているのが認め

られた。免疫応答の端緒は抗原提供細胞による抗原の認識であり、リポソームの脂質組成によるアジュバント能の差は抗原提供細胞による認識され易さ、抗原提供細胞の活性化のされ方の差を反映していることが示唆された。この点についてはさらに詳細な検討を続行中である。

リポソーム結合抗原を経口投与したマウスでは抗原特異的 IgE 抗体産生のみ抑制され、IgG 抗体産生は抑制されないことが示された。従来、抗原の経口投与によって免疫寛容が誘導されることが知られており（経口寛容）、この場合 IgG、IgE 抗体産生はともに抑制される。本研究で得られた、リポソーム結合抗原の経口投与によって IgE 抗体産生のみ抑制されるという結果は、現象として学問的に興味深いだけでなく、抗原の経口投与によるアレルギー反応の抑制という、臨床応用の可能性を検討する価値のある知見でもありと考えられる。今後この作用機構を解析するとともに、抗原としてアレルゲンを用いた検討を行う方針である。

スギ花粉抗原-リポソーム結合物は一次免疫および二次免疫において SBP 特異的 IgG 抗体産生を誘導して IgE 抗体産生を誘導しなかった。さらに、SBP-リポソームはラット皮内における PK 反応を惹起しなかった。このことはリポソームに結合した SBP が肥満細胞の活性化およびそれに続くヒスタミンの遊離を誘導しにくいことを示唆しており、抗 SBP IgE 抗体産生を誘導したマウスにおいてアナフィラキシーショックを誘導しないという結果（図-4）とあわせて、スギ花粉抗原-リポソーム結合物はアレルゲン減感作療法への臨床応用に適していると考えられた。

## 5. まとめ

本年度は抗原-リポソーム結合物のアレルギー予防・治療への応用を目標とした検討を、抗原として卵白アルブミン、破傷風トキソイド、スギ花粉抗原を用い、マウス、サル、および細胞培養系において行った。その結果、抗原-リポソーム結合物をワクチンおよびアレルギー治療薬の創製に応用することの可能性を示唆する結果が得られた。

## 6. 研究発表

- 1) Nakano Y, Mori M, Nishinohara S, Takita Y, Naito S, Kato H, Taneichi M, Komuro K, Uchida T: Surface-linked liposomal antigen induces IgE-selective unresponsiveness regardless of the lipid components of liposomes. *Bioconj Chem* 2001;12:391-395.
- 2) 内田 哲也：「抗原結合リポソームのアレルギー予防・治療への応用」臨床免疫（科学評論社）35(6):937-943.
- 3) Suzaki, Y., Ami, Y., Nagata, N., Naito, S., Kato, H., Taneichi, M., Takahashi, M., Komiya, T., Satoh, S., Gondaira, F., Sugiyama, J., Nakano, Y., Mori, M., Nishinohara, S., Komuro, K., Uchida, T. (2002) Protection of monkeys against Shiga toxin induced by Shiga toxin-liposome conjugates. *Int Arch Allergy Immunol* 2002（印刷中）
- 4) Ishikawa F, Nakano H, Seo A, Okada Y, Torihata H, Tanaka Y, Uchida T, Miyake H, Kakiuchi T: Irradiation up-regulates CD80 expression through induction of TNF-alpha and CD40 ligand expression on B lymphoma cells. *Immunology* 2002（印刷中）
- 5) Taneichi M, Naito S, Kato H, Mizuochi T, Nakano Y, Mori M, Yyamamura H, Komuro K, Uchida T: T cell-independent regulation of antigen-specific IgE antibody production induced by surface-coupled antigen of liposomes.（投稿中）
- 6) Nakano Y, Mori M, Nishinohara S, Takita Y, Naito S, Kato H, Taneichi M, Komuro K, Uchida T:

Cholesterol inclusion in liposomes affects antigen-specific IgG but not IgE antibody production in mice immunized with surface-coupled antigen of liposomes. (投稿中)

7) Naito S, Taneichi M, Kato H, Miyake H, Kiniwa M, Mori M, Nakano Y, Yamamura H, Taniguchi Y, Ikegami H, Komuro K, Uchida T.: Sugi-basic protein-liposome conjugates preserve immunogenicity but decrease allergenicity of sugi-basic protein. (投稿中)

8) Naito S, Taneichi M, Kato H, Ami Y, Suzaki Y, Mori M, Nakano Y, Yamamura H, Morokuma K, Ohkuma K, Miyake H, Kiniwa M, Komuro K, Uchida T: Selective inhibition of systemic anti-OVA IgE production in response to oral preadministration with OVA-liposome conjugates. (投稿中)

#### 7. 知的所有権の取得状況

該当無し

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社