

10% EDTA を含む PBS で回収し、100mM triethylamine(TEA)で細胞を溶解し、ファージを回収し中和後に大腸菌株 IG-1 に感染させ増幅した。以上の一連の操作を3回行った。

2) ヒースパンニング法は既に報告している方法に準じた(4)。具体的には、あらかじめヒオチン化 CCR5-L2 ペプチド (15 $\mu$ g) と scFv ファージライブラリー (1.5 $\times 10^{12}$  IU) を 4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。次に、ストレプトアビジンが結合したマクネットヒース (1.0 $\times 10^8$ 個、DynaL Biotech ASA Oslo Norway) を反応させ、CCR5-L2 に結合しているファージを回収しクローン化した。

### 3 CCR5 陽性細胞

CCR5<sup>+</sup>293 細胞は荒井秀典博士(京大 医老年科)から恵与された。

### 4 フローサイトメトリー

細胞とファージクローンを反応させ、洗浄後、ビオチン化抗 M13 抗体 (1:3000) を 30分 4 $^{\circ}$ Cにて反応させ、Ultravidin-FITC (1:1000)を結合させ EPICS XLにて解析した。

### 5 ELISA

96 穴イムノプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) にファージクローン (1 $\times 10^{12}$  virions/40 $\mu$ l/well) または scFv (250ng/40 $\mu$ l/well) を 4 $^{\circ}$ Cで一晩固定化し、0.5% gelatin/PBSでブロックした。0.1% Tween 20/PBSで洗浄後、ヒオチン化 CCR5-L2 (100ng/40 $\mu$ l/well)、ヒオチン化 BSA (100ng/40 $\mu$ l/well)、ビオチン化 gelatin (100ng/40 $\mu$ l/well) をそれぞれ加え、室温で1時間反応させた。これらの結合はアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン

(1:1000, Vector Lab (A) を反応させ、*p*-ニトロフェニルリン酸を含む基質溶液を加えることにて検出した。測定にはマイクロプレートリーダー (日本インターメット、東京) を用い、405nm での吸光度を測定した (2、3、4)。

### 6 scFv の調整

スクリーニングにより得られたファージクローンを大腸菌株 HB2151 に感染させ、IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) で可溶性 scFv の発現を誘導した。ファージミトヘクター-pCANIAB5E は、amber 変異の無い大腸菌株 HB2151 で発現させると、scFv と g3p 遺伝子間の amber stop codon によって scFv の末端で翻訳が停止し、可溶性 scFv がペリプラズムや細胞外に分泌される。培養液から培養上清、ペリプラズム抽出物を調製し、Dot blot により scFv の発現を確認した。ペリプラズム抽出物液中からの可溶性 scFv の精製は、RPAS (recombinant phage antibody system) Purification Module (Pharmacia Biotech) を用いて行った (3、8)。

### 7 Dot blot

培養上清液およびペリプラズム抽出物液をニトロセルロースメンブレンに転写し、そのメンブレンを 5% skim milk/PBS で一晩ブロックした。0.05% Tween 20/PBSで洗浄後、horse radish peroxidase (HRP) 標識抗 E tag 抗体を室温で1時間反応させた。結合は ECL reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire) を反応させ、LAS-1000 image analyzer (Fuji film, Tokyo) を用いて検出した。NFB prestained protein (NE Biolabs)

を protein marker として用いた。

## 8 Western blot

精製した可溶性 scFv を SDS-PAGE 後、PVDFメンブレン (Applied Biosystems) に転写し、そのメンブレンを 5% skim milk/PBS で一晩ブロックした。0.05% Tween 20/PBS で洗浄後、horse radish peroxidase (HRP) 標識抗 E tag 抗体を室温で 1 時間反応させた。結合は ECL reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire) を反応させ、LAS-1000 image analyzer (Fuji film Tokyo) を用いて検出した。NEB prestained protein (NE Biolabs) を protein marker として用いた (3, 8)。

## 9 抗 HIV-1 アッセイ

HIV-1 感染の際の標的細胞として、MAGI-CCR5 細胞を用いた (1)。この細胞株はヒト CD4、ヒト CCR5、ヒト CXCR4、HIV-LTR- $\beta$ -galactosidase を発現しており、HIV-1 の感染が起こるとウイルス由来の Tat タンパク質により  $\beta$ -galactosidase が転写される。MAGI-CCR5 細胞を  $1 \times 10^4$  cell/well の濃度でマイクロプレートにまき、1 日間培養後、種々の濃度に希釈したサンプル液を  $100 \mu\text{l}$  と HIV-1 Ba-L 株を  $100 \mu\text{l}$  同時に添加し、さらに 2 日間培養する。培養上清を  $100 \mu\text{l}$  抜いた後、 $100 \mu\text{l}$  の  $\beta$ -galactosidase 発光試薬を加え、ルミノメーターを用いてウイルスの感染量を定量した。感染阻害率は以下の式により算出した。

$$\text{RLU} (\%) = \left[ \frac{(\text{阻害物を含む時の発光強度}) - (\text{阻害物を含まない時の発光強度})}{\text{非感染細胞の発光強度をバックグラウンドとして、各データから引いてある。}} \right] \times 100$$

## 10 倫理面への配慮

本論文では倫理面の問題はない。

## C 研究結果

1) CCR5<sup>+</sup>293 細胞を用いた細胞パニング  
ファージライブラリーから CCR5<sup>-</sup>293 細胞に結合するものをあらかじめ吸収し、CCR5<sup>+</sup>293 細胞と特異的結合したファージを 37°C でインキュベートすることにより、細胞内に取り込ませた。その後細胞を溶解し、その中和溶液を大腸菌株 TG-1 と混合してファージを感染させ増幅した。この操作を 3 回行い、3 回目サイクルのファージについてフローサイトメトリー解析を行った。クローン化する前の選別ポリクロナールファージ ( $50 \mu\text{l}$  of  $10^{12}$  colony forming units [cfu]/ml) は CCR5<sup>+</sup>293 細胞に結合活性を示したが、CCR5<sup>-</sup>293 細胞には結合しなかった (図 2)。このファージをクローン化し、65 クローンについて検討した結果、CR5-3 および CR5-5 クローンは CCR5<sup>+</sup>293 細胞に結合活性をしめし、一方 CR5-3 は CCR5<sup>-</sup>293 細胞に若干の結合活性を示すものの、CR5-3 はほとんど結合しないことが明らかとなった (図 2)。

## 2) 合成ペプチド CCR5-L2 に対する 2D7 抗 CCR5 抗体の結合活性

CCR5 の細胞外第二ループは 2 つの点で特徴的である。1) この領域はケモカインレセプターの中でも CCR5 に特有なアミノ酸配列であること、また 2) Arg-168 から Cys-178 のアミノ酸配列は生物種間で高いホモロジーを有している。HIV-1 の感染を阻害する抗体として 2D7 抗体 (抗 CCR5 抗体) が知られてい

るが、この抗体の認識エピトープは Lys-171 と Glu-172 であるとされている(9、10、11)。これらの事実から、CCR5 の Arg 168 から Cys-178 の構造は HIV-1 感染の重要なトメインであることが示唆される。この考え方に基づいて、CCR5 の細胞外第二ループの配列 (Arg-168 から Cys-178) を含むビオチン化ペプチド CCR5-L2 (biotin-GGCAGRSQKEGLHYICS) を合成した(図3)。この CCR5-L2 ペプチドが 2D7 抗体に認識されるかを ELISA にて調べたところ、強い特異的結合活性があることが示された(図4)。このことは CCR5-L2 が細胞表面に発現する CCR5 の構造を反映していることを示唆した。

### 3) CCR5-L2 の抗 HIV-1 活性

R5 株 HIV-1 のエンVELOPE糖タンパク質 gp120 は CD4 分子に結合することで、CCR5 と特異的に相互作用する。2D7 に認識される CCR5 合成ペプチド、CCR5-L2 は HIV-1 感染における CCR5 様結合モチーフとして機能し、HIV-1 感染を阻害する可能性が示唆された。

そこで、CCR5-L2 ペプチドの抗 HIV-1 活性を調べるために MAGI-CCR5 細胞を用いた *in vitro* での HIV-1 感染の阻害実験を行った。合成ペプチド CCR5-L2 を 400  $\mu$ M まで濃度を変えて阻害活性を測定したが抗 HIV 活性はいずれの濃度でも認められなかった。一方 2D7 (4 $\mu$ g/ml) は強い阻害活性を示した(図5)。

### 4) 合成ペプチド CCR5-L2 を用いたビーズパンニング

CCR5-L2 自身が HIV-1 の感染阻害活性を示さないが、2D7 が HIV-1 感染の阻害活性を有す

ることより、CCR5-L2 が HIV-1 感染に係わる CCR5 の分子構造を反映している可能性がある。したがって、CCR5-L2 に特異的な結合活性を有する抗体ファージクローンか感染阻害活性を示す可能性があり、これを検討するために CCR5-L2 に特異的なヒト抗体ファージクローンの単離を試みた。パンニングはヒーズパンニング法を用いた。その結果、ELISA で CCR5-L2 に結合するが、gelatin や BSA に結合しないファージを 152 クローン中 40 クローンを選別した(図6)。

### 5) Western blot

HIV-1 の感染に関与する CCR5-L2 の構造は CCR5 の膜貫通部位に近接して存在し、細胞表面の CCR5 分子の奥深いところに位置するため、抗体ファージではアクセスできない可能性が考えられたため、ファージクローンではなく scFv を調整して、HIV-1 感染への影響を調べた。Dot blot により大腸菌における scFv の発現を調べたところ培養上清には scFv の発現が確認されなかったけれども、ペリプラズム抽出物には scFv の発現が確認された。ペリプラズム抽出物から精製した可溶性 scFv を用いてウェスタンブロットを行った結果、25kDa から 32.5kDa の間に scFv のバンドが検出された。

### 6) scFv の CCR5-L2 への結合活性

CCR5-L2 に対して結合活性をもつファージに提示された scFv を精製し、これらの CCR5-L2 に対する結合活性を確認するために ELISA を行った。ELISA は、ファージクローンのときと同様の方法で行った。その結果、ファージクローンでの ELISA の結果と同様に、scFv

は CCR5-L2 に対して結合活性を示すが、gelatin、BSA には結合せず、CCR5-L2 特異的であることが明らかとなった (図7)。

#### 7) scFv の抗 HIV-1 活性

CCR5-L2 特異的 scFv の抗 HIV-1 活性を調べるために MAGI-CCR5 細胞を用いた *in vitro* での HIV-1 感染の阻害実験を行った。HIV-1 として R5 株の Ba-L を用いた。2D7 (4 $\mu$ g/ml) と TAK-779 (1 $\mu$ M) は強い感染阻害活性を示したが、用いた CCR5-L2 特異的 scFv は 100 $\mu$ g/ml までの濃度で検討したがいずれも効果を示さなかった (図8)。

## D 考察

### CCR5-L2 を用いた実験

HIV-1 の感染阻害活性を有する抗 CCR5 抗体 2D7 が特異的に結合する合成ペプチド CCR5-L2 の合成に成功した。しかし、このペプチド自身には HIV-1 の感染を阻害することはできなかった。CCR5 の細胞外第二ループの Arg-168 から Cys-178 の構造は HIV-1 感染の重要なドメインであること、さらに Cys-178 がこの周辺の立体構造の安定化に参与している可能性が示唆されている。今回の感染実験の方法は、CCR5-L2 と HIV-1 Ba-L 株を細胞に同時に添加し、2 日間培養している。これは、CCR5-L2 に対して還元作用を与えるような条件であったために、ペプチド内の disulfide bond は開裂し、直鎖上ペプチドになった可能性がある。このように 1) CCR5-L2 のコンフォメーションが HIV-1 の感染に必要な CCR5 のコンフォメーションとは異なっている可能性、または 2) HIV-1 の感染は gp120 が trimer

で関与することが示唆されており、CCR5-L2 が monomer であり、結合親和性が低いため感染阻害活性が認められない可能性が考えられる。

また CCR5-L2 に結合する scFv ファージクローンの単離にも成功したが、このファージクローンも感染阻害活性を示さなかった (data not shown)。ファージレベルで感染阻害できないのは、CCR5-L2 のエピトープは細胞表面に存在する CCR5 分子の膜貫通部位近傍に位置するため、scFv ファージは CCR5 のエピトープ部分にまで達して結合できない可能性が考えられた。そこで、scFv ファージから可溶性 scFv を精製単離し、これを用いて感染阻害の実験を行ったが、ファージと同様に阻害活性は認められなかった。

また、HIV-1 感染に関し CCR5-L2 のコンフォメーションが CCR5 のコンフォメーションをミミックしているかどうかの可能性について検討するために、CCR5-L2 特異的抗体ファージクローンが CCR5<sup>+</sup>293 細胞に結合するかを FACS で調べた結果、結合活性は認められなかった。この結果は CCR5-L2 のコンフォメーションは CCR5 のコンフォメーションを正確に反映していない可能性を示唆している。

細胞表面パンニングで単離されたクローンについて

この手法では細胞表面に露出している CCR5 のいろいろな部位のコンフォメーションに対する抗体が単離される可能性がある。今後より多くのクローンの単離とこれらのクローンの感染阻害活性と認識エピトープの解析が期待される。2002年にMaxime Moulard らは抗体

ファージライブラリーを用いgp120-CD4-CCR5複合体に結合するFabを単離した(12)。この抗体 X5は多様なclade由来の株を $IC_{50}=16\sim 230\mu\text{g/ml}$ の濃度で強い阻害活性を示すことを報告している。この研究はヒト抗体ファージライブラリーによるエンターイーインヒビターの開発は有効な手段であることを明らかにしている。

ヒト抗体の受動免疫によるHIV-1感染阻害に関しては、結合特異性を異にする数多くのクローンの開発が重要であることより、私どものライブラリーから更に興味ある活性を有するクローンが単離されてくることを期待したい。

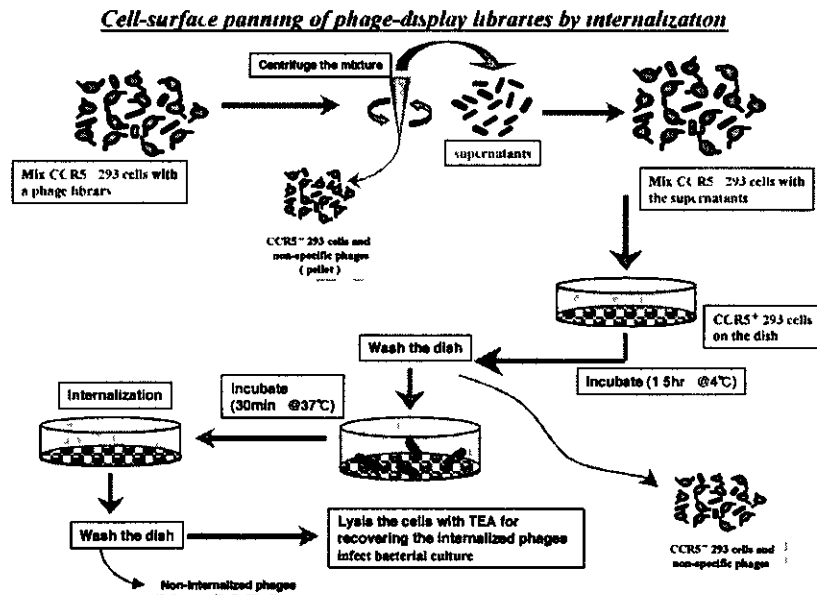
更にケモカイン受容体に対する抗体であるので、HIV-1の感染阻害の他にも、慢性炎症性疾患の治療薬としても期待できる。

#### F 参考文献

- 1 A Meta N Torigoe Y Ito R Arakaki H Nakashima and K Sugimura  
Inhibition of M-tropic HIV-1 infection by the fd phage-gene 3 protein with MIP-1 $\alpha$ -binding activity *Mol Immunol* 36 1249-1254 1999
- 2 杉村和久、伊東祐二、橋口周平、中島秀喜、中島敏博 ケモカインレセプターを介したHIV感染予防に関する研究、厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業 HIV感染予防に関する研究、平成12年度 総括 分担研究報告書 p47-59 2001
- 3 S Hashiguchi T Nakashima A Nitani, T Yoshihara K Yoshinaga Y Ito Y Maeda and K Sugimura Human Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ -Specific Human Single-Chain Fv (scFv) Antibody with Antagonistic Activity toward IgE/Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ -Binding *J Biochem* 133 1-8 2003
- 4 杉村和久、伊東祐二、橋口周平、中島敏博 ケモカインレセプターを介したHIV感染予防に関する研究、厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業 HIV感染予防に関する研究、平成13年度 総括 分担研究報告書 p69-76 2002
- 5 新村靖彦、崔学柱、橋口周平、伊東祐二、杉村和久 cell-panningを用いたCCR5に結合するヒトscFv抗体ファージクローンの探索 日本免疫学会総会 学術集会記録 第31巻 p24 2001
- 6 谷口康徳、新村靖彦、崔学柱、橋口周平、伊東祐二、杉村和久 CCR5細胞外第二ループのペプチドミミックを用いたCCR5特異的ヒト一本鎖抗体(scFv)の単離 日本免疫学会総会 学術集会記録 第32巻, p193, 2002
- 7 Tara Heitner Anne Moor, Jennifer L Garrison, Cara Marks, Tayyaba Hasan, James D Marks, Selection of cell binding and internalizing epidermal growth factor receptor antibodies from a phage display library *J Immunol Methods* 248 17-30 2001
- 8 R Gejima, K Tanaka, T Nakashima, S Hashiguchi Y Ito, K Yoshizaki and K Sugimura Human single-chain Fv (scFv) antibody specific to human IL-6 with the

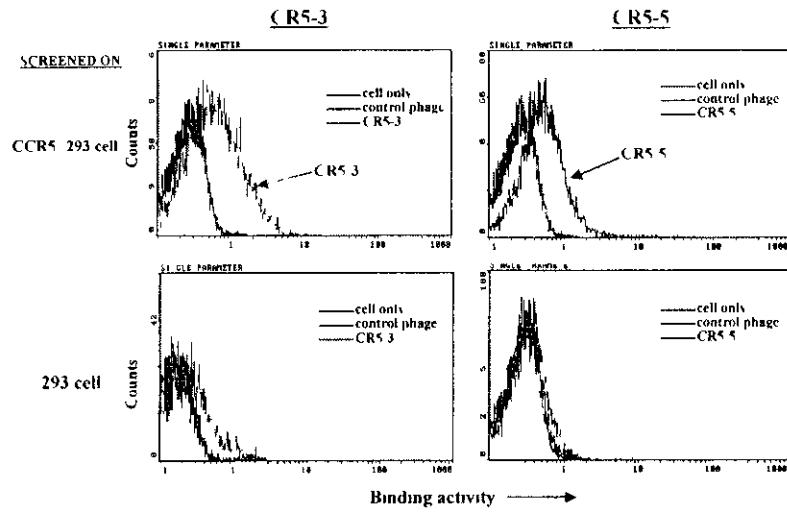
- inhibitory activity on IL-6-signaling Human Antibodies , 5, 1-9, 2003
- 9 Lee B et al , Epitope Mapping of CCR5 Reveals Multiple Conformational States and Distinct but Overlapping Structures Involved in Chemokine and Coreceptor Function J Biol Chem , 274(14), 9617-9626, 1999
- 10 杉村和久、御手洗睦和、新村靖彦、橋口周平、吉永圭介、吉満正明、伊東祐二、中島秀喜、吉崎和幸 HIV-1 エントリーインヒビターとスキン免疫、日本臨床免疫学会雑誌 23(6), 592-596, 2000
- 11 杉村和久、吉満正明、御手洗睦和、新村靖彦 HIV-1 エントリーインヒビター、臨床免疫 35(5) 594-604, 2001
- 12 Maxime Moulard et al , Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes PNAS 99, 6913-18, 2002

図 1



☒ 2

*Flow cytometric analysis*



☒ 3

*Structure of CCR5-L2 peptide*

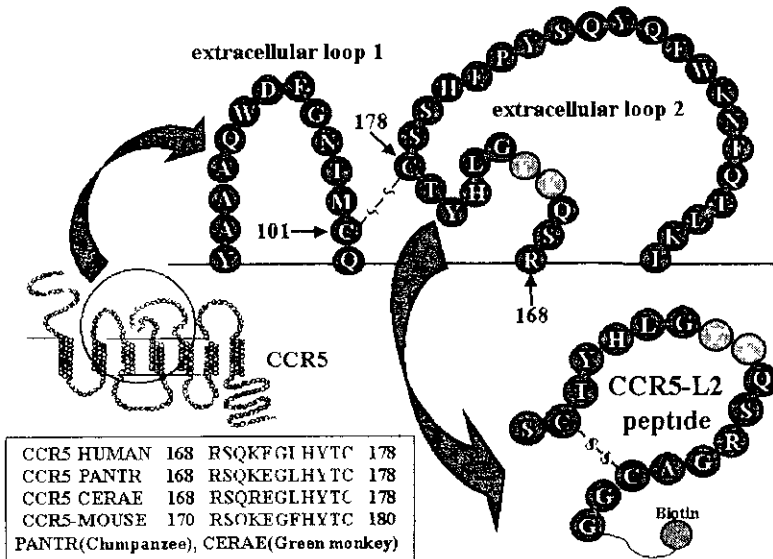
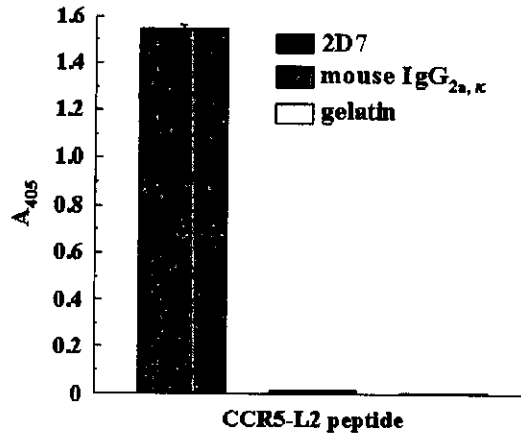


图 4

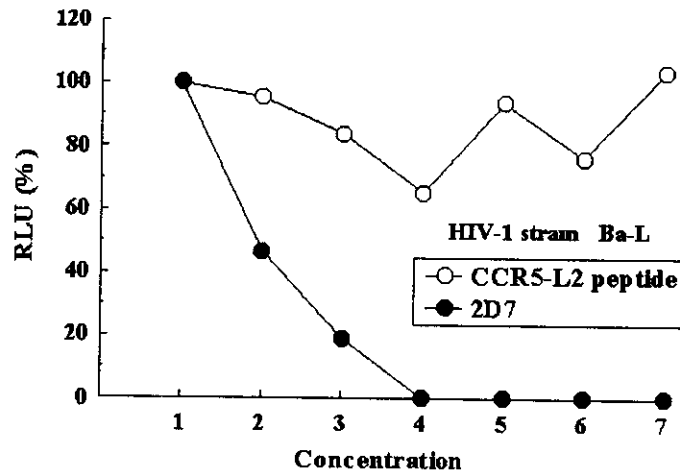
*2D7 recognize CCR5-L2 peptide*



Immuno plate was coated overnight (O/N) at 4°C with anti-CCR5 mAb (2D7, 100 ng/40 μl/well) or mouse IgG<sub>2a,κ</sub> (100 ng/40 μl/well) or mouse IgG<sub>2a,κ</sub> (100 ng/40 μl/well). The blocking was done by using 0.5% gelatin/PBS for 2 h at room temperature (RT). Then, biotinylated CCR5 L2 peptide (100 ng/40 μl/well) was added into each wells, followed by detection with alkaline phosphatase (AP)-conjugated streptavidin at a dilution of 1:1000. The absorbance was measured at 405 nm by microplate photometer.

图 5

*Inhibitory activity of CCR5-L2 peptide to HIV-1 R5 infection*

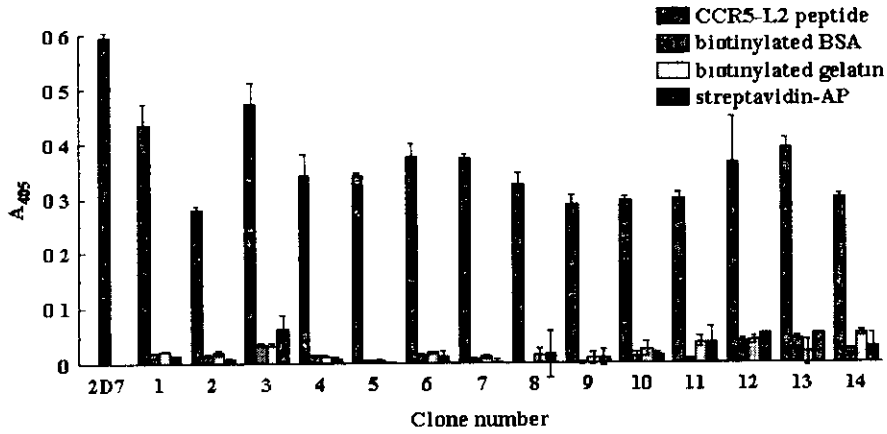


Concentration	1	2	3	4	5	6	7
CCR5-L2 peptide (μM)	0	12.5	25	50	100	200	400
2D7 (μg/ml)	0	0.125	0.25	0.5	1	2	4



图 6

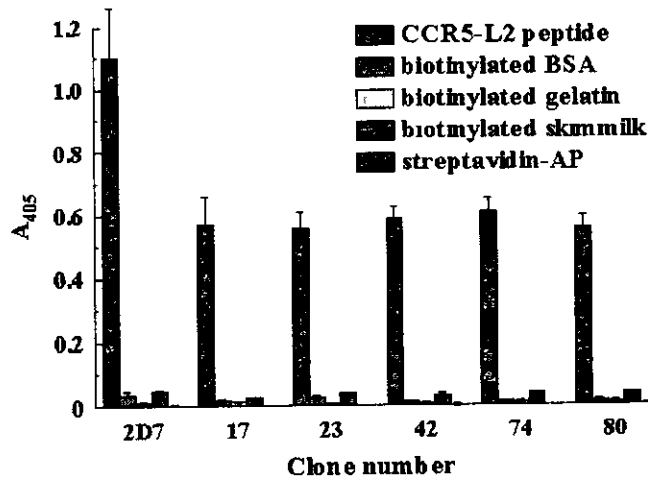
***Binding specificity of phage clones to CCR5-L2 peptide***



Immuno plates were coated O/N at 4°C with phage clones ( $1 \times 10^{12}$  virion/40  $\mu$ l/well) The blocking was done for 2 h at RT Then, biotinylated CCR5 L2 peptide, biotinylated BSA, or biotinylated gelatin (100 ng/40  $\mu$ l/well) was added into each wells, followed by detection with AP-conjugated streptavidin at a dilution of 1 1000 The absorbance was measured at 405 nm by microplate photometer

图 7

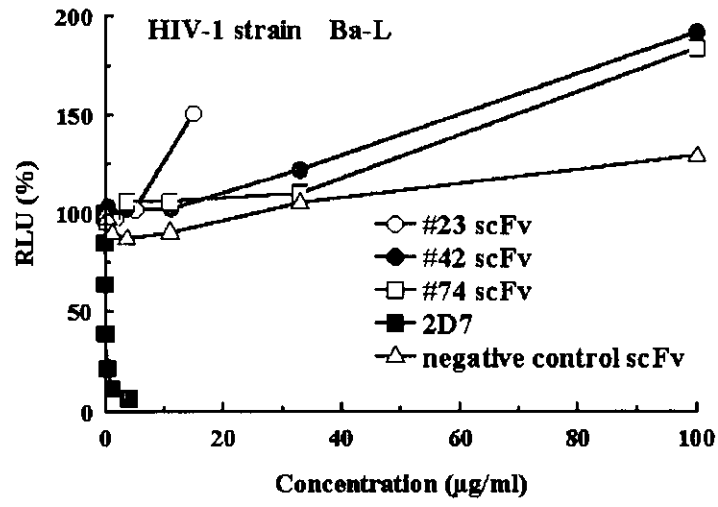
***Binding specificity of scFv to CCR5-L2 peptide***



Immuno plates were coated O/N at 4°C with scFv (250 ng/40  $\mu$ l/well) The blocking was done for 2 h at RT Then, biotinylated CCR5-L2 peptide, biotinylated BSA, biotinylated gelatin, or biotinylated skimmilk (100 ng/40  $\mu$ l/well) was added into each wells, followed by detection with AP-conjugated streptavidin at a dilution of 1 1000 The absorbance was measured at 405 nm by microplate photometer

图 8

*Inhibitory activity of scFv to HIV-1 R5 infection*



## 細胞性免疫誘導型エイズワクチンに関する研究

分担研究者 小島 直也（東海大学工学部 助教授）

共同研究者 中田 宗宏（東海大学工学部 助教授）

**研究要旨** 人工糖脂質(M5-DPPE)被覆リポソームを用いたワクチンは、人に対して毒性を示さず、封入抗原に特異的な DTH や CTL を誘導できることから、細胞性免疫の誘導が効果的であるといわれるエイズなどのウイルス感染症用のワクチンとしての期待が高まっている。しかし、その作用機序については未だ明らかではない。また、実際に人工糖脂質被覆リポソームを用いたワクチンか、その感染防御に細胞性免疫の誘導を必要とする感染症において感染防御効果があるかどうかについても不明な点が多い。そこで本年度の研究では、エイズウイルスなどと同様に細胞性免疫の誘導かその感染防御に必要であると云われている原虫 *Leishmania major* の BALB/c マウスへの感染系を用いて、人工糖脂質被覆リポソームを用いたワクチンの感染防御効果を明らかにするとともに、このリポソームにおける免疫により Th1 応答が誘起されるかどうかを検討した。

その結果、*L. major* の可溶性タンパク質 (SLA) を抗原として封入した M5-DPPE 被覆リポソームを接種した BALB/c マウスにおいては、免疫していないマウスあるいは M5-DPPE で被覆していないリポソームで免疫したマウスに比べ、感染局所の腫脹が著しく抑制された。また感染局所の直近にあるリンパ節内の原虫数も、M5-DPPE 被覆リポソームを接種した BALB/c マウスにおいてのみ著しく減少していることが確かめられた。従って、M5-DPPE 被覆リポソームからなるワクチンには、細胞性免疫を必要とするような感染症に対して防御効果があることが確かめられた。また、M5-DPPE 被覆リポソームを接種したマウスにおいてのみ脾細胞での抗原特異的な IFN- $\gamma$  の分泌および血清中の IgG2a 抗体の増加が認められた。さらに感染後に脾細胞における抗原特異的な IFN- $\gamma$  の分泌量は上昇した。このことから M5-DPPE 被覆リポソームによる免疫で BALB/c マウスは Th1 にマウントされたと考えられた。

そこで M5-DPPE 被覆リポソームの作用機序を明らかにするために、腹腔内に蛍光タンパク質を封入した M5-DPPE 被覆リポソームを投与し腹腔内細胞を回収後、解析をしたところ、蛍光タンパク質は CD11c 陽性細胞に特異的にしかも素早く取り込まれていることが判明した。このような特異的で素早い取り込みは M5-DPPE で被覆していないリポソームでは見られなかったことから、M5-DPPE 被覆リポソームは生体内においても選択的にその封入抗原を樹状細胞 単球系細胞に移入させていることが明らかとなった。

### A. 研究目的

最近、エイズウイルス(HIV)の感染防御や HIV 感染者の病態制御において細胞性免疫を誘導するようなワクチンの開発の重要性が指摘されている。また、

HIV のタンパク質あるいはその部分ペプチドはアンユハントとともに投与しないと細胞性免疫を誘導できないことも知られている。しかし 効果的な細胞性免疫誘導能をもち、ヒトに対して毒性が少なく安

全なアヌハントは現在見あたらない。

我々は、オリコマンノースを導入した人工糖脂質 (M5-DPPE) で被覆したリポソームかそのリポソーム中に封入されたタンパク質抗原またはペプチド抗原に特異的な DTH や MHC-Class I 拘束性 CTL を強く誘導するアヌハント活性を持っていることを示してきた。また、通常の免疫に用いる 100 倍量の M5-DPPE または M5-DPPE 被覆リポソームをカンキサイルの胸部皮下に投与しても、接種部位、体温、血算および末梢血リンパ球数などに目立った変化は観察されず、M5-DPPE 自体にもそれを被覆したリポソームにも抗原性や毒性が全く認められないことが確認された。これらの結果は、強力な細胞性免疫誘導アヌハント活性を有する M5-DPPE 被覆リポソームかヒトに対しても安全に使用できる有効なアヌハントであり、M5-DPPE 被覆リポソームを用いることで、人に使用できる細胞性免疫誘導型のワクチン開発が可能であることを示唆している。しかし、現時点で M5-DPPE 被覆リポソームか実際の感染症を細胞性免疫誘導によって防御するかどうかについては明らかではなかった。

そこで本研究においては、まず M5-DPPE 被覆リポソームが細胞性免疫を誘導することによって感染症を防御することかできるかどうかを *L major* 感染系を用いて明らかにすることを目的とした。*L major* は単球・マクロファージ系の細胞内に寄生する原虫である。BALB/c マウスでは *L major* による感染により Th2 応答が誘導され、それゆえに感染マウスでは原虫が排除されずに死に至る。一方、C57BL/6 マウスでは同じ原虫による感染でも Th1 応答が誘導されるため、細胞性免疫により感染マウスから原虫は排除され最終的には生存する。従って、*L major* による感染で抗原封入 M5-DPPE 被覆リポソームの接種により BALB/c マウスが生存するようになれば、それは Th1 応答が誘導された結果であると考えることができる。

一方、なぜ M5-DPPE 被覆リポソームが細胞性免疫を誘導できるのかといった分子機序についても未だ不明な点か数多くある。我々はこれまで腹腔マク

ロファージを用いて M5-DPPE 被覆リポソームのマクロファージへの取り込みを検討してきた。しかし、細胞性免疫誘導の作用機序を理解するには樹状細胞への M5-DPPE 被覆リポソームの取り込みを検討する必要がある。そこで本研究では、骨髄細胞より分化誘導した樹状細胞への M5-DPPE 被覆リポソームの取り込みを検討し、生体内においても樹状細胞を含む抗原提示細胞に特異的に M5-DPPE 被覆リポソーム内に封入された抗原が取り込まれていることを明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1 人工糖脂質の作製

マンノペンタオース(M5)およびマンノトリオース(M3)とノパルミトイルホスファチンルエタノールアミン(DPPE)を還元アミノ化反応で化学的に結合させ M5-DPPE および M3-DPPE を合成した。合成した人工糖脂質は HPLC を用い高純度に精製した。

### 2 人工糖脂質被覆リポソームの作製

*L major* を大量に培養し、その後凍結融解および超音波により破碎した。この破碎液の 100,000 x g 上清 (Soluble Leishmanial Antigen, SLA) を抗原として用いた。抗原ペプチド封入リポソームは、ノパルミトイルホスファチンルコリン(DPPC)、コレステロールおよび人工糖脂質 (M5-DPPE または M3-DPPE) を 1:1:0:1 で混合したものをを用いて脂質フィルムを作製し、次いでホルテノクスミキサーを用いて抗原を封入した人工糖脂質被覆リポソームを作製した。この際、リポソームに封入されていない可溶性の抗原は遠心により可能な限り取り除いた。さらにこのリポソームの粒径を 1  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて整え、免疫に用いた。封入タンパク質量はタンパク質定量により、またリポソームの脂質組成比は HPLC によって定量した。

### 3 人工糖脂質被覆リポソームによる *L major* 感染防御効果の解析

作製した抗原封入糖鎖被覆リポソームおよび糖鎖を

被覆していないリポソームをワクチンとして用いて、BALB/c マウスに 3  $\mu$ g の抗原を含むワクチンで腹腔内に一回免疫をした。一週間後に同様の免疫操作を行った後、さらに一週間後に  $5 \times 10^5$  の原虫を footpad に投与し、その後 footpad の腫脹を経時的に測定した。このとき、C57BL/6 マウスに対しても同様に原虫を投与し、免疫した BALB/c マウスと比較した。また、感染前及び感染後 4 週目および 6 週目にマウスより採血後、脾臓細胞を調製し、血清中の抗体価および脾細胞の抗原特異的 IFN- $\gamma$  および IL-4 の産生能を検討した。

#### 4 リポソームの樹状細胞への取り込みの解析

骨髄細胞より常法により樹状細胞を分化誘導した。一方、磁性鉄粒子を封入した人工糖脂質被覆および未被覆のリポソームを作製した。分化誘導した樹状細胞とリポソームを混合し、経時的に樹状細胞を回収し細胞中の鉄を定量することで、リポソームの樹状細胞への取り込みを検討した。

一方、生体内において実際に人工糖脂質被覆リポソームが標的細胞と考えられる抗原提示細胞（樹状細胞あるいはマクロファージ）に特異的にターゲティングされているかを検討するために、蛍光タンパク質を封入した人工糖脂質被覆リポソームを作成し、これを腹腔内に投与し、一定時間後腹腔内細胞を回収した。回収した細胞を F4/80 抗体あるいは抗 CD11c 抗体で染色し、FACS を用いて解析した。

### C 研究結果

#### 1 M5-DPPE 被覆リポソームによる *L. major* 感染防御効果

*L. major* の可溶性タンパク質を抗原として封入した M5-DPPE 被覆リポソームおよび M5-DPPE で被覆していないリポソームを作製し、これをワクチンとして用いて BALB/c マウスに腹腔経由で免疫をした。1 週間後に同様に免疫を行い、その 1 週間後に *L. major* を footpad に投与して footpad の腫脹を経時的に測定することで経過観察を行い、人工糖脂質アンジュハントの感染抑制効果を調べた。その結果、

抗原タンパク質のみを接種したマウスでは非免疫マウスの場合と同様に footpad の腫脹は経時的に増加した（感染後 6 週で約 4 mm）。また、M5-DPPE で被覆していないリポソームを接種した群では非免疫マウス群に比へ若干腫脹が軽度であったか、腫脹は経時的に増加した（感染後 6 週で約 3 mm）。一方、抗原封入 M5-DPPE 被覆リポソームを接種した群では footpad の腫脹は著しく抑制され、感染後 6 週で約 1 mm 以内にとどまった（図 1）。この腫脹は *L. major* の感染に対し抵抗性を示す C57BL/6 マウスと同程度であった。そこで感染局所直近のリンパ節を感染後 6 週のマウスから摘出し、培養しリンパ節中の原虫を限界希釈法で定量した。その結果、M5-DPPE 被覆リポソームを接種した群では原虫の量か他の群に比へ約 1/100 であった（図 2）。これらの事実は、糖鎖被覆リポソームを用いて免疫すると、1 週間後に行う原虫の大量投与で感染は成立するか、その後の原虫のリンパ節への侵入が防御されており、感染症の発症は抑制されていることを意味している。

#### 2 抗原封入 M5-DPPE 被覆リポソームによる Th1 応答の誘導

以上の原虫感染症の発症防御は C57BL/6 マウスでは自然に起こるか、これはマウスが *L. major* の感染に対して Th1 応答を示すためであるといわれている。一方 BALB/c マウスでは同じ原虫に対して Th2 応答を示すため、重篤な感染症を発症し、死にいたると考えられている。そこで抗原封入 M5-DPPE 被覆リポソームを接種した BALB/c マウスにおける原虫感染症の発症防御効果か、M5-DPPE 被覆リポソームによる Th1 応答の誘導によるものかを検討した。まず、感染防御実験の場合と同様の手順で腹腔内に抗原封入 M5-DPPE 被覆リポソームを 1 週おきに 2 回接種し、最初の免疫から 2 週間感染前に脾臓を取り出し、脾細胞の抗原特異的なサイトカインの産生能を検討した。その結果、抗原のみを接種したものや M5-DPPE で被覆していない抗原封入リポソームを接種した群では IFN- $\gamma$  の産生量はバックグラウンドレベルであったか、M5-DPPE 被覆抗原封入リポソ

ームを接種した群では IFN- $\gamma$  の産生量が極めて高いレベルを示した。一方、IL-4 の産生量は抗原のみを接種した群とほぼ同してあった (図 3)。

そこで、感染後 6 週のマウス脾細胞の抗原特異的なサイトカインの産生能を検討したところ、人工糖脂質で被覆していないリポソームを接種した群では免疫をしていないマウスと同じように相対的に IL 4 の産生が優勢であった。通常 BALB/c マウスはこの原虫の感染により Th2 応答を示すことが知られているので、人工糖脂質で被覆していないリポソームを接種した群においても非免疫群と同様に感染後 Th2 応答を示し、その結果として非免疫群と同様の経過をたどったと考えられた。それに対し M5-DPPE 被覆抗原封入リポソームを接種した群は人工糖脂質で被覆していないリポソームを接種した群や免疫をしていないマウスに比べると IFN- $\gamma$  の産生量が有意に高く、また IL-4 の産生量は有意に低い値を示した。さらに、感染後 6 週のマウス血清の IgG 抗体のサブクラスを検討したところ、M5-DPPE 被覆抗原封入リポソームを接種した群では他の群に比べ IgG2a の抗体価が有意に高く、IgG1 の抗体価が有意に低かった (図 4)。興味深いことに M5-DPPE 被覆抗原封入リポソームを接種した感染後 6 週後 BALB/c マウスの脾細胞の IFN- $\gamma$  および IL-4 の産生量は、Th1 応答を誘導することで *L major* の感染に対し抵抗性を示す C57BL/6 マウスとほぼ同してあった。以上の結果から、M5-DPPE 被覆抗原封入リポソームを接種することで BALB/c マウスに Th1 応答が誘導され、感染後も Th1 応答が維持されることで、感染症の発症が防御されたと考えられる。

### 3 M3-DPPE 被覆リポソームによる *L major* 感染防御効果

これまで M5-DPPE 被覆抗原封入リポソームを免疫に用いていたか、M5-DPPE は有機溶媒への溶解性が低く、これがリポソームを作製するときの問題点であった。そこで溶解性の高い M3-DPPE を用いて同様の効果が得られるかどうかを検討した。その結果、抗原を封入した M3-DPPE 被覆リポソームを

接種したマウスは M5-DPPE 被覆リポソームの場合と同様に *L major* 感染防御効果を示し、また有意な IFN- $\gamma$  の産生も認められた。従って、M3-DPPE 被覆リポソームを用いても Th1 応答を誘導することか可能であることが判明した。

### 4 樹状細胞への人工糖脂質被覆リポソームの取り込み

オリゴマンノースで被覆した抗原封入リポソームが Th1 応答を誘導する作用機序を明らかにするために、抗原提示細胞へのリポソームの取り込みを検討した。これまで腹腔マクロファージを単離し、これへの取り込みを検討したところマンノースレセプターに依存した取り込みが認められている。しかし、Th1 応答に主導的な役割を果たす樹状細胞に実際にオリゴマンノースで被覆した抗原封入リポソームが取り込まれ抗原提示をするかどうかは不明である。また、腹腔あるいは皮下に接種した場合、これらオリゴマンノースで被覆した抗原封入リポソームがどのような細胞に取り込まれるかといったことも未だ分かっていない。

そこでまず、骨髄細胞から分化誘導した樹状細胞を用いて磁性鉄粒子を封入したオリゴマンノース被覆リポソームによる鉄粒子の取り込みを検討した。その結果、オリゴマンノース被覆リポソームを用いた場合、被覆していないリポソームに比べ鉄粒子の樹状細胞への取り込みが増加していた (図 5)。未成熟な樹状細胞にはマンノースレセプターが発現していることが知られていることから、オリゴマンノース被覆リポソームはこのレセプターを介して樹状細胞内に取り込まれていると考えられた。

次に、腹腔内あるいは皮下にこのオリゴマンノース被覆リポソームを投与した場合に樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞のみに取り込まれるのかを検討した。蛍光標識した BSA を封入したリポソームを腹腔内に投与し、30 分後に腹腔より細胞を回収し、抗 CD11c 抗体および F4/80 抗体で細胞を染色し FACS を用いて解析したところ、M5-DPPE 被覆リポソームおよび M3-DPPE 被覆リポソームを用いた

場合 CD11c 陽性細胞の約 60% また F4/80 陽性細胞の 90% に蛍光標識した BSA の取り込みが見られた。一方糖鎖を被覆していないリポソームではその取り込みは 5% 程度であった (図 6)。また、CD11c や F4/80 が陰性の細胞にはほとんど取り込みが見られなかった。この結果は、オリゴマンノース被覆リポソームを実際に生体に投与した場合にも、リポソームが特定の細胞群 (特に CD11c 陽性細胞) に対し特異的にリポソームに封入されたタンパク質などを移入することかできることを示している。

また、リポソームの腹腔への投与から細胞の回収までの時間を変化させて取り込みを検討したか、投与後 15 分てはばすへて (60-80%) の CD11c 陽性細胞に取り込まれていることから、生体内でのオリゴマンノース被覆リポソームの CD11c 陽性細胞へのターゲットニングはきわめて特異的かつ素早く起こっていることか分かった。

#### D 考察

本研究では、これまで細胞性免疫を誘導しヒトに使用できる有効なアニューハントである M5-DPPE 被覆リポソームか実際の感染症に対して防御効果を持つかどうかを、BALB/c マウスへの *L major* の感染系をモデルとして検討した。その結果、SLA を抗原として封入した M5-DPPE 被覆リポソームを接種した群は、糖鎖未被覆のリポソームや抗原のみを接種した群と比へ、感染局所 (footpad) の腫脹か著しく抑制されており、かつ感染局所直近のリンパ節中の原虫数も顕著に少なかった。また、感染後 6 週の M5-DPPE 被覆リポソームを接種したマウス血清中の IgG2a 抗体価はそのほかの群のマウス血清中のそれと比較し有意に高く、IgG1 抗体価は有意に低くなっていた。さらに脾細胞の抗原特異的な IFN- $\gamma$  の産生は他の群と比へて非常に高く、その産生量は *L major* の感染に Th1 応答を誘導し抵抗性を示す C57BL/6 マウスの感染 6 週後の産生量と同してあった。これらの結果から、抗原を封入した M5-DPPE 被覆リポソームを接種することにより BALB/c マウスに抗原特異的な Th1 応答か誘導され、その結果と

して *L major* の感染か防御されたと考えられた。特に、M5-DPPE 被覆リポソームの接種により封入された抗原特異的な IFN- $\gamma$  の産生か見られたことは、リポソームの接種により Th1 応答か誘導されていることを示しているものと考えられる。また本研究では原虫の感染系を用いたか、M5-DPPE 被覆リポソームか Th1 応答を誘導することかできることから、Th1 応答か感染の予防や治療に必要なエイスを含む感染症全般に用いることか可能であると思われる。

さらに本研究では、M5-DPPE 被覆リポソームを腹腔内に投与すると、リポソーム内に封入されたタンパク質はきわめて特異的にかつ素早く腹腔内の CD11c 陽性細胞に取り込まれていることか確かめられた。CD11c は単球・樹状細胞のマーカーであるので、腹腔内のこれら未熟な抗原提示細胞に発現しているマンノースレセプターを介して細胞に特異的にリポソーム内に封入された抗原か取り込まれることか、Th1 応答誘導ならびに感染防御の第一段階であることか確かめられた。

#### E. 結論

本研究て実際の感染症の発症予防に M5-DPPE 被覆リポソームによるワクチンか効果的であること、またこのワクチンの感染防御の機序か、おそらく樹状細胞への抗原の特異的て素早い移入と Th1 応答の誘導によるものであることを BALB/c マウスへの *L major* の感染系を用いて示した。M5-DPPE 被覆リポソームはヒトに対して毒性や抗原性を示さず、DTH を指標とした細胞性免疫誘導能を有することから、ヒトに用いることのできる数少ない安全な細胞性免疫誘導可能なアニューハントとしての期待か高いか、今回の研究結果はこれまでの研究成果を具体的に裏付けるものであり、M5-DPPE 被覆リポソームをエイスワクチン用アニューハントとしての応用可能性を示す重要な成果であるといえる。

#### F 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) 里田泰弘、小島直也 (2002) 慢性関節リウマチに

における IgG 糖鎖構造異常の病因的意義 生化学  
74 巻第 11 号 1363-1368

- 2) Shimizu, Y, Yamakami, K, Gomi, T, Nakata, M, Asanuma, H, Tadakuma, T and **Kojima, N** (2002) Protection against *Leishmania major* infection by oligomannose-coated liposomes *Bioorg & Med Chem*, in press
  - 3) Kuroda, Y, Nakata, M, Makino, A, Matsumoto, A, Ohashi, K, Itahashi, K, Takeuchi F, Goto, M, **Kojima, N.**, and Mizuochi, T Structural studies on IgG oligosaccharides of patients with primary Sjogren's syndrome *Glycoconjugate J*, in press
  - 4) Tang, T, Nakata, M, Komishi, T, **Kojima, N.**, Mizuochi, T, & Makuuchi, M (2002) Association of histochemical expression of *Maackia amurensis* leucoaggrutin-positive glycoconjugates with behavior of human gastric cancer *Histopathology*, in press
  - 5) Kanamori, A, **Kojima, N.**, Uchimura, K, Muramatsu, T, Tamatani, T, Berndt, M C, Kansas, G S, & Kanangi R (2002) Distinct sulfation requirements of selectins disclosed using cells which support rolling mediated by all three selectins under shear flow L-selectin prefers carbohydrate 6-sulfation of tyrosine sulfation whereas P-selectin does not *J Biol Chem*, **277**, 32578-32586
  - 6) **Kojima, N**, Seino, K, Sato, Y, & Mizuochi, T (2002) Carbohydrate carriers affect adhesion of *H pylori* to immobilized Le<sup>b</sup>-oligosaccharide *FEBS Lett*, **517**, 32-36
  - 7) Kuroki, A, Kuroda, Y, Kikuchi, S, Lajaunas, F, Fulpius, T, Pastore, V, Liliane Fossati-Jimack, L, Reininger, L, Toda, T, Nakata, M, **Kojima, N**, Mizuochi, T, & Izui, S (2002) Level of Galactosylation Determines Cryoglobulin Activity of Murine IgG3 Monoclonal Rheumatoid Factor *Blood* **99**, 2922-2928
  - 8) Yu, S, **Kojima, N.**, Hakomori, S I, Kudo, S, Inoue, S, Inoue, Y (2002) Binding of rainbow trout sperm to egg is mediated by strong carbohydrate-to-carbohydrate interaction between (KDN)GM3 (deaminated neuraminyl ganglioside) and Gg3-like epitope *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 2854-2859
- 2 学会発表
- 1) 馬場一晃、鈴木崇士、黒田泰弘、中田宗宏、小島直也 リウマチ性関節炎の発症におけるカラクトース欠損 IgG の病因的意義、第 75 回日本生化学会大会（京都）2002 年 10 月
  - 2) 氏原大典、黒田泰弘、戸田東鵬、中田宗宏、小島直也、竹内二士夫 リウマチ患者血清 IgG 型リウマトイト因子の反応性とカラクトース欠損、第 75 回日本生化学会大会（京都）2002 年 10 月
  - 3) 中村彰浩、佐藤好亜、小島直也 糖鎖キャリアの違いによる *Helicobacter pylori* の Le<sup>b</sup>糖鎖への接着性の検討 第 75 回日本生化学会大会（京都）2002 年 10 月
  - 4) 清水佳隆、五味隆生、山上和夫、多田隈卓史、Biao Le、浅沼秀樹、中田宗宏、小島直也 人工糖脂質被覆リポソームワクチンによる *Leishmania major* の感染防御、第 75 回日本生化学会大会（京都）2002 年 10 月
  - 5) **N. Kojima** Affinity of *H pylori* adhesion to Le<sup>b</sup>-oligoasscharide depends on the carbohydrate carriers XVII International Symposium on Glycoconjugates, Bangalore, India, Jan 2003
  - 6) Y Shimizu, K Yamakami, T Tadakuma, **N. Kojima** Protection of *Leishmania major* infection by immunization with oligomannose-coated liposome XVII International Symposium on Glycoconjugates, Bangalore, India, Jan 2003
- G. 知的所有権の申請・取得状況  
特になし



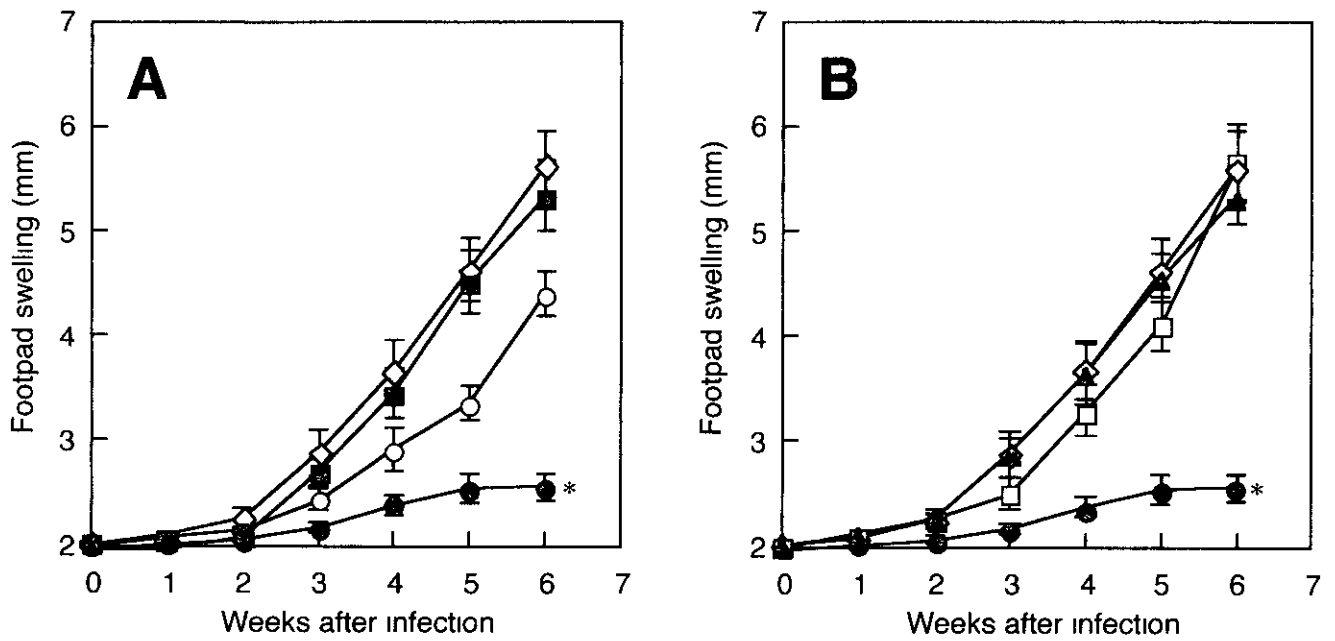


図1 M5-DPPE 被覆リポソームによる *L major* の感染防御  
 一群6匹の BALB/c マウスを M5-DPPE-coated SLA-liposomes (●), uncoated SLA-liposomes (○), SLA (◇), M5-DPPE-coated PBS-liposomes (□), M5-DPPE-coated PBS-liposomes plus SLA (▲), or PBS (■) で免疫後、*L major* をチャレンシ、footpad の腫脹を測定した。

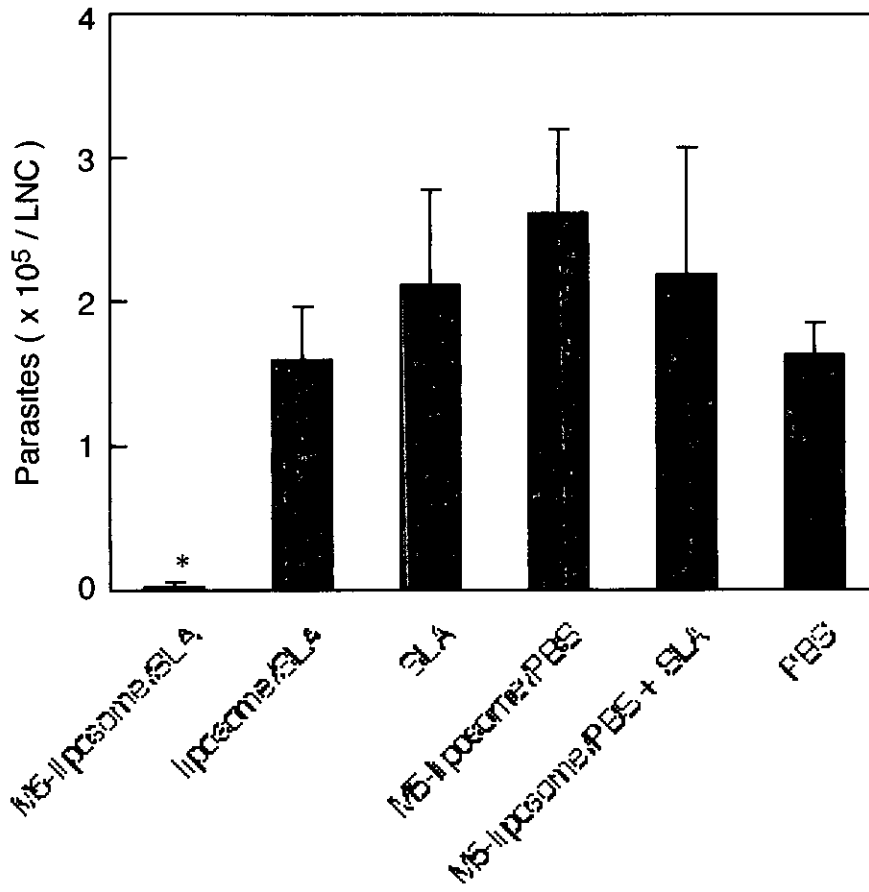


図2 リンパ節内の原虫数

感染後 6 週目に、免疫したマウスからリンパ節を取り出し、その中の原虫数を限界希釈法で定量した。

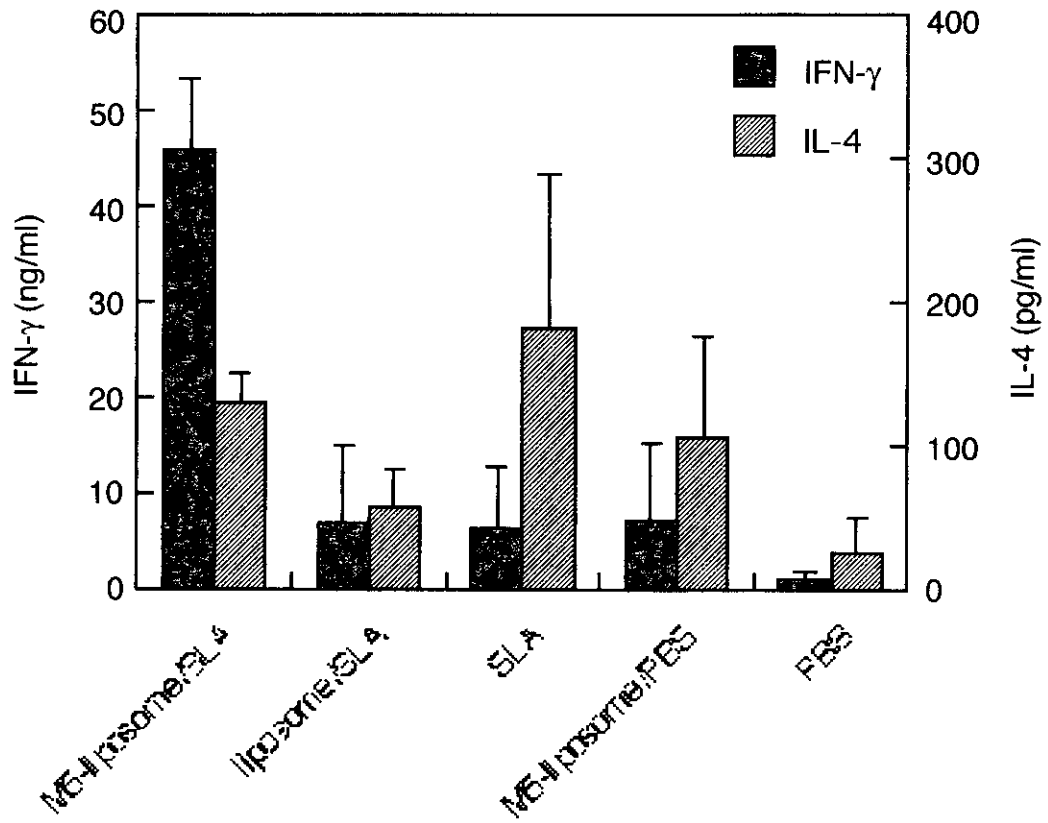


図3 免疫マウス脾臓細胞の IFN- $\gamma$  と IL-4 の産生

最終免疫より 7 日後、免疫マウスより脾細胞を調製し、抗原特異的な IFN- $\gamma$  と IL-4 の産生能を ELISA 法で定量した。

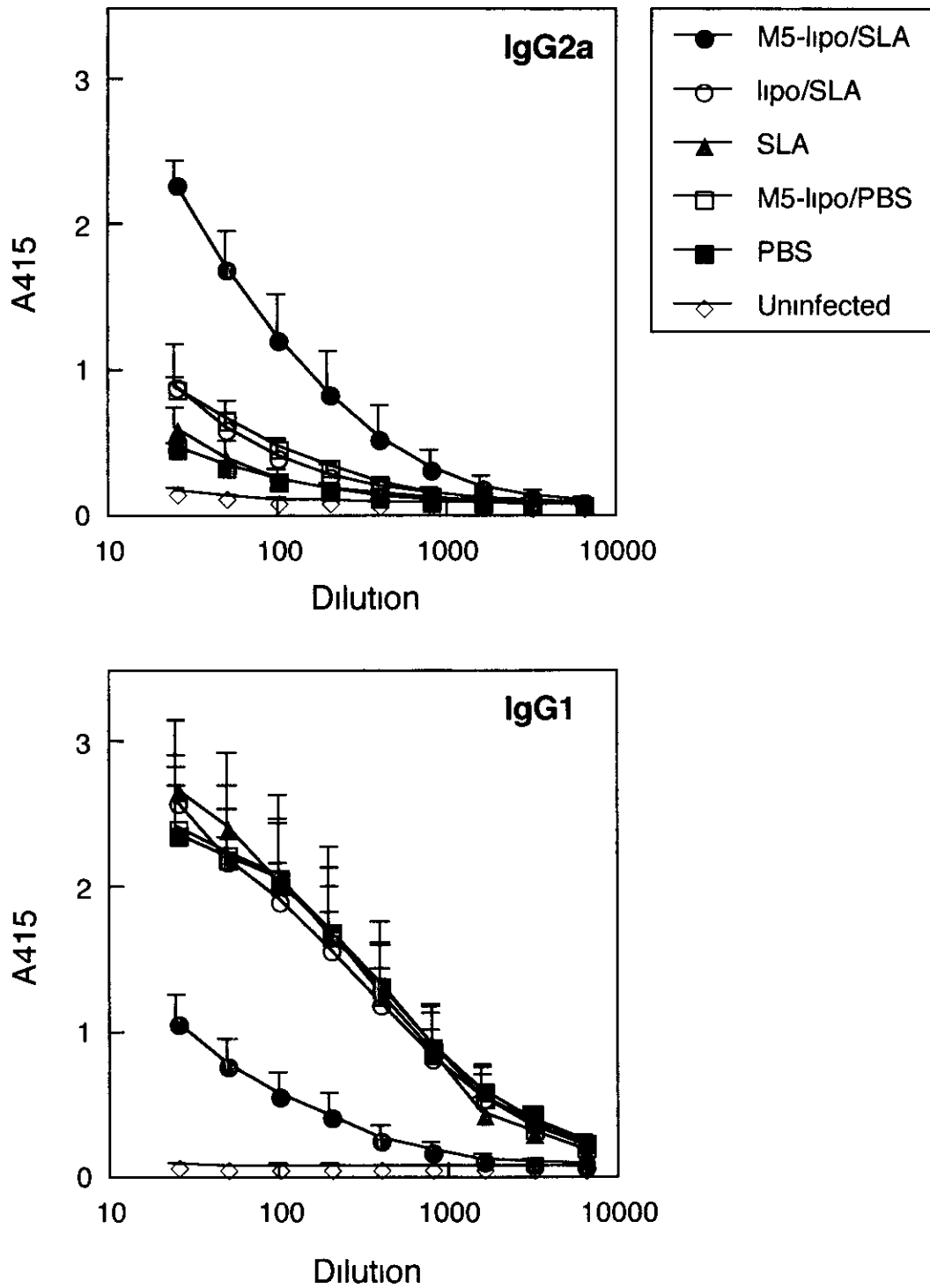


図4 感染マウス血清中のIgG1およびIgG2a抗体価  
 感染後6週のマウス血清のSLAに対する抗体価をELISA法で測定した。