

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 血液・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 | 木庭 守 |
| (4) 滋賀医科大学病理学第二講座 | 小笠原 一誠 |
| (5) 東邦大学医学部免疫学講座 | 垣内 史堂 |

要旨

本年度は抗原提供細胞におけるリポソーム結合抗原の細胞内動態、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、リコンビナント HBs 抗原投与後のサルにおける抗 HBs 抗体産生、スギ花粉抗原(SBP)-リポソーム結合物二次免疫後のサルにおける抗 SBP 抗体産生、腫瘍関連抗原ペプチドを用いた腫瘍拒絶へのリポソームの応用、等の検討を行った。

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ギー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. 抗原提供細胞におけるリポソーム結合抗原の細胞内動態の検討：これまでの検討の結果、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観察され、リポソームの膜流動性とアジュバント効果と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、クローン化マクロファージハイブリドーマの培養中に蛍光ラベル

した抗原(OVA, SIGMA grade VII)とリポソームとの結合物を添加し、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。脂質組成が異なり、アジュバント能の著しく異なる2種類のリポソーム (“Oleoyl”および“Stearoyl”) を蛍光標識した OVA、または食細胞内で消化を受けると蛍光を発する OVA (DQ-OVA™)と結合させ、マクロファージによる貪食を FACS および共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察した。さらに、OVA-リポソーム結合物とともに培養したマクロファージによる T 細胞 (OVA 特異的 T 細胞クローン 42-6A) への抗原提供とリポソームの脂質組成との関係について検討を行った。

b. 抗原-リポソーム結合物経口前投与がマウスの抗体産生に及ぼす影響の検討：OVA-リポソーム (OVA 0.5 mg in 10 mg lipid/ml, 0.5 ml at a time/mouse)あるいは OVA 溶液(OVA 0.5 m/ml in PBS, 0.5 ml at a time/mouse)を2週にわたって経口投与した後、OVA-alum (OVA 2 µg in 0.5 mg alum, 0.2 ml i.p./mouse)で免疫を行ったときの抗体産生を、アジュバント機能の異なるリポソーム (“Oleoyl”および“Stearoyl”) を用いて比較検討した。

c. リコンビナント HBs 抗原-リポソーム結合物免疫後のカニクイザルにおける抗 HBs 抗体産生の検討：化血研製リコンビナント HBs (lot. YB9911, 520 µg/ml)を使用し、HBs-リポソーム結合物を作製した。カニクイザルに HBs-リポソーム結合物 (10 mg lipid/ml, 0.5 ml/kg)あるいはアルミニウム沈降 HBs (HBs 32 mg in 9 mg alum/ml, 0.5 ml/kg)を0, 4, 8週の3回免疫し、異なるアジュバントを用いて免疫したときの抗 HBs IgG および IgE 抗体産生を比較検討した。

d. スギ花粉抗原(SBP)-リポソーム結合物投与後のブタオザルにおける抗 SBP 抗体産生の検討：林原製 SBP 抗原 (lot. 102, 3 mg/ml)を使用し、SBP-リポソーム結合物を作製した。SBP-alum (SBP 50 µg in 9 mg alum/ml, 0.2 ml/kg)免疫によって SBP 特異的 IgG および IgE 抗体を誘導したブタオザルに SBP-リポソーム結合物 (10 mg lipid/ml, 0.2 mg/kg)を二次免疫し、抗原特異的 IgG および IgE 抗体産生を検討した。

e. 腫瘍関連抗原ペプチド-リポソームによる腫瘍特異的 CTL 誘導の試み：細胞表面上の MHC クラス I 分子に特異的に結合している腫瘍関連抗原(TAA)ペプチドが次々に同定されているが、外からペプチドを投与しても MHC クラス I 分子による CTL への抗原提示は困難である。そこで、リポソームに TAA ペプチドを内包させ、抗 CD40 抗体と同時にマウス皮下に投与することにより腫瘍特異的 CTL の誘導を試み、さらにこの CTL が生体内で腫瘍を拒絶できるか否かについて検討した。また、生体内で CTL の作用を抑制する因子として TGF-βを想定し、これを中和するとどうなるかについて検討した。

3. 研究成果

a. 抗原提供細胞におけるリポソーム結合抗原の細胞内動態の検討：株化マクロファージの培養中に蛍光ラベルした OVA とリポソームとの結合物を添加して 60 分間培養の後、マクロファージを回収して蛍光強度を FACS および共焦点蛍光顕微鏡を用いて検討を行ったところ、アジュバント効果のより高い“Oleoyl”リポソームと結合した OVA はアジュバント効果の劣る“Stearoyl”リポソームと結合した OVA と比較して同一時間内により効率よくマクロファージに取り込まれることが観察された (図-1)。DQ-OVA とリポソームとの結合物を用いた検討においても、“Oleoyl”リポソームと結合した OVA は“Stearoyl”リポソームと結合した OVA と比較してマクロファージ細胞内で同一時間内により高効率に消化されることが観察された (図-2)。マクロファージを OVA-リポソームとともに

に培養した後、OVA 特異的 T 細胞クローンに対する抗原提供を検討した結果も上記の結果と一致し、“Oleoyl”リポソームと OVA との結合物をマクロファージの培養中に添加したとき、“Stearoyl”リポソームを用いた場合と比較してより高効率に T 細胞に抗原提供された。リポソームに結合したと同量の OVA (32 $\mu\text{g/ml}$)を溶液状にてマクロファージの培養中に添加した際には、OVA-リポソームのかたちで添加したときと比較してはるかに抗原提供の効率が低く、“Oleoyl”リポソームによる抗原提示の効率は溶液状の OVA を 800 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で培養中に添加したときに匹敵した (図-3)。

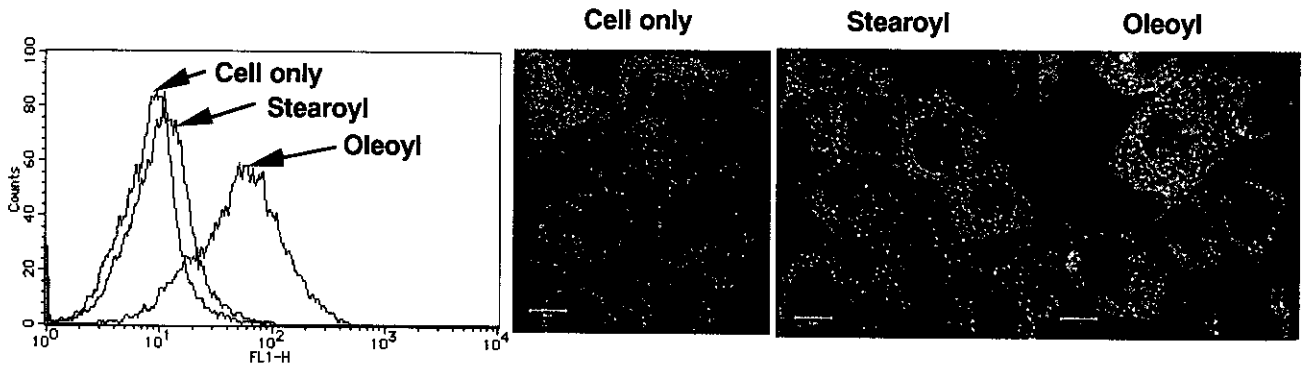


図-1 : マクロファージによる OVA-リポソーム結合物の取り込み
FACS (左) および共焦点蛍光顕微鏡像 (右)

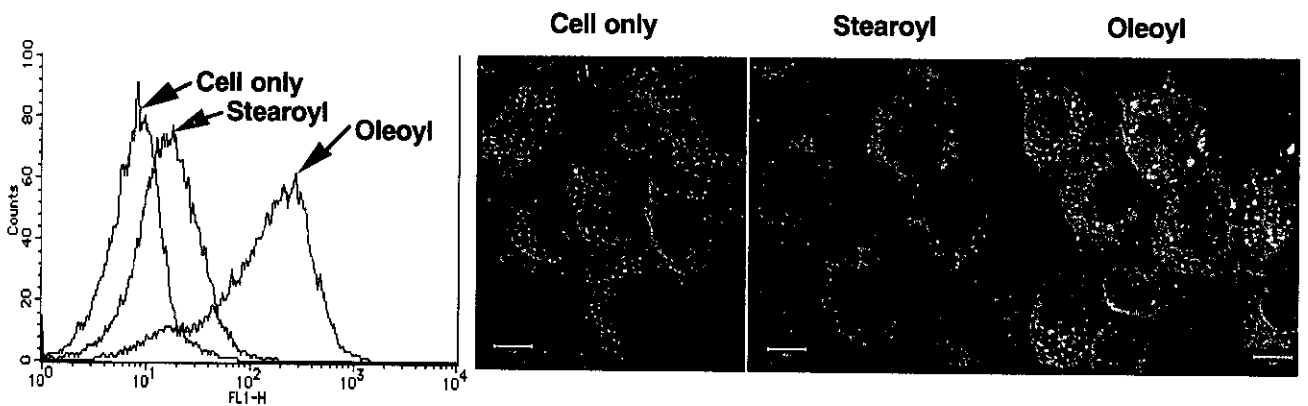


図-2 : マクロファージによるリポソーム結合 OVA の分解
FACS (左) および共焦点蛍光顕微鏡像 (右)

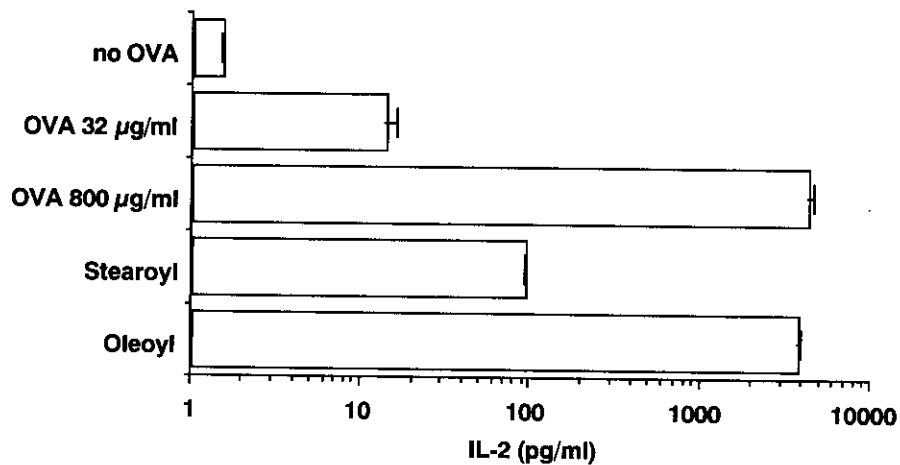


図-3 : OVA-リポソーム結合物でパルスしたマクロファージによる抗原提供

b. 抗原-リポソーム結合物経口前投与がマウスの抗体産生に及ぼす影響の検討：マウスに脂質組成の異なる 2 種類のリポソーム、“Oleoyl”および“Stearoyl”を用いて作製した OVA-リポソームを 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、抗 OVA IgE 抗体産生は両群ともに抑制されたのに対して、アジュバント効果のより高い“Oleoyl”リポソームと OVA との結合物を経口投与したときに対照の経口非投与群、“Stearoyl”リポソーム結合 OVA 投与群と比較して顕著に高レベルの IgG 抗体産生が誘導された。一方、OVA-リポソームに含まれると同量の OVA を溶液状で経口前投与したマウスでは経口寛容が誘導され、抗 OVA IgG 抗体産生は対照の経口非投与群と比較して顕著に低レベルとなった(図-4)。

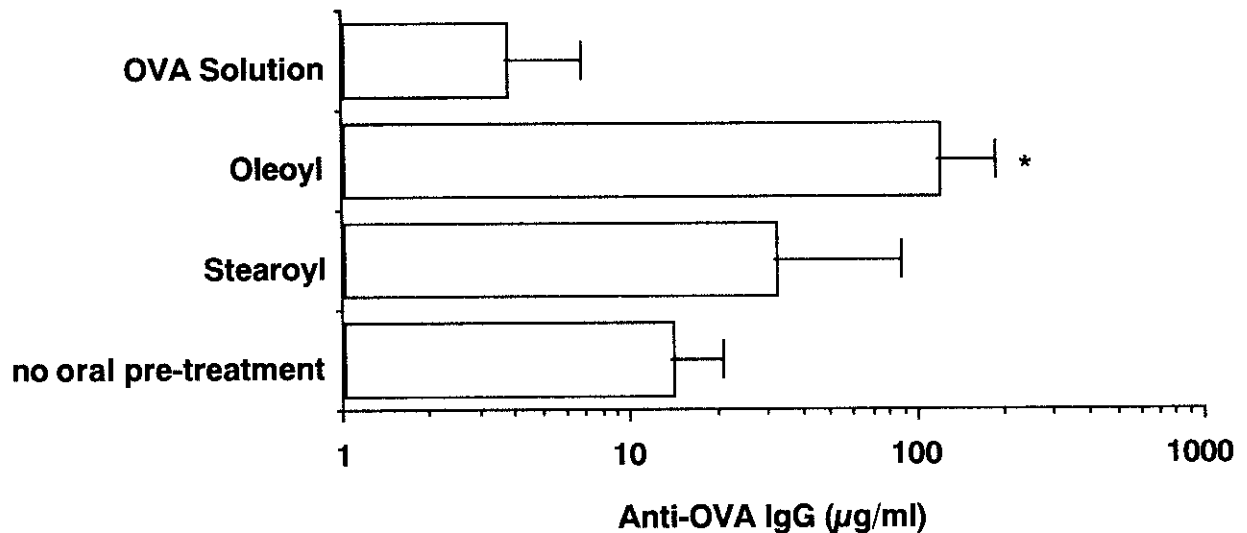


図-4：OVA-リポソームあるいは OVA 溶液を経口前投与したマウスにおける抗 OVA IgG 産生

c. リコンビナント HBs 抗原-リポソーム結合物免疫後のカニクイザルにおける抗 HBs 抗体産生の検討：HBs-リポソーム結合物を免疫したカニクイザルにおいて、抗 HBs IgG 抗体産生は誘導されたが抗 HBs IgE 抗体産生は誘導されなかった。一方、HBs-alum を免疫したカニクイザルでは、抗 HBs IgG および IgE 抗体産生が誘導された (図-5)。

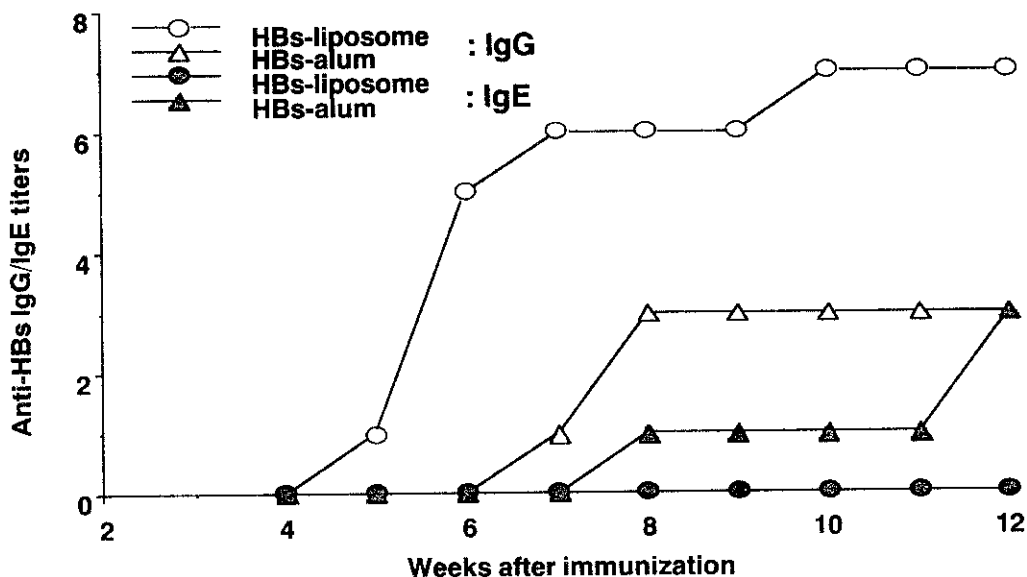


図-5：リコンビナント HBs 抗原-リポソーム結合物免疫後のサルにおける抗 HBs 抗体産生

d. スギ花粉抗原(SBP)-リポソーム結合物投与後のブタオザルにおける抗 SBP 抗体産生の検討：SBP-alum を用いた一次免疫によって抗 SBP IgG および IgE 抗体産生を誘導したサルに SBP-リポソームを二次免疫すると、抗 SBP IgG 抗体産生は増強されたが抗 SBP IgE 抗体産生は増強されなかった (図-6)。

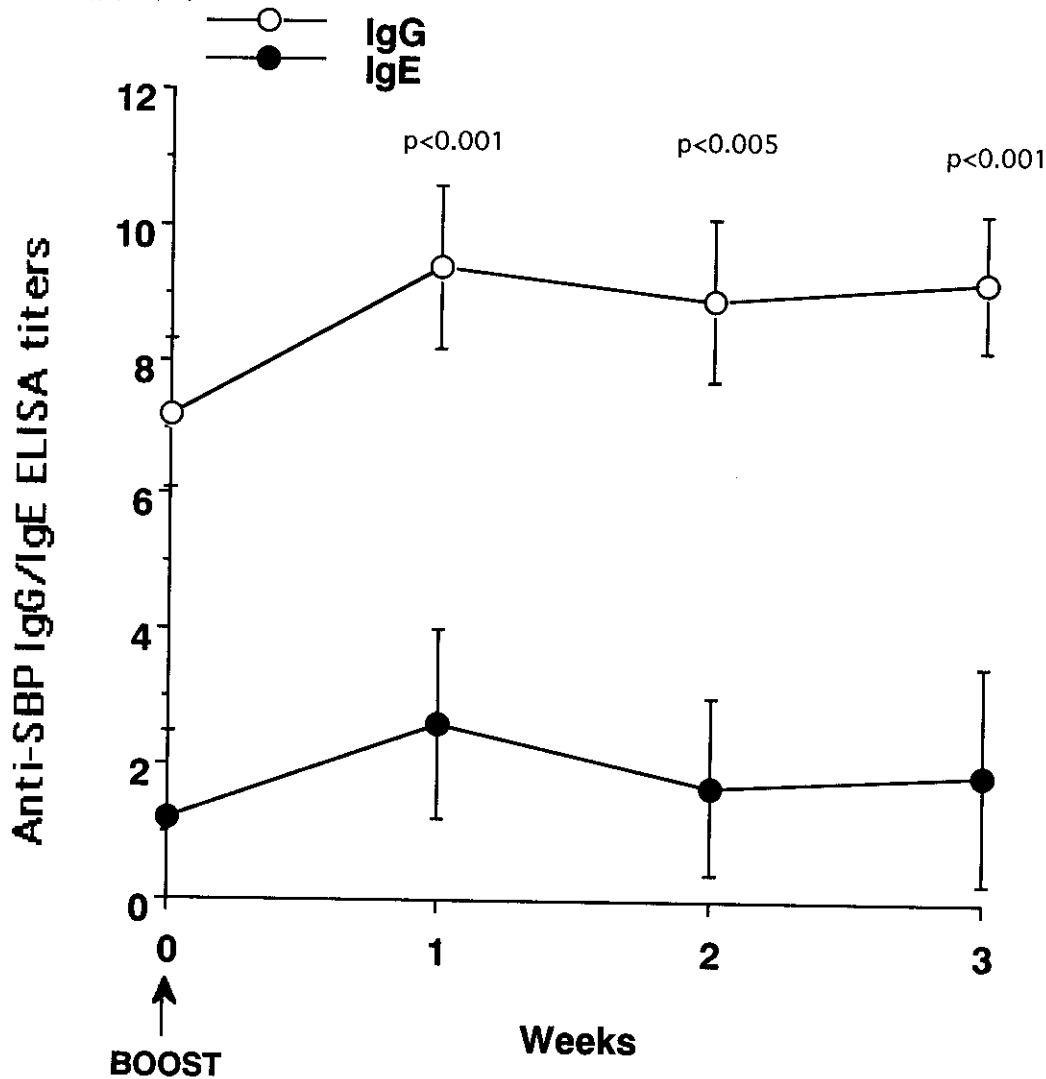


図-6：SBP-リポソーム結合物二次免疫後のサルにおける抗SBP抗体産生

e. 腫瘍関連抗原ペプチド-リポソームによる腫瘍特異的 CTL 誘導の試み：リポソームに TAA ペプチドを内包させ、抗 CD40 抗体と同時にマウス皮下に投与すると腫瘍特異的 CTL が活性化され、抗 CTLA-4 抗体でその効果がさらに増強できることが明らかになった。そこで、この方法で CTL を *in vivo* で活性化した後に腫瘍を移植したところ、完全に拒絶された。しかし、腫瘍が直径 5mm 以上になった後にリポソーム内包 TAA ペプチド+抗 CD40 抗体を投与した場合には腫瘍は拒絶されなかった。この結果から、腫瘍が何らかの免疫抑制因子を発現し、CTL の活性を抑制していることが考えられた。この抑制因子として TGF- β を想定し、リポソーム内包 TAA ペプチドとともに TGF- β を中和することに出来る分泌型 TGF- β レセプター II 分子を腫瘍の近傍に同時投与したところ、直径 5mm 以上の腫瘍の拒絶が観察された。分泌型 TGF- β レセプター II 分子あるいはリポソーム内包 TAA ペプチドの単独投与によっては腫瘍は拒絶されなかったことから、TAA ペプチドと分泌型 TGF- β レセプター II 分子の同時投与が必要であることが示唆された。以上のことから、腫瘍が分泌する TGF- β は活性化された CTL の働きを抑制するとともに CTL の活性化をも抑制すると考えられた。

4. 考察

これまでの検討によって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”Oleoyle”リポソームと、比較的アジュバント能の劣る”Stearoyle”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貪食を比較検討した。蛍光標識した OVA をリポソームに結合して検討を行ったところ、アジュバント能の高い”Oleoyle”リポソームと結合した OVA は効率よくマクロファージに取り込まれ、消化を受けることが観察された。このことはマクロファージによる OVA 特異的 T 細胞への抗原提供の検討の結果とも一致した。

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これまでの検討により明らかになっている。アジュバント能の高い”Oleoyle”リポソームを用いて同様の検討を行ったところ、OVA-リポソーム経口非投与群と比較して顕著に IgG 抗体産生が増強されたことから、経口免疫においてもリポソームの脂質組成が抗体産生の誘導に影響することが示唆され、リポソーム結合抗原を経口ワクチンの創製に応用することが期待された。今後はこの点についても検討を行う。

リコンビナント HBs 抗原-リポソーム結合物をカニクイザルに投与したとき、マウスで得られた結果と同様、抗原特異的 IgE 抗体産生の選択的抑制が観察された。この結果から、リコンビナント HBs-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。

スギ花粉抗原(SBP)-リポソーム結合物はこれまでにマウスを用いた検討によって得られた結果と同様、サルにおいても、二次免疫に用いると SBP 特異的 IgG 抗体産生を増強して SBP 特異的 IgE 抗体産生を増強しなかった。このことから、SBP-リポソーム結合物はアレルギー減感作療法への臨床応用に適していることが示された。

リポソームに TAA ペプチドと抗 CD40 抗体を内包させたものは抗原特異的に CTL を活性化するが、TAA ペプチドと抗 CD40 抗体を溶液状で投与したときには CTL を活性化出来なかったことから、CTL の活性化においてリポソームは重要な役割を担っていることが示唆された。本年度の検討に用いられたリポソームは phosphatidylserine : phosphatidylcholine = 3 : 7 で作製したものであり、TAA ペプチドがリポソームに内包された形態となっているが、このリポソームを改良することによりさらに効率よく CTL を活性化することが期待される。次年度はリポソーム表面に TAA ペプチドを結合させたものを用いて、より強い CTL の活性化および腫瘍拒絶作用の誘導を試みる。

5. まとめ

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、リコンビナント HBs 抗原、スギ花粉抗原、腫瘍関連抗原ペプチドを用い、マウス、サル、およびマクロファージ培養系を用いて行った。その結果、抗原-リポソーム結合物をワクチン、アレルギー治療薬および経口ワクチン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) 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, Komuro K, Uchida T: Protection of monkeys against Shiga toxin induced by Shiga toxin-liposome conjugates. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127:294-298.

- 2) Taneichi M, Naito S, Kato H, Mizuochi T, Nakano Y, Mori M, Yamamura H, Komuro K, Uchida T: T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen. *J Immunol* 2002;169:4246-4252.
- 3) Nakano Y, Mori M, Yamamura H, Naito S, Kato H, Taneichi M, Tanaka Y, Komuro K, Uchida T: Cholesterol inclusion in liposomes affects induction of antigen-specific IgG and IgE antibody production in mice by a surface-linked liposomal antigen. 2002;13:744-749.
- 4) 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 pre-treatment with OVA-liposome conjugates. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:314-319.
- 5) 種市麻衣子、内田哲也：完全フロイントアジュバントのIgE産生抑制機構 *臨床免疫* 2002;38:102-106.
- 6) Uchida T: Stx-liposoma conjugate as candidate vaccines. *Drugs of Today* (印刷中)
- 7) Uchida T: Surface-linked liposomal antigen induces IgE-selective unresponsiveness in a T-cell independent fashion. *Curr Drug Targets* (印刷中)

7. 知的所有権の取得状況

該当無し