

3.2. Immunization of mice with CLIP-replaced Ii expression plasmids successfully induces specific T cells in vivo

In order to examine whether these CLIP-replaced Ii p31 and p41 expression plasmids induce specific T cells in vivo, we immunized BALB/c mice with these plasmids, by using gene gun bombardment. We chose this immunization method as it was a reliable and reproducible method from our previous experience [20]. As shown in Fig. 2, the immunization with pCI-mIi p31-OVA323 or pCI-mIi p41-OVA323 allowed to have spleen cells proliferate after in vitro incubation in the presence of, but not in the absence of OVA protein. The immunization with CLIP-replaced Ii expression plasmids gave significantly higher stimulation index, compared with immunization with full-length chicken OVA cDNA expression plasmid (pCI-OVA) in our experimental condition. We did not detect any significant specific cell proliferation by using wild-type Ii p41 expression plasmid (pCI-mIi p41) or the expression plasmid for OVA 323–336 peptide only (pCI-OVA323). As all plasmids used were constructed based on the same CMV enhancer/promoter-driven eukaryotic expression plasmid, pCI, the difference of the stimulation index observed should be mainly attributable to the difference of the genes inserted into the plasmids.

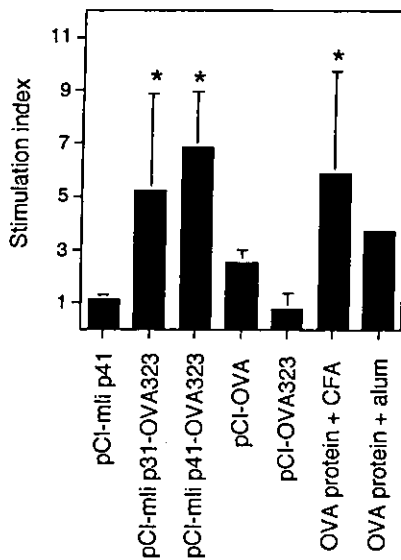


Fig. 2. OVA-specific splenocyte proliferation with immunization with pCI-mIi-OVA323 plasmids in vivo. BALB/c mice were immunized with plasmids indicated, by using gene gun four times at a week interval, or with OVA protein conjugated with CFA or alum twice at 2-week interval. Spleen cells of the immunized mice were harvested 3 weeks after the last immunization and cultured in vitro in the presence or absence of 100 μ g/ml of OVA for 48 h and pulsed with 0.5 μ Ci [methyl- 3 H] thymidine for last 12 h. The values represent stimulation index (the value after in vitro stimulation in the presence of OVA divided by the value in the absence of OVA). The mean and S.D. of three mice per group (except for an OVA + alum-immunized mouse) are shown. Asterisks indicate statistically significant ($P < 0.05$) compared with the value of pCI-mIi p41-immunized mice.

3.3. The T cells induced with pCI-mIi-OVA323 plasmid immunization are MHC class II-restricted CD4⁺ T cells

Then, we examined the phenotype of the OVA-specific T cells generated by priming with pCI-mIi-OVA323 plasmid DNA immunization. As shown in Fig. 3A, the OVA-specific proliferation of spleen cells immunized with pCI-mIi-OVA323 plasmid DNA was eliminated significantly by CD4⁺ T cell subset depletion, but not by CD8⁺ T cell subset depletion. To determine whether the OVA-specific T cells are MHC class II-restricted, OVA-specific proliferation of spleen cells immunized with pCI-mIi p41-OVA323 plasmid was tested in the presence of anti-I-A^d/E^d mAb (2G9). The OVA-specific proliferation of the spleen cells was blocked with anti-I-A^d/E^d mAb, but not by isotype-matched

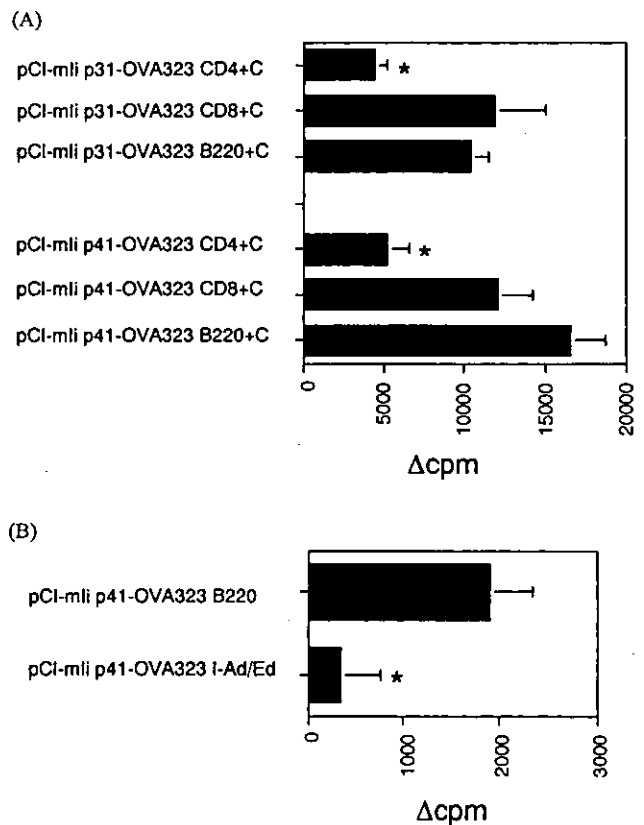


Fig. 3. Inhibition of Ag-specific splenocyte proliferation by CD4⁺ T cell subset depletion or MHC class II blocking. (A) The spleen cells from pCI-mIi-OVA323 plasmid-immunized mice were treated with anti-CD4, anti-CD8, or CD45R/B220 control mAb and rabbit complement. Then, the lymphocyte proliferation assay was performed as in Fig. 2. The mean and S.D. of Δ cpm of quintuplicate determinations of a representative experiment are shown. Asterisks indicate statistically significant ($P < 0.001$) compared with the value of control mAb + complement treatment (B220 + C). (B) The spleen cells from pCI-mIi p41-OVA323-immunized mice were stimulated with 100 μ g/ml of OVA protein in the presence of anti-I-A^d/E^d mAb or CD45R/B220 control mAb. The mean and S.D. of Δ cpm of quintuplicate determinations of a representative experiment are shown. Asterisks indicate statistically significant ($P < 0.001$) compared with the value of control mAb treatment (B220).

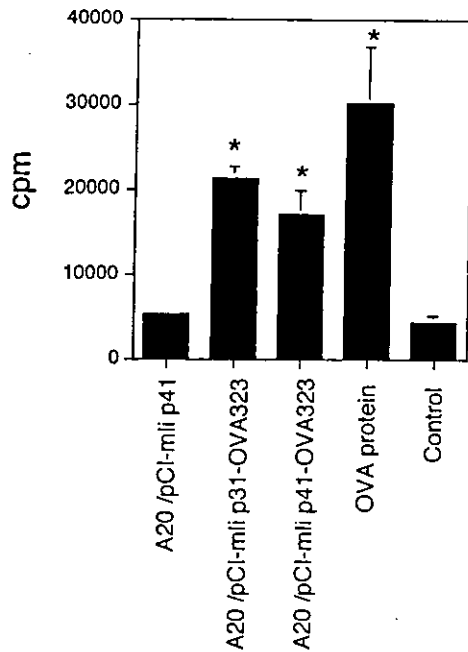


Fig. 4. A20-2J cells transfected with pCI-mli p31-OVA323 or pCI-mli p41-OVA323 stimulate naïve spleen cells from DO10-transgenic mice. Spleen cells from DO10-transgenic mice were cultured with fixed intact A20-2J cells, or fixed A20-2J cells having plasmids indicated, or in the presence (OVA protein) or absence (control) of 100 µg/ml of OVA without A20-2J cells for 48 h, and pulsed with 0.5 µCi [methyl-³H] thymidine for last 12 h. The values represent the mean and S.D. of triplicate determinations in a representative experiment. Asterisks indicate statistically significant ($P < 0.001$) compared with the value with fixed A20-2J cells having pCI-mli p41 plasmid (A20/pCI-mli p41).

control mAb (Fig. 3B). These results indicate that the OVA-specific T cells generated with pCI-mli-OVA323 plasmid DNA immunization are MHC class II-restricted CD4⁺ T cells.

3.4. The B cell lines transfected with CLIP-replaced Ii expression plasmids have a capacity to stimulate naïve spleen cells from DO10-transgenic mice

In order to support that the mutant Ii molecules produced by the plasmid DNA immunization were expressed and presented on the plasmid-transfected cells directly, we established murine A20-2J B lymphoblastoid cell lines transfected with pCI-mli p31-OVA323 or pCI-mli p41-OVA323. As shown in Fig. 4, these cell lines fixed in 4% paraformaldehyde were capable of proliferating naïve spleen cells from DO10-transgenic mice bearing OVA-specific TCR transgenes [18] in the Ag-specific manner. On the contrary, A20-2J cells having pCI-mli p41 control plasmid did not stimulate the cells. Furthermore, we performed ELISA for IFN-γ by using culture supernatants of naïve spleen cells from DO10-transgenic mice. The co-culture of spleen cells from DO10-transgenic mice and A20-2J pCI-mli p31-OVA323-, or pCI-mli p41-OVA323-stable

Table 1

IFN-γ production by spleen cells from DO10-transgenic mice after stimulation with A20 pCI-mli-OVA323-stable transfectants

Stimulation ^a	IFN-γ production (pg/ml) ^b
A20/pCI-mli p41	658 ± 372
A20/pCI-mli p31-OVA323	12658 ± 377
A20/pCI-mli p41-OVA323	12396 ± 390
OVA protein	11911 ± 937
Control	334 ± 140

^a Spleen cells of DO10-transgenic mice (2×10^6 cells per well) were cultured with A20 stable transfectants (1×10^5 cells per well) or in the presence of 100 µg/ml OVA protein. The spleen cells were also cultured without stimulation (Control).

^b After 5 days, IFN-γ concentration in culture supernatants was quantified with IFN-γ-specific ELISA as described in Section 2. The mean ± S.D. are shown.

transfectants in vitro induced Ag-specific IFN-γ production (Table 1). We also performed lymphocyte proliferation assay and ELISA for IFN-γ by using spleen cells from pCI-mli p31-OVA323-, and pCI-mli p41-OVA323-immunized mice and obtained similar results (data not shown).

3.5. Ab production against OVA by CLIP-replaced Ii expression plasmid immunization

The I-A^d-restricted OVA Th epitope, OVA 323–336, may function as a B cell epitope in vivo by itself or in connection with the amino acids flanked in the Ii molecules. In order to examine whether the CLIP-replaced Ii cDNA immunizations induce Ab production against OVA protein, sera of the immunized mice were examined. As shown in Fig. 5A, DNA immunization with pCI-mli p41, pCI-mli p31-OVA323, or pCI-OVA323 did not induce OVA-specific Ab production. On the other hand, immunization with pCI-OVA induced the strong level of the Ab comparable with those in OVA protein immunizations (Fig. 5A). Of particular interest is that some mice immunized with pCI-mli p41-OVA323 induced OVA-specific Ab production. Two mice immunized with pCI-mli p41-OVA323 among 4 mice did not produce the Ab 1 month after the last immunization. However, one mouse produced the amount of the Ab comparable with that in mice immunized with pCI-OVA. Another mouse produced the lower level of the Ab. These results indicate that OVA 323–336 peptide functions as a B cell epitope in some pCI-mli p41-OVA323-immunized BALB/c mice. In addition, we performed the peptide blocking experiment to examine the specificity of Ab produced. As shown in Fig. 5B, pre-incubation of sera from pCI-mli p41-OVA323-immunized mice with OVA 323–339 peptide, but not with control LLO 319–327 peptide, abolished the binding. On the other hand, pre-incubation of sera from mice immunized with pCI-OVA, OVA protein + CFA, or OVA protein + alum, did not affect the binding. To confirm that some pCI-mli p41-OVA323-, but not pCI-mli

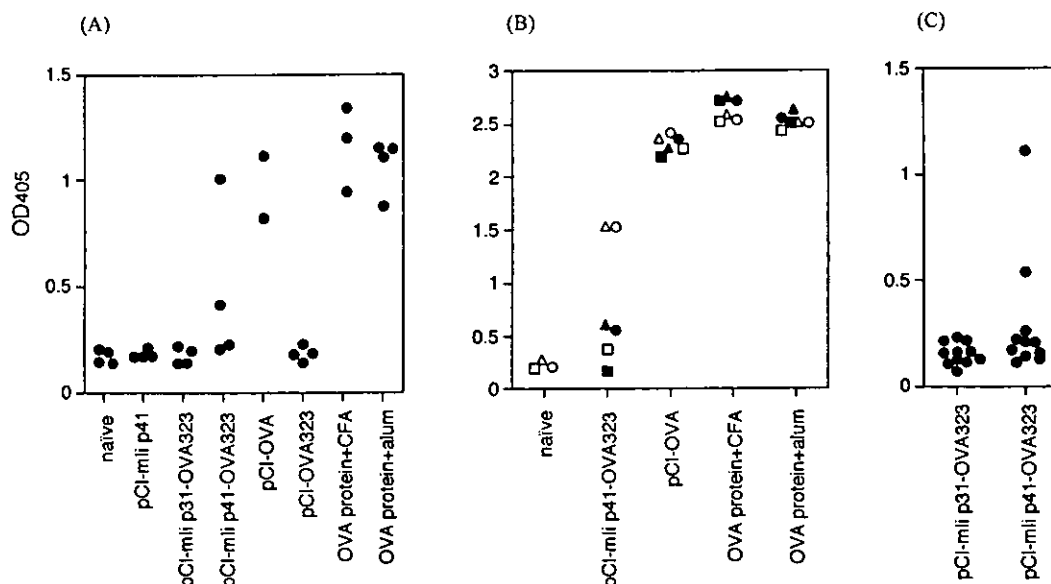


Fig. 5. Ab production against OVA by immunization with pCI-mli p41-OVA323 plasmid. (A) Sera were obtained from the immunized mice 1 month after the last immunization and stored at -20°C until assayed for OVA-specific IgG by ELISA. Each dot represents binding of $50 \times$ diluted serum from individual mice (2–4 mice for each group). The values represent the mean of two determinations. OD405, optical density at 405 nm. (B) Sera from the two immunized mice (except for a naïve mouse) were diluted 100 times and incubated with $50 \mu\text{M}$ of OVA 323–339 peptide or control LLO 319–327 peptide at room temperature for 1 h before ELISA. The bindings of untreated sera (circle), sera pretreated with OVA 323–339 peptide (square), and sera pretreated with control LLO 319–327 peptide (triangle) are shown. Sera of two individual mice (shown as open or closed symbol) were examined for each group. (C) Sera were obtained from pCI-mli p31-OVA323-, or pCI-mli p41-OVA323-immunized mice 2 weeks after the last immunization and stored at -20°C until assayed for OVA-specific IgG by ELISA. Each dot represents binding of $50 \times$ diluted serum from individual mice (11 mice for each group). The mean of two determinations is shown.

p31-OVA323-immunized mice, do produce anti-OVA Ab, we immunized 11 additional mice with pCI-mli p31-OVA323 or pCI-mli p41-OVA323 and examined anti-OVA Ab production. As shown in Fig. 5C, only one mouse produced high amounts of anti-OVA Ab and another mouse produced lower amounts of the Ab among 11 pCI-mli p41-OVA323-immunized mice. No pCI-mli p31-OVA323-immunized mice produced the Ab. These results indicate that immunization of BALB/c mice with pCI-mli p41-OVA323, but not with pCI-mli p31-OVA323, is capable of producing anti-OVA 323–336 peptide Ab, although the frequency of the mice which produce the Ab is low.

3.6. Cytokine production by spleen cells from mice immunized with pCI-mli-OVA323 plasmids

The difference of Ii isoforms used for DNA immunization may affect the induced CD4^{+} T cell subpopulation. Therefore, we examined IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-5 production by spleen cells from mice immunized with pCI-mli-OVA323 plasmids and compared it with that from mice immunized with OVA protein. Table 2 shows the result of sandwich ELISA of cytokines. Spleen cells from mice immunized with pCI-mli p31-OVA323 and pCI-mli p41-OVA323 produced a high amount of IFN- γ , although

the produced IFN- γ levels were somewhat lower than the level from the mouse immunized with OVA protein + CFA. IFN- γ levels produced by spleen cells from naïve mice or mice immunized with OVA protein + alum were low. The level of IL-2 from spleen cells of each group had a similar tendency with that of IFN- γ . On the contrary, only spleen cells from the mouse immunized with OVA protein + alum produced the high levels of IL-4 and IL-5. These results indicate that immunization with both pCI-mli p31-OVA323 and pCI-mli p41-OVA323 plasmids induces Th1-type subpopulation of CD4^{+} T cells in this experimental condition. Furthermore, we compared the cytokine expression pattern of Ag-specific T cells in anti-OVA Ab-producing mouse (#3; the mouse producing highest amounts of anti-OVA Ab among 11 pCI-mli p41-OVA323-immunized mice shown in Fig. 5C) and non-producing pCI-mli-OVA immunized mice (pCI-mli p31-OVA323 #1, #2 and pCI-mli p41-OVA323 #1, #2) as the cytokine profile of T cells in these mice may have some relevance to production of anti-OVA Ab. The result of ELISA indicates that whether the mice produce anti-OVA Ab or not, pCI-mli p41-OVA323-immunized mice showed Th1-type cytokine expression pattern; high expression of IFN- γ /IL-2 and low expression of IL-4/IL-5. An anti-OVA Ab-producing mouse (pCI-mli p41-OVA323 #3) produced slightly higher levels of IFN- γ and IL-2 than anti-OVA Ab non-producing pCI-mli-OVA immunized mice.

Table 2
Cytokine production by spleen cells from mice immunized with pCI-mIi-OVA323 plasmids or OVA protein

Immunization	Production of anti-OVA Ab	Stimulation ^b	IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-5
Naïve	–	+	1551 \pm 377	751 \pm 110	66 \pm 53	61 \pm 51
	–	Control	231 \pm 33	361 \pm 51	78 \pm 69	51 \pm 60
pCI-mIi p31-OVA323 #1	–	+	6489 \pm 761	825 \pm 124	83 \pm 23	103 \pm 32
	–	Control	273 \pm 2	581 \pm 607	81 \pm 5	39 \pm 18
pCI-mIi p31-OVA323 #2	–	+	6922 \pm 1512	ND ^c	163 \pm 36	ND
	–	Control	2157 \pm 100	ND	70 \pm 33	ND
pCI-mIi p41-OVA323 #1	–	+	4744 \pm 1207	1036 \pm 74	99 \pm 28	50 \pm 37
	–	Control	240 \pm 30	150 \pm 29	64 \pm 22	56 \pm 13
pCI-mIi p41-OVA323 #2	–	+	5117 \pm 598	1615 \pm 257	157 \pm 47	29 \pm 9
	–	Control	557 \pm 93	152 \pm 16	104 \pm 35	16 \pm 0
pCI-mIi p41-OVA323 #3	+	+	7496 \pm 571	1745 \pm 420	318 \pm 71	187 \pm 27
	+	Control	613 \pm 270	521 \pm 29	62 \pm 51	101 \pm 38
OVA protein + CFA	+	+	7659 \pm 248	3291 \pm 330	209 \pm 17	492 \pm 87
	+	Control	96 \pm 15	222 \pm 15	19 \pm 6	20 \pm 4
OVA protein + alum	+	+	2302 \pm 396	480 \pm 78	1330 \pm 82	1344 \pm 170
	+	Control	67 \pm 11	180 \pm 0	22 \pm 1	31 \pm 12

^a After 2 days (for IL-2 and IL-5) or 5 days (for IFN- γ and IL-4), cytokine concentration in culture supernatants was quantified with IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-5-specific ELISA as described in Section 2. The mean \pm S.D. of wells of triplicate in vitro stimulation is shown.

^b Spleen cells of immunized mice (2×10^6 cells per well) were cultured in the presence of 100 μ g/ml OVA protein (+) or without the protein (Control).

^c ND: not determined.

4. Discussion

We report here that DNA immunization with two CLIP-replaced Ii isoform-expression plasmids successfully induces an antigenic peptide-specific Th in vivo. There may be two possibilities for the mechanism by which the specific T cells were induced in the immunized mice. One is that the plasmid DNA may be directly introduced into the skin APC, especially epidermal Langerhans cells and dermal dendritic cells. Then, the cells migrate to lymphoid tissues like lymph nodes and subsequently prime specific T cell subset. The other is that the mutant Ii molecules produced in the plasmid DNA-transfected cells egress out of the cells. Then, APC take the molecules by endocytosis and present the Ag to T cells in lymphoid tissues. Supporting the possibility of the latter mechanism, Malcherek et al. [12] demonstrated that pulsing of human peripheral blood mononuclear cells with Ii-hybrid molecules encoding a Th epitope of tetanus toxin or acetylcholine receptor, dramatically enhances stimulation of specific T cell lines in the in vitro cell culture system. However, in the case of gene gun immunization as in this study, we speculate the first mechanism. Several groups reported that dendritic cells which received gold particles with plasmid DNA directly, play a pivotal role for eliciting immune responses by gene gun immunization [16,17]. Our result showing that fixed A20-2J B cell lymphomas having mutant Ii cDNA constructs were capable of stimulating spleen cells derived from naïve DO10-transgenic mice and pCI-mIi-OVA323-immunized mice in the Ag-specific fashion, also supports the first mechanism. In addition, we previously reported very good CTL induction by

immunization with minigene plasmid DNA encoding only a minimal CTL epitope by gene gun bombardment, suggesting APC take the plasmid directly and produce the plasmid-encoding polypeptides in the cytoplasm, then present them on MHC class I molecules [5].

Two isoforms of murine Ii molecules are generated from a gene by alternative splicing mechanism [24]. In some cases, the p41 isoform has been reported to enhance Ag presentation by reducing the proteolytic activity of the Ag processing compartments, thus protecting a subset of antigenic peptides from excessive degradation [27,28]. However, our results showed that pCI-mIi p31-OVA323 and pCI-mIi p41-OVA323 immunizations did not result in a significant difference on Ag presentation capacity for the OVA peptide (Fig. 2). It was reported that the magnitude of OVA 323–339 peptide presentation to some specific T cell hybridoma was not enhanced particularly by Ii p41 isoform expression when compared with the effect of Ii p31 isoform expression using Ltk⁻ Ii transfectants [29], suggesting that the OVA peptide stability is not affected by the presence of Ii p41 molecules. Comparing Th-stimulatory activities by immunization of other Th epitope/CLIP-replaced Ii p31 and p41 isoform cDNA plasmids may be interesting.

Surprisingly, some mice immunized with pCI-mIi p41-OVA323 produced anti-OVA323 peptide-specific Ab. Th1-type cytokine expression pattern of T cells in both anti-OVA Ab-highly producing and non-producing pCI-mIi p41-OVA323-immunized mice (Table 2) denies the possibility that the Ab production is caused by the difference of Th subset induced. We speculate that the difference of intracellular localization of two Ii isoforms is the main

reason for production of the Ab. It was reported that p31 and p41 isoforms are localized in different cell compartments [30] and that Ii molecules are exposed on the cell surface before they are internalized and transferred to the endosome in human cells [31,32]. Therefore, it is possible that some Ii p41-OVA323 molecules are expressed on the surface of the plasmid-transfected cells for a longer time than Ii p31-OVA323 molecules and induce the Ab production in vivo. Further experiments are, however, necessary to conclude that.

Taken together, we believe that the immunization system shown here is applicable to treatments for a variety of diseases including allergic and autoimmune diseases, as well as infectious diseases. This system will be also useful for analyses of the basic immunological responses to a particular Th epitope. The prognosis of a variety of immune-related diseases depend on the cytokine profiles produced by the induced specific T cells. Therefore, the strategy for the control of cytokine profiles of specific T cells, for example, by using co-immunization with IL-12 or IL-4 expression plasmids, will be worth while to try.

5. Addendum

After this work was completed, a similar approach was presented by van Tienhoven et al., *Vaccine* 19: 1515, 2001. They reported that no proliferative T cell responses were detected in spleen of immunized rats. They observed low proliferative responses only in the draining lymphnodes. The discrepancy between their and our observations will be attributable to the differences of animals used, the antigenic peptide examined, the immunization methods, and/or the immunization protocols.

Acknowledgements

We thank Mr Tetsumichi Matsuo for his excellent technical help. We also thank Dr Kenneth M. Murphy and Dr Masato Kubo for DO10-transgenic mice, Dr Ronald N. Germain for murine Ii p31 and p41 cDNAs, and Dr Naohiro Seo for providing anti-CD4, CD8a, and I-A^d/E^d mAbs. This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (Japan) and Shizuoka Research and Education Foundation.

References

- [1] Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997;15:617–48.
- [2] Lewis PJ, Babiuk LA. DNA vaccines: a review. *Adv Virus Res* 1999;54:129–88.
- [3] Tüting T, Storkus WJ, Fallo Jr LD. DNA immunization targeting the skin: molecular control of adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 1998;111:183–8.
- [4] Uchijima M, Yoshida A, Nagata T, Koide Y. Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *J Immunol* 1998;161:5594–9.
- [5] Nagata T, Uchijima M, Yoshida A, Kawashima M, Koide Y. Codon optimization effect on translational efficiency of DNA vaccine in mammalian cells: analysis of plasmid DNA encoding a CTL epitope derived from microorganisms. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:445–51.
- [6] Kaufmann SHE. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* 1993;11:129–63.
- [7] Wierenga EA, Snoek M, De Groot C, et al. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4⁺ T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 1990;144:4651–6.
- [8] Parronchi P, Macchia D, Piccinni M-P, et al. Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4538–42.
- [9] Shevach EM. Organ-specific autoimmunity. In: Paul, WE, editor. *Fundamental immunology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999. p. 1089–125.
- [10] van Bergen J, Ossendorp F, Jordens R, Mommaas AM, Drijfhout J-W, Koning F. Get into the groove! Targeting antigens to MHC class II. *Immunol Rev* 1999;172:87–96.
- [11] van Bergen J, Schoenbeger SP, Verreck F, Amons R, Offringa R, Koning F. Efficient loading of HLA-DR with a T helper epitope by genetic exchange of CLIP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7499–502.
- [12] Malcherek G, Wirblich C, Willcox N, Rammensee H-G, Trowsdale J, Melms A. MHC class II-associated invariant chain peptide replacement by T cell epitopes: engineered invariant chain as a vehicle for directed and enhanced MHC class II antigen processing and presentation. *Eur J Immunol* 1998;28:1524–33.
- [13] Fujii S, Senju S, Chen Y-Z, Ando M, Matsushita S, Nishimura Y. The CLIP- substituted invariant chain efficiently targets an antigenic peptide to HLA class II pathway in L cells. *Human Immunol* 1998;59:607–14.
- [14] Sant AJ, Miller J. MHC class II antigen processing: biology of invariant chain. *Curr Opin Immunol* 1994;6:57–63.
- [15] Germain RN. Antigen processing and presentation. In: Paul, WE, editor. *Fundamental immunology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999. p. 287–340.
- [16] Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8⁺ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med* 1998;188:1075–82.
- [17] Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Fallo Jr LD. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:1122–8.
- [18] Murphy KM, Heimberger AB, Low DY. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺ CD8⁺ TCR^{lo} thymocytes in vivo. *Science* 1990;250:1720–3.
- [19] Haskins K, Kubo R, White J, Pigeon M, Kappler J, Marrack P. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells I. Isolation with a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1983;157:1149–69.
- [20] Yoshida A, Nagata T, Uchijima M, Higashi T, Koide Y. Advantage of gene gun-mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses. *Vaccine* 2000;18:1725–9.
- [21] Chesnut RW, Colon SM, Grey HM. Requirements for the processing of antigens by antigen-presenting B cells I. Functional comparison of B cell tumors and macrophages. *J Immunol* 1982;129:2382–8.
- [22] Tsuji M, Yagi J, Abe R, Asano Y, Tada T. Shared idioptopes between anti-class II monoclonal antibodies and major histocompatibility complex recognition site of T cells. *Eur J Immunol* 1987;17:675–81.

- [23] Yoshida A, Koide Y, Uchijima M, Yoshida TO. Dissection of strain difference in acquired protective immunity against *Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin Bacillus (BCG). *J Immunol* 1995;155:2057–66.
- [24] Yamamoto K, Koch N, Steinmetz M, Hämmerling GJ. One gene encodes two distinct Ia-associated invariant chains. *J Immunol* 1985;134:3461–7.
- [25] Hunt DF, Michel H, Dickinson TA, et al. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-A^d. *Science* 1992;256:1817–20.
- [26] Bangia N, Watts TH. Evidence for invariant chain 85–101 (CLIP) binding in the antigen binding site of MHC class II molecules. *Int Immunol* 1995;7:1585–91.
- [27] Fineschi B, Sakaguchi K, Appella E, Miller J. The proteolytic environment involved in MHC class II-restricted antigen presentation can be modulated by the p41 form of invariant chain. *J Immunol* 1996;157:3211–5.
- [28] Bevec T, Stoka V, Pungercic G, Dolenc I, Turk V. Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J Exp Med* 1996;183:1331–8.
- [29] Peterson M, Miller J. Antigen presentation enhanced by the alternatively spliced invariant chain gene product p41. *Nature* 1992;357:596–8.
- [30] Romagnoli P, Layet C, Yewdell J, Bakke O, Germain RN. Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *J Exp Med* 1993;177:583–96.
- [31] Koch N, Moldenhauer G, Hofmann WJ, Möller P. Rapid intracellular pathway gives rise to cell surface expression of the MHC class II associated invariant chain (CD74). *J Immunol* 1991;147:2643–51.
- [32] Roche PA, Teletski CL, Stang E, Bakke O, Long EO. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8581–5.

血液・免疫・腫瘍 BIC Forum

別冊

メディカルレビュー社

7 DNA ワクチンによる感染防御

小出 幸夫*1, 永田 年*2

Key Sentences

- ① DNA ワクチンは抗体産生のみならず、これまで生ワクチンでのみ誘導可能であった細胞性免疫を強力に誘導する。したがって、その対象は感染症ではウイルスの慢性感染、細胞内寄生菌および原虫感染が主になる。
- ② DNA ワクチンの接種法には、筋注、遺伝子銃、皮下接種、経鼻接種などの方法があるが、遺伝子銃は用いるプラスミドの量が少量ですむ、免疫誘導の再現性がよいなどの利点がある。
- ③ エピトープ DNA ワクチンは抗原全長をコードするワクチンに比し、効率よく細胞性免疫を誘導できる。しかも、細胞内寄生病原体の種類により、細胞傷害性 T 細胞(CTL)または Th 1 細胞のどちらか有効なもののみを誘導できる。
- ④ DNA ワクチンによる免疫誘導の機序はその接種法によっても異なるが、骨髄由来の樹状細胞(DC)が T 細胞の感作に重要な働きをする点は一致している。
- ⑤ 感作—ブースト(prime-boost)ヘテロ免疫法は、特定の防御抗原を DNA ワクチンで感作し、その後組換えウイルスでブーストをかけるもので、強い細胞性免疫を誘導できる。

Key Words

DNA ワクチン, 遺伝子銃, エピトープ DNA ワクチン, 樹状細胞, 感作—ブースト(prime-boost)ヘテロ免疫法

はじめに

ジェンナーは、牛痘に感染した乳しぼりの女性は天然痘に感染しないという話にヒントを得、1796年5月に8歳の少年に牛痘を感染させた。これにより、この少年を天然痘の感染から防御することに成功した。世界最初のワクチンである。これに引き続き、パスツールは炭疽病、狂犬病、丹毒などのワクチンを次々と作製した。パスツールはこれらの弱毒株を「ヴァクチン(ワクチン)」

と名付けた。これはラテン語の雌牛を意味する「バッカ」からきており、ジェンナーが牛痘の膿を使って初めて予防接種法を確立したことに敬意を払ったためであった。その後も多くのワクチンが開発され、われわれは多大な恩恵を受けてきた。

7千年の長きにわたり人類を苦しめてきた天然痘は世界中から根絶され、これに引き続きポリオ(急性灰白髄炎)も撲滅されつつある。このようにある種の感染症に対してはワクチンの効果は絶大である。1912年からの米国 CDC (Centers for Disease Control and Prevention)

Control of infections by a DNA vaccine

* 1 Koide Yukio : 浜松医科大学微生物学教授

* 2 Nagata Toshi : 浜松医科大学微生物学助教授

のワクチン接種前後の感染症発症率の比較によれば、ポリオに対する効果は100%，ジフテリア、麻疹、ムンプス、風疹に対する効果は99%以上、そして、百日咳に対する効果は97%以上である。しかしながら、エイズ、マラリアなどの危険な感染症に有効なワクチンはいまだ開発途上にある。

当初、全く経験的に作られてきたワクチン(弱毒生ワクチン、不活化ワクチンなど)も免疫学の進歩により、感染防御免疫を成立させるのに必要な構成成分だけを抽出して作製した成分ワクチン(インフルエンザHAワクチンなど)が開発された。しかし見方を変えれば、現在では免疫応答機構が分子レベルで詳細に明らかにされているにもかかわらず、これらの知見はいまだワクチン開発に十分生かされていないともいえる。HIV、C型肝炎ウイルス(HCV)などのウイルスの慢性感染および抗酸菌、原虫などの細胞内寄生体の感染に対する防御には細胞性免疫が必須である。しかし、現在使用されているワクチンの中で細胞性免疫を誘導するものはBCGのような弱毒生ワクチンに限られており、これは様々な副反応の可能性を秘めている。近年、DNAワクチンが抗体のみならず細胞性免疫を強力に誘導できることから、弱毒生ワクチンに代わる有効で安全なワクチンとしての期待を集めている。

DNAワクチンの可能性は多くの興味ある発見と同様に偶然発見された。Wolffら²⁾は発現ベクターをリポソーム法で大腿四頭筋に導入、発現させることを試みた。この時、ネガティブ・コントロールとして発現ベクターのみ(naked plasmid)を筋注したところ、予想に反してこれが筋肉に発現ベクター由来の遺伝子発現を誘導した。この結果を受け、いくつかの研究グループがウイルス蛋白を発現するプラスミドをマウスに筋注することで、そのウイルスに対する抗体のみならず細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導すること、およびこれにより感染防御能力を誘導できることを示し³⁾、DNAワクチン開発の途が拓かれた。

DNAワクチンの研究は感染症のみならず、悪性腫瘍、自己免疫の分野でも行われているが、感染症に関わる研究を表1にまとめた。上記したようにDNAワクチンの

特徴は細胞性免疫の誘導にあるので、細胞内寄生体感染、すなわちHIV、結核、マラリア原虫に関する研究が圧倒的に多い。主に米国で行われている臨床治験を表2にまとめた。当然のことながらHIVを対象にした研究、治験が最も多いが、この分野で最近、「感作ブースト(prime-boost)」の工夫により強力な細胞性免疫を誘導できることが判明し注目されている(後述)。

DNA ワクチンによる免疫誘導の機序

DNAワクチンの免疫誘導の機序はその接種法により異なる。接種法は大きく分けて、筋注法と遺伝子銃による経皮接種法がある。上記のDNAワクチン法の発見の経緯およびコスト面より、一般的には筋注法が最も頻繁に採用されている。マウスに筋注する場合は大腿四頭筋または前頭骨筋に接種する。この場合、通常bupivacaineまたはカルジオトキシンを前投与したり、高張液(25% sucrose)にプラスミドを溶解して接種することで、プラスミドの宿主細胞への取り込み効率を高める工夫をする。遺伝子銃法では金粒子(直径1 μ m)にプラスミドをコートし、高圧ヘリウムガスを用いて空気銃の要領で皮膚に撃ち込む。この場合、通常は剃毛したマウス腹部に接種する。

すでによく知られている遺伝子銃法の長所は筋注法に比較して、100～1,000分の1のプラスミド量で同等の免疫を誘導できる点にある。一方、遺伝子銃は高価である点、また、誘導される細胞性免疫が2型ヘルパーT(Th2)細胞に限定される点が欠点として挙げられる⁴⁾。われわれは細胞内寄生菌である*Listeria monocytogenes*(以下リステリアと略す)のlisteriolysin O (LLO) 91-99を発現するプラスミドをBALB/cマウスに筋注法(50 μ g)と遺伝子銃法(2 μ g)で接種し、誘導されるCTL活性を測定した。図1にみられるように、筋注法では誘導されるCTL活性にばらつきが認められるのに対し、遺伝子銃法では安定して高い活性を持ったCTLが誘導できる⁵⁾。この免疫誘導の再現性がワクチンで最も重要であることは論を俟たない。

表1 各種感染症におけるDNAワクチンの効果(実験動物)

病原体	DNAワクチンがコードする抗原	抗体産生	CTLの誘導	感染防御
インフルエンザウイルス	NP, HA, M1	+	+	+
HIV	env, gag, rev	+	+	ND
ウシ・ヘルペスウイルス	gp	+	ND	+
狂犬病ウイルス	gp, NP	+	+	+
マラリア原虫	CSP	+	+	+
リーシュマニア	gp 63	+	ND	+
結核菌	HSP 65, Ag 85	+	+	+
B型肝炎ウイルス	HBs, HBc	+	+	+
C型肝炎ウイルス	ヌクレオカプシド	+	+	ND
単純ヘルペスウイルス	gB, gD, ICP 27	+	+	+
乳頭腫ウイルス	L1	+	ND	+
HTLV-1	env	+	ND	ND
リンパ球性脈絡膜炎ウイルス	NP	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	内毒素	+	ND	ND
肺炎マイコプラズマ	ND	+	ND	+
腸チフス菌	OmpC porin	+	ND	ND

ND ; not determined

表2 DNAワクチンの臨床試験が行われている感染症

病原体	DNAワクチンがコードする抗原	抗体産生	CTLの誘導
HIV(予防)	env, gag, rev など	+	+
HIV(治療)	env, tat, nef など	+	+
B型肝炎ウイルス(予防)	HBs	+	+
単純ヘルペスウイルス(予防)	gp, NP	+	+
インフルエンザウイルス(予防)	HA	解析中	解析中
マラリア原虫(予防)	スポロゾイト表面蛋白(CSP)	ND	+

ND ; not determined

1. 筋注法による感作のメカニズム(図2)

筋注法を用いたDNAワクチンによる感作には骨髄由来抗原提示細胞(APC)が重要な役割を担っていることが判明している。Corrら⁹⁾はF₁マウスに両親の骨髄を移植し、2種類のF₁骨髄キメラマウスを作製した。これらのマウスにDNAワクチンを筋注したところ、誘導されたCTLは骨髄ドナーのH-2に拘束されていた。また、別の研究でDNAワクチンを筋注後、10分以内に筋注部

の筋肉を切除しても免疫応答は誘導されることが報告されている⁷⁾。さらに、筋肉細胞特異的な*desmin*遺伝子のプロモーターの下流にHBs遺伝子を挿入した発現プラスミドを筋注した場合、筋肉細胞で作られたHBsは移入してきたAPC(樹状細胞; DC)により取り込まれ、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターを用いたDNAワクチンと同等の細胞性免疫を誘導できた⁸⁾。この際、興味あることにTh細胞のみならず、CTLも誘導で

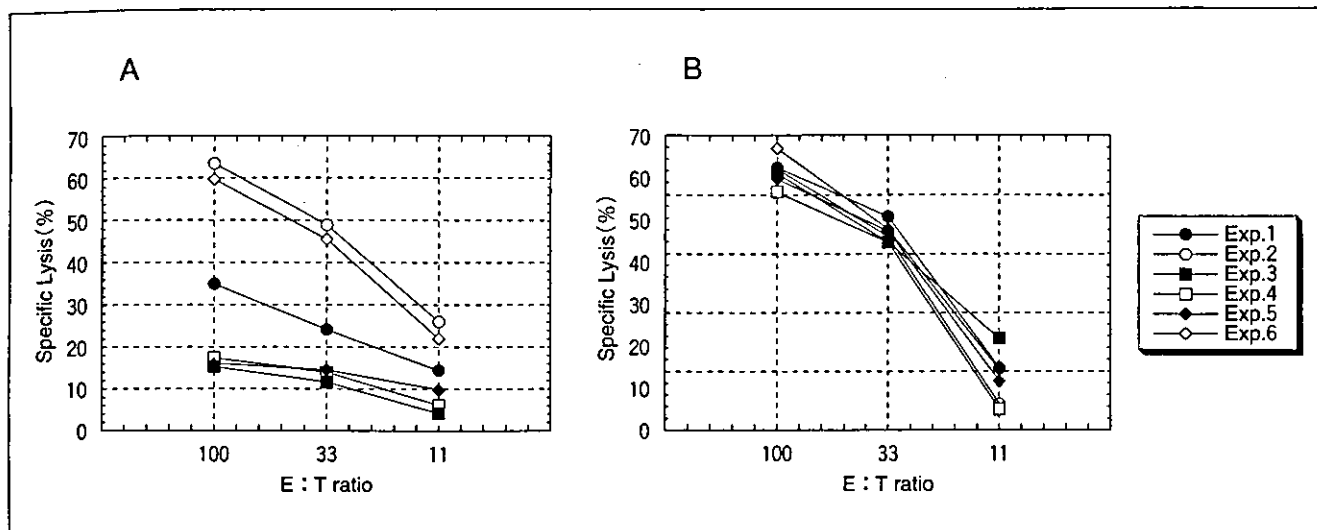


図1 筋注法と遺伝子銃法によってDNAワクチンを免疫されたマウスのCTL誘導活性の比較

BALB/c マウスに p 91 m (LLO 91-99) DNA ワクチン 50 μ g を 3 回筋注した(A)。また、遺伝子銃で同じ DNA ワクチンを 2 μ g 接種した(B)。最終免疫 2 週間後に免疫脾細胞を回収し、LLO 91-99 で 5 日間試験管内刺激し、これをエフェクター細胞、LLO 91-99 をパルスした J774 細胞(H-2^d)を標的細胞として、細胞傷害試験を行った。

き、いわゆる“cross-priming”の現象が認められた。このように、筋注では筋肉細胞、線維芽細胞などに取り込まれたプラスミドはその細胞内で抗原蛋白を産生し、これを筋肉内に進入してきた DC が取り込むか、アポトーシスを起こした抗原発現細胞を DC が取り込むかして、抗原は DC 内でいわゆる MHC クラス II 経路を介して、Th 細胞を感作すると考えられる。また、cross-priming の機序により CTL が誘導される。この cross-priming は DC に特異的で、他の APC には認められない。また、TAP-1/2 依存性であることが知られている。

DNA ワクチン(プラスミド)はそれ自身 CpG モチーフと呼ばれるアジュバント効果を示す塩基配列を持っている。すなわち、原核細胞の DNA は CpG の発現頻度が高く、しかもシトシンのメチル化は約 5% に抑えられている。これに対し、脊椎動物のゲノムでは CpG の発現頻度は抑えられており、しかもシトシンは 70~90% がメチル化されている。このような分子的差異を認識し、DC、B 細胞、マクロファージなどは IL-12、TNF- α 、IFN- α/β などのサイトカインを産生し、MHC クラス II、CD 80/86、CD 40 の発現を増強する。この結果、Th 細胞は Th 1 に誘導され、CTL の分化誘導を促すと考えられる(図 2-C)。合成オリゴ DNA を使った研

究により、CpG モチーフとして機能する最適な配列はマウスでは GACGTT、ヒトでは GTCGTT であることがわかった⁹⁾。また、ノックアウトマウスを使った研究により、CpG モチーフに対する細胞応答には Toll-like receptor (TLR) 9 が関係していることが判明している¹⁰⁾。

2. 遺伝子銃法による感作のメカニズム(図 2-B)

遺伝子銃による DNA ワクチンの接種では表皮に存在する APC であるランゲルハンス細胞(LC)に直接 DNA ワクチンが導入されるため、LC は成熟し所属リンパ節に移行、副皮質で T 細胞に抗原提示をされると考えられる。LC はもともと CC chemokine receptor (CCR) 6 を発現しているため、表皮ケラチノサイトが産生する CCR 6 のリガンドである MIP-3 α により表皮にリクルートされる。しかし、いったん“danger signal”により成熟すると、LC は CCR 7 を発現する。このリガンドである MIP-3 β (および SLC)はリンパ節内の高内皮性小静脈に発現しているためリンパ節に移行する¹¹⁾。遺伝子銃では Th 2 細胞が選択的に誘導されることはすでに記した。この理由はプラスミドが直接 LC に導入され、TLR 9 による応答をバイパスするためと考えられている。

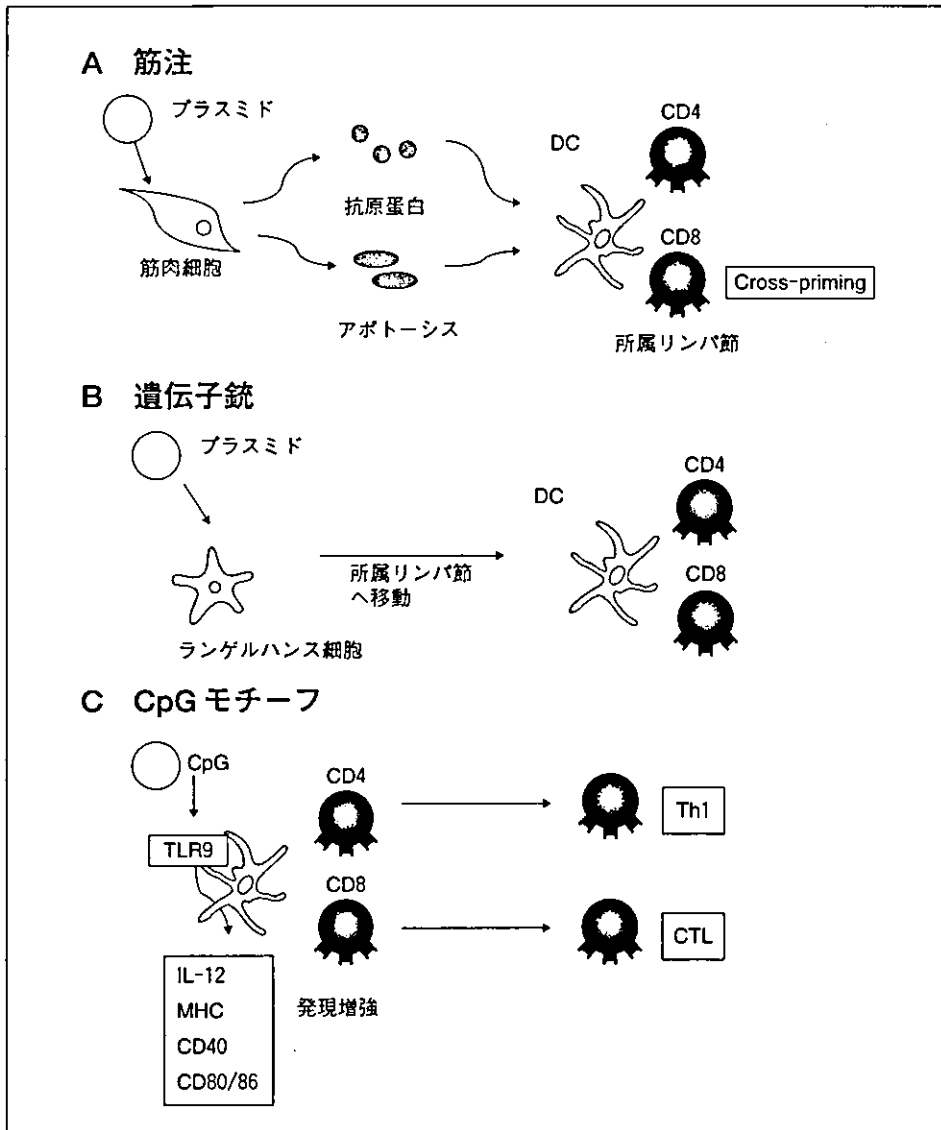


図2 DNAワクチンによって誘導される細胞性免疫応答の機序

エピソード DNA ワクチン

病原体の細胞外感染に対しては抗体が、溶菌、オプソニンによる貪食、中和反応などを引き起こし生体防御に極めて重要な役割を果たす。事実、偏性細胞内寄生体であるウイルスも予防接種により誘導された中和抗体で感染を防御できる。しかしながら、ウイルスの慢性感染(細胞内感染)、結核菌、レジオネラ、サルモネラなどの細胞内寄生菌による感染、原虫の感染に対する防御に

は抗体は無効であり、細胞性免疫の発動が必要となる。また、感染防御に必要な細胞性免疫の種類も病原体の寄生部位によって異なる。図3に示すように、ウイルス、リケッチア、原虫など細胞質内に寄生するものに対してはCTLが、結核菌、サルモネラ、レジオネラなど食胞内に寄生するものに対してはTh1が防御免疫として働くことが知られている。もちろん、前述したように食胞内に寄生した病原体に対してはcross-primingのメカニズムで、CTLも有効である可能性は残る。しかし、その逆、すなわち細胞質内寄生体に対してTh1が防御効

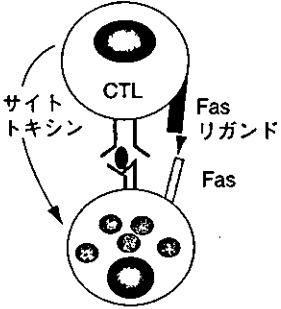
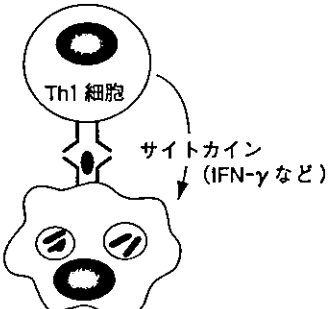
寄生部位	細胞質内	食胞内
病原体	ウイルス リステリア リケッチア 原虫	ミコバクテリア チフス菌 リステリア レジオネラ ブルセラ エルシニア クラミジア
防御免疫	<p>CTL</p>  <p>感染細胞の傷害</p> <p>サイトトキシン： パーフォリン、グランザイム</p>	<p>Th1 細胞</p>  <p>マクロファージ活性化</p>

図3 細胞内寄生体感染とそれに有効な細胞性免疫

果を示すという報告はない。これらの細胞性免疫の感染防御機構はどのようなものであろうか。Th 1 細胞はマクロファージの殺菌能を IFN- γ などで高めることにより、食胞内に寄生した病原体を排除すると考えられている。CTL のウイルス感染細胞に対する効果については考えやすい。感染ウイルスの増殖の場である宿主細胞を破壊すれば、ウイルス核酸の複製およびウイルス構造蛋白の合成およびそれらを集合しウイルス粒子をつくることは不可能となる。しかし、細菌の場合はどうであろうか。感染細胞を破壊しても細菌は放出され他の宿主細胞に侵入する可能性がある。CTL の有効性に対しては2つの説明がある。1つは CTL が産生する「グランジュラゼシン」が標的宿主細胞にパーフォリンで開けられた穴を通り、細胞内寄生細菌を殺菌するという機構である¹⁰⁾。2つ目は CTL により感染細胞を破壊することで、細菌を追い出し、食細胞に貪食、殺菌させる機序である。われわれは、目的の病原体に応じて感染防御に必要な

CTL または Th 1 細胞を任意に感作できるエピトープ DNA ワクチンの研究を行った。エピトープ DNA ワクチンの利点は他に、①抗原全長をコードする DNA ワクチンよりもはるかに強い免疫を誘導できる：これは抗原の細胞内プロセッシングをスキップし、効率よくエピトープのみをつくるためと考えられる、②毒素を抗原として用いる場合も毒性を排除できるなどが挙げられる。反対に欠点としては MHC (HLA) タイプに応じたエピトープを用意しなければならず、煩雑な点がある。

エピトープ DNA ワクチンの研究を行うため、細胞内寄生菌としてリステリアを用いた。その理由はこの細菌の感染防御には CTL と Th 1 細胞の両方が有効であるため、両細胞性免疫を誘導するワクチンの研究に適しているからである。リステリアは宿主細胞の食胞に入ると、LLO を分泌することにより食胞を破壊し細胞質へ移行する性質を持っている。このため CTL と Th 1 細胞の両者が有効と考えられる。

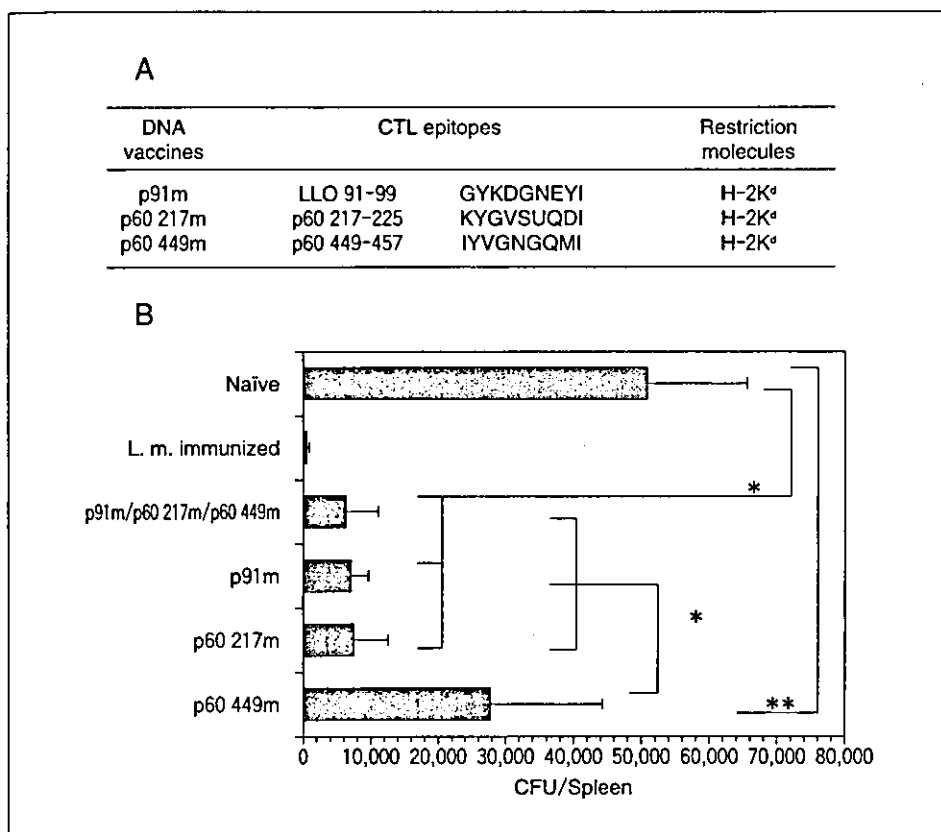


図4 リステリアに対する CTL 誘導型 DNA ワクチンとこれらによって誘導される感染防御能
 A: リステリアの H-2K^d 拘束性 CTL エピトープとこれを発現する DNA ワクチン。

B: 3種の CTL 誘導型 DNA ワクチンによるリステリア感染防御能。リステリア感染 3 日後の脾臓における菌数 (CFU) を測定した。

Naïve: 非免疫マウス。L. m. immunized: リステリア生菌免疫マウス

*: $p < 0.01$ **: $p = 0.02$

1. CTL 誘導型 DNA ワクチン

CTL 誘導型 DNA ワクチンを作製するためには、防御抗原のうち MHC クラス I 結合性ペプチドを発現するプラスミドを構築すればよい。リステリアの防御抗原としては LLO, p 60 (murein hydrolase), Mpl (metalloprotease) が知られている。われわれは図 4-A に示すような H-2K^d 拘束性 DNA ワクチンを作製した。発現ベクターとしては CMV プロモーター/エンハンサーを持つ pCI を用いた。まず、われわれが遭遇した問題は細菌と哺乳類とのコドンの使用頻度の違いであった。p 91 プラスミドで LLO 91-99 をコードする DNA 塩基配列を野生型のもの (p 91 w) とコドンをマウス (哺乳類) に適合させたもの (p 91 m) を作製し、BALB/c マウス (H-2^d) に免

疫したところコドンを適合させたものが CTL 誘導能に優れていることが判明した¹³⁾¹⁴⁾。さらに、p 91 m は CD 4⁺T 細胞非依存性に CTL を誘導することがわかった¹⁵⁾。

これら 3 種の DNA ワクチンを遺伝子銃で接種し、CTL 誘導能を比較したところ、p 91 m > p 60 217 m > p 60 449 m であった。この結果より、LLO 91-99 が最も優勢なエピトープであり、p 60 449-457 が劣勢エピトープであることが判明した。様々な実験結果より、各エピトープに対する CTL 間の干渉は存在しないことがわかった。また、CTL 誘導能は感染防御能と平行したが、興味あることにこれら 3 種の DNA ワクチンを同時に免疫しても、その感染防御能は p 91 m 単独のものを超えなかった (図 4-B)¹⁶⁾。このことは、CTL 誘導型ワクチン

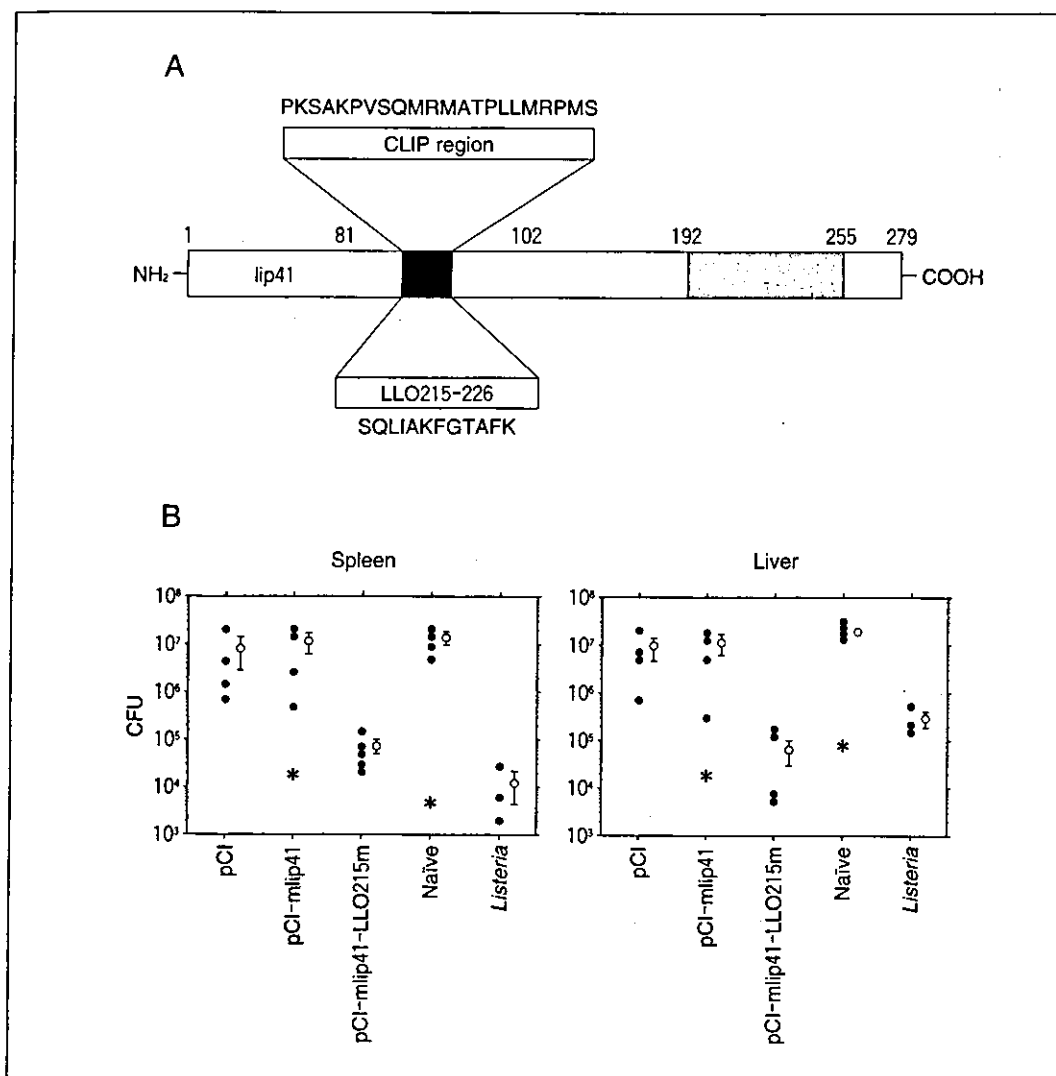


図5 Th 誘導型 DNA ワクチン

A：不変(Ii)鎖の CLIP 領域を LLO 215-226 (H-2 E_b 結合性)に置換した DNA ワクチン(pCI-mlip 41-LLO 215 m)。

B：この DNA ワクチンによるリステリア感染防御能の脾臓、肝臓における誘導能

pCI：ベクター・コントロール、pCI-mlip 41：不変鎖ウィークルのコントロール、Naive：非免疫マウス・コントロール、
Listeria：リステリア生菌免疫

*：p < 0.03

の場合、最も優勢なエピトープ単独で十分感染防御能が得られることを意味する。

2. Th 誘導型 DNA ワクチン

CTL 誘導型 DNA ワクチンは CTL エピトープのコードンを宿主動物に適合させ、発現ベクターに挿入するだけで有効であった。これに対し、Th 誘導型 DNA ワクチンの作製は困難を極めた。MHC クラス II 結合性の Th

エピトープのみを発現するプラスミドでは Th 細胞を全く感作できなかった。これは細胞質内でエピトープが発現するため当然の帰着であった。そこで、Th エピトープにシグナルシーケンスをつけ分泌型にし、MHC クラス II 経路に乗せることを目論んだが失敗に終わった。最終的に不変鎖(Ii 鎖)をウィークルとして用いることで Th 細胞の感作に成功した。不変鎖は粗面小胞体内で MHC クラス II 分子に会合しており、特にその CLIP

領域は MHC クラス II 分子のペプチド結合溝に結合している。そこで、われわれはこの CLIP 領域を Th エピトープと置換し、エピトープを強制的にクラス II 分子に結合させることを計画した¹⁷⁾。図 5-A には Th 誘導型 DNA ワクチンのコンストラクトを示す。不変鎖 (Ii p 41) の CLIP 領域を H-2 E^b 結合性の LLO 215-226 に置換した。これを C3H/He マウス (H-2^b) に遺伝子銃で免疫したところ、IFN- γ を産生する特異的 Th 1 細胞を誘導することができた¹⁸⁾。この結果はある意味で予想と異なった。なぜなら、前述したように遺伝子銃による DNA ワクチンの接種は Th 2 細胞を選択的に誘導することが知られているからである。われわれは、エピトープ DNA ワクチンは抗原全長を発現するワクチンに比し、APC によって提示されるペプチド/MHC 分子の量が多いと考えている。T 細胞レセプターの強い刺激は Th 1 へのシフトを促すのかもしれない。この Th 1 細胞誘導性に一致して、DNA ワクチン (pCI-mIip 41-LLO 215 m) はリステリアに対する感染防御能をリステリア生菌免疫 (*Listeria*) と同等のレベルまで誘導することができた。

3. 多エピトープワクチン (polyepitope vaccine)

前述したようにエピトープ DNA ワクチンの欠点は、各種 MHC (HLA) タイプに対応したエピトープワクチンを用意し、被接種者の HLA タイプを同定し、適応したワクチンを接種しなければならないという煩雑性にある。これを克服する方法として、多エピトープワクチンがある¹⁹⁾。これは、各エピトープ DNA をタンデムに連結して発現ベクターに挿入したものである。この場合、各エピトープ間に酵素による切断を考慮した配列を挿入する方法、あるいは全くこのことを考慮せずエピトープを直接連結する方法がある。また、多エピトープワクチンには一定の MHC タイプに対応した各種ウイルスのエピトープ DNA を連結して発現させる方法も報告されている。

4. エピトープ DNA ワクチンの改良

MHC 分子へのペプチドの結合親和性を高めるために、

MHC 分子に対するアンカー残基を最適なものに置換する試みが行われている²⁰⁾。これを人工 T 細胞エピトープと呼ぶ。これとは逆に T 細胞レセプターへの親和性を高め、T 細胞の反応性を高める試みも行われている²¹⁾。前者は MHC 分子のタイプによりアンカー残基が判明しているため、比較的容易に行うことができるが、後者の方法は試行錯誤が必要であり、簡単ではない。

リステリア弱毒株をヴィークルとした 抗結核菌 DNA ワクチン

DNA ワクチンを効率よく宿主細胞内へ導入するため、細胞内寄生菌の弱毒株をヴィークルとして用いる方法が試みられている。*Shigella flexneri*²²⁾ および *Salmonella typhimurium*²³⁾ の栄養素要求株に真核細胞の発現ベクターを使った DNA ワクチンを導入し、動物に接種するものである。われわれは *S. typhimurium* をヴィークルとした DNA ワクチンを作製したが、期待通りの結果は得られなかった。*S. typhimurium* は宿主の APC に取り込まれた後、食胞内で壊れ、DNA ワクチンを放出するため、転写、翻訳に支障を来す可能性がある。また、グラム陰性菌をヴィークルとして用いると LPS (リポ多糖) がプラスミドからの蛋白合成を阻害する可能性がある。

そこで、われわれはグラム陽性細胞内寄生菌であるリステリアの弱毒株をヴィークルとして、DNA ワクチンを宿主細胞 (APC) 内に導入することを計画した。リステリアは食胞から細胞質内へ移行する点、LLO が Th 1 へシフトさせる点からもこの目的に最適である。弱毒リステリア株としてはレシチナーゼ・オペロン (*mpl*, *actA*, *plcB*) を欠失した株を用いた。これにリステリア溶菌性ベクター [リステリアに対するファージのリジン遺伝子 (*PLY118*) の上流に *actA* プロモーターを配したプラスミド] に結核菌の主要な防御抗原である Ag 85 A, Ag 85 B, MPT 51 をコードする遺伝子を挿入し、エレクトロポレーションで導入した。この組換えリステリア株を C 57 BL/6 マウスに腹腔投与したところ、結核菌特異的 Th 1 細胞の誘導に成功した (Miki K, et al, manuscript in preparation)。このワクチンは経口投与可能で、結核菌

の感染防御に重要と考えられる粘膜ホーミング性T細胞($\alpha_1\beta_1$, インテグリン陽性)の誘導に有効である可能性もある。周知の通り、結核に対する生菌ワクチンであるBCGはその有効性について議論があり、米国では使用されていない。BCGの有効性について一致した見解は小児期の有効性と血行転移(粟粒結核)の阻止のみである。したがって、BCGよりも有効なワクチンの開発は重要な課題の1つである。

組換えレトロウイルス導入 DC ワクチン

DCはナイーブT細胞を有効に感作するプロフェッショナルAPCである。DCにペプチドをパルスして免疫を試みは、腫瘍免疫の分野で盛んに行われている²⁴⁾。われわれはこれをさらに改善するため、抗原遺伝子をレトロウイルスでDCに導入し、効率よく抗原提示を行うDCの作製法を確立した。プラスミドpMXとパッケージ細胞株Phoenixを用いてリステリアのCTLエピトープLLO 91-99を発現するレトロウイルスを作製した。これをBALB/cマウスの骨髄由来DCに感染させ、マウスに経静脈的に投与した。われわれの方法によるレトロウイルスのDCへの導入効率は34.8%であった。この免疫法で誘導されるCTL活性および感染防御能はDNAワクチンによるものより強力であった(Nakamura Y, et al, manuscript in preparation)。

感作—ブースト(prime-boost)ヘテロ免疫法

DNAワクチンで最近最もホットな話題は感作—ブースト・ヘテロ免疫法である。これは感作とブーストを同じ抗原を含む異なった組換えワクチンで行う方法である²⁵⁾。これにより、同じワクチンで感作—ブーストを行った場合に比し、約50~100倍のCTL活性を誘導できる。この方法は主にHIV²⁶⁾、マラリア原虫²⁷⁾感染に対するワクチン研究で実施されており、通常DNAワクチンで感作した後、組換えワクシニアウイルス(MVA: modified vaccinia Ankara, Ankara株は高度に弱毒化したワクシニア)でブーストが行われる。ブーストに組換

えfowlpox(鶏痘)ウイルスが使われる場合もある²⁸⁾。しかしながら、この逆、すなわち感作を組換えワクシニアで行い、ブーストをDNAワクチンで行った場合は増強効果は認めない。

HIV-1またはSIV特異的組換えDNAワクチン—fowlpoxプロトコルでサルを免疫すると、強い細胞性免疫が誘導されサルにHIV-1またはSIVに対する感染防御能が賦与される²⁹⁾。

現在、HIV-1特異的組換えDNA—MVAプロトコルで臨床治験が行われており、①CTL誘導能、②CTLの持続期間、③HIV-1に対する感染防御能、④AIDS発症防御能について検討されている。

同様の方法でエボラ出血熱ウイルスに対するワクチンの研究が行われている²⁹⁾。サルに組換えDNA—アデノウイルスで免疫を行い、エボラウイルスをチャレンジ感染させると、感染が防御されたと報告されている。結核に対しても組換えDNA—MVA免疫が有効であることがマウスで証明されている。

粘膜ワクチン

多くの重要な感染症、すなわち気道感染症、腸管感染症、性器感染症などは粘膜を侵入門戸とする。したがって、これらに対する感染防御には粘膜免疫を誘導することが必須となる。例えば、HIVのウイルス複製は主に腸管粘膜で起きることがわかっている。このため、粘膜ホーミング型($\alpha_1\beta_1$)CTLの誘導がHIVの血中への播種を防ぐ意味で重要である。実際、マウスにHIVワクチンを粘膜接種した後、HIVgp160を発現する組換えウイルスを粘膜チャレンジすると粘膜ホーミング性CTLによって感染が防御されることがわかっている。この場合、全身性(systemic)CTLは粘膜感染を防御するには不十分であった。

粘膜免疫を誘導するため、DNAワクチンを粘膜接種、特に経鼻免疫する方法が試みられている。粘膜免疫のアジュバントとしてCT(cholera toxin)とLT(*E.coli* labile toxin)が知られている。これらをDNAワクチンの粘膜接種の際にアジュバントとして用いることができる。し

表3 DNA ワクチンの効果増強戦略

A. サイトカイン, ケモカイン, 副刺激因子			
サイトカイン, ケモカイン, 副刺激因子	Th 1	Th 2	CTL
IL-2	+		
GM-CSF	+	+	+
IL-12	+	-	+
GM-CSF+IL-12	+	-	+
GM-CSF+IL-12+TNF- α	+	+	+
IL-15		+	+
CD 80+IL-12	+		+
CD 86+GM-CSF+IL-12			+
CD 80+ICAM-1+LFA-3 (TRICOM)	+		+
CD 154	+		+
CXCL 10 (IP-10)+	+	+	+
CCL 7 (MCP-3)			
CCL 3 (MIP-1 α)			+
CCL 5 (RANTES)			+
B. 免疫抑制回路の阻害			
阻害法	Th		CTL
抗 CTLA-4			+
抗 CD 25	+		+
抗 CTLA-4+ 抗 CD 25			+
IL-13 R α 2-Fc			+

+ : 増強, - : 抑制, ブランク : 不明

かし, CT は LT に比し IL-12 産生を抑制する作用があり, Th 1 誘導が必要な場合は適当ではないかもしれない。

前項の感作-ブースト・ヘテロ免疫で, ワクシニア DNA ワクチンのプロトコルは免疫増強効果がないと記した。しかし, 粘膜免疫を誘導するためには最初組換えワクシニアで粘膜感作を行い, その後に DNA ワクチンでブーストをかければ, 強い粘膜細胞性免疫を誘導できるようである。

DNA ワクチン効果の増強

近年解明された免疫応答の分子機構に基づき, DNA

ワクチンの効果を高める様々な方法が考えられる。表 3-A には実際に研究された, または可能性のあるサイトカイン, ケモカイン, 副刺激因子を列記した。DNA ワクチンではこれらの分子を同じプラスミドで発現させたり, 抗原との融合蛋白として発現させることが可能である。GM-CSF, IL-12, TNF- α の組み合わせは CTL の誘導に効果的である。また, IL-15 は記憶 CTL を誘導することが知られている。副刺激因子に関しては, 3 種類すなわち, CD 80, ICAM-1 (CD 54), LFA-3 (CD 58) を同時に発現する TRICOM が作製されている。これは DC を “super APC” に形質転換できる。DNA ワクチンの効果を増強する方法として, 免疫抑制回路を阻害する方法も考えられる(表 3-B)。CTLA-4 (CD 152) が活性化 T 細胞に発現し, CD 80/86 をリガンドとして T 細胞に抑制シグナルを送ることはよく知られている。CD 4⁺ CD 25⁺ T 細胞は抑制性 T 細胞として働く。また, NK T 細胞が産生する IL-13 は IL-4 R α /Stat 6 経路を介してマウス CD 8⁺ T 細胞を抑制する。これら抑制回路を阻害することで DNA ワクチンの効果を増強することも可能である。

おわりに

DNA ワクチンは細胞内寄生体に対する感染防御に必要な細胞性免疫を誘導できることで注目されている。危惧される副反応として①抗 DNA 抗体の誘導, ② DNA ワクチンの宿主ゲノムへの取り込みによる発癌の危険性が挙げられるが, 膨大な実験例にもかかわらず現在までこれらの現象は認められていない。DNA ワクチンは生ワクチンに代わる安全なワクチンとして期待されているが, 実際の免疫誘導能はこれまで生ワクチンを凌駕できなかった。しかし, 最近感作-ブースト・ヘテロ免疫法の考案により, DNA ワクチンの臨床的役割が明確になりつつある。

謝 辞

本論文に引用したデータの一部は, 浜松医科大学微生物学教室: 内嶋雅人, 第二内科: 山田 孝, 第二外科:

三鬼慶太および琉球大学医学部附属沖縄・アジア医学研究センター感染免疫研究分野：吉田篤司らとの共同研究によって得られたものであることを記し、ここに謝意を表明する。

文 献

- 1) Wolff JA, Malone R, Williams P, et al : Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247 : 1465-1468, 1990
- 2) Liu MA, Yasutomi Y, Davies ME, et al : Vaccination of mice and nonhuman primates using HIV-gene-containing DNA. *Antibiot Chemother* 48 : 100-104, 1996
- 3) Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, et al : Heterologous protection against influenza by injection DNA encoding a viral protein. *Science* 259 : 1745-1749, 1993
- 4) Pertmer TM, Roberts TR, Haynes JR : Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J Virol* 70 : 6119-6125, 1996
- 5) Yoshida A, Nagata T, Uchijima M, et al : Advantage of gene gun-mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses. *Vaccine* 18(17) : 1725-1729, 2000
- 6) Corr M, Lee DJ, Carson DA, et al : Gene vaccination with naked plasmid DNA : mechanism of CTL priming. *J Exp Med* 184 : 1555-1560, 1996
- 7) Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, et al : Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J Immunol* 158 : 4529-4532, 1997
- 8) Delphine L, Zhenlin L, Maryline M, et al : Muscle-Specific Expression of Hepatitis B Surface Antigen : No Effect on DNA-Raised Immune Responses. *Virology* 260 : 74-83, 1999
- 9) Krieg AM : An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J Lab Clin Med* 128 : 128-133, 1996
- 10) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al : A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408 : 740-745, 2000
- 11) Charbonnier A-S, Kohrgruber N, Kriehuber E, et al : Macrophage Inflammatory Protein 3 α Is Involved in the Constitutive Trafficking of Epidermal Langerhans Cells. *J Exp Med* 190 : 1755-1768, 1999
- 12) Stenger S, Rosat JP, Bloom BR, et al : Granulysin : a lethal weapon of cytolytic T cells. *Immunol Today* 20 : 390-394, 1999
- 13) Uchijima M, Yoshida A, Nagata T, Koide Y : Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *J Immunol* 161 : 5594-5599, 1998
- 14) Nagata T, Uchijima M, Yoshida A, Kawashima M, Koide Y : Codon optimization effect on translational efficiency of DNA vaccine in mammalian cells : analysis of plasmid DNA encoding a CTL epitope derived from microorganisms. *Biochem Biophys Res Commun* 261 : 445-451, 1999
- 15) Yoshida A, Nagata T, Uchijima M, Koide Y : Protective CTL response is induced in the absence of CD 4 $^{+}$ T cells and IFN- γ by gene gun DNA vaccination with a minigene encoding a CTL epitope of *Listeria monocytogenes*. *Vaccine* 19(30) : 4297-4306, 2001
- 16) Yamada T, Uchiyama H, Nagata T, et al : Protective CTL responses induced by DNA immunization against immunodominant and subdominant epitopes of *Listeria monocytogenes* are noncompetitive. *Infect Immun* 69(5) : 3427-3430, 2001
- 17) Nagata T, Higashi T, Aoshi T, et al : Immunization with plasmid DNA encoding MHC class II binding peptide/CLIP-replaced invariant chain (Ii) induces specific helper T cells in vivo : the assessment of Ii p 31 and p 41 isoforms as vehicles for immunization. *Vaccine* 20 : 105-114, 2001
- 18) Nagata T, Aoshi T, Suzuki M, et al : Induction of protective immunity to *Listeria monocytogenes* by immunization with plasmid DNA expressing a helper T-cell epitope that replaces the class II-associated invariant chain peptide of the invariant chain. *Infect Immun* 70(5) : 2676-2680, 2002
- 19) Smith SG : The polyepitope approach to DNA vaccination. *Curr Opin Mol Ther* 1 : 10-15, 1999
- 20) Ruppert J, Sidney J, Celis E, et al : Prominent Role of Secondary Anchor Residues In Peptide Binding to HLA-A 2.1 Molecules. *Cell* 74 : 929-937, 1993
- 21) Slansky JE, Rattis FM, Boyd LF, et al : Enhanced Antigen-Specific Antitumor Immunity with Altered Peptide Ligands that Stabilize the MHC-Peptide-TCR Complex. *Immunity* 13 : 529-538, 2000
- 22) Sizemore DR, Branstrom AA, Sadoff JC : Attenuated Shigella as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270 : 299-302, 1995
- 23) Darji A, Guzman CA, Gerstel B, et al : Oral somatic

- transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* **91** : 765-775, 1997
- 24) Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, et al : Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* **183** : 317-322, 1996
- 25) Ramshaw IA, Ramsay AJ : The prime-boost strategy : exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today* **21** : 163-165, 2000
- 26) Allen TM, Vogel TU, Fuller DH, et al : Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from Rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. *J Immunol* **164** : 4968-4978, 2000
- 27) Schneider J, Gilbert SC, Blanchard TJ, et al : Enhanced immunogenicity for CD 8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* **4** : 397-402, 1998
- 28) Kent SJ, Zhao A, Best SJ, et al : Enhanced T-Cell Immunogenicity and Protective Efficacy of a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vaccine Regimen Consisting of Consecutive Priming with DNA and Boosting with Recombinant Fowlpox Virus. *J Virol* **72** : 10180-10188, 1998
- 29) Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE : Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* **408** : 605-609, 2000