

**Fig. 1. Intracellular IFN- $\gamma$  staining of CD8<sup>+</sup> T cells in response to SARS-nucleocapsid-derived peptides**

Mice were immunized with either Ad-WT (A, C and E) or Ad-SARS-N (B, D and F). Spleen cells were then prepared and cultured with or without (A and B) either N-223 (C and D) or N-227 (E and F) for 5 hours. After stimulation, cells were stained for their surface expression of CD8 (x axis) and intracellular IFN- $\gamma$  (y axis). The numbers shown indicate the percentages of CD8<sup>+</sup> cells that are positive for intracellular IFN- $\gamma$ .

厚生労働科学研究費補助金（萌芽の先端医療技術推進研究事業）  
分担研究年度終了報告

3. 鳥インフルエンザウイルス関連抗原を用いたインフルエンザワクチンの開発

分担研究者 梶野喜一 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 助教授

研究要旨 H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルス由来ペプチドによる抗原特異的キラーT細胞(CTL)の活性化誘導法をマウス *in vivo* 実験系で検討した。マウス MHC 結合ペプチドについて実験を行った結果、インフルエンザウイルス核蛋白(NP)の 366-374 番残基をリポソームと結合して免疫した場合のみ、強い CTL 活性を誘導できる事が判明した。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザ感染が世界中で猛威を振るっている現在、トリ型インフルエンザウイルスのヒト型への変異が危惧されている。しかし、いつかは来ると予想されているパンデミックに対して、現存する不活化ワクチンでは迅速な対応はほぼ不可能である。我々は、大量合成を短期間で出来るリポソームとペプチドをワクチンとして利用することで、新型の強毒ウイルスに対して迅速かつ有効な対策が可能であると考え、それらによるキラーT細胞活性の効率的な誘導法の開発を目的として、研究を行った。

B. 研究方法

H5N1 型インフルエンザウイルス A/Hong Kong/483/97(HK483)の核蛋白 NP のアミノ酸配列のうち、マウス MHC class I (H-2D<sup>b</sup>)に結合する配列を数種類決定し、C57BL/6(B6)マウスを、これらのペプチドまたはコントロールペプチドで免疫した。ペプチドはリポソームに結合したものと結合しないもの、ポジティブコントロールとして、活性化樹状細胞にパルスしたものをそれぞれ比較した。

(倫理面への配慮)

本研究に使用したマウスの処置は、「北海道大学における動物実験に関する指針」に従って適切に行わ

れた。

C. 研究結果

1. マウス CTL エピトープの検索とリポソーム結合によるペプチド抗原の CTL 活性増強：

H-2D<sup>b</sup>に結合すると予想される HK483 由来ペプチド 5 種類を、インターネット上で利用可能なプログラムを用いて検索し、合成した。うち 2 種類(bF366: ASNENVEAM および bF296: YSLVGIDPF)をリポソームに結合し、CpG とともに B6 マウスに皮下投与した。リポソームと結合しなかったペプチドは何れも *in vivo* での CTL 活性を誘導出来なかったが、リポソームと結合したペプチドは、どちらも CTL 活性を誘導し、bF366 の方がやや強い CTL 活性を示した(図 1)。

2. ペプチド抗原の交差性と相互作用：

アミノ酸残基が 2 つ違う A/Puerto/Rico/8/34 株の抗原 NP366:ASNENMETM と bF366 により活性化誘導した CTL の交差性を調べた。NP366 により誘導された CTL は特異性が高く、bF366 に対してほとんど反応しなかったが、bF366 により誘導された CTL は NP366 に対して弱い交差性を示した(図 2)。しかし、これら 2 種類を同時に投与した場合は、bF366 に対する CTL 活性に影響はほとんどみられないのに対し、NP366 に対する CTL 活性は低下する結果となった(図 3)。

OVA ペプチドなど MHC への結合が強いペプチドはリポソームを結合しなくとも十分な CTL 活性を誘導可能だが、bF366 を含むほとんどのエピトープは MHC との親和性が弱く、活性化樹状細胞を使っても CTL 活性の誘導は難しい。実験結果より、ペプチドをリポソームに結合して免疫することで活性化樹状細胞よりも強力に CTL 活性を誘導出来る事が明らかになった。抗原変異の激しいインフルエンザウイルスに対応するため、ワクチン創製に際して、抗原ペプチドとして変異抗原に交差性の強い CTL を誘導するものを使うか、あるいは抗原特異性の高い CTL を誘導するペプチドを数種類混合することが考えられる。

以上、リポソームに結合して免疫する事で、本来は免疫原性の低い抗原ペプチドでも強力な抗原特異的 CTL 活性を誘導する事が明らかとなり、実用的なワクチンとしての可能性が示唆された。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし。

##### 2. 学会発表

該当なし。

#### E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

該当なし。

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

##### 3. その他

該当なし。

図1 HK483 由来ペプチドによる CTL 活性

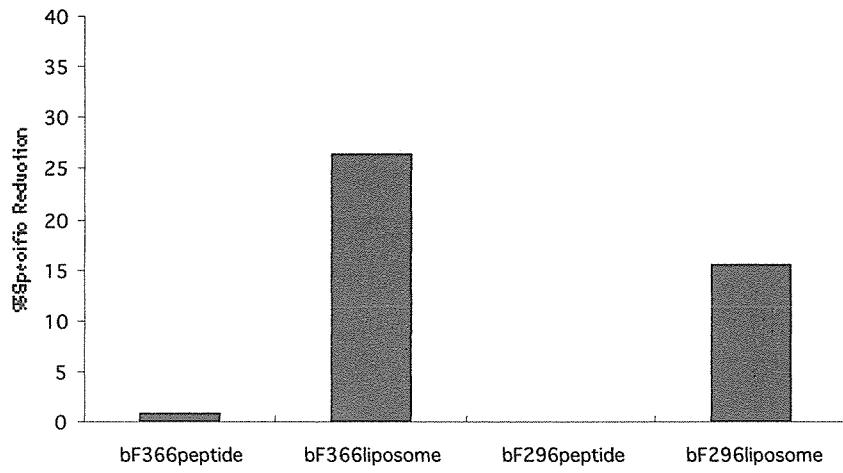


図2 bF366+lipo と NP366+lipo の交差性試験

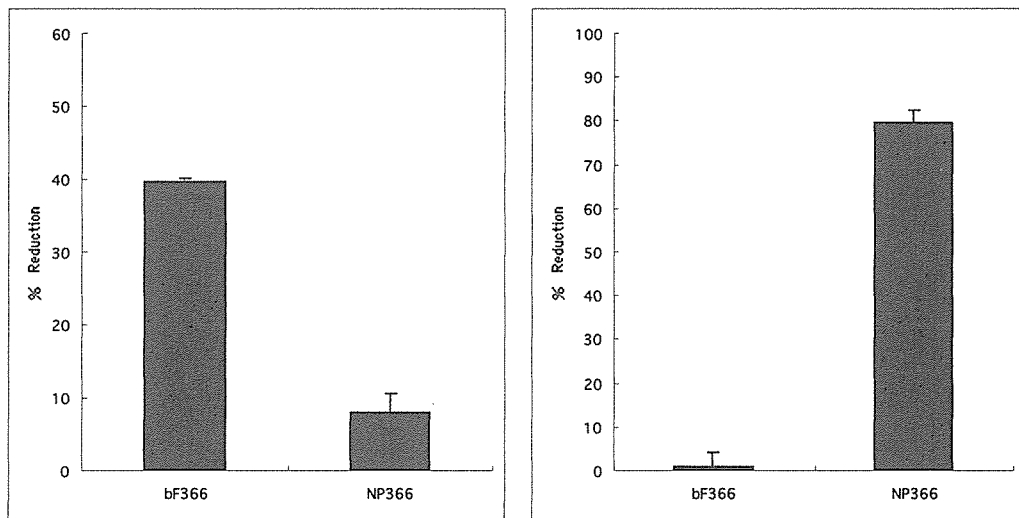
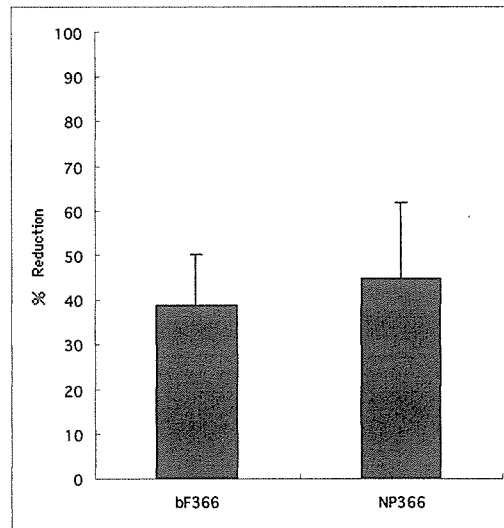


図3 bF366+lipo と NP366+lipo の混合免疫



厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究年度終了報告書

4. リポソーム結合抗原の生体内における移動経路に関する研究

分担研究者 石川 昌 東京大学大学院分子予防医学教室 助教授

研究要旨 不飽和脂肪酸から成るリポソームと卵白アルブミン（OVA）との結合物を経口投与してそのパイエル板および粘膜固有層への抗原取り込みを検討したところ、飽和脂肪酸から成るリポソームと OVA との化合物をリポソーム経口投与した場合と異なり、投与後 1、3、7、20 時間のいずれの時点においてもパイエル板上皮下（SED）領域への有意な取込が認められなかった。また粘膜固有層、腸管膜リンパ節、脾臓においても明らかな抗原局在は認められなかった。また、腸管結札により腸管内に直接投与をした場合にも、有意な取込みは認められなかった。一方、従来型の OVA-飽和脂肪酸リポソームは経口投与後に SED 領域のみならず粘膜固有層への直接的な取り込みが認められた。さらに OVA-不飽和脂肪酸リポソーム経口投与による CD8T 細胞の活性化を MHC クラス I テトラマーによる FACS 解析により検討したところ、腹腔内投与により有意な CD8T 細胞の活性化が認められたが、経口投与においては有意な CD8T 細胞の活性化が認められなかった。以上の結果から、OVA-不飽和脂肪酸リポソーム経口投与による CTL 誘導能は弱く、経口免疫においては不飽和脂肪酸リポソーム結合抗原よりも飽和脂肪酸リポソーム結合抗原の方が適していることが示唆された。

A. 研究目的

CTL 誘導能を有する OVA-不飽和脂肪酸リポソームを用いて経口投与後の抗原移動を明らかにし、腸管粘膜における CTL 産生の場を特定することを目的とした。

B. 研究方法

リポソーム OVA を経口投与した後、経時的に凍結切片を作成し、パイエル板、腸間膜リンパ節、粘膜固有層、脾臓における抗原局在を共焦点レーザー顕微鏡ないし経口顕微鏡で観察した。さらに MHC クラス I テトラマー（Kb-SIINFEKL）を用いて抗原特異的 CD8T 細胞の産生を FACS にて解析した。

（倫理面への配慮）

東京大学動物実験指針に基づき行われた。

C. 研究結果

OVA-不飽和脂肪酸リポソームを経口投与してそのパイエル板および粘膜固有層への抗原取り込みを検討したところ、投与後 1、3、7、20 時間のいずれの時点においてもパイエル板 SED 領域への有意な取込が認められなかった（図 1）。また粘膜固有層、腸管膜リンパ節、脾臓においても明らかな抗原局在は認められなかった（未提示）。また、腸管結札により腸管内に直接投与をした場合にも、有意な取込は認められなかった（図 2）。この場合も経時的変化や他リンパ組織による取込みは見られなかった。一方、OVA-飽和脂肪酸リポソームの経口投与後には SED 領域のみならず粘膜固有層への直接的な取り込みが認められた（図 3）。さらに OVA-不飽和脂肪酸リポソーム経口投与による CD8T 細

胞の活性化を MHC クラス I テトラマーを用いた FACS 解析により検討したところ、腹腔内投与により有意な CD8T 細胞の活性化が認められたが、経口投与においては有意な CD8 T 細胞の活性化が認められなかった (図 4)。

OVA-飽和脂肪酸リポソームの経口投与によりはリポソーム抗原のパイエル板 SED 領域への取り込みに加え、粘膜固有層への取り込みが認められたが、今回行った OVA -不飽和脂肪酸リポソーム投与実験では SED 領域における自家蛍光との明らかな差や粘膜固有層への取り込みは認められなかった。これは OVA -不飽和脂肪酸リポソームを結札した腸管に直接投与しても同様であった。この理由としては、投与したリポソームへの OVA の結合量の違いによるものか、あるいはリポソーム組成の違いによるものかが考えられた。OVA -不飽和脂肪酸リポソーム経口投与による OVA 特異的 CD8 感作能も弱く、当初計画した経口投与後の抗原移動経路や CTL 産生の場の検討の困難性を示唆する結果となった。一方、OVA -飽和脂肪酸リポソームは経口投与後に SED 領域のみならず粘膜固有層への直接的な取り込みが認められた。従って、経口免疫の場合は不飽和脂肪酸リポソーム結合抗原よりも飽和脂肪酸リポソーム結合抗原の方が適していると考えられ、今後リポソーム抗原投与に際しては投与経路によってリポソームの脂質組成を選択することが効果的なワクチンを創製するために重要であると考えられた。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

a. Kinoshita H., Abe J., Akadegawa K., Yurino H., Uchida T., Ikeda S., Matsushima K., Ishikawa S. Breakdown of mucosal immunity in the gut by 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Env. Health.*

*Prev. Med.* 11:256-264, 2006.

b. Ishikawa S. and Matsushima K. Aberrant B1 cell trafficking in a murine model for lupus. *Front. Biosci.* 12: 1290-1803, 2007.

c. Ueha S., Murai M., Yoneyama H., Kitabatake M., Imai T., Shimaoka T., Yonehara S., Ishikawa S. and Kouji Matsushima. Intervention of MAdCAM-1 or Fractalkine alleviates graft-versus-host reaction associated intestinal injury while preserving graft-versus-tumor effects. *Leuk. Biol.* in press.

##### 2. 学会発表

a. 石川昌、木下和洋、百合野秀朗、阿部淳、鈴木淳、松島綱治 ダイオキシンによる腸管免疫の破綻 第 76 回日本衛生学会総会講演集 246、2006.

b. Abe J., Ishikawa S., Suzuki J., Ueha S., Kinoshita H., Matsushima K. Increased Foxp3+ regulatory T cells In a murine model for SLE. *Proc. Jap. Soc. Immunol.* 36: 100, 2006.

c. Sho Ishikawa. Treg trafficking and function of In a murine model for SLE. *Proc. Jap. Soc. Immunol.* 36: 7, 2006.

E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1. 特許取得

該当なし。

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

##### 3. その他

該当なし。

図1 Alexa-OVA 結合不飽和脂肪酸リポソーム胃内投与後のパイエル板における抗原局在

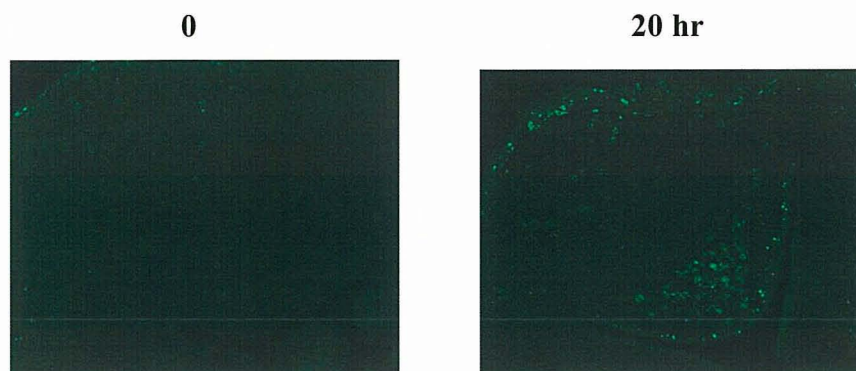


図2 Alexa-OVA 結合不飽和脂肪酸リポソーム直接小腸内投与後のパイエル板における抗原局在

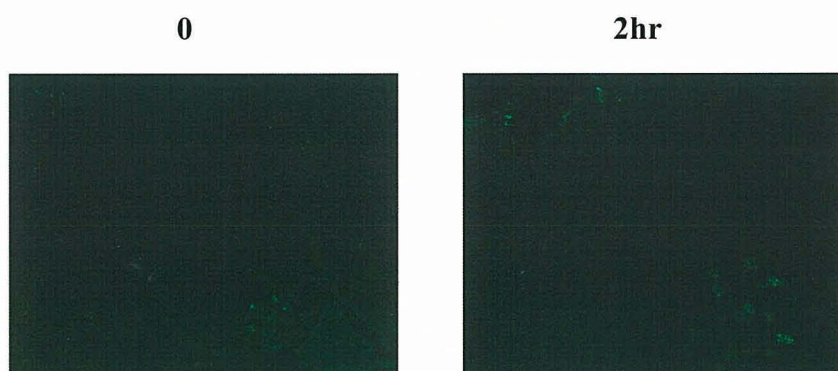


図3 Alexa-OVA 結合飽和脂肪酸リポソーム胃内投与2時間後の抗原局在

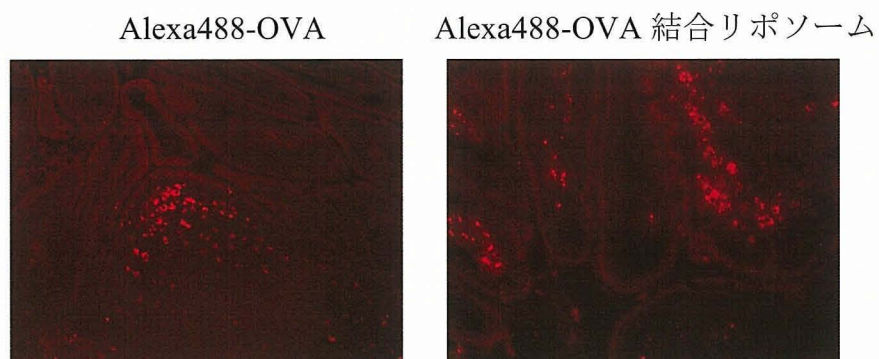
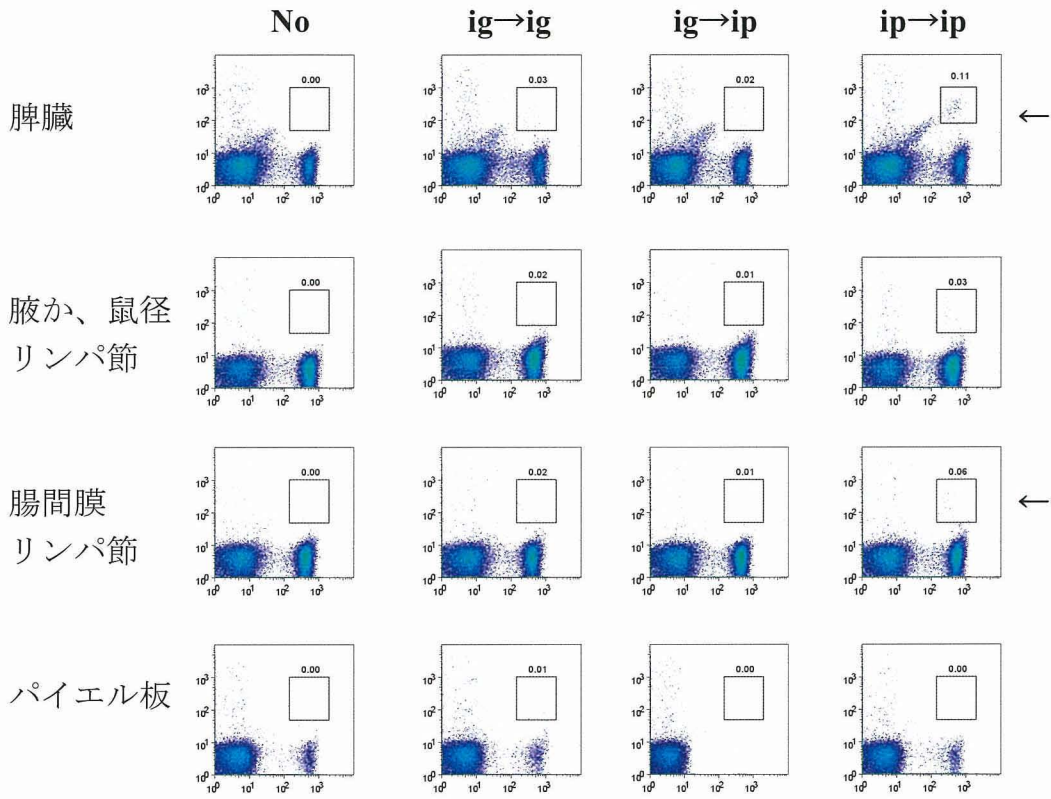




図 4. Alexa-OVA 結合不飽和脂肪酸リポソーム投与による OVA 特異的 CD8T 細胞活性化



厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究年度終了報告書

5. 抗原ペプチドとリポソームとの最適結合方法の検討

分担研究者 種市麻衣子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

研究要旨 本研究事業において使用するリポソーム処方が効率よく CTL を誘導することが可能であることは既に報告したが、今年度はリポソームの薬剤送達（DDS）能力をさらに向上させることを目的として、リポソーム上にリンパ節指向型のペプチド（homing peptide）を結合させて生体内での動態を追跡した。その結果、homing peptide を表面に結合したリポソームは高効率にリンパ節に集積し、かつリポソーム結合抗原に対する免疫誘導が顕著に増強されることが観察された。

A. 研究目的

ワクチン抗原としてのペプチドは目標とする免疫反応をピンポイントで誘導するという利点がある反面、蛋白抗原と比較して免疫原性が低いという欠点がある。その欠点を補うために、ワクチン抗原の候補としてのペプチドの検討の他にリポソームの薬剤送達能力の向上を検討することも必要である。本研究では、homing peptide をリポソームに結合させた場合の薬剤送達について検討した。

B. 研究方法

Alexa<sub>680</sub> で標識した OVA とともに homing peptide をリポソームに結合させ、BALB/c マウスに投与して抗体産生の検討および in vivo イメージングシステムを用いたリポソームの動態解析を行った。

（倫理面への配慮）

本研究に使用する実験動物は「国立感染症研究所実験動物管理運営規定」に基づいて飼育されており、実験動物の取り扱い（社）日本実験動物学会の定めた「動物実験の指針」に従って、苦痛の軽減、安楽死等に配慮しつつ行っている。

C. 研究結果

homing peptide を結合したリポソームはリポソーム結合抗原に対する免疫応答が顕著に増強されることが観察された（図-1）。また、in vivo イメージングシステムを用いた解析の結果、homing peptide を結合したリポソームは脾臓、腸間膜リンパ節に集積していることが観察された（図-2）。

リンパ節指向型の homing peptide はリポソームの薬剤送達能力の向上に寄与し、リポソーム結合抗原に対する免疫誘導を顕著に増強することが明らかとなった。本年度の検討において見出された homing peptide による送達力の向上効果を踏まえ、次年度以降はウイルス由来ペプチドを用いて CTL 誘導効果への影響を検討する予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Taneichi M, Tanaka Y, Kasai M, Mori M, Nishida M, Yamamura H, Mizuguchi J, Uchida T. Induction of differential T-cell epitope by plain- and liposome-

coupled antigen. *Bioconjugate Chemistry* 2006;17:899-904.

2. Taneichi M, Ishida H, Kajino K, Ogasawara K, Tanaka Y, Kasai M, Mori M, Nishida M, Yamamura H, Mizuguchi J, Uchida T. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8+ T-cells and induce potent antitumor immunity. *J. Immunol.* 2006;177:2324-2330.

## 2. 学会発表

1. 種市麻衣子、石田英晃、梶野喜一、小笠原一誠、田中ゆり子、笠井道之、水口純一郎、内田哲也：リポソーム表面に化学結合された抗原は CD8 陽性 T 細胞に cross-present されて腫瘍免疫を誘導する 第 36 回日本免疫学会総会、2006 年

## E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
特許申請準備中。
2. 実用新案登録  
該当なし。
3. その他  
該当なし。

図-1 homing peptideを結合したリポソームによる免疫増強

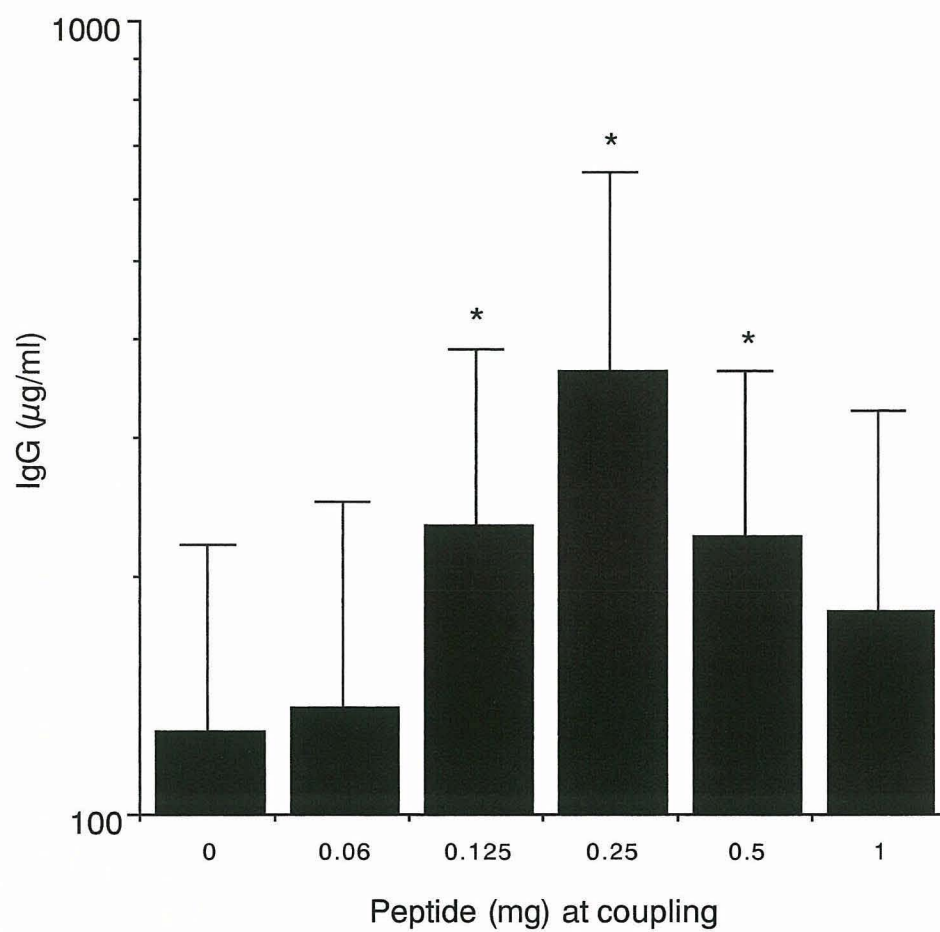
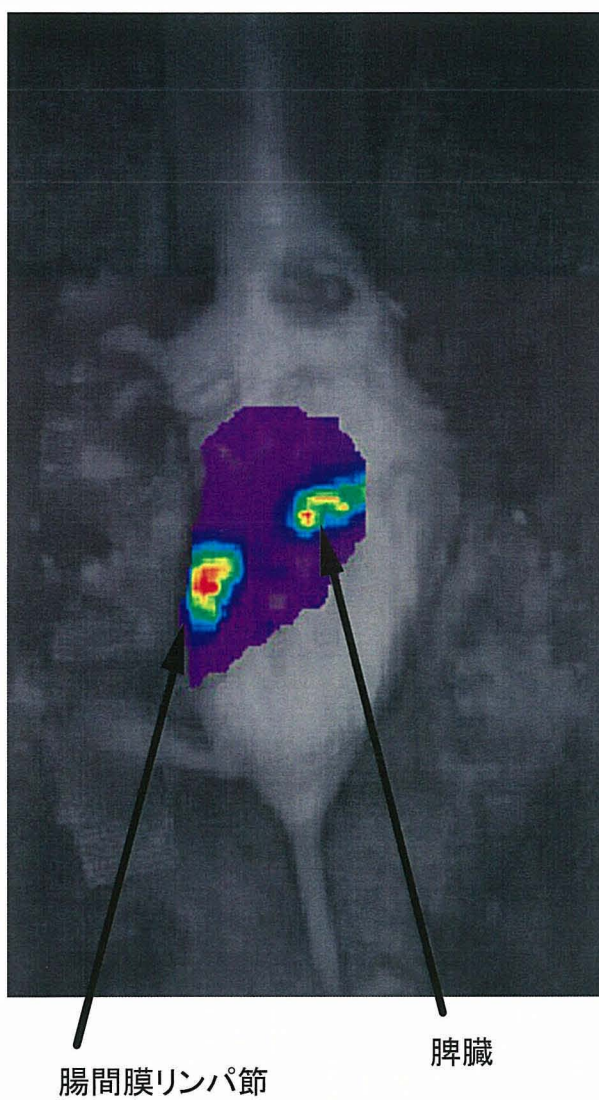


図-2 homing peptideを結合したリポソームの脾臓およびリンパ節への集積



厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究年度終了報告

6. リン脂質の合成およびリポソーム試作検討

分担研究者 小田 洋 日本油脂（株）DDS 研究所 チームリーダー

研究要旨 日本油脂株式会社では、1990 年代初頭より GMP グレードのリン脂質を世界に向けて供給し、高い評価を得ている。これまでの研究の結果、リポソームの脂質組成を選択することにより、高いアジュバント効果を得ることが出来ること、またリポソームの表面に化学結合した抗原に対する液性免疫のみならず細胞性免疫を誘導することが可能であることが明らかとなった。本研究ではこのリポソームの優れた薬剤送達能力をワクチンの創製に応用し、現在開発が急がれているウイルス疾患に対するワクチン開発を試みている。

A. 研究目的

本研究では鳥インフルエンザ、SARS、C 型肝炎に対するワクチン開発を目指しており、より効率的なワクチン開発のために、リポソームに結合させる各ペプチドの最適結合方法の検討を行い、研究に必要なリポソームの供給を行うことを目的とする。

B. 研究方法

リポソームに蛋白抗原またはペプチド抗原を結合させる最適方法の検討を行うことを目的として、脂質成分の異なるリポソームの作製を行った。

C. 研究結果

蛋白抗原のような三次構造を有する大きな抗原をリポソームに結合させる場合と、分子量の小さいペプチド抗原を結合させる場合とでは、最適な結合方法は異なり、保存方法も異なることが明らかとなった。

今年度は高病原性鳥インフルエンザ、SARS、C

型肝炎の各ウイルスを構成する蛋白に由来するペプチドを結合するための DSS 誘導リポソームを作製し、供給した。

D. 研究発表

1. 論文発表  
なし。
2. 学会発表  
なし。

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
該当なし。
2. 実用新案登録  
該当なし。
3. その他  
該当なし。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
内田 哲也	リポソーム表面結合抗原の 臨床応用	東京医科大学 雑誌	64	443-450	2006
Komori H, Nakatsura T, Senju S, Ikuta Y, Yokomine K, Yoshitake Y, Motomura Y, Beppu T, Matsui M, Torigoe T, Sato N, Baba H, Nishimura Y	Identification of HLA-A2- or -A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma.	Clin. Cancer Res.	12	2689-2697	2006
Ohno S, Moriya O, Yoshimoto T, Hayashi H, Akatsuka T, Matsui M	Immunogenic variation between multiple HLA-A*0201-restricted, hepatitis C virus-derived epitopes for cytotoxic T lymphocytes.	Viral Immunol.	19	458-467	2006
Kinoshita H, Abe J, Akadegawa K, Yurino H, Uchida T, Ikeda S, Matsushima K, Ishikawa S	Breakdown of mucosal immunity in the gut by 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).	Env. Health. Prev. Med.	11	256-264	2006



Ishikawa S, Matsushima K	Aberrant B1 cell trafficking in a murine model for lupus.	Front. Biosci.	12	1290-1803	2007
Taneichi M, Tanaka Y, Kasai M, Mori M, Nishida M, Yamamura H, Mizuguchi J, Uchida T	Induction of differential T-cell epitope by plain- and liposome-coupled antigen.	Bioconjugate Chemistry	17	899-904	2006
Taneichi M, Ishida H, Kajino K, Ogasawara K, Tanaka Y, Kasai M, Mori M, Nishida M, Yamamura H, Mizuguchi J, Uchida T	Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8+ T-cells and induce potent antitumor immunity.	J. immunol.	177	2324-2330	2006

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

リポソーム表面結合抗原の臨床応用  
Clinical application of surface-linked liposomal antigens

内 田 哲 也  
Tetsuya UCHIDA

国立感染症研究所血液・安全性研究部  
Department of Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases

総 説
-----

## リポソーム表面結合抗原の臨床応用 Clinical application of surface-linked liposomal antigens

内 田 哲 也

Tetsuya UCHIDA

国立感染症研究所血液・安全性研究部

Department of Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases

### はじめに

我々はこれまで、リポソーム表面結合抗原をワクチンの創製に応用することを目標とした検討を行ってきた。従来、リポソームを抗原のキャリアーとして用いるための検討には主として抗原を内包させたリポソームが用いられてきたが、我々は抗原をリポソームの表面に化学結合したものをマウスに投与すると抗原の特異的な IgE 抗体の産生が選択的に抑制されることを見出した。現行のワクチンにはアジュバントとして水酸化アルミニウム (alum) が用いられているが、アルミニウムアジュバントは IgE 抗体産生をよく誘導することが知られており、IgE 抗体が関与していると考えられるワクチン接種後の副反応が例年多数報告されている。そこで、リポソーム表面結合抗原をアレルギー反応を惹起しにくいワクチンの創製に応用することが期待された。さらに、ワクチンの創製に用いるリポソームの最適な脂質組成を検討する過程で、ある種の脂質を用いてリポソームを作製し、その表面に抗原を化学結合させると、抗原が抗原提供細胞から MHC クラス I を介して CD8 陽性 T 細胞に呈示され、抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞が誘導されることが近年明らかになった。このことから、リポソーム表面結合抗原を細胞性免疫の誘導を目標とするウ

イルスワクチン、および腫瘍治療薬の創製にも応用可能であることが示唆された。

本稿では、リポソーム表面結合抗原についてこれまでに明らかになった知見について解説する。

### リポソーム表面結合抗原によって 誘導される IgE 選択的無反応

BALB/c マウスにリポソーム、alum、完全フロイントアジュバント (CFA) の 3 種の異なるアジュバントを用いて卵白アルブミン (OVA) を免疫すると、抗 OVA IgG 抗体産生は同程度に誘導された (図 1a) が、抗 OVA IgE 抗体産生は OVA-alum 免疫群でのみ顕著に観察され、OVA-リポソーム、OVA-CFA 免疫群では観察されなかった (図 1b)。初回免疫 6 週間後における抗 OVA 抗体サブクラスは OVA-alum 免疫群で IgG1 が IgG2a と比較して有意に高く、これとは反対に OVA-CFA 免疫群で IgG2a が IgG1 と比較して有意に高かったが、OVA-リポソーム免疫群では両者の間に有意な差が見られなかった (表 1)。

これらの結果から、OVA-alum および OVA-CFA はそれぞれ Th2-および Th1-タイプの免疫応答を誘導するが、OVA-リポソームに関してはどちらとも言えないことが示唆された。これらのマウスの CD4 陽性 T 細胞を試験管内で抗原刺激してサイトカイン産

2006 年 6 月 17 日受付、2006 年 6 月 27 日受理

キーワード: リポソーム、ワクチン、腫瘍治療薬、アレルギー、cross-presentation

(別冊請求先: 〒 208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1 国立感染症研究所 村山分室 血液・安全性研究部)