

- mechanism partly involving IL-17.
J. Immunol. 179: 3917-3925, 2007.
- 2) M. Matsui.
Roles of the novel IL-12-associated cytokine, IL-23 in the regulation of T cell-mediated immunity. (Review Article)
Hepato. Res. 37: S310-S318, 2007.
2. 学会発表
- 1) 守屋 修、赤塚 俊隆、松井 政則
T bet⁺マウスでの制御性 T 細胞による単純ヘルペスウイルス免疫反応の抑制
第 55 回 日本ウイルス学会 2007 年 10 月 21-23 日
- 2) 赤塚俊隆、高木徹、松井政則、守屋修 (埼玉医大・微生物学) 種市麻衣子、内田哲也 (国立感染症研究所・安全性研究部)
ペプチド表面結合リポソームによる抗ウイルス CD8⁺T 細胞反応の効率的な誘導
第 55 回 日本ウイルス学会 2007 年 10 月 21-23 日
- 3) Shunsuke Kohyama, Satoshi Ohno, Akihiro Isoda, Osamu Moriya, Hidenori Hayashi, Yoichiro Iwakura, Takayuki Yoshimoto, Toshitaka Akatsuka, and Masanori Matsui
IL-23 enhances host defense against vaccinia virus infection via a mechanism partly involving IL-17
第 37 回 日本免疫学会 2007 年 11 月 20-22 日
- 4) Satoshi Ohno, Shunsuke Kohyama, Osamu Moriya, Maiko Taneichi, Hidenori Hayashi, Toshitaka Akatsuka, Tetsuya Uchida, and Masanori Matsui
Induction of SARS coronavirus-specific CTL in HLA-A*0201 transgenic mice immunized with surface-linked liposomal peptides
第 37 回 日本免疫学会 2007 年 11 月 20-22 日
- 5) Akira Takagi, Masanori Matsui, Satoshi Ohno, Hongying, Duan, Osamu Moriya, Maiko Taneichi, Tetsuya Uchida, and Toshitaka Akatsuka.
Highly efficient anti-viral CD8⁺ T-cell induction by peptides coupled to the surface of liposomes
第 37 回 日本免疫学会 2007 年 11 月 20-22 日
- 6) 高山俊輔、大野悟史、磯田明宏、守屋修、林秀徳、岩倉洋一郎、善本隆之、赤塚俊隆、松井政則
IL-12/IL-17 axis による、ウイルス感染防御における増強機構の解析
日本薬学会 第 128 年会 2008 年 3 月 26-28 日
- 7) 大野悟史、高山俊輔、守屋修、種市麻衣子、小田洋、林秀徳、赤塚俊隆、内田哲也、松井政則
SARS ウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に対するエピトープの決定とペプチド結合リポソームによる CTL の誘導
日本薬学会 第 128 年会 2008 年 3 月 26-28 日
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 1) 特許取得
特許出願準備中
- a) SARS コロナウイルスの細胞傷害性 T 細胞エピトープペプチド及びその用途
- b) H5N1 型鳥インフルエンザウイルスの細胞傷害性 T 細胞エピトープペプチドと細胞傷害性 T 細胞誘導能を持つペプチド結合リポソーム
- 2) 実用新案登録
該当なし。
- 3) その他
該当なし。

表1 SARS-CoV Nucleocapsid における、予測 CTL エピトープの結合アフィニティ

Epitope	BIMAS	SYFPEITHI	BL ₅₀ (μM) ^a	Affinity ^b
N-1	98.3	26	25.7	High
N-2	309.1	29	235.3	Low
N-3	69.6	24	52.6	High
N-4	98.3	20	46.1	High
N-5	36.3	23	165.1	Medium
N-6	1267.1	30	72.8	High
N-7	50.2	21	90.4	High
N-8	31.2	19	140.5	Medium

^aT2 細胞を用いた peptide binding assay

^bPeptide binding assay の BL₅₀ の結果による評価 : High, <100 μM; Medium, 100-200 μM; Low, >200 μM

表2 Nucleocapsid 由来エピトープを発現する組み換えアデノウイルスで免疫したマウスにおける、SARS-CoV 特異的 CTL の誘導

Epitope	ICS ^a (%)		in vitro CTL assay ^b (%)		in vivo CTL assay ^c
	Ad-SARS-N	Ad-WT	(+)	(-)	Ad-SARS-N
N-1	0.3	0.1	4.1	0	NT
N-2	0.2	0.1	4.4	0	NT
N-3	0.9	0.1	96.3	3	45.6
N-4	1.8	0.1	90.1	2.9	88.0
N-5	2.8	0.1	64.3	0.2	50.1
N-6	1.6	0.2	78.8	1.4	58.4
N-7	0.4	0.2	22.5	0	NT
N-8	0.2	0.1	5.2	0	NT

^a Nucleocapsid 由来エピトープを発現する組み換えアデノウイルス (Ad-SARS-N)又は野生型アデノウイルス (Ad-WT)で免疫したマウスの脾細胞を調整し、それぞれのペプチドで5時間刺激後、表面上のCD8と細胞内IFN-γを抗体で染色し、CD8+IFN-γ+細胞の割合をフローサイトメトリーで測定した。

^b 上述同様に組み換えアデノウイルスで免疫したマウスの脾細胞を調整し、それぞれのペプチドで抗原刺激した後、ペプチドをパルスした標的細胞 (-) ペプチドをパルスしていない標的細胞 (+) で⁵¹Cr遊離アッセイを行なった。結果は% specific lysisである。

^c 組み換えアデノウイルスで免疫したマウスに、CFSEで標識したペプチドをパルスした標的細胞を移入し、CTL killing 活性をフローサイトメトリーで測定した。結果は% specific lysisである。

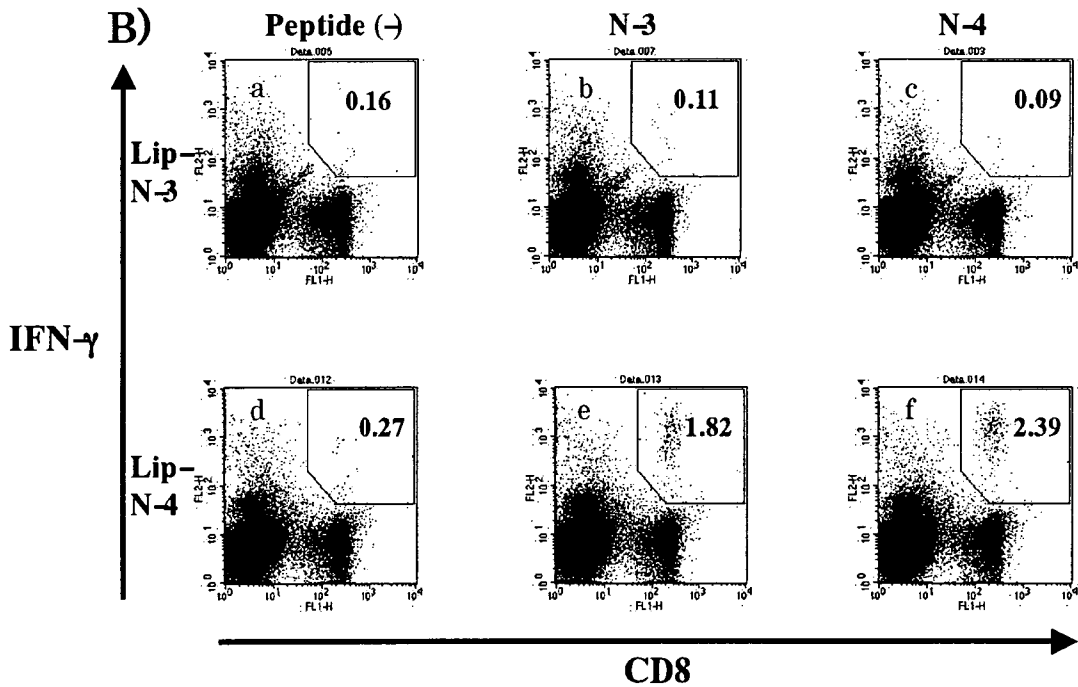
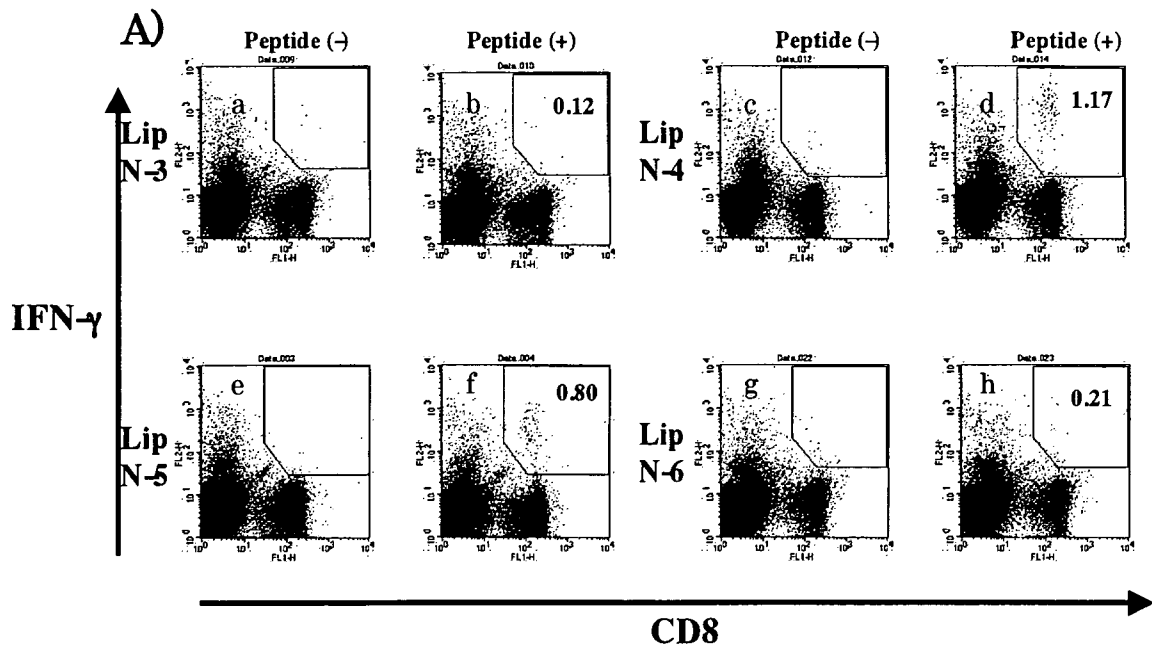


図1 SARS-CoV Nucleocapsid 由来 CTL エピトープを結合させた、ペプチド結合リポソームで免疫したマウスの脾細胞における CD8⁺IFN- γ ⁺ 細胞の検出

A) ペプチド結合リポソーム、Lip-N-3、Lip-N-4、Lip-N-5 または Lip-N-6 で HLA-A2-Tg マウスを免疫して 7 日後、脾細胞を調整し、各々のペプチドで 5 時間刺激して、CD8 と細胞内 IFN- γ を染色し、フローサイトメトリーで解析した。数字は、CD8 細胞中の IFN- γ 陽性細胞の % である。

B) Lip-N-3 又は Lip-N-4 でマウスを免疫して、その脾細胞をペプチド N-3 および N-4 で刺激した時の CD8⁺IFN- γ ⁺ 細胞の割合。

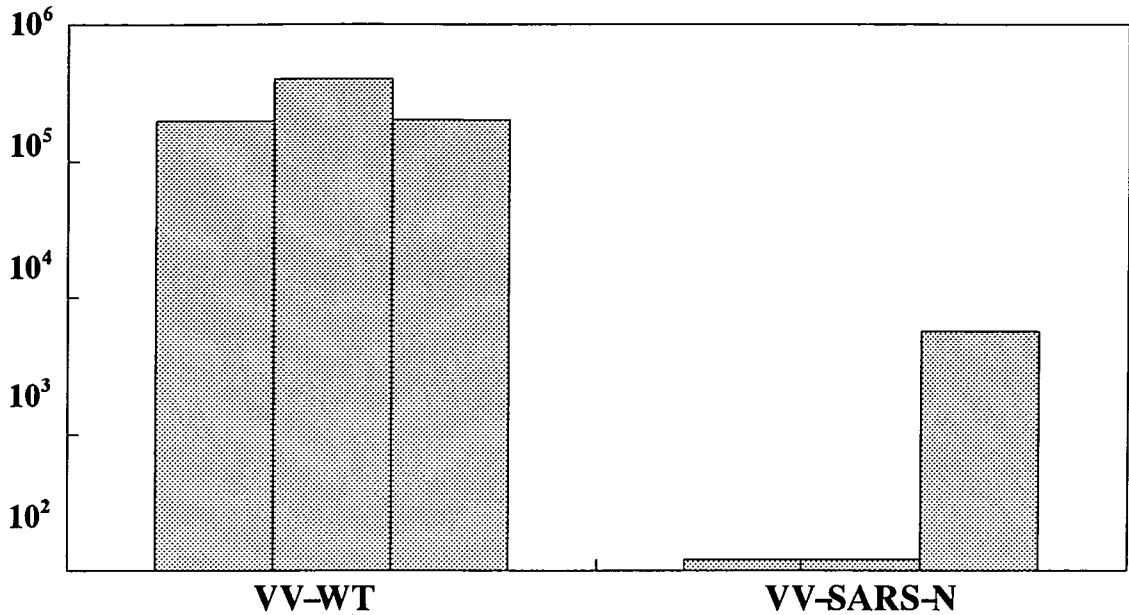


図2 ウイルスチャレンジ：Lip-N223 で免疫したマウスに、N-223 を発現するワクシニアウイルス (VV-SARS-N)又は野生型ウイルス(VV-WT)を感染させ、5日後のマウス卵巣中のウイルスのタイターを測定した。y軸はウイルスタイターを表す。

表3 SARS-CoV pp1a の予測した CTL エピトープの HLA-A2 への結合アフィニティとそれらのエピトープによって誘導される CD8⁺IFN- γ ⁺細胞数の測定結果

pp1a #	BL ₅₀ (μ M) ^a	Affinity ^a	ICS ^b (% in CD8 ⁺ cells)	pp1a #	BL ₅₀ (μ M)	Affinity	ICS (% in CD8 ⁺ cells)
1	75.7	High	0.05	16	97.3	High	0.03
2	3.1	High	0.07	17	6.2	High	0.16
3	19.2	High	0.08	18	53.0	High	0.12
4	59.8	High	0.08	19	39.6	High	0.03
5	8.4	High	0.02	20	47.1	High	0.04
6	40.3	High	0.05	21	100.4	Medium	0.06
7	4.9	High	0.07	22	31.8	High	0.07
8	65.1	High	0.05	23	22.8	High	0.20
9	6.7	High	0.05	24	6.4	High	0.50
10	3.0	High	0.19	25	25.7	High	0.06
11	323.0	Low	0.48	26	153.7	Medium	0.03
12	2432.8	Low	0.21	27	68.1	High	0.07
13	7.6	High	0.17	28	102.5	Medium	0.07
14	96.7	High	0.04	29	8.3	High	0.06
15	187.2	Medium	0.18	30	53.3	High	0.01

^aT2細胞を用いた peptide binding assay ; ^bペプチドパルスした脾細胞で免疫したマウスの脾細胞をそれぞれのペプチドで刺激し、CD8と細胞内IFN- γ を抗体で染色しフローサイトメトリーで解析した。

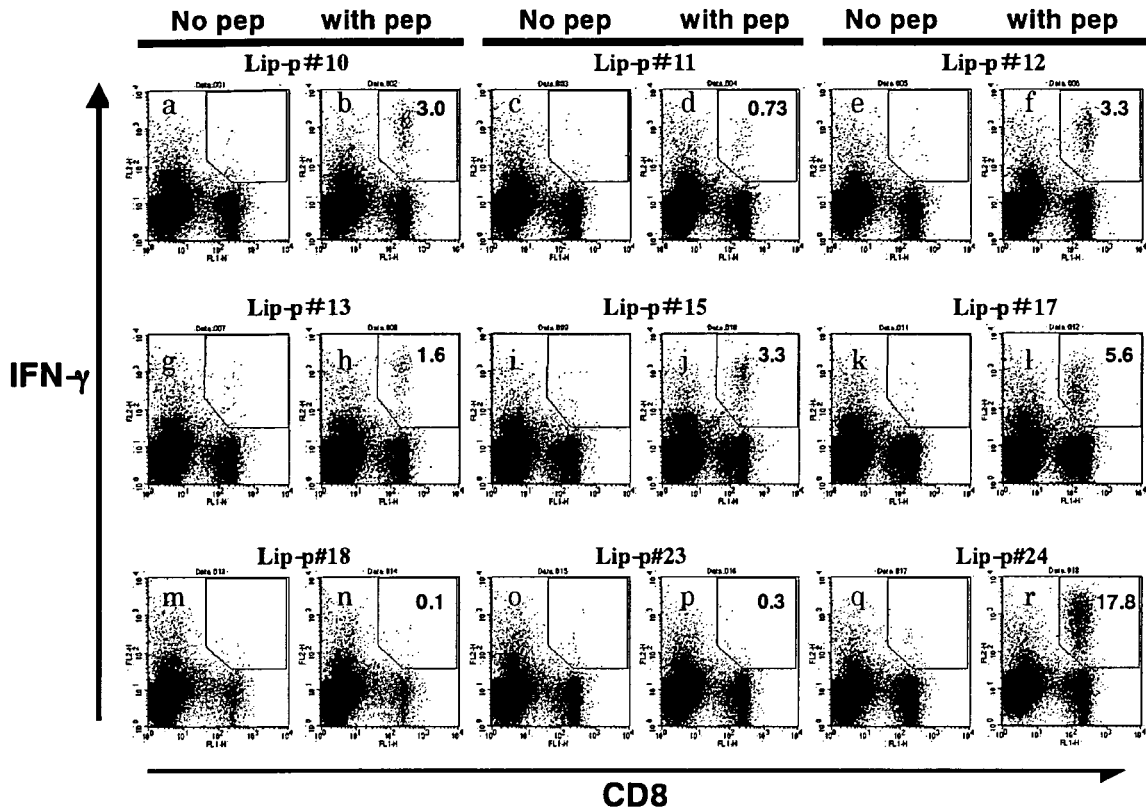


図3 SARS-CoV pp1a 由来 CTL エピトープを結合させた、ペプチド結合リポソームによる IFN- γ 産生 CTL の誘導

ペプチドパルスした細胞で免疫して、有意に CTL を誘導したペプチド 9 種類をそれぞれリポソームに結合させ、ペプチド結合リポソーム (Lip-p#10, -p#11, -p#12, -p#13, -p#15, -p#17, -p#18, -p#23, -p#24) を作製した。これらのペプチド結合リポソームを HLA-A2-Tg マウスに免疫した。免疫 7 日後に脾細胞を調整し、各々のペプチドで 5 時間抗原刺激して、CD8 と細胞内 IFN- γ を染色し、フローサイトメトリーで解析した。数字は、CD8 細胞中の IFN- γ 陽性細胞の % である。

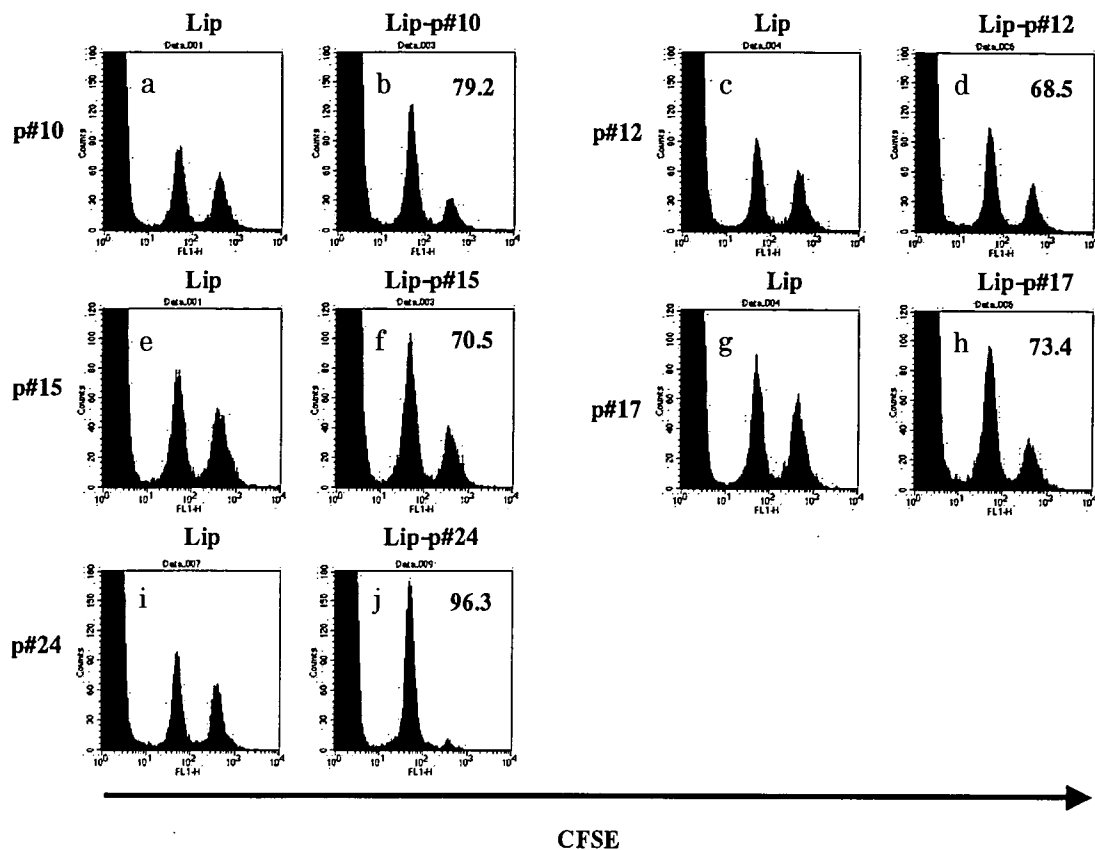


図4 ペプチド結合リポソームにより誘導されるペプチド特異的 CTL killing 活性の測定
 効率良く IFN- γ 産生 CTL を誘導する5つのペプチド結合リポソーム(Lip-p#10, -p#11, -p#12, -p#13, -p#15, -p#17, -p#18, -p#23, -p#24)で、HLA-A2-Tg マウスを免疫した。コントロールとして、ペプチドが結合していないリポソームを注射したマウス (Lip) を用意した。免疫7日後に、それぞれのペプチドをパルスした CFSE 標識標的細胞を、ペプチドでパルスしていない標的細胞とともに移入し、ペプチド特異的 CTL killing 活性をフローサイトメトリーで測定した。結果は% specific lysis である。

表4 H5N1 型鳥インフルエンザウイルス由来の予測した CTL エピトープの HLA-A2 への結合アフィニティとそれらによって誘導される CD8⁺IFN- γ ⁺ 細胞数の測定結果

peptide #	BL ₅₀ (μ M) ^a	Affinity ^a	ICS ^b (% in CD8 ⁺ cells)	peptide #	BL ₅₀ (μ M)	Affinity	ICS (% in CD8 ⁺ cells)
1	3.2	High	0.81	25	99.7	High	0.13
2	5.1	High	0.23	26	62.6	High	0.14
3	20.5	High	0.13	27	6.7	High	0.17
4	6.5	High	0.17	28	9.7	High	0.20
5	97.4	High	0.18	29	41.0	High	0.20
6	8.0	High	0.84	30	6.6	High	0.17
7	37.2	High	0.27	31	129.1	Medium	0.15
8	ND	Low	NT	32	62.4	High	0.21
9	905.8	Low	0.42	33	146.0	Medium	0.21
10	ND	Low	NT	34	40.7	High	0.18
11	75.8	High	0.18	35	126.0	Medium	0.22
12	68.0	High	0.13	36	82.4	High	0.16
13	62.5	High	0.15	37	1057.8	Low	0.48
14	52.2	High	0.36	38	74.0	High	0.15
15	69.6	High	0.18	39	126.5	Medium	0.20
16	320.0	Low	0.22	40	48.7	High	0.13
17	78.3	High	0.20	41	117.9	Medium	0.22
18	41.1	High	0.20	42	62.3	High	0.15
19	63.3	High	0.15	43	241.3	Low	0.22
20	58.5	High	0.24	44	46.4	High	0.15
21	54.6	High	0.26	45	96.5	High	0.14
22	8.2	High	0.20	46	73.1	High	0.20
23	95.0	High	0.25	47	ND	Low	0.15
24	5.7	High	0.20				

^aT2 細胞を用いた peptide binding assay: BL₅₀ の結果により、High, <100 μ M; Medium, 100-200 μ M; Low, >200 μ M と評価した。

^bペプチドパルスした脾細胞で免疫した HLA-A2-Tg マウスの脾細胞をそれぞれのペプチドで 5 時間抗原刺激し、CD8 と細胞内 IFN- γ を抗体で染色しフローサイトメトリーで解析した。数字は、CD8 細胞中の IFN- γ 陽性細胞の % である。

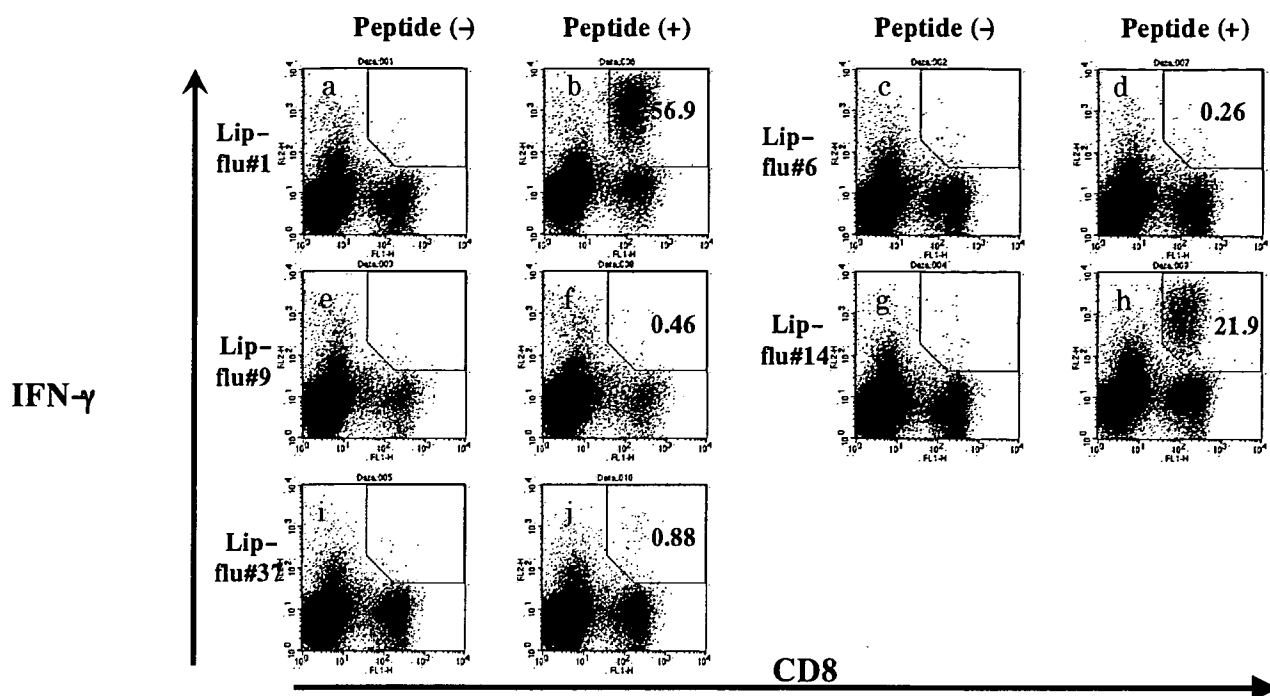


図5 H5N1型鳥インフルエンザウイルスのエピトープをつけた、ペプチド結合リポソームによるIFN- γ 産生CTLの誘導

ペプチド結合リポソーム (Lip-flu#1, -flu#6, -flu#9, -flu#14, -flu#37) でマウスを免疫し、その脾細胞を各々のペプチドで刺激して、細胞内IFN- γ 陽性CTLを染色して解析した。

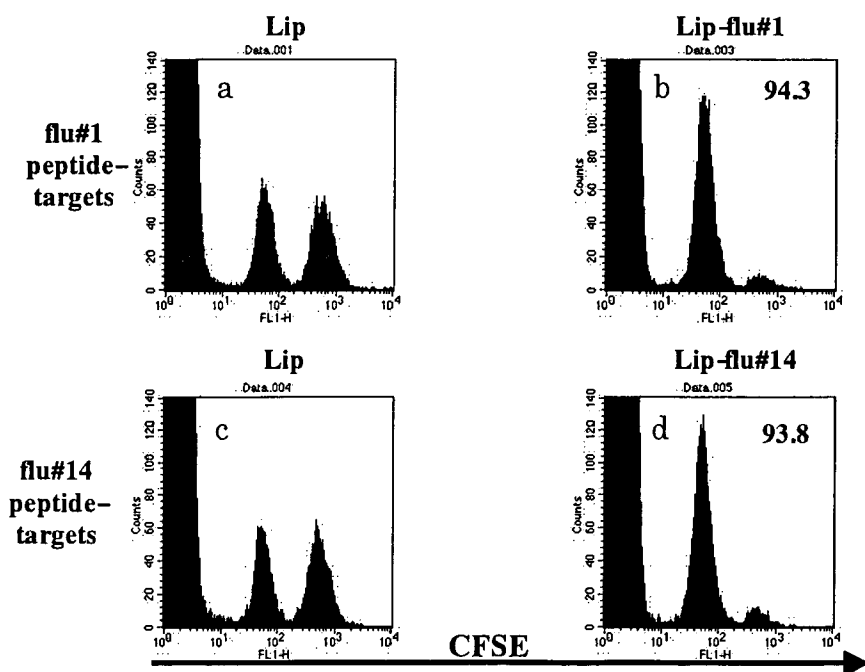


図6 ペプチド結合リポソーム(Lip-flu#1, -flu#14)で免疫したマウスにおける、ペプチド特異的CTL killing活性の測定

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

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 准教授

研究要旨

A型インフルエンザウイルスは表面抗原の変異が著しく、現在使われているインフルエンザウイルス表面抗原に対する抗体の誘導を促すワクチンは、効果が無くなる危険性が常に付きまとっている。そこで、ワクチンに普遍性を持たせる目的で、抗原変異の頻度が少ないインフルエンザウイルス内部タンパク質を標的とした、キラーT細胞誘導型の新しいインフルエンザワクチン開発を目指した。今年度は、日本人のおよそ6割に対して効果を持つと予想されるHLA-A*2402結合性ウイルスタンパク由来ペプチドに焦点を絞り、実際に生体内でキラーT細胞活性を誘導するH5N1鳥インフルエンザ内部抗原由来ペプチド配列10種類を同定した。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザウイルスが将来ヒト型へと変異し、多くの死者を伴う大流行（パンデミック）へ移行する事態が危惧されている。インフルエンザウイルスの表面抗原であるヘムアグルチニン（HA）は変異する頻度が高く、HAを標的とする従来の抗体誘導型ワクチンでは、対処しきれない可能性が大いに残されている。本研究ではインフルエンザウイルス抗原の中で比較的変異の少ないウイルス内部蛋白由来のエピトープの中から、特に広汎な株で保存されているペプチド配列を標的としたキラーT細胞（CTL）誘導型ワクチンを開発し、突如として訪れるであろうパンデミックの事態に確実に備える事を目

的とする。今年度は日本人が持つMHC遺伝子でドミナントであるHLA-A*2402をペプチドワクチンのターゲットとし、病原性の強い鳥インフルエンザウイルス株A/Hong Kong/483/97(H5N1)の内部蛋白由来のCTLエピトープを、ヒトクラスI MHCであるHLA-A*2402を発現するマウス（A24Tgマウス）を用いてスクリーニングを行い、CTLを活性化するワクチンのエピトープ候補を選出した。

B. 研究方法

1. コンピュータによるHLA-A*2402結合性CTLエピトープ予測：インターネット上で利用可能なCTLエピトープ予測プログラム

(SYFPEITHI, BIMAS, nHLAPred) を使い、H5N1 型鳥インフルエンザウイルス抗原のうち内部蛋白である nucleocapsid protein (NP), matrix protein (M), non-structural protein (NS), polymerase acidic protein (PA), polymerase basic protein 1 (PB1), polymerase basic protein 2 (PB2) のアミノ酸配列より、HLA-A*2402 の結合モチーフを持つ 9mer アミノ酸からなるエピトープの予測を行った。

2. A24Tg マウス生体内のCTL 誘導条件検討：A24Tg マウスの生体内におけるCTL 活性化誘導の最適条件を検討するため、HLA-A*2402 に結合して免疫原性のある Tyrosinase 206-214 (AFLPWHLRF) をポジティブコントロールとし、免疫活性化剤の種類と投与量、投与ペプチド量、投与経路、投与間隔と回数の条件を変えて、in vivo での標的細胞の減少度合いを観察した。

3. イムノドミナントエピトープのスクリーニング：予測したCTL エピトープの情報を元にペプチド合成を行い、A24Tg マウスCTL 誘導系を用いて、それぞれのペプチドが持つ免疫原性の判定を行った。リポソームと結合したペプチドまたはペプチドでパルスした活性化樹状細胞という2種類の異なる条件でA24Tg マウスを免疫することにより、それぞれのペプチドが持つ特性およびリポソーム結合によるCTL 活性への影響を評価した。判定は免疫7日～10日後に標的細胞を投与し、in vivo での標的細胞の抗原特異的な減少率をフローサイトメーターにより解析する事により行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子改変動物(トランスジェニックマウス)の入手および実験は「国立大学法人北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定」および「北海道大学大学院獣医学研究科・獣医学部において行う実験動物に関するガイドライン」に従って行われた。

C. 研究結果

1. H5N1 型鳥インフルエンザウイルスのHLA-A*2402 結合性イムノドミナントエピトープ同定：エピトープ予測プログラムでスコアの高かった48種類のペプチドを合成し、その中から可溶性等の生化学的条件の良好な31種類のペプチドのin vivo でのCTL 活性化誘導能を検討した (Table 1)。リポソーム結合したペプチド (lipo+pep) では6種類のペプチドに強いCTL 活性の誘導がみられ、他の3種類に有意なCTL 活性の誘導を認めた。一方活性化樹状細胞 (DC+pep) による免疫では4種類で強力なCTL 活性がみられ、2種類で有意なCTL 活性の誘導を認めた。また全体的にはリポソーム結合したペプチドの方が活性化樹状細胞による免疫に比較して、強いCTL 活性を誘導する傾向がみられた。

2. エピトープ予測プログラムの精度検証：予測に用いた3種類のプログラムのHLA-A*2402 結合ペプチドに関しての特性をCTL 活性のスクリーニング結果により検証した。nHLAPred は多くのペプチドを候補として出し、最も感度が高かったものの、その特異性は低かった。SYFPEITHI は結合ペプチドの候補が少ない割に特異性は最も高かった。

BIMAS は感度も特異性も他の2プログラムの中間であったが、スコアリングと誘導したCTL活性の相関が最も少なかった。

D. 考察

同定されたインフルエンザウイルス H5N1 株由来の10種類のイムノドミナントエピトープのうち、5種類は他の H1N1 株および H3N2 株とアミノ酸配列が同一であった。残り5種類のペプチドのうち3種類は H1N1 株または H3N2 株とN端のアミノ酸が変異しているだけであり、MHC結合アンカーは保存されているため、交差反応を起こすと考えられる。しかし残り2種類に関してはT細胞受容体と接触すると思われる位置にアミノ酸変異を伴っており、H5N1 株に特異的なペプチドであると思われる。

A24Tgマウスを用いたCTL誘導実験の最適化により、リポソーム結合ペプチド免疫により強いCTL活性の誘導が確認されたことで、次のステップであるインフルエンザウイルスを使った感染実験によるワクチンの評価が可能となった。

HLA-A*2402 結合性エピトープ予測プログラム3種類のそれぞれの特徴がはっきりした事で、他の病原体に対するエピトープ予測の精度を向上させる事が可能となり、より迅速なワクチン開発につながると考えられる。

E. 結論

高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する HLA-A*2402 結合性 CTL ペプチドワクチンの候補として10種類のイムノドミナントエ

ピトープが同定された。そのうちの大部分はヘムアグルチニンやノイラミニダーゼの型によらず保存された配列であるため、これらのエピトープを用いたリポソーム結合CTLペプチドワクチンが、H5N1 株ばかりでなく広汎なタイプのA型インフルエンザウイルス株に対しても有効である可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nagata T, Toyota T, Ishigaki H, Ichihashi T, Kajino K, Kashima Y, Itoh Y, Mori M, Oda H, Yamamura H, Taneichi M, Uchida T, Ogasawara K. Peptides coupled to the surface of a kind of liposome protect infection of influenza viruses. *Vaccine*. 25: 4914-4921, 2007.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

出願予定：H5N1 型鳥インフルエンザウイルスの細胞傷害性 T 細胞エピトープペプチドと細胞傷害性 T 細胞誘導能を持つペプチド結合リポソーム

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

Table 1

peptide name	Program	Score	DC+pep	lipo+pep
M1_1	nHLAPred	0.96		—
M2_1	nHLAPred	0.35	±	
M2_2	nHLAPred	0.93	+	±
NP_1	nHLAPred	0.99		—
NP_2	nHLAPred	0.93		—
NP_3	BIMAS	360.00		—
NP_4	nHLAPred	0.95	—	+
NP_5	BIMAS	30.00		—
NP_6	nHLAPred	0.77		±
NS1_1	nHLAPred	0.98	—	
PA_1	nHLAPred	0.88		±
PA_2	SYFPEITHI	18.00	++	++
PA_3	BIMAS	120.00		—
PA_4	SYFPEITHI	27.00	++	++
PA_5	nHLAPred	0.98	—	
PA_6	nHLAPred	0.99		—
PA_7	nHLAPred	0.66		—
PA_8	nHLAPred	0.87	—	—
PA_9	nHLAPred	0.53		—
PB1_1	BIMAS	300.00	—	+
PB1_2	nHLAPred	0.59		—
PB1_3	BIMAS	20.16	±	±
PB1_4	nHLAPred	0.99		—
PB1_5	nHLAPred	0.99	+	++
PB1_6	nHLAPred	1.00	++	++
PB1_7	nHLAPred	1.00	++	++
PB2_1	nHLAPred	0.98	±	±
PB2_2	nHLAPred	0.92		+
PB2_3	nHLAPred	0.98		—
PB2_4	BIMAS	10.50		++
PB2_5	SYFPEITHI	21.00		—

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

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 （東京大学大学院医学系研究科 准教授）

研究要旨

本年度はCTL産生を選択的に誘導するOVA-不飽和脂肪酸リポソームの粘膜における局在と移動経路を明らかにすることを目的として、Alexa488 標識 OVA-不飽和脂肪酸リポソーム 3 mg を経口投与後、経時的に凍結切片を作成し、パリエル板 SED 領域への取り込みを調べた。いずれの時点においても有意な取込は認められず、腸管結札により腸管内に直接投与をした場合にも同様であった。さらに OVA-不飽和脂肪酸リポソームによる CD8 陽性 T 細胞の活性化を MHC クラス I テトラマーによる FACS 解析で検討したところ、腹腔内投与では有意な CD8 陽性 T 細胞の活性化が認められたが、経口投与においては CD8 陽性 T 細胞の活性化が認められなかった。鼻腔投与による CTL 産生についても同様の検討を行ったが、NALT、NALT の所属リンパ節である頸部リンパ節を含め、MHC テトラマー陽性の CD8 陽性 T 細胞の増加は認められなかった。また凍結切片による NALT における局在も認められなかった。以上の結果から、OVA-不飽和脂肪酸リポソームによる CTL 誘導には粘膜面投与よりも全身投与のほうが効果的であ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および経鼻投与による CTL 産生および抗原移動を検討し、腸管および鼻粘膜における CTL 産生の場を特定することを目的とした。

B. 研究方法

6-8 週齢の C57BL/c 雌マウスに Alexa488 標識 OVA-不飽和脂肪酸リポソーム 3mg を経口投与した後、経時的に凍結切片を作成し、パリエル板、SED (Subepithelial Dome) 領域、粘膜固有層、腸間膜リンパ節、脾臓、頸部リンパ節、NALT における抗原局在を共焦点レーザー顕微鏡ないし蛍光顕微鏡で観察した。さらに経口免疫後に各リン

パ組織から細胞を調整し、MHC クラス I テトラマー (Kb-SIINFEKL) を用いて粘膜免疫による抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の産生を FACS にて解析した。経鼻免疫ではリポソーム溶液 (10mg/ml) 20 μ l を 3 回投与し、1 時間後、凍結切片を作成して局在を調べた。CTL 誘導能の検討では CpG を併用し、経鼻免疫 2 回後 NALT 細胞や頸部リンパ節細胞などを調整して FACS 解析を行った。

(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パリエル板、SED 領域、粘膜固有層への抗原取り込みを検討したところ、OVA-飽和脂肪酸リポソ-

ムの場合と異なり、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 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。また、腸管結札により腸管内に直接投与をした場合にも同様であった(図2)。さらにOVA-不飽和脂肪酸リポソームの経口投与によるCD8陽性T細胞の活性化をMHCクラスIテトラマーを用いたFACS解析によって検討したところ、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(図3)。またOVA-不飽和脂肪酸リポソームの経鼻投与後にNALTやその所属リンパ節におけるCTL産生をMHCクラスIテトラマーを用いて調べたところ有意なCD8T細胞の活性化は認められなかった(図4)。経鼻投与後のNALT凍結切片においても抗原の局在は認められなかった。

D. 考察

以前に行ったOVA-飽和脂肪酸リポソーム経口投与実験で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。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。また経鼻投与においても同様の結果が得られた。この理由として、経鼻投与では抗原投与量の絶対量が過小であったことが考えられた。この点ではOVAそのものよりOVAペプチド-リポソームのほうが効果的であろうと予想される。また、粘膜免疫においては経口寛容に及ぼす影響の違いなども考慮する必要があると考えられる。この

ような種々の原因により、OVA-不飽和脂肪酸リポソーム経口投与や経鼻投与によるOVA特異的CD8誘導能が微弱であったと考えられた。今後はOVAペプチド-リポソームによる相対的抗原量の増加、Th1誘導性アジュバントの効率アップ、粘膜免疫制御システムを考慮した検討を行う必要があると考えられた。一方で、OVA-不飽和脂肪酸リポソームによるCTL誘導には粘膜免疫より全身免疫が効果的であることが示唆された。

E. 結論

今回検討した条件下ではOVA-不飽和脂肪酸リポソーム抗原経口投与および鼻腔投与による抗原局在の追跡は出来なかった。今後、抗原およびアジュバントの形態をさらに効率的にした粘膜リポソームワクチンの検討が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表(2007-2008)

- a. 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. *J. Leuk. Biol.* 81:1760185, 2007.

2. 学会発表

- a. Abe J., Ishikawa S., Ueha S., Suzuki J., Matsushima K. Accumulation of Foxp3+ CD4+ T cells and a possible role of B1-activated CD4+ T cells in the pathogenesis of murine lupus.. *Proc. Jap. Soc. Immunol.* 37: 141, 2007.
- b. 阿部淳、石川昌、上羽悟史、鈴木淳、松島綱治 SLEモデルにおけるFoxp3陽性制御性T細胞

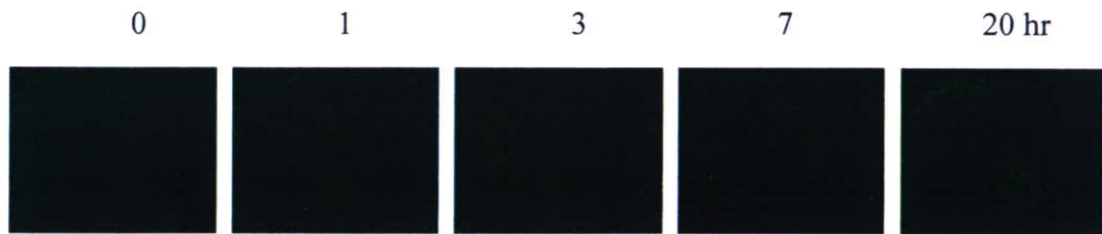
の増加 日本臨床免疫学会誌 30 : 281, 2007.

G. 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 Alexa488 標識 oleoyl-OVA リポソーム胃内投与による抗原局在

パイエル板



腸間膜リンパ節

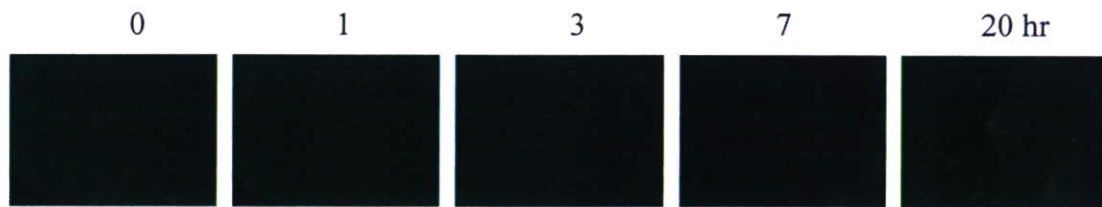
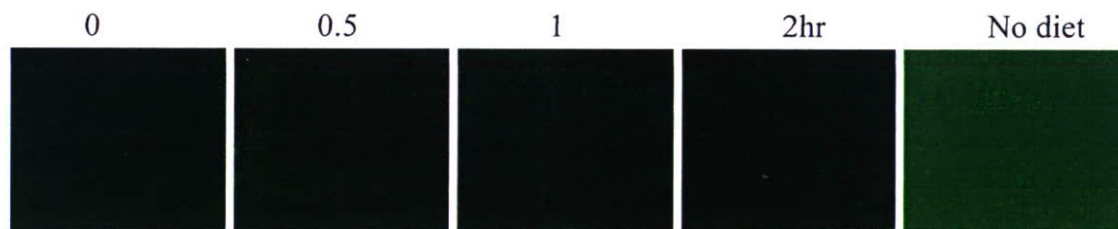


図2 Alexa488 標識 oleoyl-OVA リポソーム直接小腸内投与による抗原局在

パイエル板



腸間膜リンパ節

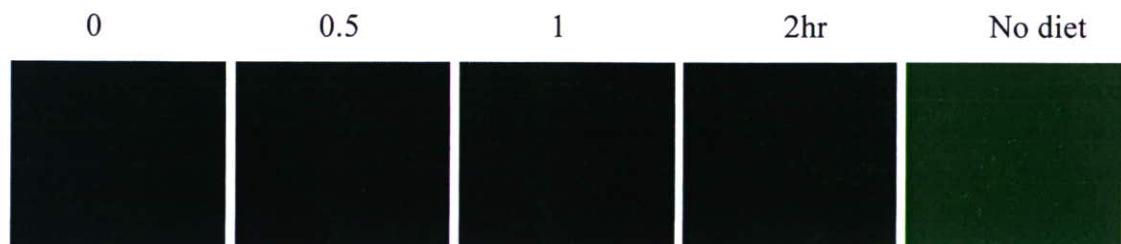


図3. Oleoyl-OVA リポソーム腹腔投与による OVA 特異的 CD8T 細胞活性化

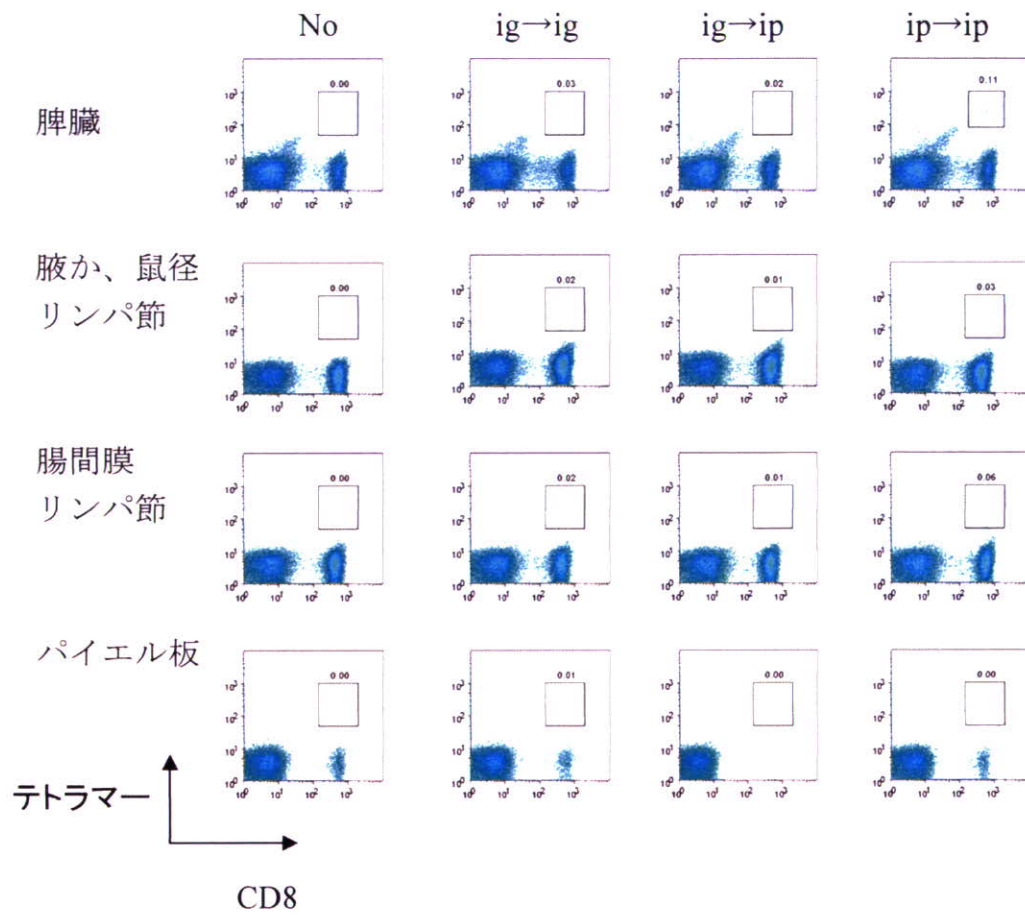
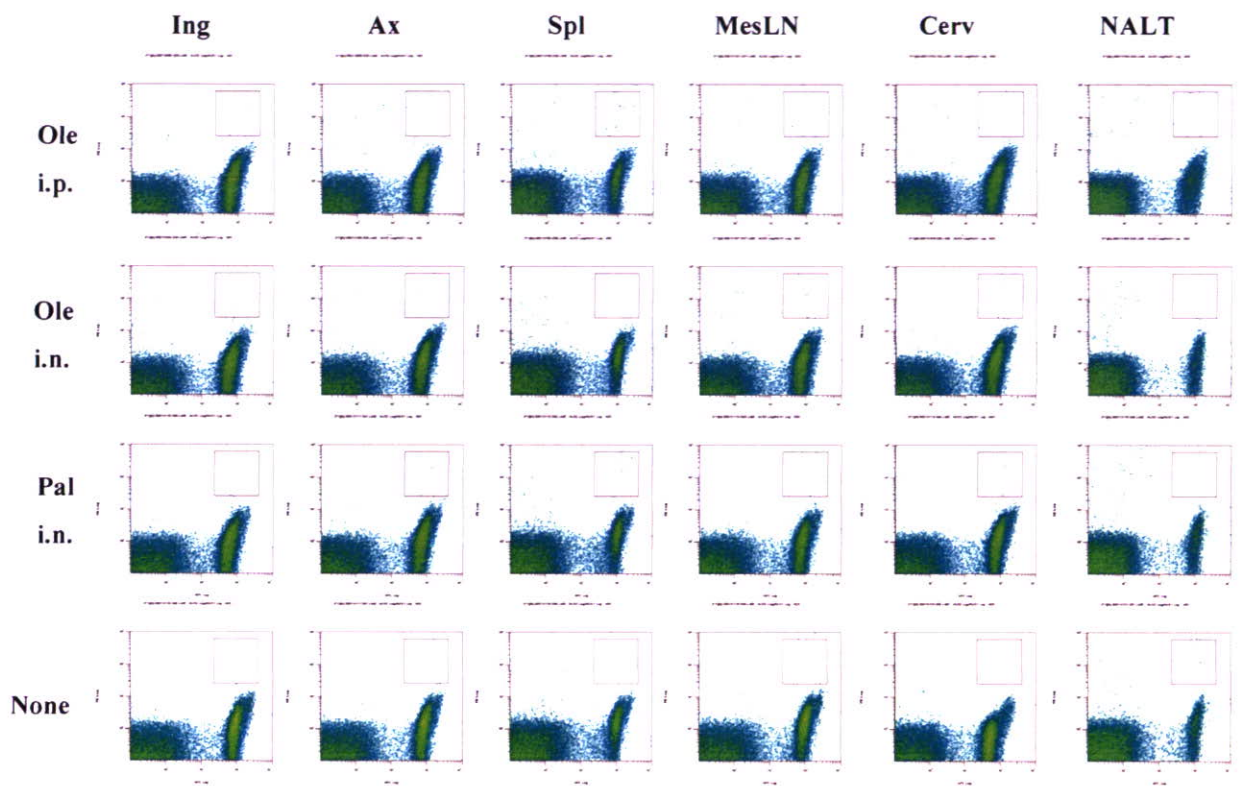


図 4. Oleoyl-OVA リポソーム経鼻投与による OVA 特異的 CD8T 細胞活性化



厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
分担研究報告書

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、今年度はワクチンのデザインに関わる問題として、CTL の誘導に CD4 陽性 T 細胞によるヘルプが必須であるか否かについて検討を行った。その結果、CTL エピトープペプチドのみを結合したリポソームで免疫することにより有意に CTL が誘導されることが明らかとなり、同様のことは CD4 陽性 T 細胞に対する抗体を投与して CD4 陽性 T 細胞を除去したマウスにおいても再現されたことから、我々が開発したペプチド結合リポソームによる免疫においては、CD4 陽性 T 細胞によるヘルプは CTL の誘導を増強するものの必須ではないことが示唆された。

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。本研究で使用するリポソームはこの欠点を補うことの出来るキャリアーである。これに加えて、我々が開発したリポソーム結合ペプチドが CD4 陽性 T 細胞によるヘルプ無しに効率的に CTL を誘導することが可能であるか否かはワクチンのデザインを決定する上できわめて重要なポイントである。本年度はリポソーム結合ペプチドによる CTL の誘導に焦点をあてて検討を行った。

B. 研究方法

抗原として卵白アルブミン（OVA）を用い、リポソーム表面に OVA の CTL エピトープ：OVA₂₅₇₋₂₆₄（H-2^b拘束性）あるいは OVA のヘルパーエピトープ：OVA₃₂₃₋₃₃₉（H-2^d拘束性）を結合して CBF1 マウス（H-2^{b/d}）に投与し、in vivo CTL アッセイによ

って OVA 特異的 CTL 誘導を検討した。

（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

図-1 に示すように、OVA₂₅₇₋₂₆₄ 結合リポソームは顕著に CTL を誘導し（図-1：c）、OVA ヘルパーエピトープ OVA₃₂₃₋₃₃₉ と共にマウスを免疫することによってさらに CTL 誘導が増強された（図-1：d）。このとき、同一濃度の溶液状の CTL エピトープを免疫した群（図-1：b）では有意な CTL 誘導が見られなかった。また、同様の検討を CD4 陽性 T 細胞に対する抗体、GK1.5 を投与して CD4 陽性 T 細胞を除去したマウスにおいて行ったところ、CD4 陽性 T 細胞除去群（図-2：d）においても正常マウス（図-2：b）と同様に CTL の

誘導が観察された。同様のことは OVA タンパクを結合したりポソームを投与したときにも観察され (図-2 : c および e) 、リポソーム結合抗原による CTL の誘導に CD4 陽性 T 細胞のヘルプが必須ではないことが示唆された。

D. 考察

OVA の CTL エピトープを結合したりポソームで免疫したマウスでは、リポソームに結合していない同一濃度の溶液状の CTL エピトープで免疫した群では有意な CTL 誘導が認められないのに対して有意に CTL を誘導し、このリポソーム処方が CTL 誘導を可能にするキャリアであることが再確認された。細胞性免疫を誘導できるワクチンのデザインにおいて、CD4 陽性細胞のヘルプを利用する必要があるかどうかについては未だ議論の余地がある。図-1 で示すように、同一リポソーム表面上に OVA ヘルパーエピトープ OVA₃₂₃₋₃₃₉ を結合させたりポソームでマウスを免疫することによって CTL 誘導の増強が認められた。しかし図-2 に示した CD4 陽性 T 細胞に対する抗体、GK1.5 を用いた検討では、CD4 陽性 T 細胞の除去は CTL 誘導に影響を与えなかったことから、CD4 陽性 T 細胞によるヘルプは必須ではないことが示唆された。

E. 結論

CTL の誘導において、CD4 陽性 T 細胞によるヘルプは CTL の誘導を増強はするものの必須ではないことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagata T, Toyota T, Ishigaki H, Ichihashi T, Kajino K, Kashima Y, Itoh Y, Mori M, Oda H, Yamamura H, Taneichi M, Uchida T, Ogasawara K. Peptides

coupled to the surface of a kind of liposome protect infection of influenza viruses. *Vaccine*. 2007;25:4914-4921.

2. Uchida, T., Taneichi M. Clinical application of surface-linked liposomal antigens. *Mini-Reviews in Medical Chemistry* 2008;8:184-192.

2. 学会発表

1. 内田哲也、種市麻衣子 : Antigen chemically coupled to the surface of liposomes induce potent antitumor immunity 第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月

2. 種市麻衣子、田中ゆり子、垣内史堂、内田哲也 : リンパ節指向型ペプチドはリポソーム結合抗原に対する免疫応答を顕著に増強する 第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 12 月

3. 大野悟史、高山俊輔、守屋修、種市麻衣子、林秀徳、赤塚俊隆、内田哲也、松井政則 : ペプチド結合リポソームによる SARS ウイルス特異的細胞障害性 T 細胞の誘導 第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 12 月

4. 高木明、松井政則、大野悟史、Duan Hongying、守屋修、種市麻衣子、内田哲也、赤塚俊隆 : ペプチド表面結合リポソームによる抗ウイルス CD8+T 細胞の誘導 第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 12 月

5. 永田智也、石垣宏仁、梶野喜一、鹿島祥隆、伊藤靖、種市麻衣子、内田哲也、小笠原一誠 : 表面にリポソームを結合したりポソームによるインフルエンザ感染防御 第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 12 月