

图-1

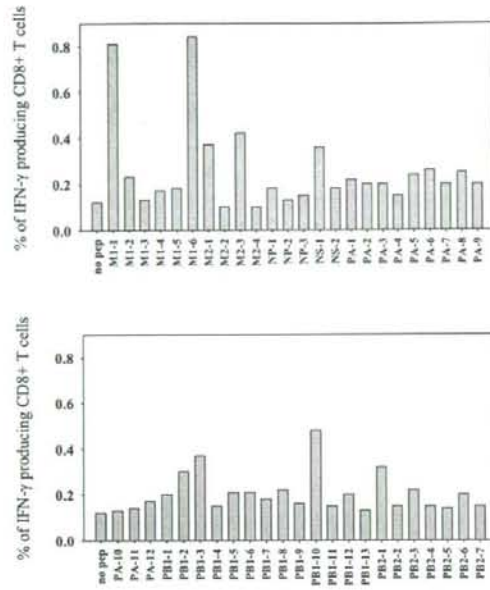


图-3

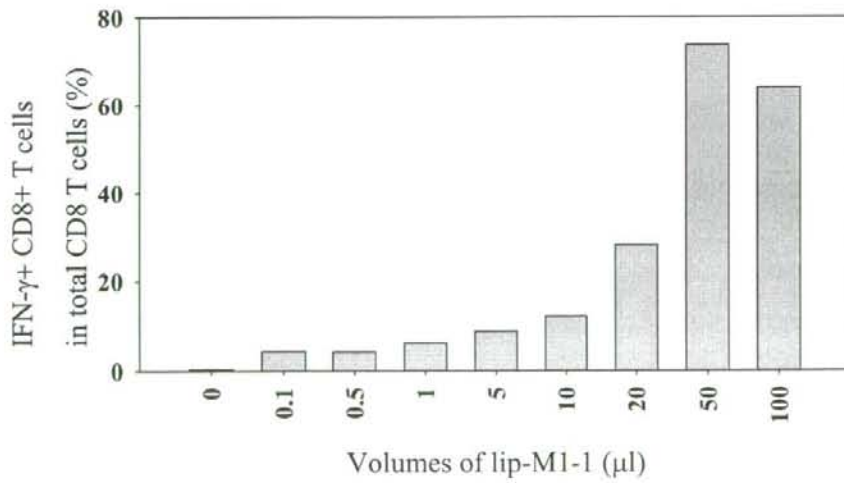


图-2

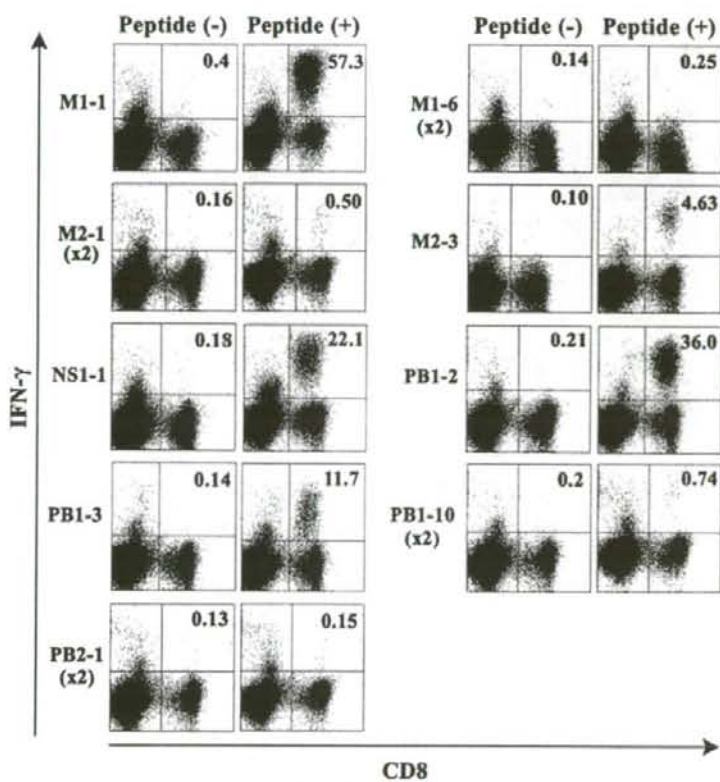


Figure 4

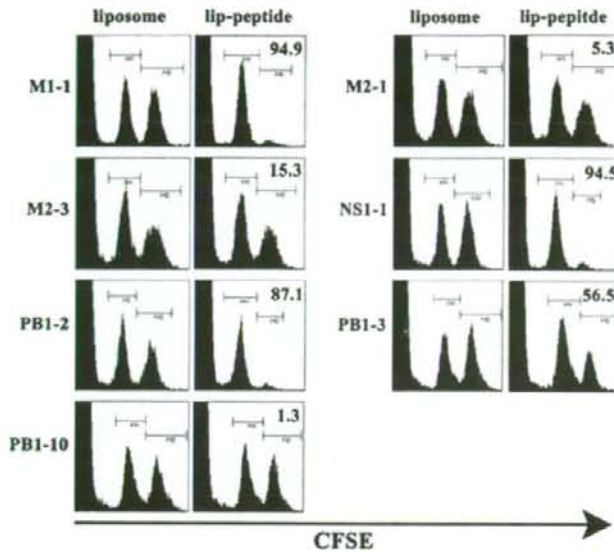


Figure 5

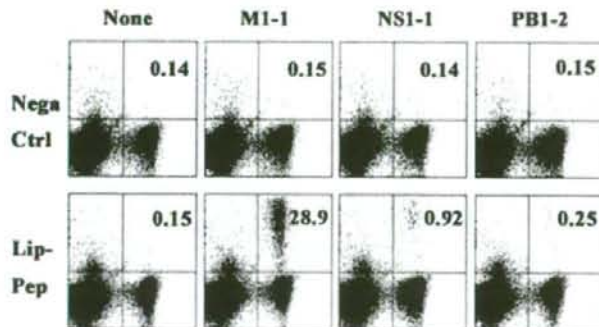


図-6

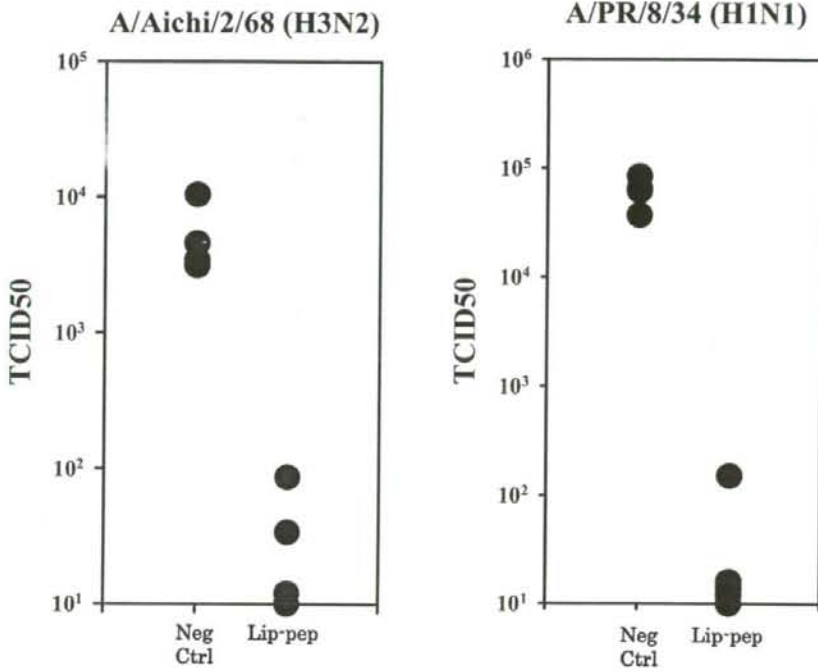
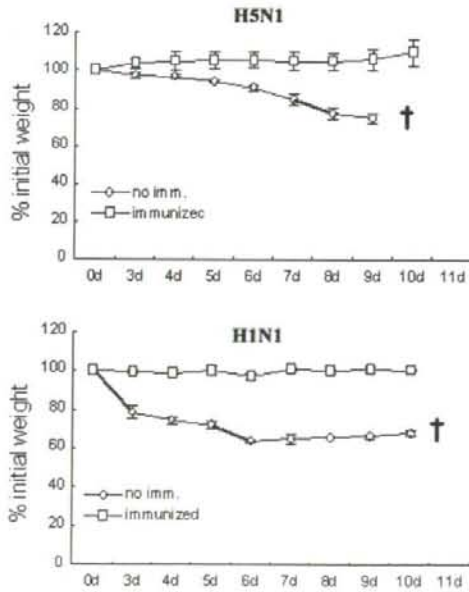


図-7



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

高病原性鳥インフルエンザウイルス関連抗原ペプチドを用いた  
インフルエンザワクチンの開発

研究分担者 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

インフルエンザAウイルスに対する細胞性免疫を誘導するヒト用のペプチド結合リポソームワクチンを開発し、その効果を検証した。インフルエンザAウイルス内部タンパク質由来ペプチドで免疫したMHCヒト化マウスは、3種類の異なる亜型のインフルエンザウイルスの感染に対して防御し、このワクチンの有効性が示された。さらにワクチンによるメモリー誘導効果もみられ、CTL誘導型インフルエンザワクチンの実用化につながる成果が得られた。

A. 研究目的

インフルエンザワクチンとして現在使われている不活化HAワクチンは、液性免疫を部分的に誘導するだけで、その感染防御効果は不十分なものである。そのため、世界中の様々な研究機関で、より強力で安全なワクチンの開発が続けられている。しかし、その多くがHAなどウイルス表面蛋白に対する抗体産生を誘導するものであり、細胞性免疫を誘導するワクチンは手付かずの状態である。本研究では、もう1つの主要な免疫システムである細胞性免疫としてのキラーT細胞(CTL)を誘導することによってインフルエンザAウイルス感染を抑制する事ができるかどうかを検証した。

B. 研究方法

昨年度までに、日本人のおよそ6割が持つMHCであるHLA-A\*2402 (A24)に結合するインフルエンザ内部タンパク由来のペプチドを、インターネット経由で利用可能なエピトープ予測プログラムを用いて検索した。その中から生体内でCTL活性を強く誘導するペプチド7種類を、A24を遺伝子導入したマウス(A24Tg)を用いたスクリーニングにより選別した。今年度はインフルエンザAウイルスに対する感染防御効果を確認するため、ペプチド7種類のうちウイルス亜型間で抗原変異が少ない3種類のペプチドをリポソームに結合させたワクチンと免疫賦与剤CpGでA24Tgを1週間間隔で3回免疫した後、1週間後に3

種類のインフルエンザAウイルス株(A/Hong Kong/483/97(H5N1), A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/Aichi/2/68(H3N2))をそれぞれ感染させ、感染後の体重変化と生残率、肺でのウイルス価を測定して感染防御効果を判定した。また、免疫の投与経路についても皮下・経鼻の2種類を検討した。

(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 (図表含む)

(1) A/Hong Kong/483/97(H5N1)株を用いた感染実験

ペプチド結合リポソームワクチンでA24Tgを経鼻と皮下それぞれから5匹ずつ免疫した。皮下投与群は5匹中1匹が死亡し、残り4匹は感染8日まで対照群と同様の体重変化を示したものの、感染9日目から徐々に回復していった。経鼻投与群は5匹すべてが生存し、体重変化もほとんどみられなかった。従って、皮下投与では部分的な感染防御効果を示したが、経鼻投与では顕著な感染抑制効果を認めた(図1)。

(2) A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 株を用いた感染実験

ペプチド結合リボソームワクチンでA24Tgを経鼻免疫し、1週間後にH1N1ウイルスを経鼻感染させたところ、すべてのマウスが生存して体重変化も全くみられなかった。ウイルス株を変えても顕著な感染抑制効果を示した(図2)。

(3) A/Aichi/2/68 (H3N2) 株を用いた感染実験  
ペプチド結合リボソームワクチンでA24Tgを経鼻免疫し、H3N2ウイルスを経鼻感染させて3日後の肺ウイルス価を測定した。対照群と比較して平均値で1/100のウイルス価の減少がみられ、顕著な感染抑制効果を示した(図3)。

(4) ペプチド結合リボソームワクチンによる免疫記憶誘導  
ペプチド結合リボソームワクチンを3回経鼻免疫後、8週間経過後にH5N1ウイルスを感染させた。4匹中2匹は生き残り、体重も8日目までは対照群と同様に減少したものの、9日目から回復した(図4)。

#### D. 考察

以上の結果より、HLA-A\*2402拘束性ペプチドを結合したリボソームにおいてウイルス亜型に依存しない細胞性免疫誘導型インフルエンザワクチンの有効性が示唆された。

#### E. 結論

CTL誘導型ワクチンによって強毒性インフルエンザウイルスの感染に対する防御能を誘導することが可能であることが示された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
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  
1) 発明の名称: 鳥インフルエンザウイルスワクチン

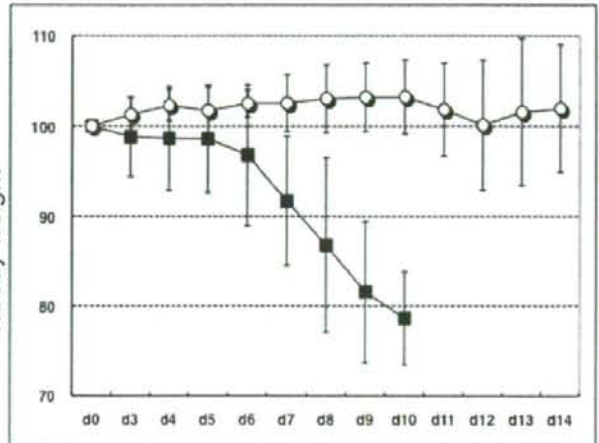
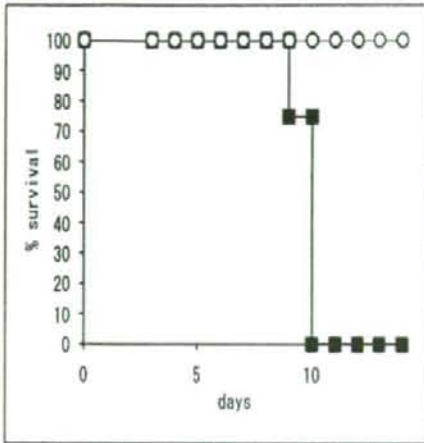
出願番号: 特願 2008-303444

出願日: 2008年11月28日(金)

発明者: 内田哲也、種市麻衣子(国立感染症研)、梶野喜一(北海道大学)、松井政則(埼玉医大)、小田洋(日油)

2. 実用新案登録  
該当なし。
3. その他  
該当なし。

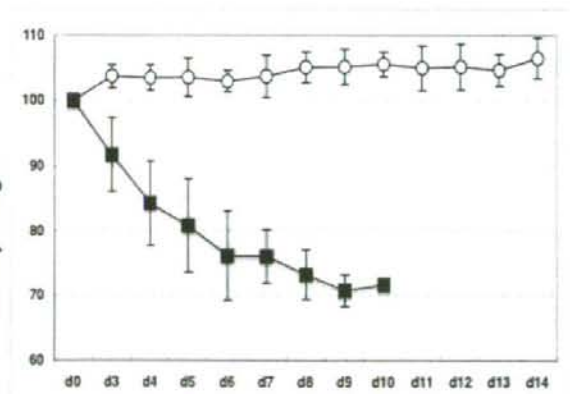
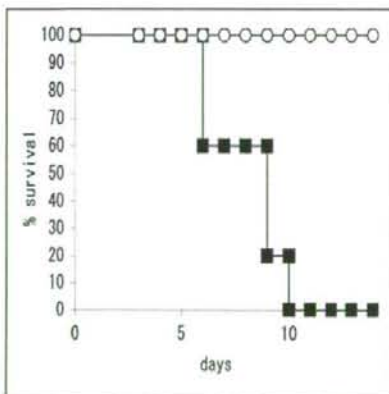
# 図1 H5N1(HK483)



■ no imm.

○ immunized

# 図2 H1N1(PR8)



■ no imm.

○ immunized

図3

H5N1(HK483)

H3N2(Aichi)

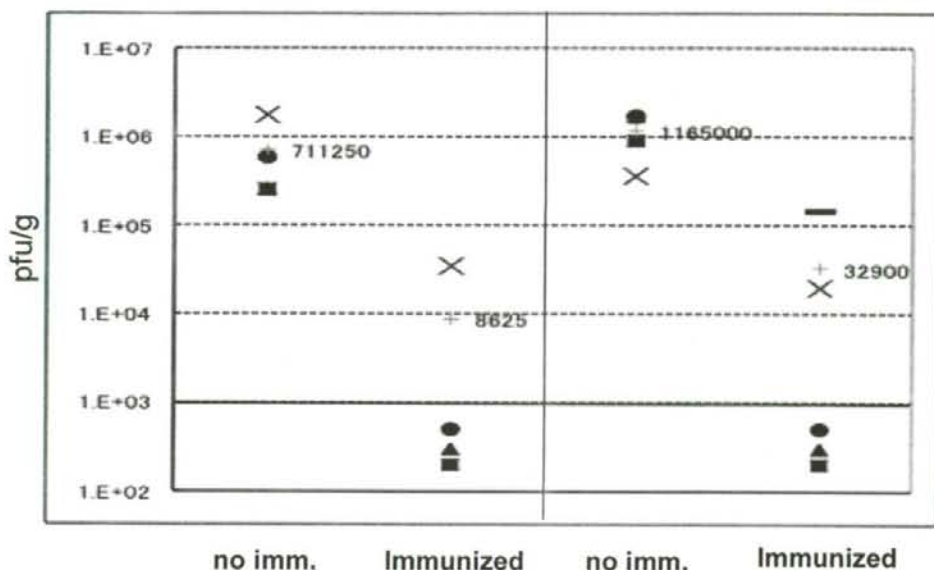
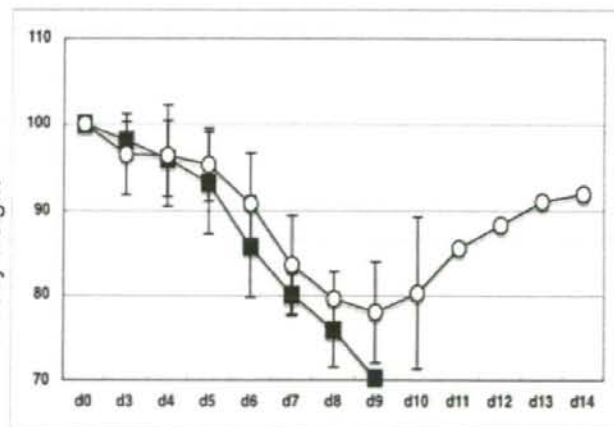
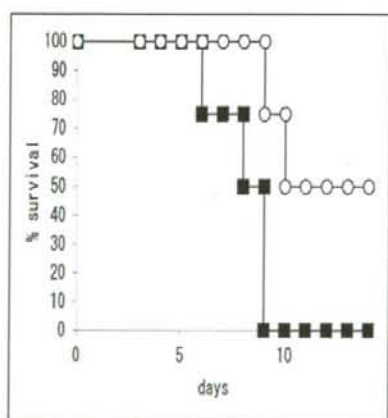


図4

H5N1(HK483)

Virus challenge: 8 weeks after final immunization



■ no imm.

○ immunized



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

リポソームワクチンの投与経路と CTL 誘導との関係の検討

研究分担者 垣内 史堂 東邦大学医学部免疫学講座 教授  
研究協力者 田中ゆり子 東邦大学医学部免疫学講座 助教

**研究要旨** リポソーム結合抗原は外来性抗原であるにもかかわらず抗原提供細胞においてMHCクラス-Iを介してCD8陽性T細胞に呈示され、その結果、細胞性免疫が誘導される。この機序の詳細を明らかにすることを目的として、マクロファージ細胞株の培養中に蛍光標識したリポソーム結合抗原を添加し、抗原の細胞内動態を検討した。マクロファージの抗原食食に対する阻害剤はリポソーム結合抗原の取り込みに影響を与えなかったが、リポソーム結合抗原の取り込みはピノサイトーシス阻害剤によって顕著に抑制された。このことから、リポソーム結合抗原が細胞性免疫の誘導を可能にする原因として、抗原提供細胞による抗原認識・取り込みの段階で、リポソーム結合抗原の挙動が一般の外来性抗原とは異なることが示唆された。

**A. 研究目的**

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が用いられているが、アルミニウムアジュバントは抗体産生（液性免疫）をよく誘導するものの細胞障害性T細胞（CTL：細胞性免疫）は誘導しにくいことが知られている。ウイルス感染を予防することを目的とするワクチンの中には従来のワクチンのように抗体産生を誘導するよりも細胞性免疫を誘導する事がより効果的であると考えられる場合があり、細胞性免疫を誘導することの出来るワクチン処方（永く求められてきた。我々が開発したリポソームワクチンはこの要請に応えうるものであるが、その作用機序、つまり何故リポソーム結合抗原が細胞性免疫を誘導することが出来るか、については未だ不明の点が多い。そこで、本年度はこの機序の解明に焦点を当てて検討を行った。

**B. 研究方法**

抗原としてOVAを用い、蛍光色素 Alexa<sub>488</sub> 標識 OVA あるいは消化を受けると蛍光を発するOVA (DQ-OVA) をリポソーム表面に結合して以下の検討を行った。

マクロファージ細胞株におけるリポソーム結合抗原の細胞内動態：株化マクロファージ

(clone #39) の培養中に蛍光標識 OVA を結合したリポソームを添加し、一定時間培養の後、マクロファージを回収してFACS解析を行った。また、この培養に先だってマクロファージを dimethylamiloride (DMA)、cytocharasin B、primaquine 等の阻害剤で処理して同様の検討を行った。

**C. 研究結果**

マクロファージ細胞株におけるリポソーム結合抗原の細胞内動態：図 1-a に示すように、蛍光標識した OVA (Alexa-OVA) を結合したリポソームの取り込みは DMA によってのみ阻害された。また、図 1-b に示すように、リポソームに結合した OVA のマクロファージにおける消化についても同様の結果が得られ、マクロファージを DMA によって前処理した場合にのみ、抗原の消化が有意に抑制された。

**D. 考察**

通常、外来抗原は生体内でマクロファージをはじめとする抗原提供細胞に貪食されると phagosome によって細胞内を移動し、lysosome 酵素による消化を受けるとMHCクラスIIコンパートメントから細胞表面に移動してCD4陽性T

細胞に呈示される。この結果外来抗原に対する免疫応答は抗体産生が主体となるが、この場合、cytocharasin Bはマクロファージによる抗原の貪食に対する阻害剤であるので抗原の取り込みが著しく抑制されるが、リポソーム結合抗原の取り込みはcytocharasin Bによって抑制されなかった。一方で、ピノサイトーシス阻害剤であるDMAによってマクロファージによるリポソーム結合抗原の取り込みおよび消化が顕著に抑制されたことから、リポソーム結合抗原は通常の外来抗原とは異なる経路で抗原提供細胞内に取り込まれ、細胞内においても異なる移動経路を辿って消化を受け、MHCクラスを介してCD8陽性T細胞に抗原提供された結果、細胞性免疫が誘導されると考えられた。

#### E. 結論

リポソーム結合抗原による細胞性免疫の誘導が抗原提供細胞におけるリポソーム結合抗原の特異な細胞内動態に起因することを示唆する結果が得られた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

1. 種市麻衣子、田中ゆり子、垣内史堂、内田哲也：リポソーム結合CTLエピトープペプチドはCD4陽性ヘルパーT細胞に非依存的にCD8陽性メモリーT細胞を誘導・維持する 第38回日本免疫学会総会、2008年12月

#### 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

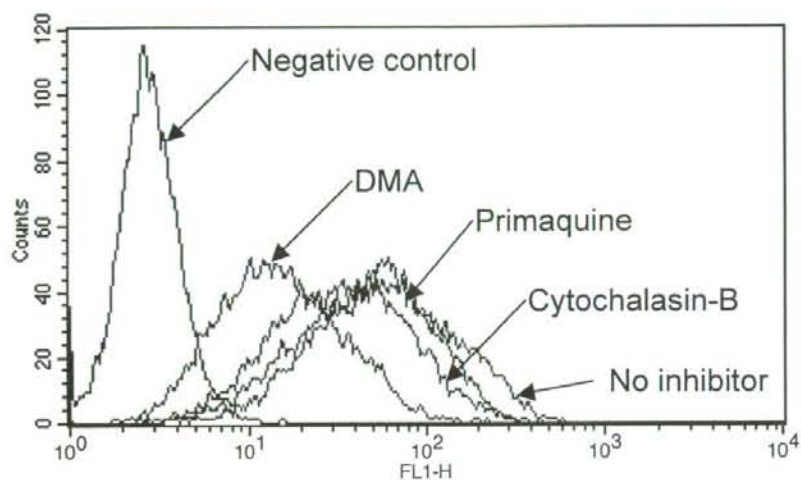
該当なし

##### 3. その他

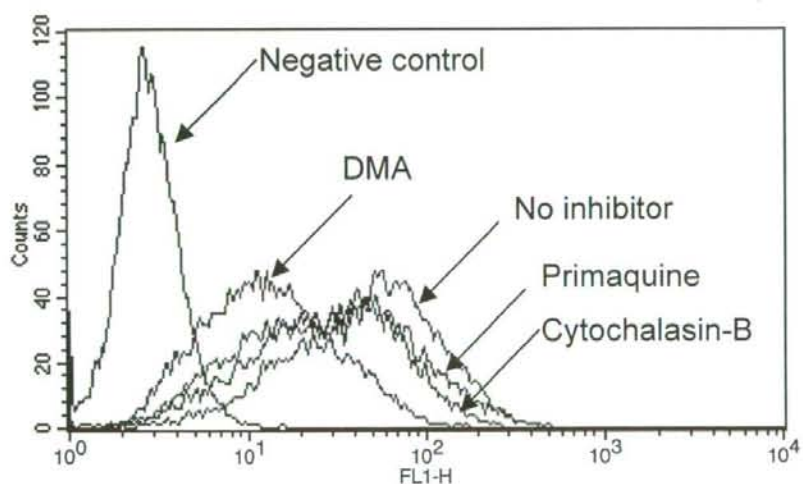
該当なし

図1 マクロファージ細胞株(clone #39)によるリポソーム結合OVAの  
取り込み(a)および消化(b)への各種阻害剤の影響。

### a. Alexa-OVA



### b. DQ-OVA



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

抗原ペプチドとリボソームとの最適結合方法の検討

研究分担者 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** ペプチド結合リボソームによるCTLの誘導・維持に関して、抗原として卵白アルブミン（OVA）を用いた基礎検討を行った。昨年度は、我々が開発したペプチド結合リボ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を報告した。本年度はワクチンの持続効果を考える上で重要なCTLの維持についての検討を行った。その結果、CTLエпитープペプチドのみを結合したリボソームで免疫することにより誘導されるCTLは免疫後20週でも確認でき、通常ではCTL反応を誘導しない濃度の抗原単独溶液の投与により速やかにCTL反応の増強が認められた。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。以上の結果からペプチド結合リボソームによる免疫においては、CTLが長期にわたって維持され2次刺激によって速やかにCTL反応が増強されること、またその維持はCD4陽性T細胞によるヘルプを必要とし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ボ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、我々が開発したリボ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・維持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。昨年度はリボソーム結合ペプチドによるCTLの誘導に関しての検討を行ったが、本年度はCTLの維持に焦点をあてて検討を行った。

**B. 研究方法**

抗原としてOVAを用い、リボソーム表面にOVAのCTLエピトープ：OVA<sub>257-264</sub>（H-2<sup>b</sup>拘束性）を結合してCBF1マウス（H-2<sup>b/d</sup>）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には（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**

OVA<sub>257-264</sub>結合リボソームは顕著にCTLを誘導し、その効果は免疫後20週でも認められた。また、免疫後の時間経過と共にCTL反応の低下が認められたが、通常ではCTL反応を誘導しない濃度の抗原単独溶液の投与（ブースト）により、速やかに有意なCTL反応の増強が認められた（図1）。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、免疫後10週のCD4陽性T細胞除去群においても正常マウスと同様にCTLの維持、及びブーストによる有意なCTL反応の増強が認められた（図2）。以上の結果から、CTLエピトープペプチドのみを結合したリボソームを免疫することによりCTL反応は誘導・維持され、CD4陽性T細胞のヘルプは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リボソームで免疫したマウスを用いた検討により、CTLが誘導・維持される事が確認された。図1で示す

ようにCTL反応は免疫後20週においても確認でき、またブーストにより速やかにCTL反応の増強が認められた。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維持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。以上の結果からCTL誘導型ペプチド結合リポソームは、より簡略な構成で効果が持続するワクチンとして有効である。

#### E. 結論

CTLの維持に関して、CTLエピトープペプチドのみを結合したリポソームを免疫することによりCTL反応は長期にわたって維持され、CD4陽性T細胞のヘルプは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. 内田哲也、種市麻衣子。リポソーム表面抗原を用いたワクチン創製。日本臨床、66(10)、1894-1902、2008。

2. 内田哲也、種市麻衣子。万能インフルエンザワクチン実現へ繋がるCTL誘導リポソームワクチンの開発。バイオインダストリー、25(11)、95-103、2008。

3. 内田哲也、種市麻衣子。万能インフルエンザワクチン。化学と生物、46(12)、812-814、2008。

##### 2. 学会発表

1. 高木徹、松井政則、守屋修、赤塚俊隆、小林信春、種市麻衣子、内田哲也：ペプチド表面結合リポソームはCD4ヘルプなしに抗ウイルスCD8<sup>+</sup>メモリーT細胞を誘導する 第56回日本ウイルス学会、2008年10月

2. 高木徹、松井政則、赤塚俊隆、種市麻衣子、内田哲也：ペプチド表面結合リポソームによる抗ウイルスCD8<sup>+</sup>T細胞反応の効率的な誘導 第12回日本ワクチン学会、2008年11月

3. 種市麻衣子、田中ゆり子、垣内史堂、内田哲也：リポソーム結合CTLエピトープペプチドは

CD4陽性ヘルパーT細胞に非依存的にCD8陽性メモリーT細胞を誘導・維持する 第38回日本免疫学会総会、2008年12月

4. 高木徹、大野悟史、守屋修、松井政則、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はCD4ヘルパーなしに抗ウイルスCD8<sup>+</sup>メモリーT細胞を誘導する 第38回日本免疫学会総会、2008年12月

5. Highly efficient anti-viral CD8<sup>+</sup> effector and memory T cell induction without T cell help by peptides coupled to the surface of liposomes. Takagi, A., M. Matsui, O. Moriya, N. Kobayashi, T. Akatsuka, Oda, H., M. Mori, A. Kobayashi, Taneichi, M., T. Uchida. Fronteers in Immunology Conference (Frontiers in Immunological Memory). Newport Beach, USA September, 2008

6. Memory CD8 T cell induction without CD4 T cell help by peptides coupled to the surface of liposomes. Takagi, A., M. Matsui, O. Moriya, N. Kobayashi, H. Oda, M. Mori, H. Yamamura, M. Taneichi, T. Uchida, and T. Akatsuka. The 15th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses. San Antonio, Texas, USA October, 2008

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

1) 発明の名称：鳥インフルエンザウイルスワクチン

出願番号：特願2008-303444

出願日：2008年11月28日（金）

発明者：内田哲也、種市麻衣子（国立感染研）、梶野喜一（北海道大学）、松井政則（埼玉医大）、小田洋（日油）

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

##### 3. その他

該当なし。

図 1 リポソーム結合OVAペプチドによるCTLの維持

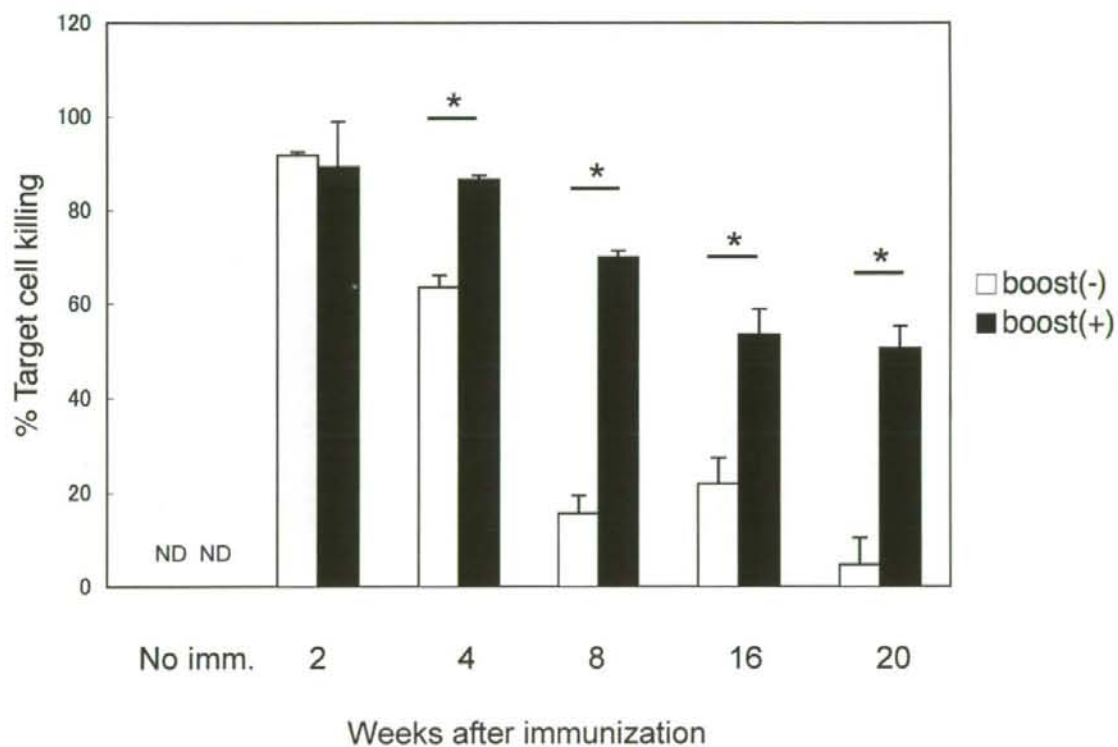
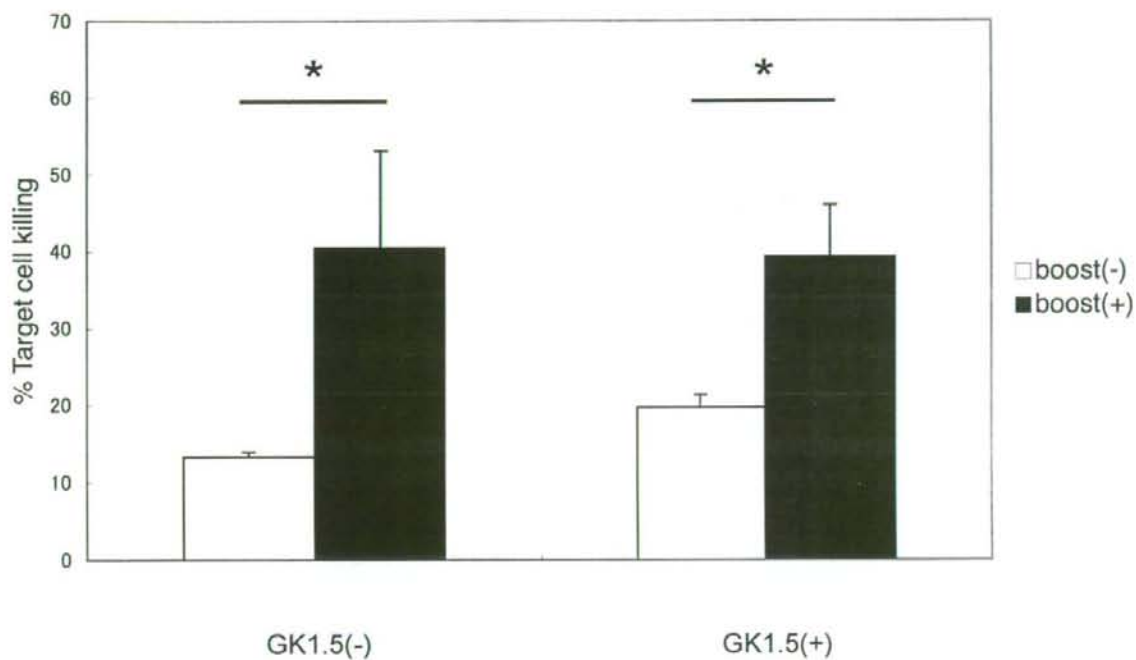


図 2 リポソーム結合OVAペプチドによるCTLの維持におけるGK1.5の影響



### 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、種市麻衣子	リポソーム表面抗原を用いたワクチン創製	日本臨床	66	1894-1902	2008
内田哲也、種市麻衣子	万能インフルエンザワクチン実現へ繋がるCTL誘導リポソームワクチンの開発	バイオインダストリー	25	95-103	2008
内田哲也、種市麻衣子	万能インフルエンザワクチン	化学と生物	46	812-814	2008
松井政則、高山俊輔、内田哲也	特集I：感染症に対するワクチンの開発とその免疫理論 SARSワクチンの開発	臨床免疫・アレルギー科	50	511-517	2008
Ohno S, Kohyama S, Taneichi M, Moriya O, Hayashi H, Oda H, Mori M, Kobayashi A, Akatsuka T, Uchida T, Matsui M	Synthetic peptides coupled to the surface of liposomes effectively induce SARS coronavirus-specific cytotoxic T lymphocytes and viral clearance in HLA-A*0201 transgenic mice.	Vaccine		in press	2009

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

研究動向 ワクチン製造

## リポソーム表面結合抗原を用いた ワクチン創製

内田 哲也 種市麻衣子

Application of surface-linked liposomal antigens for the development of vaccines

Tetsuya Uchida, Maiko Taneichi

Department of Safety Research on Blood and Biological Products,  
National Institute of Infectious Diseases

### Abstract

The potential ability of surface-linked liposomal antigens for application to vaccine development was investigated. During the course of this investigation, a significant difference, which correlated closely with the adjuvant activity of liposomes, was observed in the recognition of liposomal antigens by APCs between liposomes with different lipid components. In addition to this "quantitative" difference between liposomes with differential lipid components, a "qualitative" difference (i.e., the differential ability to induce cross-presentation) was observed among liposomes with different lipid components. Although the precise mechanism underlying this difference is currently unclear, the significant difference in membrane mobility observed between these liposomes might affect their ability to induce cross-presentation. Thus, surface-linked liposomal antigens are potentially applicable for the development of vaccines with the least allergic side effects and for a novel protocol of allergen immunotherapy. In addition, by the utilization of their ability to induce cross-presentation, surface-linked liposomal antigen might potentially serve as a candidate protocol for virus vaccines which induce CTL response, and for tumor vaccine preparation to present tumor antigens to APCs and induce effective antitumor responses.

**Key words:** liposome, vaccine, tumor, virus, cross-presentation

### はじめに

著者らはこれまで、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、著者ら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に特異的なIgE抗体の産生が選択的に抑制されることを見いだした。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

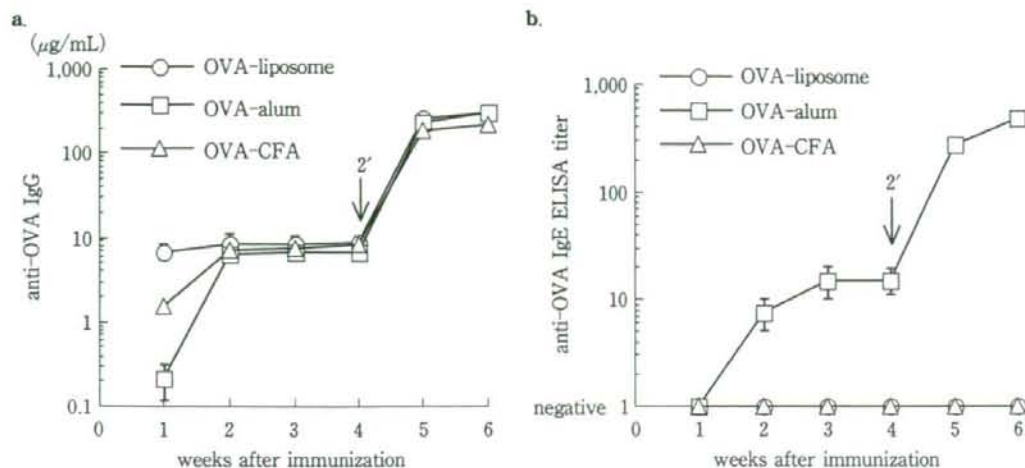


図1-a OVA免疫マウスにおける抗OVA IgG抗体産生

BALB/cマウスに3種類の異なるアジュバントを用いてOVAを0週、4週の2回免疫し、血清中の抗OVA IgG抗体をELISAを用いて測定した。

-b OVA免疫BALB/cマウスにおける抗OVA IgE抗体産生

図1-aの血清について抗OVA IgE抗体をELISAを用いて測定した。

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。更に、ワクチンの創製に使用す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MHCクラスIを介して抗原提供細胞から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応用することが期待された。

本稿では、リポソーム表面結合抗原を用いてこれまでに行われた検討の経緯および今後の臨床応用可能性について解説を行う。

### 1. 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1-a)が、抗OVA IgE抗体産生は

表1 OVA免疫マウスにおける抗OVA IgG1/IgG2a産生

immunization	anti-OVA antibodies (mg/mL)	
	IgG1	IgG2a
OVA-liposome	260.2±72.7	239.4±80.8
OVA-alum	252.8±70.4	32.6±5.4*
OVA-CFA	29.2±11.5	132.7±21.7*

図1の実験における初回免疫6週後の血清について、抗OVA Igサブクラスを測定した。

\*有意差(p<0.01)あり

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1-b)。初回免疫6週後における抗OVA Ig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みられなかった(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-リポソームはどちらとも