

200812006B

厚生科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

細胞性免疫誘導能を持つペプチド結合リポソームを
応用したウイルスワクチンの創製

平成 18 年度～20 年度 総合研究報告書

研究代表者 内田 哲也

平成 21 (2009) 年 3 月

厚生科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業

細胞性免疫誘導能を持つペプチド結合リポソームを
応用したウイルスワクチンの創製

平成 18 年度～20 年度 総合研究報告書

研究代表者 内田 哲也

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告

細胞性免疫誘導能を持つペプチド結合リボソームを応用したウイルスワクチンの創製…… 1
内田 哲也

II. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 10

III. 研究成果の刊行物・別刷…………… 12

I. 総合研究報告

細胞性免疫誘導能を持つペプチド結合リボソームを応用した
ウイルスワクチンの創製

研究代表者 内田 哲也 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

平成 18 年度に行われた検討により、我々が開発した抗原特異的細胞性免疫 (CTL) 誘導可能なリボソーム処方を用いて、1. 高病原性鳥インフルエンザワクチンの開発、2. SARS ワクチンの開発、3. C 型肝炎ワクチンの開発に向けた検討を行った。その結果、リボソーム結合ペプチドが顕著に抗原特異的 CTL を誘導することが上記 3 種類全てのウイルス由来ペプチドにおいて確かめられた。

平成 19 年度は CTL 誘導型ウイルスワクチンの創製に用いるイムノドミナントな CTL エピトープの同定作業を高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) および SARS コロナウイルスについて行った。その結果、H5N1 の内部構造タンパク由来で高効率に CTL を誘導するペプチドが多数同定され、そのうち複数のものがヒトインフルエンザウイルス H1N1 (A ソ連型) および H3N2 (A 香港型) に共通に含まれることがわかった。このことから、ヒトインフルエンザと鳥インフルエンザに対して共通に有効なワクチンの創製が可能になることが期待された。SARS コロナウイルスについてもイムノドミナントな CTL エピトープが複数同定された。また、C 型肝炎ワクチンについても組み換えワクシニアウイルスを用いたチャレンジ実験でリボソーム結合ペプチドによる感染予防効果が確認されたことから、C 型肝炎ワクチンの創製に応用することが可能であることが示唆された。

平成 20 年度は、平成 19 年度に同定した高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1 亜型) の内部構造タンパク由来 CTL エピトープペプチドを用いて、リボソーム結合ペプチドによるインフルエンザウイルス感染抵抗性誘導の可否について、ヒト HLA を遺伝子導入したマウスを用いたウイルス感染実験により検討した。その結果、非免疫対照群においては H5N1、H1N1 インフルエンザウイルスの経鼻感染後、顕著な体重減少の後に死亡したのに対して、リボソーム結合ペプチド免疫マウスは無徴候で生存した。さらに H5N1、H1N1、および H3N2 インフルエンザウイルスの肺における増殖も顕著に抑制したことから、CTL 誘導型リボソームワクチンによってウイルス感染抵抗性を誘導することが可能であること、単一のワクチン処方が H5N1、H1N1、H3N2 等のウイルス亜型に有効であること、が明らかとなった。本研究で得られた成果につき、計 3 件の特許出願を行った。

研究分担者

- 赤塚 俊隆 (埼玉医科大学微生物学教室教授)
松井 政則 (埼玉医科大学微生物学教室准教授)
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)
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)
石川 昌 (東京大学大学院分子予防医学教室准教授) :平成 18-19 年度
垣内 史堂 (東邦大学医学部免疫学講座教授)
:平成 20 年度
小田 洋 (日本油脂株式会社 DDS 研究所チームリーダー) :平成 18-19 年度
横山 晶一 (日油株式会社 DDS 研究所処方グループグループリーダー)
:平成 20 年度

A. 研究目的

現行のウイルスワクチンはウイルス抗原に対する抗体の産生(液性免疫)を誘導することを目的としている。抗体はウイルス粒子の表面抗原に対するものであるため、表面抗原の異なるウイルス亜種が出現するとワクチンが有効に働かなくなるという欠点がある。これに対し、ウイルスに対する細胞性免疫を誘導するワクチンが開発されれば、より保存されたウイルスの内部構造蛋白および調節性蛋白由来のエピトープを標的とした細胞性免疫の誘導が可能となり、ウイルスの変異の影響を受けることなく単一のワクチンで複数のウイルス亜種に対する免疫を誘導することが期待される。

従来ワクチンにアジュバントとして用いられてきたアルミニウムアジュバントは液性免疫の誘導には適しているが細胞性免疫を誘導しにくいという欠点があった。我々は近年、細胞性免疫誘導能の高いリポソーム処方を開発した。

本研究ではこのリポソーム処方を細胞性免疫(CTL)誘導型ウイルスワクチンの創製に応用し、現在開発が待たれている高病原性鳥インフルエンザワクチン、SARS ワクチン、C 型肝炎ワクチンを開発することを目的とする。

B. 研究方法

(1) イムノドミナントエピトープの同定:平成 18-19 年度に CTL 誘導型ワクチンの創製に用いるイムノドミナントエピトープの同定を行った。高病原性鳥インフルエンザ、SARS、C 型肝炎の各ウイルスについて、細胞性免疫の標的とするに適したイムノドミナントエピトープの同定を行った。各ウイルスにつき、ヒト主要組織適合抗原(MHC)クラス I に結合する抗原ペプチドを検索システムを用いて選び、それに基づいて合成したペプチドのクラス I への結合親和性を測定した。クラス I への結合親和性の高いペプチドにつき、リポソーム結合物を作製して *in vitro* (試験管内) および *in vivo* (生体内) での抗原特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)の誘導能を検討した。これらの検討を通じて本研究の目的に最も適した抗原ペプチドを決定した。

(2) インフルエンザウイルス感染実験:平成 20 年度は、平成 19 年度までに同定した CTL エピトープを用いてリポソーム結合ペプチドによるウイルス感染抵抗性誘導の可否について検討を行った。高病原性鳥インフルエンザ(H5N1 型)ウイルスの内部構造タンパクの中から検索・同定された CTL エピトープのうち、ヒトインフルエンザウイルス H1N1 型(A ソ連型) および H3N2 型(A 香港型)にも共通に含まれるものを選んでリポソームに結合し、ワクチンを作製した。このワクチンを HLA-A2 あるいは HLA-A24 の MHC class I を遺伝子導入したマウス(A2 あるいは A24 トランスジェニックマウス)に接種し、1 週間後に致死量の

H5N1 あるいは H1N1 ウイルスを経鼻感染させて経過を観察した。マウスに対して致死性の無い H3N2 型 (A 香港型) についてはウイルスの経鼻感染後にマウスの肺を回収し、ウイルス価を測定した。

(3) リポソーム結合抗原の生体内における移動経路の検討：本研究においては、リポソーム結合抗原が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内在性抗原と同様の経路で処理され、その結果、細胞性免疫が誘導されることを利用している。しかし、この間の機序の詳細は未だ明らかではない。この機序を解明することはリポソームワクチンを臨床応用するにあたって必須であると考えられることから、リポソーム結合抗原の抗原提供細胞内における動態の解析を行った。

(4) リポソーム結合抗原による CD8 陽性メモリー T 細胞誘導の検討：リポソーム結合抗原をワクチンとして臨床応用するための条件として、従来の抗体誘導型ワクチン同様、細胞性免疫 (CTL) 誘導型ワクチンにおいても免疫メモリーを誘導することが必須である。リポソーム結合抗原によって抗原特異的に CD8 陽性メモリー T 細胞を誘導することが可能か否かを検討した。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所において本研究に使用した実験動物は「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、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た。北海道大学における遺伝子改変動物 (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。埼玉医大に

おいて使用したマウスは、埼玉医大・実験動物管理運営規定に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。H1N1, H3N2 ウイルスを使用した実験は、BSL2 施設 (埼玉医大) で、H5N1 ウイルスの実験は、BSL3 施設 (北大) で行なった。

C. 研究結果

平成 18 年度に得られた成果：

(1) 高病原性鳥インフルエンザワクチンの開発：H5N1 型鳥インフルエンザウイルス株 A/Hong Kong/483/97 の nucleoprotein (NP) から MHC class I 分子に結合するペプチド 2 種類を結合モチーフ予測システムを用いて選び出し、合成した。リポソームに結合したペプチドの効果を *in vivo* CTL assay により判定したところ、リポソームと結合したペプチドは何れも CTL 活性化を誘導した。

(2) SARS ワクチンの開発：既知の SARS スパイク由来のペプチド結合リポソームをマウスに免疫することにより効率よく SARS 特異的 CTL を誘導することが可能であることを確認した上で、エピトープ予測ソフトを用い、SARS ウイルスの pp1a 領域から 30 種、NP から 8 種の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを予測し、合成ペプチドを作製した。そして、HLA-A2 への結合親和性を測定したところ、計 38 種のペプチドのうち 29 種類が極めて高い結合アフィニティを示し、予測が良好でエピトープの可能性が高いことがわかった。これらの予測エピトープをコードする人工遺伝子を PCR により作製し、これらを発現するプラスミド、組換えアデノウイルス及びワクシニアウイルスを作製した。

(3) HCV ワクチンの開発：リポソームワクチンのウイルスワクチンとしての有効性を、マウスの

LCMV 感染実験をモデルとして検討した。LCMV GP₃₃₋₄₁ ペプチド結合リポソームをマウスに免疫したところ、有意な CTL の誘導が認められた。更に LCMV チャレンジ実験で、ウイルス感染をほぼ完璧にブロックできた。以上の結果を踏まえ、現在 HCV ワクチンの創製に向けた CTL エピトープの同定を進めている。

(4) ペプチドのキャリアーとしてのリポソーム処方の開発：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。

(5) リポソーム結合抗原の生体内移動経路に関する検討：2種類の脂質組成の異なるリポソーム、飽和脂肪酸リポソームおよび不飽和脂肪酸リポソームを用いて、リポソーム結合抗原経口投与後の生体内における移動経路を検討したところ、OVA-飽和脂肪酸リポソームの経口投与によってはリポソーム抗原のバイエル板 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、OVA-不飽和脂肪酸リポソーム投与によっては 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紮した腸管に直接投与しても同様であった。このことから、経口免疫においては不飽和脂肪酸リポソームよりも飽和脂肪酸リポソームの方が適していることが示唆された。

平成 19 年度に得られた成果：

(1) 高病原性鳥インフルエンザワクチンの開発：H5N1 型鳥インフルエンザウイルスを構成するタンパクをコードする遺伝子 8 分節のうち、表面の

HA および NA を除いた 6 分節につき、検索ソフトを用いて HLA-A2 および HLA-A24 拘束性の CTL エピトープ候補を選択した。これらの候補につき、class I 結合親和性、CTL 誘導能でスクリーニングを行った結果、現時点で HLA-A2 拘束性のものが 5 種類、HLA-A24 拘束性のものが 10 種類の計 15 種類の CTL エピトープが見い出され、これらのうち 8 種類のペプチドは特に強力で CTL を誘導した。また、全 15 種類のうち 8 種類の CTL エピトープはヒトインフルエンザウイルス H1N1 および H3N2 に共通のものであった。

(2) SARS ワクチンの開発：(1)と同様の手順により SARS コロナウイルス由来の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープの同定を試みた。変異の少ない内部構造タンパク質 (NP) と調節性タンパク質 (pp1a) 領域内で検索を行った結果、5 種類の強い CTL 誘導活性を有するエピトープを見出した。

(3) HCV ワクチンの開発：マウスの LCMV 感染モデルを用いた検討の結果、1. 極めて微量のペプチド結合リポソームにより完全な感染防御効果が得られ、2. 慢性持続感染を引き起こすウイルスにも有効であり、3. 経鼻投与によりウイルスの気道感染も防御できることがわかった。以上の結果を踏まえ、HCV 由来エピトープとリポソームとの結合物を作製して HLA 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスに免疫した結果、ワクシニアウイルスを用いたチャレンジ実験において感染予防効果が確認された。

(4) ペプチド-リポソームによる CTL 誘導の必要条件の検討：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を結合したリポソームで免疫することにより CTL が誘導され、このことは 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、CD4 陽性 T 細胞によるヘ

ルブは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。

平成20年度に得られた成果：

(1) インフルエンザウイルス感染実験：H5N1型鳥インフルエンザウイルス（HK483株）、H1N1型ヒトインフルエンザウイルス（PR8株）を20LD₅₀、経鼻感染させると、非免疫対照群では顕著な体重減少の後に死亡したが、リポソーム結合ペプチド免疫群ではA2トランスジェニックマウス、A24トランスジェニックマウスとも無徴候で生存した。H5N1型、H1N1型、およびH3N2型（A香港型Aichi株）ウイルスの肺における増殖を検討したところ、免疫群では非免疫群と比較してウイルス増殖が顕著に抑制された。ウイルス感染2週間後のリポソーム結合ペプチド免疫マウスの肺からはウイルスは検出されなかった。

(2) リポソーム結合抗原の生体内における移動経路の検討：抗原提供細胞としてマクロファージ細胞株を用い、培養中に抗原を蛍光標識したリポソーム結合抗原を添加してマクロファージにおける細胞内動態を観察した。通常、外来性抗原はマクロファージに貪食されるが、リポソーム結合抗原はマクロファージに対して貪食阻害剤を作用させても変わらずに細胞内に取り込まれた。一方、マクロファージが細胞外の物質を細胞内に取り込むもうひとつの方法である「ピノサイトーシス」に対する阻害剤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は著しく減少した。このことから、我々が開発したリポソームは抗原提供細胞によるピノサイトーシスを利用してリポソーム結合抗原を細胞内に取り込ませ、その結果細胞性免疫が誘導されることが示唆された。

(3) リポソーム結合抗原によるCD8陽性メモリーT細胞誘導の検討：卵白アルブミン（OVA）由来のCTLエピトープ、OVA₂₅₇₋₂₆₄を結合したリポソーム

をマウスに免疫することによって誘導されるCTLは免疫20週後においても検出され、20週における累加免疫によって顕著なCTL応答の増強が見られたことから、リポソーム結合ペプチドの免疫によって抗原特異的CD8陽性メモリーT細胞が誘導されることが示唆された。また、同様の結果はCD4陽性T細胞を除去したマウスにおいても得られたことから、リポソーム結合ペプチドによって抗原特異的CD8陽性メモリーT細胞を誘導する際にCD4陽性T細胞は必須ではないことが明らかとなった。

D. 考察

平成19年度までに同定されたH5N1鳥インフルエンザウイルス由来CTLエピトープの多くがヒトインフルエンザウイルスH1N1およびH3N2と共通のものであったことから、これらのエピトープを用いてCTL誘導型インフルエンザワクチンを創製すれば高病原性鳥インフルエンザだけでなくヒトインフルエンザの予防にも有効であることが期待された。さらに、平成20年度に実施されたウイルス感染実験の結果、従来の抗体誘導型ワクチンとは異なり、細胞性免疫（CTL）誘導型ワクチンによってウイルス感染抵抗性が誘導可能であることが示唆された。インフルエンザウイルス亜型に共通して存在するCTLエピトープを利用してワクチンを創製することにより、ウイルス亜型に共通して有効性を発揮するワクチンを創製することが可能であると考えられた。

鳥インフルエンザウイルスと同様の手法でSARSウイルス由来のCTLエピトープの同定作業が行われ、CTL誘導型リポソームワクチンの創製に利用可能なエピトープが複数得られた。

マウスのLCMV感染モデル系を用いた検討により、リポソーム結合ペプチドが高効率にCTLを誘導してウイルス感染抵抗性を誘導することが確

かめられた。特に、慢性持続感染を惹起するウイルスに対する有効性も確認されたことから、C型肝炎に対する治療型ワクチンの創製への応用も期待された。

CTL 誘導型リボソームワクチンの構成を決定する上で重要なヘルパーエпитープの必要性の有無に関して、リボソーム結合ペプチドはCTL エピトープのみで高効率にCTL を誘導することがCD4陽性T細胞を除去したマウスにおいても確認されたことから、このワクチンにおいてヘルパーエピトープは必ずしも必要ではないことが示唆された。このことはワクチンの構成をより簡略なものに出来ることを意味する。

リボソーム結合ペプチドはCD4陽性T細胞非存在下でCD8陽性メモリーT細胞を誘導することが確かめられた。ここで得られた結果はこれまでの、CD8陽性メモリーT細胞の誘導にCD4陽性T細胞が必須である、という数多くの報告に対して新しい知見を提供する。効率よく免疫誘導を行い得る条件下においては、CD8陽性メモリーT細胞の誘導にCD4陽性T細胞は必ずしも必須ではないと考えられた。

我々が開発したリボソーム結合抗原によって高効率に細胞性免疫が誘導される機序について、リボソーム結合抗原が抗原提供細胞に取り込まれる方法が通常の外来抗原の場合と著しく異なることが原因であることを示唆する結果が得られた。このことにより、リボソーム結合抗原はウイルスが細胞に侵入した場合に近似した細胞内動態を辿り、MHC class Iを介してCD8陽性T細胞に呈示された結果CTLが誘導されると考えられた。

E. 結論

CTL 誘導型ワクチンによってインフルエンザウイルス感染抵抗性を誘導することが可能であるこ

とが明らかとなった。同様の手法は表面抗原の変異しやすい他のウイルス (HIV、HCV、SARS 等) による疾患を予防するワクチンの創製にも応用可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 内田哲也. リボソーム表面結合抗原の臨床応用
東京医科大学雑誌 2006;64 (5) 443-450
2. Komori, H., T. Nakatsura, S. Senju, Y. Ikuta, K. Yokomine, Y. Yoshitake, Y. Motomura, T. Beppu, M. Matsui, T. Torigoe, N. Sato, H. Baba, and Y. Nishimura. 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.
3. Ohno, S., O. Moriya, T. Yoshimoto, H. Hayashi, T. Akatsuka, and M. Matsui. Immunogenic variation between multiple HLA-A*0201-restricted, hepatitis C virus-derived epitopes for cytotoxic T lymphocytes. *Viral Immunol.* 19: 458-467, 2006.
4. 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.
5. 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.

6. 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.

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

8. 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

9. 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

10. 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

11. 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 第50巻 第5号511-517, 2008

12. Ohno, S., S. Kohyama, M. Taneichi, O. Moriya, H. Hayashi, H. Oda, M. Mori, A. Kobayashi, T. Akatsuka, T. Uchida, and M.

Matsui. 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* (2009) in press.

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

2. 内田哲也、種市麻衣子：Antigens 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

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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リポソームによる
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

7. 田中ゆり子、種市麻衣子、笠井道之、垣内史
堂、内田哲也：不飽和脂肪酸からなるリポソ
ームの表面に結合した抗原により誘導されるク
ロスプレゼンテーションの機序 第 37 回日本免疫
学会総会、2007 年 12 月

8. 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 第 128 回日本薬学会、
2008 年 3 月

9. Highly efficient anti-viral CD8⁺ T-cell
induction by peptides coupled to the surface
of liposomes. Akira Takagi, Masanori Matsui,
Satoshi Ohno, Hongying Duan, Osamu Moriya,
Nobuharu Kobayashi, Hiroshi Oda, Masahito Mori,
Hiroyuki Yamamura, Maiko Taneichi, Tetsuya
Uchida, Toshitaka Akatsuka. 14th International
Symposium on Hepatitis C Virus & Related
Viruses. Glasgow, Scotland UK, Sep. 9-13,
2007.

10. 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⁺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

11. 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⁺ 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

12. 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

13. 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
+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

14. Highly efficient anti-viral CD8⁺ 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

15. 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 (特許出願済 3 件)

a. 発明の名称: 「T細胞活性化剤」

出願番号: 特願 2006-21720

出願日: 平成 18 年 8 月 9 日

発明者: 内田哲也 (国立感染研)、小田洋 (日油)

b. 発明の名称: 「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」

出願番号: 特願 2008-304965

出願日: 2008 年 11 月 28 日 (金)

発明者: 内田哲也 (国立感染研)、松井政則 (埼玉医大)、小田洋 (日油)

c. 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

II. 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 |
| 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 |

| | | | | | |
|---|--|------------------------------------|----|-----------|------|
| Nagata T, Toyota T, Ishigaki H, Ichihashi T, Kajino K, Kashima Y, Itoh T, Mori M, Oda H, Yamamura H, Taneichi M, Uchida T, Ogasawara K. | Peptide coupled to the surface of a kind of liposome protect infection of influenza viruses | Vaccine | 25 | 4914-4921 | 2007 |
| Tetsuya Uchida Maiko Taneichi | Clinical application of surface-linked liposomal antigens | Mini-Reviews in Clinical Chemistry | 8 | 184-192 | 2008 |
| 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 |

III. 研究成果の刊行物・別刷

| |
|-----|
| 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)

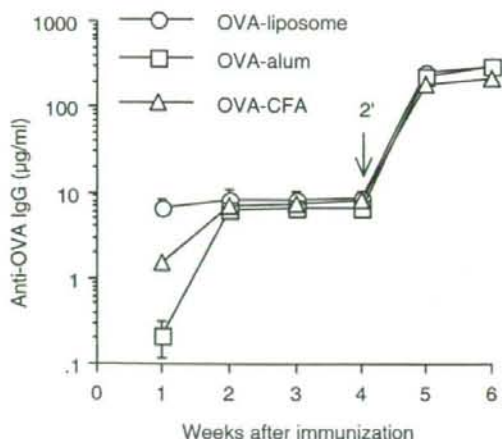


図 1a OVA 免疫マウスにおける抗 OVA IgG 抗体産生
BALB/c マウスに 3 種類の異なるアジュバントを用いて OVA を 0 週、4 週の 2 回免疫し、血清中の抗 OVA IgG 抗体を酵素抗体法 (ELISA) を用いて測定した。

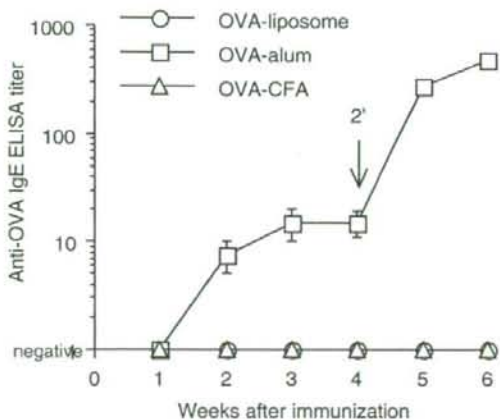


図 1b OVA 免疫 BALB/c マウスにおける抗 OVA IgE 抗体産生
図 1a の血清について抗 OVA IgE 抗体を ELISA を用いて測定した。

表 1 OVA 免疫マウスにおける抗 OVA IgG1/IgG2a 抗体産生

| immunization | anti-OVA antibodies (µg/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 抗体サブクラスを測定した。

生を検討した結果、OVA-リポソーム免疫群、OVA-alum 免疫群においては検討したすべての Th1 (IL-2 および IFN- γ) および Th2 (IL-4 および IL-5) サイト

カインの顕著な産生が認められた。抗 OVA IgE 産生を誘導しなかった OVA-リポソーム免疫群においても Th1 サイトカインだけでなく Th2 サイトカインの産生が観察され、IgE 抗体産生の抑制効果と T 細胞サイトカイン産生のプロファイルが相関しない結果となった。これに対して、OVA-CFA 免疫群では IL-4 および IL-5 の産生が見られず、典型的なタイプ I 免疫応答が誘導されていることが示唆された。

OVA-リポソームによって誘導される IgE 抗体産生の選択的抑制が IL-12 に依存的であるか否かについて IL-12 ノックアウトマウスを用いて検討したところ、図 2a に示すように、OVA-リポソームおよび OVA-alum 免疫群では同等の抗 OVA IgG 抗体産生が誘導されたが OVA-CFA 免疫群では他の 2 群と比較して顕著に低値であったことから、OVA-CFA によって誘導される抗 OVA IgG 抗体産生は IL-12 に依存的であることが示唆された。抗 OVA IgE 抗体産生は OVA-alum 免疫群で顕著に観察されたが、OVA-リポソーム免疫群では観察されなかった (図 2b)。このことから、OVA-リポソームによる IgE 産生の選択的抑制効果は IL-12 に非依存的な機序によるものであることが示唆された。

OVA-リポソームと OVA-CFA はともに IgE 抗体産生を選択的に抑制するという点で共通しているが、OVA-リポソーム免疫マウスの CD4 陽性 T 細胞は顕著に Th2 サイトカインを産生するのに対して OVA-CFA 免疫マウスの CD4 陽性 T 細胞は Th2 サイトカインを産生しなかったことから、OVA-CFA は典型的な Th1 タイプ免疫応答の誘導を介して IgE 抗体産生の選択的抑制を誘導するが OVA-リポソームは必ずしもそうではないことが示唆された。このことは、Ig 抗体サブクラスの検討と、IL-12 欠損マウスを用いた検討によって裏付けられた。IL-12 は Th1 の誘導において中心的役割を担うことが知られており、OVA-CFA によって誘導される抗 OVA IgG 抗体産生は IL-12 欠損マウスにおいて正常マウスと比較して低レベルであったが OVA-リポソームは正常マウスと同レベルの抗 OVA IgG 抗体産生を誘導した。

IgE 選択的無反応は抗原とリポソームとの結合方法によらず誘導される

当初、抗原とリポソームとの結合はグルタルアルデヒド (GA) を用いて行ったが¹⁾、この方法では GA によって重合した抗原がリポソームに結合する。抗

原-リポソーム結合物によって誘導されるIgE抗体産生の選択的抑制効果が、抗原とリポソームとの結合によるものであるか、またはGAによる抗原の重合によるものであるかを確認する目的で、GAの他にN-(6-maleimidocaproyloxy) succinimide (EMCS)、disuccinimidyl suberate (DSS)、N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) の3種類の架橋試薬を使用してOVA結合リポソームを作製し、比較検討を行った²⁾。その結果、いずれの結合方法でOVA結合リポソームを作製した場合においても抗OVA IgE抗体産生は誘導されず、抗OVA IgG抗体産生は同程度に誘導され

た。一方、OVAとリポソームとの混合溶液、あるいはラテックス粒子にOVAを物理吸着させたものは顕著な抗OVA IgE抗体産生を誘導したことから、IgE抗体産生の選択的抑制を誘導するためには抗原とリポソームとの化学結合が必須であるが、抗原とリポソームとの架橋方法にはよらないことが示唆された。

IgG抗体産生の誘導におけるアジュバント効果はリポソームの脂質組成によって異なる

不飽和脂肪酸(オレイン酸)、およびアシル鎖長の異なる飽和脂肪酸(ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸)を用いて脂質組成の異なる4種類のリポソームを作製し、それぞれについて表面にOVAを結合したものをマウスに投与して抗体産生誘導能の比較を行った³⁾。その結果、図3に示すように、抗原特異的IgG抗体産生は不飽和脂肪酸からなるリポソームを使用した群において最も高値であり、飽和脂肪酸の中ではアシル鎖長(ミリスチン酸=14、パルミチン酸=16、ステアリン酸=18)の短いほど高値のIgG抗体産生が誘導された。IgG抗体産生の誘導能はリポソームの膜流動性の高さに関連したことから、リポソームの膜流動性とアジュバント効果との間に密接な関連があると考えられた。また、いずれの場合にもIgE抗体産生は誘導されなかったことから、リポソームのアジュバント効果とリポソーム表面結合抗原に

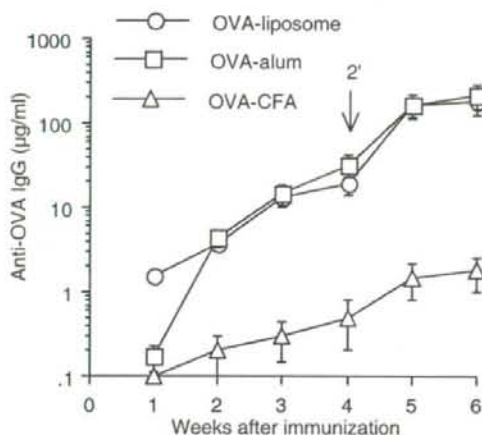


図2a OVA免疫IL-12ノックアウトマウスにおける抗OVA IgG抗体産生

IL-12ノックアウトマウスに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。

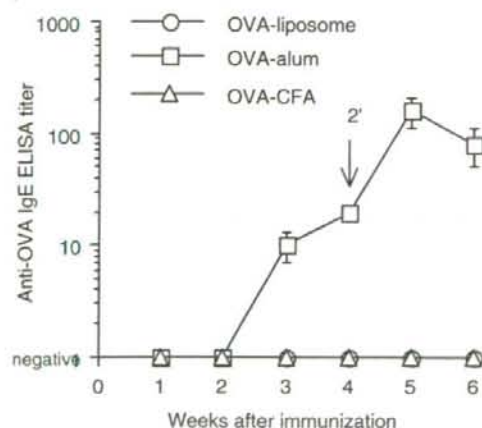


図2b OVA免疫IL-12ノックアウトマウスにおける抗OVA IgE抗体産生

図2aの血清について抗OVA IgE抗体をELISAを用いて測定した。

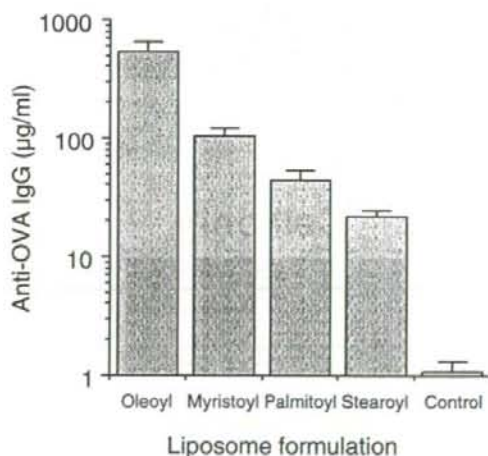


図3 脂質組成の異なるリポソームと結合したOVAによって誘導される抗OVA IgG抗体産生

オレイン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸からなるリポソームにOVAを結合させ、BALB/cマウスに0週、4週の2回免疫した。初回免疫後6週における血清中抗OVA IgG抗体価を示す。