

図5 腫瘍抗原ペプチドを投与したマウスにおける腫瘍拒絶

C57BL/6 マウスに E.G7 を移植し、腫瘍径が約 5mm となったときに腫瘍の周囲に OVA ペプチド結合リボソームを CpG, 抗 IL-10 モノクローナル抗体とともに投与して腫瘍径の変化を観察した。

○: CpG, 抗 IL-10 モノクローナル抗体のみ投与。

□: ペプチド溶液を CpG, 抗 IL-10 モノクローナル抗体とともに投与。

△: ペプチド結合リボソームを CpG, 抗 IL-10 モノクローナル抗体とともに投与。

*有意差 ($p < 0.01$) あり

すると CD4 陽性 T 細胞だけが活性化したが、不飽和脂肪酸からなるリボソームに結合した OVA は CD4 陽性 T 細胞だけでなく CD8 陽性 T 細胞も活性化した。

これらの結果から、不飽和脂肪酸からなるリボソームに結合した抗原は、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 cross-present されることが明らかになった。そこで、OVA のペプチドを発現した腫瘍細胞株 E.G7 をマウスに移植して担癌マウスを作製し、不飽和脂肪酸からなるリボソームに結合したペプチドを CpG, 抗 IL-10 モノクローナル抗体とともにこのマウスに投与したところ、図 5 に示すように、投与後 10 日以内に腫瘍が消滅した。CpG, 抗 IL-10 モノクローナル抗体だけを投与したマウ

ス、および同一量のペプチドを溶液状にて CpG, 抗 IL-10 モノクローナル抗体とともに投与した群では腫瘍拒絶は観察されなかった。腫瘍拒絶が観察されたマウス由来の脾臓 CD8 陽性細胞中で OVA ペプチド特異的な細胞群が有意に増加していることが観察された(図 6)ことから、不飽和脂肪酸からなるリボソームに結合したペプチドは抗腫瘍免疫を誘導することが示された。

6. CTL 誘導型インフルエンザワクチン創製への応用

前述のように、リボソーム表面に抗原ペプチドを結合したものをマウスに投与すると抗原特異的な細胞性免疫を高効率に誘導することが明らかになったことから、この方法を CTL 誘導型ウイルスワクチンの創製に応用することが期待

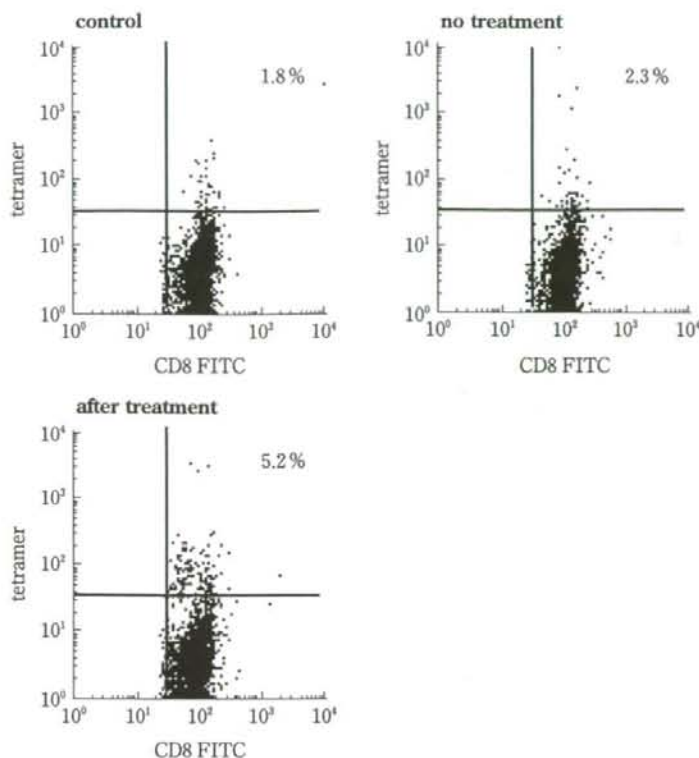


図6 腫瘍を拒絶したマウスにおけるCTL誘導

マウス脾臓由来 CD8 陽性細胞の OVA ペプチド-MHC クラス I (H2-K^b) 複合体を FACS を用いて解析した。

control: 正常マウス, no treatment: 腫瘍拒絶の観察されなかった担癌マウス, after treatment: 図5の実験において腫瘍拒絶の観察されたマウス。

された。そこでマウスのインフルエンザウイルス感染モデルを用い、リボソーム表面に H3N2 型インフルエンザウイルス由来の CTL エピトープを有する抗原ペプチドを化学結合させて免疫を行ったところ、抗原特異的 CTL が誘導されて肺におけるウイルスの増殖が顕著に抑制されることが確かめられた⁴⁾。現在、CTL 誘導型の H5N1 型鳥インフルエンザワクチンの開発を試みている。これまでの検討の結果、H5N1 型鳥インフルエンザウイルス由来のイムノドミナントな CTL エピトープが複数同定され、このうちの多くがヒトインフルエンザウイルス (H1N1 型および H3N2 型) 由来の CTL エピトープと完全に一致した。このことから、インフルエンザウイルスの亜型を超えて有効性を発揮す

ることのできるワクチンの創製が期待されている。

おわりに

現行のワクチンにアジュバントとして用いられている水酸化アルミニウムは、取り扱いの簡便さ、低コスト、高いアジュバント効果、などの利点を有するが、一方で、ワクチン接種後のアレルギー反応に関与する IgE 抗体産生を誘導するほか、液性免疫は誘導するが細胞性免疫は誘導しにくい、代謝を受けることなく体内に蓄積する、などの欠点を有する。本研究は現行のワクチンアジュバントがもつこれらの問題を解決することを目的として開始された。リボソーム表面結合抗原は IgE 抗体産生を選択的に抑制

し、IgG 抗体産生を増強する。また、リポソームは生体の細胞膜構成成分からなるため、極めて毒性が低く、代謝を受けて生体内に残留しないことから、リポソーム表面結合抗原が現行のワクチンに代わるワクチンの処方として期待された。更に、近年の検討の結果、リポソームの脂質組成を選択することによって細胞性免疫を

よく誘導することのできる処方が開発された。これらのことから、リポソーム表面結合抗原をアレルギー反応を誘導しにくいワクチンのほか、細胞性免疫の誘導を目標とするウイルスワクチン、腫瘍治療薬の開発に応用することが期待される。

■ 文 献

- 1) Uchida T, et al: Ovalbumin coupled either with murine red blood cells or liposome induces IgG but not IgE antibody production. Brown F, Haaheim LR(ed): Modulation of the Immune Response to Vaccine Antigens. Dev Biol Stand Basel Karger 92: 355-365, 1998.
- 2) Nakano Y, et al: Antigen-specific, IgE-selective unresponsiveness induced by antigen-liposome conjugates: Comparison of four different conjugation methods. Int Arch Allergy Immunol 120: 199-208, 1999.
- 3) Nakano Y, et al: Surface-linked liposomal antigen induces IgE-selective unresponsiveness regardless of the lipid components of liposomes. Bioconjug Chem 12: 391-395, 2001.
- 4) Tanaka Y, et al: Liposomes with differential lipid components exert differential adjuvanticity in antigen-liposome conjugates via differential recognition by macrophages. Bioconjug Chem 15: 35-40, 2004.
- 5) Taneichi M, et al: T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen. J Immunol 169: 4246-4252, 2002.
- 6) Uchida T: Surface-linked liposomal antigen induces IgE-selective unresponsiveness in a T-cell independent fashion. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 3: 119-135, 2003.
- 7) Taneichi M, et al: Antigens 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.
- 8) Nagata T, et al: Peptides coupled to the surface of a kind of liposome protect infection of influenza viruses. Vaccine 25: 4914-4921, 2007.

万能インフルエンザワクチン実現へ繋がる CTL 誘導型リポソームワクチンの開発

CTL-based Liposome Vaccine for the Development of Universal Influenza Vaccine

内田哲也*¹ 種市麻衣子*²

従来のワクチンが主として液性免疫（抗体産生）を誘導するものであったのに対して、ワクチン抗原をリポソームの表面に結合することにより細胞性免疫（CTL）を誘導するワクチンの創製が可能であることが明らかになった。このことを利用して、現在筆者らは CTL 誘導型万能インフルエンザワクチンの開発を試みている。

1. はじめに

20 世紀にワクチンが開発されて一定の成功をおさめたことにより、感染症はもはや人類の敵ではない、と思われた時期もあったが、20 世紀の終わりから 21 世紀にかけて後天性免疫不全症候群（エイズ）、重症急性呼吸器症候群（SARS）、高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）等のいわゆる新興感染症と、一度は制圧されたかに見えた感染症が再び流行する再興感染症とが出現して再び人類の生命を脅かしている。上記 3 種類の新興感染症には、原因病原体であるウイルスが高頻度に変異を繰り返すことにより従来型のワクチンによって誘導される抗体による免疫防御の網をくぐり抜けてしまう、という共通点がある。

生体の免疫システムは大きく「自然免疫系」と「獲得免疫系」の 2 種類に分けられ、このうち「獲得免疫系」はさらに「液性免疫」と「細胞性免疫」の 2 種類に分けられる。従来のワクチンは主として「液性免疫」を利用し、病原体の表面に存在す

る特異抗原に対する「抗体」の産生を誘導することによって、細菌・ウイルスを排除することを目的としている。このため、ウイルスが変異して表面抗原の形を変えてしまうと、ワクチンによって誘導された「抗体」がウイルスに作用することができず、ウイルスの感染・増殖を許す結果となる。一方、生体がウイルスに自然感染した場合には、ウイルス表面の抗原に対する「抗体」の産生と、ウイルス感染細胞を破壊してウイルスの複製を阻止する働きをする「CTL (Cytotoxic T Lymphocyte: 細胞障害性 T 細胞)」とが同時に誘導されると考えられている。

一般に、ワクチンとして生体に投与された「外来抗原」は免疫システムにおいて抗原提供細胞で消化されたあと、主要組織適合抗原 (MHC) クラス II を介して CD4 陽性 T 細胞に呈示され、抗体の産生が誘導される（液性免疫）。一方、ウイルス感染細胞におけるウイルス由来抗原のような「内在性抗原」は MHC クラス I を介して CD8 陽性 T 細胞に呈示され、CTL が誘導される（細胞性免

*¹Tetsuya Uchida 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

*²Maiko Taneichi 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

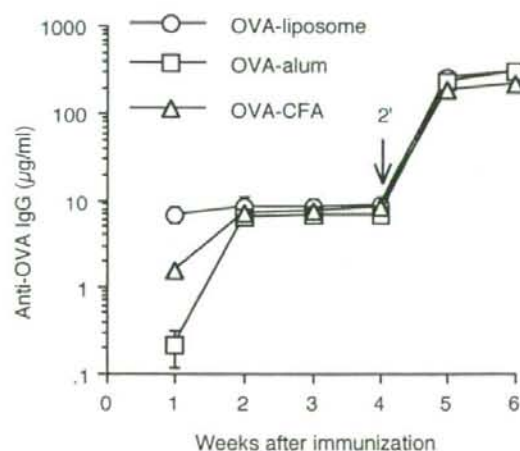
疫)。また、近年これ以外に、「外来抗原」でありながら抗原提供細胞において「内在性抗原」のように扱われ、MHCクラスIを介してCD8陽性T細胞に抗原呈示される、いわゆる「クロスプレゼンテーション」が行われる場合があることが知られている。従って、もしワクチン抗原を抗原提供細胞において「クロスプレゼンテーション」させることができれば、CTLを誘導するワクチンを創製することが可能となる。

我々はこれまでに、抗原をリボソームの表面に化学結合させてマウスに免疫することにより、高効率に抗原特異的なIgG抗体産生が誘導される一方で、ワクチンに対するアレルギー反応の原因となるIgE抗体の産生が全く誘導されないことを見出した¹⁻³⁾。さらに、リボソームの脂質組成を選択することによって、リボソーム表面に結合した抗原が抗原提供細胞において「クロスプレゼンテーション」され、抗原に特異的なCTLが誘導されることを見出した⁴⁻⁶⁾。このことから、この抗原-リボソーム結合物をCTL誘導型インフルエンザワクチンの創製に応用することが期待された⁷⁾。

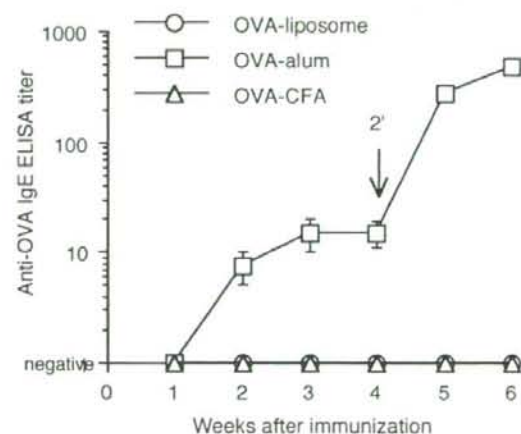
2. リボソーム表面結合抗原によって誘導されるIgE選択的無反応

BALB/cマウスにリボソーム、アルミニウムアジュバント (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る (図1(a)) 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-リボソーム、OVA-CFA免疫群では観察されない (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いが、OVA-リボソーム免疫群では両者の間に有意な差が見られない (表1)。

これらの結果は、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-リボソームはどちらも言えないことを示唆している。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生を検討すると、OVA-リボソーム



(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。

図1

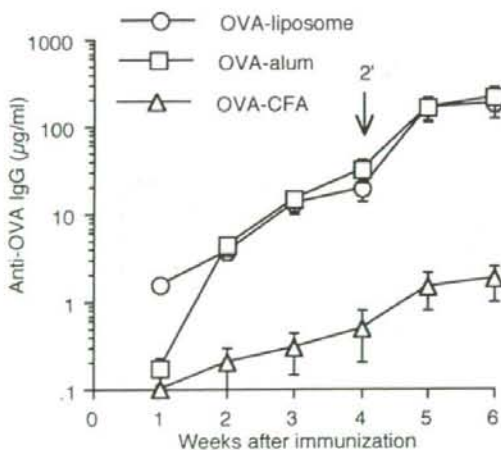
免疫群、OVA-alum 免疫群においては検討したすべてのサイトカインの顕著な産生が認められる一方、抗 OVA IgE 産生を誘導しない OVA-リボソーム免疫群においても、Th1 サイトカイン (IL-2 および IFN- γ) だけでなく Th2 サイトカイン (IL-4 および IL-5) の産生が観察され、IgE 産生の抑制効果と T 細胞サイトカイン産生のプロファイルとは相関しない。これに対して、OVA-CFA 免疫群では IL-4 および IL-5 の産生が見られず、典型的なタイプ I 免疫応答が誘導されていることが示唆される。

OVA-リボソームによって誘導される IgE 産生

表 1 OVA 免疫マウスにおける抗 OVA IgG1/IgG2a 産生

immunization	anti-OVA antibodies ($\mu\text{g/ml}$)	
	IgG1	IgG2a
OVA-liposome	260.2 \pm 72.7	239.4 \pm 80.8
OVA-alum	252.8 \pm 70.4	32.6 \pm 5.4*
OVA-CFA	29.2 \pm 11.5	132.7 \pm 21.7*

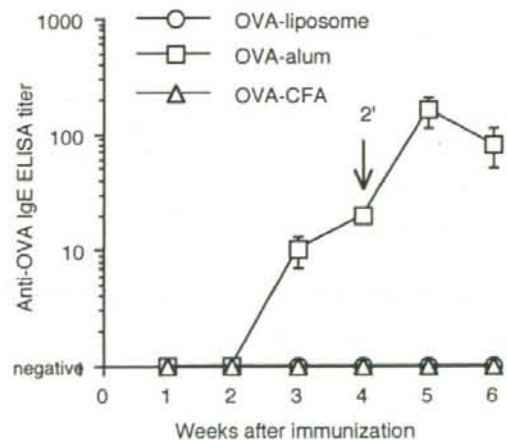
図 1 の実験における初回免疫 6 週後の血清について、抗 OVA Ig サブクラスを測定した。



(a) 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。

の選択的抑制が、Th1 の誘導において中心的役割を担うことが知られている IL-12 に依存するかどうかを IL-12 ノックアウトマウスを用いて検討したところ、図 2(a)に示すように、OVA-リボソームおよび OVA-alum 免疫群では同等の抗 OVA IgG 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 産生は IL-12 に依存するもの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-リボソーム免疫群では観察されなかった (図 2(b))。このことから、OVA-リボソームによる 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-リボソームと OVA-CFA はともに IgE 産生を選択的に抑制するという点では共通しているが、OVA-リボ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いことから、OVA-CFA は典型的な Th1 タイプ免疫応答の誘



(b) 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 2(a)の血清について抗 OVA IgE 抗体を ELISA を用いて測定した。

図 2

導を介して IgE 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 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も裏付けられた。

3. 抗原とリポソームとの結合方法によらず誘導される IgE 選択的無反応

当初、抗原とリポソームとの結合にはグルタルアルデヒド (GA) を用いたが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。そこで、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り、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。

4. リポソームの脂質組成によって異なるアジュバント効果

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

和脂肪酸を組成に持つリポソームを使用した群において最も高く、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 IgG 抗体産生の誘導能が高かった。IgG 抗体産生の誘導能はリポソームの膜流動性と相関したことから、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よる IgE 抗体産生の選択的抑制効果とは独立していることが示唆された。さらに、蛍光標識した OVA あるいは消化を受けると蛍光を発する OVA をリポソームと結合させたものをマクロファージ培養中に添加して FACS を用いた解析を行ったところ、オレイン酸からなるリポソームに結合した OVA はステアリン酸からなるリポソームに結合した OVA と比べて同一時間内により多くマクロファージに貪食され、消化を受けることがわかった⁴⁾。このことから、いわゆるアジュバント効果は抗原提供細胞による認識され易さと相関することが示唆された。

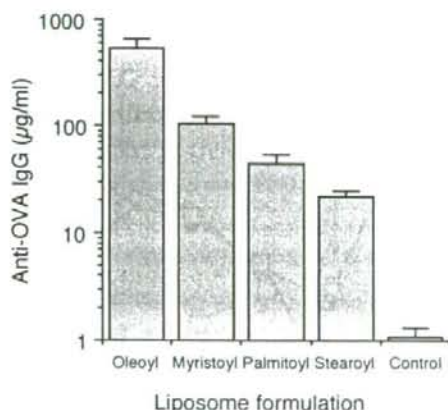


図3 脂質組成の異なるリポソームと結合した OVA によって誘導される抗 OVA IgG 抗体産生

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。

5. T細胞に非依存的なIgE抗体産生の調節機構

OVA-リポソームおよびOVA-alum免疫マウス由来のCD4陽性T細胞について、T細胞欠損マウス（ヌードマウス）において抗OVA抗体産生を誘導する能力を比較検討した⁵⁾。表2に示すように、OVA-リポソーム免疫マウス由来CD4陽性T細胞はOVA-alumを免疫したヌードマウスにおいて抗OVA IgE産生を誘導した。これに対して、OVA-alum免疫マウス由来CD4陽性T細胞はヌードマウスをOVA-リポソームで免疫したとき抗OVA IgE産生を誘導しなかった。このように、IgE産生の選択的抑制はヌードマウスをOVA-リポソームで免疫したときに誘導され、T細胞ドナーの免疫方法との関係は見られなかった。また、IL-10およびCD8陽性T細胞がIgE産生の調節に関与していることが知られているが、IL-10の活性を中和する抗体、およびCD8陽性T細胞を除去する抗体の*in vivo*投与はOVA-リポソームによるIgE産生の選択的抑制に影響しなかった。

T細胞欠損マウスへのCD4陽性T細胞移入実験によってOVA-リポソーム免疫マウス由来CD4陽性T細胞はヌードマウスにおける抗OVA IgE産生を誘導することが示唆され、OVA-alum免疫マウス由来CD4陽性T細胞はヌードマウスをOVA-リポソームで免疫すると抗OVA IgE産

生を誘導しないことが示されたことから、OVA-リポソームによるIgE産生の抑制機構にCD4陽性T細胞は関与していないことが示唆された。CD4陽性T細胞の代わりに脾細胞からB細胞のみを除去したものをを用いた時にも同様の結果が得られたことから、OVA-リポソームによって誘導されるIgE産生の選択的抑制においてはB細胞が重要な役割を担っていることが示唆された。

これらの結果は、同一の抗原に対して異なるアジュバントを使用することにより異なるパターンの免疫応答が誘導されることを示している。OVAは元来アレルゲン性を有しているが、リポソームあるいはCFAを使用することによりIgE産生が選択的に抑制される。OVA-CFAによるIgE産生の抑制にはTh1が関与しているがOVA-リポソームによるIgE産生の抑制にはTh1は関与していない。このことはTh1およびTh2のバランスによらないIgE産生調節機構の存在を示唆している。

6. 不飽和脂肪酸からなるリポソームを用いて作製されたリポソーム表面結合抗原による腫瘍拒絶の誘導

上述のように、リポソームの脂質組成を変えることによりアジュバント効果に変化することが示されたが、このような量的な変化の他に、近年の検討の結果、リポソームの脂質組成を変えることによってリポソーム表面結合抗原が液性免疫（抗

表2 OVA免疫マウス由来脾臓CD4陽性T細胞を移入したT細胞欠損マウスにおける抗OVA抗体産生

immunization of T-cell donor	immunization of recipient mice	Anti-OVA antibodies	
		IgG ($\mu\text{g/ml}$)	IgE ELISA titer
no	OVA-liposome	12.3 \pm 8.7	N. D.
	OVA-alum	17.7 \pm 5.2	N. D.
OVA-liposome	OVA-liposome	144.7 \pm 24.3	N. D.
	OVA-alum	124.3 \pm 12.8	105.6 \pm 10.7
OVA-alum	OVA-liposome	178.0 \pm 28.3	N. D.
	OVA-alum	246.8 \pm 29.4	139.3 \pm 12.3

OVA-リポソームあるいはOVA-alumで免疫したマウスの脾臓由来CD4陽性T細胞をT細胞欠損マウスに移入した後、OVA-リポソームあるいはOVA-alumで免疫を行い、細胞移入4週間後に採血を行って血清中の抗OVA抗体を測定した。

体産生),あるいは細胞性免疫(CTL活性化)を誘導する,という質的变化がもたらされることが明らかになった⁶⁾。マクロファージのクラスIIコンパートメントを赤色に蛍光標識しておき,リボソームに結合したOVAを緑色に蛍光標識したマクロファージ培養中に添加すると,飽和脂肪酸からなるリボソームに結合したOVAは貪食を受けた後すべてマクロファージのクラスIIコンパートメントに集結するが,不飽和脂肪酸からなるリボソームに結合したOVAの一部は細胞質に留まることがわかった。さらに,消化を受けて蛍光を発するOVAをリボソームに結合させて同様の検討を行ったところ,不飽和脂肪酸からなるリボソームに結合したOVAの一部は細胞質中で消化を受けることがわかった。この結果は試験管内でのCD4およびCD8陽性T細胞への抗原提供を検討した結果ともよく一致した。すなわち,飽和脂肪酸からなるリボソームに結合したOVAをOVA免疫マウス由来のT細胞および抗原提供細胞の培養中に添加するとCD4陽性T細胞だけが活性化したが,不飽和脂肪酸からなるリボソームに結合したOVAはCD4陽性T細胞だけでなくCD8陽性T細胞も活性化した(表3)。

これらの結果から,不飽和脂肪酸からなるリボソームに結合した抗原は,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cross-presentされることが明らかになった。そこで,OVAのペプチドを発現した腫瘍細胞株E.G7をマウスに移植

して担がんマウスを作製し,不飽和脂肪酸からなるリボソームに結合したペプチドをCpG,抗IL-10抗体とともにこのマウスに投与したところ,図4に示すように,投与後10日以内に腫瘍が消滅した。CpG,抗IL-10抗体だけを投与したマウス,および同一量のペプチドを溶液状にて投与した群では腫瘍拒絶は観察されなかった。腫瘍拒絶

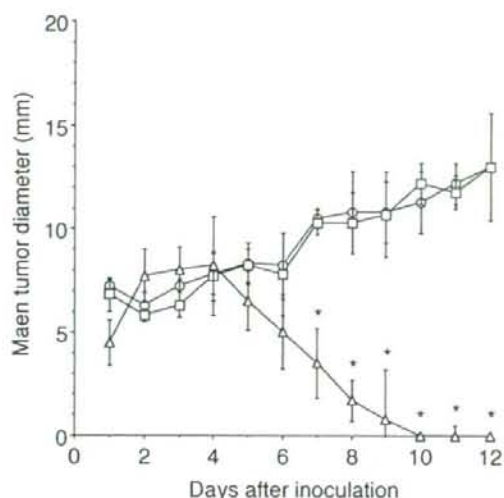


図4 腫瘍抗原ペプチドを投与したマウスにおける腫瘍拒絶

C57BL/6マウスにE.G7を移植し,腫瘍径が約5mmとなった時に腫瘍の周囲にOVAペプチド結合リボソームをCpG,抗IL-10モノクローナル抗体と共に投与して腫瘍径の変化を観察した。○:CpG,抗IL-10モノクローナル抗体のみ投与。□:ペプチド溶液をCpG,抗IL-10モノクローナル抗体とともに投与。△:ペプチド結合リボソームをCpG,抗IL-10モノクローナル抗体とともに投与。

表3 OVAをパルスしたマクロファージによるCD4/CD8陽性T細胞の活性化

in vitro Ag	Liposomes	CD4 T-cells		CD8 T-cells	
		IL-5	IFN- γ	IL-5	IFN- γ
none		ND	ND	ND	ND
OVA solution		96.2 \pm 12.5	ND	ND	ND
OVA-liposome	Saturated	910.2 \pm 23.0	88.7 \pm 45.0	ND	ND
OVA-liposome	Unsaturated	1,065.5 \pm 31.9	115.1 \pm 28.6	163.3 \pm 99.1	149.9 \pm 83.8

マウス脾臓より得られた抗原提供細胞をOVAあるいはリボソーム結合OVAでパルスした後,OVA免疫マウス脾臓由来CD4/CD8陽性T細胞と共培養し,培養上清中のサイトカインを測定した。

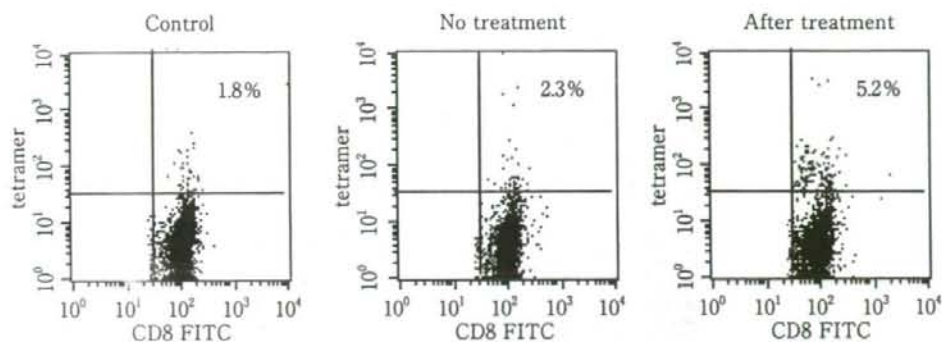


図5 腫瘍を拒絶したマウスにおける CTL 誘導

マウス脾臓由来 CD8 陽性細胞の OVA ペプチド-MHC クラス I (H2-K^b) 複合体を FACS を用いて解析した。Control: 正常マウス。No treatment: 腫瘍拒絶の観察されなかった担がんマウス。After treatment: 図6の実験において腫瘍拒絶の観察されたマウス。

が観察されたマウス由来の脾臓 CD8 陽性細胞中で OVA ペプチド特異的な細胞群が有意に増加していることが観察された (図5) ことから、不飽和脂肪酸からなるリポソームに結合したペプチドは抗腫瘍免疫を誘導することが示された。

7. CTL 誘導型インフルエンザワクチンの開発

従来インフルエンザワクチンは、インフルエンザウイルスの表面抗原に対する抗体の産生を誘導し、ウイルスの生体の細胞への感染を阻止することを目標としている。ヒトに流行するインフルエンザウイルス A 型には H1 から H16 までの HA 亜型と、N1 から N9 までの NA 亜型があり、ヒトインフルエンザウイルスには H1N1 型 (ソ連型)、H3N2 型 (香港型) といった亜型が存在する。抗体誘導型ワクチンは異なる亜型のインフルエンザウイルスには無効であるため、ウイルスの流行を予測してウイルスの亜型ごとにワクチンを作製する必要がある。また、新型インフルエンザウイルスが出現すると、改めてワクチンを作製することが必要であり、完成までに一定の期間を要する。これに対し、インフルエンザウイルスの亜型に共通な内部構造タンパクをターゲットとした CTL 誘導ワクチンが創製されれば、単一のワクチンが異なるウイルス亜型に有効となることが期待され

る (図6)。そこで筆者らは、H5N1 型インフルエンザウイルスを構成する 8 分節のうち、HA、NA 以外の 6 分節 (図7) から CTL の標的となりうるエピトープを検索し、このエピトープをもつペプチドとリポソームとの結合物を作製した。この結合物をヒト MHC クラス I 発現したトランスジェニックマウス (HHD マウス) に免疫して CTL 誘導能を検討したところ、複数のペプチドに高い活性が認められ、その多くが H1N1 型、H3N2 型ウイルスに共通に存在するものであった。

このようにして同定された CTL エピトープを用いて作製したペプチド-リポソーム結合物がインフルエンザワクチンとして有効であるためには、①これらの CTL エピトープが実際に H5N1 型ウイルスに感染した細胞の表面に MHC クラス I を介して呈示され、その結果ウイルス感染細胞が CTL によって破壊・除去されること、②抗体によらず CTL の誘導だけで生体のウイルス感染抵抗性が誘導されること、が求められる。そこで、あらかじめペプチド-リポソーム結合物を投与した HHD マウスに H5N1 型インフルエンザウイルスを感染させ、ウイルス感染抵抗性が誘導されるか否かについて検討を行ったところ、非免疫対照群は H5N1 ウイルス感染後、顕著な体重減少の後死亡したのに対し、ペプチド-リポソーム免疫

液性免疫（抗体）の標的（HA, NA）

細胞性免疫（CTL）の標的
（より保存された内部構造タンパク）

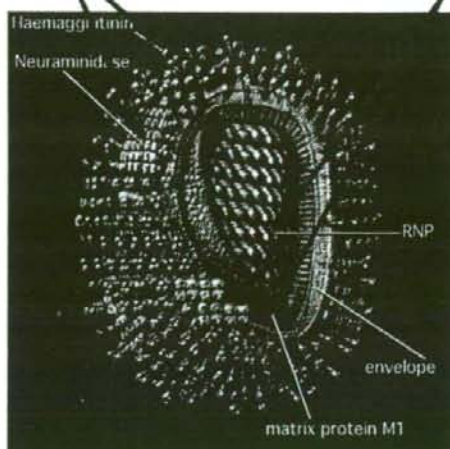


図6 インフルエンザウイルスの構造

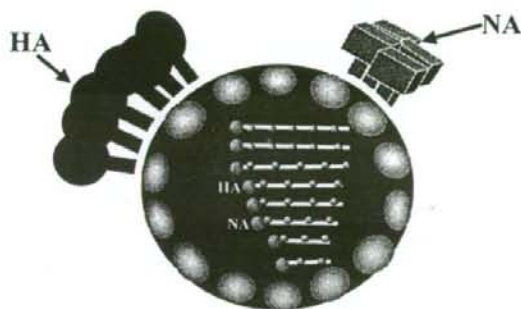


図7 インフルエンザウイルスを構成する8分節

群では体重減少が見られず無徴候で生存した。同様の結果はH1N1型ウイルスおよびH3N2型ウイルス感染実験においても得られた。

これらのことから、H5N1型インフルエンザウイルス由来の内部構造タンパクから同定されたCTLエпитープペプチドとリボソームとの結合物はH5N1型ウイルス感染細胞を排除し、ウイルスの複製を阻止する免疫を誘導することにより、ウイルス感染抵抗性を誘導することが可能であり、同時に既存のヒトインフルエンザウイルスに対しても有効であることが示された。

8. 万能インフルエンザワクチンの臨床応用にむけて

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になった。従来型のインフルエンザワクチンに対して、CTL誘導型リボソームワクチンの利点は、ウイルスの変異の少ない、保存された領域を免疫の標的にすることにより幅広いウイルス亜型に対応できることにある。これに加えて、リボソームワクチンはアレルギー反応等ワクチンに対する副反応を惹起しにくいという特長を有する。一般に、ペプチドは免疫応答をピンポイントで誘導できる反面、免疫原性が低いという欠点があるが、リボソーム表面に結合することでこの欠点が克服された。

これまでに、HLA A2およびHLA A24拘束性のインフルエンザウイルス由来エピトープが同定されている。これらのHLAタイプは日本および欧米の人口の約8割をカバーするが、今後これ以外のマイナーなHLAタイプに拘束性のエピトープも順次同定してゆく予定であり、これによってグローバルに有効かつウイルス亜型に共通なインフルエンザワクチンの創製が可能であると考えて

いる。

この研究は厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）、研究課題名「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」（研究期間：平成18-20年度）によって行われた。

文 献

- 1) S. Naito *et al.*, Ovalbumin-liposome conjugate induced IgG but not IgE antibody production. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **109**, 223-228 (1996)
- 2) Y. Nakano *et al.*, Antigen-specific, IgE-selective unresponsiveness induced by antigen-liposome conjugates: Comparison of four different conjugation methods. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **120**, 199-208 (1999)
- 3) Y. Nakano *et al.*, Surface-linked liposomal antigen induces IgE-selective unresponsiveness regardless of the lipid components of liposomes. *Bioconj. Chem.*, **12**, 391-395 (2001)
- 4) Y. Tanaka *et al.*, Liposomes with differential lipid components exert differential adjuvant activity in antigen-liposome conjugates via differential recognition by macrophages. *Bioconj. Chem.*, **15**, 35-40 (2004)
- 5) M. Taneichi *et al.*, T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen. *J. Immunol.*, **169**, 4246-4252 (2002)
- 6) M. Taneichi *et al.*, Antigens 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)
- 7) T. Uchida, M. Taneichi, Clinical application of surface-linked liposomal antigens. *Mini Rev. Med. Chem.*, **8**, 184-192 (2008)

再生医療技術の最前線

Recent progress in Regenerative Medicine Technologies

監修：岡野光夫（東京女子医科大学 先端生命医学研究所 所長・教授）
大和雅之（東京女子医科大学 先端生命医学研究所 准教授）

★個々の患者に最適な医療を提供するオーダーメイド医療として、注目されている再生医療！
★角膜、歯、骨、皮膚、軟骨、心筋、血管、神経などの最新の再生技術を掲載！

構成及び内容

- 1章 スキャホールド
 1. 生分解吸収性高分子
 2. 無機系材料
 3. コンポジット材料
- 2章 再生医療基盤技術
 1. 細胞分離
 2. 組織培養
 3. バイオリクター
 4. 生体シグナル因子の活用技術
— ドラッグデリバリーシステム (DDS) —
 5. 遺伝子組換え動物モデル
 6. バイオメディカルイメージング
- 3章 細胞ソース
 1. ES細胞—その可能性—
 2. 幹細胞—肝幹細胞を用いた再生医療の可能性—
 3. Side Population (SP) 細胞
 4. 神経幹細胞による神経再生への治療戦略
- 4章 軟組織
 1. 上皮幹細胞を用いた皮膚再生技術の実験
 2. 気管の再生
 3. 食道
 4. 角膜の再生医療
 5. 網膜の再生医療
 6. 歯根膜
 7. 血管
 8. 心筋組織再生
 9. 心臓弁の再生—体内で自己細胞により再生—

10. 自己化を誘導する無細胞化心臓弁の創生—
中枢神経
 11. 末梢神経再生tube
 12. 膀胱の組織工学
 13. 腎臓—腎臓の再生とハイブリッド型バイオ人工腎臓の開発—
 14. 組織工学アプローチによる肝再生療法
 15. 肺への細胞シート工学の応用
- 5章 硬組織
 1. 骨
 2. 軟骨再生
 3. 歯の再生
 - 6章 安全性
 1. 評価方法
 2. 再生医療製品のギャップ結合細胞間連絡機能評価の重要性について
 - 7章 再生医療の現状と将来展望
—再生医療関連ベンチャー紹介—
 1. 株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (J-TEC)
 2. 株式会社 ビーシーエス—当社の戦略—
 3. アンジュラス株式会社
 4. アンジュラスMG株式会社—肝細胞増殖因子HGF遺伝子治療薬の現状と将来—
 5. 株式会社セルシード
 6. 株式会社カルディオ—心臓・血管を中心とした循環器系領域における再生医療の確立—

監修・執筆者一覧

- | | | |
|------|----|------------|
| 岡野光夫 | 夫徳 | Mara Gomez |
| 大和雅之 | 悉夫 | Flores |
| 伊藤 | 敬夫 | 石川 |
| 古藤 | 勉 | 新岡 |
| 小野 | 康充 | 日野 |
| 岡田 | 正弘 | 勝谷 |
| 竹澤 | 明公 | 岡谷 |
| 畑田 | 彦彦 | 清水 |
| 細田 | 康二 | 岩崎 |
| 小林 | 美正 | 野村 |
| 神田 | 英弥 | 野村 |
| 小原 | 啓二 | 田中 |
| 佐藤 | 啓一 | 柳田 |
| 菊池 | 眞 | 小原 |
| 安達 | 啓三 | 石原 |
| 川瀬 | 八郎 | 佐藤 |
| 中辻 | 薫 | 菊池 |
| 守田 | 晴平 | 安達 |
| 内野 | 光之 | 川瀬 |
| 岡野 | 大輔 | 中辻 |
| 小川 | 大輔 | 守田 |
| 小井 | 宗志 | 内野 |
| 小島 | 一 | 岡野 |
| 大木 | 幸二 | 小川 |
| 山本 | 道政 | 小井 |
| 西田 | 道政 | 小島 |
| 万代 | 道政 | 大木 |
| 高橋 | 道政 | 山本 |
| 秋月 | 道政 | 西田 |
| 長谷川 | 昌輝 | 万代 |
| | | 高橋 |
| | | 秋月 |
| | | 長谷川 |
| | | 内村 |
| | | 野村 |
| | | 田中 |
| | | 柳田 |
| | | 小原 |
| | | 石原 |
| | | 佐藤 |
| | | 菊池 |
| | | 安達 |
| | | 川瀬 |
| | | 中辻 |
| | | 守田 |
| | | 内野 |
| | | 岡野 |
| | | 小川 |
| | | 小井 |
| | | 小島 |
| | | 大木 |
| | | 山本 |
| | | 西田 |
| | | 万代 |
| | | 高橋 |
| | | 秋月 |
| | | 長谷川 |
| | | 内村 |

■体裁/B5判・281頁 ■発行/2007年5月 ■定価/68,250円(本体65,000円+税5%)

<発行>

シーエムシー出版

申込 FAX: 03(3293)2069
http://www.cmcbooks.co.jp/



今日の話




万能インフルエンザワクチン

内部構造タンパク質をターゲットにした細胞障害性 T 細胞 (CTL) 誘導型ワクチン

ワクチンは人類が感染症を予防することを可能にしたという点で、20 世紀の医療における最大の成功例であるといっても過言ではない。ワクチンの成功によって、感染症がもはや人類の敵ではない、と思われた時期もあったが、20 世紀の終わりから 21 世紀にかけて出現した、後天性免疫不全症候群 (エイズ)、重症急性呼吸器症候群 (SARS)、高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) などをはじめとする、いわゆる新興感染症、および、一度は制圧されたかに見えた感染症が再び出現する、再興感染症が人類の生命を脅かしている。上記 3 種類の新興感染症に共通していることは、原因病原体であるウイルスが高頻度に変異を繰り返し、従来型のワクチンによって誘導される、抗体による免疫防御の網をぐくり抜けてしまうことである。

生体の免疫システムは自然免疫系と獲得免疫系の 2 種類に分けられ、獲得免疫系はさらに液性免疫と細胞性免疫の 2 種類に分けられる。従来型のワクチンは主として液性免疫を利用し、病原体の表面に存在する特異抗原に対する抗体の産生を誘導することによって、細菌を排除し、ウイルスの宿主細胞への感染を防御することを目的としている。このため、ウイルスが変異して表面抗原の形を変えてしまうと、ワクチンによって誘導された抗体がウイルスに作用することができず、ウイルスの感染・増殖を許す結果となる。一方、生体がウイルスに自然感染した場合には、ウイルス表面の抗原に対する抗体の産生 (液性免疫) に加えて、ウイルス感染細胞を破壊してウイルスの複製を阻止するはたらきをする CTL (Cyto-

toxic T Lymphocyte: 細胞障害性 T 細胞) の誘導 (細胞性免疫) が生体防御に関わっていると考えられている。

一般に、ワクチンとして生体に投与された「外来抗原」は免疫システムにおいて抗原提供細胞で消化された後、主要組織適合抗原 (MHC) クラス II を介して CD4 陽性 T 細胞に呈示され、その結果抗体が産生される。一方、ウイルス感染細胞におけるウイルス由来抗原のような「内在性抗原」は MHC クラス I を介して CD8 陽性 T 細胞に呈示され、CTL が誘導される。また、これらとは別に、「外来抗原」でありながら抗原提供細胞において「内在性抗原」のように扱われ、MHC クラス I を介して CD8 陽性 T 細胞に抗原呈示される、いわゆる「クロスプレゼンテーション」が行なわれる場合があることが知られている。したがって、もしワクチン抗原を抗原提供細胞において「クロスプレゼンテーション」させる手段があれば、CTL を誘導するワクチンの創製が可能となる。

筆者らはこれまでに、抗原をリボソームの表面に化学結合させてマウスに免疫することにより、高効率に抗原特異的 IgG 抗体産生が誘導される一方で、ワクチンに対するアレルギー反応の原因となる IgE 抗体の産生がまったく誘導されないことを見いだした⁽¹⁻³⁾。さらに、リボソームの脂質組成を選択することによって、リボソーム表面に結合した抗原が抗原提供細胞において「クロスプレゼンテーション」され、抗原に特異的な CTL が誘導されることを見いだした⁽⁴⁻⁶⁾。そこで、現在この抗原・リボソーム結合物を CTL 誘導型インフルエンザ

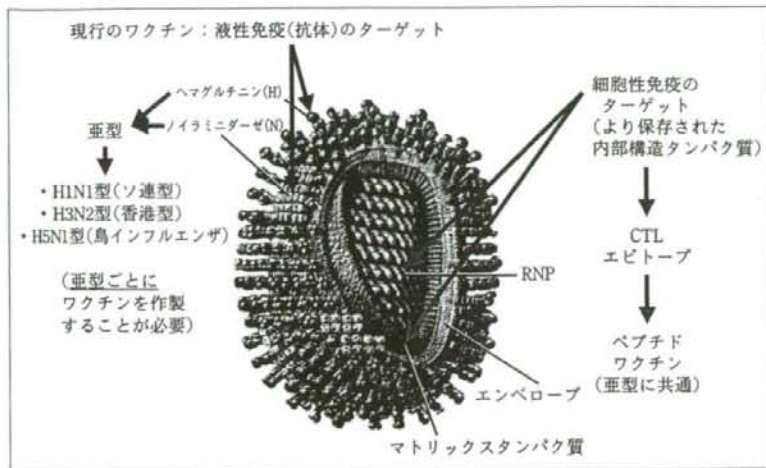


図1 ■ インフルエンザウイルスの構造

従来のインフルエンザワクチンはウイルス表面の抗原に対する抗体の産生を誘導することを目的としているため、ウイルスの亜型ごとにワクチンを作製する必要がある。これに対し、ウイルスの亜型に共通した内部構造タンパク質をターゲットとしたCTL誘導型ワクチンは、異なるウイルスの亜型に対応可能である。

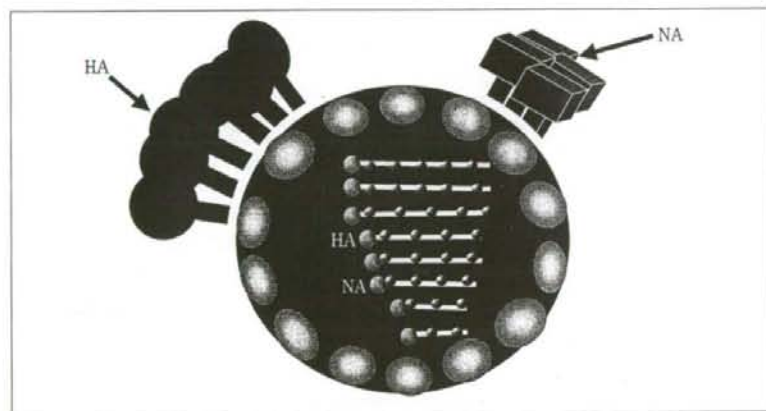


図2 ■ インフルエンザウイルスを構成する8分節

このうち、ウイルス表面のHAおよびNAを除いた6分節からCTLエпитープを検索した。

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いる。

従来のインフルエンザワクチンは、インフルエンザウイルスの表面抗原に対する抗体の産生を誘導し、ウイルスの感染を阻止することを目標としている。ヒトに流行するインフルエンザウイルスA型にはH1からH16までのHA亜型と、N1からN9までのNA亜型があり、ヒトインフルエンザウイルスにはH1N1型(ソ連型)、H3N2型(香港型)といった亜型が存在する。抗体誘導型ワクチンは異なる亜型のインフルエンザウイルスには無効であるため、ウイルスの流行を予測してウイルスの亜型ごとにワクチンを作製する必要がある。また、新型インフルエンザウイルスが出現すると、これに対して有

効なワクチンを準備するためには一定の期間を要する。これに対し、ウイルス亜型に共通な内部構造タンパク質をターゲットとしたCTL誘導ワクチンが創製されれば、1種類で異なるウイルス亜型に有効なワクチンとなることが期待される(図1)。そこで筆者らは、H5N1型インフルエンザウイルスを構成する8分節のうち、HA、NA以外の6分節(図2)からCTLのターゲットとなりうるエпитープを検索し、このエпитープを有するペプチドを合成してリボソームとの結合物を作製した。この結合物をヒトMHCクラスIを発現したトランスジェニックマウス(HHDマウス)に免疫してCTL誘導能を検討したところ、高い活性をもつペプチドが複数認められ、その多くがH1N1型、H3N2型インフルエンザウイ

ルスにも存在するものであった。

このようにして同定された CTL エピトープを用いて作製したペプチド-リポソーム結合物がインフルエンザワクチンとして有効であるためには、これらの CTL エピトープが実際に H5N1 型ウイルスに感染した細胞の表面に MHC クラス I を介して呈示され、ウイルス感染細胞が抗原特異的 CTL によって破壊・除去されることと、抗体によらず CTL の誘導だけで生体のウイルス感染抵抗性が誘導されることが必須である。そこで、あらかじめペプチド-リポソームを免疫した HHD マウスに H5N1 型インフルエンザウイルスを感染させ、感染抵抗性が誘導されるか否かについて検討を行なったところ、非免疫対照群は H5N1 型ウイルス感染後、顕著な体重減少の後に死亡したのに対し、ペプチド-リポソーム免疫群では体重減少が見られず無徴候で生存した。同様の結果は H1N1 型ウイルスおよび H3N2 型ウイルスを用いた感染実験においても得られた。

以上の結果から、インフルエンザウイルスの内部構造をターゲットとした CTL 誘導型リポソームワクチンがインフルエンザウイルスの亜型に対して有効な「万能インフルエンザワクチン」として臨床応用可能であることが示唆された。これまでに、HLA A2 および HLA A24 拘束性の CTL エピトープが同定されている。これらの HLA タイプは日本および欧米の人口の約 8 割をカバーするが、現在、これ以外のマイナーな HLA タイプに拘束性の CTL エピトープの同定を進めており、グローバルに有効なインフルエンザワクチンの創製を目指している。

- 1) M. Taneichi *et al.* : *J. Immunol.*, 169, 4246 (2002).
 - 2) T. Uchida : *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.*, 3, 119 (2003).
 - 3) 内田哲也 : *アレルギー科*, 18, 252 (2004).
 - 4) M. Taneichi *et al.* : *J. Immunol.*, 177, 2324 (2006).
 - 5) 内田哲也 : *東京医科大学雑誌*, 64, 443 (2006).
 - 6) T. Uchida *et al.* : *Mini Rev. Med. Chem.*, 8, 184 (2008).
- (内田哲也, 種市麻衣子, 国立感染症研究所)

完全長 cDNA の大規模解析とバイオリソースとしての利用 トランスクリプトーム解明からバイオリソースの整備へ

ゲノムプロジェクトの終了により、生物のトランスクリプトーム（生体で転写されている mRNA の全貌）が明らかになるのも近いと思われた。しかし、近年の FANTOM⁽¹⁾をはじめとする大規模プロジェクトにより「RNA 新大陸」が発見され、ゲノムに関する我々の認識も大きく変わった。この発見を支えたのは完全長 cDNA ライブラリーの作製とその大規模解析である。

完全長 cDNA とは、もともになる mRNA の転写開始点から転写終結点まですべてを含んでいる cDNA である。「完全長」とわざわざ呼ばれるのは、逆に言えばそれだけ、完全な形の cDNA の取得の難しさを表わしている。cDNA は逆転写酵素を使って人工的に mRNA から作製するが、逆転写酵素の活性が弱いこと、生体には強力な RNase が存在するため、作製過程で mRNA の分解を招くことなどが原因で、完全長の cDNA を取得することは困難であった。しかし最近、いくつかの新しい方法が開発されてきている。

真核生物の mRNA はその 5' 末端に 7-メチルグアノシンという特殊なヌクレオチドが付加され、それが次のヌクレオチドと 5'-5' 結合している。この構造はキャ

ップ構造と呼ばれる。また、3' 末端側にはアデニンの反復配列（ポリ A テール）が付加される（図 1）。完全長 cDNA の合成方法はいくつかあるが、いずれも高度な技術を要する。このうち、オリゴキャップ法⁽²⁾、キャップトラッパー法⁽³⁾がよく用いられているが、これらはいずれも mRNA の 5' キャップ構造を利用する方法である。前者がキャップ構造を任意のオリゴヌクレオチドに置換し、それをもとに完全長 cDNA を取得するのにに対し（図 2）、後者はキャップ構造にビオチンを付加したのち、ポリ T プライマーを使って cDNA の第一鎖を合成する。こののち、一本鎖 RNA を分解する RNase I を添加する。これによって不完全の cDNA と RNA のハイブリッド分子はキャップ構造を含む部分が分解される。そののち、ビオチンと親和性をもつストレプトアビジン固定化ビーズを使ってキャップ構造をもつ RNA と完全長



図 1 ■ 真核生物の完全長 RNA

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*

松井政則**
高山俊輔**
内田哲也***

Key Words: SARS coronavirus, vaccine, humoral immunity, cellular immunity

はじめに

2002年11月に、中国広東省で新型肺炎として発生した重症急性呼吸器症候群(SARS)は、翌年2月までに香港、台湾などに広まった(図1)。3月には、WHOが世界中に警報を出したが、同年7月に流行の終息が宣言された。結局、29か国で8,096人が感染し774人が死亡した。致死率は、60歳未満で13.2%であるが、60歳以上ではきわめて高かった(50%)。その後、2003~2004年に単発的発生が数件起こったが、それ以降、発生はない。しかし、ウイルスは自然宿主に潜んでいると思われ、有効なワクチンの早急な開発が必要である。

SARSコロナウイルス(SARS-CoV)

SARSをひき起こすSARS-CoVは、約30Kbのきわめて大きな(+)鎖RNAからなる新種のコロナウイルスである(図2A)。ゲノムは、13~15のopen reading frame(ORF)からなり、5'末端からレプリカーゼとプロテアーゼをコードするORF1aと1bがあり、少なくとも7つの構造遺伝子、スパイク(S), 3a, エンベロープ(E), メンブレン(M),

7a, 7b, スクロオカプシド(N)が位置している(図2B)。S領域内のレセプター結合ドメイン(RBD)は、レセプターであるアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)と結合し¹⁾、ウイルス侵入に重要な役割をする。

S蛋白に基づく系統発生的解析によると、SARS-CoVは4つのグループに分けられる(図3)¹⁾。グループ1は、2003年に中国でハクビシンから分離されたウイルスであり、ヒトACE2がレセプターではない。グループ2は、ハクビシンやタヌキ由来のウイルス、および2003~2004年にヒトで散発的に発生したウイルスであり、致死的なグループ3のウイルスより病原性が低い。しかし、ヒトACE2に結合するRBDをもつ。グループ3は、2002~2003年に発生した、Urbani株などの病原性の高いウイルスである。そして、グループ4は、コウモリより得られた株である。これらは、Urbani株に比べて、12~22%のアミノ酸が異なる。これらの解析から、SARS-CoVは、コウモリに起源をもち、ハクビシンやタヌキに感染し、さらに種を越えてヒトへ感染したと考えられる。ハクビシンからヒトに感染した当初は、高い病原性をもたないが、ヒトからヒトへと感染が進むにつれて変異し、きわめて高い病原性をもったと考えられる。

* Progress in SARS vaccine development.

** Masanori MATSUI, D.D.S., Ph.D. & Shunsuke KOHYAMA: 埼玉医科大学医学部微生物学[〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38]; Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Saitama Medical University, Saitama-ken 350-0495, JAPAN

*** Tetsuya UCHIDA, Ph.D.: 国立感染症研究所血液・安全性研究部

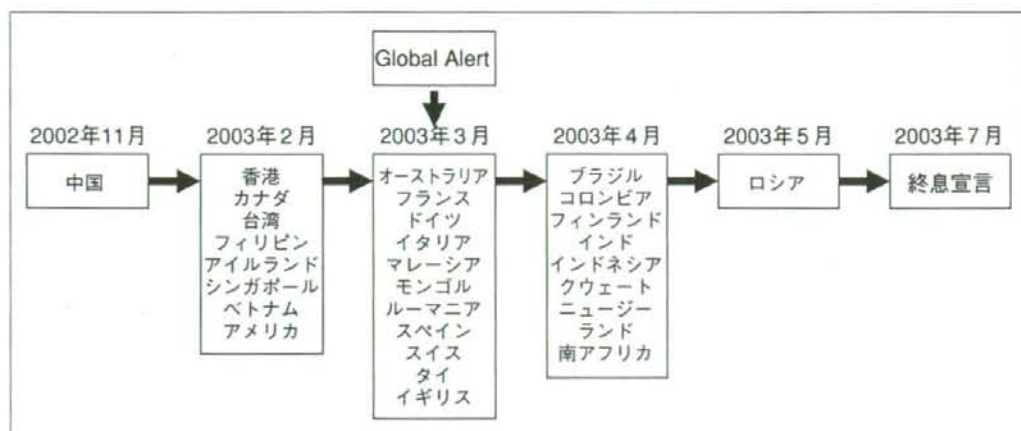


図1 2002～2003年におけるSARS-CoVのアウトブレイク

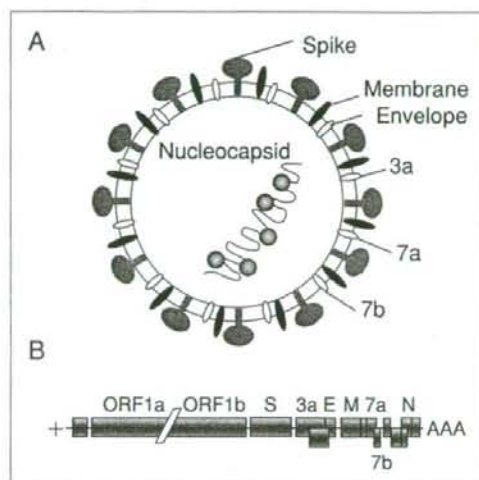


図2 SARS-CoVの構造

A : SARS-CoVの概略図。B : SARS-CoVのゲノム構造。

SARS-CoVに対する免疫反応

SARS-CoVに感染したマウスの血清がSARS-CoVの増殖を抑えたことから、中和抗体が感染制御に重要であることが示唆された。とくに、中和抗体の抗原決定基がRBDに存在するので、S蛋白が中和抗体の抗原としてもっとも重要と思われる。実際に、感染から回復したヒトの血清に、S蛋白のみに対する中和抗体が存在した¹⁾。

一方、SARS-CoVに対する細胞性免疫の役割は、よくわかっていない。急性期では、患者の95%でCD4⁺、CD8⁺T細胞数の減少がみられるが、回復するにつれてT細胞数は増加する。また、

あるHLA class IアレルがSARSの病状に関係しているため、CD8⁺細胞傷害性T細胞(CTL)が一定の役割をしていると考えられる。実際に、感染回復患者において、CTLが強力に誘導され、SやN蛋白からCTLエピトープが同定された。Yangら²⁾によると、S蛋白を発現するDNAワクチンによって中和抗体とS特異的CTLが誘導されたが、SARS-CoVの増殖を抑えたのは中和抗体であった。しかし、CTLはS蛋白などの構造蛋白のみでなく、調節性蛋白に対しても誘導できる。CTLのドミナントエピトープが、小さなS蛋白ではなく、大きな調節性蛋白領域に存在すると考えることは可能である。最近、SARSから自然に回復したヒトの免疫反応を調べたところ、強いCTLが検出された³⁾。これは、他のウイルス感染症と同様に、CTLが宿主防御に重要であることを強く示唆している。驚いたことに、NK、NK-T、およびT/B細胞欠損マウスでは、正常マウスと同様、チャレンジしたSARS-CoVを排除した⁴⁾。しかし、マウスはSARS-CoVに感染するが、症状はきわめて軽度である。したがって、この結果を単純にヒトに当てはめるべきではない。

SARSワクチン

上述のように、S蛋白に対する中和抗体が、ウイルスの排除に効果があると思われる。したがって、今までのワクチン研究では、S蛋白に対する体液性免疫に焦点がおかれた。しかし、ネコのコロナウイルス(FIPV)の感染では、antibody-de-

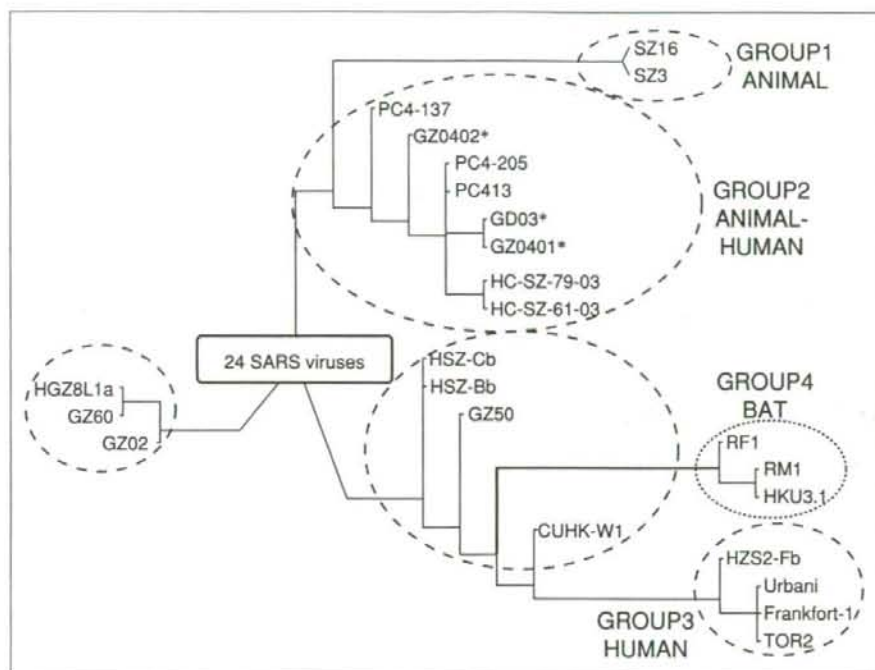


図3 SARS-CoVの系統樹

グループ1：2003年に中国南部でハクビシンから得られたウイルス，グループ2：ハクビシンやタヌキから得られたウイルス，および2003～2004年にヒトに散発的に発生したウイルス，グループ3：2002～2003年にヒトに流行したウイルス，グループ4：2005～2006年にキクガシラコウモリから得られたウイルス，グループ3と4の間の太線は，系統発生的にずっと離れていることを示している。

pendent enhancementがみられる。この現象は、FIPVに感染してS蛋白に対する中和抗体が誘導されたネコが、FIPVに再度感染すると、初感染よりずっと重篤になるという現象である¹⁾。今のところ、FIPVに限ってみられる現象であるが、同じ科に属するSARS-CoVにおいて可能性がないわけではない。さらに、S蛋白がマウスに急性の肺損傷を起こすことがわかった⁴⁾。SARS-CoVのレセプターであるACE2は、ACEとともにレニン-アンジオテンシン系における相同蛋白質である(図4)。ACEは肺の損傷をひき起こすが、ACE2はこの系で負の調節因子として作用する。SARS-CoVが感染した場合、S蛋白はACE2に結合してその発現を減少させ、肺の損傷を促進する。2003～2004年に散発的に発生したウイルスは、2002～2003年に流行したウイルスよりずっと病原性が低かったが、これは、S蛋白変異のために、ACE2への結合力が弱く、それにより肺炎の症状が軽

度であったと推測されている。もし、中和抗体を誘導するためにS蛋白を産生するワクチンが投与された場合、上述の機構により重症の肺炎に陥るかもしれない。

以上のようなことから、実験的に効果があるからといってS蛋白に対する中和抗体を誘導するワクチンのみに目的を絞るのは危険である。一般に、ウイルスに対する免疫防御反応は、体液性免疫と細胞性免疫が両輪として働く必要があるため、SARSにおいても、両方を誘導する方法を探索することが必要であろう。CTLの大きな特徴は、そのウイルス由来の蛋白質すべてに対して、CTLが誘導できるという点である。変異したS蛋白は中和抗体に抵抗性を示す⁵⁾が、CTLでは、変異の少ないN蛋白や調節性蛋白質に対しても誘導することが可能であり、アミノ酸変異による影響を最小限に抑えられる。SARS-CoVの場合、きわめて大きなORF1aと1bがあり、そこにドミナントエ

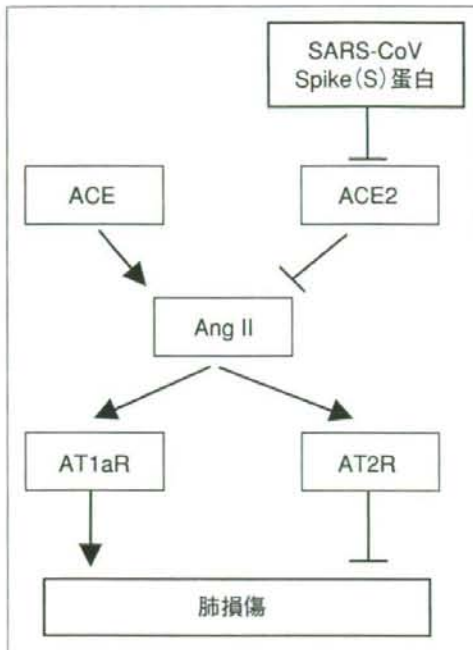


図4 SARS-CoVのS蛋白による急性肺損傷の機構
アンジオテンシン変換酵素(ACE)はアンジオテンシンI(Ang I)を切断してAng IIを産生する。Ang IIは、アンジオテンシンII type 1a受容体(AT1aR)に結合して肺の損傷をひき起こしたり、アンジオテンシンII type 2受容体(AT2R)に結合して肺損傷を減じたりする。一方、SARS-CoVのレセプターであるACE2は、Ang IIを不活性化してこの系における負の調節因子として作用する。SARS-CoVが感染した場合、そのS蛋白はACE2に結合してACE2の発現を減少させ、肺の損傷を促進する。

ビトープが存在する可能性は高い。そのように保存されたエピトープに対するCTLを誘導できれば、ヒトのSARS-CoVとともに、動物に自然感染し、いつかまた再興してヒトに猛威を振るうであろうSARS-CoV様ウイルスの両方を防御しようようなワクチンが開発できるかもしれない。

SARSワクチンの開発

今までに、さまざまなワクチン候補が報告されたが、それぞれ長所短所があり(表1)、実用化できる方法はまだ確立されていない(表2)。

1. 不活化SARS-CoV

不活化したSARS-CoVを使ったワクチン法は、安全で確実に体液性免疫を誘導できる。しかし、不活化ウイルス作製のために、危険なウイルス

を大量に培養する必要がある。また、細胞性免疫の誘導はほとんど期待できない。

SARS-CoVは、UVやホルマリンで不活化できる。Spruthら⁵⁾は、安全のため、ホルマリンとUVの2段階でウイルスを不活化した。それをマウスに免疫したところ、中和抗体やIFN- γ を誘導して、SARS-CoVのチャレンジにも抵抗性を示した。また、 β -プロピオラクトンで不活化したSARS-CoVは、マウスに中和抗体を誘導し、組換えアデノウイルスより効率よくSARS-CoVの増殖を抑制した⁶⁾。

2. 弱毒化SARS-CoV

E遺伝子を除去して弱毒化したSARS-CoVは、ハムスターに中和抗体を強力に誘導した⁷⁾。そして、Urbani株(グループ3)だけでなく、GD03株(グループ2)の増殖も抑制した。しかし、安全性の点では疑問である。

3. サブユニットワクチン

サブユニットワクチンは、ウイルスを含まないので安全である。しかし、抗原性が低いので、免疫アジュバントとともに、複数回投与する必要がある。

S蛋白全体または一部をマウスに免疫した実験が多く報告されている。Heら⁸⁾は、Tor2株(グループ3)、GD03株(グループ2)、およびSZ3株(グループ1)のRBDの組換え蛋白をFcと融合させ、マウスやウサギに免疫した。その結果、それぞれのウイルス株に対する中和抗体が誘導された。しかし、Tor2-RBDで免疫したマウスから作製した単クローン抗体はすべてTor2、GD03を中和したが、SZ3に対しては、中和するものとしなかったのが存在した。したがって、エピトープを選べば、ウイルスの種を超えて効果があることがわかった。

4. Virus-like particles (VLPs)

VLPsは、ゲノムがないのでウイルス増殖はしないが、本来のウイルス粒子と同じ構造をもち、細胞指向性が同じなのでワクチンに利用できる。Luら⁹⁾は、SARS-CoVのS、M、Eを発現するバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させて、VLPsを作製した。これは、マウスに中和抗体と細胞性免疫を誘導した。

5. 組換えウイルス

ウイルスベクターは、強い体液性免疫と細胞

表1 各種ワクチン法の利点と欠点

ワクチン	利点	欠点
不活化ウイルス	ウイルスの複製がないので、安全で、安定である。 体液性免疫の誘導が期待できる。	強い細胞性免疫の誘導は期待できない。 不活化ウイルスを作製するために、危険なウイルスを大量に培養するので危険である。 不完全な不活化による、ウイルス感染の危険性。
サブユニット	安全性が高い。 容易に大量生産できる。	免疫原性が弱いので、複数回投与する必要がある。 抗原性のある蛋白質、またはエピトープを探す必要がある。
組換えウイルス	体液性免疫と細胞性免疫の両方を強力に誘導できる。	免疫不全のヒトに使用する場合、危険性を伴う。 弱毒株が野生株に変わる危険性がある。
DNAワクチン	体液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導できる。 安全性、安定性が高い。 容易に作製できる。	免疫原性が弱い。

表2 SARSワクチンの開発

ワクチン	特徴	抗原	動物	結果	文献
不活化 SARS-CoV	UVとホルマリン	ウイルス全体	BALB/c	中和抗体、細胞性免疫 SARS-CoVに対する防御反応	5
	β -プロピオラク トン	ウイルス全体	129S6/SvEvマ ウス	SARS-CoVに対する防御反応 アデノウイルスより良し	6
弱毒化 SARS-CoV	E遺伝子欠損	E蛋白を除くウ イルス全体	ハムスター	中和抗体 SARS-CoVに対する防御反応	7
サブユニット	Fcとの融合蛋白	ヒト、ハクビシ ン由来ウイルス のRBD(S蛋白)	BALB/cマウス ウサギ	中和抗体 それぞれのウイルス株に対する交 差防御反応	8
VLPs	バキューウウイル スによる	S, M, E 蛋白	BALB/c	中和抗体 細胞性免疫	9
組換えウイルス	MVA	S蛋白	BALB/c	中和抗体 SARS-CoVに対する防御反応	10
	MVA	S蛋白	フェレット	中和抗体、肝炎発症	11
	アデノウイルス	S, N 蛋白	アカゲザル	中和抗体、T細胞反応	12
	水疱性口内炎ウ イルス	S蛋白	BALB/c	中和抗体 SARS-CoVに対する防御反応	13
	アデノ随伴ウイ ルス	RBD(S蛋白)	BALB/c	中和抗体、CTL SARS-CoVに対する防御反応	14
DNAワクチン		S蛋白	BALB/c	中和抗体、T細胞 ウイルス防御は中和抗体による	2
	calreticulin遺伝 子挿入	N蛋白	C57BL/6	中和抗体、CTL 組換えウイルスに対する防御免疫	15
プライム・ ブースト	DNA・アデノウ イルス	N蛋白	BALB/c	抗体、IFN- γ 産生	16

性免疫の両方を誘導するため、ワクチンの有力な候補である。したがって、さまざまな弱毒化ウイルスで組換え生ワクチンの開発が行われている。しかし、免疫不全患者に投与する場合など、危険性は残る。

(1) ワクシニアウイルス

いくつか弱毒株があるが、modified vaccinia virus Ankara (MVA) がもっとも広く使用されている。

Bishtら¹⁰⁾は、S遺伝子をMVAに組み込んで、マウスに免疫し中和抗体を誘導した。そして、SARS-CoVに対する防御効果を示した。一方、Weingartlら¹¹⁾は、S遺伝子を組み込んだMVAをフェレットに免疫したが、SARS-CoVの感染によって肝炎が発症したため、ワクチンの副作用を提言した。

(2) アデノウイルス

アデノウイルスは、組み込まれた外来抗原に