

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应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应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)

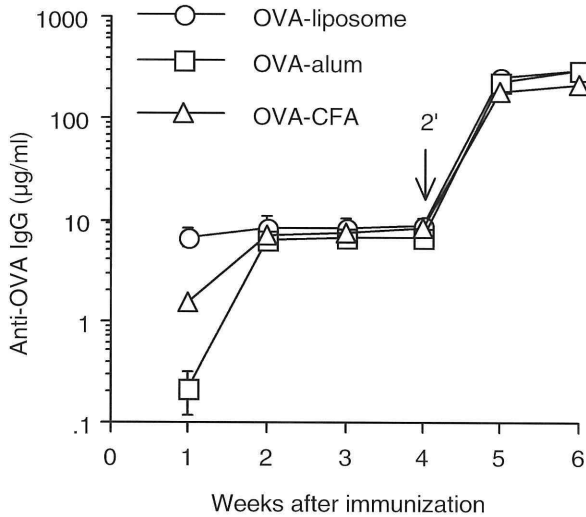


図 1a OVA 免疫マウスにおける抗 OVA IgG 抗体産生
BALB/c マウスに 3 種類の異なるアジュバントを用いて OVA を 0 週、4 週の 2 回免疫し、血清中の抗 OVA IgG 抗体を酵素抗体法 (ELISA) を用いて測定した。

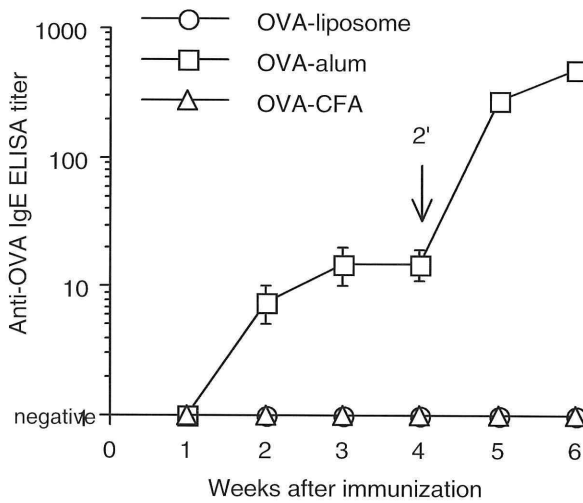


図 1b OVA 免疫 BALB/c マウスにおける抗 OVA IgE 抗体産生
図 1a の血清について抗 OVA IgE 抗体を ELISA を用いて測定した。

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 1 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 に依存するかどうかについて 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 に依存してい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²⁾、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

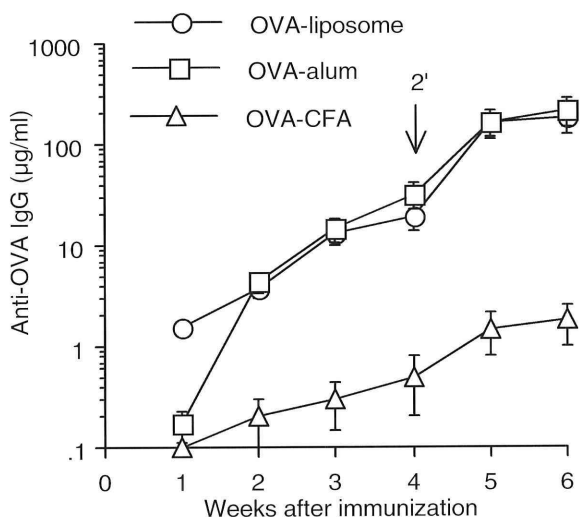


図 2a OVA 免疫 IL-12 ノックアウトマウスにおける抗 OVA IgG 抗体産生
IL-12 ノックアウトマウスに 3 種類の異なるアジュバントを用いて OVA を 0 週、4 週の 2 回免疫し、血清中の抗 OVA IgG 抗体を ELISA を用いて測定した。

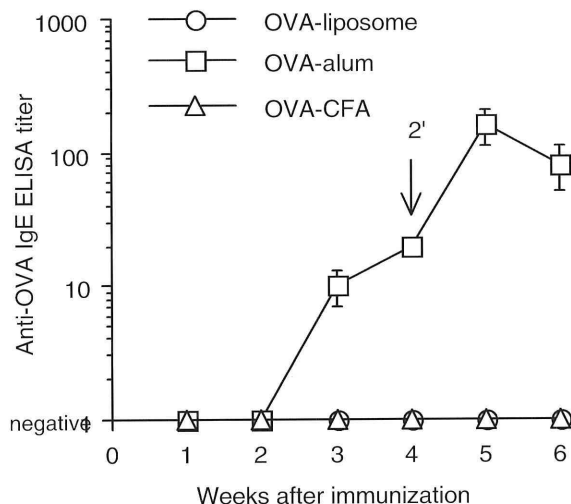


図 2b OVA 免疫 IL-12 ノックアウトマウスにおける抗 OVA IgE 抗体産生
図 2a の血清について抗 OVA IgE 抗体を ELISA を用いて測定した。

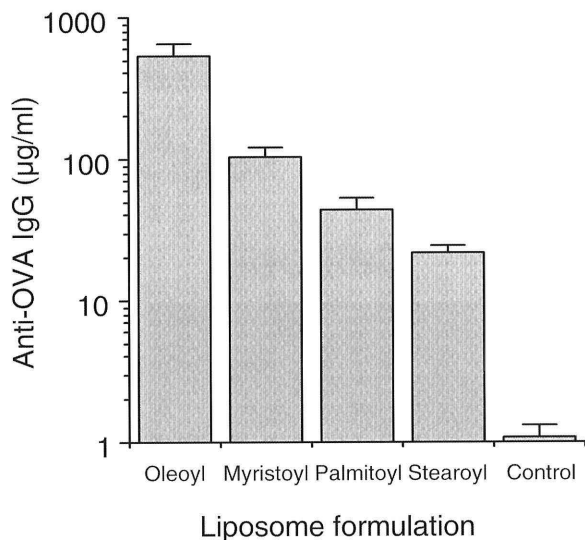


図 3 脂質組成の異なるリポソームと結合した OVA によって誘導される抗 OVA IgG 抗体産生
オレイン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸からなるリポソームに OVA を結合させ、BALB/c マウスに 0 週、4 週の 2 回免疫した。初回免疫後 6 週における血清中抗 OVA IgG 抗体価を示す。

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 (DQ-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共焦点蛍光顕微鏡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 (図 4a)、かつ消化を受ける (図 4b) ことが示された。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⁴⁾。

リポソーム表面結合抗原によって誘導される IgE 選択的無反応は T 細胞に非依存的である

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 細胞をヌードマウスに移入し、OVA-alum を免疫すると、抗 OVA IgE 産生が誘導された。これに対して、OVA-alum 免疫マウス由来 CD4 陽性 T 細胞をヌードマウスに移入し、OVA-リポソームを免疫すると、抗 OVA IgE 産生は誘導されなかった。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観察され、T 細胞ドナーの免疫方法にはよらなかった。IL-10 および CD8 陽性 T 細胞が IgE 産生の調節に関与することを示唆する報告がされているが、IL-10 の活性を中和するモノクローナル抗体、および CD8 陽性 T 細胞を除去するモノクローナル抗体を *in vivo* 投与しても 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に影響は見られなかったことから、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に IL-10 あるいは CD8 陽性 T 細胞は関与しないと考えられた。

Cell only Stearoyl Oleoyl

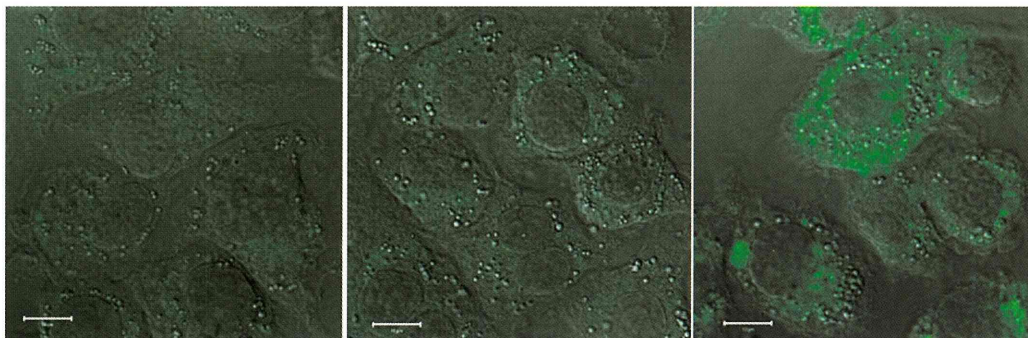


図 4a 2 種類の異なる脂質組成のリポソームに結合した OVA のマクロファージによる貪食
 蛍光標識した OVA をステアリン酸 (Stearoyl)、オレイン酸 (Plepyl) からなるリポソームと結合させ、マクロファージ培養中に添加した。培養開始後 60 分における共焦点蛍光顕微鏡像を示す。

Cell only Stearoyl Oleoyl

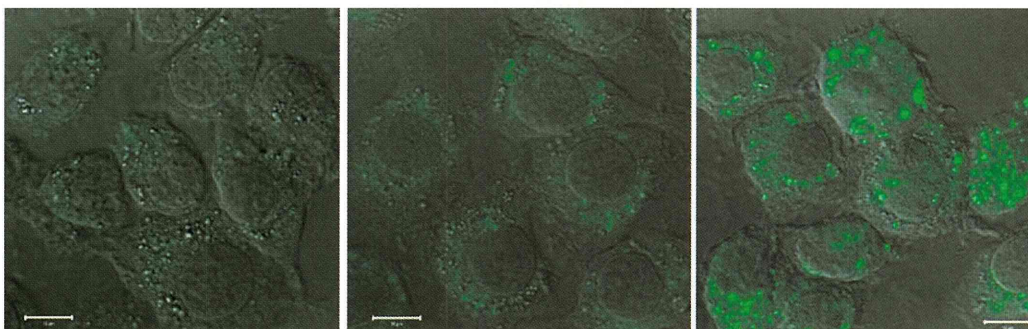


図 4b 2 種類の異なる脂質組成のリポソームに結合した OVA のマクロファージによる消化
 消化を受けると蛍光を発する OVA (DQ-OVA) をステアリン酸 (Stearoyl)、オレイン酸 (Plepyl) からなるリポソームと結合させ、マクロファージ培養中に添加した。培養開始後 60 分における共焦点蛍光顕微鏡像を示す。

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。

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 細胞は抗 OVA IgE 抗体産生を支持することが示され、OVA-alum 免疫マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を移入したヌードマウスにおいても OVA-リポソームで免疫すると抗 OVA IgE 産生が誘導され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明らかになった。CD4 陽性 T 細胞のかわりに脾細胞から B 細胞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。このことから、Th1 および Th2 のバランスによらない IgE 産生調節機構が存在することが示唆された。

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は
細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導し、
腫瘍拒絶を誘導する

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が変化することが示されたが、このような量的な変化だけでなく、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近年の検討の結果、明らかになった⁹⁾。マクロファージのクラス II compartment を赤色に蛍光標識しておき、リポソームに結合させる OVA を緑色に蛍光標識したものをマクロファージ培養中に添加すると、図 5a に示すように、飽和脂肪酸からなるリポソームに結合した OVA は貪食を受けた後すべてマクロファージのクラス II compartment に集結するが、不飽和脂肪酸からなるリポソームに結合した 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 (DQ-OVA) をリポ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ポソームに結合した OVA の一部はクラス II compartment の外で消化を受けることがわかった (図 5b)。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ポソームに結合した 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ポソームに結合した 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ポ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ポソームに結合した OVA の

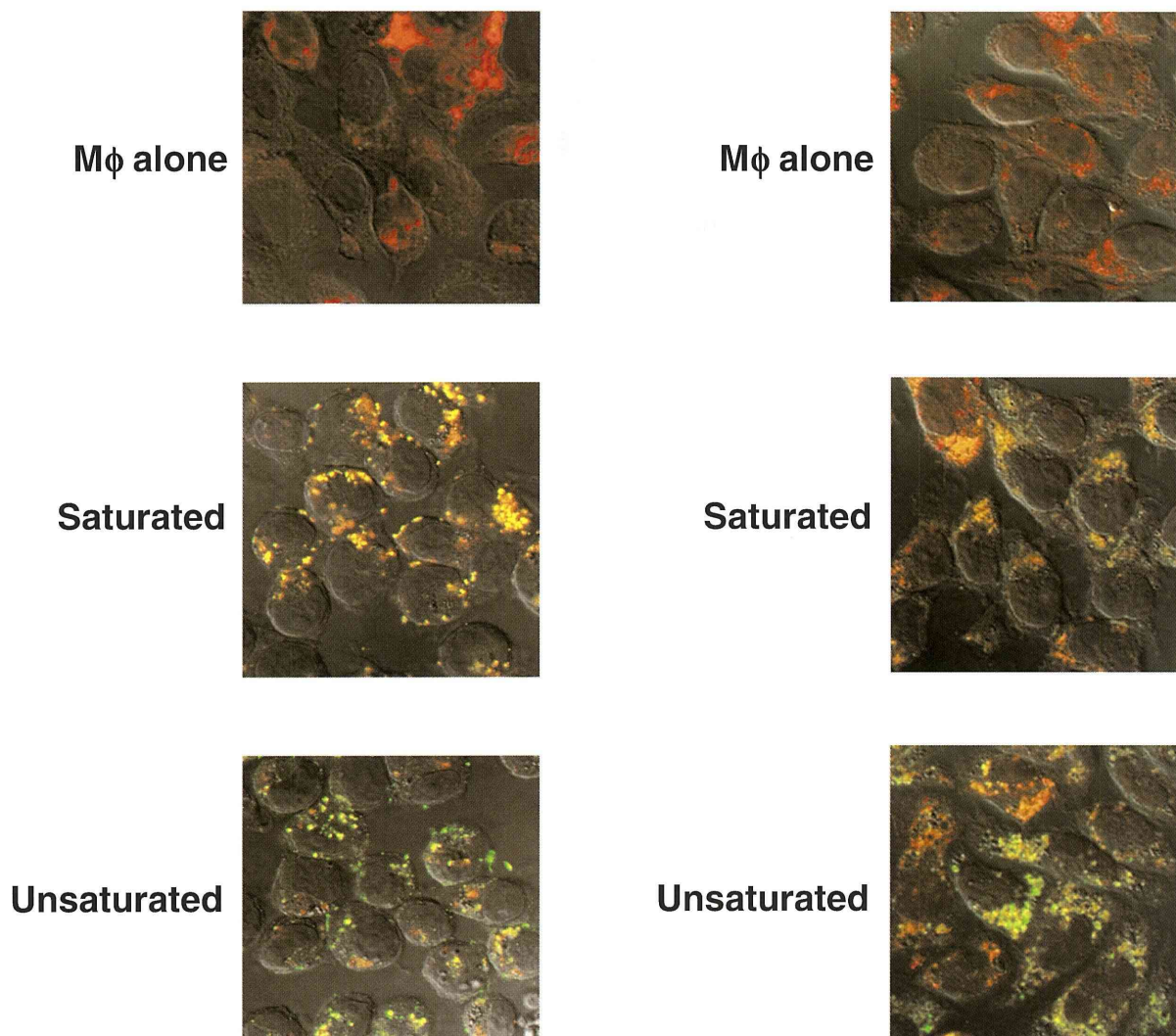


図 5a リポソームに結合した OVA のマクロファージ細胞中における局在
 クラス II を赤色の蛍光で標識したマクロファージの培養中に、緑色の蛍光で標識した OVA と飽和脂肪酸 (Saturated) あるいは不飽和脂肪酸 (Unsaturated) からなるリポソームとの結合物を添加した。培養開始後 60 分における共焦点蛍光顕微鏡像を示す。

図 5b リポソームに結合した OVA のマクロファージ細胞中における消化
 クラス II を赤色の蛍光で標識したマクロファージの培養中に、消化を受けると蛍光を発する OVA (DQ-OVA) と飽和脂肪酸 (Saturated) あるいは不飽和脂肪酸 (Unsaturated) からなるリポソームとの結合物を添加した。培養開始後 60 分における共焦点蛍光顕微鏡像を示す。

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
 マウス脾臓より得られた抗原提供細胞を OVA あるいはリポソーム結合 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。

<i>in vitro</i> 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

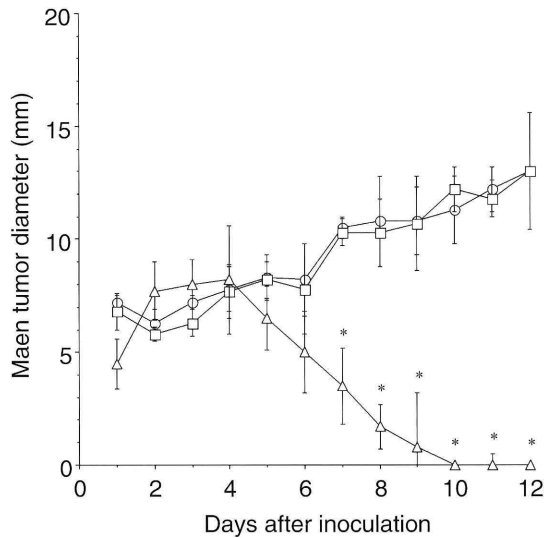


図6 腫瘍抗原ペプチドを投与したマウスにおける腫瘍拒絶
C57BL/6マウスにE.G7を移植し、腫瘍径が約5mmとなった時に腫瘍の周囲にOVAペプチド結合リポソームをCpG、抗IL-10モノクローナル抗体と共に投与して腫瘍径の変化を観察した。○：CpG、抗IL-10モノクローナル抗体のみ投与。□：ペプチド溶液をCpG、抗IL-10モノクローナル抗体とともに投与。△：ペプチド結合リポソームをCpG、抗IL-10モノクローナル抗体とともに投与。

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6に示すように、投与後10日以内に腫瘍が消滅した。一方、CpG、抗IL-10抗体だけを投与したマウス、および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。図7に示すように、腫瘍拒絶が観察されたマウス由来の脾臓CD8陽性T細胞中ではOVAペプチドに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CD8陽性T細胞を活性化し、細胞性免疫を誘導することが示された。

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、取扱の簡便さ、低コスト、高いアジュバント効果、等の利点を有するが、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く、代謝を受けることなく体内に蓄積する、等の欠点がある。本研究は現行のワクチンアジュバントが持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。リポ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

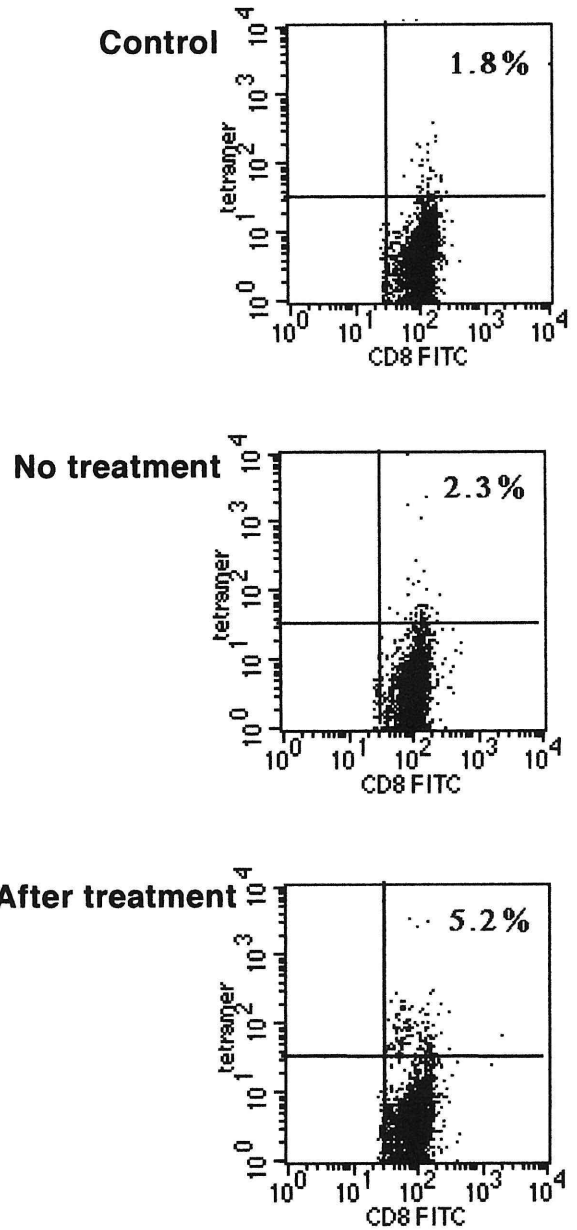


図7 腫瘍を拒絶したマウスにおけるCTL誘導
マウス脾臓由来CD8陽性細胞のOVAペプチド-MHCクラスI(H2-K^b)複合体をFACSを用いて解析した。Control：正常マウス。No treatment：腫瘍拒絶の観察されなかった担癌マウス。After treatment：図6の実験において腫瘍拒絶の観察されたマウス。

る。さらに、リポソームは生体の細胞膜構成成分からなるため、きわめて毒性が低く、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アルミニウムアジュバントに代わるワクチンの処方として期待された。これに加えて、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。

これまでに得られた知見をもとに、我々は現在、リポソーム表面結合抗原を高病原性鳥インフルエンザ、Severe acute respiratory syndrome (SARS) といった新興感染症に対するワクチン、および、腫瘍治療薬の創製に応用するべく検討を行っている。

文 献

- 1) Naito S, Horino A, Nakayama M, Nakano Y, Nagai T, Mizuguchi J, Komuro K, Uchida T: Ovalbumin-liposome conjugate induced IgG but not IgE antibody production. *Int Arch Allergy Immunol* **109**: 223-228, 1996
- 2) Nakano Y, Mori M, Nishinohara S, Takita Y, Naito S, Horino A, Kato H, Taneichi M, Komuro K, Uchida T: 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, Mori M, Nishinohara S, Takita Y, Naito S, Kato H, Taneichi M, Komuro K, Uchida T: Surface-linked liposomal antigen induces IgE-selective unresponsiveness regardless of the lipid components of liposomes. *Bioconj Chem* **12**: 391-395, 2001
- 4) Tanaka Y, Kasai M, Taneichi M, Naito S, Kato H, Mori M, Nishida M, Maekawa N, Yamamura H, Komuro K, Uchida T: Liposomes with differential lipid components exert differential adjuvanticity in antigen-liposome conjugates via differential recognition by macrophages. *Bioconj Chem* **15**: 35-40, 2004
- 5) Taneichi M, Naito S, Kato H, Tanaka Y, Mori M, Nakano Y, Yamamura H, Ishida H, Komuro K, Uchida T: T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen. *J Immunol* **169**: 4246-4252, 2002
- 6) Taneichi M, Ishida H, Kajino K, Ogasawara K, Tanaka Y, Kasai M, Mori M, Nishida M, Yamamura H, Mizuguchi J, Uchida T: Antigens chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8⁺ T cells and induce potent antitumor immunity. *J Immunol* 2006 in press