リポソームを用いた感染症ワクチンの開発

特集 感染症対策に資する新規ワクチンシステムの開発

内 田 哲 也*

Development of CTL-based liposomal vaccines

The current vaccination strategy is aimed at eliciting neutralizing antibody responses against surface antigens of pathogens. Although antibody-mediated immunity to the surface of antigens reduces the probability of infection and morbidity, an antibody against one virus type or subtype can provide limited or no protection against another. We developed liposome vaccine which is capable of inducing CTL response against internal antigens of influenza viruses and removing virus-infected cells in the host. The CTL-based liposomal vaccine might be applicable for the development of vaccines against influenza and other viruses which frequently changes their surface antigenic molecules.

現行のワクチンは主として病原体表面の蛋白に結合する抗体の産生を誘導することを目的としているため、インフルエンザウイルスのように表面抗原の異なるウイルス亜型および変異体に対しては奏功しにくい場合がある。筆者らはウイルス内部に高度に保存された蛋白を標的とし、宿主のウイルス感染細胞を破壊・除去することのできる細胞性免疫(CTL)を誘導するリポソームワクチンを開発した。CTL誘導型リポソームワクチンはインフルエンザウイルスだけでなく、表面の抗原を頻繁に変異させるウイルスに対するワクチンの開発への応用が期待される。

Tetsuya Uchida*

key words : vaccine, viral infection, liposome, CTL

2009年3月にヒト-ヒト感染可能な新型インフルエンザウイルスがメキシコで出現して以来、地球規模で感染が拡大している。その原因の一つとして、現行の季節性インフルエンザワクチンが新型インフルエンザウイルスに対する感染防御に奏功しないことがあげられる。

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目的としているため、表面抗原が変異すると抗体が有効に作用しなくなる。ウイルス表面の抗原を頻繁に変異させて抗体による免疫応答から逃れるウイルスはインフルエンザウイルスだけではなく、ほかにエイズウイルス、SARSウイルス、C型肝炎ウイルス、エボラウイルスなどが知られている。ウイルスの自然感染において、生体は抗体による、いわゆる「液性免疫」に加えてウイルス感染細胞を破壊・除去する細胞障害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)に

よる、「細胞性免疫」を用いて対応していると考えられている。

本稿では、従来のウイルスワクチンの弱点を補完することが期待される細胞性免疫誘導型リポソームワクチンの開発について紹介する。

現行のウイルスワクチンの問題点

現行のウイルスワクチンにおける問題点について、インフルエンザを例に述べることにする。インフルエンザウイルスの表面にはヘマグルチニン(hemagglutinin: HA)とノイラミニダーゼ(neuraminidase: NA)という2種類の糖蛋白質が存在する(図1)。HAには16種類の、NAには9種類のセロタイプが存在し、これらの組み合わせによって理論的に合計144種類のウイルス亜型が存在する。これらのうち、現在までのところヒト-ヒト感染の能力を有するインフルエンザウイルス亜型はH1N1, H2N2, H3N2の3種類である。

インフルエンザウイルスは2通りの方法で変異す

* Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases 国立感染症研究所血液・安全性研究部

図1 インフルエンザウイルスの構造

る。一つは、ウイルスに感染した宿主の体内で HA, NA のセロタイプの組み替え(遺伝子再集合)が行われて新しい亜型が出現する, いわゆる“antigenic shift”とよばれるもので, もう一つは, 同一のセロタイプのなかで遺伝子変異が行われて変異体が生じる, いわゆる“antigenic drift”とよばれるものである。

2009 年の新型インフルエンザウイルスは季節性インフルエンザウイルスと同じ H1N1 亜型に属するが, 新型インフルエンザウイルスの HA には季節性インフルエンザウイルスの HA と比較して約 20~24% の遺伝子変異部分があることが知られている¹⁾。2 種類の異なるセロタイプ, H1 および H2 間における HA の遺伝子変異が約 40~46% であることからすると, 新型インフルエンザにおける HA の遺伝子変異は同一のセロタイプ内における遺伝子変異としては比較的広汎なものであるということが出来る。

米国 CDC による調査の結果, 季節性インフルエンザワクチンによって誘導される抗体は新型インフルエンザウイルスに作用しないことが確かめられているが²⁾, これは上述の, 同一 HA セロタイプ(H1)における遺伝子変異が原因であり, 季節性インフルエンザウイルスの HA に対する抗体が新型インフルエンザウイルスの HA には結合しにくいことに

よると考えられる。

このように, 現行のインフルエンザワクチンは異なるセロタイプに対してだけでなく, 同一のセロタイプ内でも HA に遺伝子変異がおきたものに対しては十分に奏功しない場合が少なくないため, 新型インフルエンザウイルスが出現するたびに新しくワクチンを製造する必要が生じる。同様の問題は表面抗原を頻繁に変異させる他のウイルスにおいても存在する。

現行のワクチンに使用されている アルミニウムアジュバント

現行のワクチンには, 多くの場合アルミニウムアジュバントが添加されている。「アジュバント」はラテン語の“adjuvare(助ける)”を語源としており, 免疫原性の低いワクチン抗原に対する免疫応答を付与することを目的としている。

アルミニウムアジュバントは 1926 年に Glenney ら³⁾によって報告されて以来, ワクチン抗原の免疫原性を高め, 効率的に抗体の産生を誘導することのできる, 低コストかつ取り扱いの簡便なアジュバントとして, 20 世紀のワクチンを成功に導いた立役者であるということが出来る。

しかし一方で, アルミニウムアジュバントは液性免疫の誘導には有効であるが細胞性免疫は誘導しにくいことが知られている⁴⁾。

また, 液性免疫および細胞性免疫といった, いわゆる「獲得免疫(adaptive immunity)」が稼働するためには, 生体が病原体感染の初期に病原体特有のパターンを認識して応答する, いわゆる「自然免疫(innate immunity)」の活性化が必須であると考えられている⁵⁾。

病原体のパターンを認識する受容体(pattern recognition receptor: PRR)は Toll 様受容体(toll-like receptor: TLR)ともよばれ, マクロファージ, 樹状細胞といった抗原提供細胞に存在する。したがって, ワクチンが獲得免疫を誘導するためにはワクチンアジュバントに TLR を介した自然免疫の活性化作用が必須であることになるが, 一方で, アルミニウムアジュバントによる免疫付与には TLR が関与

表2 異なるインフルエンザウイルス亜型におけるアミノ酸の相同性

分 節	アミノ酸残基数	H5N1 (A/HongKong/156/97)	H1N1 (A/IvPR8/34)	H3N2 (A/Aichi/2/68)
M1	252	100%	95%	96%
M2	97	100%	86%	89%
NP	498	100%	94%	95%
NS1	225	100%	92%	88%
PA	716	100%	96%	96%
PB1	757	100%	97%	96%
PB2	759	100%	96%	96%

H5N1 型(A/HK/156/97)株におけるウイルス内部蛋白のアミノ酸組成に対する H1N1 型、H3N2 型ウイルスのアミノ酸相同性(%)を示す。

表1 液性免疫と細胞性免疫

液性免疫(抗体産生)

目 的：ウイルス粒子が宿主の細胞に吸着するのを阻止する。

対 象：ウイルス表面の蛋白抗原

細胞性免疫(CTL)

目 的：ウイルス感染細胞を破壊・除去し、ウイルスの自己複製を阻止する。

対 象：ウイルスを構成するすべての蛋白抗原

注：現行のワクチンは主として液性免疫を誘導するが、自然感染では液性免疫、細胞性免疫の両方が働く。

していないという報告があり⁶⁾、アルミニウムアジュバントの作用機序については依然不明の点が多い⁷⁾。

液性免疫と細胞性免疫

上述のように、従来のウイルスワクチンの多くは、ウイルス表面の抗原に結合する抗体の産生を誘導し、ウイルスが宿主の細胞に吸着・感染することを阻止する。抗体を介した液性免疫のほかに、生体にはもうひとつの免疫機能である細胞性免疫が備わっている。細胞性免疫においては、ウイルス感染細胞を破壊・除去する CTL が誘導される。CTL はウイルスに含まれるすべての蛋白抗原を標的とすることができる。ウイルスが生体に自然感染した際には、生体は液性免疫と細胞性免疫の両方を用いて感染防御を行っていると考えられている(表1)。

表面抗原と比較して、ウイルス内部の蛋白は比較的安定している。インフルエンザウイルスの場合、表面抗原が頻繁に変異するのに対してウイルス内部の蛋白はウイルス亜型および変異体の間で比較的安定しており、各分節を構成する蛋白のアミノ酸組成

はウイルス亜型間でほとんど一致している(表2)⁸⁾。1977年に Effros ら⁹⁾が A 型インフルエンザウイルスに特異的な CTL が異なる亜型のインフルエンザウイルスにも作用しうることを報告して以来、ウイルス内部の蛋白から CTL の標的となる部分(CTL エピトープ)を選択することにより、インフルエンザウイルスの亜型および変異体に対して幅広く有効性を発揮できるワクチンの創製が可能であることが多くの研究者によって指摘されている¹⁰⁻¹³⁾。

一般に、ワクチン抗原のように生体にとって「外来性抗原」であるものは、抗原提供細胞において主要組織適合複合体(major histocompatibility complex：MHC)クラス II を介して CD4 陽性 T 細胞に提示された結果、液性免疫(抗体産生)が誘導される(図2)。

これに対して、ウイルス感染細胞におけるウイルス抗原のような「内在性抗原」は、MHC クラス I を介して CD8 陽性 T 細胞に提示された結果、CTL が誘導される。この原理に従えば、従来のワクチンが主として病原体の表面抗原に対する抗体産生を誘導するのはきわめて自然なことである。

一方で、「外来性抗原」であっても MHC クラス I を介して CD8 陽性 T 細胞に提示され、CTL が誘導される、「クロスプレゼンテーション(cross-presentation)」とよばれる経路が存在することも知られており¹⁴⁾、この経路を利用してワクチン抗原に特異的な CTL を誘導することのできる免疫方法の開発が、特にウイルスワクチンにおいて期待される。

図2 液性免疫と細胞性免疫の誘導機序

細胞性免疫を誘導するワクチンの開発

筆者らは、抗原をリポソームの表面に化学結合したものの(図3)をマウスに免疫すると、抗原特異的なIgG抗体産生が誘導される一方で、IgE抗体産生が抑制されることを見いだした(図4)¹⁵⁾。

卵白アルブミン(ovalbumin: OVA)をアルミニウムアジュバントとともにマウスに免疫すると、抗OVA IgG抗体とともにIgE抗体が産生されるが、OVAをリポソームに結合させて免疫すると、IgG抗体は産生されるがIgE抗体は産生されない。病原体に対して中和抗体として作用するのは主としてIgG抗体であり、IgE抗体はワクチン抗原に対するアレルギー反応に関与し、ワクチン接種における副反応の原因の一つとなっている。アルミニウムアジュバントはワクチン抗原に特異的なIgE抗体の産生を誘導することが知られており⁴⁾、リポソーム結合抗原はアレルギー反応を惹起しにくいワクチンの創製に応用可能であると考えられる。

また、リポソームのアジュバント効果はリポソームの脂質組成によって顕著に異なることがわかった(図5)¹⁶⁾。これに加え、特定の脂質を使用して作製したリポソームに結合した抗原はCD4陽性T細胞だけでなくCD8陽性T細胞にも提示されることが明らかになり、このリポソームに腫瘍特異抗原を結合してマウスに投与することによって抗原特異的CTLによる腫瘍拒絶が誘導されることが確かめられた(図6)¹⁷⁾。このことから、CTLを誘導することが可能なりポソーム処方を用いてCTL誘導型ウイルスワクチンを創製することが期待された¹⁸⁾。

細胞性免疫誘導型インフルエンザワクチンの開発

CTL誘導型リポソームワクチンの有効性はまずマウスモデルを用いた実験において確認された¹⁹⁾。インフルエンザウイルス核蛋白(NP)由来のCTLエピートプであるNP₃₆₆₋₃₇₄を結合したリポソームを

図3 リポソーム表面結合抗原

a: 抗原内包リポソーム, b: リポソーム表面結合抗原

これまでに行われたリポソームを臨床応用するための検討の多くにおいて抗原がリポソームに内包されていた(a)のに対して, 筆者らは抗原をリポソーム表面に化学結合する方法をとった(b)

図4 OVA免疫マウスにおける抗OVA抗体産生

a: IgG, b: IgE

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およびIgE抗体をELISAを用いて測定した。

TLRリガンドであるCpGとともにマウスに免疫し, インフルエンザウイルスを経鼻感染させたところ, 肺におけるウイルスの増殖が顕著に抑制された。そこで, ヒトHLA拘束性のインフルエンザウイルス由来CTLエピトープを同定し, ヒトに応用可能なインフルエンザワクチンの開発を試みた。

インフルエンザウイルスのゲノムを構成する8分節(図1)のうち, HA, NA以外の6分節からCTLの標的となりうるエピトープを検索し, このエピトープを持つペプチドとリポソームとの結合物を作製した。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)にペプチド-リポ

図5 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. グラフは初回免疫後 6 週における血清中抗 OVA IgG 抗体価を示す.

ソーム結合物を免疫して CTL 誘導能を検討したところ, 複数のペプチドに高い CTL 誘導活性が認められ, その多くが季節性インフルエンザウイルス H1N1 型, H3N2 型, 新型インフルエンザウイルス H1N1 型, および高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 型に共通に含まれるものであった.

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インフルエンザウイルスに感染した細胞の表面に MHC クラス I を介して提示され, ②ウイルス感染細胞が CTL によって破壊・除去され, ③宿主において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, ペプチド-リポソーム結合物を免疫した HHD マウスに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, 免疫マウスにおいては H1N1 型および H3N2 型インフルエンザウイルスの肺における増殖が顕著に抑制されることが確かめられた. さらに, 致死量の H1N1 型インフルエンザウイルスを感染させたとき, 非免疫対照群は顕著な体

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 となったときに腫瘍の周囲に 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, △: ペプチド結合リポソームを CpG, 抗 IL-10 モノクローナル抗体とともに投与)

重減少ののち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みられず無徴候で生存した.

これらのことから, インフルエンザウイルス由来の内部構造蛋白から同定された CTL エピトープペプチドを用いた CTL 誘導型リポソームワクチンはインフルエンザウイルス感染細胞を排除し, ウイルスの複製を阻止すること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が異なる重型のインフルエンザウイルスを用いた感染実験において確認された.

これまでに, NP, M1, NS1 などのインフルエンザウイルス内部蛋白由来の CTL エピトープが数多くの研究者によって報告されている^{10,12,20-22)}. これらの CTL エピトープを用いてインフルエンザウイルスの重型・変異体に幅広く有効性を発揮できるワクチンを創製することが期待されているが²³⁾, これまでに報告された CTL 誘導型ワクチンの候補物質による感染抵抗性の誘導は部分的なものに留まってい

る^{11,23)}ことから、CTL 誘導型インフルエンザワクチンは現行のインフルエンザワクチンが奏功しない新型インフルエンザによって惹き起こされる症状を緩和するものと位置づけられている^{13,20)}。

これに対し、筆者らが開発した CTL 誘導型リポソームワクチンは高効率に CTL を誘導し、このワクチンの投与により肺におけるウイルス増殖を顕著に抑制することがヒト MHC クラス I を遺伝子導入したマウスにおいて確かめられている。これに加え、リポソームワクチンは免疫 1 週間後に感染抵抗性を誘導することが可能であることから、インフルエンザパンデミックに対する発生時対応としても有効であると期待される。

CTL 誘導型リポソームワクチンがこのように有効であることの理由の一つとして、リポソーム結合抗原が免疫システムの抗原提示細胞に高効率に認識され²⁴⁾、かつ抗原提示細胞において MHC クラス I を介して CD8 陽性 T 細胞に提示される¹⁷⁾という性質があげられる。さらに、このリポソームワクチンは長期間持続可能な CD8 陽性メモリー T 細胞を誘導するので、現行の抗体誘導型インフルエンザワクチン同様、免疫後少なくとも 1 シーズンは効果が持続すると予想される。

従来、CD8 陽性メモリー T 細胞の誘導には CD4 陽性ヘルパー T 細胞による補助が必須であるといわれてきたが^{25~29)}、筆者らのリポソームワクチンには CD4 陽性 T 細胞のエピトープは含まれておらず、免疫効率を高めることができれば CD4 陽性ヘルパー T 細胞の補助なしに CD8 陽性メモリー T 細胞を誘導することが示唆された。

CTL 誘導型リポソームワクチンの 臨床応用可能性

筆者らが開発した CTL 誘導型リポソームワクチンは、従来の抗体誘導型ワクチンの欠点を補完することができるという点において特に有意義である。この観点から、頻繁に遺伝子変異を起こすことによって表面抗原の構造を変え、抗体による免疫応答から逃れるタイプのウイルス(インフルエンザウイルスのほか、エイズウイルス、SARS ウイルス、C

型肝炎ウイルス、エボラウイルスなど)に対するワクチンの創製に CTL 誘導型リポソームワクチンを応用することが最も有効であると考えている。

文 献

- 1) Gatherer D : The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *J Clin Virol* 45 : 174-178, 2009.
- 2) CDC : Morbidity and Mortality Weekly Report Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *MMWR* 58 : 521-524, 2009.
- 3) Glenny AT, Pope CG : Immunology notes. XXIII. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol* 29 : 31-40, 1926.
- 4) Aggrebeck H, Wantzin J, Heon I : Booster vaccination against diphtheria and tetanus in man : comparison of three different vaccine formations-III. *Vaccine* 14 : 1265-1272, 1996.
- 5) Takeda K, Kaisho T, Akira S : Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21 : 335-376, 2003.
- 6) Gavin AL, Hoebe K, Duong B, Ota T, Martin C et al. : Adjuvant-enhanced antibody responses occur without Toll-like receptor signaling. *Science* 314 : 1936-1938, 2006.
- 7) Marrack P, McKee AS, Munks MW : Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev* 9 : 287-293, 2009.
- 8) McMichael AJ, Gotch FM, Noble GR, Beare PA : Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N Engl J Med* 309 : 13-17, 1983.
- 9) Effros RB, Doherty PC, Gerhard W, Bennink J : Generation of both cross-reactive and virus-specific T-cell populations after immunization with serologically distinct influenza A viruses. *J Exp Med* 145 : 557-568, 1977.
- 10) Townsend ARM, Rothbard J, Gotch FM, Bahadur G, Wraith D et al. : The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* 44 : 959-968, 1986.
- 11) Epstein SL, Tumpey TM, Misplon JA, Lo CY, Cooper LA et al. : DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg Infect Dis* 8 : 796-801, 2002.
- 12) Berkhoff EGM, Wit D, Geelhoed-Mieras MM, Boon ACM, Symons J et al. : Functional constraints of influenza A virus epitopes limit escape from cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 79 : 11239-11246, 2005.
- 13) Doherty PC, Kelso A : Toward a broadly protective influenza vaccine. *J Clin Invest* 118 : 3273-3275, 2008.
- 14) Heath WR, Carbone FR : Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19 : 47-64, 2001.
- 15) Taneichi M, Naito S, Kato H, Tanaka Y, Mori M et al. : T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen. *J Immunol* 169 : 4246-4252, 2002.
- 16) Nakano Y, Mori M, Nishinohara S, Takita Y, Naito S et al. : Surface-linked liposomal antigen induces IgE-selective unresponsiveness regardless of the lipid components of liposomes. *Bioconj Chem* 12 : 391-395, 2001.
- 17) Taneichi M, Ishida H, Kajino K, Ogasawara K, Tanaka Y et al. : Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8⁺ T cells and induce potent anti-tumor immunity. *J Immunol* 177 : 2324-2330, 2006.
- 18) Uchida T, Taneichi M : Clinical application of surface-

- linked liposomal antigens. *Mini-Rev Med Chem* 8 : 184-192, 2008.
- 19) Nagata T, Toyota T, Ishigaki H, Ichihashi T, Kajino K et al. : Peptides coupled to the surface of a kind of liposome protect infection of influenza viruses. *Vaccine* 25 : 4914-4921, 2007.
 - 20) Kreijtz JHCM, Mutsert G, Baalen CA, Fouchier RAM, Osterhaus ADME et al. : Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T-lymphocyte populations directed to human influenza A virus. *J Virol* 82 : 5161-5166, 2008.
 - 21) Epstein SL, Kong W, Miplon JA, Lo CY, Tumpey TM et al. : Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine* 23 : 5404-5410, 2005.
 - 22) Gotch F, McMichael A, Smith G, Moss B : Identification of viral molecules recognized by influenza-specific human cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 165 : 408-416, 1987.
 - 23) Thomas PG, Keating R, Hulse-Post DJ, Doherty PC : Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerg Infect Dis* 12 : 48-54, 2006.
 - 24) Tanaka Y, Kasai M, Taneichi M, Naito S, Kato H et al. : Liposomes with differential lipid components exert differential adjuvanticity in antigen-liposome conjugates via differential recognition by macrophages. *Bioconj Chem* 15 : 35-40, 2004.
 - 25) Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R : CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 68 : 8056-8063, 1994.
 - 26) Belz GT, Wodartz D, Diaz G, Nowak MA, Doherty PC : Compromised influenza virus-specific CD8⁺-T-cell memory in CD4⁺-T-cell-deficient mice. *J Virol* 76 : 12388-12393, 2002.
 - 27) Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG et al. : CD4⁺ T cells are required for the secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* 421 : 852-856, 2003.
 - 28) Shedlock DJ, Shen H : Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300 : 337-339, 2003.
 - 29) Sun JC, Williams MA, Bevan MJ : CD4⁺ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8⁺ T cells after acute infection. *Nat Immunol* 5 : 927-933, 2004.