膜融合リポソームを用いた外来性抗原の MHC class I 分子を介する抗原提示

中西 剛・國澤 純・林 哲・堤 康央^{*1)}, 早川 堯夫^{*2)}, 真弓 忠範^{*1)}

Fusogenic liposome directs an exogenous antigen into class I major histocompatibility complex antigen-presenting pathway

We previously reported that fusogenic liposomes (FL) prepared by fusing simple liposomes with Sendai virus particles, could introduce their contents directly and efficiently into the cytoplasm. In this report, we investigated that exogenous antigen was processed and presented by class I major histocompatibility complex (MHC) molecules after delivery into cells by using FL. FL could introduce fragment A of diphtheria toxin, maintaining its cytotoxicity, into the cytoplasm of cells efficiently *in vitro*. Consistent with this, cells treated with ovalbumin (OVA) in FL were as susceptible to lysis by class I MHC-restricted, OVA-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) as OVA-transfected clones. However, cells treated with naive OVA or OVA in simple liposomes were failed to lysis by OVA-specific CTL. These results indicated that FL could direct a exogenous antigen into class I MHC presentation pathway as a result of introduction of them into the cytoplasm. Thus, FL may facilitate induction of CD8⁺ CTL responses in vaccinations with exogenous soluble antigens, and they may serve as readily available tools for dissecting class I MHC immunity to viruses and other intracellular pathogens.

Tsuyoshi Nakanishi・Jun Kunisawa・
Akira Hayashi・Yasuo Tsutsumi^{*1)},
Takao Hayakawa^{*2)}, Tadanori Mayumi^{*1)}

key words : fusogenic liposome, ovalbumin,
class I major histocompatibility complex,
cytotoxic T lymphocyte, exogenous antigen

免疫系は、自己・非自己を認識し、生体に侵入した病原体等の異物を排除することにより、生体の恒常性を維持しようとする生体防御機構である。その免疫系において CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte (CTL) は、さまざまなウイルスや寄生虫などに感染した病態細胞や腫瘍細胞を、正常な細胞と見分けて殺傷する作用を有することから、細胞性免疫の中心的な役割を担う非常に重要なエフェクター細胞の一つと考えられる。CD8⁺ CTL は、MHC class I 分子を介してウイルス抗原や腫瘍拒絶抗原などを提示している細胞によって活性化され、抗原特異的な細胞傷害性を示す。

一般に、MHC class I 分子による抗原提示においては、正常自己抗原はもちろんのこと、感染によって複製されたウイルス蛋白質や、癌化によって生じた突然変異蛋白質など、細胞質中に存在する内在性抗原が対象となってくる(図1)。内在性抗原は、非ライソゾーム系の酵素であるプロテアソームによってプロセッシングを受け、ペプチド断片となったのち、TAP (transporter associated with antigen processing) とよばれる小胞体膜に局在する輸送蛋白質によって、細胞質から小胞体へと運ばれる。小胞体内でさらにプロセッシングを受け、9 mer 程度となった抗原ペプチドは、MHC class I 分子と結合して細胞表面へ送達される^{1,2)}。このようにして MHC class I 分子上に提示された自己、非自己(病態)抗原を見分けることにより、CD8⁺ CTL は病態細胞のみを排除している。一方で、細胞外に存在する病原体由来の抗原、いわゆる外来性抗原は、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞に、エンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれ、エンドソーム内で

^{*1)} Faculty and Graduated School of Pharmaceutical Science, Osaka University 大阪大学薬学部薬科学講座

^{*2)} National Institute of Health Sciences 国立医薬品食品衛生研究所
Offprint requests to : Tadanori Mayumi, Ph.D., Faculty and Graduated School of Pharmaceutical Science, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565

図1 MHC class I, II分子を介する抗原提示経路

16 mer 程度の抗原ペプチドにまでプロセッシングされる(図1). そして CIIV (class II-containing vesicle) とよばれるコンパートメントに運ばれ, MHC class II 分子と結合したのちに細胞表面で $CD4^+$ helper T cell (Th) に認識されることにより, 宿主の免疫機構を誘導するものと考えられている¹⁻⁵⁾.

さて近年, AIDS をはじめとする emerging infection diseases や reemerging infection diseases の克服が, 学際的にも社会的にも重要課題となっており, 予防は言うに及ばず, 治療までも想定したワクチン開発が試みられている. しかしながら, これまでわずかな成功例を除いてワクチン開発のほとんどは, 安全性の点で致命的欠陥を有していた. そのため, 人工的に合成した安全性の高い抗原部位のみを, ワクチンとして用いようとするサブユニット/ペプチドワクチンが注目されるようになってきた. しかし, サブユニット/ペプチドワクチンは単独で投与しても, 外来性抗原として認識されてしまうために, CTL の誘導はまったく期待できない. したがって, これらを安全性にすぐれ, かつ CTL をも効率よく誘導するワクチンとして設計していくためには, 外来性抗原を MHC class I 抗原提示経路に送達しうる

delivery system の開発が必要不可欠となってくる.

これまでに筆者らは, リポソームにセンダイウイルスの膜融合能を付与した膜融合リポソーム (FL) の開発を行ってきた. FL は, *in vitro*, *in vivo* 双方において, 遺伝子や蛋白質など, リポソーム内に封入できるものならいかなるものでも, 細胞に傷害を与えることなく, 効率よく細胞質中に直接導入することができる⁶⁻⁸⁾(図2). したがって, FL を用いて封入抗原をエンドサイトーシス経路ではなく, 直接細胞質中に導入することで, 細胞に外来性抗原を内在性抗原として認識させ, MHC class I 分子を介した抗原提示が可能になるものと考えられる(図1). さらには FL は, *in vivo* に直接適用した場合において, 外来性抗原に対する CTL を誘導できるワクチンベクター/アジュバントとなりうる可能性を秘めている.

本研究では, FL を CTL 誘導可能なワクチンベクター/アジュバントとして開拓していくことを念頭に, まず FL によって細胞質内に導入された封入抗原が, *in vitro* で MHC class I 抗原提示経路に送達されうるかについて検討した.

図 2 FL による薬物(封入物質)の細胞質内への送達

試料と方法

(1) 動物・細胞

C57BL/6 雄性マウス(6~8 週齢)は日本 SLC から購入した。EL4(東北大学加齢医学研究所癌細胞保存施設より供与)は RP1640(10%牛胎児血清含有 RPMI-1640)で, primary spleen cell は 50 μ M 2-mercaptoethanol を含有する RP1640 で培養した。また, ovalbumin(OVA)発現遺伝子を導入した EL4 クローンである EG7(ATCC より購入)は 400 μ g/ml G418 を含有する RP1640 で培養した⁹⁾。

(2) FL の調整

FL の調整は, Mizuguchi らの方法を一部改変して作製した⁶⁻⁸⁾。すなわち卵黄レシチン, コレステロール, ホスファチジン酸が 4:5:1(モル比)の混合脂質を用いて, 凍結融解法¹⁰⁾で作製したリポソームと, 予め紫外線照射(2,000 J/cm²)することによりウイルス RNA を断片化したセンダウイルスを 37°C で 2 時間反応させたのち, ショ糖密度勾配遠心法により未反応のリポソームとセンダウイルスを除き, FL を精製した。本 FL に封入された各物質の内封量は 15,000 HAU/ml の FL あたり, OVA においては 100 μ g/ml, ジフテリア毒素フラグメント A 鎖(DTA)においては 4 μ g/ml であった。

(3) ジフテリア毒素フラグメント A 鎖(DTA)による細胞傷害性試験

FL の細胞質内への物質送達能は, DTA をマーカー蛋白質として評価した。DTA は, 単独では細胞質内に到達することができないが, 数分子でも細胞質内に導入されると強い細胞傷害活性を有することから, キャリアの細胞質内への物質送達能を評価できるすぐれたマーカー蛋白質である^{11,12)}。DTA 封入 FL(DTA-FL), DTA 封入リポソーム(DTA-lipo)または, なにも封入していない FL(empty-FL)を EL4(終密度 1×10^7 cells/ml)に加え, 4°C, 30 分間 incubate したのち, 37°C, 30 分間 incubate した。incubate 終了後, EL4 を wash しさらに 48 時間培養した。細胞の viability は MTT 法により評価した。

(4) OVA 特異的 CTL の誘導

CTL の誘導は, OVA をモデル抗原として検討した¹³⁾。C57BL/6 マウスに OVA とフロイト完全アジュバントの混合物(OVA-CFA)を OVA 量で 100 μ g 免疫し, 10 日後に脾細胞を回収したのち, mitomycin C 処理をした EG7 と mixed lymphocyte tumor cell culture(MLTC)を行うことで CTL を sensitization した。5 日後, spleen cell を回収し, これを OVA 特異的 CTL として用いた。

図3 FLによるMHC class I抗原提示経路への抗原分子送達能の評価法

(5) FLによる細胞への抗原導入およびCTL assay

OVA封入FL(OVA-FL), OVA封入リポソーム(OVA-lipo), またはEmpty-FLをEL4(終密度 1×10^7 cells/ml)に加え, 4°C で30分間incubateしたのち, 37°C , 30分間incubateすることによりEL4への抗原導入を行った。Incubate終了後, EL4をwashし, さらに2時間培養した。本細胞をtarget細胞として, 先に作成したCTLを用い, これらに対する4時間の ^{51}Cr -release assayを行った(図3)。

(6) FACS解析

EL4, EG7に対して, anti-MHC class I抗体とanti-MHC class II抗体を用い, FACS解析を行った。

結果と考察

(1) FLの細胞質内への物質送達能の評価

FLに限らず, 細胞質内への物質導入ベクターを評価していくためには, ① 単独では細胞質内には入ることができず, ② 細胞外ではまったく活性を示さない, ③ 細胞質内に導入されれば非常に高い活性(毒性)を示す, ④ 安定かつ効率よくベクターに組み込める(封入できる)などの条件を備え

たマーカー物質が必須となる。

この目的にもっとも適合する物質の一つとして, ジフテリア菌によって産生されるジフテリア毒素のフラグメントA鎖(DTA)がある。DTAは, 数分子でも細胞質内に導入されると, 蛋白質合成系のポリペプチド鎖延長因子であるEF-2をADP-リボシル化することによって, 蛋白質合成を阻害し, 著明な細胞傷害活性を示す¹¹⁾。また *in vitro* において intact なジフテリア毒素が毒素高感受性細胞である Vero 細胞を, わずか 100 pg/ml の濃度で死滅させる一方で, DTA はその 10^6 倍である 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度においてもまったく毒素を示さない¹²⁾。したがって, DTA は FL の細胞質内への物質導入効率を評価するマーカーとしてきわめてすぐれているものと考えられる。

この DTA を用いて細胞質内への物質運搬能を評価したところ, 4 μg DTA/ml の DTA-lipo を作用させてもまったく毒性が認められなかったのに対し, DTA-FL はそのわずか 1/100 の濃度においても細胞傷害活性を示し, 0.4 μg DTA/ml ではほとんどすべての細胞を傷害した(図4)。また, empty-FL にはまったく細胞傷害活性が認められなかったことから, DTA-FL の効果はセンダイウイルス由来の蛋白質によるものではないことも

図4 DTA-FLのEL4に対する細胞傷害効果
各sampleをEL4に加え、4°C、30分間incubateした。さらに37°C、30分間incubateしたのち、EL4をwashし、48時間培養した。細胞のviabilityはMTT法を用いて評価した。
1: DTA-lipo (0.4 µg DTA/ml), 2: DTA-lipo (4 µg DTA/ml), 3: DTA-FL (0.04 µg DTA/ml, 150 HAU/ml), 4: DTA-FL (0.4 µg DTA/ml, 1,500 HAU/ml), 5: empty-FL (1,500 HAU/ml)

確認された(図4)。したがって、FLはDTAを効率よく細胞質内に送達した結果、EL4に対して細胞傷害性を示したものと考えられた。

(2) FLによるMHC class I抗原提示経路への外来性抗原分子の送達

FLによるMHC class I抗原提示経路への外来性抗原分子の送達能は、OVAをモデル抗原とし、OVA特異的に反応するCTLを用いることで評価した。OVA特異的CTLは、OVA-CFAを投与したC57BL/6マウスのspleen cellを、MHC class I分子とともにOVA peptideを提示しているEG7⁹⁾で、*in vitro*でsensitizationすることにより作成した。本方法で作成されたCTLは、CD8⁺であり、MHC class I拘束性でOVA特異的に細胞傷害性を示すことがすでに報告されている¹³⁾。また今回、target細胞として使用したEL4とEG7についてFACS解析を行ったところ、双方ともMHC class I陽性、MHC class II陰性の細胞であった(図5)。したがって、FLを用いてOVAを細胞質内に導入されたEL4が、OVA特異的CTLに傷害されるか否かを検討することにより、FLによるOVAのMHC class I分子を介する抗原提示能を評価することが可能である(図

3)。その結果、OVA-FL 10 µg OVA/mlを作用させたEL4は、ポジティブコントロールであるEG7と同程度、CTLに傷害されたが、OVA-lipoについてはその10倍の濃度である100 µg OVA/mlを作用させても、無処理のEL4とまったく同程度の傷害しか認められなかった(図6)。またこの傷害は、empty-FLを作用させた際にはまったく認められなかったことから、抗原特異的な反応であり、FLを修飾しているセンダイウイルス由来の蛋白質による影響ではないことも確認された(図6)。したがって、FLはOVAを効率よく細胞質内に送達した結果、OVAをMHC class I抗原提示経路に送達したものと考えられた。一般に、外来性抗原はMHC class Iではなく、MHC class IIを介して抗原提示されることが知られているが、本実験ではFLを用いることにより、外来性抗原を効率よく細胞質内に導入できる結果、MHC class I抗原提示経路に送達できることを明らかとした(図4, 6)。さらに筆者らは、OVA-FLを免疫したマウスでは、OVA-CFAを免疫したもののよりもさらに強いOVA特異的CTL活性が認められることをすでに確認している(中西ら、投稿準備中)。

これまでにも、外来性抗原のMHC class Iを介する抗原提示を試みた研究がいくつか報告されている¹⁴⁻¹⁸⁾。しかしながら、そのどれもがエンドサイトーシス経路のため、これらのアプローチはペプチドワクチンには応用が困難であるという致命的な欠点を有している。細胞質内に導入された抗原は、非ライソゾーム系の酵素であるプロテアソームによってプロセッシングを受けるが、これまでの研究によると、プロテアソームは抗原蛋白質から正確にMHC class I分子と結合しうる抗原ペプチドを切り出すことが判明している¹⁹⁾。これに対し、ライソゾーム系の酵素によるプロセッシングは、MHC class I分子と結合しうる抗原ペプチドを正確に切り出すようなものではなく、ランダムな分解が行われるため、導入抗原のほとんどがunknownな分解を受けてしまう。そのため、エンドサイトーシス経路を経るようなアプローチを用いた場合、せっかくMHC class I分子に結

図 5 EG7, EL4 における MHC class I, II 分子の発現

EG7 (A, B), EL4 (C, D) に対して, anti-MHC class I 抗体 (A, C) と anti-MHC class II 抗体 (B, D) を用いて染色し, FACS 解析した。

図 6 FL による MHC class I 抗原提示経路への抗原分子送達

各 sample を EL4 に加え, 4°C, 30 分間 incubate した。さらに 37°C, 30 分間 incubate したのち, EL4 を wash し, 2 時間培養した。本細胞を target 細胞として, OVA 特異的 CTL を用いて ^{51}Cr -release assay を行った。

1: 無処理 EL4, 2: OVA 遺伝子導入 EL4 (EG7), 3: OVA-lipo (10 µg OVA/ml), 4: OVA-lipo (100 µg OVA/ml), 5: OVA-FL (10 µg OVA/ml, 1,500 HAU/ml), 6: empty-FL (1,500 HAU/ml)

合しうようなモチーフを持つペプチドワクチンを設計したとしても, その大部分が MHC class I 分子と結合する以前に分解されてしまうため, 結局大量のペプチドを用いなければならなくなってしまう可能性が強い。また Rammensee らは,

CTL を活性化するために必要とされる細胞質内 peptide の分子数は, わずか 200~500 分子であることを報告している²⁰⁾。したがって, ペプチドワクチンを考えた場合には, intact なまま細胞質内に直接導入できるアプローチが有効であると考えられ, この点において FL は, これまでに報告されてきたどのアプローチよりもはるかにすぐれているといえる。

現在筆者らは, FL をペプチドワクチンにも応用可能であるかを検討するために, FL による詳細な MHC class I 抗原提示経路を検索中であり, また封入抗原をペプチドにした際にも有効であるかなどを鋭意検討中である。

結 語

近年の分子生物学の発展に伴い, さまざまな病原体の抗原エピトープが同定されてきており, また癌についても一部ではあるが, その抗原エピトープが徐々に同定されつつある。したがって, 安全性にすぐれたペプチドワクチンは, 21 世紀に向けて早期実現が切望されるものと考えられる。このような背景にもかかわらず, ペプチドワクチンに対するアジュバント開発は, はるかに立ち後れているのが現状である。すなわち, FL に限らず, 細胞性免疫を効果的に誘導できるアジュバン

トの開発・研究は、学際的にも社会的にも非常に緊急性が高く、意義深いものと考えられる。一方で、エンドサイトーシス経路ではなく、直接細胞内に物質導入が可能というFLの特性を用いることにより、細胞質内に存在する抗原がどのようにプロセッシングされるかなどの細胞内動態の解明や、また細胞質内や小胞体内でのペプチドのトリミングを考慮した、最適な抗原ペプチドの構築などの検討も可能となる。したがってFLは、単なるワクチン開発にとどまらず、ミクロレベルにおける生命現象をも追求可能とするものであり、生命科学の発展に大いに貢献するものであると確信している。FLのアジュバントとしての開発および作用機構の解明を通じて、近い将来、FLをアジュバントとして用いたサブユニット/ペプチドワクチン療法が多くの疾患を克服しうること期待したい。

本研究の一部は、文部省科学研究費やヒューマンサイエンス振興財団、医薬品副作用被害救済、研究振興調査機構などの助成金により行われました。また、EL4 thymomaをご供与頂きました東北大学加齢医学研究所・癌細胞保存施設に深謝します。

文 献

- 1) Brodsky FM, Guagliardi LE: The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 9: 707-744, 1991.
- 2) Braciale TJ, Braciale VL: Antigen presentation: structural themes and functional variations. *Immunol. Today* 12: 124-129, 1991.
- 3) Amigorena S, Drake JR, Webster P, Mellman I: Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 369: 113-120, 1994.
- 4) Tulp A, Verwoerd D, Dobberstein B, Ploegh HL, Pieters J: Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* 369: 120-126, 1994.
- 5) West MA, Lucocq JM, Watts C: Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. *Nature* 369: 147-151, 1994.
- 6) Mizuguchi H, Nakanishi T, Nakanishi M, Nakagawa T, Nakagawa S, Mayumi T: Intratumor administration of fusogenic liposomes containing fragment A of diphtheria toxin suppressed tumor growth. *Cancer Lett.* 100: 63-69, 1996.
- 7) Mizuguchi H, Nakanishi M, Nakanishi T, Nakagawa T, Nakagawa S, Mayumi T: Application of fusogenic liposomes containing fragment A of diphtheria toxin to cancer therapy. *Br. J. Cancer* 73: 472-476, 1996.
- 8) Mizuguchi H, Nakagawa T, Nakanishi M, Imazu S, Nakagawa S, Mayumi T: Efficient gene transfer into mammalian cells using fusogenic liposome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 402-407, 1996.
- 9) Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ: Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54: 777-785, 1988.
- 10) Pick U: Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Arch. Biochem. Biophys.* 212: 186-194, 1981.
- 11) Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T, Okada Y: One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* 15: 245-250, 1978.
- 12) Uchida T: Diphtheria toxin; biological activity. Molecular action of toxins and viruses. (eds. Cohen P, Heyningen SV), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982, p 1-31.
- 13) Ke Y, Li Y, Kapp JA: Ovalbumin injected with complete Freund's adjuvant stimulates cytolytic responses. *Eur. J. Immunol.* 25: 549-553, 1995.
- 14) Lee KD, Oh YK, Portnoy DA, Swanson JA: Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.* 271: 7249-7252, 1996.
- 15) Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ, Harding CV: Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361: 359-362, 1993.
- 16) Kovacsics-Bankowski M, Clark K, Benacerraf B, Rock KL: Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4942-4946, 1993.
- 17) Nair S, Zhou F, Reddy R, Huang L, Rouse BT: Soluble proteins delivered to dendritic cells via pH-sensitive liposomes induce primary cytotoxic T lymphocyte responses *in vitro*. *J. Exp. Med.* 175: 609-612, 1992.
- 18) Donnelly JJ, Ulmer JB, Hawe LA, Friedman A, Shi XP et al.: Targeted delivery of peptide epitopes to class I major histocompatibility molecules by a modified *Pseudomonas* exotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3530-3534, 1993.
- 19) York IA, Rock KL: Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 369-396, 1996.
- 20) Falk K, Rotzschke O, Deres K, Metzger J, Jung G, Rammensee HG: Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J. Exp. Med.* 174: 425-434, 1991.