

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06405

研究課題名(和文) 免疫老化を考慮した次世代型インフルエンザワクチン開発の基盤構築

研究課題名(英文) Establishment of a basic analytical platform for the development of a next-generation influenza vaccine considering immunosenescence

研究代表者

高濱 正吉 (Takahama, Shokichi)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難病・免疫ゲノム研究センター プレジジョン
免疫プロジェクト・プロジェクト研究員

研究者番号：60510287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者にも有効なワクチンの開発は、急速に高齢化の進む本邦における急務の課題である。本研究では、インフルエンザウイルスに対する抗体の定常領域 Fc を介した Fc 受容体 (FcRs) 依存的免疫応答を介する感染防御に着目し、カニクイザル血中細胞を用いて FcRs 依存的免疫応答を網羅的に評価する新規解析系を樹立した。樹立した解析系を用い、精製 IgG とワクチン接種後の血清とでは FcR 依存性免疫応答のエフェクター細胞が異なることを、更に若齢及び高齢ザル血液での検証によりアジュバント応答能が高齢ザルで減弱していることを見出した。免疫老化を考慮した次世代型インフルエンザワクチン開発基盤構築の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液の細胞は様々なパターンで FcR 発現細胞が混在するが、従来の FcR 依存的免疫応答の解析法では、それを区別し同時に評価することは困難であった。今回樹立した系は、抗体依存的に標的細胞と結合したカニクイザル血中細胞各サブセットを同時に評価することが可能である。即ち、ワクチン開発に汎用される非ヒト霊長類における FcR 依存的免疫応答の解析基盤が構築できた点のみならずこの系がヒトや他の動物にも応用可能な汎用性の高い新しい系である点に学術的意義がある。また、特に大動物における免疫老化の解析基盤は依然として不十分であり、本研究成果は、免疫老化を考慮した様々なワクチン開発基盤として社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：The development of vaccines that are effective for the elderly is an urgent issue in Japan, where the population is rapidly aging. In this study, we focused on the protection against influenza virus via Fc, a constant region of antibodies, and its receptor (FcRs)-dependent immune response. Here, we established a novel assay system for comprehensively evaluating FcRs-dependent immune responses using blood cells from cynomolgus monkey. Using this system, we found that effector cells of FcR-dependent immune response differed between purified IgG and vaccinated serum, and that adjuvant response ability was attenuated in elderly monkey blood by verification in young and elderly monkey blood. Taken together, we constructed a basic analytical platform for the development of a next-generation influenza vaccine considering immunosenescence.

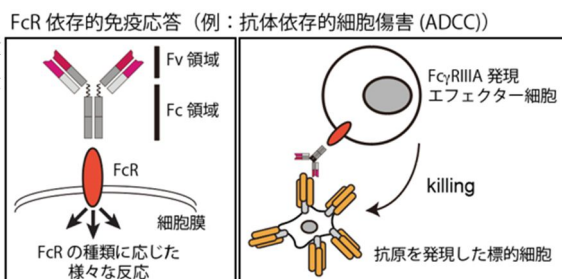
研究分野：分子細胞生物学・免疫学

キーワード：Fc受容体依存的免疫応答 非ヒト霊長類 カニクイザル ハイパラメーターフローサイトメトリー インフルエンザウイルス ワクチン

1. 研究開始当初の背景

通常インフルエンザワクチンにより誘導される抗体の活性には、「中和活性」及び「FcR 依存的免疫応答誘導活性」の二つが存在する(右図)。

そのうちインフルエンザウイルスに対する抗体を介した FcR 依存的免疫応答は、感染細胞の排除に重要であることが実験的に示されているにもかかわらず(Bournazos et al, *Cell*, 2014)、ワクチンにより誘導される抗体の FcR 依存的免疫応答の重要性に対する評価は未検証な場合が多い。その理由の一つは、中和が、本質的には分子あるいは分子複合体に直接作用するのに対し、抗体



依存的細胞障害 (ADCC) 活性を始めとする FcR 依存的免疫応答は、細胞を介し間接に作用することから、実験系の構築が容易ではないことであると推察される。実際に、中和活性の評価系は確立されて一般化されているものがほとんどであるが、FcR 依存的免疫応答については、研究者毎に様々なアッセイ系が考案されており、安定的かつ標準的な方法が存在しない。

一般的に FcR 依存的免疫応答のうち、特に研究の進んでいる ADCC 活性評価系に関しても、ヒト NK 細胞株を用いてヒト及びサル FcγRIIIA を強制発現した NK 細胞株を樹立し、luciferase 活性を指標に標的細胞数を評価する系は存在する (Alpert et al, *J Virol*, 2012) もの、改変 NK 細胞株の維持が難しく安定性に欠けることから、汎用されるには至っていない。

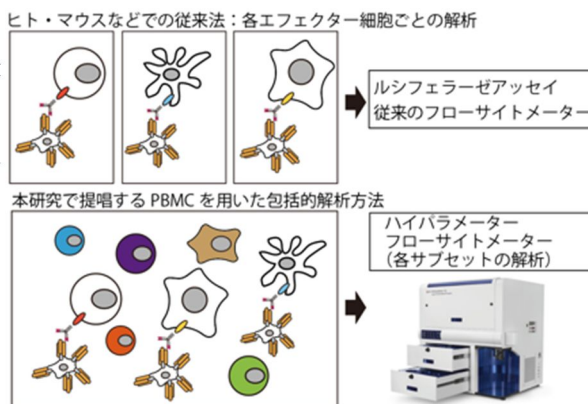
上記に加え、各免疫細胞における各 FcR は発現様式やその発現量、各 IgG サブタイプへの親和性が異なることから、体内環境で起こる反応は、非常に複雑であり、細胞株を用いた解析系ではその評価に限界がある。しかしながら、このような複雑な要因が絡む体内環境を踏まえて FcR 発現細胞を包括的に解析し、総合的な FcR 依存的免疫応答のアウトプットを評価する実験系は未だ存在しない。

我々はこれまでに、広範囲な A 型インフルエンザウイルス株に対するワクチンによる感染防御には、誘導される抗体のウイルス中和活性の有無のみならず、FcRs 依存的免疫応答による感染防御が重要であることをマウスモデルで報告している (Yamamoto et al, *Int Immunol.*, 2019)

以上の背景をもとに本研究では、高齢者においてインフルエンザワクチンの効果が減弱している理由として、ワクチンにより誘導される抗体の「広範囲 FcR 依存的免疫応答」に関する年齢毎の質的な違いが存在し、それゆえワクチン効果に差異が生じている可能性があるとの仮説を考えた。本研究においては、カニクイザルを用いた新規 FcR 依存的免疫応答解析系を開発することで、上記仮説の真偽を検証し、免疫老化を考慮した次世代型インフルエンザワクチン開発の基盤構築を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルスに対する抗体の定常領域 Fc を介した Fc 受容体(FcR)依存的免疫応答を介する感染防御効果に着目し、まず、次世代フローサイトメーターを活用し、カニクイザルにおける FcR 依存的免疫応答の新たな解析系を樹立する。具体的には、カニクイザル由来末梢血単核球(PBMC)をエフェクター細胞として使い、ヘマグルチニン (HA) 抗原蛋白質を安定発現する肺上皮細胞株 A549 と抗体と共培養を行い、ハイパラメーターフローサイトメーターを用いて複数の免疫細胞サブセットのエフェクター細胞活性の同時的評価を行うという、全く新しい解析系である。これにより、従来法と異なり包括的な FcR 依存的免疫応答の評価が可能になると考えられる(右図)



その上で、インフルエンザワクチンを投与したカニクイザル由来血清を用いて FcR 依存的免疫応答変化について検証を行い、免疫老化を考慮した次世代型インフルエンザワクチン開発の基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

FcR 依存的免疫応答の標的モデル細胞株として、各インフルエンザ亜株由来の HA 抗原を細胞表面に発現する標的細胞株を樹立する。また、カニクイザル PBMC での評価のために、従来ヒト

型である広範囲中和 HA 抗体クローンをカニクイザル型に変換を行う。同時に、FcR 結合能が増強することが知られている Fc 領域の変異体 IgG も作成する。その後、HA 抗体によりラベルされた標的細胞とカニクイザル PBMC を共培養し、HA 抗体及び FcR 依存的な標的細胞と PBMC 中の細胞サブセットの評価をマルチカラーサイトメーター及びイメージングサイトメーターにより行う。さらにワクチンにより得られた血清を用いた評価も行う。また、免疫老化の評価のために、ハイパラメーターフローサイトメーターによりカニクイザル PBMC 中の多様な免疫細胞サブセットを網羅的に同定する系を樹立し、得られたデータセットを用いた若齢群及び高齢群の比較により、サブセット毎の免疫老化状態の評価を行う。

4. 研究成果

初年度: 抗 HA 抗体の FcRs 依存的応答を簡便に解析するためのスクリーニング系の準備として、HA 発現標的細胞株ライブラリの樹立を行った。まず、ルシフェラーゼを安定発現するヒト肺上皮細胞株 A549 細胞 (A549.luc) を元に、NK 細胞に耐性を持つ A549NKR.luc を作製した。その後、各インフルエンザ亜型由来 HA を遺伝子導入し、HA 発現量の高い細胞集団をソーティングし、薬剤選択による安定株化を行った。また、FcRs 依存的免疫応答の評価系を確立するために、広範囲 HA 中和モノクローナル抗体である FI6 の抗 HA ヒト型 IgG1(hIgG1)抗体のコンストラクトから、カニクイザル型 IgG1(cyIgG1)への変換を行い、カニクイザル型 IgG1 がヒト型と同様に標的細胞表面の HA を認識することを確認した(図 1)。さらに、このカニクイザル IgG1 を鑄型として、ヒト及びマウスで Fc 受容体結合能が増強することが知られている GASDALIE 変異体 (Bournazos et al, *Cell*, 2014)、及び、Fc 受容体結合能を欠失することが知られている GRLR、LALA 変異体についてもカニクイザル型を作製し、FI6 と同様に HA を認識できることを確認した。

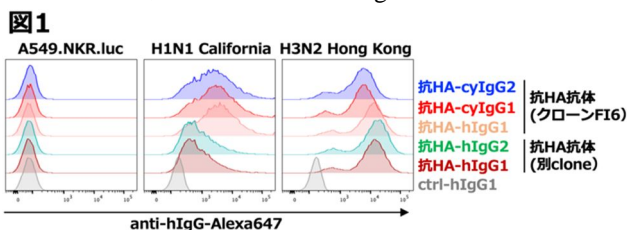


図1 抗HAカニクイザル型IgG1/IgG2を用いたHA発現標的細胞株細胞表面のHA検出。(cyIgG1/2は、カニクイザル型Fc領域を持つIgGを、hIgG1/2はヒト型を示す)。

2年度目: 初年度に作成した HA 発現標的細胞株 A549NKR.luc 株と広範囲 HA 中和モノクローナル抗体である FI6 のカニクイザル型 IgG1 及び IgG2 を用いて、マルチカラーフローサイトメーター及び、イメージングサイトメーターにより、抗 HA 抗体依存的なカニクイザル PBMC と標的細胞との結合を評価した。CFSE ラベルしたカニクイザル PBMC と標的細胞とを精製リコンビナント IgG 存在下で反応させたところ、CFSE 陽性 doublet の割合は、control-IgG1 に比べ FI6-IgG1 存在下で有意に増加していたことから、FI6-IgG1 依存的なカニクイザル PBMC と標的細胞との結合が起こることが示唆された(図 2,3)。この結合は、FI6-IgG2 では有意に減少していた。さらに、イメージングサイトメーターを用いた解析により、この doublet は実際に標的細胞とカニクイザル PBMC とが結合した結果生じていることが明らかとなった(図 3)。

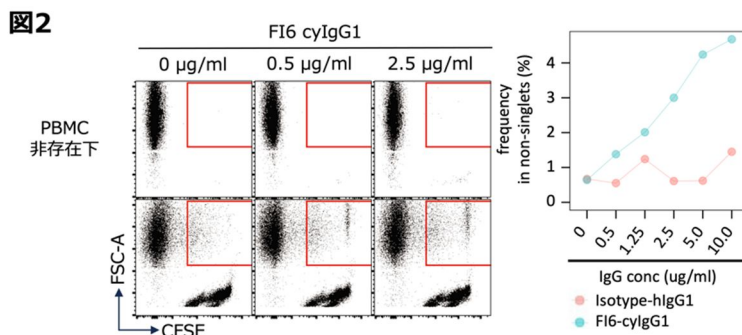


図2 HA発現標的細胞とPBMC中のエフェクター細胞の結合。抗HA抗体(FI6)でラベルした標的細胞と蛍光色素CFSEによりラベルしたPBMCの共培養後に、Singlet以外の集団をサイズとCFSE蛍光強度で展開した図(左)とその定量結果(右)。抗HA特異的抗体濃度依存的に、両者の結合(赤四角内)が増えている。

次に、蛍光標識した各 Fc 受容体に対する抗体及びサブセットマーカーを加えたマルチカラーフローサイトメーターでの解析(図 4)により、FI6-IgG 依存的に標的細胞と結合していたカニクイザル PBMC 側のサブセットは、主に NK 細胞(約 36%)と各単球サブセット(classical/intermediate/non-classical monocytes: 合計約 50%)から構成されることが明らかとなった(図 5)。興味深いことに、精製 IgG ではなく実際にインフルエンザワクチンを免疫したカニクイザル由来の血清を用いてカニクイザル PBMC 中の Fc 受容体依存性の標的細胞への結合について評価を行ったところ、精製 IgG での結果とは異なり、単球が約 80%を占め、NK 細胞の占める割合は約 13%と低かった(図 5)。以上より、実際のワクチンにより得られる抗血清においては、IgG 依存的な標的細胞への結合は、主に単球を介したものであることが示唆された。

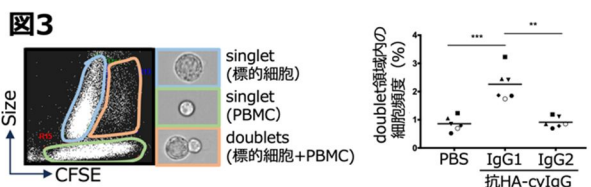
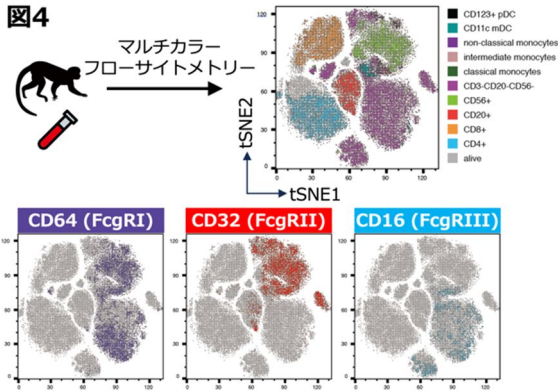
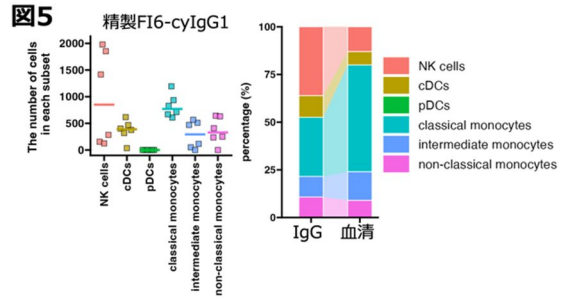


図3 イメージングサイトメーターでの標的細胞とPBMCの結合評価。フローサイトメーターと同様にCFSEとサイズで展開した際各領域の構成細胞の代表例(左)と頻度(右)

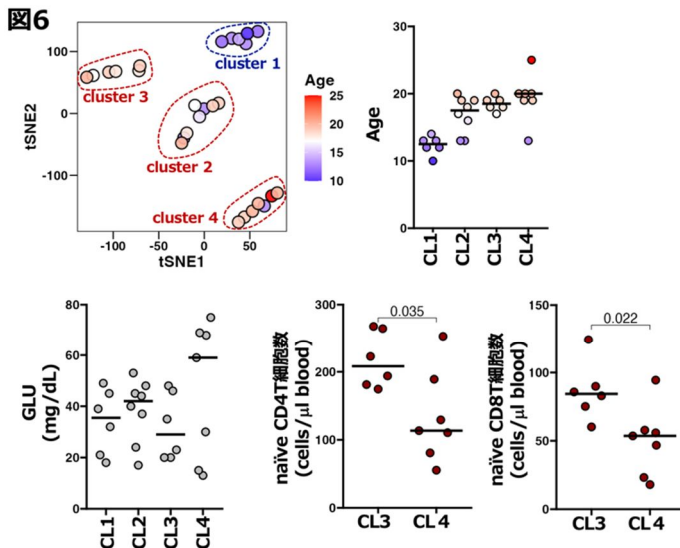


PBMC中のFc受容体発現細胞の網羅的解析を可能とするマルチカラーフローサイトメトリーパネルを用いた解析。細胞サブセットの分布（上）と各Fc受容体の発現分布（下）。

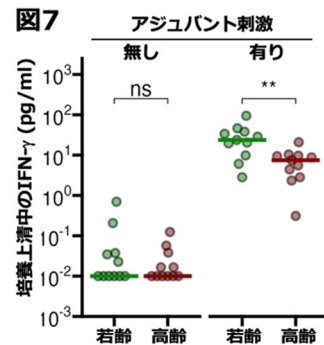


標的細胞と結合したPBMCサブセットの内訳。精製F16-cyIgG1で検出された各細胞サブセットの絶対数（左）と精製F16-cyIgG1あるいはワクチン血清をそれぞれ用いた場合の相対数（右）。

最終年度：コロナ禍でのワクチン開発への高齢個体の供給問題を鑑み、新規ワクチン投与と検体の解析に必要な、年齢ごとの免疫状態を把握できる解析基盤を構築した。具体的には、ハイパラメーターフローサイトメーターにより、カニクイザル PBMC 中の末梢血造血幹細胞を含む多様な免疫細胞サブセットを一つのパネルで網羅的に同定する系を構築した。若齢・高齢サル由来 PBMC での検証により、高齢サルにおいては、PBMC 中の CD34 陽性細胞、naïve T 細胞などの割合が有意に低下していること、各免疫細胞サブセット絶対数の加齢に伴う変化は線形ではなく非線形であり、細胞亜集団毎に加齢の影響を受けるタイミングが異なることが示唆された。加えて、生化学検査値等を統合したデータセットを用いた機械学習により、年齢だけでは見いだせない個体ごとの免疫老化を把握できる基盤を樹立した(図6)。さらに、*in vitro* でのアジュバント刺激実験により、高齢サル由来 PBMC ではアジュバント応答が減弱する点を見出し(図7)、その一部については論文化している (Takahama et al. *Molecular Therapy Methods and Clinical Development.*, 2023)。また、前年度までに樹立した FcRs 評価系についても、新たに Fc 結合部位変異等のデータを追加し、論文化した (Masuta, Takahama et al., *iScience*, 2022)。以上により、加齢に伴う免疫状態を踏まえたワクチンの安全性・有効性評価が可能となり、免疫老化を考慮した次世代型インフルエンザワクチン開発の基盤が構築できたと考える。



網羅的免疫細胞プロファイルによる免疫老化の解析。マルチカラーフローサイトメトリーで得られたデータによるtSNE解析図（左上）若齢はcluster1に高齢は3つのクラスターに分類される（左上）。クラスター(CL)2-4間で年齢の差はない（右上）が、CL4では有意にGLU濃度が高く（左下）、免疫老化マーカーのnaïve CD4/CD8T細胞数はCL4で低下している（右下）。



若齢及び高齢カニクイザルPBMCをアジュバント (c-di-AMP)で刺激し、24時間培養後の培養上清中のIFN- γ をELISAにて測定した結果。アスタリスクは、Mann-Whitney テストの結果 (**: $P < 0.01$)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Takahama Shokichi, Nogimori Takuto, Higashiguchi Masaya, Murakami Hiroto, Akita Hirofumi, Yamamoto Takuya | 4. 巻 571 |
| 2. 論文標題 Simultaneous monitoring assay for T-cell receptor stimulation-dependent activation of CD4 and CD8 T cells using inducible markers on the cell surface | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 53 ~ 59 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.037 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Masuta Yuji, Takahama Shokichi, Nogimori Takuto, Moriyama Saya, Takahashi Yoshimasa, Yamamoto Takuya | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 Assessment of Fc receptor-dependent binding of influenza hemagglutinin vaccine-induced antibodies in a non-human primate model | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 105085 ~ 105085 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105085 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Takahama Shokichi, Ishige Kazuya, Nogimori Takuto, Yasutomi Yasuhiro, Appay Victor, Yamamoto Takuya | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Model for predicting age-dependent safety and immunomodulatory effects of STING ligands in non-human primates | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development | 6. 最初と最後の頁 99 ~ 115 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2022.12.008 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuji Masuta, Shokichi Takahama, Takuto Nogimori, Saya Moriyama, Yoshimasa Takahashi, Takuya Yamamoto |
| 2. 発表標題 Analysis of Fc receptor-mediated target-effector cells binding via influenza vaccine-induced antibodies in a non-human primate model. |
| 3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 升田雄士、高濱正吉、野木森拓人、森山彩野、高橋宜聖、山本拓也。 |
| 2. 発表標題 霊長類モデルにおけるインフルエンザワクチンにより誘導される抗体Fc 受容体依存的免疫応答の評価 |
| 3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shokichi Takahama, Kazuya Ishige, Takuto Nogimori, Yasuhiro Yasutomi, Victor Appay, Takuya Yamamoto. |
| 2. 発表標題 Prediction of the safety and efficacy of STING ligands administration in the nonhuman primate model |
| 3. 学会等名 第29回日本免疫毒性学会学術年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高濱正吉 |
| 2. 発表標題 ヒト臨床試験における生体応答の予測に向けた非ヒト霊長類モデルの活用（免疫賦活化剤と肝移植の例）（口頭） |
| 3. 学会等名 第6回理論免疫学ワークショップ |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takuto Nogimori, Yuji Masuta, Shokichi Takahama, Yasuhiro Yasutomi, Victor Appay, Takuya Yamamoto |
| 2. 発表標題 Impact of immune aging on naive T cells in the non-human primate model |
| 3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 非ヒト霊長類モデルを用いたT細胞老化を基軸とする免疫老化現象の本質的解明 |
| 2. 発表標題 Takuto Nogimori, Yuji Masuta, Shokichi Takahama, Takuya Yamamoto. |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|--------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 清田 純、山本 拓也 (高濱 正吉) | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 羊土社 | 5. 総ページ数 320 |
| 3. 書名 新世代フローサイトメトリー活用スタンダード | |

| | |
|----------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 高濱正吉、山本拓也 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 科学評論社 | 5. 総ページ数 7 |
| 3. 書名 臨床免疫・アレルギー科 (免疫老化研究の展望) | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 山本 拓也 (Yamamoto Takuya) (60752368) | 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難病・免疫ゲノム研究センター プレシジョン免疫プロジェクト・プロジェクトリーダー (84420) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|