

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08850

研究課題名（和文）P2受容体を標的としたメモリーCTL誘導ワクチンシステムの開発

研究課題名（英文）Memory CTL-inducing vaccine system targeting P2 receptors

研究代表者

松尾 一彦（Matsuo, Kazuhiko）

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：70615921

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、CD70陽性樹状細胞が鼻腔内粘膜固有層に存在し、P2X1,2,4受容体を発現することを明らかにした。また、CD70陽性樹状細胞は α -ATPの刺激によりTh17細胞分化を促進した。さらに、モデル抗原OVAとともに α -ATPを経鼻投与したマウスにおいて、エフェクターフェーズだけでなく、メモリーフェーズにおいてCTLの誘導および抗腫瘍効果が認められ、P2受容体阻害剤であるsuraminの前投与により、上記の免疫応答は抑制された。これらの結果は、 α -ATPはTh17細胞誘導を介してエフェクターおよびメモリーCTLを誘導できる粘膜免疫アジュバントとして有用であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のCTL誘導アジュバントの研究は、DCの活性化およびTh1細胞の誘導促進を介してCTLを誘導するアプローチである。一方、本研究の α -ATPはTh1細胞ではなくTh17細胞を介してCTLを誘導する新たなメカニズムによりCTLを誘導できるアジュバントであると言える。

現在メモリーCTLを効率よく誘導できる実用的なアジュバントの報告は皆無である。本研究では、エフェクターだけでなくメモリーCTLを誘導できることを明らかにした。このことから、本アプローチを応用することで、長期的な免疫応答により生涯感染症の予防やがんの治療/予防を達成できるワクチンシステムの開発に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We showed that (i) CD70+ dendritic cells (DCs) were present in the nasal lamina propria and expressed P2X1R, P2X2R and P2X4R; (ii) CD70+DCs but not CD70-DCs enhanced Th17 cell differentiation of cocultured splenic CD4+ T cells upon stimulation with α -ATP; (iii) mice intranasally immunized with ovalbumin (OVA) and α -ATP had increased OVA-specific Th17 cells and CTLs in the nasal lamina propria and regional lymph nodes at both an effector phase and a memory phase; (iv) mice intranasally immunized with OVA and α -ATP also inhibited E.G7-OVA tumor growth; (v) suramin, a broad-range inhibitor of P2 receptors, suppressed the increases of OVA-specific Th17 cells and CTLs, and antitumor effect. Collectively, α -ATP may be a promising mucosal adjuvant that promotes antigen-specific effector and memory CTL responses via CD70+ DC-mediated Th17 induction.

研究分野：免疫学

キーワード：ワクチンアジュバント CTL Th17

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現行のワクチンは抗原特異的抗体を誘導できるが、ウイルス感染細胞やがん細胞の排除に重要な CTL を誘導できないため、CTL 誘導を達成しうるアジュバントの開発が必須となっている。Toll 様受容体 (TLR) リガンドは DC を強く活性化することで Th1 細胞を誘導し、CTL を誘導できることが多数報告されているが、重篤な副反応を誘発するため、実用化には至っていない。また、これまでのワクチンアジュバントは、エフェクター CTL を強く誘導できるものの、長期的な免疫応答に関わるメモリー CTL 誘導を実現できた報告はない。近年、P2 受容体が、粘膜組織特有の CD70 陽性 DC を介して Th17 細胞を誘導すること、また、メモリー CTL の生存維持に関わることが明らかとなった。一方で、Th17 細胞は直接 CD8 陽性 T 細胞から CTL を誘導することから、P2 受容体は Th17 細胞依存的 CTL 誘導にも寄与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、P2 受容体によるエフェクター/メモリー CTL の誘導・維持機構を解明し、P2 受容体リガンドである加水分解抵抗性 ATP ($\alpha\beta$ -ATP) のアジュバントとしての有用性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 細胞株と実験動物

モデル抗原である OVA の強制発現細胞株 (E.G7-OVA) は ATCC より購入した。E.G7-OVA は RPMI1640 (10% FBS、50 μ M 2-ME、400 μ g/ml G418) を用いてそれぞれ培養した。C57BL/6 は日本 SLC より購入し、近畿大学の実験動物規程に従って実験に供した。

(2) 細胞単離

鼻腔粘膜固有層は RPMI1640 (1 mg/ml Collagenase D) 溶液中で 37°C、30 分間振とうした後、70 μ m セルストレーナーに通すことによって単細胞を単離した。リンパ節からの細胞単離は 70 μ m セルストレーナー上で組織をすりつぶすことによって得た。CD70 陽性樹状細胞ならびに CD70 陰性樹状細胞は FACS Aria により分取した。CD4 陽性 T 細胞は BD IMag cell separation を用いて単離した。

(3) Real-time PCR

定量的 PCR は KAPA SYBR Fast qPCR Kit を用いて行った。プライマーは下記を使用した。+5
-ACGAAACAAGAAGGTGGGAGT-3 and -5 -AGCCACTTGAGGTCTGGTAT-3 for P2X1R
+5 -GAGAGCTCCATCATCACCAAA-3 and -5 -CAGGTCTGGGAAGGAGTAAC-3 for P2X2R
+5 -CCGAGAACTTCACCATTTTCA-3 and -5 -TTTATGTCCTTGTCGGTGAGG-3 for P2X3R
+5 -TGGCTACAATTTTCAGGTTTGC-3 and -5 -GATCATGGTTGGGATGATGTC-3 for P2X4R
+5 -CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT-3 and 5 -AAGTAGGAAGGCCGT GGTT-3 for IL-6
+5 -ACAGCATCGCATGGACCAA-3 and 5 -AAGCAACCCGATCAAGAATGTG-3 for integrin- 8
+5 -CGCCTATCTTCGGGATGAATC-3 and 5 -CCAACCGATACTCCATGAAAATG-3 for integrin- V
+5 -CAGCAGCGATCATCCCTCAAAG-3 and -5 -CAGGACCAGGATCTCTTGCTG for IL-17A
+5 -CTCAAGTGGCATAGATGT-3 and -5 -GAGATAATCTGGCTCTGCAGGATT-3 for IFN- γ

(4) In vitro 共培養

CD4 陽性 T 細胞 (5 \times 10³ cells per well) と CD70 陰性樹状細胞あるいは CD70 陽性樹状細胞 (5 \times 10² cells per well) は $\alpha\beta$ -ATP (10 μ M) の存在下で 4 日間共培養した。

(5) ワクチン接種プロトコル

OVA (grade VI) と $\alpha\beta$ -ATP は Sigma-Aldrich 社より購入した。C57BL/6 に対して、PBS、OVA 単独 (10 μ g)、あるいは OVA (10 μ g) + $\alpha\beta$ -ATP (100 μ g) を 1 週間隔で 3 回鼻腔内に投与した一部のマウスには P2 受容体の阻害剤である suramin (300 μ g) をワクチン接種の 1 時間前に鼻腔内に投与した。

(6) T 細胞応答の解析

免疫したマウスの鼻腔粘膜固有層ならびに頸部リンパ節から細胞を単離し、OVA (1 mg/ml) および OVA 由来 H-2Kb 拘束性ペプチド (1 μ g/ml) とともに培養した。24 時間後に、IL-17A 産生 CD4 陽性 T 細胞 (Th17 細胞)、IFN- γ 産生 CD4 陽性 T 細胞 (Th1 細胞)、IFN- γ 産生 CD8 陽性 T 細胞 (CTL) をフローサイトメトリーにより解析した。

(7) 担癌マウスモデル

免疫1週間あるいは8週間後に、マウスの腹部皮内に E.G7-OVA 細胞 (5×10^5 cells) を接種した。経日的に腫瘍組織の長径と短径を計測し、長径 (mm) \times 短径(mm) $^2 \times 0.5236$ の式に従って腫瘍体積を算出した。

4. 研究成果

(1) 鼻腔粘膜固有層における CD70 陽性樹状細胞の同定

これまで CD70 陽性樹状細胞は腸管粘膜固有層での存在が報告されているが、鼻腔内の粘膜固有層での存在は報告されていない。Fig. 1A に示すように、CD70 陽性 CD11c 低発現の樹状細胞は鼻腔内粘膜固有層においても検出された。また、この分画細胞は P2X1、P2X2、P2X4 受容体を発現することが示唆された (Fig. 1B)。これらの結果は、鼻腔内の粘膜固有層にも CD70 陽性樹状細胞が存在することを示している。

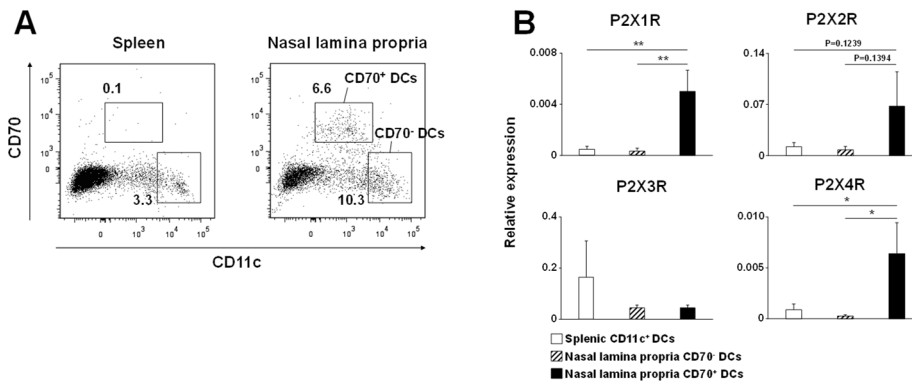


Fig. 1. Identification of CD70⁺CD11c^{low} DCs in nasal lamina propria. (A) Flow cytometry. Cells were isolated from the spleen and the nasal lamina propria of C57BL/6 mice. CD70⁺CD11c^{low} DCs in the CD45 gate were analyzed by flow cytometry. Representative results from at least three independent experiments are shown. (B) Real-time PCR. The expression of P2X1, 2, 3 and 4R in splenic CD11c⁺ DCs, nasal lamina propria CD70⁻ DCs and CD70⁺ DCs was examined by real-time PCR. The data are expressed as mean \pm SE of four independent experiments. *P < 0.05. **P < 0.01.

(2) 鼻腔内 CD70 陽性樹状細胞による Th17 細胞誘導

腸管粘膜固有層中の CD70 陽性樹状細胞は ATP により刺激によって Th17 偏向性因子である IL-6 や TGF- β 活性化に関わるインテグリンの発現が上昇することが報告されている。そこで鼻腔内から単離した CD70 陽性樹状細胞ならびに CD70 陰性樹状細胞に対して加水分解抵抗性 ATP を作用させ、それらの発現を real-time PCR にて解析した。その結果、CD70 陽性樹状細胞においてのみ、IL-6、integrin- α V、integrin- β 8 の発現上昇が認められた (Fig. 2A)。さらに、加水分解抵抗性 ATP により刺激した CD70 陽性樹状細胞と CD4 陽性 T 細胞を共培養し、IL-17A、IFN- γ 、IL-4 の mRNA レベルを解析した。その結果、加水分解抵抗性 ATP で刺激した CD70 陽性細胞と共培養した群では、IL-17A の発現が有意に上昇した (Fig. 2B)。このことから、鼻腔粘膜固有層中の CD70 陽性樹状細胞も Th17 細胞を選択的に誘導する特徴を有することが示唆された。

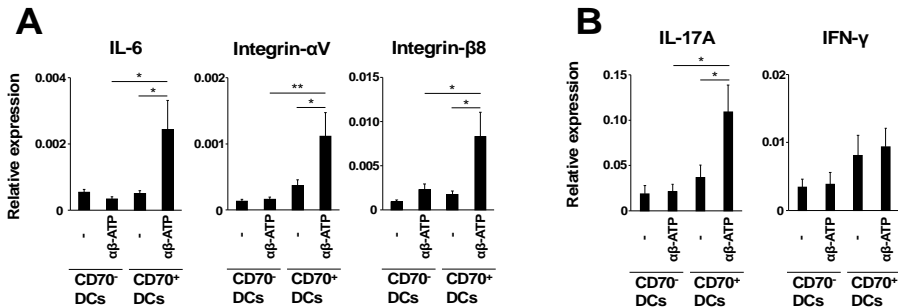


Fig. 2 Immune characteristics of CD70⁺CD11c^{low} DCs in nasal lamina propria. (A) Induction of IL-6, integrin- α V and integrin- β 8 in CD70⁺CD11c^{low} DCs by $\alpha\beta$ -ATP. CD70⁻CD11c⁺ DCs and CD70⁺CD11c^{low} DCs were isolated from the nasal lamina propria and treated with or without $\alpha\beta$ -ATP (10 μ M) for 3 h. The mRNA expression levels of IL-6, integrin- α V and integrin- β 8 were examined by real-time PCR. The data are expressed as mean \pm SE of four to eight independent experiments. (B) Induction of Th17 cells in vitro. Splenic CD4⁺ T cells were cocultured with nasal lamina propria CD70⁻CD11c⁺ DCs or CD70⁺CD11c^{low} DCs with or without $\alpha\beta$ -ATP for 4 days. The mRNA expression levels of IL-17A and

IFN- γ were examined by real-time PCR. The data are expressed as mean \pm SE of 5–10 independent experiments. *P < 0.05. **P < 0.01.

(3) 加水分解抵抗性 ATP による免疫誘導特性

次に、モデル抗原 OVA とともに加水分解抵抗性 ATP をアジュバントとして鼻腔内投与したマウスにおける免疫応答を解析した。Fig. 3 に示す通り、加水分解抵抗性 ATP は鼻腔粘膜固有層ならびに頸部リンパ節において OVA 特異的 Th17 細胞および CD8 陽性 CTL の割合を有意に増加させた。一方で、Th1 細胞の割合には変化は認められなかった。この結果から、加水分解抵抗性 ATP は *in vivo* においても Th17 細胞誘導を有意に増強することが示された。さらに、Th17 細胞誘導増強に伴い CD8 陽性 CTL の誘導も促進したものと考えられる。

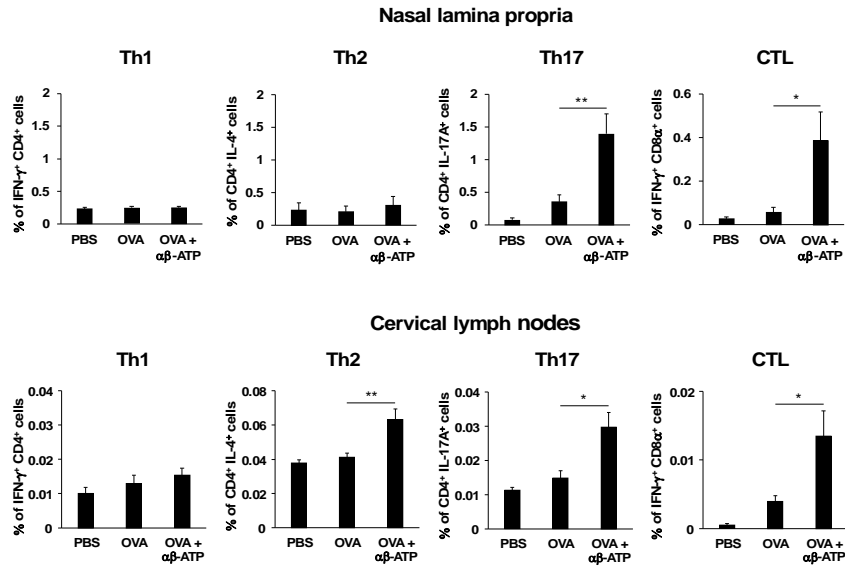


Fig. 3. Effect of $\alpha\beta$ -ATP on OVA-specific Th17 cells and CTLs. Induction of OVA-specific Th17 cells and CTLs *in vivo*. C57BL/6 mice were intranasally immunized with PBS, OVA alone or OVA + $\alpha\beta$ -ATP three times with 1-week intervals. One week after the last immunization, cells were isolated from the nasal lamina propria and cervical lymph nodes. Isolated cells were stimulated with OVA (1 mg ml $^{-1}$) or OVA peptide (1 μ g ml $^{-1}$) for 24 h *in vitro*. Th17 cells (CD4+IL-17 $^+$ cells) Th1 cells (CD4+IFN- γ + cells), and CTLs (CD8+IFN- γ + cells) were counted by flow cytometry. The data are expressed as mean \pm SE of results from six mice.

(4) 抗腫瘍効果

次に、OVA 発現腫瘍を用いて抗腫瘍効果について検討した。OVA とともに加水分解抵抗性 ATP を 1 週間隔で 3 回免疫し、1 週間後と 8 週間後に E.G7-OVA 腫瘍を皮内接種した。免疫 1 週間後のエフェクターフェーズおよび 8 週間後のメモリーフェーズのどちらにおいても加水分解抵抗性 ATP 併用マウスでは OVA 単独免疫マウスと比べて有意に腫瘍増殖を抑制した (Fig. 4)。この結果から、加水分解抵抗性 ATP はエフェクター CTL のみならずメモリー CTL をも誘導できるアジュバントであることが示唆された。

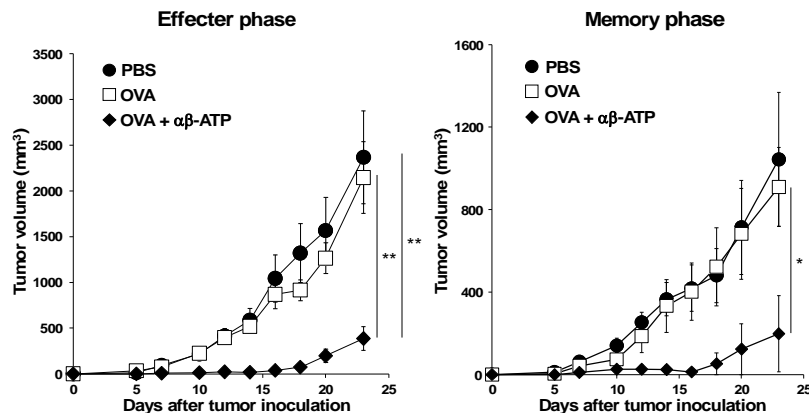


Fig. 4 Antitumor effect: mice were immunized as mentioned above. One week or 8 weeks after the immunization, mice were challenged with E.G7-OVA cells in the flank. The tumor volume was calculated by measuring the major and minor axes of the tumor at indicated time points. The data are expressed as mean \pm SE of results from six mice. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

(5) P2 受容体阻害剤

加水分解抵抗性 ATP によるアジュバント効果における P2 受容体の関与を確認するために、P2 受容体の阻害剤として知られる suramin を用いて検討した。免疫の 1 時間前に suramin を前投与し、抗原特異的免疫応答の誘導への影響を解析した結果、鼻腔粘膜固有層ならびに頸部リンパ節のどちらにおいても、加水分解抵抗性 ATP 併用マウスにおいて Th17 細胞ならびに CTL の割合が減少した (Fig. 5A)。さらに、suramin の前投与により加水分解抵抗性 ATP 併用マウスで認められた抗腫瘍効果も消失した (Fig. 5B)。これらの結果から、加水分解抵抗性 ATP によるアジュバント活性には P2 受容体を介したシグナルが関与すると考えられた。

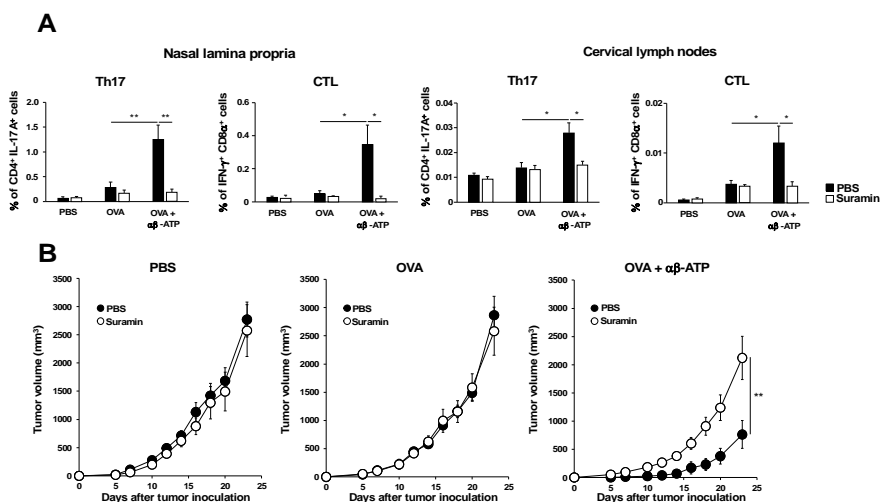


Fig. 5. Inhibition of $\alpha\beta$ -ATP-enhanced CTL responses by suramin, a P2 receptor inhibitor. (A) Induction of OVA-specific Th17 cells and CTLs in vivo. C57BL/6 mice were intranasally immunized with PBS, OVA alone or OVA + $\alpha\beta$ -ATP in the presence or absence of suramin three times with 1-week intervals. One week after the last immunization, cells were isolated from the nasal lamina propria and cervical lymph nodes. Isolated cells were stimulated with OVA (1 mg ml⁻¹) or OVA peptide (1 μ g ml⁻¹) for 24 h in vitro. Th17 cells (CD4⁺IL-17⁺ cells) and CTLs (CD8⁺IFN- γ ⁺ cells) were counted by flow cytometry. The data are expressed as mean \pm SE of results from six mice. (B) Antitumor effect: Mice were immunized as mentioned above. One week after the last immunization, mice were challenged with E.G7-OVA cells in the flank. The data are expressed as mean \pm SE of results from six mice. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

(6) 結論

CD70 陽性樹状細胞は加水分解性 ATP 刺激による Th17 細胞誘導を介して抗原特異的 CD8 陽性 CTL 応答を増強することが示唆された。CD70 陽性樹状細胞によるメモリーCTL 誘導機構などは今後明らかにする必要があるが、加水分解抵抗性 ATP はエフェクターのみならずメモリーCTL をも誘導可能な経鼻ワクチン用アジュバントとして有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuo Kazuhiko, Yoshie Osamu, Kitahata Kosuke, Kamei Momo, Hara Yuta, Nakayama Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Recent Progress in Dendritic Cell-Based Cancer Immunotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2495 ~ 2495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13102495	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 Shinya Yamamoto, Kazuhiko Matsuo, Sho Sakai, Itsuki Mishima, Yuta Hara, Naoki Oiso, Akira Kawada, Osamu Yoshie, Takashi Nakayama	4. 巻 33
2. 論文標題 P2X receptor agonist enhances tumor-specific CTL responses through CD70+ DC-mediated Th17 induction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 49-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa068	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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	中山 隆志 (Nakayama Takashi) (60319663)	近畿大学・薬学部・教授 (34419)	

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
---------	---------