

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16269

研究課題名（和文）経鼻ワクチンの効率的なIgA産生を誘導する新規樹状細胞サブセットの同定と機能解明

研究課題名（英文）Identification and functional elucidation of a novel dendritic cell subset that induces efficient IgA production by nasal vaccine

研究代表者

佐々木 永太（Sasaki, Eita）

国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター・主任研究官

研究者番号：40762216

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ワクチン接種時に誘導される抗原提示能の高いpDCサブセットの同定を試みた。インフルエンザワクチンやアジュバント接種時に肺に集簇するpDCはPDCA1+CD11c+CD11b+B220-F4/80-CD9+CD81+のマクロファージ様サブセットであることを見出した。このpDCサブセットはpDCマーカー遺伝子の他、TLR9やTLR7を発現し、高い抗原提示能を有することが見出された。さらに、pDC移植実験や感染防御試験の結果から、当該pDCサブセットが、肺における感染免疫やワクチン免疫に重要な役割を担っていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、粘膜免疫応答に重要な新しいpDCサブセットを見出すことができ、学術的な新しい発見を含む成果であり、免疫学やワクチン学の成果として重要な知見である。また、このサブセットを誘導できるアジュバントが存在することから、有効性の高い粘膜ワクチン設計において、本研究で見出したpDCサブセットを活性化させる戦略も有用であると思われ、引き続き効率的なpDCサブセットの分化方法について検証する必要がある。これらの成果は、有効な粘膜ワクチン開発において重要な知見となりうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to identify novel pDC subsets with high antigen-presenting ability induced by vaccination and found that pDCs that accumulate in the lungs during influenza vaccine or adjuvant inoculation are a macrophage-like subset (PDCA1+CD11c+CD11b+B220-F4/80-CD9+CD81+). This pDC subset was found to express pDC marker genes and TLRs, and to have high antigen-presenting ability. Furthermore, the results of pDC transfer experiments and infection protection tests showed that this pDC subset plays an important role in infection immunity and vaccine immunity in the lungs.

研究分野：免疫学、ワクチン学

キーワード：粘膜免疫 インフルエンザワクチン 樹状細胞 IgA アジュバント 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

呼吸器感染ウイルスの場合、経鼻ワクチン接種による IgA 抗体産生の誘導が感染防御に極めて重要であり、そのメカニズム解明は重要な課題である。形質細胞様樹状細胞 (pDC) はウイルス感染時に 1 型インターフェロン (IFN) を産生する特徴的な細胞であるが、pDC は IgA 抗体産生にも関与することが強く示唆されており、従来の 1 型 IFN による機序では説明ができない未知の pDC 機能について、解明が待たれている。そこで、本研究では肺に集簇した pDC から効率良く、IgA が産生誘導される機序を解明するために、IgA 産生に重要な未知の pDC サブセットの同定と、その IgA 産生誘導メカニズムの解明を行う。

2. 研究の目的

近年、インフルエンザウイルスに対するワクチンとして「経鼻ワクチン」の開発研究が急速に進展されている。より迅速に、多くの IgA を産生誘導させることは、経鼻ワクチンの効果発揮に極めて重要であり、臨床応用への「要」となる部分であることから、IgA 産生能を向上させる策が求められている。本研究計画の目的は、IgA 産生に関わる重要な pDC サブセットを同定し、その機能を IgA 産生に重要なサイトカイン産生、抗原提示能力および B 細胞活性化の視点からの解明することである。pDC の IgA 産生に対する機能と、IgA 産生に対する重要性については明らかにされておらず、1 型 IFN 以外の視点からメカニズム解明を目指すことは本研究独自の視点である。申請者はすでに、肺での pDC 集簇が IgA 産生に重要であることや 1 型 IFN 産生の依存性が低いことを見出しつつあり、新たな免疫機構の解明が期待されている。

3. 研究の方法

集簇した肺のマクロファージ様 pDC のサブセットの中から、ワクチン未刺激・未感染時と比較して特に顕著な増加が認められ、かつ抗原提示関連因子の発現強度の高い細胞集団をフローサイトメーターで解析・同定する。次にこれらの細胞について pDC サブセットマーカーとして報告のある表面抗原を含めて、主要な表面マーカー発現の網羅的な解析を行う。見出したサブセットについて、網羅的に細胞表面抗原と、自然免疫関連の遺伝子群の発現レベルを明らかにするため、同定したサブセットと既知の pDC サブセットを、フローサイトメーターで単離し、マイクロアレイ解析を行う。

同定したサブセットが pDC に分類されるのか明らかにするため、同定したサブセットについて、pDC 特異的に発現する e2-2 遺伝子と IFN レギュレーターの Irf7 等の発現解析、細胞内 TLR3, 7, 8, および 9 の発現解析および細胞形態解析を行う。pDC がアジュバント刺激によって、どのような機序で同定したサブセットに分化するのかを *in vitro* で明らかにするため、骨髄細胞由来樹状細胞 (FL-DC) を作成・単離精製し、pDC を得る。抗原・アジュバント刺激での pDC 分化誘導パターンを解析し、分泌サイトカインやサブセット前駆細胞と思われる細胞集団を細胞表面マーカーの発現を元に解明する。

In vivo における 1 型 IFN の pDC サブセット分化への重要性を明らかにするため、Ifnar1^{-/-}マウスを用いて、各種 pDC 活性化アジュバント投与による肺への pDC 集簇と、目的サブセットの分化誘導を解析する。また、Ifnar1^{-/-}マウスにアジュバント含有インフルエンザワクチンを経鼻接種し、IgA 抗体産生における 1 型 IFN の重要性を明らかにする。

同定した pDC サブセットの B 細胞活性化、形質細胞分化促進作用を明らかにするため、同定したマウス pDC サブセットと B 細胞をセルソーターによって分取し、*in vitro* で、IL-2, IL-10 および CD40L 存在下で 12 日間共培養し、培地中 IgG および IgM 濃度を測定する。

同定した pDC サブセットが抗原特異的抗体産生を強く誘導させるのかを明らかにするため、同定した pDC サブセットおよび、それ以外の pDC サブセットをセルソーターによって分取し、*in vitro* においてインフルエンザ抗原にパルスさせた後、無感作のマウスに移植し、2 週間後に血清中の抗原特異的抗体量の測定を行う。pDC サブセットのワクチン効果と感染防御における機能を直接的に明らかにするため、*in vitro* でインフルエンザ HA 抗原をパルスさせた各種 pDC サブセットを、無感作のマウスにそれぞれ移植し、その後、ワクチンと同株のインフルエンザウイルスに感染させ、感染防御に対する効果を、致死率、ウイルス価で評価する。

4. 研究成果

本研究では、ワクチン接種時に誘導される抗原提示能の高い pDC サブセットを同定するため、イ

インフルエンザワクチンやアジュバント接種時に、肺に集簇するマクロファージ様 pDC (PDCA1+CD11c+CD11b+B220-F4/80-) のサブセットの中から、ワクチン未刺激・未感染時と比較して特に顕著な増加が認められ、かつ抗原提示関連因子 (CD86, CD80, CD40, I-A/I-E, H-2k 等) の発現強度の高い細胞集団をフローサイトメーターで解析・同定することを目的とした。その結果、CD9+CD81+の細胞集団において特に、抗原提示関連因子が高いことが判明した。さらに TLR の発現を解析したところ、TLR7 および TLR9 を発現することを見出した。さらに、同定したサブセットについて、pDC 特異的に発現する e2-2 遺伝子の発現が認められることを見出した。また、ギムザ染色から、細胞の形態は pDC に近いが、突起状の形状を持つことが明らかになった。以上の結果から、肺に集簇する PDCA1+CD11c+CD11b+B220-F4/80-CD9+CD81+のマクロファージ様 pDC のサブセットが、TLR を発現し、高い抗原提示能を有することを見出され、当該 pDC サブセットが、肺における感染免疫やワクチン免疫に重要な役割を担っていることを見出した。

pDC サブセットの分化機構を明らかにするため、マウス骨髄由来樹状細胞 (FL-DC) を作成し、同定したマクロファージ様 pDC サブセットの分化機構を解析した。その結果、CpG ODN や 1 型 IFN 誘導型アジュバントによる CD11c+B220+細胞からマクロファージ様 pDC サブセットし、CD11c+PDCA1+細胞からはほとんど分化しないことを見出した。さらに、分化が完了することで、PDCA1 の発現が上昇することを見出した。pDC マーカーとして使用されている Siglec-H の発現変動は、ほとんど認められなかった。さらに、1 型 IFN 受容体ノックアウトマウスの FL-DC でも、マクロファージ様 pDC サブセットへの分化誘導が認められた。このことから、1 型 IFN はマクロファージ様 pDC サブセットへの分化に寄与しないことを見出した。

同定したマクロファージ様 pDC サブセットのアジュバント刺激による産生サイトカインを解析したところ、IFN の産生が認められたが、それは定常状態の pDC よりも低値を示した。また、IL-6 等の炎症性サイトカインはほとんど分泌しないことを明らかにした。さらに、1 型 IFN 受容体ノックアウトマウスでは、CpG ODN や 1 型 IFN 誘導型アジュバントによる肺へのマクロファージ様 pDC サブセットが認められず、ワクチン抗原特異的な IgA 抗体価の上昇も著しく低下することを見出した。さらに、初代培養細胞や、CXCR3 中和抗体を用いた実験によって、マクロファージ様 pDC サブセットの肺への集簇には IFN を介した CXCL9-11 と pDC に発現する CXCR3 が重要であることを見出した。

同定した pDC サブセットの B 細胞活性化、形質細胞分化促進作用を明らかにするため、同定したマウス pDC サブセットと B 細胞 (CD19 抗原陽性) をセルソーターによって分取し、in vitro で、IL-2, IL-10 および CD40L 存在下で 12 日間共培養し、培地中 IgG および IgM 濃度を測定したところ、pDC 存在下において IgG および IgM 産生が認められた。同定した pDC サブセットが抗原特異的抗体産生を強く誘導させるのかを明らかにするため、同定した pDC サブセットおよび、それ以外の pDC サブセットをセルソーターによって分取し、in vitro においてインフルエンザ抗原にパルスさせた後、無感作のマウスに移植し、2 週間後に血清中の抗原特異的抗体量の測定を行った。その結果、同定した pDC サブセットを移植したマウスにおいて、強い抗原特異的 IgG 抗体価の上昇が認められた。さらに、抗原パルスした pDC サブセットを気管支内移植したところ、移植されたマウスにおいて抗原特異的 IgA 抗体価の誘導が認められた。このことから pDC サブセットは局所において抗原提示を行い、液性免疫を誘導することが明らかになった。抗原パルスした pDC サブセットが移植されたマウスにインフルエンザ H1N1 ウイルスを感染させ、体重減量を評価したところ、抗原パルスをしていない pDC サブセットを移植したマウスと比較して、体重減少は有意に抑制された。また、肺胞洗浄液や鼻腔洗浄液中のウイルス価も有意に低下しており、pDC による感染防御免疫が誘導されていることを明らかにした。

以上の結果から、本研究では同定した pDC サブセットが肺や気管支における IgA 抗体産生に関与し、呼吸器系ウイルス感染防御において重要な役割を担うことを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sasaki Eita, Asanuma Hideki, Momose Haruka, Furuhashi Keiko, Mizukami Takuo, Matsumura Takayuki, Takahashi Yoshimasa, Hamaguchi Isao	4. 巻 -
2. 論文標題 Systemically inoculated adjuvants stimulate pDC-dependent IgA response in local site	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mucimm.2023.03.003	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 Sasaki Eita, Asanuma Hideki, Momose Haruka, Furuhashi Keiko, Mizukami Takuo, Hamaguchi Isao	4. 巻 17
2. 論文標題 Nasal alum-adjuvanted vaccine promotes IL-33 release from alveolar epithelial cells that elicits IgA production via type 2 immune responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1009890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1009890	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 Sasaki Eita, Asanuma Hideki, Momose Haruka, Furuhashi Keiko, Mizukami Takuo, Hamaguchi Isao	4. 巻 11
2. 論文標題 Immunogenicity and Toxicity of Different Adjuvants Can Be Characterized by Profiling Lung Biomarker Genes After Nasal Immunization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 2171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.02171	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 Sasaki Eita, Hamaguchi Isao, Mizukami Takuo	4. 巻 16
2. 論文標題 Pharmacodynamic and safety considerations for influenza vaccine and adjuvant design	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology	6. 最初と最後の頁 1051 ~ 1061
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/17425255.2020.1807936	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木 永太、浅沼 秀樹、百瀬 暖佳、古畑 啓子、水上 拓郎、浜口 功
2. 発表標題 遺伝子マーカーを用いたアジュバント含有経鼻ワクチンの細胞傷害性と有効性評価
3. 学会等名 日本免疫毒性学会 学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eita Sasaki
2. 発表標題 Systemically inoculated adjuvants stimulate pDC-dependent IgA response in local site.
3. 学会等名 日米医学協力計画汎太平洋新興・再興感染症(EID)国際会議（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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