

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591105

研究課題名(和文) 形質細胞様樹状細胞を活性化するアジュバントを取り入れた感染症粘膜ワクチンの開発

研究課題名(英文) Mucosal vaccine with adjuvant that activates plasmacytoid dendritic cells

研究代表者

伊保 澄子 (Iho, Sumiko)

福井大学・医学部・講師

研究者番号：80151653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、形質細胞様樹状細胞(pDC)の活性化を介して全身に防御免疫を誘導する粘膜ワクチンを開発することを目的としている。代表研究者らは、粘膜ワクチンのアジュバント候補としてpDCを活性化するCpGオリゴDNA「G9.1」を開発した。G9.1はヒトやマウスの細胞にTh1免疫を誘導した。抗原タンパク質と共にマウス鼻腔内に投与すると粘膜IgAが産生され、pDC依存性にIgG抗体が産生された。結核免疫の低下したモルモットに特定の結核菌抗原と共投与すると、結核菌感染抵抗性が増強した。その機序のひとつに抗原によるG9.1活性の増強が示唆された。G9.1を取り入れた新規粘膜ワクチンの開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：CpG oligoDNAs (ODNs) are currently tested in clinical trials as vaccine adjuvants. They have the nuclease-resistant phosphorothioate bond; the immune responses elicited differ according to the CpG ODN sequence and vaccination method. To develop a CpG ODN that can induce plasmacytoid dendritic cell (pDC)-mediated Th1 immunity through the mucosa, we constructed phosphodiester CpG ODN "G9.1" and investigated its usefulness as mucosal adjuvant. G9.1 increased Th1 immunity in mice and humans. Nasal vaccination of G9.1 with diphtheria toxoid (DT) to mice induced DT-specific mucosal IgA and serum IgG2a/c (Th1-type). Induction of Th1-type Ab depended on pDCs. Combined immunization with a specific Mycobacterium tuberculosis antigen and G9.1 to a model animal, which exhibits weak immunity against Mycobacterium tuberculosis infection, augmented the protective immunity. The increase in G9.1 activity with this antigen may be involved in the mechanisms. G9.1 seems to be a promising mucosal adjuvant.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：粘膜ワクチン アジュバント CpG oligoDNA 形質細胞様樹状細胞 Th1 結核ワクチン

1. 研究開始当初の背景

世界規模で発生している新興・再興感染症への対策としてワクチン接種は重要である。しかし従来の注射法では、分泌型 IgA 抗体の誘導が望めないため、感染の初期バリアとなる粘膜面での防御は期待できない。これに対し粘膜投与法は、交差性の高い分泌型 IgA 抗体の誘導により粘膜面での感染防御が期待でき、全身性の免疫応答も得られるので感染症の発症・重症化の阻止に有効と考えられる。粘膜ワクチンによる防御免疫の誘導にはアジュバントが必要であるが、これまでに様々なタイプが候補にあがってきたものの、広く用いられるに至ったものがないのが現状と思われる。

粘膜と全身に防御免疫を効率よく誘導するには、粘膜に存在する樹状細胞の活性化が重要である。なかでも形質細胞様樹状細胞 (pDC) は微生物が侵入するとその核酸成分を認識して IFN- α を産生し、Th1 免疫を誘導して感染拡大の防止に働くと推定されることから、粘膜ワクチンの開発には粘膜 pDC を如何に活性化するかがポイントであると思われる。申請者らは、TLR9 リガンドとして、細菌 DNA 疑似 CpG DNA (以下 G9.1) を開発した (特許 3976742 号)。これまでの研究において G9.1 は、口蓋扁桃細胞に pDC の活性化を介して Th1 免疫を誘導することが示されたことから、粘膜ワクチンのアジュバントとして有用性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、粘膜 pDC の活性化を介して全身に防御免疫を誘導し得る、新しいタイプの経鼻ワクチンを開発することを最終目的としている (図 1)。平成 22 年度から 25 年度は、①経鼻投与 G9.1 が粘膜 pDC の活性化を介して全身に防御免疫を増強することを明らかにし、②成人結核に対する経鼻ブースターワクチンの開発を具体的目標に G9.1 の有用性を確立する。③さらに pDC 機能の制御について検討し、G9.1 を取り入れた感染症粘膜ワクチンの開発可能性を明らかにする。

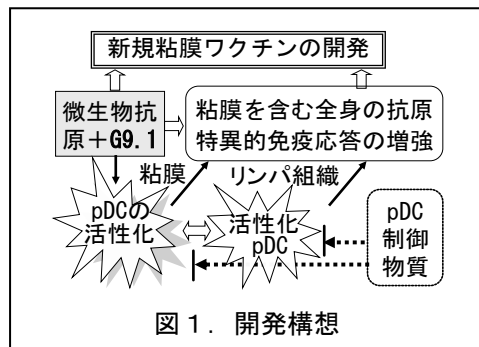


図 1. 開発構想

3. 研究の方法

(1) マウスへの免疫 (図 2) :

ジフテリアトキソイド (DT) を抗原、G9.1 をアジュバントとして C57BL/6 マウスまたは BALB/c マウスに免疫した。既知のリコン

ピナントコレラトキシンサブユニット B (rCTB) を G9.1 の対照アジュバントとした。抗毒素価は細胞培養法、抗体価及びサイトカイン濃度は ELISA 法にて測定した。また、BALB/c マウスに pDC 特異抗体を投与して pDC を除去した後に DT+G9.1 を投与し、免疫応答への pDC の関与を検証した。

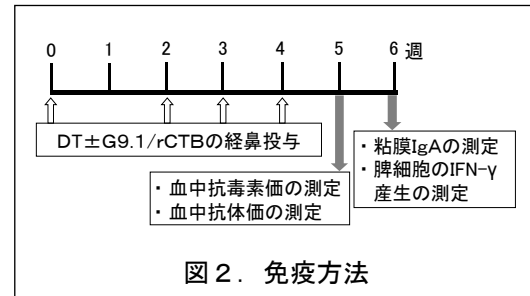


図 2. 免疫方法

(2) G9.1 のマウス骨髄細胞、脾細胞に対する作用の解析 :

C57BL/6 マウスまたは BALB/c マウスの骨髄細胞を G9.1 単独または抗原 + G9.1 と共培養し、培養上清のサイトカイン濃度を ELISA 法にて測定した。また、培養細胞の T-bet (Th1 細胞の分化を促進する転写因子) と GATA-3 (Th2 細胞の分化を促進する転写因子) の発現をリアルタイム RT-PCR 法により測定し、T-bet/GATA-3 比を指標に Th1 免疫と Th2 免疫の誘導を評価した。

(3) G9.1 のヒト細胞に対する作用の解析 :

成人の末梢血から比重遠心法 (比重 1.077) で分離した細胞を末梢血単核球とし、末梢血単核球から分離した CD3⁺CD19⁺CD56⁺CD16⁺CD11c⁺ 細胞を pDC として使用した。それぞれの細胞を抗原 A、G9.1、または抗原 A + G9.1 と共に 16 時間培養した。培養上清中の IFN- α 濃度を pDC 活性化の指標とし、(2) に準じて測定した末梢血単核球の T-bet、GATA-3 の発現を Th1、Th2 免疫の指標とした。

(4) G9.1 を取り入れた結核ブースターワクチンの開発可能性の検証 :

① 抗体産生による評価

C57BL/6 マウスに結核関連抗原 A と G9.1、またはコントロールとして抗原 A と rCTB を経鼻投与した。2 週目と 3 週目に同組成を追加投与し、4 週目に採取した末梢血の血清について抗原 A 特異的な IgG2c 抗体 (Th1 型) の力価を測定した。

② DTH 反応による評価

弱抗原性の BCG Tokyo 亜株 II 型を皮内接種し 8 週経過したモルモットを、結核免疫が低下した成人のモデルとし、2 ヶ月おきに 2 回、抗原 A と G9.1 を皮内投与した。最終免疫から 2 ヶ月後に抗原 A に対する DTH 反応を測定した。BCG Tokyo と同等の活性を示す亜株 I 型 (強抗原性) を接種したモルモットの DTH 反応を、陽性コントロールとした。BCG Tokyo 亜株は日本 BCG 研究所山本三郎博士

に御供与いただいた。

③ 噴霧感染実験による評価

上記モデルモルモットに抗原 A と G9.1 を 3 週毎 3 回皮下投与した。最終免疫から 3 週後に結核菌を噴霧し、5 週後に剖検して肺、脾臓の病変を観察した。また、4 週間の還元培養による菌数測定により、結核菌に対する感染抵抗性を評価した。

(5) 有意差検定：

Student *t* test を用いた。図中の*と**は対照コントロールと比較してそれぞれ $p < 0.05$ と $p < 0.01$ で差があることを示す。

(6) 倫理面への配慮：

ヒト血液の研究使用は福井大学医学部倫理審査委員会にて承認を得て、実験は福井大学で行った。動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て、実験は感染症研究所で行った。

4. 研究成果

(1) G9.1 のアジュバントとしての有用性：

DT+G9.1 を経鼻投与されたマウスの血中には DT 特異的な IgG 抗体が検出され、毒素中和活性が認められた(図 3)。これらの反応は TLR9 ノックアウトマウスでは認められなかった (Plos One 2014; 9:e88846 参照)。

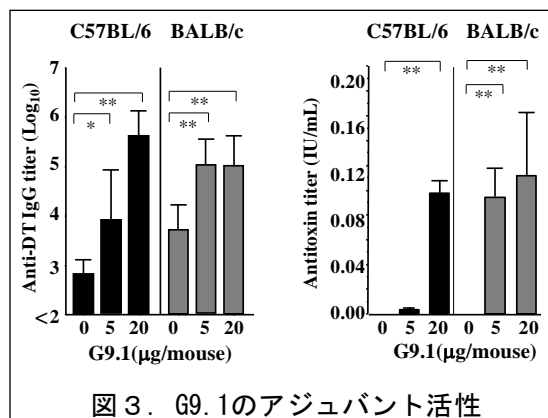


図 3. G9.1 のアジュバント活性

G9.1 を DT と共に投与すると、IgG1 に加えて Th1 型抗体の IgG2a (BALB/c) と IgG2c (C57BL/6) の産生が誘導された(図 4 上)。一方、rCTB を共投与されたマウスでは IgG1 のみが産生された(図 4 下)。また、G9.1 を共投与されたマウスの脾細胞を DT と培養すると、Th1 型サイトカイン IFN- γ が rCTB を共投与されたマウスより強く産生された(図 5 左)。さらに、骨髄細胞を G9.1 と共培養すると、*Tbet/GATA-3* 比が増強した(図 5 右、図中 negG9.1 は G9.1 の陰性コントロール)。G9.1 は rCTB と異なり Th1 免疫を誘導するアジュバントとして有用であると思われる。

G9.1 のアジュバント活性に G9.1 の標的細胞である pDC が関与しているかどうかを調べるため、pDC を除去した BALB/c マウスに DT と G9.1 を 1 カ月間隔で 2 回経鼻投与した。最終免疫の 1 カ月後に DT 特異的な IgG1 と IgG2a の血中力価を測定したところ、pDC

除去マウスでは IgG2a 抗体は検出されず、IgG1 抗体の力価も対照マウスの 10 分の 1 以下に留まることが示された(図 6)。これらの結果より、G9.1 を経鼻投与されたマウスでは pDC 依存性に免疫反応が起こり、そのメカニズムは Th1 免疫の誘導に強く関与することが示唆された。

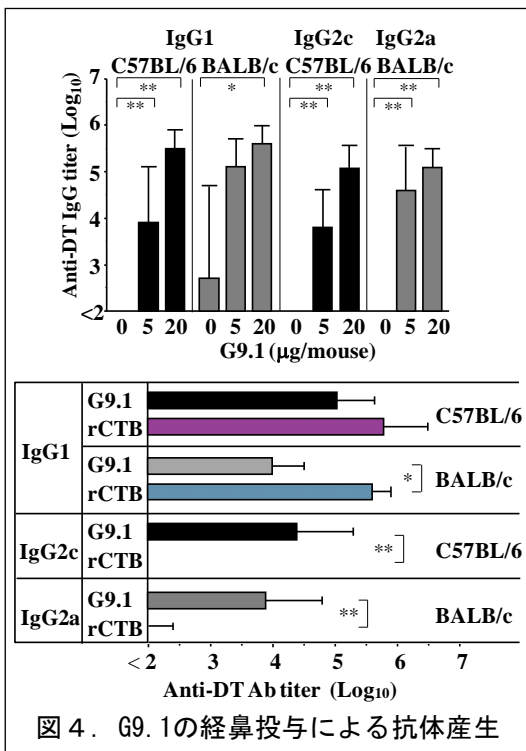


図 4. G9.1 の経鼻投与による抗体産生

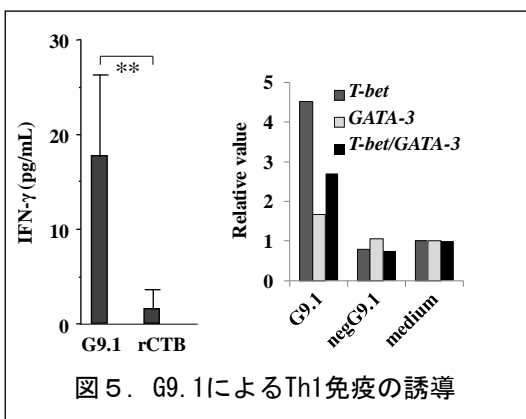


図 5. G9.1 による Th1 免疫の誘導

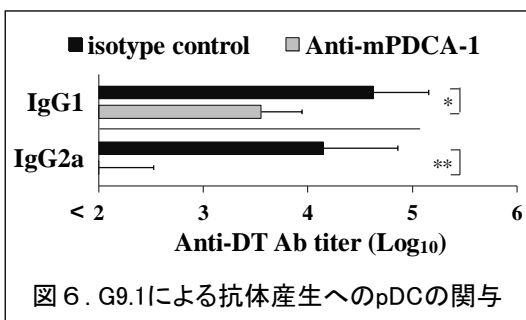
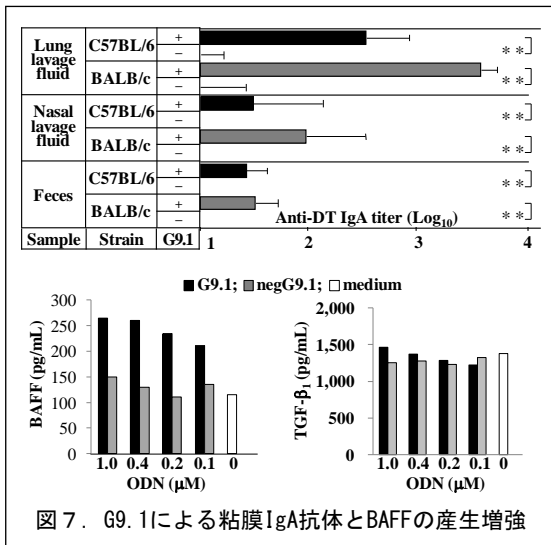


図 6. G9.1 による抗体産生への pDC の関与

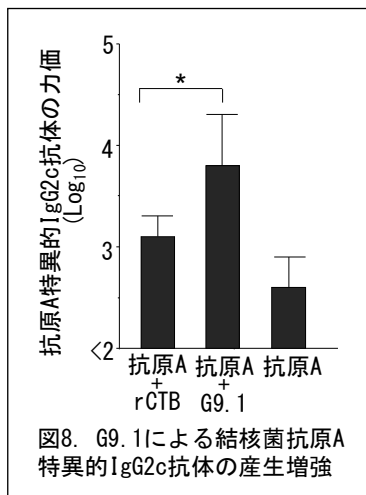
肺・鼻洗浄液及び糞には DT 特異的な IgA 抗体が検出され、骨髄細胞の培養により G9.1 は IgA クラススイッチを刺激する BAFF の産生を亢進することが示された(図 7)。IgE 産生量は検出レベル以下であった。これらの成

果は Plos One 2014; 9:e88846 に掲載されている。



[小括 1] pDC に作用する G9.1 をタンパク質抗原と共にマウスに経鼻投与すると、抗原特異的な粘膜IgA抗体とIgG抗体が産生され、更にTh1免疫が誘導されることが示された。G9.1はpDC活性化を介した感染症粘膜ワクチンの開発に応用が可能と思われる。

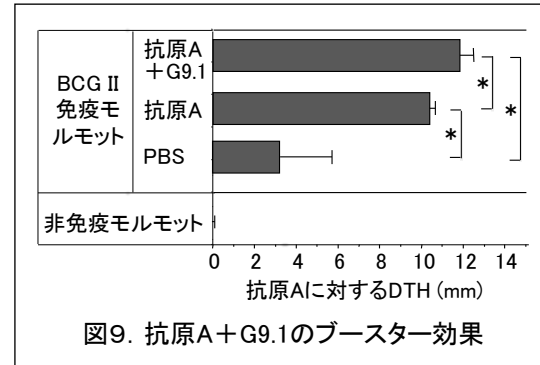
(2) 結核ブースターワクチンの開発可能性：
次に、結核ブースターワクチンの開発を具体的目標にG9.1の有用性について検討した。まず、方法の項(4)①に従って抗原Aを経鼻免疫したC57BL/6マウスについて調べたところ、抗原特異的なIgG2cはrCTB共投与群よりもG9.1共投与群で強く産生されることが示された(図8)。



次いで結核菌抗原AとG9.1の投与により細胞性免疫が誘導されるかどうかを、方法の項(4)②に従って調べたところ、G9.1の共投与は、抗原A単独投与やrCTB共投与に比べて、DTH反応を強く誘導することが示された(図9)。

さらに、方法(4)③に従って結核菌噴霧感染に対する抵抗性を調べた。結核菌噴霧感染後

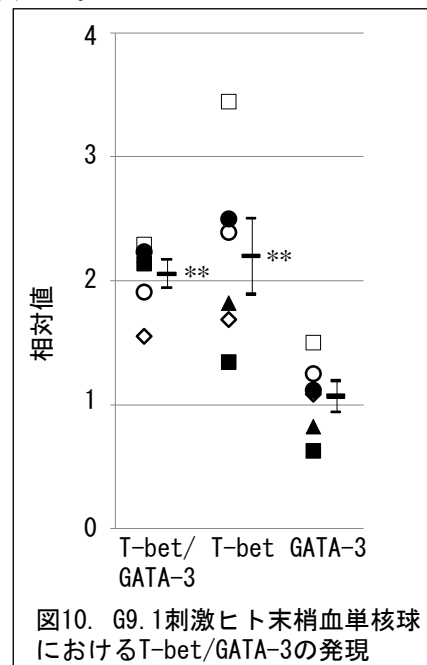
の肺・脾臓を観察したところ、G9.1添加群では結節等の病変が少なく病態の改善がみられた。肺臓器内菌数は、G9.1投与・非投与群間に差異は認められないものの、PBS投与群に比べ菌数が低下した。脾臓では、PBS投与群に比べ、抗原A投与群や抗原A+G9.1投与群で感染結核菌数が著減し、特に抗原A+



G9.1投与群では100倍程度の菌数低下が認められた。これらの成果については第87回日本細菌学会総会にて報告した。

[小括 2] 結核免疫が低下したモルモットに結核菌関連抗原AをG9.1と組み合わせて免疫すると、結核菌感染に対する抵抗性が増強した。

(3) ヒト細胞に対するG9.1の作用：
最後に、上記動物実験で得られた結果がヒトにおいても観察されるかどうかについて検討した。



ヒト末梢血単核球をG9.1と共培養するとIFN-αとIFN-γが産生された(Plos One 2014; 9:e88846)。Th2型サイトカインやTh17型サイトカインは産生されず、Tbetの発現が亢進しTbet/GATA-3比が上昇した(図10:記号はドナー毎に異なる)。Th1免疫の誘導は抗原Aを組み合わせても維持され

た(図 11)。G9.1 はヒトにおいても T 細胞免疫を誘導するアジュバントとして有用であることが示唆される。

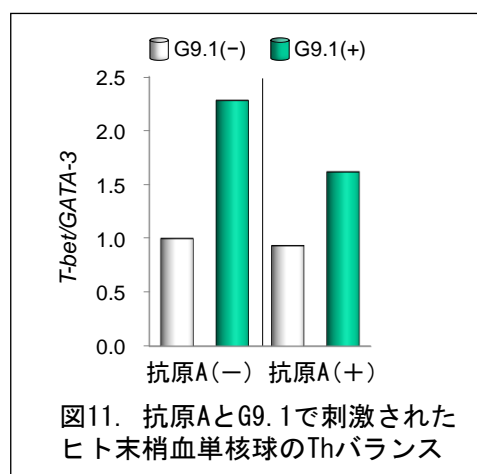


図11. 抗原AとG9.1で刺激されたヒト末梢血単核球のThバランス

作用機構を解明するため pDC を抗原 A と G9.1 と共に培養したところ、抗原 A には G9.1 の IFN- α 誘導活性を増強する作用があることが示された(図 12)。機序の詳細を検討中である。

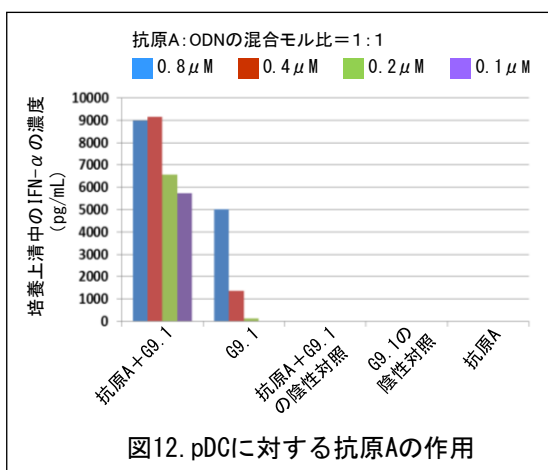


図12. pDCに対する抗原Aの作用

[小括 3] G9.1 はヒトにおいても Th1 優位の免疫を誘導する可能性が示された。また、微生物抗原のなかには G9.1 の活性を増強するものがあり、ワクチン開発に有用な知見が得られた。

(4) 考察：

我が国における成人肺結核症の増加の背景には、乳幼児期に接種した BCG ワクチンによる抗結核効果が加齢とともに減弱することが要因のひとつとして挙げられる。しかし結核免疫の増強を意図した BCG そのものの再接種は重大な副作用のため困難である。今回得られた結果は、適切な抗原を選択し、pDC を活性化する G9.1 をアジュバントに用いることにより、成人期の結核根絶を目指すワクチンの創製が可能になることを示唆しており非常に意義深い。

G9.1 はパリンδροーム様 CpG モチーフを含む 30 鎖長のオリゴ DNA である。自然型

の骨格から成るにもかかわらず既知 TLR9 リガンドよりはるかに強い活性を示す(図 13)。このことは副作用の軽減に繋がるので創薬開発に有利である。しかしながら本研究において、微生物感染により産生されるサイトカインのなかには pDC 活性化を抑制するものがあることが判明した。G9.1 は粘膜 IgA の産生を誘導するので抑制メカニズムが粘膜ワクチンの開発に支障をきたすことはないと思われるが、pDC 制御の機構と防御免疫への影響については詳細な検討が必要である。

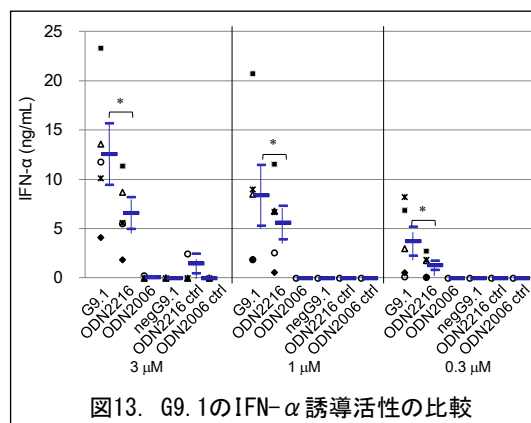


図13. G9.1のIFN- α 誘導活性の比較

(5) 結論：

G9.1 をアジュバントとして取り入れることにより、pDC 依存性に防御免疫を誘導する粘膜ワクチンの開発が可能になることを明らかにした。特に抗原性とアジュバント性の相互活性化を基盤とした新規ワクチンの開発が期待できる。

(6) 謝辞：

本研究に際して様々なご指導とご支援を頂きました皆さまに深謝申し上げます。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

- ① Maeyama JI, Takatsuka H, Suzuki F, Kubota A, Horiguchi S, Komiya T, Shimada I, Murata E, Osawa Y, Kitagawa H, Matsuki T, Yamamoto S, Iho S. A palindromic CpG-containing phosphodiester oligodeoxynucleotides as a mucosal adjuvant stimulates plasmacytoid dendritic cell-mediated TH1 immunity, Plos One、査読有、9 巻、2014、e88846
DOI: 10.1371/journal.pone.0088846.
- ② Taniguchi K, Takii T, Yamamoto S, Maeyama J, Iho S, Maruyama M, Iizuka N, Ozeki Y, Matsumoto S, Hasegawa T, Miyatake Y, Itoh S, Onozaki K. Reactivation of immune responses against Mycobacterium tuberculosis by boosting with the CpG oligomer in aged mice primarily vaccinated with Mycobacterium bovis BCG、Immun Ageing

〔学会発表〕(計 3 3 件)

- ① 前山順一、山崎利雄、山本十糸子、林大介、松本壮吉、網康至、須崎百合子、伊保澄子、山本三郎、結核菌組換えタンパク質および TLR9 リガンドを用いた結核ブースターワクチンの結核菌噴霧感染による評価、第 87 回日本細菌学会総会、東京、2014.3.26-2014.3.28
- ② 前山順一、伊保澄子、岡真優子、井坂雅徳、松本壮吉、山本三郎。BCG Tokyo172 株のサブポピュレーション BCG-II を用いた結核ブースターワクチンの評価系の構築とワクチン候補の評価、第 86 回日本細菌学会総、千葉、2013.3.18-2013.3.20
- ③ 前山順一、伊保澄子、井坂雅徳、山本三郎。粘膜アジュバントとして新規 A 型 CpG-DNA の作用機構：形質細胞様樹状細胞の関与、第 85 回日本細菌学会、長崎、2012. 3.28-2012.3.29、
- ④ Maeyama JI, Iho S, Osada-Oka M, Matsumoto S, Isaka M, Yamamoto S. Immune responses in guinea pig administered with anti-tuberculosis booster vaccine candidate consisting of recombinant proteins of Myco-bacterium tuberculosis and adjuvants, The IUMS 2011 Sapporo Congress /International Union of Micro-biological Societies, Sapporo, 2011.9.6-2011. 9.10
- ⑤ Maeyama JI, Iho S, Matsumoto S, Isaka M, Yamamoto S. Effects of adjuvants on guinea pig and mouse administered with recombinant proteins derived from Mycobacterium tuberculosis. Keystone Symposium. Tuberculosis: Immunology, Cell Biology and Novel Vaccination Strategies. Vancouver, British Columbia. 2011.1. 15-2011.1.20.
- ⑥ Meyama JI, Iho S, Komiyama T, Takahashi M, Matsuki T, Yamamoto S. Newly-identified phosphodiester CpG-DNA has mucosal adjuvanticity by intranasal administration with diphtheria toxoid. 14th International. 14th International Congress of Immunology, Kobe. 2010.8.22-2010.8. 27.

〔図書〕(計 5 件)

- ① Iho S, Osawa Y, Takatsuka H, Maeyama J-I, Horiguchi S, Kitagawa H, Yamamoto S. Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo, Unique characteristics of palindromic CpG

-oligodeoxynucleotide. *In* BCG vaccine and adjuvant (Takii T, Maeyama J-I, and Yamamoto S. 268 pages), 2011, 157-176.

- ② Maeyama J-I. Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo, Mucosal adjuvants. *In* BCG vaccine and adjuvant (Takii T, Maeyama J-I, and Yamamoto S. 268 pages), 2011, 177-192.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：免疫刺激 G9.1 の抗結核ブースターワクチンへの応用。

発明者：伊保澄子、前山順一、松本壮吉、山本三郎

権利者：福井大学、国立感染症研究所長、大阪市立大学、日本ビーシー製造株式会社

種類：特許

番号：特願 2011-080646

出願年月日：2011.3.31

国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：Immunostimulatory oligonucleotide that induces interferon alpha

発明者：Kitagawa H, Iho S, Yamamoto S, Matsuki T.

権利者：江守商事株式会社、福井大学

種類：特許

番号：US7718623

取得年月日：2010.5.18

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊保 澄子 (IHO, Sumiko)

福井大学・医学部・講師

研究者番号：8 0 1 5 1 6 5 3

(2) 研究分担者

前山 順一 (MAEYAMA Junichi)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・

主任研究官

研究者番号：4 0 1 9 9 6 4 1

竹内 健司 (TAKEUCHI Kneji)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：4 0 2 3 6 4 1 9

島田 一郎 (SHIMADA Ichiroh)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：2 0 2 7 2 9 0 8