

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591111

研究課題名（和文）樹状細胞の分泌膜小胞を用いた新タイプ治療用ワクチン：慢性ウイルス感染症への展開

研究課題名（英文）New therapeutic vaccines by using small membrane vesicle secreted by dendritic cells: New development for chronic virus infections

研究代表者

守屋 修（MORIYA OSAMU）

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40049862

## 研究成果の概要（和文）：

エキソソーム(Ex)にはリンパ球活性化マーカー陽性細胞数の増加、細胞傷害性T細胞、NK細胞の誘導活性、IFN $\gamma$ 産生細胞の増加が認められた。これらExにはI-Ab, HLA-A2, HSP, Rae $\gamma$ が検出された。Exでの細胞傷害性T細胞の誘導にはCD8 $^{+}$ T細胞は必須だが、CD4 $^{+}$ T細胞には依存しない反応系の存在が示唆され、樹状細胞へのExの刺激はTLR-2が関与していることも明らかになった。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated whether exosome (Ex) derived from dendritic cells (DC) can be attractive candidate for antiviral immunity in the transgenic mice (HHD) expressing HLA-A0201. We isolated Ex from culture supernatant of DC that were infected with recombinant Adenovirus (Rec Ad) expressing NS3-5A of Hepatitis C virus (HCV) with or without maturation reagents of DC such as LPS, IL-12, CpG, phorbol ester, ionomycin, CD40L or ATP. By estimating dot blot assay, Ex contained CD63, CD81, CD44, I-Ab, HLA-A2, HSP, and Rae $\gamma$ . Responses of cytotoxic T lymphocytes (CTL) or natural killer cells were induced by these Exs. IFN $\gamma$  syntheses estimated by ELISPOT assay showed increased numbers of secreting cells. From the findings of increased concentration of Rae $\gamma$  and HSP in Exs and the frequency of NKG2D-positive cells in the splenic cells after the Ex stimulation, we hypothesized that NK cell increases in number induce IFN $\gamma$  synthesis and cytolytic function in part just after the Ex stimulation. CD8 $^{+}$  T cells, but not CD4 $^{+}$  T cells may be important for the effects of Ex on CTL responses. Among the TLRs tested, TLR-2 suggested an important role as receptor of Ex in addition to the well known LFA molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 2012年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3400,000  | 1,020,000 | 4,420,000 |

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：感染症治療学、慢性ウイルス感染

1. 研究開始当初の背景

我が国の国民病の一つである HCV 感染症は診断・治療の進歩にもかかわらず依然として予後不良である。HCV 肝炎の慢性化や肝癌に至る免疫経過の一端に抗原提示細胞や細胞傷害性 T 細胞の機能低下があり、HCV 感染症ではこれら免疫抑制に打ち勝つ有効なワクチン材料の開発が重要である。

本研究では新規ワクチン材料の開発を目的として今までと全く異なった生体材料、すなわち、樹状細胞由来の分泌性輸送担体のエキソソーム(Ex)を免疫賦活剤という観点で検討した。これまで Ex は遠隔細胞に多数の分子を安定して運ぶ情報伝達機能を持つ物質輸送小胞として重要性が知られていた。マクロファージから分泌される Ex ではマクロファージ生体膜の一部、主要組織適合抗原・エピトープ複合体、細胞接着因子など多数の免疫機能分子の存在が報告されている。

近年、NK 細胞などの免疫細胞には免疫反応の促進、あるいは逆に反応抑制と機能的に相反する抗原受容体の存在がいくつか報告されている。抑制型受容体と反応せず直接細胞質へ侵入する Ex の特性を利用した Ex による抗原物質運搬の仕組みの利用は、免疫反応を亢進する可能性が高く、強い免疫刺激が誘導可能なワクチン材料の新規候補になりうる事が予想されている。

2. 研究の目的

免疫能が低下した担癌生体では癌細胞由来 Ex が免疫細胞群に認識されることで強い抗腫瘍効果を示す。本研究ではこれまでとは全く異なった生体材料の Ex による細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞などに代表される免疫細胞群の誘導、IFN 産生能、ウイルスチャレンジ実験等を指標にして HCV 慢性感染症の治

療ワクチンの開発をめざした。この成果は HCV 感染症の治療のみならず、他の多くの慢性ウイルス感染治療用の免疫賦活剤の材料として有用となる事が予想される。

3. 研究の方法

マウスはフランスパスツール研より恵与された HLA-A2-1 を発現したトランスジェニックマウス(HHD)で、細胞性免疫応答は高い性質を示す。HHD マウス作出に用いた元の C57Bl マウスも併せて用いた。

樹状細胞は FCS free の AIM-V 培地で、LPS, CpG (type A,B, ならびにこれらの negative sequences) IL-12, IFN, フォルボールエステル(PMS), Ionomycin, ATP などの樹状細胞刺激剤の存在下、HCV NS3-5A を発現する組み換えアデノウイルスを感染後、培養日数(1-7日)を変えて Ex を分取し、Ex 採取に最適な培養日数は Ex タンパク定量を Bradford 法で、Ex 特異的分子の CD63, CD81 あるいは免疫反応に関与する各種因子、CD44, HLA-A2, I-Ab, Rae , ストレスタンパク:HSP 量などを定量的なドットプロット法で測定した。

細胞での CD63, CD81, CD44, HLA-A2, I-Ab, Rae ,HSP 分子の存在は免疫染色法で観察した。Ex でのリンパ球感作状態はマウス足蹠での遅延型アレルギー反応でその炎症レベルを測定した。

IFN 産生細胞数は ELISPOT 法によった。HCV エピトープ特異的な細胞傷害性 T リンパ球(CTL)、ならびに NK 細胞のキラー活性は <sup>51</sup>Cr ラベルの標識細胞での <sup>51</sup>Cr 遊離反応で測定した。

CD4, CD8<sup>+</sup>T 細胞の in vivo 除去は GK1.5, 53.6.7 のモノクローナル抗体の腹腔内投与によった。Ex のリンパ球、樹状細胞への結合

阻害反応はLFA, TLR(1,2,4)に対する抗体をあらかじめ処理し、その後に Ex を処理後、リンパ球活性化の程度はCD44 陽性細胞数を免疫染色法で、また樹状細胞については未熟、成熟状態の DC について、IFN 産生細胞数を ELISPOT 法により測定し産生細胞数頻度の程度より受容体に対する阻害レベルを判定した。

#### 4. 研究成果

樹状細胞の培養では、培養日数の増加と共に Ex マーカーの CD63, CD81 陽性細胞数が増加した(図 1)。分泌された Ex 量は培養 3 日目より明らかな増加をみた。

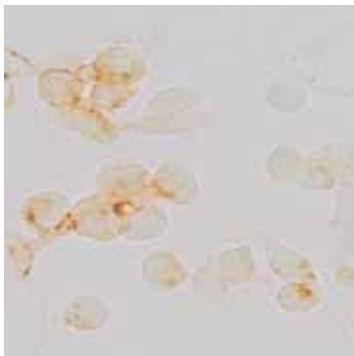


図 1 CD63 陽性細胞

各種樹状細胞刺激剤と RecAd の共刺激処置で Ex 量はいずれも増加傾向をみたが、特に LPS, IL-12+IFN, CpG 処置で増加した。培養液で Ex 増量を誘導した樹状細胞においても Ex マーカーの CD63, CD8, その他検討した成分がいずれも増加した(図 2)。

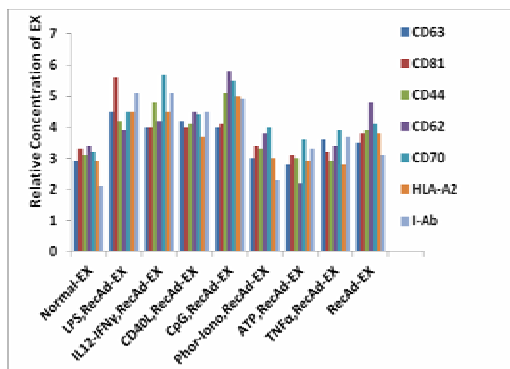


図 2 Ex での成分プロフィール

In vivo, in vitro での Ex 刺激ではリンパ球活性化マーカーである CD44 陽性の細胞数が増加し、Ex が細胞内へ侵入したことを示す細胞内微細脂肪滴の陽性細胞数も増加傾向を示し、Ex 投与による明らかなリンパ球刺激反応が確認された。

未感作リンパ球培養での生存率も Ex 無処置の対象群と比べ各種 Ex 添加でリンパ球の生存率は明らかに増加した。検討したこれら Ex

にはウイルスの増殖は検出されなかった。

個体レベルでのリンパ球感作の程度を足蹠遅延型アレルギー反応で観察した結果、CpG あるいは IL-12 と IFN の共刺激を RecAd と共に樹状細胞を処置して得られた Ex のマウスへの感作で明らかな陽性反応がみられた。

CTL, NK 細胞によるキラー活性は IL-12 と IFN, あるいは CpG と RecAd 共刺激の Ex 処置でこれらの細胞群の誘導をみた(図 3)。

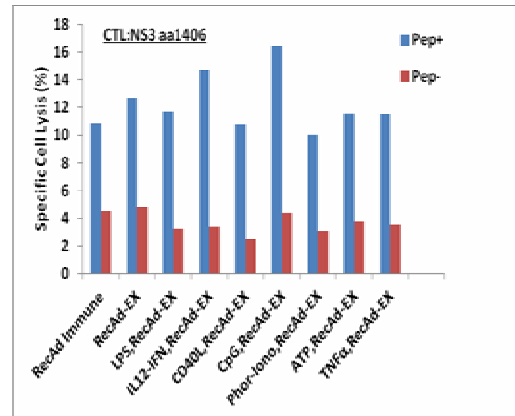


図 3 細胞傷害性 T 細胞の誘導

ELISPOT 法での IFN 産生細胞数でも同様な反応が示された(図 4)。

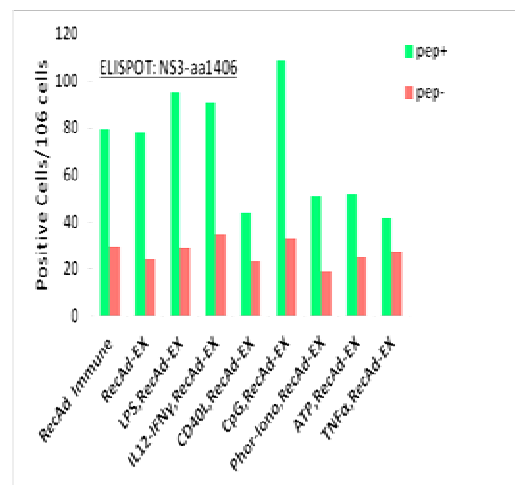


図 4 ELISPOT での IFN 産生細胞数

Dot blot assay で NK 細胞リガンドの RAE1 が Ex に検出され、脾での NKG2D 陽性細胞群も Ex 刺激で増加した。

繰り返しの Ex 刺激で HCV 特異のエピトープに対する免疫記憶細胞の誘導も明らかであった。Ex 刺激後 120 日で NK 細胞と予想される YAC 細胞に対するキラー活性が検出され、ELISPOT 法でも低レベルながら IFN 陽性細胞がみられた。この時、脾での NK 細胞数増加が NKG2D 陽性細胞より確認され、Ex 刺激で

の CTL 免疫記憶反応の誘導に加え NK 細胞での長期の免疫反応維持の可能性が考えられた。

Ex 刺激による CTL 免疫応答の誘導は CD4<sup>+</sup>T 細胞に一部非依存性で、CD8<sup>+</sup> T 細胞に依存性を示した。Ex の未熟樹状細胞への取り込み能を、TLR-1、-2、-4 の抗 TLR 抗体を Ex 刺激前の樹状細胞に処置し、樹状細胞での IFN 産生能の変動を ELISPOT 法で検討した。検討したなかでは抗 TLR-2 抗体にのみ強い抑制反応が見られ、抗 TLR-2 の微量投与 (0.01 μg/ml) でも著明な抑制反応が観察された。活性化樹状細胞では未熟樹状細胞と比較し Ex による IFN 産生能は低下したが、抗 TLR-2 による抑制反応は依然として観察された。抗 LFA 前処置でも Ex 刺激への抑制効果が見られたが抑性の強さは抗 TLR で著しかった。これまで Ex 刺激は LFA を介するとの報告のみが見られたが LFA 以外に TLR-2 を介する Ex の刺激経路の存在も示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2 件)

1. Moriya Osamu, Exosomes derived from dendritic cells treated with CpG ODN stimulated cytolytic responses and induction of memory cells in anti-viral immune responses. 第 41 回日本免疫学会総会・学術総会 2012 年 12 月 6 日 神戸市国際会議場

2. Moriya Osamu, Akatsuka Toshitaka. Exosomes released from dendritic cells are immunomodulator in viral infection. 第 40 回日本免疫学会総会・学術総会 2011 年 11 月 28 日 千葉市幕張メッセ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

守屋修 (MORIYA OSAMU)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40049862

### (3) 連携研究者

小林信春 (KOBAYASHI NOBUHARU)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10150616