

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830115

研究課題名(和文)従来型ワクチンを凌ぐ有効性を持つマクロファージ指向型ワクチンの免疫誘導機構の解明

研究課題名(英文)The mechanisms of macrophage dependent vaccine

研究代表者

村岡 大輔 (Muraoka, Daisuke)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20608955

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)：我々は、独自のドラッグデリバリーシステムであるCHPナノゲルを応用したがん治療用ワクチンを開発する過程で、CHPがんワクチンによる細胞性免疫誘導が抗原提示細胞としてマクロファージに依存的であることを見出した(マクロファージ指向型ワクチン)。本申請研究では、マクロファージ指向型ワクチンと従来型樹状細胞指向型ワクチンを比較し、細胞性免疫誘導に有用なマクロファージポピュレーションの同定および当細胞への抗原の送達機構、さらにマクロファージ指向型ワクチンの強力な免疫誘導能を支持する分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Previously we had identified that macrophage has critical role in the induction of immune responses elicited with CHP cancer vaccine (Macrophage oriented vaccine). In this study, to reveal the mechanisms of immune response induced with macrophage oriented vaccine, we compared with CHP cancer long peptide vaccine and the long peptide vaccine emulsified with IFA (classical dendritic cell dependent vaccine). As a result, we had demonstrated that the medullary macrophage has a critical role in macrophage oriented vaccine. Furthermore, we had shown the detailed mechanism which is involved in the efficacy of this vaccine system.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：がんワクチン

1. 研究開始当初の背景

がんワクチンや感染症ワクチンの開発において、ワクチンの免疫原性や有効性の向上のための工夫が多く試みられている。その中で効果の点で特に注目されているのが、ワクチン抗原のリンパ節への送達技術(DDS)である。我々も独自開発のDDS「CHP ナノゲル」を用いて、高性能のがんワクチンの創製に取り組んできた。我々は、その過程において、CHP ナノゲルはワクチン抗原を効率良く受動的にリンパ節へと送達できること、CHP ナノゲルによって送達された抗原はマクロファージにより提示されワクチン特異的細胞性免疫が惹起されることを明らかにした(マクロファージ指向型)。また、従来型の樹上細胞依存型ワクチン(IFA)と比較し、マクロファージ指向型ワクチンは細胞性免疫誘導能および抗腫瘍効果が優れていることも明らかにしてきた。しかし、多くのワクチン開発研究が抗原提示細胞として樹状細胞を中心に進められてきたこともあり、ワクチンの機能発現におけるマクロファージの重要性の解明は不十分である。

2. 研究の目的

本申請研究では、マクロファージ指向型ワクチンと樹状細胞依存型ワクチンの比較検討を進め、ワクチンがマクロファージ指向型となる分子基盤の解明すると共に、その強力な有効性を支える機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CHP/抗原複合体の動態解析

CHP ナノゲルと蛍光標識した長鎖ペプチド抗原を複合体化し(CHP/抗原複合体)マウスへと皮下投与した。投与 16 時間後に従属リンパ節を回収し、フローサイトメトリーを用いてマクロファージ(CD11b 陽性細胞)による CHP/抗原複合体の取り込みについて検討した。さらに詳細な解析を行う為、マクロファージを以下の様なポピュレーションに区別する解析も行った。Medullary sinus Macrophage (MSM: CD11b 陽性 F4/80 陽性 CD169 陽性)、Medullary cord Macrophage (MCM: CD11b 陽性 F4/80 陽性 CD169 陰性)、Subcapsular sinus Macrophage (SSM: CD11b 陽性 F4/80 陰性 CD169 陽性)

(2) 抗原提示細胞の解析

CHP/mERK2 ロングペプチド複合体をマウスへと皮下投与し、16 時間後に従属リンパ節を採取した。リンパ節よりマクロファージを回収し、別途用意した 9m 抗原特異的 TCR 発現トランスジェニックマウス DUC18 より CD8 陽性 T 細胞を単離し共培養して、抗原提示活性を評価した。抗原提示活性の指標としては、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の分裂および IFN- $\gamma$  産生を用いた。

(3) 可溶性アジュバントの動態解析

FITC 標識した CpG ODN (可溶性 TL9 アゴニスト)をマウスへと皮下投与し、16 時間後にリンパ節を回収して抗原提示細胞への取り込みをフローサイトメトリーを用いて検討した。標的細胞としては、樹状細胞およびマクロファージについて解析した。

(4) 可溶性アジュバントによる抗原提示細胞の活性化の検討

マウスへ poly I:C(可溶性 TLR3 アゴニスト)および CpG ODN を皮下投与しリンパ節を回収して抗原提示細胞の活性化をフローサイトメトリーを用いて検討した。標的細胞としては、樹状細胞およびマクロファージについて解析し、活性化の指標には CD80 および CD86 を用いた。

4. 研究成果

(1) CHP/抗原複合体の電荷および粒子径はマクロファージへの取り込み効率に影響する

CHP/抗原複合体がマクロファージ指向性を獲得する機構について検討した。CHP ナノゲルに正電荷を付加した陽イオン性 CHP ナノゲル(CHP/DEAE, CHP/NH<sub>2</sub>) および粒子径が巨大な CHP ナノゲル(CHESG)を作製し蛍光標識抗原と複合体化した(表 1)。

サンプルID	CHP	電荷	粒子径(DLS)
①	従来型CHP	なし	55 nm
②	CHP/DEAE	陽イオン性 (正電荷)	153 nm
③	CHP/NH <sub>2</sub>	陽イオン性 (正電荷)	86 nm
④	CHESG	なし	182 nm

表 1. 各 CHP/抗原複合体の電荷および粒子径

各種 CHP ナノゲル/抗原複合体をマウスへと皮下投与しリンパ節のマクロファージへの取り込みを検討した。その結果、粒子径 50nm ほどで不活化である従来型の CHP/抗原複合体がリンパ節のマクロファージへと効率的に取り込まれるのに対して、CHESG/抗原複合体および CHP-DEAE/抗原、CHP-NH<sub>2</sub>/抗原複合体では、著しく取り込み効率が低かった(図 1)。

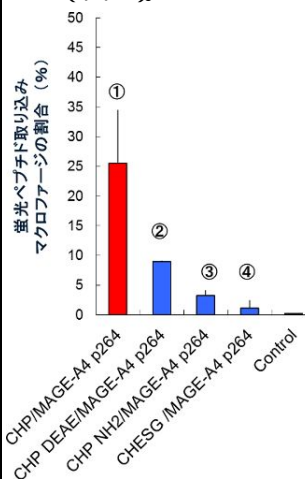


図 1  
作製した各種 CHP/長鎖ペプチド複合体をマウスに皮下投与し、マクロファージによる取り込みを検討した。その結果、陽イオン性 CHP 及び粒子径を増大させた CHP/抗原複合体でマクロファージへの取り込みが著しく減少した。

次に我々は、皮下投与された CHP/抗原複合体のマクロファージへの送達を細胞依存的であるか非依存的であるかを検討した。異なる2種類の蛍光標識を施した長鎖ペプチドを用意し、それぞれを CHP ナノゲルと複合体化した後マウスの同じ従属リンパ節に属する異なる部位へと皮下投与しマクロファージによる抗原の取り込みを観察した。その結果、各抗原を異なる箇所投与したにも関わらず、マクロファージは両蛍光標識の抗原を取り込んでいた。これは、それぞれの抗原が従属リンパ節へと受動的に流れ込み、そこで混合された抗原をマクロファージが取りこんでいるためと考えられる(図2)。以上より、CHP/抗原複合体はリンパ節へと細胞非依存的に送達された後、マクロファージに取り込まれることが示唆された。

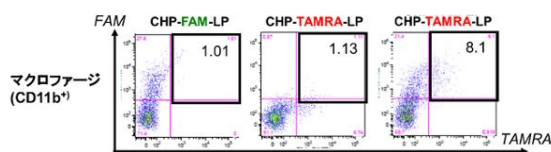


図2. 長鎖ペプチドをFAM もしくはTAMRA にて標識しCHP 複合体化した。それらを同じ従属リンパ節に属する異なる箇所へと皮下投与して、16 時間後のマクロファージへの取り込みを検討した。その結果、従属リンパ節において両蛍光シグナルを有するマクロファージが観察された。

(2) CHP/抗原複合体は Medullary Macrophage により提示される。CHP/抗原複合体を取り込むマクロファージを更に詳細に解析した結果、リンパ節のSSMへは取り込まれずMCMおよびMSMなどのMedullary Macrophage に効率的に取り込まれることが明らかになった(図3)。

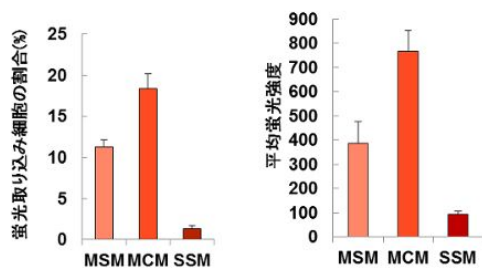


図3. FITC 標識CHP/抗原複合体をBALB/c マウスへ皮下投与した後、リンパ節より細胞を回収し各細胞群での蛍光ペプチド由来シグナルをフローサイトメトリーにて解析した。CHP/抗原複合体を取り込むマクロファージに注目し解析した結果、F4/80陽性のMSM およびMCM がCHP/抗原複合体を効率的に取り込んでいることが明らかになった。

また、この時の抗原提示活性は抗原の取り込み効率と同傾向であり、Medullary Macrophage では強い抗原提示活性が確認されたのに対し、SSMでは認められなかった。以上より CHP/抗原複合体は皮下投与後リンパ節の Medullary Macrophage に取り込まれ、直接 CD8 陽性 T 細胞へと抗原提示されることが示唆された(図4)。

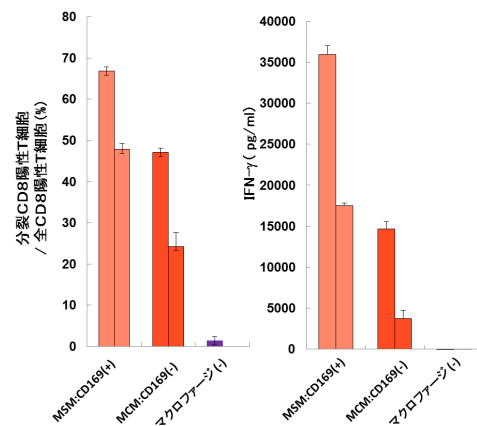


図4. BALB/c マウスに、CHP/抗原複合体と CpG ODN を皮下投与し、従属リンパ節を回収した。リンパ節より各細胞分画をソートし、mERK2 特異的 CD8 陽性 T 細胞と共培養して抗原提示活性を検出した。その結果、MSM 及び MCM の両マクロファージが抗原提示活性を有する事が明らかになった。

(3) 可溶性アジュバントはマクロファージ細胞に優位に作用する

CHP/抗原複合体の強力な薬理活性を支持する機構を明らかにする為、可溶性アジュバントの動態に注目し検討を行った。その結果、皮下投与された CpG ODN はリンパ節のマクロファージにより効率的に取り込まれることが明らかになった(図5A)。さらに、CpG ODN および poly I:C 投与後のこれら抗原提示細胞の活性化を検討した結果、樹状細胞よりマクロファージで細胞表面上の CD80 および CD86 が高く発現していることが明らかになった(図5B)。以上より、マクロファージ指向性ワクチンの強い薬理活性は、マクロファージのアジュバントに対する高感受性が高い為だと考えられた。

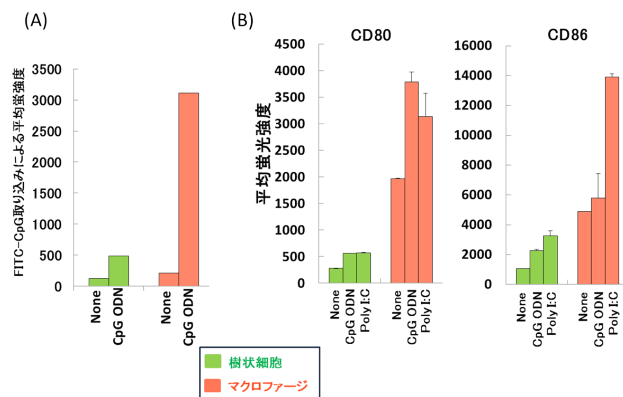


図5. A) FITC 標識CpG ODN をBALB/c マウスへ皮下投与した。樹状細胞と比べて、マクロファージ細胞でより多くのFITC 標識CpG ODN が取り込まれていることが確認された。B)CpG ODN およびPoly I:C をBALB/cマウスへ皮下投与した。樹状細胞と比べて、マクロファージ細胞がより強く活性化していることが明らかになった。

おわりに  
以上の結果より、CHP ナノゲルはアジュバント感受性の高いマクロファージに長鎖ペプチド抗原を選択的かつ効率的に送達して

抗原提示細胞とすることで、強力な免疫誘導を惹起していると考えられた。本研究は、アジュバント併用ワクチンによる免疫誘導においてマクロファージは有用な抗原提示細胞となり得る可能性や、抗原デリバリーシステムがワクチンによる免疫誘導の機構を大きく左右する可能性を示唆している。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 3件 全て査読あり)

Nishikawa K, Seo N, Torii M, Ma N, Muraoka D, Tawara I, Masuya M, Tanaka K, Takei Y, Shiku H, Katayama N, Kato T. Interleukin-17 induces an atypical M2-like macrophage subpopulation that regulates intestinal inflammation. PLoS One. 2014 Sep 25;9(9):e108494.

Muraoka D, Harada N, Hayashi T, Tahara Y, Momose F, Sawada S, Mukai SA, Akiyoshi K, Shiku H. Nanogel-based immunologically stealth vaccine targets macrophages in the medulla of lymph node and induces potent antitumor immunity. ACS Nano. 2014 Sep 23;8(9):9209-18.

Ishihara M, Seo N, Mitsui J, Muraoka D, Tanaka M, Mineno J, Ikeda H, Shiku H. Systemic CD8<sup>+</sup> T cell-mediated tumoricidal effects by intratumoral treatment of oncolytic herpes simplex virus with the agonistic monoclonal antibody for murine glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor. PLoS One. 2014 Aug 8;9(8):e104669.

〔学会発表〕(計 3件)

村岡 大輔、原田直純、林妙、百瀬文康、澤田晋一、秋吉一成、珠玖洋 CHP ナノゲルはロングペプチド抗原をリンパ節内のマクロファージに抗原提示させる 2013年7月3日~5日 (第17回日本がん免疫学会総会、ANAクラウンプラザホテル宇部・山口県・宇部市)

Daisuke Muraoka, Naozumi Harada, Tae Hayashi, Kazunari Akiyoshi and Hiroshi Shiku. Peptide sequence design and delivery are critical for the immunogenicity of long peptide-based vaccines. 2013年10月3日~5日 (第72回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜・神奈川県・横浜市)

MURAOK Daisuke, HARADA Naozumi, HAYASHI Tae, MOMOSE Fumiyasu, SAWADA Shin-ichi, AKIYOSHI Kazunari, SHIKU Hiroshi Macrophage is a good target as antigen presenting cell to induce strong immune responses elicited with administration of vaccination antigen and immunological adjuvant. 2013年12月11日~13日 (第42回日本免疫学会学術総会、幕張メッセ・千葉県・千葉市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

村岡 大輔 (MURAOKA DAISUKE)  
三重大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20608955