

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560221

研究課題名(和文)近赤外レーザーによる物理的免疫アジュバントの確立：生体の新たな光感受機構の探求

研究課題名(英文) Establishment of near infrared laser adjuvants: An exploration of new mechanisms in light reception

研究代表者

塚田 孝祐 (Tsukada, Kosuke)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：00351883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：現在のワクチンの多くは免疫アジュバント(免疫賦活剤)が混合されているが、その安全性や効果に問題が残されている。最近、我々は近赤外光照射がアジュバントとして機能することを明らかにしたが、その詳細なメカニズムは不明である。

まず、培養した角化細胞に均一な強度プロファイルでレーザー光を照射する光学系を確立した。角化細胞に発現するCCL20のmRNAをqRT-PCR法にて発現量を解析した。また、活性酸素に着目し、ESR法にて活性酸素を定量する方法およびミトコンドリアの酸素消費量を定量する手法をそれぞれ確立した。今後、これらの定量解析から近赤外レーザー照射による免疫活性化メカニズムが明らかになると期待される。

研究成果の概要(英文)：The vaccine adjuvant is an essential component for most of modern vaccines to be effective. However, there is a paucity of both safe and effective vaccine adjuvant. Recently, near-infrared (NIR) laser light has been shown to significantly enhancing vaccine responses and can be used as vaccine adjuvant by others and us. However, critical pieces of information to advance this technology to the point of advanced pre-clinical development are still largely missing. We developed a laser system to irradiate cultured cells with flat beam profile. We cultured human epithelial keratinocytes and measured CCL20 expressions with qRT-PCR after laser irradiations. Next, we focused on mitochondrial functions and established measurement methods to quantify reactive oxygen species with ESR and their oxygen consumption with oxygen sensor, respectively. These quantitative analysis will reveal the detailed mechanisms on immune activation with near infrared laser.

研究分野：生体医工学

キーワード：レーザー ワクチン アジュバント 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

現在世界中で使用されているワクチンは単独では感染防御に十分な免疫応答を誘導しないため、多くの場合免疫アジュバント(免疫賦活剤)混合することが必須になっている。しかし、開発段階や既に認可されているアジュバントでも投与部位の疼痛・炎症や疲労・筋肉痛などの全身反応といった重篤な副作用が報告されている(Coffman RL, Immunity, 2010; Rappuoli R, Nat Rev Immunol, 2011)。従って既存の化学または生物製剤による方法には限界があると考えられ、副作用が少なくかつ効果的な新しいアジュバントの開発が強く求められている。

近年、可視光レーザーの皮膚照射による物理的作用がワクチンにより誘導される免疫応答を増強し、免疫アジュバントとして機能するという研究が米国およびロシアより報告されたが(Chen X, PLoS ONE, 2010; Onikienko SB, Donosologiya, 2007)、このレーザーの免疫増強効果は非常に弱く、また可視レーザー光が皮膚のメラニン色素に吸収されるため皮膚色によって効果が異なるなど実用面での問題が多く指摘されていた。

2. 研究の目的

本研究は低出力の近赤外レーザー光を皮膚また粘膜に短時間照射するという簡便かつ安全な処置がワクチンに対する免疫アジュバントとして作用するという知見をもとに、近赤外光が免疫応答を増強する機序を細胞ならびに分子レベルにて解明することを目的とする。これらの実現により副作用を有する化学・生物製剤に代わり、より安全なレーザー照射という物理的作用による免疫アジュバントの臨床治験・応用が可能になり安全かつ効果的なワクチン開発を加速すると期待される。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞へのレーザー照射系の構築

図1に培養細胞へのレーザー照射系の概略を示した。1064 nmの連続レーザー光を24ウェル細胞培養プレートの1ウェルφ15.6 mmに照射する設計とした。照射するレーザー光の強度分布を一樣にするため、Expander, Homogenizerを経由して培養細胞に照射される。

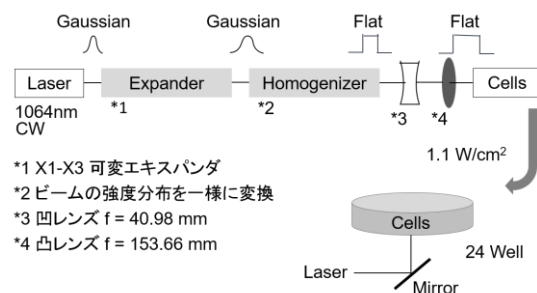


図1 近赤外レーザー照射系の概要

(2) レーザ照射によって発現する遺伝子の同定

ヒト表皮角化細胞 HEKa を HKGS (Human keratinocyte growth supplement, Life Technologies)を添加した培地 Epilife (Medium with 60 μm calcium, Life Technologies)を用いてガラス底 24 ウェルプレートに培養した(図2)。Confluentな状態を確認後、レーザー放射照度および照射時間を変えて照射した。

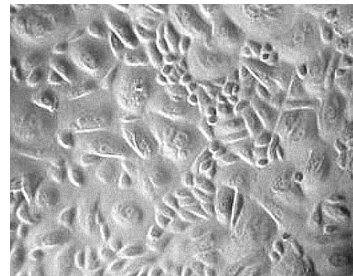


図2 培養 HEKa 細胞

マウスの実験でレーザー照射によって発現の増加が認められたサイトカイン CCL20 に着目し、qRT-PCR法にて mRNA の発現量を定量した。CCL20 のプライマー塩基配列は 'GCAAGCAACTTTGACTGCTG' (Forward), 'ATTTGCGCACACAGACAACT' (Reverse)', また、コントロールとして用いた β-actin は AGAAAATCTGGCACCACAC' (Forward), 'TTTGAGACCTTCAACAC' (Reverse) とした。

(3) 活性酸素の定量実験

レーザー照射による免疫活性化メカニズムに活性酸素(以下 ROS)が関与している作業仮説を実証するために、電子スピン共鳴法(以下 ESR)を用いて ROS を定量した。まず、フェントン反応によって発生する Hydroxyl Radical (•OH) をスピントラッピング剤である DMPO 及び CYPMPO を用いて方法の有効性を実証した。

次に ESR セル内にて培養した HEKa 細胞に 0, 52, 260, 520 mW/cm² でレーザー照射を 300 秒行い、直ちにスピントラッピング剤を添加した。37°Cにて 30 分間培養した後、ESR スペクトルを計測した。

(4) ミトコンドリアの単離と酸素消費量の推定

ROS の主な産生源がミトコンドリアであると仮定し、レーザー照射によって生じるミトコンドリアの変化、特に酸素消費量に着目し、単離したミトコンドリアの酸素消費量を推定する実験系を構築した。

麻醉下にてマウス肝臓を摘出し、ホモジナイズ後に遠心分離を行いミトコンドリアを単離した。呼吸バッファを調整し、0.5 mg/ml でミトコンドリア懸濁液を作製し、4 ml ガスタイトキュベットに入れ、攪拌子でゆるやかに攪拌しながらホットバスにて 37°C を維持

した. ニードル式マイクロ酸素濃度計 Microx TX3 を用いて呼吸バッファの酸素分圧を計測し, 酸素消費速度を定量した.

4. 研究成果

(1) 培養細胞へのレーザー照射系の構築

レーザー光源からのビームプロファイルおよびホモジナイザー通過後のプロファイルを図 3 に示した. 細胞へレーザー照射する際にガウシアン強度分布のまま照射すると培養細胞へ与えるエネルギーは培養部位によって異なる. 最終的に均一な強度分布 (点線) を縦横方向で 2.2 倍に拡大し, さらに散乱板を介して最終的に 24 ウェルプレートに照射する系を構築した.

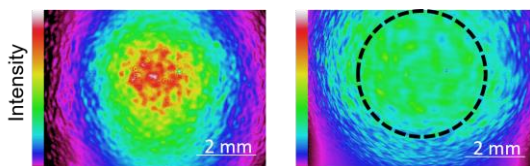


図 3 レーザの強度プロファイルの調整

(2) レーザ照射による CCL20 の発現量の定量解析

図 4 にレーザー光の放射照度に対する CCL20 の発現量を示した. 20 mW/cm² でやや増加し, それ以上の放射照度では減少する傾向が見られたが, 僅かな変化に留まっており, これはレーザーの放射照度や照射時間, 総エネルギーが最適では無かったか, あるいは 1064 nm のレーザー照射はヒト角化細胞の CCL20 発現にはほぼ影響しないことが考えられる. これまでに我々のグループではマウス皮膚にレーザーを照射した場合, CCL20 の有意な増加を明らかにしているが, *in vivo* と *in vitro* では環境が全く異なるため, *in vitro* 系では遺伝子発現に必要な条件が欠落しているか, または CCL20 の発現増加は角化細胞以外の主に免疫担当細胞に由来していると考えられる. 今後は培養系においても, 例えば肥満細胞の単独あるいは HEK 細胞との共培養系を実現し, レーザ照射を行うことで *in vivo* で得られた結果を再現することが可能になると思われる.

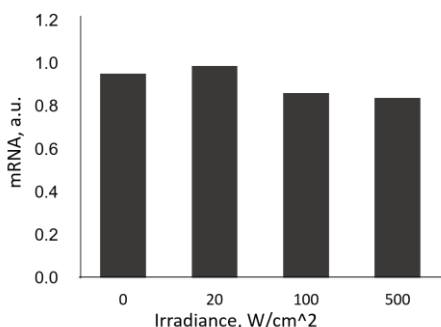


図 4 レーザの照射プロファイルの調整

(3) 活性酸素の定量実験

レーザー照射によって発生する ROS を検出するため, スピントラップ剤 DMPO で $\cdot\text{OH}$ を検出する方法を採用した. 図 5 は Fenton 反応によって生成させた $\cdot\text{OH}$ の ESR スペクトル, 同様に図 6 は CYPMPO を用いて $\text{O}_2^{\cdot-}$ を検出した ESR スペクトルである. CYPMPO は DMPO に比べて長時間シグナルを維持できる特徴があるため, レーザ照射後にサンプル調整を要する本法では CYPMPO が適していると思われた. また, これらは試薬反応系で生成させた ROS であり, ミトコンドリア試料から産生される微量な ROS を検出するためには, 培養細胞だけでなくミトコンドリアを単離し, 高濃度の懸濁液を作製することによって ROS の濃度を高める必要があると思われた.

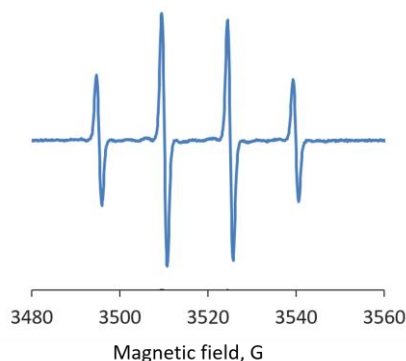


図 5 DMPO による $\cdot\text{OH}$ の検出

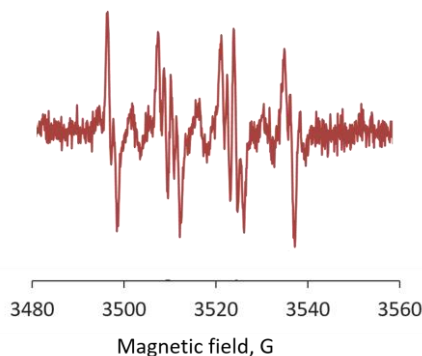


図 6 CYPMPO による $\text{O}_2^{\cdot-}$ の検出

(4) ミトコンドリア単離と酸素消費量の推定

前項で述べたように, レーザ照射によって生じる ROS はミトコンドリア由来であると仮定し, レーザ照射によってミトコンドリア機能に生じる変化を定量するために, 酸素消費量を計測した. 図 7 はガスタイトキューベット内のバッファの酸素分圧の時間変化を示している. 青・赤ラインは同条件でミトコンドリア懸濁液を作製し, 計測の再現性を確認した. この実験で得られた平均の酸素消費量は 14.3 nmol/min/mg と推定された. また, 黒線は酸素分圧 75mmHg に減少した時点で Antimycin-A を加え, ミトコンドリアの呼吸を抑制した結果, 酸素分圧の変化は完全に消失し, 従って酸素分圧の変化はミトコンドリア

アの呼吸に依るものであると示された。

今後、ミトコンドリア懸濁液に対してレーザを照射し、照射エネルギーに対するミトコンドリアの酸素消費量を測定することで、レーザと活性酸素の相互関係を明らかにする。

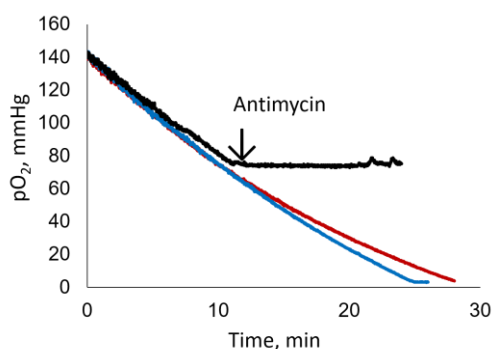


図7 ミトコンドリア酸素消費量の推定

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)

- ① Ishikawa M., Kajimura M., Morikawa T., Tsukada K., Tsuji T., Kusaka G., Tanaka Y., Suematsu M., Leukocyte plugging and cortical capillary flow after subarachnoid hemorrhage, *Acta Neurochirurgica*, in press. (査読あり)
- ② Sato A., Kadokura K., Uchida H., Tsukada K., An in vitro hepatic zonation model with a continuous oxygen gradient in a microdevice, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453, 767-71, 2014. (査読あり)
- ③ Yamada R., Tabuchi S., Tsukada K., Optical scanning of tissue oxygen tension and hypoxia imaging in solid tumors, *Advanced Biomedical Engineering*, 3, 65-71, 2014. (査読あり)

[学会発表] (計7件)

- ① Kadokura K., Sato A., Okazaki Y. and Tsukada K., A cell culture microdevice with a continuous oxygen gradient for microvascular research in vitro, 10th World Congress for Microcirculation, 2015.9.25, 京都国際会議場 (京都府・京都市) .
- ② Oda K., and Tsukada K., Quantification and imaging of regional vascular permeability and partial pressure oxygen, 10th World Congress for Microcirculation, 2015.9.25, 京都国際会議場

(京都府・京都市) .

- ③ Hase T., Tamano Y. and Tsukada K., Direct measurement of glycolytic metabolites with nanoparticle-based surface-enhanced Raman scattering, 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2015.8.29, Milano (Italy).
- ④ Kadokura K., Sato A., Uchida H. and Tsukada K., Angiogenesis imaging in a cell culture microfluidic device mimicking the tumor microenvironment, 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2015.8.28, Milano (Italy).
- ⑤ Ando Y., Yanagisawa Y. and Tsukada K., An organic light-emitting diode for oxygen sensing based on phosphorescence lifetime, 2014 Annual Meeting of BMES, 2014.10.23, San Antonio (USA).
- ⑥ Morse K., Yuan J., Forbes B.M., Hibert M.L., Lee E.L.Q., Tan R.Y.Y., Whicher L., Goudie C., Yang Y., Chen T., Edelblute B., Collette B., Edington L., Trussler J., Nezivar J., Leblanc P., Bronson R., Tsukada K., Suematsu M., Dover J., Brauns t., Gelfand J., Poznansky M.C., Kashiwagi S., Near-Infrared Lasers to Adjuvant Vaccines, Infectious Disease World Summit, 2014.7, Boston (USA).
- ⑦ Tsukada K., Laser-assisted hypoxia imaging for tumor biology, 37th Naito Conference, 2014.7.17, ヒルトンニセコビレッジ (北海道・虻田郡ニセコ町).

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚田 孝祐 (TSUKADA, Kosuke)
慶應義塾大学・理工学部・准教授
研究者番号：00351883

(2)連携研究者

末松 誠 (SUEMATSU, Makoto)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：00206385