

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860775

研究課題名(和文) 高活性型ケモカインを用いたCTL誘導型ワクチンアジュバントの開発

研究課題名(英文) Development of adjuvants for CTL induction using high active form of lymphotactin/XCL1

研究代表者

松尾 一彦 (MATSUO, Kazuhiko)

近畿大学・薬学部・助教

研究者番号：70615921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ケモカイン受容体XCR1がCTL誘導に特化した樹状細胞に選択的に発現することが明らかとなり、XCR1のリガンドであるXCL1のCTL誘導アジュバントへの応用が期待されている。本研究では、XCL1の構造変異体(XCL1-CC3)を作製し、XCL1-CC3が野生型XCL1-WTに比べて細胞遊走活性が向上することを明らかとした。また、in vivoにおいてXCL1-CC3は有意にCD103陽性樹状細胞を抗原投与部位に集積させ、OVA特異的CTL誘導を促進した。さらに、XCL1-CC3を併用投与したマウスにおいては非常に強力な抗腫瘍効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have indicated that targeting antigens to XCR1, a chemokine receptor selectively expressed on cross-presenting dendritic cells using antigen fused to XCL1/Lymphotactin, an XCR1 ligand, represents an effective induction of CD8+ T cell response. In this study, we generate a high active form of XCL1 (XCL1-CC3) and investigate in vivo adjuvant efficacy. Wild-type XCL1 (XCL1-WT) have higher cell migration activity and calcium mobilization activity than XCL1-CC3. When intradermally injected with ovalbumin as a model antigen, both XCL1-WT and XCL1-CC3 induced potent CD8+ T cell responses and XCL1-CC3 showed more effective CD8+ T cell-mediated antitumor immunity than XCL1-WT. In addition, XCL1-CC3 enhanced an accumulation of CD103+XCR1+ cross-presenting dendritic cells rather than XCL1-WT. The present results indicate that XCL1-CC3 has potential to induce more efficient CD8+ T cells responses as CTL-inducing vaccine adjuvant than XCL1-WT.

研究分野：免疫学

キーワード：ケモカイン ワクチン アジュバント CTL

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は従来の注射型ワクチンに代わる簡便で低侵襲なマイクロニードル型経皮ワクチン製剤の開発研究の立ち上げに携わり、基礎・前臨床研究において本製剤が感染症予防効果を発揮することを実証してきた。また、本剤は健康人に対して安全に適用できることを報告しており、現在インフルエンザ経皮ワクチン製剤の安全性および有効性を検証する臨床研究を推進している。これらは早期実用化が期待され、国際的にも非常に注目を集めている。

しかしながら、現行のワクチンは抗原特異的 IgG 抗体の誘導は達成するものの、ウイルス感染細胞や癌細胞の排除に実質的な役割を果たす細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導能に乏しい。従って、より有効なワクチンの開発においては CTL 誘導を達成しうる新規免疫賦活剤 (アジュバント) の開発が必要となる。

ワクチンによる抗原特異的免疫誘導機構としては、まず樹状細胞が投与された抗原を認識、捕捉し、その抗原情報を T 細胞や B 細胞に提示することによって、抗原特異的免疫応答が誘導される。昨今の免疫学研究において、皮膚の真皮組織に存在する CD103 陽性真皮樹状細胞 (CD103+dDC) は CTL の誘導に特化していること、この DC にはケモカインレセプター XCR1 が選択的に発現していることが報告された。

そこで、本研究では XCR1 に対するケモカインである XCL1 を投与することで CD103+dDC を抗原投与部位へと積極的に集積させ、その細胞に対する抗原送達効率を向上させることで CTL 誘導を促進しうる新たなケモカインアジュバントという概念を提案する。そして最終的には、インフルエンザワクチンや癌ワクチンへの応用を試みる。

2. 研究の目的

本研究では、免疫誘導の司令塔である樹状細胞のうち、ケモカインレセプターとして XCR1 を発現する樹状細胞が細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導に特化しているという知見に基づき、XCR1 に対するケモカインである XCL1 をワクチンアジュバント候補として選択し、その活性増強体 XCL1 を CTL 誘導型アジュバントとして開発することを目的としている。ケモカインを利用して CTL の誘導を促進する新規ワクチンアジュバントの概念を提案し、癌ワクチンへの応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

CHO-F 細胞、293-F 細胞はそれぞれ CHO Expression Medium、293 Expression medium を用いて、37℃、8% CO₂ 条件下で振とう培養した。CHO-F 細胞、293-F 細胞は Life technologies 社より購入した。

mXCR1 安定発現細胞株 (L-mXCR1) は

RPMI1640 (10%FBS、50 μM 2-ME、抗生物質 (ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液)、L-glutamine、NEAA) を用いて、37℃、5% CO₂ 条件下で培養した。なお、FBS は 56℃、30 分間の非道化処理を行った。

(2) 細胞単離

回収した皮膚を RPMI1640 (20% FBS 0.247 U/ml Collagenase D type 7.5 mg DNase 25 μl を含む) 5 ml に浸し、37℃、8% CO₂ 条件下で 1 時間振とう培養した。その後、4 倍量の PBS を加え、70 μl Cell Strainer を通し 2000 rpm 15 分遠心した。上清を除去し、staining buffer で細胞濃度を調整した。

(3) ケモカイン精製

プラスミド 37.5 μl (1000 ng/μl pcDNA3.1-mXCL1-His ならびに pcDNA3.1-mXCL1-CC3-His) と Opti Pro SFM 562.5 μl を混和したプラスミド溶液と、FreeStyle MAX reagent 37.5 μl と Opti Pro SFM 562.5 μl を混和した FreeStyle MAX reagent 溶液を混和し、室温で 10 分間静置した。1×10⁶ cells/ml に調製した CHO-F 細胞あるいは 293-F 細胞にプラスミド-FreeStyle MAX reagent 混合溶液を添加し、37℃、8% CO₂ 条件下で 3 日間振とう培養した。培養上清を回収し、His-Trap を用いて標準プロトコルに従って mXCL1-His ならびに mXCL1-CC3-His を精製した。

(4) 細胞遊走活性

L-mXCR1 を RPMI1640 (0.5% BSA、20 mM HEPES (pH 7.4)、without phenol red) にて 1×10⁷ cells/ml に調製した。L-mXCR1 を CHEMOTX chemotaxis chamber の upper well に 25 μl/well で添加し、作製した mXCL1-His ならびに mXCL1-CC3-His を lower well に 300 μl/well で添加した。37℃、5% CO₂ 条件下で 1 時間静置した後に、lower well に遊走した細胞を回収した。0.1% Triton X-100 で融解し、PicoGreen double-stranded DNA quantitation reagent を用いて定量した。

(5) Ca²⁺濃度上昇反応測定

L-mXCR1 を HBSS (0.1% BSA および 10 mM HEPES (pH7.4) を含む) にて 1×10⁶ cells/ml に調製し、3 μM fura-2AM を添加した。洗浄後、細胞を F3000 fluorescence spectrophotometer 用キュベットに添加し、野生体 XCL1 ならびに XCL1-CC3 で刺激した。340 nm と 380 nm で励起し、510 nm の蛍光を測定し、蛍光強度比 (R340/380) を算出した。

(6) フローサイトメトリー

staining buffer で調整した細胞に対して、Fc block を添加し、4℃で 30 分間静置した。その後、FITC 標識 anti-mouse CD8 ならびに PE 標識 H-2Kb OVA Tetramer-SIINFEKL を添加し、4℃で 30 分間静置した。1 ml の staining buffer を添加し、2000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除去し、500 μl の staining buffer で懸濁して、フローサイトメーターにより解析した。

(7) 抗腫瘍効果

C57BL/6 マウスに対して OVA (100 µg)、XCL1-His (30 µg) と OVA (100 µg) の混合溶液、XCL1-CC3-His (30 µg) と OVA (100 µg) の混合溶液を 1 週間隔で 3 回皮内投与した。最終免疫の 1 週間後に E.G7-OVA 細胞を 5×10^5 cells/50 µL 皮内生着させた。経日的に腫瘍の長径および短径を測り、反楕円の体積公式 (長径 \times 短径 2×0.5236) に当てはめ算出した。なお、腫瘍長径が 20 mm を超えたマウスは安楽死させた。

(8) CD103 陽性 DC の集積率

投与 0 時間、3 時間、6 時間、12 時間後の投与部位の皮膚組織から細胞を単離し、集積した DC の割合をフローサイトメーターにより解析した。抗体は Percp-Cy5.5 標識 anti-mouse CD45、APC 標識 anti-mouse MHC class II、PE/Cy7 標識 anti-mouse CD11b、FITC 標識 anti-mouse CD103 を用いた。

4. 研究成果

(1) 哺乳動物由来細胞株で作製した野生体 XCL1 ならびに高活性型変異体 XCL1-CC3 の細胞遊走活性の評価

XCL1 は他のケモカインと異なり、一つの S-S 結合のみを持ち、C 末端には 22 アミノ酸のムチン様ドメイン (セリンとスレオニンの集合体) が存在する。この領域は、O 型糖鎖付与されており、活性において重要な領域であることが明らかとなっている。このことから、ケモカイン蛋白質はその活性に糖鎖の結合が重要な役割を果たすと言える。しかしながら、市販されているリコンビナント XCL1 は大腸菌から作製されている為、作製した蛋白質に糖鎖付与が起こらない。高活性 XCL1 の作製のために、糖鎖付与 XCL1 の作製を試みた。そこで、糖鎖構造の異なる哺乳動物由来の細胞株である CHO-F 細胞と HEK293-F 細胞から野生型 XCL1 ならびに高活性型変異体 XCL1-CC3 を作製し、細胞遊走活性を検討した。

その結果、CHO-F 細胞および 293-F 細胞のいずれにおいても、野生体 XCL1 より高活性型変異体 XCL1-CC3 のピークは低濃度側にシフトしており、活性の向上が見られた。さらに、CHO-F 細胞および 293-F 細胞で作製した高活性型変異体 XCL1-CC3 の活性を比較すると、293-F 細胞で作製した高活性型変異体 XCL1-CC3 の方が低濃度でより高い活性を示した (図 1)。このことから、高活性型変異体 XCL1-CC3 は野生体 XCL1 に比べて細胞遊走活性が高いことが明らかとなり、さらに CHO-F 細胞より 293-F 細胞による糖鎖結合がより活性を上昇させると考えられる。

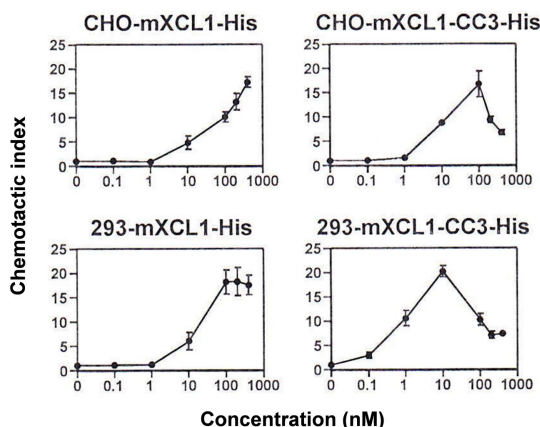


図 1. 細胞遊走活性評価

(2) 293-F 細胞で作製した野生体 XCL1 ならびに高活性型変異体 XCL1-CC3 の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇反応の測定

ケモカイン受容体は 7 回膜貫通型タンパク質に結合している三量体 G タンパク質を介してシグナルを伝達する。G タンパク質のサブユニットは主に細胞遊走活性に関与し、サブユニットを介した細胞内 Ca 放出は、血管新生や抗アポトーシス活性等を誘導すると考えられている。そこで、293-F 細胞で作製した野生体 XCL1 ならびに高活性型変異体 XCL1-CC3 滴下後の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇反応を検討した。

293-mXCL1 ならびに 293-mXCL1-CC3 のいずれにおいても濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇反応が見られたが、293-mXCL1-CC3 併用群の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇反応の方が強い事が明らかとなった (図 2)。このことから、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇反応についても 293-mXCL1-CC3 は 293-mXCL1 に比べて活性が強いことが判明した。

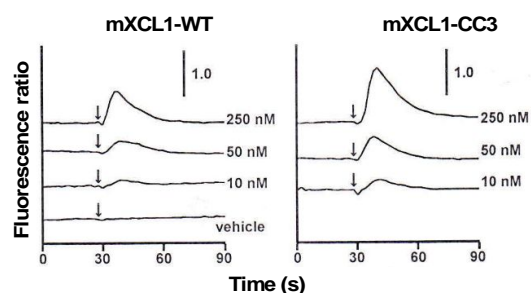


図 2. 細胞内カルシウム濃度上昇反応

(3) 抗原投与部位における CD103+DC 集積率の検討

クロスプレゼンテーションに優れている CD11b-CD103+DC には特異的に XCR1 が発現している。XCR1 のリガンドである XCL1 を抗原と共投与することで、投与部位に CD11b-CD103+XCR1+DC が集積すると考えられる。そこで、各免疫群による DC 集積率を検討した。

各免疫群で、投与 6 時間後の XCR1 陽性の

CD11b-CD103+ DC の集積率は増加したが、293-mXCL1-CC3 併用群で最も有意な差が得られた(図3)。また、CD11b+CD103-XCR1-DC、CD11b-CD103-XCR1-DC についても増加傾向を示したが、各免疫群で差は見られなかった。これは、293-mXCL1-CC3 は XCR1+DC を積極的に集積させたことを示している。

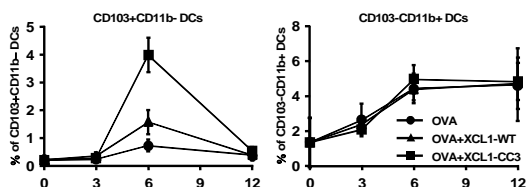


図3 . In vivo における CD103 陽性樹状細胞の集積率の解析

(4) 293-F 細胞で作製した高活性型変異体 XCL1-CC3 の CTL 誘導能の検討

抗原を取り込んだ DC は所属リンパ節に遊走され、そこでナイーブ CD8+T 細胞に抗原提示を行う。これにより、ナイーブ CD8+T 細胞は、抗原特異的 CTL へと分化される。所属リンパ節にて誘導された CTL は標的へと遊走され、パーフォリンやグランザイムなどを分泌し、標的細胞を破壊する。そこで、CTL 誘導の場である所属リンパ節についてフローサイトメトリー解析を行い、抗原特異的 CTL を検出した。

293-mXCL1 では OVA 単独群の約 2 倍の OVA 特異的 CTL を誘導したが、293-mXCL1-CC3 併用群では OVA 単独群の約 4 倍 OVA 特異的 CTL 誘導効率が上昇した(図4)。このことから、293-F 細胞で作製した高活性型変異体 XCL1-CC3 は CTL 誘導アジュバントとして有用である事が示唆された。

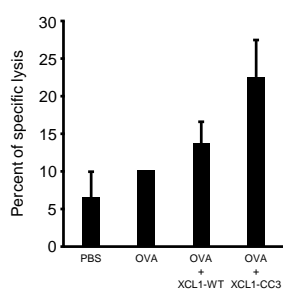


図4 . OVA 特異的 CTL 誘導効率の評価

(5) 293-F 細胞で作製した高活性型変異体 XCL1-CC3 の抗腫瘍効果

誘導された OVA 特異的 CTL の細胞傷害活性を検討するために、E.G7-OVA 腫瘍細胞を皮内接種し、E.G7-OVA 細胞の腫瘍増殖を比較した。その結果、293-mXCL1-CC3 併用群で、腫瘍増殖が最も抑制され、一部のマウスにおいては完全に腫瘍の生着が拒絶された(図5)。

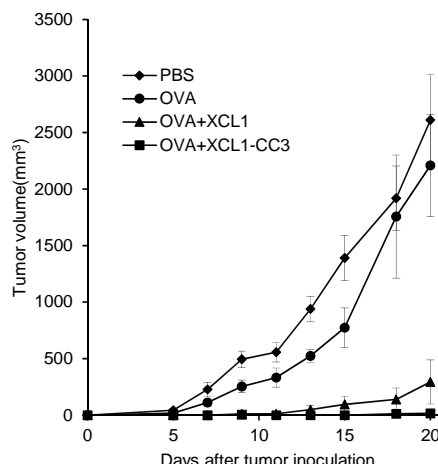


図5 . 抗腫瘍効果の検討

これらの結果から、高活性型変異体 XCL1-CC3 は野生型 XCL1-WT に比べて、in vivo においても XCR1 発現 CD103 陽性樹状細胞の集積率が非常に高く、CD103 陽性樹状細胞の CD8 陽性 T 細胞への抗原提示、抗原特異的 CTL 誘導、さらには抗腫瘍効果を促進できることを明らかとした。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

Matsuo K, Koizumi K, Fujita M, Morikawa T, Jo M, Shibahara N, Saiki I, Yoshie O, Nakayama T. Efficient use of a crude drug/herb library reveals Ehedra Herb as a specific antagonist for Th2-specific chemokine receptors CCR3, CCR4, and CCR8. *Front. Cell Dev. Biol.* 2016, 4, 54.

Matsuo K, Itoh T, Koyama A, Imamura R, Kawai S, Nishiwaki K, Oiso N, Kawada A, Yoshie O, Nakayama T. CCR4 is critically involved in effective antitumor immunity in mice bearing intradermal B16 melanoma. *Cancer Lett.* 2016, 378, 16-22.

[学会発表](計 7 件)

石橋美保、松尾一彦、川端史花、北畑孝祐、中山隆志 高活性型 lymphotactin/XCL1 を用いたがんワクチンアジュバントの開発 日本薬学会第 137 年会(仙台国際センター、宮城)2017 年 3 月 25 ~ 27 日

YAMAMOTO Shinya, MATSUO Kazuhiko, YOSHIE Osamu, NAKAYAMA Takashi. A CC3

variant of lymphotactin/XCL1 (XCL1-CC3) functions as a potent adjuvant to accumulate CD103+XCR1+ cross-presenting dendritic cells and induce antigen-specific CD8+ T cell responses. 第45回日本免疫学会学術集会(沖縄コンベンションセンター、沖縄) 2016年12月5~7日

Shinya Yamamoto, Kazuhiko Matsuo, Takashi Nakayama. A CC3 variant of lymphotactin/XCL1(XCL1-CC3) is an effective CTL-inducing adjuvant for cancer immunotherapy. The 12th International Conference on Protein Phosphatase (Kindai University, Osaka) 2016年10月27~30日

北畑孝祐、松尾一彦、義江修、中山隆志 高活性型 lymphotactin/XCL1 を用いたがんワクチンアジュバントの開発 第66回日本薬学会近畿支部総会・大会(大阪薬科大学、大阪) 2016年10月15日

川端史花、松尾一彦、長谷川裕太、西馬伶、中山隆志 ケモカイン lymphotactin/XCL1 を用いた CTL 誘導アジュバントの開発 日本薬学会第136年会(パシフィコ横浜、神奈川) 2016年3月27~29日

長谷川裕太、松尾一彦、中山隆志 高活性型 lymphotactin/XCL1 の作製ならびに CTL 誘導能 第65回日本薬学会近畿支部大会・総会(大阪大谷大学、大阪) 2015年10月17日

Kazuhiko Matsuo, Takashi Nakayama. Roles of chemokines in immune response induction and their application for vaccine development. Kinki Univ Anti-aring Mini-sympo2014 (近畿大学、大阪) 2014年6月7日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 一彦 (MATSUO, Kazuhiko)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：70615921