

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09590

研究課題名(和文)感染症に対する新規ワクチンシステムの基盤研究

研究課題名(英文)Evaluation of new type of vaccine strategy against infectious diseases

研究代表者

清水 佳奈子(Shimizu, Kanako)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：20391980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：感染症に対するワクチンの究極の目標は長期に渡る獲得免疫と液性免疫の誘導にある。我々はNKトリグランドと蛋白抗原を含有した細胞ワクチン、人工アジュバントベクター細胞(aAVC)を用いて、生体内成熟化DCが通常の抗原特異的CD4+ T細胞のみならず、CD4Tfhを誘導することで長期に渡る抗体産生誘導につながることを明らかにした。さらに、インフルエンザ感染モデルに応用し、HA抗原発現aAVC(aAVC-HA)を一度免疫するだけで、致死量のインフルエンザを接種した場合においても著明な防御効果を示すことを明らかにした。これにより、生体内DC標的療法であるaAVCはウイルス感染に有用であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The goal of vaccines against infectious diseases is to induce long-term cellular and humoral immunity. Development of synthetic anti-viral vaccines that trigger CD4+ T cell-dependent B cell immune responses has been attempted. Here, we show, using a cellular vaccine carrying foreign protein antigen plus iNKT cell glycolipid antigen, designated as artificial adjuvant vector cells (aAVCs), that mature DCs in situ elicit not only ordinal antigen-specific CD4+ T cells, but also CD4+ Tfh and germinal center, resulted in inducing long-term antibody production. As a mechanism, CD4+ Tfh cells, but not Bcl6-/- CD4+ T or iNKTfh cells played an important role. To develop it for influenza infection, we established influenza hemagglutinin-carrying aAVC (aAVC-HA) and found that all the mice vaccinated with aAVC-HA were protected from influenza infection. Thus, the in vivo DC targeting therapy by aAVC would be useful for protection against viral infection.

研究分野：免疫学

キーワード：in vivo DC targeting NKT antibody CD4Tfh influenza

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでの研究で、NK・NKT細胞(自然免疫)とキラーT細胞(獲得免疫)の両者を同時に活性化でき(J Exp Med 2007, Blood 2009)、更には免疫記憶化させることができるワクチンシステムを構築した(J Immunol 2013)。この多機能性免疫応答を誘導できるワクチンシステムを人工アジュバントベクター細胞(artificial adjuvant vector cell:aAVC)と呼んでいる。aAVCは、標的蛋白抗原とアジュバント作用を有しているワクチン誘導細胞であり、具体的には他家細胞に自然免疫リンパ球であるNKT細胞のリガンド(α -GalCer : α -ガラクトシルセラミド)を付加し、標的抗原 mRNA と CD1d mRNA を遺伝子導入した事で構成される(図1)

aAVCの免疫学的機序について説明する。このワクチンの最初のトリガーとなる免疫細胞であるNKT細胞は自然免疫の代表的な細胞で、T細胞受容体(TCR)の α 鎖に可変性のないインバリアント鎖を有する。抗原刺激やIL-12などの炎症性サイトカインにより短時間で大量のサイトカイン(特にIFN- γ)を産生し、直接抗腫瘍活性を発揮すると同時に、NK細胞を活性化することで、自然免疫全体を活性化できる。(Fujii et al. Blood 2009)。aAVCによる獲得免疫応答の誘導は、この細胞をワクチンとして投与すると、投与したaAVCが殺傷され、速やかに生体内の樹状細胞に取り込まれる。そうするとaAVCに発現している標的抗原 mRNA 由来の蛋白抗原を効率よくCD8⁺T細胞へ抗原提示し、抗腫瘍細胞傷害性T細胞を誘導する(Fujii et al. Blood 2009, Oncoimmunology 2013)。さらに、最近メモリーCD8⁺T細胞を誘導できることも明らかにした(Shimizu et al, J Immunol 2013)。即ち、この方法は死細胞を効率よく取り込むと言う樹状細胞の特性を利用した生体内樹状細胞機能の最大限活用化している方法といえる(Fujii et al, J Exp Med 2003, 2004)。

2. 研究の目的

近年インフルエンザH1N1型によるパンデミック感染やデボラ出血熱等の新興感染症の

脅威が世界的に強まっている。このような感染症は環境異常やグローバル化が進むにつれ今後益々大きな問題となりうる。感染症に対するワクチンシステムの基盤研究は治療薬の開発と共に重要な課題である。本研究では、我々が開発を進めてきたaAVCワクチンシステムを感染症の防御に応用するべく、特にCD4⁺T細胞を介した液性免疫の誘導に着目し、ワクチンの開発と同時に抗体産生誘導の免疫学的機序を解明することを目的とした。特に、感染症モデルとしてはインフルエンザ感染症モデルを用い、感染防御効果と免疫応答からその有効性を評価し、基礎的な知見の蓄積と将来的な創薬の可能性を探る。

3. 研究の方法

感染症に対するaAVCワクチンの有用性について、液性免疫の誘導効果に着目し、モデル抗原およびインフルエンザ感染症モデルで検証する。以下の項目に関して検討を行った。

(1) OVA発現aAVC(aAVC-OVA)のアジュバント効果と他のアジュバントとの比較検討

aAVC-OVA、またそれに含まれるOVA蛋白量と同等のOVA蛋白とAlumまたは α -GalCerを免疫し、OVA特異的抗体アイソタイプを測定し、抗体産生の誘導効率を比較検討した。

(2) 抗体産生と誘導されたNKT細胞およびCD4⁺T細胞の特性評価

aAVCはNKT細胞の活性化をトリガーに免疫カスケードが起動する。最近の報告ではNKT細胞の中にNKTfhとして抗体産生誘導をサブセットが存在する。そこで、抗体産生がCD4⁺T、NKT細胞いずれに依存しているのかをCD4KO, MHC Class II KOマウスを用いて検討した。さらに、OVA特異的CD4⁺T細胞であるOT2を用いて、WT OT2およびBcl6cKO OT2の免疫応答性を評価した。

(3) 抗原提示細胞の評価

CD4⁺T細胞を誘導する樹状細胞サブセットを同定する。樹状細胞については、CD11c-DTRマウス、XCR1-DTR-Vneusマウスを用いて、

CD4⁺T 細胞誘導に必要な樹状細胞サブセットを検証した。

(4) 抗体産生の boosting 効果、および長期抗体産生の評価

aAVC-OVA を用いてマウスを免疫し(1次免疫)、aAVC-OVA または α -GalCer を添加した樹状細胞(DC/Gal)で2回目の免疫を行い、OVA 特異的抗体を測定し、boosting 効果を判定した。抗体産生の2次応答に CD4⁺T 細胞、または NKT 細胞のいずれが必須であるかを検討した。

(5) インフルエンザ感染モデルでの aAVC ワクチンの有用性の評価

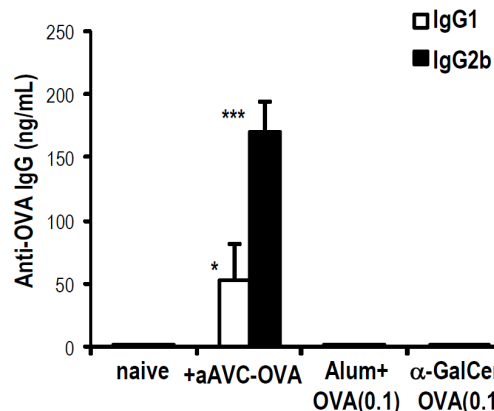
インフルエンザ PR8 株の HA 抗原を発現させた aAVC-HA を作製し、従来のインフルエンザワクチン(不活化ワクチン)との抗体産生効果の比較検討と、インフルエンザ感染における防御効果を検証した。

4. 研究成果

(1) OVA 発現 aAVC のアジュバンド効果と他のアジュバンドとの比較検討

aAVC-OVA は細胞内に OVA 蛋白を 100-200 ng/5x10⁵ cells で含有する。1) aAVC-OVA, 2) OVA 蛋白 100ng+Alum, 3) OVA 蛋白 100ng+ α -GalCer 2ug をマウスに免疫し、2週間後に抗 OVA 抗体の IgG1, IgG2b アイソタイプを測定した結果、OVA+Alum, OVA+ α -GalCer では抗体が検出されなかったのに対し、aAVC-OVA では IgG2b 優位の抗体産生を認めた(図1)。Alum 群において OVA 蛋白量を 1000 倍増量すると、aAVC-OVA と同等の IgG2b, IgG1 に関しては aAVC-OVA を凌駕する抗体産生を認めた。また、免疫したマウスの脾臓を調べたところ、aAVC ワクチンでは高率に胚中心ができることが判明した。つまり aAVC では type I 優位の抗体産生を効率的に誘導できることを示唆した。

図1



(2) 抗体産生と誘導された NKT 細胞および CD4T 細胞の特性評価

CD4KO, MHC class II KO マウスでは、NKTfh は WT マウスと同様に誘導されるにも拘らず、いずれも抗体産生が全く検出できなかった(図2)。よって、aAVC の抗体産生は CD4⁺T 細胞依存性であることが明らかとなった。次に CD4Tfh 細胞が誘導されない、Bcl6cKO マウスに aAVC-OVA を免疫したところ、やはり抗体産生は認められなかった。さらに、Bcl6 cKO マウスに野生型の OT2 を輸注し、aAVC-OVA を免疫し、抗体産生を評価したところ、抗体産生が回復することが判明した(図4)。よって aAVC ワクチンシステムでは CD4Tfh 細胞が抗体産生に必須であることが明らかとなった。

図2

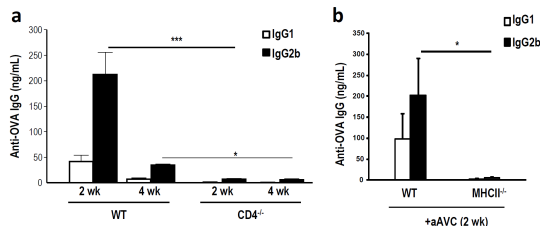


図3

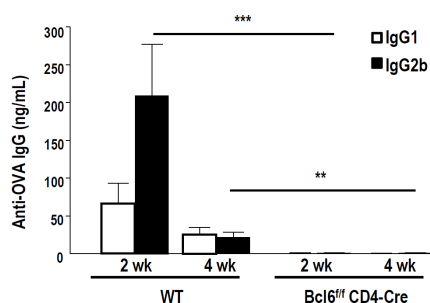
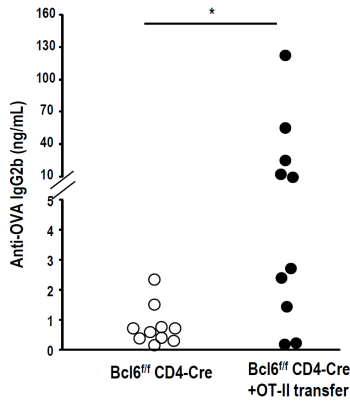


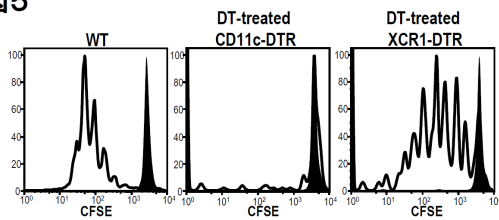
図4



(3) 抗原提示細胞の評価

CFSE で標識した OT2 細胞を 1) WT, 2) DT 処理した CD11c-DTR マウス、3) DT 処理した XCR1-DTR マウスに輸注し、翌日に aAVC-OVA を免疫した。さらに 3 日後に CFSE dilution により、OT2 細胞の増殖を評価したところ、DC を全て除去すると、CD4⁺T 細胞の応答が起きないのに対し、XCR1 陽性 DC サブセットのみを除去したマウスでは若干抑制されるものの、明らかに OT2 細胞が増殖していることがわかった(図 5)。これにより、CD4⁺T 細胞に対しては XCR1 陰性 DC サブセットが関与していることが判明した。

図5

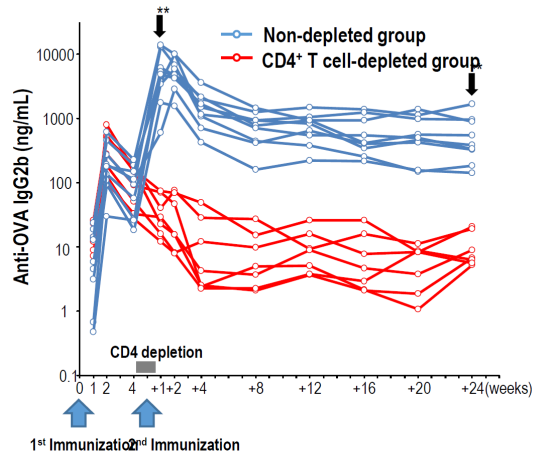


(4) 抗体産生の boosting 効果、および長期抗体産生の評価

aAVC-OVA をマウスに免疫し、aAVC-OVA または α -GalCer を添加した樹状細胞(DC/Gal)で 2 回目の boosting を行うと、aAVC-OVA では boosting 効果を認めるのに対し、DC/Gal では認めなかった。逆に、CD4⁺T 細胞を boosting 前に除去すると全く boosting 効果は認められなかった。これにより、boosting 効果は NKT ではなく CD4⁺T 細胞依存性であることがわかった。また Boosting により 6-12 ヶ月以上にわたり、高力価の抗体を維持することが

できることが判明した(図 6)。

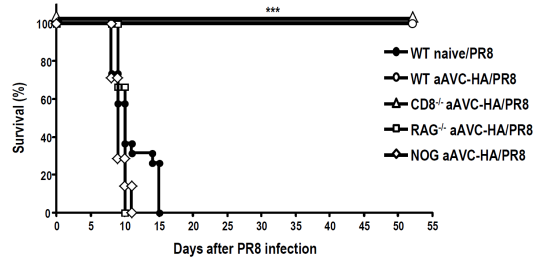
図6



(5) インフルエンザ感染モデルでの aAVC ワクチンの有用性の評価

インフルエンザ PR8 株の HA 抗原を発現させた aAVC-HA を作製し、従来のインフルエンザワクチン(不活化ワクチン)との抗体産生効果の比較検討したところ、aAVC-HA は従来のワクチンに比べ約 10 倍の抗体産生を誘導することが判明した。次に、aAVC-HA をマウスに免疫し、2 週間後に致死量のインフルエンザ接種し、体重と生存率を測定した。その結果、ワクチン群では、体重減少等の症状もなく全てのマウスが生存することを確認した(図 7)。これにより、aAVC ワクチンシステムは長期抗体誘導に優れ、感染モデルにおいても有効な防御効果をもたらすことが判明した。

図7



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 7 件)

1. Fujii S, Yamasaki S, Sato Y and Shimizu K.
Vaccine designs utilizing

invariant(i)NKT-licensed antigen presenting cells (APCs) provide iNKT or T cell help for B cell responses. *Front Immunol.* In press 査読有

2. Fujii S and Shimizu K. Exploiting antitumor immunotherapeutic novel strategies by deciphering the cross talk between invariant NKT cells and dendritic cells. *Front Immunol.* 2017, 8:886. 査読有
3. Yamasaki S, Shimizu K, Kometani K, Sakurai M, Kawamura M, and Fujii S. *In vivo* dendritic cell targeting cellular vaccine induces CD4⁺ Tfh cell-dependent antibody against influenza virus. *Sci Rep* 2016, 6:35173. 査読有
4. Shimizu K, Yamasaki S, Shinga J, Sato Y, Watanabe T, Ohara O, Kuzushima K, Yagita H, Komuro Y, Asakura M, and Fujii S. Systemic DC activation modulates the tumor microenvironment and shapes the long-lived tumor-specific memory mediated by CD8⁺ T cells. *Cancer Res* 2016, 76:3756-66. 査読有
5. 清水佳奈子 「NK, NKT 細胞について教えてください」がん免疫療法 *Cancer Immunotherapy* 2018, 2 (1):36-38. 査読無
6. 藤井眞一郎、山崎哲、伊豫田智典、清水佳奈子「最近の樹状細胞の基礎的知見から次世代樹状細胞標的療法への展望」**臨床免疫・アレルギー科** 2017. 67(6):560-566 査読無
7. 藤井 眞一郎、山崎哲、清水佳奈子 「がん免疫における樹状細胞の役割」**炎症と免疫** 2017. 25(6):66-71 査読無

[学会発表](計 4 件)

- 1) Kanako Shimizu “Systemic and potent DC activation modulates the tumor microenvironment and shapes the long-lived tumor-specific

memory T cells” The 75th Annual meeting of the Japanese Cancer association, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan 10/8/2017 (Workshop, oral)

- 2) Kanako Shimizu “Transfer of mRNA encoding invariant NKT cell receptors imparts glycolipid specific responses to T cells and $\gamma\delta$ T cells” The 8th Annual Meeting of Society of Immunotherapy for Hematological Disorders, The Alumni Hall ”Frate” , Hokkaido University, Sapporo, Japan 9/3/2017 (Workshop, oral)
- 3) Kanako Shimizu “**Strong antitumor response and immunological memory elicited by NKT cell-licensed, tumor antigen captured DCs *in situ* as a new type of cancer vaccine**” The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, Sapporo, 11/19/2015 (Workshop, oral)
- 4) Kanako Shimizu “**Strong antitumor response and immunological memory immunity elicited by NKT cell-licensed, tumor antigen captured DCs *in situ* as a new type of cancer vaccine**” Cell Symposia , Sitges, Spain, 6/15/2015 (poster)

[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：
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

清水 佳奈子 (SHIMIZU, Kanako)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医
科学研究センター・上級研究員

研究者番号：20391980

(2)研究分担者

藤井 眞一郎 (FUJII, Shin-ichiro) 国立研
究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研
究センター・チームリーダー

研究者番号：10392094

(3) 研究分担者

山崎 哲 (YAMASAKI, Satoru) 国立研究開発
法人理化学研究所・統合生命医科学研究セン
ター・研究員

研究者番号：30392161

(4)研究協力者

()