

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18873

研究課題名(和文) 粘膜免疫誘導ワクチンとしてのアデノウイルスベクターの開発とメカニズム解明

研究課題名(英文) Mechanisms of induction of mucosal immunity by adenovirus vector vaccine

研究代表者

立花 雅史 (Tachibana, Masashi)

大阪大学・薬学研究科・特任准教授

研究者番号：80513449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜面を初発感染部位とする新興・再興感染症に対する効果的なワクチンとしては、全身及び粘膜の双方において強い免疫応答を誘導可能であることが望まれている。アデノウイルスベクター(Adv)を筋肉内へ投与すると、全身だけでなく粘膜面においても搭載抗原特異的なCD8+ T細胞を強く誘導可能である。本研究では、Advのワクチン効果発現メカニズムについて検討し、I型インターフェロン(Type I IFN)によって誘導されるIL-17産生性ヘルパーT細胞(Th17)が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Few of the current vaccines can induce antigen (Ag)-specific immunity in both mucosal and systemic compartments. Hence, the development of vaccines that realize both protections against various pathogens is a high priority in global health. It was reported that intramuscular vaccination of an adenovirus vector (Adv) can induce Ag-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in both systemic and gut-mucosal compartments. We previously revealed that type I IFN signaling is required for the induction of gut-mucosal, not systemic, CTLs, following the vaccination. Here, we revealed that type I IFN is required for the induction of Ag-specific Th17 cells, which could promote the induction of Ag-specific CTLs selectively in the gut mucosa. These data suggested that Th17 cells translate systemic type I IFN into gut-mucosal CTL response following the vaccination. Our findings should lead to the development of promising Adv vaccines that can establish both systemic and gut-mucosal protective immunity.

研究分野：免疫学、分子細胞生物学

キーワード：アデノウイルスベクター 粘膜ワクチン Th17 Type I IFN 炎症性樹状細胞 炎症性単球

## 1. 研究開始当初の背景

近年、猛威を振るっているエイズや結核などの新興・再興感染症の多くは粘膜面を初発感染部位とする粘膜感染症である。これらに対する効果的なワクチンとしては、全身及び粘膜の双方において強い免疫応答を誘導可能であることが望まれている。しかしながら現在のところ、全身免疫応答および粘膜免疫応答を同時に強く活性化できるようなワクチンは数少ない。これまでに我々は、アデノウイルスベクター(Adenovirus vector; Adv)を筋肉内へ投与すると、全身だけでなく粘膜面においても搭載抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T lymphocyte; CTL) を強く誘導可能であることを明らかにしてきた。このことから、Adv ワクチンは革新的なワクチンとなる可能性を十二分に秘めていると言え、Adv による免疫誘導の分子メカニズムを解明することで、HIV 感染症をはじめ、近年猛威を振るっている強毒型インフルエンザ等に対する効果的なワクチン開発に直結するものと期待される。

さて近年、自然免疫はその後に続く獲得免疫応答の誘導に必須であることが明らかにされ、その制御はワクチン開発の上で最も重要なステップであると考えられるようになってきた。さて、Adv は大きく分けて 2 種類の成分から構成されている。一つは、外殻タンパクであるカプシドであり、もう一つは核酸(ゲノム DNA と Non-coding RNA (VA-RNA))である。カプシドが自然免疫反応を惹起するという報告はあるが、どの報告もゲノム DNA を完全には除外できていないため、カプシド単独の効果については依然として不明なままである。一方の Adv 由来核酸については、細胞質やエンドソーム内で種々の核酸センサーによる認識を受けていることを、我々を始め複数の研究グループが明らかにしている。

核酸による自然免疫の活性化により、 $\alpha$ 型 IFN(インターフェロン)が多く産生される。これまでに我々は、 $\alpha$ 型 IFN 受容体ノックアウトマウス (*Ifnar2*<sup>-/-</sup>マウス)では、Adv 投与後の抗原特異的 CTL が全身系では正常に誘導されるものの、粘膜面での誘導レベルは低いことを明らかにしている。これらのことから、 $\alpha$ 型 IFN による自然免疫活性化から引き起こされる IL-17 産生性ヘルパー T 細胞 (T helper 17; Th17) の誘導が新規粘膜免疫ワクチンの開発標的として有望であると考えられた。

## 2. 研究の目的

Adv 筋肉内投与後の粘膜免疫誘導メカニズムについて、投与部位である筋肉と免疫実行組織である腸管との臓器連関がどのように制御されるのかを細胞レベル・分子レベルで明らかにする。

## 3. 研究の方法

### Adv の免疫

マウスの大腿四頭筋内に Adv を  $1 \times 10^{10}$  vp/mouse (片脚につき  $5 \times 10^9$  vp/50  $\mu$ L PBS) で投与した。

### 単核球単離

#### [脾臓]

摘出した脾臓を 70  $\mu$ m セルストレーナー上でプランジャーを用い細胞を分散させ、遠心分離によって細胞を回収した。その後、NH<sub>4</sub>Cl 溶液で懸濁することにより赤血球を除去し、2% FBS を含む PBS を用いて洗浄して得られた単核球を実験に用いた。

#### [リンパ節]

摘出したリンパ節を 70  $\mu$ m セルストレーナー上でプランジャーを用い細胞を分散させ、遠心分離によって細胞を回収した。その後、2% FBS を含む PBS を用いて洗浄して得られた単核球を実験に用いた。

#### [小腸粘膜固有層 (lamina propria; LP)]

摘出した小腸からパイエル板を除去した後、管状の組織を切り開き PBS を用いて洗浄した。その後、長さ 1-2 cm 程に刻んだ小腸組織を 2% FBS、0.5 mM EDTA を含む RPMI1640 培地中で 37 °C、20 min 撪拌した。次に、回収した小腸組織を 2% FBS を含む RPMI1640 培地中で撪拌して洗浄した後、2% FBS と 0.5 mg/mL コラゲナーゼを含む RPMI1640 培地中で撪拌した。その後、回収した上清を 70  $\mu$ m セルストレーナーに通し、遠心分離によって細胞を回収した。また、回収した小腸組織をもう一度コラゲナーゼ処理し、細胞を回収した。最後に、Percoll Plus を用いた密度勾配遠心法 (40%と 75%)によって精製した細胞を、2% FBS を含む RPMI1640 培地で洗浄し、得られた単核球を実験に用いた。

### RNA 抽出と定量的 RT-PCR

回収した組織および細胞から、ISOGEN を用いて total RNA を回収し、SuperScript VIL0 を用いて逆転写反応を行い、complementary DNA (cDNA) を合成した。定量的 RT-PCR は、StepOne Plus real-time PCR system により cDNA を鋳型として SYBR Green gene expression assays を用いて増幅し、細胞中の mRNA 量を定量した。発現比較は Ct 法を用いて行い、各 mRNA 発現量はマウス *Actb* あるいは *Gapdh* の mRNA 発現量で標準化した。

### フローサイトメトリー

細胞を anti-CD16/32 抗体によりブロッキング後、各種蛍光標識抗体で染色を行った。死細胞は 7-amino-actinomycin D、SYTOX Blue あるいは LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain kit により染色し除去した。染色サンプルは BD LSRFortessa flow cytometer あるいは MACSQuant flow cytometer により測定し、データは BD FACSDiva software あるいは

は FlowJo software を用いて解析した。

### β-gal 特異的な Th17 の検出

所属リンパ節あるいは小腸粘膜固有層より単離した単核球を PE-anti CD4 抗体により染色し、anti-PE ultrapure microbeads により標識後、AutoMACS Pro sorter を用いて標識細胞を純化し、ヘルパーT細胞とした。また、脾臓より単離した単核球を anti-CD11c microbeads により標識後、AutoMACS Pro sorter を用いて標識細胞を純化し、脾臓 DC とした。100 μg/mL β-gal タンパク質の存在下で、ヘルパーT細胞を脾臓 DC と 4:1 の比で共培養し、培養 1 日後に回収した細胞を遺伝子発現解析に、また培養 4 日後に回収した培養上清をタンパク質量に用いた。培養上清中の IL-17A および IL-22 を DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits を用いて検出した。

### In vitro Th17 分化誘導および Th17 の移入

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>細胞を SH800 セルソーターを用いて脾臓およびリンパ節から純化し、得られた細胞をナイーブヘルパーT細胞とした。ナイーブヘルパーT細胞は、10% FBS、2 mM GlutaMAX、100 U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin、50 μM 2-ME を含む IMDM 培地中で、プレートに結合させた 2 μg/mL anti-CD3ε抗体、ならびに 2 μg/mL CD28 抗体、10 μg/mL anti-IFN-γ、anti-IL-4、20 ng/mL IL-1β、IL-6、IL-23 (R&D systems) の液性因子存在下で培養した。培養 3 日後に培地を等量添加し、培養 4 日後に回収した細胞を Th17 として実験に用いた。分化した細胞 (2 × 10<sup>6</sup> cells/マウス) を尾静脈内に投与し、マウスに移入した。

## 4. 研究成果

### Adv 投与部位の所属リンパ節における I 型 IFN シグナル活性化

野生型 (wild-type; WT) マウスへの Adv 筋肉内投与後、Adv は投与部位である筋肉と鼠径部リンパ節 (inguinal lymph nodes; iLNs) に多く分布する一方で、腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph nodes; MLN) にはほとんど分布しない。この Adv の分布と相関して、I 型 IFN である *Ifna* や *Ifnb* の遺伝子発現が所属リンパ節では上昇していた一方で、MLN ではこれら遺伝子の発現上昇は認められなかった。一方、*Ifnar2*<sup>-/-</sup>マウスの所属リンパ節では、これら遺伝子発現は Adv 筋肉内投与後も上昇していなかった。このことから、I 型 IFN はその受容体を介してポジティブフィードバックにより I 型 IFN 発現を増幅させると考えられた。ここまでの結果より、Adv 筋肉内投与後、所属リンパ節が主な自然免疫応答の場であり、そこで I 型 IFN シグナルが活性化されることが示された。

### I 型 IFN シグナルによる所属リンパ節での Th17 の分化誘導

CTL の誘導にはヘルパーT細胞の働きも重要であることから、所属リンパ節での I 型 IFN シグナル活性化が特定のヘルパーT細胞サブセットを誘導することで、腸管粘膜 CTL が誘導される可能性が考えられた。ナイーブヘルパーT細胞は、活性化される際に曝されるサイトカイン環境に応じて数種のヘルパーT細胞サブセットに分化しうることから、その分化に関わるサイトカイン群の所属リンパ節における遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法により解析した。その結果、Th17 への分化に重要な *Il6*、*Il1b*、*Il23a* の遺伝子発現が、Adv 筋肉内投与後の WT マウスでは上昇するものの、*Ifnar2*<sup>-/-</sup>マウスでは上昇が認められなかった。このことから、I 型 IFN シグナルが Th17 分化誘導サイトカインの発現上昇を介して、Th17 への分化を制御している可能性が示された。

Th17 は細胞外細菌に対する防御や自己免疫疾患の発症において重要な細胞であり、健康個体においては腸管に多く存在して腸管粘膜免疫系の恒常性維持を担っていることなどが明らかにされてきている。加えて、Th17 が CTL の増殖や活性化に関わるとも報告されている。以上のことから、Adv 筋肉内投与後に誘導される Th17 が腸管粘膜 CTL の誘導に重要なのではないかと仮説を立てた。そこで、実際に所属リンパ節で抗原特異的な Th17 が誘導されているのかを検証するため、Adv 筋肉内投与後のマウス所属リンパ節より単離したヘルパーT細胞を抗原特異的な刺激下で培養し、Th17 産生サイトカインの発現について検討した。まず、*Il17a*、*Il17f*、*Il22* の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した結果、これらの遺伝子発現が Adv 筋肉内投与後の所属リンパ節ヘルパーT細胞において経時的に上昇することが明らかとなった。したがって、Adv 筋肉内投与後の WT マウス所属リンパ節において抗原特異的な Th17 が誘導され、経時的に増加していることが示された。さらに、Adv 筋肉内投与 1 週間後の *Ifnar2*<sup>-/-</sup>マウス所属リンパ節より単離したヘルパーT細胞からの Th17 サイトカイン産生量は、WT マウスと比較して IL-17A は減少傾向であり、IL-22 は有意に減少していた (図 1)。以上の結果から、所属リンパ節において I 型 IFN シグナル依存的に抗原特異的な Th17 が誘導されていることが示された。

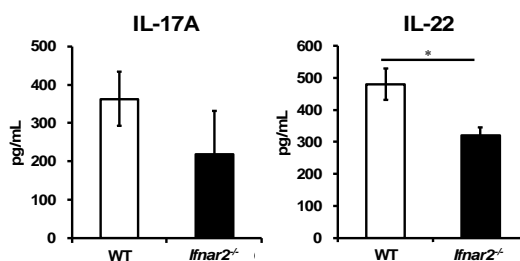


図 1. 所属リンパ節における Th17

## I 型 IFN シグナルによる Inf DC の所属リンパ節への誘引と活性化

過去の研究より、炎症性樹状細胞 (inflammatory DC; inf DC) が Th17 分化に関わることが報告されていることから、所属リンパ節においては I 型 IFN シグナル依存的に inf DC が増加ならびに活性化しているのではないかと考えられた。予想どおり、Adv 筋肉内投与後の WT マウス所属リンパ節で inf DC の割合が増加していた一方で、*Ifnar2*<sup>-/-</sup> マウス所属リンパ節においては増加していなかった (図 2)。さらに、*Ifnar2*<sup>-/-</sup> マウス所属リンパ節の inf DC における T 細胞活性化誘導マーカーである主要組織適合遺伝子複合体クラス II (major histocompatibility complex class-II; MHC-II) ならびに CD80、CD86 の発現レベルは、WT マウスと比較して有意に低値であることが明らかとなった。以上のことから、Adv 筋肉内投与後に inf DC が I 型 IFN シグナル依存的に増加・活性化することが、所属リンパ節での Th17 分化誘導に寄与することが示唆された。

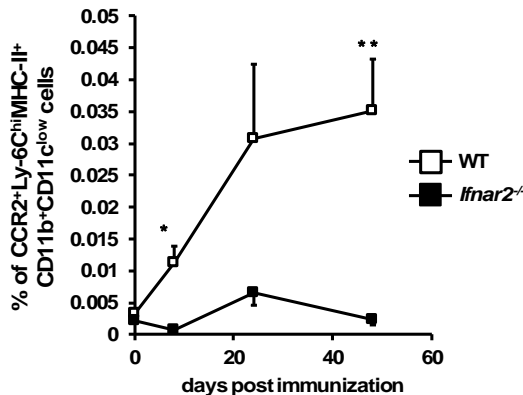


図 2 . 所属リンパ節における inf DC

## I 型 IFN シグナルによる腸管粘膜面での Th17 誘導

以上の結果を踏まえると、Adv 筋肉内投与後、所属リンパ節において誘導された抗原特異的な Th17 が腸管粘膜面へと遊走し、そこで腸管粘膜 CTL を誘導している可能性が考えられた。そこで、Adv 筋肉内投与 2 週間後の腸管粘膜面に抗原特異的な Th17 が誘導されているかを調べるため、腸管粘膜面についても図 1 と同様の検討を行った。その結果、腸管粘膜面より単離したヘルパー T 細胞を抗原特異的な刺激下で培養した後の IL-17A と

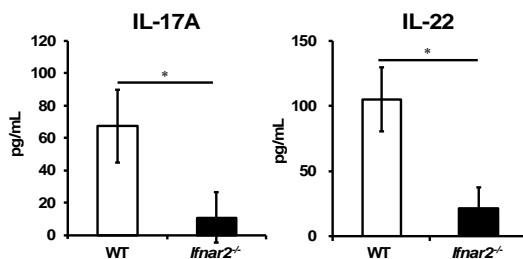


図 3 . 腸管粘膜面における Th17

IL-22 の産生量は、*Ifnar2* 欠損により有意に減少することが明らかとなった (図 3)。この結果は、*Ifnar2* 欠損により腸管粘膜面での抗原特異的な Th17 が減少することを示している。

## Th17 による腸管粘膜 CTL 誘導

次に、*in vitro* で分化誘導した Th17 を尾静脈内投与により *Ifnar2*<sup>-/-</sup> マウスに移入し、その後 Adv を筋肉内投与することで、*Ifnar2*<sup>-/-</sup> マウスにおける腸管粘膜 CTL 誘導の減弱が回復するかどうかを検討した。コントロールとして PBS を尾静脈内投与した *Ifnar2*<sup>-/-</sup> マウスと比較して、Th17 を尾静脈内投与した *Ifnar2*<sup>-/-</sup> マウスの腸管粘膜面では抗原特異的な CTL の割合が有意に増加し、WT マウスに近いレベルまで回復した。一方で、脾臓における抗原特異的な CTL の割合は、*Ifnar2*<sup>-/-</sup> マウスへの Th17 移入後も有意な変化は認められなかった (図 4)。以上のことから、I 型 IFN シグナルを介した腸管粘膜 CTL の誘導において Th17 が重要な働きを担っている可能性が示された。

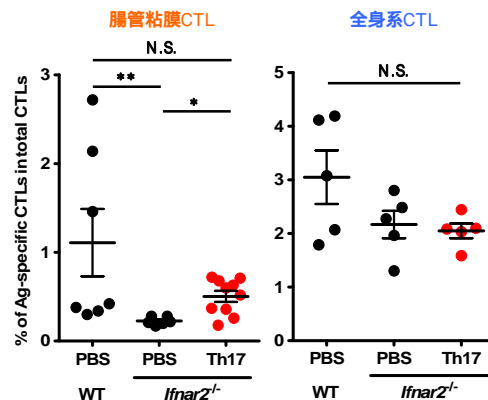


図 4 . Th17 移入により *Ifnar2*<sup>-/-</sup> マウスでの腸管粘膜 CTL が回復する

最後に、本メカニズムを踏まえ、Th17 誘導の増強により Adv のワクチン効果を高められないかと考えた。そこで、WT マウスに Th17 を移入することで腸管粘膜 CTL の誘導を促進可能かどうか検討することとした。その結果、

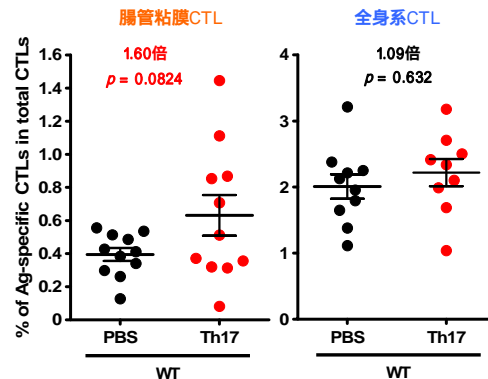


図 5 . Th17 移入により WT マウスでの腸管粘膜 CTL が増加する

WT マウス脾臓の抗原特異的な CTL の割合は Th17 移入により 1.09 倍の増加 ( $p=0.632$ ) であったのに対し、腸管粘膜面の抗原特異的な CTL の割合は Th17 移入により 1.60 倍の増加 ( $p=0.0824$ ) を示した (図 5)。以上の結果から、Th17 が全身系よりも腸管粘膜面における抗原特異的な CTL 誘導を促進する可能性が示された。

本研究結果より、Adv 筋肉内投与後の抗原特異的な腸管粘膜 CTL の誘導において、I 型 IFN シグナル活性化による Th17 誘導が重要であることが明らかになった。本研究結果は我々の知る限り、Th17 が腸管粘膜選択的に CTL 誘導を促進することを世界で初めて示したものであり、これまで不明であった全身免疫から粘膜免疫への橋渡し機構の解明に寄与するものである。さらに、ワクチン開発において、Th17 誘導の増強により腸管粘膜 CTL の誘導を促進可能であるという新規コンセプトに繋がる知見を得た。以上、本研究結果がより効果的で安全な Adv ワクチンの開発を推進させるだけでなく、現在広く用いられている注射型ワクチンに対して新たに粘膜免疫誘導能を付与できるようなアジュバントの開発にも繋がると期待される。

## 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 1 件)

Masahisa Hemmi, Masashi Tachibana, Natsuki Fujimoto, Masaki Shoji, Fuminori Sakurai, Kouji Kobiyama, Ken J. Ishii, Shizuo Akira, Hiroyuki Mizuguchi, T Helper 17 Promotes Induction of Antigen-Specific Gut-Mucosal Cytotoxic T Lymphocytes following Adenovirus Vector Vaccination. *Front Immunol.* 2017; 8:1456. 査読有  
DOI: 10.3389/fimmu.2017.01456

[学会発表](計 9 件)

Masahisa Hemmi, Masashi Tachibana, Fujimoto Natsuki, Masaki Shoji, Fuminori Sakurai, Kouji Kobiyama, Ken J. Ishii, Shizuo Akira, Hiroyuki Mizuguchi, Type I IFN signaling induces inflammatory DCs following intramuscular administration of an adenovirus vector vaccine、第 24 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム、2016 年、ソラシティカンファレンスセンター(東京都千代田区)  
Masahisa Hemmi, Masashi Tachibana, Fujimoto Natsuki, Masaki Shoji, Fuminori Sakurai, Kouji Kobiyama, Ken J. Ishii, Shizuo Akira, Hiroyuki Mizuguchi, Type I IFN signaling

regulates the antigen-specific mucosal immunity following systemic administration of an adenovirus vector vaccine、European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) 2016 Annual Congress、2016 年、Palazzo dei Congressi e Palazzo degli Affari (イタリア、フィレンツェ)

Masahisa Hemmi, Masashi Tachibana, Fujimoto Natsuki, Masaki Shoji, Fuminori Sakurai, Kouji Kobiyama, Ken J. Ishii, Shizuo Akira, Hiroyuki Mizuguchi, Type I IFN signaling induces inflammatory DCs following intramuscular administration of an adenovirus vector vaccine、第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年、沖縄コンベンションセンター、ラグナガーデンホテル(沖縄県宜野湾市)

Natsuki Fujimoto, Masashi Tachibana, Masahisa Hemmi, Masaki Shoji, Fuminori Sakurai, Kouji Kobiyama, Ken J. Ishii, Shizuo Akira, Hiroyuki Mizuguchi, Type I IFN signaling plays an important role in recruiting inflammatory monocytes following adenovirus vector vaccination、第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年、沖縄コンベンションセンター、ラグナガーデンホテル(沖縄県宜野湾市)

藤本夏希、立花雅史、辺見昌久、庄司正樹、櫻井文教、審良静男、水口裕之、アデノウイルスベクターワクチンによる粘膜免疫誘導メカニズム解明-I 型インターフェロンシグナル依存的に制御される炎症性単球の役割-、日本薬学会第 137 年会、2017 年、仙台国際センター、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

立花雅史、辺見昌久、藤本夏希、庄司正樹、櫻井文教、小檜山康司、石井健、審良静男、水口裕之、粘膜免疫誘導型ワクチンとしてのアデノウイルスベクター、第 33 回日本 DDS 学会学術集会(招待講演)、2017 年、京都市勧業館みやこめっせ(京都市)

Masahisa Hemmi, Masashi Tachibana, Natsuki Fujimoto, Masaki Shoji, Fuminori Sakurai, Kouji Kobiyama, Ken J. Ishii, Shizuo Akira, Hiroyuki Mizuguchi, Type I IFN signaling induces Th17 cells capable of promoting gut-mucosal CTLs following intramuscular vaccination of an adenovirus vector、5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society(国際学会)、2017 年、石川音楽堂(石川県金沢市)

Masahisa Hemmi, Masashi Tachibana, Natsuki Fujimoto, Masaki Shoji, Fuminori Sakurai, Ken J. Ishii, Shizuo

Akira, Hiroyuki Mizuguchi、Th17 promotes the induction of antigen-specific gut-mucosal CTLs following intramuscular vaccination of an adenovirus vector、第46回日本免疫学会学術集会、2017年、仙台国際センター（宮城県仙台市）

Masashi Tachibana, Masahisa Hemmi, Natsuki Fujimoto, Masaki Shoji, Fuminori Sakurai, Kouji Kobiyama, Ken J. Ishii, Shizuo Akira, Hiroyuki Mizuguchi、Th17 promotes the induction of antigen-specific gut-mucosal cytotoxic T lymphocytes following intramuscular vaccination of an adenovirus vector、第11回次世代アジュバント研究会、2018年、千里ライフサイエンスセンター（大阪府豊中市）

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )

〔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  
<https://www.seika.site/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

立花 雅史 (TACHIBANA, Masashi)  
大阪大学・大学院薬学研究科・特任准教授  
研究者番号：80513449

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )