

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07491

研究課題名（和文）自然免疫受容体に対するアゴニスト抗体のワクチンアジュバントへの応用

研究課題名（英文）Development of a vaccine adjuvant with an agonistic monoclonal antibody against Toll-like receptor

研究代表者

山崎 達也（Yamazaki, Tatsuya）

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：50624087

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、自然免疫受容体RP105に対するアゴニスト抗体（クローン名：RP/14）を遺伝子免疫法の新しいアジュバント（免疫賦活物質）として応用することを目指した。RP/14は強力なB細胞活性化能があり、抗原と共有結合させてマウスへ接種することで強力なアジュバント効果が得られることが知られていた。本研究ではタンパク質抗体ではなく、RP/14を発現する「抗体遺伝子」を用いた。抗体遺伝子は低コスト化が期待でき、目的に応じて抗体構造を改変しやすいためである。実際にRP/14遺伝子とウイルス抗原遺伝子をマウスに同時に接種すると、血中で特異的抗体価が上昇し、致死量のウイルス感染の防御効果も認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症に対するワクチンは未だに開発が困難なものが多数存在する。その解決策の1つとして、アジュバントの開発は重要である。しかしアジュバントの多くは、自然免疫受容体を活性化する核酸誘導体や微生物構成成分由来の物質が中心で、副反応もあることが問題である。一方で、“抗体”は特異性が高く、自己タンパク質であるので、安全性は高いと考えられる。しかし抗体医薬は高い精製コストが課題である。本研究の成果から、遺伝子ワクチンにおける抗RP105アゴニスト抗体のアジュバント効果を明らかにすることができた。これより、遺伝子ワクチンのための、低コストで副作用の少ない安全なアジュバント候補を提示できたと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to utilize an agonist monoclonal antibody against Radioprotective 105 (RP105), which belongs to the TLR family, as an adjuvant in genetic immunization. RP/14 can potently activate B cells, and its covalent conjugation with an antigen can induce high levels of antigen-specific antibodies in mice. According to our previous report, we constructed plasmids coding for RP/14 because a "gene-based antibody" is cost-effective and allows for easier structural modifications based on conceptual designs compared to protein-based antibody. We immunized Balb/c mice with the plasmids coding RP/14 and hemagglutinin(HA), one of the membrane proteins on influenza A virus(IAV). We found that the HA-specific antibody significantly increased in the serum. We then infected the mice with a lethal dose of IAV and confirmed the prophylactic effect. These results indicate the adjuvant effect of RP/14 in genetic immunization.

研究分野：抗体工学

キーワード：抗体遺伝子 遺伝子免疫 アジュバント RP105(CD180) インフルエンザウイルス 自然免疫受容体

## 1. 研究開始当初の背景

感染症に対するワクチンにおいて、未だに開発が困難なものが多数存在する。その解決策の1つとして、免疫を賦活化する物質(アジュバント)の開発が進められている。しかしアジュバントの多くは、自然免疫受容体を活性化する核酸誘導体や微生物構成成分由来の物質が中心で、副反応もあることが問題となっている。ゆえに、アジュバント活性は高く、副反応が低い新しいアジュバント開発が必要である。

一方で、自然免疫受容体 **Radioprotective 105 (RP105)** は、抗体産生細胞であるB細胞に発現しており、そのアゴニスト抗体(クローン名:RP/14)はB細胞の高い増殖活性を示す(Miyake K et al J Exp Med 1994)。そのB細胞活性化レベルは、強力なB細胞活性化因子として知られるリポ多糖(LPS)と同等以上であることが示唆されている(Jennings R T et al Int Immunol 2016)。過去の研究から、**RP/14 をタンパク質抗原と共有結合させたもの**をマウスに接種すると、強力なアジュバント効果を得られることも報告されている(Chaplin J W et al J Exp Med 2013)。“抗体”は特異性が高く、自己のタンパク質であるので、安全性は高いと考えられる。しかし抗体医薬(タンパク質抗体)は精製コストが高いことが課題である。また、RP/14 をタンパク質抗原と共有結合させることは、さらにコストがかかり、特に膜タンパク質抗原を共有結合させることは難しいと考えられた。

研究代表者らは、これまでの研究で、**抗体遺伝子**を用いたあたらしい受動免疫法で、インフルエンザの長期的な予防(Yamazaki T et al Jpn J Infect Dis 2011)と治療(Yamazaki T et al Front Immunol 2018)に成功していた。ウイルスを中和する抗体を発現する遺伝子をマウスに単回接種することで、致死量のインフルエンザウイルスの感染を有意に防御できることを報告した。タンパク質抗体に比べ抗体遺伝子の利点は、精製が簡便で持続的な発現が期待できることである。さらに遺伝子改変によって容易に抗体の性質を変えることもできる。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、「RP/14」に、B細胞受容体(B cell receptor, BCR)の「細胞膜貫通ドメイン(Transmembrane domain, TM)」を付加させた膜タンパク質である“**RP/14-TM**”を**発現する抗体遺伝子を、遺伝子ワクチンのアジュバントへ応用**することを目指した。このRP/14-TMと、インフルエンザウイルスの膜タンパク質の1つヘマグルチニン(hemagglutinin, HA)を細胞膜上にそれぞれ発現させることで、細胞膜を介して両者を簡便に「結合」できると考えた(Fig.1)。

インフルエンザウイルスは、自身の膜タンパク質であるHAを宿主細胞の感染受容体に結合させて、細胞へ感染する。ゆえにHAはワクチンの主要なターゲットである。また、遺伝子の精製はタンパク質に比べて簡便である。RP/14-TMによってHA特異的抗体レベルの上昇が認められれば、簡便で有効な遺伝子ワクチンのアジュバントとなると考えた。

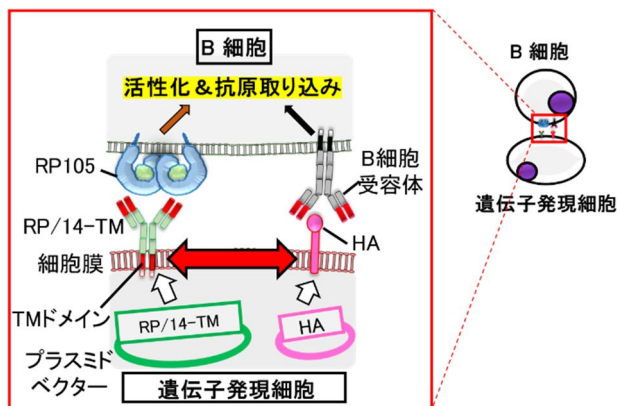


Fig.1 膜貫通ドメイン(TM)を付加したRP/14(RP/14-TM)とインフルエンザウイルス膜抗原(HA)を発現する細胞によって、抗原を取り込んだB細胞を活性化できると予想した概念図。細胞膜を介してRP/14と抗原を“結合”できる(赤矢印)と考えた。

本研究の目的を達成するために、以下の解明に取り組んだ。

- 抗体遺伝子から発現したRP/14(分泌型)やRP/14-TMにB細胞活性化能はあるか
- RP/14-TM遺伝子とHA遺伝子をマウスに同時に接種してHA特異的抗体価は上昇するか
- 両遺伝子の同時接種により、致死量のインフルエンザウイルス感染を防御できるか

### 3. 研究の方法

- RP/14 産生ハイブリドーマ (Rat IgG2a, ) から抗体遺伝子をクローニングし、プラスミド DNA ベクターへ組込んだ。ただし定常領域は、それぞれ Mouse IgG1, に組換えた。
- RP/14 発現抗体遺伝子を Balb/c マウスへ、ハイドロダイナミクス法 (水力学的な圧力により遺伝子導入する方法) を用いて尾静脈から接種し、定期的に血清を採取した。その血清中における経時的な RP/14 レベルの変化を解析した (研究成果: Fig.4)。
- 同様に遺伝子接種を行い、発現させた RP/14 の *in vivo* におけるアゴニスト活性を解析した。具体的には、血清中の総 IgG レベルと、B 細胞が多く存在する組織である脾臓の大きさと重量を測定した (研究成果: Fig.5)。
- BCR の細胞膜貫通ドメイン (TM) を付加した RP/14-TM を発現する抗体遺伝子を作製した (Fig.2)。この RP/14-TM 抗体遺伝子と HA 遺伝子とともに Human Embryonic Kidney (HEK, ヒト胎児腎臓) 293T 細胞へ導入し、フローサイトメーターを用いて発現を確認した (研究成果: Fig.6)。また RP/14-TM 発現細胞と B 細胞と共培養して、B 細胞の活性化能や RP/14-TM と RP105 分子との相互作用の解析を行った (研究成果: Fig.7)。
- RP/14-TM 抗体遺伝子と HA 遺伝子を同時に Balb/c マウスに接種し、2 週間後に血清を採取した (Fig.3)。また、致死量のインフルエンザウイルス (H1N1 亜型, A/Puerto Rico/8/34 [A/PR8] 株, マウス馴化株) を肺感染させ、3 日後に肺洗浄液を回収した。洗浄液中のウイルス価はブランク法で測定した (研究成果: Fig.8)。
- 別の Balb/c マウスを用意して、同様のスケジュールで感染実験を行い、感染による体重減少と生存率も測定した (研究成果: Fig.9)。

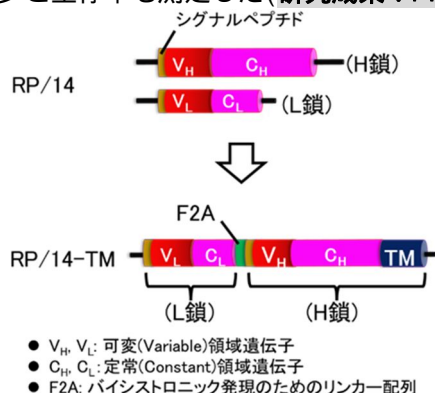


Fig.2 RP/14 と RP/14-TM の遺伝子構造

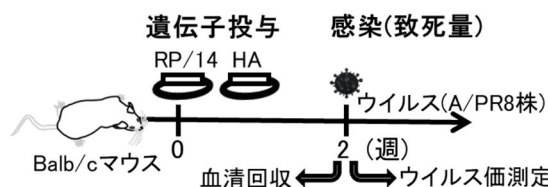


Fig.3 遺伝子ワクチン接種と感染スケジュール

### 4. 研究成果

#### 抗体遺伝子から発現した RP/14 (分泌型) や RP/14-TM の B 細胞活性化能について

RP/14 抗体遺伝子を接種して 4 日目までは、高レベル (約 10  $\mu\text{g/mL}$ ) の RP/14 を血清中で検出できた (Fig.4)。この RP/14 発現レベルは、研究代表者らの以前の研究 (Yamazaki T et al Front Immunol 2018) で用いた、抗 HA 抗体遺伝子を接種して得られた発現レベルと同等であった。一方、接種後 7 日目から急激に抗体レベルは減少し、14 日目では、ほとんど Back ground レベルにまで減少した。以前の研究では、接種後 14 日目でも高レベルの抗 HA 抗体は維持されていた。そこで、RP105 欠損マウスへ、RP/14 抗体遺伝子を接種したところ、接種後 14 日目でも高レベルの RP/14 レベルが検出された。これより、抗原 (RP105) 依存的に抗体レベルが減少することが示唆された。

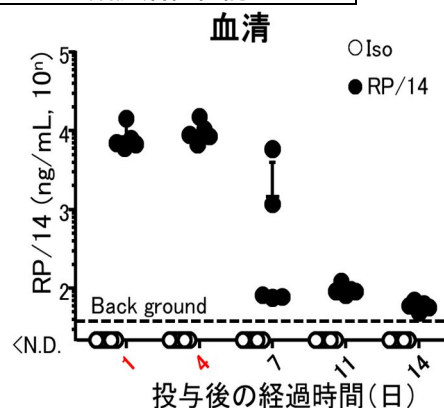


Fig.4 血清中の RP/14 レベルの経時変化

Iso: アイソタイプコントロール群

(図は Yamazaki T et al Front Immunol 2020 を改変)

興味深いことに、血清中の総 IgG レベルは、RP/14 レベルと逆相関するように、接種後 7 日目より有意に上昇することが分かった (Fig.5A)。同じタイミングで、総 IgM レベルも若干の上昇が認められたが、その後はコントロール群と有意な差は認められなかった。一方で脾臓は、RP/14 抗体遺伝子接種によって、接種後 4 日目で肥大し、重量が有意に増えた (Fig.5B)。この脾臓の肥大は、接種後 14 日目ではコントロール群と有意な差は認められなかった。これらの要因として、RP/14 抗体遺伝子接種によって B 細胞が活性化したためと考えられた。以上より、生体内で発現させた RP/14 の *in vivo* におけるアゴニスト活性が確認された。

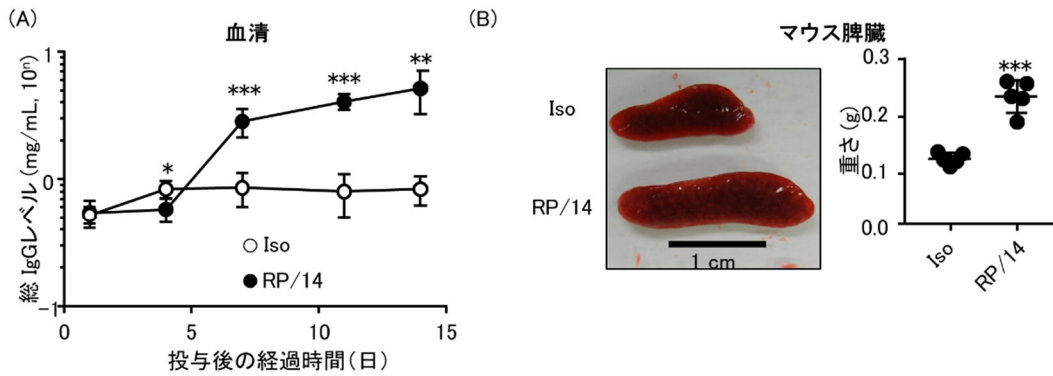


Fig.5 RP/14 抗体遺伝子接種により、血清中の総 IgG レベルの上昇と、脾臓の肥大化が認められた (図は Yamazaki T et al Front Immunol 2020 を改変)

抗体遺伝子由来の RP/14 のアゴニスト活性を確認できたので、続いて RP/14-TM を発現する抗体遺伝子を作製した。HEK293T 細胞に RP/14-TM を HA とともに発現させたところ、同一細胞膜上に、両者の発現を検出できた (Fig.6)。

さらに、RP/14-TM 発現 HEK293T 細胞と脾臓細胞を 2 日間共培養した。フローサイトメーターで、B 細胞上の CD86 (活性化マーカー) レベルを測定したところ、RP/14-TM 発現細胞によって、そのレベルは上昇していた。これより、RP/14-TM の B 細胞活性化能が確認された。

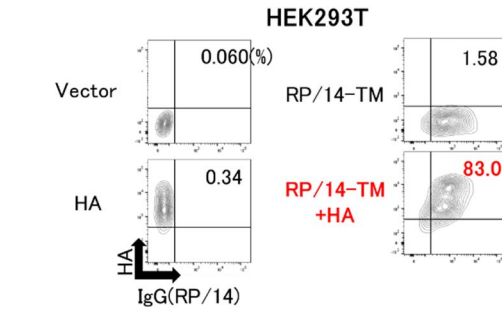


Fig.6 同一細胞膜上に RP/14-TM と HA の発現を確認できた (図中の数値は MFI を表す) (図は Yamazaki T et al Front Immunol 2020 を改変)

そこで、細胞膜上に存在する RP/14-TM は、B 細胞にどのように作用して活性化しているかを解明するために、RP/14-TM と B 細胞上の RP105 の分子間相互作用に着目することにした。まずは、RP/14-TM 発現細胞と共培養した B 細胞上の RP105 レベルを、フローサイトメーターで測定した。ただし、フローサイトメーターで RP105 を検出可能な抗体は、RP/14-TM のパレンタル抗体 (すなわち RP/14) のみである。すると、B 細胞上の RP105 レベルは、RP/14-TM 発現細胞との共培養によって低下していた。一般的に、リガンドが細胞膜上の受容体タンパク質に結合すると、その受容体は internalization (細胞内移行) する可能性があることは知られている。RP/14-TM と RP105 の相互作用も同様の現象が考えられたが、trocytosis (細胞間における細胞膜移動) により RP/14-TM が B 細胞上に移行したため検出抗体 (パレンタル抗体, RP/14) と競合した可能性も考えられた。前者は RP/14 とエピトープ (抗原認識部位) を異にする検出抗体が必要なので解析できなかった。後者は、B 細胞上の IgG レベル (注: RP/14-TM のアイソタイプは IgG) を測定することで、検証できると考えた (Fig.7)。解析の結果、コントロール細胞との共培養では B 細胞上に IgG はほとんど検出されなかったが、RP/14-TM 発現細胞と共培養した B 細胞上では IgG が検出された (Fig.7 left)。また、RP105 欠損 B 細胞では、RP/14-TM 発現細胞と共培養しても、その B 細胞上では IgG は検出されなかった。以上より、細胞膜上に発現させた RP/14-TM は、RP105 依存的に B 細胞膜上へ移行して、B 細胞を活性化することが示唆された (Fig.7 right)。

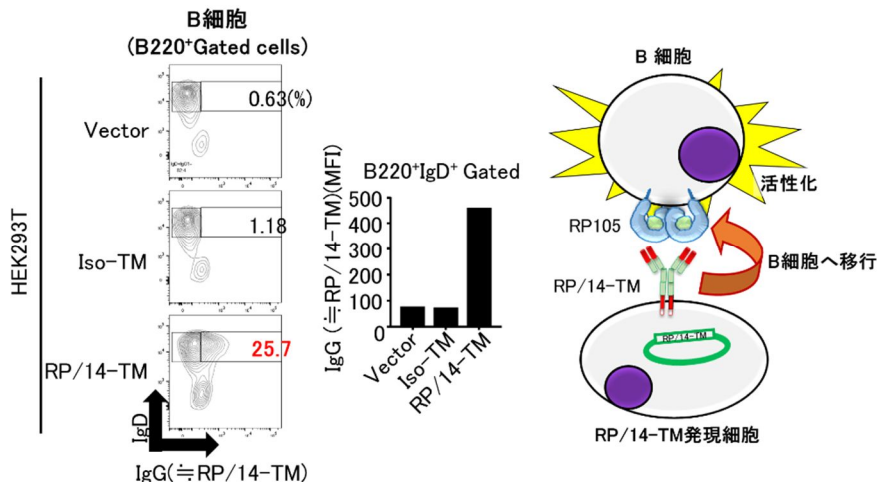


Fig.7 細胞膜上に発現させた RP/14-TM は、RP105 依存的に B 細胞膜上へ移行していた RP/14-TM 発現 HEK293T 細胞と B 細胞を 2 日間共培養し、フローサイトメーターで B 細胞上の IgG レベルを検出した。本実験では IgG RP/14-TM とした。

\* 内在性 IgG と区別するために、IgD<sup>+</sup> Gate で IgG レベル (MFI) を解析した。 (図は Yamazaki T et al Front Immunol 2020 を改変)

## RP/14-TM 遺伝子のアジュバント効果の評価

RP/14-TM 抗体遺伝子と HA 遺伝子を同時に接種したマウスの血清では、HA 特異的 IgG 価 (Fig.8A) および HA 特異的 IgM 価 (Fig.8B) は、それぞれ有意に上昇することが分かった。そこで実際に中和能のある抗体が誘導されているかを確認するために、段階希釈した免疫血清とインフルエンザウイルスを混合して培養細胞へ添加し、感染を防御できる力価 (中和価) を測定した。その結果、RP/14-TM 抗体遺伝子の接種によって、中和抗体価も有意に上昇することが確認された (Fig.8C)。

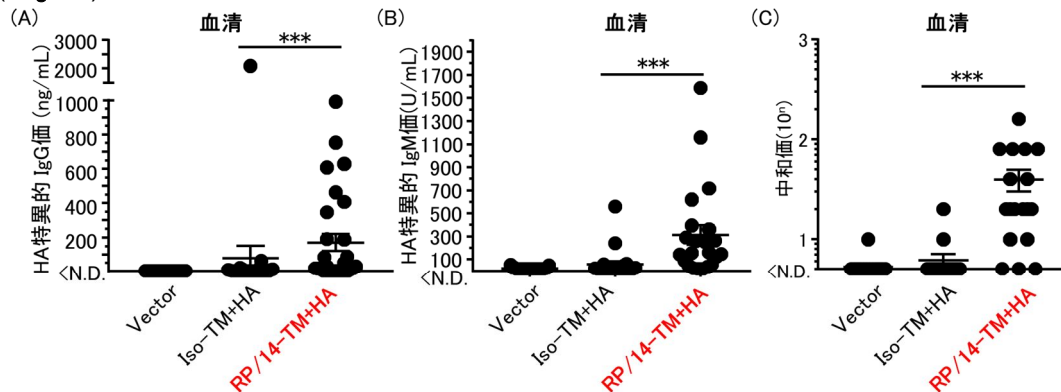


Fig.8 RP/14-TM 抗体遺伝子と HA 遺伝子をマウスへ同時に接種し、14 日後に血清を回収した。RP/14-TM 抗体遺伝子接種によって、血清中の HA 特異的 IgG 価(A)と HA 特異的 IgM 価(B)、中和抗体価(C)は、有意に上昇した

(図は Yamazaki T et al Front Immunol 2020 を改変)

RP/14-TM 抗体遺伝子と HA 遺伝子を同時に接種したマウスに、致死量のインフルエンザウイルスを肺 (下気道) に感染させ、肺洗浄液中のウイルス価を測定した。その結果、限定的ではあるが、コントロール群と比べて、約 7 倍程度、有意にウイルス価の減少が認められた (Fig.9A)。また別のマウス群を用意して同様の実験を行った結果、有意に体重減少の抑制 (Fig.9B) と生存率の上昇 (Fig.9C) が認められた。以上の結果から、RP/14-TM 抗体遺伝子に、遺伝子免疫におけるアジュバント効果があることが示された。

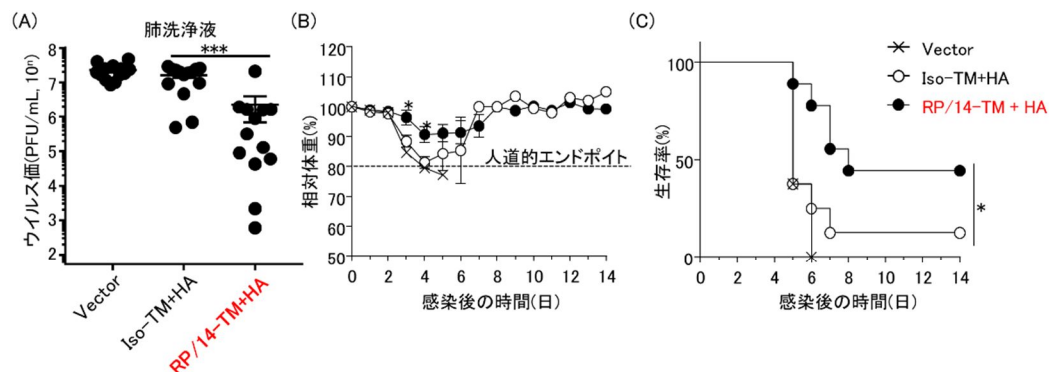


Fig.9 RP/14-TM と HA 発現プラスミドを同時接種したマウスに致死量のインフルエンザウイルスを肺感染させた。その結果、感染後の肺洗浄液中のウイルス価は有意に減少し(A)、体重減少の抑制(B) と生存率の上昇(C) が認められた。

(図は Yamazaki T et al Front Immunol 2020 を改変)

## 本研究の課題

- RP105 を検出できる抗体の制限もあって、RP/14-TM によって RP105 分子がどのように変化するのか (internalization するのか? RP105 分子同士が架橋するのか?)、その分子メカニズムを十分には解析できなかった。
- RP/14-TM 抗体遺伝子をアジュバントとして実用化のためには、さらにその効果を高める必要がある。そのために、抗体遺伝子構造を工夫する必要があると考えている。

本研究の成果により、抗体遺伝子を遺伝子ワクチンのアジュバントへ応用できる可能性を示した。本研究ではインフルエンザを感染症のモデルとしたが、他のウイルス抗原遺伝子を用いれば、様々なウイルス感染症にも応用できると考えている。遺伝子ワクチンにおいて、「抗体遺伝子」は、安全で汎用性の高いアジュバントとなることが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 山崎 達也、高村(赤司) 祥子	4. 巻 24
2. 論文標題 抗体遺伝子を用いたウイルス感染症制御への挑戦	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 エンドトキシン・自然免疫研究	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24753/jeiis.24.0_1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 山崎達也, 高村(赤司)祥子	4. 巻 55
2. 論文標題 「抗体遺伝子」を用いた受動免疫によるウイルス感染症の制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 921-925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Biswas Mrityunjoy, Yamazaki Tatsuya, Tomono Susumu, Karnan Sivasundaram, Takagi Hidekazu, Ichimonji Isao, Inui Masanori, Nagaoka Fumiaki, Hosokawa Yoshitaka, Akashi Takamura Sachiko	4. 巻 596
2. 論文標題 Cell surface expression of human<sc>RP105</sc>depends on<i>N</i> glycosylation of<sc>MD</sc> 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3211~3231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki Tatsuya, Biswas Mrityunjoy, Kosugi Kouyu, Nagashima Maria, Inui Masanori, Tomono Susumu, Takagi Hidekazu, Ichimonji Isao, Nagaoka Fumiaki, Ainai Akira, Hasegawa Hideki, Chiba Joe, Akashi-Takamura Sachiko	4. 巻 11
2. 論文標題 A Novel Gene Delivery Vector of Agonistic Anti-Radioprotective 105 Expressed on Cell Membranes Shows Adjuvant Effect for DNA Immunization Against Influenza	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.606518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Biswas Mrityunjoy, Yamazaki Tatsuya, Chiba Joe, Akashi-Takamura Sachiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Broadly Neutralizing Antibodies for Influenza: Passive Immunotherapy and Intranasal Vaccination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 424 ~ 424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines8030424	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 山崎 達也、高村 (赤司) 祥子	4. 巻 22
2. 論文標題 コレラ菌抽出物によるIgEの不活化とアナフィラキシーの抑制	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 エンドトキシン・自然免疫研究	6. 最初と最後の頁 72 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24753/jeiis.22.0_72	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tatsuya Yamazaki, Sachiko Akashi-Takamura	4. 巻 22
2. 論文標題 Could a sugar chain on IgE be a new target for therapy for allergy?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycoforum	6. 最初と最後の頁 A15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32285/glycoforum.22A15	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山崎達也, 高村祥子
2. 発表標題 TLRファミリー分子RP105に対するアゴニスト抗体はインフルエンザウイルス感染予防のための遺伝子免疫でアジュバント効果を示す
3. 学会等名 2022年度 東海乳酸菌研究会総会・研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tatsuya Yamazaki, Mrityunjoy Biswas, Masanori Inui, Susumu Tomono, Sachiko Akashi-Takamura
2. 発表標題 Recombinant anti-RP105 provides an adjuvant effect for gene immunization against influenza
3. 学会等名 The 51th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎達也, 高村(赤司)祥子
2. 発表標題 ヒトRP105の細胞膜上への発現はMD-1に付加したN結合型糖鎖に依存する
3. 学会等名 第27回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎達也
2. 発表標題 自然免疫受容体RP105に対するアゴニスト抗体を用いたB細胞活性化とその応用
3. 学会等名 第10回Transplant Immunology Forum
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎達也
2. 発表標題 「抗体遺伝子を用いた感染症防御への挑戦」
3. 学会等名 第26回日本エンドトキシン・自然免疫研究会奨励賞(最優秀賞)(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 山崎達也, Mrityunjoy Biswas, 乾匡範, 伴野勸, 一文字功, 相内章, 高村(赤司)祥子
2. 発表標題 Agonistic anti-radioprotective 105 shows adjuvant effect for DNA immunization against influenza
3. 学会等名 第50回免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuya Yamazaki, Susumu Tomono, Masanori Inui, Isao Ichimonji, and Sachiko Akashi-Takamura
2. 発表標題 The effect of commercial receptor-destroying enzyme (RDE) from Vibrio cholerae to human IgE activity
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛知医科大学医学部 感染・免疫学講座 <a href="http://www.aichi-med-u.ac.jp/M-12/index.html">http://www.aichi-med-u.ac.jp/M-12/index.html</a> 愛知医科大学 医学部 感染・免疫学講座2 (旧寄生虫学) <a href="http://www.aichi-med-u.ac.jp/M-12/index.html">http://www.aichi-med-u.ac.jp/M-12/index.html</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------