

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 3 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590986

研究課題名（和文） 細胞性免疫誘導型樹状細胞の結核ワクチンへの応用

研究課題名（英文） Type-1 polarized dendritic cell vaccine for tuberculosis

研究代表者

中村 祐太郎 (NAKAMURA YUTARO)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60436962

研究成果の概要（和文）：

結核菌を含む細胞内寄生菌に対する安全で有効なワクチンの開発が切望されている。我々は生体で最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞 (Dendritic cell; DC) を用いた DC ワクチンが、結核菌を含む細胞内寄生菌に対し有効であることを報告してきた。一方、我々は同時に従来と異なった培養を用いることで、DC をより細胞性免疫の誘導をきたしやすい細胞性免疫誘導型 DC (DC1) を作製することに成功し、腫瘍モデルでその有効性を確認した。今回このような DC1 ワクチンを用いて細胞内寄生菌であるリステリアモデルでその有用性を検討した。その結果、GM-CSF, IL-4, IFN- γ , および LPS にて培養した DC (DC1) 投与群において、GM-CSF および LPS のみにて培養した DC (通常型 DC) 投与群に比し有意に抗原特異的な CTL 誘導および感染防御能が増強することが確認され、さらに有意な生存期間の延長も認められた。細胞性免疫誘導型 DC ワクチンは細胞内寄生菌に対する有望なワクチンと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The development of effective vaccine strategies for intracellular bacteria, including tuberculosis, is one of the major frontiers of medical research. Our previous studies showed that dendritic cell (DC) vaccine is a promising approach for eliciting protective immunity against intracellular bacteria. Recently, we found that more preferable DCs were generated by the presence of IL-4 and IFN- γ during the maturation of mouse DCs (type-1 polarization), resulting in improved induction of anti-tumor immunity in cancer. Here we show that such type-1 polarized DCs promote dramatic enhancement of protective immunity against an intracellular bacterium, *Listeria monocytogenes*. Murine bone marrow-derived DCs were cultured and matured with LPS, IL-4 and IFN- γ (type-1 polarized DCs; DC1), and with LPS alone (non-polarized DCs; DC). DCs were loaded with listeriolysin O (LLO) 91-99, H2-K^d-restricted epitope of *L. monocytogenes*, and were injected into naïve BALB/c mice intravenously. Type-1 polarized DCs vaccine strongly enhanced LLO 91-99-specific CD8⁺ T cells exhibiting epitope-specific cytotoxic activity and IFN- γ production, leading to significant induction of protective immunity against *L. monocytogenes*. Type-1 polarized DCs are potential candidates for enhancing protective immunity in the design of effective vaccination strategies against intracellular bacteria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学・呼吸器病学

キーワード：免疫学, 感染症, 細胞ワクチン

1. 研究開始当初の背景

結核感染症は現代においても、年間数百万人の新規発病がみられる最も深刻な感染症の一つである。しかし現在のところ完全な防御免疫を誘導するワクチンはない。したがって優れた効果を持ち、かつ安全なワクチンの開発への期待が高まっている。一方 DC は免疫誘導に必須の細胞である。リンパ節において MHC 分子と共刺激分子を介し、T 細胞を活性化し、その増殖と機能を誘導する。最近、IFN- α と poly I:C で培養した DC (α DC1) が、多量の IL-12 を産生し、強い Th1 誘導能を有することが報告された (Cancer Res 2004)。 α DC1 は、腫瘍抗原に対して通常の DC ワクチンに比し約 40 倍強力な CTL 誘導能を有していた。さらに α DC1 は NK 細胞の腫瘍に対する抗腫瘍活性をも誘導していた。このような細胞性免疫誘導型 DC ワクチンは、今後腫瘍領域の臨床現場において極めて有望な治療法となることが期待されている。また我々はマウスにおいても細胞性免疫誘導型 DC ワクチンの性質を有する DC の開発に成功し、動物腫瘍モデルにてその有効性を立証した。以上のことから、結核感染症においても菌由来の抗原蛋白と細胞性免疫誘導型 DC を用いることにより、遺伝子導入に比しより簡便に DC のワクチン効果をさらに高めることが期待できる。

2. 研究の目的

細胞内寄生菌に対する感染防御能の高い DC ワクチンを開発するために、細胞性免疫誘導型 DC を作製し、そのワクチンとしての有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞性免疫誘導型 DC の作製および type-1 免疫誘導能の検討

マウス骨髄細胞を採取し、GM-CSF と IL-4 を用いて DC を誘導する。その後 IFN- γ を添加

し細胞性免疫誘導型 DC を誘導する。作製したワクチンの細胞性免疫誘導能を IL-12p70 の産生能を確認する。

(2) DC ワクチンにより誘導される抗原特異的 CD8 陽性細胞の細胞障害機能を検討する

(1)にて作製した DC ワクチンにリステリア抗原のエピトープ (LL091-99) をパルスし、マウスに静脈投与する。6 週間後に脾臓を摘出し細胞分離した後に、抗原 (LL091-99) を表出した J774 細胞 (マウスのリンパ腫；標的細胞) と 5 日間培養し、得られた細胞を用いて LDH assay (CTL assay) を行う。標的細胞が Killing され、放出された LDH を測定し、抗原特異的な CTL の活性を解析する。

(3) 感染防御能の検討

(2)と同様な手順で免疫を行い、6 週間後に 1×10^4 CFU (LD50) のリステリア菌を静注し感染させる。72 時間後に脾臓および肝臓を摘出し Soy-Agar 培地を用いて菌量をカウントする。

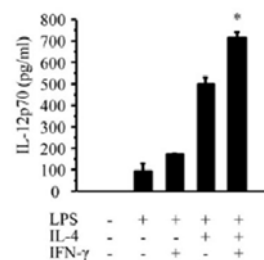
(4) 生存率の検討

(3)と同様な手順で免疫、感染を行い、その後生存率を測定した。

4. 研究成果

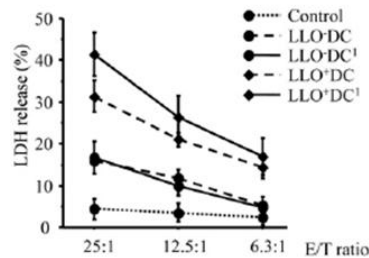
(1) 細胞性免疫誘導型 DC の作製および type-1 免疫誘導能の検討.

GM-CSF, IL-4, および IFN- γ で培養した樹状細胞 (細胞性免疫誘導型樹状細胞) は、CD40L の刺激により有意にこれらのサイトカインで刺激していない DC に比し IL-12p70 の産生



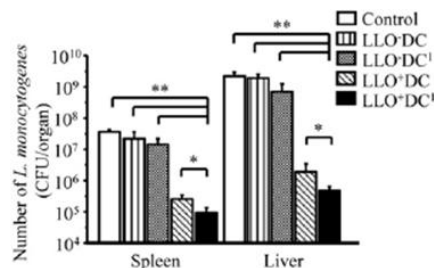
(2) DC ワクチンにより誘導される抗原特異的 CD8 陽性細胞の細胞障害機能を検討する。

リステリア抗原をパルスした細胞性免疫誘導型 DC ワクチンを投与した群において、通常型 DC 群に比し有意に抗原特異的な CTL が誘導されていた。



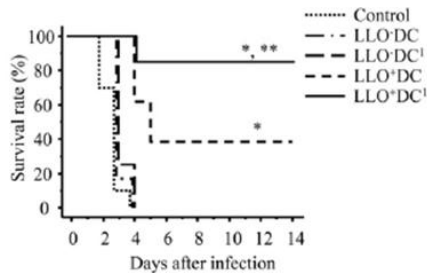
(3) 感染防御能の検討

リステリア抗原をパルスした細胞性免疫誘導型 DC ワクチンを投与した群において、通常型 DC 群に比し脾臓および肝臓の双方で有意に感染した菌量の抑制をきたした。



(4) 生存率の検討

更にリステリア抗原をパルスした細胞性免疫誘導型 DC ワクチンを投与した群において、通常型 DC 群に比し有意に生存率の延長をきたした。



これらの結果より細胞性免疫誘導型 DC ワクチンを用いることにより有意に細胞内寄生菌に対する感染防御能を増強し、さらには生存率も延長させることが明かとなった。これまで細胞免疫誘導型 DC ワクチンは癌領域においてその有効性の検討がなされてきたが、感染症領域においての有効性を証明した研究は本研究が初めてである。従って広く感染症領域への本ワクチンの有用性の可能性が示された。

今後結核菌を用いた研究を継続し、さらに臨床応用へ向けたヒト検体を用いての免疫誘導能の実験を予定している。

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 20 件)

1. Kato M, Nakamura Y, (他 9 名, 2 番目). Enhanced anti-tumor immunity by superantigen-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Jul;60(7):1029-38. (査読あり)
2. Kono M, Nakamura Y, (他 13 名, 2 番目). Plasma CCN2 (connective tissue growth factor; CTGF) is a potential biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Clinica Chimica Acta.* 20;412:2211-5. 2011. (査読あり)
3. Hozumi H, Nakamura Y, (他 15 名, 2 番目). *J Comput Assist Tomogr.* 35(5):583-9. 2011. (査読あり)
4. Furuhashi K, Suda T, Hasegawa H, Suzuki Y, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, (他 4 名, 5 番目). Mouse Lung CD103+ and CD11bhigh dendritic cells preferentially induce distinct CD4+ T cell responses. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011 (in press). (査読あり)
5. Hasegawa H, Inui N, Suda T, Shibata K, Nakamura Y, (他 3 名, 5 番目). Expressions of multidrug resistance protein 1 and multidrug resistance-associated protein 1 in lung dendritic cells. *Life Sci.* 2011 Aug 15;89(7-8):282-7. (査読あり)
6. Suzuki Y, Suda T, (他 12 名, 2 番目) Inui N, Nakano Y, Nakamura H, Chida K. Serum activity of indoleamine 2,3-dioxygenase predicts prognosis of community-acquired pneumonia. *J Infect.* 63(3):215-22, 2011. (査読あり)
7. Nagata T, Koide Y. Induction of Specific CD8 T Cells against Intracellular Bacteria by CD8 T-Cell-Oriented Immunization Approaches. *J Biomed Biotechnol.* 764542, 2010(査読なし)
8. Furuhashi K, Suda T, Nakamura Y, (他 8 名, 3 番目). Increased expression of YKL-40, a chitinase-like protein, in serum and lung of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 2010. (査読あり)
9. Suda T, Kono M, Nakamura Y, (他 15 名, 3 番目). Distinct prognosis of idiopathic nonspecific interstitial

- pneumonia (NSIP) fulfilling criteria for undifferentiated connective tissue disease (UCTD). *Respir Med* 104:1527-34, 2010. (査読あり)
10. Karayama M, Inui N, Suda T, Nakamura Y, (他 2 名, 4 番目). Antiendothelial Cell Antibodies in Patients With COPD. *Chest*. 138:1303-8. 2010. (査読あり)
 11. Eweda G, Suzuki D, Nagata T, (他 2 名, 3 番目). Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secretory proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*. 2010 Jun 23;28(29):4616-25. (査読あり)
 12. Giermasz AS, Urban JA, Nakamura Y, (他 4 名, 3 番目). Type-1 polarized dendritic cells primed for high IL-12 production show enhanced activity as cancer vaccines. *58(8):1329-36*. 2009. (査読あり)
 13. Uto T, Takehara Y, Nakamura Y, (他 6 名, 3 番目). Higher sensitivity and specificity for diffusion-weighted imaging of malignant lung lesions without apparent diffusion coefficient quantification. *Radiology* 252: 247-254, 2009.
 14. Suda T, Kaida Y, Nakamura Y, (他 11 名, 3 番目). Acute exacerbation of interstitial pneumonia associated with collagen vascular diseases. *Respir Med* 103: 846-853, 2009. (査読あり)
 15. Uchiyama H, Suda T, Nakamura Y, (他 12 名, 3 番目): Alterations in Smoking Habits Are Associated With Acute Eosinophilic Pneumonia. *Chest* 133(5) : 1174-1180, 2008. (査読あり)
 16. Ozawa Y, Suda T, Nagata T, Hashimoto D, Nakamura Y, (他 5 名, 5 番目). Mucosal vaccine using CTL epitope-pulsed dendritic cell confers protection for intracellular pathogen. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 440-448, 2009. (査読あり)
 17. Fujisawa T, Suda T, Matsuda H, Inui N, Nakamura Y, (他 7 名, 5 番目): Real-time PCR is more specific than conventional PCR for induced sputum diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in immunocompromised patients without HIV infection. *Respirology*:203-9, 2009. (査読あり)
 18. Kuroishi S, Suda T, Fujisawa T, Ide K, Inui N, Nakamura Y, (他 2 名, 6 番目). Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta1 in mouse tracheal epithelial cells. *Respirology* 14: 828-837, 2009. (査読あり)
 19. Suzuki Y, Suda T, Furuhashi K, Suzuki M, Fujie M, Hahimoto D, Nakamura Y, (他 3 名, 7 番目). Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. *Lung Cancer* 67: 361-365, 2010. (査読あり)
 20. Ozawa Y, Suda T, (他 8 名, 2 番目). Cumulative incidence of and predictive factors for lung cancer in IPF. *Respirology* 14: 723-728, 2009.
- [学会発表] (計 4 件)
1. Nakamura Y, Suda T, Kono M, (他 8 名, 1 番目); Rheumatoid Lung Disease: Analysis of Biopsy-proven 54 Cases, 16th Congress of the Asian Pasific Society of Respirology 2011, Shanghai (Shanghai, China)
 2. Nakamura Y., Suda T, Kono M, (他 9 名, 1 番目) Prognostic Significance Of Histopathologic And Radiographic Pattern In Interstitial Lung Disease: Associated With Rheumatoid Arthritis: American Thoracic Society International Conference 2011, (Denver, USA)
 3. Kono M, Nakamura Y, M Kato (他 12 名, 2 番目) Enhancement Of Protective Immunity Against An Intracellular Bacterium Usinig Type-1 Polarized Dendritic Cells American Thoracic Society. 2011.05.13. (Denver, USA)
 4. Kato M, Nakamura Y, Ozawa Y, (他 6 名, 2 番目) Enhancement Of Anti-Tumor Immunity With Superantigen-Pulsed Dendritic Cells. American Thoracic Society. 2010.05.14. (New Orleans, USA)
 5. Nakamura Y, T. Suda, Y. Kaida, (他 7 名 1 番目) The Incidence of Lung Cancer in Fibrotic Interstitial Pneumonia: Idiopathic Versus Collagen Vascular Disease related Histologic Subtypes. American Thoracic Society International Conference 2010 (New Orleans, USA)

〔図書〕（計4件）

1. 中村祐太郎 スパイロメトリー：林秀晴，千田金吾編集，必携・内科検査手技マニュアル，南江堂，東京，119-122，2011年，
2. 中村祐太郎 胸腔鏡検査，胸腔鏡下肺生検：林秀晴，千田金吾編集，必携・内科検査手技マニュアル，南江堂，東京，127-130，2011年．
3. 中村祐太郎 ファンギゾン，アムビゾーム：千田金吾編集，呼吸器疾患エッセンシャルドラッグ108改訂第二版，南江堂，東京，152-154，2009年．
4. 中村祐太郎 トラクリア，レバチオ：千田金吾編集，呼吸器疾患エッセンシャルドラッグ108改訂第二版，南江堂，東京，298-299，2009年．

〔その他〕

浜松医科大学第二内科（呼吸器内科）
ホームページ：

<http://hamamatsu-lung.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 祐太郎 (NAKAMURA YUTARO)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60436962

(2) 研究分担者

須田 隆文 (SUDA TAKAFUMI)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：30291397

永田 年 (NAGATA TOSHI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：90275024

(3) 研究協力者

河野 雅人 (KONO MASATO)
浜松医科大学・医学部・大学院生

加藤 真人 (KATO MASATO)
浜松医科大学・医学部・大学院生

Pawel Kalinski
University of Pittsburgh, Department of Surgery

Adam S Giermasz
University of California San Francisco,
Department of Hematology/Oncology