

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591160

研究課題名(和文) 臨床応用へ向けた結核患者における細胞性免疫誘導型樹状細胞ワクチンの免疫応答の解析

研究課題名(英文) Type 1-polarized dendritic cells pulsed with ESAT-6 are a potent immunogen against tuberculosis

研究代表者

中村 祐太郎 (Yutaro, Nakamura)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60436962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は細胞性免疫誘導型樹状細胞ワクチンが、動物モデルの細胞内寄生菌感染症において極めて有望なワクチンとなることを最近報告した。今回は結核患者の血液を用いて細胞性免疫誘導型樹状細胞ワクチンが、強い細胞性免疫誘導をきたすことを明かにした。結核患者末梢血樹状細胞を通常型、または細胞性免疫誘導型に各種サイトカインにて誘導、結核抗原と共培養し免疫応答を比較した。その結果、細胞性免疫誘導型樹状細胞で通常型樹状細胞に比し有意にIL12p70の産生が亢進し、強い結核抗原特異的T細胞の誘導がなされていることを確認した。これらより結核患者において細胞性免疫誘導型樹状細胞は有望なワクチンとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The development of effective vaccine strategies for tuberculosis(TB) is one of the major frontiers of medical research. Our previous studies showed that type-1 polarized dendritic cell (alphaDC1) vaccine is a promising approach for eliciting protective immunity against intracellular bacteria in animal model. Here we showed that alpha DC1 from TB patients could significantly induce antigen specific type-1 immunity. Monocyte-derived DCs from TB patients were induced to mature using a "standard" cytokine cocktail or using an alpha-type 1-polarized DC (alphaDC1) cocktail and were pulsed with established TB antigen (ESAT-6). AlphaDC1 secreted substantially higher levels of IL-12p70 than standard DCs. Furthermore alphaDC1 induced much higher numbers of interferon gamma producing functional T cells against TB. The current demonstration that TB antigen pulsed alphaDC1 are potent inducers of TB-specific T cells helps to develop improved immunotherapies.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：結核 樹状細胞 細胞性免疫 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。本邦においては、結核予防のために BCG 接種が広く行われてきたが、成人の結核発症の抑制に繋がるという客観的証拠がなく、また生菌免疫のために免疫力の低下した個体には接種できないなどの問題がある。また次世代のワクチンとして、近年結核菌由来の抗原蛋白を遺伝子操作を用いて発現させたプラスミドを接種する DNA ワクチンが研究されているが、現在のところ完全な防御免疫を誘導するまでには至っていない。したがって BCG 生菌免疫より優れた効果を持ち、かつ安全なワクチンの開発への期待が高まっている。

樹状細胞ワクチン (DC ワクチン) は、腫瘍抗原を有効に提示し強い抗腫瘍免疫を誘導することから、癌領域においてその臨床効果が確認されている。一方 DC の誘導する細胞性免疫は、細胞内寄生菌に対する感染防御能及び抗腫瘍免疫の誘導に必須である。細胞性免疫の誘導は様々な DC からのサイトカインによってなされ、中でも IL12 p70 が中心的な役割を果たしている。細胞性免疫誘導型 DC は、申請者が米国ピッツバーグ大学の Kalinski 博士らとともに癌領域において研究開発してきた DC であり、生体内、外で特定のサイトカイン刺激或いは T 細胞からのシグナルなどにより DC を細胞性免疫のきたしやすい状態に誘導し、ワクチンとして用いる方法である (図 1)。最近申請者らは動物モデルにおいて、多量の IL-12 を産生し、強い細胞性免疫誘導能を有する細胞性免疫誘導型 DC ワクチンが、結核菌と同様な細胞内寄生菌であるリステリア菌にきわめて有効であることを確認した (Vaccine 2012)。

以上よりヒトの結核症患者において本ワクチンの著明な免疫増強効果が確認できれば、有望なワクチンとして直接臨床応用へ結びつけることが期待される。

2. 研究の目的

細胞免疫誘導型 DC ワクチンの結核患者血液における免疫応答を解析することにより、ヒトの結核に対する予防及び治療ワクチンとしての研究基盤を確立する

3. 研究の方法

1) 細胞性免疫誘導型 DC の作成およびその性質の検討

結核患者の血液を採取し GM-CSF と IL-4 を用いて DC を誘導する。その後、細胞性免疫誘導型 DC を誘導するため TNF-alpha, IL-1beta, IFN-gamma, IFNalpha, Poly-I:C を添加、一方通常型 DC として TNF-alpha, PGE2, IL-1beta,

IL-6 を添加し培養する。作成したワクチンの遊走能を Chemotaxis Index (CCL19) で、また細胞性免疫誘導能を IL-12p70 の産生能で確認する。

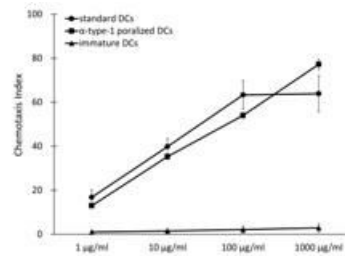
2) 結核患者末梢血における抗原特異的 type-1 免疫の誘導能の検討

上記で得られた患者血液から Percoll にてリンパ球分画を分離する。抗原 (ESAT-6) を 24 時間共培養した細胞性免疫誘導型 DC または通常型 DC とともに培養し抗原特異的な IFNgamma の産生を ELISPOT 法で行う。

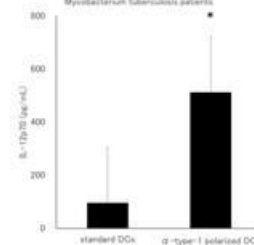
4. 研究成果

1) 細胞性免疫誘導型 DC の作成およびその性質の検討

CXCL19/CXCL21 を用いた CCL7 による遊走能の検討においては通常型、および細胞性免疫誘導型樹状細胞ともに、未成熟な樹状細胞に比してより強力な遊走能を呈していた。

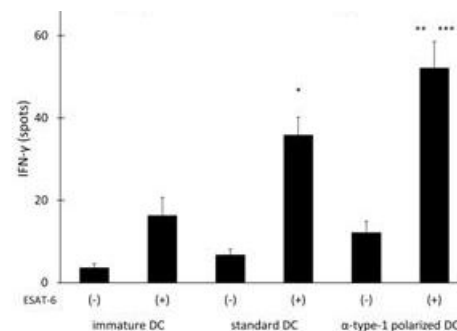


IL-12p70 産生能の比較では、細胞性免疫誘導型樹状細胞は、通常型樹状細胞に比し有意に産生能が亢進していた。



2) 結核患者末梢血における抗原特異的 type-1 免疫の誘導能の検討

結核患者の血液において、細胞性免疫誘導型樹状細胞は、通常型樹状細胞に比し有意に結核抗原特異的な IFN の産生をきたした。



これらの結果より結核患者の血液において、

細胞性免疫誘導型樹状細胞の作成は可能であり、通常型樹状細胞に比しより強力な細胞性免疫の誘導がなされることが明らかとなった。今後、結核ワクチンとして臨床応用へ向けた研究を継続する。

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 21件)

1. Hozumi H, Enomoto N, Kono M, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Sumikawa H, Johkoh T, Nakashima R, Imura Y, Mimori T, Suda T. Prognostic Significance of Anti-Aminoacyl-tRNA Synthetase Antibodies in Polymyositis/Dermatomyositis-Associated Interstitial Lung Disease: A Retrospective Case Control Study. *PLoS One*. 19;10(3):e0120313. 2015. (査読あり)
2. Oyama Y, Fujisawa T, Hashimoto D, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Kuroishi S, Yokomura K, Toyoshima M, Yamada T, Shirai T, Masuda M, Yasuda K, Hayakawa H, Chida K, Suda T. Efficacy of short-term prednisolone treatment in patients with chronic eosinophilic pneumonia. *Eur Respir J*. ERJ-01996-2014. 2015. (査読あり)
3. Akamatsu T, Inui N, Kusagaya H, Nakamura Y, Suda T, Chida K. Evaluation of antibody levels over 3 years after 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccination in patients with pulmonary diseases receiving steroids and immunosuppressive agents. *Clin Biochem*. 48(3):125-9. 2015. (査読あり)
4. Matsushima S, Inui N, Yasui H, Kono M, Nakamura Y, Toyoshima M, Shirai T, Suda T. Indacaterol and tiotropium combination therapy in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther*. 11-5. 2015. (査読あり)
5. Kato M, Fujisawa T, Hashimoto D, Kono M, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Hamada E, Miyazaki O, Kurashita S, Maekawa M, Suda T. Plasma connective tissue growth factor levels as potential biomarkers of airway obstruction in patients with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 113(3):295-300. 2014. (査読あり)
6. Fujisawa T, Hozumi H, Kono M, Enomoto N, Hashimoto D, Nakamura Y, Inui N, Yokomura K, Koshimizu N, Toyoshima M, Shirai T, Yasuda K, Hayakawa H, Suda T. Prognostic factors for myositis-associated interstitial lung disease. *PLoS One*. 9(6):e98824. 2014. (査読あり)
7. Enomoto N, Kusagaya H, Oyama Y, Kono M, Kaida Y, Kuroishi S, Hashimoto D, Fujisawa T, Yokomura K, Inui N, Nakamura Y, Suda T. Quantitative analysis of lungelastic fibers in idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis (IPPFE): comparison of clinical, radiological, and pathological findings with those of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *BMC Pulm Med*. 14:91. 2014. (査読あり)
8. Kono M, Nakamura Y, Enomoto N, Hashimoto D, Fujisawa T, Inui N, Maekawa M, Suda T, Colby TV, Chida K. Usual interstitial pneumonia preceding collagen vascular disease: a retrospective case control study of patients initially diagnosed with idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*. 15;9(4):e94775. 2014. (査読あり)
9. Ito Y, Karayama M, Inui N, Kuroishi S, Nakano H, Nakamura Y, Yokomura K, Toyoshima M, Shirai T, Masuda M, Yamada T, Yasuda K, Hayakawa H, Suda T, Chida K. Aprepitant in patients with advanced non-small-cell lung cancer receiving carboplatin-based chemotherapy. *Lung Cancer*. 2014. (査読あり)
10. Hozumi H, Nakamura Y, Johkoh T, Sumikawa H, Colby TV, Kono M, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Suda T, Chida K. Acute exacerbation in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: a retrospective case control study. *BMJ Open* 3;3(9):e003132. 2013. (査読あり)
11. Enomoto N, Suda T, Kono M, Kaida Y, Hashimoto D, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Imokawa S, Funai K, Chida K. Amount of elastic fibers predicts prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 107(10):1608-16. 2013. (査読あり)
12. Kusagaya H, Fujisawa T, Yamanaka K, Mori K, Hashimoto D, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Wu R, Maekawa M, Suda T, Chida K. TLR-Mediated Airway IL-17C Enhances Epithelial Host Defense in an Autocrine/Paracrine Manner. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Jan;50(1):30-9. 2013. (査読あり)
13. Harada M, Inui N, Suda T, Nakamura Y, Wajima T, Matsuo Y, Chida K. Pharmacokinetic analysis of doripenem in elderly patients with nosocomial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*.

- 42(2):149-54.2013. (査読あり)
14. Yasui H, Inui N, Furuhashi K, Nakamura Y, Uto T, Sato J, Yasuda K, Takehara Y, Suda T, Chida K. Multidetector-row computed tomography assessment of adding budesonide/formoterol to tiotropium in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther*, 26(3):336-41., 2013. (査読あり)
 15. Fujisawa T, Yasui H, Akamatsu T, Hashimoto D, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Maekawa M, Suda T, Chida K. Alveolar nitric oxide concentration reflects peripheral airway obstruction in stable asthma. 18(3):522-7, *Respirology* 2013. (査読あり)
 16. Hozumi H, Nakamura Y, Johkoh T, Sumikawa H, Colby TV, Kono M, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Suda T, Chida K. Acute exacerbation in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: a retrospective case control study. *BMJ Open* 3;3(9):e003132. 2013. (査読あり)
 17. Enomoto N, Suda T, Kono M, Kaida Y, Hashimoto D, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Imokawa S, Funai K, Chida K. Amount of elastic fibers predicts prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 107(10):1608-16. 2013. (査読あり)
 18. Kusagaya H, Fujisawa T, Yamanaka K, Mori K, Hashimoto D, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Wu R, Maekawa M, Suda T, Chida K. TLR-Mediated Airway IL-17C Enhances Epithelial Host Defense in an Autocrine/Paracrine Manner. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Jan;50(1):30-9. 2013. (査読あり)
 19. Harada M, Inui N, Suda T, Nakamura Y, Wajima T, Matsuo Y, Chida K. Pharmacokinetic analysis of doripenem in elderly patients with nosocomial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*. 42(2):149-54.2013. (査読あり)
 20. Yasui H, Inui N, Furuhashi K, Nakamura Y, Uto T, Sato J, Yasuda K, Takehara Y, Suda T, Chida K. Multidetector-row computed tomography assessment of adding budesonide/formoterol to tiotropium in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther*, 26(3):336-41., 2013. (査読あり)
 21. Fujisawa T, Yasui H, Akamatsu T, Hashimoto D, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Maekawa M, Suda T, Chida K. Alveolar nitric oxide concentration

reflects peripheral airway obstruction in stable asthma. 18(3):522-7, *Respirology* 2013. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Nakamura Y, Satake Y, Kusagaya H, Oyama Y, Kono M, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Colby TV, Suda T. Idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis: Possibility of making a diagnosis without surgical lung biopsy. 18th International Colloquium on Lung and Airway Fibrosis. 2014. (Mont Trembrant, Canada)
2. Nakamura Y, Suda T, Oyama Y, Hozumi H, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Chida K, Colby TV. Prognostic Factors of Biopsy-Proven Rheumatoid Lung Disease: Relationship between Histopathologic Features and Mortality. American Thoracic Society International Conference 2013, (Philadelphia, USA)
3. Nakamura Y, Miura K, Kono M, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Suda T, Chida K. Ultrasonic Microscope for Imaging of Fibrotic Interstitial Pneumonia American Thoracic Society International Conference 2012 (San Francisco, USA).

〔図書〕(計 3 件)

1. 中村祐太郎: 間質性肺炎, Q&A でわかる呼吸器疾患ガイドライン実践ブック 南江堂, 東京, p112-114, 2013 年
2. 中村祐太郎: 薬剤性肺障害, Q&A でわかる呼吸器疾患ガイドライン実践ブック 南江堂, 東京, p150-151, 2013 年
3. 中村祐太郎: 肺高血圧症, Q&A でわかる呼吸器疾患ガイドライン実践ブック 南江堂, 東京, p131-132, 2013 年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔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)
浜松医科大学附属病院 講師
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 教授
研究者番号：30291397

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