

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461558

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いたムコ多糖症におけるワクチンの免疫誘導効果の解析

研究課題名(英文) Analysis of vaccine-mediated immune induction in Mucopolysaccharidosis-specific iPS cells

研究代表者

徳原 大介 (Tokuhara, Daisuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60448751

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)：Toll様受容体(TLR)を介した自然免疫応答を解析した結果、健常者由来のiPS細胞から分化した樹状細胞との比較では、zymosanとMALP2によるサイトカイン産生が健常者と比較してムコ多糖患者では低いことが示された。また、対照となる健常者の新生児期と成人期の自然免疫応答の差異について解析を進めたところ、新生児におけるTLRを介した自然免疫応答の未熟性は免疫細胞やTLRによって異なり、zymosanがTLR2を介して新生児に成人と同等の免疫応答を惹起できることがわかった。今後、同症小児患者に対するワクチン開発においては、zymosanをアジュバントに用いた開発が有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：When Toll-like receptor (TLR)-mediated innate immune response was compared between Mucopolysaccharidosis (MPS)-specific cells and control iPS cells, zymosan or MALP2-mediated cytokine levels were significantly lower in MPS-specific iPS cells-derived dendritic cells compared to control iPS cells-derived dendritic cells. Then, when TLR-mediated innate immune response was compared between healthy neonates and healthy adults, immaturity of TLR-mediated immune response was disclosed to depend on cell types and TLR types in neonates, however zymosan provided comparable immune response between neonates and adults. Therefore, vaccine using zymosan as an adjuvant may play a key role in vaccine development for MPS children.

研究分野：粘膜免疫学

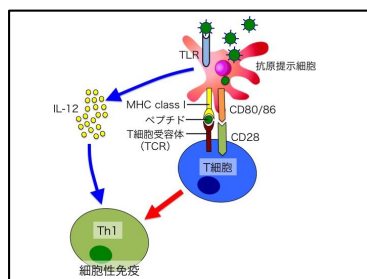
キーワード：ワクチン 自然免疫 小児 感染症 単球 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

ムコ多糖症 (MPS) は、ライソゾームの酵素異常による老廃物の細胞内蓄積によって細胞の膨化・臓器の肥大を起こす疾患であり、呼吸器感染症が死亡の主要な契機となるため、ワクチンによる効果的な感染症予防は不可欠である。ワクチンの免疫誘導の中核を担う樹状細胞も同疾患では酵素異常によって膨化するが、MPS 患者における樹状細胞 (DC) の免疫機構異常については情報が無い。また、新生児や乳児は年長児や健常成人と比較して感染症に罹患・重篤化しやすい一方、ワクチンによる免疫誘導効果は低く、その原因としてワクチン抗原や病原微生物を認識する Toll 様受容体 (TLR) の機能が新生児や乳児では低いと考えられており、MPS の小児患者ではさらに感染のリスクやワクチンによる免疫誘導効果の低さに影響を与えており、それらの患者に対する効果的なワクチンの開発は感染予防戦略にとって重要な課題といえる。

2. 研究の目的

MPS 患者は呼吸器感染により重篤化するリスクが高く、感染症に対する防御免疫誘導効果が低いことが推察されるが、その免疫能力については十分に分かっていない。また、健常者であっても、新生児や乳児は年長児や健常成人と比較して感染症に罹患・重篤化しやすい一方、ワクチンによる免疫誘導効果は低い。したがって、MPS、特に小児患者においてワクチンによる防御免疫を効果的に誘導できるアジュバントの開発は重要な課題と考えられる。さらに、ワクチンによる獲得免疫誘導には抗原提示細胞が病原微生物を TLR を介して認識し活性化され T 細胞に抗原提示を行う必要があることから (下図)、TLR を介した自然免疫応答を増強するアジュバントの開発に焦点をおいた研究が必要である。今回我々は、MPS 患者の自然免疫応答について検索するとともに、臍帯血を利用して新生児・乳児の自然免疫を効果的に賦活できるアジュバントの探索を行なったので報告する。



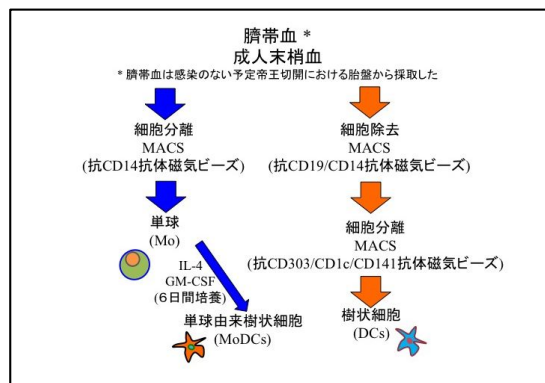
3. 研究の方法

(1) MPS 患者・健常者からの iPS 細胞の樹立と DC への分化:

MPS 患者ならびに健常者の皮膚生検で得られた線維芽細胞に対して Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc の遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入を行い、iPS 細胞の誘導・樹立を

行った。さらに Senju らの方法に従い、OP9 細胞をフィーダー細胞として iPS 細胞を培養し、分化・浮遊した細胞を回収し GM-CSF の存在下で培養し DC を分化誘導させた (文献)。MPS 由来の DC ならびに健常者由来の DC の自然免疫応答を比較するために、DC に LPS (TLR4 リガンド)、Pam3CSK4 (TLR1/2 リガンド)、Flagellin (TLR5 リガンド)、Zymosan (TLR2 リガンド)、CpG (TLR9 リガンド)、Poly(I:C) (TLR3 リガンド) あるいは Imiquimod (TLR7 リガンド) を添加し、12 時間後の培養上清中のサイトカイン (IL-8, IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10) 濃度を測定した。

(2) 自然免疫応答は年齢による差異が知られているため、健常者における新生児期と成人期の自然免疫応答の差異について解析を進めた。しかし、新生児から解析に必要な量の採血を行うのは侵襲的であるため、出産後に廃棄される胎盤から採取できる臍帯血が新生児の血液を反映すると考えられることから、臍帯血と成人血中の免疫細胞の自然免疫応答の比較を行うこととした。予定帝王切開例から臍帯血を採取し、対照群として健常成人から末梢血を採取した。リンパ球分離液を用いて単核球を回収した後、磁気細胞分離法により単核球を分離した。同様に磁気細胞分離法を用いて DC を分離した。単核球の一部は IL-4 と GM-CSF を添加して約 6 日間培養し DC (MoDC) へ分化させた (下図)。単核球、DC、あるいは MoDC を含んだ培地に LPS (TLR4 リガンド)、Pam3CSK4 (TLR1/2 リガンド)、Flagellin (TLR5 リガンド)、Zymosan (TLR2 リガンド)、CpG (TLR9 リガンド)、Poly(I:C) (TLR3 リガンド) あるいは Imiquimod (TLR7 リガンド) を添加し、12 時間後の培養上清中のサイトカイン (IL-8, IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10) 濃度を測定した。



(3) Zymosan は TLR2/TLR6 ヘテロ二量体のリガンドとされているが、MALP も TLR2/TLR6 ヘテロ二量体であることから、zymosan と MALP2 の間で自然免疫応答の活性化に差がないかどうかを評価した。(1)と同様に単核球、DC を分離し、あるいは MoDC を分化誘導し、

それらの細胞を含んだ培地に MALP2 (TLR2/TLR6 リガンド)を添加し、12 時間後の培養上清中のサイトカイン(IL-8 ,IL-6 ,TNF- α , IL-1 , IL-10)濃度を測定した。

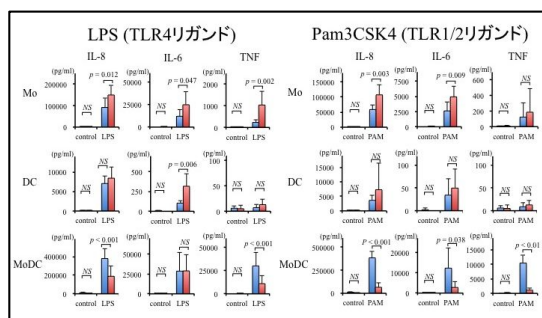
4 . 研究成果

(1) 健康者由来の iPS 細胞から分化誘導した DC との比較では、zymosan と MALP によるサイトカイン産生が MPS 特異的 iPS 細胞から分化誘導した DC では低い傾向が見られた。一方、iPS 細胞から誘導した DC は、培養条件によってサイトカイン産生能に差異が生じるため、同手法を用いて MPS 患者における自然免疫応答を評価するためには、分化誘導の工程における諸条件を厳格にしサンプル数をさらに増やしていく必要があると考えられた。

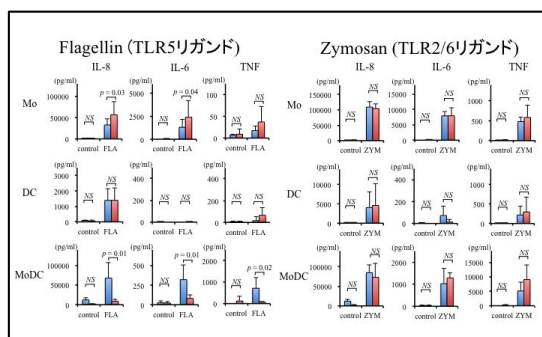
(2) LPS , Pam3CSK4 , flagellin , Poly(I:C) で刺激した場合、単球は成人よりも臍帯血群で低い炎症性サイトカイン産生を示したが、DC では両群に差はなく、MoDC は臍帯血群が成人よりも高い炎症性サイトカイン産生を示した(下図)。CpG と Imiquimod で刺激した場合、DC は成人と臍帯血群で炎症性サイトカイン産生に差はなく、単球と MoDC は成人と臍帯血の両群で有意な炎症性サイトカイン産生を認めなかった。一方、Zymosan で刺激した場合、単球・DC・MoDC における炎症性サイトカイン産生は成人と臍帯血の両群において差を認めなかった(下図)。

出芽酵母の細胞壁成分である Zymosan は、成人と同等の自然免疫応答を臍帯血の免疫担当細胞に惹起できることから、MPS の小児患者を含めた乳幼児の感染症に対するワクチンのアジュバントとして有用である可能性が示唆された。

(3) MALP2 で刺激した場合、単球と DC にお



ける炎症性サイトカイン産生は成人と臍帯



血の両群において差を認めなかった。MoDC は臍帯血群が成人よりも高い炎症性サイトカイン産生を示した。MoDC は組織炎症に参与する事から、乳幼児に対するワクチンのアジュバントとして MALP2 は副反応を誘導するため適さないことが示唆された。

効果的にワクチンによる獲得免疫の誘導を行うためには、単球や DC などの抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示を行う必要があるが、アジュバントは抗原提示細胞による抗原提示能力を高めることが期待される。今回の研究結果から、ワクチンによる免疫誘導効果が低いと予想される MPS の小児患者や健康乳幼児では、zymosan をアジュバントとして用いることによって、より高いワクチン効果を期待できるのではないかと考えられた。

< 引用文献 >

Senju S, et al. Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy. Gene Therapy. 2011;18:874-883

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)

Kyoko Nohmi, Daisuke Tokuhara, Daisuke Tachibana, Mika Saito, Yuko Sakashita, Akemi Nakano, Hiroyuki Terada, Hiroko Katayama, Masayasu Koyama, Haruo Shintaku. Zymosan Induces Immune Responses Comparable with Those of Adults in Monocytes, Dendritic Cells, and Monocyte-Derived Dendritic Cells from Cord Blood. Journal of Pediatrics. 査読有 2015;167:155-162.

[学会発表] (計 6 件)

1. 能見恭好, 徳原大介, 齊藤三佳, 新宅治夫. 臍帯血由来免疫細胞の自然免疫機構を基盤とした、乳幼児の消化管感染症に対するワクチンアジュバント開発. 第 42 回日本小児栄養消化器肝臓学会. 2015 年 10 月 16-18 日 . 広島国際会議場 (広島県広島市)
2. Tokuhara Daisuke, Nohmi Kyoko, Saito Mika, Shintaku Haruo. Zymosan but not other TLR agonists, induces immune responses comparable to those of adults in monocytes, DCs, and monocyte-derived DCs of neonates. European Academy of Paediatrics Congress and Mastercourse

2015. 17-20 September, 2015. Oslo,
Norway
3. Nohmi Kyoko, Tokuhara Daisuke, Saito
Mika, Shintaku Haruo. Zymosan induces
innate immune responses in neonates
comparable to adults. Asian Society for
Pediatric Research 2015. Apr 15-18, 2015.
Osaka, Japan
 4. 能見恭子、徳原大介、齋藤三佳、新宅治
夫 . ヒト臍帯血細胞を用いた新生児の自
然免疫機構の解明 : TLR2 リガンドは成
人と同等の自然免疫応答を新生児に誘
導しうる . 日本未熟児新生児学会 . 2014
年 11 月 10 日 ~ 11 月 12 日 . ひめぎんホ
ール (愛媛県松山市)
 5. Tokuhara Daisuke, Nohmi Kyoko, Saito
Mika, Shintaku Haruo. Zymosan but not
LPS, Pam3CSK4, or flagellin induces
immune responses in monocytes, DCs, and
monocyte-derived DCs of neonates
comparable to those of adults. The 5th
Congress of the European Academy of
Paediatric Societies. October 17-21, 2014.
Barcelona, Spain.
 6. Tokuhara Daisuke. Development of New
Generations of Mucosal Vaccines against
Gastrointestinal Infectious Diseases.
(Symposium) 13th Asian Pan-Pacific
Society for Pediatric Gastroenterology,
Hepatology and Nutrition, Oct 31-Nov 3,
2013. Tokyo, Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
[http://www.med.osaka-cu.ac.jp/pediat/gr
oup.html](http://www.med.osaka-cu.ac.jp/pediat/group.html)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者
徳原 大介 (TOKUHARA, Daisuke)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号 : 60448751

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし