

■受領No.1411

17 型ヘルパーT 細胞を標的とした 新規粘膜ワクチンアジュバントの開発

代表研究者

立花 雅史

大阪大学大学院薬学研究科 ワクチン・免疫制御学プロジェクト 特任准教授 (常勤)



Development of a novel mucosal vaccine adjuvant targeting T helper 17 cells

Principal Researcher

Masashi Tachibana,

Project for Vaccine and Immune Regulation, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University. Specially Appointed Associate Professor

理想的なワクチンでは、全身免疫応答のみならず粘膜免疫応答をも誘導できる必要がある。我々はこれまで、全身系投与による粘膜面への抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導には、I 型インターフェロン産生を伴う自然免疫の活性化と、続く 17 型ヘルパー T (Th17) 細胞の誘導が重要であることを明らかにしている。本研究では、細胞質内核酸センサーである STING のリガンド、および Th17 細胞のマスター転写因子 ROR γ t に対する合成アゴニストの投与により、上記の機構を再現できる可能性も見出した。これは、ヘルパー T 細胞を標的とする次世代型ワクチンアジュバントの実現可能性を示すものである。

It is necessary to induce not only a systemic immune response but also a mucosal immune response for the prevention of infection. We previously showed that activation of innate immunity with type I interferon production, followed by induction of T helper 17 (Th17) cells, is important for the induction of antigen-specific cytotoxic T cells (CTL) in mucosal compartments by systemic vaccination. In this study, we also found that this mechanism could be reproduced by the administration of ligands for STING, a cytoplasmic nucleic acid sensor, and a synthetic agonist for ROR γ t, the master transcription factor of Th17 cells. This indicates the feasibility of next-generation vaccine adjuvants targeting helper T cells.

1. 研究内容

1.1 目的

近年、猛威を振るっているエイズや新型インフルエンザ感染症、新型コロナウイルス感染症などの新興・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には、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。また、現在広く用いられているワクチンの多くは液性免疫応答のみを誘導するものであり、一定の効果が認められるものである。しかしながら、HIV のような易変異性ウイルスの場合、中和抗体による認識部位に変異が入ってしまい中和抗体が効かなくなることが知られている。また、ワクチンによって誘導される細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の“質”とエイズ発症の間には負の相関が認められることが報告されていることから、ワクチンによって効果的な細胞性免疫

を誘導することも重要視されている。つまり、現行のワクチンとは異なり細胞性免疫を誘導可能なワクチンは、易変異性病原体に対するワクチンとしても極めて高い有効性を示すと期待できる。

我々のこれまでの研究により、アデノウイルスベクター (Adv) を筋肉内へ投与することで、全身だけでなく粘膜面においても搭載抗原特異的な CTL を強く誘導するメカニズムを明らかにしている (*Front Immunol.* 2017)。さらに腸管粘膜面への CTL 誘導メカニズムに関して、投与部位である筋肉組織やその所属リンパ節における I 型インターフェロン (interferon; IFN) 産生や炎症性樹状細胞 (inflammatory dendritic cell; inf DC) 誘導を伴う自然免疫の活性化と、続く所属リンパ節における 17 型ヘルパー T (T helper 17; Th17) 細胞の誘導という 2 つのステップが重要であることを明らかにしている。そこで本研究では、全身及び粘膜の双方において強い細胞性免疫と液性免疫を誘導可能な新規ワクチンアジュバントの開発を目指し、Adv ワクチンによる免疫応答を模倣できる低分子化合物の創出を目的とした。Adv ワクチンによる I 型 IFN の誘導には Adv 由来核酸 (ゲノム DNA 等) が重要であることも見出していることから、細胞質内核酸センサーである stimulator of interferon genes (STING) に着目し、その内因性リガンドである 2'3'-cyclic GMP-AMP (cGAMP) や合成リガンドである 2'3'-cyclic dimeric GMP (c-di-GMP) などの環状ジヌクレオチド (cyclic dinucleotide; CDN) の新規ワクチンアジュバントとしての可能性について検討した。

1.2 結果

1.2.1 cGAMP 投与により腸管粘膜面に抗原特異的 CTL が誘導される

まず、CDN の抗原特異的 CTL 誘導能に関して検討を行った。抗原タンパク質として Ovalbumin (OVA) を用い、OVA と cGAMP あるいは c-di-GMP の混合溶液をマウスの両脚の大腿四頭

筋内に注射投与した。また対照群としては AddaVax を用いた。AddaVax は、上市されているアジュバントである MF59 と同様のエマルジョン型構造を持ち、細胞性免疫を誘導できることが知られている。免疫 2 週間後、全身免疫応答が起こる場として主要な脾臓を解析したところ、AddaVax および cGAMP 投与群では OVA 単独投与群に対して抗原特異的 CTL が誘導される傾向にあった。これらの個体では小腸の粘膜固有層 (Lamina propria) においても同様に抗原特異的 CTL が誘導される傾向にあった。このことから、cGAMP により腸管粘膜面 CTL 誘導が促進される機構が存在する可能性が示された。また、c-di-GMP 投与群では OVA 単独投与群に対して脾臓および腸管粘膜面の両方においてわずかながら抗原特異的 CTL の増加傾向が認められた。

1.2.2 cGAMP や c-di-GMP の投与部位である筋肉において I 型 IFN 産生が誘導される

次に、投与部位である筋肉における I 型 IFN 発現を確認したところ、OVA 単独投与群に対して AddaVax 投与群では I 型 IFN の発現は低下する傾向にあった一方で、cGAMP や c-di-GMP 投与群では発現が増強する傾向が認められた。また inf DC の前駆細胞である炎症性単球 (inflammatory monocyte; inf Mo) は CCR2 を発現しており、CCR2 リガンドである CCL2 や CCL7 は inf Mo の炎症部位への誘引に重要であることが知られている。そこで、これらのケモカインの発現についても解析したところ、AddaVax 投与群と同様に、cGAMP や c-di-GMP 投与群においても発現上昇傾向が認められた。以上の結果および、Adv による inf DC 誘導が I 型 IFN 依存的であることを踏まえると、いずれのアジュバントによっても inf Mo は誘引されうるが、AddaVax ではなく CDN によってのみ inf DC が誘導される可能性が考えられた。

1.2.3 所属リンパ節において I 型 IFN 依存的に inf DC が誘導される

前述の結果を受け、所属リンパ節における inf DC 誘導について検討を行った。その結果、予想どおり AddaVax では inf DC が誘導されていなかった一方で、cGAMP および c-di-GMP では誘導される傾向が認められた。さらに、その他の樹状細胞サブセットの誘導に対する影響は認められなかったことから、cGAMP および c-di-GMP は DC サブセットの中でも inf DC を特異的に誘導できる可能性が示された。Interleukin (IL)-1 \cdot 、IL-6、IL-23 および transforming growth factor (TGF)- β は Th17 細胞分化を促進するサイトカインであることが知られており、inf DC はこれらのサイトカインを産生することで Th17 細胞分化誘導に寄与すると考えられている。Adv ワクチンにより IL-1 β 、IL-6、IL-23 発現は誘導される一方で、TGF- β 発現は誘導されないことから、iLN における前者 3 つのサイトカイン発現について評価を行った。その結果、cGAMP 投与群ではいずれのサイトカインの発現も OVA 単独投与群と同程度であり、c-di-GMP 投与群では Il1b および Il23a の発現は OVA 単独投与群と比較して上昇傾向にあったものの、Il6 の発現は同程度であった。以上の結果より、Adv ワクチンと同様に cGAMP および c-di-GMP は、I 型 IFN シグナル依存的に inf DC を誘導するが、その inf DC は Th17 細胞誘導に寄与するほど十分には活性化されていない可能性が示された。

1.2.4 合成 ROR γ t アゴニストは、c-di-GMP により抑制された ROR γ t 遺伝子発現の低下を回復させる

健常マウスの脾臓およびリンパ節よりセルソーターを用いて単離した naïve CD4 $^+$ T 細胞に、抗原刺激とともにサイトカイン刺激 (IL-1 β , IL-6, IL-23) を加えて培養することで Th17 細胞が得られるが、c-di-GMP を添加したところ、ROR γ t 発

現の低下傾向が認められ、Th17 細胞誘導が抑制されることが示唆された。そこで、ROR γ t アゴニストを投与することで、c-di-GMP による Th17 細胞誘導抑制効果を打ち消すことができるのではないかと考え、検討を行った。これまでと同様に、c-di-GMP を OVA とともに大腿四頭筋内へ注射投与し、その 24 時間後に合成 ROR γ t アゴニストである SR0987 を腹腔内投与した。そして、筋肉内投与から 1 週間後の所属リンパ節において、c-di-GMP 投与により抑制されていた ROR γ t 発現が SR0987 の投与により上昇する傾向が認められた。したがって、ROR γ t アゴニストの投与により Th17 細胞を誘導できる可能性が示唆された。

1.3 結論

Adv ワクチンとは異なり、cGAMP や c-di-GMP は Th17 細胞を誘導できる可能性はあるものの、十分には誘導できない可能性が示された。しかしながら、ROR γ t アゴニストを共投与することで Th17 細胞をより強く誘導できる可能性も見出すことができた。当初の目的を達成し、さらに研究を推進することで、我が国の保健医療の向上に貢献することを目指す。

2. 発表 (研究成果の発表)

村田 雄飛、岡田 直貴、立花 雅史、抗原特異的な粘膜免疫応答の誘導を目指した c-di-GMP の全身投与、日本薬学会第140年会 (web開催、2020年3月)