The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ユニバーサルインフルエンザワクチン開発のための免疫グロブリンFcγ受容体を介した免疫反応評価系の確立
Author(s)	升田, 雄士
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92111
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　升田　雄士　）	
論文題名	ユニバーサルインフルエンザワクチン開発のための免疫グロブリンFcγ受容体を介した免疫反応評価系の確立

論文内容の要旨

現行のインフルエンザワクチンに期待される作用機序は、インフルエンザウイルスの膜タンパク質であるHA (Hemagglutinin) のヘッド領域を主とする中和抗体が誘導し、インフルエンザウイルス感染を防御することである。しかしながら、インフルエンザウイルスは、HAのヘッド領域に高頻度に変異を起こすことから、ワクチン株と流行株が不一致の場合、パンデミックを引き起こす可能性がある。そこで、広範なインフルエンザウイルス株に対して有効な免疫反応を誘導できるユニバーサルインフルエンザワクチンの開発が求められている。

ユニバーサルインフルエンザワクチン開発に向けた課題の一つが、有効性評価系の選択肢が非常に限られていることである。現在は、Hemagglutination inhibitionアッセイを用いて中和活性を測定する評価が標準化されている。しかし、近年では、中和活性以外にも、cytotoxic T lymphocyte反応やFcγ受容体と抗体を介した免疫反応がインフルエンザウイルス感染制御や重症化予防に重要であることが報告されている。中でも、natural killer (NK) 細胞やマクロファージ、単球に発現するFcγ受容体と抗体が結合することにより、これらの免疫細胞が活性化し、抗体依存性細胞傷害活性及び抗体依存性細胞貪食とよばれる感染細胞を除去するFcγ受容体を介したエフェクター機能がユニバーサルインフルエンザワクチンの開発に重要であることが知られている。一方で、これまでのFcγ受容体を介したエフェクター機能の評価に関する報告の多くは、エフェクター細胞として細胞株を用いており、細胞株を用いたアッセイでは、生体内に存在する多様な免疫細胞とのFcγ受容体の発現分布の違いや免疫細胞間での相互作用が反映されづらいという課題が存在していた。このような背景を踏まえ、本研究では、Fcγ受容体を介したエフェクター機能を反映するターゲット-エフェクター結合を評価する新規の非ヒト霊長類であるカニクイザルperipheral blood mononuclear cells (PBMC) を用いた評価系の確立し、インフルエンザHAスプリットワクチンの課題を検討した。

まず、カニクイザルPBMCを用いて、抗体を介したHA発現ターゲット細胞との結合をフローサイトメトリーにより解析することを可能とする評価系を構築した。最初に、広範抗HA中和モノクローナル抗体であるFI6-cynoIgG抗体を用いて検討を行い、カニクイザルPBMC中のエフェクター細胞とHA発現ターゲット細胞が結合した細胞数の濃度依存的な増加が認められた。さらに、FI6-cynoIgG1抗体処置とFI6-cynoIgG2抗体処置を比較すると、結合した細胞の頻度が有意に増加した。これらのことより、本評価系は、抗体のサブクラス間のFcγ受容体への親和性の差を見分けることができる高感度なアッセイ系であることが明らかとなった。次に、本評価系で認められた細胞の結合が、抗体を介した抗体-Fcγ受容体相互作用に依存するかを検証した。Fcγ受容体への結合能を低下させたFI6-cynoIgG1 LALA抗体を作製し、FI6-cynoIgG1抗体と結合する細胞の頻度を比較した。その結果、FI6-cynoIgG1 LALA抗体を処置した群は、FI6-cynoIgG1抗体を処置した群と比較して、結合した細胞の頻度が有意に低下し、その程度は、陰性対照と同程度であった。また、イメージングフローサイトメーターを用いた検討により、その結合した細胞は、カニクイザルPBMC中のエフェクター細胞とターゲット細胞であることを視覚的に確認した。さらに、結合したエフェクター細胞のFcγ受容体の発現様式について検討すると、結合した細胞は、単一のFcγ受容体を発現している訳ではなく、多様なFcγ受容体を発現様式していた。また、結合した細胞のサブセットに関しては、NK細胞及び単球のサブセットの一つであるclassical monocyteが主であることが明らかとなった。

次に、インフルエンザHAスプリットワクチンを投与した際の、血液中のHAと結合する抗体を網羅的に評価するために、カニクイザルにインフルエンザHAスプリットワクチン接種し、その後誘導されるHA特異的抗体のFcγ受容体を介したエフェクター機能について、血漿およびPBMCを用いて、第一章にて構築した評価系にて検討を行った。その結果、精製抗体を用いた場合と異なり、インフルエンザHAスプリットワクチン接種により誘導される血漿中は、主にclassical monocyteがターゲット細胞と結合した。一方で、NK細胞の結合能は低いことが明らかとなった。さらに、結合したclassical monocyteおよび結合していないclassical monocyteをソーティングし、活性化マーカーであるCD80の遺伝子発現を比較したところ、結合したclassical monocyteは、結合していないclassical monocyteと比較して、

CD80の遺伝子発現の有意な上昇が認められた。最後に、血液中のIgG以外の抗体のアイソタイプの関与を検証するため、血漿中のIgGをカラム精製し、結合した細胞サブセットの同定を行った。その結果、血漿から精製したIgGをターゲット細胞に処置すると、インフルエンザHAスプリットワクチン接種後の血漿を処置した際と同様にclassical monocyteが主にターゲット細胞に結合した。よって、インフルエンザHAスプリットワクチン接種後の血漿を処置した際に認められるFcγ受容体-エフェクター機能は、主に抗HA特異的IgG抗体を介していることが示唆された。以上のことから、現行インフルエンザワクチンにより誘導されるHA特異的IgGは、NK細胞に結合する能力が低いことが課題であることを明確にすることができた。

本研究において、カニクイザルPBMCを用いたFcγ受容体を介した免疫反応評価系を構築し、現行のインフルエンザワクチンのプラットフォームであるスプリットワクチン接種後の免疫反応を解析し、課題を確認できたことは、今後のユニバーサルインフルエンザワクチンの開発の一助になることから、本研究で得られた知見は、今後のインフルエンザワクチン開発に貢献できるものと考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　升田　雄士　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　招へい教授	山本　拓也
	副 査　教授	水口　裕之
	副 査　教授	吉岡　靖雄

論文審査の結果の要旨

インフルエンザは、インフルエンザウイルスに感染することにより、咳や発熱を呈する急性呼吸器感染症である。本国において、毎年1000万人以上が罹患し、1万人以上が入院する。通常、インフルエンザワクチン接種により、表面抗原ヘマグルチニン（Hemagglutinin; HA)のヘッド領域を主とする中和抗体が誘導され、インフルエンザウイルス感染を防御することが期待される。しかしながら、インフルエンザウイルスは、HAのヘッド領域に高頻度に変異を起こすことから、ワクチン株と流行株が不一致の場合、パンデミックを引き起こす可能性がある。そこで、広範なインフルエンザウイルス株に対して有効な免疫反応を誘導できるユニバーサルインフルエンザワクチンの開発が求められている。例えば、比較的変異が少なく広範な株で保存されたHAステム領域に対する抗体の一部が、広範囲中和抗体として機能する例が報告されている。この種の広範囲中和抗体クローンは、多様な株への中和活性を持つのみならず、中和活性をエスケープするような変異あるいは中和抵抗性株に対しても、Fcを介したNK細胞依存性の抗体依存性細胞傷害活性（antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC)やミエロイド系細胞依存性の抗体依存性細胞貪食(antibody-dependent cellular phagocytosis; ADCP)などのFc受容体依存性応答により感染防御能を発揮することが知られている。従って、ユニバーサルインフルエンザワクチン開発において、そのようなFc受容体依存性応答を惹起する戦略が重要であり、Fc受容体依存性応答の解析は必要不可欠である。しかしながら、ワクチン開発の非臨床試験における重要なモデル生物である非ヒト霊長類において、Fc受容体を解析する方法論は限られていた。

本論文は、ユニバーサルインフルエンザワクチン開発への応用を目指した非ヒト霊長類におけるFc受容体機能評価系の樹立を目指したものである。分子生物学及びイメージングフローサイトメトリー、マルチカラーフローサイトメトリーを駆使して解析系を樹立し、以下の知見を得ている。

1. カニクイザル型 Fc を持つモデル広範囲抗体クローン FI6 をモデル抗体として用い、カニクイザル PBMC における Fc 受容体を介した結合、その強弱の判定、結合した細胞サブセットの種類、結合した細胞における Fc 受容体発現パターンのプロファイルを可能とする新規解析系を樹立した。
2. カニクイザルにスプリットワクチンを投与し、ワクチンにより誘導された血清を用い、上記実験系での Fc 受容体応答を検出できることを示した。
3. 精製リコンビナント抗体とワクチン誘導抗体とで、Fc 受容体を介して結合している細胞サブセットの割合が異なること、ワクチン血清では主に単球が結合していること、また結合している単球は実際に活性化していること、即ち ADCP を間接的に評価できていることを示した。

以上、本論文の成果は、非ヒト霊長類におけるFc受容体機能解析をシングルセルレベルで可能とする基盤となり得る技術であり、今後のユニバーサルインフルエンザワクチン開発をはじめとするFc受容体機能が重要とされる多様なワクチン開発に向けた重要な知見であるため、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。