

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Fc γ 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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

2022年度（令和4年度）博士論文

博士論文題名

**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 Fc γ 受容体を介した
免疫反応評価系の確立**

大阪大学大学院薬学研究科 創成薬学専攻

免疫老化制御学分野

升田 雄士

目次

略語一覧

緒論

本論

第一章 カニクイザル末梢血単核細胞を用いた $Fc\gamma$ 受容体を介した免疫反応の解析系の構築

第二章 カニクイザルを用いたインフルエンザ HA スプリットワクチン接種後の $Fc\gamma$ 受容体を介した免疫反応の解析

総括

結論

謝辞

補足図

参考文献

略語一覽

ADCC	• • • • •	antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADCP	• • • • •	antibody-dependent cellular phagocytosis
CA	• • • • •	A/California/07/2009
CCR	• • • • •	CC-Chemokine receptor
CD	• • • • •	Cluster of Differentiation
cDC	• • • • •	conventional dendritic cells
cDNA	• • • • •	complementary deoxyribonucleic acid
CFSE	• • • • •	5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CTL	• • • • •	cytotoxic T lymphocyte
cyno	• • • • •	cynomolgus macaque
FSC	• • • • •	forward scatter
FBS	• • • • •	Fetal bovine serum
HA	• • • • •	Hemagglutinin
HAI	• • • • •	Hemagglutination inhibition
HLA	• • • • •	Human leukocyte antigen
IAV	• • • • •	Influenza virus A
IFN	• • • • •	Interferon
Ig	• • • • •	Immunoglobulin
luc	• • • • •	luciferase
NK	• • • • •	natural killer
NKR	• • • • •	natural killer cell resistant

NC	• • • • •	A/New Caledonia/20/99
PBMC	• • • • •	peripheral blood mononuclear cells
PBS	• • • • •	phosphate-buffered saline
pDC	• • • • •	plasmacytoid dendritic cell
PR8	• • • • •	A/Puerto Rico/8/1934
SD	• • • • •	standard deviation
SEM	• • • • •	standard error of the mean
Th1	• • • • •	T helper type 1
Th2	• • • • •	T helper type 2
TLR	• • • • •	Toll-like receptor
qRT-PCR	• • • • •	Quantitative real time-polymerase chain reaction

緒論

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[1]。ヒトに感染し、症状が現れるインフルエンザウイルスは、A、B及びC型の3つが知られている[2]。現在、A及びB型インフルエンザウイルスが主に流行している。B型インフルエンザウイルスはヒトのみに感染するが、A型インフルエンザウイルス (Influenza virus A; IAV) は、ヒトのみならず、豚や野生の渡り鳥などが自然宿主と考えられている[3, 4]。これらの動物に感染したインフルエンザウイルス株に、同一宿主に異種インフルエンザウイルス株が共感染すると、遺伝子再集合と呼ばれるインフルエンザウイルス株間で遺伝子が交換される。具体的には、IAVは、主にヘマグルチニン (Hemagglutinin; HA) のヘッド領域において高頻度に変異が起こり (抗原ドリフト)、パンデミックを引き起こすことが危惧され、脅威となっている[5]。

ヒトでのIAV感染に対応するために、これまで様々なワクチンや抗ウイルス薬が開発、使用されている。中でも、公衆衛生的にはワクチンが最も費用対効果が高い。期待される作用機序としては、インフルエンザワクチン接種により、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である。しかしながら、前述のように、IAV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。

これまでに、ユニバーサルインフルエンザワクチンの開発を目指し、様々なアプローチが試みられている。その一つとして、ワクチン抗原へのアジュバントの添加がある。アジュバントは、主に自然免疫を介して免疫細胞を活性化し、抗原への免疫記憶能を高める。インフルエンザワクチンにおいても、スクアレンベースのアジュバントであるMF59やAS03が既にワクチンアジュバントとして一部承認されている[6]。私は、これまでに次世代型Toll-like receptor (TLR) 9アゴニストであるK3-SPGをアジュバントとして用いることで、インフルエンザ抗原への免疫反応を高める戦略を検討し、報告してきた[7, 8]。この報告の概要について以下に要点をまとめる。

アジュバントとして用いたK3-SPGは、TLR9アゴニストであるK3をDectin-1に結合するシゾフィランで包んだナノ粒子である。K3-SPGの免疫賦活化作用の特徴としては、*in vitro*にてヒト末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) からI型、II型インターフェロン (Interferon; IFN) 及びT helper type 1 (Th1) 型サイトカイン産生を強力に誘導することが挙げられる[9]。そこで私は、K3、K3-SPG及びTLR3等に認識され、炎症を引き起こすアジュバントであるPoly(I:C)を単剤で非ヒト霊長類であるカニクイザルに*in vivo*にて投与すること

により、その後の免疫反応を解析した[8]。まず、各種アジュバント2mgを投与後の炎症反応に関して、血液中の各種血球細胞数の経時的な変化について検討を行った。その結果、Poly(I:C)を投与した群は、K3及びK3-SPGを投与した群と比較して、血液中の白血球数、好中球数及び単球・好酸球・好塩基球数が投与8時間後に有意に増加した。さらに、炎症時に血液中で増加及び活性化することが知られているintermediate monocyteへのアジュバント投与の影響を評価した[10, 11]。その結果、Poly(I:C)投与1日後において、Human leukocyte antigen (HLA)-DR陽性細胞中のintermediate monocyteの頻度の有意な増加、及び活性化マーカーであるCC-Chemokine receptor (CCR) 7及びCluster of Differentiation (CD) 83の発現上昇が認められた (Supplementary Figure 1-3)。TLR9を発現し、活性化した際にI型IFNを産生する樹状細胞のサブセットの一つである形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell; pDC) は、K3-SPG投与1日後において、活性化が認められた。一方で、他のアジュバント投与では、pDCの活性化は認められなかった。

以上より、K3-SPGは非ヒト霊長類において、顕著な炎症を惹起することなく、特にTh1型の獲得免疫誘導に重要なサイトカイン産生を増強することができ、ワクチンアジュバントとして有望であるという結果が得られた。

そこで次に、このような特性を持つK3-SPGを用いて、ワクチン開発を考える前提となるインフルエンザウイルスの感染防御に関わる免疫反応を詳細に解析した。前提として、インフルエンザウイルス感染防御の主体となる免疫反応は、インフルエンザウイルスがシアル酸受容体に結合する過程を阻害する中和活性が挙げられる。この中和活性は、HAのヘッド領域に存在する受容体結合領域に抗体が結合することにより、インフルエンザウイルスがシアル酸受容体に結合し、気道上皮細胞に感染することを防御する。現行のインフルエンザワクチンの有効性評価は、この中和活性を指標としている。ただ一方で、この中和活性はヘッド領域に対する抗体が主な役割を担っているが、ヘッド領域はしばしば変異が入りやすいことから、流行株とワクチン株の配列が大きく異なる場合には、感染防御能を発揮することが困難となる。一方で、ウイルスが体内の細胞に感染した後、ウイルスの更なる増殖を防ぐためには、細胞障害性T細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) 反応や抗体のFc γ 受容体を介した免疫反応が重要であることが知られている [12, 13]。

以上の前提を踏まえ、私は、まずK3-SPGをA/New Caledonia/20/99(NC)株HAスプリットワクチンのワクチンアジュバントとして用い (K3-SPG HA)、マウスに接種して攻撃接種試験を行なった。対照群としては、HAスプリットワクチンのみ、T helper type 2 (Th2) 型免疫反応を誘導するためのHAスプリットワクチンにアラムアジュバントを添加した群 (Alum HA)、パンデミックインフルエンザワクチン用アジュバントとして用いられているMF59と同様の組成である実験用試薬のAddavax (Addavax HA) [14]を設定した。その結果、Addavax HA、K3-SPG HAでワクチン株と同種のウイルス (NC) での攻撃接種に対して防御効果が認められた。一方

で、異種インフルエンザウイルス株 (A/Puerto Rico/8/34; PR8) で攻撃接種した場合は、K3-SPG HA群でのみ防御効果を示すことが確認された。次に、K3-SPGのワクチン株と異種株に対する防御機構の解明を試みた。その結果、CTL反応及び中和活性はこの防御機構には関与している可能性が低いことが明らかとなった。一方で、抗体とFc受容体を介した免疫反応の関与を検証するため、Fc受容体 γ 欠損マウス (-/-) にK3-SPG添加型NC株HAスプリットワクチンを接種し、異種インフルエンザウイルス株であるPR8株インフルエンザウイルスを感染させ、同様の処置を行った野生型マウス (+/+) と生存率を比較した。その結果、K3-SPG添加型HAスプリットワクチンを接種したFc受容体 γ 欠損マウスは、K3-SPG添加型HAスプリットワクチンを接種した野生型マウスと比較して、PR8株インフルエンザウイルス感染後の生存率が有意に低下した。

以上より、K3-SPG添加型HAスプリットワクチンによって誘導される抗体反応では、Fc γ 受容体を介した免疫応答が異種インフルエンザウイルス感染に対する防御効果に重要であることが示唆された[7] (Supplementary Figure 4-5)。これまでも、精製抗体を用いて、マウスを用いてFc γ 受容体を介した免疫反応が、インフルエンザウイルス感染に重要であるという報告がされている[15,16]。Fc γ 受容体を発現するnatural killer (NK) 細胞やマクロファージ、単球がFc γ 受容体と抗体が結合することにより、活性化し、感染細胞に対して、抗体依存性細胞傷害活性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) 及び抗体依存性細胞貪食 (antibody-dependent cellular phagocytosis; ADCP) とよばれる細胞障害があるグランザイムやパーフォリンを放出することで感染細胞を死滅させる、または、感染細胞を貪食することで排除する。このような免疫反応により、インフルエンザウイルスが体内で増殖することを防ぐことができる [17]。

このような研究を通じて、先に述べた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点も見えてきた。そのうち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。ユニバーサルインフルエンザワクチンを開発するためには、現行ワクチンとの差異を明確にできるような新しい評価系が必要であると考えられる。しかし、現在はHemagglutination inhibition (HAI) アッセイが標準の評価系となっている。このアッセイは、HAのヘッド領域に存在する受容体結合部位周辺のエピトープへの結合能に基づいて、インフルエンザウイルスに対する中和活性を測定する評価系である。ただ近年では、中和活性以外にも、CTL反応やFc γ 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[12, 13]。そこで、中和活性以外の免疫反応がインフルエンザウイルス感染に対してどのような役割を担っているかに関して、評価系の構築からワクチン接種後の免疫反応の解析を行うこととした。この結果は、今後のユニバーサルインフルエンザワクチンの開発において、重要な知見となると考えられるため、ここに博士論文として纏めた次第である。

本論

第一章 カニクイザル末梢血単核細胞を用いたFc γ 受容体を介した免疫反応の解析系の構築

諸論で述べた先行研究を踏まえ、ユニバーサルインフルエンザワクチン開発においては、異種インフルエンザウイルスに対する免疫グロブリンとFc受容体を介した免疫反応評価法を確立することが重要であると考えられる。加えて実用化を見据えたワクチン開発においては、有効性を評価するための動物モデルの選定が重要である。もちろん、マウスは最も広く用いられている動物モデルである。しかしながら、マウスはそもそもインフルエンザウイルスの自然宿主ではなく、さらにヒトで流行を引き起こすインフルエンザウイルス株は、マウスでは感染性が低いことが知られている。さらにFc受容体を介した免疫反応に関しても、Immunoglobulin (Ig) Gのサブクラスの種類やそれに関連するFc受容体の発現分布がヒトとは異なることが知られている。具体的には、マウスは、ヒトのFc γ 受容体IIIaと機能的に類似したFc γ 受容体IVを発現しているが、その分布やIgGサブクラスとの結合においてヒトFc γ 受容体IIIaと異なる[18]。そのため、マウス以外の実験動物モデルを用いることも考慮する必要がある。

一方で、アカゲザルやカニクイザルなどの非ヒト霊長類モデルは、遺伝学的に最もヒトに近縁であるのみならず、ヒトとFc γ 受容体について発現分布が類似している。そのため、非ヒト霊長類は、ヒトのFc γ 受容体機能を予測する上で有用な動物モデルであることが示唆されている。これまでも、非ヒト霊長類を用いてFc γ 受容体-エフェクター機能に関する研究は行われており、例えばFc γ 受容体を介した抗体との結合がインフルエンザウイルス排出量の減少と関連していることが報告されている[19, 20]。ヒトFc γ 受容体には、主にFc γ 受容体I (CD64)、Fc γ 受容体II (CD32)、Fc γ 受容体IIIa (CD16) の3種類存在することが知られているが[18]、サルFc γ 受容体もヒトFc γ 受容体と多くの共通点を持つ。例えば、ヒト及びサルではどちらにおいても、IgG1及びIgG3は、Fc γ 受容体I、Fc γ 受容体II、Fc γ 受容体IIIaに結合し、一方で、IgG2に関しては、各Fc γ 受容体への結合力がIgG1及びIgG3と比較して低いことが知られている (Table1)[21]。

Fc γ 受容体IとFc γ 受容体IIは、単球、マクロファージ、及び樹状細胞に発現し、Fc γ 受容体IIIaは、NK細胞、好中球、単球、及びマクロファージに発現することが知られている[22-24]。そのため、各々の免疫担当細胞が、それぞれのIgGサブクラス-Fc γ 受容体を介した標的細胞との結合により、結合した各々の免疫細胞が活性化し、ADCC及びADCPが誘導される[17]。

	Fc γ 受容体 I	Fc γ 受容体 II	Fc γ 受容体 IIIa
IgG1	+++	++	+
IgG2	-	+	-
IgG3	+++	++	++
IgG4	++	+	+

Table 1. ヒトにおける各Fc γ 受容体とIgGサブクラスの結合力

各Fc γ 受容体とIgGサブクラスの結合力を相対的に示す。(- < + < ++ < +++)

その他に考慮すべき点として、これまでのADCCやADCP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いることが挙げられる。エフェクター細胞として用いられている細胞株は、Fc γ 受容体の発現様式が初代細胞とは異なることから、初代細胞と異なる抗体との結合や反応を示すことが懸念される。また生体内に存在する免疫細胞は互いに作用することで免疫応答を行なっている点が重要であり、細胞株を用いた実験ではこの点が軽視されてきたことも課題である[25-27]。Fc γ 受容体-エフェクター機能は、NK細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞[28]、B細胞[29]に加え、CD8⁺T細胞の活性化にも関与しており、特定の細胞サブセットのみの評価では不完全なものであるといえる。そのため、初代細胞を用いてFc γ 受容体-エフェクター機能を同時かつ総合的に評価できるシステムの開発が必要であると考えられる[15, 16, 28-30]。加えてこれまでの非ヒト霊長類を用いたFc γ 受容体を介した免疫反応を用いた評価系に関しては、十分なアッセイ系が構築されていない。

以上を踏まえて本章では、カニクイザルのPBMCを用いてFc γ 受容体を介した免疫反応の解析系の構築を試みることにした。

【実験材料と方法】

ターゲット細胞株の樹立

ホタルルシフェラーゼ (luciferase; luc) のcomplementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を人工合成し、pMx-IRES-Puro ベクター (Cell Biolabs, Inc, San Diego, CA, USA) に組み込んだ。ルシフェラーゼ導入マウスレトロウイルスを作製するために、pMx-fLuc-IRES-Puro ベクターをPlatinum-Aパッケージング細胞 (Cell Biolabs, Inc.) にトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後、培養上清を回収し、A549細胞に感染させ、A549-luc細胞を樹立した。その後、NK細胞を介した細胞障害に耐性があるターゲット細胞を樹立するため、A549-luc細胞とNK細胞株であるNK92mi細胞株と1週間共培養後、別のNK細胞株であるKHYG-1細胞株とさらに1週間共培養し、NK細胞に抵抗性であるA549- natural killer cell resistant (NKR)-luc細胞株を作製した。次に、A549-NKR-luc細胞株にHAを発現させるため、pCMV/R H1 A/Puerto Rico/8/1934 (PR8) ベクターまたは、pCMV/R H1 A/California/07/2009 (CA) ベクターをA549-NKR-luc細胞に4D-Nucleofector System (Lonza, Basel, Switzerland) を用いてエレクトロポレーションにて導入した。エレクトロポレーション後、FI6抗体を結合させ、Alexa Fluor 647標識抗ヒトIgG (H+L) 抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を結合させ、HA発現が高い細胞に関してセルソーターを用いてソーティングし、Blasticidine (終濃度10 μ g/ml) で選択し、HA発現A549-NKR-luc細胞株を樹立した。

ターゲット細胞株のNK細胞に対する耐性評価

NK92mi細胞株とA549-lucまたはA549-NKR-luc細胞株を1:1、2:1、4:1及び8:1の割合で6時間共培養した。培養後にLuciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて細胞を溶解し、基質を加えた後、発光を測定した

カニクイザル型モノクローナル抗体の作製

PD-1 cynomolgus macaque (cyno) IgG1重鎖及び軽鎖を発現するpcDNA3.1-PD-1 cynoIgG1ベクターは、医薬基盤・健康・栄養研究所の永田諭志博士から供与頂いた。可変領域をNEBuilder HiFi DNA Assembly (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) によりFI6重鎖可変領域及び軽鎖可変領域[31]と入れ替えた。cynoIgG2重鎖定常領域及びcynoIgG1 LALA (L234A and L235A) 変異体は、コドン最適化後、人工合成により作製し、NheIとNotIサイトによりpcDNA3.1-PD-1のcynoIgG重鎖中のcynoIgG1定常領域と組み替えた。

作製したプラスミドを用いてExpi293発現システム (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) にて抗体を発現させた。すなわち、Expi293F細胞をFreeStyle無血清培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で培養し、100mL FreeStyle無血清培地で 1×10^6 / mLに調

整した。10mL Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 中の重鎖及び軽鎖プラスミド各100 μ g 及び100 μ L 293fectin (Thermo Fisher Scientific) を混合し、Expi293F細胞にトランスフェクションした。20分後、100mL FreeStyle無血清培地を加え、5日間振とう培養した。細胞の培養上清を回収し、0.45 μ mフィルターで濾過した。上清をAKTA flux s (Cytiva, Tokyo, Japan) を用いて濃縮し、等量の40 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を加えた。AKTA Start を用いて 20mMリン酸バッファーで平衡化したHiTrap rProtein A FFカラム (Cytiva) に溶液を添加した。20 mMリン酸緩衝液で洗浄後、100 mM glycine-HCl (pH 2.7) (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) で溶出し、ピーク画分を1M Tris (pH 9.0) (Nippon Gene, Tokyo, Japan) で中和し、Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes (Thermo Fisher Scientific) を用いてphosphate-buffered saline (PBS) で4 $^{\circ}$ Cにて一晩透析した。その後、Amicon Ultra-3K (Thermo Fisher Scientific) を用いて、1mg/mlとなるように濃縮した [32-35]。

フローサイトメトリーによる抗体-Fc γ 受容体を介した細胞結合評価

カニクイザルの凍結 PBMC を解凍し、10%非働化 fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich)、100unit/ml penicillin 及び 100 μ g/ml streptomycin (Sigma-Aldrich) (以下、R10) に 50units/mL Benzonase (Merck, Darmstadt, Germany) を添加し、標準条件 (37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95%湿度) 下にて 1 時間処理した。R10 で洗浄後、蛍光色素 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, Thermo Fisher Scientific) を終濃度 5 μ M にて標準状態で 7 分間標識し、氷冷した 6% FBS 含有 PBS で 2 回洗浄し、反応を停止させた。その後、R10 に再懸濁し、細胞数を計測した。HA 発現-A549-NKR-luc 細胞は、細胞数を計測後、終濃度 10 μ g/ml にて FI6-cynoIgG1/LALA/2 抗体または control humanIgG1 抗体 (clone QA16A12, BioLegend, San Diego, CA, USA) を加え、室温で 15 分間インキュベートした。インキュベーション後、PBS で洗浄した。HA 発現-A549-NKR-luc 細胞 (1 \times 10⁵ 個) と CFSE 標識した PBMC (1 \times 10⁵ 個) を 96 ウェル丸底プレート (Corning, Glendale, AZ, USA) で 15 分間共培養を行った。その後、96 ウェル V 底プレート (Corning) に移し、PBS で 2 回洗浄した後、LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific) で室温にて 10 分間染色を行った。PBS で洗浄後、細胞を 1%パラホルムアルデヒドで固定し、5つのレーザーを装備した FACSymphony A5 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて分析した。データは FlowJo ソフトウェアバージョン 10.7.1 (BD Biosciences) で解析した。

フローサイトメトリーによるFc γ 受容体発現分布及びサブセットマーカー同定解析

カニクイザルの凍結PBMCを解凍し、R10に50units/mL Benzonaseを添加し、標準条件下にて1時間処理した。R10で洗浄後、CFSEを100nMにて標準状態で7分間標識し、氷冷した6%

FBS含有PBSで2回洗浄し、反応を停止させた。その後、R10に再懸濁し、細胞数を計測した。HA発現-A549-NKR-luc細胞は、細胞数を計測後、終濃度10 μ g/ml FI6-cynoIgG1抗体またはFI6-cynoIgG2抗体を加え、室温で15分間インキュベートした。インキュベーション後、PBSで洗浄した。HA発現-A549-NKR-luc細胞 (1 \times 10⁵個) とCFSE標識したPBMC (5 \times 10⁵個) を96ウェル丸底プレートで15分間共培養を行った。その後、96ウェルV底プレートに移し、PBSで2回洗浄した後、結合細胞を含む細胞懸濁液を、LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Stain Kit で染色した後、FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を加え、室温で10分間インキュベートした。PBSで洗浄後、細胞を抗CD64-PE (10.1)、抗CD123-Cy7PE (7G3)、抗CD56-Alexa Fluor 700 (B159)、抗CD32-BV786 (FL18.26)、抗CD3-BUV615 (SP-34)、抗CD14-BUV805 (M5E2) (いずれもBD Biosciences)、抗CD11c-PE-Cy5 (3.9)、抗CD16-APC-Cy7 (3G8)、抗CD20-BV711 (2H7) (いずれもBioLegend)、抗CD159a (NKG2A)-APC (Z199) (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)、抗HLA-DR-TDPE (TU36) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)、室温15分間で染色した。PBSで洗浄後、1%パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、フローサイトメーターで測定した。

イメージングフローサイトメトリー解析

PR8-HA発現A549-NKR-luc細胞にFI6-cynoIgG1抗体またはFI6-cynoIgG2抗体を終濃度0.5 μ g/mlで室温にて15分間結合させた。洗浄後、細胞をER tracker Red (Thermo Fisher Scientific) を用いて標準条件下で15分間標識した。カニクイザルのPBMCを終濃度2nM CFSEで標識した。これらの細胞を標準条件下で45分間共培養し、Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) を終濃度250ng/mlで室温にて15分間標識した。PBSで2回洗浄後、細胞を1%パラホルムアルデヒドで固定し、PBSに再懸濁し、ImageStreamX Mk II (Luminex, Austin, TX, USA) を用いて測定した。データは、IDEASソフトウェアバージョン6.2 (Luminex) を用いて解析した。

動物実験とPBMCのサンプリング

この検討では、20頭のカニクイザルを使用した。すべての動物は、Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Institutes of Health Report no.85-23 (Department of Health and Human Services, Bethesda, MD, 1985) に従って飼育され、プロトコル承認 (DS30-41R1) を得て、医薬基盤・健康・栄養研究所霊長類医科学研究センターで採血を行った。また、PBMCは、Ficoll-Paque PLUS (Cytiva) を用いて採取した。PBMCは10%DMSOを含むFBS中で凍結し、液体窒素下で保存した。

統計解析

統計解析は、Prism 7.0a (GraphPad, San Diego, CA, USA) を用いて行った。2群間の差は、対応のないサンプルについてはMann-Whitney U検定、対応のあるサンプルについてはWilcoxonの符号順位検定を用いて統計解析を行った。p値が0.05より小さい場合を統計学的有意性が認められるとした。

【結果】

(HAを発現するターゲット細胞の作製)

評価系を構築する第一歩として、まず、ターゲット細胞の作製を試みた。IAVは肺上皮細胞から感染するため、ヒト肺上皮細胞であるA549細胞株をターゲット細胞の親細胞として選択した。A549細胞にマウスレトロウイルスを用いて、相対的な数を定量的にモニターするためにルシフェラーゼ遺伝子を導入した (A549-luc細胞)。次に、A549細胞は、NK細胞と共培養するとNK細胞の細胞障害により死滅するため、A549-luc細胞をNK細胞株であるKHYG-1細胞株と1週間共培養し、さらに別のNK細胞株であるNK92mi細胞株と1週間共培養することにより、NK細胞の細胞障害に耐性を有する細胞を樹立した (A549-NKR-luc細胞)。NK細胞の細胞障害に耐性であるかを確認するため、NK92mi細胞株 (effector cells; E) とA549-NKR-luc細胞及びA549-luc細胞 (target cells; T) を各比率で6時間培養し、その後、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、各比率において、A549-NKR-lucはA549-lucと比較し、ルシフェラーゼ活性が有意に高く、NK細胞の障害活性に対して耐性が高いことが認められた (Figure 1)。その後、A549-NKR-luc細胞にカリフォルニア株由来HA (CA-HA) とPR8株由来HA (PR8-HA) を安定的に発現する細胞株を樹立した。

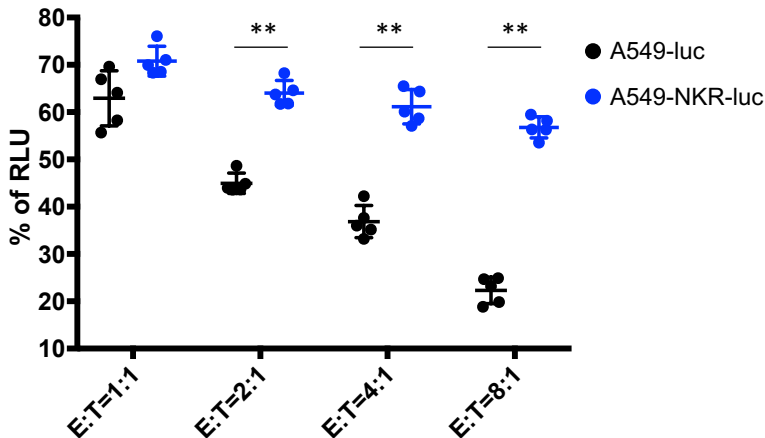


Figure 1. HA発現A549-NKR-luc細胞株の樹立

A549-luc及びA549-NKR-luc細胞株をNK92mi細胞株と各比率で共培養した。培養6時間後に細胞を溶解し、基質を加えた後、発光を測定した (n=5)。データは平均値±standard deviation (SD) で示した。群間の差はMann-Whitney U検定で統計解析を行った。**p<0.01

次に、非ヒト霊長類細胞におけるFc γ 受容体-エフェクター機能をモニターする高感度なアッセイ系を確立するために、広範抗HA中和モノクローナル抗体として知られているFI6抗体[31]を用いて検討を行なった。ヒトはFc γ 受容体を介した免疫反応に関して、IgGのサブクラス間でその寄与度が異なることが知られており、ヒトIgG1及びヒトIgG3抗体は、ヒトIgG2抗体と比較して、各Fc γ 受容体への親和性が高い[18, 36]。そこで、各Fc γ 受容体とのサブクラス間の違い

を評価できる高感度なアッセイ系であるかを確認するため、Fc γ 受容体高親和性であるIgG1及びIgG3のうち、血液中のIgGサブクラスの過半数を占めるIgG1について、ヒト型のFI6抗体のFc領域をカニクイザル型IgG1及びヒト型のFI6抗体のFc領域をFc γ 受容体低親和性であるカニクイザル型IgG2へと改変したFI6-cynoIgG1抗体及びFI6-cynoIgG2抗体を作製した。その後、CA-HA発現A549-NKR-luc細胞の細胞表面におけるHAへのFI6-cynoIgG抗体へ結合能を評価するため、蛍光標識した抗IgG抗体を結合させ、フローサイトメトリーにより解析した。その結果をヒストグラムで示した。その結果、FI6-cynoIgG1抗体とIgG2抗体は同濃度においてCA-HA発現A549-NKR-luc細胞に対して、同程度に結合した。また、抗体の濃度を高めることで、その結合する抗体量が増加したことから、用量依存性が認められた (Figure 2A)。陰性対照であるHAに結合しないcontrol humanIgG1抗体と比較することにより、各濃度 (0.016、0.08、0.4、2及び10 μ g/ml) において、FI6-cynoIgG1抗体及びIgG2抗体は、生細胞に結合した抗体量が有意に多かった (Figure 2B)。以上より、これら抗体の抗体可変領域であるFabの抗原結合能力は同程度であると判断し、これらの各種cynoIgG抗体を用いて、以降のFc-エフェクター機能評価系構築のための実験を行うことにした。

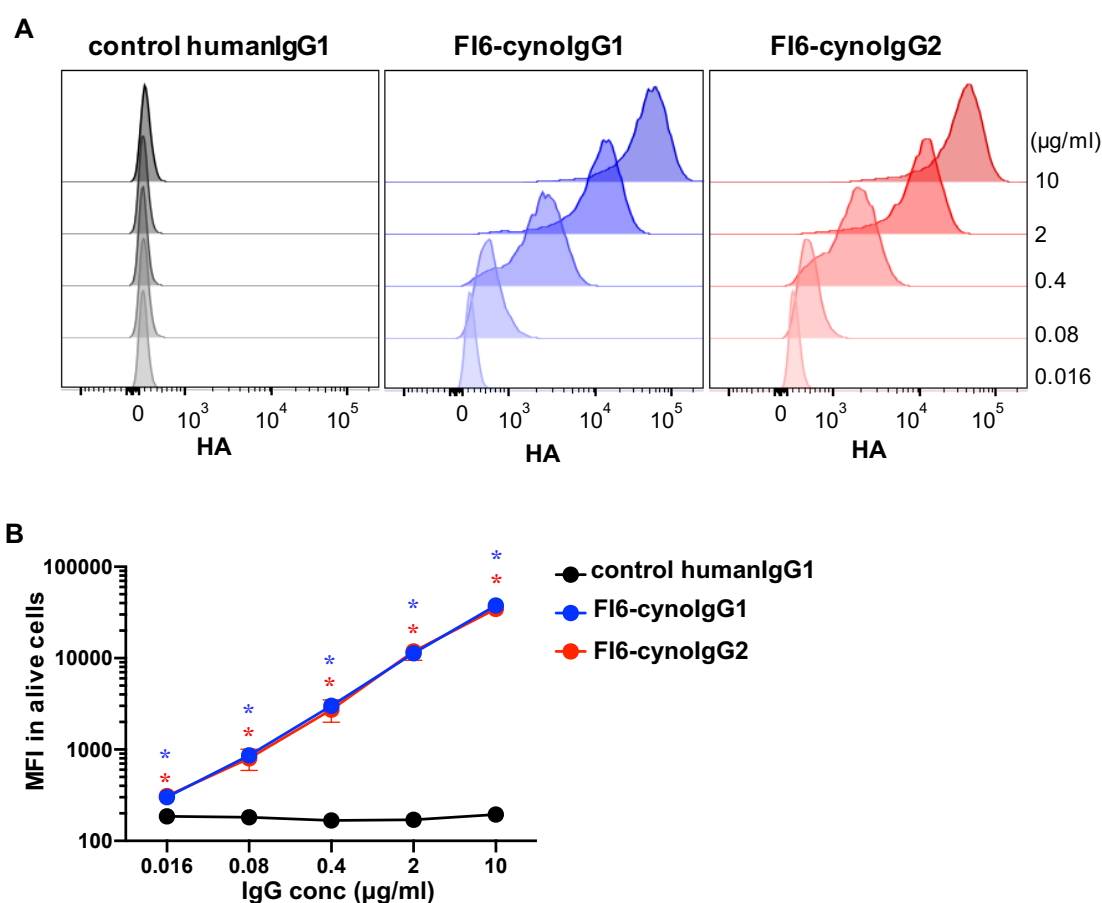


Figure 2. ターゲット細胞とカニクイザル型FI6抗体の結合試験

A549-NKR-luc細胞に各用量のFI6-cynoIgG1、IgG2、またはcontrol humanIgG1を結合させ、その後、Alexa Fluor 647標識抗ヒトIgG (H+L) 抗体を結合させ、フローサイトメーターにて測定した。(A) 代表的なデータのヒストグラム。(B) 4回繰り返した際

のデータ。データは平均値±SDで示した。群間の差はMann-Whitney U検定で統計解析を行った。*p<0.05

(抗体依存性結合アッセイの確立)

作製した各種FI6-cynoIgGが、Fc γ 受容体依存的にHA発現ターゲット細胞とエフェクター細胞の結合を介在できるか否かを評価するために、エフェクター細胞としてCFSE標識したPBMCを用いて、フローサイトメトリーによる解析を行った。この時にターゲット細胞としてはCA-HA発現細胞を用いた。Figure 3Aに示すように、赤枠で示した部分がターゲット細胞とエフェクター細胞が結合したことにより、その大きさが変化した細胞集団となる。なお、赤枠の左側に示される細胞集団は、ターゲット細胞のみの細胞集団、赤枠の下側に示される細胞集団がCFSE標識したPBMC単独の細胞集団である。CFSE標識したPBMCにターゲット細胞が結合することにより、CFSEの蛍光を維持したまま、大きさのみが大きくなることでFCS-Aの値が大きくなり、赤枠内にターゲット細胞とエフェクター細胞が結合した細胞集団が検出されることとなる。この指標に従って評価した結果、FI6-cynoIgG1抗体を介したCFSE標識PBMCのターゲット細胞への結合能は、陰性対照であるcontrol humanIgG1抗体と比較して、用量依存的に有意に増加した(Figure 3B及びC)。

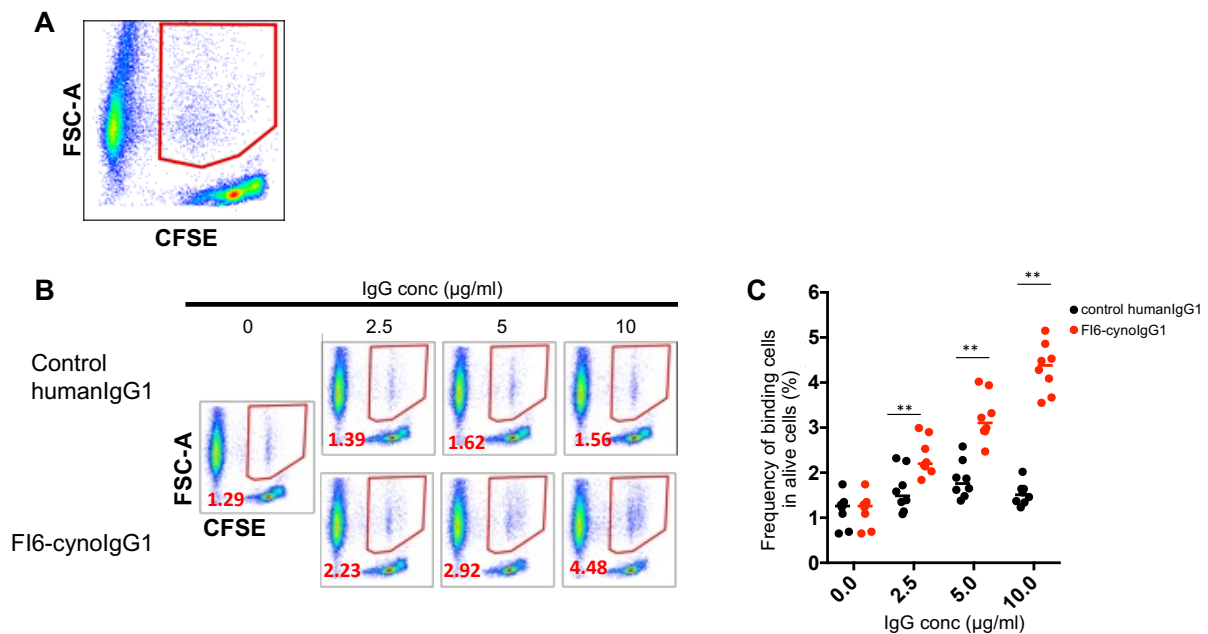


Figure 3. 抗体-Fc γ 受容体依存性結合アッセイ系の確立

(A) 代表的な結合した細胞のフローサイトメトリーの図。生細胞をgatingした後、CFSEとFSC-Aで展開した。(B) 代表的なCA-HA発現A549-NKR-luc細胞とカニクイザルPBMC間の結合細胞の図。各濃度のFI6-cynoIgG抗体をCA-HA発現A549-NKR-luc細胞に結合させ、CFSE標識したカニクイザルPBMCと培養し、フローサイトメトリーにて解析した。(C) 8検体を用いたHA発現A549-NKR-luc細胞とカニクイザルPBMC間の結合細胞。Wilcoxonの符号順位検定を用いて統計解析を行った。**p<0.01

また、前述のように、ヒトIgG1抗体は、ヒトIgG2抗体と比較して、各Fc γ 受容体への親和性が高い[18, 36]。そこで、本評価系において、FI6-cynoIgG1抗体とFI6-cynoIgG2抗体処置に

より、結合したPBMCの結合頻度に差が認められるか否かについて検討を行った。その結果、CA-HA発現細胞にFI6-cynoIgG1抗体及びFI6-cynoIgG2抗体を処置すると、陰性対照 (control humanIgG1) と比較して、結合した細胞の頻度が有意に高かった (Figure 4A)。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 (Figure 4A)。また、PR8-HA発現細胞を用いて同様の検討を行ったところ、CA-HA発現細胞を用いた際と同様に、FI6-cynoIgG1抗体処置がFI6-cynoIgG2抗体処置と比較し、結合した細胞の頻度が有意に高かった (Figure 4B)。以上より、FI6-cynoIgG1抗体とFI6-cynoIgG2抗体のFabの抗原結合能力は同程度であることも踏まえ (Figure 2B)、本評価系は、抗体のサブクラス間のFc γ 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-Fc γ 受容体相互作用に依存するかを検証することとした。そのために、まずFI6-cynoIgG1抗体のFc領域のアミノ酸をL234A及びL235A (LALA)に置換することにより、Fc γ 受容体への結合能を低下させたFI6-cynoIgG1 LALA抗体[37, 38]を作製した。このFI6-cynoIgG1 LALA抗体を用いて、FI6-cynoIgG1抗体と結合する細胞の頻度を比較した。CA-HA発現細胞を用いて検討を行ったところ、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 (PBS) と同程度であった (Figure 4C)。また、PR8-HA発現細胞を用いて検討を行ったところ、CA-HA発現細胞を用いた際と同様の結果となった (Figure 4D)。以上より、FI6-cynoIgG1抗体を処置した際に認められる結合した細胞は、抗体のFc領域とFc γ 受容体の結合によることが示唆され、この評価系が、非ヒト霊長類サンプルを用いた高感度なFc γ 受容体を介した抗体依存性結合アッセイとして利用できることが示唆された。

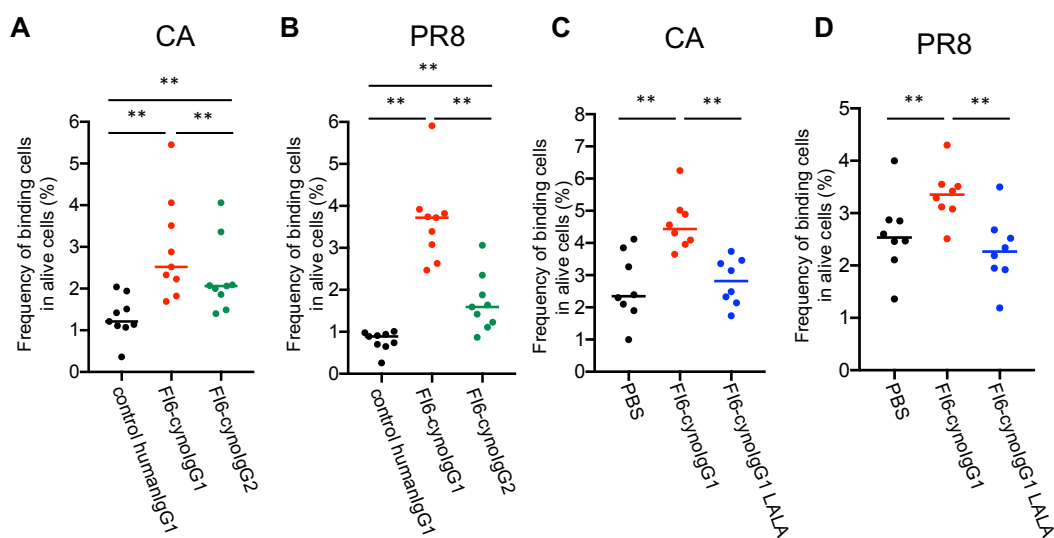


Figure 4. 各種cynoIgG抗体を用いたFc γ 受容体依存性結合アッセイ系の評価

(A) CA-HA及び(B) PR8-HA発現A549-NKR-luc細胞及びガネクイザルPBMCにおける、各IgGサブクラスによる結合細胞の頻度

各抗体10 μ g/mlにてHA発現A549-NKR-luc細胞に処置し、CFSE標識したカニクイザルPBMCと培養し、フローサイトメトリーにて解析した (n=9)。Wilcoxonの符号順位検定を用いて統計解析を行った。**p<0.01 (C) CA-HA及び (D) PR8-HA発現A549-NKR-luc細胞とカニクイザルPBMCにおけるFI6-IgG1抗体及びFI6-cynoIgG1 LALA抗体による結合細胞の頻度 各抗体10 μ g/mlにてHA発現A549-NKR-luc細胞に処置し、CFSE標識したカニクイザルPBMCと培養し、フローサイトメトリーにて解析した (n=8) Wilcoxonの符号順位検定を用いて統計解析を行った。**p<0.01

(イメージングフローサイトメトリーによる評価系の解析)

フローサイトメトリーで観察された結合した細胞が、ターゲット細胞とエフェクター細胞により形成されていることを視覚的に確認することとした。本検討には、抗体や色素を用いることにより細胞の状態を可視化できる装置である、イメージングフローサイトメーターを用いて解析した。まず、ターゲット細胞であるPR8-HA発現A549-NKR-luc細胞とFI6-cynoIgG1抗体を結合させた。その後、エフェクター細胞であるPBMCを識別するために、PR8-HA発現A549-NKR-luc細胞を小胞体特異的に染色できるER-Trackerで標識し、PBMCをCFSEで標識した。その後、PR8-HA発現A549-NKR-luc細胞とPBMCを共培養し、細胞の核をHoechst 33342 (Hoechst) を用いて染色し、イメージングフローサイトメーターを用いて観察した。その結果、PR8-HA発現A549-NKR-luc細胞は、ER-Tracker (オレンジ) と核がHoechst (紫) で染色され、PBMCは、CFSE (緑) とHoechstにより染色されていることを確認した。さらに、明視野 (Bright Field) にて2つの細胞が結合した細胞集団 (doublets) を観察すると、一方の細胞は、ER-Tracker (オレンジ) と核がHoechst (紫) で染色されたR8-HA発現A549-NKR-luc細胞であり、他方の細胞は、CFSE (緑) とHoechst (紫) により染色されたPBMCであることが確認された (Figure 5)。

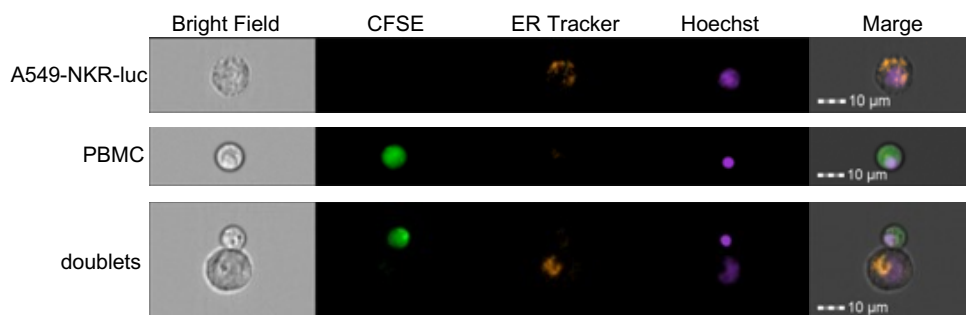


Figure 5. イメージングフローサイトメーターを用いた代表的な画像

PR8-HA発現A549-NKR-luc細胞をER tracker (オレンジ)で染色し、FI6-cynoIgG1抗体を結合させた後に、CFSE (緑) で標識したPBMCと共培養し、核をHoechst 33342 (紫) で染色した後に、イメージングフローサイトメーターを用いて観察した。

次に、イメージングフローサイトメトリー解析ソフトを用いて、結合した細胞を機械的に判別することとした。明視野 (Ch01) を用いてmaximum pixel featureとmean pixel featureで展開し、デブリスとフォーカスが合っていない細胞を除去し (R4)、明視野 (Ch01) において丸みの指標であるlobe featureが2以上の集団を選択した (R5)。次に、対称性の指標であるsymmetry4と円性の指標であるcircularity featuresを用いて、3つの集団 (2つ以上の細胞が結

合したbinds、2つの細胞が存在するが結合していないseparate、単細胞であるsinglet) に分割した (Figure 6A)。その後、それぞれの集団を明視野で確認すると、bindsでは、2つ以上の細胞が結合しており、separateでは、2つ以上の細胞が存在するが結合していないこと、singletでは単細胞のみであることが確認できた (Figure 6B)。以上より、このgating strategyを用いることによりbindsの割合を算出することで、結合したdoublet細胞の割合を評価できると考えられた。

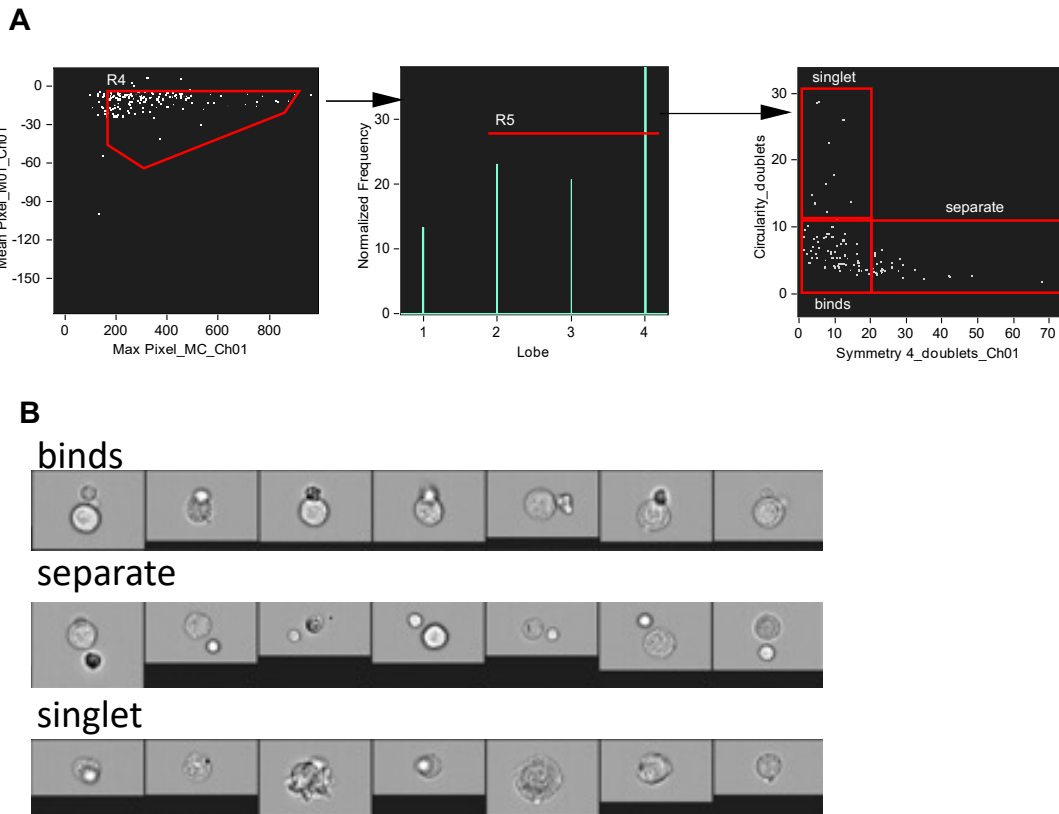


Figure 6. イメージングフローサイトメーターを用いた解析法

(A)gating strategy 明視野 (Ch01) を用いてmaximum pixel featureとmean pixel featureで展開し、デブリスとフォーカスが合っていない細胞を除去し (R4)、明視野 (Ch01)において丸みの指標であるlobe featureが2以上の集団を選択した (R5)。対称性の指標であるsymmetry4と円性の指標であるcircularity featuresを作成した。最後に、symmetry4とcircularity featuresを用いて、3つの集団 (binds, singlet, separate) に分けた。(B) 各集団の代表的な明視野画像

そこで、ターゲット細胞であるPR8-HA発現A549-NKR-luc細胞とFI6-cynoIgG1抗体またはFI6-cynoIgG2抗体を結合させた。陰性対照として、PBS処置を設定した。その後、エフェクター細胞であるPBMCを識別するために、PR8-HA発現A549-NKR-luc細胞をER-Trackerで標識し、PBMCをCFSEで標識した。続いて、PR8-HA発現A549-NKR-luc細胞とPBMCを共培養し、Hoechstを用いて染色した後、イメージングフローサイトメーターを用いて観察した。フローサイトメーターを用いた解析と同様に、面積 (Area) とCFSEの蛍光強度に基づいてgatingし、3つの領域 (R1, R2, R3) に分割した (Figure 7A)。その後、各領域について上記の解析を行い、各領域に対してbindsの割合を算出した。その結果、いずれの処置においても、結合した細

胞 (multiplets) の頻度がR1領域において最も高かった (Figure 7B)。さらに、R1領域に関して、FI6-cynoIgG1抗体とFI6-cynoIgG2抗体処置による結合した細胞の頻度を比較すると、FI6-cynoIgG1抗体処置は、FI6-cynoIgG2抗体処置よりも結合した細胞の頻度が有意に高かった (Figure 7C)。この結果は前述のフローサイトメーターを用いたアッセイ結果と同様であったことから、結合アッセイで検出された細胞結合は、抗体-Fc γ 受容体相互作用を介してターゲット細胞であるHA発現A549-NKR-luc細胞とPBMC中のエフェクター細胞から構成されることが明らかとなった。

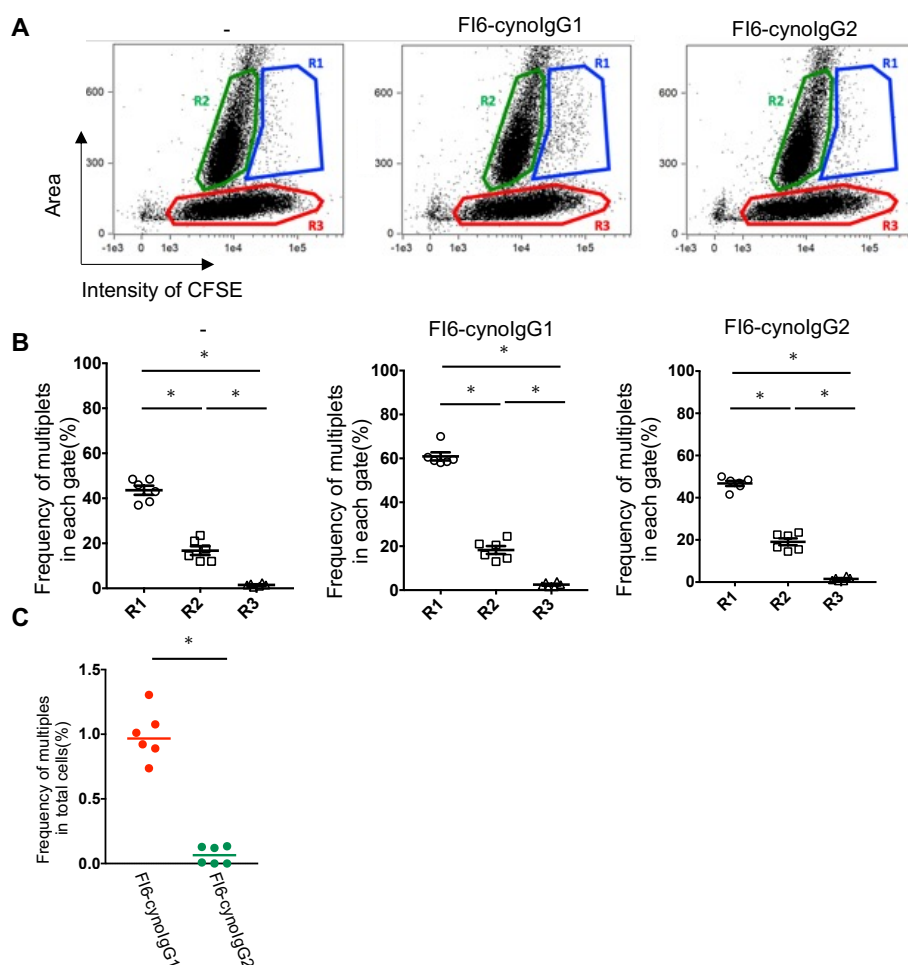


Figure 7. イメージングフローサイトメーターを用いたcynoIgG抗体処置による結合した細胞の評価

(A) イメージングフローサイトメーター解析による代表的なプロット。3つの集団 (R1, R2, R3) をCFSEの強度と面積を拡大することでゲートした。(B) 各領域におけるmultipletsの頻度。結合アッセイ後、イメージングフローサイトメーターを用いて解析を行い、各領域におけるmultipletsの頻度を算出した。(n=6) Wilcoxonの符号順位検定を用いて統計解析を行った。データは平均値± standard error of the mean (SEM) で示す。*p<0.05 (C) FI6-cynoIgG1抗体及びFI6-cynoIgG2抗体処置によるR1におけるmultipletsの頻度 (n=6) Wilcoxonの符号順位検定を用いて統計解析を行った。データは中央値を示す。*p<0.05

(FI6-cynoIgG1抗体処置による細胞結合に関与するエフェクター細胞のFc γ 受容体の発現分布及び細胞サブセットの同定)

結合したエフェクター細胞のFc γ 受容体の発現分布及び免疫細胞のサブセットを同定するために、カニクイザルPBMCを用いてフローサイトメトリーにより解析できるよう、染色パネルを設計し、gatingを行った。Figure 8で示すgating strategyにより、Live/Deadにより赤枠で囲まれた生細胞をgatingした後に、CFSEとforward scatter (FSC)-Aで展開することにより、Target cells、PBMCs及びBinding cellsの3つの領域に分割した。その後、Binding cellsよりFc γ 受容体の発現を評価するため、それぞれFc γ 受容体I (CD64)、Fc γ 受容体II (CD32) 及びFc γ 受容体IIIa (CD16) で展開した。次に、免疫細胞のサブセットを分画するため、T細胞 (CD3⁺) 細胞をgatingした後、T細胞以外の細胞集団からNKG2AとCD20で展開することにより、NK細胞 (NKG2A⁺) 及びB細胞 (CD20⁺) をゲートした。さらに、NK細胞及びB細胞以外の細胞集団からHLA-DRとCD14で展開した。HLA-DR陽性の細胞集団からCD14とCD16で展開することにより、Classical monocyte (CD14⁺CD16⁻)、Intermediate monocyte (CD14⁺CD16⁺) 及び Non-classical monocyte (CD14^{dim}CD16⁺⁺) からなる3つの単球サブセットに分画した。

また、HLA-DR陽性かつCD14陰性の細胞集団から、CD11cとCD123で展開することにより、conventional dendritic cells (cDCs; CD11c⁺CD123⁻) 及びpDCs (CD11c⁻CD123⁺) をゲートした。以降、この染色パネルを用いてカニクイザルPBMCを用いて、フローサイトメトリー解析を行うこととした。

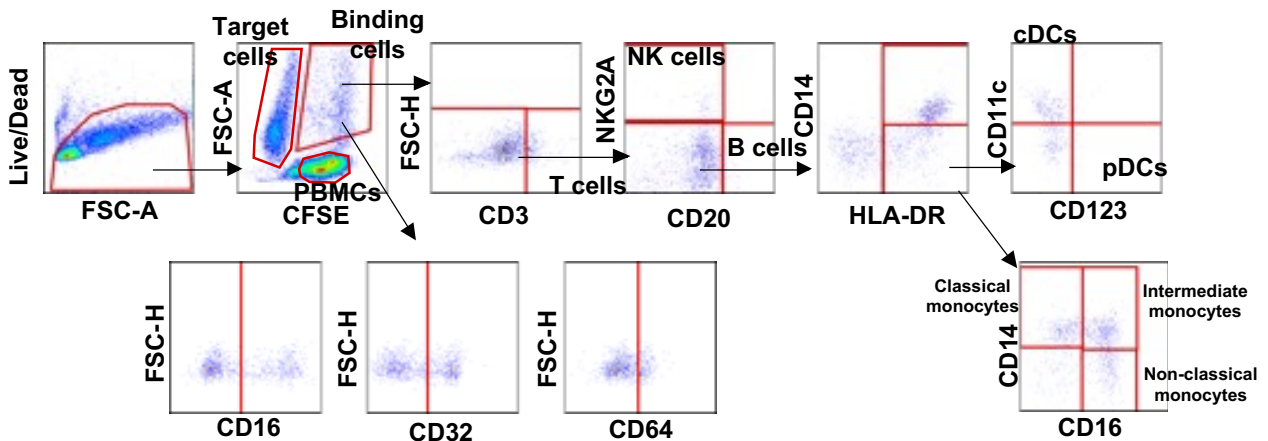


Figure 8. PBMC中エフェクター細胞のFc γ 受容体発現分布及び細胞サブセット同定のためのgating strategy
このgating strategyにより、エフェクター細胞のFc γ 受容体I (CD64),II (CD32) 及び IIIa (CD16) の発現及び細胞サブセットを同定した。

FI6-cynoIgG抗体を用いて、ターゲット細胞であるCA-HA発現A549-NKR-luc細胞に結合したエフェクター細胞のFc γ 受容体の発現分布及び免疫細胞のサブセットの同定を試みた。その結果、Figure 9Aに示すように、FI6-cynoIgG1抗体処置により、結合したエフェクター細胞のう

ち、CD16⁺CD32⁺CD64⁺、CD16⁺CD32⁻CD64⁺、CD16⁻CD32⁺CD64⁺及びCD16⁻CD32⁻CD64⁺細胞の数が陰性対照であるPBS処置 (-) と比較して有意に増加した。一方で、FI6-cynoIgG2抗体処置により、FI6-cynoIgG1抗体処置と同様にCD16⁻CD32⁺CD64⁺細胞数が増加し、CD16⁻CD32⁻CD64⁺細胞数がPBS処置と比較して有意に増加した。以上より、抗体を介したターゲット細胞とエフェクター細胞の結合に関与するPBMCのFc_γ受容体の発現は多様であることが示唆された。また、CD16、CD32、CD64の各単一陽性細胞サブセットは、FI6-cynoIgG1またはFI6-cynoIgG2処置によりPBS処置よりも結合した細胞数が多いことから、抗体を介したターゲット細胞とエフェクター細胞の結合に3種類すべてのFc_γ受容体が関与していることが考えられた。

次に、ターゲット細胞に結合したPBMC中のエフェクター細胞のサブセットについて解析を行った。各細胞サブセット数に関して、FI6-cynoIgG1抗体処置した際の各細胞サブセットの細胞数からPBS処置での各細胞サブセットの細胞数を引くことにより算出した。その結果、FI6-cynoIgG1抗体処置した際のターゲット細胞に結合した免疫細胞サブセットは、主にNK細胞 (NK cells) とclassical monocyte (classical monocytes) であった (Figure 9B及びC)。

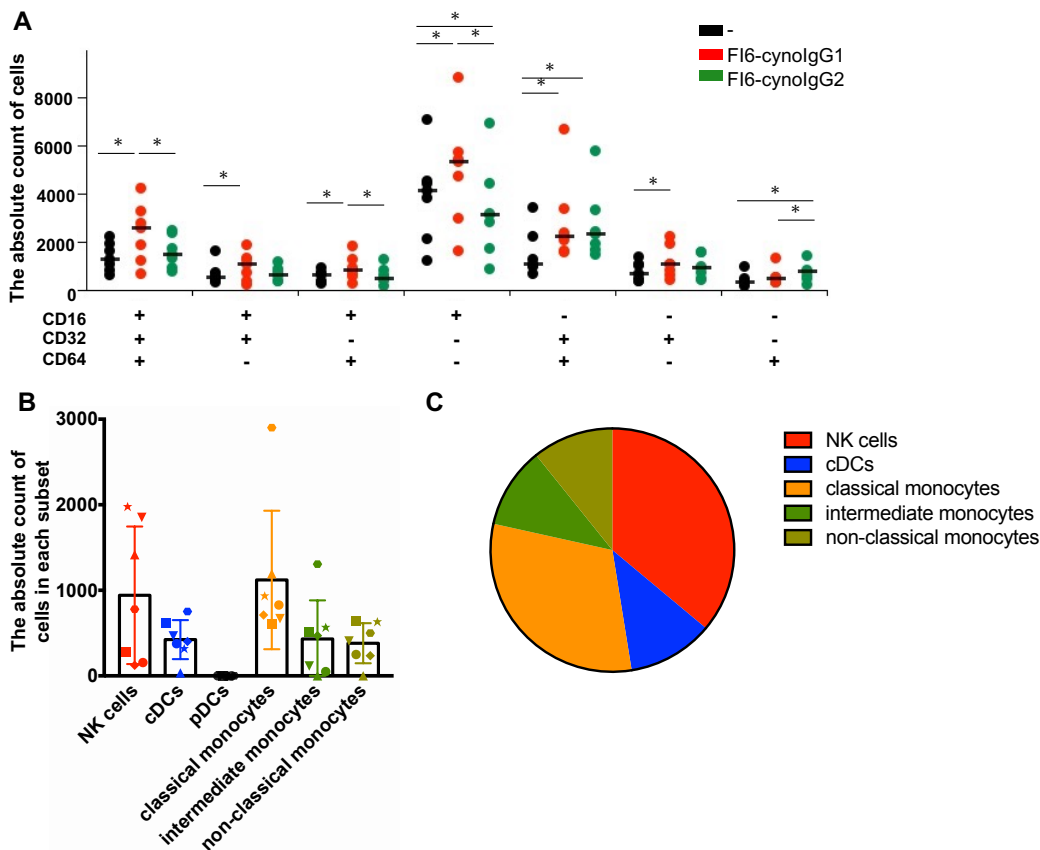


Figure 9. FI6cynoIgG1抗体は多様なFc_γRを介してNK細胞やclassical monocyteとCA-HA発現細胞との結合を誘導する

(A) 結合細胞におけるエフェクター細胞のFc_γ受容体の発現分布 CA-HA発現細胞とFI6-cynoIgG1抗体またはFI6-cynoIgG2抗体を用いて結合させた後に、フローサイトメトリー解析を行った。(n=7) Wilcoxonの符号順位検定を用いて統計解析を行った。
*p<0.05 FI6-cynoIgG1抗体処置による各細胞サブセットの細胞数 (B) と割合 (C)。FI6-cynoIgG1処置における各細胞の数からPBS処置による細胞数を差し引いた。データは平均値±SDを示す。

最後に、他のインフルエンザウイルス株HA発現細胞に対しても同様の傾向が認められるか否かについて検討を行うため、HA-PR8発現A549-NKR-luc細胞を用いて検討を行った。その結果、結合したエフェクター細胞のFc γ 受容体の発現分布及び細胞のサブセットはHA-CA発現A549-NKR-luc細胞を用いて検討を行った際と同様の傾向が認められた (Figure 10A、B及びC)。以上より、FI6-cynoIgG1抗体を用いたHA特異的Fc γ 受容体依存性の細胞結合は、多様なFc γ 受容体を介しており、主にNK細胞や単球が関与している可能性が高いことが示唆された。

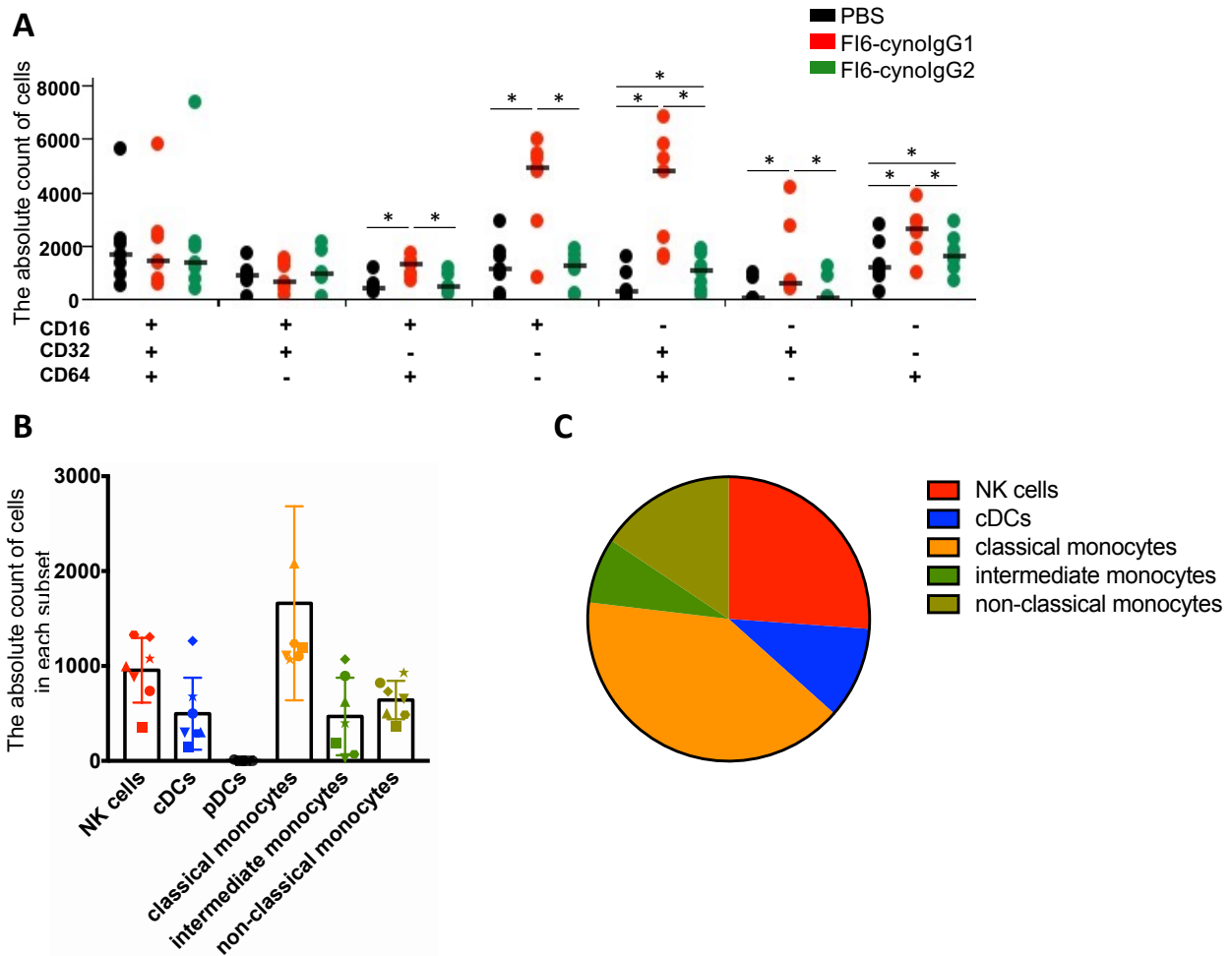


Figure 10. FI6cynoIgG1抗体とPR8-HA発現細胞との結合に関与する細胞のFc γ 受容体の発現分布及びサブセットはCA-HA発現細胞を用いた際と同様である

(A) 結合細胞におけるエフェクター細胞のFc γ 受容体の発現分布 PR8-HA発現細胞とFI6-cynoIgG1抗体またはFI6-cynoIgG2抗体を用いて結合させた後に、フローサイトメトリー解析を行った。(n=7) Wilcoxonの符号順位検定を用いて統計解析を行った。
*p<0.05 FI6-cynoIgG1抗体処置による各細胞サブセットの細胞数 (B) と割合 (C)。FI6-cynoIgG1処置における各細胞の数からPBS処置による細胞数を差し引いた。データは平均値±SDを示す。

【考察】

本章では、カニクイザルのPBMCを用いてFc γ 受容体を介した免疫反応の解析系を構築した。その結果、FI6-cynoIgG1抗体をCA-HA発現ターゲット細胞に処置すると、CD16⁺CD32⁺CD64⁺、CD16⁺CD32⁻CD64⁻、CD16⁻CD32⁺CD64⁺及びCD16⁻CD32⁺CD64⁻細胞の数がPBS処置と比較して有意に増加した。一方で、FI6-cynoIgG2抗体をターゲット細胞に処置すると、FI6-cynoIgG1抗体処置と同様にCD16⁻CD32⁺CD64⁺細胞数が増加し、CD16⁻CD32⁻CD64⁺細胞数がPBS処置と比較して有意に増加した。結合した細胞数がFI6-cynoIgG1抗体処置の方が、FI6-cynoIgG2抗体処置よりも有意に増加していた。これまでの報告では、ヒトIgG1はヒトIgG2よりも各Fc γ 受容体に結合する親和性が高いことが知られており[18]、本解析系においても同様の傾向が認められた。また、FI6-cynoIgG1抗体はCD16⁺CD32⁻CD64⁻、CD16⁻CD32⁺CD64⁺及びCD16⁺CD32⁺CD64⁺細胞のCA-HA発現ターゲット細胞への結合を誘導することが確認されたが、CD16⁺CD32⁻CD64⁻細胞のターゲット細胞への結合は、CD16を介すると考えられる。CD16⁻CD32⁺CD64⁺及びCD16⁺CD32⁺CD64⁺細胞については、CD32やCD16と比較してCD64はIgG1に対する結合能が高いことから、ターゲット細胞への結合は主にCD64を介して起こると想定される。

次に、ターゲット細胞に結合したPBMCの細胞サブセットについて検討した。その結果、ターゲット細胞に結合した免疫細胞は、主にNK細胞とclassical monocyteであることが明らかとなった (Figure 9B及びC、Figure 10B及びC)。FI6-cynoIgG1抗体を介した結合は、NK細胞やclassical monocyteが主に関与するが、NK細胞はCD16⁺CD32⁻CD64⁻に、classical monocyteはCD16⁻CD32⁺CD64⁺の細胞集団に含まれる可能性がある。前述のように、NK細胞はADCC、単球はADCPに関与することが知られていることから、ADCCとADCPの両者が誘導されている可能性が考えられる。

以上より、本評価系を用いて精製抗体であるFI6-cynoIgGを処置することにより、ターゲット細胞-エフェクター細胞の結合に3種類すべてのFc γ 受容体が関与しており、ターゲット細胞に結合する免疫細胞は、主にNK細胞とclassical monocyteであることが明らかとなった。

第二章 カニクイザルを用いたインフルエンザHAスプリットワクチン接種後のFc γ 受容体を介した免疫反応の解析

前章において、精製抗体を用いてFc γ 受容体を介した免疫反応の解析系を構築した。その過程にて使用したFI6-cynoIgG抗体は、Expi293細胞を用いて抗体を産生させることで作製した。一般的に、抗体作製に用いる細胞種によりグリコシル化が異なり、Fc受容体との結合親和性や機能が変化することが知られている[39-41]。そのため、生体内における抗体の糖鎖付加が精製抗体と同様か否か、及び精製抗体を用いた結果が直接生体内の免疫反応を反映できるかどうかは不明である。さらに、高力価のHAI抗体や、インフルエンザワクチン接種者の血清にHAI活性を有する抗体を添加するとADCC誘導が阻害されることも報告されている[42]。したがって、インフルエンザワクチンの効果を正確に評価するためには、インフルエンザワクチン接種により誘導される血液中の抗体を総合的に評価することが必要である。

そこで、本章では、血液中のHAと結合する抗体を網羅的に評価するために、第一章で確立したカニクイザルPBMCを用いたFc γ 受容体を介した免疫反応の解析系を応用する形で、カニクイザルにHAスプリットワクチンを2回接種した後に得られた血漿を用いて検討を行なった。

【実験材料と方法】

ターゲット細胞株

前章の実験材料に準じた。

フローサイトメトリーによる抗体-Fc γ 受容体を介した細胞結合評価

前章の実験方法に準じた。

フローサイトメトリーによるFc γ 受容体発現分布及びサブセットマーカー同定解析

前章の実験方法に準じた。なお、血漿からのIgG精製には、rProteinA/ProteinG GraviTrap (Cytiva) を用いて、推奨手順通りに行った。

動物実験とPBMCのサンプリング

6頭のカニクイザルに15 μ gの A/CA/07/2009 H1N1スプリットワクチンを0週と3週に計2回筋肉内投与した。投与0週目から毎週採血を行い、血漿及びPBMCを分離した。

抗体価の測定

カニクイザルの血漿中のCA-HAに対する抗体価は、酵素結合免疫吸着法で測定した。CA-HAに対する抗HA特異的抗体価を測定するために、96ウェルプレートにCA-HAタンパク質溶液を4℃で一晩コーティングした。1%ウシ血清アルブミン溶液で1時間ブロッキングした後、プレートを洗浄し、段階希釈した血漿を添加し、室温にて2時間インキュベートした。その後、結合した抗体を検出するため、プレートを洗浄し、ビオチン標識抗ヒトIgG抗体 (BD Biosciences) を添加し、室温にて1時間インキュベートした。その後、プレートを洗浄し、HRP標識ストレプトアビジン (Thermo Fisher Scientific) を添加し、室温にて1時間インキュベートした。プレートを洗浄後、TMB溶液 (SeraCare Life Sciences, Inc., Milford, MA) を添加し、1M硫酸を加えて反応を停止し、吸光度を波長450nmで測定した。エンドポイントタイターは、吸光度0.3をカットオフ値として算出した。ワクチンスケジュールにおける6週目の血漿 (Figure 11) をエンドポイントカ価が52.5となるようPBSで希釈し、アッセイに使用した。

遺伝子発現解析

カニクイザルPBMCをR10に懸濁し、血漿とCA-HA発現A549-NKR-luc細胞を4時間標準条件下にてインキュベートした。その後、フローサイトメトリーによるFc γ 受容体発現分布及びサブセットマーカー同定解析と同様に細胞を染色し、Figure 8に示すgating strategyに基づきCA-HA発現A549-NKR-luc細胞と結合したclassical monocyte (binding classical monocytes) 及

び結合していないclassical monocyteとCA-HA発現A549-NKR-luc細胞の混合 (classical monocytes + target cells) をFACSymphony S6 (BD Biosciences) を用いてソーティングし、RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてmRNAを精製した。cDNAは、SuperScript III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製したmRNAから逆転写した。Quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いてStep One Plus (Thermo Fisher Scientific) を用いて行い、CD80及びCD83の発現を測定した。プライマー配列は以下の通り。

cynoGAPDH (Forward primer 5'-AGAAGTATGACAACAGCCTCA-3', Reverse primer 5'-ACTGTGGTCATGAGTCCTCC-3')

cynoCD80 (Forward primer 5'-AAACTCGCATCTACTGGCAAA-3', Reverse primer 5'-GGTTCTTGTACTIONCGGGCCATA-3')

cynoCD83 (Forward primer 5'-AAAGCTGGCATGGAACGAG-3', Reverse primer 5'-TGTCTTGGAAGAGTCACTGGC-3')

活性化マーカー発現の解析は、cynoGAPDHをハウスキーピング遺伝子とし、 $\Delta\Delta C_t$ 法にて行った。

統計解析

前章の実験方法に準じた。なお、相関係数は、Spearmanの順位相関係数を用いた。

【結果】

(カニクイザルを用いたインフルエンザHAスプリットワクチン接種後のFc γ 受容体エフェクター機能の評価)

前章にて構築した評価系を用いてインフルエンザワクチン後の血漿サンプルを用いて解析した。すなわち、6頭のカニクイザルに0及び3週目に筋肉内投与にてCA株インフルエンザHAスプリットワクチンを接種し、経時的に採血を行った (Figure 11)。その血漿とPBMC及びCA-HA発現細胞を用いて検討を行った。

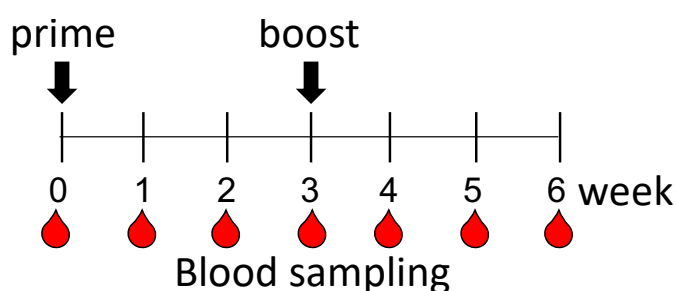


Figure 11. インフルエンザワクチン接種及び採血スケジュール

6頭のカニクイザルに0及び3週目に筋肉内投与にてインフルエンザワクチンを接種し、経時的に採血を行った。

まず、ワクチン接種後の血漿を用いて、抗CA-HA抗体価を測定した。その結果、6頭全てのカニクイザルにおいて、インフルエンザHAスプリットワクチン接種後の抗CA-HA抗体価の上昇が認められた (Figure 12A)。次に、インフルエンザHAスプリットワクチン接種後の血漿中に含まれる抗体がCA-HA発現A549-NKR-luc細胞に結合するか否かについて検討するため、CA-HA発現A549-NKR-luc細胞に血漿を添加し、その後、蛍光標識した抗IgG抗体を結合させてフローサイトメトリー解析を実施した。その結果、インフルエンザHAスプリットワクチン接種後の血漿処置 (SV) は、陰性対照であるPBS処置 (PBS) と比較し、横軸で示すHAに結合した抗体量が多かった (Figure 12B)。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中に存在する抗HA抗体がCA-HA発現細胞が表面に発現するCA-HAに対して結合することが示された。次に、抗HA-CA抗体価が十分に上昇していたワクチン接種後6週目の血漿を抗HA-CA抗体価に応じて希釈し、構築した評価系を用いて結合した細胞数を算出し、抗HA-CA抗体価との相関関係が認められるか否かについて検討した。その結果、横軸で示す結合した細胞数と縦軸で示す抗HA-CA抗体価の間に相関関係は認められなかった (Figure 12C)。以上のことから、HA特異的IgGの量からFc γ 受容体-エフェクター機能を予測することは困難であると考えられる。

続いて、ターゲット細胞に結合したエフェクター細胞に関して、Fc γ 受容体の発現を評価した。その結果、インフルエンザHAスプリットワクチン接種後の血漿処置 (plasma) により、FI6-cynoIgG1抗体処置の際と同様に、CD16⁻CD32⁺CD64⁺、CD16⁺CD32⁻CD64⁺、CD16⁻

CD32⁺CD64⁻、CD16⁻CD32⁻CD64⁺細胞数が陰性対照であるPBS処置 (-) と比較して有意に増加した。一方で、FI6-cynoIgG1抗体処置とは異なり、CD16⁺CD32⁻CD64⁻細胞数は血漿処置により増加しなかった (Figure 12D)。次に、結合した細胞の細胞サブセットを同定した。その結果、結合に主に関与する細胞サブセットはclassical monocyteであった。FI6-cynoIgG1抗体処置により結合への関与が認められたNK細胞に関しては、その他の細胞サブセットと同程度であり、異なる傾向が認められた (Figure 12E及びF)。これらの結果から、少なくともカニクイザルにおいては、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Fc_γ受容体-エフェクター機能は、主にclassical monocyteによって介在していることが示唆された。

血液中には、IgG抗体以外のIgM抗体をはじめとする抗体のアイソタイプが存在する。そこで、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CA-HA発現A549-NKR-luc細胞に処置すると、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CA-HA発現A549-NKR-luc細胞に結合した (Figure 12G及びH)。以上のことから、ワクチン接種後の血漿を処置した際に認められるFc_γ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。

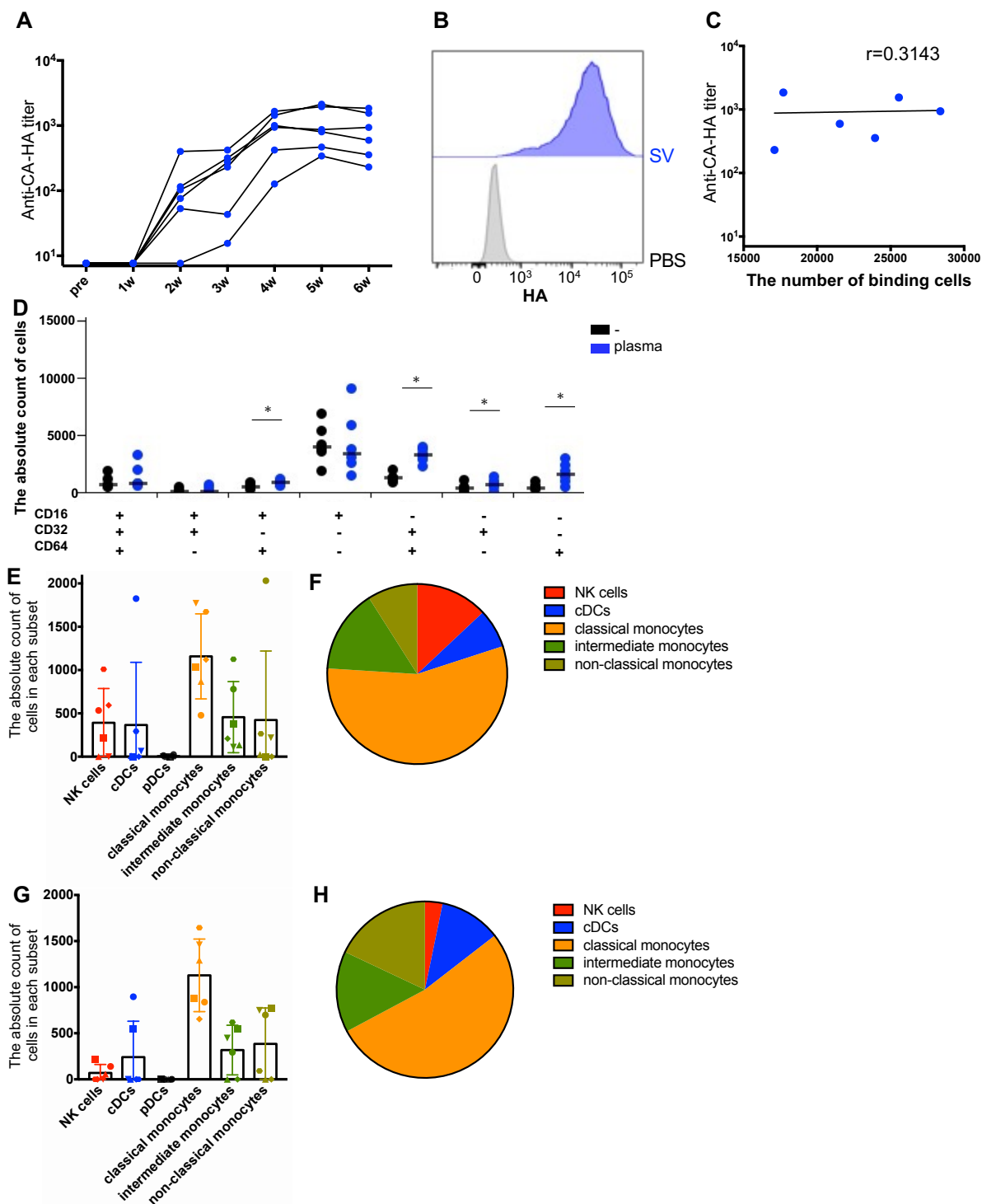


Figure 12. インフルエンザHAスプリットワクチン接種により誘導された抗HA IgG抗体は、classical monocyteとCA-HA発現細胞との結合を誘導する

(A) インフルエンザHAスプリットワクチン接種後のCA-HAに対する抗体価の推移 インフルエンザHAスプリットワクチン接種した後に毎週採血を行い、その血漿を用いて、CA-HAに対する抗体価を測定した (n=6)。(B) インフルエンザHAスプリットワクチン接種後の血漿処置によるCA-HA発現細胞へのIgG抗体の結合 図は代表的なヒストグラムを示す。(C) インフルエンザHAスプリットワクチン接種後6週後の抗CA-HA抗体価と結合した細胞数との相関関係 Spearman相関検定を用いて統計解析を行った。(D) ターゲット細胞に結合した細胞のFc γ 受容体発現の分布 CA-HA発現細胞に血漿を処置し、結合したPBMCをフローサイトメトリーにて解析した。Wilcoxonの符号順位検定を用いて統計解析を行った。* $p < 0.05$ ターゲット細胞に結合した細胞の各サブセットの細胞数 (E) と頻度 (F)。血漿処置における各細胞サブセットの細胞数からPBS処置による細胞数を差し引いた。データは平均値 \pm SDを示す。血漿中IgG処置によるターゲット細胞に結合した細胞の各サブセットの細胞数 (G) と頻度 (H)。血漿処置における各細胞サブセットの細胞数からPBS処置による細胞数を差し引いた。データは平均値 \pm SDを示す。

これまでのインフルエンザHAスプリットワクチン接種後の血漿を用いた検討により、classical monocyteが主なエフェクター細胞であることが示唆された。そこで、ターゲット細胞に結合したclassical monocyteがFc γ 受容体に抗体が結合することにより活性化しているか否かについて検討するため、CA-HA発現A549-NKR-luc細胞に血漿を4時間処置し、CA-HA発現A549-NKR-luc細胞と結合したclassical monocyte (binding classical monocytes) 及び結合していないclassical monocyteとCA-HA発現A549-NKR-luc細胞の混合 (classical monocytes + target cells) について、セルソーターを用いて分画し、qRT-PCRにて活性化マーカーであるCD80及びCD83の遺伝子発現を比較した。その結果、binding classical monocytesは、classical monocytes + target cellsと比較し、CD80の発現が有意に上昇し、CD83は増加傾向 ($p=0.0625$) が認められた。以上より、インフルエンザHAスプリットワクチン接種後の血漿処置により、CA-HA発現A549-NKR-luc細胞と結合したclassical monocyteは活性化していることが示唆された (Figure 13)。

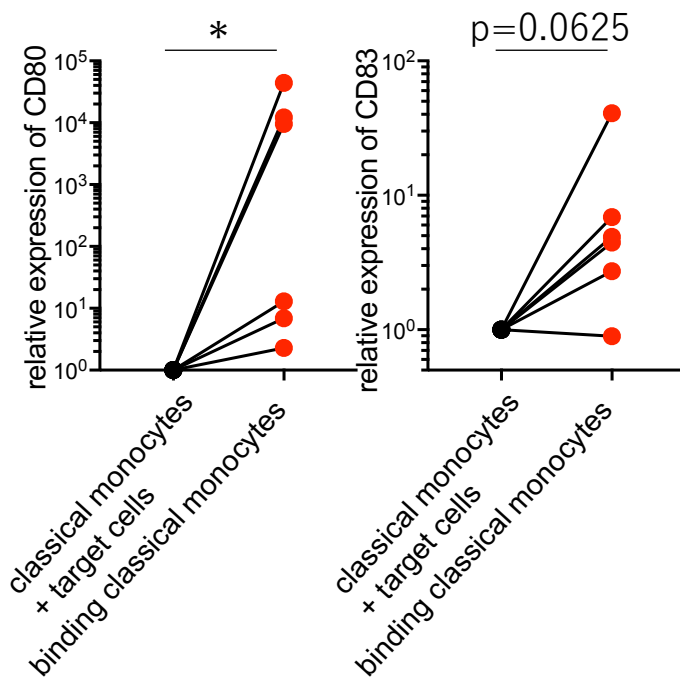


Figure 13. ターゲット細胞に結合したclassical monocyteの活性化

CA-HA 発現 A549-NKR-luc 細胞をインフルエンザ HA スプリットワクチン接種後 6 週目の血漿とともにインキュベートした後、PBMC と 4 時間共培養した。その後、CA-HA 発現 A549-NKR-luc 細胞と結合した classical monocyte (binding classical monocytes) 及び結合していない classical monocyte と CA-HA 発現 A549-NKR-luc 細胞の混合 (classical monocytes+target cells) をそれぞれソーティングし、CD80 及び CD83 の遺伝子発現発現を qRT-PCR で測定した (n=6) Wilcoxon の符号順位検定を用いて統計解析を行った。 * $p<0.05$

【考察】

本章では、カニクイザルに現行のインフルエンザワクチンを接種した際に誘導される抗体と、それに伴うFc γ 受容体-エフェクター機能に関して、PBMCを用いた新しい評価系により検証を行った。その結果、精製抗体としてFI6-cynoIgG1抗体で処置した際とは異なり、ワクチン接種したカニクイザルの血漿中抗体は、Fc γ 受容体を介したNK細胞への結合能が低いという結果であった（Figure 10F及びFigure 12F）。この原因としては、IgG1以外のIgGサブクラスが影響している可能性、あるいは血漿中のHA特異的抗体の糖鎖修飾等の翻訳後修飾が精製抗体と異なっている可能性などが考えられる。前者については、カニクイザルのIgGサブクラスを測定できる抗体が市販されておらず検討を行うことが困難である。また、グリコシル化などの糖鎖修飾に関しては、血漿と精製抗体それぞれについて脱グリコシル化などの処理により違いを検討することで、本章で認められたNK細胞への結合が低いことの原因を特定できる可能性がある。これまでの報告では、季節性インフルエンザワクチン接種では広範なウイルス株に反応性を有するADCC誘導抗体が十分に誘導されないことが示されており[43-45]、本研究の結果はこの結果を支持するものとなっている。加えて、本研究成果は、現行インフルエンザワクチンのADCC誘導能に関する問題点が示唆される結果となったと考えている。

他方、これまでに3価インフルエンザワクチン接種により、成人ではワクチン株のHAタンパク質に対するADCP活性が上昇することが報告されている[46]。この報告では、単球細胞株であるTHP-1細胞を用いて検討を行っていたが、PBMCを用いた本研究においても、ワクチン接種後の抗体はFc γ 受容体を介したターゲット-エフェクター結合に主に単球が関与していることが示された。さらに、単球表現系の詳細な解析により、classical monocyteが主に結合に関与していることが明らかになった。classical monocyteは他の単球サブセットと比較して高い貪食能を有することが報告されていることから[47]、スプリットワクチン接種によりclassical monocyteが誘導抗体を介してターゲット細胞に結合し、ADCP活性が示される可能性が示唆される。しかしその程度は、FI6-cynoIgG1精製抗体を投与した場合と同程度であり、IgG抗体のclassical monocyteへの結合の限界であると考えられる。また本評価系の今後の課題としては、活性化が認められたclassical monocyteに関して、貪食能が向上しているか否かについて検討することが重要であると考えられる。

本検討において、classical monocyteの活性化をqRT-PCRを用いて、CD80及びCD83の遺伝子発現を評価した。フローサイトメトリーを用いてFc γ 受容体の発現、細胞種の同定と同時に活性化マーカーの発現を評価することが理想である。しかしながら、フローサイトメトリーを用いてCD80及びCD83の活性化マーカーを細胞表面で検出するためには、8時間以上PBMCを刺激する必要があり、短時間の刺激では、これらの細胞表面の活性化マーカーを検出することができない[48, 49]。また、8時間の刺激により単球のマーカーの一つであるCD14の発現が変化するこ

とが知られており[50]、表面マーカーを用いて適切な細胞集団を同定することができない。そこで、ターゲット細胞とPBMCを4時間共培養した後、結合しているclassical monocyteをソーティングし、CD80及びCD83の発現をqRT-PCRで評価した。

ワクチン株でない他のインフルエンザウイルスHA発現ターゲット細胞を用いたサル血漿を用いた検討は未実施であり、今後検討することが必要である。この検討を行うことで、交差防御にFc γ 受容体を介した免疫反応がどのように関与しているかを考察できる一助となると考えられる。一方で、第一章において示す通り、広範抗HA中和モノクローナル抗体であるFI6を用いたCA-HA及びPR8-HA発現細胞に対するPBMCサブセット結合能の検討 (Figure9及び10) から、結合した細胞の各Fc γ 受容体の発現様式及び細胞種に関しては、IgG1型IgG2型ともに、CAとPR8とで同様の傾向を示した。以上より、インフルエンザウイルス株間で保存されたエピトープに対する同一サブクラス抗体であれば、CAとPR8とで同様の傾向を示すことが示唆される。従って、今回のワクチン株であるCAにより誘導された抗体プールにおけるCA-HA反応画分のサブクラス比率及びPR8-HA反応画分のサブクラス比率が同じである場合、PR8でも同様の傾向を示すと考えられる。

以上を踏まえて、現行のインフルエンザスプリットワクチンの有効性を改善するためには、例えばADCC活性を向上させるようにTh1型アジュバントを添加し、ADCC誘導能の高い抗体を誘導する試みが考えられる。本研究で確立した評価系はターゲット細胞が発現するHAの由来株を変えることで、より広範なHA株に対する免疫グロブリンFc γ 受容体を介した免疫反応を解析することが可能であり、現行のインフルエンザワクチンの課題を解決しうるユニバーサルインフルエンザワクチンの開発のために有用であると期待している。

総括

私は、これまでにインフルエンザワクチンにアジュバントを添加する戦略を用いて、ユニバーサルインフルエンザワクチンの開発を目指して研究を行ってきた。その検討過程において、Fc γ 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示された。一方で、ワクチン開発を進めていく上で、これまでのFc γ 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Fc γ 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。そのため、特に非臨床から臨床試験へ進む上で重要な動物モデルである非ヒト霊長類モデルを用いた研究結果の解釈が困難となっており、ワクチン開発の障害となっていた。そのような背景を踏まえ、本研究では、Fc γ 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PBMCを用いた評価系の確立を目指して研究を行った。

第一章では、カニクイザルPBMCを用いて、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。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うと、エフェクター細胞とターゲット細胞が結合した細胞数が濃度依存的に増加し、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、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は、Fc γ 受容体の発現様式が多様であり、その細胞サブセットは、NK細胞及びclassical monocyteであることが明らかとなった。

第二章では、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後に誘導される抗体のFc γ 受容体を介したエフェクター機能について、第一章にて構築した評価系を用いて検討を行った。その結果、精製抗体を用いた場合と異なり、ワクチンにより誘導される血漿中の抗体は、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ことから、現行インフルエンザワクチンの課題点を明確にすることができた (Figure 14)。

以上、本研究により、ワクチン開発で必須であると考えられる非ヒト霊長類モデルのより詳細な解析、特にFc γ 受容体-エフェクター機能を評価するための高感度なアッセイ系が確立されたことで、今後のユニバーサルインフルエンザワクチン開発に大きな進展をもたらすことが期待される。

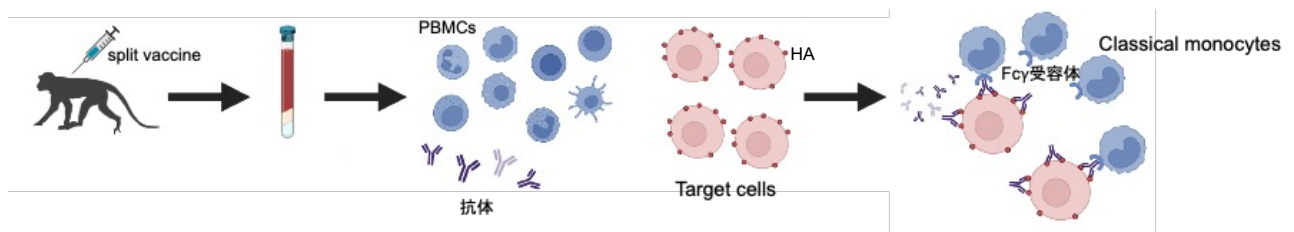


Figure 14. 本研究の総括図

カニクイザルサンプルを用いて、Fc γ 受容体とHA特異的IgG抗体を介した免疫反応を評価するアッセイ系を構築した。その後、スプリットインフルエンザワクチンをカニクイザルに接種後のサンプルを用いて解析を行なったところ、主にターゲット細胞に結合する細胞は、classical monocyteであり、その活性化が認められた。

結論

本博士論文では、カニクイザルのPBMCを用いたFc γ 受容体を介した免疫反応の解析系を構築し、インフルエンザスプリットワクチン接種後のFc γ 受容体を介した免疫反応について検討した。その結果、エフェクター細胞は、複数のFc γ 受容体と抗IgG抗体を介してPBMCが結合し、その細胞種は単一でないことが明らかとなった。FI6-cynoIgG1抗体を用いた際には、NK細胞とclassical monocyteがターゲット細胞に結合した主な細胞サブセットであった。さらに、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後のサンプルを用いて検討すると、ターゲット細胞には、主にclassical monocyteが結合し活性化マーカーの遺伝子発現が上昇していることが認められた。

現行のインフルエンザスプリットワクチンは、ADCC活性が低く、その点が課題の一つと考えられるため、NK細胞の活性化を誘導できるTh1型アジュバントの添加、Fc γ 受容体-エフェクター活性の高い精製抗体を添加する、もしくは抗原設計を変更することにより、ADCC活性を高めることができると考えられる。これらの方法を実施することにより、ワクチン株以外のインフルエンザウイルス株にも有効なワクチンの開発に繋がることが期待される。

今後の本評価系の課題として、ターゲット細胞に結合したエフェクター細胞が、ターゲット細胞に対する細胞障害や貪食などの機能的な役割を有しているか否かについて検討することが重要であると考えられる。すなわち、ターゲット細胞に結合しているclassical monocyteの活性化が認められたが、その活性化がウイルス感染細胞を排除するために、十分であるか否かについて検討する必要がある。

本博士論文において、カニクイザルのPBMCを用いたFc γ 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。

謝辞

本稿を終えるにあたり、大阪大学大学院薬学研究科免疫老化制御分野招聘教授山本 拓也先生(国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所免疫老化プロジェクトリーダー)には、会社員時代から今日に至るまで、研究に対する姿勢や考え方、人生の歩み方を人並みならぬ熱意を持って御指導、御鞭撻を賜りました。ここに衷心より深甚なる感謝の意を表します。

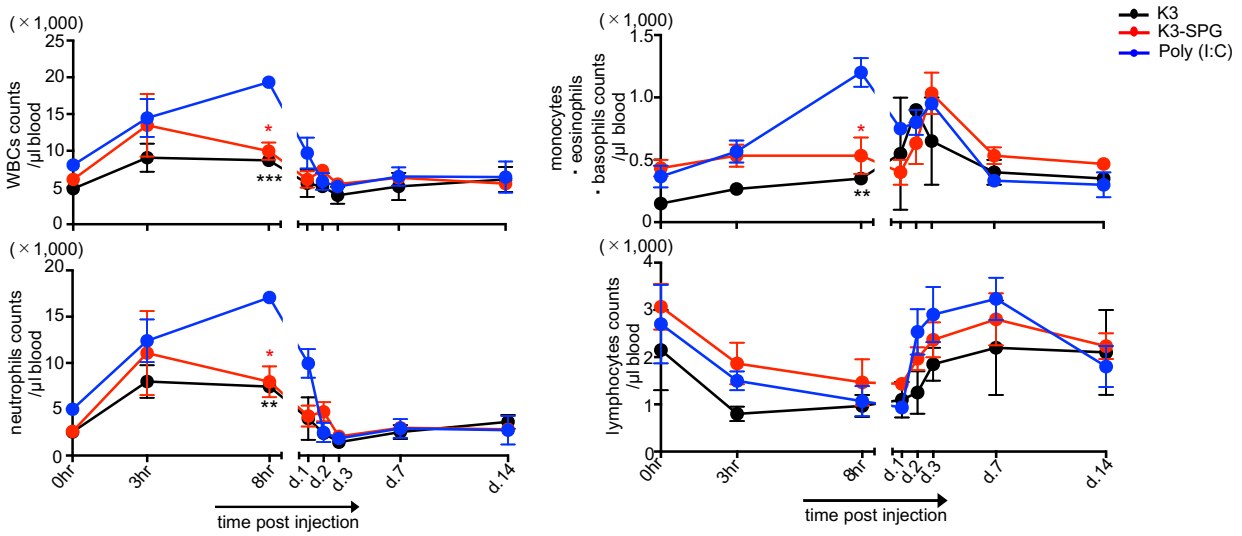
本研究を遂行するに当たり、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所免疫老化プロジェクト高濱 正吉先生には、実験系の構築から論文の校正に至るまで、多大なるご指導を頂きました。心より御礼を申し上げます。温かい御指導と種々の貴重な御助言を賜り、幾多の夜を共に乗り越えてきた、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所免疫老化プロジェクト野木森 拓人先生、鷺崎 彩夏先生、ブルコ先生に心よりお礼申し上げます。数々の貴重なご助言をいただきました、国立感染症研究所治療薬・ワクチン開発研究センター長高橋 宜聖先生、森山 彩野先生、安達 悠先生、西山 紋恵先生に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、抗体作製にあたり、基本骨格となるベクターを賜りました、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所抗体デザインプロジェクトリーダーの永田 諭志先生に心より御礼申し上げます。また、カニクイザルを用いた検討を手助けいただきました国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所霊長類医化学研究センターの保富 康宏先生、岡村 智崇先生に心より感謝いたします。

加えて、本研究を進めるにあたり、共に励まし合い、支え合った国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所免疫老化プロジェクト長東 佑太研修生、村上 弘大協力研究員、東口 公哉協力研究員に心より感謝いたします。また研究生活を送るにあたり、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所免疫老化プロジェクトの皆様に謹んで感謝いたします。

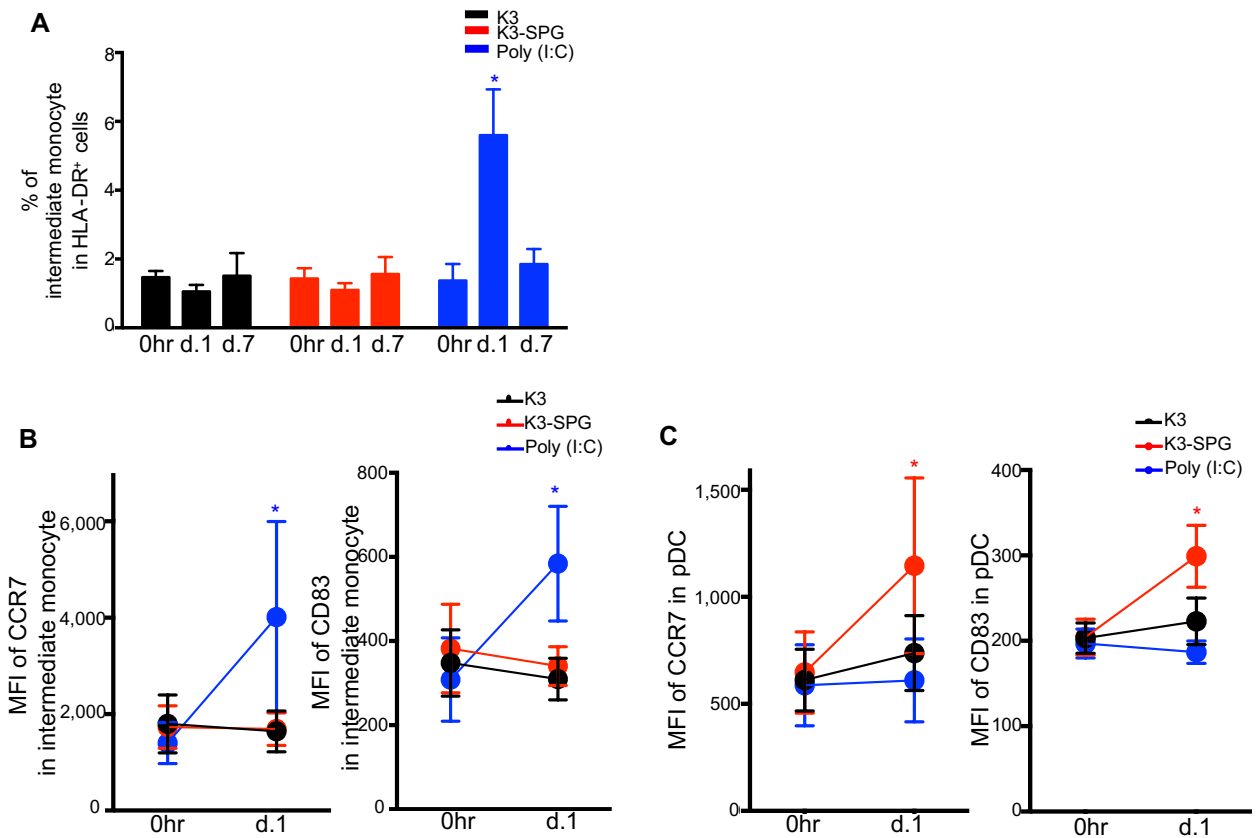
最後に、家に帰らずとも、研究の進捗を常に温かく見守り支えてくれた家族に万感の思いで感謝いたします。

補足図



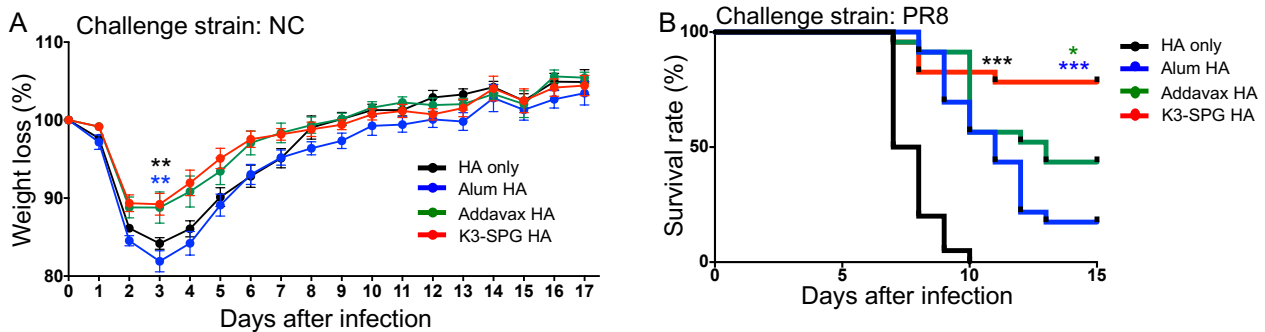
Supplementary Figure 1. カニクイザルにpoly(I:C)、K3またはK3-SPG投与後の血液中各種血球細胞の変動

カニクイザルに2 mgのK3、K3-SPG、またはPoly(I:C)を皮下投与し、投与前及び投与後の各時間点で採血を行った。白血球、好中球、単球、好酸球、好塩基球、及びリンパ球の数の動態は、血算によって評価した。データは平均値 \pm SEMを示す。p値は、Welch補正を用いた対応のない2標本t検定を用いて統計解析を行った。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



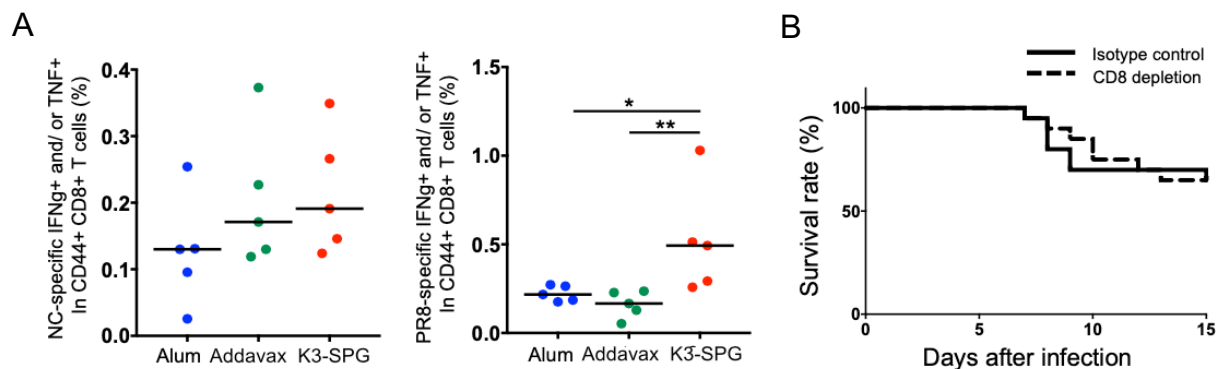
Supplementary Figure 2. カニクイザルへのpoly(I:C)とK3-SPG投与によるintermediate monocyteとpDCの活性化

(A) 各アジュバント投与後のintermediate monocyteの頻度。(B, C) 各アジュバント投与前及び投与1日後のintermediate monocyte (B) 及びpDC (C) の活性化。データは平均値±SEMを示す。p値は、Poly(I:C)との比較のためにWilcoxonの符号順位検定を用いて統計解析を行った。*p<0.05



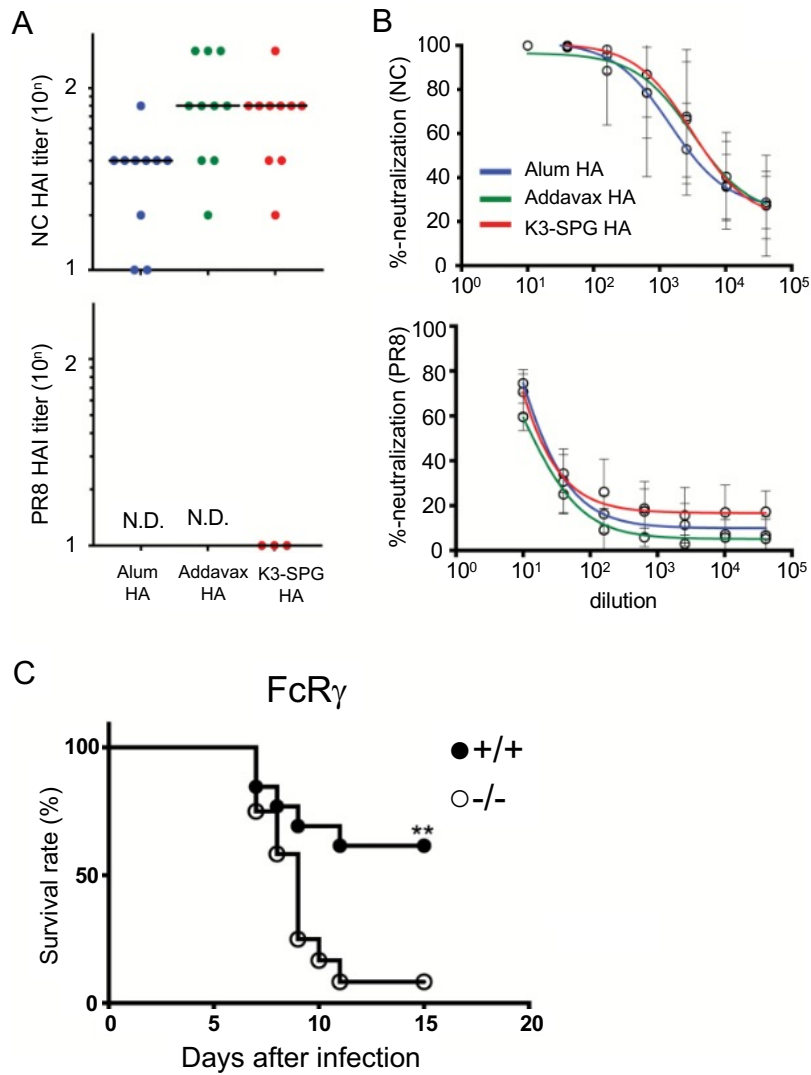
Supplementary Figure 3. 各種アジュバント添加 HA スプリットワクチンを用いた攻撃接種試験

C57BL/6J マウスに 1µg の NC 株 HA スプリットワクチンを単独 (HA only)、またはアジュバントとして alum (alum HA)、Addavax (Addavax HA)または K3-SPG (K3-SPG HA)を添加し、0 日目と 28 日目に筋肉内投与した。最終ワクチン接種から 7 日後にマウスに NC または PR8 インフルエンザウイルスを感染させた。(A) NC IAV 感染後の体重減少。マウスの体重は、感染後 17 日目まで測定した。各ワクチン接種群の 0 日目と比較した体重変化率をプロットした。Welch 補正を用いた対応のない 2 標本 t 検定を用いて統計解析を行った (n=10-12) **p<0.01。(B) PR8 IAV 感染後の生存曲線。生存率は、感染後 15 日目まで評価した。生存率をプロットし、K3-SPG HA 群と他のワクチン群との差を log-rank 検定を用いて統計解析を行った (n=20-23) *p<0.05, ***p<0.001



Supplementary Figure 4. 異種IAV感染に対するHA特異的CD8+T細胞応答の役割

(A) 最終ワクチン接種から7日後にしたC57BL/6Jマウスから脾細胞を採取し、NCまたはPR8 HAに対応するオーバーラップしたペプチドで刺激した。CD44+ CD8+T細胞集団におけるNC HAまたはPR8 HA特異的IFN-gammaまたはTNF-alpha陽性細胞の頻度を示す。Mann-Whitney U検定を用いて統計解析を行った (n=5) *p<0.05, **p<0.01 (B) マウスを0日目と28日目にK3-SPGを添加した1µgのHASプリットワクチンで免疫した。抗CD8抗体は32、33、34、38、42、46日目に腹腔内投与した。35日目にマウスに PR8 IAVを感染させ、その後の生存を感染後15日目まで評価した (n=20)。



Supplementary Figure 5. 異種IAV感染に対する防御に対するFc γ 受容体を介した免疫応答

(A) 各アジュバント添加型インフルエンザワクチン接種後のNC及びPR8 IAVに対する血清HAI価. (B) 各アジュバント添加型インフルエンザワクチン接種後の血清のH1N1シュードウイルスに対する中和活性 (C) 野生型(+/+)(n = 13)及びFc受容体 γ 欠損マウス(-/-)(n = 12)に0日目及び28日目に各アジュバント添加NC HAスプリットワクチン1 μ gを接種した。最後の接種から7日後にPR8 IAVを感染させ、その後の生存を感染後15日目まで評価した。群間の差はlog-rank検定で統計解析を行った。**p<0.01

参考文献

1. 厚生労働省ホームページ . Available from: https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/kekkaku-kansenshou/infuenza/index.html.
2. Uyeki, T.M., et al., *Influenza*. Lancet, 2022. **400**(10353): p. 693-706.
3. Olsen, B., et al., *Global patterns of influenza a virus in wild birds*. Science, 2006. **312**(5772): p. 384-8.
4. Wille, M. and E.C. Holmes, *The Ecology and Evolution of Influenza Viruses*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2020. **10**(7).
5. Subbarao, K., *Avian influenza H7N9 viruses: a rare second warning*. Cell Res, 2018. **28**(1): p. 1-2.
6. Tregoning, J.S., R.F. Russell, and E. Kinnear, *Adjuvanted influenza vaccines*. Hum Vaccin Immunother, 2018. **14**(3): p. 550-564.
7. Yamamoto, T., et al., *A unique nanoparticulate TLR9 agonist enables a HA split vaccine to confer FcγR-mediated protection against heterologous lethal influenza virus infection*. Int Immunol, 2019. **31**(2): p. 81-90.
8. Masuta, Y., et al., *An Antigen-Free, Plasmacytoid Dendritic Cell-Targeting Immunotherapy To Bolster Memory CD8(+) T Cells in Nonhuman Primates*. J Immunol, 2018. **200**(6): p. 2067-2075.
9. Kobiyama, K., et al., *Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(8): p. 3086-91.
10. Ingersoll, M.A., et al., *Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation*. Trends Immunol, 2011. **32**(10): p. 470-7.
11. Kwissa, M., et al., *Distinct TLR adjuvants differentially stimulate systemic and local innate immune responses in nonhuman primates*. Blood, 2012. **119**(9): p. 2044-55.
12. Jegaskanda, S., et al., *Fc or not Fc; that is the question: Antibody Fc-receptor interactions are key to universal influenza vaccine design*. Hum Vaccin Immunother, 2017. **13**(6): p. 1-9.
13. Auladell, M., et al., *Recalling the Future: Immunological Memory Toward Unpredictable Influenza Viruses*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1400.
14. Calabro, S., et al., *The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect*. Vaccine, 2013. **31**(33): p. 3363-9.
15. DiLillo, D.J., et al., *Broadly neutralizing anti-influenza antibodies require Fc receptor engagement for in vivo protection*. J Clin Invest, 2016. **126**(2): p. 605-10.
16. DiLillo, D.J., et al., *Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcγR interactions for protection against influenza virus in vivo*. Nat Med, 2014. **20**(2): p. 143-51.
17. Boudreau, C.M. and G. Alter, *Extra-Neutralizing FcR-Mediated Antibody Functions for a Universal Influenza Vaccine*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 440.
18. Bruhns, P., *Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models*. Blood, 2012. **119**(24): p. 5640-9.
19. Florek, N.W., et al., *Modified vaccinia virus Ankara encoding influenza virus hemagglutinin induces heterosubtypic immunity in macaques*. J Virol, 2014. **88**(22): p. 13418-28.
20. Jegaskanda, S., et al., *Antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with control of pandemic H1N1 influenza virus infection of macaques*. J Virol, 2013. **87**(10): p. 5512-22.
21. Castro-Dopico, T. and M.R. Clatworthy, *IgG and FcγR Receptors in Intestinal Immunity and Inflammation*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 805.
22. Jegaskanda, S., P.C. Reading, and S.J. Kent, *Influenza-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity:*

- toward a universal influenza vaccine. *J Immunol*, 2014. **193**(2): p. 469-75.
23. Seidel, U.J., P. Schlegel, and P. Lang, *Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 76.
 24. Mullarkey, C.E., et al., *Broadly Neutralizing Hemagglutinin Stalk-Specific Antibodies Induce Potent Phagocytosis of Immune Complexes by Neutrophils in an Fc-Dependent Manner*. *mBio*, 2016. **7**(5).
 25. Ana-Sosa-Batiz, F., et al., *Influenza-Specific Antibody-Dependent Phagocytosis*. *PLoS One*, 2016. **11**(4): p. e0154461.
 26. Simhadri, V.R., et al., *A Human Anti-M2 Antibody Mediates Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) and Cytokine Secretion by Resting and Cytokine-Preactivated Natural Killer (NK) Cells*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0124677.
 27. Vandervan, H.A., et al., *What Lies Beneath: Antibody Dependent Natural Killer Cell Activation by Antibodies to Internal Influenza Virus Proteins*. *EBioMedicine*, 2016. **8**: p. 277-290.
 28. Bournazos, S., et al., *Fc-optimized antibodies elicit CD8 immunity to viral respiratory infection*. *Nature*, 2020. **588**(7838): p. 485-490.
 29. Maamary, J., et al., *Increasing the breadth and potency of response to the seasonal influenza virus vaccine by immune complex immunization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(38): p. 10172-10177.
 30. Adachi, Y., et al., *Exposure of an occluded hemagglutinin epitope drives selection of a class of cross-protective influenza antibodies*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 3883.
 31. Corti, D., et al., *A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins*. *Science*, 2011. **333**(6044): p. 850-6.
 32. Wu, X., et al., *Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1*. *Science*, 2010. **329**(5993): p. 856-61.
 33. Wu, X., et al., *Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing*. *Science*, 2011. **333**(6049): p. 1593-602.
 34. Doria-Rose, N.A., et al., *HIV-1 neutralization coverage is improved by combining monoclonal antibodies that target independent epitopes*. *J Virol*, 2012. **86**(6): p. 3393-7.
 35. Li, Y., et al., *HIV-1 neutralizing antibodies display dual recognition of the primary and coreceptor binding sites and preferential binding to fully cleaved envelope glycoproteins*. *J Virol*, 2012. **86**(20): p. 11231-41.
 36. de Taeye, S.W., et al., *FcγR Binding and ADCC Activity of Human IgG Allotypes*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 740.
 37. Lund, J., et al., *Human Fc gamma RI and Fc gamma RII interact with distinct but overlapping sites on human IgG*. *J Immunol*, 1991. **147**(8): p. 2657-62.
 38. Parsons, M.S., et al., *Fc-dependent functions are redundant to efficacy of anti-HIV antibody PGT121 in macaques*. *J Clin Invest*, 2019. **129**(1): p. 182-191.
 39. Jennewein, M.F. and G. Alter, *The Immunoregulatory Roles of Antibody Glycosylation*. *Trends Immunol*, 2017. **38**(5): p. 358-372.
 40. Boyoglu-Barnum, S., et al., *Glycan repositioning of influenza hemagglutinin stem facilitates the elicitation of protective cross-group antibody responses*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 791.
 41. He, W., et al., *Epitope specificity plays a critical role in regulating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against influenza A virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(42): p. 11931-11936.
 42. Cox, F., et al., *HA Antibody-Mediated FcγRIIIa Activity Is Both Dependent on FcR Engagement and Interactions between HA and Sialic Acids*. *Frontiers in Immunology*, 2016. **7**.
 43. Jegaskanda, S., et al., *Generation and Protective Ability of Influenza Virus-Specific Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Humans Elicited by Vaccination, Natural Infection, and Experimental Challenge*. *J Infect Dis*, 2016. **214**(6): p. 945-52.
 44. Jacobsen, H., et al., *Influenza Virus Hemagglutinin Stalk-Specific Antibodies in Human Serum are a Surrogate Marker for In Vivo Protection in a Serum Transfer Mouse Challenge Model*. *mBio*, 2017. **8**(5).

45. Vandervan, H.A., et al., *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Responses to Seasonal Influenza Vaccination in Older Adults*. J Infect Dis, 2017. **217**(1): p. 12-23.
46. Ana-Sosa-Batiz, F., et al., *Antibody-dependent phagocytosis (ADP) responses following trivalent inactivated influenza vaccination of younger and older adults*. Vaccine, 2017. **35**(47): p. 6451-6458.
47. Mukherjee, R., et al., *Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13886.
48. Hirano, R., et al., *Human thymic stromal lymphopoietin enhances expression of CD80 in human CD14+ monocytes/macrophages*. Inflamm Res, 2011. **60**(6): p. 605-10.
49. Silveira, G.F., et al., *Immature dendritic cells generated from cryopreserved human monocytes show impaired ability to respond to LPS and to induce allogeneic lymphocyte proliferation*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e71291.
50. Jiang, W., et al., *Impaired monocyte maturation in response to CpG oligodeoxynucleotide is related to viral RNA levels in human immunodeficiency virus disease and is at least partially mediated by deficiencies in alpha/beta interferon responsiveness and production*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4109-19.