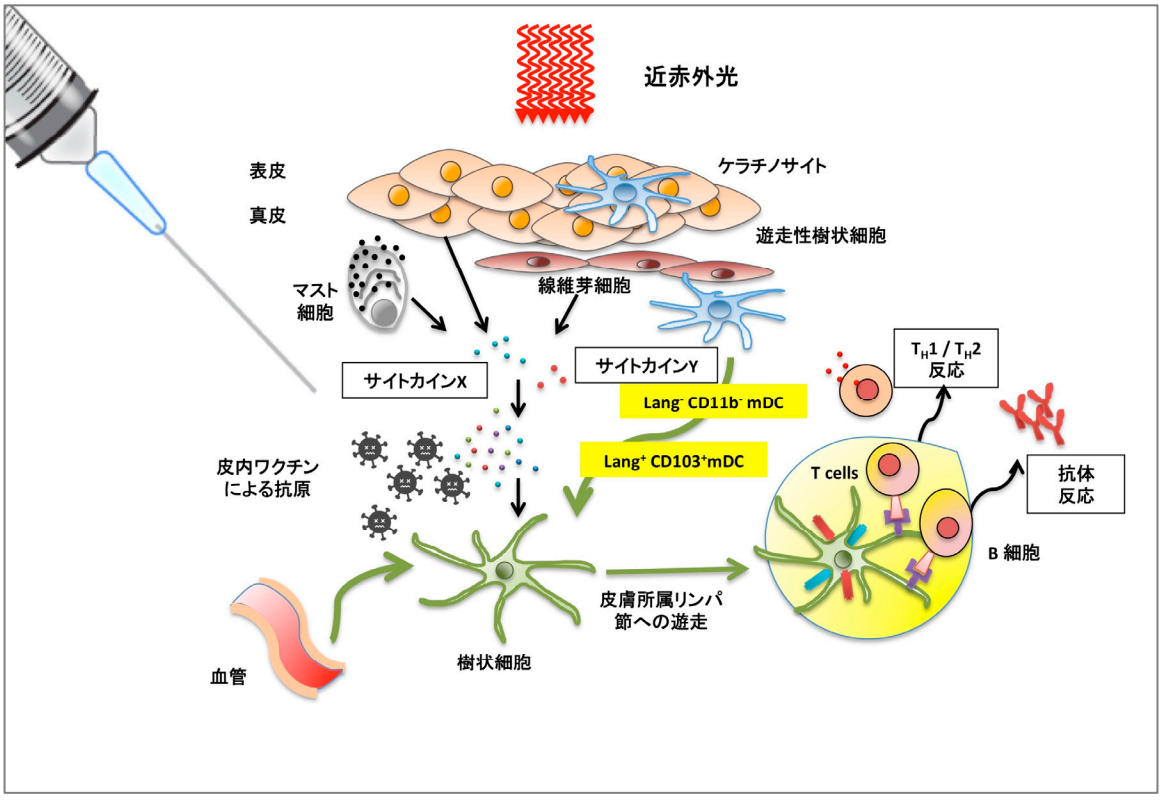
193　近赤外光を用いたワクチンアジュバント機序の解明	君塚　善文

【目的】現在のワクチン製剤は安全性の追求からその抗原が選択的になる一方で、免疫原性が低下し有効性が減少している。そこで免疫反応を惹起するために金属や生体化合物由来の免疫賦活化剤（アジュバント）が添加されるが、アジュバント自体に種々の副作用が知られ、より安全で効果的な技術が求められている。これまで、我々は安全な条件の近赤外光の皮膚への照射がその直後に接種されたワクチンの効果を増強することを明らかにしてきた。そこで本研究では、光受容細胞に注目し、生体が近赤外光を免疫反応につなげていく分子機構を明らかにすることを目的とする。
【方法】光源として連続波 1,064 nm の近赤外光を用いた。マウス皮膚を構成する細胞の培養系に近赤外光を照射し、活性酸素検出薬を用いて細胞内活性酸素種（ROS）産生を定量化した。近赤外光照射後のマウス表皮を採取し自然免疫に関与する諸遺伝子の変化を定量的に評価した。除毛後の皮膚に FITC 溶液を塗布し皮内の細胞を標識した後に近赤外光を照射し、皮膚所属リンパ節を採取し、照射が樹状細胞の遊走へどのように影響を与えるかをフローサイトメトリにて評価した。インフルエンザワクチンマウスモデルにて抗インフルエンザ特異抗体の定量を ELISA で行った。
【結果】マスト細胞の培養系では近赤外光照射によって ROS 産生の増加が観察された。N-アセチルシステインの前投与やマスト細胞欠損マウスを用いることで近赤外光によるインフルエンザワクチンモデルのアジュバント効果は減弱し、マスト細胞欠損マウスの皮膚にマスト細胞を再構成することでアジュバント効果も復元されたことから、マスト細胞が近赤外光の受容体細胞として重要な働きをしていることが分かった。光照射後の皮内では CCL20 や CCL2 など樹状細胞の活性化、遊走促進に関与する遺伝子の増加が認められ、皮膚所属リンパ節への遊走が促進されていることも明らかになった。以上のことから、近赤外光によるアジュバント効果には皮膚マスト細胞から始まる樹状細胞の遊走促進作用が重要な役割を持つことが明らかになった。

近赤外光の照射によるワクチンアジュバント効果



193. 近赤外光を用いたワクチンアジュバント機序の解明

君塚　善文

防衛医科大学校 内科学教室（感染症・呼吸器）

Key words：ワクチン，インフルエンザ，レーザー，アジュバント

緒　言

ワクチンは生体の持つ免疫応答を利用し、病原体や異物などの抗原を体内に接種し免疫を誘導する医療技術である。ワクチン抗原は病原体の成分が多く残るほど副作用が起こる可能性があり、近年のワクチン製剤は安全性の観点から病原体成分の一部を抽出してワクチン抗原にしている。しかし、標的となる抗原が限局することで肝心の免疫誘導能も減少してしまう。そこで、現在のワクチン製剤には免疫賦活化剤（アジュバント）の添加を要する製剤が多い。

現在、本邦で認可されているアジュバント添加ワクチンは、アルミニウム化合物などの鉱酸塩を中心に、油性物質や界面活性剤などの混合剤がアジュバントとして使われているが、アジュバント自体の副反応が問題視されており、より安全で有効性の高いアジュバントの開発が求められている。

1970 年代に安定した光源としてレーザー技術が開発されると物理的なエネルギーである光をアジュバントとして着目し活用するレーザーアジュバントの概念が生まれた［1］。皮内ワクチンとの併用を想定されており、光を皮膚に照射した直後にワクチン抗原を接種する。原理によって皮膚への傷害性や波長、出力形式などに違いがあるが、我々は非侵襲的な照度の連続波近赤外光を皮膚に照射することにより、その直後に接種されたワクチンの効果を増強することを明らかにしてきた［2〜4］。そこで本研究では、光受容細胞に注目し、生体が近赤外光を免疫反応につなげていく分子機構を明らかにすることを目的とする。

方　法

1.　レーザー光源

本研究では、光源として Nd : YVO_4 1,064 nm を用いた連続波を用いた （RMI Laser、Lafayette、CO）。*In vivo* における非侵襲的照度を 5.0 W/cm^2 とし 5 mm 径のスポットに 1 分間照射した。*In vitro* においては 0.5 W/cm^2 の照度を 22 mm 径に成形し、12 ウェル平底プレートの円形ウェルに一様に照射した。

2.　インフルエンザワクチンモデル

C57BL/6J を背景とする 8 週齢の野生型マウス、*Batf3* 欠損マウス、マスト細胞欠損マウス（sash: $Kit^{W\text{-}sh}/Kit^{W\text{-}sh}$）を用いた。レーザーを照射する 2 日前にマウスの背部を剃毛・除毛し、レーザーを照射直後の同部位にインフルエンザウィルスワクチン（A/PR/8/34、1 μg/10 μl；Charles River）を皮内注した。皮内投与 4 週間後、経鼻的に 2.0×10^5 EID_{50} A/PR/8/34 生ウィルスを感染させ、感染後 4 日目に血清を採取して安楽死させた。血清はインフルエンザ特異的 IgG、IgG1、IgG2c を ELISA 法により定量した［3］。また、生存率の評価のためには 1.5×10^6 EID_{50}で感染し経時的に観察した。

3.　リンパ球遊走試験

レーザー照射 4 時間前に剃毛したマウス皮膚に 10 μl FITC 液を塗布した。レーザー照射直後に卵白アルブミンを皮内注射し、48 時間後に皮膚所属リンパ節を摘出した。細胞を単離し樹状細胞を表面抗原で標識しフローサイトメトリでサブグループごとの FITC 陽性細胞数をカウントした［4］。

結果および考察

1. 骨髄誘導マスト細胞モデルによる近赤外光照射による活性化シグナルの検索

マウス骨髄から誘導したマスト細胞に近赤外光を照射すると細胞内の活性酸素種(ROS)の産生が見られた(図 1A)。この反応はケラチノサイトなど他の皮膚構成細胞でもみられたがマスト細胞で顕著な反応であった。また、マウス皮内の RNA を抽出し近赤外光の照射後に樹状細胞の遊走や活性化に関与が知られるサイトカインの上昇が見られた(図 1B)。この反応はマスト細胞欠損マウスにおいて減弱しており、近赤外光の受容細胞としてマスト細胞が重要な働きをしていることが推測された［5］。

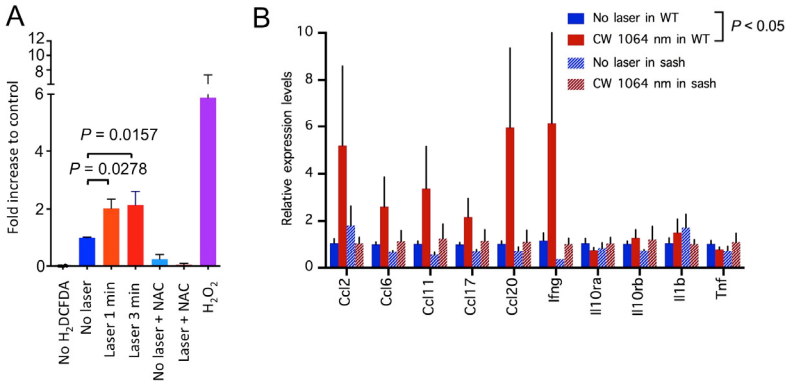


図 1. 近赤外光照射によるマスト細胞内の活性酸素種の産生とマウス皮内のサイトカイン発現

A) マウス骨髄誘導マスト細胞に近赤外光を照射した際の細胞内活性酸素種の産生細胞の割合の変化。NAC 投与下で反応は消失する。

B) 野生型マウス（WT）およびマスト細胞欠損マウス（sash）の近赤外光照射後のマウス皮内のサイトカイン発現量の変化（student unpaired two-tailed *t* test）。

2. マウスワクチンモデルにおける近赤外アジュバント作用へのマスト細胞の寄与の検証

マスト細胞の近赤外光によるアジュバント効果への影響を評価するため、インフルエンザワクチンマウスモデルで検証した（図 2)。野生型マウスで見られたアジュバント効果はマスト細胞欠損マウスで減弱すること、その効果は皮内に野生型マウスから誘導されたマスト細胞を再構成することで回復したことから、近赤外アジュバント効果に皮膚マスト細胞が重要な役割をしていることが明らかになった［5］。

3. 近赤外アジュバント作用に寄与する樹状細胞集団の同定

近赤外光照射後の皮膚所属リンパ節では $Lang^+$ migDC および $Lang^-$ $CD11b^-$ migDC の遊走亢進がみられ、ワクチン抗原の抗原提示に寄与している可能性が示唆された（図 3)。

続いて、$Lang^+$ migDC の中で、どの樹状細胞集団がアジュバント効果に寄与しているか同定するために、遺伝子改変マウスを用いてインフルエンザワクチンモデルで検証した。$Lang^+$ $CD103^+$ mig DC が選択的に欠損している $Batf3^{-/-}$マウスにおいて、アジュバント効果が皮内投与単独群と同程度まで減弱しており、この樹状細胞群に近赤外アジュバント効果が寄与していることが推測された（図 4)。

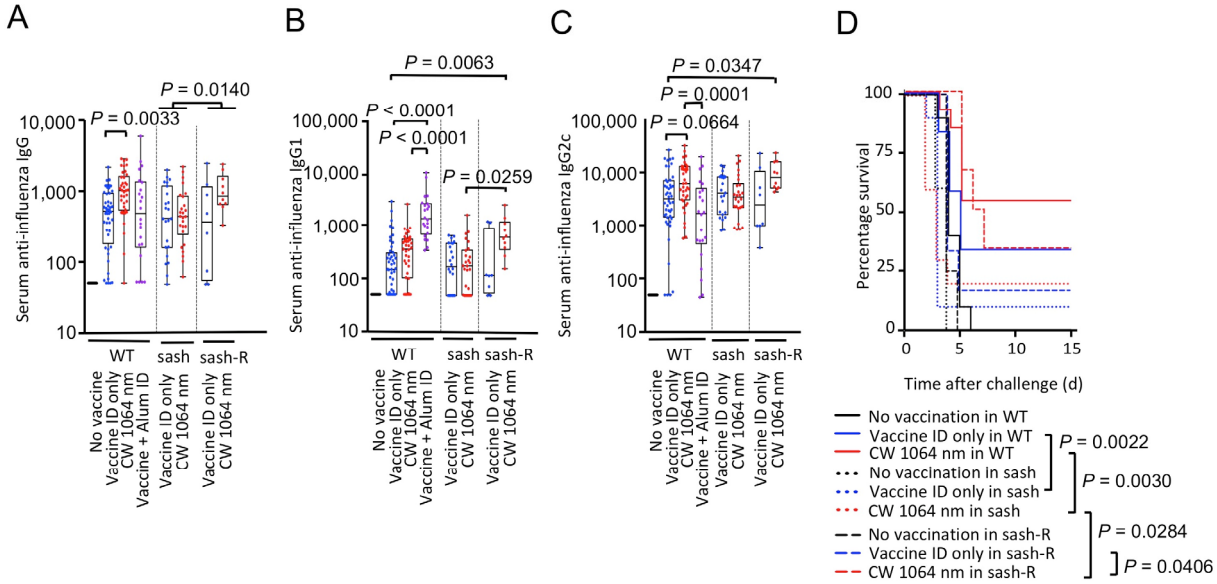


図 2. インフルエンザワクチンマウスモデルにおけるマスト細胞のアジュバント効果への寄与

抗インフルエンザ特異抗体価（A : IgG、B : IgG1、C : IgG2c）。sash はマスト細胞欠損マウス、sash-R は皮内にマスト細胞を再構築した sash マウス（two-way ANOVA）。

D：免疫 4 週間目のインフルエンザウィルス経鼻投与後の生存率の評価（Kaplan-Meier survival plots）。

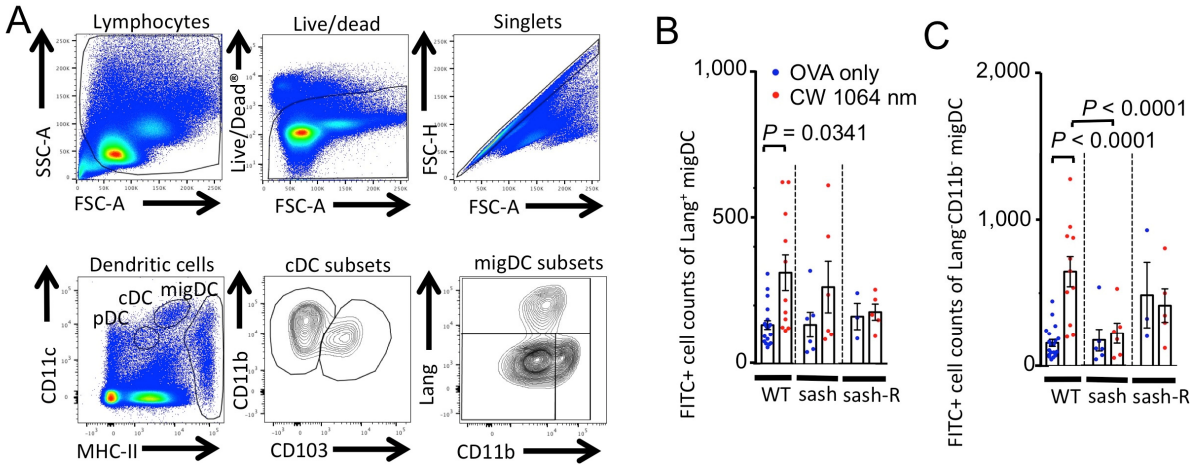


図 3. FITC painting 法による皮膚所属リンパ節への樹状細胞遊走の評価

A) ゲーティング。

B) $Lang^+$ migDC。

C) $Lang^-$ $CD11b^-$ migDC（two-way ANOVA）。

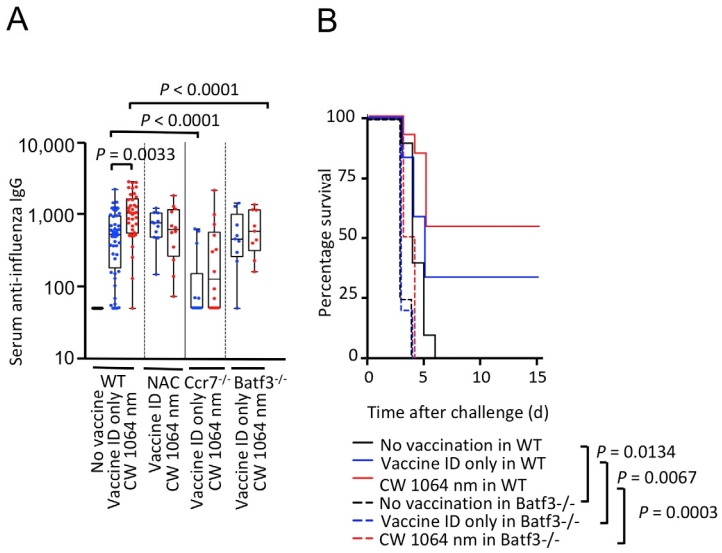


図 4. インフルエンザワクチンマウスモデルにおける樹状細胞のアジュバント効果への寄与の評価

A) 抗インフルエンザウィルス特異抗体価（two-way ANOVA）。

B) 免疫 4 週間目のインフルエンザウィルス経鼻投与後の生存率の評価（Kaplan-Meier survival plots）。

以上のことから、近赤外光によるアジュバント効果には皮膚マスト細胞から始まる樹状細胞の遊走促進作用が重要な役割を持つことが明らかになった。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、米国 Harvard Medical College, Massachusetts General Hospital, Gordon Medical Imaging Center, Department of Medicine の Dr. Satoshi Kashiwagi と防衛医科大学校医用工学講座の櫛引俊宏である。また、実験遂行に多大なるご助力を頂いている防衛医科大学校内科学講座（感染症・呼吸器）の川名明彦教授、同国際感染症教室の宮平靖教授、国立感染症研究所インフルエンザウィルス研究センターの佐藤佳代子先生、岩手医科大学微生物学講座の吉野直人先生、小田切崇先生にこの場をお借りして感謝申し上げます。

文　献

1) Kashiwagi S, Brauns T, Gelfand J, Poznansky MC. Laser vaccine adjuvants. History, progress, and potential. Hum Vaccin Immunother. 2014;10(7):1892-907. PMID: 25424797 DOI: 10.4161/hv.28840.

2) Kimizuka Y, Callahan JJ, Huang Z, Morse K, Katagiri W, Shigeta A, et al. Semiconductor diode laser device adjuvanting intradermal vaccine. Vaccine. 2017;35(18):2404-12. PMID: 28365253 DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.03.036.

3) Kashiwagi S, Yuan J, Forbes B, Hibert ML, Lee EL, Whicher L, et al. Near-infrared laser adjuvant for influenza vaccine. PLoS One. 2013;8(12):e82899. PMID: 24349390 DOI: 10.1371/journal.pone.0082899.

4) Morse K, Kimizuka Y, Chan MPK, Shibata M, Shimaoka Y, Takeuchi S, et al. Near-Infrared 1064 nm Laser Modulates Migratory Dendritic Cells To Augment the Immune Response to Intradermal Influenza Vaccine. J Immunol. 2017;199(4):1319-32. PMID: 28710250; DOI: 10.4049/jimmunol.1601873.

5) Kimizuka Y, Katagiri W, Locascio JJ, Shigeta A, Sasaki Y, Shibata M, et al. Brief Exposure of Skin to Near-Infrared Laser Modulates Mast Cell Function and Augments the Immune Response. J Immunol. 2018;201(12):3587-603. PMID: 30420435 DOI: 10.4049/jimmunol.1701687.