

## 65. T細胞を基盤としたインフルエンザ新規ワクチン開発

久保 允人

Key words : インフルエンザ, 抗体, 免疫

東京理科大学 生命医科学研究所  
分子病態学研究部門

### 緒言

インフルエンザウイルスによるパンデミック感染は有史以来、最も多くの人類を死にいたらしめたウイルスである。最近の2009年のインフルエンザH1N1型によるパンデミック感染は記憶に新しい。また、近年多発傾向にある鳥インフルエンザH5N1, H7N9はヒトに対して高い病原性を持つことから、ヒト型への変異に伴うパンデミック化は非常に大きな被害をもたらすことが予想される。インフルエンザに対する感染防御対策としては、抗体を基盤とした効果の高いワクチンの開発が不可欠である。ウイルスの主要抗原は粒子表面のヘマグルチニン(HA)であり、感染個体で産生されたHAに対する抗体が、ウイルスの感染拡大を抑え、最も有効なワクチンとして働くことは言うまでもない。しかしながら、これまでに流行したウイルスHAに対する抗体は、インフルエンザウイルスの高い遺伝子変異率と遺伝子交雑による多様性によって作り出される新型ウイルスのHAを認識することはできない。これが、変異ウイルスの感染拡大を引き起こし、病原性の高いウイルスがパンデミック化する事に繋がってしまう。

インフルエンザに対する感染防御において抗体はその中核的な役割を果たす重要な生体分子であり、この分子は免疫応答の司令塔的な存在であるT細胞から産生されるサイトカイン(IL-4, IL-21)の制御の下B細胞から産生される。これまで、この抗体産生を制御するサイトカインは「2型ヘルパーT細胞(TH2細胞)から産生されると考えられていたが、我々はこのT細胞がリンパ濾胞に局在するリンパ濾胞型ヘルパーT細胞:TFH細胞であることが明らかにした<sup>1)</sup>。TFH細胞は、2次リンパ組織において抗体が作られる「場」と考えられている胚中心の形成にも必須であることから、抗体産生を構成する上で非常に重要な細胞であることが分かってきている<sup>2,3)</sup>。そのため、インフルエンザに対するより効率の良いワクチンを開発するためには、TFH細胞の役割を知ることは重要な課題と言える。

### 方法

T細胞特異的・B細胞特異的Bcl6欠損マウスは理研IMS竹森先生より分与された。

IFN $\gamma$ レポーターマウスはVenusをレポーターとする目的で、Venus遺伝子をIFN $\gamma$ の3末端UTRに挿入したBAC contrastを作製した。BAC contrastを遺伝子導入することで、トランスジェニックマウスを作製した。

ペプチドライブラリーの構築: HAのアミノ酸配列に従い、120個のペプチドライブラリーを作製した。

IFN $\gamma$  Venusレポーターマウスを不活化ウイルスで免疫した後、このマウスから脾臓由来のT細胞を精製した。次に、このT細胞を樹状細胞が存在する環境下で、ペプチドとともに培養する。培養7日後、再びT細胞を集めて、Venusの発現(IFN $\gamma$ )の発現を解析した。IL-2はELISAにより、細胞増殖はMTTにより測定した。

### 結果

インフルエンザではウイルス感染時において、IFN- $\gamma$ を産生するTH1細胞と抗体産生を制御するTFH細胞が誘導される。インフルエンザに対する感染防御において抗体はその中核的な役割を果たす重要な生体分子であり、TFH細胞から産生されるサイトカイン(IL-4, IL-21)の制御下で、B細胞が集まるB cell follicleや胚中心にて、B細胞が抗体産生細胞(プラズマ細胞)に変わることによってつくられる。このTFH細胞の分化には転写因子Bcl6が必要とされることから、インフルエンザの感染防御におけるTFH細胞の役割を解析するため、転写因子Bcl6をT細胞あるいはB細胞特

異的に欠損させたマウスを作製し、TFH細胞が存在しない条件での感染防御および抗体産生機構を解析した。ワクチンとして、不活化ウイルスで免疫したマウスでは、ウイルスに対して特異的なIgG抗体が作られることで、抵抗性を獲得する。実際、ワクチンを受けたマウスの血清を、感染を受けたことが無いマウスに移入すると、そのマウスはウイルスに強い抵抗性を獲得した。一方、T細胞特異的Bcl6欠損TFH細胞が存在しないだけでなく、Bリンパ濾胞内に形成される胚中心の形成も消失していた。ところが、これらT細胞欠損マウスにおけるインフルエンザに対する抵抗性を解析したところ、欠損マウスでも正常マウスと同等のインフルエンザに対する抵抗性が認められた。一方、欠損マウスでIgG1抗体の産生が減弱したのに対し、IgG2b, IgG2c抗体の産生は正常マウスと同等であった。このことから、インフルエンザによって誘導されるIgG2抗体の産生にはTFH細胞が関与しないことが分かってきた。このIgG2抗体の産生はT細胞に依存し、特にサイトカインIFN $\gamma$ を産生するCXCR3<sup>+</sup> TH1細胞によってその産生は制御された。

そこで、IFN $\gamma$ 産生TH1細胞の生体内動態を追跡する目的で、IFN $\gamma$ の発現をGFP蛍光色素で追跡できるシステム、IFN $\gamma$ レポーターマウスを使って解析したところ、2次リンパ組織内におけるIFN $\gamma$ 産生TH1細胞は、免疫後B cell follicleに移動してB細胞と出会うことによって、B細胞のAIDの発現を誘導してクラススイッチを制御していた。

インフルエンザにおけるT細胞エピトープの探索とエピトープに反応するT細胞の可視化を行うためIFN $\gamma$ レポーターマウスに不活化ウイルスで免疫した後、脾臓やリンパ節において、TH1細胞を活性化させるT細胞エピトープの探索を行った。HAと核内蛋白(NP)上にIFN $\gamma$ を誘導する特定のエピトープが存在することが示された。しかしながら、これらエピトープはIL-2や細胞増殖を制御するエピトープとはオーバーラップすることはなかった(図1)。

このことから、インフルエンザ免疫時では、IFN $\gamma$ 産生TH1細胞はエピトープ特異的に誘導されることが明らかにされ、このエピトープを使うことにより効率の高いTH1細胞を誘導することが可能になることが予想された。

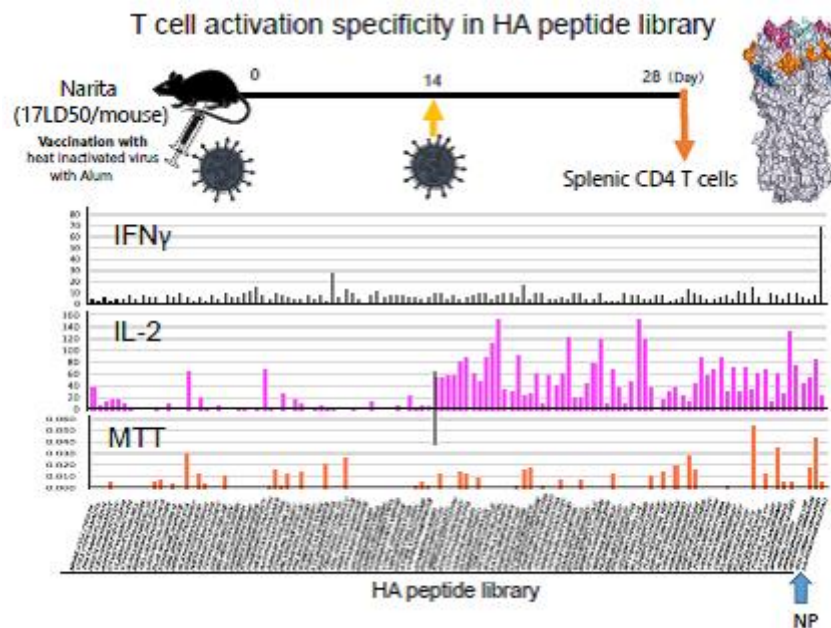


図1. インフルエンザにおけるT細胞エピトープの探索。

IFN $\gamma$  Venusレポーターマウスを不活化ウイルスで免疫した後、このマウスから脾臓由来のT細胞を精製した。次に、このT細胞を樹状細胞が存在する環境下で、120種類のペプチドとともに培養した。培養7日後、再びT細胞を集めて、Venusの発現(IFN $\gamma$ )、IL-2産生、細胞増殖(MTT)について検討した。縦軸は反応、横軸は使用したペプチドの配列を示す。

## 考 察

Bcl6 を T 細胞あるいは B 細胞特異的に欠損させたマウス, すなわち TFH 細胞が存在しない条件でも, 不活化ウイルスで免疫されたマウスはウイルスに対して高い抵抗性をもつ IgG2 抗体を誘導したことから, IgG2 抗体さえ誘導できれば有効なワクチンとして効果を示すことが示された. また, IgG2 抗体の産生には, IFN  $\gamma$  を産生する TH1 細胞の存在が必要であったことから, よりよいワクチンの開発には, TH1 細胞を効率良く誘導する必要性があることが考察された.

そこで, TH1 細胞を効率良く誘導するエピトープを探索したところ, ウイルス抗原の特定のエピトープが必要であることが, HA と NP のペプチドライブラリーの解析から明らかにされた. このエピトープを使うことにより効率の高い TH1 細胞を誘導することが可能になることが予想され, ワクチン投与に適切な抗原の探索に活用できる可能性が示された.

## 共同研究者

本研究の共同研究者は, 理化学研究所の宮内浩典研究員である. 本稿を終えるにあたり, 本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます.

## 文 献

- 1) Harada, Y., Tanaka, S., Motomura, Y., Harada, Y., Ohno, S., Ohno, S., Yanagi, Y., Inoue, H. & Kubo, M. : The 3' enhancer CNS2 is a critical regulator of interleukin-4-mediated humoral immunity in follicular helper T cells. *Immunity*, **36** : 188-200, 2012.
- 2) Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T., Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., Ohara, O., Rajewsky, K. & Takemori, T. : Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J. Exp. Med.*, **209** : 2079-2097, 2012.
- 3) Ise, W., Inoue, T., McLachlan, J. B., Kometani, K., Kubo, M., Okada, T. & Kurosaki, T. : Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression of memory TFH cells *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111** : 11792-11797, 2014.