

博士學位論文

ヘルパーT細胞サブセットの機能を選択的に制御すること
による新規ワクチンアジュバントに関する研究

近畿大学大学院
薬学研究科 薬科学専攻
山本 真也

目次

略語一覧	1
序論	2
本論	4
第一章 CCR4 阻害剤を用いた Treg の遊走阻害によるワクチン効果増強アジュバントの開発	4
I. 実験方法	5
II. 実験結果	9
1. CCR4 欠損マウスにおける抗原特異的な抗体価の誘導および Treg の集積	9
2. 筋肉組織における CCR4 リガンド発現細胞の解析	10
3. CCR4 欠損マウスにおける DC の活性化マーカーの発現と所属リンパ節への遊走解析	10
4. CCR4 阻害剤によるアジュバント効果とメカニズム解析	11
III. 考察および小括	14
第二章 P2 受容体アゴニストを用いた Th17 細胞を介した CTL 誘導ワクチンアジュバント	16
I. 実験方法	18
II. 実験結果	22
1. 鼻粘膜固有層における CD70 ⁺ CD11c ^{low} 樹状細胞の同定	22
2. $\alpha\beta$ -ATP 併用投与時における T 細胞の割合	23
3. $\alpha\beta$ -ATP による抗原特異的抗体の誘導と抗腫瘍効果	24
4. P2 受容体阻害剤を用いた T 細胞誘導阻害効果や抗腫瘍効果減弱の解析	25
III. 考察および小括	27
総括	29
参考文献	32

略語一覽

APC	Allophycocyanin
ATP	adenosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CCL	CC chemokine ligand
CCR	CC chemokine receptor
CLA	cutaneous lymphocyte antigen
CLN	cervical lymph nodes
CTL	cytotoxic T-lymphocyte
DC	dendritic cell
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
Foxp	Fork-head Box Protein P
HRP	horseradish peroxidase
IFN	Interferon
IL	interleukin
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MHC	major histocompatibility complex
NEAA	Non-Essential Amino Acid
OVA	ovalbumin
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein
PFA	paraformaldehyde
PMA	Phorbol Myristate Acetate
poly(I:C)	polyinosinic-polycytidylic acid
P2R	purinergic 2 receptor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SP	spleen
TGF	transforming growth factor
Th	T-helper
TLR	Toll-like receptor
Treg	regulatory T cell
2-Me	2-Mercaptoethanol

序論

ワクチンは生体に備わっている免疫反応を利用することで、特定の病原体に対する防御反応を獲得させる医薬品である。現在使用されているワクチンとして、生ワクチンと不活化ワクチンの大きく二つが存在している。生ワクチンは、病原性を限りなく弱くした製剤であるため、自然感染に近い状態で免疫を獲得できるが、弱毒化された病原体が体内で増殖するため、副反応のリスクが高いことが問題となる。不活化ワクチンは病原性をなくした製剤であるため安全性が高いが、ワクチンの効果を獲得するために免疫賦活作用のあるアジュバントの併用が必須となる。

世界で初めて使用されたアジュバントにアルミニウム塩が知られている。アルミニウム塩は 1932 年にジフテリアトキソイドワクチンに使用されてから、これまで多くのワクチンに使用されている [1, 2]。一方で、アジュバントが効果を示すメカニズムは不明なまま経験的なワクチン開発が続いており、科学的な根拠が必要とされてきた。現在では、分子から生体レベルに至るまでの科学的なアプローチにより、アジュバントが効果を示すための詳細なメカニズムが次々に明らかとなってきた。特に、T 細胞や B 細胞を主体とする獲得免疫の誘導には、マクロファージや樹状細胞を主体とする自然免疫の活性化が必須であることが明らかにされている [2, 3]。現在研究段階で最も有望な候補物質が DC のパターン認識受容体の 1 つである toll-like receptor (TLR) を標的としたアゴニストである。TLR アゴニストは Th1 細胞の誘導や樹状細胞 (dendritic cell; DC) のクロスプレゼンテーション能の増加により細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) を誘導する [4-6]。さらに、T-helper (Th) 2 細胞を誘導することで様々な抗体を誘導している。しかし、これら TLR のリガンドは外来生物由来の物質がほとんどであり、アジュバントとして使用したときの炎症反応等による強い副反応が問題となっている。なかでも TLR3 のアゴニストである polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) は臨床試験において、炎症反応による、発熱、紅斑、生死にかかわるエンドトキシン様ショック等が問題となり、実用化にまで至らなかった [7, 8]。さらに、その反応性をよりマイルドなものにした TLR アゴニストが開発され、その臨床試験が進んでいるが、反応性をマイルドにしたためか効果が不十分となり、臨床応用には至っていない [8]。そのため TLR を標的としたアジュバントではなく、別のものを標的としたアジュバントが求められている。

Th細胞にはいくつかのサブセットが存在しており、大きくTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞およびregulatory T cell (Treg)に分類されている。Th1細胞はinterferon (IFN)- γ やIL-2を産生し、CTL誘導に関与している[9, 10]。Th2細胞はIL-4やIL-5などを産生し、抗体産生細胞の誘導に関わっている[11]。Th17細胞はIL-17Aを産生することで細菌感染を防ぐ役割を果たすとともに、CTLの誘導にも関与することが報告されている[12-14]。一方、Tregは生体の恒常性維持や免疫寛容に関与しているが、ワクチンなどの免疫反応も抑制していることが知られている[15, 16]。すなわちTh細胞の機能を制御することによって病原体やがん細胞の排除など目的とするワクチンの効果を増強できると考えられる。実際に、アジュバントとして最も使用されているアルミニウム塩はTh2細胞を誘導することで抗体産生を促進していることが知られている[17, 18]。

そこで本稿では、TLRアゴニストではないアジュバントであり、Th細胞サブセットの機能を選択的に制御できるアジュバントの効果やメカニズムの解明を試みた。また、Th1細胞やTh2細胞の誘導を介した従来のアジュバントとは異なり、TregやTh17細胞などのTh細胞サブセットの機能を選択的に制御できるこれまでにないアジュバント候補物質を用いることで、ワクチン効果を向上できるか検討した。

本論

第一章 CCR4 阻害剤を用いた Treg の遊走阻害によるワクチン効果増強

アジュバントの開発

Treg は免疫抑制作用を持ち、自己寛容や恒常性の維持において役割を果たしている[15, 16]。しかし、Treg は微生物やがんに対する免疫反応や、ワクチン投与による免疫の獲得をも抑制することが知られている[19]。実際に、Treg を除去することで微生物やがんに対する防御的な免疫反応やワクチン投与による免疫反応が向上することが明らかになっている[20, 21]。Treg はケモカイン受容体 CCR4 が選択的に発現しており、そのリガンドとして CCL17 および CCL22 が知られている[22, 23]。そして、Treg は CCL17 や CCL22 を介して DC の周辺へと遊走し、DC の成熟や活性化を抑制していることが報告されている[24, 25]。他にも Treg は様々な免疫反応を抑制できるため、免疫療法やワクチン開発において、免疫反応を調節するための良い標的となると考えられている。

近年の研究では、CCR4 阻害剤をワクチンアジュバントとして投与することで、Treg の集積を抑制し、液性免疫や細胞性免疫の活性を増強することが示された[26-28]。そのため、Treg の集積を抑制するために CCR4 を標的とすることはワクチンとして抗原特異的な免疫応答を誘導するための効果的な方法であると考えられる。しかし、CCR4 は Treg 以外にも、ワクチンによる免疫反応に重要な Th2 細胞にも発現することが知られている[22, 23]。また、Treg は自己免疫疾患の発症の抑制にも関与しているため、Treg の機能を抑制することによる副反応の発現が懸念される[15, 16]。したがって、CCR4 を標的とした新規ワクチンアジュバントの開発においては、実際に臨床適応できるものであるか判断するために、詳細なメカニズムの探索が重要となる。そこで本章では、ワクチンによる抗原特異的免疫応答の誘導における CCR4 の寄与について検討するとともに、CCR4 阻害剤をワクチンアジュバントとして投与することにより、生体内でどのようなメカニズムで免疫向上を示しているのか明らかにすることを目的とした。

I. 実験方法

1. 細胞株

E.G7-OVA 細胞 (EL4 細胞の OVA cDNA トランスフェクタント) は、American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) から購入し、10% FBS (Sigma-Aldrich Inc.)、50 μ M 2-Mercaptoethanol (2-Me) (gibco)、および 800 μ g/ml G418 含有 RPMI1640 培地 (Wako) で培養した。なお、FBS は 56°C、30 分間の非動化処理を行った。

2. 実験動物

C57BL/6 マウスおよび BALB/c マウスは、日本クレア株式会社より購入した。CCR4 欠損マウスは、Jackson Laboratory より購入し、12 世代以上にわたって BALB/c マウスと戻し交配した。実験動物には固形飼料および水道水を摂取させ、約 24°C で 12 時間の明暗サイクルに保持された SPF 環境下の部屋で飼育した。なお、動物実験に関しては研究計画を近畿大学動物実験委員会に申請し、承認を得たうえで近畿大学実験動物規定に基づいて行った。

3. 投与薬物

ニワトリ卵白アルブミン OVA (ovalbumin; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) をモデル抗原として使用した。BALB/c および CCR4 欠損マウスに OVA (1 μ g) または OVA (1 μ g) および Compound 22 (0.2 μ g) を筋肉内に投与した。Compound 22 は公開済みの情報 [29] を基に近畿大学薬学部創薬分子設計学研究室の西脇敬二先生に合成を依頼した。

4. 抗体価測定

免疫したマウスから血清を採取し、OVA 特異的 IgG、IgG1、および IgG2a 力価を、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した。まず、OVA 溶液を ELISA plate に分注し、4°C で一晩静置して固相化した。4% スキムミルク/TBS (0.05% NaN₃ を含む) を 200 μ l/well で添加し、37°C で 2 時間ブロッキングした後、0.4% スキムミルク/TBS で希釈調整した検体を 50 μ l/well で添加し、室温で 2 時間静置した。TBS-T (0.1% Tween 20 含有 TBS) で 3 回洗浄後、検出抗体として HRP 標識 Goat Anti-mouse IgG、IgG1、あるいは IgG2a 抗体を各 50 μ l/well で添加した。なお各抗体はメーカー推奨濃度で使用し、

0.4% スキムミルク/TBS (NaN₃ を含まない) で希釈した。室温で 2 時間静置した後、TBS-T で 3 回洗浄し、Milli Q で 1 回洗浄後、HRP 基質液を 100 µl/well で添加した。発色後、2N H₂SO₄ を 100 µl/well で添加して反応を停止させ、450 - 620 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。抗体価は、吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率の逆数の対数を Reciprocal log₂ titer として算出した。

5. 細胞の単離

筋肉組織を摘出し、1.0 mg/ml コラゲナーゼ D (Roche; Basel, Switzerland)、0.8 U/ml Dispase II (Roche)、および 0.1 mg/ml DNase I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 含有 RPMI-1640 溶液で 37°C、1 時間振とうしながらインキュベート。その後、免疫細胞を分離するために、Percoll 勾配遠心分離を使用した。40% Percoll と 70% Percoll の中間層から免疫細胞を分離した。リンパ節および脾細胞からの細胞は、70 µm Cell Strainer を通過させることにより単離した。

6. フローサイトメトリー

単離した細胞を 10% FBS (Sigma-Aldrich Inc.)、2-Me (gibco)、L-Glutamin (gibco)、抗生物質 (gibco) および NEAA (gibco) 含有 RPMI1640 (complete medium) で懸濁し、 1.0×10^6 cells/1 ml/well で 24 well plate に播種した。PMA を 40 ng/well、Ionomycin (Wako) を 1 µg/well、GolgiPlug (BD Biosciences) を 1 µl/well で添加し、37°C で 4 時間培養した。培養後、細胞を 1.5 ml のエッペンチューブに回収し、遠心分離した (2000 rpm、5 分間、4°C)。上清を除去し、細胞ペレットを 100 µl の 0.1% BSA (bovine serum albumin; Sigma-Aldrich Inc.)、0.05% NaN₃ を含む PBS (staining buffer) で懸濁した。そこに staining buffer で 10 倍希釈した anti-mouse CD16/32 (clone; 2.4G2) (BioLegend) を 10 µl/tube 添加し、4°C で 30 分間静置した。その後、細胞外染色抗体を加え、4°C で 30 分間静置した後、staining buffer で洗浄した。その後、CytotfixCytoperm (BD Biosciences) を 250 µl/tube で加えて細胞を懸濁し、4°C で 20 分間静置した。Permash buffer (BD Biosciences) で洗浄した後に、細胞を 100 µl の Permash buffer で懸濁した。これに細胞内染色抗体を加え 4°C で 30 分間静置することで、細胞内マーカーを染色した。Permash buffer で洗浄した後に、500 µl の staining buffer で細胞を懸濁し、フローサイトメトリー解析に供した。なお、フローサイトメトリー解析前に、細胞懸濁液を 40 µm Cell Strainer に通した。また、抗体は全て staining buffer で希釈した。

使用した細胞外染色抗体

AlexaFluor488 標識 anti-mouse CD4 (clone GK1.5)、PerCP/cy5.5 標識 anti-mouse CD45 (clone 30-FF11)、PE 標識 anti-mouse CCR4 (clone 2G12)、PE 標識 anti-mouse CD11c (clone N418)、APC 標識 anti-mouse IA/IE (clone M5/114.15.2)、BV421 標識 anti-mouse CD40 (clone 3/23)、APC/cy7 標識 anti-mouse CD86 (clone GL-1)、PE/cy7 標識 anti-mouse CCR7 (clone G043H7)、APC/cy7 標識 anti-mouse CD4 (clone GK1.5) および PE/cy7 標識 anti-mouse CD8 α (clone 53-6.7) は BioLegend より購入した。

使用した細胞内染色抗体

APC 標識 anti-mouse IFN- γ (clone XMG1.2)、AlexaFluor488 標識 anti-mouse IL-4 (clone 11B11) および AlexaFluor647 標識 anti-mouse Foxp3 (clone 150D) は BioLegend より購入した。

7. Real-time PCR

筋肉組織からの mRNA 抽出には RNAiso Plus (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を使用した。全量 1 μ g の RNA template を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO CO., LTD., Osaka, Japan) で逆転写し cDNA を得た。Kapa SYBR Fast qPCR キット (Kapa Biosystems, Woburn, MA) を使用して、ABI7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) で解析を行った。PCR は 94 °C 5 分 (Initial denaturation) の後、40 サイクルの 94 °C 30 秒 (denaturation)、60 °C 30 秒 (annealing, extension) の反応条件で行った。使用したプライマーは Table 1 の通りである。

Table 1. Primers used in this study.

Target mRNA	Forward primer	Reverse primer
CCL17	TGAGGTCACCTTCAGATGCTGC	ACCAATCTGATGGCCTTCTTC
CCL22	TCTGATGCAGGTCCCTATGGT	TTATGGAGTAGCTTCTTCAC
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

それぞれの mRNA 発現は 2^{- Δ Ct} 法を用いて GAPDH mRNA で標準化し定量した。

8. 免疫染色

筋肉サンプルを解剖し、1% PFA 含有 PBS で一晩固定し、20% スクロース含有 PBS で洗浄し、OCT compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) に包埋し、凍結した。切片を薄切し、PBS で再水和し、2% BSA、1% donkey 血清含有の PBS でブロックした。次に、切片を rabbit anti-CCL22 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) とともに 4 °C で一晩インキュベートした。洗浄後、切片を Alexa Fluor 555 標識 donkey anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific) で 1 時間インキュベートし、FITC 標識 anti-CD11b (M1 / 70; BioLegend) および APC 標識 anti-CD11c (N418 ; BioLegend) で一晩インキュベートした。その後、DAPI (Dojindo, Kumamoto, Japan) を添加し 1 時間インキュベートした。最後に、切片を ProLong Gold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific) でマウントし、スペクトル共焦点レーザー走査顕微鏡 (C1si; Nikon) で観察した。

9. OVA 特異的 T 細胞応答

単離した細胞を complete medium で懸濁し、 1.0×10^6 cells/well で 24 well plate に播種した。OVA 特異的 CTL 応答を解析するために OVA peptide (1 μ g/ml) で 1 日培養した。さらに、OVA 特異的ヘルパー T 細胞応答を解析するために OVA (1 mg/ml) で 2 日培養した。培養後、それぞれ回収し、フローサイトメトリーにて解析を行った。

10. 腫瘍細胞の投与方法および腫瘍径の測定方法

最終免疫の 1 週間後に E.G7-OVA 細胞を 1.0×10^6 cells/50 μ L で皮内に摂取した。経日的に腫瘍の長径および短径を測り、半楕円の体積公式 (長径 \times 短径² \times 0.5236) に当てはめ算出した。なお、腫瘍長径が 20 mm を超えたマウスは安楽死させた。

11. 統計処理

得られた実験値は、平均値 \pm 標準誤差で示した。統計的有意性の判定には、2 群間の場合は Student-t 検定を用い、多群間の場合は分散分析を行った後、Tukey-Kramer 法により検定した。P < 0.05、P < 0.01 で有意差ありとした。

II. 実験結果

1. CCR4 欠損マウスにおける抗原特異的な抗体価の誘導および Treg の集積

ワクチンの投与経路は様々であり、それぞれ特有の免疫反応を引き起こすことが知られている。そして、それぞれの投与経路における免疫誘導機構において、Treg の免疫抑制における CCR4 の寄与は全く不明である。そのため、CCR4 欠損マウスを用いて、様々な経路で抗原投与を行うことで、どの投与経路において最も強く抗原特異的な抗体価の誘導が認められるのか検討を行った。さらに、Treg の集積抑制が免疫誘導の場であるリンパ節で行われるのか、もしくは投与部位である組織で行われるのか解析した。

OVA の皮内、皮下、経鼻および筋肉内投与を 2 週間隔で二回行い、最終投与の 2 週間後に OVA 特異的な抗体価を解析した。OVA 特異的 IgG、IgG1 および IgG2a いずれにおいても CCR4 欠損マウスの筋肉内投与において抗体価の上昇が認められた (Fig. 1A)。

抗体価の上昇が認められた筋肉内投与において、抗原投与部位である筋肉組織ならびに抗原特異的免疫誘導の場である所属リンパ節における Treg の割合を解析したところ、リンパ節では変化が見られなかったものの、CCR4 欠損マウスの筋肉組織において OVA の投与 6 時間後の Treg の集積抑制が認められた (Fig. 1B)。また、筋肉組織に集積した Treg が CCR4 を発現していることも認められた (Fig. 1C)。

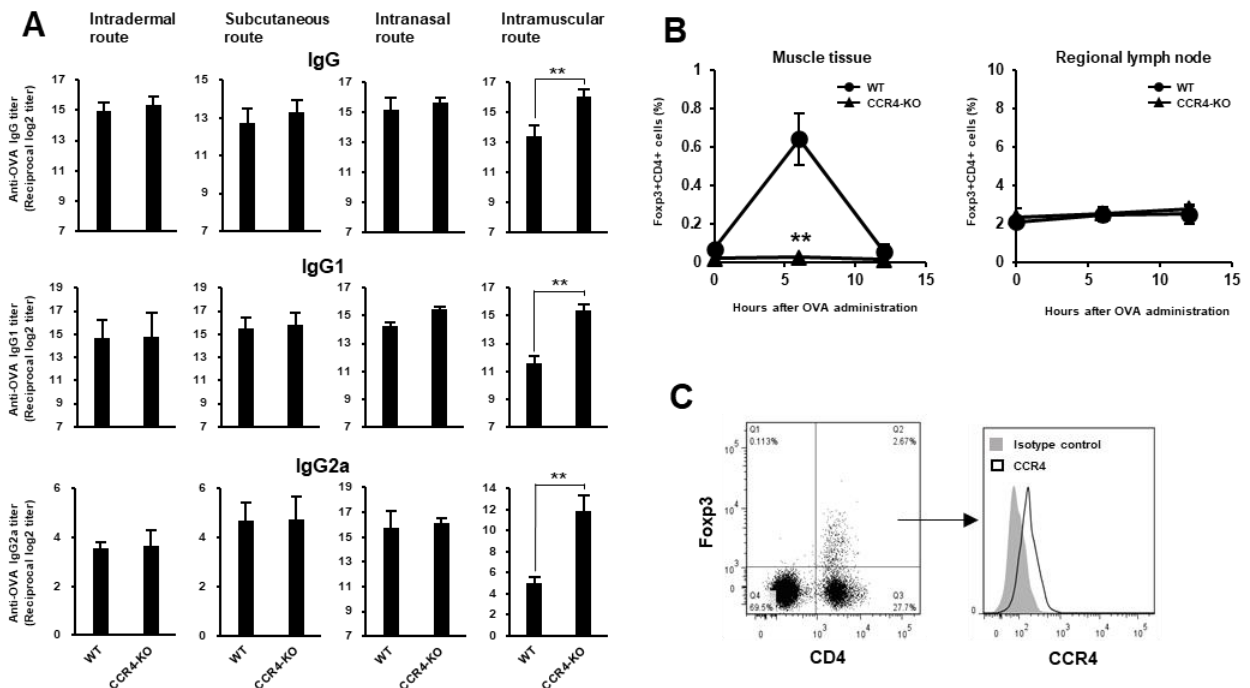


Fig. 1 The impact of CCR4-deficiency on Treg cell recruitment to the muscle tissue.

BALB/c WT or CCR4-deficient mice were immunized intramuscularly with OVA twice at one-week intervals. (A) OVA-specific IgG responses. OVA-specific IgG, IgG1, and IgG2a titers were measured by ELISA. (B) Treg cells in the muscle tissue and the regional lymph node. Foxp3⁺CD4⁺ Treg cells were analyzed by flow cytometry. (C) CCR4 expression on Foxp3⁺CD4⁺ Treg cells in the muscle tissue. CCR4 expression was analyzed by flow cytometry. The data are expressed as mean ± SE of results from six mice. **p < 0.01.

2. 筋肉組織における CCR4 リガンド発現細胞の解析

CCR4 のリガンドは CCL17 と CCL22 である。そこで、抗原を筋肉内投与した場合の筋肉組織における CCL17 と CCL22 の発現を解析した。Real-time PCR により筋肉組織における CCR4 リガンドの発現を解析したところ、CCL17 の発現は変化が見られなかったが、OVA 投与 6 時間後において CCL22 の発現上昇が認められた (Fig. 2A)。そこで、筋肉組織における CCL22 の発現細胞の解析を試みた。CCL22 発現細胞として DC およびマクロファージの存在が知られている [30]。そこで、OVA 投与 6 時間後における DC およびマクロファージの CCL22 の発現を免疫染色にて解析したところ、CD11b で表わされるマクロファージが CCL22 を発現していることが認められた。また、CD11c で表わされる DC において、CCL22 の発現は認められなかった (Fig. 2B)。

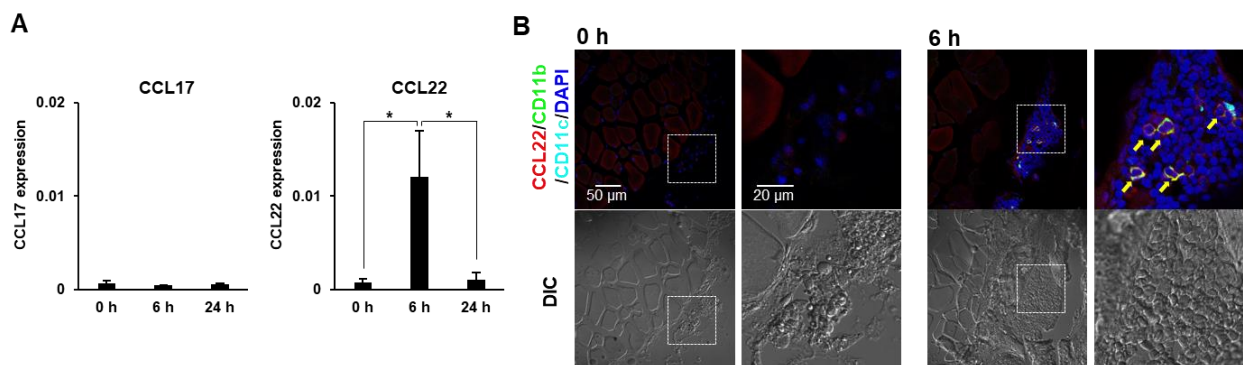


Fig. 2 Induction of CCL22 expression in the muscle tissue.

(A) The expression levels of CCL17 and CCL22 mRNAs in the muscle tissue were examined by real-time PCR. The data are expressed as mean ± SE of results from four mice. *p < 0.05. (B) The frozen skin sections were double stained for CCL22 (red), CD11c (cyan), and CD11b (green), DAPI (blue). The yellow arrowhead indicates co-localization of CCL22 and CD11b. Representative results from at least three independent experiments are shown.

3. CCR4 欠損マウスにおける DC の活性化マーカーの発現と所属リンパ節への遊走解析

CCR4 欠損によって抗原投与後の筋肉組織への Treg の集積が阻害されることを明らかにした。

Treg の筋肉組織における免疫抑制機構として、免疫誘導の初期段階となる、DC の活性化を抑制してい

る報告がある[24, 25]。そのため、筋肉組織における DC の CD40 や CD86 などの活性化マーカーの発現を解析した。また、活性化した DC はリンパ節ホーミングに関わる CCR7 を発現し、免疫誘導の場であるリンパ節へと遊走することが知られる。そこで筋肉組織における DC の CCR7 の発現、ならびにリンパ節中へと遊走した DC の割合も経時的に解析した。OVA 投与 12 時間後の筋肉組織における DC の活性化マーカーの発現および CCR7 の発現を解析したところ、OVA を投与した CCR4 欠損マウスの DC において CD40、CD86 および CCR7 の発現上昇が認められた (Fig. 3A)。さらに、抗原を取り込んだ DC のリンパ節への遊走割合を解析したところ、OVA 投与後 24 時間および 48 時間において、CCR4 欠損マウスのリンパ節へと遊走した DC の割合が上昇した (Fig. 3B)。

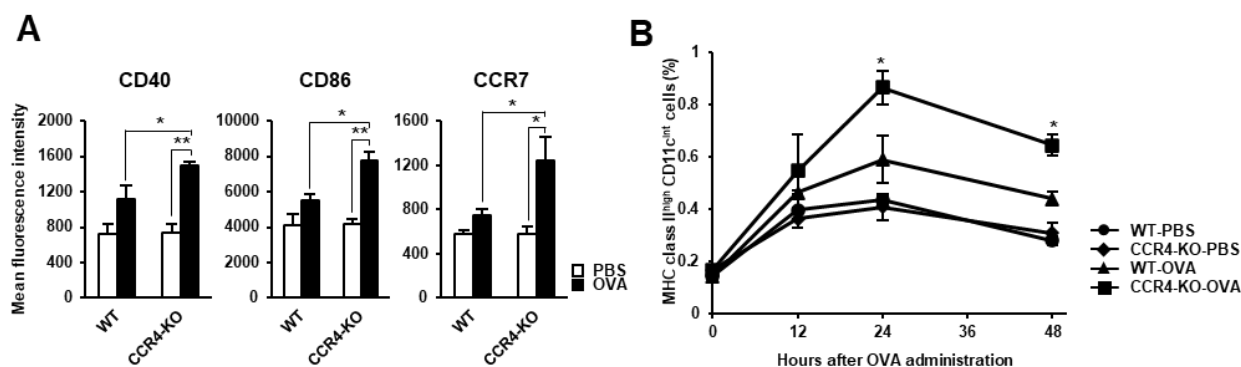


Fig. 3 Enhanced DC activation and their migration to the regional lymph node in CCR4-deficient mice. BALB/c WT or CCR4-deficient mice were immunized intramuscularly with Alexa Fluor 488-conjugated OVA (1 μ g). Twelve hour later, cells were isolated from the muscle tissue and 12, 24, or 48 h later, cells were isolated from the regional lymph node. (A) The surface expression of CD40, CD86, and CCR7 on OVA loaded CD11c⁺ DCs at 12 h after the OVA injection were analyzed by flow cytometry. (B) The percentage of migratory DCs (MHC class II^{high} CD11c^{int} DCs) in the regional lymph node was analyzed by flow cytometry. The data are expressed as mean \pm SE of results from six mice. *p < 0.05. **p < 0.01.

4. CCR4 阻害剤によるアジュバント効果とメカニズム解析

これまでの CCR4 欠損マウスを用いた結果から、CCR4 欠損マウスの筋肉組織に OVA を投与することで、WT マウスと比べて筋肉組織における Treg の集積が抑制され、DC の活性化を促し、抗体価の上昇が引き起こされることが示唆された。そのため、CCR4 阻害剤を投与することで、同様の結果が引き起こされるか解析を行った。なお、CCR4 の阻害剤には compound 22 を使用した。そして、OVA およ

び OVA + compound 22 を筋肉内投与し、各種解析を行った。まず、Treg の集積を解析したところ、compound 22 の併用投与によって、筋肉組織における Treg の集積が投与 6 時間後において減少した。また、所属リンパ節における Treg の集積に変化は見られなかった (Fig. 4A)。筋肉組織の DC における活性化マーカーの発現や CCR7 の発現について解析したところ、compound 22 の併用投与において、CD40 の発現上昇傾向や CD86 および CCR7 の発現上昇が認められた (Fig. 4B)。そして、所属リンパ節へと遊走した DC の割合を解析したところ、compound 22 の併用投与後 24 時間および 48 時間において、リンパ節へと遊走した DC の割合が上昇した (Fig. 4C)。

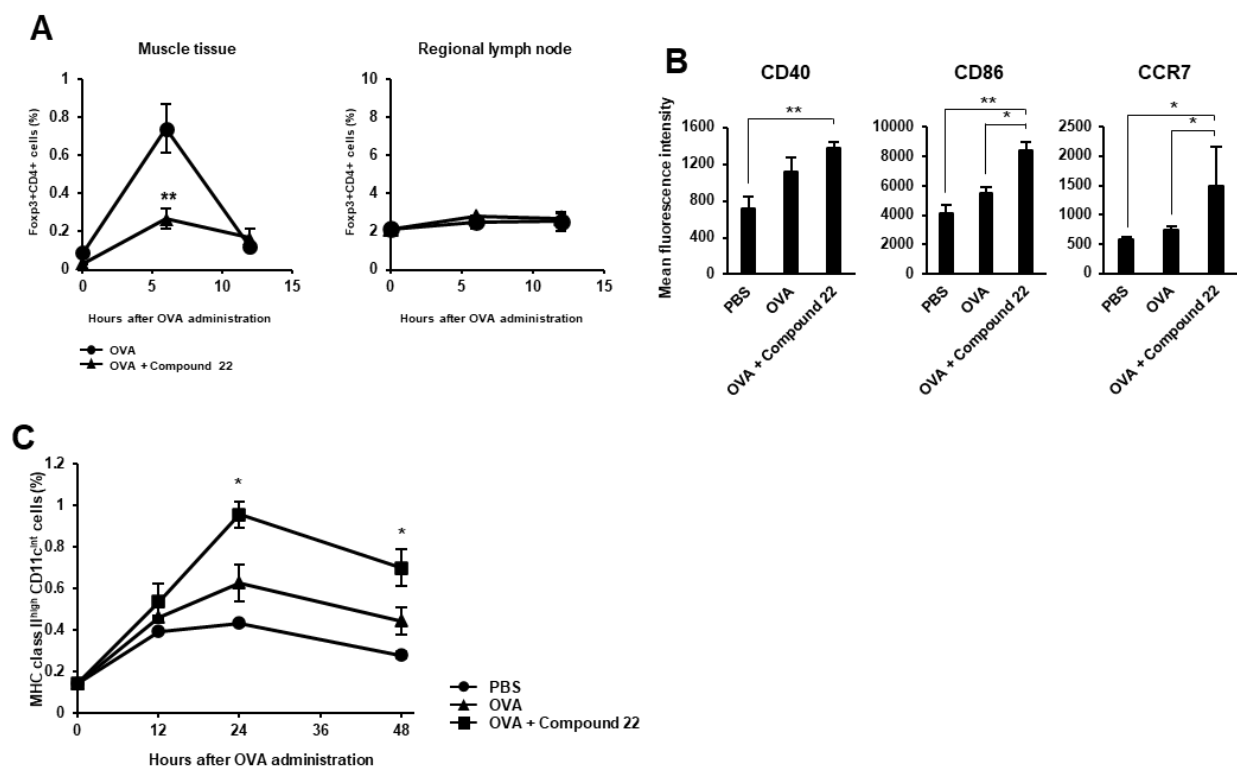


Fig. 4 Compound 22 inhibits Treg cell recruitment to the muscle tissue.

BALB/c mice were immunized intramuscularly with OVA (1 μ g) alone or OVA (1 μ g) and Compound 22 (0.2 μ g). 6 or 12 h later, cells were isolated from the muscle tissue and 12, 24, or 48 h later, cells were isolated from the regional lymph node. (A) Treg cells in the muscle tissue and the regional lymph node. Foxp3⁺CD4⁺ Treg cells were analyzed by flow cytometry. (B) The surface expression of CD40, CD86, and CCR7 on OVA loaded CD11c⁺ DCs at 12 h after the OVA injection were analyzed by flow cytometry. (C) The percentage of migratory DCs (MHC class II^{high} CD11c^{int} DCs) in the regional lymph node was analyzed by flow cytometry. The data are expressed as mean \pm SE of results from six mice. *p < 0.05. **p < 0.01.

次に、compound 22 のワクチンアジュバントとしての効果を解析するために、ワクチンの効果に重要な各種解析を行った。まず compound 22 の併用投与においても抗原特異的な抗体価が上昇するか解析した。compound 22 の併用投与を 2 週間隔で二回行い、最終投与から 2 週目に血清を回収し、各種抗体価を測定した結果、compound 22 の併用投与によって OVA 特異的な IgG、IgG1 および IgG2a の上昇が認められた (Fig. 5A)。さらに、compound 22 の併用投与において、抗原特異的な T 細胞が誘導されるか解析した。その結果、compound 22 の併用投与で Th2 細胞、Th1 細胞および CTL の上昇が認められた (Fig. 5B)。そして、compound 22 の併用投与において抗腫瘍効果が認められるか解析した。compound 22 の併用投与を 1 週間隔で二回行い、最終投与の 7 日後に E.G7-OVA 腫瘍細胞を皮内接種し、経日的に腫瘍体積の解析を行った結果、compound 22 の併用投与で抗腫瘍効果が認められた (Fig. 5C)。

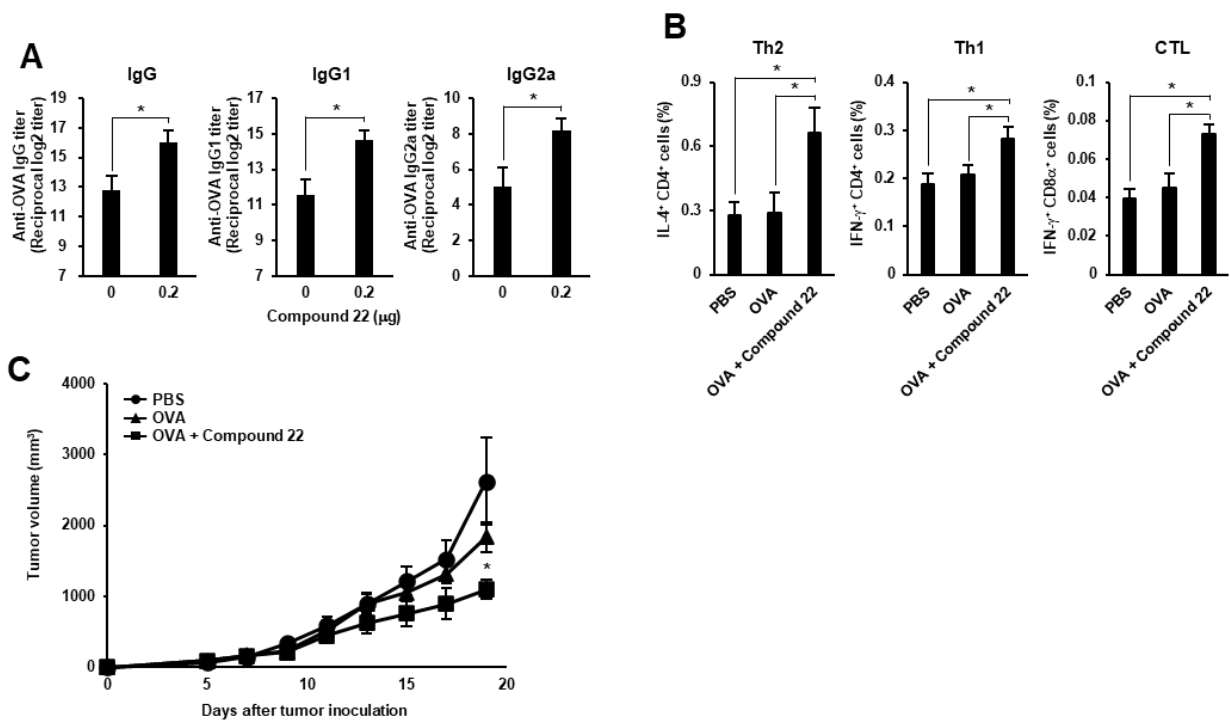


Fig. 5 The effect of Compound 22 as a vaccine adjuvant.

BALB/c and C57BL/6 mice were immunized intramuscularly with OVA (1 μg) alone or OVA (1 μg) and Compound 22 (0.2 μg) twice at one-week intervals. (A) OVA-specific IgG responses. OVA-specific IgG, IgG1, and IgG2a titers were measured by ELISA. (B) OVA-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses. Seven days after the final immunization, splenocytes (2×10^6 cells/mL) were activated with OVA (1 mg/mL), and the expression of IL-4 and IFN-γ was analyzed by flow cytometry. (C) Antitumor effect in a murine tumor model. C57BL/6 mice were immunized intramuscularly with OVA (1 μg) alone or OVA (1 μg) and Compound 22 (0.2 μg) twice at one-week intervals. One week after the final immunization, these mice were challenged with E.G7-OVA cells in the flank; then the tumor volume was calculated after measuring the major and minor axes of the tumor at indicated points. The data are expressed as mean ± SE of results from six mice (A, C) or eight mice (B). *p < 0.05.

III. 考察および小括

本章において、筋肉内投与ワクチンにおいて CCR4 は免疫抑制に寄与することを明らかにし、そのメカニズムは、抗原投与部位への Treg の集積による DC の活性化阻害によるものであることを示した。一方で、皮内、皮下および経鼻投与では CCR4 欠損マウスにおける抗体価の上昇がなかった。これに関しては、組織特異性が関与していると考えられる。免疫細胞の遊走には組織特異性があり、それを制御しているのがケモカインと細胞接着因子であることが知られている。粘膜免疫である経鼻投与においてはケモカインである CCR9 と、インテグリンである $\alpha 4\beta 7$ が重要である。また、皮内や皮下投与においては接着分子である cutaneous lymphocyte antigen (CLA) とケモカインである CCR4 および CCR10 が遊走に関わることが知られている[22, 23]。しかし、CCR4 や CCR10 の単独の欠損では皮膚における遊走にほとんど変化が見られなかったが、CCR4 と CCR10 をどちらも欠損させることでドミナントに皮膚への遊走が抑制されることが報告されている[31]。そのため、皮膚の Treg の集積に関しては CCR10 が働いていたと考えられる。そして、筋肉組織における組織特異性はこれまでほとんど明らかとなっていない。そのため、今回の結果は筋肉組織の組織特異性には CCR4 が関与していることを示唆している。

また、CCR4 を発現している細胞は Treg だけではない。他にも Th2 細胞、Th17 細胞、Th22 細胞などにおいて CCR4 の発現が知られている[22, 23]。Th2 細胞は抗体価の上昇に関与していることが知られているが本研究において、Th2 細胞の CCR4 を阻害することによる抗体価の減少は認められなかった。Th2 細胞は CCR4 だけでなく、CCR3 および CCR8 を発現することが知られているため、CCR4 ではない他の受容体が働いている可能性が考えられる。さらに、naïve CD4+ T 細胞には CCR4 は発現していないことから、CCR4 の阻害は液性免疫の初期には関与せず、ワクチン投与前から存在する内在性の Treg のみが関与した可能性も考えられる。また、抗体の誘導には Th2 細胞だけでなく Tfh 細胞も優れていることが知られている[32]。Tfh 細胞は CCR4 を発現していないことが報告されているため、CCR4 を阻害することによる直接的な影響はないと考えられる。そして、他の Th 細胞サブセットと同様で、CCR4 阻害剤の投与により DC のリンパ節への遊走が促進され、Tfh 細胞の誘導が向上することで抗体価が上昇したと考えられる。

DCの活性化マーカーはT細胞との抗原提示に重要であることが知られている。さらに、DCにおけるCCR7の発現は活性化したDCのリンパ節への遊走に重要となっている[33]。本研究においてDCの活性化マーカーであるCD40およびCD86、さらにCCR7の発現が低下することが示された。これまでの報告でDCの活性化マーカーであるCD40およびCD86の発現はTregインタラクションにより低下することが知られている[25]。しかし、CCR7の発現に関してはほとんど報告がない。そのため、TregがDCのCCR7の発現を低下させたメカニズムに関しては不明であり、今後解明する必要があると考えられる。

CCR4の阻害剤はアジュバントとして使用できる報告は他にもあり、それらはメカニズムがわかっていない。また、メカニズムを明らかにしている論文も存在しているが、その論文で使用されているCCR4阻害剤であるAF-399/42018025はリンパ節中におけるTregの遊走を阻害することにより、ワクチンの効果を増強している[26]。本研究においてはTregの集積は投与部位において抑制されており、異なるデータとなっている。この違いに関して詳細な理由は不明であるが、AF-399/42018025はCCR4ではない他のケモカイン受容体との相互作用を解析していない。それに比べて、我々が使用したCompound 22は他のケモカイン受容体には作用せず、CCR4特異的な阻害活性を示すことを明らかにしている。さらに、CCR4の欠損マウスを用いて投与部位である筋肉組織においてTregの集積が抑制されていることを明らかとしている。これらのことから、Tregのリンパ節における遊走阻害よりも投与部位における遊走阻害が重要であると考えている。

これらのことから、CCR4阻害剤を筋肉組織に投与することで、筋肉組織におけるTregの集積を抑制し、DCの活性化促進やリンパ節への遊走促進を介して、Th細胞やCTL誘導を引き起こし、抗体価の誘導や抗腫瘍効果の上昇を引き起こすことを明らかとした。これらの知見はCCR4阻害剤がTregを制御することで免疫反応を上昇するアジュバントとして期待できることを明らかにしたものである。

第二章 P2 受容体アゴニストを用いた Th17 細胞を介した

CTL 誘導ワクチンアジュバント

近年、IFN- γ を産生する Th1 細胞および IL-4 を産生する Th2 細胞とは異なる、新しい Th 細胞サブセットとして、IL-17 を産生する Th17 細胞が発見された[34, 35]。Th17 細胞は IL-6 や transforming growth factor (TGF)- β などのサイトカイン刺激により、naïve CD4+ T 細胞から分化誘導され、IL-17 の他にも IL-17F, IL-22 を産生している[36-38]。Th17 細胞はこれらのサイトカインにより、抗菌ペプチドの産生誘導、好中球の活性化や遊走を促進することで真菌や病原細菌の感染を防御する機能を持つ[12-14]。また最近では、Th17 細胞が IL-2 を介して CTL を誘導するという報告がある[39]。我々の研究においてもメラノーマの排除に Th17 細胞を介した CTL 誘導が重要な役割を果たすことを明らかとしている[40]。また、肺転移がんにおいて Th17 細胞の移入により、CTL の誘導が促され、がんの増殖を抑制することも報告されている[41]。そのため、Th17 細胞を介した CTL 誘導を行うワクチンアジュバントの開発は可能であると考えた。

Th17 細胞は粘膜組織に多く存在することが知られている。そのため、Th17 細胞を介したワクチンアジュバントの投与経路として粘膜組織への投与を考えた。粘膜免疫は呼吸器や消化器, 泌尿, 生殖器のような粘膜で覆われた組織における免疫システムであり、生体の恒常性を維持する上で重要な役割を果たしている。粘膜免疫において重要な役割を担うのが粘膜関連リンパ組織 (MALT) である[42]。MALT の上皮層には M 細胞と呼ばれる抗原取り込みに特化した細胞が存在しており、その直下のマクロファージや DC などの抗原提示細胞が抗原の貪食を行う[42, 43]。これらの抗原提示細胞はその周囲に存在するナイーブ T 細胞に抗原を提示し、抗原に対する免疫を誘導している。粘膜免疫においては、MALT だけでなく粘膜固有層に存在する DC も関与する。粘膜固有層に存在する DC にはいくつかのサブセットがあり、中でも CD11b⁺, CD11c^{hi}, TLR5⁺ DC と CD70⁺, CD11b^{hi}, CD11c^{low} DC はそれぞれ TLR5 および adenosine triphosphate (ATP) の受容体である purinergic 2 (P2) 受容体を介して Th17 細胞を誘導することが報告されている[44, 45]。CD70⁺, CD11b^{hi}, CD11c^{low} DC は他の DC と比べて P2 受容体の発現量が高く、腸管内において細菌が産生する ATP 刺激により活性化し、IL-6 や TGF- β を産生することで Th17 細胞を誘導していると考えられている[44]。

そこで、粘膜に常在する CD70⁺, CD11b^{hi}, CD11c^{low} DC を P2 受容体アゴニストで活性化させることで、Th17 細胞を誘導し、Th17 細胞依存的な CTL 誘導アジュバントの開発を試みた。

I. 実験方法

1. 実験動物

C57BL/6 マウス (7-10 週齢、雌) は清水実験材料から購入した。実験動物には固形飼料および水道水を摂取させ、約 24°C で 12 時間の明暗サイクルに保持された SPF 環境下の部屋で飼育した。なお、動物実験に関しては研究計画を近畿大学動物実験委員会に申請し、承認を得たうえで近畿大学実験動物規定に基づいて行った。

2. 細胞の単離

マウスの鼻粘膜固有層を摘出し、RPMI-1640 溶液に 1.0 mg/ml のコラゲナーゼ D (Sigma-Aldrich Inc.) を加えた溶液内ですりつぶし、37°C で 30 分間振とうしながらインキュベート。PBS を 15 ml まで添加し 40 µm Cell Strainer を通した後、1,500 rpm で 7 分間遠心を行い上清除去。塩化アンモニウム溶血剤 2 ml で懸濁し氷上で 5 min インキュベート後、PBS を 10 ml 添加し 1,500 rpm で 7 分間遠心を行い上清除去することで単細胞を得た。マウスの頸部リンパ節を摘出し、PBS 内ですりつぶした後、40 µm Cell Strainer に通すことで単細胞を得た。マウスの脾臓を摘出し、PBS 内ですりつぶした後、40 µm Cell Strainer に通し、1,500 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。塩化アンモニウム溶血剤 5 ml で懸濁し氷上で 5 分間インキュベート後、PBS を 10 ml 添加し 1,500 rpm で 5 分間遠心を行い上清除去することで単細胞を得た。

3. フローサイトメトリー

第一章に記した方法で行った。

使用した細胞外染色抗体

FITC 標識 anti-mouse CD4 (clone; GK1.5)、APC/cy7 標識 anti-mouse CD4 (clone GK1.5)、PE 標識 anti-mouse CD11c (clone; N418)、PE/cy7 標識 anti-mouse CD8α (clone; 53-6.7)、PerCP/cy5.5 標識 anti-mouse CD45 (clone; 30-F11)、Biotin 標識 anti-mouse CD70 (clone; FR70) および APC 標識 streptavidin は BioLegend より購入した。

使用した細胞内染色抗体

APC 標識 anti-mouse IFN- γ (clone; XMG1.2)、AlexaFluor488 標識 anti-mouse IL-4 (clone 11B11) および PE 標識 anti-mouse IL-17A (clone; TC11-18H10.1) は BioLegend より購入した。

4. Real-time PCR

第一章に記した方法で行った。使用したプライマーは Table 2 の通りである。

Table 2. Primers used in this study.

Target mRNA	Forward primer	Reverse primer
P2X1R	ACGAAACAAGAAGGTGGGAGT	AGGCCACTTGAGGTCTGGTAT
P2X2R	GAGAGCTCCATCATCACAAA	CAGGGTCTGGGAAGGAGTAAC
P2X3R	CCGAGAACTTCACCATTTTCA	TTTATGTCCTTGTCGGTGAGG
P2X4R	TGGCTACAATTCAGGTTTGC	GATCATGGTTGGGATGATGTC
IL-6	CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT	AAGTAGGGAAGGCCGTGGTT
integrin- β 8	ACAGCATCGCATGGACCAA	AAGCAACCCGATCAAGAATGTG
integrin- α V	CGCCTATCTTCGGGAATGAATC	CCAACCGATACTCCATGAAAATG
IL-4	CAGCTAGTTGTCATCCTGGTCTTC	GCCGATGATGTCTCTCAAGTGA
IL-17A	CAGCAGCGATCATCCCTCAAAG	CAGGACCAGGATCTCTTGCTG
IFN- γ	GGAGGAACTGGCAAAGGATGG	GGTGGACCACTGGGATGAGC
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

5. CD4⁺T 細胞および DC の単離方法

CD4⁺T 細胞に関して、脾臓から細胞を単離し、staining buffer で 2.0×10^7 cells/ml の濃度に細胞数を調整した。その後、anti-mouse CD16/32 を $1 \mu\text{l}/1.0 \times 10^6$ cells で加えて 15 分間インキュベートした。次に、Bionylated Mouse CD4 T lymphocyte Enrichment Cocktail (BD Biosciences) を $5 \mu\text{l}/1.0 \times 10^6$ cells で加えて、氷上で 15 分間インキュベートした。10 倍量の BD IMag buffer で洗浄し、ボルテックスした BD IMAG Streptavidin Particles Plus (BD Biosciences) を $5 \mu\text{l}/1.0 \times 10^6$ cells で加えて 30 分間インキュベートした。BD IMag buffer (BD Biosciences) で 2.0×10^7 cells/ml の濃度に細胞数を調整し、magnet にセットした。8 分後、上清を回収し、もう一度 magnet にセットした。8 分後、上清を回収し、細胞数を調整した。DC に関して、脾臓および鼻粘膜固有層から細胞を単離し、anti-mouse CD45, anti-mouse CD11c, anti-mouse CD70 で細胞外染色を行う。その後、セルソーターFACSAria (BD Biosciences)にて DC 分画を単離した。

6. *In vitro* における細胞培養方法

10% FBS (Sigma-Aldrich Inc.)、2-Me (gibco)、L-Glutamin (gibco)、抗生物質 (gibco) および NEAA (gibco) 含有 RPMI1640 (complete medium) で、CD4⁺T 細胞 (5×10^3 cells/well) と DC (5×10^2 cells/well) を U 底 96well plate に播種した。そして、anti-mouse CD3 および anti-mouse CD28 をそれぞれ 0.5 μ g/ml、 $\alpha\beta$ -ATP を 10 μ M で添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 4 日間培養した。

7. 使用薬物と投与スケジュール

モデル抗原として OVA を使用し、10 mg/ml の濃度になるように PBS で溶解した。 $\alpha\beta$ -ATP (Sigma-Aldrich Inc.) は 50 mg/ml の濃度になるように PBS で溶解した。投与群は下記の 3 群である。

1. PBS (15 μ l) 溶液
2. OVA (10 μ g/15 μ l) 単独溶液
3. OVA (10 μ g) と $\alpha\beta$ -ATP (100 μ g) 混合溶液 (15 μ l)

これを C57BL/6 マウスに対して下記 3 群に鼻腔内投与した。この免疫は 1 週間隔で 3 回行った。

8. OVA 特異的 T 細胞応答

第一章に記した方法で行った。

9. *In vivo* CTL assay

マウスの脾臓から細胞を単離し、細胞数を測定し、 1.0×10^7 cells に調整した Tube A と Tube B を作成した。それぞれ RPMI1640 1 ml で懸濁し、Tube A にのみ OVA peptide (Sigma-Aldrich Inc.) が 10 μ M になるように懸濁し、どちらも 37°C で 1 時間インキュベートする。1,500 rpm で 5 分間遠心を行い上清除去し、PBS で洗浄した。CFSE (eBioscience) を CFSE 10 μ M (CFSE^{high}) と CFSE 1 μ M (CFSE^{low}) の濃度で調整し、CFSE^{high} 1 ml、CFSE^{low} 1 ml をそれぞれ Tube A、Tube B に加え懸濁し、遮光しながら 15 分間インキュベートした。RPMI1640 (20% FBS) を 5 ml 加え、氷上で 5 分間インキュベートした。1,500 rpm で 5 分間遠心を行い上清除去し、PBS で洗浄する。RPMI1640 を Tube A、B にそれぞれ 250 μ l 加え、それらを混ぜ合わせた。調整した細胞 500 μ l を最終免疫の 1 週間後のマウスに静脈注射した。18 時間後、静脈注射したマウスの脾臓から細胞を単離し、PBS で懸濁した。細胞数を調整後、細胞懸濁液を 40 μ m

Cell Strainer に通し、フローサイトメトリー解析に供した。フローサイトメトリー解析結果から OVA 特異的細胞傷害活性を算出した。また、これは静脈注射するマウス一匹分の実験方法である。

OVA 特異的細胞傷害活性算出方法

specific lysis (%) = $100 - ([CFSE^{high} \text{ immunized}/CFSE^{low} \text{ immunized}]/[CFSE^{high} \text{ control}/CFSE^{low} \text{ control}]) \times 100$

10. 腫瘍細胞培養方法および投与方法

第一章に記した方法で行った。

11. P2 受容体阻害剤 Suramin の投与スケジュール

P2 受容体阻害剤である suramin (Sigma-Aldrich Inc.) を PBS に溶解し、300 μg /匹で鼻腔内投与した。投与はワクチン投与 1 時間前に投与した。

12. 統計処理

第一章に記した方法で行った。

II. 実験結果

1. 鼻粘膜固有層における CD70⁺、CD11c^{low} 樹状細胞の同定

粘膜組織特有の CD70⁺ DC が腸管粘膜固有層で検出されているが、未だ鼻粘膜固有層に存在しているという報告はない。そのため、鼻粘膜固有層における CD70⁺ DC の存在を明らかにするため、各種解析を行った。まず、CD70⁺ DC が鼻粘膜固有層に存在しているかフローサイトメトリーにて解析を行った。また、CD70⁺ DC がほとんど検出できないと報告がある脾臓組織における CD70⁺ DC の解析も同時に行った[44]。その結果、CD70⁺ DC は鼻粘膜固有層でのみ検出することができ、従来の報告通り脾臓中では検出されなかった (Fig. 6A)。また、CD70⁺ DC はいくつかの P2 受容体を他の DC と比べて多く発現していることが報告されている。中でも P2X 受容体が Th17 細胞の誘導に関与していると考えられている。そのため、鼻粘膜固有層より単離した CD70⁺ DC における P2X_{1,2,3,4} 受容体の発現を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、P2X_{1, 2, 4} 受容体の発現は CD70⁺ DC でのみ上昇していることが示された。また、P2X₃ 受容体の発現はどの DC においても大きな差は認められなかった (Fig. 6B)。

CD70⁺ DC は Th17 細胞の分化誘導に優れていることが報告されており、Th17 細胞の分化誘導には IL-6 や TGF- β による刺激が必要となる。そのため、単離した CD70⁺ DC に ATP で活性化シグナルを加えることで、これらサイトカインの分泌が上昇するか解析を行った。なお、TGF- β は通常状態は不活性化状態であり、インテグリンの働きによって活性化状態となることから、TGF- β の活性化を促すインテグリンの発現を解析した。また、通常の ATP はエクトヌクレオチダーゼによる加水分解を受けてしまうため、加水分解抵抗性の ATP ($\alpha\beta$ -ATP) をアジュバントとして使用した[46, 47]。CD70⁻ DC では、 $\alpha\beta$ -ATP の添加によって IL-6 やインテグリンの発現上昇は見られなかったが、 $\alpha\beta$ -ATP の刺激を加えた CD70⁺ DC においてのみ IL-6 やインテグリンの発現が上昇した (Fig. 6C)。

続いて、CD4⁺ T 細胞と共培養を行うことで、実際に Th17 細胞が誘導されるか解析を行った。CD70⁻ DC との共培養系では IL-17A の発現に差が見られなかったものの、 $\alpha\beta$ -ATP の刺激を加えた CD70⁺ DC との共培養系においてのみ IL-17A の発現が上昇した。なお、IFN- γ においてはどちらの反応系においても差が見られなかったが、IL-4 においてはどちらの反応系においても発現上昇が認められた (Fig. 6D)。

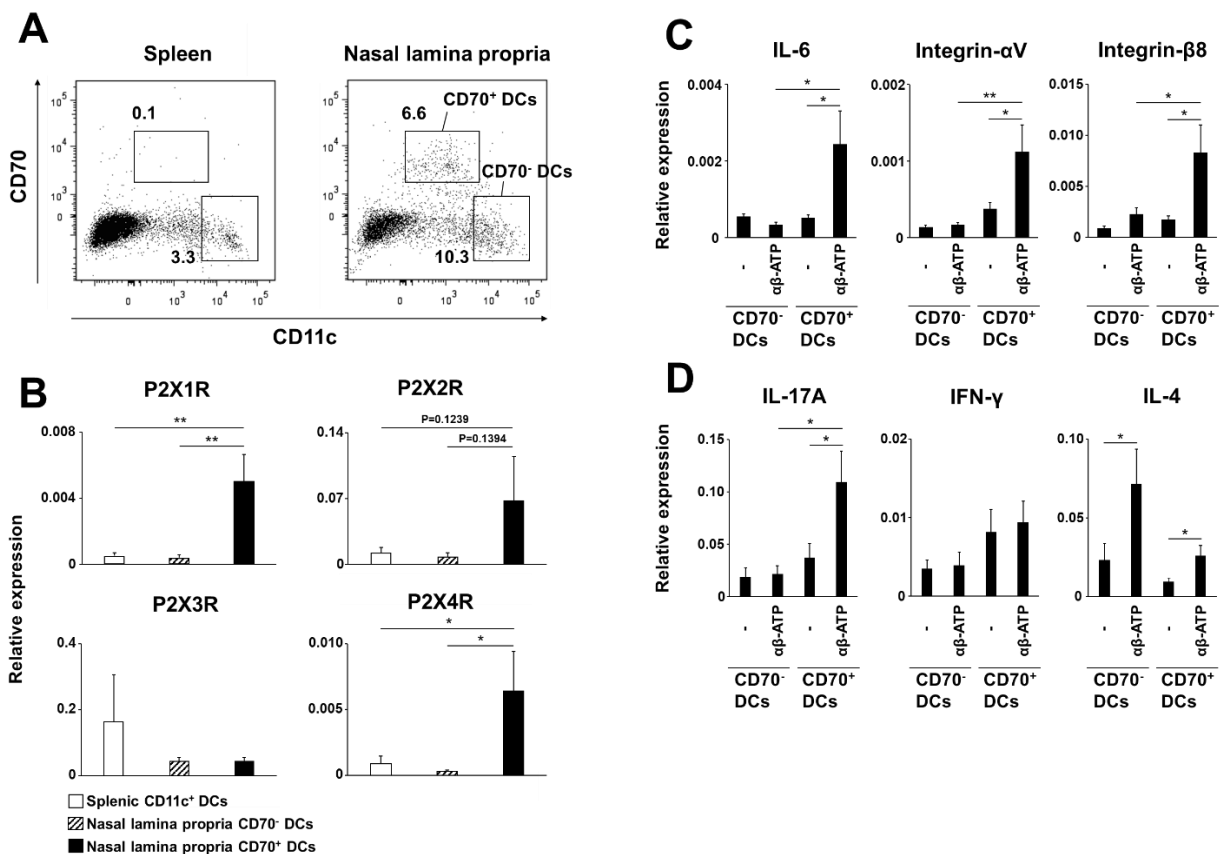


Fig. 6 Identification of CD70⁺CD11c^{low} dendritic cells in nasal lamina propria.

(A) Flow cytometry. Cells were isolated from the spleen and the nasal lamina propria of C57BL/6 mice. CD70⁺CD11c^{low} DCs in the CD45 gate were analyzed by flow cytometry. Representative results from at least three independent experiments are shown. (B) Real-time PCR. The expression of P2X1, 2, 3 and 4R in splenic CD11c⁺ DCs, nasal lamina propria CD70⁻ DCs and CD70⁺ DCs was examined by real-time PCR. The data are expressed as mean \pm SE of four independent experiments. (C) Induction of IL-6, integrin- α V and integrin- β 8 in CD70⁺CD11c^{low} DCs by $\alpha\beta$ -ATP. CD70⁻CD11c⁺ DCs and CD70⁺CD11c^{low} DCs were isolated from the nasal lamina propria and treated with or without $\alpha\beta$ -ATP (10 μ M) for 3 h. The mRNA expression levels of IL-6, integrin- α V and integrin- β 8 were examined by real-time PCR. The data are expressed as mean \pm SE of four to eight independent experiments. (D) Induction of Th17 cells in vitro. Splenic CD4⁺ T cells were cocultured with nasal lamina propria CD70⁻CD11c⁺ DCs or CD70⁺CD11c^{low} DCs in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies and with or without $\alpha\beta$ -ATP for 4 days. The mRNA expression levels of IL-17A, IL-4, and IFN- γ were examined by real-time PCR. The data are expressed as mean \pm SE of 5–10 independent experiments. *P < 0.05. **P < 0.01.

2. $\alpha\beta$ -ATP 併用投与時における T 細胞の割合

先ほどの結果より、in vitro において鼻粘膜固有層中の CD70⁺ DC が $\alpha\beta$ -ATP の刺激によって Th17 細胞を誘導することが明らかとなった。そこで、 $\alpha\beta$ -ATP をマウスの鼻腔内に投与することで、鼻腔内投与に関連するリンパ組織である頸部リンパ節や、実行組織となる鼻粘膜固有層において Th17 細胞の分

化誘導が上昇するかフローサイトメトリーにて解析した。頸部リンパ節および鼻粘膜固有層において $\alpha\beta$ -ATP 併用群で Th17 細胞の増加が認められ、さらに CTL も上昇することが示された。さらに、頸部リンパ節において $\alpha\beta$ -ATP 併用群で Th2 細胞の上昇が認められた。また、Th1 細胞においてはどの投与群においても差は認められなかった (Fig. 7)。

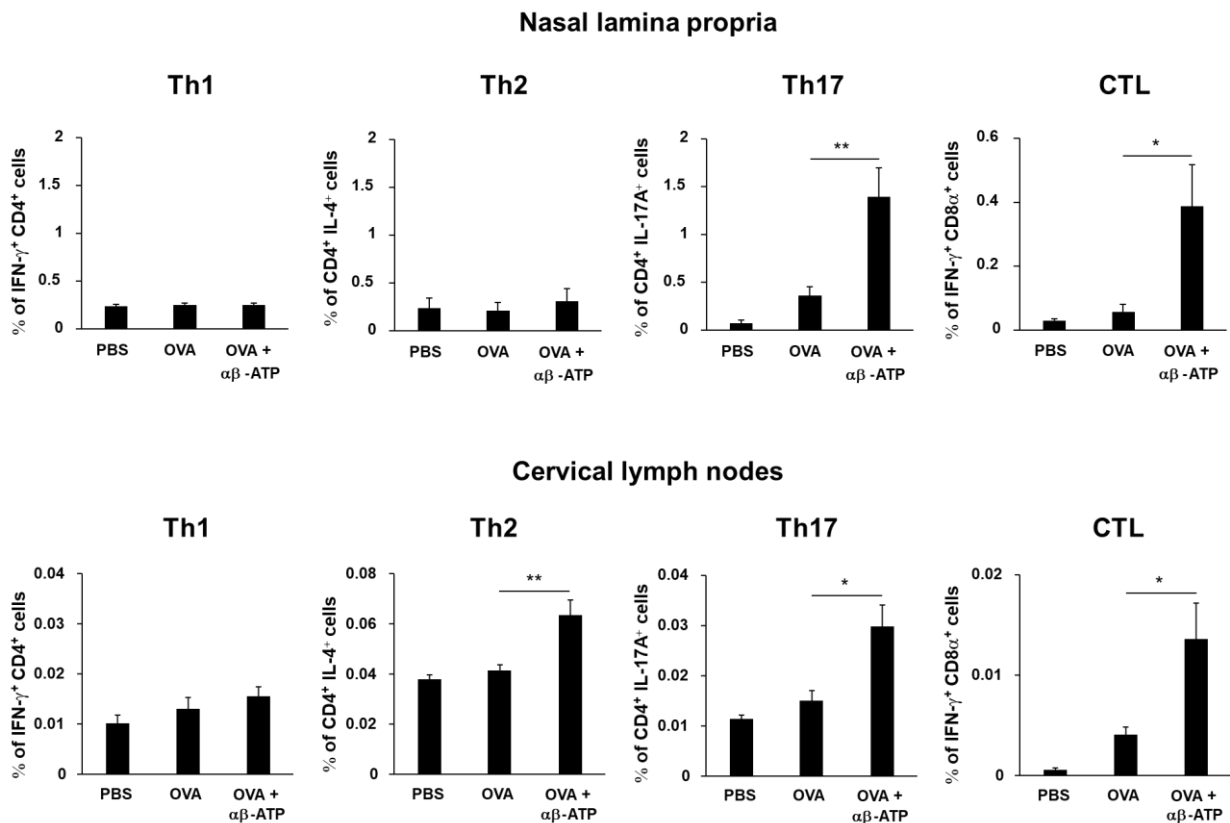


Fig. 7 The percentages of OVA-specific T cells in CLN and Nasal lamina propria.

Induction of OVA-specific Th17 cells and CTLs in vivo. C57BL/6 mice were intranasally immunized with PBS, OVA alone or OVA + $\alpha\beta$ -ATP three times with 1-week intervals. One week after the last immunization, cells were isolated from the nasal lamina propria and cervical lymph nodes. Isolated cells were stimulated with OVA (1 mg/ml) or OVA peptide (1 μ g/ml) for 24 h in vitro. Th17 cells (CD4⁺IL-17⁺ cells), Th1 cells (CD4⁺IFN- γ ⁺ cells), Th2 cells (CD4⁺IL-4⁺ cells) and CTLs (CD8⁺IFN- γ ⁺ cells) were counted by flow cytometry. The data are expressed as mean \pm SE of results from six mice. The data are expressed as mean \pm SE of results from five mice. The data are expressed as mean \pm SE of results from six mice. *P < 0.05. **P < 0.01.

3. $\alpha\beta$ -ATP による抗原特異的抗体の誘導と抗腫瘍効果

第二章, II-2 より $\alpha\beta$ -ATP の併用投与は頸部リンパ節で、抗体の誘導に優れた Th2 細胞を誘導することが示された。抗体の誘導において、Th2 細胞は IgG1 の誘導に優れていることや、Th1 細胞は IgG2c の誘導に優れていることが知られている[48]。そこで、OVA 特異的な IgG1 および IgG2c を解析したと

ころ、 $\alpha\beta$ -ATP 併用群で IgG1 の上昇が認められた。そして、 $\alpha\beta$ -ATP 併用群で Th1 細胞の上昇に相関する IgG2c の上昇は認められなかった (Fig. 8A)。さらに、誘導された CTL に抗原特異的な細胞傷害活性があるか最終免疫の 7 日後に *in vivo* CTL assay を行い、解析を行った。その結果、 $\alpha\beta$ -ATP 併用投与群でのみ、OVA をパルスした細胞の減少が示された。さらに抗原特異的な細胞傷害活性を解析すると、 $\alpha\beta$ -ATP 併用群でのみ、抗原特異的な細胞傷害活性の上昇が示された (Fig. 8B)。そこで、実際に $\alpha\beta$ -ATP の併用投与により抗腫瘍効果を示すかどうか検討を行った。最終投与の 7 日後に E.G7-OVA 腫瘍細胞を皮内接種し、経日的に腫瘍体積の解析を行った結果、 $\alpha\beta$ -ATP 併用群でのみ腫瘍の増殖抑制効果を示した (Fig. 8C)。

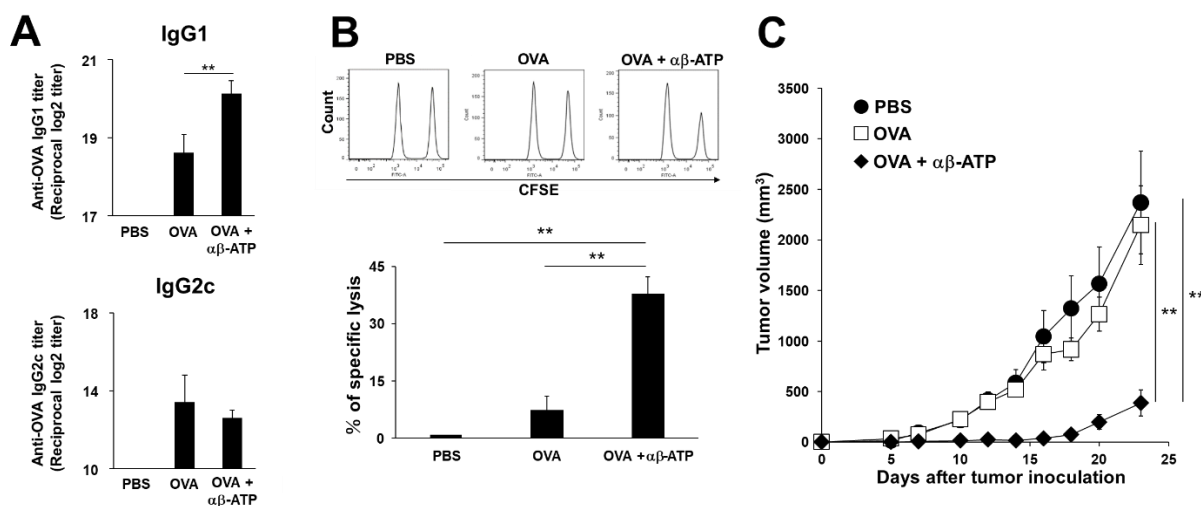


Fig. 8 Effect of $\alpha\beta$ -ATP on OVA-specific antibody and antitumor effect.

(A) Serum IgG1 and IgG2c. OVA-specific IgG1 and IgG2c titers were measured by ELISA. (B) *In vivo* CTL assay. Mice were immunized as mentioned above. One week after the immunization, these mice were intravenously injected with OVA257–264-pulsed CFSE^{high} splenocytes (antigen-positive target), and non-pulsed CFSE^{low} splenocytes (negative control). After 16 h, CFSE-labeled target cells in the spleen were analyzed by flow cytometry. The data are expressed as mean \pm SE of results from five mice. (C) Antitumor effect: mice were immunized as mentioned above. One week or 8 weeks after the immunization, mice were challenged with E.G7-OVA cells in the flank. The tumor volume was calculated by measuring the major and minor axes of the tumor at indicated time points. The data are expressed as mean \pm SE of results from six mice. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

4. P2 受容体阻害剤を用いた T 細胞誘導阻害効果や抗腫瘍効果減弱の解析

これまでの結果より、 $\alpha\beta$ -ATP は抗原特異的な CTL を誘導し、抗腫瘍効果を示した。そこで、この効果が $\alpha\beta$ -ATP による P2 受容体刺激を介したものであるかを解析するため、P2 受容体阻害剤である suramin[49]を $\alpha\beta$ -ATP 投与 1 時間前に投与し、各種解析を行った。まず、T 細胞の割合に関して解析し

た。αβ-ATP 投与で頸部リンパ節や鼻粘膜固有層において上昇が認められた Th17 細胞と CTL の割合は suramin の前投与により著しく減少することが示された。また、頸部リンパ節において上昇が認められた Th2 細胞の割合も suramin の投与により減少することが示された (Fig. 9A)。さらに、αβ-ATP 併用群で示された腫瘍の増殖抑制効果が、suramin の併用により減弱することが示された。一方、suramin の併用によって PBS 投与群間および OVA 投与群間における抗腫瘍効果に差は認められなかった (Fig. 9B)。

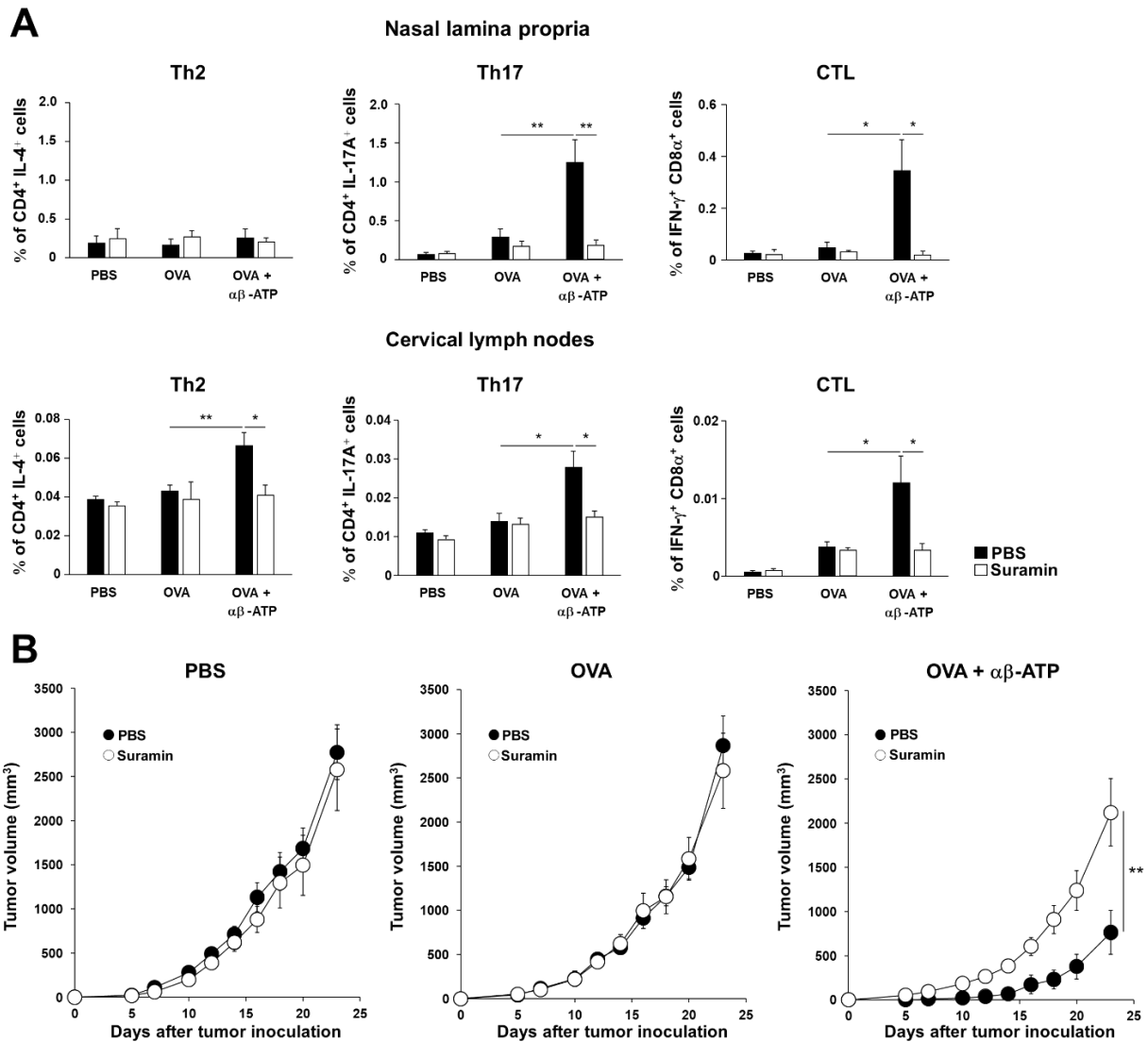


Fig. 9 Inhibition of $\alpha\beta$ -ATP-enhanced CTL responses by suramin, a P2 receptor inhibitor.

(A) Induction of OVA-specific Th17 cells and CTLs in vivo. C57BL/6 mice were intranasally immunized with PBS, OVA alone or OVA + $\alpha\beta$ -ATP in the presence or absence of suramin three times with 1-week intervals. One week after the last immunization, cells were isolated from the nasal lamina propria and cervical lymph nodes. Isolated cells were stimulated with OVA (1 mg/ml) for 48 h or OVA peptide (1 μ g/ml) for 24 h in vitro. Th17 cells (CD4⁺IL-17⁺ cells), Th2 cells (CD4⁺IL-4⁺ cells) and CTLs (CD8⁺IFN- γ ⁺ cells) were counted by flow cytometry. The data are expressed as mean \pm SE of results from six mice. (B) Antitumor effect: Mice were immunized as mentioned above. One week after the last immunization, mice were challenged with E.G7-OVA cells in the flank. The data are expressed as mean \pm SE of results from six mice. *P < 0.05. **P < 0.01.

III. 考察および小括

粘膜組織では様々な DC サブセットが存在する。本章において標的とした CD70⁺, CD11b^{hi}, CD11c^{low} DC は他の DC サブセットと比べて ATP の受容体となる P2 受容体が多く発現しており、腸内細菌の産生する ATP によって Th17 細胞を誘導することが報告されている[44]。本章で得られた結果は、CD70⁺DC が鼻粘膜固有層に存在しており、*in vitro* における CD4⁺ T 細胞との共培養においても $\alpha\beta$ -ATP 添加群で Th17 細胞の指標となる IL-17A の上昇を示した。そして、 $\alpha\beta$ -ATP を併用投与することで、鼻腔内免疫に関連する組織において Th1 細胞ではなく Th17 細胞の上昇やそれに続く CTL 誘導が認められた。さらに、誘導された CTL は抗原特異的な細胞傷害活性を示す細胞であり、OVA を発現している腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果も示した。そして、P2 受容体の阻害剤である suramin 投与によって、 $\alpha\beta$ -ATP 併用投与による抗腫瘍効果の減弱が認められた。そのため、 $\alpha\beta$ -ATP の作用は P2 受容体を介した作用であると考えられる。

粘膜組織特有の Th17 細胞を誘導できる DC サブセットには CD70⁺, CD11b^{hi}, CD11c^{low} DC 以外にも CD11b⁺, CD11c^{hi}, TLR5⁺ DC が存在する[45]。この DC は TLR5 のリガンドとなる flagellin の刺激を受けることで活性化し Th17 細胞の分化誘導を促進している報告はあるが、P2 受容体を介して Th17 細胞を誘導するかは不明である。しかし、TLR3 以外の TLR のシグナル伝達経路にはアダプタータンパク質である MyD88 が関与するが[50]、MyD88-KO マウスに ATP 投与を行うことでも腸内の Th17 細胞が増加することが報告されている。この報告からも CD70⁺, CD11b^{hi}, CD11c^{low} DC が Th17 細胞を誘導していることは確かであると考えられる[44]。この研究においても、P2 受容体阻害剤である suramin 投与により、腫瘍の増殖抑制効果が著しく減弱した。そのため、TLR5⁺ DC ではなく CD70⁺, CD11b^{hi}, CD11c^{low} DC を介した Th17 細胞の分化増殖が促進されたと考えられる。また、 $\alpha\beta$ -ATP の併用投与によって Th2 細胞の誘導も認められた。これは、以前の論文においても、 $\alpha\beta$ -ATP の皮内投与により抗体価の誘導が見られたことから、IL-4 の誘導に関しては粘膜組織に存在する CD70⁺ DC に限らず、他の DC においても誘導されると考えられる[51]。

これまでに Th17 細胞はリンパ腫[52]、骨髄腫[53]、乳がん[54]、結腸がん[55]、胃がん[56, 57]、肝細胞がん[58]、黒色腫[54]、卵巣がん[59, 60]、前立腺がん[61]など、さまざまな種類のヒトの腫瘍に存在することが明らかとなっており、組織によって腫瘍を増殖させる働きや腫瘍を減少させる働きを示す

という、異なる報告が数多くされていた。腫瘍を増殖させる働きでは、IL-17 が腫瘍組織における血管新生や血行性の転移を促進させることが報告されている[58, 62, 63]。腫瘍を減少させる働きとしては CTL や NK 細胞の反応性を向上させることや好中球浸潤を増加させることで腫瘍を排除するとの報告がある[64, 65]。そして、Th17 細胞はパーフォリンやグランザイムを産生しないため直接的に抗腫瘍効果を発揮しないと考えられている[66, 67]。そのため、他の抗腫瘍活性を持つ免疫細胞を誘導することで間接的に抗腫瘍活性を引き起こすと考えられる[68]。また、Th17 細胞の産生する IL-17 はマクロファージを活性化して IL-12 の産生を促進することが報告されており[69]、IL-12 は CTL の産生促進や細胞傷害活性の向上を引き起こすことが知られている[70]。さらに、近年では IL-2 を介して CTL を誘導しているとの報告がされた[39]。今回の $\alpha\beta$ -ATP 投与でも、従来から CTL 誘導を行うことが知られている Th1 細胞は増殖していないが、Th17 細胞の増殖と CTL の上昇が示されたことから、Th17 細胞を介した CTL 誘導が行われたと考えられる。さらに、肺転移がんにおいては Th1 細胞の移入よりも Th17 細胞の移入による CTL 誘導効果や抗腫瘍効果が強いことが報告されている[41]。こういった報告からも、Th1 細胞だけでなく、Th17 細胞を介した CTL 誘導アジュバントの探索や開発を行うことは、がん種や病原体に合わせた治療に活かすことができると考えられる。

免疫系は全身を循環する血液のリンパ球あるいは胸腺や脾臓などを中心とした全身免疫系と腸管をはじめとした粘膜で被膜された臓器で作動している粘膜免疫系に分けることができる。そして、皮下投与などの全身免疫系へのワクチン投与では粘膜免疫系をほとんど誘導することができないが、鼻腔内投与などの粘膜免疫系へのワクチン投与では粘膜免疫系だけでなく全身免疫系も誘導されることが知られている[71, 72]。今回の研究で鼻腔内投与により皮内投与した腫瘍に対する抗腫瘍効果を示すという、全身免疫系での効果を示した。鼻腔内投与により全身免疫系である頸部リンパ節で免疫反応が起こるとい報告があるため[73, 74]、頸部リンパ節で CTL 誘導が行われた結果、抗腫瘍効果を示したのではないかと考えられる。

以上のことから、 $\alpha\beta$ -ATP は CD70⁺ DC の持つ P2R を介した Th17 細胞依存的な CTL 誘導を行う新規ワクチンアジュバントとして有効であると考えられる。

総括

Th 細胞は現在では様々な種類が明らかとなっているが、近年まで Th1 細胞と Th2 細胞の二種類の存在しか知られていなかった。そして、Th1 細胞と Th2 細胞は互いの反応を抑制していることが知られており、これらのバランスの変化が異常な免疫応答を引き起こすという、Th1/Th2 バランス仮説により Th 細胞の関わる疾患の説明が行われてきた[75]。しかしながら近年、新たに Th17 細胞や Treg が同定され、これまで以上に Th 細胞が様々な免疫応答を制御することが明らかになった。本研究は、近年明らかとなった細胞である、Th17 細胞や Treg の機能を利用して免疫増強を行うアジュバントの開発を試みた研究となる。新たな Th 細胞サブセットの同定により、アジュバントとして利用できる Th 細胞サブセットの幅が広がったと考えられる。このような Th 細胞サブセットを制御できるアジュバントを研究することで、これまでにない新たなメカニズムによって免疫増強を達成するワクチンの開発に応用できると考えられる。

現在 CTL 誘導ワクチンアジュバントとして最も研究が進んでいるのが TLR リガンドである。TLR リガンドの中には強い副反応が起きないように改良されたものもあり、いくつかの TLR リガンドで臨床試験が行われた[76-78]。しかし、臨床試験を行っていた 50 個以上の TLR リガンドのほとんどが第三相試験にて効果不十分でドロップアウトしている[8]。このことから TLR リガンド以外のアジュバント候補物質を探すことが重要となる。

従来から知られている Th 細胞である Th1 細胞および Th2 細胞を介したアジュバント活性を持つ研究が進められていた。今回の研究によって Treg の機能を抑制することで免疫活性を向上させるアジュバントや、Th17 細胞を増加させることで CTL の誘導を向上するアジュバントに関する研究を行い、その抗体誘導効果や抗腫瘍効果を提示した。これらは従来の Th1 細胞や Th2 細胞を標的としたアジュバントではなく、これまでにないメカニズムのアジュバントである。そのため、従来のアジュバントとの併用により、相乗効果が得られる可能性が考えられる。こういった作用メカニズムの異なるアジュバントであれば、単一のアジュバントよりも効果が得られることが報告されている[79]。また、アジュバントの投与量を減少させても同等以上の効果が得られ、アジュバントの副反応を減少させることにつながると考えられる。

一方で、Treg や Th17 細胞はそれぞれ自己免疫疾患にも関与している。Treg の反応を抑制すること

により、本来 Treg が抑制していた自己に対する免疫応答が誘導される可能性が考えられる。また、自己免疫疾患に関与する Th17 細胞を誘導することにより、過剰な免疫応答を引き起こす可能性が考えられる。こういった自己免疫疾患が引き起こされる可能性は完全に排除することはできない。しかしながら、ワクチンとして短期的に局所投与を行うことにより、その可能性は低くなると考えている。自己免疫疾患の原因は未だ不明な点が多いが、遺伝的な要因や環境による要因が絡み合い、免疫機能に異常をきたして発症すると考えられている。そして、その要因には感染症による影響が最も多いと考えられている。感染が自己抗原への交差反応性免疫応答を向上してしまう可能性があり、免疫応答の上昇が感染期間中に全身で引き起こされることが原因として考察されている。ワクチンの投与によって免疫応答が上昇するが、その期間は感染症よりも短く、投与部位周辺で局所的に引き起こされるため、自己免疫疾患が発症する可能性は少ないと考えられる。そして、現在使用されているワクチンの投与によって自己免疫疾患が発症した割合は限りなく少ないことが知られている。また、自己免疫疾患を引き起こす感染症はワクチンで防ぐことも可能であり、ワクチン投与により感染症の発症リスクを減少させることで、自己免疫疾患が発症する確率が低くなることも明らかとなっている[80]。

CTL を誘導するアジュバントは感染症だけでなく、がんに対しても使用可能である。現在、免疫チェックポイント分子阻害剤である PD-1 抗体が注目を集めており、様々な抗がん作用のある薬物との併用投与により抗がん効果の上昇が期待されている。PD-1 は T 細胞上に存在する分子であり、PD-L1 と結合することで T 細胞の活性を抑制しており、がん細胞が T 細胞の免疫排除を逃れている[81]。この PD-1 を抗体でブロックすることにより、T 細胞への免疫抑制シグナルが入らなくなり、がん細胞を排除することができる。今回の研究ではがん細胞の実質的な排除を担っている CTL を誘導している。腫瘍抗原特異的な CTL が存在しなければ、多量の PD-1 抗体を投与したとしてもほとんど効果を発揮しないと考えられる。そのため、アジュバントと PD-1 抗体の併用により、さらなる抗腫瘍効果の上昇が期待できると考えられる。

以上、本研究において、CCR4 阻害剤は筋肉組織において Treg の集積を抑制することで、DC の活性化やリンパ節への遊走を促進し、抗体の誘導および抗腫瘍効果を示した。さらに、P2 受容体アゴニストは粘膜組織の CD70⁺ DC を活性化させることで、Th17 細胞依存的な CTL 誘導および抗腫瘍効果を示した。このように、Th 細胞を制御することによってワクチン反応の向上が可能であることを明らかに

した。こういった様々な Th 細胞の時間的な制御や空間的な制御によって、疾患に合った免疫反応を誘導できるワクチンシステムの構築が進むと考えられる。そして、これによって構築されたワクチンシステムは、がんや感染症だけでなく、生活習慣病や他の疾患においても利用することができる。そのため、作用メカニズムの異なる様々なワクチンアジュバントの研究開発は多くのヒトを含めた動物において有用な研究であると考えられる。

参考文献

1. Park, W.H. and M.C. Schroder, *Diphtheria Toxin-Antitoxin and Toxoid: A Comparison*. Am J Public Health Nations Health, 1932. **22**(1): p. 7-16.
2. Di Pasquale, A., et al., *Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond*. Vaccines (Basel), 2015. **3**(2): p. 320-43.
3. Sun, H., K.G. Pollock, and J.M. Brewer, *Analysis of the role of vaccine adjuvants in modulating dendritic cell activation and antigen presentation in vitro*. Vaccine, 2003. **21**(9-10): p. 849-55.
4. Navabi, H., et al., *A clinical grade poly I:C-analogue (Ampligen) promotes optimal DC maturation and Th1-type T cell responses of healthy donors and cancer patients in vitro*. Vaccine, 2009. **27**(1): p. 107-15.
5. Krieg, A.M., et al., *Induction of systemic TH1-like innate immunity in normal volunteers following subcutaneous but not intravenous administration of CPG 7909, a synthetic B-class CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonist*. J Immunother, 2004. **27**(6): p. 460-71.
6. Klinman, D.M., *Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(4): p. 249-58.
7. Levine, A.S. and H.B. Levy, *Phase I-II trials of poly IC stabilized with poly-L-lysine*. Cancer Treat Rep, 1978. **62**(11): p. 1907-12.
8. Galluzzi, L., et al., *Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy*. Oncoimmunology, 2012. **1**(5): p. 699-716.
9. Yoon, S.H., et al., *Selective addition of CXCR3(+) CCR4(-) CD4(+) Th1 cells enhances generation of cytotoxic T cells by dendritic cells in vitro*. Exp Mol Med, 2009. **41**(3): p. 161-70.
10. Chattopadhyay, S. and N.G. Chakraborty, *Continuous presence of Th1 conditions is necessary for longer lasting tumor-specific CTL activity in stimulation cultures with PBL*. Hum Immunol, 2005. **66**(8): p. 884-91.
11. Kopf, M., et al., *Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses*. Nature, 1993. **362**(6417): p. 245-8.
12. Ishigame, H., et al., *Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against*

- mucoepithelial bacterial infection and allergic responses*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 108-19.
13. Raffatellu, M., et al., *Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut*. Nat Med, 2008. **14**(4): p. 421-8.
 14. Saijo, S., et al., *Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against Candida albicans*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 681-91.
 15. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
 16. Sakaguchi, S., *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance*. Cell, 2000. **101**(5): p. 455-8.
 17. Mbow, M.L., et al., *New adjuvants for human vaccines*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(3): p. 411-6.
 18. Marrack, P., A.S. McKee, and M.W. Munks, *Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(4): p. 287-93.
 19. Bayry, J., *Regulatory T cells as adjuvant target for enhancing the viral disease vaccine efficacy*. Virusdisease, 2014. **25**(1): p. 18-25.
 20. Belkaid, Y. and B.T. Rouse, *Natural regulatory T cells in infectious disease*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 353-60.
 21. Peggs, K.S., et al., *Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies*. J Exp Med, 2009. **206**(8): p. 1717-25.
 22. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *The chemokine superfamily revisited*. Immunity, 2012. **36**(5): p. 705-16.
 23. Bachelierie, F., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2013. **66**(1): p. 1-79.
 24. Bayry, J., et al., *Human dendritic cells acquire a semimature phenotype and lymph node homing potential through interaction with CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4184-93.
 25. Tadokoro, C.E., et al., *Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 505-11.
 26. Pere, H., et al., *A CCR4 antagonist combined with vaccines induces antigen-specific CD8+ T cells and tumor immunity against self antigens*. Blood, 2011. **118**(18): p. 4853-62.

27. Bayry, J., et al., *In silico identified CCR4 antagonists target regulatory T cells and exert adjuvant activity in vaccination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 10221-6.
28. Davies, M.N., et al., *Toward the discovery of vaccine adjuvants: coupling in silico screening and in vitro analysis of antagonist binding to human and mouse CCR4 receptors*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e8084.
29. Purandare, A.V., et al., *Core exploration in optimization of chemokine receptor CCR4 antagonists*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. **17**(3): p. 679-82.
30. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.
31. Reiss, Y., et al., *CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin*. J Exp Med, 2001. **194**(10): p. 1541-7.
32. King, C., S.G. Tangye, and C.R. Mackay, *T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 741-66.
33. Langenkamp, A., et al., *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 311-6.
34. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
35. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
36. Dong, C., *TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 337-48.
37. Chang, S.H. and C. Dong, *A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses*. Cell Res, 2007. **17**(5): p. 435-40.
38. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
39. Ankathatti Munegowda, M., et al., *Th17 and Th17-stimulated CD8(+) T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity*. Cancer Immunol Immunother, 2011.

- 60(10): p. 1473-84.
40. Matsuo, K., et al., *CCR4 is critically involved in effective antitumor immunity in mice bearing intradermal B16 melanoma*. *Cancer Lett*, 2016. **378**(1): p. 16-22.
 41. Martin-Orozco, N., et al., *T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity*. *Immunity*, 2009. **31**(5): p. 787-98.
 42. Brandtzaeg, P., *Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation*. *Immunol Invest*, 2010. **39**(4-5): p. 303-55.
 43. Wang, M., et al., *Roles of M cells in infection and mucosal vaccines*. *Hum Vaccin Immunother*, 2014. **10**(12): p. 3544-51.
 44. Atarashi, K., et al., *ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation*. *Nature*, 2008. **455**(7214): p. 808-12.
 45. Uematsu, S., et al., *Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(7): p. 769-76.
 46. Junger, W.G., *Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(3): p. 201-12.
 47. Burnstock, G. and J.M. Boeynaems, *Purinergic signalling and immune cells*. *Purinergic Signal*, 2014. **10**(4): p. 529-64.
 48. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells*. *Adv Immunol*, 1989. **46**: p. 111-47.
 49. North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(4): p. 1013-67.
 50. Li, X., S. Jiang, and R.I. Tapping, *Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival*. *Cytokine*, 2009. **49**(1): p. 1-9.
 51. Matsuo, K., et al., *Vaccination with Antigen Combined with alphabeta-ATP as a Vaccine Adjuvant Enhances Antigen-Specific Antibody Production via Dendritic Cell Activation*. *Biol Pharm Bull*, 2016. **39**(6): p. 1073-6.
 52. Galand, C., et al., *Th17 cells are involved in the local control of tumor progression in primary intraocular lymphoma*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e24622.
 53. Noonan, K., et al., *A novel role of IL-17-producing lymphocytes in mediating lytic bone disease in*

- multiple myeloma*. Blood, 2010. **116**(18): p. 3554-63.
54. Su, X., et al., *Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells*. J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1630-41.
55. Tosolini, M., et al., *Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer*. Cancer Res, 2011. **71**(4): p. 1263-71.
56. Hahn, J.N., V.G. Falck, and F.R. Jirik, *Smad4 deficiency in T cells leads to the Th17-associated development of premalignant gastroduodenal lesions in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 4030-42.
57. Maruyama, T., et al., *Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer*. Cancer Sci, 2010. **101**(9): p. 1947-54.
58. Zhang, J.P., et al., *Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients*. J Hepatol, 2009. **50**(5): p. 980-9.
59. Charles, K.A., et al., *The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans*. J Clin Invest, 2009. **119**(10): p. 3011-23.
60. Leveque, L., et al., *Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4+ regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells*. J Immunother, 2009. **32**(2): p. 101-8.
61. Sfanos, K.S., et al., *Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(11): p. 3254-61.
62. Li, J., et al., *Interleukin 17A promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF-kB induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21816.
63. Huang, Q., et al., *IL-17 Promotes Angiogenic Factors IL-6, IL-8, and Vegf Production via Stat1 in Lung Adenocarcinoma*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 36551.
64. Lin, Y., et al., *Interleukin-17 is a favorable prognostic marker for colorectal cancer*. Clin Transl Oncol, 2014. **17**(1): p. 50-6.
65. Qian, X., et al., *Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis*. Cytokine, 2016. **89**: p. 34-44.

66. Kryczek, I., et al., *Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments*. *Blood*, 2009. **114**(6): p. 1141-9.
67. Yen, H.R., et al., *Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity*. *J Immunol*, 2009. **183**(11): p. 7161-8.
68. Zou, W. and N.P. Restifo, *T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(4): p. 248-56.
69. Jovanovic, D.V., et al., *IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages*. *J Immunol*, 1998. **160**(7): p. 3513-21.
70. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(2): p. 133-46.
71. McCluskie, M.J. and H.L. Davis, *CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice*. *J Immunol*, 1998. **161**(9): p. 4463-6.
72. McCluskie, M.J. and H.L. Davis, *Mucosal immunization with DNA vaccines*. *Microbes Infect*, 1999. **1**(9): p. 685-98.
73. Sabirov, A. and D.W. Metzger, *Intranasal vaccination of infant mice induces protective immunity in the absence of nasal-associated lymphoid tissue*. *Vaccine*, 2008. **26**(12): p. 1566-76.
74. Pizzolla, A., et al., *Nasal-associated lymphoid tissues (NALTs) support the recall but not priming of influenza virus-specific cytotoxic T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(20): p. 5225-5230.
75. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 145-73.
76. Sugiyama, T., et al., *Immunoadjuvant effects of polyadenylic:polyuridylic acids through TLR3 and TLR7*. *Int Immunol*, 2008. **20**(1): p. 1-9.
77. Gowen, B.B., et al., *TLR3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro Virus infection by the double-stranded RNA (dsRNA), poly(I:C12U), but not Poly(I:C): differential recognition of synthetic dsRNA molecules*. *J Immunol*, 2007. **178**(8): p. 5200-8.
78. Manegold, C., et al., *A phase III randomized study of gemcitabine and cisplatin with or without PF-3512676 (TLR9 agonist) as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer*. *Ann Oncol*,

2011. **23**(1): p. 72-7.

79. Sato-Kaneko, F., et al., *A Dual Adjuvant System for Intranasal Boosting of Local and Systemic Immunity for Influenza Vaccination*. *Vaccines* (Basel), 2022. **10**(10).

80. Wraith, D.C., M. Goldman, and P.H. Lambert, *Vaccination and autoimmune disease: what is the evidence?* *Lancet*, 2003. **362**(9396): p. 1659-66.

81. Chen, D.S. and I. Mellman, *Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point*. *Nature*, 2017. **541**(7637): p. 321-330.

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なるご指導、ご鞭撻を賜り、研究の魅力と厳しさを御教授頂きました恩師、近畿大学薬学部化学療法学研究室 教授 中山隆志 先生に甚大なる謝意を表します。

また本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜り、研究に対する姿勢と情熱を御教授頂きました、近畿大学薬学部化学療法学研究室 講師 松尾一彦 先生に心より厚くお礼申し上げます。

さらに本研究に際し、暖かいご指導とご助言を賜りました近畿大学薬学部化学療法学研究室 講師 原雄大 先生に心よりお礼申し上げます。

また、免疫染色に際して技術協力頂きました姫路獨協大学薬学部 教授 長久保大輔 先生、Compound 22 を作成頂きました近畿大学薬学部創薬科学科 講師 西脇敬二 先生、本論文作製にご協力頂きました化学療法学研究室内の皆様に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり貴重なご指導、ご助言を賜りました主査 近畿大学薬学部病態薬理学研究室 教授 川畑篤史 先生、副主査 近畿大学薬学部生物薬剤学研究室 教授 岩城正宏 先生に御礼申し上げます。

最後に、常に暖かく見守り支えてくれました家族に感謝いたします。