

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7575492号  
(P7575492)

(45)発行日 令和6年10月29日(2024.10.29)

(24)登録日 令和6年10月21日(2024.10.21)

(51)国際特許分類	F I
A 6 1 K 31/6615(2006.01)	A 6 1 K 31/6615
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 39/135 (2006.01)	A 6 1 K 39/135

請求項の数 5 (全23頁)

(21)出願番号	特願2022-572763(P2022-572763)	(73)特許権者	520130373 リパブリック オブ コリア (アニマル アンド プラント クオレンティン エー ジェンシー) REPUBLIC OF KOREA (A NIMAL AND PLANT QUA RANTINE AGENCY) 大韓民国 3 9 6 6 0 キョンサンブク ド、キムチョン - シ、ヒョクシン 8 - 口、1 7 7
(86)(22)出願日	令和2年6月26日(2020.6.26)	(74)代理人	110003074 弁理士法人須磨特許事務所
(65)公表番号	特表2023-527404(P2023-527404 A)	(72)発明者	リー ミン ザ 大韓民国、5 0 5 3 5 キョンサンナム ド、ヤンサンシ、テウン5ギル、7、1 最終頁に続く
(43)公表日	令和5年6月28日(2023.6.28)		
(86)国際出願番号	PCT/KR2020/008364		
(87)国際公開番号	WO2021/261635		
(87)国際公開日	令和3年12月30日(2021.12.30)		
審査請求日	令和4年11月25日(2022.11.25)		

(54)【発明の名称】 新規な免疫増強剤及びこれを含むワクチン組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

T細胞アゴニストである Isopentenyl pyrophosphate trilithium salt を有効成分として含む免疫増強剤組成物を含む口蹄疫ワクチン組成物。

【請求項2】

前記有効成分は、免疫増強剤組成物の0.01~1重量%含まれることを特徴とする、請求項1に記載の口蹄疫ワクチン組成物。

【請求項3】

前記有効成分の他に、添加剤、賦形剤又は担体がさらに含まれることを特徴とする、請求項1に記載の口蹄疫ワクチン組成物。

【請求項4】

前記免疫増強剤組成物は、オイル剤形またはノンオイル剤形であることを特徴とする、請求項1に記載の口蹄疫ワクチン組成物。

【請求項5】

前記免疫増強剤組成物は、口蹄疫ワクチン組成物の30~70重量%で含まれることを特徴とする、請求項1乃至4のいずれか一項に記載の口蹄疫ワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な免疫増強剤に関し、より具体的には、非典型的T細胞アゴニスト及び典型的T細胞アゴニストを含む新規な免疫増強剤及びこれを含むワクチン組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

口蹄疫(FMD)は、偶蹄類(二つに割れた蹄を持つ動物)、とりわけ牛と豚において非常に速やかに伝播される急性伝染病であって、深刻な動物の生産性の低下と経済的損失の原因となる。FMDに対する大部分の臨床研究は、豚よりは牛でのワクチン効能を向上させるのに重点を置いたものであった。FMDワクチン生産のためのOIE(Office International Epizooties)指針は、豚ではなく、牛についての効能試験手順のみを定義している。しかし、FMDの重症度は、ウイルス菌株及び影響を受ける宿主種の双方に大きく依存する。急性臨床FMDは、他の反芻動物よりも豚において一層深刻であり、感染した豚は、多量のエアロゾルウイルスを排出することができ、深刻な疾病の伝播危険が高い。

10

【0003】

近年、韓国のワクチン接種動向によれば、FMDワクチンは、牛の免疫反応を効果的に誘導するが、その一方で、豚においては、血清内における高いウイルス中和抗体力価(Virus Neutralization(VN) Titer)にもかかわらず、口蹄疫ウイルス感染への完全な防御のための十分な免疫反応をもたらさない。このような違いは、畜種別のFMDウイルスに対する感受性または予防接種に対する宿主の免疫反応で説明することができる。

20

【0004】

不活性化口蹄疫ウイルス(FMDV)、すなわち、不活化抗原を含有するワクチン接種は、主に宿主防御及びFMD制御に用いられる。ワクチンの免疫原性及び効能を向上させるために、オイルエマルジョンなどのアジュバント(補助剤)及びサポニン、ゲルなどのような免疫増強剤などがワクチン成分として添加される。最近、サイトカイン(例えば、IL-15、IL-18及びIFN)並びにToll様受容体(TLR)-3アゴニストとしてのポリ(I:C)、TLR-9アゴニストとしてのCpG及びTLR-7/8アゴニストとしてのR848(Resiquimod)を含むパターン認識受容体(PRR)リガンドが、新しいFMDワクチンアジュバントとして提案された。しかし、このような研究は、基本的な水準で進められ、FMDV抗原またはFMDワクチンが媒介する細胞性免疫反応及び体液性免疫反応に対する理解を一層深めるためのメカニズム研究はほとんど行われてこなかった。

30

【0005】

本発明の目的は、先天性免疫反応と体液性免疫反応のリンカーとして作用し、宿主(host)防御において「新しい保護者」として提案された(gamma delta)T細胞、iNK(invariant natural killer)T細胞、MAIT(mucosal-associated invariant T)細胞を含む非典型的(unconventional)T細胞及びT細胞のような典型的(conventional)T細胞のアゴニスト(agonist)をワクチンアジュバントとして使用し、樹状細胞(dendritic cells、DCs)、マクロファージ(macrophages、Ms)、及びモノサイト(monocytes)などのような抗原提示細胞(Antigen presenting cells、APCs)の刺激なしにT細胞を直接的に刺激して、より速やかで且つより強い細胞性免疫反応を導くことで、ワクチン接種時の宿主の初期防御に重要な役割をし、細胞性・体液性免疫反応を同時に刺激して、動物、特に豚における強力なメモリー反応(memory response)及びその抗体力価を誘導する免疫増強用補助物質及びこれを含む口蹄疫ワクチン組成物を開発することである。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

50

【文献】Lee, M. J. et al. Mincle and STING-stimulating adjuvants elicit robust cellular immunity and drive long-lasting memory responses in a foot-and-mouth disease vaccine. *Front. Immunol.* 10, 2509 (2019).

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上述した問題点を解決するために、本発明は、牛と豚の免疫細胞における非典型的T細胞及び典型的T細胞の直接的な活性化によって強力な細胞性免疫反応を誘導する新規な免疫増強剤組成物を提供することを課題とする。

【0008】

また、本発明は、前記免疫増強剤組成物を含むワクチン組成物を提供することを他の一つの課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記の課題を達成するために、本発明は、牛と豚の免疫細胞において強力な細胞性免疫反応を誘導する新規な免疫増強剤組成物を提供する。

【0010】

前記新規な免疫増強剤は、非典型的T細胞アゴニスト(unconventional T cell agonist)及び典型的T細胞アゴニスト(conventional T cell agonist)を有効成分として含む。

【0011】

本発明における免疫増強剤(immunostimulant)またはアジュバント(adjuvant)は、抗原が起こす免疫反応を増強させる物質を意味する。該免疫増強剤は、ワクチンにおいて少量の抗原でも同一の効力を奏することができるので、従前の半分ないし3分の1程度の抗原でワクチンを作ることができる。

【0012】

本発明における典型的T細胞アゴニストは、ROR $\gamma$ t(RAR-related orphan receptor gamma t)を含む。

【0013】

本発明における非典型的T細胞アゴニストは、上述したように既に公知されている典型的T細胞アゴニストを除いたT細胞アゴニストを意味する。前記非典型的T細胞アゴニストは、望ましくは、T細胞アゴニスト、iNKT細胞アゴニスト、MAIT細胞アゴニストであり得るが、これらに限定されるものではない。

【0014】

前記非典型的T細胞アゴニストまたは典型的T細胞アゴニストは、免疫増強剤組成物の0.01~1重量%、望ましくは、0.1~0.5重量%、より望ましくは、0.2~0.3重量%含まれ得る。前記範囲未満であれば、免疫増強の効果が現われないことがあり、前記範囲を超えると毒性が誘発される可能性がある。

【0015】

本発明の免疫増強剤または免疫増強剤組成物は、前記成分以外に当業界で広く知られているオイル(またはオイルエマルジョン)、乳化剤、及びゲルなどをさらに含むことができる。

【0016】

前記オイル(またはオイルエマルジョン)は、ISA201、ISA61、ISA50、ISA206、またはISA207であり得るが、これらに限定されない。

【0017】

前記乳化剤は、一般に乳化剤と認められる物質、例えばTWEEN(登録商標)またはSPAN(登録商標)製品ラインの他の製品(それぞれポリエトキシ化ソルビトール脂肪酸エステル、及び脂肪酸置換のソルビタン界面活性剤)及びPEG-40ヒマシ油または他のPEG化(PEGylated)水素化オイルのような他の溶解性改善剤を含み得

10

20

30

40

50

るが、これらに限定されるものではない。

【0018】

また、免疫増強剤（またはアジュバント）組成物は、通常、オイル剤形で免疫増強の効果に優れるが、本発明による免疫増強剤組成物は、ノンオイル剤形で免疫増強の効果に優れる。

【0019】

前記免疫増強剤を製造するために、当業界で通常用いられる添加剤、賦形剤、担体などをさらに含むことができ、当業界で免疫増強剤を製造するために用いる通常的な製造方法によって製造されることができる。

【0020】

本発明の免疫増強剤組成物の投与後に現われる免疫増強の効果は、免疫媒介物質または細胞によるものであることができ、具体的には、細胞性免疫、粘膜免疫、体液性免疫増強効果を含み得るが、これらに限定されない。

【0021】

前記免疫は、ウイルス、かび、バクテリア及び寄生虫のうちのいずれか一つの病原体に対する感染または癌に対する免疫を含むことができるが、これらに限定されない。

【0022】

前記ウイルスは、口蹄疫ウイルス（FMDV）、リーシュマニア（Leishmania）、ヒト免疫不全ウイルス（Human Immunodeficiency virus、HIV）、C型肝炎ウイルス（Hepatitis C virus、HCV）、E型肝炎ウイルス（Hepatitis E virus、HEV）、A型肝炎ウイルス（Hepatitis A virus、HAV）、B型肝炎ウイルス（Hepatitis B virus、HBV）、結核（tuberculosis）、単純ヘルペスウイルス（Herpes Simplex virus、HSV）、マラリア原虫（malaria causing parasites）、ヒトパピローマウイルス（Human Papilloma virus、HPV）、インフルエンザウイルス（influenza virus）、はしかウイルス（measles virus）、ムンプスウイルス（mumps virus）、エボラウイルス（Ebola virus）、呼吸器多核体ウイルス（Respiratory Syncytial virus、RSV）、ウエストナイルウイルス（West Nile virus、WNV）などを含むが、これらに限定されない。

【0023】

また、本発明は、前記免疫増強剤組成物を含むワクチン組成物を提供する。

【0024】

前記免疫増強剤組成物は、ワクチン組成物の全重量に対して30～70重量%、望ましくは、40～50重量%含まれることができるが、これに限定されるものではない。前記範囲未満であればワクチンの効果が現われないことがあり、前記範囲を超える場合、投与時に毒性が現われることができる。

【0025】

前記ワクチン組成物は、当業界でワクチン組成物を製造する際に通常使われる添加剤、賦形剤、担体などをさらに含むことができる。

【0026】

また、前記ワクチン組成物は、当業界でワクチン組成物を製造するために使う通常の製造方法によって製造されることができる。

【0027】

本発明において、前記ワクチンの種類は制限されるものではないが、望ましくは、ウイルスワクチン、より望ましくは、口蹄疫ワクチンであることができる。

【0028】

口蹄疫ワクチン組成物に本発明による免疫増強剤が含まれる場合、前記口蹄疫ワクチン組成物は、血清型O、血清型A、血清型Asia1、血清型C、血清型SAT1、血清型SAT2、血清型SAT3の口蹄疫ウイルスなどに対して免疫効果を発揮し得る。望まし

10

20

30

40

50

くは、血清型 O、血清型 A の口蹄疫ウイルスに対してより強い免疫効果を発揮し得る。

【0029】

前記ワクチン組成物は、舌下投与、経皮投与、直腸投与、経粘膜投与、局所的投与、口腔投与、胸膜内投与、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、脊椎腔内投与、関節内投与などの方法で投与されることができる。

【発明の効果】

【0030】

本発明は、牛、豚の先天性細胞性免疫反応を強化して体液性免疫反応をより効率的に向上させることができる新しい免疫増強剤及びこれを含むワクチン組成物を提供することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、不活性化された FMDV O/TWN/97 抗原により誘導された牛及び豚での PBMCs、リンパ球、単核球及び T 細胞増殖結果を示す図である。

【図2】図2a~2dは、FMDV(O/TWN/97-R) 抗原により媒介された豚免疫細胞と牛免疫細胞における炎症性サイトカインの発現結果を示す図である。

【図3】図3は、FMDV(O/TWN/97-R) 抗原により媒介された豚免疫細胞と牛免疫細胞における炎症性サイトカインの発現結果を示す図である。

【図4】図4は、FMDV 抗原が豚の Mo-DCs 及び Mo-Ms でサイトカイン発現を直接刺激することを示す図である。

20

【図5】図5a及び5bは、FMDV 抗原が食作用によって豚 DCs 及び Ms に細胞内取り込み(endocytosis)されて細胞性免疫を開始することを示す図である。

【図6】図6aは、牛と豚での免疫反応の違いを究明するための実験過程を示す図であり、図6b及び図6cは、豚で非正常的に過発現された先天性免疫反応及び FMD ワクチン予防接種による T 細胞の疲弊の経路(exhaustion pathway)の誘導結果を示す図である。

【図7】図7aは、実験例1の実験過程を示した図であり、図7b~図7dは、非典型的 T 細胞アゴニスト及び典型的 T 細胞アゴニストがマウスの初期、中期及び長期免疫を誘導することを確認した結果を示した図である。

【図8】図8aは、実験例2の実験過程を示した図であり、図8bは、T 細胞アゴニスト誘導豚 PBMCs での細胞増殖の結果を示した図である。

30

【図9】図9a~図9eは、実験例3の結果である非典型的 T 細胞アゴニスト及び典型的 T 細胞アゴニストによる豚での非正常的な先天性免疫反応の改善及び T 細胞を含む免疫細胞の活性化の結果を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0032】

以下、本発明を実施例及び実験例によって詳しく説明する。

ただし、下記実施例及び実験例は、本発明を例示するものに過ぎず、本発明の内容が下記実施例及び実験例に限定されるものではない。

【0033】

40

< 実験材料及び方法 >

1. 抗原の精製及び不活性化

精製された不活性化ウイルス抗原を、逆遺伝学的手法による P1 の表現型切り替え(リファレンス配列)用に構築された FMDV O/TWN/97-R (GenBank AY593823; P1) に感染された BHK-21 細胞で製造した。

【0034】

ウイルス感染の場合、培養培地を無血清ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM; HyClone、Logan、UT、USA)に切り替え、細胞を 37、5%二酸化炭素で 1 時間の間インキュベーションすることでウイルスに接種した。次いで、細胞外ウイルスを除去した。感染後 24 時間に、振とう培養器で 24 時間の間 0.003 N バイナリーエ

50

チレンイミンを2回処理してウイルスを不活性化させた後、ポリエチレングリコール (PEG) 6000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に濃縮させた。得られたウイルス濃縮物と15 - 45%ショ糖密度勾配を重層して遠心分離した。

#### 【0035】

超遠心分離後、遠心分離チューブの底を穿孔して1 mL分画を収集した。それぞれの分画のサンプルにおけるFMDV粒子の存在は、側方流動装置であるUA-6 (BioSign FMDV Ag; Princeton BioMeditech, Princeton, NJ, USA) を用いて、光学密度に基づいて確認された。現場実験に使用するに先立って、PEGで前処理された上清液をZZ-R127及びBHK-21細胞を少なくとも2回通過させて細胞変性効果 (CPE) が発生しなかったことを確認することで、上清液に生ウイルスの不在を確認した。

10

#### 【0036】

##### 2. PBMCsの分離

抗原媒介免疫反応を調べるために、豚と牛の全血を、韓国の京畿道動物衛生試験所から寄贈してもらった。全血 (15 mL) をBD Vacutainerヘパリンチューブ (BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) に収集して、Ficoll-Paque<sup>T</sup> M PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA) で勾配、遠心分離し、次いで、残留赤血球を塩化アンモニウム・カリウム (ACK) 溶解緩衝液 (Gibco, Carlsbad, CA, USA) で処理して溶解させた。PBMCsを2%ウシ胎児血清 (FBS) (Gibco) が補充された、Ca<sup>2+</sup>及びMg<sup>2+</sup> (Gibco) が含まれないダルベッコ (Dulbecco) のPBSに懸濁させ、フローサイトメーター (MACSQuant (登録商標) Analyzer, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて計数した。すべての細胞は使用直前に新たに分離し、凍結保存された細胞は、如何なる実験にも使用しなかった。精製されたPBMCsを10% FBS (HyClone, Logan, Utah, USA)、3 mM L-グルタミン (Sigma-Aldrich) 及び100 U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) が補充されたRPMI 1640 (Gibco) 培地に再懸濁させた。次いで、精製されたPBMCsを25 cm<sup>2</sup> 組織培養フラスコ (Eppendorf, Hamburg, Germany) に分注して、5% CO<sub>2</sub>、37 °Cの環境で培養して新たに分離された単球を付着させた。3時間の培養後、リンパ球分離のために非接着細胞を収集した。残りの接着細胞は、それぞれのフラスコに4 mLのRPMI 1640 成長培地を添加する前にダルベッコ (Dulbecco) リン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) (Gibco) で幅広く洗浄し、次いで5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて37 °Cで培養した。

20

30

#### 【0037】

##### 3. 磁気活性化細胞分離 (MACS) による細胞分離

単球、リンパ球及びT細胞をPBMCsから分離した。1次免疫細胞の分離のために、付着性PBMCsから単球を、及び非接着細胞からT細胞をMACSにより精製した。PBMCsから得られた接着細胞及び非接着細胞をMACS緩衝液 (0.5% BSA及び2 mM EDTAが補充された1×PBS) に簡単に再懸濁させた。単球及びT細胞は、それぞれ製造社の指示に従って単球単離キット及びPanT細胞単離キット (Miltenyi Biotec) と磁気マイクロビーズを用いて分離し、更に、蛍光活性化セルソーター (FACS, MoFlo (登録商標) Astrios<sup>TM</sup> Cell Sorter, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて追加で分離した。分離された細胞の精製は、フローサイトメーター (MACSQuant Analyzer, Miltenyi Biotec) によって確認され、FlowJoソフトウェアバージョンvX.0.7 (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA) で分析

40

50

された。分離された細胞の純度は95%よりも高かった。

#### 【0038】

##### 4. Mo-DCs及びMo-M<sub>1</sub>sの生成

Mo-DCsの分化のために、分離された単球を10%FBS(Hyclone)、3mM L-グルタミン(Sigma-Aldrich)、100U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン(Sigma-Aldrich)、50ng/mL GM-CSF及びIL-4(Miltenyi Biotec)が補充された完全なRPMI 1640培地(Gibco)で7日間培養して、未成熟DCsを生成させた。3日目に、同一体積の前記言及された培地を添加して、7日目には、細胞溶解前に激しい洗浄によって非接着汚染細胞を除去した。純粋なDCsの分離のために、製造社(Miltenyi Biotec)の指示に従って、抗CD11c磁性ビーズを用いた。CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>細胞の純度は95%以上であり、細胞は5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで37℃の環境で維持された。

10

#### 【0039】

Mo-M<sub>1</sub>sの分化のために、単離された単球を10<sup>6</sup>個/mLで12ウェルプレートに分注して10%FBS(Hyclone)、1xMEM非必須アミノ酸、1mM ピルビン酸ナトリウム、0.05mM 2-メルカプトエタノール(Sigma-Aldrich)、100U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン(Sigma-Aldrich)及び50ng/mL マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)(Abcam, Cambridge, MA, USA)が補充されたRPMI 1640培地(Gibco)で6日間培養した。更なるM-CSFを2日目に添加し、全ての培地を4日目に新たに交換した。CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>細胞の純度は95%超であった。細胞は5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで37℃の環境で維持された。

20

#### 【0040】

##### 5. 成熟したDCsの準備

成熟したDCsは、次のような6つの処理中のいずれか一つを追加して生成された：処理なし(刺激しない)、LPS(E.coli 055:B5, Sigma-Aldrich [100ng/mL]) + rpIFN- $\gamma$  (Novus Biologicals, LLC, Littleton, CO, USA [20ng/mL])、rpTNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA [20ng/mL])、抗原単独(抗原[1 $\mu$ g/mL])、LPS + rpIFN- $\gamma$  + 抗原(LPS [100ng/mL]、rpIFN- $\gamma$  [20ng/mL]及び抗原[1 $\mu$ g/mL])またはrpTNF- $\alpha$  + 抗原(rpTNF- $\alpha$  [20ng/mL]及び抗原[1 $\mu$ g/mL])。処理後の特定時点(0、6、12、24、48、72及び96h)で、ELISAのために細胞培養上清液を回収した。

30

#### 【0041】

##### 6. M1/M2M<sub>1</sub>sの分極化

7日の成長後、Mo-M<sub>1</sub>sを6つの処理中のいずれか一つで処理した：処理なし(刺激しない)、M1M<sub>1</sub>s(LPS [100ng/mL]及びrpIFN- $\gamma$  [20ng/mL])、M2M<sub>1</sub>s(rpIL-4, R&D Systems [20ng/mL])、抗原単独(1 $\mu$ g/mL)、M1M<sub>1</sub>s + 抗原(IFN- $\gamma$  [20ng/mL]及びLPS [100ng/mL]及び抗原[1 $\mu$ g/mL])またはM2M<sub>1</sub>s + 抗原(IL-4 [20ng/mL] + 抗原[1 $\mu$ g/mL])。処理後の特定時点(0、6、12、24、48、72及び96h)で、細胞培養上清液をELISAのために回収した。

40

#### 【0042】

##### 7. 牛及び豚PBMCsにおける細胞培養、抗原処理及びBrdUの統合分析

分離されるか分化された細胞(1x10<sup>6</sup>個/ウェル)を10%ウシ胎児血清(Hyclone)、3mM L-グルタミン(Sigma-Aldrich)、10mM HEPES、100U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン(Sigma-Aldrich)及び0.05mM 2-メルカプトエタノール(Sigma-Aldrich)が補充

50

されたRPMI 1640培地(Gibco)からなる完全培地で5%CO<sub>2</sub>、37℃インキュベーターで培養した(Sigma-Aldrich)。刺激のために、細胞は各抗原1μgで処理された。処理後の特定時点(0、6、12、24、48、72、96、120、144、168、192、216及び240h)で、DNA合成の間のBrdUの取り込みに基づくBrdU細胞増殖分析キット(細胞Signaling Technology、MA、USA)を製造社の指示に従って用いて、細胞増殖を試験した。簡略には、10μM BrdUを細胞培養液に添加して37℃で4時間の間培養した。次いで、細胞を固定させて、抗BrdUマウスモノクローナル抗体とともに培養した後、西洋ワサビ(horseradish)ペルオキシダーゼを結合させたヤギ抗マウス抗体を用いて処理した。発色基質であるテトラメチルベンジジンを発色に用いた。450/550nmの二つの波長で吸光度を測定した。Cell Titer - Blue™分析キット(Promega、Madison、WI、USA)を用いて細胞生存力をモニタリングした。培地単独対照処理と比較して、実験処理は、細胞生存力に影響を及ぼさなかった。

10

## 【0043】

## 8. ELISA

牛及び豚IL-1、IL-6、IL-10、IL-12/23p40、IL-23及びTNFに対するELISA(DuoSet、R&D Systems、Minneapolis、MN、USA; Cloud-Clone Corporation、Houston、USA)は、製造社の指示に従って、細胞培養上清液を用いて行った。

20

## 【0044】

## 9. 食作用(phagocytosis)の阻害

食作用を阻害するため、Mo-DCs及びMo-Msを抗原処理前に45分間5μg/mLのサイトカラシンD(CytD)(Sigma-Aldrich)とインキュベーションした。次いで、CytD処理されたMo-DCs及びMo-Msを1μg/mLの抗原とともに培養した。6時間後、培養された上清液をELISAのために収集した。

## 【0045】

## 10. 牛と豚

牛と豚の自然状態での免疫反応の根本的な違いと、FMDV O抗原により媒介される免疫反応及び関連メカニズムを理解するために、牛と豚を用いた現場実験は、Lee et al. に説明された方法によって行われた。FMD抗体陰性動物を用いた(牛は5ヶ月齢、豚は10~12週齢)。牛と豚を2グループに分けた(n=5/グループ)。試験の間、動物は隔離された状態で維持された。試験は、農林畜産検疫本部の動物実験倫理委員会(承認番号IACUC-2018-800及びIACUC-2019-185)の承認を得て機関指針に従い遂行された。

30

## 【0046】

## 11. ワクチン接種及びサンプリング

FMD抗原としてO/TWN/97-R Agを使用した。陽性対照群に対するワクチン組成物は次のとおりである: 15μgのO/TNW/97-R抗原(牛及び豚に使用する場合の1回用量)、ISA206(50%、w/w)、10%Al(OH)<sub>3</sub>及び150μg Quil-Aを含む単一用量で製造された1mLのワクチン。ナীব(naive)PBMCs分離のために、全血をナীব対照群(口蹄疫抗体陰性)の牛、豚から収集した。ワクチン接種は、28日間隔で2回行い、陽性対照群動物の首に筋肉内経路を介して1mLのワクチン(1回用量)を注射した。血清学的分析のために、牛及び豚から0、14、28、42、56、70及び84dpvで血液サンプルを収集し、牛及び豚からPBMCs分離のために28dpv(1回接種後28日目、2回ワクチン接種前)に血液サンプルを収集した。当該動物の体温、ワクチン接種部位の症状及び食欲について、毎日モニタリングした。テストが遂行されるまで血清サンプルを-80℃で保管した。

40

## 【0047】

## 12. RNA配列分析(RNA-Seq)

RNA-Seq分析のために、ナীব対照群(n=3/グループ)及び陽性対照群(n

50

= 3 / グループ) ( 2 8 d p v ) の牛及び豚の全血からの P B M C s を、Lee, M.J. et al. Mincle and STING-Stimulating Adjuvants Elicit Robust cellular Immunity and Drive Long-Lasting Memory Responses in a Foot-and-Mouth Disease Vaccine. Front Immunol, 2509 (2019) ((以下、Lee et al. という) に記述された方法に従って、Ficoll - Paque<sup>TM</sup> PLUS (GE Healthcare Bio - Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA) を用いて密度勾配遠心法により遠心分離した。

#### 【 0 0 4 8 】

##### 1 3 . ライブラリ ( Library ) 構築及びシーケンシング

高い処理量の牛及び豚転写体データを得るために、イルミナ ( Illumina ) の次世代シーケンシング ( next generation sequencing、NGS ) を実施した。製造社のプロトコールに従って、TRIzol Reagent ( Invitrogen ) 及び RNeasy Mini Kit ( QIAGEN ) を用いて牛及び豚の P B M C s から総 RNA をそれぞれ抽出した。次いで、総 RNA を Nanodrop 分光光度計 ( Thermo Scientific、Wilmington、USA ) を用いて定量し、RNA 6000 Nano 分析キット ( Agilent Technologies、Santa Clara、USA ) 及び Bioanalyzer 2100 ( Agilent ) によって、その品質を評価した。NGS シーケンシングライブラリは、製造社のプロトコールに従って、TruSeq RNA サンプル準備キット ( Illumina、San Diego、CA、USA ) を用いて 1  $\mu$ g の総 RNA から生成された。すなわち、ポリ ( A ) 含有 RNA 分子は、ポリ T オリゴ結合磁性ビーズを用いて精製された。精製後、総ポリ ( A ) + RNA を高温で 2 価陽イオンを用いて小片に断片化した。切断された mRNA 断片をランダムプライマーを用いて 1 本鎖 cDNA に逆転写させた。短い断片を QiaQuick PCR 抽出キットで精製し、最終回収及びポリ ( A ) の付加のために溶離緩衝液に分解した。それから、短い断片をシーケンシングアダプダと連結した。各ライブラリは、相異なる MID タグを隣接させて分離された。次いで、生成された cDNA ライブラリを NovaSeq<sup>TM</sup> 6000 システム ( Illumina ) でサンプルに対してペアードエンドシーケンシング ( 2  $\times$  1 0 1 b p ) した。

#### 【 0 0 4 9 】

##### 1 4 . 遺伝子発現の分析

低品質塩基 ( PHERD score ( Q ) < 2 0 ) 及びアダプダーの汚染は、媒介変数として「ILLUMINACLIP: TruSeq3 - SE: 2 : 3 0 : 1 0 LEADING: 3 SLIDINGWINDOW: 4 : 1 5 MINLEN: 3 6」を用いて Trimmomatic v . 0 . 3 6 によって除去された。品質点数の確認及び読み出し長さの確認後に、RNA - Seq 読み出し値 ( リード ) は STAR を基本媒介変数として使用して期待値最大化 ( RSEM、RNA - Seq ) を用いてリファレンスの Bostaurus ゲノム ( 2 0 1 8 年 4 月発行 ; ARS - UCD 1 . 2 ; GCA\_\_0 0 2 2 6 3 7 9 5 . 2 ) にマッピング ( Mapping ) された。ゲノムから各遺伝子 / 転写体に対する発現値を得るために、期待値最大化方法による発現を推定した。RSEM によって推定された読み出しカウントは edgeR v 3 . 2 2 . 5 に適用されて統計的有意性ととも微分発現点数を得た。また、フィルター、すなわち TPM ( transcripts per million ) 0 . 3、読み出し回数 5 及び log<sub>2</sub> フォールド ( fold ) 変化 1 が差等的に表現された転写体の選択に適用された。最後に、発現された転写体 ( すなわち、TPM 0 . 3 及び読み出し回数 5 ) を分析して各条件及び遺伝子ファミリー ( 免疫遺伝子、T 細胞マーカー及び TLR、CDS、CLR 信号伝達経路遺伝子 ) での発現パターンを示した。

#### 【 0 0 5 0 】

##### 1 5 . 創意工夫経路の分析 ( Ingenuity Pathway Analysis : IPA )

次いで、発現プロファイルを類似した発現パターンのクラスターに分類した。しかるのち、IPA ( QIAGEN Inc . , <https://www.qiagenbioinformatics.com/produ>

10

20

30

40

50

cts/ingenuity-pathway-analysis) を用いて、豊かな経路、ネットワーク及び機能を分析した。最後に、社内 R s c r i p t を用いて重要な経路に係わるすべての遺伝子を示す 2 値ヒートマップを作った。

#### 【0051】

<強力なワクチンアジュバントとしての非典型的 T 細胞アゴニストの効果の評価及び実験方法>

##### 1. マウス

年齢及び性別が一致する野生型 C 5 7 B L / 6 マウス ( 6 ~ 7 週齢、雌 ) は、K O S A B I O I n c . ( 韓国 の 京畿道 所在 ) から 購入 した。すべてのマウスは、農林畜産検疫本部内の動物生物安全第三等級 ( A B S L 3 ) の特定病原体不在 ( s p e c i f i c p a t h o g e n f r e e、S P F ) 動物施設の微小隔離ケージに入れた。研究は、機関指針に従い農林畜産検疫本部の動物実験倫理委員会 ( 承認番号 I A C U C - 2 0 1 8 - 8 0 0 及び I A C U C - 2 0 1 9 - 1 8 5 ) の承認を受けて遂行された。

#### 【0052】

2. 非典型的 T 細胞アゴニスト及び典型的 T 細胞アゴニストにより媒介される補助性及び宿主防御

F M D ワクチンアジュバントとして、強力な細胞性及び体液性免疫反応の同時誘導及び非典型的 T 細胞アゴニスト及び典型的 T 細胞アゴニストの潜在力を評価するとともに、F M D V 感染に対する保護効果を調べるために、提示された戦略を用いて実験を遂行した ( 図 7 a ) ( グループ当たり n = 1 0 )。O / T W N / 9 7 - R 抗原は、非活性化された F M D V 抗原として使われた。P C 群に対するワクチン組成物は次のとおりである：O / T W N / 9 7 - R 抗原 ( 1 5 μ g / 用量 / m L、牛及び豚への使用のための 1 / 1 0 用量 )、1 0 % A l ( O H ) <sub>3</sub> 及び 1 5 μ g / Q u i l - A / マウスを使用し、総体積は 1 0 0 μ L とした。実験群のすべてのマウスは、アジュバント ( 免疫増強剤 ) として、非典型的 T 細胞アゴニストまたは典型的 T 細胞アゴニストを免疫増強剤組成物の全重量の約 0 . 2 重量 %、ワクチン全重量対比約 0 . 1 重量 % となるように添加して、P C 群と同一の組成でワクチンを提供してもらった。

#### 【0053】

これらの実験に用いられた非典型的 T 細胞アゴニスト及び典型的 T 細胞アゴニストは、S i g m a - A l d r i c h ( T 細胞アゴニスト ; I s o p e n t e n y l p y r o p h o s p h a t e t r i l i t h i u m s a l t、I P P ( I )、( E ) - 1 - H y d r o x y - 2 - m e t h y l - 2 - b u t e n y l 4 - p y r o p h o s p h a t e l i t h i u m s a l t、H M P ( H )、A b c a m ( i N K T 細胞アゴニスト ; - G a l a c t o s y l c e r a m i d e、- G a l c e r ( G )、T 細胞アゴニスト ( R O R T ( R ) ) 及び C a y m a n ( M A I T 細胞アゴニスト ; 6 - F o r m y l p t e r i n ( F )、C a y m a n C h e m i c a l、A n n A r b o r、M I、U S A ) からそれぞれ購入した。

#### 【0054】

陰性対照群グループのマウスには、同一の経路を通じて同一体積のリン酸緩衝食塩水 ( P B S、p H 7 . 0 ) が投与された。簡略には、ワクチン接種を 3 5 日間隔で 2 回遂行し、マウスの太もも筋肉に筋肉内ワクチン接種した。ワクチン接種の後、8 4 d p v または 1 6 8 d p v に、マウスに対し、腹腔内注射によって F M D V ( O / V E T / 2 0 1 3 の 1 0 0 L D 5 0、M E - S A トポタイプ ) を攻撃接種した。マウスの生存率及び体重は、最大 7 d p c ( 7 d a y s p o s t c h a l l e n g e、攻撃接種後 7 日 ) までモニタリングした。また、0、7、1 4、2 8、5 6、8 4 及び 1 6 8 d p v においてマウスからサンプリングされた血清を、A 型構造タンパク質酵素結合免疫吸着測定法 ( s t r u c t u r a l p r o t e i n ( S P ) A E L I S A ) 及びウイルス中和抗体 ( v i r u s n e u t r a l i z a t i o n、V N ) 力価 ( t i t e r s ) によって分析して、誘導された細胞性及び体液性免疫反応を調査した。

#### 【0055】

10

20

30

40

50

### 3. 血清学的分析

血清からSP抗体を検出するために、Lee et al. に記述されているようにPrionCHECK FMDV O型 ELISAキット (Prionics AG, Switzerland) を用いた。ELISAプレートでの吸光度をパーセント阻害 (PI) 値に換算した。PI値が50%以上であるとき、動物は抗体陽性と思われた。

#### 【0056】

VNテストは、Lee et al. に説明されたように、世界動物保健機関 (OIE) のマニュアルに従って遂行された。血清を56 の水槽における30分間の熱処理によって不活性化させた。細胞密度を、70%単一層を形成するように調整し、血清サンプルの2倍希釈系列 (1:8 ~ 1:1024) を調製した。次いで、希釈血清サンプルを100組織培養感染量 (TCID<sub>50</sub>) / 0.5 mL の同型ウイルスと37 で1時間の間、インキュベーションした。1時間後、LF-BK (牛の腎臓) 細胞懸濁液をすべてのウェルに添加した。2~3日後、CPEを確認して力価を決めた。ここで力価は100TCID<sub>50</sub> のウイルスの中和に必要な抗体反復希釈物のLog<sub>10</sub>として計算された。

#### 【0057】

### 4. PBMCsの分離

FMD抗体陰性動物を豚PBMCs分離のためのドナー (n = 3 / グループ) として使用した。全血 (15 mL / 各ドナー) をBD Vacutainerヘパリンチューブに独立に収集した。PBMCs分離に関する詳しいプロトコールは前述したとおりである。すべての細胞は、使用直前に新鮮に分離され、いかなる実験でも凍結保存された細胞は使われなかった。次いで、精製されたPBMCsを10% FBS (HyClone)、3 mM L-グルタミン (Sigma-Aldrich) 及び100 U/mL ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) が補充されたRPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA, USA) に再懸濁させた。96ウェルプレートにウェル当たり1 × 10<sup>5</sup>個でプレーティングし、5% CO<sub>2</sub>、37 の環境でインキュベーションした。3時間の培養後、培養培地を無血清培地に交換し、FMDV O (O/TWN/97-R) 抗原単独または多様な非典型的T細胞アゴニスト及びT細胞アゴニストまたはPRRリガンドとともに抗原で刺激した。

#### 【0058】

### 5. 豚PBMCsにおけるBrdUの統合分析

細胞増殖分析に対する詳細なプロトコールは、上述したとおりである。非典型的T細胞アゴニスト及び典型的T細胞アゴニストで処理した後、12時間及び36時間後に、細胞増殖を製造社の指示に従って試験した。

#### 【0059】

### 6. RNA-Seq

RNA-Seq分析のために、血清内FMD抗体陰性豚の全血 (n = 3 / グループ) から豚PBMCsを単離した。単離されたPBMCsを、FMDV O (O/TWN/97-R) 抗原とともに、T細胞アゴニスト (イソペンチルピロリン酸三リチウム塩、IPP (I))、(E)-1-ヒドロキシ-2-メチル-2-ブテニル4-ピロリン酸リチウム塩、HMP (H))、iNKT細胞アゴニスト (α-Gラクトシルセラミド、Galcer (G)、Abcam) 及びMAIT細胞アゴニスト (6-ホルミルプテリン (6-Formylpterin) (F)、Cayman Chemical) を含む非典型的T細胞アゴニスト、T細胞アゴニスト (RORγT (R)、Abcam) 及びPRRリガンド (レシキモド (Resiquimod)、R848、TLR-7/8アゴニスト) 及びトレハロース-6,6-ジベヘナート (TDB、Mincleアゴニスト); TDB及び環状ビス(3'-5')ジグアニル酸 (c-di-GMP、STINGアゴニスト、InvivoGen, San Diego, CA, USA) で処理した。12時間のインキュベーション後、PBMCsを収集して (preparation)、qRT-PCRのためにRNAを抽出した。

ライブラリの構築及び配列分析、遺伝子発現分析及びIPAを上述したように遂行した。

## 【 0 0 6 0 】

## 7 . 統計

他に言及されない限り、すべての定量的データは、平均 ± S E M で表示される。グループ間統計的有意性に対する値の比較は、T u k e y の多重比較テストまたは二つのデータポイントを比較するためのスチューデントの t 検定とともに一元配置分散分析を用いて行われた。統計分析には、G r a p h P a d P r i s m 8 . 3 . 1 ソフトウェア ( G r a p h P a d S o f t w a r e , S a n D i e g o , U S A ) を用いた。

## 【 0 0 6 1 】

< 予備実験例 > 牛と豚の免疫差の評価

1 . F M D V 抗原は、豚由来のものより、牛由来の P B M C s 、リンパ球、単球及び T 細胞において、より強力な増殖を誘発する。 10

B r d U 細胞増殖分析を用いて牛及び豚 P B M C s 、リンパ球、単球及び T 細胞の O / T W N / 9 7 - R 抗原により媒介される増殖を観察した。すべての種類の細胞において、牛細胞の増殖は、豚細胞のそれよりも有意に高かった (  $p < 0 . 0 0 1$  ) ( 図 1 の a ~ d ) 。

## 【 0 0 6 2 】

2 . F M D V 抗原は、豚免疫細胞と比べて牛免疫細胞で炎症性サイトカイン発現を有意に誘導する。

O / T W N / 9 7 - R 抗原により媒介されたサイトカイン発現分析は、豚 P B M C s においてサイトカインの発現が 1 2 時間乃至 4 8 時間でピークに到達した後、急激に減少したが、牛 P B M C においては 2 4 時間以内にサイトカインの発現が著しく増加し、2 4 0 時間までこの水準が維持されたことを示した ( 図 2 の a ~ d 、表 1 ) 。 20

## 【 0 0 6 3 】

リンパ球における O / T W N / 9 7 - R 抗原により媒介されたサイトカイン発現は、豚細胞よりも牛細胞の方で著しく高かった ( 図 2 b の e ~ h 、表 1 ) 。豚単球における O / T W N / 9 7 - R 抗原媒介サイトカインの発現について ( 図 2 c の i ~ l 、表 1 ) 、I L - 2 、I L - 6 、T N F 及び I F N の発現は、牛単球におけるそれよりも著しく高かった。牛及び豚 T 細胞において、O / T W N / 9 7 - R 抗原により媒介されるサイトカイン発現の経時変化を評価した ( 図 2 d の m ~ p 、表 1 ) 。サイトカインの発現は、牛及び豚のいずれの T 細胞においても 2 4 時間まで急速に増加した。その後、豚 T 細胞では徐々に減少したが、牛細胞では 2 4 0 時間までほとんど一定に維持された。 30

## 【 0 0 6 4 】

I L - 1 、I L - 1 2 / 2 3 p 4 0 及び I L - 1 0 発現のキネティクスは、豚 P B M C s 、リンパ球、単球及び T 細胞で確認された。炎症性サイトカインとして I L - 1 及び I L - 1 2 / 2 3 p 4 0 の発現は高かった。一方、抗炎症性サイトカイン I L - 1 0 の発現は著しく低かった ( 図 3 ) 。

## 【 0 0 6 5 】

【表 1】

細胞	IL-2		IL-6		TNF $\alpha$		IFN $\gamma$ s	
	牛	豚	牛	豚	牛	豚	牛	豚
PBMCs	70.14 $\pm 0.69$ ***	47.33 $\pm 1$ 3.88	858.65 $\pm$ 104.74***	171.00 $\pm 23.0$ 9	458.00 $\pm$ 37.91	416.43 $\pm 13.8$ ns	192.33 $\pm 16.2$ 2	ND
リンパ球	268.41 $\pm 4.00$	238.30 $\pm$ 34.21 <sup>ns</sup>	256.88 $\pm$ 137.25	ND	434.19 $\pm$ 91.92***	117.71 $\pm 16.6$ 3	439.00 $\pm 125.$ 37*	30.22 $\pm$ 10.85
単核白血球	511.06 $\pm 25.5$ 9	457.70 $\pm$ 93.99 <sup>ns</sup>	335.27 $\pm$ 68.87	392.97 $\pm 54.7$ 9 <sup>ns</sup>	726.86 $\pm$ 93.54	512.67 $\pm 150.$ 49 <sup>ns</sup>	194.33 $\pm 7.06$	591.80 $\pm 171.4$ 5 <sup>ns</sup>
T細胞	393.36 $\pm 39.7$ 8	360.10 $\pm$ 31.02 <sup>ns</sup>	142.35 $\pm$ 62.07	30.15 $\pm 6.46$	404.95 $\pm$ 20.14**	179.00 $\pm 31.0$ 5	201.00 $\pm 15.8$ 8	ND

10

## 【0066】

3. FMDV 抗原は、豚 Mo-DCs 及び Mo-Ms でサイトカイン発現を直接刺激する。

牛よりも免疫反応が低い豚における APC の反応を調査するために、豚 Mo-DCs 及び Mo-Ms を単球から分極化し、O/TWN/97-R 抗原によって刺激して抗原媒介サイトカインが直接分泌されるか否かを確認した。Mo-DCs (図 4a の a~e、表 2) 及び/または Mo-Ms (図 4a の f 及び図 4b の g~j、表 3)、IL-1、IL-6、IL-12/23p40 (48 時間) 及び TNF (24 時間) の発現は、ピーク水準に到達した後減少した。O/TWN/97-R 抗原は、これらの全ての炎症性サイトカインの発現を著しく高い水準で誘導したが、IL-10 (抗炎症性サイトカイン) は、Mo-DCs 及び Mo-Ms で低い水準で発現された。特に、LPS 及び IFN-刺激 M1Ms は IL-4-刺激 M2Ms よりも顕著に反応した。

20

## 【0067】

【表 2】

処理	Mo-DCs				
	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-10	IL-12/23p40	TNF $\alpha$
無刺激	ND	ND	ND	ND	ND
LPS+IFN $\gamma$	2574.67 $\pm 62.$ 71	715.57 $\pm 144$ .87	22.52 $\pm 2.$ 83	762.33 $\pm 109.$ 14	2578.00 $\pm 370$ .16
TNF $\alpha$	432.97 $\pm 15.6$ 8	201.33 $\pm 48.$ 09	10.85 $\pm 1.$ 01	135.67 $\pm 28.4$ 8	74.00 $\pm 15.82$
Ag	1958.67 $\pm 201$ .11	277.53 $\pm 27.$ 67	60.58 $\pm 4.$ 95	432.33 $\pm 39.3$ 0	2327.00 $\pm 456$ .45
LPS+IFN $\gamma$ + Ag	3337.67 $\pm 112$ .95	393.70 $\pm 42.$ 88	11.11 $\pm 0.$ 80	2445.67 $\pm 487$ .73	3075.67 $\pm 236$ .01
TNF $\alpha$ + Ag	713.93 $\pm 54.7$ 9	94.67 $\pm 13.7$ 3	69.99 $\pm 4.$ 75	142.33 $\pm 23.3$ 3	764.67 $\pm 224.$ 68
最大時間地点 (h)	48	48	24	48	24

30

40

## 【0068】

50

【表 3】

処理	Mo-MΦs				
	IL-1β	IL-6	IL-10	IL-12/23p40	TNFα
無刺激	ND	ND	ND	ND	ND
LPS+IFNγ	1339.00±128.74	1959.33±511.82	6.80±2.28	115.67±27.29	700.67±118.75
IL-4	223.43±21.45	ND	1.88±0.56	29.00±5.77	ND
Ag	1026.30±187.08	925.30±119.05	13.40±0.67	72.33±12.02	1920.67±389.75
LPS+IFNγ + Ag	1800.00±57.29	1214.83±382.81	9.00±0.69	262.33±52.07	2332.33±288.26
IL-4+Ag	100.68±18.31	456.57±60.04	1.49±0.13	55.67±6.67	634.33±81.32
最大時間地点 (h)	48	24	24	24	24

## 【0069】

4. FMDV 抗原は、食作用によって豚 DCs 及び Ms へ細胞内取り込み (endocytosis) されて細胞免疫を開始する。

豚 Mo-DCs 及び Mo-Ms への O/TWN/97-R 抗原のエンドサイトーシス (endocytosis) による先天性免疫反応を開始及び増幅させる経路を確認するために、細胞をファゴサイトーシス (phagocytosis) 抑制剤であるサイトカラシン D (CytD) で処理する前と後に、抗原で処理して共同培養し、細胞培養液におけるサイトカインの発現を観察した (図 5a 及び図 5b)。Mo-DCs 及び Mo-Ms において、CytD 処理前に抗原と共同培養した後、24 時間及び 48 時間後に、サイトカインの発現は上昇したが、その一方で、CytD 処理後に抗原と共同培養した場合には有意に抑制された。Mo-Ms での IL-10 発現は、CytD 処理後やや抑制されたが、処理前の水準とほぼ変わらなかった。

## 【0070】

5. 豚における非正常的に過発現された先天性免疫反応及び FMD ワクチン予防接種による T 細胞の疲弊の経路 (exhaustion pathway) の誘導

抗原が媒介する豚 APC の刺激及び豚 DCs 及び Ms の食作用による抗原のエンドサイトーシスにもかかわらず、牛に比べて、豚における免疫反応がより低い原因を明らかにするため、本発明者らは FMD 抗体陰性動物からナীব牛及び豚 PBMCs を分離して RNA-Seq を遂行した。

## 【0071】

以上の手順に従って、牛と豚の免疫反応を比較したところ、生体内で FMD ワクチン接種によって誘導された牛と豚の免疫反応の根本的な違いが確認された (図 6a ~ 図 6c)。自然状態で、牛の先天性免疫反応はよく制御されて維持されることに対し、豚では非正常的に過剰活性化された (図 6a の b、c)。結果的に、FMD ワクチン接種は、家畜で正常な免疫反応を誘導する反面、T 細胞の疲弊の経路 (TBX21、NEAT1、NEAT3、NEAT5、EOMES、PRDM1、BCL6 及び PDCD1) に関する遺伝子の発現は、豚で有意に増加した (図 6b)。特に、TLR/CDs 及び CLR 信号伝達経路に関する遺伝子の発現分析は、牛で IL23A 及び IL23R 発現が FMD ワクチン接種によって効果的に誘導されたことを立証した。IL23A は、豚で過発現パターンを示したが、IL23R 発現は観察されなかった (図 6c)。

## 【0072】

< 実験例 1 > FMD ワクチンアジュバントとしての非典型的 T 細胞アゴニストは、マウスの初期、中期及び長期免疫を誘導する。

APC を刺激しないで T 細胞を直接活性化させることで強力な細胞性免疫反応を誘導する

ために、新規なFMDワクチンアジュバントとして、T細胞、iNKT細胞、MAIT細胞を含む非典型的T細胞のアゴニスト及び典型的T細胞のアゴニストの利用可能性を、対象(目的)動物である豚における実験の前にマウスで評価した。また、オイルエマルジョンのないワクチンでも初期、中期及び長期免疫反応を効率的に誘導し、FMDV感染時の宿主保護効果があるかどうかを評価した(図7a)。

#### 【0073】

対照群と比べて、S P - O E L I S Aによる抗体力価は、T細胞アゴニスト(イソペンチルピロリン酸三リチウム塩、I P P ( I ) )、( E ) - 1 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 2 - プテニル 4 - ピロリン酸リチウム塩、H M P ( H ) )、i N K T細胞アゴニスト( - ガラクトシルセラミド、 - G a l c e r ( G ) )の投与後、ワクチン接種後7日( d p v )で有意に高かった。力価は、また、14 d p vでMAIT細胞アゴニスト(6 - ホルミルプテリン(6 - F o r m y l p t e r i n ) ( F ) )投与群で増加された。典型的T細胞アゴニスト( R O R T ( R ) )について、抗体力価は、28 d p vで非典型的T細胞アゴニストのそれと同程度であった。すべての実験群において、抗体力価は168 d p vまで対照群のそれより有意に高かった(図7b)。

#### 【0074】

ウイルス中和抗体(VN)力価は、S P - O E L I S Aによる抗体力価と類似した傾向を示した。T細胞アゴニスト(I)、T細胞アゴニスト(H)及びiNKT細胞アゴニスト(G)投与群は、7 d p vで中和抗体力価がおおよそ100倍増加し、また、MAIT細胞アゴニスト(F)投与群でも14 d p vで高い水準のVN力価が見られた。28 d p vにおいて、VN力価は、T細胞アゴニスト(I)及びiNKT細胞アゴニスト(G)投与群で最も高かった。VN力価は、ブースティング後56 d p vで最大値を示し、すべての非典型的T細胞アゴニスト投与群は、168 d p vで対照群より有意により高い中和抗体力価を維持した(図7b)。84及び168 d p vで実施したFMDV(100LD<sub>50</sub>のO/VET/2013)チャレンジテストでは、すべてのアジュバント処理群が100%の生存率(図7c)を示し、体重変化はほとんどなかった(図7d)。したがって、非典型的T細胞アゴニストを含有するFMDワクチンは、マウスで初期、中期及び長期免疫の誘導に強力な影響を及ぼすことが確認された。

#### 【0075】

<実験例2> 非典型的T細胞アゴニストは、豚PBMCsの強力な細胞増殖を誘導する。インキュベーション後、12時間及び36時間の時点で、FMD抗体陰性生成動物から分離された豚ナイーブPBMCsにおいて、非典型的T細胞アゴニストにより媒介される細胞増殖が観察された(図8a)。実際の試験ワクチンと類似した条件を提供するために、FMD血清型O(O/TWN/97-R)抗原を非典型的T細胞アゴニストと共に投与した。細胞増殖は次の順に高く現われた: 抗原+T細胞アゴニスト(H)>抗原+iNKT細胞アゴニスト(G)>抗原+MAIT細胞アゴニスト(F)>抗原+T細胞アゴニスト(R)>抗原+T細胞アゴニスト(I)>抗原単独(図8b)。

#### 【0076】

<実験例3> 非典型的T細胞アゴニストは、豚で非正常的な先天性免疫反応を改善してAPC刺激なしに強力な免疫反応を誘導するT細胞を直接的に活性化する。豚で強力な細胞性免疫反応を誘導することで、牛に比べて低い免疫原性を克服して豚で提起されている様々な問題に対する解決策を提供すべく、PRR sリガンドでDCs及びM sのようなAPCを刺激することで、T細胞を間接的に活性化させて免疫反応を誘導するシステムと、非典型的T細胞アゴニスト及びT細胞アゴニストによってT細胞を直接的に刺激して免疫反応を誘導するシステムとを比較した。ナイーブPBMCsをFMD抗体陰性(seronegative)豚から分離し、抗原+PRRリガンド(レシキモド(R848、TLR-7/8アゴニスト)及びトレハロース-6,6-ジベヘナート(TDB、Mincleアゴニスト); TDB及び環状ピス(3'-5')ジグアニル酸(c-di-GMP、STINGアゴニスト)若しくは抗原+非典型的T細胞アゴニスト(T細胞アゴニスト、I; T細胞アゴニスト、H; iNKT細胞アゴニスト、G; MA

10

20

30

40

50

I T細胞アゴニスト、F)または抗原+ T細胞アゴニスト、R、または抗原単独で処理して、12時間後にPBMCsを収集して、総RNAをTRIzol Reagent (Invitrogen)及びRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて製造社が推奨する方法によって抽出、RNA-Seqを実施して、免疫増強剤媒介性の細胞性免疫反応及び関連遺伝子の発現プロファイルを確認した(図9a~図9e)。

【0077】

TLR/CD5シグナル伝達関連遺伝子の発現プロファイルは、PRRリガンドがTLR-7/8、cGAS及びRUNX3の発現を誘導し、従来の非典型的T細胞アゴニストは、TBK1、RUNX1、IL23A及びIL23Rの発現に有意に影響を及ぼしたことを示した(図9aのa)。CLRシグナル伝達経路は、PRRリガンド処理と比べて典型的細胞アゴニストで処理することにより、著しく誘導された。IL23A及びIL23Rは、特に非典型的T細胞アゴニストの中でiNKT細胞アゴニスト(G)及び典型的T細胞アゴニスト(R)処理されたグループで高く発現された(図9aのb)。T細胞の疲弊の経路の関連遺伝子の発現は、PRRリガンド及び非典型的T細胞アゴニスト処理によって改善された(図9aのc)。Th1、Th2、Th9、Th17、Th22、Tfh、pTreg及びtTreg細胞での遺伝子発現は、PRRリガンド処理されたグループと比べて、非典型的T細胞アゴニスト及び典型的T細胞アゴニストで処理されたグループで有意に増加された。また、IL23A及びIL23R発現が増強されたし、LTA、STAT4、CCL17、CCL22、IL10、RORA、CCL20、IL17A、IL17F、IL1及びIL1発現も、T細胞アゴニスト処理によって増加された(図9aのd、図9bのe~h、図9cのi~k)。特に、M1、M2a、M2b、M2c、M2d及びDCsでの遺伝子発現は、APC刺激PRRリガンド処理と比べて、非典型的T細胞アゴニスト及び典型的T細胞アゴニスト処理によって著しく向上した。さらに、CD80、CD86、CCL1、CCL2、CCL3、CCL17、CCL22、IL1、IL23A、TNF、IL1R2、TGM2、CXCL10、CXCL16及びCD14の発現が顕著に増加した(図9cのl及び図9dのm、n、図9eのo~q)。NK細胞において、非典型的T細胞アゴニスト及びT細胞アゴニスト処理によるITGB2及びIFNAR2遺伝子の発現の増加が観察された(図9eのr)。

10

20

【0078】

[謝辞情報]

課題固有番号：1545019609

課題番号：B-1543386-2019-21-03

課題管理機関名：農林畜産検疫本部

研究事業名：農林畜産検疫検査技術開発

研究課題名：ノンオイルタイプの長期免疫誘導が可能な次世代豚口蹄疫ワクチンプラットフォーム構築

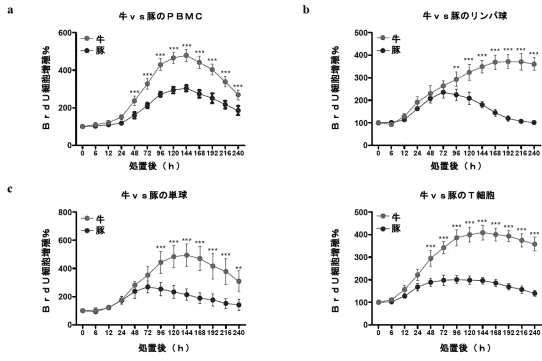
30

40

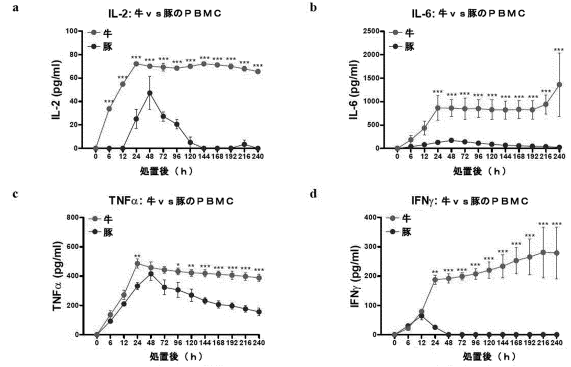
50

【図面】

【図 1】

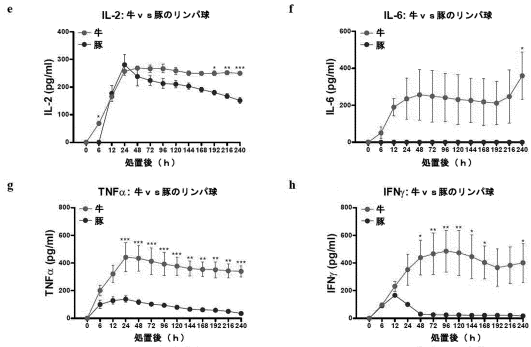


【図 2 a】

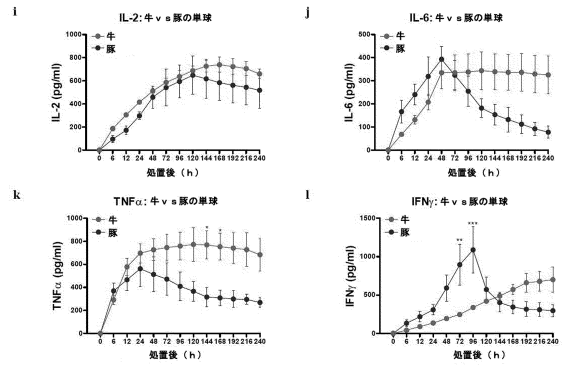


10

【図 2 b】



【図 2 c】



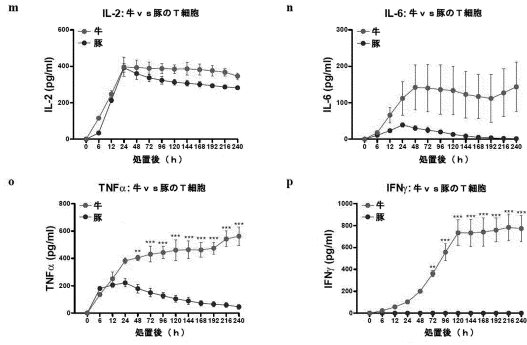
20

30

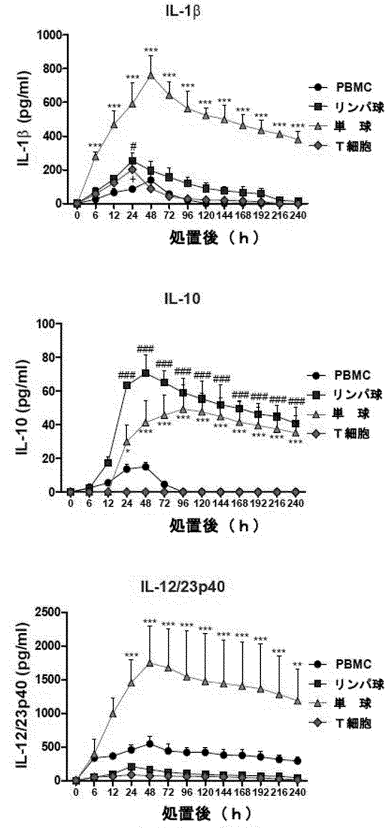
40

50

【 2 d 】



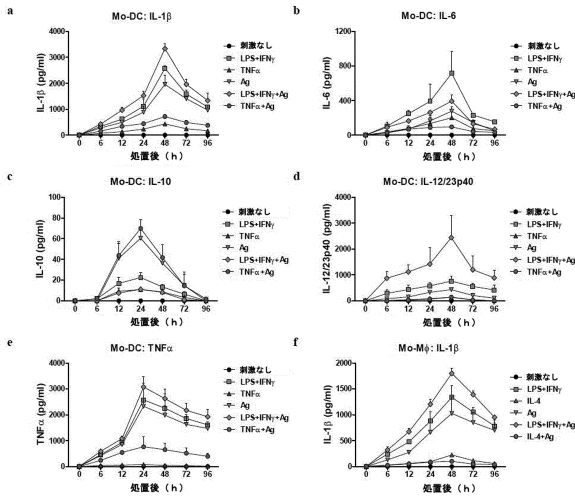
【 3 】



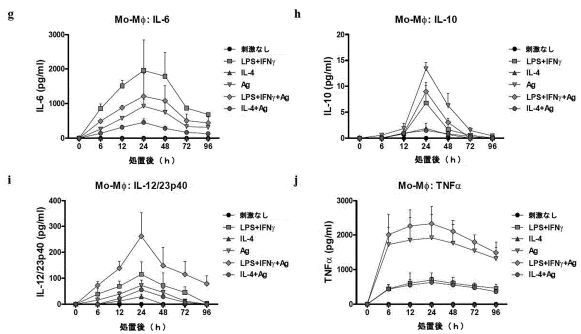
10

20

【 4 a 】



【 4 b 】

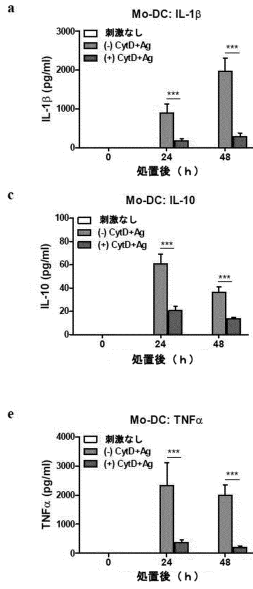


30

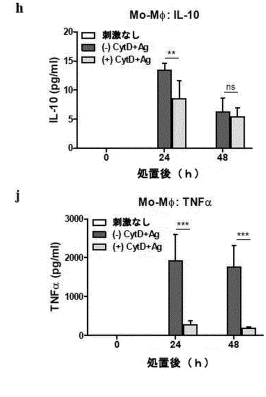
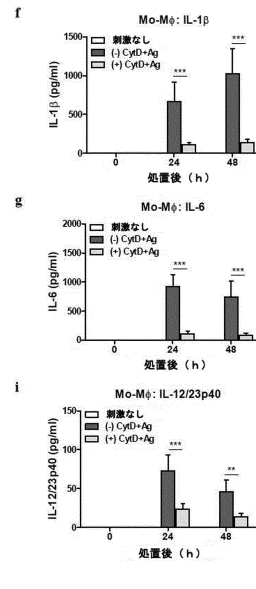
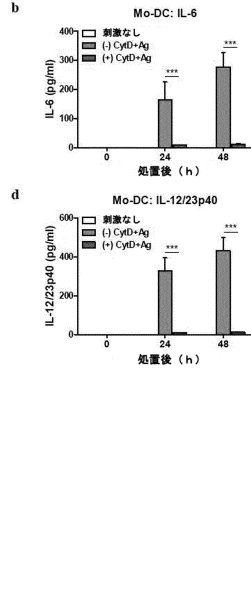
40

50

【 5 a 】

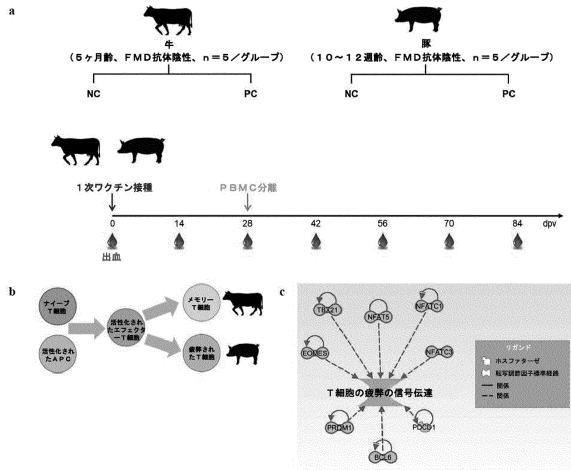


【 5 b 】

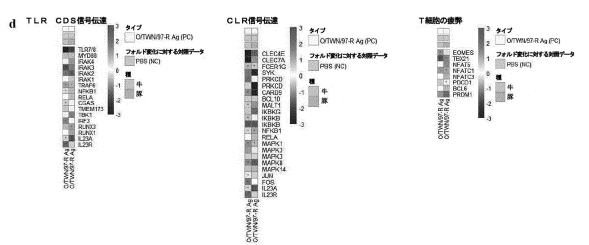


10

【 6 a 】



【 6 b 】



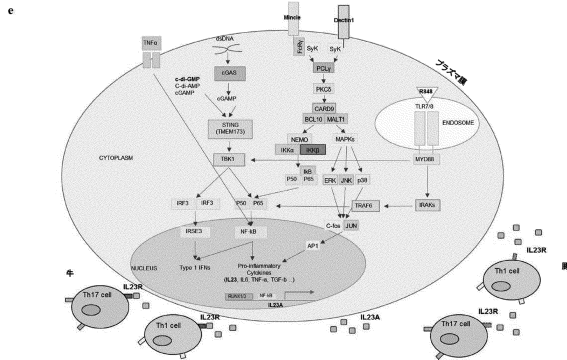
20

30

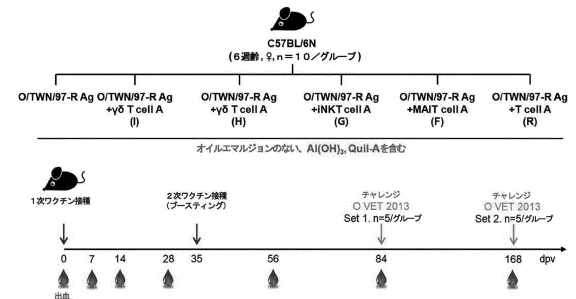
40

50

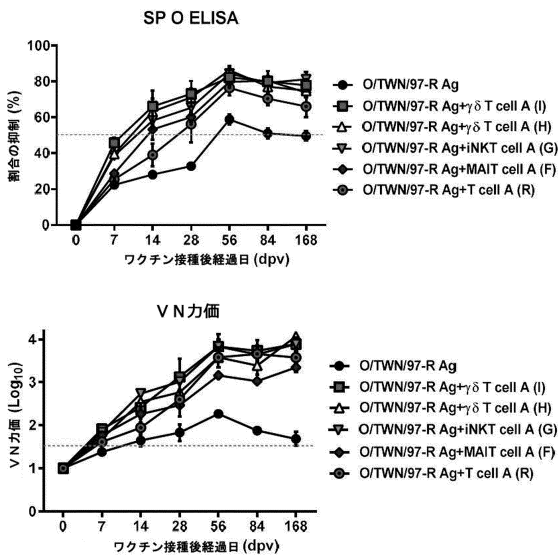
【図 6 c】



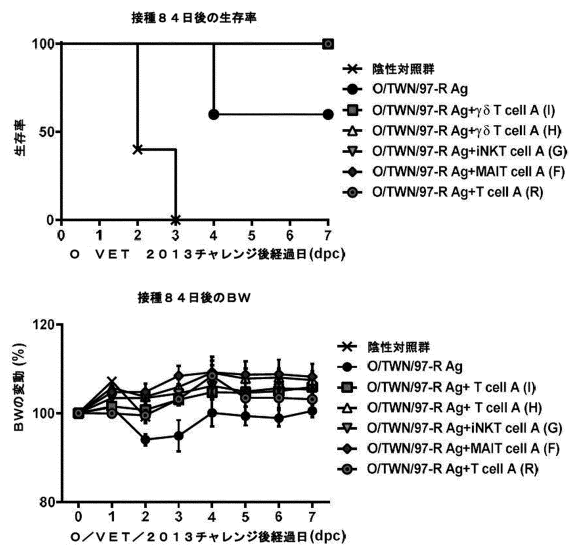
【図 7 a】



【図 7 b】



【図 7 c】



10

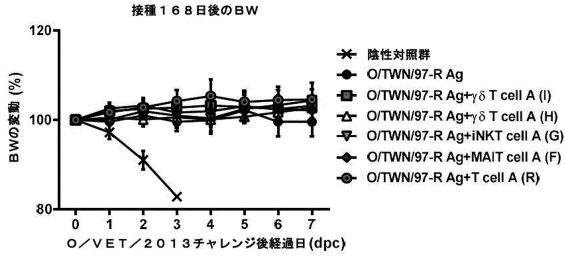
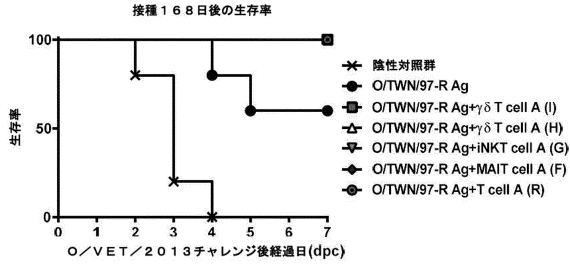
20

30

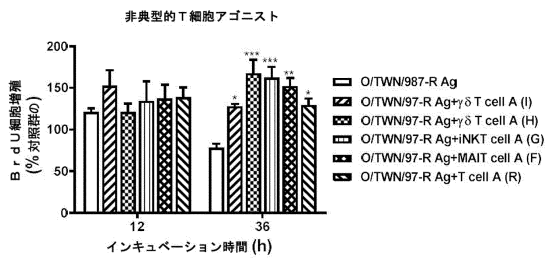
40

50

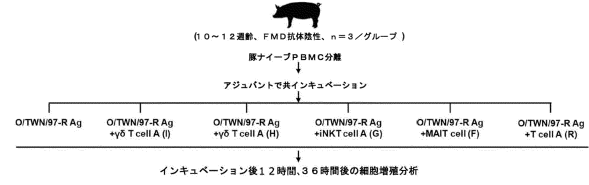
【 図 7 d 】



【 図 8 b 】

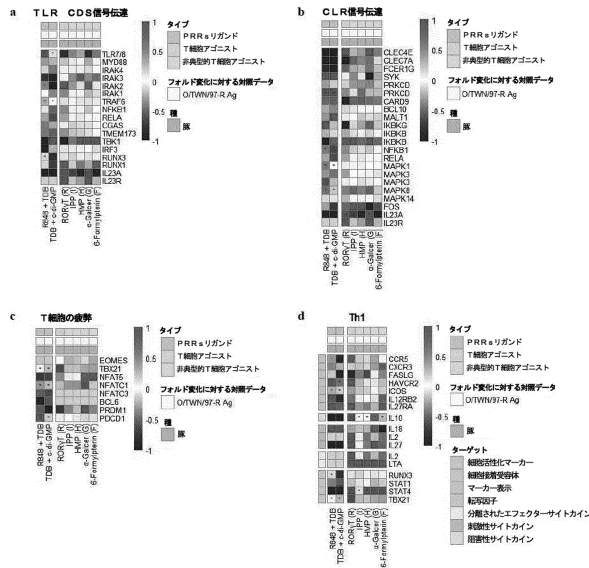


【 図 8 a 】



10

【 図 9 a 】



20

30

40

50



## フロントページの続き

- 06ドン 406ホ
- (72)発明者 チョ ヒョン ドン  
大韓民国、39660 キョンサンブクト、キムチョンシ、ヒョクシン 1口、75、103ドン  
1014ホ
- (72)発明者 キム ス ミ  
大韓民国、34899 テジョンシ、ジュング、ケベクロ1615ボンギル、34、115ドン 1  
903ホ
- (72)発明者 キム ビョウン ハン  
大韓民国、06760 ソウルシ、ソチョグ、パンベソンヘンギル、1、101ドン 202ホ
- (72)発明者 パク ジョン ヒョン  
大韓民国、39660 キョンサンブクト、キムチョンシ、ヒョクシン 4口、46、105ドン  
2505ホ
- 審査官 川合 理恵
- (56)参考文献 特表2007-534743(JP,A)  
特表2009-507030(JP,A)  
Ke Wen et al., Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2012年  
, Vol.35, No.4, Pages 289-301  
H.-H. Takamatsu et al., Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006年, Vol. 11  
2, Pages 49-61  
H.-H. Takamatsu et al., Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006年, Vol. 11  
2, pages. 49-61
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
A61K 39/00  
A61K 39/135  
A61K 39/39  
A61K 31/66  
A61P 37/04  
A61P 31/14  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(ST  
N)