

令和元年6月19日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16068

研究課題名(和文) 粘膜アジュバント、ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンの作用機序の解明

研究課題名(英文) Understanding the mechanisms of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD) in mucosal adjuvanticity

研究代表者

日下部 峻斗 (Kusakabe, Takato)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ワクチン・アジュバント研究センター・プロジェクト研究員

研究者番号：20794035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：現在、ニードルフリーで注射型ワクチンよりも防御効果があるとされるアジュバント添加の経鼻型ワクチンが注目されている。我々はこれまでマウスを用いてヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン(HP-β-CD)が経鼻型ワクチンの効果を高める物質(粘膜アジュバント)として有用であることを見出した。本研究ではこのHP-β-CDが一過的な細胞死を誘導しIL-33を放出させ、そのIL-33によって免疫反応を高めていることが明らかになった。また、その効果は経鼻と皮下への投与において全く違う作用機序であり、ワクチン効果におけるアジュバントの選択と投与経路の重要性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺や鼻腔局所の粘膜免疫に関して、局所の細胞がどのような働きをしているのかについては未だ不明な点が多い。そのような背景において、本研究では、粘膜アジュバントのメカニズムの一つとしてIL-33が関与していることを見出した。本発見はIL-33を介したアジュバント物質としては初めてとなる。また、IL-33は近年アレルギーの分野で注目を浴びているサイトカインであるが、本研究では感染防御効果に寄与するという利点があるということでIL-33の役割の多様性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Vaccinology has focused on non-living vaccines, which are more stable and safety than live-attenuated vaccines but often show limited immunogenicity. Vaccine adjuvants are traditionally used to augment and modulate the immunogenicity of vaccines. We previously reported that hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD), a widely used pharmaceutical excipient to improve solubility, can be used effectively as an adjuvant for influenza vaccine in both subcutaneous and intranasal administration. However, the molecular mechanisms of adjuvanticity of HP-β-CD hasn't been investigated in detail. In this study, we observed HP-β-CD to release of IL-33 but not elevated in other vaccine adjuvants. Furthermore, our data suggest that IL-33/ST2 signaling is responsible for the adjuvant effect of HP-β-CD by intranasal administration. Our study suggests that the understanding of administration route and tissue-specific immune responses are critical for the design of unique vaccine adjuvants.

研究分野：ワクチン学・粘膜免疫学

キーワード：アジュバント 粘膜アジュバント シクロデキストリン ワクチン DAMP IL-33 経鼻 作用機序

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

呼吸器感染症は、全世界での罹患率と死亡の原因において2番目に多い疾患である。特に新型コロナウイルスやウイルス性の呼吸器感染症病原体は、人々の生命および健康に重大な影響を与えるおそれがあり、感染予防のワクチン開発が急務となっている。近年、針を使わず防御効果が高いとされる経鼻型ワクチンが注目され、実際に国外において弱毒生ワクチンの季節性インフルエンザワクチンが使用されている。しかし、弱毒生ワクチンは保管に条件があり、安全面において問題があるため、アジュバントを添加したより安全な不活化ワクチンの開発が行われている。現在、粘膜アジュバントとしてヒトに臨床応用されているものはなく、現在承認されているもしくは開発中のアジュバントを粘膜アジュバントとして試みられている。しかし、既に臨床応用されているアラムや粘膜アジュバントとして強力なコレラトキシンは生体内動態や副作用といった観点から使用できない。そのため、有効かつ安全な粘膜アジュバントの開発が急務とされている。

我々はこれまでに次世代アジュバントの開発研究を行ってきた。その過程で、溶解剤として使用されているHP-β-CDが皮下投与での効果的なワクチンアジュバントとして機能を有することを見出した(J Immunol 2015)。また、さらにマウスにおいて経鼻投与でもアジュバント効果を示すことを見出した(Vaccine 2016)。HP-β-CDはすでに医薬品の溶解剤や安定化剤としてさまざまな投与経路・製剤にも用いられており、安全性の高い物質であり、新規粘膜アジュバントとして有効性が高いと考えられる。現時点においてHP-β-CDの粘膜アジュバントとしての詳細な作用機序に関して明らかになっておらず、安全性を理解するうえでも、作用機序の理論構築は課題である。

これまでに我々はHP-β-CD投与によりダメージ(傷害)関連分子パターン(Damage associated molecular patterns: DAMPs)を放出することで、免疫の活性化が起きている、

免疫活性化に重要で、Toll様受容体(TLR)などのさまざまな自然免疫受容体の下流のシグナル伝達体であるMyD88とよばれるアダプタータンパク質がアジュバント効果に寄与している、ことを明らかにしている。これらの結果から我々は、HP-β-CDにさらされた鼻腔や気道の上皮細胞によって放出されたDAMPsの成分がMyD88の上流シグナルの受容体に認識され、免疫が活性化されてアジュバント効果を示していると考えている。そこで、本研究ではHP-β-CDをマウスに経鼻投与したときのアジュバント活性に関する詳細な分子メカニズムや細胞の作用機序に関しての機能解析を行い、新規粘膜アジュバントの開発に重要なアジュバント効果のメカニズムについて解明することにより、実用化に向けての理論基盤の構築をすることを目標とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は経鼻投与によるHP-β-CDのアジュバント作用機序についての研究を行い、呼吸器感染症に効果のある粘膜ワクチンの開発に展開するための基盤となる知見を得ることである。具体的にはどのようなDAMPsの成分が関与し、どの受容体が認識し、どのように局所もしくは全身免疫の活性化が起きているのかを明らかにする。さらにどの細胞が作用機序に関与しているかどうかを解析する。

3. 研究の方法

研究室で所有している種々の免疫関連遺伝子欠損マウスを用いて、アジュバント効果に寄与する遺伝子・シグナル伝達経路の特定を行った。免疫方法に関しては、マウスに一週間間隔で抗原とアジュバントを同時に添加したものを2回経鼻投与で免疫を行った。最後の免疫の一週間後に血清もしくは気管支肺胞洗浄液、鼻腔洗浄液を回収し、その抗原特異的なIgGやIgA抗体価を測定することで全身性免疫応答や局所の免疫応答をアジュバント効果として評価した。ポジティブコントロールには一般的に臨床で使用されているアラム(アルミニウム塩)や臨床では使用されていないが強い免疫応答を誘導するコレラトキシンを使用した。遺伝子欠損マウスには代表的な自然免疫受容体であるToll様受容体(TLR)やRIG-I様受容体(RLR), NOD様受容体(NLR), C型レクチン受容体(CLR)に関する受容体もしくはその下流のシグナル伝達体や炎症に関与しているIL-1ファミリーサイトカインなどをターゲットしたものを使用した。また、免疫後の肺組織標本作製し、アジュバント効果に寄与する因子がどの細胞から産生されどの細胞を制御しているのか解析した。さらに明らかになった遺伝子欠損マウスを用いてインフルエンザ感染マウスモデルを作成し、感染後の体重減少や生存率を観察することで抗体産生だけでなく実際に感染防御効果があるのかを検証した。

4. 研究成果

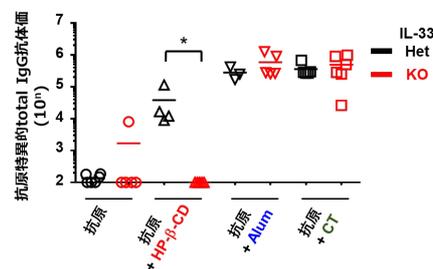


図2. IL-33依存性はHP-β-CD投与と特異的な作用機序である
I/33ヘテロとノックアウトマウスに抗原とともにアジュバントを経鼻投与し、その後の血清中の抗原特異的な抗体価を測定した。Alum:アルミニウム塩、CT:コレラトキシン

様々な遺伝子欠損マウスを用いて HP-β-CD のアジュバント効果を検証したところ、IL-33 さらにはその受容体である ST2 欠損マウスにおいて経鼻投与の HP-β-CD による抗原特異的な抗体産生が消失した。一方で、他の IL-1 ファミリーサイトカインや上皮細胞が産生するサイトカインの欠損マウスでは抗体産生の消失は認められなかった。さらに、q-PCR や ELISA 法を用いて IL-33 遺伝子発現・産生を調べたところ、HP-β-CD 経鼻投与群における BALF や肺のライセート中の IL33 が一過的に増加していることがわかった。次に HP-β-CD 経鼻投与後の肺組織を観察した。すると、サーファクタントプロテイン C (SP-C) ポジティブ細胞において IL-33 の染色が観察された。このことから HP-β-CD 経鼻投与後に一過的に IL-33 が肺上皮細胞から放出され、それがアジュバント効果に寄与していることが示唆された。

さらにアラムやコレラトキシンの経鼻投与、HP-β-CD の皮下投与における IL-33 のアジュバント効果への寄与を調べたところ、どの実験においても IL-33 の寄与は認められなかった。これは IL-33 を介したシグナル伝達経路が HP-β-CD 特異的な反応であり、さらに HP-β-CD のアジュバント効果は肺と皮下への投与において全く違う作用機序を示すと考えられる。最後にインフルエンザ感染マウスモデルを作成し、インフルエンザワクチン投与した IL-33 遺伝子欠損マウスの感染後の生存率を観察した。すると、HP-β-CD 経鼻投与の IL-33 欠損マウスはヘテロマウスに比べ著しく生存率が低下した。すなわち、IL-33 のシグナル経路は HP-β-CD 経鼻投与の感染防御の効果に寄与していることがわかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hayashi T, Momota M, Kuroda E, Kusakabe T, Kobari S, Makisaka K, Ohno Y, Suzuki Y, Nakagawa F, Lee MSJ, Coban C, Onodera R, Higashi T, Motoyama K, Ishii KJ, Arima H, DAMP-Inducing Adjuvant and PAMP Adjuvants Parallely Enhance Protective Type-2 and Type-1 Immune Responses to Influenza Split Vaccination, *Front Immunol*, 20(9): 2619 (2018), 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

Takato Kusakabe, Shingo Kobari, Etsushi Kuroda, Ken J Ishii, Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) act as IL-33-inducible adjuvant in intranasal administration, 第 47 回日本免疫学会学術集会, 2018

日下部峻斗, 小張慎吾, 黒田悦史, 石井健, 経鼻投与によるヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンは IL-33 依存的なアジュバント効果を示す, 第 22 回日本ワクチン学会学術集会, 2018

Takato Kusakabe, Shingo Kobari, Etsushi Kuroda, Ken J Ishii, The mode of action by which hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) functions as a vaccine adjuvant, 3rd International Society of Vaccine Asia Meeting, 2018

Takato Kusakabe, Etsushi Kuroda, Ken J Ishii, IL-33 regulates the adjuvant effect of hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) in the lung, 6th International

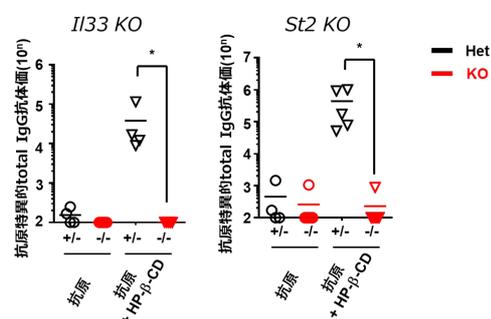


図 1. HP-β-CD のアジュバント効果は IL-33/ST2 依存性を示す I133, st2 ヘテロとノックアウトマウスに抗原とともに HP-β-CD を経鼻投与し、その後の血清中の抗原特異的抗体価を測定した。

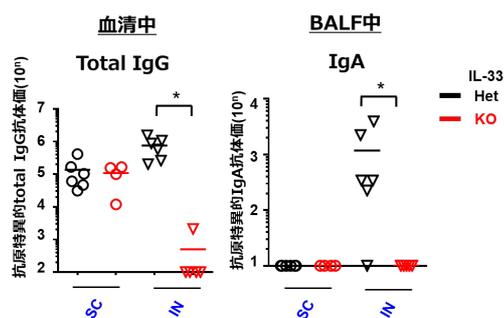


図 3. IL-33 依存的なアジュバント効果は HP-β-CD 経鼻投与時のみで見られる I133 ヘテロとノックアウトマウスに抗原とともに HP-β-CD を皮下もしくは経鼻投与し、その後の血清中の抗原特異的抗体価を測定した。

Cytokine & Interferon Society, 2018

日下部峻斗, 小張慎吾, 黒田悦史, 石井健, ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン経鼻投与におけるアジュバント作用機序の解析, 第 25 回日本免疫毒性学会 学術年会, 2018

Takato Kusakabe, Etsushi Kuroda, Ken J Ishii, Clinical development of Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin (HP-β-CD) as a vaccine adjuvant, MODERN VACCINE ADJUVANTS FORMULATION 2018, 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等