

令和 元年 9 月 3 日現在

機関番号：24402

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2018～2018

課題番号：17KK0196

研究課題名（和文）新生児・乳児に特化した舌下粘膜ワクチンアジュバントの分子基盤の解明

研究課題名（英文）Development of sublingual mucosal vaccine adjuvant for neonates and infants

研究代表者

徳原 大介（TOKUHARA, Daisuke）

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60448751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,600,000円

渡航期間：9.5ヶ月

研究成果の概要（和文）：マウスの骨髄由来樹状細胞にzymosanあるいはLPSを添加し16時間培養し、ミトコンドリアの呼吸機能をFlux analyzerを用いて解析した。LPSは時間の経過とともにミトコンドリアの呼吸機能を阻害したのに対して、zymosanは16時間後まで経時的に呼吸機能を阻害せず維持することがわかった。これまでの基盤研究での成果から、zymosanは新生児の抗原提示細胞の機能を効果的に増強することがわかっているが、そのメカニズムとして、zymosanが抗原提示細胞のミトコンドリアの呼吸機能を阻害せずに細胞機能の効果的な維持・増強に働き、免疫増強効果を発揮しているのではないかと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳幼児に特化したワクチンを開発する上で重要な点は有効性に加えて安全性である。これまでの我々の研究成果から、zymosanが乳幼児に特化した舌下ワクチンアジュバントとして有用であることを明らかにしてきたが、今回の国際共同研究によって、そのメカニズムの一端が明らかとなった。すなわち、zymosanは抗原提示細胞の呼吸機能を阻害せず維持することによって抗原提示機能を維持できる可能性があり、細胞障害性を示さないことで安全性を担保していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined mitochondrial respiratory spare capacity of murine bone marrow-derived dendritic cells after 16 hours of co-culture with zymosan or LPS by means of Flux analyzer. As results, LPS inhibited mitochondrial oxygen consumption rate (OCR), whereas zymosan didn't impair the OCR until 16 hours of stimulation. We have so far elucidated that zymosan enhanced the functions of neonatal antigen-presenting cells. Flux analyzer examination indicated that effectiveness of zymosan as vaccine adjuvant may be mediated via the maintenance of mitochondrial function of antigen-presenting cells.

研究分野：粘膜免疫学、小児感染症学

キーワード：ワクチン アジュバント 自然免疫 Toll様受容体 抗原提示細胞

1. 研究開始当初の背景

世界における5歳未満の乳幼児の死亡者数は年間630万人にのぼり、死亡原因の46%を感染症が占める。したがって乳幼児の感染症に対する効果的な予防戦略の構築は世界的に重要な課題であり、予防戦略の要として安全かつ効果的なワクチンの開発が常に求められている。現在国内で承認されている約20種類のワクチンのうち3分の2は乳幼児（多くは乳児期に接種）を対象としているが、そのうちBCG以外のすべてのワクチンが複数回（2～4回）の接種を必要としている。成人と乳幼児の両群で接種されるインフルエンザウイルスやコレラなどのワクチンに関して接種回数を比較した場合においても、乳幼児は成人よりも複数回のワクチンを必要とすることから、乳幼児における現行ワクチンの免疫誘導効果が成人と比較して低いことが示唆される。

これまで研究代表者は、東京大学医科学研究所の清野宏教授とともに、小児の感染症に対するワクチン開発に取り組み、ワクチン抗原をイネ種子であるコメに発現させた室温保存可能なコメ型経口コレラワクチンの開発を進め、成熟マウスにおける有効性を報告した¹⁾。同ワクチンは小腸の免疫誘導組織であるパイエル板から効果的に取り込まれ防御免疫を誘導することができるが、幼若マウスと成熟マウスにおける同コメ型ワクチンの免疫誘導効果を比較すると、幼若マウスは成熟マウスよりも多くの接種回数を必要とすることがわかった。また、研究代表者らはロタウイルスに対する予防抗体も開発したが、その研究過程において、乳幼児の下痢症の重要な原因であるロタウイルスは、幼若マウス(生後5日目)には感染を成立し下痢を呈するものの、成熟マウスには感染しないことを知見として得ている²⁾。このように、乳幼児や幼若マウスは成人や成熟マウスと比較して感染症に罹患しやすく、ワクチンによる免疫誘導効果が低い。乳幼児が成人よりも数多くの種類のワクチンを必要とし、今後もRSウイルスやノロウイルスなどに対する新しいワクチンが必要となることを考えれば、少ない接種回数で効果的に防御免疫を乳幼児、特に乳児に付与できるワクチンの開発基盤を構築する必要がある。

乳幼児に特化したワクチン開発のキーとなる点はデリバリーシステム(経口や経鼻など)とアジュバントの2点と考えられる。デリバリーシステムに関しては、これまでの我々の研究成果から舌下経路による免疫が呼吸器と消化管の両粘膜組織へ効果的に防御免疫を付与できることを明らかにしており、乳幼児モデルの幼若マウスにおいても免疫誘導効果が得られることを実証している。一方、ワクチン抗原に対する免疫細胞の応答を効果的に賦活化するアジュバントについては十分な探索が行えていない。乳幼児に特化したワクチン開発を進めるためには、乳幼児におけるワクチンの免疫誘導に関わるシステムを理解し、その理解に立脚した研究を展開することが理にかなっているが、乳幼児から研究に必要な血液や粘膜組織を採取することは侵襲性が高く倫理的に認められないため、乳幼児の免疫誘導システムの基礎的な探求は国内外でほとんど行われていない。これに対して本研究代表者は、出産後に廃棄される胎盤から採取できる臍帯血に注目し、臍帯血から分離した免疫細胞を用いた新生児の自然免疫探求ならびにアジュバント探索を展開してきた。そして、健常成人と比べて一様に低いと考えられていた新生児の自然免疫応答はToll様受容体(TLR)や抗原提示細胞の種類によって異なり、TLR2/6作動薬(zymosan)が抗原提示細胞の種類を問わず成人と同等のサイトカイン産生を惹起できることを明らかにした³⁾。したがって、我々はzymosanが乳幼児に特化した舌下ワクチンのアジュバントになりうると考えてその有用性や安全性を検証する研究を進めてきた。

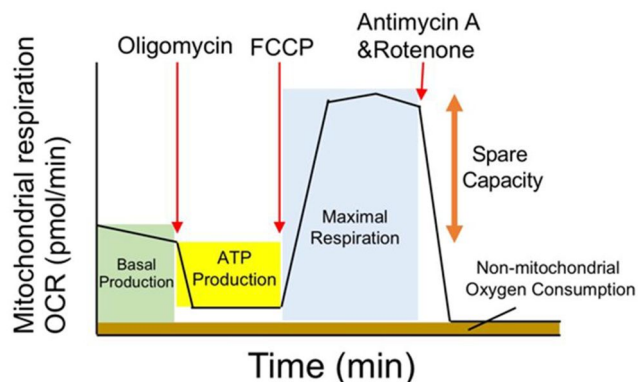
2. 研究の目的

本研究では、米国カリフォルニア大学サンディエゴ校消化器内科学のPeter B Ernst教授との

国際共同研究によって、zymosanのワクチンアジュバントとしての機能を発揮する基盤となるメカニズムを明らかにすることを目的とした。Peter B Ernst教授は免疫を制御するアデノシンならびにその受容体の世界的な権威であり、共同研究開始当初はアデノシン受容体やアデノシン合成分子（CD73など）のノックアウトマウスを用いることで、zymosanの免疫誘導をアデノシンの観点から解明しようと試みた。しかしそれらノックアウトマウスの繁殖状況が芳しくなく、研究を継続的に実施するだけのマウスを確保できない状況もあり、Peter B Ernst教授の研究室において導入されていたミトコンドリア解析機能装置であるFlux analyzerを用いた検討を進めることとした。ミトコンドリアは細胞のエネルギー源であるATPの産生装置であり、酸素消費によってATPを産生する。ワクチン抗原や病原微生物に対して適切に処理能力を発揮するためには、ミトコンドリアが活性化しATPを産生する必要があり、酸素消費量が上昇する。すなわち、ワクチン抗原を取りこみ獲得免疫への橋渡しをする樹状細胞が、アジュバントであるzymosanの刺激によって効果的に賦活化された場合には、樹状細胞におけるミトコンドリアの酸素消費量が障害されずに維持あるいは増強されることが望ましいと考えられる。したがって本研究では、zymosanによって樹状細胞ならびに内部のミトコンドリアがどのような影響を受けるかを明らかにすることで、zymosanのワクチンアジュバントとしての機序ならびに安全性を評価することとした。

3. 研究の方法

マウスの骨髄細胞から樹状細胞へ分化させ、Flux analyzer専用96穴プレートに播種し（ 1×10^6 cells/well）、TLR4作動薬（LPS, 100ng/mL）あるいはTLR2/6作動薬（zymosan, $10 \mu\text{g/mL}$ ）を添加し、5%CO₂ インキュベーターで16時間培養した。培養後、Seahorse XF98 Flux analyzerを用いてオリゴマイシン、FCCP、ロテノン等のミトコンドリア阻害剤による経時的なミトコンドリアの酸素消費量を測定した（下図）。



4. 研究成果

LPSは樹状細胞に対する刺激時間の経過とともにミトコンドリアの呼吸機能(spare capacity)を阻害したのに対して、zymosanは16時間後まで経時的に呼吸機能を阻害せず維持することがわかった。これまでの我々の基盤研究での成果から、zymosanは新生児の抗原提示細胞の抗原提示機能やサイトカイン産生を効果的に増強することがわかっているが³⁾、そのメカニズムの一つとして、zymosanが抗原提示細胞のミトコンドリアの呼吸機能を阻害せずに細胞機能の効果的な維持・増強に働き、抗原提示機能の増強に寄与し免疫増強効果を発揮しているのではないかと考えられた（投稿準備中）。本国際共同研究によって、新生児・乳児に特化したワクチンアジュバントとしてのzymosanの有用性に関する基礎的メカニズムの基盤を構築することができ、今後、臍帯血から分離した単球や樹状細胞のミトコンドリアを対象にしたzymosanの機能についても検

討する予定である。

<引用文献>

Tokuhara Daisuke, Yuki Yoshikazu, Nochi Tomonori, Kodama Toshio, Mejima Mio, Kurokawa Shiho, Takahashi Yuko, Nanno Masanobu, Nakanishi Ushio, Takaiwa Fumio, Honda Takeshi, Kiyono Hiroshi. Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:8794-9.

②Tokuhara Daisuke, Álvarez Beatriz, Mejima Mio, Hiroiwa Tomoko, Takahashi Yuko, Kurokawa Shiho, Kuroda Masaharu, Oyama Masaki, Kozuka-Hata Hiroko, Nochi Tomonori, Sagara Hiroshi, Aladin Farah, Marcotte Harold, Frenken Leon G, Iturriza-Gómara Miren, Kiyono Hiroshi, Hammarström Lennart, Yuki Y. Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. *J Clin Invest*. 2013;123:3829-38.

Nohmi Kyoko, Tokuhara Daisuke, Tachibana Daisuke, Saito Mika, Sakashita Yuko, Nakano Akemi, Terada Hiroyuki, Katayama Hiroko, Koyama Masayasu. Zymosan induces immune responses comparable with those of adults in monocytes, dendritic cells, and monocytederived dendritic cells from cord blood. *J Pediatr*. 2015; 167: 155-162.

5. 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tokuhara Daisuke, Kurashima Yohsuke, Kamioka Mariko, Nakayama Toshinori, Ernst Peter, Kiyono Hiroshi. A comprehensive understanding of the gut mucosal immune system in allergic inflammation. *Allergology International*. 2019; 68: 17-25. (査読有) DOI: 10.1016/j.alit.2018.09.004.

徳原 大介、清野 宏 . ワクチン開発— 過去から学び、次世代型への展開 . 小児内科 . 2018; 50: 1186-1194 . (査読無)

〔学会発表〕(計 4 件)

徳原 大介 . 乳幼児に特化した次世代型ノロウイルスワクチンの開発 . 第122 回日本小児科学会学術集会 (金沢) 2019 年

匹田 典克 , 徳原 大介 . 臍帯血由来単球におけるTLR を介した自然免疫応答の解析 . 第122回日本小児科学会学術集会 (金沢) 2019 年

Tokuhara Daisuke. Intratissue commensal bacteria in Peyer's Patches. 3rd Annual Symposium for the Center for Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine Development. (San Diego, USA) 2019 年

匹田 典克 , 趙 有季 , 橘 大輔 , 濱崎 考史 , 古山 将康 , 徳原 大介 . 小児消化管感染症に対するワクチンアジュバント開発 : 抗原提示細胞の免疫賦活物質探索 . 第15 回日本小児消化管感染症研究会 (大阪) 2019 年

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況（計 0 件）
なし

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：ピーター ビー アーンスト

ローマ字氏名：(PETER B Ernst)

所属研究機関名：カリフォルニア大学サンディエゴ校

部局名：消化器内科学

職名：教授

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：清野 宏

ローマ字氏名：(KIYONO hiroschi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。