

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006 年度～2008 年度
 課題番号：18790323
 研究課題名(和文) 肺サーファクタントを基にした新人工ワクチンアジュバント：感染とアレルギー治療
 研究課題名(英文) A novel adjuvant that based on pulmonary surfactant.

研究代表者
 水野 大 (MIZUNO DAI)
 徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教
 研究者番号：70380061

研究成果の概要：インフルエンザをはじめとする経粘膜感染症やアレルギー治療に有用とされる経鼻ワクチンに関する研究を行った。経鼻ワクチンの効果を増強させるアジュバントとして見いだした、生体成分肺サーファクタントの有効成分を分析し、これを基に人工アジュバントの作成を行った。さらに肺サーファクタントは免疫担当細胞へワクチンを運び込む運搬体として働いている可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,000,000	0	1,000,000
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	240,000	3,540,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：経鼻ワクチン、インフルエンザ、ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

SARS や AIDS、インフルエンザなどそのアウトブレイクの可能性と経済的損失が危惧される経粘膜感染症の予防には、あらかじめ粘膜免疫機構を誘導する粘膜ワクチンが有用である。粘膜ワクチンは粘膜免疫を誘導すると同時に、血中の過剰な抗体産生を抑制する作用があることから、アトピーや食物アレルギー、あるいはシックハウス症候群の様な過剰免疫反応による疾病の治療にも有用であると考えられる。しかし通常粘膜では抗原提示能が皮下注射に比べ極めて弱く、強力なアジュバントを必要とする。しかしながらこれまでに開発されたアジュバントは大腸

菌毒素、コレラ毒素等毒素が多く、しかもその活性中心をつぶしてもヒトへの強い副作用が残ることが報告されており、ヒトに有効な粘膜ワクチンアジュバントは未だ開発されていない。我々がこれまでに見いだした牛肺サーファクタント中に含まれる生体アジュバント様物質を応用したヒト型合成粘膜アジュバントを開発することで、世界初の効果的な粘膜ワクチン法の実現を目指した。

2. 研究の目的

研究目的として、以下のようなことを明らかにしようと計画した。

(1)我々が見いだした牛肺サーファクタント

中のアジュバント様物質は、数種類のリン脂質および、肺サーファクタントに特異的な一群のタンパク成分からなる。これらに由来するヒト型の成分を精製・合成し、これらを用いてアジュバント活性に必要な最小構成単位を同定する。これを基盤に牛肺微量成分の影響を排除できる安全なヒト型合成抗原アジュバントの開発を行う。

(2)人工アジュバントの実用化に向けて、モデル動物実験により、経粘膜感染症の予防およびアレルギーの減感作療法の両側面から、粘膜ワクチンの有効性を検討する。

(3)このアジュバントの持つ免疫寛容に関与しうる粘膜 IgA 選択的な誘導から、IgA および IgG 両抗体産生の誘導への切り替えを可能にするアジュバント作用の理論的根拠を明らかにすることにより、今後の広範な応用研究の基盤とする。

3. 研究の方法

ウシ肺サーファクタント中に含まれるアジュバント有効成分の探索を行った。これまでの解析結果から脂質成分および、脂質膜結合型と思われる 2 種のタンパクが関与している可能性が考えられた。ゲルろ過によりウシ肺サーファクタントから 2 種のタンパク成分をそれぞれ単離精製し、これらを用いて粘膜アジュバント作用に対する寄与を比較検討した。ウシ肺サーファクタントの脂質成分組成を模した混合脂質を作成し、これにウシ肺サーファクタントから精製したタンパク成分を混合した、人工肺サーファクタント素材を作成した。これら人工肺サーファクタント素材をインフルエンザワクチンと混合、マウスに経鼻接種を行った。二次免疫 2 週間後のマウス気道粘膜における抗インフルエンザ IgA の誘導を ELISA により測定した。これを指標として、その免疫増強作用の評価を行った。

有効成分として同定されたタンパク成分に対して、有効部位の同定を試みた。アミノ酸配列を切りつめた誘導体を作成し、これを材料とした人工肺サーファクタント素材を作成した。人工肺サーファクタント素材をインフルエンザワクチンと混合、マウスに経鼻接種を行った。二次免疫 2 週間後のマウス気道粘膜における抗インフルエンザ IgA の誘導を指標として、その免疫増強作用の評価を行った。

ウシ肺サーファクタントおよびワクチンを混合した電子顕微鏡観察を行った。経鼻ワクチンの免疫担当細胞への取り込み効率を、マウス骨髄より調製した樹状細胞をモデルとして検討した。蛍光標識したワクチンを樹状細胞へ添加し、一定時間後の細胞をフローサイトメトリーにより測定した蛍光強度を指標として評価を行った。前出の方法により

見いだされた有効成分を最小構成単位とした人工肺サーファクタント素材についても同様の方法により、評価を行った。

4. 研究成果

ウシ肺サーファクタントには主成分として、リン脂質と脂肪酸からなる脂質成分および、脂質膜結合型、膜貫通型の低分子タンパクが含まれている。この 2 種の低分子タンパク成分を、ゲルろ過によりウシ肺サーファクタントから単離精製することに成功した。肺サーファクタントの脂質成分組成を模した混合脂質にウシ肺サーファクタントから精製したタンパク成分を混合した、人工肺サーファクタント素材をインフルエンザワクチンと混合、マウスに経鼻接種を行った。二次免疫 2 週間後のマウス気道粘膜における抗インフルエンザ IgA の誘導を指標としてその免疫増強作用の評価を行ったところ、2 種のタンパク成分のうち、膜貫通型タンパクを材料とした素材においてウシ肺サーファクタントとほぼ同程度の免疫増強作用が認められた。一方、膜結合型のタンパク成分を材料とした時には有意な免疫増強作用は認められなかった。さらにヒト肺サーファクタントの膜貫通型タンパク全配列を持つ合成ペプチドを脂質に混合した人工ヒト型肺サーファクタント素材においてもウシ肺サーファクタントと同様の免疫増強作用が認められた。これらの結果から肺サーファクタントの免疫増強作用には、膜貫通型の肺サーファクタント成分タンパクが必要であることが示された。

次に肺サーファクタント免疫増強作用の必須成分として同定された、この膜貫通型肺サーファクタントタンパクの増強効果に対する有効領域の探索を行った。膜貫通型タンパク C 末端の膜貫通 α ヘリックス領域を切り詰めた誘導体を作成、サーファクタント脂質成分組成を模した混合脂質にこれを混合した切り詰め型人工サーファクタント (切詰型素材) を作成した。この切詰型素材をインフルエンザワクチンと混合、マウスに経鼻接種を行った。二次免疫 2 週間後のマウス気道粘膜における抗インフルエンザ IgA の誘導を指標として免疫増強作用の評価を行ったところ、切詰型素材の免疫増強作用は、天然肺サーファクタントに比べて有意に低くなることが明らかとなった。さらに我々は、タンパクと脂質膜との結びつきを助けるアンカーとして、上記 C 末端切り詰め型タンパクの N 末端をパルミトイル化した誘導体を材料とした「パルミトイル化素材」を作成し、同様にマウスへの経鼻ワクチン接種による免疫増強作用の比較検討を行った。パルミトイル化素材は天然肺サーファクタントと同等の免疫増強作用を示した。膜貫通型肺サーファ

クタンタンパクの膜貫通 α ヘリックス領域の切り詰めによる免疫増強作用の消失は、タンパク N 末端のアルミトイル化により回復することが示され、膜貫通型肺サーファクタンタンパクがその効果を発揮するためには、脂質膜に膜貫通型肺サーファクタンタンパクが結合されることが必要であると示唆された。

サーファクタンとワクチンを混合した経鼻ワクチンの電子顕微鏡観察を行ったところ、経鼻ワクチン液中でサーファクタンはその膜上にワクチンを結合したリポソーム状の形態をとることが明らかとなった。このことからサーファクタンの免疫増強作用の機序には、サーファクタンリポソームを運搬体とした抗原デリバリーがあるのではないかと考えた。これを明らかにするために、マウス骨髄より調製した樹状細胞をモデルとした検討を行った。蛍光標識したワクチンを樹状細胞へ添加し、一定時間後の細胞をフローサイトメトリーにより測定した蛍光強度を指標として評価を行ったところ、サーファクタンにより細胞へのワクチンの取込量が増加することが明らかとなった。また、免疫増強作用の必須成分である膜貫通サーファクタンタンパク成分を材料とした人工サーファクタンを用いて樹状細胞への蛍光標識ワクチンの取込を検討したところ、天然サーファクタンと同様のワクチン取込増進が認められた。サーファクタンによる免疫増強に抗原提示細胞へのワクチン取込の増進が関わっていることが示され、また、ワクチン取込増進には有効成分である膜貫通サーファクタンタンパクの寄与があると考えられた。

本研究において基盤となった牛肺サーファクタンを用いた経鼻ワクチン接種法は、従来の毒素等を用いた副作用等のリスクの高い方法とは異なり、生体成分をアジュバントとすることで安全に使用できるワクチン接種法となりうる。また、その有効成分の同定を行ったことで、これをモデルとした人工アジュバントの開発を行うことが可能となった。人工アジュバントの材料は、例えばサーファクタンタンパクのアミノ酸配列をヒト型で作成できるなど、異種動物に由来するタンパク成分を排除することでアレルギー等のリスクを軽減し、連続投与が可能となりうる。こういったことからアレルギー治療等への応用も期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Fujimoto C, Kido H, Sawabuchi T,

Mizuno D, Hayama M, Yanagawa H, Takeda N, Evaluation of nasal IgA secretion in normal subjects by nasal spray and aspiration., *Auris Nasus Larynx.*, 査読有, 6, 2009, 300-3004

2. Kido H, Mizuno D, Takei T, Nasal vaccines, *Nippon Rinsho.*, 査読無, 66, 2008, 1881-1887

3. 木戸 博, 水野 大, 武井 恒知, 経鼻投与型インフルエンザワクチン, *総合臨床*, 査読無, 57, 2008, 2628-2633

4. 木戸 博, 水野 大, 西野 真紀, 白木 孝行, 武井 恒知, 肺サーファクタンの粘膜アジュバント作用, *臨床免疫・アレルギー科*, 査読無, 46, 2006, 411-415

5. Mizuno D, Kubo I, Ide M, Ichinomiya T, Kido H, Modified pulmonary surfactant is a potent adjuvant that stimulates the mucosal IgA production in response to the influenza Virus Antigen., *Journal of Immunology*, 査読有, 176, 2006, 1122-30

[学会発表] (計 5 件)

1. (木本 貴士), 水野 大, 福田 明穂, 武井 恒知, 品原 和加子, 木戸 博, 人工合成ヒト肺サーファクタンタンパク C のアジュバント活性に必要なペプチド配列の探索, 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学学会年会合同大会, 2008 年 12 月 10 日, 兵庫

2. (福田 明穂), 澤淵 貴子, 品原 和加子, 水野 大, 木戸 博, 現行インフルエンザワクチンの鼻腔粘膜 IgA 誘導能と, 感染者と非感染者の鼻腔粘膜 IgA 量の検討, 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学学会年会合同大会, 2008 年 12 月 10 日, 神戸

3. 木戸 博, (福田 明穂), 木本 貴士, 武井 恒知, 品原 和加子, 水野 大, インフルエンザ感染を左右する気道粘膜免疫の重要性と, 生体成分粘膜ワクチンアジュバントを用いた経鼻ワクチン開発, 第 12 回日本ワクチン学会 学術集会, 2008 年 11 月 8 日, 熊本

4. (Mizuno D), Takei T, Nishino M, Shinahara W, Kimoto T, Fukuda A, Kido H, SP-C is the essential component for the adjuvant activity of Surfacten., 第 30 回日本分子生物学学会年会・第 80 回生化学会大会, 2007 年 12 月 13 日, 神奈川

5. (Mizuno D), Ide-Kurihara M, Ichinomiya T, Kubo I, Takei T, Nishino M, Usuki T, Kido H, Modified pulmonary surfactant is a novel antigen vehicle for influenza virus antigen to nasal-associated lymphoid tissues., 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006 年 6 月 20 日, 京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 大 (MIZUNO DAI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教

研究者番号：70380061