

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2007 ～ 2009 年度

課題番号：19591979

研究課題名（和文） 上気道における免疫監視、免疫制御誘導の解明

研究課題名（英文）Mucosal immunity in the upper respiratory tract and vaccine development

研究代表者

鈴木 正志 (SUZUKI MASASHI)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：60211314

研究成果の概要（和文）：

Flt3L (fms-like tyrosine kinase receptor-3 ligand)は、樹状細胞の分化増殖を促進させる作用を有することがわかっている。免疫応答の誘導や制御において、樹状細胞は中心的役割を担っているため、樹状細胞をターゲットにした免疫療法やワクチンは効果的であると考えられる。Flt3L の鼻粘膜樹状細胞、および鼻粘膜免疫応答への影響について検討した。マウスに対しリコンビナント Flt3L 10 μ g を経鼻的もしくは経腹腔的に投与し、5 日後に鼻粘膜を採取し、免疫組織化学およびフローサイトメトリーにて樹状細胞について解析した。次に Flt3L 投与後のマウスに対して、インフルエンザ菌の P6 外膜タンパクにて経鼻免疫を行ない、抗原特異的免疫応答について解析した。その結果、経鼻的もしくは経腹腔的 Flt3L 投与後、粘膜免疫誘導組織である NALT (nasal-associated lymphoid tissue)中の CD11c⁺樹状細胞が増加した。T 細胞、B 細胞への影響は明らかではなかった。経鼻免疫後、興味あることに経鼻的 Flt3L 投与では抗原特異的免疫応答を増幅させたのに対し、経腹腔的 Flt3L 投与ではトレランスが誘導された。このことから Flt3L による樹状細胞をターゲットにした新しい免疫療法・ワクチンの可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Dendritic cells (DCs) are essential for the induction of antigen (Ag)-specific immune responses, DC-targeted vaccination might be an effective strategy for the induction of the specific immune responses. Flt3 ligand (Flt3L) mobilizes and stimulates myeloid and lymphoid progenitor cells, and DCs. The purpose of this study is to investigate the effect of Flt3L on the induction of Ag-specific immune responses in nasal mucosa. Mice were administered with Flt3L 10 μ g intranasally or intraperitoneally, on day 0. After the Flt3L application, mice were further immunized with P6 outer membrane protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) 10 μ g on day 6, 13, and 20, and mice were killed on day 27. Control were not given Flt3L. The number and subset of DCs in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) were analyzed by flow cytometry. P6-specific antibody titers in nasal wash and serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and P6-specific antibody-producing cells were examined by enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. CD11c⁺ DCs increased in NALT after nasal Flt3L administration. In addition, P6-specific nasal IgA and systemic IgG titers were significantly elevated in nasally Flt3L-treated mice, possessing higher number of the specific IgA-producing in nasal mucosa. This study showed that nasal but not peritoneal application with a single dose of Flt3L induced increase of NALT DCs, resulted in enhanced local and systemic immune responses. These findings suggest that nasal application with Flt3L might be a useful vaccine strategy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,200,000	360,000	1,560,000
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：上気道、粘膜免疫、ワクチン

1. 研究開始当初の背景

近年、粘膜免疫が注目されており、種々の感染症に対する粘膜ワクチン開発のための研究が進められている。粘膜ワクチンは全身系IgGとともに粘膜系IgAを誘導できるという利点があり、粘膜面における病原微生物の侵入防御に効果的であると考えられている。抗原の投与ルートには経口、経鼻、経直腸、経膣などがあるが、経鼻投与により、上気道に抗原特異的免疫応答を最も有効に誘導できることから、上気道感染症に対しては経鼻ワクチンが有効であると考えられている。しかし粘膜ワクチンは多くの場合、死菌ワクチンであり、有効な免疫応答の賦活化のためには適当なアジュバントを必要とする。代表的な粘膜アジュバントであるコレラトキシン(CT)には毒性の問題があり、抗原のみならずアジュバントの選択も粘膜ワクチン開発にとって重要な問題である。我々はこれまでインフルエンザ菌(nontypeable *Haemophilus influenzae*; NTHi)の菌株共通抗原であるP6外膜蛋白を抗原とし、CTをアジュバントとして経鼻免疫を行なうことで、鼻咽腔のみならず中耳にもP6特異的免疫応答が誘導され、実験的中耳炎モデルにおいても抑制効果があることを報告している。また最近ではCTに代わりうるアジュバントとしてCpG DNAを用いてP6特異的免疫応答を安全かつ有効に誘導しうることを報告している。CpG DNAはtoll-like receptor (TLR) 9のリガンドであり、TLR9の主な表出細胞は樹状細胞とB細胞である。樹状細胞は免疫ネットワークを多方面から制御し、免疫応答の誘導や制御において中心的役割を担っているため、このように樹状細胞をターゲットにした免疫療法やワクチンは効果的であると考えられる。

2. 研究の目的

fms-like tyrosine kinase receptor-3 ligand (Flt3L)は、Flt3 レセプターのリガンドであり、造血前駆細胞の増殖因子である。レセプターであるFlt3はCD34⁺骨髄前駆細胞に発現しており、リガンドであるFlt3Lはおもに骨髄stroma細胞から産生される。Flt3Lは樹状細胞に対しても作用を有しており、骨髄前駆細胞からの樹状細胞の分化促進作用や血中やリンパ組織中における樹状細胞数の増加作用を有することがわかっている。また最近ではFlt3LのcDNAプラスミドを経鼻ワクチンのアジュバントとして使用し抗原特異的免疫応答を誘導した研究も報告されている。Flt3Lの鼻粘膜樹状細胞および抗原特異的鼻粘膜免疫応答への影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) Flt3L投与

6週齢、雄、SPFのBALB/cマウスをすべての実験に使用した。リコンビナント・ヒトFlt3L (PeproTech EC, London) 10 μ gを経鼻的もしくは経腹腔的に投与した。経鼻投与はFlt3L 10 μ gをPBS 10 μ lに溶解し、両鼻腔に前鼻孔より5 μ lずつ投与した。経腹腔投与はFlt3L 10 μ gをPBS 100 μ lに溶解し、注射にて腹腔投与した。3、6、10日後にマウスを屠殺し、上気道における粘膜免疫誘導組織であるnasal-associated lymphoid tissue (NALT)を採取し、単核球を分離した。FITC標識抗マウスCD11c抗体、PE標識抗マウスCD11b抗体、Cy-Chrome標識抗マウスCD8 α 抗体(すべてBD Pharmingen, San Diego)にて染色し、フローサイトメトリーにて樹状細胞数およびそのサブセットについて解析した。

(2) P6経鼻免疫と特異的免疫応答の誘導

次にFlt3Lの抗原特異的鼻粘膜免疫応答へ

の影響について検討した。Flt3L 10 μ g を経鼻的もしくは経腹腔的に投与し (day 0)、投与後 6 日目から、週 1 回、計 3 回 (day 6, 13, 20)、P6 10 μ g にて経鼻免疫を行なった。P6 は我々の研究室にてインフルエンザ菌 (NTHi, strain 76) より精製したものを使用した⁴⁾。また、この経鼻免疫にはアジュバントは加えず、抗原の単独投与とした。コントロールは Flt3L 投与を行わずに P6 経鼻免疫を行なったマウスとした。最終免疫後 1 週間目 (day 27) にマウスを屠殺した。

血清、鼻腔洗浄液を採取し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて P6 特異的抗体価を測定した。また鼻粘膜、脾臓を採取し、単核球を分離し、enzyme-linked immunospot (ELISPOT) 法にて P6 特異的抗体産生細胞数を測定した。

(3) インフルエンザ菌注入

経鼻免疫のワクチン効果についても検討した。上記と同様に Flt3L 投与および P6 経鼻免疫を行ない、最終免疫後 1 週間目 (day 27) にインフルエンザ菌懸濁液 (NTHi, strain 76, 10¹⁰cfu/ml) 10 μ l を経鼻的にマウス鼻咽腔へ注入した (10⁸cfu/mouse)。細菌注入 24 時間後にマウスを屠殺し、鼻腔洗浄液を採取した。回収したサンプルを適宜希釈し、チョコレート寒天培地に播種した。37°C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養後、インフルエンザ菌のコロニー数を計測し、鼻咽腔インフルエンザ菌の生菌数とした。

4. 研究成果

(1) Flt3L 投与により NALT 中の CD11c⁺ 樹状細胞が頻度、絶対数ともに増加した。樹状細胞数の増加は Flt3L 投与後 6 日目がピークであった。経鼻投与、経腹腔投与のいずれにおいても樹状細胞の増加が認められたが、経鼻投与の方が増加の割合が大きかった (表 1)。樹状細胞の増加がピークであった Flt3L 投与後 6 日目において樹状細胞サブセット別に解析すると、興味あることに経鼻投与では CD8 α ⁺ 樹状細胞の増加が優位であった。一方、経腹腔投与では CD8 α ⁺ 樹状細胞の増加も認められたが、CD11b⁺ 樹状細胞の増加が著明であった。(2) これまでの結果から Flt3L 投与後 6 日目に NALT 中に最も樹状細胞が増加することが明らかとなったため、経鼻免疫はこの時点から開始することとした。P6 経鼻免疫により鼻腔洗浄液中の特異的 IgA ならびの血清中の特異的 IgG が増加した。P6 単独の経鼻投与でも特異的免疫応答は検出されたものの、そのレベルは低かった。あらかじめ Flt3L を経鼻投与することで鼻腔洗浄液中の特異的 IgA および血清中の特異的 IgG 抗体価の有意な上昇を認めた。また経鼻的 Flt3L 投与によって鼻粘膜中の特異的 IgA 産生細胞の増加も認めた。

経鼻的 Flt3L 投与が経鼻免疫によって誘導された P6 特異的免疫応答を増幅させたのに対し、経腹腔的 Flt3L 投与ではコントロールと差を認めず、その増幅効果は明らかではなかった。

(3) インフルエンザ菌注入後のクリアランスの検討では、P6 単独免疫群、経腹腔的 Flt3L 投与群では未免疫の場合と明らかな差を認めなかったが、経鼻的 Flt3L 投与群では鼻腔洗浄液中のインフルエンザ菌数の有意な減少を認め、鼻咽腔からのインフルエンザ菌のクリアランスが促進された。このことから経鼻的 Flt3L 投与と P6 経鼻免疫の組み合わせによりワクチン効果があることが明らかとなった。

樹状細胞は免疫応答の誘導において中心的役割を担っているため、樹状細胞をターゲットとすることは戦略上、合理的であると考えられる。我々は粘膜局所での樹状細胞の賦活化という狙いから、これまで CpG DNA を経鼻アジュバントに使用し、抗原特異的免疫応答を誘導し、その有用性を明らかにしている。今回は Flt3L の樹状細胞に対する分化増殖作用を利用し、粘膜局所で樹状細胞を増やすとどのように鼻粘膜免疫応答が修飾されるかについて検討した。その結果、経鼻的に Flt3L を投与することにより、NALT の樹状細胞が増加し、P6 経鼻免疫による抗原特異的免疫応答が増幅され、鼻咽腔からのインフルエンザ菌の排除も促進された。しかし経腹腔的 (全身的) Flt3L 投与では NALT の樹状細胞は増加したものの、抗原特異的鼻粘膜免疫応答は増幅されなかった。経粘膜的 Flt3L 投与の免疫賦活化作用が示唆されており、経鼻や経気管投与の報告がある。Flt3L の cDNA プラスミドを経鼻アジュバントとして用いた研究では、卵白アルブミン (OVA) とともに計 3 回経鼻投与し、OVA 特異的免疫応答を誘導している。今回の我々の研究では、Flt3L タンパクの 1 回投与のみで鼻咽腔から効果的にインフルエンザ菌を排除しうるような抗原特異的免疫応答を誘導しうることを明らかにした。経鼻的 Flt3L 投与の鼻粘膜免疫賦活化作用という点では一致している。鼻粘膜局所の樹状細胞を増やし、さらにその樹状細胞を賦活化するという考えから、Flt3L と CpG DNA の併用も有効であると思われる。我々の以前の研究では P6 と CpG DNA で経鼻免疫を行なった場合、鼻咽腔から効果的にインフルエンザ菌を排除しうるような特異的免疫応答を誘導するためには 3 回の経鼻免疫を必要とするが、経鼻的 Flt3L 投与後に P6 と CpG DNA で経鼻免疫を行なうと、2 回の経鼻免疫で十分な特異的免疫応答が誘導可能であった。ワクチン接種という観点から考えると、同じ効果が得られるのであればワクチン接種回数の軽減は臨床的に有益であると思われる。以上のこ

とから、経鼻的Flt3L投与は樹状細胞を介した上気道粘膜免疫の賦活化に有用であり、また経鼻的Flt3L投与とこれまで報告されているような経鼻ワクチンプロトコルを組み合わせることでより効率的な特異的免疫応答の誘導が可能になるものと思われる。今後の粘膜ワクチン開発において、Flt3Lは1つの武器になると思われる。

経粘膜的Flt3L投与が免疫を賦活化させることに対して、Flt3Lを全身投与した場合には、樹状細胞は増加するものの、その後の抗原投与の際、抗原単独ではトレランス（寛容）が誘導され、また抗原にアジュバントを加えて投与すると特異的免疫応答が誘導されることが報告されている。つまりFlt3Lは免疫増強作用と免疫寛容の誘導という全く相反する作用を有している。実際に気道アレルギーモデルに対してFlt3Lを全身投与することで気道過敏性が改善したという報告もあり、Flt3Lは樹状細胞を介した免疫賦活化と寛容誘導という相反する目的で使用されている。何故、Flt3Lの投与ルートが違えば後の免疫応答が異なるのかについて、局所のリンパ組織における樹状細胞を比較検討した研究はこれまでなく、樹状細胞サブセットの違いについても言及されていない。樹状細胞のユニークな特性として細胞系統の多様性と機能の可塑性が挙げられる。すなわち樹状細胞はその起源や属性によりミエロイド系とリンパ系に大別され、それぞれ異なる機能を有する（lineage heterogeneity）。その一方、同一系統の樹状細胞でもその成熟段階や刺激シグナルの種類に応じてその機能は修飾・改変される（functional plasticity）。粘膜免疫機構は分泌型IgA誘導のために全身系とは異なったユニークな特徴を有しているが、樹状細胞についても、粘膜系リンパ組織においては最低3種類の異なった成熟樹状細胞サブセットが存在することがわかっている。これらサブセットはCD11c、CD8 α 、CD11bといった表面抗原の違いによりミエロイド系（CD11c⁺、CD8 α ⁺、CD11b⁺）、リンパ系（CD11c⁺、CD8 α ⁻、CD11b⁻）、DN系（double negative; CD11c⁻、CD8 α ⁻、CD11b⁻）に分類される。ミエロイド系であるCD11b⁺樹状細胞はIL-10産生制御性T細胞（T_{reg}）を誘導する。リンパ系であるCD8 α ⁺樹状細胞はCD4⁺T細胞に抗原提示を行なう。これら2種類は同一パイエル板内においても存在部位が異なることもわかっている。粘膜系樹状細胞に関してはまだ十分に解析されておらず、研究が進められている段階ではあるが、これら3種類の樹状細胞が粘膜免疫に関与し、免疫と寛容という正と負の免疫応答を調節していると考えられている。今回の我々の研究では、経鼻的Flt3L投与と全身的Flt3L投与における鼻粘膜免疫応答の差が、Flt3Lによって粘膜免疫誘導組織NALT

に誘導された樹状細胞の違いによるものである可能性が示唆された。すなわち経鼻的および全身的いずれもFlt3L投与により、CD11c⁺樹状細胞の増加を認めたが、経鼻的投与ではCD8 α ⁺樹状細胞が優位に増加したのに対し、全身的投与ではCD11b⁺樹状細胞の著明な増加が認められた。このように機能的に異なった樹状細胞サブセットにより抗原投与後の粘膜免疫応答に差が生じているものと思われる。今後、粘膜系樹状細胞に加えて、T細胞との相互作用についても検討することで、さらに詳細なメカニズムが明らかになるものと思われる。結論として、経鼻的Flt3L投与は抗原特異的鼻粘膜免疫応答を増幅させたことからFlt3Lによる樹状細胞をターゲットにした新しい免疫療法・ワクチンの可能性が示唆された。

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 8件）

1. Kodama S, Hirano T, Noda K, Abe N, Suzuki M. A single nasal dose of fms-like tyrosine kinase receptor-3 ligand, but not peritoneal application, enhances nontypeable *Haemophilus influenzae*-specific long term mucosal immune responses in the nasopharynx. Vaccine 28: 2510-2516, 2010. (査読有)

2. Hirano T, Kodama S, Suzuki M. The role of toll-like receptor 4 in eliciting acquired immune responses against nontypeable *Haemophilus influenzae* following intranasal immunization with outer membrane protein. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 73: 1657-1665, 2009. (査読有)

〔学会発表〕（計 12件）

1. Kodama S, Hirano T, Suzuki M. Role of toll-like receptor (TLR) 4 and efficacy of TLR9 ligand in the middle ear protective immunity. 6th Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media. May 8, 2009. Seoul, Korea.

2. Kodama S, Hirano T, Suzuki M. A single nasal dose of Flt3L ligand enhances mucosal immune responses in the nasopharynx. 9th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media June 5, 2007. St. Pete Beach, Florida, USA

〔図書〕（計 0件）

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/ent/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 正志 (SUZUKI MASASHI)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：60211314

(2) 研究分担者

平野 隆 (HIRANO TAKASHI)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：20305056

児玉 悟 (KODAMA SATORU)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：40325717

(3) 連携研究者 なし