

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03384

研究課題名(和文)働き蜂から分泌される固有の中鎖脂肪酸による粘膜ワクチン創出基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of basic technology for creating mucosal vaccines using unique medium-chain fatty acids secreted by worker bees

研究代表者

三隅 将吾 (Misumi, Shogo)

熊本大学・大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター・教授

研究者番号：40264311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により働き蜂下咽頭腺より産生される10-HDAAによって、粘膜面に存在する抗原取組み細胞である「M細胞」の分化を誘導できるということを発見した。これは、これまでにない第3のM細胞分化メカニズムを示しており、実際に抗原特異的なIgAの産生を向上させることが、*in vivo*で証明でき、新規粘膜ワクチン技術の開発に寄与できたと考えている。また、M細胞標的分子TGDKを結合させたワクチン抗原をマウスに経鼻投与させて、実際に粘膜における抗原特異的IgAの産生が上昇していることが証明できたことから、より低容量の抗原曝露で十分な粘膜免疫を誘導できるプラットフォームを構築できると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義としては、長年M細胞分化モデルとして用いてこられたCaco-2細胞とRaji-B細胞の共培養モデルのM細胞分化メカニズムを明らかにした。その上で、10-HDAAによる腸管上皮細胞の処理はRANKの発現を上昇させるために、M細胞誘導が促されることが明らかとなった。

社会的意義としては、今般の新型コロナウイルス感染症のように経気道感染する場合に、本研究で開発された技術を用いて、粘膜において病原体特異的な免疫応答を誘導させることができれば、より効率的に病原体を体内に侵入させることを阻止できるワクチンの提供に繋がる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we discovered that 10-HDAA produced from the hypopharyngeal gland can induce the differentiation of "M cells", which are antigen-uptaking cells present on the mucosal surface. This indicates the third mechanism of M cell differentiation that has never been seen before. Furthermore, it was proved *in vivo* that it actually improved the production of antigen-specific IgA, which contributed to the development of new mucosal vaccine technology. On the other hand, it was proved that the production of antigen-specific IgA in the mucosa was actually increased by administering the TGDK-labeled vaccine antigen to the nasal tract of mice. These findings indicate that a platform capable of inducing sufficient mucosal immunity with lower doses of antigen exposure could be constructed.

研究分野：衛生薬学

キーワード：粘膜ワクチン

1. 研究開始当初の背景

本申請後に、国内における新興感染症やワクチンに対する国民の関心度は、大きく変わったと思われる。また、文部科学省は、国内のワクチン開発や生産体制を強化するために拠点となる大学を整備し、今後 10 年間にわたって研究費を支援する新たな事業に乗り出す方針を表明した。しかしながら、もともと新型コロナウイルス感染症が流行する前の日本は、「ワクチン後進国」などと指摘されてきた。日本の予防接種制度は、ようやく近年先進国並みに定期接種ワクチンの導入が進み、ワクチンにより VPD が増えつつあるという状況であったといえる。2018 年の麻疹の流行のように、海外からの流入を端とする感染症の発生事例は、過去にワクチンの接種を十分に受けることができなかった世代の対策が必至であることを示しており、国家安全保障の面からも検討が求められていた。つまり、その時点から本邦では、政府主導で感染症の発生動向を監視し、ワクチンを用いて子供や妊婦に対し効果的に感染症対策を講じるという戦略が明確化されると同時に、ワクチン未接種成人に対しても感染症対策を講じることが求められていた。歴史的には、日本では、戦後の「予防接種法」制定とともに 12 疾病のワクチン接種が義務化されたことで感染症による死者は大幅に減少したが、同時にワクチンによる健康被害も発生するようになった。特に、1989 年から開始された MMR ワクチンでは、ムンプスワクチンの成分による無菌性髄膜炎により国に対する訴訟等が相次いだ結果、わずか 4 年で中止されるという事態になった。このような背景を受け、ワクチンの負の側面ばかりが強調され国民の不安が増し、国は予防接種に消極的になり、1994 年の予防接種法改正により、接種要件が「義務」から「勧奨」接種へと緩和され、接種形態も「集団」から「個別」接種へと変わってしまったために、ワクチンの接種を十分に受けることができなかった世代が発生したという背景がある。したがって、本邦においてワクチンのメリットを国民が十分享受するためには、次の 3 点を改善する必要がある。

- 1) 科学的根拠に基づきワクチンの有効性を示し、国民に十分理解してもらう。
 - 2) 科学的根拠に基づきワクチンの安全性の向上に務め、予防接種率の向上につなげる。
 - 3) 予防接種をめぐる有害事象と副作用の区別の明確化に務め、ワクチン接種に伴う副作用に対して、救済制度の充実を図り、安心して予防接種を受けられるように制度を整備する。
- 上記のうち本研究では、1)および 2)に注目し、科学的根拠に基づきより有効性・安全を向上させた粘膜ワクチンを創製するための基本技術を開発することを目指す必要があった。

2. 研究の目的

- 1) 不活化インフルエンザウイルスに M 細胞標的分子 TGDK を標識するための方法を検討する。
- 2) TGDK 標識ワクチン抗原のトランスサイトーシス機構を明らかにする。
- 3) 10-HDAA および TGDK 標識インフルエンザウイルスの粘膜免疫誘導能を検討する。
- 4) 10-HDAA による「M 細胞」の分化誘導に関与するシグナル伝達機構を精査する。
- 5) 10-HDAA 誘導体および天然物由来 M 細胞分化誘導因子を探索する。

3. 研究の方法

1) 不活化インフルエンザウイルスに M 細胞標的分子 TGDK を標識する

不活化インフルエンザウイルスに TGDK を標識する。標識量は、プローブ添加量を調節して調節する。また、ラベル効率率は電気泳動およびウエスタンブロット解析で行い、SRD 試験によりワクチン抗原の品質管理を行った。

2) TGDK 標識ワクチン抗原のトランスサイトーシス機構の解析

TGDK は、霊長類 M 細胞から取込まれ、粘膜ワクチンによる抗原特異的 IgA の誘導を高めることを明らかにしてきた(J. Immunol. (2009) 182: 6061-70.)。1)で調製した TI 抗原を *in vitro* M 細胞分化モデル (Food Science & Nutrition, 3, 222-227 (2013))を用いて、トランスサイトーシス効率を評価した。

3) 10-HDAA および TGDK 標識インフルエンザウイルスの *in vivo* 評価

10-HDAA (100 nmol)および TGDK 標識インフルエンザウイルス(TI 抗原)(1.5 μg/匹)を

混合しマウスに経鼻投与後、血清と鼻腔洗浄液中の抗体価を ELISA で測定した。グループ A は 10-HDAA のみを投与したグループ。グループ B は TI 抗原のみを投与したグループ。グループ C は 10-HDAA と TI 抗原を同時投与したグループ。グループ D は 10-HDAA と TI 抗原を同時投与するとともに、以前の霊長類を用いた実験を参考に、TI 抗原を投与前 3 日間 10-HDAA のみを投与しておくグループ。

4) 10-HDAA による M 細胞の分化誘導に関するシグナル伝達機構の解明

10-HDAA の標的レセプター候補として脂肪酸受容体 GPR40, GPR43, GPR84, GPR120 を想定しており、それらのノックアウト Caco-2 細胞を、CRISPR-Cas9 システムを用いて作製後、M 細胞分化をマーカーである Spi-B および GP2 の発現変動を指標にデジタル PCR を用いて解析した。

5) 10-HDAA 誘導体および天然物由来 M 細胞分化誘導因子

天然物由来の 10-HDAA 誘導体（中鎖脂肪酸）をすでに 25 種類確保した。また、本研究では、天然物由来（植物、微生物）M 細胞分化誘導分子を効率的に探索するために、CRISPR-Cas9 システムを用いて NanoLuc knock-in Caco-2 cells を調製し、Spi-B および GP2 reporter assay を準備し、ハイスループットスクリーニングを行った。

4. 研究成果

1) 不活化インフルエンザウイルスに M 細胞標的分子 TGDK を標識する

不活化インフルエンザウイルスに TGDK を標識できた。TGDK のラベル化は、ウイルスの亜株ごとで違いが出るのがわかった。理由としては、HA を含むウイルス粒子外のタンパク質の糖鎖の程度が異なり、TGDK のラベル化効率が変わることが予想された。また、TGDK ラベル化は想定される一級アミン全てをラベルされるような条件でウイルスを処理すると、HA の抗原性に影響がでるために、適度なラベル化が求められると判断している。ラベルの程度は、すくなくとも *in vitro* M 細胞モデルからの取り込み効率を向上させるレベルでラベルするという判断に至っている。

2) TGDK 標識ワクチン抗原のトランスサイトーシス機構の解析

TGDK で不活化インフルエンザウイルスをラベル化すると *in vitro* M 細胞モデルで取り込み量が向上する (特願 2021-057382)。

3) 10-HDAA および TGDK 標識インフルエンザウイルスの *in vivo* 評価

TGDK 標識インフルエンザウイルス(TI 抗原)(1.5 $\mu\text{g}/\text{匹}$)をマウスに経鼻投与後、抗原特異的な IgA の産生量は上昇する(特願 2021-057382)。10-HDAA の効果は、投与量を再度調整して、再検討が必要となった。

4) 10-HDAA による M 細胞の分化誘導に関するシグナル伝達機構の解明

10-HDAA の標的レセプターは、未だ特定ができていない。その理由は、候補の GPCR 以外のパスイーイも M 細胞の分化に関与している可能性が出ているためである。投与量の違いにより、M 細胞分化に関するシグナルの伝わり方に差がでている可能性を考えてる。

5) 10-HDAA 誘導体および天然物由来 M 細胞分化誘導因子

構築したレポターアッセイ系の細胞の維持が難しい。現在までに、維持条件を確立したので、現在再度実験系のバリデーションを行って、スクリーニングをしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Isayama, T., Etoh, H., Kishimoto, N., Takasaki, T., Kuratani, A., Ikuta, T., Tatefuji, T., Takamune, N., Muneoka, A., Takahashi, Y., Misumi, S.	4. 巻 43
2. 論文標題 10-Hydroxydecanoic Acid Potentially Elicits Antigen-Specific IgA Responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull .	6. 最初と最後の頁 1202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00101.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高崎 稔大、岸本 直樹、井上 貴文、竹内 航輔、高宗 暢暁、三股 亮太郎、三隅 将吾
2. 発表標題 Tetragalloyl-D-Lysine Dendrimerによるワクチン抗原ラベルはMicrofold細胞のポドカリキシンを介した抗原取込みを促進する
3. 学会等名 第19回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高崎 稔大、岸本 直樹、井上 貴文、高宗 暢暁、三股 亮太郎、三隅 将吾
2. 発表標題 Tetragalloyl-D-Lysine Dendrimerによるワクチン抗原ラベルはMicrofold細胞からのワクチン抗原取込みを促進する
3. 学会等名 フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸本 直樹、中田 渚、高崎 稔大、谷 翼、三股 亮太郎、三隅 将吾
2. 発表標題 M細胞標的分子TGDKのインフルエンザ経粘膜ワクチン開発への応用
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中田 渚、岸本 直樹、三股 亮太郎、三隅 将吾
2. 発表標題 M細胞ターゲット分子のインフルエンザワクチンへの応用
3. 学会等名 第37回DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三隅 将吾
2. 発表標題 ウイルス感染の成立と宿主応答の分子基盤解明と予防・治療に関する研究
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三隅 将吾
2. 発表標題 M細胞分化誘導法の開発と粘膜ワクチン開発
3. 学会等名 第38回 日本薬学会九州山口支部大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野塚 渉、岸本 直樹、中田 渚、三股 亮太郎、三隅 将吾
2. 発表標題 M細胞標的分子TGDKは経鼻ワクチンのデリバリー機能とアジュバント活性を併せもつ
3. 学会等名 第25回 日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 経粘膜投与薬剤	発明者 三隅将吾、岸本直樹、三股亮太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-143948	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 没食子酸又は没食子酸結合化合物を含有する液剤	発明者 三隅将吾、岸本直樹、三股亮太郎、中田 渚、小野塚	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-207342	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計4件

産業財産権の名称 粘膜免疫賦活剤	発明者 三隅将吾、立藤智基、生田智樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、MY-180228-A	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 粘膜免疫賦活剤	発明者 三隅将吾、立藤智基、生田智樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、11201708536T	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 粘膜免疫賦活剤	発明者 三隅将吾、立藤智基、生田智樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、TW1719977B	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 粘膜免疫調整剤	発明者 三隅将吾、生田智樹、立藤智基、谷央子、井ノ岡 博	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6845548号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高宗 暢暁 (Takamune Nobutoki) (60322749)	熊本大学・熊本創生推進機構・准教授 (17401)	
研究分担者	岸本 直樹 (Kishimoto Naoki) (80756148)	熊本大学・大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学 研究センター・助教 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------