

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08514

研究課題名（和文）慢性閉塞性肺疾患の増悪をもたらす呼吸器感染症を予防するための経鼻ワクチン開発

研究課題名（英文）Development of an intranasal vaccine to prevent respiratory infections that cause exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.

研究代表者

中橋 理佳（Nakahashi, Rika）

千葉大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：80391887

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：COPDは喫煙による肺の炎症性疾患で、呼吸器感染症による急性増悪が問題となっている。この急性増悪に対して感染予防ワクチンが有効な手段と考えられるが、未だ万能なワクチンがない。本研究では、COPD疾患の増悪を左右するインフルエンザ菌および肺炎球菌を標的としたハイブリッド抗原を作製し、デリバリーシステムであるカチオン化ナノゲルと組み合わせた経鼻ワクチン開発を目指した。経鼻免疫したCOPDモデルマウスは、未免疫に比し、肺感染後のインフルエンザ菌数を減少させ、肺における炎症性細胞の浸潤を抑制した。すなわち、本経鼻ワクチンが、COPD患者における呼吸器感染症による重症化を予防可能なワクチンと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPDは、タバコの煙などを含む有害物質を長期にわたり吸入暴露することで生じる肺の炎症性疾患で、WHOによる2019年統計では、世界における死亡原因の第3位であり、年々増加傾向にある重大な疾患である。なかでも、呼吸器感染症が急性増悪を引き起こし病態や予後に大きく影響することが大きな問題となっており、本研究で目指す呼吸器感染症の予防ワクチンの創出は、この問題を大きく解決すると考えられ、社会的に意義深い。

研究成果の概要（英文）：COPD is an inflammatory disease of the lungs caused by smoking, and acute exacerbations due to respiratory tract infections are thought to be a severe problem. Vaccines that prevent infections are seen to be an effective means of treating these acute exacerbations, but there is still no universal and effective vaccine. In this study, hybrid antigens targeting *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*, which are known to induce COPD exacerbations, were produced, and combined with a novel delivery system, cationic nanogel, to develop a nasal vaccine. Intranasal immunization of the cationic nanogel vaccine on the COPD model mice reduced the number of *Haemophilus influenzae* after lung infection and suppressed the infiltration of the inflammatory cells in the lungs compared to unimmunized mice. These results suggest that our nasal vaccine can prevent severe lung inflammation caused by the respiratory infections in COPD patients.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：経鼻ワクチン 粘膜免疫応答 カチオン化ナノゲル 慢性閉塞性肺疾患 ドラッグデリバリーシステム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

COPD は、タバコの煙などを含む有害物質を長期にわたり吸入暴露することで生じる肺の炎症性疾患である。また、WHO による 2016 年統計では、COPD は世界における死亡原因の第 3 位であり、年々増加傾向にある重大な疾患である。その発症の最大の原因が喫煙とされているが、呼吸器感染症が急性増悪を引き起こし病態や予後に大きく影響することが大きな問題となっている (*N. Engl. J. Med.* 359:2355-2365, 2008)。実際、COPD 患者で最もよく検出され増悪に寄与している細菌として、NTHi と肺炎球菌が挙げられる。このような呼吸器感染症に対しては、ワクチン接種による予防が最も効果的な手段と考えられる。しかしながら、NTHi に対するワクチン自体存在せず、現行の肺炎球菌ワクチンは標的とする血清型に限られており血清置換のリスクに対応できる万能なものではない。従って、COPD 患者における疾患増悪の予防を目指した NTHi および肺炎球菌を標的としたワクチン開発は喫緊の課題と言える。

### 2. 研究の目的

本研究では、COPD 疾患の増悪を左右する NTHi および肺炎球菌の両者を標的としたハイブリッド抗原による経鼻ワクチン開発を目指す。ワクチン抗原は、NTHi の外膜蛋白である P6 および肺炎球菌表面蛋白である PspA を連結したキメラ蛋白とする。P6 は、すべてのインフルエンザ菌が共通で保有しアミノ酸配列レベルで菌株間において高い相同性を持つこと、PspA も同様にすべての肺炎球菌で発現しいずれも高い免疫原性を持つ。実際、申請者らによるこれまでの解析で、それぞれの単独抗原を用いて健常マウスにおける免疫応答および感染防御効果が示されていることから、キメラ蛋白によるハイブリッド抗原は、広範に NTHi および肺炎球菌感染をカバーする潜在性を持ち、本目的を達成するための有効性の高いワクチン抗原候補と考えられる。本ハイブリッド抗原を、当研究室で開発した経鼻ワクチンの新規デリバリーシステムであるカチオン化ナノゲル(cCHP ナノゲル)と混合して野生型マウスまたは COPD モデルマウスに経鼻免疫し、誘導される免疫応答の解析に加え、臨床単離のインフルエンザ菌株や肺炎球菌株を感染させた際の肺における炎症増強に対する防御効果の解析を実施し、重症化予防ワクチンとしての有効性を検証する。

### 3. 研究の方法

ワクチン抗原の作製のため、肺炎球菌 D39 株由来の PspA エピトープ配列に、NTHi S76 株の P6 細胞外領域を連結させた遺伝子を pET-20b ベクターにクローニング後、大腸菌に形質転換して蛋白質を発現させた。6M 尿素下で、His タグによるアフィニティ精製及び Sephadex G-100 カラムによるゲル濾過を組み合わせて蛋白精製した。なお、ムコポリサッカライドをほぼ完全に除去するため pyrogen-free 工程で行った (*Fish, Shellfish. Immunol* 24:506, 2008)。更に、6M 尿素から段階透析した PBS 溶解精製蛋白質と cCHP ナノゲルを混合し、40℃ で 1 時間処理することで抗原を cCHP ナノゲル内に包埋しワクチンとした (図 1)。

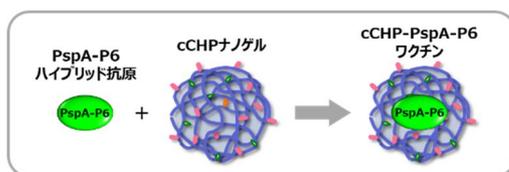


図1. ワクチンの作製方法

COPD モデルマウスは、喫煙モデルに比し短期間で作出可能なエラストーゼ誘導モデルを利用した。蛋白質分解酵素であるエラストーゼをマウスの鼻に注入すると、約 3 週間後に COPD の主な症状である肺気腫が形成される (*Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*

49:971-977, 2013)。そこで、エラストーゼを経鼻投与して 3 週間後に、経鼻免疫試験を実施した。本ワクチンによる免疫応答を解析するために、マウスに 10 µg のハイブリッド抗原を含む cCHP ナノゲルワクチンを、経鼻的に 1 週毎に計 3 回投与した。免疫後経時的に血清および鼻腔洗浄液を、一定期間

経過後に安楽死処置して肺洗浄液を回収し、抗原特異的な IgG および IgA を ELISA により解析した。さらに、予め、感染条件を決定した NTHi を経鼻感染させ、気管支洗浄液または肺組織サンプルを用いて、ハイブリッド抗原を用いた経鼻ワクチンによる防御効果を、肺の炎症を指標に評価した。

#### 4. 研究成果

COPD モデルマウスの作出は、蛋白質分解酵素であるエラスターゼ 0.3U を、マウスに 1 週おきに計 2 回経鼻的に肺へ注入し誘導する条件を見出した。エラスターゼの投与後、約 3 週間後に COPD の主な症状である肺気腫が形成されることを、肺組織切片を用いた HE 染色により確認した (図 2)。さらに、炎症に伴い、肺洗浄液中への好中球やマクロファージなどの細胞が顕著に浸潤してくることを FACS 解析で明らかにした。次に、COPD

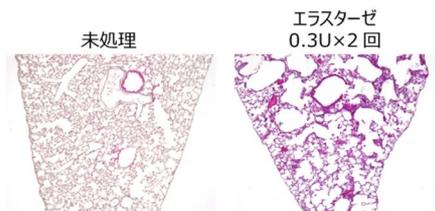


図2. エラスターゼの経肺投与により肺気腫が誘導された

モデルマウスに、cCHP ナノゲル経鼻ワクチンによる免疫を実施し、誘導されてくる抗原特異的抗体を ELISA 解析した。その結果、ハイブリッド抗原特異的な IgG が血中や肺洗浄液中に誘導されること、同様に抗原特異的な分泌型 IgA が鼻腔洗浄液中に誘導されることも確認された

(図 3)。以上から、cCHP ナノゲル経鼻ワクチンにより全身性および粘膜面の両方での免疫応答が誘導されることを確認した。次に、cCHP ナノゲル経鼻ワクチンによる COPD 増悪抑制効果を解

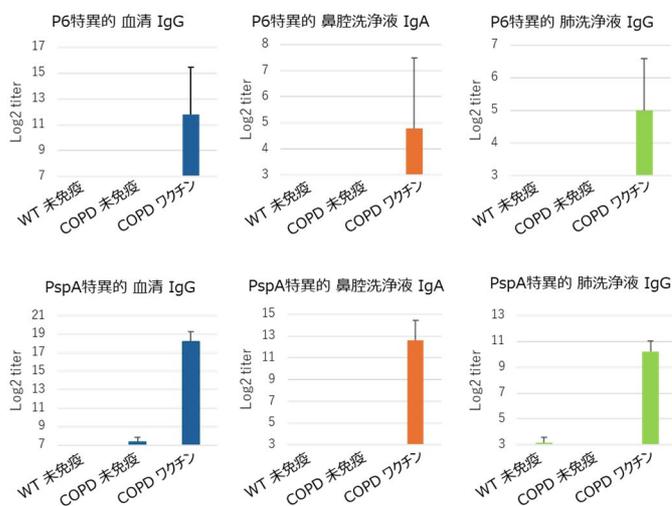


図3. 経鼻免疫によりCOPDモデルマウスで抗原特異的免疫応答が誘導された

析するため、COPD モデルマウスにおいて NTHi または肺炎球菌の感染実験を進めることにした。感染条件などを決める予備解析の結果から、経肺感染でコントロールしやすい NTHi 感染試験から着手した。COPD モデルマウスに cCHP ナノゲル経鼻ワクチンを投与し、特異的抗体価が誘導されていることを確認後、 $2.5 \times 10^6$  CFU の NTHi を経肺感染させた。感染後 1 日および 2 日において肺組織を摘出し、組織中の細菌数をチョコレート寒天上のコロニーに

て計測した。一方、肺組織中に浸潤する細胞を、細胞表面マーカーを指標に FACS 解析した。その結果、感染後 2 日にかけて、COPD 未免疫マウスの肺組織中に NTHi が多く検出されたが、一方ワクチン投与マウスでは、比較的細菌数が減少している傾向が観察された。次に、肺の炎症の指

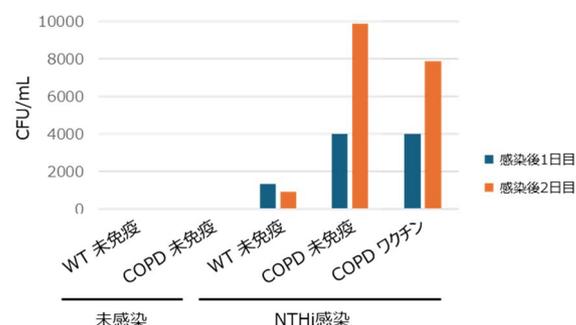


図4. NTHi経肺感染後の肺における細菌数 (コロニーカウント)

標となる好中球の浸潤レベルを見ると、野生型マウスに感染させた条件と比べ、COPD による炎症増大は観察されず、さらにワクチンによる浸潤抑制効果も見られなかった。一方、漏出マクロファージにおいては、特に NTHi 感染 2 日目において、野生型マウスにおける感染状況に比し、感染後の COPD マウスにおいて浸潤数が増したが、ワクチン投与マウスでは野生型レベルまで抑えられていること

がわかった。すなわち、ハイブリッド抗原と cCHP ナノゲルによる経鼻ワクチンが、COPD モデルマウスにおいて、感染後の細菌数を減少させ、肺における炎症増大を抑える可能性があることが示唆された。今後、肺炎球菌感染に対する本経鼻ワクチンによる肺炎増悪抑制効果の有無も含めさらなる詳細な解析が必要と考えられる。

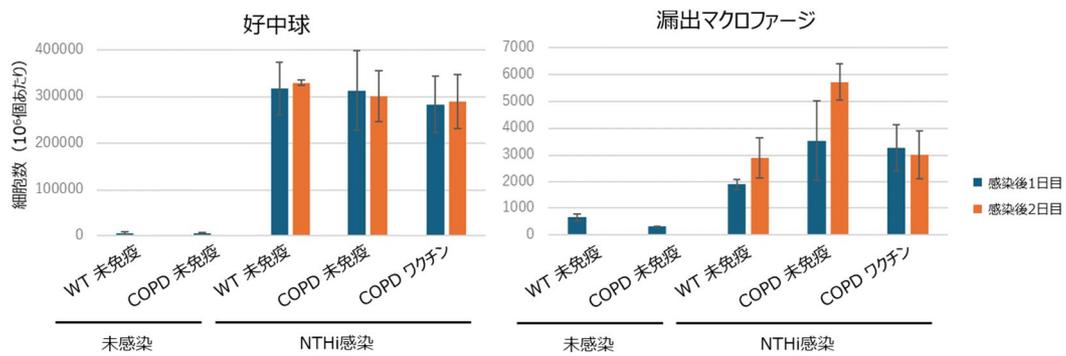


図5. NTHi経肺感染後の肺に浸潤する好中球または漏出マクロファージの細胞数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakahashi-Ouchida Rika, Mori Hiromi, Yuki Yoshikazu, Umemoto Shingo, Hirano Takashi, Uchida Yohei, Machita Tomonori, Yamanoue Tomoyuki, Sawada Shin-ichi, Suzuki Masashi, Fujihashi Kohtaro, Akiyoshi Kazunari, Kurono Yuichi, Kiyono Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Induction of Mucosal IgA-Mediated Protective Immunity Against Nontypeable Haemophilus influenzae Infection by a Cationic Nanogel-Based P6 Nasal Vaccine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 819859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.819859	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 -

1. 著者名 Nakahashi-Ouchida Rika, Fujihashi Kohtaro, Kurashima Yosuke, Yuki Yoshikazu, Kiyono Hiroshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Nasal vaccines: solutions for respiratory infectious diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Trends in Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 124 ~ 140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molmed.2022.10.009	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------