

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23229004

研究課題名(和文) 顎顔面免疫と生殖器免疫のクロストーク

研究課題名(英文) Immunological crosstalk between nasal and reproductive mucosal tissue

研究代表者

清野 宏 (Kiyono, Hiroshi)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：10271032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 165,200,000円

研究成果の概要(和文)：鼻粘膜への抗原投与は、鼻粘膜の免疫応答だけでなく、遠隔の粘膜面である生殖粘膜でも免疫応答が誘導されることから、この分子・細胞メカニズムの解明は効率的・効果的な生殖器免疫すなわちHIVやHSVなどの性感染症に対する新世代粘膜ワクチンの開発に繋がると考えられる。本研究では鼻粘膜を中心とした顎顔面免疫と生殖器免疫とのクロストークに関わる分子群の同定を目指し、新たな細胞遊走因子群の関与を明らかにした。さらに、経鼻免疫はその安全性についての課題が提起されていることから、申請者らが開発した新世代粘膜デリバリーワクチンとしてナノ粒子を用いたワクチンを用いて、その安全性についても検証した。

研究成果の概要(英文)：The antigen administration to the nasal mucosa induces not only the immune responses in the nasal mucosa but reproductive tissue even its distant parts in our body. Therefore, the elucidation of molecular and cellular mechanisms of the nasal-reproductive mucosal crosstalk would be connected for the development of next generation mucosal vaccine for sexually transmitted diseases caused by HIV and HSV. In this project, we aim to identify the responsible molecule for the crosstalk and finally and successfully identified the contribution of unique chemoattractant pathways. In addition, we confirmed the safety of the nasal vaccine with our novel mucosal vaccine developed by nanoparticles and found no dissemination of antigen to the brain in mice and monkey study and found its safety. These results collectively indicated the successful establishment of basic approval methods for the mucosal vaccine targeting immunological crosstalk between nasal and reproductive mucosal tissue.

研究分野：免疫学、粘膜免疫学

キーワード：粘膜免疫 経鼻ワクチン HSV2 アジュバント

1. 研究開始当初の背景

一個所の粘膜関連リンパ組織(MALT)に抗原投与することで遠隔の粘膜面に抗原特異的免疫応答が誘導されることは現象論として知られているものの、その分子・細胞機構については不明であった。パイエル板において誘導される抗原特異的免疫担当細胞の腸管粘膜指向性決定分子群が同定されたが、経鼻免疫および経眼免疫によって誘導される抗原特異的免疫担当細胞の腔粘膜組織指向性を決定する分子機構については不明であった。鼻粘膜をはじめ顎顔面免疫と生殖器免疫とのクロストークの分子基盤の解明は性感染症の効果的な予防法の確立につながる。

2. 研究の目的

(1) 当研究室で同定し、その組織形成分子・細胞機構を明らかにしてきた鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)と涙道関連リンパ組織(TALT)を介して、抗原の経鼻免疫および経眼免疫によって遠隔の腔粘膜において抗原特異的免疫応答が誘導される分子・細胞機構を明らかにすることを目的とし、腔粘膜感染防御に必須であるエフェクターメモリーCD4⁺ T/CD8⁺ T 細胞および抗原特異的 IgA⁺ B 細胞の誘導組織から腔粘膜組織への移動および局在の制御機構について解析する。そしてそれらの知見を利用した性感染症に対する新世代粘膜ワクチンの開発への基盤研究遂行を目指す。

(2) 粘膜組織は、上皮層によって強固に覆われており、経鼻ワクチンの効果を最大限に誘導するためには、上気道粘膜免疫システムへの効果的なワクチンデリバリー技術の開発が必要不可欠である。そこで、新規経鼻ワクチンの開発を目指し、アジュバントフリーの次世代型のドラッグデリバリーシステムの応用としてカチオン性のナノ粒子（ナノゲル）が蛋白質を疎水的会合力により自発的にナノゲルに複合化しうる性質に着目し、これを経鼻ワクチンに応用した新たなアジュバントフリー警備粘膜ワクチンの創生を目指す。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、抗原の経鼻・経眼免疫により誘導される抗原特異的 IgA 産生細胞およびエフェクターT 細胞の腔粘膜組織指向性獲得分子機構、特に、1) 抗原特異的

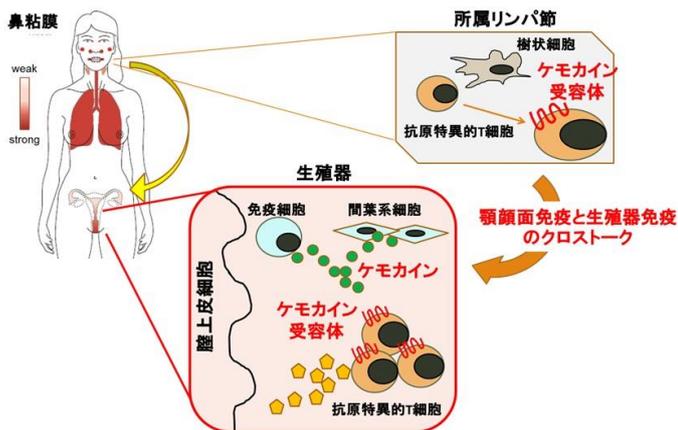
IgA 産生細胞およびエフェクターT 細胞の細胞移動制御分子の同定 2) DNA マイクロアレイ法および培養上清の FPLC 解析による樹状細胞が発現していると予測される腔粘膜組織指向性誘導・制御分子の同定についての解析を遂行した。

(2) カチオン化ナノゲルは、正電荷を持つ鼻腔粘膜上皮へと長時間付着する特性を持つ。一方で、経鼻ワクチンは、投与されたワクチン抗原が、嗅上皮-嗅球を介した伝達経路により脳内に移行し、中枢神経系に影響を与えるリスクも懸念される。そこで本研究では、浜松ホトニクス社の協力のもと、放射性同位体 ¹⁸F を標識した抗原をナノゲルに封入して経鼻投与したマウスおよびカニクイザルにおいて、PET と MRI を組み合わせたシステムを構築し、経鼻投与後の抗原の嗅球や脳内へ移行について検証を行った。

4. 研究成果

(1) 単純ヘルペスウイルス 2 型(Herpes Simplex Virus type2: HSV-2)に対する効果的な腔免疫の誘導機序の解明に取り組んでおり、これまでに経鼻免疫によって誘導される抗原特異的免疫担当細胞 (CD4⁺ T 細胞) の腔粘膜組織指向性を決定する分子機構として、ケモカイン受容体 (CCR) とリガンド (CCL) に関連する特定のケモカインの重要性を強く示唆するデータを得た (論文並びに特許出願準備のため公表を控えます)。この経路が腔粘膜組織への免疫細胞の遊走に重要な役割を担うことが明らかとなった。経鼻免疫後に特定のケモカイン受容体を強く発現する CD4⁺T 細胞が、前頸静脈リンパ節で増加していることから、前頸静脈リンパ節で腔粘膜指向性の獲得が行われていることが明らかとなっている。さらに、同ケモカインリガンドが腔粘膜の間葉系細胞などの非血球系細胞から産生されていることから、間葉系細胞と抗原特異的免疫担当細胞の相互作用によって腔粘膜免疫応答が促進されていることが推察される。本研究結果から CCR-CCL 経路の増強が効果的な経鼻ワクチン誘導性の生殖器免疫応答の惹起が可能であることが明らかとなった (図 1)。

図1. 顎顔面免疫と生殖器免疫のクロストークの機序

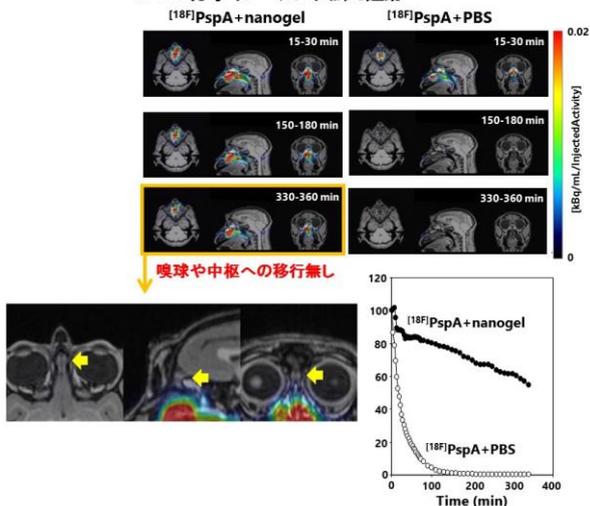


(2) PET と MRI を組み合わせた枠輪抗原の挙動解析システムにより、経鼻投与後の抗原が嗅球や脳へは移行せず中枢神経系に影響を与えない可能性を明らかにし、その安全性を証明した (図2)。

図2. ナノゲル経鼻ワクチンの安全性(サル)

安全性: 中枢への移行 (嗅上皮-嗅球-中枢)

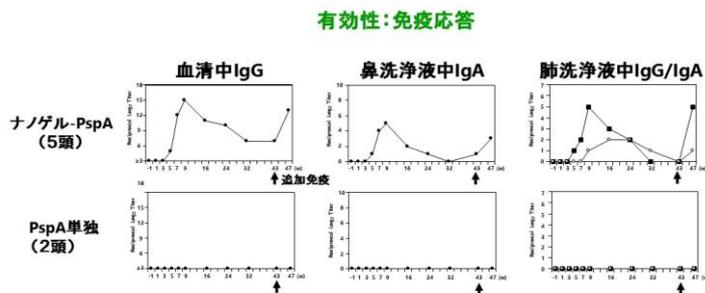
ナノゲル肺炎球菌ワクチンの経鼻投与後、その体内動態を¹⁸F-PET分子イメージング法で追跡



さらに、ナノゲル経鼻ワクチンによる免疫応答の誘導を検討するため、ワクチン抗原として肺炎球菌表層タンパク質 (PspA) をナノゲルに封入しマウスに経鼻投与した。その結果、血清中に抗原特異的 IgG 抗体が上昇してくるのみならず、粘膜面での防御に重要な鼻腔洗浄液中にも抗原特異的な分泌型の IgA 抗体が誘導されてくることが明らかとなった。さらに、カンクイザルを用いた PspA ナノゲルの経鼻投与においても、肺炎球菌に対して中和活性を持つ抗体が、全身のみならず呼吸器洗浄液中に誘導されてくることが分かり、ヒトにより近い霊長

類におけるナノゲル経鼻ワクチンの有用性を示唆した。アジュバントを必要としない経鼻ワクチン開発が安全性の観点からも望まれているが、カチオン化ナノゲルを用いたワクチン抗原のデリバリーシステムは、コレラ毒素などの粘膜アジュバント非存在下においても、高いレベルの防御免疫応答を誘導できることが実証され、注射型のワクチンに替わる次世代型粘膜ワクチンとして期待される (図3)。

図3. ナノゲル経鼻ワクチンの有効性(サル)



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 年間の合計 75 件)
(計 5 年間の合計 112 件)

1. Azegami, T., et al., 2017. Nanogel-based nasal ghrelin vaccine prevents obesity. *Mucosal Immunol.* doi: 10.1038/mi.2016.137. (in press)
2. Joo, S., et al., 2017. Critical role of TSLP-responsive mucosal DCs for the induction of nasal antigen-specific IgA response. *Mucosal Immunol.* doi: 10.1038/mi.2016.103 (in press)
3. Fukuyama, Y., et al., 2015. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal Immunol.* 8: 1144-1153.
4. Nagatake, T., et al., 2015. Central role of core binding factor β 2 in mucosa-associated lymphoid tissue organogenesis in mouse. *PLoS One* 10: e0127460.
5. Fukuyama, Y., et al., 2015. Nasal administration of cholera toxin as a mucosal adjuvant damages the olfactory system in mice. *PLoS One.* 10: e0139368.
6. Kunisawa, J., et al., 2015. Mode of bioenergetic metabolism during B

- cell differentiation in the intestine determines the distinct requirement for vitamin B1. *Cell Rep.* 13: 122-131.
7. Okada, K., et al., 2015. Identification and analysis of natural killer cells in murine nasal passages. *PLoS ONE* 10(11): e0142920.
 8. Kurashima, Y., et al., 2014. The enzyme cyp26B1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis. *Immunity* 40:530-541.
 9. Goto, Y., et al., 2014. Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science* 345(6202):1254009.
 10. Sato, A., et al., 2014. Vaginal memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for protective T cell recruitment and prevention of genital HSV-2 disease. *J Virol.* 88(23):13699-13708.
 11. Sato, S., et al., 2013. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol.* 6:838-846.
 12. Kong, I-G., et al., 2013. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *pneumococcus*. *Infect. Immun.* 81:1625-1634.
 13. Fukuyama., et al., 2013. Potential roles of CCR5⁺ CCR6⁺ Dendritic cells induced by nasal ovalbumin plus Flt3 ligand expressing adenovirus for mucosal IgA responses. *PLoS One* 8:e60453.
 14. Kunisawa, J., et al., 2013. Microbe-dependent CD11b⁺ IgA⁺ plasma cells mediate robust early-phase intestinal IgA responses in mice. *Nature Commun.* 4:1772.
 15. Yuki, Y., et al., 2013. Nanogel-based antigen delivery system for nasal vaccines. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 29:61-72
2. Queensland University of Technology, "Gut Multi-Ecosystem for Symbiosis and Protection", "MucoRice and NanoGel for Oral and Nasal Vaccines", Invited Lecturer, Kiyono, H., Queensland, Australia
 3. AgResearch, Ruaura Research Center, "Gut Multi-Ecosystem for Symbiosis and Protection", "MucoRice and NanoGel for Oral and Nasal Vaccines", Kiyono, H., Invited Lecturer, Hamilton, New Zealand
 4. International Symposium on Recent Advances in Rhinosinusitis and Nasal Polyposis (ISRNP), "Cutting Edge of Mucosal Immunology and Its Clinical Application", Kiyono, H., Invited Speaker, Kuala Lumpur, Malaysia
 5. Japanese Society of Immunology, Summer School 2015, Lecture, Organized Summer School 2015, "Development of New General Vaccine by the Uniqueness of Mucosal Immune System", Hyogo, Japan.
 6. The 3rd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum (IIMVF), Chair and Invited Speaker, "Nanogel based nasal vaccine for the prevention of Streptococcus pneumoniae infection", Berlin, Germany.
 7. The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Session 12 on "Mucosal Immunity and Vaccine" Invited Speaker, "Mucosal Protective and Homeostatic Immunity for Vaccine Development", Sapporo, Japan.

[図書] (計 5年間の合計 11件)

1. 中橋理佳、清野宏、2016、 『粘膜免疫を基盤としたワクチン開発』、 「実験医学」 8: 1-6、 羊土社
2. 中橋理佳、長竹貴広、清野宏、2016、 『粘膜関連リンパ組織のユニーク性と臨床応用』、 「リンパ学会誌 39(2): 80-87、 株式会社ライフメディコム
3. Mason, H., Thuenemann, E., Kiyono, H., Kessans, S., Matoba, N. and Mor, T. 2015, Mucosal vaccines from plant biotechnology In *Mucosal Immunology Fourth Edition*,

[学会発表] (計 5年間の合計 130件)

【招待講演】

1. HWASUN International Vaccine Forum, "MucoRice and NanoGel: New Generation of Mucosal Vaccines for Aero-digestive Infectious Diseases", Kiyono, H., Invited Speaker, Hwasun, Korea

- Mestecky, J. et al (eds), Academic Press, pp. 1271-1289.
4. Kiyono, H. 2015. Role of dental science for the development of mucosal immunology and vaccine. Hiroshima University Faculty of Dentistry 50th Anniversary Book, Japan, pp.44-49.
 5. Nochi, T. and Kiyono H. 2015. Chapter one "Importance of gut microbiota" In Thorough Research Immunity. ,Seya et. al. (eds), NPO Forum of supporting advanced Medicine. Sapporo, Japan. pp. 16-17.

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称 : 抗肥満ワクチン
発明者 : 畔上達彦、幸 義和、伊藤 裕、清野 宏
権利者 : 東京大学、慶應大学
番号 : JP2016-65175
出願年月日 : 2016/3/29
国内外の別 : 国内

名称 : PNEUMOCOCCAL VACCINE COMBINING SELECTED ALPHA HELICAL DOMAINS AND PROLINE RICH DOMAINS OF PNEUMOCOCCAL SURFACE PROTEIN A
発明者 : Kiyono, Hiroshi, Kneller, Robert, Yoshikazu Yuki, Briles, David E, Mukerji, Reshmi, Genschmer, Kristopher
権利者 : 東京大学、アラバマ大学
番号 : 62429782

出願年月日 : 2016/12/2
国内外の別 : 国外 (US)
名称 : ノロウイルス抗体
発明者 : 幸義和、清野宏
権利者 : 東京大学
番号 : 特願 2017- 70757
出願年月日 : 2017/3/31
国内外の別 : 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称 : Mucosal vaccine using cationic nanogel
発明者 : Akiyono kazunari, Kiyono Hiroshi, Yuki Yoshikazui, Nochi Tomonori
権利者 : 京都大学、東京大学
番号 : EP2345419B1
取得年月日 : 2017/2/22
国内外の別 : 国外 (EP)

[その他]

ホームページ等 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清野 宏 (Kiyono, Hiroshi)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号 : 10271032