

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462584

研究課題名(和文) 樹状細胞を標的とした経鼻ワクチンの臨床応用に向けた研究

研究課題名(英文) Nasal vaccine with dendritic cells activation

研究代表者

児玉 悟 (KODAMA, SATORU)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：40325717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：NKT細胞と樹状細胞の細胞間相互作用による免疫応答の誘導を明らかにし、より効率的な免疫誘導とワクチン開発の研究を行った。インフルエンザ菌P6や肺炎球菌PspAとともにGalCerをマウスに対して経鼻免疫を行なうことで、強力な抗原特異的免疫応答が誘導され、鼻粘膜局所におけるNKT細胞と樹状細胞の細胞間相互作用が明らかとなった。このGalCerによって誘導される生体防御免疫応答にはTh17細胞が関与していることも明らかとなった。興味あることにGalCer単独投与によってもNKT細胞と樹状細胞の細胞間相互作用が観察され、生体防御免疫応答が誘導された。

研究成果の概要(英文)：Mucosal immune responses in the nasopharynx associated with NKT cell activation were examined. Mice were administered galactosylceramide (GalCer) intranasally as a ligand for NKT cells, without any antigen. After nasal immunization, dendritic cells (DCs) increased in nasal-associated lymphoid tissue. Antibody-producing cells, mainly those that produce immunoglobulin A, significantly increased in the nasal passage (NP). Interleukin (IL)-17-producing Th 17 cells were also induced in the NP. Bacterial challenges with live Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae resulted in enhanced clearances of both bacterial species from the nasopharynx. It is interesting that bacterial clearance was impaired by IL-17 neutralization. These results suggest that the activation of NKT cells by nasal administration of GalCer induced protective immunity in the nasopharynx, possibly involving the interaction with DCs and induction of Th17 cells.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：樹状細胞 粘膜免疫 ワクチン 上気道

### 1. 研究開始当初の背景

病原微生物の侵入に絶えず曝されている粘膜面には全身系とは異なったユニークな免疫システムが存在している。粘膜免疫機構は腸管を中心に研究が行なわれているが、上気道の粘膜免疫の研究は十分とは言えない。申請者はこれまでに世界に先駆けて、上気道における粘膜免疫誘導組織である鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)からの免疫担当細胞分離に成功し、上気道粘膜免疫機構の特徴について明らかにし、また上気道における抗原特異的免疫応答の誘導には、経鼻免疫が最も効果的であることを明らかにしてきた。そして抗原の経鼻投与により、中耳粘膜にも特異的免疫応答が誘導されうることを明らかにし、インフルエンザ菌を用いた中耳炎モデルにおいて経鼻ワクチンの効果を明らかにした。さらに世界に先駆けて鼻粘膜、耳管、中耳からの細胞分離法を確立し、上気道粘膜免疫研究のモデルを確立した。

粘膜免疫応答を賦活化するためには、有効かつ安全なアジュバントも重要である。申請者はこれまで Toll-like receptor (TLR) 9 のリガンドである CpG DNA が経鼻アジュバントとして安全かつ有効であることを明らかにした。このメカニズムとして重要な点は樹状細胞の活性化である。樹状細胞は T 細胞、B 細胞を制御し、免疫応答の司令塔として機能している。この樹状細胞をターゲットとし、上気道の樹状細胞を活性化させることで、より効率的に特異的免疫応答が誘導されうるものと考えている。実際に樹状細胞の増殖因子である Flt3 ligand を経鼻的に投与すると NALT の成熟樹状細胞が増加し、免疫応答が増幅される。最近では、NKT 細胞のリガンドである  $\alpha$ -GalCer を経鼻アジュバントとして用いることで、鼻粘膜 NKT 細胞を介して樹状細胞が成熟、増加し、抗原特異的免疫応答が強力に誘導されることや、この生体防御免疫における Th17 免疫応答の関与を明らかにした。またこれまでの複数のアジュバントの検討から  $\alpha$ -GalCer が最も効果的かつ安全なアジュバントであることが明らかとなった。

これまでの研究から、さらなる投与方法、デリバリーシステムの工夫、ワクチン形態の改良により、経鼻ワクチンのさらなる発展が示唆された。本研究ではこうした一連の研究成果を基に、鼻粘膜の樹状細胞を中心としてさらに研究を進展させていき、有効かつ安全なワクチンの開発につなげていく。

### 2. 研究の目的

樹状細胞は免疫応答の司令塔として重要な役割を担っている。樹状細胞の誘導、制御は免疫応答の誘導、制御につながると思われる。本研究では、樹状細胞を中心に上気道粘膜免疫機構の解析を行ない、樹状細胞の活性化を介して、種々の粘膜疾患に対応するような、より効果的なワクチン開発

とその臨床応用を目標としている。NKT細胞と樹状細胞の細胞間相互作用による免疫応答の誘導を明らかにし、より効率的な免疫誘導を試みる。

NKT細胞のリガンドである $\alpha$ -GalCerを抗原とともに経鼻免疫することで、NKT細胞が活性化され、細胞間相互作用により樹状細胞が成熟、活性化し、抗原特異的免疫応答が誘導される。さらに強力かつ効果的、持続的な免疫応答の誘導のために免疫プロトコルを検討し、長期間の経過観察も行なっていく。またNKT細胞と樹状細胞の細胞間相互作用についても解析を進め、上気道における特異性についても検討する。これまでの研究からTh17細胞が局所に誘導されることもわかっているが、Th17細胞の生体防御免疫における詳細な役割についても解析を行なう。

インフルエンザ菌のP6外膜タンパクを抗原とした経鼻免疫による免疫応答の誘導およびその解析といった一連の実験系はすでに確立され、P6のT細胞・B細胞エピトープをコードするDNA含有プラスミドを用いたDNAワクチンの作製と特異的免疫応答の誘導にも成功している。DNAワクチンの吸収率向上のためにISCOMを用いて、新しいワクチンデリバリーシステムを確立する。

我々はこれまで液体ワクチンを用いているが、ゲル状に固めて、鼻内で徐放するワクチンを作成すると、免疫回数の減少が期待できる。また医療用ゼラチンも開発されており、安全性の面も問題ない。

### 3. 研究の方法

インフルエンザ菌 P6 や肺炎球菌 PspA とともに $\alpha$ -GalCer をマウスに対して経鼻免疫を行ない、抗原特異的免疫応答について ELISA、ELISPOT 法にて検討する。感染実験による長期間の免疫効果、予防効果の観察も行なっていく。RT-PCR によるサイトカイン産生パターンから Th1/Th2 型免疫応答についても検討する。また NKT 細胞と樹状細胞の体内動態について、フローサイトメトリーや免疫組織化学、さらにバイオイメージングにより細胞間相互作用の詳細を検討する。従来よりも強力かつ効果的、持続的な免疫応答の誘導のために免疫プロトコルの改良や糖鎖構造を変化させた $\alpha$ -GalCer の誘導体を用いて免疫実験を行なう。

次に樹状細胞と Th17 細胞との細胞間相互作用の解析を進める。またインフルエンザ菌や肺炎球菌の鼻咽腔感染モデルにおいて、抗 IL-17 抗体を用いて IL-17 を中和することで、上気道感染症における Th17 細胞の重要性について検討する。

また $\alpha$ -GalCer をマウスに対して抗原フリーで単独投与し、粘膜免疫への作用、免疫応答の誘導について検討する。

つぎに次世代のワクチンである DNA ワクチンの有用性について検討する。これまでにインフルエンザ菌の P6 タンパクの T 細胞・

B細胞エピトープをコードする発現ベクター、DNA ワクチンの作製に成功している。DNA ワクチンは適当なデリバリーシステムが必要であるが、Immunostimulating complex (ISCOM)を用いてリポソーム化し、効果発現の増加について検討する。DNA ワクチンは比較的ワクチンのデザインが簡単であるため、種々の抗原、増殖因子、アジュバントを混合することも可能である。目的遺伝子のクローニングを行ない、PCR で増幅した後に、哺乳類用の発現ベクターに組み込み、大腸菌に入れ、培養し、精製する。この精製したプラスミドを ISCOM とともにマウスに対し経鼻投与する。抗原特異的免疫応答について ELISA、ELISPOT 法にて検討する。RT-PCR によるサイトカイン産生パターンから Th1/Th2 型免疫応答についても検討する。全体として免疫応答がバランスよく、生体防御に向かうように、分子の配合や量を調整していく。

さらなるワクチンデリバリーとして従来型の液体ワクチン（抗原+アジュバント）に医療用ゼラチンを加え、ハイドロゲルワクチンを作製することに成功している。マウスの鼻内で徐放させるためにはマウスの鼻内温度、ゲルの濃度と架橋材の濃度が関係しているが、3-5 日で徐放する濃度は予備実験である程度決まっている。マウスに対しゲルワクチンを経鼻投与し、抗原特異的免疫応答について ELISA、ELISPOT 法にて検討する。効果発現と免疫回数の減少により、従来型のワクチンよりも効果があるか否かを検証する。

#### 4. 研究成果

インフルエンザ菌 P6 や肺炎球菌 PspA とともに $\alpha$ -GalCer をマウスに対して経鼻免疫を行ない、抗原特異的免疫応答について検討した結果、強力な抗原特異的免疫応答が誘導され、感染実験においても長期間の免疫効果、予防効果が誘導された。また鼻粘膜局所における NKT 細胞と樹状細胞の細胞間相互作用が明らかとなった。この $\alpha$ -GalCer によって誘導される生体防御免疫応答には Th17 細胞が関与していることも明らかとなった。

次に $\alpha$ -GalCer 単独投与の効果について検討した。その結果、興味あることに $\alpha$ -GalCer 単独投与によっても鼻粘膜局所における IgA 産生の増強が観察された。NKT 細胞の活性化と NKT 細胞と樹状細胞の細胞間相互作用により B 細胞、T 細胞が活性化され、生体防御免疫応答が誘導された。抗原フリー、アジュバント単独投与という状況下での免疫誘導に関して、結論づけるには複数回の検討を要した。Specific pathogen free および Conventional の環境下では免疫応答が誘導され、Germ free の環境下では免疫応答は誘導されないことから、生体防御のための免疫応答誘導においては常在細菌、Commensal bacteria も重要であることが示唆された。このことから、日常生活においていわゆる善玉

菌を増やすことが、ワクチン効果を高め、感染症予防につながることを示唆された。

DNA ワクチンの有用性について検討した結果、インフルエンザ菌の P6 タンパクの T 細胞・B 細胞エピトープをコードする発現ベクター、DNA ワクチンと ISCOM を経鼻投与することにより、長期間の免疫応答誘導が可能であった。

医療用ゼラチンを用いたハイドロゲルワクチンによる免疫誘導実験では、特異的免疫応答の誘導可能であったものの、鼻呼吸障害をきたすため、ゲルの調整とワクチンの徐放化についてさらなる検討を要するものと思われた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1 : Iwasaki T, Hirano T, Kodama S, Kadowaki Y, Moriyama M, Kawano T, Suzuki M. Monophosphoryl lipid A enhances nontypeable *Haemophilus influenzae*-specific mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 97: 5-12, 2017. (査読有)

2 : Hirano T, Kodama S, Kawano T, Suzuki M. Accumulation of regulatory T cells and chronic inflammation in the middle ear in a mouse model of chronic otitis media with effusion induced by combined Eustachian tube blockage and nontypeable *Haemophilus influenzae* infection. *Infect Immune* 84: 356-364, 2016. (査読有)

3 : Umemoto S, Kodama S, Noda K, Hirano T, Suzuki M. Mucosal immune responses associated with NKT cell activation and dendritic cell expansion by nasal administration of  $\alpha$ -galactosylceramide in the nasopharynx. *Otolaryngol* 5: 1000216, 2015. (査読有)

[学会発表](計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 悟 (Kodama, Satoru)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：40325717

(2) 研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

〔その他の研究協力者〕

( )