

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462585

研究課題名(和文) Toll様受容体アゴニストを用いた上気道粘膜免疫誘導と機序の解明

研究課題名(英文) Monophosphoryl lipid A enhances nontypeable Haemophilus influenzae-specific mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜アジュバントとしてMonophosphoryl lipid A (MPL：TLR4 アゴニスト)を用いた場合の鼻粘膜獲得免疫応答につき検討した。動物はBALB/cマウスを用い、抗原はインフルエンザ菌由来外膜蛋白(OMP)とし、MPLと共に経鼻免疫を行った。対照はリン酸緩衝液を投与した。経鼻免疫後にインフルエンザ菌溶液を経鼻投与し、系時的に鼻腔洗浄液を採取し生菌数を計測した。鼻腔洗浄液、血清中のOMP特異的抗体価をELISAにて測定した。インフルエンザ菌数は対照群と比べ、MPL投与群では減少し、MPL投与群において鼻腔洗浄液及び血清ではOMP特異的IgAもしくはIgG抗体価がより上昇した。

研究成果の概要(英文)：We used monophosphoryl lipid A (MPL), a toll-like receptor (TLR) 4 agonist, as an adjuvant to induce mucosal immune responses against Nontypeable Haemophilus influenzae (NTHi) to enhance bacterial clearance from the nasopharynx. Mice were administered outer membrane protein (OMP) and 0, 10, or 20 micro g MPL intranasally. Control mice were administered phosphate-buffered saline. After immunization, these mice were challenged with NTHi, and then, the mice were killed and nasal washes were collected. The numbers of NTHi were counted and OMP-specific antibodies were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay. The MPL 10 and 20 micro g group produced a significant reduction in the number of bacteria recovered from the nasal washes compared to the control group. OMP-specific IgA titers in nasal washes were also augmented in the MPL groups compared to the control and OMP groups. MPL is suitable for eliciting effective mucosal immune responses against NTHi in the nasopharynx.

研究分野：医歯薬学

キーワード：中耳炎ワクチン インフルエンザ菌 粘膜アジュバント

## 1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎は小児に好発するがたびたび遷延化し、慢性の経過をたどり治療に難渋する場合を認める。急性中耳炎の起炎菌において、肺炎球菌、インフルエンザ桿菌、モラキセラカタール菌が最も多く検出されている事はよく知られているが、鼻咽腔に存在する起炎菌が、経耳管的に中耳に侵入することから急性中耳炎を発症することが知られており、鼻腔組織における免疫賦活による中耳炎ワクチンの開発は重要である。当科において、いままでインフルエンザ菌外膜蛋白 (Outer membrane protein: OMP) や P6 蛋白を用いた中耳炎ワクチンへの臨床応用について経鼻粘膜免疫応答を通じて研究を行っており、OMP や P6 の粘膜免疫賦活化により、IgA を主体とした粘膜免疫応答や IgG を主体とした全身免疫応答を惹起し、鼻咽腔や中耳からのインフルエンザ菌クリアランスが促進されることを報告してきた。粘膜免疫応答の誘導には、粘膜アジュバントは必須であり、当科においてコレラトキシンのみならず、CpG、 $\alpha$ -galactosylceramide、CCL20 などの様々な粘膜アジュバントについて粘膜免疫応答の賦活化効果について報告を行ってきた。今回、ヒトの経皮的ワクチンにおけるアジュバントとして臨床使用されている Monophospholipid A (MPL) のインフルエンザ菌抗原に対する粘膜アジュバント効果については検証されていない。

## 2. 研究の目的

外来微生物に対する生体防御機構において自然免疫および獲得免疫の関与は非常に重要である。MPL は Toll-like receptor (TLR)4 agonist の 1 つであり、全身免疫のワクチンアジュバントとして実際の臨床に応用されており、肺炎球菌ワクチンや子宮頸癌予防ワクチン等に使用され安全性も確立されている。以前、我々は TLR4 変異マウスおよび野生株マウスを用いてインフルエンザ菌由来 OMP を抗原として用いた経鼻投与を行い、鼻粘膜免疫応答について検証した。TLR4 変異マウスにおいては野生株マウスと比較して、Th1/2 応答の不均衡に伴う獲得免疫応答の低下を認めており、TLR4 と上気道粘膜における獲得免疫能とは関連することが示唆された。今回、我々は TLR4 agonist の 1 つである MPL を粘膜アジュバントとして用いて、OMP を免疫抗原として経鼻免疫を行うことにより、TLR4 刺激による鼻咽腔粘膜局所における獲得免疫応答が誘導されるかどうか検討をおこなった。

## 3. 研究の方法

### 1) マウスモデル作成

SPF 下にて飼育した、雄性、BALB/cNSea マウス 5 週令を用いた。ワクチン抗原として無莢膜型インフルエンザ菌 strain76 から抽出した外膜蛋白 (OMP) を用い、OMP10  $\mu$ g と人工合成した MPL を粘膜アジュバントを加えた溶液 (0  $\mu$ g/mouse: OMP 群、10  $\mu$ g/mouse: MPL10 群、20  $\mu$ g/mouse: MPL20 群) を作成し、ケタミン・ザイラジン麻酔下に 10  $\mu$ l づつ (各鼻腔に 5  $\mu$ l)、週 1 回計 3 回経鼻免疫を行った。対照はリン酸緩衝液 (PBS) 投与マウスとした。

### 2) 鼻咽腔クリアランスと OMP 特異的抗体産生

経鼻免疫後 21 日目にインフルエンザ菌溶液 (10<sup>7</sup>cfu/mouse) をケタミン・ザイラジン麻酔下に 10  $\mu$ l づつ (各鼻腔に 5  $\mu$ l) 経鼻投与を行い、投与後 6、12 時間後に鼻咽腔洗浄液を採取し、希釈法によりチョコレート寒天培地にて培養し、鼻腔洗浄液中のインフルエンザ菌コロニー数を数え、生菌数を計測した。OMP を 96 穴プレートにコーティングした後に、鼻腔洗浄液及び血清を反応させ、OMP 特異的抗体価測定を ELISA にて測定した。

### 3) リンパ組織での樹状細胞 (DC) 動態

鼻粘膜関連リンパ組織 (NALT)、頸部リンパ節 (CLN) 及び脾臓 (SPL) における DC の変化について検討するため、経鼻免疫後 21 日目のマウスから各組織を採取した後に、金属メッシュにより組織を破砕し単核球を採取した。採取した単核球を FITC 標識抗マウス IA/IE 抗体、Per-CP 標識抗マウス CD11c 抗体にて細胞表面抗原を染色し、各群における組織中の DC の変化について検討し、FITC 標識抗マウス CD80/86 抗体、PE 標識抗 CD11b 抗体、Per-CP 標識抗マウス CD11c 抗体にて細胞表面抗原を染色し、conventional DC の活性化についても検討した。

### 4) MPL 刺激による DC への影響

マウス脾臓より proteinase 処理により単細胞化した後に、anti-CD11c MicroBead kit を用いて MACS cell sorter にて CD11c 陽性細胞 (DC) を分離採取した。採取した単核球を 1x10<sup>5</sup> cell/ml に 10% FCS 加 RPMI 培地にて調整したのちに、24 穴培養プレートに 1 ml に分注し、それぞれ MPL を 10、20  $\mu$ g 投与し共培養を行った。培養後 6、12、24 時間後に上清を採取し、Bio-Plex Pro<sup>TM</sup> Mouse Cytokine assay を行い、培養液中のサイトカイン産生について検討した。対照には PBS を添加している。

## 4. 研究成果

### 1) 鼻咽腔クリアランスと OMP 特異的抗体価

インフルエンザ菌の鼻咽腔クリアラン

スは、12時間後では、MPL10、MPL20 群共に、対照群と比して有意にクリアランスが促進しており、MPL10 群では OMP 群と比較しても有意にクリアランスが促進していた(図1)。OMP 特異的抗体価においては、鼻腔洗浄液については OMP 特異的 IgA 抗体価、血清では OMP 特異的 IgG の上昇が認められたが、MPL10、MPL20 群において、対照群、OMP 群と比して有意に抗体価の増加を認めた(図2)。

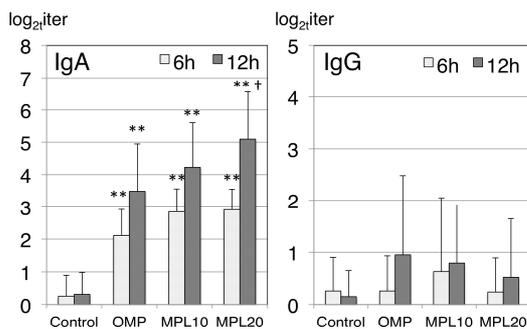
## 2) 各組織における DC 分布

対照群、OMP 群、MPL10 群、MPL20 群において、鼻粘膜関連リンパ組織(NALT)、頸部リンパ節(CLN)及び脾臓(SPL)における DC 分布は、MPL 投与により各組織における DC の構成割合が増加しており、conventional DC において活性化した DC の構成割合も増加していた(図3)。

## 3) DC からのサイトカイン産生

TNF- $\alpha$  濃度はMPL刺激により早期から産生濃度の上昇を認めており、平均TNF- $\alpha$  濃度は対照では0pg/mLであったが、MPL10 群と MPL20群では6時間培養にて、それぞれ71.2 及び64.8 pg/mLであり、12時間培養にて34.3及び 32.3pg/mLであり、有意に上昇を認めた。一方、IL-10 濃度は培養中徐々に濃度上昇を認めており、対照では0 pg/mLであったが、MPL10 群と MPL20群では6時間培養にて、それぞれ1.3 及び1.9 pg/mLであり、12時間培養にて1.9 及び 2.2pg/mL、24時間培養にて2.7及び 3.1pg/mLであり、有意に上昇を認めた(図4)。

## a



## b

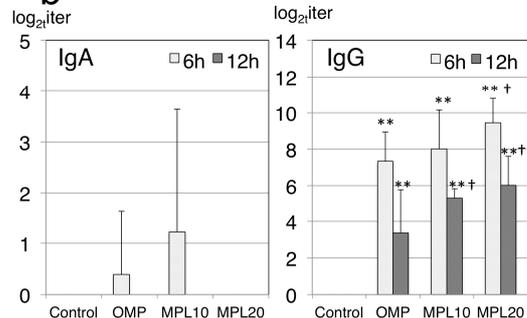


図1 : OMP 特異的抗体価

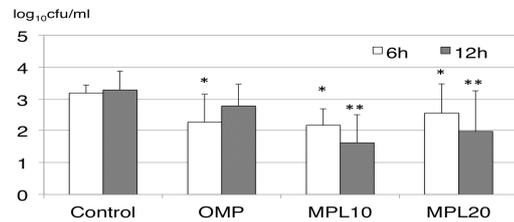


図2 : 鼻咽腔クリアランス

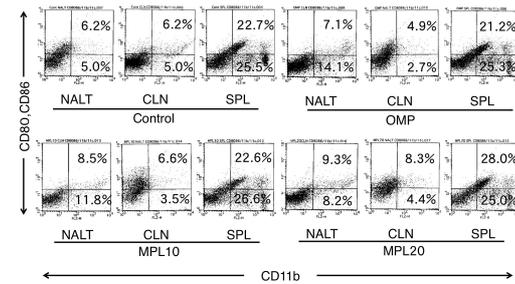


図3 : Conventional DC の活性

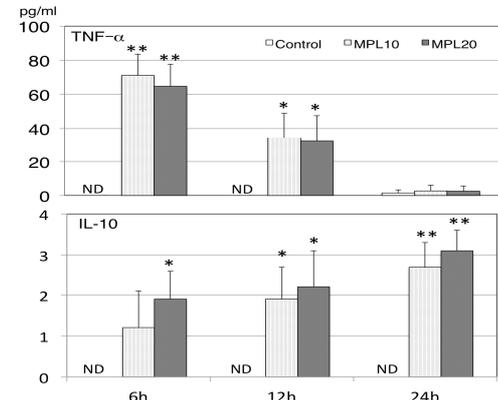


図4 : DC からのサイトカイン産生

## 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 5 件)

1. Hirano T., Kodama S., Kawano T., Suzuki M.: Accumulation of regulatory t cell 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, *Infection and immunity*, 84(1), 356-364, 2016, doi:10.1128/IAI.01128-15. 査読あり。

2. 平野 隆, 児玉 悟, 鈴木正志: 慢性中耳炎病態と中耳粘膜免疫反応, 耳鼻咽喉科と慢性炎症, 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 北隆館 138-144 2016. 査読無し。

3. Moriyama M., Hirano T., Kodama S., Kawano T., Suzuki M.: Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-1 expression on polymorphonuclear neutrophils

enhanced the bacterial clearance from the nose in synergy with TLR4, 7th Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media 12-16 June 2013 Stockholm, Sweden, MEDIMOND 25. 2014. 査読無し。

4. Kawano T., Hirano T., Kadowaki Y., Moriyama M., Iwasaki T., Noguchi K., Kobayashi T., Suzuki M.: Analysis of the mucosal immune system of middle ear and nose in Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 knockout mouse model with allergic rhinitis, 7th Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media 12-16 June 2013 Stockholm, Sweden, 21-24, MEDIMOND 21-24. 2014. 査読無し。

5. Hirano T., Kodama S., Kawano T., Moriyama M., Suzuki M.: Analysis of dynamics of Th17 cells in chronic middle ear inflammation induced by nontypeable *Haemophilus influenzae*, 7th Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media 12-16 June 2013 Stockholm, Sweden, MEDIMOND 17-19. 2014. 査読無し。

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 平野 隆, 門脇嘉宣, 児玉 悟, 川野利明, 鈴木正志: インフルエンザ菌 Phosphorylcholine の表出と中耳ムチン Muc5ac 生産への影響. 第 35 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2017.4.13-15, 旭川グランドホテル, 旭川市

2. 平野 隆, 門脇嘉宣, 児玉 悟, 川野利明, 鈴木正志: インフルエンザ菌 Phosphorylchoine の表出と中耳粘膜ムチン産生能への影響(ポスター). 第 26 回日本耳科学会総会・学術講演会 2016.10.5-8, ホテル国際 21, 長野市

3. 平野 隆, 岩崎太郎, 門脇嘉宣, 森山宗仁, 児玉 悟, 鈴木正志: Monophosphoryl lipid A を粘膜アジュバントとして用いた中耳炎予防ワクチンへの応用. 第 24 回日本耳科学会, 2014.10.16-18, 朱鷺メッセ, 新潟市

4. Hirano T., Kodama S., Moriyama M., Iwasaki T., Kadowaki Y., Kawano T., Suzuki M.: Effect of anti-CD25 monoclonal antibody on chronic otitis media in mice model. The 18th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, 2015, 6. 7-11, Maryland, U.S.A.

5. Tateyama K., Yoshida N., Kishibe K.,

Morita Y., Iino Y., Suzuki M., Harabuchi Y.: Otitis media with anca-associated vasculitis (OMAAV): A retrospective multi-center study in japan-2) clinical differences according to ancas. The 18th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, 2015, 6. 7-11, Maryland, U.S.A

6. Suzuki M., Hirano T., Iwasaki T., Kodama S., Moriyama Mu., Kadowaki Y., Kawano T.: Monophosphoryl lipid A enhances nontypeable *haemophilus influenzae*-specific mucosal immune responses in the nasal mucosa (poster). The 18th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, 2015, 6.7-11, Maryland, U.S.A.

〔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

門脇 嘉宣 (KADOWAKI YOSHINORI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号: 10706980

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )

