

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670077

研究課題名(和文)1粒子イメージングによる動態解析を基盤としたIgE非誘導性ワクチン創成への挑戦

研究課題名(英文)Challenge for the development of vaccine without the production of IgE

研究代表者

吉岡 靖雄 (Yoshioka, Yasuo)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授(常勤)

研究者番号：00392308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はこれまで、ナノ粒子をワクチン抗原キャリアとして適用することで、強い抗原特異的免疫応答を誘導可能であること、さらに条件によっては、逆に、IgG抗体(ワクチンの有効性を規定)は著しく減弱する一方で、IgE抗体産生(ワクチンリスクの主要因)が増強し、アナフィラキシーショックが顕著に惹起されることを先駆けて見出した。本研究では、そのメカニズム解明を図り、将来的に、IgEを産生しないワクチン開発に資する基盤情報の収集を図った。その結果、皮膚塗布においては、曝露する抗原が減少した場合、抗原特異的IgGとIgEの産生バランスが変化し、その後のアナフィラキシーショックが誘導されやすいことを見出した。

研究成果の概要(英文)：Here we tried to clarify the relationship between the dose of cutaneous exposure to antigen and the susceptibility to the IgE-mediated allergic response in relation to IgG production. NC/Nga mice were epicutaneously exposed to different doses of antigen to induce atopic dermatitis like skin lesions. We then evaluated the skin lesions, the induction of antigen-specific immune responses, and the susceptibility to anaphylaxis. Dose-dependent exacerbation of atopic dermatitis like skin lesions and antigen-specific IgG and IgE production were observed. However, mice exposed to relatively low doses of antigen showed hypersusceptibility to antigen specific anaphylaxis. We also showed that adoptive transfer of antigen specific IgG rescued mice from the hypersusceptibility seen in those exposed to low doses of antigen.

研究分野：安全科学

キーワード：IgE ワクチン 免疫

1. 研究開始当初の背景

近年のインフルエンザパンデミックやコロナウイルスの猛威、狂犬病や結核等の再興からも明らかなように、新興・再興感染症は、先進国・発展途上国を問わず未だに生命を脅かす病となっている。そのため、感染症に対するワクチンの新規開発や増産が地球規模で推進されているものの、パンデミックの際に供給可能なワクチン量の乏しさや安全性など、数多くの懸念が指摘されている。特に、子宮頸がんワクチンの副作用により、「積極的な接種勧奨の差し控え」が厚生労働省から発令されるなど、ワクチンの副作用（ワクチンリスク）への社会懸念が高まっており、その克服は医療薬学における最重要課題となっている。申請者はこれまで、100 nm 以下の素材であるナノマテリアル（NM）をワクチン抗原キャリアとして適用することで、アラムアジュバント以上の、抗原特異的免疫応答を誘導可能であることを見出した。さらに興味深いことに、投与ルートを変えることで、逆に、IgG 抗体（ワクチンの有効性を規定）は著しく減弱する一方で、IgE 抗体産生（ワクチンリスクの主要因）が増強し、アナフィラキシーショックが顕著に惹起されることを先駆けて見出した。これまで、IgE 抗体の誘導（ワクチンリスク）を克服できなかった根底には、IgE 抗体が、IgG 抗体とパラレルに産生される事実が常識として理解されてきたためである。即ち、本モデルを用いて、IgE と IgG の産生機序を詳細に検討することで、将来的に、IgE を産生しないワクチンの開発などに繋がる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、NM と抗原の動態を精査することで、「NM の物性」「NM・抗原の動態」「免疫応答」の連関を解析することを目的とした。特に、抗原の曝露量により、IgE 産生がどのように変化するのか、また、その後のアナフィラキシーショックの誘発などにどのように影響するかを精査することで、今後の、有効かつ安全なワクチン開発に資する基盤情報の収集を図った。

特に我々はこれまで、アレルギーモデルとして汎用される NC/Nga マウスを用い、シリカナノ粒子とダニ抗原（Dp）を皮膚に塗布した場合、アトピー性皮膚炎（AD）の病態を呈すること、さらに、IgE 偏向性の免疫応答が誘導され、IgE 性のアレルギー発症に関する感受性が亢進することを明らかとしている。そこで本検討では、まず、シリカナノ粒子と Dp の塗布により、なぜ、IgE 偏向性の免疫応答が惹起されるかを検討した。さらに、得られた知見に基づき、より詳細なメカニズムの解明を目指し、Dp の投与量の違いが、免疫応答さらには、その後のアナフィラキシーショックに与える影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

NC/Nga slc マウス（雌性）は、日本エスエルシーより購入し、6 週齢にて実験を開始した。

(2) ダニ抗原の皮膚塗布による AD 様病態の誘導

6 週齢の NC/Nga slc マウスの上背部の毛を脱毛した後、蒸留水に浸したキムワイブを用いて洗い流した。その翌日、Dp を 120, 60, 30 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ で、両耳介の内側、および除毛した上背部に塗布した。塗布は週三回で 4 週間塗布した。

(3) アナフィラキシーショックの誘導

マウスに上記のスケジュールで AD 病態を発症させた後、最終投与から一週間後に Dp (640 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を尾静脈より投与した。投与直後から 10 分毎に直腸体温を測定し、体温低下をアナフィラキシーショックの指標とした。

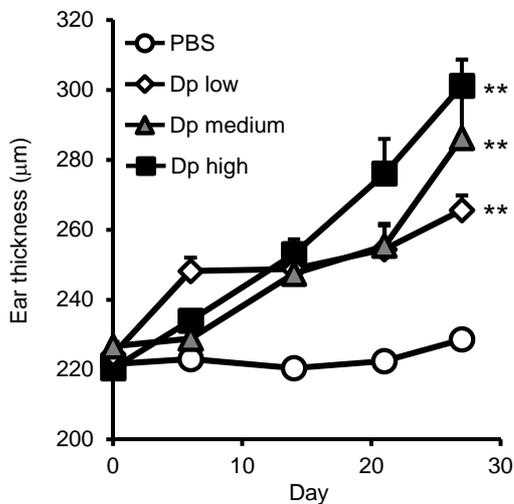
4. 研究成果

(1) シリカナノ粒子と Dp の相互作用が免疫応答に及ぼす影響評価

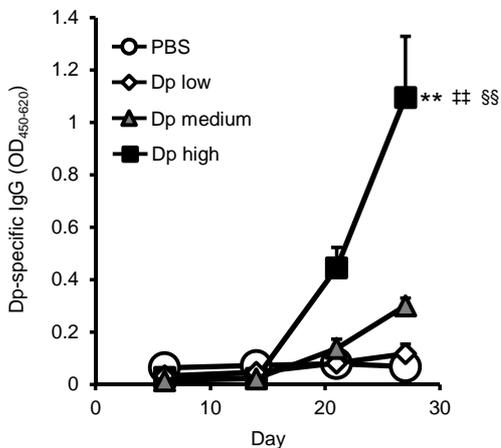
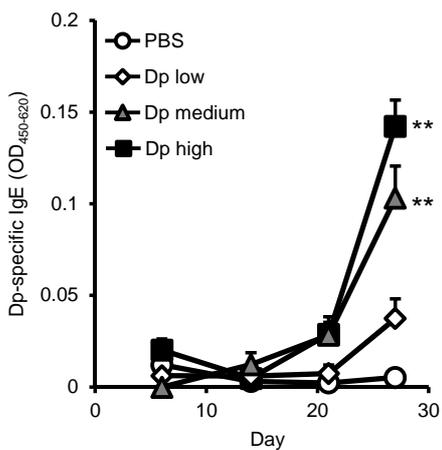
シリカナノ粒子と Dp を混合した後、皮膚塗布することで、抗原特異的 IgE が増強されることを明らかとしているが、粒子と抗原の相互作用による物性変化に着目して、メカニズム解明を試みた。その結果、シリカナノ粒子と抗原を混合することで、粒子と抗原の複合体を形成することで、凝集物が形成されることが明らかとなった。さらに、凝集物の形成により、単独で存在する抗原量が著しく減少していた。シリカナノ粒子と凝集物を形成しない異なる抗原を用いた場合では、IgE の産生増強といった免疫応答の変化が観察されなかった事実からも、凝集体形成により、単独で存在する抗原量が減少したことが IgE 増加の要因と考えられた。一方で、なぜ、抗原量が減少することで、IgE の増加が観察されたかは不明であったため、そのメカニズム解明を図った。

(2) Dp の曝露量が、AD 様病態、及び抗体産生に与える影響

NC/Nga マウスに、Dp を濃度三点 (120, 60, 30 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$: 各々、高用量曝露群、中用量曝露群、低用量曝露群と表記) で、塗布し、AD 様病態を誘導した。まず、耳介の腫れと、病理所見により皮膚病態を解析した結果、耳介の厚さ、痂皮形成、表皮の肥厚、炎症性細胞浸潤、肥満細胞浸潤数の全ての項目で、Dp の曝露量依存に病態の悪化が認められた。



次に、Dp の曝露量と抗体産生量の関連を評価した。経過的に血清中の総 IgE、Dp 特異的 IgE、総 IgG、Dp 特異的 IgG の産生量を評価した。その結果、いずれにおいても、皮膚塗布開始 3 週目以降に急激に増加する傾向が観察された。また、いずれにおいても、Dp の曝露量依存的に、抗体価が高い傾向が観察された。特に、総 IgG、Dp 特異的 IgG について、高用量曝露群でその増加量は顕著であった。一方で、総 IgE、Dp 特異的 IgE の産生は、Dp 曝露量依存的に増加傾向ではあるものの、IgG よりも Dp 曝露量依存性が認められにくい傾向が観察された。従って、皮膚から曝露するアレルゲンが多いほど、IgG 性の免疫応答に偏る傾向が観察された。本結果は、疫学的

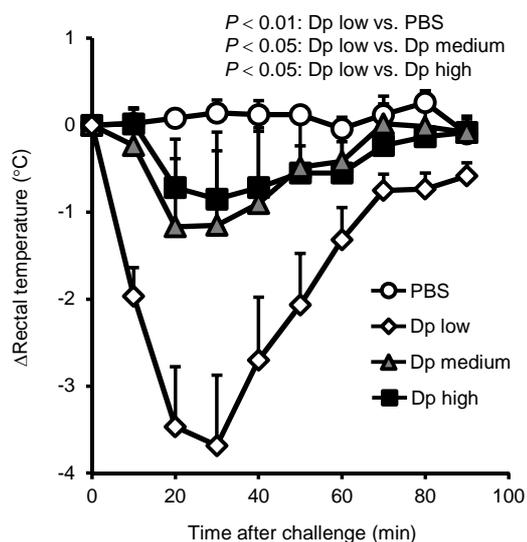


に観察されるアレルゲン曝露量と抗体産生の関連を支持する結果であると考えられた。

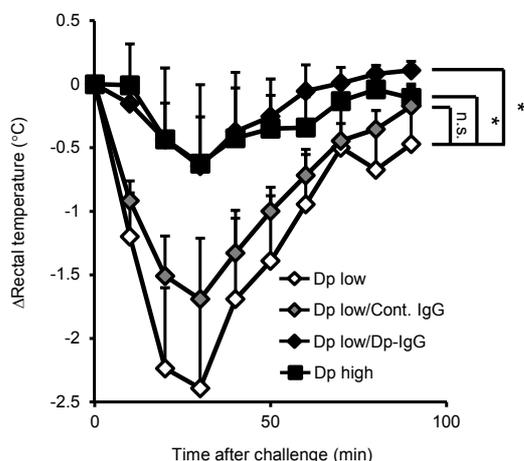
次に、Dp の曝露量が、T 細胞性の免疫応答に与える影響を評価した。各マウスの脾細胞を *in vitro* にて Dp で再刺激し、上清中のサイトカイン量を測定した。Th1 型のサイトカインとして IFN- γ を、Th2 型のサイトカインとして IL-4、IL-5、IL-13 を、Th17 型のサイトカインとして IL-17A を測定した。その結果、IFN- γ 、IL-17A は、いずれの群においてもほぼ同様に産生されていた。一方で、Th2 型のサイトカインである IL-4、5、13 の産生については、Dp の曝露量依存的に、逆にその産生量が減少する傾向にあった。

(3) Dp 曝露量と IgE 性アレルギー反応発症への感受性の連関

IgE 性のアレルギー反応を反映するアナフィラキシーモデルを用いて、アレルゲン曝露量が IgE 性のアレルギー発症に与える影響を評価した。最終塗布後、各マウスに Dp を静脈内投与し、体温低下を指標として、アナフィラキシーショックの重症度を評価した。その結果、Dp 曝露量に反比例し、低用量曝露群で、最も顕著な体温低下が観察された。従って、より低用量のアレルゲンへの曝露により、IgE 性のアレルギーを発症しやすくなることが示された。次に、低用量のアレルゲン曝露により、IgE 性のアレルギー発症への感受性が増加するメカニズムを解明するため、体温低下と抗体価の相関を解析した。その結果、総 IgG 量と共に、Dp 特異的 IgG3 を除いた Dp 特異的 IgG の全てのサブタイプの力価と体温低下に有意な負の相関が認められた。従って、Dp 特異的な IgG が、IgE 性のアレルギー発症に予防的に働いていることが示唆された。



これまでの結果により、低用量曝露群で、高用量曝露群よりもアナフィラキシーショックへの感受性が亢進する現象は、低用量曝露群でIgGの産生が低いことに起因すると考えられた。そこで本仮説を検証するため、低用量曝露群に、Dp特異的なIgGを移入し、アナフィラキシーへの感受性が軽減されるかを検証した。最終塗布の1週間後、低用量曝露群にDp特異的なIgGを移入し、その24時間後、Dpを静脈内投与してアナフィラキシーショックを誘導した。その結果、Dp特異的なIgGを移入した低用量群では、有意に体温低下が軽減され、高用量曝露群とほぼ同等の体温低下のみが観察された。従って、低用量曝露群におけるアナフィラキシーショックへの感受性の亢進は、Dp特異的なIgGの産生が低いことに起因することが示された。



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2件)

Hirai T, Yoshioka Y, Takahashi H, Handa T, Izumi N, Mori T, Uemura E, Nishijima N, Sagami KI, Yamaguchi M, Eto SI, Nagano K, Kamada H, Tsunoda SI, Ishii KJ, Higashisaka K, Tsutsumi Y. High-dose cutaneous exposure to mite allergen induces IgG-mediated protection against anaphylaxis. Clin Exp Allergy. 2016 Feb 19. (査読有) doi: 10.1111/cea.12722.

Hirai T, Yoshioka Y, Takahashi H, Ichihashi K, Udaka A, Mori T, Nishijima N, Yoshida T, Nagano K, Kamada H, Tsunoda S, Takagi T, Ishii KJ, Nabeshi H, Yoshikawa T, Higashisaka K, Tsutsumi Y. Cutaneous exposure to agglomerates of silica nanoparticles and allergen results in IgE-biased immune response and

increased sensitivity to anaphylaxis in mice. Part Fibre Toxicol. 2015 Jun 26;12:16. (査読有) doi: 10.1186/s12989-015-0095-3.

[学会発表](計1件)

吉岡靖雄, 東阪和馬, 堤康央: Sustainable Nanotechnology を目指したナノ安全科学研究., 第42回日本毒性学会学術年会., 金沢(石川), 2015年6月.

[図書](計2件)

Yoshioka Y, Higashisaka K, Tsutsumi Y. Biocompatibility of nanomaterials. In Lu Zheng-Rong ed., Nanomaterials in Pharmacology. Springer. p185-199. 2016.

Hirai T, Yoshioka Y, Higashisaka K, Tsutsumi Y. Potential hazards of skin exposure to nanoparticles. In Andrij Holian ed., Biological Effects of Fibrous and Particulate Substances, Springer. p123-135. 2016.

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉岡靖雄 (YOSHIOKA, Yasuo)
大阪大学・微生物病研究所・特任准教授(常勤)
研究者番号: 00392308

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

永井 健治 (NAGAI, Takeharu)
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号: 20311350

新井 由之 (ARAI, Yoshiyuki)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号: 20444515