

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月15日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10039

研究課題名(和文) 新生児・乳児に特化した舌下粘膜ワクチンアジュバントの開発と分子基盤の解明

研究課題名(英文) Development of sublingual mucosal vaccine adjuvant for neonates and infants

研究代表者

徳原 大介 (TOKUHARA, DAISUKE)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60448751

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)：臍帯血と健常成人末梢血を用いて、TLR作動薬刺激に対する新生児と成人の抗原提示細胞の機能の差異を検証した。その結果、新生児の抗原提示細胞は成人と表現型が異なり、基礎的な抗原提示機能(MHC class IIやCD80)が低いものの、TLR作動薬(LPSやzymosan)は成人よりも新生児の抗原提示細胞の賦活化に効果的であり、新生児・乳児に特化した舌下ワクチンのアジュバントとして適していると考えられた(論文投稿中)。また、それらTLR作動薬の中でも、これまでの我々の研究成果も踏まえて考えれば、zymosanが最も安全性かつ効果の面でアジュバントとして期待できるのではないかと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のワクチンは健常成人や成熟マウスにおける効果をもとに開発され、乳幼児に応用されている。しかし乳幼児はそれらのワクチンによる免疫誘導効果が低く、成人よりも複数回の接種を必要とする。その問題点を克服するためには、成熟した免疫システムを対象にしたワクチンの開発ステップを見直す必要があり、乳幼児免疫の理解に立脚したワクチン開発が望ましい。しかし、乳幼児から研究用に血液を採取することは侵襲性が高いため、我々は痛みを伴わずに採取できる臍帯血を用いた解析を展開している。本研究成果はヒト臍帯血から得られるため、動物実験や成人で得られた結果よりもシームレスに乳幼児に特化したワクチン開発への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Human cord blood and adult peripheral blood monocytes were isolated and stimulated with lipopolysaccharide (TLR4 agonist) or zymosan (TLR2/6 agonist). Expression levels of MHC-class II, CD80, CD86, CD11b, CD11c, CD14, and CD16 were evaluated. Cord blood CD14+CD16high monocytes showed significantly lower levels of basal expression of MHC-class II, CD80, and CD11b compared with those of adult CD14+CD16intermediate monocytes. The ratios of lipopolysaccharide-stimulated expression levels to basal levels for MHC-class II, CD80, and CD11b and the ratios of zymosan-stimulated expression levels to basal levels for MHC-class II, CD86, CD11b, and CD11c were significantly higher in cord blood monocytes than in adult blood monocytes. Despite showing selective impairment of basal expression of surface antigens, neonatal monocytes are hyperresponsive to TLR stimulation compared with adult. Application of TLR agonists may complement induction of protective immunity as a vaccine adjuvant in children.

研究分野：粘膜免疫学、小児感染症学

キーワード：ワクチン アジュバント 感染症 小児 臍帯血 自然免疫 Toll様受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界における5歳未満の乳幼児の死亡者数は年間630万人にのぼり、死亡原因の46%を感染症が占める。したがって乳幼児の感染症に対する効果的な予防戦略の構築は世界的に重要な課題であり、予防戦略の要として安全かつ効果的なワクチンの開発が常に求められている。現在国内で承認されている約20種類のワクチンのうち3分の2は乳幼児(多くは乳児期に接種)を対象としているが、そのうちBCG以外のすべてのワクチンが複数回(2~4回)の接種を必要としている。成人と乳幼児の両群で接種されるインフルエンザウイルスやコレラなどのワクチンに関して接種回数を比較した場合においても、乳幼児は成人よりも複数回のワクチンを必要とすることから、乳幼児における現行ワクチンの免疫誘導効果が成人と比較して低いことが示唆される。

これまで研究代表者は、東京大学医科学研究所の清野宏教授とともに、小児の感染症に対するワクチン開発に取り組み、ワクチン抗原をイネ種子であるコメに発現させた室温保存可能なコメ型経口コレラワクチンの開発を進め、成熟マウスにおける有効性を報告した¹⁾。同ワクチンは小腸の免疫誘導組織であるパイエル板から効果的に取り込まれ防御免疫を誘導することができるが、幼若マウスと成熟マウスにおける同コメ型ワクチンの免疫誘導効果を比較すると、幼若マウスは成熟マウスよりも多くの接種回数を必要とすることがわかった。また、研究代表者らはロタウイルスに対する予防抗体も開発したが、その研究過程において、乳幼児の下痢症の重要な原因であるロタウイルスは、幼若マウス(生後5日目)には感染を成立し下痢を呈するものの、成熟マウスには感染しないことを知見として得ている²⁾。このように、乳幼児や幼若マウスは成人や成熟マウスと比較して感染症に罹患しやすく、ワクチンによる免疫誘導効果が低い。乳幼児が成人よりも数多くの種類のワクチンを必要とし、今後もRSウイルスやノロウイルスなどに対する新しいワクチンが必要となることを考えれば、少ない接種回数で効果的に防御免疫を乳幼児、特に乳児に付与できるワクチンの開発基盤を構築する必要がある。

2. 研究の目的

乳幼児に特化したワクチン開発のキーとなる点はデリバリーシステム(経口や経鼻など)とアジュバントの2点と考えられる。デリバリーシステムに関しては、これまでの我々の研究成果から舌下経路による免疫が呼吸器と消化管の両粘膜組織へ効果的に防御免疫を付与できることを明らかにしており、乳幼児モデルの幼若マウスにおいても免疫誘導効果が得られることを実証している。一方、ワクチン抗原に対する免疫細胞の応答を効果的に賦活化するアジュバントについては十分な探索が行えていない。乳幼児に特化したワクチン開発を進めるためには、乳幼児におけるワクチンの免疫誘導に関わるシステムを理解し、その理解に立脚した研究を展開することが理にかなっているが、乳幼児から研究に必要な血液や粘膜組織を採取することは侵襲性が高く倫理的に認められないため、乳幼児の免疫誘導システムの基礎的な探求は国内外でほとんど行われていない。これに対して本研究代表者は、出産後に廃棄される胎盤から採取できる臍帯血に注目し、臍帯血から分離した免疫細胞を用いた新生児の自然免疫探求ならびにアジュバント探索を展開してきた。そして、健康成人と比べて低いと考えられていた新生児の自然免疫応答はToll様受容体(TLR)や抗原提示細胞の種類によって異なり、TLR2/6作動薬(zymosan)が抗原提示細胞の種類を問わず成人と同等のサイトカイン産生を惹起できることを明らかにした³⁾。本研究では、これまでの我々の臍帯血解析研究を発展させ、乳幼児に特化した舌下ワクチンのアジュバントのさらなる探索ならびにその有用性に関わる分子基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

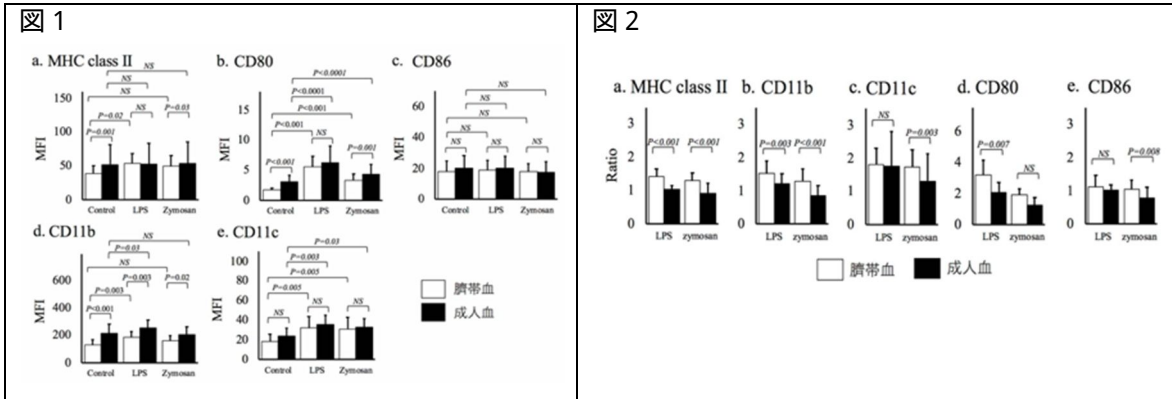
感染症のない予定帝王切開15例(妊娠週数平均 37.8 ± 0.41 週, Apgar score 平均 $7.9 \pm 0.7 / 8.7 \pm 0.5$ [1/5分])の胎盤から出生後に臍帯血を無菌的に採取し、対照群として健康成人19例(平均年齢 26.7 ± 3.0 歳, 男/女 12/7)から末梢血を採取した。両群の血液からリンパ球分離液を用いて単核球を単離し、磁気分離法によってCD14陽性単球を分離した。CD14陽性単球(1×10^6 個)にTLR4作動薬(Lipopolysaccharide, LPS; 100 ng/mL)、TLR2/6作動薬(zymosan; 10 μ g/mL)あるいは非刺激コントロールとしてPBSを添加し、5% CO₂インキュベーターにて6時間培養した。培養後の細胞を回収し、細胞表面分子(CD11b, CD11c, CD80, CD86, MHC class II, CD14, CD16)の発現をフローサイトメーター(LSR II)を用いて測定した。また培養上清も回収し、上清中のサイトカイン濃度をCBA kitを用いて測定した。測定結果は臍帯血群・成人血群ならびに刺激群と非刺激群の2群間で比較した。

4. 研究成果

(1) 細胞表面分子の発現比較 (図1)

非刺激条件下では、臍帯血群は成人血群よりもHLA、CD11b、CD80の発現が有意に低値であった。つまり、新生児期の抗原提示細胞の抗原提示に関わる分子の基礎発現が成人と比較して低いことが示唆された。LPS刺激下では、臍帯血群は成人血群よりもCD11bの発現が有意に低値を示した。Zymosan刺激下では、臍帯血群は成人血群よりもHLA、CD11b、CD80の発現において有意に低値を示した。

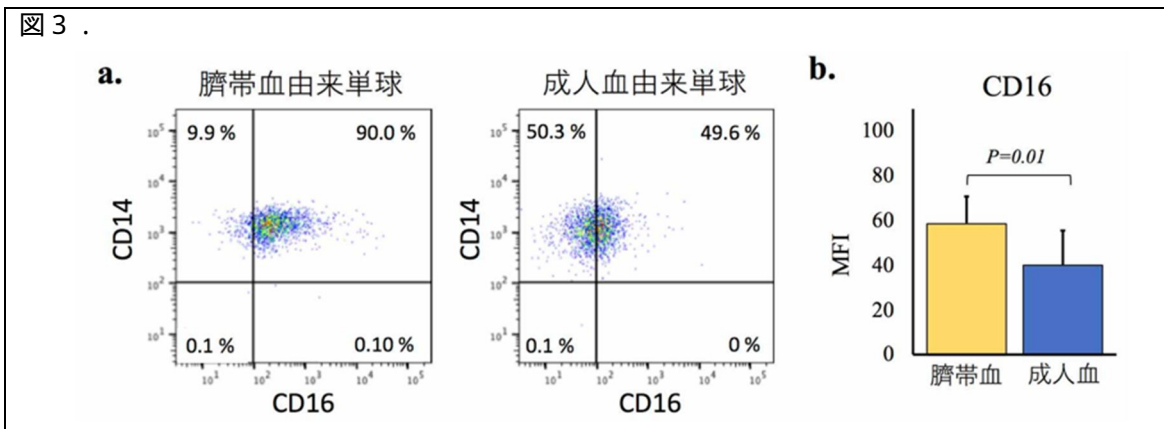
(2) 細胞表面分子のTLR刺激による発現強度の比較 (図2)



TLR 刺激による反応性（非刺激に対する刺激後の発現強度比）を比較すると、臍帯血群単球は成人血群の単球よりも表面分子の発現強度が高い傾向を示した。（1）の結果を含め考えると、新生児の抗原提示細胞の抗原提示に関わる基礎的機能は成人よりも低い、TLR 刺激に対する免疫応答は成人よりもむしろ良く、基礎発現の低さゆえに最終的な分子発現が見かけ上低く見えるのではないかと考えられた。

（3）臍帯血由来単球と成人血由来単球の表現型の差異の解析（図 3）

両群の単球の CD14 発現に有意な差は認めなかったが、CD16 の発現は成人血由来単球よりも臍帯血由来の単球が有意に高い結果が得られた（図 3 a, b）。従って、ヒト単球は出生時においては成人と比較して機能面だけでなく表現型の点においても異なることが示唆された。



（4）サイトカイン産生の解析

臍帯血・成人血両群における LPS ならびに zymosan 刺激後のサイトカイン産生（IL-8, IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10）を測定したが、有意な差はなかった。

（1）～（3）の結果から、新生児の抗原提示細胞は成人と表現型が異なり、基礎的な抗原提示機能が低いものの、TLR 作動薬は成人よりも新生児の抗原提示細胞の賦活化に効果的であり、新生児・乳児に特化した舌化ワクチンのアジュバントとして適していると考えられた（論文投稿中）。また、それら TLR 作動薬の中でも、これまでの我々の研究成果（Nohmi K. J Pediatr. 2015）も踏まえて考えれば、zymosan が最も安全性かつ効果の面でアジュバントとして期待できるのではないかと考えている。

< 引用文献 >

Tokuhara Daisuke, Yuki Yoshikazu, Nochi Tomonori, Kodama Toshio, Mejima Mio, Kurokawa Shiho, Takahashi Yuko, Nanno Masanobu, Nakanishi Ushio, Takaiwa Fumio, Honda Takeshi, Kiyono Hiroshi. Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:8794-9.

Tokuhara Daisuke, Álvarez Beatriz, Mejima Mio, Hiroiwa Tomoko, Takahashi Yuko, Kurokawa Shiho, Kuroda Masaharu, Oyama Masaki, Kozuka-Hata Hiroko, Nochi Tomonori, Sagara Hiroshi, Aladin Farah, Marcotte Harold, Frenken Leon G, Iturriza-Gómara Miren, Kiyono Hiroshi, Hammarström Lennart, Yuki Y. Rice-based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. J Clin Invest. 2013;123:3829-38.

Nohmi Kyoko, Tokuhara Daisuke, Tachibana Daisuke, Saito Mika, Sakashita Yuko, Nakano Akemi, Terada Hiroyuki, Katayama Hiroko, Koyama Masayasu. Zymosan induces immune responses comparable with those of adults in monocytes, dendritic cells, and monocyte-derived dendritic cells from cord blood. J Pediatr. 2015; 167: 155-162.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Tokuhara Daisuke, Kurashima Yohsuke, Kamioka Mariko, Nakayama Toshinori, Ernst Peter, Kiyono Hiroshi. A comprehensive understanding of the gut mucosal immune system in allergic inflammation. *Allergology International*. 2019; 68: 17-25. (査読有) DOI: 10.1016/j.alit.2018.09.004.

Tokuhara Daisuke, Challenges in developing mucosal vaccines and antibodies against infectious diarrhea in children. *Pediatrics International*. 2018; 214-223. (査読有) DOI: 10.1111/ped.13497.

徳原 大介, 清野 宏. ワクチン開発-過去から学び、次世代型への展開. *小児内科*. 2018;50:1186-1194. (査読無)

〔学会発表〕(計 3 件)

徳原 大介. 乳幼児に特化した次世代型ノロウイルスワクチンの開発. 第 122 回日本小児科学会学術集会 (金沢) 2019 年

匹田 典克, 徳原 大介. 臍帯血由来単球における TLR を介した自然免疫応答の解析. 第 122 回日本小児科学会学術集会 (金沢) 2019 年

匹田 典克, 趙 有季, 橘 大輔, 濱崎 考史, 古山 将康, 徳原 大介. 小児消化管感染症に対するワクチンアジュバント開発: 抗原提示細胞の免疫賦活物質探索. 第 15 回日本小児消化管感染症研究会 (大阪) 2019 年

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/pediat/research.html#group11>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 匹田 典克

ローマ字氏名: (HIKITA norikatsu)

研究協力者氏名: 橘 大輔

ローマ字氏名: (TACHIBANA daisuke)

研究協力者氏名: 趙 有季

ローマ字氏名: (CHO yuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。