

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17926

研究課題名(和文) Th17を介した生体成分由来の経口アジュバントの感染防御IgA誘導機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism analysis of oral vaccine adjuvant derived from pulmonary surfactant forced on Th17-mediated IgA induction

研究代表者

木本 貴士 (KIMOTO, Takashi)

徳島大学・先端酵素学研究所(デザイン)・特任助教

研究者番号：90724261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体成分由来のアジュバントSF-10は、病原体の感染部位である粘膜のIgA抗体を強力に誘導できる。本研究では、SF-10とインフルエンザワクチンを混合して誘導されるIgA抗体が制御性T細胞(Treg)やTh17に関与するかを検討した。その結果、Tregは一定の関与が確認されたが、Th17については本試験中に解明することができなかった。HAV-SF-10によって誘導されるIgAの感染防御に対する有意性を検討した結果、IgA非存在下でもIgGが存在すれば感染致死を防ぐことができた。一方で、IgA非存在下では感染後の体重減少が著しく、感染阻止や重症化予防にIgAが有用であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在臨床で使用されている感染防御ワクチンのほとんどは、注射型ワクチンであり、粘膜の抗体、特にIgA抗体を誘導することができない。通常、病原体は粘膜から体内に侵入するため、粘膜の感染防御免疫を誘導できる経粘膜投与ワクチンは次世代のワクチンとして期待されている。私たちが開発した生体成分肺サーファクタント由来の免疫増強剤(アジュバント)であるSF-10は経口投与アジュバントとして有効である。本研究でSF-10によるIgA誘導機序の一端が解明され、また誘導されるIgAとIgGそれぞれの有意性が確認された。これら知見は次世代のワクチン開発に大きく貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：SF-10, an adjuvant derived from pulmonary surfactant, can potently induce IgA antibodies in the mucosa that is the site of pathogen infection. In this study, we investigated whether the IgA antibodies induced by mixing SF-10 with influenza vaccine (HAV-SF-10) involved regulatory T cells (Treg) and Th17. As a result, it was confirmed that Treg was involved in the induction of IgA by oral administration of HAV-SF-10 to some extent, but the involvement of Th17 could not be clarified in this study. We examined the infection protection effect of the IgA induced by oral administration of HAV-SF-10 and found that the presence of IgG prevented infection fatalities even in the absence of IgA. On the other hand, in the absence of IgA, there was significant weight loss after infection, indicating the usefulness of IgA in preventing infection and severe disease.

研究分野：ワクチン学

キーワード：経口ワクチン 肺サーファクタント インフルエンザ 腸管免疫 Th17 Treg IgA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在臨床で用いられているインフルエンザワクチン (HAV) は皮下・筋肉内投与型ワクチンであり、これは血液 IgG による肺炎等の重症化予防には有効であるが、実際にウイルスが感染、増殖する気道粘膜の IgA を誘導しないため感染防御効果はほとんどない。この問題を解決するために、当研究室は粘膜 IgA を誘導できる粘膜投与 HAV の開発研究に着手した。その結果、当研究室が開発した肺サーファクタント由来粘膜アジュバント SF-10 と HAV を混合した経口投与ワクチン (HAV-SF-10) が強力に粘膜 IgA を誘導できることを見出した。IgA は粘膜局所での感染防御に重要であるだけでなく、変異が起こったウイルス株においても中和効果を示すいわゆる交叉反応性が高いことから、IgA 誘導型ワクチンは、次世代の感染防御ワクチンとして実用化が強く望まれている。当研究室が開発した SF-10 アジュバントは粘膜の IgA を強く誘導できるが、その感染防御における有意性と IgA 誘導メカニズムについては十分分かっていない。先行している研究で HAV-SF-10 を経口投与したマウスのリンパ球の中で、HAV 応答性の Th17 サイトカイン産生細胞が誘導されていることを明らかにしている。Th17 は、抗体産生細胞の IgA 産生細胞へのクラススイッチ促進作用や IgA の粘膜への分泌に必須な pIg 受容体の発現を粘膜上皮細胞で増強する働きがあり、粘膜 IgA 誘導に強く関与している。加えて粘膜組織には制御性 T 細胞 (Treg) が多量に存在し IgA 産生細胞へのクラススイッチに重要な TGF- $\beta$  を産生・分泌している。以上の知見から、HAV-SF-10 経口投与により誘導される粘膜 IgA の誘導メカニズムの一端が Th17 と Treg である可能性が推測される。

### 2. 研究の目的

先述したように肺サーファクタント由来アジュバント SF-10 を HAV と混合し、経口投与すると粘膜 IgA を強力に誘導できることが分かっている。本研究では SF-10 アジュバントの開発研究を通じて粘膜 IgA の感染防御における有意性を明らかにし、またその誘導メカニズムを Th17 と Treg に着目して明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) anti-CD25 抗体処理マウスにおける IgA 産生の検討

BALB/c マウスに、anti-mouse CD25 (IL-2R )及び isotype control として anti-horseradish peroxidase (共に InVivoMAb, Bioxcell) を 200  $\mu$ g/head でそれぞれ腹腔内投与した。初回投与 2 日後に追加で各抗体を腹腔内投与した。追加抗体投与 3 日後に 1  $\mu$ g インフルエンザエーテルスプリットワクチン (HAV: A/Singapore(H1N1)) を皮下投与 (s.c.)、または 1  $\mu$ g の HAV 混合 SF-10 (HAV-SF-10, HAV : SF-10 = 1 : 10 (w/w)) を経口投与 (p.o.) した。初回免疫 3 日後に追加免疫し、最終免疫 2 週間後に脾臓細胞、血清、そして肺洗浄液を採取した。脾臓細胞は Treg が anti-CD25 抗体で減少・枯渇しているかを確認するために Treg のマスター転写因子である Foxp3 を蛍光抗体で染色し、Flow cytometry で解析した。また脾臓細胞中の HAV 特異的な IgA と IgG 抗体産生細胞を ELISPOT で検出した。血清は HAV 特異的 IgG、肺洗浄液は HAV 特異的 IgA 抗体を ELISA で測定した。

#### (2) ROR $\gamma$ 阻害剤を用いた Th17 枯渇マウスの作製とその IgA 産生の検討

“Int Immunopharmacol., doi: 10.1016/j.intimp.2015.03.017” を参考に、BALB/c マウスに、0.1 mg の Digoxin を一日二回、6 日間毎日腹腔内投与した。また別の実験系として、“Arthritis Rheumatol., doi: 10.1002/art.38272” や “Cell Rep. doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.101.” を参考にして、0.4 mg の SR2211 を一日二回、6 日間毎日腹腔内投与した。研究成果で追記するが、参考論文に従って各阻害剤を投与した結果、マウスの状態が著しく悪くなり、試験続行が困難となったため途中で本検討は中止した。

#### (3) IgA の影響を可能な限りなくした状態における感染防御能の検討 (母子移行免疫の利用)

本来であれば上記 (1) や (2) で IgA の産生を強く減弱させられるのかを確認し、可能であった場合は、IgA 産生枯渇状態のマウスに致死量のインフルエンザウイルスを感染させ、HA-SF-10 経口投与によって誘導される IgA の感染防御における有意性を明らかにする予定であった。しかしながら、本試験期間中に IgA の影響を排除することが困難であることが判明したため、母子移行免疫システムを利用した検討を行った。雌の BALB/c マウスに 1  $\mu$ g HAV を筋肉内投与 (i.m.)、または 1  $\mu$ g の HAV 混合 SF-10 (HAV-SF-10, HAV : SF-10 = 1 : 10 (w/w)) を経口投与した。初回免疫 14 日後に追加免疫し、最終免疫 2 週間後に雄マウスと交配させた。各群の仔マウスを出生後 4 週齢まで飼育し、尻尾より血液を採取し、その後致死量のインフルエンザウイルス (A/PR8(H1N1): 3 PFU/head) を経鼻感染させた。感染後二週間生存率と体重変化を観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) anti-CD25 抗体処理により Treg を抑制すると粘膜 IgA 抗体誘導が低下した。

Treg は Foxp3 をマスター転写因子とし、CD25 を細胞表面に発現している。Anti-CD25 抗体は Treg

の depletion (枯渇) として使用されている。ワクチン投与前に anti-CD25 を腹腔内に投与したマウスの脾臓細胞を採取し、その Foxp3 発現細胞を検出したところ、anti-CD25 処理マウスは Foxp3 発現細胞が有意に減少することが確認された (図 1)。しかしながら、本方法では完全な Treg の除去には至らないことも分かった。これらマウスの血清中抗 HAV IgG 抗体と肺洗浄液中抗 HAV IgA 抗体を測定したところ、有意差はつかないものの ( $P=0.054$ )、anti-CD25 処理によって HAV-SF-10 経口投与により誘導される肺洗浄液中 IgA は顕著に減少することが確認された (図 2)。この時、HAV-SF-10 経口投与により誘導される血清 IgG の誘導は anti-CD25 処理による影響を受けず、iso type control 処理マウスとほぼ同じ抗体価であった。また陽性コントロールである HAV 皮下投与は、従来の結果と同様粘膜の IgA は誘導されず、血清 IgG の誘導が確認された。Treg は免疫系を負に制御する制御性 T 細胞であるためか、有意差はつかないものの anti-CD25 処理により血清 IgG 抗体価が高く誘導される傾向が見られた。さらに、これら抗体を産生している細胞 (HAV 特異抗体産生細胞) を ELISPOT で検出した結果、ELISA と同様の結果が得られた (図 3)。以上の結果より、HAV-SF-10 経口投与による IgA 誘導には Treg が関与している可能性が示唆された。しかしながら、その後 anti-CD25 投与回数

図1. anti-CD25抗体処理マウスのFoxp3発現細胞の変化

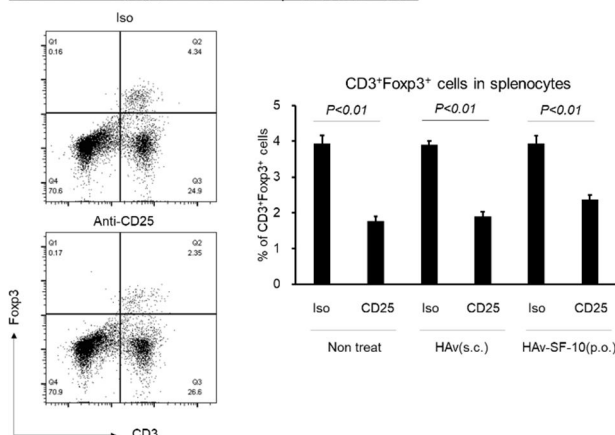


図2. Treg depletion抗体anti-CD25抗体投与マウスにおけるHAV特異抗体誘導効果の検討

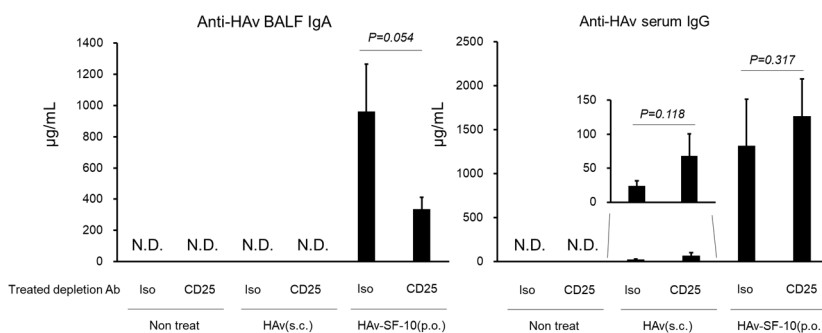
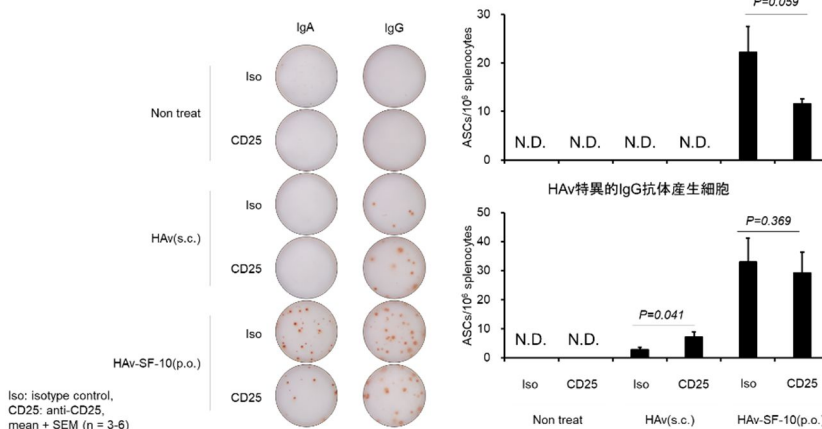


図3. anti-CD25抗体投与マウス脾臓におけるHAV特異抗体産生細胞の検出



等の条件を変えてさらに強く Treg を抑制し、IgA 産生を抑制できる方法を模索したが、本方法で抑制できる IgA 量には限界があることが分かった。図 2 の結果で示した HAV-SF-10 経口投与により誘導される肺洗浄液 IgA は Treg を抑制した状態でも 300 µg/mL の測定値を示した。過去の知見から私たちの測定システムで IgA 抗体価が数十 µg/mL でも検出されれば、感染防御には十分なことが分かっている。従って、これ以上、本方法で IgA のインフルエンザウイルス感染に対する有意性を検証することは困難であるため、次に Th17 に焦点を当てた研究を開始した。

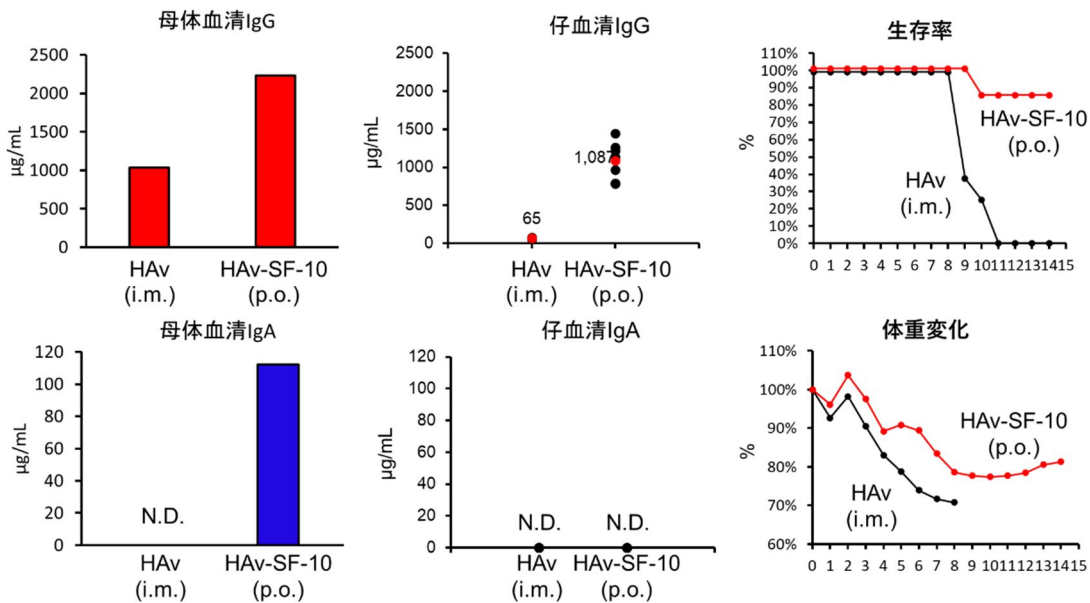
## (2) ROR $\gamma$ t 阻害剤 Digoxin や SR2211 を用いた検討

Th17 は ROR $\gamma$ t をマスター転写としてもつヘルパー T 細胞として知られている。細胞に ROR $\gamma$ t 阻害剤である Digoxin や SR2211 を処置すると Th17 が主に産生する IL-17 の産生が減少することが報告されている (ACS Chem Biol., DOI: 10.1021/cb200496y)。先述したように IL-17 は粘膜 IgA 誘導に関与しているため、これら阻害剤をマウスへ投与して HAV-SF-10 経口投与により誘導される IgA がどのような影響を受けるかを検討した。しかしながら、Digoxin や SR2211、共にマウスへワクチン前に事前腹腔内投与すると投与数日後には毛並みが悪くなるなど明らかな体調不良が観察され、試験を中止せざるを得ない状況となった。今後は例えば IL-17 の depletion 抗体を用いる、あるいは ROR $\gamma$ t のノックアウトマウスを作成し、解析を行う必要があると考えた。本計画中で、これら追加の解析を行うことは困難であるため、HAV-SF-10 経口投与によって誘導される IgA 抗体のインフルエンザ感染防御に係る有意性を明らかにするために別の角度から検討を行った。

(3) 母子移行免疫システムを用いて、IgA の関与を可能な限り低減させたときの感染防御能の解析

当初の計画では、Treg や Th17、あるいはその両方を枯渇させ、IgA 産生を低減させてその上でインフルエンザ感染試験を行い、インフルエンザ感染防御に係る IgA の有意性を評価・検討する予定であった。しかしながら前述したように本計画中に IgA の影響を強く低減させる実験系が確立できなかったため、その代替として母子移行免疫システムを利用した実験系で試験を行った。母体の血中 IgG 抗体は胎盤を介して胎児へ移行し、病原体から一定期間出生後の新生児・乳幼児を守る。また母乳を介した IgA 抗体は、乳幼児の消化管粘膜感染も防御すると言われている。本試験計画とは別の試験で、私たちは経粘膜投与ワクチンによって粘膜 IgA を誘導した雌マウスを交配し、生まれた仔マウスにはワクチン抗原特異的血清 IgG 抗体は検出されるが、肺洗浄液からは IgA 抗体が検出されないことを確認している。詳細な解析は十分ではないが、この知見から母子移行システムを使用すれば少なくとも粘膜 IgA が検出感度以下となるレベルまで低減させることができると考えた。

図4 母子移行抗体と仔マウスの感染防御能



まず HAv-SF-10 を経口投与した雌マウスの交配前の血清中抗 HAv 抗体価を尻尾から採血した血清を用いて測定し、IgG と IgA が共に誘導されていることを確認した。この時対照群とした HAv を筋肉内投与した雌マウスの血清からは抗 HAv IgG は検出されるが IgA は検出されないことも確認した。これら雌マウスを交配し、出生した仔マウスを離乳期である 4 週齢まで飼育した。感染前に尻尾から採血した後、致死量のインフルエンザウイルスを感染させた。各仔マウスの血清中抗 HAv 抗体を測定したところ、HAV 筋肉内投与および HAv-SF-10 経口投与母体から出生した仔マウス全てにおいて IgG は検出されるが IgA は検出されなかった。感染後、生存率を観察したところ、HAV 筋肉内投与母体より生まれた仔マウスは、感染 11 日目までに全個体が死亡した一方で、HAV-SF-10 経口投与母体より生まれた仔マウスは、1 匹死亡したものの観察終了時点での生存率は 86%であった (図 4)。

本試験を行って予想外だったのが、実質的に血液 IgG 抗体のみで感染を防御できた点である。背景で記述したように IgA は交叉反応性が強く、IgG は弱いとされる。インフルエンザウイルスは変異しやすいため、毎年流行予測に合わせてワクチンが製造されている。特に細胞へ結合・侵入するために必要なウイルス表面のヘマグルチニン (HA) の変異は、ワクチンによって誘導される感染防御抗体の効果に大きな影響を与える。インフルエンザウイルスデータベース (<https://www.fludb.org>) の情報を元に HA タンパクの相同性を解析すると、年により差はあるものの A 型インフルエンザ (H1N1) の HA は、年が変わると 2-3%程度アミノ酸配列が変異する。また 2009 年のパンデミック前後では約 20%の変異があった。本試験では 2009 年パンデミック時に流行したウイルス株を直近の系譜にもつ A/Singapore/GP1908/2015(H1N1) をワクチン株として免疫したマウスに、オリジナルは 1934 年に分離された A/PR8/34(H1N1) をマウスに感染するよう順化させた A/PR8 を感染させて試験を行っており、相同性も約 80%と抗原性が大きく乖離している。この条件で試験を行い、抗原性の大きく離れたワクチン抗原によって誘導された IgG による感染防御効果が示されたことは昨今のワクチン学の通説からは外れた新たな知見であると考えられる。ただしその一方、本実験で行った HAv-SF-10 経口投与母体より生まれた仔マウスは、感染により強く体重が減少することも確認されたことから、重症化予防のみならず感染防御にはやはり粘膜 IgA が重要であること改めて分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kido Hiroshi, Takahashi Etsuhisa, Kimoto Takashi	4. 巻 166
2. 論文標題 Role of host trypsin-type serine proteases and influenza virus-cytokine-trypsin cycle in influenza viral pathogenesis. Pathogenesis-based therapeutic options	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 203 ~ 213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biochi.2019.09.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木本 貴士、堺 聡子、亀田 桂子、森田 涼子、高橋 悦久、木戸 博
2. 発表標題 肺サーファクタント由来人工合成SF-10アジュバント混合経口インフルエンザワクチンは、抗インフルエンザ長期免疫記憶を誘導する。
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木本 貴士、堺 聡子、亀田 桂子、森田 涼子、高橋 悦久、木戸 博
2. 発表標題 肺サーファクタント由来人工合成粘膜アジュバントSF-10は、乳幼児期に抗インフルエンザ長期免疫記憶を誘導できる経口粘膜アジュバントである。
3. 学会等名 日本肺サーファクタント・界面医学会 第55回学術研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木本 貴士、堺 聡子、亀田 桂子、森田 涼子、高橋 悦久、木戸 博
2. 発表標題 ヒト生体成分肺サーファクタント由来人工合成SF-10アジュバントは、乳幼児期に長期感染防御免疫を誘導できる経口アジュバントである。
3. 学会等名 第23回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木本 貴士
2. 発表標題 ヒトの生体成分肺サーファクタントの生理作用を利用した安全で有効な新規粘膜アジュバントSF-10の開発
3. 学会等名 第8回高橋奨励賞受賞講演 (日本ワクチン学会) (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関