

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500527

研究課題名(和文) 生体成分肺サーファクタント粘膜アジュバントの新規応用：ガンワクチンへの適用

研究課題名(英文) The application to cancer vaccine of SSF that mimics pulmonary surfactant

研究代表者

水野 大 (Mizuno, Dai)

武蔵野大学・薬学研究所・講師

研究者番号：70380061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、我々が開発した肺サーファクタント由来人工粘膜アジュバントSSFに、細胞性免疫亢進作用があることが見出された。インフルエンザ抗原をSSFとともにマウスに経鼻接種することで、抗原特異的なIgG2a抗体が誘導された。SSFワクチン経鼻接種マウスにおいては、接種局所の粘膜組織ならびに関連リンパ組織におけるIFN- $\gamma$ の分泌と、抗原特異的な細胞障害性T細胞の誘導が認められた。SSFの細胞性免疫誘導能は、がんワクチンの開発などに応用可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The cellular immunity inducing effect of SSF, a synthetic adjuvant that mimics pulmonary surfactant, were shown in this study. Nasal inoculation of vaccine and SSF induced IgG2a antibody, IFN- $\gamma$  secreting T cell, and cytotoxic T cell. SSF is assumed to be a mucosal adjuvant that useful for cancer vaccine therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺サーファクタント 粘膜免疫 ワクチン 生体機能材料

## 1. 研究開始当初の背景

我々は肺胞内腔を膜状に覆う生体成分肺サーファクタント中に、血中 IgG 誘導に加え粘膜 IgA 抗体誘導を可能にする粘膜アジュバント作用を持つ成分を見いだした (J Immunol. 176, 1122-30, 2006、Vaccine. 27, 5620-7, 2009)。この肺サーファクタント成分による経鼻ワクチンの粘膜アジュバント効果とその有効成分の解析を進めたところ、肺サーファクタント成分は、1) 抗原を搭載し、抗原の免疫担当細胞への取込増進と鼻腔組織内への抗原貯留を増進する、2) 抗原性の極めて低い低分子膜貫通型肺サーファクタントタンパク SP-C を必須成分とする。肺サーファクタントはこれらの性質により、抗原ベクターとして働くことでアジュバント作用を発揮することを明らかとした (Vaccine. 29, 5368-78, 2011、Influenza Other Respi Viruses. 7, 1218-26, 2013)。この肺サーファクタント成分自身は免疫担当細胞を活性化せず (J Immunol. 176, 1122-30, 2006)、これを用いたワクチン接種において、白血球の減少やサイトカインの過剰な分泌など副作用に結びつく応答は認められなかった (Vaccine. 27, 5620-7, 2009)。生体成分である肺サーファクタントを利用することで、ウイルス成分や菌体成分を利用したアジュバントとは異なる "安全性の高い" アジュバントを創出した。

さらにこれらの知見を基に、3種の生体膜脂質を主成分としこれに SP-C を加えて構成された人工粘膜アジュバント SSF の開発に成功した (Vaccine. 29, 5368-78, 2011)。この粘膜アジュバントは GMP に則した材料・製法により製造し、GLP 安全性試験をクリアしており、肺サーファクタント成分と同等の効果を示した。肺サーファクタント成分由来の粘膜アジュバント SSF は安全かつ有効な経粘膜感染予防法の開発に貢献し得る。

## 1. 研究の目的

以上の研究を基盤に、この生体成分由来の

新規アジュバントの応用範囲をさらに広げるため、SSF の作用機序とこれをガンワクチンに発展させる可能性を検討した。近年、感染予防へ用いるのみならず、ワクチンによって細胞性免疫を亢進させ細胞傷害性 T 細胞にガン細胞を排除させるといったように、ガンの予防あるいは治療へワクチン接種を応用することが期待されている。ワクチン接種による細胞性免疫の亢進は困難とされるが、近年、特殊なリポソーム運搬体などにより抗原提示細胞内のエンドソームへ抗原を運び込み、抗原をリソソームまで運搬せず、初期エンドソームなどで崩壊し、抗原を手放すようなワクチン接種を行うことで、液性免疫のみならず細胞性免疫を誘導するクロスプレゼンテーションが可能であることが明らかとなった。抗原提示細胞内における抗原の輸送経路がクロスプレゼンテーションに重要であるとされ、不飽和あるいは極性基をもつリン脂質を用いるなどして、エンドソーム内などにおける脂質膜の崩壊性を高めたりリポソームによるクロスプレゼンテーションが提唱されている (J Immunol 177, 2324 - 30, 2006、Drug Deliv Sys. 23, 644 - 53, 2008、Proc Natl Acad Sci USA, 106,17463-8, 2009)。

SSF を構成するタンパク成分 SP-C は、作用によって、呼吸により絶えず収縮する肺胞に肺サーファクタント脂質膜を留まらせる作用をもち、脂質成分の気道粘膜組織表面への吸着促進と脂質膜構造の崩壊性を高める性質がある (N Engl J Med. 347, 2141-8, 2002)。SP-C を材料として含むことで、SSF の主成分である生体膜脂質成分の崩壊性を高め、これにより SSF にクロスプレゼンテーション誘導能を持たせることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1)SSF およびその成分を改変したアジュバントの作成

SSF およびこれを用いたワクチン抗原の作成は、以前の研究方法に従って行われた

(Vaccine. 29, 5368-78, 2011)。SSF はホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール (PG)、パルミチン酸、および SP-C を構成成分とする。本研究ではSSFに加えて、PGをホスファチジルセリン (PS) に置き換えたSSF (SSF(PS)) を作成した。これらを用いて以下の検討を行った。

(2)SSFを用いた経鼻ワクチン接種により誘導される抗体サブクラス

インフルエンザワクチンをSSFと混合し、これをマウスに経鼻接種した。二次免疫2週間後に採取されたマウス血液中のIgG1およびIgG2a抗体価を酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)により測定し、これを指標に免疫応答の性質を評価した。

(3)SSFを用いた経鼻ワクチン接種により誘導されるサイトカイン分泌細胞

インフルエンザワクチンをSSFと混合し、これをマウスに経鼻接種した。二次免疫2週間後に鼻咽腔 (NP) および鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT)リンパ球を採取した。採取したリンパ球を抗原刺激下で16時間培養し、培養上清中に分泌されたIFN- $\gamma$ をELISAにより定量した。

(4)SSFによる抗原取り込み作用機序についての検討

細胞分離精製装置にてマウス骨髄より樹状細胞を調製した。蛍光標識した抗原をSSFと混合し、これをアミロライド誘導体あるいはサイトカリンDとともに樹状細胞に添加した。1時間後にフローサイトメトリー (FACS)により細胞の蛍光強度を測定、これを指標として細胞への抗原取り込み効果へのそれぞれの阻害剤の影響を評価した。

(5)SSFによる細胞傷害性T細胞 (CTL) の誘導促進効果の検討

オボアルブミン (OVA) をマウスにSSFとともに経鼻接種し、接種7日後に鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT)、NP、および頸部リンパ節 (CLN) からリンパ球を採取した。採取されたリンパ球表面のOVA特異的なT細胞

受容体およびCD8の発現量をFACSで評価した。

### 3. 研究成果

(1)SSFにより亢進された、経鼻ワクチン免疫誘導の性質に関する検討

SSFを用いた経鼻ワクチンによる免疫応答の性質を、誘導された抗体サブクラスを評価することによって検討した(図1)。インフルエンザワクチン等で多用される皮下接種を受けたマウス血液中の抗体は、ほとんどが液性免疫によって誘導されるIgG1であった。

IgG2aはIgG1の100分の1程度のレベルしか検出されなかった。経鼻接種による抗体誘導は、SSFをワクチンに混合することにより顕著に増強された(図1「ワクチン+SSF」)。誘導された抗体サブクラスは、IgG1とIgG2aがほぼ同程度の水準であった。これはヘルパーT細胞を誘導する典型的なアジュバントであるpoly(I:C)と(データ示さず)同等の結果であり、SSFを用いた経鼻ワクチン接種によってpoly(I:C)と同様にヘルパーT細胞による細胞性免疫を誘導しうることが期待された。

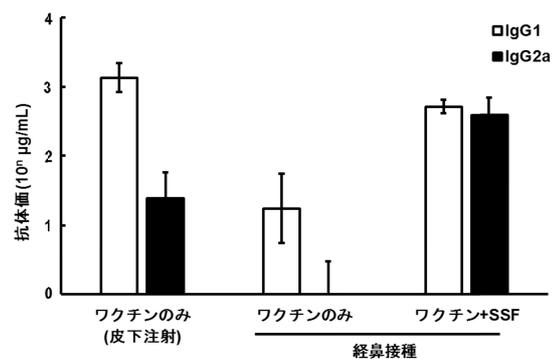


図1 SSFを用いた経鼻ワクチン接種マウスにおいて誘導された抗体サブクラス。データは各群マウス5匹の平均値±標準偏差で示した。

(2)SSFによる抗原取り込み作用機序についての検討

抗原が細胞質に輸送されてプロテオソーム

よって分解を受けることで、細胞性免疫が誘起される。我々は、SSF に抗原提示細胞などへの抗原取り込みを増強する効果があることを明らかとしている (Vaccine. 29, 5368-78, 2011)。本研究においては、マクロピノサイトーシスの阻害剤であるアミロライド誘導體、あるいはファゴサイトーシスの阻害剤サイトカラシン D を用いて、SSF による抗原取り込みのメカニズムに関する検討を行った。取り込み効率は、SSF と混合した蛍光標識抗原を添加して培養したマウス樹状細胞の蛍光強度を FACS で測定することで評価した (図 2)。SSF により増強された抗原の取り込み効率は (図 2 黒グラフ)、アミロライド誘導體を添加することにより著しく阻害された。一方サイトカラシン D は抗原取り込みに影響を与えなかった。以上の結果から SSF の抗原取り込み作用は主にマクロピノサイトーシスによることが示された。今後このマクロピノサイトーシスによる抗原取り込みが SSF による免疫増強効果にどのような影響を与えているのか、さらに検討を進めて生きたいと考える。SSF を構成するタンパク成分 SP-C には脂質膜の崩壊性を高める作用があり、抗原を取り込んだマクロピノサイトーシス小胞を崩壊させることにより抗原を細胞質へ放出しているのではないかと推察された。

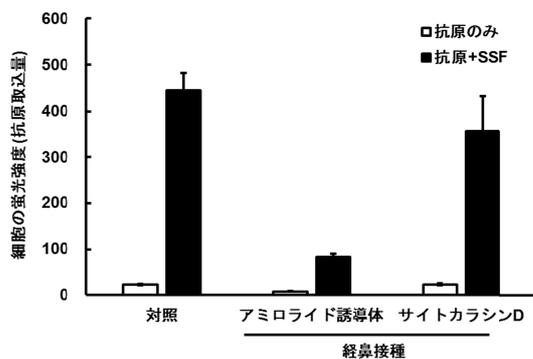


図 2 マウス樹状細胞への抗原取込に対する阻害剤の影響。データは 3 回の実験の平均値±標準偏差で示した。

### (3)SSF の構成成分の改変に関する検討

本研究では細胞性免疫にかかわることが知られている PS を構成成分とした SSF(PS)を作成し、その免疫増強作用に関する検討を行った。SSF(PS)は SSF と同様に、IgG1、IgG2a をともに誘導し、またマクロピノサイトーシスによる細胞への抗原取り込みを増強した (データ示さず)。SSF(PS)の抗体誘導、抗原取り込み効果は SSF と同等であった。

### (4)SSF による細胞傷害性 T 細胞誘導の検討

SSF 混合ワクチン経鼻投与マウスよりリンパ球を調整し、サイトカイン分泌を検討した。NP に IFN- $\gamma$  産生リンパ球が誘導されていた (データ示さず)。そこで、細胞性免疫のエフェクター細胞である CTL (細胞傷害性 T 細胞) が、SF-10 混合抗原の経鼻投与によって誘導されるか検討した。

SSF を混合した OVA を経鼻接種したマウス NALT、NP、および CLN から採取されたリンパ球に含まれる抗原特異的 CTL を、T-Select MHC tetramer (MBL) により評価した (図 3)。OVA のみを経鼻投与したマウスでは、いずれの組織においても CD8(+)細胞の誘導は認められなかった。OVA+SSF 投与および OVA+poly(I:C)投与マウスの NALT および NP に CD8(+)細胞の誘導が認められた。一方 CLN においては CD8(+)細胞の誘導は認められなかった。OVA+poly(I:C)投与マウスに誘導された CD8(+)細胞は、NP においてはその大半を OVA 特異的 CTL が占めていたが、NALT においては OVA 特異的ではないものがかなりの割合で含まれており、アジュバントである poly(I:C)特異的 CTL が誘導されたことが示唆された。一方、OVA+SSF 投与マウスに誘導された CD8(+)細胞は、NALT、NP いずれにおいてもその大半を OVA 特異的 CTL が占めており、SSF そのものは CTL を誘導しないことが示唆された。

これらのことから、SSF は共投与した抗原特異的な細胞性免疫を投与局所に誘導する自身に抗原性のないアジュバントであり、がん

ワクチンへの応用が可能であると考えられた。

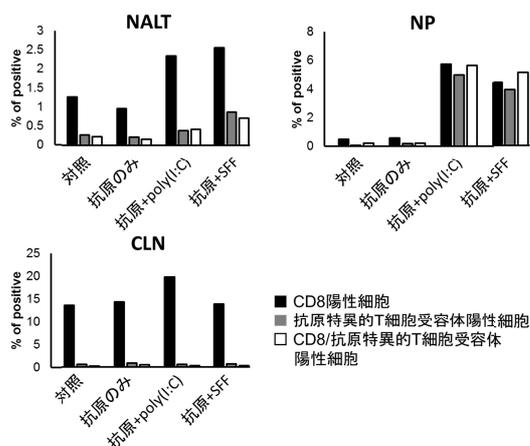


図3 SSFを用いた経鼻ワクチン接種マウスにおける細胞傷害性T細胞誘導の検討。ワクチン接種マウスNALT、NP、CLNより採取されたリンパ球表面のCD8(黒)および抗原特異的T細胞受容体(黒)の発現量をFACSで評価した。CD8、抗原特異的T細胞受容体とともに要請であった細胞の割合を図中白のグラフで表した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

1. Mizuno D et al., Protective activity of carnosine and anserine against zinc-induced neurotoxicity: a possible treatment for vascular dementia. *Metallomics*, 査読有, 2015, ahead of print, doi: 10.1039/C5MT00049A.
2. Maekawa et al. Oral Administration of *Lactobacillus pentosus* Strain S-PT84 Enhances Anti-Influenza Virus-Specific IgG Production in Plasma after Limited Dose of Influenza Virus Vaccination in Mice. *J Vac Immunotechnol*, 査読有, 2015, 2, 1-5.
3. Mizuno D et al., Involvement of trace elements in the pathogenesis of prion diseases. *Curr Pharm Biotech*, 査読有, 15, 2014, 1049-57, doi: 10.2174/1389201015666141103020625.
4. Mizuno D et al., Carnosine: A Possible Drug

for Vascular Dementia. *J Vasc Med Surg*, 査読有, 2, 2014, 146, doi: 10.4172/2329-6925.1000146.

5. Kawahara M et al., Disruption of Zinc Homeostasis and the Pathogenesis of Senile Dementia. *Metallomics*, 査読有, 6, 2013, 209-219, doi: 10.1039/c3mt00257h.

6. Shinahara W et al., Immunomodulator clarithromycin enhances mucosal and systemic immune responses and reduces re-infection rate in pediatric patients with influenza treated with antiviral neuraminidase inhibitors: a retrospective analysis. *PLoS One*, 査読有, 8, 2013, e70060, doi: 10.1371/journal.pone.0070060.

7. Mizuno D et al., The involvement of endoplasmic reticulum-stress in zinc neurotoxicity and the pathogenesis of vascular type senile dementia. *Int J Mol Sci*, 査読有, 14, 2013, 22067-22081, doi:10.3390/ijms141122067.

8. Kimoto T et al., Intranasal influenza vaccination using a new synthetic mucosal adjuvant SF-10: induction of potent local and systemic immunity with balanced Th1 and Th2 responses. *Influenza Other Respi Viruses*, 査読有, 7, 2013, 1218-1226, doi: 10.1111/irv.12124.

9. Takahashi E et al., Oral clarithromycin enhances airway IgA immunity through induction of IgA class switching recombination and B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family molecule on mucosal dendritic cells in mice infected with influenza A virus. *J Virol*, 査読有, 86, 2012, 10924-10934. doi: 10.1128/JVI.01207-12

10. 木戸博他, マクロライド薬によるインフルエンザ感染時の粘膜免疫増強作用, *臨床と微生物*, 査読無, 39, 2012, 331-335.

[学会発表](計9件)

1. 水野大, 日本の予防接種制度を、予防接種禍から考える, *日本社会医療学会第15回記*

念大会, 2014年10月19日, 九州保健福祉大学(宮崎)

2. 水野 大 他, アロマテラピー精油 *in vitro* 機能評価系の開発, 第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2014年8月20日, 帝京大学(東京)

3. 水野 大 他, アロマテラピー精油の GT1-7 細胞 (不死化視床下部神経細胞) に対する影響, 第134回日本薬学会年会, 2014年3月28日, 熊本市総合体育館(熊本)

4. 水野 大 他, 脳血管認知症予防・治療薬としてのカルノシンの作用メカニズム解析, 第134回日本薬学会年会, 2014年3月28日, 熊本市総合体育館(熊本)

5. Mizuno D et al., Effects of carnosine on Zinc-induced neurotoxicity and its analysis in rat's brain, International Society For Trance Element Reserch in Humans 2013, 2013年11月18日, Keio Plaza Hotel(Tokyo)

6. 水野 大 他, 人工サーファクタント SF10 による経鼻インフルエンザワクチンアジュバント効果, 第57回日本薬学会関東支部大会, 2013年10月26日, 帝京大学(東京)

7. 水野 大 他, 亜鉛による神経細胞死のカルノシン抑制機構の検討, 第26回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2013年8月2日, 昭和大学(東京)

8. 水野 大 他, カニクイザルを用いた、ヒト肺サーファクタント由来 SF-10 アジュバントによる経鼻インフルエンザワクチンの効果検討, 第85回日本生化学会大会, 2012年12月16日, 福岡国際会議場(福岡県)

9. 水野 大 他, カニクイザルを用いた、ヒト肺サーファクタント由来 SF-10 アジュバントによる経鼻インフルエンザワクチンの効果検討, 第16回日本ワクチン学会, 2012年11月18日, パシフィコ横浜(横浜)

[ 図書 ] (計3件)

. 水野 大 他, 第17章. 薬事制度 (医薬品・医療機器等の恩恵と被害). 『生命倫理・医

事法』, 医療科学社, 東京, 印刷中. Mizuno D et al., Oligomerization of proteins and neurodegenerative diseases. In Oligomerization of Chemical and Biological Compounds, ed by Lesieur C, InTech, Rijeka, 2014, 279-293, ISBN 980-953-307-1130-3.

. 水野 大, 第8章5節 経鼻ワクチン. ワクチン開発における最新動向~規制動向・安全性評価・品質管理・アジュバント・開発事例~, 株式会社情報機構, 東京, 2013, 175-186, ISBN 978-4-86502-044-1.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

水野 大 (MIZUNO DAI)

武蔵野大学・薬学研究所・講師

研究者番号: 7 0 3 8 0 0 6 1

### (2)連携研究者

木戸 博 (KIDO HIROSHI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・特任教授

研究者番号: 5 0 1 4 4 9 7 8