

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462689

研究課題名(和文)ホスホリルコリンを用いた多機能性粘膜ワクチンの開発

研究課題名(英文)Application of phosphorylcholine for multi-functional mucosal vaccine

研究代表者

黒野 祐一 (KURONO, YUICHI)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：80153427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：卵白アルブミン(OVA)感作によるアレルギー性鼻炎モデルマウスを作成し、ホスホリルコリン(PC)経鼻および舌下投与によるアレルギー性鼻炎の抑制効果を検討した。その結果、PC投与によってアレルギー性鼻炎症状が有意に抑制され、樹状細胞からのIL-12産生、頸部リンパ節における制御性T細胞の誘導によってIgE産生が抑制されることが証明された。また、上皮細胞への肺炎球菌およびインフルエンザ菌の接着は、PCによる上皮細胞の処理によって抑制されることが実証された。これらの結果から、PCはワクチンとして免疫応答を誘導するのみならず、それ自体が細菌感染を阻止する多機能性を備えていると推測された。

研究成果の概要(英文)：Murine model of allergic rhinitis sensitized with ovalbumin were pre-immunized with phosphorylcholine (PC) via intranasal or sublingual routes and the inhibitory effects of PC on the occurrence of allergic rhinitis. The results showed that intranasal as well as sublingual immunization with PC induced the production of IL-12 from dendritic cells and regulatory T cells in cervical lymph nodes and decreased OVA-specific serum IgE levels. Further, the treatment of buccal epithelial cells with PC inhibited the adherence of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae to those epithelial cells. Those findings suggest that PC is equipped with multi-functional activity which can induce immune responses as a mucosal vaccine and prevent bacterial infection directly by inhibiting the adherence to mucosal surfaces.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：ホスホリルコリン PC-KLH 粘膜免疫 粘膜ワクチン 経鼻免疫 舌下免疫 経皮免疫 アレルギー性鼻炎

## 1. 研究開始当初の背景

最近、本邦でも7価に続いて13価の肺炎球菌ワクチン(プレベナー<sup>®</sup>)が定期接種化され、肺炎や髄膜炎など肺炎球菌による重症侵襲性感染症は激減した。また、肺炎球菌は肺炎や髄膜炎以外にも急性中耳炎や急性副鼻腔炎などの通常疾患の起炎菌であることから、これらの感染症もこのワクチンの普及によってその発症頻度が低下すると期待される。ところが、すでに10年以上前からプレベナー<sup>®</sup>が使用されている欧米の疫学調査によると急性中耳炎の予防効果は極めて低いことが判明し、これはワクチンに含まれる株以外の肺炎球菌あるいはインフルエンザ菌によって発症する急性中耳炎が増加したためと考えられている。したがって、ワクチンによって急性中耳炎を予防するためには、その起炎菌すべてに有効な広域スペクトラムをもつワクチンの開発が必要とされている。

そこで、我々は、すべての細菌の細胞壁構成成分であるホスホリルコリン(PC)に着目し、PCとkeyhole limpet hemocyanin(KLH)の結合物質であるPC-KLHをコレラトキシン(CT)とともにマウスに経鼻投与し、これが肺炎球菌とインフルエンザ菌による感染予防に有効なことを明らかにした。しかし、この研究で使用したPC-KLHはヒト毒性があり、また、市販されているPCは非可溶性であるため、これらをそのまま臨床に用いることはできない。そこで、これらの問題点を解決し、PCワクチンを実用化するため、我々はすでに日油(株)と提携し、カチオン化およびナノ化した可溶性PC配合体(MPC-CMPC-NA)を作成した。カチオン化によって粘膜への付着性が増加し、ナノ化によって粘膜浸透性が向上することから、粘膜ワクチンとしての免疫原性が高まり、粘膜アジュバントも不要になると推測される。

また、最近、我々は、PCの経鼻免疫でIgEの産生が抑制されることを報告した。PCは動脈硬化やIgA腎症の発症にも関与し、肺炎球菌ワクチンで動脈硬化が予防され、動脈硬化症例は健常人と比較して抗PC-IgMが低値であること、PCと肺炎球菌の莢膜多糖体をマウスに投与することでIgA腎症が発症することが報告されている。さらに、PCはPAF受容体のリガンドとしても働き、PCを菌体表面に有する肺炎球菌やインフルエンザ菌の上皮細胞への接着および細胞内浸潤に重要な役割を果たしている。すなわち、PCは多種多様な疾患や病態に関わる因子であり、このPCを応用することで多機能性を有する粘膜ワクチンの開発ができると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、PCの多機能性を実証し、新たな粘膜ワクチンの開発を目的として、マウスおよびヒト組織材料を用いて、以下の4項目を明らかにすることを目的とした。

(1) 可溶性PC配合体であるMPC-C、MPC-NAを経鼻、舌下、経皮投与することによって、PC-KLHと同等あるいはそれ以上の全身および粘膜免疫応答が誘導できるか、また、CTなどの粘膜アジュバントを用いずともPC配合体のみで免疫応答が誘導できるかを検討する。

(2) アレルギー性鼻炎モデルを作成し、PCの経鼻そして舌下投与免疫によってアレルギー性鼻炎の発症が予防できるかを検討する。

(3) PC粘膜ワクチンの投与によってPC特異的IgAが誘導されIgA腎症が発症することが懸念されることから、IgA腎症におけるPCに対する免疫応答の役割を明らかにする。

(4) PCの直接作用による細菌感染予防の可能性を明らかにするため、粘膜上皮への肺炎球菌およびインフルエンザ菌の接着におけるPCの抑制効果を*in vitro*で検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 粘膜免疫応答を誘導するためのPC配合体の至適容量と免疫方法の設定

これまでの研究ではPC-KLHを50 $\mu$ gとCTを1 $\mu$ g用い、週1回3回の経鼻そして舌下免疫で粘膜免疫応答が誘導されることを明らかにした。しかし、リピジュア<sup>®</sup>単剤では有意な免疫応答は誘導できなかった。そこで、リピジュア<sup>®</sup>よりも粘膜吸着性や浸透性が高いMPC-CやMPC-NAで免疫応答が誘導できるかを確認するため、これらPC配合体の濃度を振り分け、免疫を行い経時的に血液と唾液を採取し免疫動態を観察した。また、粘膜アジュバントとしてのCT併用の有無についても検討した。

(2) PC配合体の経皮投与による免疫応答の観察

長さ50 $\mu$ m、100 $\mu$ m、150 $\mu$ m、200 $\mu$ mのマイクロニードルを用いて剃毛したマウスの背部あるいは頸部の皮膚、耳介をこれで数箇所刺し、各種濃度のPC-KLHおよびPC配合体を塗布し30分間安静にした。この操作を週1回連続して行い、経時的に免疫動態を観察した。さらに、粘膜アジュバントのCT併用による相違、背部、頸部、耳介の経皮免疫応答の相違を検討した。

(3) PC経粘膜免疫によるアレルギー性鼻炎発症の予防効果の評価

OVA をアルミニウムゲルとともに週 1 回、2 回、腹腔内投与し、その 1 週間から連日、7 日間、OVA で経鼻刺激し、アレルギー性鼻炎モデルを作成した。アレルギー性鼻炎発症は、OVA の最終経鼻刺激直後 5 分間の鼻症状(くしゃみ、鼻こすり)の程度、血清中 OVA 特異的 IgE 濃度、鼻粘膜の好酸球浸潤により確認した。

このアレルギー性鼻炎モデルにおいて、最初の OVA 腹腔感作の 3 週間前から、週 1 回、3 回、PC-KLH を経鼻、舌下投与し、PC 経粘膜免疫によるアレルギー性鼻炎症状ならびに血清中 OVA 特異的 IgE 値、鼻粘膜の好酸球浸潤の抑制の有無を観察した。さらに、頸部リンパ節および脾臓からリンパ球を分離し、マイクロビーズ細胞分離法を用いて CD4 陽性 T 細胞を分離し、マイトマイシン処理した抗原提示細胞および OVA とともに 48 時間培養し、培養上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-4、TGF- $\beta$ 、IL10、T-bet、GATA3、Foxp3 を ELISA および RT-PCR で解析した。

(4) IgA 腎症患者の口蓋扁桃における PC 特異的免疫応答

PC は細菌のみならずヒト細胞の構成因子でもあり、これをワクチンとして用いた際に、自己免疫応答を誘導することが懸念される。そこで、ヒト口蓋扁桃における PC 特異的抗体産生の有無、そして IgA 腎症への PC の関与を検討するため、口蓋扁桃摘出によって得られた扁桃組織からリンパ球を分離し、ELISPOT 法によって、PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数を定量した。また、患者血清中の PC 特異的抗体価を ELISA 法で測定し、これらの結果と IgA 腎症の重症度と予後、血液生化学的結果等と比較し、PC 特異的免疫応答と IgA 腎症との関連性を検討した。

(5) PC の細菌接着の抑制効果

PC が肺炎球菌やインフルエンザ菌などの細胞膜表面に存在し、これが粘膜上皮の PAF 受容体と結合することがこれら細菌の上皮接着に関与することが知られている。そこで、ヒト頬粘膜を擦過して得られた上皮細胞を PC-KLH および PC 配合体で処理し、これによる各種細菌の接着抑制効果を検討した。リジンで処理した 96 穴の細胞培養プレートに頬粘膜上皮細胞浮遊液を添加し、遠心処理によってプレートに上皮細胞を付着させた。この上皮細胞を PC-KLH および PC 配合体で処理し、その後肺炎球菌およびインフルエンザ菌浮遊液を添加した。30 分間培養後、細胞に接着していない細菌を洗浄除去し、サポニンで上皮細胞を融解し、その融解液を寒天培養

シャーレに塗布し、その細菌数を測定して上皮細胞に接着した細菌数とした。また、細菌をビオチン化して、アビジン-ビオチン法を応用した ELISA 法で接着細菌数を定量する方法を確立し、同様に解析した。

4. 研究成果

(1) MPC-C、MPC-NA の粘膜ワクチンとしての免疫原性

ホスホリルコリン(PC)配合体をマウスに経鼻および舌下投与し、その免疫原性を検討した。しかし、これらの PC 配合体は単体では有意な免疫応答は誘導せず、また粘膜アジュバントであるコレラトキシン(CT)と併用しても PC 特異的な免疫応答はみられなかった。したがって、その後の研究には、スカシガイからの抽出タンパクである keyhole limpet hemocyanin (KLH)との結合体である PC-KLH を使用した。

(2) PC 経皮投与による粘膜免疫応答

マイクロニードルの経皮免疫応答への効果を観察したが、マイクロニードルを用いた群と用いなかった群とで、PC-KLH に対する免疫応答に有意な差はみられなかった。そこで、その免疫応答をマイクロニードルを用いずにマウスの種々の部位で検討したところ、耳介へ PC-KLH を CT とともに経皮投与すると高い免疫応答が誘導され、経皮ワクチンの新たな投与経路になりうると考えられた。なお、CT を併用しない場合でも免疫応答は観察されたが、経鼻や舌下など他のルートによる免疫応答と比較して極めて軽微であった。

(3) PC 経粘膜免疫によるアレルギー性鼻炎発症の予防効果

これまでに行った粘膜免疫の研究では粘膜アジュバントの CT を抗原とともに投与してきた。しかし、CT が Th2 型の免疫応答を強力に誘導し IgE 産生を促進することから、アレルギー性鼻炎の予防効果を検討する本研究では CT を用いず、PC-KLH をこれまでの倍量の 100  $\mu$ g を投与した。その結果、CT 併用時よりも低値ではあるが有意な血清中 PC 特異的 IgM、IgG、IgA 応答がえられた。

アレルギー性鼻炎症状の抑制効果は、PC-KLH の経鼻ならびに舌下免疫群の両者で認められた。しかし、血清中の OVA 特異的 IgE 値、鼻粘膜中の好酸球浸潤の程度は舌下免疫群で低値であり、アレルギー性鼻炎の抑制効果は舌下免疫のほうが強いことが示唆された。アレルギー性鼻炎抑制の機序として、経鼻免疫群そして舌下免疫群とともに脾臓の CD4 陽性 T 細胞からの IL-4 産生の抑制が関与すると

考えられた。また、経鼻免疫群では、脾臓から分離した樹状細胞からの IL-12 産生が PC-KLH 刺激によって亢進していた。一方、舌下免疫群では頸部リンパ節および脾臓の CD4 陽性 T 細胞からの IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 、IL10 の産生亢進、IL-4 の産生抑制が認められ、さらに T-bet の亢進、GATA3 の抑制、Foxp3 の亢進がみられた。以上の結果から、PC-KLH の経鼻および舌下免疫によって Th1 型反応が増強され、その一方で Th2 型反応が抑制されること、さらに制御性 T 細胞が誘導され、その作用によって IgE 産生が抑制されながらも外分泌液中の分泌型 IgA 産生が維持されることが示唆された。

#### (4) IgA 腎症患者の口蓋扁桃における PC 特異的免疫応答

口蓋扁桃の PC 特異的 IgA 産生細胞数は IgA 腎症の予後不良群で有意に高値であった。しかし、血清中の PC 特異的抗体活性は慢性扁桃炎患者と同レベルで、PC 特異的 IgG 値はむしろ IgA 腎症患者のほうが低値であった。また、腎機能を反映する血清クレアチニン値は口蓋扁桃の PC 特異的 IgA 産生細胞数と有意に正の相関を示した。したがって、口蓋扁桃における PC に対する免疫応答の異常が IgA 腎症の病態に関与すること、PC 特異的免疫応答を誘導するのみでは IgA 腎症を発症するリスクは少ないことが示唆された。

#### (5) PC の細菌接着の抑制効果

肺炎球菌およびインフルエンザ菌の類粘膜上皮への接着は PC 処理によって抑制され、さらにわずか 1 分間上皮細胞を処理するだけでもこれら細菌の接着が抑制されることが証明された。また、PAF 受容体を PAF 受容体アンタゴニストで処理すると細菌接着が抑制されることから、肺炎球菌およびインフルエンザ菌の上皮への接着は PC と PAF 受容体との結合によってもたらされると考えられた。しかし、PC 処理あるいは PAF 受容体アンタゴニスト処理で完全に細菌の接着が抑制されないことから、他の細菌接着の機序も関与することが示唆された。

以上の結果から、PC はワクチンとして粘膜および全身免疫応答を誘導するのみならず、樹状細胞からの IL-12 産生を促すとともに制御性 T 細胞を誘導してアレルギー性鼻炎の発症を阻止し、さらに PC それ自体が細菌感染を抑制する多機能性を備えていることが実証された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

#### 1. Nagano H., Kurono Y.

Transcutaneous immunization with phosphorylcholine induced antigen - specific mucosal and systemic immune responses in BALB/c mice.

Auris Nasus Larynx 42(6) 478- 482 2015

(査読有)

#### 2. Y. Tanimoto, S. Fukuyama, N. Tanaka, J. Ohori, Y. Tanimoto, Y. Kurono

Presence of keratin-specific antibody-forming cells in palatine tonsils of patients with pustulosis palmaris et plantaris(PPP) and its correlation with prognosis after tonsillectomy.

Acta Oto-Laryngologica 134(1) 79-87 2014

(査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

#### 1. 永野広海

耳介経皮免疫による粘膜免疫応答の誘導  
日本耳科学会総会学術講演会

2015 年 10 月 7 日～10 月 10 日

(長崎ブリックホール：長崎県長崎市)

#### 2. 牧瀬高穂

ホスホリルコリン舌下投与による粘膜免疫応答の誘導

第 54 回日本鼻科学会総会・学術講演会

2015 年 10 月 1 日～10 月 3 日

(広島国際会議場：広島県広島市)

#### 3. Yuichi Kurono

The application of mucosal immunization with phosphorylcholine for preventing upper airway infection and allergic rhinitis.

13<sup>th</sup> Asian-Oceania ORL-HNS Congress

2015 年 3 月 20 日～ 3 月 22 日

(台北国際コンベンションセンター：台湾台北市)

#### 4. 永野広海

ヒアルロン酸マイクロニードルを用いた経皮免疫

第 33 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会

2015 年 2 月 26 日～ 2 月 28 日

(東武ホールバント東京：東京都)

#### 5. 宮下圭一

Phosphorylcholine 経鼻投与によるアレルギー反応抑制効果

第 33 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会

2015 年 2 月 26 日～ 2 月 28 日

(東武ホールバント東京：東京都)

#### 6. 永野広海

CTおよびPC 経皮免疫による粘膜免疫応答の経時的変化について

第32回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会  
2014年2月6日～2月8日  
(ホテルメトロポリス徳島：徳島県徳島市)

7. K. Miyashita

Phosphorylcholine suppresses the allergic rhinitis in mice.

第42回日本免疫学会学術集会  
2013年12月11日～12月13日  
(幕張メッセ：千葉県千葉市)

8. 黒野祐一

IgA 腎症の扁桃におけるホスホリルコリン特異的抗体産生

第26回日本口腔・咽頭科学会総会学術講演会  
2013年9月12日～9月13日  
(ANA クワイクワザ ホテル ラクコト名古屋：  
愛知県名古屋市)

9. 永野広海

コレラトキシン経皮免疫による粘膜免疫応答

第26回日本口腔・咽頭科学会総会学術講演会  
2013年9月12日～9月13日  
(ANA クワイクワザ ホテル ラクコト名古屋：  
愛知県名古屋市)

10. 永野広海

PC 経皮免疫による粘膜免疫応答の誘導

第114回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会  
2013年5月15日～5月18日  
(日ソフ札幌：北海道札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒野祐一 (KURONO YUICHI)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  
研究者番号：80153427

(2) 研究分担者

宮下圭一 (MIYASHITA KEIICHI)  
鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属  
病院・助教  
研究者番号：30585063

川島雅樹 (KAWABATA MASAKI)  
鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属  
病院・助教  
研究者番号：30585112

牧瀬高穂 (MAKISE TAKAO)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：30585120

永野広海 (NAGANO HIROMI)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教  
研究者番号：60613148

間世田佳子 (MASEDA YOSHIKO)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：70535666