

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18950

研究課題名(和文) Claudin-4結合分子を用いた経鼻ワクチンの免疫誘導のメカニズム解析

研究課題名(英文) Immunological involvement of airway cilium function in the pneumococcal nasal vaccine using claudin-4 binder

研究代表者

鈴木 英彦 (Suzuki, Hidehiko)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ワクチンマテリアルプロジェクト・プロジェクト研究員

研究者番号：10710296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：粘液などの鼻腔物理的バリアは異物の侵入を防いでおり、経鼻ワクチンに対しても障壁となっている可能性がある。そこで、申請者がこれまでに開発したclaudin-4指向性分子であるC-CPEを用いた経鼻肺炎球菌ワクチン(PspA-C-CPE)を粘液貯留の認められるTtll1欠損マウスに投与したところ、鼻腔での免疫誘導組織であるNALT周辺の過剰な粘液により、PspA-C-CPEのNALTへの結合不全が生じた。これにより胚中心形成異常が認められ、粘膜免疫誘導も低下した。一方、粘液を除くことによりこれらの粘膜免疫誘導低下は回復した。すなわち、過剰な粘液が経鼻ワクチンの障壁となりうることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nasal physical barrier (ex. mucus) prevents the entry of exogenous materials. Nasal vaccine is probably affected by nasal physical barrier, but it remains unknown. In this study, I used Ttll1 knockout (KO) mice, which showed accumulation of nasal mucus, to check whether claudin-4-targeting vaccine (PspA-C-CPE) was affected by nasal physical barrier. Ttll1 KO mice showed accumulation of nasal mucus around NALT, which was an immune induction site in nose. PspA-C-CPE was trapped by nasal mucus, and PspA-C-CPE could not effectively bind to NALT. Furthermore, PspA-specific nasal IgA was impaired with decrease of germinal center formation in Ttll1 KO mice. Thus, insufficient binding of PspA-C-CPE to NALT led to the impaired PspA-specific nasal IgA responses. Ttll1 KO mice treated with mucus remover showed recover of immune induction of PspA-specific nasal IgA. These findings indicated that accumulation of nasal mucus is an interfering factor in claudin-4-targeting nasal vaccine.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：粘膜免疫 ワクチン 粘液

1. 研究開始当初の背景

エボラ出血熱やデング熱の例にあるように感染症は未だ猛威を振るっている。感染症対策としては注射型ワクチンが主流であり、全身免疫による感染症重篤化予防には効果的であるが、多くの感染症の感染部位である粘膜での免疫誘導に乏しく初発感染予防は期待できない。一方、粘膜ワクチンは全身・粘膜免疫の双方を誘導できるため感染症重篤化予防のみならず、初発感染予防も可能である理想的な感染症ワクチンである。しかしながら、抗原を単に吸ったり、飲んだりするだけでは効果的な免疫応答は誘導できない。そのため、多くの免疫担当細胞が集積する粘膜関連リンパ組織へワクチン抗原を送達することが粘膜ワクチン開発において重要である。申請者はこれまでに鼻腔における免疫誘導組織である鼻腔関連リンパ組織 (NALT) 上皮細胞上にタイトジャンクション構成分子である claudin-4 が高発現していることに着目したワクチン送達技術を確立している。Claudin-4 結合分子であるウエルシュ菌毒素 C 末断片 (C-CPE) と肺炎球菌ワクチン抗原 (PspA) との融合タンパク質 (PspA-C-CPE) をマウスに経鼻投与することにより、PspA を NALT 上皮細胞に効率的に送達可能であり、肺炎球菌に対する生体防御活性を誘導できることを報告している (Suzuki H, et, al, 2015, PLoS ONE)。

経鼻ワクチンの投与組織である鼻腔には繊毛や粘液といった鼻腔物理的バリアが存在しており、花粉や病原体の侵入阻害に働いている。この点において経鼻ワクチンもまた、鼻腔物理的バリアの影響を受けている可能性がある。Tubulin tyrosine ligase-like family, member 1 (Ttll1) は鼻腔繊毛運動に関わる分子として知られている。Ttll1 knockout (KO) マウスは繊毛運動異常に伴い粘液の排出が正常にできず、鼻腔組織に過剰な粘液貯留を示すことが報告されている。そこで、本研究では Ttll1 KO マウスに PspA-C-CPE を経鼻投与した際の免疫応答を検証することで、鼻腔物理的バリアが経鼻ワクチンに与える影響を精査した。

2. 研究の目的

鼻腔物理的バリアが claudin-4 指向性ワクチンに与える影響の検証

3. 研究の方法

(1) PspA-C-CPE の経鼻投与

Ttll1 hetero (He) もしくは KO マウスに PspA-C-CPE (PspA 量: 5 µg) を週 1 回、計 3 回経鼻投与した。最終免疫の 1 週間後に血清、鼻腔洗浄液を回収し、ELISA により PspA 特異的抗体を検出した。また、NALT 組織を回収し、免疫染色およびフローサイトメーターを用いて各リンパ組織を測定した。また、N-アセチルシステインを経鼻投与し、30 分後に PspA-C-CPE を経鼻投与することにより粘液

除去の影響を検証した。

(2) 粘液貯留の検証

Ttll1 KO マウスの鼻腔切片を作製し、アルシアンブルー染色により粘液を染色した。

(3) PspA-C-CPE の NALT 結合性

ビオチン化した PspA-C-CPE を Ttll1 KO マウスに経鼻投与し、その鼻腔切片を用い、蛍光染色により PspA-C-CPE の NALT 結合性を検証した。

4. 研究成果

鼻腔物理的バリアが claudin-4 指向性経鼻ワクチンに与える影響を検証するために、まず、Ttll1 He および KO マウスに PspA-C-CPE を経鼻投与し、PspA 特異的免疫応答を測定した。その結果、PspA 特異的血清 IgG は誘導されたものの、PspA 特異的鼻腔 IgA は Ttll1 KO マウスにおいて誘導低下が認められた。すなわち、過剰な鼻腔物理的バリアは粘膜免疫誘導を阻害することを明らかとした。

次に、鼻腔における免疫誘導組織である NALT の各種リンパ細胞の誘導を検証した。その結果、Ttll1 KO マウスでは B 細胞、T 細胞は Ttll1 He マウスと同様に誘導されていたが、抗体のクラススイッチの場であり、親和性成熟の場である胚中心 B 細胞数が低下していた。また、胚中心形成に重要なサブセットである濾胞ヘルパー T 細胞数の低下も確認できた。この結果と相関し、胚中心形成を確認したところ、Ttll1 He に比べて KO マウスでは胚中心形成異常が認められた。すなわち、Ttll1 KO マウスでは胚中心形成異常に伴い、粘膜免疫誘導が阻害されていることを明らかにした。

次に、PspA-C-CPE の NALT 上皮細胞への結合性に着目した検証を行った。PspA-C-CPE の claudin-4 結合が免疫誘導の引き金となっているが、Ttll1 KO マウスでは正常に claudin-4 の発現が認められた。一方、NALT 周辺の粘液貯留を検証したところ、NALT を覆うように粘液の貯留が認められ、投与した PspA-C-CPE の NALT 上皮細胞への結合不全も認められた。すなわち、過剰な粘液により投与した PspA-C-CPE が捕捉され、NALT 上皮細胞へ十分に結合できず、胚中心形成異常に伴う粘膜免疫誘導阻害が生じることを示した。

また、粘液除去剤として知られている N-アセチルシステインを用いて粘液除去の影響を検証した。その結果、粘液除去した Ttll1 KO マウスは粘膜免疫誘導の低下を示さなかった。

以上のことから、過剰な粘液が貯留する場合、claudin-4 指向性経鼻ワクチンは粘液に捕捉され NALT 上皮細胞に効率的に結合できなくなった結果、胚中心形成不全を伴い粘膜免疫誘導の低下が生じることを明らかとした。また、粘液の影響を除くことにより正常に粘膜免疫が誘導されたことから花粉症

や副鼻腔炎などの粘液貯留の症状を呈する場合には粘液の影響を考慮した上で、経鼻ワクチンを接種することが必要だと思われる。

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 5 件)

. Kunisawa J, Sugiura Y, Wake T, Nagatake T, Suzuki H, Nagasawa R, Shikata S, Honda K, Hashimoto E, Suzuki Y, Setou M, Suematsu M, Kiyono H, Mode of bioenergetics metabolism during B cell differentiation in the intestine determines the distinct requirement for vitamin B1, *Cell Rep*, 13, 122-131, 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.063. (査読あり)

. Suzuki H, Watari A, Hashimoto E, Yonemitsu M, Kiyono H, Yagi K, Kondoh M, Kunisawa J, C-terminal *Clostridium perfringens* enterotoxin-mediated antigen delivery for nasal pneumococcal vaccine, *PLoS ONE*, 10, e0126352, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0126352. (査読あり)

. Nagatake T, Fukuyama S, Sato S, Okura H, Tachibana M, Taniuchi I, Ito K, Shimojou M, Matsumoto N, Suzuki H, Kunisawa J, Kiyono H, Central role of core binding factor 2 in mucosa-associated lymphoid tissue organogenesis in mouse, *PLoS ONE*, 10, e0127460, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0127460. (査読あり)

. Kunisawa J, Arita M, Hayasaka T, Harada T, Iwamoto R, Nagasawa R, Shikata S, Nagatake T, Suzuki H, Hashimoto E, Kurashoma Y, Suzuki Y, Arai H, Setou M, Kiyono H, Dietary 3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut, *Sci Rep*, 5, 9750, 2015, doi: 10.1038/srep09750. (査読あり)

. Suzuki H, Kunisawa J, Vitamin-mediated immune regulation in the development of inflammatory diseases, *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 15, 212-215, 2015, doi: 10.2174/1871530315666150316122128. (査読あり)

[学会発表](計 6 件)

. 鈴木 英彦、長竹 貴広、那須 彩香、池上 浩司、瀬藤 光利、濱崎 洋子、清野 宏、八木 清仁、近藤 昌夫、國澤 純、Claudin-4 指向型経鼻ワクチンにおける鼻腔物理的バリアの影響、第 10 回次世代アジュバント研究会、2017 年 1 月 24 日、千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市

. SUZUKI Hidehiko, NAGATAKE Takahiro,

KIYONO Hiroshi, KUNISAWA Jun, Mucus accumulation caused by impaired mucociliary function is an interfering factor in the C-CPE-based claudin-4-targeting nasal vaccine, 第 45 回日本免疫学会学術総会、2016 年 12 月 5 日、沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野座市

. SUZUKI Hidehiko, NAGATAKE Takahiro, NASU Ayaka, IKEGAMI Koji, SETOU Mitsutoshi, KIYONO Hiroshi, YAGI Kiyohito, KONDOH Masuo and KUNISAWA Jun, Immunological involvement of airway mucociliary function in the claudin-4-targeting pneumococcal nasal vaccine, 16th International Congress of Immunology, 2016 年 8 月 26 日, Melbourne Convention and Exhibition Center, Australia Melbourne

. 鈴木 英彦、長竹 貴広、那須 彩香、池上浩司、瀬藤光利、清野 宏、八木 清仁、近藤 昌夫、國澤 純、クローデイン 4 標的型経鼻ワクチンシステムにおける鼻腔物理的機能の影響、第 9 回次世代アジュバント研究会、2016 年 1 月 19 日、千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市

. SUZUKI Hidehiko, NAGATAKE Takahiro, KIYONO Hiroshi, KUNISAWA Jun, Immunological involvement of airway cilium in the induction of antigen-specific immune responses against nasally immunized pneumococcal vaccine using claudin binder, 第 44 回日本免疫学会学術総会、2015 年 11 月 19 日、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市

. 鈴木 英彦、長竹 貴広、那須 彩香、渡利 彰浩、池上 浩司、瀬藤 光利、清野 宏、八木 清仁、近藤 昌夫、國澤 純、Claudin 標的型経鼻ワクチンにおける鼻腔物理的機能の影響、第 4 回感染症若手フォーラム、2015 年 9 月 8 日、アテナ海月、兵庫県淡路市

[図書](計 2 件)

. 鈴木 英彦、國澤 純、ビタミンによる免疫応答の制御と疾患、先端医学社、炎症と免疫、25 (1):29-33、2015

. 鈴木 英彦、國澤 純、粘膜免疫の特異性に着目したワクチンマテリアルの開発、鳥居薬品株式会社、感染・炎症・免疫、45: 49-55、2015

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.nibiohn.go.jp/vaccine_material_project/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 英彦 (Suzuki Hidehiko)
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養
研究所 ワクチンマテリアルプロジェクト
プロジェクト研究員
研究者番号：10710296

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()