

令和元年6月12日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11239

研究課題名(和文)ホスホリルコリンの二相作用を応用した新たな粘膜ワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of novel mucosal vaccine by applying the biphasic reaction of phosphorylcholine

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホリルコリン(PC)による粘膜免疫応答の誘導作用、そしてPC自体が有する抗炎症作用を解析し、この二相作用を応用した新たなワクチンの開発を目指して本研究を行った。その結果、PCが粘膜ワクチンとして有効であると同時に、PC特異的免疫応答がIgA腎症の重症化を抑制し、CRPと競合して抗炎症反応をもたらすことが示された。さらに、PCは上皮細胞表面のPAF受容体と結合して細菌の接着、バイオフィーム形成を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行の肺炎球菌やインフルエンザ菌感染症に対するワクチンはその効果が限定的であり、より広域スペクトラムを有するワクチンの開発が求められている。その候補の一つがホスホリルコリン(PC)であり、本研究によってPCが粘膜ワクチンとして有用であるだけでなく、PCに対する免疫応答がIgA腎症の重症化抑制作用や自然免疫系を介する抗炎症作用を持つことが明らかになった。さらにPCはその直接作用によっても細菌感染症の発症や慢性化を阻止できることが示唆され、従来のワクチンの概念を超えた新たなワクチン開発への応用が期待される。また、現在推進されている薬剤耐性(AMR)対策にも貢献でき、社会的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a novel mucosal vaccine by applying the biphasic reaction of phosphorylcholine (PC), PC-specific immune responses and anti-inflammatory effects of PC were investigated. The results showed that intra-nasal as well as sublingual administration with PC could induce PC-specific mucosal and systemic immune responses, which inhibit the aggravation of IgA nephropathy and reduce acute inflammatory reaction by competing with CRP. Further, pretreatment of epithelial cells with PC decreased bacterial adherence and biofilm formation, suggesting the effectiveness of PC as mucosal vaccine having biphasic reaction.

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 ワクチン 粘膜免疫 アレルギー IgA腎症 抗炎症作用 細菌接着 バイオフィーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 侵襲性肺炎や中耳炎などの上気道感染症に対するワクチンとして、結合型 13 価肺炎球菌ワクチン (プレバナー®) や Hib ワクチン (アクトヒブ®) がすでに臨床で使用されている。しかし、血清型置換によってワクチン株以外の肺炎球菌感染症が増加し、上下気道感染症をもたらすインフルエンザ菌は莢膜を持たないため Hib ワクチンは無効であることから、広域スペクトラムをもつ新たなワクチンの開発が望まれている。すべての細菌の細胞壁に存在するホスホリルコリン (PC) はその候補の一つであり、我々は以前、PC 化合物である PC-KLH をコレラトキシン (CT) とともにマウスに経鼻投与することで PC 特異的免疫応答が誘導されることを報告した。しかし、ワクチンの経鼻投与は中枢神経障害をもたらすことが危惧され、経鼻以外のワクチン投与経路を見出すことが必要とされている。
- (2) マウスを肺炎球菌で免疫すると PC 特異的 IgM が産生され、これがダニ虫体表面の PC に作用して喘息の発症が抑制されること、さらに PC 特異的 IgM が動脈硬化の発症を阻止することが知られており、PC 特異的免疫応答は感染症以外の疾患の病態にも関与し、PC 粘膜ワクチンがこれらの疾患の予防にも有効なことが示唆される。
- (3) PC は血小板活性化因子受容体 (PAF-R) のリガンドとして働き、PC と PAF-R の結合を介した細菌接着に関与することが知られている。したがって、PC は免疫応答を誘導するだけでなく、それ自体も細菌接着を阻止し、感染症の発症を抑制できると推測される。
すなわち、PC は多機能性であるとともに免疫作用と抗炎症作用の二相作用を持ち、免疫応答の誘導を介した様々な疾患の予防、そして PC の直接作用による感染や炎症の予防ならびに治療に応用できると期待される。

2. 研究の目的

- (1) PC を舌下そして経皮投与し、それぞれの粘膜および全身免疫応答を経鼻免疫と比較し、これらが経鼻に代わる粘膜ワクチンの投与経路となり得るか検討する。
- (2) 卵白アルブミン (OVA) の全身および経鼻感作によってアレルギー性鼻炎モデルを作成し、PC 粘膜ワクチンによるアレルギー性鼻炎発症の予防効果を検討する。
- (3) IgA 腎症および急性喉頭蓋炎ならびに扁桃周囲膿瘍患者における PC 特異的免疫応答を観察し、PC そしてその免疫応答の多機能性を検討する。
- (4) ヒト咽頭粘膜上皮細胞を PC あるいは抗 PAF-R 抗体で処理し、肺炎球菌およびインフルエンザ菌の上皮細胞への接着や侵入における PC の関与を検討する。さらに、インフルエンザ菌接着後のバイオフィーム産生への影響を観察し、PC の直接作用による細菌感染の発症ならびに慢性化に対する抑制効果を評価する。

3. 研究の方法

- (1) 6 週齢の雌性 BALB/c マウスに PC-KLH を粘膜アジュバントとして CT とともに経鼻、舌下および経皮投与し、唾液、鼻腔洗浄液、血清を最終免疫から 1 週間後に採取し、これらの検体中の PC 特異的免疫グロブリン濃度を ELISA 法で測定した。さらに、マウスの脾臓から CD4 陽性 T 細胞を分離し、抗原提示細胞と PC とともに培養し、培養上清中の Th1 および Th2 型サイトカイン濃度を ELISA 法で測定した。
- (2) 6 週齢の雌性 BALB/c マウスに OVA を Alum とともに腹腔内投与し、さらに OVA で経鼻感作してアレルギー性鼻炎モデルを作成した。そして、OVA 全身感作前に PC-KLH で経鼻免疫し、アレルギー性鼻炎症状の発現を観察した。また、血清中の OVA 特異的 IgE 値、CD4 陽性 T 細胞および樹状細胞のサイトカイン産生を ELISA 法で測定した。
- (3) IgA 腎症および慢性扁桃炎患者から摘出された扁桃および末梢血から比重遠心法でリンパ球を分離し、PC 特異的免疫グロブリン産生細胞数を ELISPOT 法によって測定した。また、血清中の PC 特異的免疫グロブリン濃度を ELISA 法で測定し、これらの測定値と IgA 腎症患者の透析導入リスクとを比較した。さらに、急性喉頭蓋炎ならびに扁桃周囲膿瘍患者の血清中の PC 特異的免疫グロブリン濃度を ELISA 法で測定し、CRP および白血球数と比較した。
- (4) Detroit 562 cells を PC-KLH、抗 PAF-R 抗体で処理し、肺炎球菌およびインフルエンザ菌の接着と細胞内侵入を観察した。また、肺炎球菌およびインフルエンザ菌を抗 PC 抗体で処理し、その上皮細胞への接着と細胞内侵入への影響を検討した。さらに、ヒト頬粘膜上皮細胞を 96 穴マイクロプレート内で培養し、これを PC-KLH で処理したのちにインフルエンザ菌を接種し、その後のバイオフィーム産生を蛍光顕微鏡で観察した。また、先の実験と同様にインフルエンザ菌を抗 PC 抗体で処理したのちに上皮細胞表面に接種し、その後のバイオフィーム産生を観察した。

4. 研究成果

- (1) 唾液や鼻腔洗浄液などの外分泌液および血清中の PC 特異的免疫グロブリンは経鼻、舌下、そして経皮免疫でも同等に上昇した。(図 1) 一方、血清中の IgG サブクラスを比較すると、経鼻と経皮免疫では IgG1、舌下免疫では IgG2a が高値であり、また、経鼻と経皮免疫では血清中の IgE 値が舌下免疫より高値であり、経鼻と経皮免疫では TH2 型、舌下免疫では Th1 型優位の免疫応答が誘導されることが示唆された。

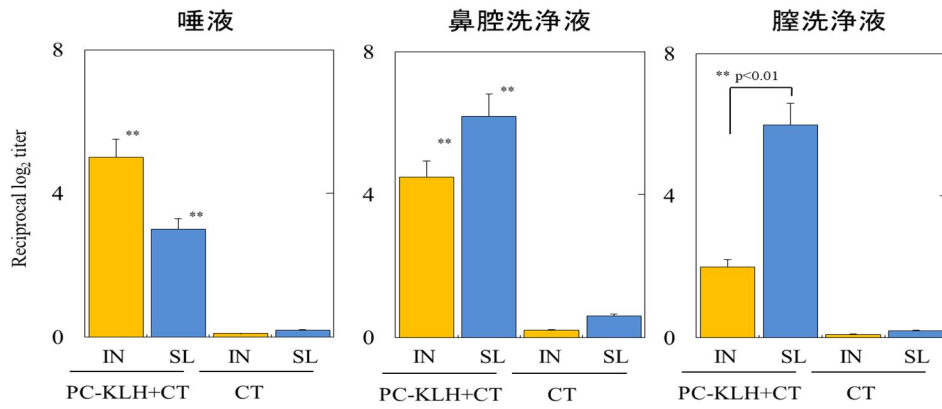


図1：外分泌液中のPC 特異的IgA 応答

そして、このことを支持する結果として、経鼻と経皮免疫ではIL-4の産生が著明であり、舌下免疫ではIFN- γ の産生が有意に高かった。したがって、舌下免疫は経鼻免疫や経皮免疫と同等の粘膜および全身免疫応答を誘導することができ、アレルギー反応を生じる危険性が少ない、より安全なワクチンの投与経路になると考えられる。

- (2) PC-KLH 経鼻免疫群では、対照群と比較して有意にOVA 経鼻投与後の鼻かきおよびくしゃみの回数が少なかった。(図2) さらに、血清中のOVA 特異的IgE 値、鼻粘膜組織中の好酸球数もPC-KLH 経鼻免疫群で有意に低値であり、PC-KLH 経鼻免疫によってアレルギー性鼻炎の発症を予防できることが示された。

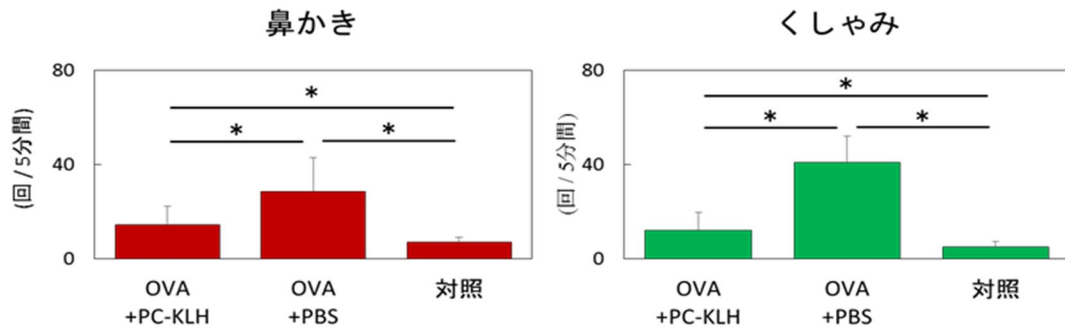


図2：OVA 経鼻投与後のアレルギー性鼻炎症状

また、PC-KLH 経鼻免疫群では脾臓から分離したCD4 陽性細胞からのIL-4 産生が減少し、一方、樹状細胞からのIL-12p40の産生はPC-KLH で増加したことから、アレルギー性炎症の抑制がTh1 型免疫応答の亢進によってもたらされたと推測される。

- (3) 扁桃におけるPC 特異的免疫グロブリン産生細胞数は慢性扁桃炎と比較してIgA 腎症で高値を示し、IgA 産生細胞数は有意に高かった。一方、末梢血中のPC 特異的免疫グロブリン産生細胞数は扁桃と比較して著しく少なく、IgA 腎症は慢性扁桃炎より低値であった。血清中のPC 特異的免疫グロブリン濃度はIgA 腎症と慢性扁桃炎で有意な差はみられなかったが、IgA 腎症における血清中PC 特異的免疫グロブリン濃度を透析導入リスク群別に比較したところ、PC 特異的IgM は低・中等リスク群と比較して超高リスク群で有意に低値であり、PC 特異的IgM がIgA 腎症の重症化を抑制していることが示唆された。(図3)

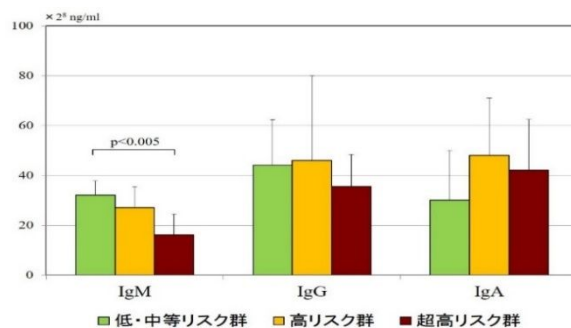


図3：血清中PC 特異的免疫グロブリンと透析導入リスク

急性喉頭蓋炎および扁桃周囲膿瘍患者の血清中のCRP値とPC特異的免疫グロブリン濃度を比較すると、PC特異的IgMはCRP値そして白血球数と有意な負の相関を示し、PC特異的IgMが高値なほど炎症反応が低いこと、すなわちPC特異的IgMがCRPと競合して炎症反応を抑制すると考えられる。(図4)

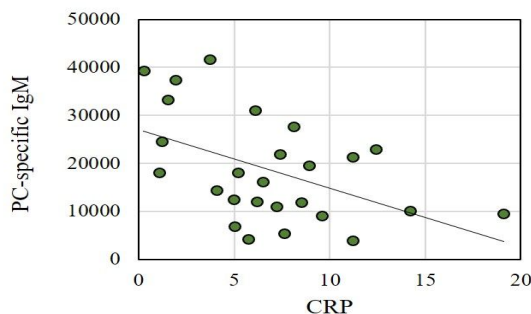


図4：CRP値とPC特異的IgMの相関

さらに興味深いことに、CRP値と白血球数は男性と比較して女性で有意に低値であり、PC特異的IgMは女性が有意に高値を示した。急性喉頭蓋炎や扁桃周囲膿瘍の発症頻度は男性より女性のほうが低く、この性差にPC特異的IgMが関与していると推測される。

(4) 肺炎球菌、インフルエンザ菌はともに、PC高発現株のほうがPC低発現株よりも接着細菌数が有意に多く、PCの発現と接着細菌数は正の相関を認めた。そして、肺炎球菌およびインフルエンザ菌のPC高発現株では、上皮細胞を抗PAF-R抗体およびPC-KLHで処理することで、あるいは細菌を抗PC抗体で前処理することで細菌の接着が有意に抑制された。(図5)しかし、PC低発現株ではこうした抑制効果がみられなかった。また、インフルエンザ菌は6時間培養後に上皮細胞内へ侵入し、細菌接着実験と同様に、上皮細胞を抗PAF-R抗体あるいはPC-KLHで前処理することで、あるいはインフルエンザ菌を抗PC抗体で前処理することで上皮細胞内への侵入が抑制された。

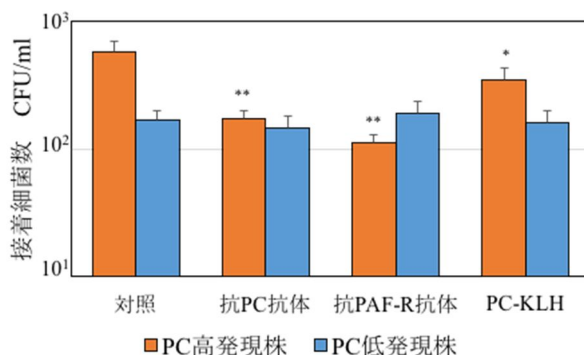


図5：肺炎球菌の細胞接着における各種抗体PC-KLHの抑制効果

インフルエンザ菌10菌株中4菌株でバイオフィルムの形成が認められ、これらの菌株はいずれもPCの発現量が多かった。そこで、頬粘膜上皮細胞をPC-KLHで前処理したのち、あるいはインフルエンザ菌を抗PC抗体で前処理したのちにバイオフィルム形成を観察すると、こうした前処理で有意にその産生が抑制された。(図6)

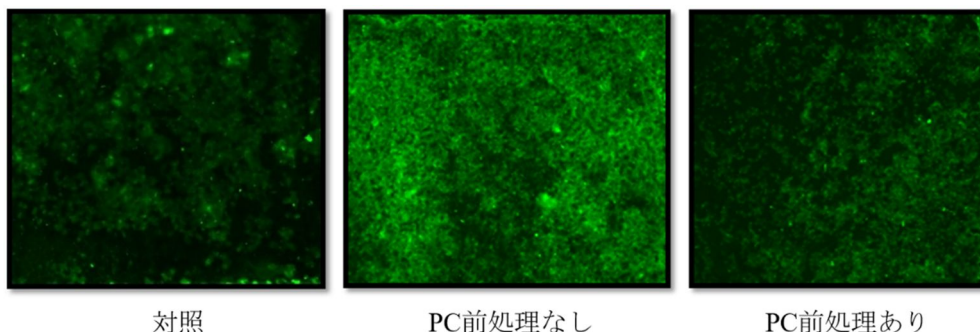


図6：上皮細胞のPC処理によるバイオフィルム産生の抑制

これらの結果から、PC は免疫応答を誘導するだけでなく、その直接作用によっても細菌の接着や細胞内侵入を阻止できる二相作用を有し、PC 粘膜ワクチンが従来のワクチンの概念を超えた新たなワクチンになり得ると考えられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

1. Junichiro Ohori, Tomohiro Jimura, and Yuichi Kurono.
The role of phosphorylcholine-specific IgM in acute upper respiratory tract infection.
Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology, in press 2019 査読有
DOI : 10.1177/0003489419835568
2. Junichiro Ohori, Tomohiro Jimura, Yuichi Kuorno
The role of phosphorylcholine-specific immune responses in the tonsils and peripheral blood on IgA nephropathy
Acta Otolaryngol. 138(12):1099-1104. 2018 査読有
DOI : 10.1080/00016489.2018.1522450
3. Hiroyuki Iuchi, Junichiro Ohori, Takayuki Kyutoku, Kotoko Ito, Yuichi Kurono
Role of phosphorylcholine in *Streptococcus pneumoniae* and nontypeable *Haemophilus influenzae* adherence to epithelial cells
Auris Nasus Larynx. Nov.29 2018 査読有 DOI : 10.1016/j.anl.2018.11.003.
4. Yoshiko Maseda, Junichiro Ohori, Norimitsu Tanaka, Hiromi Nagano, Keiichi Miyashita, Yuichi Kurono
Mucosal and systemic immune response to sublingual or intranasal immunization with phosphorylcholine
Auris Nasus Larynx. 45(2) : 273-280 2018 査読有 DOI : 10.1016/j.anl.2017.04.009
5. Keiichi Miyashita, Junichiro Ohori, Hiromi Nagano, Satoshi Fukuyama, Yuichi Kurono
Intranasal immunization with phosphorylcholine suppresses allergic rhinitis in mice
The Laryngoscope 128(7): E234-E240 2018 査読有 DOI : 10.1002/lary.27030
6. Nagano H, Jimura T, Nagano M, Makise T, Miyashita K, Kurono Y.
Transcutaneous immunization in auricle skin induces antigen-specific mucosal and systemic immune responses in BALB/c mice. Auris Nasus Larynx. 44 (4):411-416 2017 査読有
DOI : 10.1016/j.anl.2016.08.006

[学会発表](計8件)

1. 地村友宏
ホスホリルコリン経鼻免疫応答におけるコレラトキシンと Poly(I;C)のアジュバント効果の相違
第57回日本鼻科学会総会・学術講演会 2018年
2. 井内寛之
肺炎球菌およびインフルエンザ菌の上皮細胞接着に対するホスホリルコリン重合体の阻害効果
第6回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会総会・学術講演会 2018年
3. T. Jiumra
Differences in immune responses induced by intranasal administration with phosphorylcholine together with poly(I;C) and that with CT as mucosal adjuvant
Seven Departments Joint Meeting of Otolaryngology 2018
4. M. Iuchi
The role of phosphorylcholine in the adherence of *Streptococcus pneumoniae* and nontypeable *Haemophilus influenzae*
Seven Departments Joint Meeting of Otolaryngology 2018
5. 井内寛之
肺炎球菌およびインフルエンザ菌の上皮接着におけるホスホリルコリンの関与
第118回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会 2017
6. 地村友宏
Poly(I;C)をアジュバントとして用いたPC 経鼻免疫による免疫応答の検討
第20回日本ワクチン学会学術集会 2016
7. 大堀純一郎
シンポジウム「粘膜免疫の臨床応用—鼻咽腔、口腔、腸管の粘膜を利用した炎症性疾患の制御機構の理解」 経鼻粘膜ワクチンの開発
第29回日本口腔・咽喉頭科学会総会ならびに学術講演会 2016
8. 井内寛之
肺炎球菌およびインフルエンザ菌の上皮接着におけるホスホリルコリンの関与
第4回日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会総会・学術講演会 2016

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：大堀 純一郎
ローマ字氏名：OHORI Junichiro
所属機関名：鹿児島大学
部局名：医歯学域附属病院
職名：講師
研究者番号（8桁）：90507162

研究分担者氏名：永野 広海
ローマ字氏名：NAGANO Hiromi
所属機関名：鹿児島大学
部局：医歯学域医学系
職名：講師
研究者番号（8桁）：60613148

研究分担者氏名：宮下 圭一
ローマ字氏名：MIYASHITA Keiichi
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：医歯学域附属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：30585063

研究分担者氏名：牧瀬 高穂
ローマ字氏名：MAKISE Takao
所属機関名：鹿児島大学
部局：医歯学域医学系
職名：助教
研究者番号（8桁）：30585120

研究分担者氏名：井内 寛之
ローマ字氏名：IUCHI Hiroyuki
所属機関名：鹿児島大学
部局：医歯学域医学系
身分：助教
研究者番号（8桁）：90645285

研究分担者氏名：地村 友宏
ローマ字氏名：JIMURA Tomohiro
所属機関名：鹿児島大学
部局：附属病院
職名：医員
研究者番号（8桁）：10709596

（2018年5月15日 削除）

研究分担者氏名：原田 みずえ
ローマ字氏名：HARADA Mizue
所属機関名：鹿児島大学
部局：医歯学域医学系・助教
研究者番号（8桁）：20585103

(2) 研究協力者

なし

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。