

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08821

研究課題名(和文)新規抗原デリバリーシステムを利用した結核経鼻ワクチン開発のための基盤研究

研究課題名(英文)Basic research for the TB vaccine development based on the novel drug delivery system.

研究代表者

中橋 理佳 (Nakahashi, Rika)

東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：80391887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまで多糖プルランとコレステロールからなるカチオン化ナノゲルにワクチン抗原を被覆した世界初の経鼻ワクチンシステムを開発し、肺炎球菌の表面抗原などを用いて、マウス及びサルでその有効性と安全性を確認してきた。本研究では、結核菌抗原を用いた新規の結核経鼻ワクチン開発に取り組む。高い感染防御効果を獲得するために、複数の結核ワクチン抗原候補と種々の粘膜アジュバントの組み合わせによる免疫誘導効果を、マウス経鼻免疫後に抗原特異的なT細胞(Th1)を検出しスクリーニングする。また、ワクチン接種による防御免疫効果をマウスにおける結核菌攻撃試験により検証し成人における結核経鼻ワクチンの実用化を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新興再興感染症である結核は、成人においては現行のBCGワクチンが無効であることから、肺炎を併発し、重症化すると死亡を含む重篤な疾病を発症させることが知られているが、成人を対象とした結核に有効なワクチンは未だ開発されていない。結核菌は、上気道から感染し下気道での肺炎を誘導するため、従来の注射型よりも粘膜面に効率よく免疫応答を惹起できる経鼻ワクチンの開発が期待されている。一方、経鼻投与ではワクチン抗原やアジュバントの脳移行などの安全性を配慮する必要もある。そこで、免疫誘導に優れ且つ中枢にも影響しないナノゲルシステムを用いた結核経鼻ワクチンは、最も実用化に近いワクチン候補として期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed the novel nasal vaccine system, a cationized nanogel consisting of polysaccharide pullulan and cholesterol, and demonstrated its effectiveness and safety in mice and monkeys using surface antigens of *S. pneumoniae*. In this study, we aim to develop a nasal tuberculosis vaccine using *M. tuberculosis* derived a several antigen candidates. In order to induce a high protective efficacy against infection, the effect on the immune response by the combination of a vaccine antigens and mucosal adjuvants is screened by detecting antigen-specific T cells (Th1) after nasal immunization in mice. In addition, the protective efficacy of the vaccine will be verified by the challenge experiment in vaccinated mice, and we aim to proceed the clinical use of the nasal tuberculosis vaccine in adults.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：カチオン化ナノゲル 経鼻ワクチン 粘膜免疫応答 ドラッグデリバリーシステム 結核ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新興再興感染症として結核は、インフルエンザと並んで臨床上重要な上気道感染症病原体で、特に大人では、現行の BCG ワクチンが無効であることから肺炎を併発し、重症化すると死亡を含む重篤な疾病を発症させる。このため、弱毒結核菌型、アデノウイルスやワクチニアウイルスベクター型など多くの結核ワクチンの開発が進んでいるものの、成人を対象とした結核に有効なワクチンは未だ実用化に至っていない。結核菌は、上下気道における感染症であることから、従来の注射型ワクチンに替わり経鼻粘膜ワクチンでの開発が期待されている。即ち、全身系での防御抗体の誘導のみならず、上気道下気道粘膜である鼻腔、気管支、肺において Th1 細胞性免疫の誘導が結核菌の転移増殖阻止には必須であると考えられ、それを効率よく誘導できる経鼻粘膜ワクチンの開発が求められている。

2. 研究の目的

我々は、これまで多糖プルランとコレステロールからなるカチオン化ナノサイズゲル(ナノゲル)にワクチン抗原を被覆した経鼻ワクチンシステムを開発し(Nat. Mater. 9:572, 2010)、例えば肺炎球菌の表面抗原などを用いて、マウスやサルにおいてナノゲル経鼻ワクチンの有効性および安全性を実証してきた(Infected. Immun. 8:1625, 2013)。そこで、本研究では、結核菌抗原を用いたナノゲル型経鼻ワクチンの開発を目指す。

3. 研究の方法

本ナノゲル結核経鼻ワクチンで用いるワクチン候補抗原は、大腸菌で発現させ精製して準備する。次に、精製抗原を、カチオン化ナノゲルと混合することでナノゲル内に被覆させ、さらに細胞性免疫に特化した粘膜アジュバントを添加することでワクチンを最終調製する。本ワクチンによる免疫応答を解析するために、7週齢の Balb/c 雌マウスに1週ごとに計3回経鼻投与を実施する。最終免疫より1~2週後において、マウスから脾臓および肺を摘出し、マグネットビーズで CD4 細胞を精製して抗原特異的な IFN 産生細胞を Th1、IL-17 産生細胞を Th17 として ELISPOT アッセイにより検出することで免疫応答を評価する。さらに、ワクチンによる感染防御効果を確かめるため、ワクチン後のマウスを用いて結核菌強毒株を用いた感染実験を行い、肺や脾臓中の菌数を測定し評価する。

4. 研究成果

カチオン化ナノゲルと精製した結核菌抗原を混合してナノゲル化し、粘膜アジュバントを添加してマウスに経鼻免疫したところ、脾臓および肺の両組織において、抗原刺激依存的に IFN を産生する Th1 が検出された。すなわち、ナノゲルワクチンシステムにより、全身および下気道粘膜の両方で、抗原特異的免疫応答が誘導されることが示唆された。一方、粘膜アジュバントの非存在下においては、抗原特異的 Th1 の誘導は認められなかった。以上から、カチオン化ナノゲルを基盤とした結核ワクチンにおいて、細胞性免疫に特化した粘膜アジュバントが必須であることが示唆された。また、細菌感染による宿主の防御において重要とされる Th17 細胞の誘導の有無を確かめたところ、Th1 と同様に、ナノゲル結核抗原および粘膜アジュバントの経鼻投与により、脾臓および肺において抗原特異的 Th17 が誘導されてくることがわかった。次に、ナノゲル結核経鼻ワクチンの有効性を確かめるため、比較対象として、未免疫群、および現行ワクチンである BCG の皮下投与群を準備し、結核菌強毒株を気道感染させたところ、感染後の肺および脾臓における結核菌の数が、ナノゲル結核経鼻ワクチン群で未免疫と比べて減少していることが

わかった(国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所、霊長類医科学研究センター 保富康宏先生との共同研究)。また、そのワクチン効果は、BCG 皮下投与群に匹敵する効果であった。本解析を基盤に、さらに本ワクチンのヒトでの実用化に向けた研究を進めていきたいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakahashi-Ouchida R., Yuki Y., Kiyono H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Cationic pullulan nanogel as a safe and effective nasal vaccine delivery system for respiratory infectious diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Vaccines & Immunotherapeutics	6. 最初と最後の頁 2189 - 2193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14760584.2017.1395702	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 -
1. 著者名 西村 潤、中橋 理佳、幸 義和、清野 宏	4. 巻 264
2. 論文標題 粘膜ワクチンの潮流と課題	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 18227-18234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 中橋理佳、幸義和、清野 宏	4. 巻 27
2. 論文標題 ナノゲルデリバリーシステムによる肺炎球菌経鼻ワクチンの開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 19-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Azegami T, Yuki Y, Nakahashi R, Itoh H, Kiyono H.	4. 巻 98
2. 論文標題 Nanogel-based nasal vaccines for infectious and lifestyle-related diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 19-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molimm.2017.10.022.	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 -

1. 著者名 Nakahashi-Ouchida R., Yuki Y., Kiyono H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Development of a nanogel-based nasal vaccine as a novel antigen delivery system.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Expert Review of Vaccines	6. 最初と最後の頁 1231-1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14760584.2017.1395702	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 細胞性免疫を誘導する経鼻ワクチン	発明者 幸義和・中橋理佳・清野宏	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/030399	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 肺炎球菌表面タンパク質	発明者 幸義和・中橋理佳・清野宏	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-065362	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞性免疫を誘導する経鼻ワクチン	発明者 清野 宏、中橋 理佳、幸 義和	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2018-14651	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	幸 義和 (Yuki Yoshikazu) (60345030)	東京大学・医科学研究所・特任研究員 (12601)	削除：2018年1月12日