

令和元年6月17日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16267

研究課題名(和文) 乳幼児期の活発な消化管免疫の優位性を生かした経口粘膜ワクチン開発と作用機序解析

研究課題名(英文) Development of oral mucosal vaccine for infant.

研究代表者

木本 貴士 (KIMOTO, Takashi)

徳島大学・先端酵素学研究所(デザイン)・特任研究員

研究者番号：90724261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト生体成分肺サーファクタント由来経口投与アジュバントSF-10が、消化管粘膜の抗原提示細胞へワクチン抗原を効率よく運搬し、乳幼児期に強力かつ長期間持続する感染防御免疫を誘導できることを見出した。インフルエンザワクチンとSF-10を混合し、免疫系の未発達とされる乳幼児マウスに経口投与すると、成熟マウスと同等の血液IgGと気道粘膜IgAを誘導した。さらにSF-10混合インフルエンザワクチン経口投与したマウスは、免疫後1年経過しても致死量のインフルエンザウイルス感染に対して100%の生存率を示した。以上、SF-10経口アジュバントの乳幼児期における効果的な感染防御免疫誘導能が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘膜投与ワクチンは、皮下・筋肉投与ワクチンでは誘導できない粘膜IgAを誘導できるため、世界中で活発な開発研究が展開されている。本研究では生体成分肺サーファクタント由来経口投与アジュバントSF-10が、乳幼児期に強い感染防御免疫を誘導し、さらに少なくとも投与1年間はその免疫が持続されることを明らかにした。これら結果は、ワクチンを最も必要とする乳幼児期において安全かつ効果的な新たなワクチンが開発可能であることを示唆しており、今後SF-10アジュバントを用いた気道粘膜や消化管粘膜の感染症ワクチンの開発が加速することが期待される。

研究成果の概要(英文)： We have developed mucosal adjuvant SF-10 derived from human pulmonary surfactant. In this study, we found several new findings on oral adjuvant SF-10 in infant mouse. The findings include i) Oral administration of antigen combined with SF-10 enhanced antigen uptake into intestinal antigen presenting cells including CD11b+CD103- cells related in IFN- or IL-17 producing T cells and CD11b+CD103+ cells related in regulatory T cells. ii) Oral administration of influenza vaccine (HAv) combined with SF-10 (HAv-SF-10) potentially induced HAv-specific IgG in serum and IgA in respiratory mucosa in infant mouse. iii) Orally administration of HAv-SF-10 induced HAv-specific memory Th1, Th2 and Th17 cells and HAv-specific IgG and IgA producing B cells in infant mouse. iv) These protective immunities lasted for 1 year in infant mouse.

These results indicated that SF-10 oral adjuvant can be used for infectious disease vaccine in early childhood.

研究分野：ワクチン

キーワード：粘膜ワクチン 肺サーファクタント インフルエンザワクチン 経口投与 乳幼児

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児呼吸窮迫症候群治療薬である肺サーファクタント製剤サーファクテンは、経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとして有効である(J. Immunol. 2006;176;1122)。我々は、肺サーファクタントのアジュバント活性に必要な成分が、脂質三成分とヒトサーファクタントプロテイン C 類似ペプチド K6L16 の組み合わせにあることを見出し、これらの知見をもとに SF-10 アジュバントを開発した。SF-10 をインフルエンザワクチン (以下、HAV) と混合し (HAV-SF-10)、成熟マウス (7 週齢) に経鼻投与すると血液中抗インフルエンザ IgG 抗体の強い誘導と、現行の皮下ワクチン投与では誘導されない鼻腔粘膜の抗インフルエンザ IgA 抗体の強い誘導が確認された。これらマウスに致死量のインフルエンザウイルスを感染させたところ、HAV 単独皮下投与群が生存率 20% の条件下で、HAV-SF-10 経鼻投与群は 100% の生存率を示した (Influenza Other Respir Viruses. 2013;7;1218)。

(2) 近年、肺サーファクタントは気道粘膜以外に、胎児期の消化管粘膜においても吸収され、生理活性を示すことが報告された。この知見を受けて SF-10 を経口アジュバントとして使用した結果、経鼻投与と比較して 10 倍以上の抗体誘導効果が得られた。またこの効果は成熟マウスよりも乳幼児マウス (2 週齢) の方が高いことが分かった。これら結果は、乳幼児期は皮下や経鼻投与ワクチンよりも、予想外に消化管免疫が活発で、この優位性を生かした経口投与ワクチンが効果的であることを示唆するものである。

2. 研究の目的

(1) SF-10 はワクチン抗原運搬型アジュバントであり、投与部位の抗原提示細胞にワクチン抗原を効率運搬する性質がある。先行している経鼻投与においては鼻腔粘膜の抗原提示細胞へのワクチン抗原取り込み増強効果を確認している (PloS one 2018;13:e0191133)。しかし、消化管粘膜においても同じことが言えるのかは不明であった。そこで小腸における SF-10 による抗原取り込み増強効果を検討した。

(2) 乳幼児期は、定期ワクチン接種が開始される重要な時期である。しかしながら、従来臨床でよく用いられる皮下投与型ワクチンは血液中 IgG 抗体を誘導するが、実際に大半の病原体の感染が成立する粘膜局所の IgA 抗体を全く誘導できず、十分な効果があるとは言えない。一方 SF-10 混合ワクチン経口投与は、強力に粘膜 IgA を誘導できるため、乳幼児期に効果的なワクチンとして臨床応用が期待される。ここでは、乳幼児期に効果的なワクチン開発を目指して、SF-10 混合ワクチン経口投与の有効性を感染防御効果とその持続性を中心に解析を行った。

(3) 一般に乳幼児期は成熟期と比較して免疫系が未発達なため、ワクチン効果が低いと言われているにもかかわらず、SF-10 混合経口ワクチンは乳幼児にも強力な免疫誘導が可能である。ここでは、なぜ SF-10 混合経口ワクチンが乳幼児マウスに有効であるのかを明らかにするために成熟マウスと免疫誘導能について比較検討した。

3. 研究の方法

(1) 消化管粘膜における抗原取り込み増強効果

BALB/c マウスに、200 μ L の 100 μ g Alexa647 蛍光ラベル化オボアルブミン (fOVA) および 100 μ g fOVA 混合 SF-10 (fOVA-SF-10) を経口投与した。投与 12 時間と 24 時間後にそれぞれ、小腸を摘出し、2 mM EDTA in HBSS で上皮層細胞を、1.5 mg/mL collagenase type IV in HBSS で粘膜固有層細胞をそれぞれ単離精製した。単離細胞を蛍光ラベル化 anti-mouse I-A/I-E (MHC II)、CD11b、CD11c そして CD103 で染色し、Flow cytometry で fOVA 取込み細胞を解析した。

(2) 乳幼児マウスにおける有効性評価: 感染防御効果とその免疫持続性

生後 2 週齢の BALB/c マウスにそれぞれ 1 μ g HAV と 10 μ g SF-10 を混合し、経口投与した。この時対照群として、HAV 皮下、HAV 経鼻、HAV 経口、HAV-SF-10 経鼻投与群も設定した。初回免疫 3、14、17 日後に追加免疫し、最終免疫 2 週間後または 1 年後に血液、鼻腔洗浄液、肺洗浄液を採取した。血液、鼻腔洗浄液、肺洗浄液の抗 HAV 抗体価を ELISA により測定した。この時脾臓、骨髄、肺よりリンパ球を精製し、ELISPOT により抗 HAV 抗体産生細胞を検出した。また 1 年経過マウスの脾臓細胞を単離精製し、HAV 存在下で培養した。培養 3 日目に培養上清の Th1 サイトカイン、Th2 サイトカイン、そして Th17 サイトカインを Legendplex で測定した。さらに別に用意した 1 年経過マウスに致死量のインフルエンザウイルスを感染させて、生存率と体重変化を観察した。

(3) 乳幼児マウスと成熟マウスの比較

生後 2 週齢 (乳幼児) と 7 週齢 (成熟期) の BALB/c マウスにそれぞれ 1 μ g HAV と 10 μ g SF-10 を混合し (HAV-SF-10)、100 μ L/head で経口投与した。またこの時、成熟マウスにおいては投与量を 200 μ L にした群も設定した。初回免疫 3、14、17 日後に追加免疫し、最終免疫 2 週間後に血液と肺洗浄液を採取した。抗 HAV 抗体価を ELISA により測定した。さらに同マウスの脾臓細胞を単離精製し、HAV 存在下で培養した。培養 3 日目に培養上清の Th1 サイトカイン

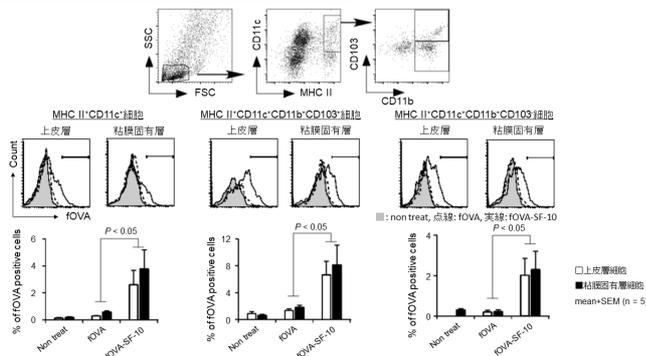
ン、Th2 サイトカイン、そして Th17 サイトカインを Legendplex で測定した。

4. 研究成果

(1) SF-10 は、消化管粘膜における抗原提示細胞への抗原取り込みを増強させた。

fOVA-SF-10 経口投与 12 時間後における抗原取り込み増強効果を検討した (図 1)。fOVA 単独投与群と比較して fOVA-SF-10 投与群は、上皮層と粘膜固有層共に、MHC II⁺ CD11b⁺ 細胞 (抗原提示細胞) への fOVA 取込み増強効果が確認された。また MHC II⁺ CD11b⁺ 細胞の中でも小腸の IFN- γ 産生 effector T 細胞や IL-17 産生 effector T 細胞をより強く誘導すると報告されている CD11c⁺CD103⁺ 細胞と、制御性 T 細胞の誘導に關与するとされる CD11c⁺CD103⁻ 細胞においても、fOVA-SF-10 投与群は高い抗原取込増強効果を示した。なお投与 24 時間後には抗原取込み細胞は検出されなかった。これら結果より肺サーファクタント由来アジュバント SF-10 が消化管粘膜においても抗原取り込みを増強することが分かった。

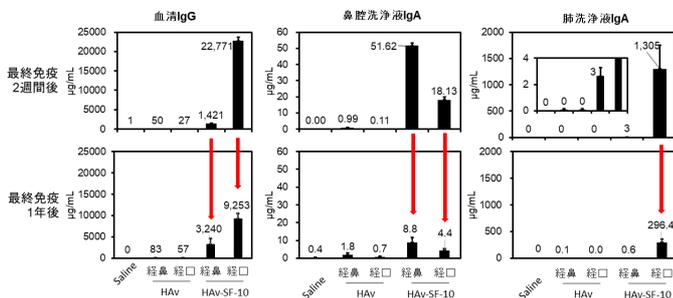
図1 SF-10の小腸抗原提示細胞への抗原取り込み増強効果



(2) SF-10 は乳幼児マウスにおいて強力かつ長期間持続する感染防御免疫を誘導した。

最終免疫 2 週間後と 1 年後の血液、鼻腔洗浄液、肺洗浄液の抗 HAV 抗体価を比較した。最終免疫 2 週間後時点において、経鼻および経口の HAV 単独投与群はほとんど抗体を誘導しなかったが、SF-10 混合群は経鼻、経口共に高い抗体誘導を示した。特に HAV-SF-10 経口投与は血液と肺洗浄液中の抗体誘導効果が強力で、HAV-SF-10 経鼻投与と比較して、血液 IgG は 10 倍以上、肺洗浄液 IgA は 400 倍以上であった。最終免疫 1 年経過後において、HAV-SF-10 経口投与は血液 IgG が約 1/3、鼻腔洗浄液 IgA が約 1/4、肺洗浄液 IgA が約 1/4 になるものの、1 年後においても高い抗体価を維持していた (図 2)。

図2 最終免疫2週間および1年後におけるHAV-SF-10投与マウスの抗HAV抗体価



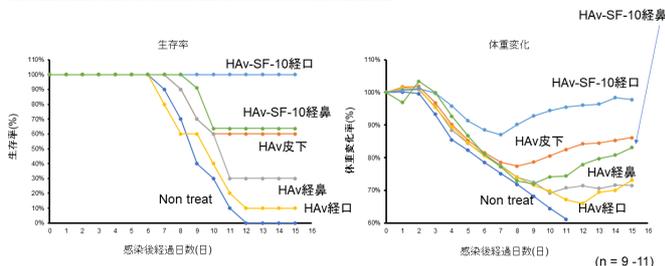
乳幼児期に誘導された抗HAV抗体が1年以上も持続して血液と気道粘膜で検出されることが確認された。

次にこれら抗体がどの組織で産生されているのかを確認するために ELISPOT により脾臓、骨髓、肺の抗 HAV 抗体産生細胞を検出した。最終免疫 2 週間後と比較して、脾臓では 1 年経過により抗体産生細胞数が 1/6 程度に減少したが、骨髓では約 2 倍多く検出された。骨髓は長期生存抗体産生細胞が移行することが知られているため、これら結果は、HAV-SF-10 経口投与は長期生存抗体産生細胞を誘導できることを示している。興味深いことに肺においては 1 年経過しても同等数の抗体産生細胞が検出された。これは後述する最終免疫 1 年後におけるインフルエンザウイルス感染防御に寄与したと考えられる。

最終免疫 1 年後に、T 細胞免疫が形成維持されているかを確認するために、脾臓細胞における HAV 応答性サイトカインを検出した。その結果、Th1、Th2、Th17 サイトカインすべてにおいて HAV-SF-10 経口投与群の脾臓細胞は HAV 応答性に産生・分泌することが分かった。

ここまでの結果より、最終免疫 1 年後にも HAV-SF-10 は粘膜抗体を始め抗インフルエンザ免疫が持続していることが示された。最後にこの維持されている免疫が実際のインフルエンザ感染に対して防御効果があるのかを検討した (図 3)。その結果、従来臨床で用いられている HAV 皮下投与が生存率 60% の条件下で HAV-SF-10 経口投与は 100% の生存率を示した。また感染時の体重変化においても HAV-SF-10 経口投与は、HAV 皮下投与と比較して体重減少が低度であった。

図3 最終免疫1年後における致死量のインフルエンザ感染実験



カプランマイヤーによる有意差検定結果 (生存率)
 Non_treat vs HAV皮下 (P=0.0321), vs HAV経鼻 (P=0.0965), HAV経口 (P=0.7898), +SF10経鼻 (P=0.0036), +SF10経口 (P=0.001)
 HAV-SF10(po) vs HAV皮下 (P=0.0394), vs HAV経鼻 (P=0.0028), HAV経口 (P=0.0003), +SF10経鼻 (P=0.0506)

以上の結果より、HAV-SF-10 経口投与は乳幼児期において有効なワクチンであり、その感染

防御効果は少なくとも1年は持続することが示された。

(3) SF-10 混合 HAV 経口投与ワクチンによる免疫誘導効果において、乳幼児マウスと成熟マウスの間に差は認められなかった。

乳幼児マウスと成熟マウスに HAV-SF-10 をそれぞれ経口投与した結果、両者 100 μ L/head 投与時には乳幼児マウスは成熟マウスより高い抗体誘導効果を示した。一方で、成熟マウスに 200 μ L/head で経口投与した場合は、乳幼児マウスと成熟マウスの抗体誘導効果に差がなくなった。これは乳幼児マウスの方が成熟マウスと比較して、消化管体積が小さく、経口投与時に胃を通り越してワクチンが小腸まで速やかに達することにより、胃酸の影響を回避できるためと推測される。事実、成熟マウスに 100 μ L で投与した場合、投与直後の投与物の大半が胃に留まるが、200 μ L/head で投与すると投与直後に十二指腸まで投与物が達していることを確認した。その他乳幼児マウスが低容量で効果を示した理由として、乳幼児は胃腸の消化機能が未発達のために胃酸の影響が低いため、100 μ L の投与でも抗原性が維持され、高い抗体誘導効果を示したと推測される。

この実験結果を踏まえて、乳幼児マウスには 100 μ L、成熟マウスには 200 μ L で経口投与し、HAV 応答性のサイトカイン産生能を検討した。その結果、乳幼児マウスと成熟マウスの脾臓細胞は共に HAV に応答して Th1 サイトカインである IFN- γ と IL-2、Th2 サイトカインである IL-4 と IL-5、そして Th17 サイトカインである IL-17A と IL-22 を産生・分泌した。これら産生パターンと強度に乳幼児マウスと成熟マウスの間に差はなかった。

研究開始当時は、乳幼児期が成熟期と比較して、消化管粘膜免疫が活発であると考えていたが、予想に反して SF-10 アジュバントは乳幼児期のみならず成熟期においても同様・同等の効果を持つことが分かった。一方で、免疫系が未発達とされる乳幼児期において HAV-SF-10 経口投与がなぜ高い効果を示すのかを今回の研究からは十分明らかにすることはできなかった。本研究により、HAV-SF-10 は粘膜の IgA を強く誘導できることも改めて分かった。また T 細胞解析の結果、IgA 誘導に関与が報告されている Th17 を誘導することも見出した。さらに本研究の標的であった消化管粘膜は TGF- β を介した IgA 誘導に関与する制御性 T 細胞が豊富な組織である。以上の点を考慮して、今後 SF-10 経口アジュバントの感染防御効果には、粘膜の IgA が重要な役割を果たしているかと仮定し、Th 17 と制御性 T 細胞を中心とした SF-10 アジュバントの作用機序解析を継続して行う。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Oral vaccination with influenza hemagglutinin combined with human pulmonary surfactant-mimicking synthetic adjuvant SF-10 induces efficient local and systemic immunity compared with nasal and subcutaneous vaccination and provides protective immunity in mice, Kimoto T, Kim H, Sakai S, Takahashi E, Kido H, Vaccine, 37, 612-622, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.12.002., 2019年, 査読有

Clarithromycin suppresses induction of monocyte chemoattractant protein-1 and matrix metalloproteinase-9 and improves pathological changes in the lungs and heart of mice infected with influenza A virus., Takahashi E, Indalao IL, Sawabuchi T, Mizuno K, Sakai S, Kimoto T, Kim H, Kido H, Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 56, 6-13, doi: 10.1016/j.cimid.2017.11.002., 2018年, 査読有

Adjuvanting influenza hemagglutinin vaccine with a human pulmonary surfactant-mimicking synthetic compound SF-10 induces local and systemic cell-mediated immunity in mice., Kim H, Kimoto T, Sakai S, Takahashi E, Kido H, PLoS one, 13, e0191133, doi: 10.1371/journal.pone.0191133., 2018年, 査読有

[学会発表](計10件)

木本貴士等、肺サーファクタント由来人工合成 SF-10 アジュバントの小腸粘膜抗原提示細胞への抗原取り込み増強効果と抗原特異的抗体産生細胞の誘導効果の検討、第22回日本ワクチン学会学術集会、2018年

木本貴士等、SF-10 adjuvant derived from pulmonary surfactant enhance to incorporate antigens into intestinal antigen presenting cells and induce antigen specific immunities. 日本肺サーファクタント・界面医学会第54回学術研究会、2018年

木本貴士等、肺サーファクタント由来人工合成 SF-10 アジュバントは、小腸粘膜の抗原提示細胞への抗原取り込みを増強し、消化管と気道粘膜の抗原特異的抗体産生細胞を誘導する。第91回日本生化学会大会、2018年

木本貴士等、ヒト肺サーファクタント由来、新規経口粘膜アジュバント SF-10 インフルエンザワクチンの開発、第90回日本生化学会大会、2017年

木本貴士等、ヒト肺サーファクタント由来粘膜アジュバント SF-10 の経口インフルエンザ

ワクチンへの応用、第 21 回日本ワクチン学会学術集会、2017 年
木本貴士等、新生児呼吸窮迫症候群治療薬サーファクテンに類似した人工粘膜アジュバント SF-10 混合経鼻インフルエンザワクチンは乳児期マウスに防御抗体を誘導する、) 第 49 回日本小児感染症学会総会・学術集会、2017 年
木本貴士等、ヒト肺サーファクタント由来粘膜アジュバント SF-10 混合経口投与インフルエンザワクチンは強力に全身免疫と局所免疫を誘導する、第 53 回日本肺サーファクタント・界面医学会学術研究会、2017 年

〔図書〕(計 3 件)

木本貴士、木戸博、日本肺サーファクタント・界面医学会、日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌、49 号、2018 年、p.52 (p.8-12) (共著)
木本貴士、木戸博、東京医学社、小児内科、50 巻 8 号、2018 年、p.152 (p.1301-1304) (共著)
木本貴士、金恵珍、堺聡子、高橋悦久、木戸博、日本肺サーファクタント・界面医学会、日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌、48 号、2017 年、p.50 (p.20-22) (共著)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。