

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06798

研究課題名(和文) NO供与体を利用した新規粘膜ワクチンシステムの開発

研究課題名(英文) The development of a novel mucosal vaccine system using NO donors

研究代表者

多田 塁 (TADA, RUI)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：70635888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：次世代ワクチンとして粘膜ワクチンが有望視されている。しかし、臨床応用されているサブユニット型粘膜ワクチンはない。そこで新たな発想として、一酸化窒素供与体を利用した粘膜ワクチンシステムの開発を目指した。本研究によって、一酸化窒素供与体を抗原タンパク質とともに経鼻投与することで抗原特異的粘膜IgAおよび全身IgGの産生が顕著に亢進することを見いだした。さらに本システムは、炎症反応や体重減少などがほぼみられなかったことから安全性が高いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルスのパンデミックは人類の感染症に対する脆弱さを痛感させた。生命のみならず社会秩序および経済を守るためには効果的な粘膜ワクチンの開発が必要不可欠であると思われる。本研究により見いだされた一酸化窒素供与体を用いたサブユニット型の粘膜ワクチンシステムは、粘膜ワクチンの新しいモダリティとなり得ると考えられた。さらなる研究開発によって多くのワクチンモダリティの一翼を担うことで社会に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mucosal vaccine is widely considered as next-generation vaccines to combat infectious diseases. However, there are no subunit-type mucosal vaccines in clinical settings. Therefore, we aimed to develop a mucosal vaccine system using a nitric oxide donor. In this study, we found that intranasal administration of a nitric oxide donor in combination with an antigenic protein potentiated antigen-specific both mucosal IgA and systemic IgG. Furthermore, this system was considered to be safe, as inflammatory reactions and weight loss were not observed.

研究分野：薬剤学、免疫学

キーワード：粘膜ワクチン 一酸化窒素 タイトジャンクション 抗原送達

### 1. 研究開始当初の背景

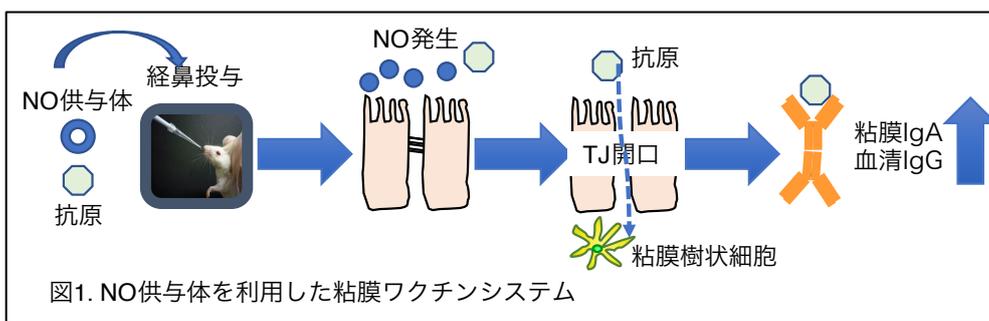
医療が発達した現代においても、世界の死因の少なくとも第2位を感染症が占めている。さらに近年、薬剤耐性菌の増加もあり、従来の抗生剤に替わる戦略の開発が望まれている。なかでも、次世代ワクチンとして粘膜ワクチンが有望視され、世界中で研究開発がおこなわれている。しかしながら、臨床応用されている粘膜ワクチンは少数の生ワクチンおよび不活化ワクチンのみである。病原体そのものが含まれる生ワクチンや不活化ワクチンは副反応などの危険性が高いため、病原体の抗原を構成成分とする“サブユニット型粘膜ワクチン”の開発が急務であるが、臨床応用には至っていない。その要因として、粘膜面は本質的に免疫応答免疫応答を誘導しがたいため、抗原に対する特異的免疫応答を効果的かつ安全に誘導する方法論に乏しいことが挙げられる。

粘膜免疫の効果的な誘導には粘膜アジュバントを用いて自然免疫を活性化する、もしくは抗原を粘膜上皮層下の固有層に局在する粘膜樹状細胞に管腔側から効率的に送達する必要がある。これまでに種々の粘膜アジュバントが報告されているが、その多くは病原体由来毒素などの分子である。一方、粘膜樹状細胞へ抗原を送達する戦略として、病原体が粘膜下へ侵入する際に用いる分子を利用する方法などが開発されている。両者の方法論共に主に病原体由来の分子を利用しているため、臨床応用を考えた際に副作用等の問題が生じる。

最近、一酸化窒素が粘膜上皮層の密着結合(タイトジャンクション)を一時的に開口させ、高分子を基底膜側へ送達可能であることが報告されている。申請者は、この一酸化窒素の粘膜上皮層のタイトジャンクション開口を介した高分子の吸収促進作用が、経粘膜投与した抗原の粘膜樹状細胞への送達を可能にすると考えた。そこで本研究では、一酸化窒素を発生させる一酸化窒素供与体を利用した新しい発想を基にした経鼻投与型粘膜ワクチンシステムの開発を目指す。

### 2. 研究の目的

申請者は病原体由来成分を含まないナノマテリアルが粘膜アジュバントとして機能し(Tada et al., PLOS ONE, 2015, Tada et al., Mol Pharm, 2018)、これを応用した肺炎球菌ワクチン開発に成功している(Tada et al., Int Immunopharm, 2018, Tada et al., Pharmaceutics, 2021)。しかしながら、粘膜アジュバントを用いた粘膜ワクチンシステムは自然免疫の活性化(炎症)を利用しているために過剰な炎症の誘起など、安全上の懸念がある。上述の課題は、現在臨床で使用されている低分子化合物を用いた粘膜樹状細胞への抗原送達システムを構築出来れば解決可能と考えられる。申請者はこれらを、一酸化窒素が粘膜上皮層のタイトジャンクションを一時的に開口し、高分子を基底膜側(すなわち固有層)へ送達可能であることに着目し着想を得た。本研究により、一酸化窒素の有するタイトジャンクション開口作用を利用した粘膜ワクチンシステムが開発されれば、サブユニット型粘膜ワクチンの臨床応用への第一歩となる(図1)。



### 3. 研究の方法

#### 1) 一酸化窒素供与体と抗原タンパク質の経鼻投与後の抗原特異的抗体産生の評価

7週齢のBALB/c雌性マウスにモデル抗原としてオボアルブミン(OVA)と一酸化窒素供与体としてSodium nitroprusside (SNP)を週1回経鼻投与した。これをdays 0、7および14の3週間に渡りおこない、最終免疫日の1週間後(days 21)に血清および粘膜洗浄液(鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液および膈洗浄液)を採取した。これらのサンプル中のOVA特異的抗体価は抗原固相化enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法にて検討した。

#### 2) 一酸化窒素供与体の経鼻投与による安全性の評価

7週齢のBALB/c雌性マウスにSNPを週1回の経鼻投与をおこなう。安全性の評価は①体重変化、②鼻粘膜局所における炎症の有無を定量PCRでの炎症性遺伝子発現を指標に評価および③鼻粘膜組織局所における炎症細胞(好中球など)の走化性を免疫染色等により評価する。

#### 3) 一酸化窒素供与体による抗原の粘膜樹状細胞への送達能評価

SNPと蛍光標識OVAを経鼻投与し、6あるいは24時間後に鼻粘膜組織を回収後、凍結切片

を作製し、樹状細胞マーカー(CD11c)にて免疫染色し、粘膜樹状細胞と蛍光標識 OVA の局在を蛍光顕微鏡で評価した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 一酸化窒素供与体と抗原タンパク質の経鼻投与による抗原特異的抗体産生誘導法の確立

まず、SNP と OVA を経鼻免疫した際に、粘膜および全身の両面において抗原特異的抗体の誘導が亢進するかどうかを検討した。その結果、SNP を併用することによって、抗原特異的な粘膜 IgA および全身 IgG が顕著に亢進することが明らかとなった(図 2)。さらに、この抗原特異的抗体産生誘導は一酸化窒素を発生しない SNP アナログである sodium ferrocyanide ではほぼ見られなかったことから、SNP による一酸化窒素の発生を介している可能性が示唆された。

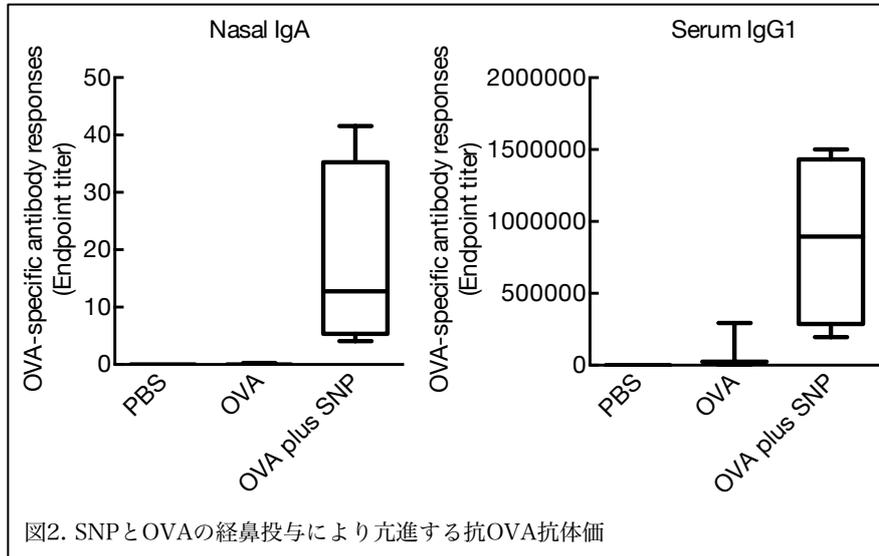


図2. SNPとOVAの経鼻投与により亢進する抗OVA抗体価

##### 2) 一酸化窒素供与体の経鼻投与による安全性

項目 1 の検討で、SNP の経鼻投与が抗原特異的抗体産生を亢進することが明らかとなった。SNP は臨床で既に広く用いられていることから安全性が高いと考えられるが、鼻粘膜への投与による知見はほぼない。そこで、SNP の経鼻投与による安全性を体重変化と炎症性遺伝子発現を指標に検討した。その結果、SNP の頻回経鼻投与においてもマウスの体重減少および炎症性遺伝子発現等は見られなかった(図 3)。

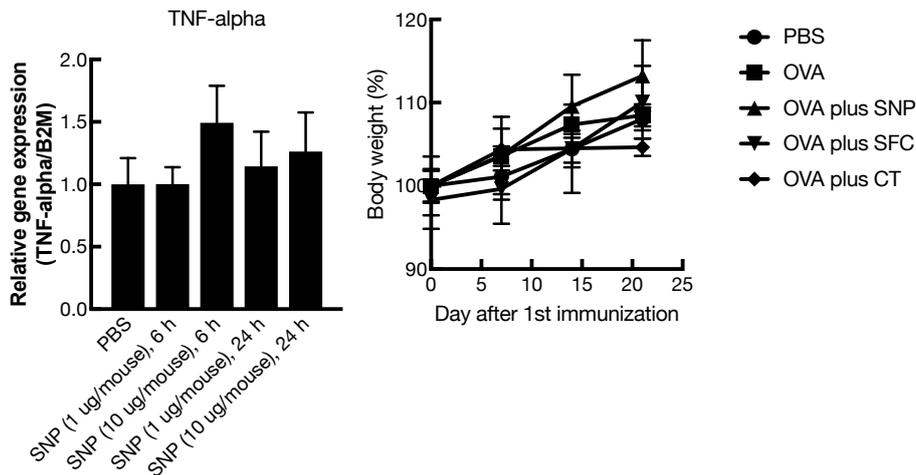


図3. SNPの経鼻投与による安全性評価

##### 3) 一酸化窒素供与体による抗原の粘膜樹状細胞への送達

次に、SNP と OVA の併用経鼻投与が鼻腔の粘膜上皮層下に存在する粘膜固有層(粘膜樹状細胞が多く局在するエリア)への抗原送達を促進するかどうかを検討した。その結果、SNP の併用により抗原の粘膜固有層への送達が促進していることが明らかとなった。

以上、本研究により一酸化窒素供与体を用いた経鼻投与型サブユニットワクチンシステムの開発に成功した。今後は本システムを実際に病原体由来の抗原を用い、感染モデルマウスでの検討をおこなうことにより感染症に対する粘膜ワクチンシステムとして機能するかどうかを評価していく予定である。さらなる研究により、一酸化窒素供与体を用いて感染症に対する粘膜ワク

チンシステムの開発に繋がることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tada Rui, Ogasawara Miki, Yamanaka Daisuke, Sakurai Yasuhiro, Negishi Yoichi, Kiyono Hiroshi, Ohno Naohito, Kunisawa Jun, Aramaki Yukihiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Enzymatically polymerised polyphenols prepared from various precursors potentiate antigen-specific immune responses in both mucosal and systemic compartments in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0246422	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 Tada Rui, Ohshima Akihiro, Tanazawa Yuya, Ohmi Akari, Takahashi Saeko, Kiyono Hiroshi, Kunisawa Jun, Aramaki Yukihiko, Negishi Yoichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Essential Role of Host Double-Stranded DNA Released from Dying Cells by Cationic Liposomes for Mucosal Adjuvanticity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 8~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vaccines8010008	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 Tada Rui, Yamanaka Daisuke, Ogasawara Miki, Saito Momoko, Ohno Naohito, Kiyono Hiroshi, Kunisawa Jun, Aramaki Yukihiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Polymeric Caffeic Acid Is a Safer Mucosal Adjuvant That Augments Antigen-Specific Mucosal and Systemic Immune Responses in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 4226 ~ 4234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00648	査読の有無 有
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 Tada Rui, Hidaka Akira, Kiyono Hiroshi, Kunisawa Jun, Aramaki Yukihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Intranasal administration of cationic liposomes enhanced granulocyte macrophage colony-stimulating factor expression and this expression is dispensable for mucosal adjuvant activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-018-3591-3	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 Tada Rui, Suzuki Hidehiko, Takahashi Saeko, Negishi Yoichi, Kiyono Hiroshi, Kunisawa Jun, Aramaki Yukihiko	4. 巻 61
2. 論文標題 Nasal vaccination with pneumococcal surface protein A in combination with cationic liposomes consisting of DOTAP and DC-chol confers antigen-mediated protective immunity against Streptococcus pneumoniae infections in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 385 ~ 393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2018.06.027	査読の有無 有
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 Tada Rui, Suzuki Hidehiko, Ogasawara Miki, Yamanaka Daisuke, Adachi Yoshiyuki, Kunisawa Jun, Negishi Yoichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Polymeric Caffeic Acid Acts as a Nasal Vaccine Formulation against Streptococcus pneumoniae Infections in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 585 ~ 585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13040585	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 Tada Rui, Hidaka Akira, Tanazawa Yuya, Ohmi Akari, Muto Shoko, Ogasawara Miki, Saito Momoko, Ohshima Akihiro, Iwase Naoko, Honjo Emi, Kiyono Hiroshi, Kunisawa Jun, Negishi Yoichi	4. 巻 101
2. 論文標題 Role of interleukin-6 in antigen-specific mucosal immunoglobulin A induction by cationic liposomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 108280 ~ 108280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2021.108280	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 多田 隼, 鈴木英彦, 小笠原樹, 山中大輔, 大野尚仁, 國澤純, 根岸洋一
2. 発表標題 酵素重合カフェ酸を用いた経鼻投与型肺炎球菌ワクチンの開発
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多田 壘, 鈴木英彦, 高橋佐慧子, 清野宏, 國澤純, 新槇幸彦, 根岸洋一
2. 発表標題 経鼻投与型リボソームワクチンを用いた肺炎球菌ワクチンの開発
3. 学会等名 第35回 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田 和駿, 多田 壘, 棚澤 佑哉, 近江 珠怜, 大島 亮洋, 清野 宏, 國澤 純, 新槇 幸彦, 根岸 洋一
2. 発表標題 正電荷リボソームの経鼻投与により局所に遊走される免疫細胞の解析
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 大樹, 多田 壘, 小笠原 樹, 永井 柚帆, 斎藤 桃子, 山中 大輔, 國澤 純, 大野 尚仁, 新槇 幸彦, 根岸 洋一
2. 発表標題 種々の前駆体から酵素重合したポリフェノールの粘膜アジュバント活性比較
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝瑠瑛, 多田壘, 大島亮洋, 棚澤佑哉, 近江珠怜, 根岸洋一, 清野宏, 國澤純, 新槇幸彦
2. 発表標題 傷害関連分子パターンの正電荷リボソームの有する粘膜アジュバント活性に対する関与
3. 学会等名 第62回 日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井 柚帆、多田 壘、小笠原 樹、齋藤 桃子、山中大 輔、櫻井 康博、根岸 洋一、國澤 純、大野 尚仁、新橋 幸彦
2. 発表標題 酵素重合化カフェ酸を利用した新規粘膜ワクチンシステムの開発
3. 学会等名 第62回 日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多田 壘、永井 柚帆、小笠原 樹、山中大 輔、安達 禎之、國澤 純、根岸 洋一
2. 発表標題 ポリフェノール高分子による抗原デリバリーを介した粘膜ワクチンシステム
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多田 壘、永井 柚帆、伊藤 大樹、櫻井 康博、山中大 輔、安達 禎之、國澤 純、根岸 洋一
2. 発表標題 酵素重合ポリフェノールの粘膜アジュバント活性に及ぼす粘膜付着剤添加の影響
3. 学会等名 第37回 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多田 壘、日高 晃、棚澤 佑哉、近江 珠伶、小笠原 樹、齋藤 桃子、大島 亮洋、清野 宏、國澤 純、根岸 洋一
2. 発表標題 IL-6の正電荷リポソームが有する粘膜アジュバント活性に対する寄与
3. 学会等名 第65回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者:101名、技術情報協会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 598
3. 書名 創薬研究者・アカデミア研究者が知っておくべき最新の免疫学とその応用技術	

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------