

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09850

研究課題名(和文)新規粘膜アジュバントを用いた広域スペクトラムワクチンの開発に関する研究

研究課題名(英文)Development of a wide-spectrum vaccine using a new mucosal adjuvant

研究代表者

黒野 祐一 (Kurono, Yuichi)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：80153427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホリルコリン(PC)重合体(R-MPC)には樹状細胞を介したアジュバント作用があり、卵白アルブミン(OVA)に対する粘膜免疫応答を増強し、その作用はR-MPCとOVAを結合するよりも混合するほうが強かった。また、R-MPCにも免疫原性があり、OVAと結合することでPC特異的免疫応答が増強された。しかし、OVA特異的IgEの産生増強はみられなかった。これらの結果から、R-MPCには免疫原性とともアジュバント作用があり、より広域スペクトラムを有する粘膜ワクチンそして粘膜アジュバントとしても応用が可能と考えられた。また、本製剤は型アレルギーを発症するリスクが少ないことも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

R-MPCは分子量が約400の物質で、それ自体は免疫原性を持たない。しかし、OVAと結合することでOVAがキャリア蛋白、そしてR-MPCがハプテンとなって免疫原性を獲得することが示された。さらに、R-MPCがTLR4のリガンドとなって免疫応答を増強することから、TLRを介する粘膜アジュバントとして応用できると考えられた。これらの研究成果から、R-MPCを細菌蛋白抗原と結合することでより多くの細菌感染に有効で血清型置換を起こすことがない広域スペクトラムワクチン、さらには臨床応用が可能な粘膜アジュバントの開発が進み、感染症の制御ならびに薬剤耐性対策推進の一助になると期待される。

研究成果の概要(英文)：The study showed that a phosphorylcholine (PC)-derivative (R-MPC) had an adjuvant effect via dendritic cells. So that intranasal administration of R-MPC together with ovalbumin (OVA) induced OVA-specific mucosal immune responses, which was significantly higher in the group immunized with the mixture of R-MPC and OVA than that immunized with R-MPC binding with OVA. Moreover, R-MPC had an antigenicity and PC-specific immune response was enhanced by the administration with R-MPC binding with OVA. However, intranasal administration with R-MPC did not increase OVA-specific IgE. Those results suggest that R-MPC has an antigenicity as well as adjuvanticity and might be able to apply as a wide-spectrum mucosa vaccine and a mucosal adjuvant without causing side effects due to type I allergy.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：ホスホリルコリン重合体 経鼻ワクチン 粘膜免疫 Th1/Th2型免疫応答 広域スペクトラム 粘膜アジュバント

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、研究者個人に帰属します。

新規粘膜アジュバントを用いた広域スペクトラムワクチンの開発に関する研究

Development of a wide-spectrum vaccine using a new mucosal adjuvant

1. 研究開始当初の背景

弱毒化経鼻インフルエンザワクチンの優れたインフルエンザ予防効果が報告され、感染症予防のための更なる経粘膜ワクチンの開発に大きな期待が寄せられている。しかし、弱毒化ワクチンはワクチン株の変異による有害事象が懸念されることから、安全性に優れる不活化ワクチンのほうが臨床応用には望ましい。ところが、不活化ワクチンの経粘膜投与で十分な免疫応答を誘導するには何らかのアジュバントを併用することが必須となる。コレラトキシン (CT) は強力な粘膜アジュバントであり、動物実験で頻用され、我々もホスホリルコリン (PC) とキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) の重合体 (PC-KLH) を CT とともに経鼻、舌下、経皮的にマウスに接種し、肺炎球菌やインフルエンザ菌による感染の防御が可能な粘膜および全身免疫応答を誘導できることを報告してきた。しかし、CT はヒトに対しては毒性が強く、実地臨床で使用することはできない。そこで、ヒトに応用可能な大腸菌の heat-labile toxin が経鼻不活化インフルエンザワクチンのアジュバントとして開発され臨床試験が行われた。ところが、このアジュバントが嗅神経を介して中枢に作用し、顔面神経麻痺を高頻度で発症したことから、その臨床応用が中止された。したがって、不活化粘膜ワクチンの臨床応用の実現には、安全な粘膜アジュバントの開発が急務とされている。

現在、侵襲性肺炎球菌感染症や髄膜炎の予防を目的として結合型肺炎球菌ワクチンや b 型インフルエンザ菌ワクチンが本邦でも定期接種化され、その優れた予防効果が示されている。しかし、同じく肺炎球菌やインフルエンザ菌を起炎菌とする急性中耳炎や急性副鼻腔炎、急性咽頭炎は今なお高頻度で発症しており、その理由として、ワクチン株以外の細菌による感染さらには血清型置換が指摘され、問題視されている。したがって、現行のワクチンよりもさらに多種多様な細菌に有効な広域スペクトラムをもつワクチンの開発が必要とされている。

PC はすべてのグラム陽性および陰性菌の細胞外膜に含有されていることから、広域スペクトラムを有するワクチンの候補の一つであるが、これまでにそれに関する研究は我々の施設のほかには実施されていない。また、線虫類が分泌する ES-62 は PC を含み、免疫調節作用があることが報告されており、PC がアジュバントとして作用することも推測される。これらの背景から、免疫原性ならびにアジュバント作用を有する PC 誘導体を開発することを立案した。

2. 研究の目的

PC を用いた広域スペクトラムワクチン、そして安全で効果的な新規粘膜アジュバントの開発を目指すことを目的とする。

PC を含む ES-62 や卵白アルブミン (OVA) と PC の重合体に免疫調節作用があること、さらに PC-KLH が TLR4 を介して Th1 型免疫応答を誘導することが知られており、PC 重合体が PC 特異的免疫応答を誘導すると同時に粘膜アジュバントとしても働くことが推測される。しかし、PC は非可溶性であり、PC-KLH はヒト毒性が強いためこれらを臨床に使用することはできない。そこで我々が着目したのが日油 (株) によって最近開発された結合型 PC 重合体 (Reactive MPC: R-MPC) で、本製剤はヒトへの安全性そして種々の蛋白と容易に結合することが実証されており、これが新規粘膜アジュバントさらに粘膜ワクチンとしても応用できると推測される。こうした理由により、日油 (株) から R-MPC の供与を受け、OVA などの蛋白抗原と結合させ、そのアジュバント作用ならびに免疫原性を観察することとした。

3. 研究の方法

(1) R-MPC の粘膜アジュバント作用と免疫原性

R-MPC と OVA の結合製剤 (R-MPC-OVA) および R-MPC の結合性をグリシン処理で消去した製剤と OVA の混合液 (R-MPC+OVA) さらに対照として CT と OVA の混合液 (CT+OVA) をマウスに 1

週ごと3回経鼻投与し、最終免疫終了後1週目に唾液、鼻腔洗浄液、血清を採取し、粘膜および全身免疫応答を観察した。また、鼻粘膜の組織学的障害、免疫後の異常行動の有無を確認し、鼻粘膜局所そして中枢への影響を評価した。

(2) R-MPC による Th1/Th2 免疫応答

免疫したマウスから採取された血清中の OVA および PC 特異的 IgG サブクラスを ELISA で測定し、さらに脾臓から単核球を分離し、抗原提示細胞とともに OVA および R-MPC で刺激し、IL-4, IFN- γ 、IL-10 の産生量を ELISA で定量した。

(3) R-MPC のアジュバント作用誘導機序

非免疫マウスの脾臓から樹状細胞 (CD11c 陽性細胞) を分離し、R-MPC、R-MPC-OVA そして対照としてリポ多糖体 (LPS) で刺激し、IL-12p40 の産生量を ELISA で測定した。

4. 研究成果

(1) R-MPC の粘膜アジュバント作用と免疫原性

免疫マウスの唾液中 PC 特異的 IgA は R-MPC-OVA 群、R-MPC+OVA 群、CT+OVA 群の順に高値を示したが、OVA 特異的 IgA は CT+OVA 群、R-MPC+OVA 群、R-MPC-OVA 群の順に高値であった。血清中 IgM、IgG、IgA 抗体価も、PC 特異的抗体価は R-MPC-OVA 群、R-MPC+OVA 群、CT+OVA 群の順に、OVA 特異的抗体価は CT+OVA 群、R-MPC+OVA 群、R-MPC-OVA 群の順に高値を示した。また、血清中総 IgE は各群で差はみられなかったが、OVA 特異的 IgE は CT+OVA 群で有意に高値となり、R-MPC+OVA 群と R-MPC-OVA 群ではともに低値で両者間に差はなかった。なお、いずれの免疫でもマウスの異常行動や粘膜障害は確認されず、R-MPC の中枢神経や鼻粘膜への影響はないと考えられた。

(2) R-MPC による Th1/Th2 免疫応答

IgG サブクラス抗体価は OVA および PC 特異的抗体価ともに IgG1 抗体価が最も高値で、OVA 特異的抗体価は CT+OVA 群、R-MPC+OVA 群、R-MPC-OVA 群の順に、PC 特異的抗体価は R-MPC-OVA 群、R-MPC+OVA 群、CT+OVA 群の順に高値であった。

単核球から産生される IL-4、IFN- γ 、IL-10 は OVA 刺激時のほうが R-MPC 刺激時よりも著しく高値であり、OVA 刺激によって CT+OVA 群、R-MPC+OVA 群、R-MPC-OVA 群の順にすべてのサイトカイン量が高値を示した。一方、R-MPC 刺激では、いずれの群もサイトカインの産生量はほぼ同じであった。

(3) R-MPC のアジュバント作用誘導機序

樹状細胞から産生される IL-12p40 は LPS、R-MPC、R-MPC-OVA の順に高く、いずれも濃度依存性に IL-12p40 が高値を示した。

以上の結果から、R-MPC には樹状細胞の TLR4 を介したアジュバント作用があり、R-MPC と結合あるいは混合した蛋白抗原に対する粘膜免疫応答を誘導し、そのアジュバント作用は結合化するよりも混合するほうが強いことが示唆された。また、R-MPC 自体にも免疫原性があり、PC 特異的免疫応答は OVA と結合すること、すなわちキャリアタンパクと結合することで増強されることが示された。これらの粘膜免疫応答は Th1 および Th2 型両者の反応によって誘導されるが、R-MPC では CT のような OVA 特異的 IgE の産生はみられず、制御性 T 細胞の活性化が関与していると推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 2. Yuichi Kurono	4. 巻 49
2. 論文標題 3. The mucosal immune system of the upper respiratory tract and recent progress in mucosal vaccines.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 4. Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 1-1-0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2021.07.003.	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 2. 黒野祐一、井内寛之、山下 勝	4. 巻 125
2. 論文標題 3. 含嗽の細菌付着上皮細胞の除去作用に関する研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会会報	6. 最初と最後の頁 279-284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3950/jjibi inkoka.125.279	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 黒野祐一、井内寛之、山下 勝	4. 巻 126(5)
2. 論文標題 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンポリマーの新規含嗽薬としての有用性	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日耳鼻会報 掲載予定	6. 最初と最後の頁 -
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 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 Tomohiro Jimura , Yuichi Kurono , Takashi Hirano, Masaki Kawabata, Masaru Yamashita	4. 巻 -
2. 論文標題 Application of phosphorylcholine derivative as mucosal adjuvant enhancing mucosal immune responses in the upper respiratory tract.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx 投稿中	6. 最初と最後の頁 -
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 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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒野 祐一
2. 発表標題 水道水による含漱の効果に関する考察
3. 学会等名 令和4年同門会・地方部会合同学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒野 祐一
2. 発表標題 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンポリマー（MPCP）の 新規含嗽薬としての有用性
3. 学会等名 令和5年同門会・地方部会合同学術講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 経鼻粘膜ワクチン用アジュバント	発明者 黒野祐一、川畠雅樹、地村友宏	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、7165327	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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	宮下 圭一 (Miyashita Keiichi) (30585063)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教 (17701)	
研究分担者	川畠 雅樹 (Kawabata Masaki) (30585112)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	永野 広海 (Nagano Hiromi) (60613148)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	
研究分担者	大堀 純一郎 (Ohori Junichiro) (90507162)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	

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