

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09717

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント阻害による上気道粘膜免疫応答賦活化

研究課題名(英文) Activation of upper respiratory mucosal immune response by immune checkpoint inhibitors

研究代表者

鈴木 正志 (Suzuki, Masashi)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：60211314

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)：高齢である12カ月齢マウス、18カ月齢マウスにおいては経鼻投与に抗PD-L1抗体投与を併用した。経鼻免疫後7日目に、鼻腔洗浄液および血清を採取し、OMP特異的抗体価を測定した。鼻粘膜、鼻粘膜関連リンパ組織、頸部リンパ節、脾臓を採取し、フローサイトメトリーによるT細胞解析を行った。抗PD-L1抗体投与に伴い、12カ月齢マウスおよび18カ月齢マウスともにPD-1陽性CD4陽性T細胞比の増加を認めしたが、12カ月齢マウスのみCD4陽性T細胞にCD69の発現増強を認めリンパ球の活性化が示された。また、濾胞ヘルパーT細胞は12カ月齢マウスのみ局所リンパ組織において増加傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における65歳以上の侵襲型インフルエンザ菌感染症の主な疾患は肺炎であり、次いで菌血症、髄膜炎であり、症例致死率少なくなく、インフルエンザ菌分離株の95%は無莢膜型であるとの報告があり、高齢者におけるインフルエンザ菌経鼻粘膜ワクチンによる上気道免疫応答の賦活化は重要である。抗PD-L1抗体投与によるインフルエンザ菌経鼻粘膜ワクチンに対する上気道免疫応答の再活性化は12カ月齢マウスのみであり、18カ月齢マウスにおいて効果を認めなかった。しかし、PD-1経路ブロックによる粘膜免疫応答の再活性化の可能性が示され、高齢者に対するインフルエンザ菌ワクチン療法の確立に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aged Mice (12- and 18-month-old mice) were used in this study, they were administered intranasally 10 µg of OMP and 1 µg of cholera toxin as mucosal adjuvant three times a week. Intranasal administration was combined with anti-PD-L1 antibody administration in order to activate mucosal immunity. On day 7 after intranasal immunization, nasal lavage fluid and serum were collected and OMP-specific antibody titers were measured. Nasal mucosa, nasal mucosa-associated lymphoid tissue, cervical lymph nodes, and spleen were collected, flow cytometric analysis was performed. OMP-specific antibody increased with anti-PD-L1 antibody administration in 12-month-old mice. However, 18-month-old mice showed no increase in OMP-specific antibody titer. Twelve-month-old mice showed an enhanced CD69 expression in CD4-positive T lymphocytes. In addition, follicular helper T cells showed an increasing trend in lymphoid tissues in 12-month-old mice, but not 18-month-old mice.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：上気道感染症 インフルエンザ菌 粘膜免疫 加齢 PD1経路 PD-L1

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎は小児において発生頻度が極めて高い上気道感染の1つであり、肺炎球菌やインフルエンザ菌は主たる起炎菌である。現在、小児肺炎球菌性髄膜炎、菌血症予防として13価肺炎球菌(PCV13)ワクチンや沈降10価肺炎球菌結合型ワクチンが小児に適用があるが、現行のワクチン療法では特に無莢膜型インフルエンザ菌性中耳炎の発症予防は困難である。また、本邦における2018年の侵襲型インフルエンザ菌(NTHi)感染症では、65歳以上の侵襲型インフルエンザ菌感染症の主な疾患は肺炎であり、次いで菌血症、髄膜炎であり、症例致死率は65歳以上では26.1%であり、分離されたインフルエンザ菌のうち95%は無莢膜株であったと報告がある。また、50歳以上における成人での鼻咽腔へのNTHiの定着率は10.5%であり、急性呼吸器症状の発症とNTHiの定着には関連を認めたとの報告がある。これらの報告からも、NTHiは小児のみならず高齢者を含めて、上気道のみならず下気道においても感染症を発症する起炎菌であり、いずれの疾患においても鼻咽腔におけるNTHiの定着が発症の引き金になりうるということが推測される。このような背景からNTHiワクチンの開発は、小児のみならず高齢者においても急務であり重要な意義を持つものと思われる。PD-1/PD-L1シグナル阻害によるCD8陽性T細胞を主体として免疫応答の再活性化について報告されているが、CD4陽性T細胞に対する免疫への影響についての報告は少なく、粘膜ワクチンにおける粘膜型IgA抗体を主体としたPD-1/PD-L1シグナル阻害による効果についての検討はない。

2. 研究の目的

Programmed cell death-1 (PD-1 : CD279)は、1992年に同定された免疫補助受容体であり、分子構造的には免疫グロブリンスーパーファミリーに属する免疫抑制補助シグナル受容体であり、活性化されたT細胞、B細胞および骨髄系細胞に発現し、T細胞の増殖とエフェクター機能を抑制することが知られており、PD-1のリガンドであるPD-L1は、マクロファージや血管内皮細胞などに恒常的に発現しており、炎症などの刺激によって発現が増強し、腫瘍細胞やウイルス感染細胞などもPD-L1を発現することで、PD-1/PD-L1シグナルによりT細胞の増殖や傷害機能が抑制され、免疫監視から逃避していることが知られている。近年、免疫チェックポイント分子を標的とした抗体療法は、腫瘍免疫応答を賦活化する免疫療法として、様々な悪性腫瘍疾患の治療に適用となっており、頭頸部癌においても2017年から適用になっている。T細胞上のPD-1、もしくは悪性腫瘍細胞や抗原提示細胞が発現するPD-L1に結合する抗体を投与することにより、T細胞上のPD-1との相互作用を阻害することによりT細胞への抑制シグナル伝達が阻害し、CD8陽性の細胞傷害性T細胞の活性化が維持するとされており、抗ウイルスおよび腫瘍効果を発揮することが知られている。今回、加齢に伴う経鼻ワクチン投与における抗体産生能の変化と、高齢マウスへの抗PD-L1抗体投与によるPD-1/PD-L1免疫チェックポイント阻害を行った場合の経鼻粘膜免疫および全身免疫応答におけるCD4陽性T細胞の動態について解析を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

動物 : SPF下にて飼育した、雄性、BALB/cマウス(12カ月齢、18カ月齢)を用いて検討している。
経鼻免疫マウスモデル : NTHi由来外膜蛋白(OMP)とコレラトキシンをアジュバントとして、リン酸緩衝液(PBS)に溶解しOMP溶液を調製した。12カ月齢マウス、18カ月齢マウスにOMP溶液を週1回計3回経鼻免疫を行った。経鼻免疫終了後7日目に、ケタミン・ザイラジン溶液にて深麻酔を行い採血し頸椎脱臼させた後に、両側下顎骨切断し、開口させ後鼻腔から200 μ lの生理食塩水で鼻腔を洗浄して鼻腔洗浄液を採取した。

抗PD-L1抗体投与モデル : 免疫前1日前と免疫終了後3日目に抗PD-L1抗体250 μ gの腹腔内投与を行い、各マウスにOMP溶液を週1回計3回経鼻免疫を行っている。経鼻免疫終了後7日目に上記と同様に試料を採取している。

フローサイトメトリーによる解析 : 12カ月齢マウス、18カ月齢マウスに対して、OMP経鼻免疫を施行し、抗PD-L1抗体投与の有無について解析を行った。12カ月齢マウス、18カ月齢マウスから鼻粘膜、鼻粘膜関連リンパ組織(NALT)、頸部リンパ節(CLN)、脾臓(SPL)を採取し、鼻粘膜(NP)はコラゲネースtype IVによる処理を行い、NALT、頸部リンパ節、脾臓などのリンパ組織はスチールメッシュにて細碎し単核球を採取した。鼻粘膜由来単核球は比重遠沈法にて分離採取している。前方散乱光シグナル(FSC)と側方散乱光シグナル(SSC)を基にリンパ球が存在する領域にゲートをかけ、各組織から採取した単核球をFITC標識抗マウスCD3a抗体、Pacific Blue標識抗マウスCD4抗体、濾胞ヘルパーT細胞に表出するCXCR5を認識するPE標識抗マウスCD185抗体、リンパ球の活性化を示すCD69を認識するPerCP-Cy5.5標識抗マウスCD69抗体、PD-1を認識するPerCP-Cy5.5標識抗マウスCD279抗体を用いて染色し、CD3陽性CD4陽性T細胞にゲートを囲み、それぞれの抗体に対する発現について評価している

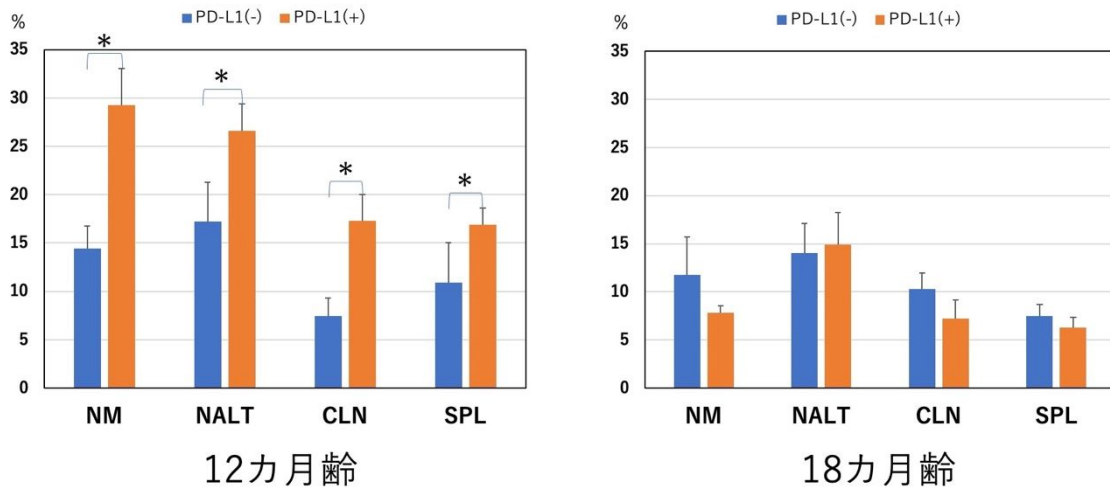
4. 研究成果

(1)抗 PD-L1 抗体投与による CD4 陽性 T 細胞動態の解析

12 カ月齢マウスおよび 18 カ月齢マウスにおける CD4 陽性 T 細胞における、リンパ球活性化マーカーである CD69 陽性を示した細胞比率について図 1 に示す。12 カ月齢マウスでは抗 PD-L1 抗体投与により、今回対象とした鼻粘膜(NM)、鼻粘膜関連リンパ組織(NALT)、頸部リンパ節(CLN)、脾臓(SPL)すべての組織において、CD69 + CD4 + T 細胞比率の増加を認めた。しかし、18 カ月齢マウスにおいては CD69 + CD4 + T 細胞比率の増加を認めなかった。次に、CD4 + T 細胞における PD-1 発現について図 2 に示す。抗 PD-L1 抗体投与により、12 カ月齢マウスおよび 18 カ月齢マウス共に CD279 + CD4 + T 細胞比率の増加を認めており、CD4 陽性 T 細胞における PD-1 発現は増加傾向を認めた。

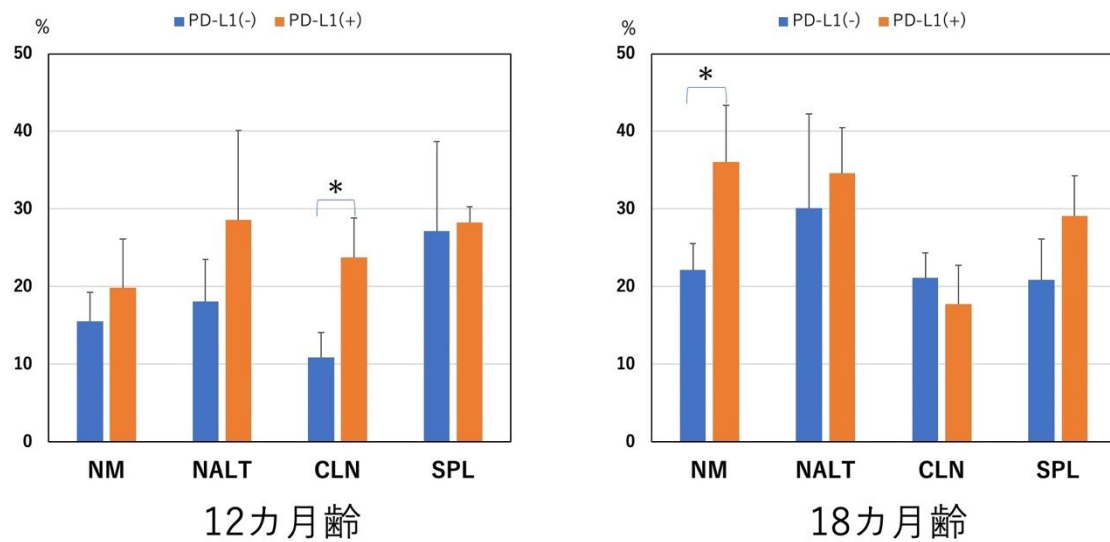
(2)抗 PD-L1 抗体投与による濾胞性ヘルパー T 細胞動態の解析

CXCR5 (CD185)を発現する二次リンパ組織の濾胞胚中心に存在するヘルパー T 細胞について、抗 PD-L1 抗体投与による影響について検討した。濾胞ヘルパー T 細胞を示唆する CD185 + CD4 + T 細胞は、リンパ組織でない鼻粘膜組織には少なく、NALT、頸部リンパ節や脾臓といったリンパ組織に多く認められた。抗 PD-L1 抗体投与による CD185 + CD4 + T 細胞の反応は 12 カ月齢マウスと 18 カ月齢マウスでは異なっており、抗 PD-L1 抗体投与により 12 カ月齢マウスが CD185 + CD4 + T 細胞増加するのに対して、18 カ月齢マウスでは低下していた(図 3)。



* : PD-L1(-)とPD-L1(+)との比較においてp<0.05

図 1 : 抗 PD-L1 抗体投与による 12 カ月齢マウスおよび 18 カ月齢マウスにおける CD4 陽性 T 細胞におけるリンパ球活性化



* : PD-L1(-)とPD-L1(+)との比較においてp<0.05

図 2 : 抗 PD-L1 抗体投与による 12 カ月齢マウスおよび 18 カ月齢マウスにおける CD4 陽性 T 細胞における PD-1 発現

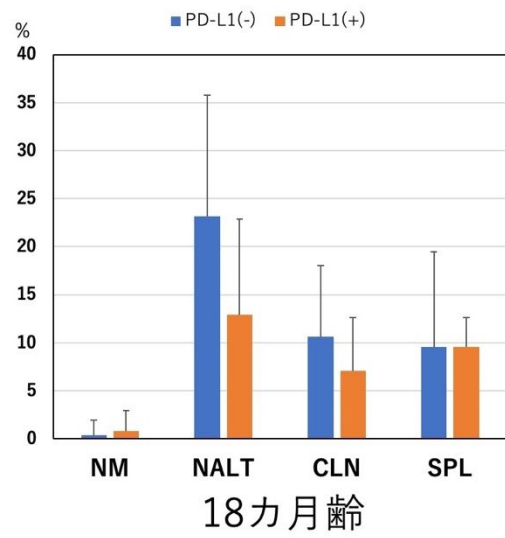
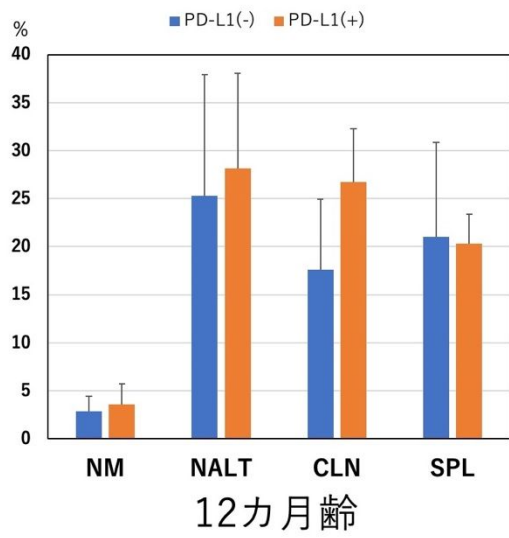


図3：抗 PD-L1 抗体投与による 12 カ月齢マウスおよび 18 カ月齢マウスにおける濾胞性ヘルパーT 細胞を示唆する CD4 陽性 T 細胞の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 平野 隆, 川野利明, 吉永和弘, 門脇嘉宣, 梅本真吾, 松永崇志, 鈴木正志	4. 巻 3
2. 論文標題 加齢マウスにおける抗PD-L1抗体による経鼻粘膜免疫賦活化とヘルパーT細胞の関与	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会誌	6. 最初と最後の頁 139-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24805/jiaio.3.4_139	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野 隆, 鈴木正志 他
2. 発表標題 抗PDL-1抗体投与後の上気道免疫応答の解析
3. 学会等名 第31回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野 隆, 川野利明, 高倉苑佳, 松永崇志, 吉永和弘, 鈴木正志
2. 発表標題 加齢に伴う経鼻粘膜ワクチン投与における下気道免疫応答の解析
3. 学会等名 第72回日本気管食道科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野 隆, 川野利明, 高倉苑佳, 吉永和弘, 松永崇志, 鈴木正志
2. 発表標題 抗PD-L1抗体投与による上気道粘膜免疫応答の賦活化の試み
3. 学会等名 第2回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野 隆, 川野利明, 門脇嘉宣, 吉永和弘, 松永崇志, 鈴木正志
2. 発表標題 抗PD-L1抗体投与によるインフルエンザ菌に対する上気道粘膜免疫への影響
3. 学会等名 第32回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野 隆, 川野利明, 吉永和弘, 門脇嘉宣, 鈴木正志
2. 発表標題 抗PD-L1抗体が与える経鼻粘膜免疫におけるリンパ球動態への影響
3. 学会等名 第3回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野 隆, 川野利明, 吉永和弘, 門脇嘉宣, 梅本真吾, 松永崇志, 鈴木正志
2. 発表標題 加齢マウスにおける抗PD-L1抗体による経鼻粘膜免疫賦活化とヘルパーT細胞の関与
3. 学会等名 第4回耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平野 隆, 川野利明, 吉永和弘, 門脇嘉宣, 梅本真吾, 松永崇志, 鈴木正志
2. 発表標題 インフルエンザ菌に対する経鼻免疫が中耳粘膜免疫応答に及ぼす影響
3. 学会等名 第4回耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担者	平野 隆 (Hirano Takashi) (20305056)	大分大学・医学部・講師 (17501)	
研究 分担者	川野 利明 (Kawano Toshiaki) (30633424)	大分大学・医学部・講師 (17501)	
研究 分担者	門脇 嘉宣 (Kadowaki Yoshinori) (10706980)	大分大学・医学部・助教 (17501)	

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
---------	---------