

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年8月27日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成22年度 ～ 平成24年度

課題番号：22590073

研究課題名（和文） 脂質ナノキャリアーの粘膜ワクチンアジュバントとしての IL-6 産生機構の解明

研究課題名（英文） IL-6 acts as a key cytokine in the augmentation of mucosal immunity following intranasal administration of antigen with liposomes

研究代表者

新槇 幸彦 (ARAMAKI YUKIHIKO)

東京薬科大学 薬学部・教授

研究者番号：90138959

研究成果の概要（和文）：本研究は DOTAP/DC-chol より構成される正電荷リポソームの経鼻投与における粘膜ワクチンアジュバント機構に関して、抗原の取り込み、IL-6 産生細胞の同定と IL-6 の役割についてマウスを用いて検討を加えたものである。DOTAP/DC-chol のアジュバント作用の一因として、NALT 樹状細胞への抗原である OVA の取り込み量が増加すること、および IL-6 が産生されることにより IL-6 受容体を発現する CD11b 陽性細胞が抗原特異的 IgA 産生細胞へと分化することを明らかとした。また、Nasal Passage での IL-6 産生に GM-CSF が深く関与する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：The mucosal immune system acts as a first line of defense against infection caused by luminal pathogens. To deliver antigen and mucosal adjuvants to nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) effectively is an important for the development of mucosal immunity. In this study, we examined the activation mechanism of mucosal immunity following intranasal administration of antigen in combination with cationic liposomes composed of DOTAP and DC-cholesterol (DC-Chol). Intranasal administration of OVA with cationic liposomes induced higher levels of mucosal IgA and systemic IgG. Antigen specific IgA level was the same to that of mice which were immunized with OVA and cholera toxin. Uptake of OVA in NALT DC was enhanced by DOTAP/DC-Chol as carrier. Furthermore, DOTAP/DC-Chol enhanced the production of IL-6, an important cytokine for the induction of antigen-specific mucosal IgA, in the nasal passage. Pre-treatment of mice with anti-IL-6R antibody suppressed the production of IgA to the control levels. The antibody treatment decreased CD138⁺ and IgA⁺B220⁺ cell populations which have been up-regulated in nasal passage by nasal administration of OVA with CpG-ODN and cationic liposomes. These findings strongly suggested that intranasal administration of antigen with CpG-ODN and cationic liposomes induced mucosal immunity, and IL-6 could act as an important cytokine for the augmentation of mucosal immune response. Recently, GM-CSF was strongly suggested the contribution in the production IL-6 following intranasal administration of OVA and the cationic liposomes composed of DOTAP/DC-Chol.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	2,600,000	780,000	3,380,000
23年度	600,000	180,000	780,000
24年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：リポソーム、粘膜ワクチン、アジュバント、IL-6、ナノキャリアー

1. 研究開始当初の背景

HIV, インフルエンザや結核などの多くの新興・再興感染症に対する新たな治療・予防法の確立が急がれている。現行の多くのワクチンは注射による投与であり、全身免疫を誘導し生体防御を期待したものである。しかしながら、注射によるワクチン接種では粘膜免疫を誘導することができないため、経粘膜感染する病原微生物の感染を粘膜で防御することは困難である。そこで粘膜免疫と全身免疫の両免疫系を賦活化することのできる経粘膜投与型のワクチン開発に対する期待が高まっている。呼吸器において、粘膜関連リンパ組織である NALT は誘導組織として、鼻腔固有層である nasal passage は実行組織として機能している。したがって NALT に効率良く抗原や粘膜アジュバントを送達することが効果的な粘膜免疫の誘導へと繋がると考えられている。これまで、DOTAP を構成脂質とし、cholesterol またはその誘導体である DC-cholesterol (DC-chol) を構成脂質とした正電荷 liposome とモデル抗原として OVA と共に経鼻投与することにより、粘膜免疫及び全身免疫系のいずれもが賦活化されることを明らかとし、DOTAP-DC-Chol よりなる正電荷リポソームが新たな粘膜アジュバントとして期待された。本リポソームの経鼻投与により、nasal passage において IL-6 の有意に高い産生が認められ、抗 IL-6 受容体抗体の腹腔からの前投与により IgA 産生が完全に抑制されたことから DOTAP/DC-chol 投与による粘膜 IgA 産生に IL-6 が重要な役割を果たしていることを明らかとした。しかし DOTAP/DC-chol 投与後の IL-6 産生細胞や抗原特異的 IgA 産生誘導において IL-6 がどのような役割を果たしているかについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

新興・再興感染症に対する新たな予防戦略として、ワクチン開発に対する期待は高い。感染ルートを考えたとき、粘膜免疫系を賦活化することは理にかなっている。粘膜免疫系の賦活化には動物実験ではこれらトキシンなどのが用いられているが、当然ヒトには適用できず、新たな視点からのアジュバントの開発が望まれている。我々は、これまでリポソームの DDS への応用や免疫系細胞の機能に及ぼす研究を展開し、負電荷リポソ

ムによるマクロファージの機能抑制やある種の正電荷リポソームによるマクロファージのアポトーシス誘導を明らかにしてきた。これまで、我々は DOTAP/DC-chol からなる正電荷リポソームの経鼻投与により、粘膜免疫が賦活化され、その誘導に IL-6 の関与が深く関わることを明らかにしたことから、本研究では DOTAP/DC-chol による IgA 産生機構の解明について、抗原の取り込み、IL-6 産生細胞の同定と IL-6 の役割、さらに粘膜免疫賦活化におけるケモカインの役割について検討を加えた。

3. 研究の方法

SPF 雌性 BALB/c マウス (6~8 週齢) は東京実験動物より購入し、東京薬科大学実験動物倫理規定に従って実施した。NALT および nasal passage 細胞は定法に従って調製した。DOTAP/DC-chol (molar ratio=1/1) リポソームはボルテキシング法で調製し、OVA 50mg とともにマウスに経鼻投与した。

Nasal passage におけるサイトカインや抗体レベルはサンドイッチ ELISA 法で、細胞分化や抗原の取り込み等は Flow cytometry で検討した。

4. 研究成果

NALT における OVA および liposome の取り込み

樹状細胞は抗原の取り込み、抗原提示など粘膜免疫応答においても重要な役割を担っていることが報告されている。経鼻ワクチンの開発において、NALT に存在する樹状細胞へ効率良く抗原やアジュバントを送達することが重要である。そこで樹状細胞のマーカー抗原である CD11c を指標に、NALT の樹状細胞における抗原の取り込みについて検討した。マウスにモデル抗原として OVA とともに DOTAP/DC-chol を経鼻投与し、1 時間後に NALT の単核球細胞を調製して抗 CD11c 抗体で処理し flow cytometry により検出したところ、OVA 単独投与群と比較して、DOTAP/DC-chol 投与群において樹状細胞に OVA が効率良く取り込まれていることが明らかとなった (Fig. 1)。さらに DOTAP/DC-chol を併用することで NALT 上皮細胞へ OVA が留まりやすくなり、樹状細胞への取り込みが増大していることを、共焦点顕微鏡を用いた観察により明らかとした。

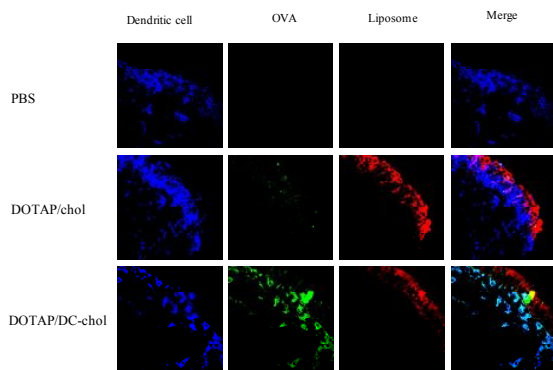


Fig. 1 Uptake of OVA and liposomes by CD11⁺ cells in NALT

IL-6 産生細胞の同定と IgA 産生誘導機構の検討

DOTAP/DC-chol 投与による IL-6 産生細胞は、CD4 陽性 T 細胞であることを示唆する結果を得た。さらに DOTAP/DC-chol によって増加する CD11b 陽性細胞に IL-6 受容体が発現することを明らかとした。CD11b 抗原は一般に樹状細胞やマクロファージ、B 細胞などに発現していることから、CD11b 細胞におけるこれらの細胞表面抗原の発現について検討したところ、全て低レベルであった。しかしながら腸管などの粘膜には、B220 の発現が低レベルである特殊な B1 細胞が存在することが報告されていることから、B1 細胞の表面抗原である CD5 の有無について検討し、CD5 を発現しない B1 細胞である可能性が示唆された。さらに DOTAP/DC-chol 投与群において増加した CD11b 細胞は IgA 産生細胞へと分化が誘導されたことから、DOTAP/DC-chol 投与により CD4 陽性 T 細胞から IL-6 が産生され、IL-6 受容体を発現する CD11b 細胞が IgA 産生細胞へと分化している可能性が示唆された (Fig. 2)。

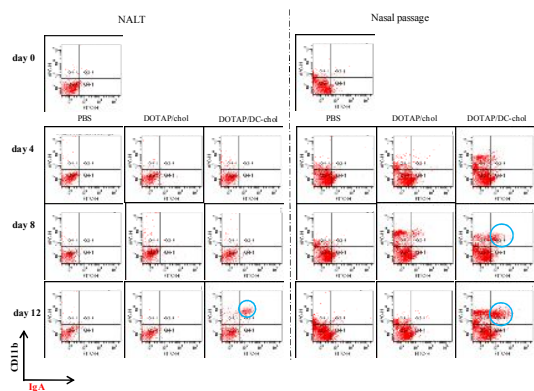


Fig. 2 Changes in CD11b⁺IgA⁺ cells in NALT and nasal passage

DOTAP/DC-cholesterol による IL-6 産生における GM-CSF の関与

DOTAP/DC-chol が樹状細胞に取り込まれた後、どのような機構で CD4 陽性 T 細胞からの IL-6 産生を誘導しているか検討した。直接 CD4 陽性 T 細胞にリポソームを作用させても IL-6 の産生が認められないこと、および樹状細胞と CD4 陽性 T 細胞の共培養条件下でリポソームを作用させても IL-6 産生が観察されなかった。GM-CSF は IL-6 の産生を誘導するサイトカインの一つであることが知られていることから、リポソーム添加による IL-6 の産生誘導に関して GM-CSF に注目した。RT-PCR および ELISA により、抗原である OVA と DOTAP/DC-chol 投与群において、IL-6 mRNA およびタンパクレベルでの上昇が観察された。

現在、OVA と DOTAP/DC-chol 投与による IL-6 産生誘導における GM-CSF の関与について、GM-CSF の中和抗体を持ちた実験を進めている。

DOTAP/DC-chol による免疫賦活化機構には未だ不明な点が残るものの、投与方法が非常に簡便かつ安全性が高く、また高い効果も得られたことから、今後感染症に対する簡便で効果的な経鼻投与型ワクチンとして実用化されることを期待したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

Y. Aramaki, N. Iwase, E. Honjo, Y. Negishi, J. Kunisawa, H. Kiyono
IL-6 acts as a key cytokine in the augmentation of mucosal immunity following intranasal administration of antigen with liposomes.

The Third International Conference on Modern Vaccines/Adjuvants Formulation 2010 (2010 年 10 月, カンヌ)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
東京薬科大学 薬学部 薬物送達学教室ホ
ームページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新槇幸彦 (ARAMAKI YUKIHIKO)
東京薬科大学 薬学部・教授
研究者番号：90138959

(2) 研究分担者

根岸洋一 (NEGISHI YOICHI)
東京薬科大学 薬学部・准教授
研究者番号：50286978

(3) 連携研究者

()

研究者番号：