

## 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24年 3月31日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790433

研究課題名（和文）肺サーファクタントによる、副作用リスクのない万能インフルエンザ経鼻ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of a new nasal vaccine effective against many types of influenza that based on pulmonary surfactant.

研究代表者

水野 大（MIZUNO DAI）

徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教

研究者番号：70380061

研究成果の概要（和文）：肺サーファクタント由来の人工粘膜アジュバント SF10 を用いた、経鼻インフルエンザワクチンの開発を行った。ウイルスの変異によってアミノ酸配列が変化しにくいとされる M2 由来のペプチドを合成し、これを抗原として用いた。SF10 は樹状細胞へ M2 ペプチド抗原を取り込ませる作用を有し、これを用いた経鼻ワクチン接種によって粘膜局所および全身における M2 抗原に対する抗体を誘導させることに成功した。

研究成果の概要（英文）：We developed a new vaccine, which was constitute of influeza M2 antigen and SF10 a synthetic adjuvant that mimics pulmonary surfactant. Fluoresceinated M2 delivery to cultured dendritic cells was significantly enhanced by co-administration of SF10. And intranasal immunization of M2-SF10 enhanced local and systemic immune responses, compared with those induced by M2 antigen alone.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：感染防御、ワクチン、肺サーファクタント

## 1. 研究開始当初の背景

現行のインフルエンザワクチン（HA ワクチン）は、皮下あるいは筋肉内に接種され、主に血中抗ウイルス IgG を誘導する。誘導された IgG は主にインフルエンザのヘマグルチニン（HA）を抗原とし、ウイルスの感染を防ぐとされる。しかしながら交差反応性の低い IgG では、極めて高い頻度で起こる HA の変異に対応しきれず、各年の流行株を予測してこれに応じたワクチンを毎年製造する必要がある。近年その効果がウイルスの変異に左

右されないワクチンの研究が進められており、血中 IgG より交差反応性が高いとされる粘膜 IgA を誘導できる経鼻ワクチンなどの粘膜ワクチンが注目されている。また、ウイルスタンパクの中でも M2 のような変異の少ないものを抗原として用いる「万能」インフルエンザワクチンの可能性が示唆されている。しかしながら粘膜組織が抗原を容易に排除してしまうなどの理由で、粘膜ワクチンは十分な免疫感作がなされにくく、また、M2 のような抗原の単独接種では十分に免疫が向

上しないなどの問題が指摘されている。このため、これらのワクチンを臨床に用いるためにはアジュバント添加など何らかの形で免疫増感を行う必要があり、そのための試みが様々になされている。

我々は生体成分肺サーファクタントに経鼻ワクチン増感作用を持つ成分が存在することを見いだした (J Immunol. 176, 1122-30, 2006)。肺サーファクタントの増感作用により、HA 経鼻ワクチンによる血中 IgG 誘導に加え粘膜 IgA 抗体の誘導に成功した (Vaccine. 27, 5620-7, 2009, Vaccine)。現在これを基盤とした人工粘膜アジュバントの開発およびその作用機序解析を行っている。肺サーファクタントの経鼻ワクチン増感作用機序には、1) ワクチンの免疫担当細胞への取込と、2) 経鼻接種されたワクチンの鼻腔組織内における貯留を増進する抗原デリバリー効果があることを明らかとした。さらに、肺サーファクタントの経鼻ワクチン増感作用の必須成分を同定し、これにより、肺サーファクタント様人工粘膜アジュバント (SSF) を作成し (Vaccine. 29, 2011, 5368-78)、さらにこの SSF に増粘剤としてポリマーを加えより強力なワクチン増感を可能とした人工粘膜アジュバント SF10 を開発した。これにより従来なしえなかった、副作用リスクを負わない経鼻ワクチンの増感が可能となった。

## 2. 研究の目的

我々の開発した肺サーファクタント由来人工粘膜アジュバント SF10 を用いた、M2 抗原による万能経鼻インフルエンザワクチンの開発を試みた。従来のインフルエンザ HA ワクチンではなしえなかった、季節性株の変異や鳥型・新型株のパンデミックに対応できる新しいワクチン接種法の提唱につながることを期待される。

抗原として M2 タンパクの抗原エピトープとなりうるアミノ酸配列のペプチドを合成し、これを SF10 と混合した経鼻ワクチンを作成した。SF10 は脂質を主成分とするリポソーム型の抗原ビークルであることが明らかとなっており、SF10 に対してワクチンを効果的に融合させることが必要となる。そこで、抗原ペプチドに脂肪酸アンカーを付与して脂質膜との融合性を高めることにより SF10 に高効率にペプチドを搭載することを試みた。我々の人工アジュバントによる抗原ビークル効果が発揮されているか否かを、抗原の樹状細胞への取り込みを指標として評価した。また、作成された経鼻ワクチンをマウスに接種し、血中および鼻腔粘膜における抗体誘導が上昇するか評価を行った。これらによる季節性インフルエンザ株の変異や、新興株の流行に対応しうる「万能ワクチン」の可能性を示すことを目的とした。

本研究により、インフルエンザ M2 タンパクに対する抗体を血中のみならず粘膜に誘導することのできる経鼻ワクチン接種法を見いだすことができれば、従来型ワクチンの、1) 生産に鶏卵 (有精卵) が必要で生産規模が制限される。2) 誘導された免疫がウイルスの変異によって失われる。といった弱点の克服が可能であると考えられる。我々が見いだした肺サーファクタントによる経鼻ワクチン増感作用は生体成分によるものであり、副作用につながるような応答を示しておらず、これまでになくアレルギーや毒性リスクの低いものと考えられる (J Immunol. 176, 1122-30, 2006, Vaccine. 27, 5620-7, 2009)。これを用いることにより、「安全な万能インフルエンザワクチン」として臨床応用が期待される。

さらに、本研究の成果により SF10 によって、HA ワクチンのような特定のウイルス成分を用いるのではなく、ペプチドによる経鼻ワクチン接種が可能となれば、抗原ペプチドを対象疾患の抗原エピトープに切り替えることで、SF10 を SARS や AIDS などインフルエンザ以外の様々な経粘膜疾患に対するワクチンの増感剤として用いる「万能アジュバント」としての可能性を示すことにもつながる。

## 3. 研究の方法

### 1. 抗原ペプチドの合成と SSF による樹状細胞への抗原取り込み増進作用の評価

M2 抗原のアミノ酸配列より抗原エピトープとなりうる配列として、M2 抗原膜外領域に相当する 24 アミノ酸の配列を持つペプチド (M2e) を抗原ペプチドとして合成を行った。アミノ酸配列の確認はプロテインシーケンサーによって行った。これに加えて、SSF への結合を促すアンカーとしてパルミチン酸を付与した M2e の合成も行った (M2e-PA)。これら抗原ペプチドを蛍光色素で標識し、抗原ペプチドの SSF による効率的なデリバリーの評価を行った。細胞分離精製装置にてマウス骨髄より精製した樹状細胞へ、蛍光標識ペプチドと SSF の混合物を添加し、一定時間後にフローサイトメトリーにより樹状細胞の蛍光強度を測定、これを指標としてワクチンおよび増感剤の取込効果の比較検討を行った。

### 2. モデル動物実験による経鼻ワクチンの有効性の評価

SSF に抗原ペプチドをおよび粘性を高めるためのポリマーを混合した経鼻ワクチン M2e-SF10 あるいは M2e-PA-SF10 を作成、マウスに接種を行った。マウスへの接種は 2 週間隔で 3 回実施し、3 次免疫 2 週間後に鼻腔洗浄液および血清の採取を行った。採取された鼻腔洗浄液中の IgA 及び血中 IgG 抗体価を、

M2e を固相化した ELISA によりそれぞれ評価した。

#### 4. 研究成果

##### 1. 抗原ペプチドの合成と SSF による樹状細胞への抗原取り込み増進作用の評価

肺サーファクタントのアジュバント作用には抗原の抗原提示細胞への取り込み増進が関わっていることを、従来のインフルエンザワクチン (HA) を用いた検討により明らかとしている (Vaccine. 29, 2011, 5368-78)。この HA に対すると同様ペプチド抗原である M2e の抗原提示細胞への取り込みも SSF が増進するか否かを、フローサイトメトリーにより評価した。蛍光標識 M2e と SSF を混合して作製した抗原 M2e-SSF を樹状細胞へ添加し一定時間後の蛍光強度は、M2e のみを添加した時よりも顕著に増加した。M2e-PA を SSF と混合した M2e-PA-SSF を添加した細胞においては、蛍光強度が M2e-SSF を添加した時よりもさらに増加した。M2e-PA のみを添加した細胞においても、M2e を添加した細胞も蛍光強度が増加する傾向があったことから、M2e-PA に付与されたパルミチン酸のアンカーが直接取り込み増進に関わっていることが示唆された。SSF による M2e あるいは M2e-PA の樹状細胞への取り込み増進は、従来の HA 取り込み増進効果と同等レベルに達しており、SSF により M2 抗原による抗体誘導の増感が期待できる経鼻ワクチン作製が行えることが期待された。

##### 2. モデル動物実験による経鼻ワクチンの有効性の評価

SSF を用いて作製された経鼻ワクチンの有効性を、マウスをモデル動物として用いた試験によって評価した。評価は、経鼻ワクチン接種マウスの鼻腔粘膜および血中における抗原ペプチド特異的抗体価によって行った。合成ペプチドである M2e は、ウイルス由来のタンパク抗原であるインフルエンザ不活化ワクチン (HA) よりも抗原性が低く、従来の SSF アジュバントを用いたワクチン接種では効果が得られないことが懸念された。そこで、SSF のデリバリー効果をさらに高めるため増粘剤としてポリマーを混合した新しい人工粘膜アジュバントを作成し、これを用いた経鼻ワクチン接種試験を試みた。抗原に M2e あるいは M2e-PA を用い、SSF と混合後ポリマーを添加したものをそれぞれ M2e-SF10、M2e-PA-SF10 としてこれらをマウスへ経鼻接種した。SSF による高いデリバリー効果を示した M2e-PA-SF10 では M2 特異的な抗体はほとんど誘導されなかった。脂肪酸付与がペプチドの立体構造などを変化させ、抗原性に悪影響を与えた可能性が考えられた。一方 M2e を用いた経鼻ワクチン M2e-SF10 では、M2

抗原特異的な抗体が、鼻腔粘膜および血中の双方に誘導され、M2 ペプチドを用いた経鼻ワクチン開発の可能性が示された。

##### 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 5 件)

1. Mizuno D et al., Surfactant protein C is an essential constituent for mucosal adjuvanticity of Surfacten, acting as an antigen delivery vehicle and inducing both local and systemic immunity. Vaccine. 査読有, 29, 2011, 5368 - 5378. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.090

2. 水野 大, SP-C はサーファクテンによる経鼻ワクチン増感効果の必須成分である. 日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌, 査読無, 41, 2010, 32 - 33. doi: 無し

3. 木戸 博, 経鼻粘膜機能とインフルエンザ感染, 小児内科, 査読無し, 42, 2010, 1541 - 1545. doi: 無し

4. Takahashi E et al., Attenuation of inducible respiratory immune responses by oseltamivir treatment in mice infected with influenza A virus. Microbes Infect. 査読有, 12, 2010, 778 - 783. doi: 10.1016/j.micinf.2010.04.013

5. 木戸 博, 経鼻ワクチンの開発状況, インフルエンザ, 査読無, 11, 2010, 184 - 190. doi: 無し

[学会発表] (計 8 件)

1. 木本貴士, ヒト肺サーファクタント由来 SF-10 アジュバントを用いた経鼻インフルエンザワクチンによる抗体産生細胞の鼻腔内局在と抗体サブタイプの検討, 第 15 回 日本ワクチン学会学術集会, 2011 年 12 月 10 日, 日本教育会館(東京都)

2. 木本貴士, 肺サーファクタント由来人工合成粘膜アジュバント SSF の抗原取込増強機構の解析, 第 47 回 肺サーファクタント界面医学会, 2011 年 10 月 29 日, 徳島大学(徳島県)

3. 水野 大, 肺サーファクタント由来人工合成粘膜アジュバント SF10 の開発と抗体誘導効果の検討, 第 47 回 肺サーファクタント界面医学会, 2011 年 10 月 29 日, 徳島大学(徳島県)

4. 木本貴士, ヒト肺サーファクタント類似合成粘膜アジュバント SF-10 による効果的な生体免疫応答と、抗インフルエンザ特異抗体の誘導機序, 第 84 回 日本生化学会大会, 2011 年 9 月 24 日, 国立京都国際会館(京都府)

5. Mizuno D, Synthetic antigen vehicle SF-10 adjuvant, mimicking human pulmonary surfactant, for effective intranasal flu vaccine International Union of Microbiological Societies

2011, 2011年9月12日, 札幌コンベンションセンター(北海道)

6. 木本貴士, 肺サーファクタント由来 SF-10 アジュバントによる経鼻インフルエンザワクチンの抗体誘導効果. 第14回日本ワクチン学会学術集会, 2010年12月11日, 九段会館(東京)

7. 水野 大, 人工粘膜アジュバント SF10 による経鼻インフルエンザワクチンの局所と全身の抗体誘導効果の検討. 第33回日本分子生物学会年回・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月10日, 神戸ポートアイランド(兵庫)

8. Kimoto T, Synthetic antigen vehicle SF-10 adjuvant, mimicking human pulmonary surfactant, for intranasal flu vaccine. Options for the Control of Influenza VII, 2010年9月3日, Hon Kong SAR (China)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: RSV 粘膜ワクチン。

発明者: 木戸 博, 水野 大, 武井恒知, 上田博嗣, 吉川浩司, 大隅恵介, 山本伸行, 周藤健治

権利者: 国立大学法人徳島大学、株式会社応用酵素医学研究所、アステラス製薬株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2011-185873

出願年月日: 2011年8月29日

国内外の別: 国内

○取得状況(計2件)

名称: 経粘膜及び経皮投与を可能にする抗原薬物ビークル、これを用いる粘膜免疫の誘導方法、粘膜ワクチン及び DDS。

発明者: 木戸 博, 水野 大

権利者: 国立大学法人徳島大学

種類: 特許

番号: 特許第 4843795 号

取得年月日: 2011年10月22日

国内外の別: 国内

名称: 局所粘膜免疫誘導促進用抗原薬物ヴェークル、これを用いる粘膜ワクチン、アレルギーの予防剤又は治療剤、薬物伝達システム、および粘膜免疫の誘導法。

発明者: 木戸 博, 武井恒知, 水野 大

権利者: 国立大学法人徳島大学

種類: 特許

番号: 特許第 10-0992492 号

取得年月日: 2010年11月1日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 大 (MIZUNO DAI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教

研究者番号: 70380061