

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592512

研究課題名(和文) 上気道粘膜免疫誘導機序の解明

研究課題名(英文) Mucosal immunity in the upper respiratory tract

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) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：ガラクトシルセラミド(GalCer)はNKT細胞のリガンドでありNKT細胞を介して樹状細胞を成熟活性化させる作用が有る。NKT細胞と樹状細胞を標的にした免疫療法やワクチンは効果的であると考えGalCerの鼻粘膜免疫応答への効果について検討した。マウスにGalCerを経鼻的に投与し鼻粘膜NKT細胞と樹状細胞について、インフルエンザ菌のP6外膜タンパクとGalCerにて経鼻免疫を行ない抗原特異的免疫応答について解析した。その結果、鼻粘膜のNKT細胞と樹状細胞が増加し経鼻ワクチン免疫後、P6特異的免疫応答が誘導された。NKT細胞と樹状細胞をターゲットにした新しいワクチン療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of alpha-galactosylceramide (aGalCer) as a mucosal adjuvant was examined. Mice were immunized intranasally with nontypeable Haemophilus influenzae (NTHi) P6 protein and a-GalCer. P6-specific antibody responses in the form of P6-specific IgA in nasal washes and serum IgG titers were significantly elevated. Splenic CD4+ T cells expressed P6-specific Th1 and Th2 cytokine mRNA. In addition, NTHi was quantified in nasal washes following NTHi challenges, and the clearance of NTHi from the nasopharynx was also enhanced. These results indicate that aGalCer might be an effective mucosal adjuvant.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：粘膜免疫 樹状細胞 NKT細胞 上気道

1. 研究開始当初の背景

近年、粘膜免疫が注目されており、種々の感染症に対する粘膜ワクチン開発のための研究が進められている。粘膜ワクチンは全身系 IgG とともに粘膜系 IgA を誘導できるという利点があり、粘膜面における病原微生物の侵入防御に効果的であると考えられている。抗原の投与ルートには経口、経鼻、経直腸、経膣などがあるが、経鼻投与により、上気道に抗原特異的免疫応答を最も有効に誘導できることから、上気道感染症に対しては経鼻ワクチンが有効であると考えられている。しかし粘膜ワクチンは多くの場合、死菌ワクチンであり、有効な免疫応答の賦活化のためには適当なアジュバントを必要とする。代表的な粘膜アジュバントであるコレラトキシン (CT) には毒性の問題があり、抗原のみならずアジュバントの選択も粘膜ワクチン開発にとって重要な問題である。我々はこれまでインフルエンザ菌 (nontypeable *Haemophilus influenzae*; NTHi) の菌株共通抗原である P6 外膜蛋白を抗原とし、CT をアジュバントとして経鼻免疫を行なうことで、鼻咽腔のみならず中耳にも P6 特異的免疫応答が誘導され、実験的中耳炎モデルにおいても抑制効果があることを報告している。また最近では CT に代わりうるアジュバントとして CpG DNA を用いて P6 特異的免疫応答を安全かつ有効に誘導しうることを報告している。CpG DNA は toll-like receptor (TLR) 9 のリガンドであり、TLR9 の主な表出細胞は樹状細胞と B 細胞である。樹状細胞は免疫ネットワークを多方面から制御し、免疫応答の誘導や制御において中心的役割を担っているため、このように樹状細胞をターゲットにした免疫療法やワクチンは効果的であると考えられる。当研究グループでは樹状細胞の活性化を目的としたワクチンの研究を進めてきたが、最近、NKT 細胞に注目し、研究を進めた。

2. 研究の目的

NKT 細胞は生体内における頻度は少ないものの生体防御に重要な役割を果たしている。ガラクトシルセラミド (GalCer) は NKT 細胞のリガンドであり、NKT 細胞の活性化により、樹状細胞の活性化と成熟が促進される。NKT 細胞と樹状細胞をターゲットとすることでより強力な生体防御免疫の誘導が期待される。GalCer の粘膜アジュバントとしての有用性、特に経鼻アジュバントとしての免疫誘導メカニズムについてはこれまで十分に検討されていないため、GalCer 投与によって誘導される NKT 細胞と樹状細胞の生体防御免疫のメカニズムについて検討した。

3. 研究の方法

(1) GalCer 投与

6 週齢、雄、SPF の BALB/c マウスをすべての実験に使用した。リコンビナント・マウス GalCer 2 μ g を経鼻的もしくは経腹腔的に投与

した。経鼻投与は GalCer 2 μ g を PBS 8 μ l と混合し、両鼻腔に前鼻孔より 5 μ l ずつ投与した。計 3 回投与後、マウスを屠殺し、上気道における粘膜免疫誘導組織である nasal-associated lymphoid tissue (NALT) を採取し、単核球を分離した。FITC 標識抗マウス CD11c 抗体、PE 標識抗マウス CD11b 抗体、Cy-Chrome 標識抗マウス CD8 α 抗体にて染色し、フローサイトメトリーにて、NKT 細胞、樹状細胞およびそのサブセットについて解析した。

(2) P6 経鼻免疫と特異的免疫応答の誘導

次に GalCer の粘膜アジュバントとしての抗原特異的鼻粘膜免疫応答の誘導効果について検討した。GalCer 2 μ g とインフルエンザ菌の外膜タンパク P6 10 μ g を週 1 回、計 3 回経鼻免疫を行なった。P6 は我々の研究室にてインフルエンザ菌 (NTHi, strain 76) より精製したものを使用した。最終免疫後 1 週間後にマウスを屠殺した。

血清、鼻腔洗浄液を採取し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて P6 特異的抗体価を測定した。また鼻粘膜、脾臓を採取し、単核球を分離し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISPOT) 法にて P6 特異的抗体産生細胞数を測定した。鼻粘膜より CD4⁺ T 細胞を単離し、抗原提示細胞と P6 の存在下に培養し、mRNA を抽出し、特異的サイトカインの発言を RT-PCR にて検討した。

(3) インフルエンザ菌注入

経鼻免疫のワクチン効果についても検討した。上記と同様に GalCer と P6 にて経鼻免疫を行ない、最終免疫後 1 週間後にインフルエンザ菌懸濁液 (NTHi, strain 76, 10¹⁰cfu/ml) 10 μ l を経鼻的にマウス鼻咽腔へ注入した (10⁸cfu/mouse)。細菌注入 24 時間後にマウスを屠殺し、鼻腔洗浄液を採取した。回収したサンプルを適宜希釈し、チョコレート寒天培地に播種した。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養後、インフルエンザ菌のコロニー数を計測し、鼻咽腔インフルエンザ菌の生菌数とした。

4. 研究成果

(1) GalCer 単独経鼻投与の効果

GalCer 単独投与後の鼻粘膜では IgA 産生細胞の増加を認めた。粘膜免疫誘導組織である NALT において樹状細胞および NKT 細胞両者の増加を認めた。この細胞増加は頸部リンパ節では観察されず、樹状細胞と NKT 細胞の細胞間相互作用の場が NALT であることが明らかになった。

(2) GalCer とアジュバントとした経鼻ワクチンによる抗原特異的免疫応答の誘導

GalCer と P6 を経鼻免疫することにより、NALT 中の CD11c⁺ 樹状細胞が頻度、絶対数ともに増加した。また樹状細胞サブセット別に解析すると、興味あることに経鼻投与では CD8 α ⁺ 樹状細胞の増加が優位であった。また樹状細胞上の MHC II の発現も増強した。NKT 細胞のリガンドによる刺激に加え、抗原を加え

ることにより、さらに樹状細胞の成熟・活性化が促進された。またこれまでの経鼻免疫の実験系同様に鼻腔洗浄液中の P6 特異的 IgA ならびの血清中の P6 特異的 IgG が増加したが、これまで種々のアジュバントを用いて検討してきた中でも、免疫誘導効果は最も強かった。鼻粘膜中の P6 特異的 IgA 産生細胞も著明に増加した。CD4⁺ T 細胞によるサイトカイン発現では Th1, Th2 サイトカインの発現が認められた。興味あることに Th17 サイトカインの発現増強も観察された。以上のことから、NKT 細胞と樹状細胞の細胞間相互作用により、T 細胞、B 細胞が活性化され、強力な抗原特異的防御免疫が誘導された。

(3) 経鼻 DNA ワクチンの感染予防効果

インフルエンザ生菌注入後のクリアランスの検討では、経鼻免疫により、鼻腔洗浄液中のインフルエンザ生菌数の有意な減少を認め、鼻咽腔からのインフルエンザ菌のクリアランスが促進された。このことから GalCer と P6 による抗原特異的免疫応答の誘導および上気道炎感染予防におけるワクチン効果があることが明らかとなった。

樹状細胞は免疫応答の誘導において中心的役割を担っているため、樹状細胞をターゲットとすることは戦略上、合理的であると考えられる。我々は粘膜局所での樹状細胞の賦活化という狙いから、これまで CpG DNA をはじめとする種々のアジュバントを用いてその有用性を明らかにしている。これまでは樹状細胞に直接作用し、樹状細胞を活性化するようなアジュバントを用いてきたが、今回は NKT 細胞の免疫細胞としての働きに注目し、NKT 細胞のリガンドである GalCer を用い、NKT 細胞の活性化を通して、樹状細胞を成熟活性化させるようにプロトコールを作成した。その結果、これまでのアジュバントに比べても、非常に強力な抗原特異的免疫応答が誘導された。

樹状細胞のユニークな特性として細胞系統の多様性と機能の可塑性が挙げられる。すなわち樹状細胞はその起源や属性によりミエロイド系とリンパ系に大別され、それぞれ異なる機能を有する。その一方、同一系統の樹状細胞でもその成熟段階や刺激シグナルの種類に応じてその機能は修飾・改変される。粘膜免疫機構は分泌型 IgA 誘導のために全身系とは異なったユニークな特徴を有しているが、樹状細胞についても、粘膜系リンパ組織においては最低 3 種類の異なった成熟樹状細胞サブセットが存在することがわかっている。ミエロイド系である CD11b⁺ 樹状細胞は IL-10 産生制御性 T 細胞 (T_{reg}) を誘導する。リンパ系である CD8α⁺ 樹状細胞は CD4⁺ T 細胞に抗原提示を行なう。これら 2 種類は同一パイエル板内においても存在部位が異なることもわかっている。粘膜系樹状細胞に関してはまだ十分に解析されておらず、研究が進められている段階ではあるが、これら 3 種類の樹状細胞が粘膜免疫に関与し、免疫と寛容とい

う正と負の免疫応答を調節していると考えられている。今回の我々の研究では、NKT 細胞の活性化により、粘膜免疫誘導組織 NALT に誘導される樹状細胞の選択性がある可能性が示唆された。すなわち GalCer と P6 の経鼻ワクチン投与により、CD11c⁺ 樹状細胞の増加を認め、CD8α⁺ 樹状細胞が優位に増加した。このように機能的に異なった樹状細胞サブセットにより特異的免疫応答が誘導されたものと思われた。今後 NKT 細胞が産生するサイトカインについて検討することにより、NKT 細胞と樹状細胞の細胞間相互作用の詳細が明らかになるものと思われる。

樹状細胞活性化により、最終的に T 細胞、B 細胞も活性化され、抗原特異的免疫応答が増幅され、鼻咽腔からのインフルエンザ菌の排除も促進された。インフルエンザ菌に対する感染予防効果についてはこれまで報告されたものの中でも強力であった。分泌型 IgA の誘導には Th1, Th2 サイトカインが重要であり、両者とも粘膜免疫応答においては重要なサイトカインである。加えて、今回は Th17 サイトカインの関与が明らかになった。Th17 細胞の役割を明らかにするために、マウスに対し、抗 IL-17 抗体を経鼻投与し、鼻粘膜中の Th17 細胞をノックダウンした状態でインフルエンザ菌を注入すると、鼻咽腔からの菌の排除効果が悪くなる。したがって Th17 細胞も一連の免疫応答、生体防御免疫において重要な役割を担っていることが明らかとなった。結論として NKT 細胞と樹状細胞を標的とした経鼻ワクチンは新しい免疫療法・ワクチン戦略となりうることを示唆された。

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 10 件)

1. Kawano T, Hirano T, Kodama S, Mitsui MT, Ahmed K, Nishizono A, Suzuki M. Pli play an important role in enhancing the bacterial clearance from the middle ear in a mouse model of acute otitis media with *Moraxella catarrhalis*. Pathog Dis 67: 119-131, 2013. (査読有)

2. Noda K, Hirano T, Noda K, Kodama S, Ichimiya I, Suzuki M. Effect of low-intensity focused ultrasound on the middle ear in a mouse model of acute otitis media. Ultrasound Med Biol 39: 413-423, 2013. (査読有)

3. Kodama S, Hirano T, Noda K, Umemoto S, Suzuki M. Nasal immunization with plasmid DNA encoding P6 protein and immunostimulatory complexes elicits nontypeable *Haemophilus influenzae*-specific long term mucosal

immune responses in the nasopharynx. Vaccine 29: 1881-1890, 2011. (査読有)

4. Kodama S, Abe N, Hirano T, Suzuki M. A single nasal dose of CCL20 chemokine induces dendritic cell recruitment and enhances nontypeable *Haemophilus influenzae*-specific immune responses in the nasal mucosa. Acta Otolaryngol 131: 989-996, 2011. (査読有)

5. Kodama S, Suzuki M. Nasal-associated lymphoid tissue immunity and vaccine development. Adv Otorhinolaryngol 72: 110-112, 2011. (査読有)

6. Noda K, Kodama S, Umemoto S, Nomi N, Hirano T, Suzuki M. Th17 cells contribute to nontypeable *Haemophilus influenzae*-specific protective immunity induced by nasal vaccination with P6 outer membrane protein and a-galactosylceramide. Microbiol Immunol 55: 584-581, 2011. (査読有)

7. Hirano T, Kodama S, Kawano T, Maeda K, Suzuki M. Monophosphoryl lipid A induced innate immune responses via TLR4 to enhance clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from the nasopharynx in mice. FEMS immunol Med Microbiol 63: 407-417, 2011. (査読有)

8. Noda K, Kodama S, Umemoto S, Nomi N, Hirano T, Suzuki M. Th17 cells contribute to nontypeable *Haemophilus influenzae*-specific protective immunity induced by nasal vaccination with P6 outer membrane protein and a-galactosylceramide. Microbiol Immunol 55: 584-581, 2011. (査読有)

9. Hirano T, Kodama S, Kawano T, Maeda K, Suzuki M. Monophosphoryl lipid A induced innate immune responses via TLR4 to enhance clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from the nasopharynx in mice. FEMS immunol Med Microbiol 63: 407-417, 2011. (査読有)

10. Okamoto T, Kodama S, Nomi N, Umemoto S, Suzuki M. Expression of bone morphogenic protein in sinonasal inverted papilloma with new bone formation. Allergy Rhinol 2: 16-20, 2011. (査読有)

[学会発表](計1件)

1. Kodama S, Suzuki M. Vaccination in

otitis media. 20th IFOS (第20回世界耳鼻咽喉科学会). Seoul, June 1, 2013.

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.oita-u.ac.jp/ent/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
鈴木 正志 (SUZUKI MASASI)
大分大学・医学部・教授
研究者番号: 60211314

(2)研究分担者
平野 隆 (HIRANO TAKASHI)
大分大学・医学部・講師
研究者番号: 20305056

(3)連携研究者 ()

研究者番号: