

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592513

研究課題名(和文) 鼻粘膜樹状細胞を標的とした経鼻ワクチンの開発

研究課題名(英文) Dendritic cell-targeted nasal vaccine development

研究代表者

児玉 悟 (KODAMA, SATORU)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：40325717

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)：DNAワクチンは、樹状細胞に取り込まれ、特異的免疫応答を誘導することがわかっている。DNAワクチンの鼻粘膜樹状細胞、および鼻粘膜免疫応答への効果について検討した。インフルエンザ菌のP6外膜タンパクとコードするDNAをDNAプラスミドに組み込み、DNAワクチンを作成した。マウスに対しこのDNAワクチンを経鼻的に投与し、抗原特異的免疫応答について解析した。経鼻免疫後、P6特異的免疫応答が誘導され、鼻咽腔からのインフルエンザ菌も排除された。以上のことからDNAワクチンによる樹状細胞をターゲットにした新しい免疫療法・ワクチンの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells (DCs) are essential for the induction of antigen (Ag)-specific immune responses, DC-targeted vaccination might be an effective strategy for the induction of the specific immune responses. A DNA plasmid encoding the P6 outer membrane protein of nontypeable Haemophilus influenzae (NTHi) was constructed. Mice were immunized 3 times intranasally with the DNA plasmid and Matrix-M, an immunostimulatory complex adjuvant. P6-specific nasal wash IgA and serum IgG were elevated following immunization with the DNA plasmid and Matrix-M. The number of specific IgA-producing cells increased in the nasal passages of the immunized mice. Moreover, DNA vaccination enhanced bacterial clearance. These findings suggest that a successful DNA vaccination protocol has been developed. Nasal vaccination with P6 DNA vaccine and Matrix-M might be a new effective regimen for the induction of specific protective immunity in the upper respiratory tract.

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：樹状細胞 上気道 粘膜免疫 経鼻ワクチン

## 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。

## 2. 研究の目的

DNA ワクチンは新しいワクチンである。P6 をベースとした経鼻 DNA ワクチンはこれまでなかったため、DNA ワクチンの鼻粘膜樹状細胞および抗原特異的鼻粘膜免疫応答への効果について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA ワクチンの作成

インフルエンザ菌の P6 外膜タンパクの T 細胞 B 細胞エピトープをコードする DNA を DNA プラスミドに組み込み、DNA ワクチンを作成した。プラスミド DNA を PCR にて増幅し、P6 DNA が組み込まれていることを確認した。

実験動物として 6 週齢、雄、SPF の BALB/c マウスをすべての実験に使用した。DNA ワクチン 100 $\mu$ g をワクチンデリバリーシステムとして ISCOM (Immunostimulatory complex) 10 $\mu$ g と混合し、経鼻的に計 3 回投与した。7 日後にマウスを屠殺し、鼻腔洗浄液を採取した。また上気道における粘膜免疫誘導組織である nasal-associated lymphoid tissue (NALT) と鼻粘膜を採取し、単核球を分離した。

上記検体よりタンパクを抽出し、ウェスタンブロット法にて P6 タンパクの発現を確認した。

### (2) DNA ワクチンによる特異的免疫応答の誘導

P6 をコードする DNA ワクチンによる P6 特異的鼻粘膜免疫応答の誘導について検討した。前述のように DNA ワクチンと ISCOM を経鼻的に週 1 回、計 3 回投与した。最終免疫後 1 週間目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。

また NALT 単核球を 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 $\alpha$  抗体にて染色し、フローサイトメトリーにて樹状細胞数およびそのサブセットについて解析した。

### (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 DNA ワクチンにて経鼻免疫を行ない、最終免疫後 1 週間目にインフルエンザ生菌懸濁液 (NTHi, strain 76, 10<sup>10</sup>cfu/ml) 10 $\mu$ l を経鼻的にマウス鼻咽腔へ注入した (10<sup>8</sup>cfu/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% CO<sub>2</sub> 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) 鼻粘膜における P6 タンパクの発現

P6 をコードする DNA ワクチンの経鼻的投与により鼻粘膜での P6 タンパクの発現が確認された。

### (2) 経鼻 DNA ワクチンによる抗原特異的免疫応答の誘導

経鼻 DNA ワクチン投与により NALT 中の CD11c<sup>+</sup>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 $\alpha$ <sup>+</sup>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。

経鼻 DNA ワクチン投与により鼻腔洗浄液中の P6 特異的 IgA ならびの血清中の P6 特異的 IgG が増加した。ISCOM なしのプラスミド単独経鼻投与でも特異的免疫応答は検出されたものの、そのレベルは極めて低かった。また経鼻 DNA ワクチン投与によって鼻粘膜中の P6 特異的 IgA 産生細胞の増加も認められた。

### (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 DNA ワクチン投与により、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。このことから経鼻 DNA ワクチン投与による抗原特異的免疫応答の誘導および上気道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 を経鼻アジュバントに使用し、抗原特異的免疫応答を誘導し、その有用性を明らかにしている。今回は新しい形のワクチンとして DNA ワクチンによる免疫応答の誘導を試みた。ワクチンデリバリーシステムとして ISCOM を経鼻免疫に応用した。経鼻 DNA ワクチン投与により、鼻粘膜中での P6 タンパクの発現が確認された。このことは DNA ワクチンが生体細胞、抗原提示細胞に取り込まれ、宿主の翻訳システムで DNA から mRNA、そしてタンパクが合成されたことを意味している。NALT の樹状細胞が増加し、MHC II の発現が増強したことより、経鼻 DNA ワクチン投与により、樹状細胞が活性化され、さらに効率的に抗原提示および免疫誘導を行なっていることが示唆された。樹状細胞活性化により、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。経鼻 DNA ワクチンによる P6 特異的免疫応答の誘導および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ていない。以上のことから、経鼻 DNA 投与は樹状細胞を介した上気道粘膜免疫の賦活化に有用であり、複数の抗原を組み合わせることでより効率的な上気道炎に関連した病原体特異的免疫応答の誘導が可能になるものと思われる。今後の粘膜ワクチン開発において、DNA ワクチンは 1 つの武器になると思われる。

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 (lineage heterogeneity)。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 (functional plasticity)。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 種類の異なる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。これらサブセットは CD11c、CD8 $\alpha$ 、CD11b といった表面抗原の違いによりミエロイド系 (CD11c<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>)、リンパ系 (CD11c<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>)、DN 系 (double negative; CD11c<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>) に分類される。ミエロイド系である CD11b<sup>+</sup> 樹状細胞は IL-10 産生制御性 T 細胞 (T<sub>reg</sub>) を誘導する。リンパ系である CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> 樹状

細胞は CD4<sup>+</sup> 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、経鼻 DNA ワクチン投与では、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。すなわち経鼻 DNA ワクチン投与により、CD11c<sup>+</sup> 樹状細胞の増加を認め、CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> 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経鼻 DNA ワクチン投与後の特異的免疫応答が誘導されたものと思われた。結論として、経鼻 DNA ワクチンは樹状細胞をターゲットにした新しい免疫療法・ワクチン療法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 11 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. 児玉悟. 経鼻ワクチンによる免疫誘導. 日本鼻科学会誌 51: 58-59, 2012. (査読無)
4. 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)
5. 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)

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

7. 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  $\alpha$ -galactosylceramide. *Microbiol Immunol* 55: 584-581, 2011. (査読有)

8. 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)

9. 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  $\alpha$ -galactosylceramide. *Microbiol Immunol* 55: 584-581, 2011. (査読有)

10. 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)

11. 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2件)

1. Kodama S. Vaccination in otitis media. Keynote lecture, 20th IFOS (第20回世界耳鼻咽喉科学会. 基調講演). Seoul, June 1, 2013.

2. 児玉悟. 経鼻ワクチンによる免疫誘導. 第18回日本鼻科学会鼻科学会賞受賞講演. 第50回日本鼻科学会. 岡山. 12月2日 2011年

〔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

児玉 悟 (KODAMA SATORU)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：40325717

(2)研究分担者

鈴木 正志 (SUZUKI MASASHI)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：60211314

能美 希 (NOMI NOZOMI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40468020

(3)連携研究者

( )

研究者番号：