

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670514

研究課題名（和文）新生児の自然免疫応答の解明を基盤としたRSウイルス経鼻ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of Nasal Vaccine against RS virus based on neonatal innate immunity

## 研究代表者

齊藤 三佳（Saito, Mika）

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：40419700

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：RSV蛋白に対する新生児および成人の免疫応答は弱く、効果的なRSVワクチンの開発にはアジュバントが必要である。出芽酵母の細胞壁成分であるZymosanは、TLR2/TLR6ヘテロ二量体に対するリガンドであるが、成人と同等の自然免疫応答を臍帯血の免疫担当細胞に惹起できることから、新生児・乳児のRSV感染症に対する経鼻ワクチンのアジュバントとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Adjuvant is necessary for the development of vaccine against RSV, because the immune response against recombinant RSV protein is weak in neonates and adults. Zymosan, a cell wall extract from *Saccharomyces cerevisiae*, gave comparable innate immune response via TLR2/TLR6 heterodimer in the immune cells of cord blood and adult blood, thus may be useful as a nasal vaccine adjuvant against RSV in neonates and infants.

研究分野：新生児

キーワード：ワクチン アジュバント 新生児 自然免疫 RSウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

RSV は乳幼児の重要な呼吸器感染症ウイルスであり、世界中で年間 6400 万人が罹患し、340 万人が入院している。1960 年代に不活化注射ワクチンが開発されたが、ワクチンによる重篤な合併症のため使用できなくなり、それ以降実用化されたワクチンはない。一方、ワクチンのかわりにモノクローナル抗体製剤が開発され、未熟児などのハイリスク児における RSV 感染症の重篤化予防策がとられたが、抗体製剤の適応外の乳児も重篤な RSV 感染症を呈するため、全ての乳幼児をワクチンで予防することが理にかなっており、安全かつ効果的なワクチンの開発が必要である。RSV ワクチンは新生児・乳児期からの接種が望ましいが、新生児・乳児は成人と比較してワクチンによる免疫誘導効果が低く、Toll-like receptor (TLR) を中心とする自然免疫応答の未熟性が示唆される。また、1960 年代に開発され重篤な合併症を呈した不活化注射ワクチンは、Th2 型サイトカインを介した好酸球の活性化が RSV 自然感染による呼吸器疾患を増悪させた一因と考えられ、TLR を介した自然免疫応答が不十分であったことが原因と考えられ、効果的な自然免疫応答を惹起できる RSV ワクチンが必要とされている。

## 2. 研究の目的

本研究では、新生児免疫を反映する臍帯血中の免疫担当細胞の自然免疫能を TLR を中心に解析し、それらの知見を基盤として RSV 抗原に対して新生児の自然免疫を賦活できるアジュバントを利用した経鼻ワクチンを開発する。そのために、(1) RSV 抗原に対する成人と新生児の自然免疫応答の探索、(2) 母体が新生児の自然免疫に及ぼす影響の解明、(3) 新生児の自然免疫応答を効果的に賦活する TLR リガンドの探索、を行った。

## 3. 研究の方法

(1) RSV 抗原に対する成人と新生児の自然免疫応答の検索：

RSV のリコンビナント蛋白をワクチン抗原として用いることを想定し、同リコンビナント蛋白に対する単球の免疫応答を解析した。予定帝王切開 3 例から臍帯血を採取し、対照群として健常成人 3 名から末梢血を採取し、リンパ球分離液を用いて単核球を回収した後、磁気細胞分離法により単球を分離した。RSV リコンビナント蛋白は酵母由来のものをを用いた(大腸菌由来の蛋白は LPS を含有しているため、過剰に自然免疫を賦活化するため)。単球  $1 \times 10^6$  個に対して RSV 蛋白を 100ng/mL、1000ng/mL 添加し、12 時間、24 時間、48 時間、72 時間の培養後の上清後のサイトカイン(Interleukin [IL]-8, IL-6, IL-1 $\beta$ ,

IL-10, tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ , IL12p70) を測定した。

(2) 母体が新生児の自然免疫に及ぼす影響の解明：

妊娠中の合併症、特に糖代謝異常が児の自然免疫応答に与える影響を TLR に焦点を置いて検討した。糖尿病合併もしくは妊娠中に糖代謝異常を指摘された母体群(DM 群; n=8) および糖代謝異常のない母体群(コントロール群; n=7)の妊娠 36 週以降の分娩後に臍帯血を採取した。臍帯血から単核球を分離した後、抗 CD14 抗体磁気ビーズを用いて単球を分離し、単球に LPS (TLR4 リガンド), Flagellin (TLR5 リガンド), Pam3CSK4 (TLR1/2 リガンド), Zymosan (TLR2/6 リガンド), Macrophage-activating lipopeptide (MALP; TLR2/6 リガンド)を加えて 37 インキュベーターで 12 時間培養した後、培養上清を回収し、上清中のサイトカイン(Interleukin [IL]-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ , IL12p70)を測定した。

(2) 新生児の自然免疫応答を効果的に賦活する TLR リガンドの探索：

予定帝王切開 20 例から臍帯血を採取し、対照群として健常成人 19 名から末梢血を採取した。リンパ球分離液を用いて単核球を回収した後、磁気細胞分離法により単球を分離した。同様に磁気細胞分離法を用いて樹状細胞(DC)を分離した。単球の一部は IL-4 と GM-CSF を添加して約 6 日間培養し DC (MoDC)へ分化させた。単球、DC、あるいは MoDC を含んだ培地に LPS、Pam3CSK4、Flagellin、Zymosan、CpG、Poly(I:C)あるいは Imiquimod を添加し、12 時間後の培養上清中のサイトカイン (IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10)濃度を測定した。

## 4. 研究成果

(1) RSV 蛋白に対する成人と新生児の免疫応答はいずれも弱く、48 時間および 72 時間培養後の上清において IL-8 の有意な上昇がコントロールよりも認められたものの、それ以外のサイトカインの有意な上昇はみられなかった。以上から、RSV リコンビナント蛋白単独による RSV ワクチンの開発は望ましくなく、アジュバントの添加が必要ながわかった。

(2) 母体に関する 2 群間比較では、DM 群はコントロール群に比べ有意に BMI 値が高値であった。新生児に関する 2 群比較では、DM 群とコントロール群の間に有意な差は認めなかった。Pam3csk4 による刺激では、DM 群はコントロール群よりも高い IL-8 産生および TNF- $\alpha$  産生を示した。同様に、flagellin による刺激では DM 群はコントロール群よりも高い IL-8 産生を示した。LPS・zymosan・MALP による刺激では、両群間のサイトカイ

ン産生に有意な差を認めなかった。以上の結果から、妊娠中の糖代謝異常は、児の単球における TLR5 及び TLR1/2 を介した自然免疫応答を活性化することがわかった。TLR5 と TLR1/2 は新生児期の敗血症や髄膜炎の代表的な原因である大腸菌や *L. monocytogenes* に対する免疫応答に関与することが知られていることから、過剰な免疫応答は、それらの病原微生物による症状増悪に関与していることも示唆された。

(3) LPS, Pam3CSK4, flagellin, Poly(I:C) で刺激した場合、単球は成人よりも臍帯血群で低い炎症性サイトカイン産生を示したが、DC では両群に差はなく、MoDC は臍帯血群が成人よりも高い炎症性サイトカイン産生を示した。CpG と Imiquimod で刺激した場合、DC は成人と臍帯血群で炎症性サイトカイン産生に差はなく、単球と MoDC は成人と臍帯血の両群で有意な炎症性サイトカイン産生を認めなかった。一方、Zymosan で刺激した場合、単球・DC・MoDC における炎症性サイトカイン産生は成人と臍帯血の両群において差を認めなかった。MoDC は炎症時に単球から分化して組織中に出現すると考えられており、ワクチン接種後の副反応に関わる可能性が考えられる。そのため、新生児における MoDC の免疫応答は成人と比較して高いことは望ましくないと推測される。以上の結果から、出芽酵母の細胞壁成分である Zymosan は、成人と同等の自然免疫応答を臍帯血の免疫担当細胞に惹起でき、RSV に対する新生児・乳児のワクチンのアジュバントとして有用である可能性が示唆された。

#### 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 3 件)

1. Akitoshi Tsuruhara, Kazuyoshi Aso, Daisuke Tokuhara, Junichiro Ohori, Masaki Kawabata, Yuichi Kurono, Jerry R McGhee, Kohtaro Fujihashi. Rejuvenation of mucosal immunosenescence by adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *International Immunology*. 査読有 2016;29:5-10.
2. Sakika Yanai, Daisuke Tokuhara, Daisuke Tachibana, Mika Saito, Yuko Sakashita, Haruo Shintaku, Masayasu Koyama. Diabetic pregnancy activates the innate immune response through TLR5 or TLR1/2 on neonatal monocyte. *Journal of Reproductive Immunology*. 査読有 2016;117:17-23.
3. Kyoko Nohmi, Daisuke Tokuhara, Daisuke Tachibana, Mika Saito, Yuko Sakashita, Akemi Nakano, Hiroyuki Terada, Hiroko Yamamoto, Masayasu Koyama, Haruo

Shintaku. Zymosan Induces Immune Responses comparable with those of adults in Monocytes, dendritic cell, and Monocyte-derived dendritic cells from cord blood. *Journal of Pediatrics*. 査読有 2015;167:155-162.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Sakika Yanai, Daisuke Tokuhara, Daisuke Tachibana, Mika Saito, Haruo Shintaku, Masayasu Koyama. Diabetes mellitus in pregnancy activates the innate immune response on neonatal monocyte. The 9<sup>th</sup> International Symposium on Diabetes, Hypertension, Metabolic Syndrome and Pregnancy. 2017, Mar, 8-12, Barcelona, Spain.
2. Daisuke Tokuhara, Sakika Yanai, Daisuke Tachibana, Mika Saito, Yuki Cho, Masayasu Koyama, Haruo Shintaku. Diabetic pregnancy activates innate immune response through TLR5 or TLR1/2 on cord blood-derived monocytes. 6th International Congress of UENPS. 2016, Nov, 23-25, 2016, Valencia, Spain.
3. Yuki Cho, Daisuke Tokuhara, Kyoko Nohmi, Mika Saito, Daisuke Tachibana, Masayasu Koyama, Haruo Shintaku. TLR2/TLR6 heterodimer-mediated innate immune response in cord blood immune cells. 6th International Congress of UENPS. 2016, Nov, 23-25, 2016, Valencia, Spain.
4. 柳井咲花 徳原大介 橘大輔 斎藤三佳, 新宅治夫, 古山将康. 妊娠中の糖代謝異常は新生児における過剰な自然免疫応答を惹起する. 第 119 回日本小児科学会学術集会. 2016 年 5 月 13-15 日. ロイトン札幌(北海道札幌市)
5. 能見恭子, 徳原大介, 斎藤三佳, 新宅治夫. 臍帯血由来免疫細胞の自然免疫機構を基盤とした、乳幼児の消化管感染症に対するワクチンアジュバント開発. 第 42 回日本小児栄養消化器肝臓学会. 2015 年 10 月 16 日~18 日. 広島国際会議場(広島県広島市)
6. Tokuhara Daisuke, Nohmi Kyoko, Saito Mika, Shintaku Haruo. Zymosan but not other TLR agonists, induces immune responses comparable to those of adults in monocytes, DCs, and monocyte-derived DCs of neonates. European Academy of Paediatrics Congress and Mastercourse 2015. 17-20 September. 2015. Oslo, Norway
7. Nohmi Kyoko, Tokuhara Daisuke, Saito Mika, Shintaku Haruo. Zymosan induces innate immune responses in neonates comparable to adults. Asian Society for Pediatric Research 2015. Apr 15-18, 2015. Osaka, Japan

8. 能見恭子、徳原大介、齊藤三佳、新宅治夫 .TLR2 リガンドは成人と同等の自然免疫応答を新生児に誘導する . 第 118 回日本小児科学会 . 2015 年 4 月 17 日 ~4 月 19 日 . 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
9. 能見恭子、徳原大介、齊藤三佳、新宅治夫 .ヒト臍帯血細胞を用いた新生児の自然免疫機構の解明 : TLR2 リガンドは成人と同等の自然免疫応答を新生児に誘導しうる . 第 59 回日本未熟児新生児学会 . 2014 年 11 月 10 日 ~12 日 . ひめぎんホール (愛媛県松山市)
10. Tokuhara Daisuke, Nohmi Kyoko, Saito Mika, Shintaku Haruo. Zymosan but not LPS, Pam3CSK4, or flagellin induces immune responses in monocytes, DCs, and monocyte-derived DCs of neonates comparable to those of adults. The 5th Congress of the European Academy of Paediatric Societies. October 17-21, 2014, Barcelona, Spain.

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齊藤 三佳 (SAITO, Mika)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 40419700

### (2) 研究分担者

徳原 大介 (TOKUHARA, Daisuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号 : 60448751

### (3) 連携研究者 なし