

結核ワクチンにおける粘膜免疫応答の解析

研究分担者	國澤 純	（独）医薬基盤研究所	プロジェクトリーダー
研究協力者	長竹貴広	同上	研究員
	鈴木英彦	同上	プロジェクト研究員

研究要旨

本研究では、ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス（hPIV2）に結核菌抗原 Ag85B を発現させた粘膜免疫誘導型新規結核ワクチン（rhPIV2-Ag85 ワクチン）の開発に関し、粘膜免疫学的な観点から免疫誘導メカニズムの解析と安全性の評価を行う。本事業の2年目である平成26年度は上記の目標達成に向け、hPIV2 感染における免疫応答を免疫組織学的解析、フローサイトメトリー解析により検討した。その結果、hPIV2 の感染により誘導性気管支関連リンパ組織（iBALT）が発達することが見いだされた。さらに、hPIV2 感染は鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）に対して強力な胚中心反応や免疫担当細胞数の増加を誘導した。また、rhPIV2-Ag85B ワクチンの経気管的な投与は経鼻的な投与に比べて脾臓での胚中心反応の誘導に優れていた。一方、経鼻的な投与はNALTでの肺中心反応の誘導により優れ、鼻粘膜、肺におけるT細胞数を顕著に増加させることがわかった。

A. 研究目的

多くの病原微生物の侵入門戸となっている粘膜組織には、多種多様な免疫担当細胞から構成される粘膜免疫システムが構築されており、生体防御の中核的役割を担っている。これら粘膜免疫システムの有する生体防御機能を応用した粘膜ワクチンが実用化されるようになってきた。粘膜ワクチンは、抗原を”吸わせる、飲ませる“といった方法により接種するワクチンで、すでに日本国内においても、ロタウイルスに対する2種類のワクチンが経口ワクチンとして上市されている。全身免疫系にのみ免疫応答を誘導できる従来の注射によるワクチン接種とは異なり、粘膜ワクチンは粘膜免疫と全身系免疫の両部位に免疫応答を誘導できることから、粘膜組織を初発感染部位とする病原体に対する優れたワクチンとして絶大な効果を発揮すると期待されている。

上述のように徐々に実用化のステージに入ってきている粘膜ワクチンであるが、呼吸器疾患である結核においても粘膜ワクチンの開発が期待されている。結核は世界の3大感染症の一つであ

り、日本国内でも年間2万人以上の方が罹患している。すでに使用されている結核ワクチンとしてBCGが存在するが、肺結核の主要な感染患者である成人に対して明確な予防効果は認められていないことから、新規ワクチン、特に肺結核を防御するための粘膜ワクチンの開発が必要急務とされている。

本事業においては、これまでに研究代表者である保富がマウスを用いた解析から経鼻結核ワクチンとしての有効性を示している結核菌抗原 Ag85B 発現ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス（hPIV2）（rhPIV2-Ag85 ワクチン）について、研究分担者の國澤がこれまでに蓄積してきた粘膜免疫に関する知的・技術基盤を用い、rhPIV2-Ag85 ワクチンの粘膜免疫誘導メカニズムの解明と安全性の評価を行う

B. 研究方法

B-1. rhPIV2-GFP 感染、フローサイトメトリー解析、免疫組織学的解析

8週齢の C57BL/6J マウスをイソフルランに

より麻酔し、rhPIV2-GFPをDay (D) 0, D7の2回経鼻的に投与した (1×10^8 TCID50/50 μ L/mouse)。D24にマウスを解剖し、NALT、肺、脾臓を採取しフローサイトメトリー解析 (NALT、右肺、脾臓) と免疫組織学的解析 (左肺) を行った。

フローサイトメトリー解析のための染色においては、Fc blockにて非特異的結合を阻害した回収細胞を蛍光標識した各抗体と反応させた。生細胞と死細胞はViaprobeにより識別した。

免疫組織学的解析においては、左肺を採取し氷上にて冷却したPBSで洗浄後、OCT compoundに包埋し液体窒素により凍結サンプルを得た。これをクリオスタットにより切片を作製し (6μ m)、2% NCS-PBSでブロッキング後、精製一次抗体、続いて蛍光標識二次抗体と反応させた。核はDAPIにより染色した。

B-2. rhPIV2-Ag85Bの経鼻投与と経気管投与

8週齢のC57BL/6Jマウスをペントバルビタールにより麻酔し、rhPIV2-Ag85BをD0, D7の2回経鼻的あるいは経気管的に投与した (1×10^8 TCID50/50 μ L/mouse)。D14にマウスを解剖し、NALT、鼻粘膜、肺、脾臓を採取しフローサイトメトリー解析を行った。

(倫理面への配慮)

各処置を麻酔下で実施し、頸椎脱臼による安楽死を実施した。

C. 研究結果

C-1. hPIV2感染によるiBALT形成と呼吸器関連粘膜リンパ組織で観察される免疫応答

rhPIV2-GFPの経鼻投与後、肺を免疫組織学的解析に供したところ、B細胞やT細胞、樹状細胞の集積が認められた (図1)。免疫細胞群のこのような集積はrhPIV2-GFPを投与していないマウスの肺では認められなかった (図1)。またフローサイトメトリー解析によって、rhPIV2-GFPを感染させたマウスの肺では胚中心反応が誘導され、T

細胞や樹状細胞の数が増加していることが示された (図2)。これらの免疫応答は上気道での免疫誘導組織として知られるNALTにおいても認められた (図2)。以上の結果は、rhPIV2-GFPの感染によりiBALTの形成が誘導されること、また、NALTやiBALTが呼吸器関連免疫誘導組織としてrhPIV2-Ag85Bワクチンの免疫誘導メカニズムの一端を担っている可能性を示唆していると考えられる。

C-2. rhPIV2-Ag85Bワクチンの投与経路による免疫応答の違い

rhPIV2-Ag85Bワクチンを経気管的に投与し下気道をメインに作用させた場合と経鼻的に投与し上気道と下気道の両部位に作用させた場合とを比べると、経気管的な投与が脾臓での胚中心反応の誘導に優れていることがわかった (図3)。一方、経鼻的な投与により上気道と下気道の両部位に作用させた場合にはNALTや肺での胚中心反応の誘導に優れていた (図3)。さらに、経鼻的な投与は経気管的な投与に比べてNALTや鼻粘膜、肺でのT細胞の数をより増加させることがわかった (図4)。

D. 考察

本研究においては、粘膜ワクチンにおいて免疫誘導の中核となる粘膜リンパ組織に焦点を当てた研究を遂行した。今回の研究結果から、上気道に発達するNALT (ヒトではワルダイエル扁桃輪を構成する咽頭扁桃に相当すると考えられている) と、感染により誘導される下気道のiBALTはrhPIV2-Ag85Bワクチンの免疫誘導メカニズムに重要な役割を担う可能性が示唆された。

iBALTはインフルエンザ感染や喘息などの慢性炎症反応に伴って形成が誘導される三次リンパ組織として知られ、下気道での免疫誘導組織として機能することが考えられている。今回、hPIV2感染によりiBALT形成が誘導されることが示された。さらに、NALTにおいても胚中心反応をはじめとする免疫応答が認められたことから、これら呼

吸器関連粘膜リンパ組織が rhPIV2-Ag85B ワクチンの免疫誘導メカニズムの一端を担っている可能性が高い。今後はこれらのリンパ節を形成する分子群の同定やその機能抑制に伴う免疫応答を解析することで、rhPIV2-Ag85B ワクチンの免疫誘導メカニズムが解明されるものと期待できる。

本研究における麻酔下での経鼻的な投与プロトコールは上気道と下気道の両呼吸器粘膜に作用する系である。一方、経気管的な投与の場合には下気道が直接的な感作の場と考えられる。これら2つの投与経路の比較により、経気管的な投与は全身性の免疫応答に優れる一方、経鼻的な投与は呼吸器粘膜での応答に優れていることが示唆された。上気道と下気道ではたらく免疫システムがそれぞれユニークな機能を発揮する可能性があり、今後その詳細を明らかにすることで rhPIV2-Ag85B ワクチンの効果を最大限に発揮するための基礎的な知見が得られることが期待される。

E . 結論

hPIV2 感染により iBALT の組織形成が誘導された。rhPIV2-Ag85B ワクチンの経気管的な投与は全身性の免疫応答に、経鼻的な投与は呼吸器粘膜での免疫応答により優れていることが示唆された。

F . 健康危険情報

総括、研究報告書にまとめて記入

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1 J. Kunisawa*, M. Arita, T. Hayasaka, T. Harada, R. Iwamoto, R. Nagasawa, S. Shikata, T. Nagatake, H. Suzuki, E. Hashimoto, Y. Kurashima, Y. Suzuki, H. Arai, M. Setou, and H. Kiyono, Dietary 3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to

17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut. *Sci Rep* (2015, in press)

- 2 Y. Kurashima, H. Kiyono, and J. Kunisawa*, Pathophysiological role of extracellular purinergic mediators in the control of intestinal inflammation, *Mediators of Inflammation* (2015, in press)
- 3 J. Kunisawa* and H. Kiyono, Vitamins mediate immunological homeostasis and diseases at the surface of the body, *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* (2015, in press)
- 4 Y. Goto, T. Obata, J. Kunisawa, S. Sato, I. I. Ivanov, A. Lamichhane, N. Takeyama, M. Kamioka, M. Sakamoto, T. Matsuki, H. Setoyama, A. Imaoka, S. Uematsu, S. Akira, S. E. Domino, P. Kulig, B. Becher, J. Renauld, C. Sasakawa, Y. Umesaki, Y. Benno, and H. Kiyono, Innate lymphoid cells govern intestinal epithelial fucosylation, *Science* 345(6202): 1254009, 2014
- 5 A. Sato, A. Suwanto, M. Okabe, S. Sato, T. Nochi, T. Imai, N. Koyanagi, J. Kunisawa, Y. Kawaguchi, and H. Kiyono, Vaginal memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for protective T cell recruitment and prevention of genital HSV-2 disease, *J Virol* 88(23):13699-13708,2014
- 6 J. Kunisawa*, E. Hashimoto, A. Inoue, R. Nagasawa, Y. Suzuki, I. Ishikawa, S. Shikata, M. Arita, J. Aoki, and H. Kiyono, Regulation of intestinal IgA responses by dietary palmitic acid and its metabolism, *J Immunol* 193: 1666-1671, 2014

- 7 Y. Kurashima, T. Amiya, K. Fujisawa, N. Shibata, Y. Suzuki, Y. Kogure, E. Hashimoto, A. Otsuka, K. Kabashima, S. Sato, T. Sato, M. Kubo, S. Akira, K. Miyake, Jun Kunisawa*, and H. Kiyono, The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis, *Immunity* 40:530-41, 2014
- 8 長竹貴広、國澤純 腸管組織における多元的免疫制御システムと食物アレルギー **医学のあゆみ** (印刷中)
- 9 鈴木英彦、國澤純 粘膜免疫の特異性に着目したワクチンマテリアルの開発 **感染・炎症・免疫** (印刷中)
- 10 鈴木英彦、國澤純 CD11b 陽性 IgA 産生細胞の誘導と機能 **臨床免疫・アレルギー科** 62: 552-556, 2014
- 11 倉島洋介、佐藤健、清野宏、國澤純 DAMPs によるマスト細胞の活性化と疾患 **臨床免疫・アレルギー科** 62: 675-679, 2014
- 12 長竹貴広、國澤純 脂質を介した腸管免疫システムの制御 **医学のあゆみ** 248, 1019-1024, 2014
- 13 鈴木英彦、國澤純 粘膜免疫システムの多面的機能を応用したワクチン開発の現状と未来 The Frontiers in Life Sciences 「生命科学からの創薬へのイノベーション」 57-62, 2014
- 14 鈴木英彦、近藤昌夫、八木清仁、清野宏、國澤純 微生物の有する粘膜組織指向性を用いた粘膜ワクチンデリバリー開発への展望 **薬学雑誌** 134, 629-634, 2014
- 15 近藤昌夫、國澤純 上皮細胞を標的とした創薬研究の新展開 **薬学雑誌** 134, 613, 2014
- 16 高里良宏、倉島洋介、清野宏、國澤純 抑制型免疫システムを応用した次世代型抗アレルギーワクチンの開発 *Bioindustry* 6, 55-60, 2014
2. 学会発表
1. 國澤純、粘膜免疫のユニーク性を標的としたワクチンの開発の最前線 **日本薬学会第135年会** 神戸(神戸学院大学)(2015年3月28日)
2. 鈴木英彦、國澤純、Claudin-4 を標的とした経鼻ワクチンの開発 **日本薬学会第135年会** 神戸(神戸学院大学)(2015年3月27日)
3. Jun Kunisawa、Lipid-mediated immune network in the development of intestinal allergy **第88回日本薬理学会年会** 名古屋(名古屋国際会議場)(2015年3月20日)
4. 國澤純、腸管免疫ネットワークの学術的解明と創薬・ワクチン開発への展開 **第7回鈴鹿病態薬学研究会** 三重(鈴鹿医療科学大学)(2015年2月25日)
5. 國澤純、腸内環境因子を介した免疫制御の基礎的解明と免疫創薬への応用 **千里ライフサイエンスセミナー - アカデミア創薬の進展 -** 大阪(千里ライフサイエンスセンター)(2015年2月13日)
6. Takahiro Nagatake, Makoto Arita, Ryo Iwamoto, Takahiro Hayasaka, Takashi Harada, Tetsuya Honda, Naomi Matsumoto, Michiko Shimojou, Risa Nagasawa, Shiori Shikata, Eri Hashimoto, Yosuke Kurashima, Yuji Suzuki, Hidehiko Suzuki, Kenji Kabashima, Hiroyuki Arai, Mitsutoshi Setou, Hiroshi Kiyono, and Jun Kunisawa, Dietary 3 fatty acid-originated 17,18-epoxyeicostetraenoic acid prevents the development of allergic

- inflammation in the gut and skin 6th **Phospholipase A2 and Lipid Mediators**, Tokyo, Japan (10 - 12 February, 2015)
7. 國澤純、腸内環境を介した免疫制御とワクチン開発・免疫創薬への展開 **第19回関西大学先端科学技術シンポジウム** 大阪 (関西大学)(2015年1月23日)
 8. Takahiro Nagatake, Naomi Matsumoto, Michiko Shimojou, Hidehiko Suzuki, Satoshi Fukuyama, Shintaro Sato, Kentaro Ogami, Yusuke Tsujimura, Mitsuo Kawano, Tetsuya Nosaka, Hiroshi Kiyono, Yasuhiro Yasutomi, and Jun Kunisawa, Immunological and organogenesis diversity of mucosa-associated lymphoid tissues for the development of mucosal vaccine **第8回次世代アジュバント研究会**, 大阪 (千里ライフサイエンスセンター) (2015年1月20日)
 9. 鈴木英彦、米満美紀、長竹貴広、池上浩司、瀬藤光利、清野宏、近藤昌夫、國澤純、Claudin-4 標的型肺炎球菌ワクチンの開発と鼻腔の物理的機能の免疫誘導に与える影響の検討 **第8回次世代アジュバント研究会**, 大阪 (千里ライフサイエンスセンター) (2015年1月20日)
 10. Sachiko Akashi-Takamura, Natsuko Yamakawa, Takuma Shibata, Yosuke Kurashima, Jun Kunisawa, Hiroshi Kiyono, Kazuhiro Suzuki, Junichi Kikuta, Masaru Ishii, and Kensuke Miyake, MD-1 influences a binding between S1P1 and BCR **第43回日本免疫学会学術集会**, 京都 (国立京都国際会館) (2014年12月10-12日)
 11. Aldina Suwanto, Ayuko Sato, Shintaro Sato, Tomonori Nochi, Jun Kunisawa, and Hiroshi Kiyono, Vaginal resident memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for early clearance of genital HSV-2 infection **第43回日本免疫学会学術集会**, 京都 (国立京都国際会館) (2014年12月10-12日)
 12. Satoshi Ueha, Fumiko Suenaga, Jun Abe, Mizuha Kosugi, Yusuke Shono, Jun Kunisawa, Shintaro Sato, Hiroshi Kiyono, and Koji Matsushima, Loss of lymph node fibroblastic reticular cells and high endothelial cells underlies humoral immunodeficiency in mouse GVHD **第43回日本免疫学会学術集会**, 京都 (国立京都国際会館) (2014年12月10-12日)
 13. Jun Kunisawa Functional Diversity of IgA-producing Plasma Cells for the Development of Mucosal Vaccine **The 1st International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014** (University of Tokyo, Tokyo, 21 October, 2014)
 14. 國澤純、脂質 免疫ネットワークを起点にした免疫疾患の解明と創薬研究への展開 **第87回日本生化学会** 京都 (国立京都国際会館) (2014年10月16日)
 15. 國澤純、東洋医学を起点とした粘膜免疫制御メカニズムの解明と創薬への展開 **日本生薬学会第61回年会** 福岡 (福岡大学) (2014年9月13日)
 16. 國澤純、粘膜免疫のユニーク性に基づく粘膜ワクチンの開発・免疫創薬への新展開 **第30回日本DDS学会** 東京 (慶応義塾大学) (2014年7月31日)
 17. 國澤純、腸内環境因子を介した免疫制御の解明と創薬・ワクチン開発への展開 **第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会** 京都 (同志社大学寒梅館) (2014年7月15日)
 18. Yoshifumi Kotani, Jun Kunisawa, and Hiroshi Kiyono, The mechanism underlying

the IgA enhancement of Lactobacillus pentosus strain b240 in the gut immune system **FOCIS 2014**, Chicago, US (25 - 28 June, 2014)

19. 國澤純、東洋医学を起点とした粘膜免疫制御メカニズムの解明と創薬への展開 **第65回日本東洋医学会学術総会** 東京(東京国際フォーラム)(2014年6月28日)
20. Jun Kunisawa Commensal Bacteria and Diet in the Control of Intestinal Immunosurveillance and Diseases **18th**

Annual Meeting of Intestinal Microbiology (University of Tokyo, Tokyo, 12 June, 2014)

21. 國澤純、腸内環境ネットワークを介した免疫制御とヘルスサイエンス **第14回日本抗加齢医学会総会** 大阪(大阪国際会議場)(2014年6月6日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

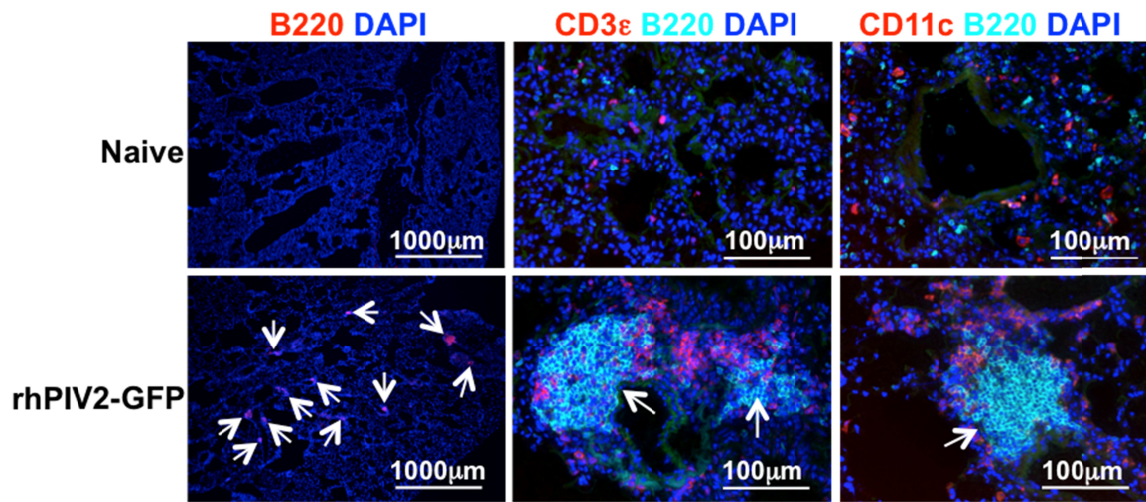


図1 rhPIV2-GFPをマウスに感染させ、肺を免疫組織学的解析に供した。rhPIV2-GFPの感染により気管支周囲または実質にB細胞、T細胞、樹状細胞の集積が認められた。矢印はB細胞の集積を指す。

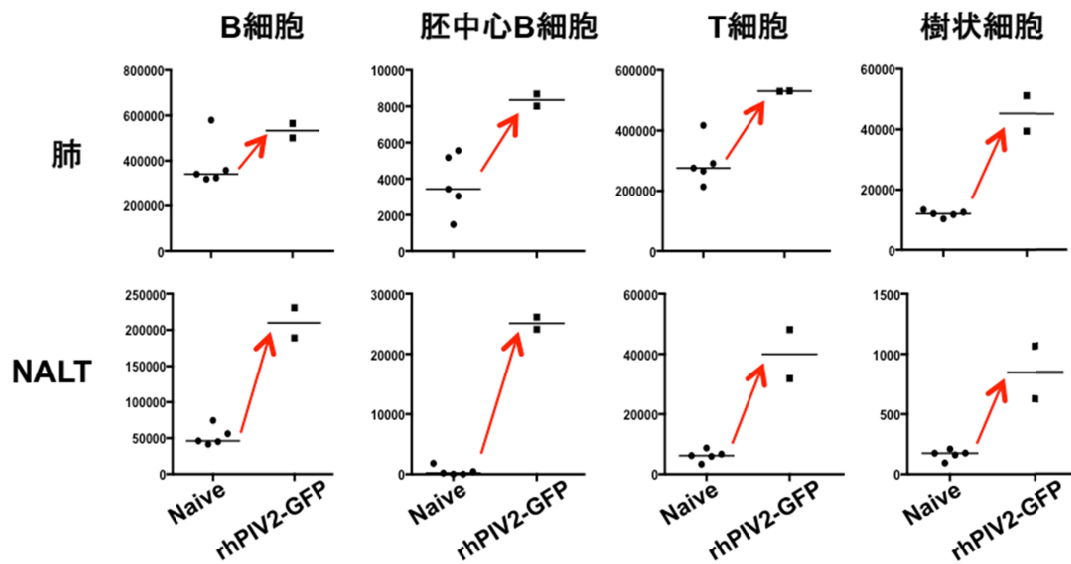


図2 rhPIV2-GFPをマウスに感染させ、肺とNALTをフローサイトメトリ解析に供し各種免疫担当細胞の数を求めた。rhPIV2-GFPの感染により肺、NALTともに各種免疫担当細胞数の増加が観察された。

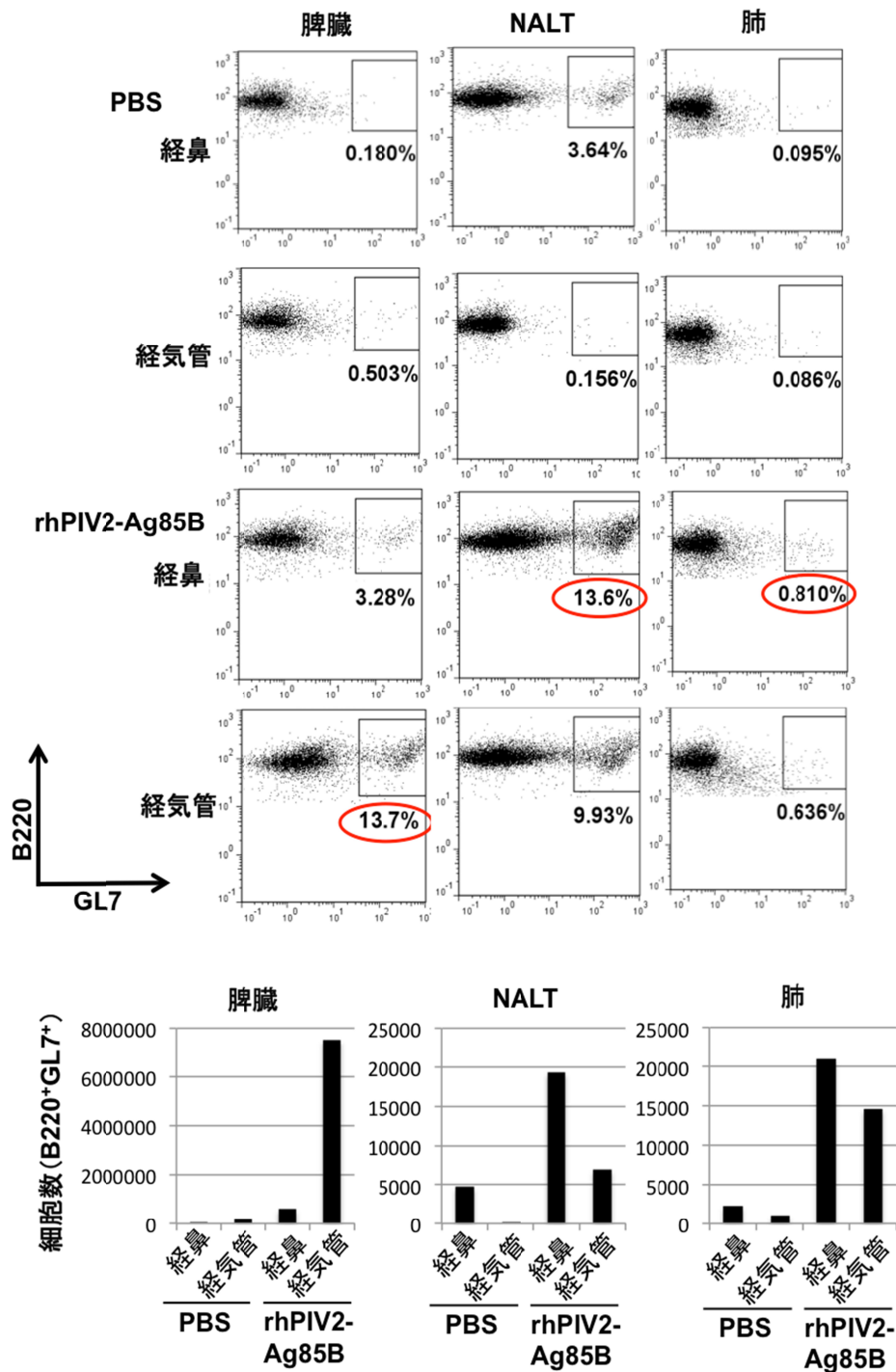


図3 rhPIV2-Ag85Bを経鼻的あるいは経気管的にマウスに感染させ、脾臓、NALT、肺をフローサイトメリー解析に供し胚中心B細胞の数を求めた。経気管的な投与は経鼻的投与に比べて脾臓での胚中心反応の誘導に優れていた。一方、経鼻的投与はNALTや肺での胚中心反応の誘導に効果が高かった。上段は生細胞かつB220陽性集団のフローサイトメリー結果を、下段はB220+GL7+胚中心B細胞の数を示す。

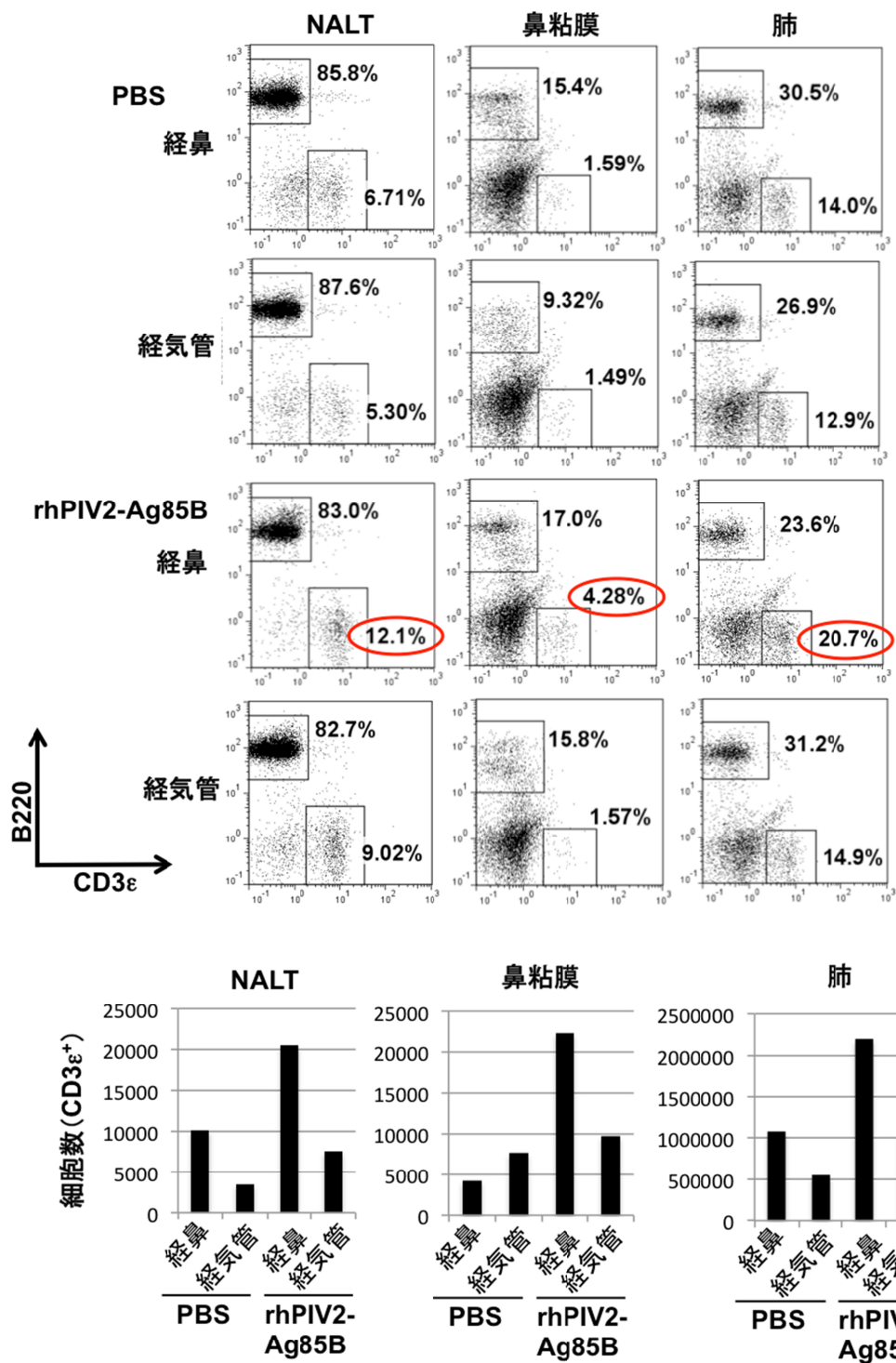


図4 rhPIV2-Ag85Bを経鼻的あるいは経気管的にマウスに感染させ、NALT、鼻粘膜、肺をフローサイトメリー解析に供しT細胞の数を求めた。経鼻的な投与は経気管的な投与に比べてNALTや鼻粘膜、肺でのT細胞の増加が顕著に認められた。上段は生細胞集団のフローサイトメリー結果を、下段はCD3ε+T細胞の数を示す。