

201447018A

厚生労働科学研究委託費

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

(委託業務題目) 乳幼児に適用可能な安全性と有効性の高い

SF-10 アジュバントによるインフルエンザ・RSV

感染防御免疫誘導に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 木戸 博

平成27(2015)年3月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

乳幼児に適用可能な安全性と有効性の高いSF-10アジュバントによるインフルエンザ・RSV感染防御免疫誘導に関する研究-----	1
木戸 博	

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. SF-10アジュバントの免疫増強作用機序の解析に関する研究 -----	13
木戸 博、亀村 典生	
2. SF-10アジュバントの安全性に関する研究 -----	21
遠藤 淳、篠田 香織、井上 和恵	
3. SF-10アジュバントの抗体誘導臓器の調査に関する研究 ---	25
高橋 悦久	
4. SF-10アジュバントが適用可能な抗原の解明 -----	31
木戸 博	

III. 学会等発表実績 -----	35
--------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	36
-----------------------	----

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告

（総括）

乳幼児に適用可能な安全性と有効性の高いSF-10アジュバントによるインフルエンザ・RSV
感染防御免疫誘導に関する研究

業務主任者 木戸 博 徳島大学疾患酵素学研究センター 特任教授

研究要旨

SF-10 アジュバントは、肺サーファクタントに類似した人工合成アジュバント（SSF）と増粘剤の Carboxy vinyl polymer から成り、抗原は SF-10 アジュバントに結合後、樹状細胞に運搬され、取り込まれて抗原提示が始まる。SF-10 アジュバントの製造工程各ステップのパラメーターが検討され、再現性の良い製造結果が得られた。SF-10 アジュバントの免疫増強作用機序の解析では、SF-10 はマクロピノサイトーシスによる樹状細胞への抗原の取り込みを促進した。取り込まれた抗原は、細胞内で速やかにペプチドに分解され、おそらくリソゾーム経路で MHC class II と、TAP1-小胞体経路で MHC class I の両方に抗原提示されることが明らかになった。さらに、MHC class I から CD8⁺ T 細胞を介して細胞障害性 T 細胞に抗原情報の伝達が、MHC class II から CD4⁺ T 細胞を介する抗原情報伝達が明らかになった。粘膜局所の T 細胞非依存性抗原シグナル伝達経路においては、SF-10 は BAFF の転写を促進し、B 細胞の IgA クラススイッチを亢進した。抗体誘導臓器の検討では、経鼻接種した気道粘膜と血液での抗体産生以外に、腸管免疫、膈免疫を著しく亢進させ、抗体を大量に誘導していることが判明した。SF-10 アジュバント適用抗原の検索では、食物アレルギーワクチンを視野に入れた ovalbumin や、気道感染症での RS ウイルス抗原で抗体誘導が確かめられていたが、新たに検討した肺炎球菌では SF-10 アジュバントへの結合が確かめられた。

研究分担者

- ・木戸博：徳島大学疾患酵素学研究センター・特任教授
- ・高橋悦久：徳島大学疾患酵素学研究センター・特任助教
- ・亀村典生：徳島大学疾患酵素学研究センター・特別研究員
- ・遠藤淳：第一三共株式会社・ワクチン事業本部・主任研究員
- ・篠田香織：第一三共株式会社・ワクチン事業本部・専門研究員
- ・井上和恵：第一三共株式会社・ワクチン事業本部・副主任研究員

A. 研究目的

現状でのインフルエンザワクチンを始めとした各種ワクチンの多くは、通常感染ルートでは無く、皮下注射か筋肉注射型のワクチンで、この場合図1に示すように抗体誘導は血液の IgG を主体とした肺炎予防に限定され、初感染部位の気道粘膜の IgA 抗体の誘導は期待されない。次世代型のワクチン開発では、より予防効果の強いワクチンを開発するために自然感染ルートの経鼻接種ワクチンである必要がある。経鼻接

種ワクチンの場合、気道粘膜の分泌型 IgA を誘導して感染予防効果を誘導するだけでなく、血液中の IgG 抗体を誘導して肺炎防止効果を発現する。鼻腔は絶えず異物にさらされるため異物排除機能の優れた部位で、ここでの免疫系を刺激して抗体誘導を導くためには、免疫増強作用を示すアジュバントの添加が不可欠である。

これまでに開発された主要な粘膜アジュバントを図 2 に示す。樹状細胞を直接刺激して免疫誘導効率を増強するアジュバントの群と、樹状細胞への抗原運搬効率を増強させるアジュバント群の 2 つのグループに分類できる。これまで一般に、前者のグループの場合、アジュバントの有効性が強くなればなる程、自己免疫等のアジュバント病のリスクが高まって安全性に問題が現れ、安全性と有効性の両者を両立させることは困難であった。この問題を解決するために、本プロジェクトではアジュバントを代謝回転の速いヒトの生体成分に限定して、過剰な樹状細胞の刺激を回避することで、安全性を確保することとした。このような条件を満足する生体成分粘膜アジュバントは、図 2 に示す抗原運搬体としての肺サーファクタントのみである。

本プロジェクトでは、肺サーファクタントの代わりにこれに類似した人工合成肺サーファクタント SF-10 を使用して免疫系への過剰刺激を抑制し、さらに自然感染ルートで抗原を接種することで、生体が持つ生体防御機能をフル動員することで、抗体誘導の有効性と安全性を両立させた世界で最も強力な粘膜免疫アジュバントを完成させた。

本プロジェクトの研究目的は、2 歳以下の乳幼児への適用を視野に、SF-10 について下記の 4 項目、① SF-10 アジュバントの作

用機序の解析、② SF-10 アジュバントの安全性の検討、③ SF-10 アジュバントの抗体誘導臓器の調査、④ SF-10 アジュバントが適用可能な抗原、を明らかにする。

B. 研究方法

SF-10 アジュバントは、図 3 に示す肺サーファクタントの成分の中から、粘膜アジュバント作用に必要な成分として、dipalmytoyl phosphatidylcholine (DPPC)、Phosphatidyl glycerol (PG)、Phosphatidic acid (PA)、Surfactant protein C (SP-C) が同定され、強い疎水性のために工業生産が困難な SP-C に代わって K6L16 ペプチドが発明され、肺サーファクタントに類似した人工合成アジュバント (SSF) が完成した。さらに噴霧された抗原と SSF の鼻腔内での滞留効果を増強させるための増粘剤として Carboxy vinyl polymer (CVP) を加え、SF-10 が完成した。図 4 は肺サーファクタントと HA 抗原を混合した電子顕微鏡写真(A)と、HA 抗原と SF-10 を混合した電子顕微鏡写真(B)を示す。SF-10+HA 抗原の場合、CVP のポリマー鎖に HA 抗原が絡め取られて、樹状細胞に HA 抗原が効果的に運搬されて抗原提示されると期待される。SF-10 アジュバントでは、抗原と SSF との効果的な結合が重要で、そのため各製造工程で工夫がなされ、再現性の良い抗原と SF-10 の安定結合が得られるようになった。この検体を使用して以下の研究が実施された。

1) SF-10 アジュバントの作用機序の解析 a. 樹状細胞への抗原の取り込み促進機序の解析

樹状細胞の培養系で、インフルエンザワクチン抗原の SF-10 アジュバント (人工合成肺サーファクタント SSF+ 増粘剤 Carboxy

vinyl polymer(CVP)) による取り込み促進機序の解明が実施された。細胞培養系での実験では、増粘剤の CVP が SSF-HA の拡散を障害することから、SF-10 の代わりにアジュバントとして SSF を、抗原にはインフルエンザ haemagglutinin (HA) を主成分とするスプリットワクチン抗原を用いて作用機序を解析した。

b. 局所免疫でのIgA抗体誘導、全身免疫でのIgG抗体誘導におけるクラススイッチ促進機序の解析

樹状細胞に取り込まれた抗原シグナルが、その後のT細胞の活性化とB細胞のクラススイッチの促進にどのように伝達され、抗体誘導の増幅に繋がるかを検討した。今年度の研究では、抗原シグナル伝達の最初の過程を構成する機序を明らかにするため、マウスの骨髄培養細胞から分化させた樹状細胞を用いて、局所免疫と全身免疫へのシグナル伝達を解析した。

2) SF-10アジュバントの安全性の検討

SF-10の安全性の検討の初年度は、マウスを用いた病理学的リスク因子の解析を実施することとした。最終的には、ヒト用に開発した噴霧デバイスを使用した安全性の検討、を計画している。

3) SF-10アジュバントの抗体誘導臓器の調査

SF-10アジュバントを用いたインフルエンザHAワクチン抗原経鼻接種に反応して抗体誘導促進臓器を調査するために、マウスの鼻腔洗浄液、気管支肺胞洗浄液、膺液、消化管洗浄液、便中の抗HA特異的分泌型IgAの定量を実施した。

4) SF-10アジュバントが適用可能な抗原

SF-10アジュバントによる抗体誘導の増強

効果は、SSFの脂質膜に抗原が結合して樹状細胞に運ばれて、粘膜の分泌型IgAと血液IgG誘導を引き起こすことから、SSFの脂質膜に抗原が結合しなくてはならない。SSFの脂質膜と抗原との結合をモニターする方法の検索と、今後に向けたSSF結合抗原の検索を実施する。

(倫理面への配慮)

本研究は、徳島大学動物実験委員会の承認を受け、その指針に従い実施した。

C. 研究結果

本実験で使用したインフルエンザ haemagglutinin (HA) の抗体誘導効果を図5に示す。8週齢の Balb/C マウス (雌)、各群5匹に、生理食塩水投与群、Influenza A California/07/2009(H1N1) HA (0.4 µg/匹) 群、HA (0.4 µg/匹)+SSF (4 µg/匹)+0.5% CVP (HA-SF-10 群)、HA (0.4 µg/匹)+Poly (I:C) (4 µg/匹) (HA-Poly (I:C) 群) を、2週間間隔で3回経鼻投与 (片鼻に3 µL づつ) して、最終投与から2週後に、血液と鼻腔洗浄液を採取して、抗インフルエンザ HA 抗体の濃度を ELISA で測定して平均値と中央値で示している。その結果、生理食塩水のバックグラウンド値で、鼻汁、血液の抗 HA 抗体は、それぞれ 2-3 ng/mL、10-20 ng/mL を示したのに対して、HA 単独の3回投与で鼻汁、血液の抗 HA 抗体はそれぞれ 5-10 ng/mL、30-40 ng/mL 程度の増加は見られたが、SF-10 アジュバント添加の 1/1000 程度で、図に表示した µg/mL のスケールではほぼ 0 に近い値として表示されている。これに対して、HA-SF-10 群では鼻腔の IgA 値 (中央値) で 30 µg/mL を、血液 IgG 値で 2765 µg/mL を示した。この抗体誘導効果は、文献上世界で最も効果的な抗体誘導効果と言える。この

抗体誘導効果は、樹状細胞を直接刺激する Poly(I:C) を SSF と同量添加よりも、中央値で 1.6 倍（鼻汁）、2.6 倍（血液）の抗体誘導効果を示した。HA+SSF に比べると、抗体誘導効果は 15 倍（鼻汁）、8.5 倍（血液）を示し、SF-10 (CVP+SSF) の場合著明な抗体誘導増幅効果を示している。CVP は単に増粘剤としてではなく、図 4 に示すように SSF との共存下に HA 抗原を効率よく樹状細胞に運搬しているためと推定している。

上記の検体を用いて以下の解析を実施した。

1) SF-10 アジュバントの作用機序の解析
a. 樹状細胞への抗原の取り込み促進機序の解析

7 週齢の BALB/c マウスの大腿骨より骨髓細胞を採取して、GM-CSF/IL-4 添加培地で 7 日間培養して樹状細胞に分化した細胞を、Anti-CD11c-conjugated magnetic beads を用いて選択的に採取して用いた。この実験系では、培地に添加する HA-SF-10 は CVP の増粘効果で塊となって均一に培地中に分散しないため、HA-SSF の条件で樹状細胞への抗原の取り込み促進機序の解析を実施している。HA の樹状細胞への取り込みは、図 6 に示すように温度依存性で、取り込み促進効果はエネルギー依存性であることが示唆された。37°C の条件で、HA 単独に比べて HA-SSF は約 10.5 倍の促進効果を示した。

次に SSF の HA 取り込み促進効果の作用機序を解析するために、マウス骨髓由来の樹状細胞 (5×10^5 cells) にナトリウムチャンネル阻害を介したエンドサイトーシス阻害剤の Amiloride、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤の Chlorpromazine、アクチン重合阻害剤の Cytochalasin B、Cytochalasin D をそれぞれ 1 時間添加して蛍光色素 ATTO488 標識 HA の取り込みをフロ

ーサイトメトリーで検証した。阻害剤無添加の HA+SSF の細胞内への取り込みを 1 とした時の、各種条件下の取り込み抑制効果を図 7 に示している。これらの中で、Amiloride が濃度依存性に著明に HA の取り込みを阻害していることから、SSF による HA の取り込み促進効果は、Amiloride で抑制されるマクロピノサイトーシスと推定された。なお Cytochalasin B を添加した実験系では、僅かな阻害傾向が見られたが、統系的有意差ではなかった。

HA 抗原を取り込んだ樹状細胞では、樹状細胞の活性化マーカーの CD86 の発現が増加することを報告している。そこで図 7 と同じ条件下で細胞を処理した時の、樹状細胞表面の活性化マーカー CD86 を指標に各種阻害剤の効果を検証した結果を図 8 に示す。図に示すように、Amiloride の処理のみで CD86 の発現レベルが有意に減少しており、SSF は HA 抗原をマクロピノサイトーシスで細胞に取り込んで抗原シグナルを発現していることが判明した。

b. 局所免疫での IgA 抗体誘導、全身免疫での IgG 抗体誘導におけるクラススイッチ促進機序の解析

樹状細胞に取り込まれた抗原シグナルが、その後の T 細胞の活性化と B 細胞のクラススイッチの促進にどのように伝達され、抗体誘導の増幅に繋がるかを検討した。これらの中でも、T 細胞非依存性に鼻粘膜局所で樹状細胞から直接 B 細胞に抗原シグナルが伝達されて IgA 産生のクラススイッチが促進される系と、T 細胞依存性のシグナル伝達系が知られている。

図 9 に T 細胞非依存性の抗原シグナル伝達系に関与すると言われる因子群、BAFF、APRIL、TACI、BAFF-R を示している。調べた 4 種に因子の中で、BAFF の転写のみが図 1

0に示すようにHA+SSFによって増加していた。またこの実験では、HA抗原以外に食物アレルギーワクチンを意識して、卵の主要食物抗原であるOvalbumin (OVA)を添加した場合も検証しているが、HAと同様OVAでもBAFFの発現は増加していた。なお、この実験では抗原の非存在下で単独で樹状細胞を刺激することが報告されているPoly(I:C)を添加してPositive Controlとしている。Poly(I:C)は単独で著明に樹状細胞を刺激して、その効果は長時間持続することを確認している(データ非表示)。このことは、樹状細胞を刺激する図2に示したアジュバント群が、その副作用として自己免疫疾患を誘導することに関係している可能性を示唆する。

抗原を取り込んだ樹状細胞からT細胞を介して抗原シグナルが伝達されるさいに起こるとされるMHC class IとMHC class IIのシグナル伝達系を図11に示す。従来の研究で、HA+SSFでMHC class IIのシグナル伝達が増強されることを報告していることから、今年度の研究ではMHC class Iを介する細胞性免疫系への関与を検証した。

図12に示すように樹状細胞の小胞体への抗原の取り込みに関与する因子のTAP1の発現が有意に増加していた。HA+SSF以外にもOVA+SSFでも同様に増加しており、このTAP1の増加はPoly(I:C)でも認められた。

TAP1を介して小胞体に取り込まれた抗原は抗原ペプチドにまで分解されて、その抗原ペプチドは図13に示すように、樹状細胞のMHC class I上に提示され、CD8⁺T細胞に抗原情報は伝達され、活性化された後にインターフェロン(IFN) γ を産生する細胞障害性CD8T細胞に分化する。この抗原情報によって活性化されたCD8T細胞(細胞障害性CD8T細胞)が産生されているかを、検

証した。

BALB/cマウスに生理食塩水、HA抗原、HA+SF-10、HA+Poly(I:C)のそれぞれを3回点鼻した4群から鼻腔内細胞を収集して、抗CD8陽性、抗IFN γ 産生細胞を測定した結果を図14に示す。樹状細胞からの抗原情報がCD8T細胞に伝達され、活性化を受けてインターフェロン(IFN) γ を産生している細胞障害性CD8T細胞の比率が棒で示されている。生理食塩水やHA単独投与に比べてHA-SF-10投与群とHA-Poly(I:C)投与群では細胞障害性CD8T細胞が増加していることがわかる。さらに抗原情報を刷り込まれたCD8T細胞の測定系として汎用されているOVA/MHC Tetramerを用いた測定を、同様に実施した。ここでは、BALB/cマウスに生理食塩水、OVA抗原、OVA+SF-10、OVA+Poly(I:C)のそれぞれを3回点鼻した4群から鼻腔内細胞を収集して、図15に示すように抗CD8陽性OVA/MHC Tetramer結合細胞をカウントして棒に示した。SF-10はPoly(I:C)と同様にOVA抗原を認識した細胞障害性CD8T細胞の増加を示した。

以上から、SF-10は抗原情報をT細胞非依存性に鼻腔局所でB細胞の情報を伝えると共に、T細胞依存性の経路を介してMHC class IとMHC class IIに抗原シグナルを伝達して、液性免疫と細胞性免疫の両方を活性化していることが示唆された。

2) SF-10アジュバントの安全性の検討

SF-10の安全性の検討の初年度は、マウスを用いた病理学的リスク因子の解析を実施中である。具体的には、図16に記載した実験計画に基づいて病理組織学的解析を進めるが、ここで記載しているLevel 1, 2, 3については、図17に示す部位に相当する。現在実験は実施中である。

3) SF-10アジュバントの抗体誘導臓器の調査

SF-10 アジュバントを用いたインフルエンザ HA ワクチン抗原経鼻接種に反応する抗体誘導促進臓器を調査するために、マウスの鼻腔洗浄液、気管支肺胞洗浄液、膿液、消化管洗浄液、便中の抗 HA 分泌型 IgA の定量を実施した。

図 1 8 に実験系を示す。8 週齢の Balb/C マウス (雌)、各群 5 匹に、生理食塩水投与群、Influenza A California/07/2009 (H1N1) HA (0.4 $\mu\text{g}/\text{匹}$) 群、HA (0.4 $\mu\text{g}/\text{匹}$)+SSF (4 $\mu\text{g}/\text{匹}$)+0.5% CVP (HA-SF-10 群)、HA (0.4 $\mu\text{g}/\text{匹}$)+Poly (I:C) (4 $\mu\text{g}/\text{匹}$) (HA-Poly (I:C) 群) を、2 週間間隔で 3 回経鼻投与 (片鼻に 3 μL づつ) して、最終投与から 2 週後に、血液と鼻腔洗浄液 (0.1% BSA/saline, 1mL)、肺洗浄液 (0.1% BSA/saline, 2mL)、膿洗浄液 (0.1% BSA/saline, 1mL)、腸管洗浄液 (0.1% BSA/saline, 2mL)、糞便 (盲腸内の糞便 100 mg を 500 μL のプロテアーゼインヒビターカクテルを含む PBS) を採取した。なお糞便を溶解する溶液に含まれるプロテアーゼインヒビターを含む各試薬の最終濃度は、10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、0.1 mM leupeptin、0.1 mM bestatin、0.1 mM E-64c、0.3 M KCl、15% dimethyl sulfoxide、0.05% Tween 20 である。

図 1 9 には経鼻接種したインフルエンザ HA 抗原特異的分泌型 IgA のマウス 1 匹当たりの分泌総量を示す。各臓器の HA 抗原特異的分泌型 IgA 総量は、いずれの臓器においても Poly (I:C) に比べて SF-10 の誘導効果は高かった。膿液中に分泌される量は、鼻腔に分泌される総量の約半分を、さらに腸管洗浄液中には鼻腔洗浄液とほぼ同量のインフルエンザ HA 抗原特異的分泌型 IgA が検出

された。なお、糞便中には比較的大量の抗体が含まれており、そのため腸管内には生体内で最も多量の特異抗体が含まれることが判明した。これらの事は、腸管感染症、膣感染症ワクチンに経鼻接種ワクチンが有効であることを示唆している。

4) SF-10アジュバントが適用可能な抗原

SF-10 アジュバントによる抗体誘導の増強効果は、SSF の脂質膜に抗原が結合して樹状細胞に運ばれて、粘膜 IgA と血液 IgG 誘導を引き起こすことから、SSF の脂質膜に抗原が結合しなくてはならない。SSF の脂質膜と抗原との結合をモニターする方法の検索、今後に向けた SSF 結合抗原の検索を実施した。

これまでに SSF と結合して、抗体誘導を導くことがわかっている抗原に、RSV のウイルス膜たんぱく質の抗原、食物アレルギーワクチンの抗原として OVA を明らかにしている。ここでは新たに、肺炎球菌ワクチンの開発に SF-10 が使用できないかを検討した。結合条件の検索には、様々な条件下で市販の肺炎球菌ポリサッカライド抗原を溶解し、SSF を加え相互の結合力をカロリーメーターで測定した。図 2 0 に示す結果から、結合定数 (K_d)、結合熱力学量 (ΔH , ΔS , ΔG)、結合サイト数が計算できるため、最も結合し易い条件を検索できると推定している。

D. 考察

本プロジェクトでは、安全性と抗体誘導の有効性を両立させるアジュバントとして、代謝回転の速い生体成分として肺サーファクタントに注目し、肺サーファクタントに類似した人工合成肺サーファクタント SF-10 を完成させて、免疫系への過剰刺激を抑制した抗原運搬体としてのアジュバント

を世界で最初に完成させた。さらにアジュバントの投与を自然感染ルートにすることで、生体が持つ様々な生体防御機能をフル動員することで、極めて有効な抗体誘導効果を実現させた。これまでのアジュバントでは、安全性と有効性を両立させることは困難であったが、代謝回転の速い生体成分に着目することで、安全でしかも世界で最も強力な粘膜免疫アジュバントとなった。本プロジェクトでは、なぜ抗体誘導効果が強力であるのに、炎症反応や自己免疫反応が認められないかについて、その作用機序の解析を中心に実施された。

① SF-10 アジュバントの作用機序の解析の結果、抗体誘導については粘膜局所の樹状細胞で観察される T 細胞非依存性の B 細胞での IgA クラススイッチ促進機序が関与していることが明らかになった。さらに抗原提示された樹状細胞から、MHC class I と MHC class II を介する抗原シグナル伝達系が共に作用して、液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導している実態が明らかになった。このような作用を示す SF-10 アジュバントであるが、抗原の非存在下では樹状細胞の刺激作用は全くない。SSF、SF-10 は、抗原との共存下に樹状細胞での抗原の取り込みを促進していることが判明した。

② SF-10 アジュバントの安全性の検討については、初年度の計画としてマウスを用いた鼻腔内での非刺激性、神経系への影響の有無を検証中である。

③ SF-10 アジュバントの抗体誘導臓器の調査では経鼻接種の条件下で、血液中の IgG 以外に気道粘膜の IgA、膣粘膜の IgA、腸管粘膜の IgA を多量の産生していることが判明したことから、腸管粘膜ワクチン、膣粘膜ワクチンの開発に応用できることが判明した。

④ SF-10 アジュバントが適用可能な抗原のスクリーニングとその条件をカロリメータを用いることで、最適条件を検索できることが明らかになった。

E. 結論

安全で有効な生体成分粘膜アジュバント SF-10 の作用機序の一端が明らかになってきた。今後さらなる詳細な解析を通じて、SF-10 の安全性が代謝以外の点にもあるのか、強力な抗体誘導効果が、何に由来するかをさらに絞り込んで解析を進める。自然感染ルートの経鼻接種は、気道以外の全身の粘膜で多量の抗体を産生することが明らかになり、腸管や膣等の各種感染症、さらにはアレルギーワクチン等への応用を示唆している。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

<論文発表>

- 1) Maekawa T, Kimoto T, Mizuno D, Furukawa Y, Ida M, Takahashi E, Izumo T, Ono Y, Shibata H, Kido H. Oral administration of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 enhances anti-influenza virus-specific IgG production in plasma after limited doses of influenza virus vaccination in mice. *J Vaccine Immunotechnology* (2015) 2(1):5.
- 2) Hiyoshi M, Indalao IL, Yano M, Takahashi E, Kido H. Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3 β -mediated β -catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase

- in membrane permeability. *Arch Virol* (2015) 160(1): 225-234.
- 3) Pan HY, Sun HM, Xue LJ, pan M, Wang YP, Kido H, Zhu JH. Ectopic trypsin in the myocardium promotes dilated cardiomyopathy after influenza A virus infection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307(6): H922-932, (2014)
- 4) Yamane K, Indalao IL, Chida J, Yamamoto Y, Hanawa M, Kido H. Diisopropylamine dichloroacetate, a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor, as a potential therapeutic agent for metabolic disorders and multiorgan failure in severe influenza. *PLoS ONE* 9(5): e98032. (2014)
- 5) Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Motita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y. Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 134(4): 824-830, (2014)
- 6) Yano M, Endo H, Okumura Y, Kido H. Ibuprofen enhances the anti-cancer activity of cisplatin in lung cancer cells by inhibiting the heat shock protein 70. *Cell Death Dis.* 5:e1027, (2014)
- 7) 木戸博: 肺サーファクタントの新たな医学応用の可能性、粘膜アジュバントへの応用とワクチン開発 分子呼吸器病 (2014)18(1):171-175.
- 8) 木戸博: インフルエンザ感染症における粘膜免疫の重要性 *Annual Review 呼吸器* (2014) 24-29.

<学会発表>

1) 木戸博: インフルエンザ粘膜ワクチン開発の現状. 第88回日本感染症学術学会学術講演会、第62回日本化学療法学会総会 合同学会 福岡 2014.6.18-20.

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

<特許取得>

1. 特許番号:特許第 5473899 号
 登録日:平成 26 年 2 月 14 日
 出願番号:特願 2010-505901
 出願日:平成 21 年 3 月 30 日
 発明の名称:合成ペプチドを含有する抗原薬物ビークルとこれを用いる粘膜ワクチン
 発明者:木戸博、武井恒知、水野大

<特許出願>

なし

<実用新案登録>

なし

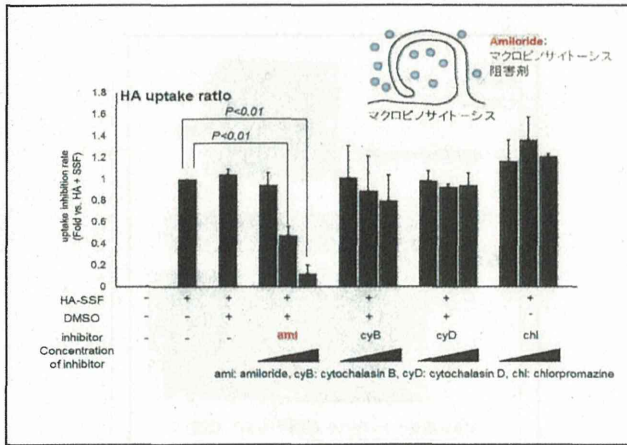


図 7. マクロフィノサイトーシスによる HA-SSF の取り込み促進効果

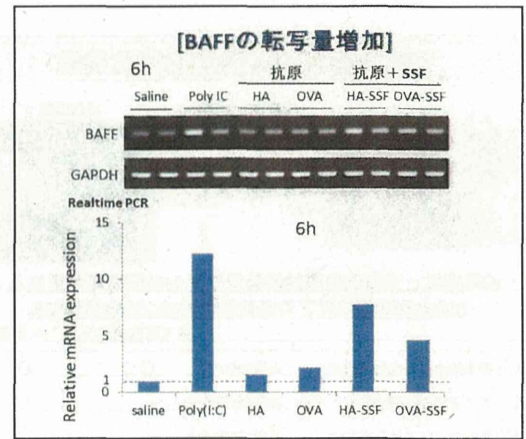


図 10. 鼻腔粘膜局所の樹状細胞の BAFF の転写促進効果

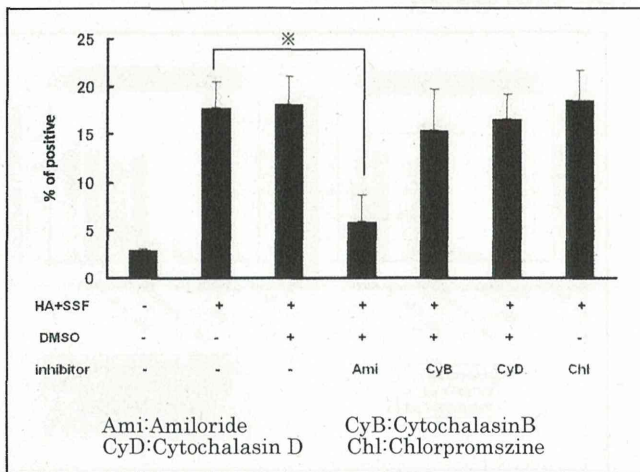


図 8. CD86 陽性細胞の割合で表示した各種エンドサイトーシス阻害剤の影響

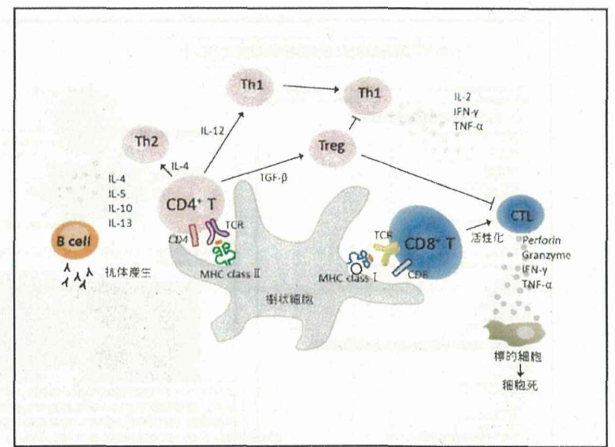


図 11. CD4+, CD8+ T 細胞を経由する抗原のシグナル伝達系

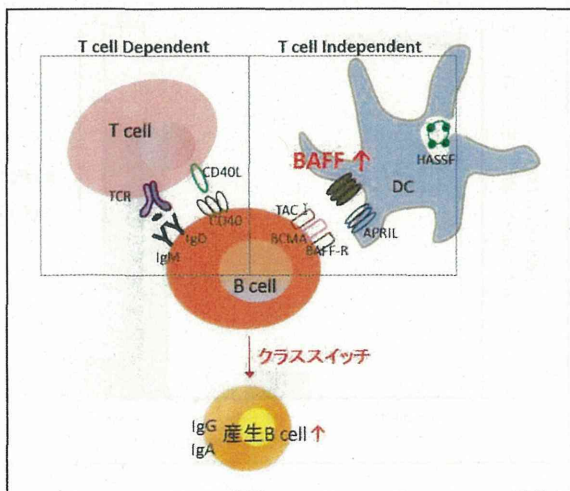


図 9. T 細胞非依存性経路を経由した粘膜局所の IgA 産生のクラススイッチ促進機序

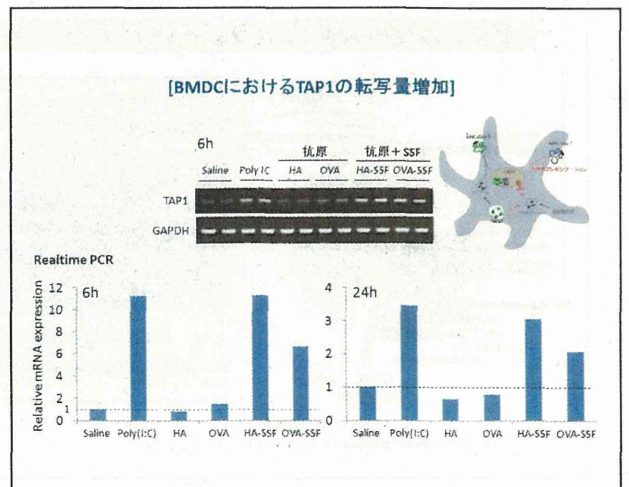


図 12. HA-SSF、OVA-SSF を処理した樹状細胞の TAP1 の発現増加

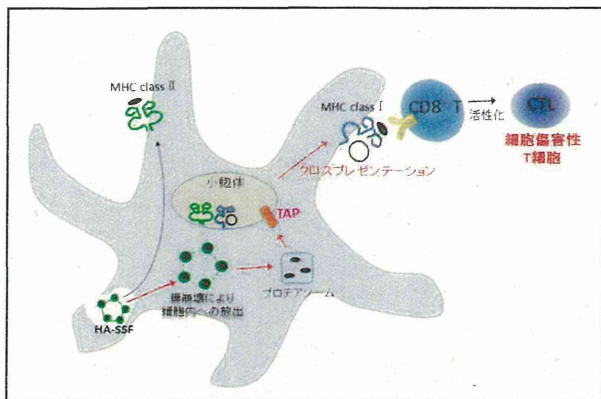


図 13. HA-SSF による MHC class I を介する CD8⁺T 細胞の活性化

高用量頻回投与後の病理学的所見

被検動物: Balb/C mouse female 6-week-old

N = 3

vaccine conc.: PBS cont. ugHA/μL

接種法: 3 μL x 2 (each cavity) を1週間隔で3回経鼻投与

3回投与翌日に採材、頭部を10%中性ホルマリンにて固定 (鼻腔内に10%中性ホルマリンを還流後)

脱灰処理後にパラフィンブロックを作成し、切片作成、HE染色し鼻腔内の病理学的解析を行う

解剖学的検査	採材	組織学的検査
鼻腔 (Nasal cavity)	頭部 (鼻腔含む) (Head (including nasal cavity))	Nasal cavity (level 1)
		Nasal cavity (level 2)
		Nasal cavity (level 3)
		Nasopharynx

図 16. マウスを用いた病理学的リスク因子の把握実験計画

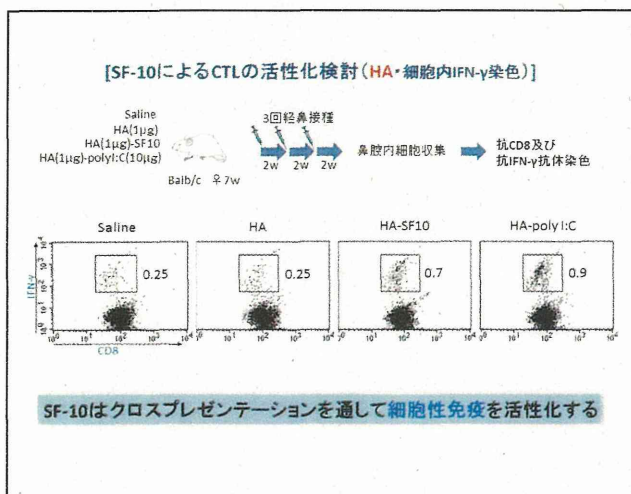


図 14. HA-SF-10 の経鼻投与による細胞性免疫の活性化の確認

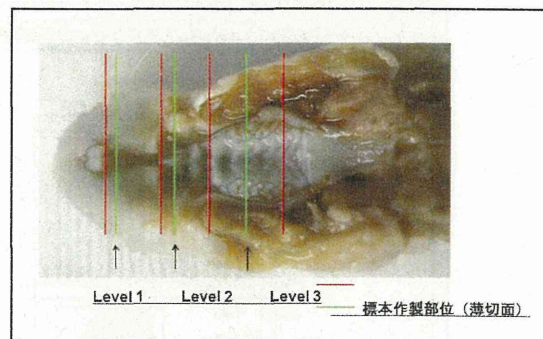


図 17. 標本切り出し部位と薄切面 (ラットの例)

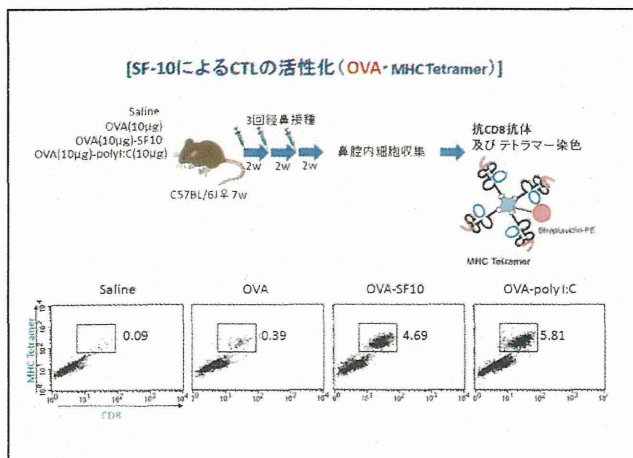


図 15. OVA-SF-10 の経鼻投与による細胞性免疫の HA-SF-10 による抗体活性化と細胞障害性 T 細胞、CTL の出現

SF10を用いた経鼻投与における抗体誘導臓器の調査

試験群 (各群 Balb/C マウス (8w, ♀) n=5)

- saline
- HA(0.4 ug)
- HA(0.4 ug)-SSF(4 ug)+0.5% CVP (HA-SF10)
- HA(0.4 ug)-Poly(I:C)(4 ug)

試験スケジュール



採取各臓器

- 鼻腔洗浄液 (nasal wash) : 0.1% BSA / saline 1ml
- 肺洗浄液 (lung wash) : 0.1% BSA / saline 2ml
- 腸管洗浄液 (intestine wash) : 0.1% BSA / saline 2ml
- 糞便 (feces) : 100mg / 500ul inhibitor cocktail buffer
- 膣洗浄液 (vagina wash) : 0.1% BSA / saline 1ml

図 18. 経鼻接種誘導臓器の調査

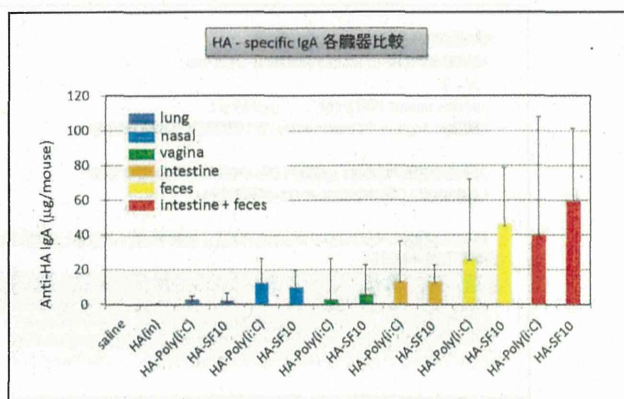


図 19. 経鼻接種 HA-SF-10 による HA 特異 IgA 抗体の誘導

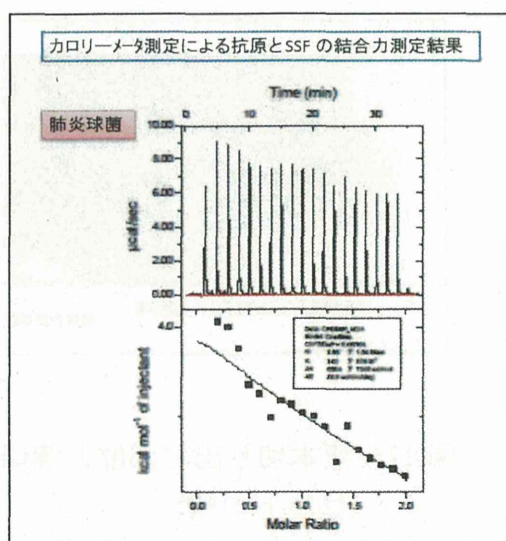


図 20. カロリーメーターによる抗原と SSF との結合力測定 (肺炎球菌の場合)

II. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告

分担研究報告書

SF-10アジュバントの免疫増強作用機序の解析に関する研究

研究分担者 木戸 博（徳島大学疾患酵素学研究センター 特任教授）
研究分担者 亀村 典生（徳島大学疾患酵素学研究センター 特別学術研究員）
研究協力者 金 恵珍（徳島大学疾患酵素学研究センター 特別学術研究員）

研究要旨

代謝回転の速い生体成分の肺サーファクタントに粘膜アジュバント活性を見出し、この肺サーファクタントに類似した人工合成肺サーファクタント SSF に増粘剤の Carboxy vinyl polymer を加えて、SF-10 アジュバントができている。SF-10、SSF には樹状細胞を刺激する作用は認められないが、インフルエンザ HA ワクチンとの共存下に鼻腔の分泌型 IgA 抗体と血液の IgG 抗体を著明に誘導して、その誘導効果は世界のトップレベルであるが、炎症性反応等の副作用は全く見られない。これまでに報告されているほとんどのアジュバントでは、アジュバントの Efficacy が上がれば上がるほど、Safety に問題が生じている。これまでのアジュバントとは異なる SF-10、SSF の作用機序に焦点を合わせて解析が行われた。

SF-10、SSF は、樹状細胞に抗原を効率良く運んで、自らは速やかに細胞内で分解されて免疫系への過剰な刺激を引き起こさない仕組みが明らかになってきた。樹状細胞に取り込まれた HA 抗原は、これまでに明らかになっている 3 つの抗体誘導経路の全てを動員して抗体誘導を引き起こしていることが確認された。具体的には、T 細胞非依存性の鼻腔局所での B 細胞の IgA クラススイッチ促進機序の一つとして、BAFF の転写効果が確かめられた。一方、T 細胞依存性の経路では、MHC class II を介する CD4⁺T 細胞依存性の液性免疫系の増強効果と、MHC class I を介する CD8⁺T 細胞依存性の細胞性免疫系の発動効果である。これら 3 つの抗体誘導経路の促進は、アジュバント単独で樹状細胞を強く刺激する Poly(I:C) でも同様に認められている。これらのことから、安全な SF-10 アジュバントの効果は、効果的な抗原の運搬能力と、細胞内での速やかな分解による過剰な免疫系の刺激の無いことに由来し、SF-10 の抗体誘導効果の有効性は、Poly(I:C) と同様に、T 細胞非依存性と T 細胞依存性の両面からの作用に由来すると考えられた。今後さらなる詳細な解析を進める。

A. 研究目的

これまでに開発された主要な粘膜アジュバントは、樹状細胞を直接刺激して免疫誘導効率を増強するアジュバントと、樹状細胞への抗原の運搬効率を増強させるアジュ

バントの 2 種類に分けて考えることができる。多くのアジュバントは前者に属し、抗原が存在しなくても、アジュバント単独で樹状細胞を刺激する。そのためこのようなアジュバントは一般に、アジュバントの有

効性が強くなればなる程、自己免疫等のアジュバント病のリスクが高まって安全性に問題が現れ、安全性と有効性の両者を同時に達成させることは困難であった。この問題は、今回提案する SF-10 アジュバントの出現により、解決の方法が見えてきたと考えている。具体的には、アジュバントを代謝回転の速い（分解され易い）ヒトの生体成分に限定して、過剰な樹状細胞の刺激を回避することで、安全性を確保しながら、細胞内に抗原情報をしっかりと導入する方法である。以上の条件を満足する生体成分粘膜アジュバントとして、肺サーファクタントを発見し、その人工合成品の SSF を完成させ、さらに増粘剤の Carboxy vinyl polymer (CVP) を加えて、SF-10 アジュバントが完成した。

B. 研究方法

a. 樹状細胞への抗原の取り込み促進機序の解析

樹状細胞の培養系で、インフルエンザワクチン抗原の SF-10 アジュバント（人工合成肺サーファクタント SSF+ 増粘剤 Carboxy vinyl polymer (CVP)）による取り込み促進機序の解明が実施された。細胞培養系での実験には増粘剤の CVP が不用であることから、SF-10 の代わりにアジュバントとして SSF を、抗原にはインフルエンザ haemagglutinin (HA) を主成分とするスプリットワクチン抗原を用いて作用機序を解析した。

b. 局所免疫での IgA 抗体誘導、全身免疫での IgG 抗体誘導におけるクラススイッチ促進機序の解析

樹状細胞に取り込まれた抗原シグナルが、その後の T 細胞の活性化と B 細胞のクラス

スイッチの促進にどのように伝達され、抗体誘導の増幅に繋がるかを検討した。今年度の研究では、抗原シグナルの伝達の最初の過程を構成する機序を明らかにするため、マウス骨髄培養細胞から分化させた樹状細胞を用いて、局所免疫と全身免疫へのシグナル伝達を解析した。また、これまで細胞性免疫の作用機序解析には抗原として ovalbumin (OVA) が良く使用されていたことから、HA 抗原以外に OVA を抗原として利用して作用機序解析を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は、徳島大学動物実験委員会の承認を受け、その指針に従い実施した。

C. 研究結果

a. 樹状細胞への抗原の取り込み促進機序の解析

7 週齢の BALB/c マウスの大腿骨より骨髄細胞を採取して、GM-CSF/IL-4 添加培地で 7 日間培養して樹状細胞に分化した細胞を、Anti-CD11c-conjugated magnetic beads を用いて選択的に採取して用いた。この実験系では、培地に添加する HA-SF-10 は CVP の増粘効果で塊となって均一に培地中に分散しないため、HA-SSF の条件で樹状細胞への抗原の取り込み促進機序の解析を実施した。HA の樹状細胞への取り込みは、図 1 に示すように温度依存性で、取り込み促進効果はエネルギー依存性であることが示唆された。37°C の条件で、HA 単独に比べて HA-SSF は約 10.5 倍の促進効果を示した。

次に、HA を fluorescein isothiocyanate (FITC) で、SSF を ATTO488 でラベルして、細胞内に取り込まれるスピードをモニターした。その結果、図 2 に示すように、添加後 5 分間の Lag の後に HA の細胞内への取り込み

は SSF によって急速に促進され、1 時間内では HA 単独の取り込みに比べて約 10 倍の促進効果を示した。HA 蛍光ラベルと SSF 蛍光ラベルの細胞内取り込み過程で、両者は常に共存していることから、HA-SSF は結合したまま細胞内に取り込まれていることが判明した。さらに細胞内へ取り込まれた後の経過では、図 3 に示すように SSF は HA に比べて速やかに消失するだけでなく、細胞内の局在も両者は異なってくることから、別々のオルガネラで分解されると推定された。HA は最終的には微粒子にまで分解された。

次に SSF の HA 取り込み促進効果の作用機序を解析するために、マウス骨髄由来の樹状細胞 (5×10^5 cells) にナトリウムチャンネル阻害を介したエンドサイトーシス阻害剤の Amiloride、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤の Chlorpromazine、アクチン重合阻害剤の Cytochalasin B、Cytochalasin D をそれぞれ 1 時間添加して蛍光色素 ATTO488 標識 HA の取り込みをフローサイトメトリーで検証した。阻害剤無添加の HA+SSF の細胞内への取り込みを 1 とした時の、各種条件下の取り込み抑制効果を図 4 に示している。これらの中で、Amiloride が濃度依存性に HA の取り込みを阻害していることから、SSF による HA の取り込み促進効果は、Amiloride で抑制されるマクロピノサイトーシスと推定された。なお Cytochalasin B を添加した実験系では、僅かな阻害傾向が見られたが、統系学的有意差はなかった。

HA 抗原を取り込んだ樹状細胞では、樹状細胞の活性化マーカーの CD86 の発現が増加することを報告している。そこで図 4 と同じ条件下で細胞を処理した時の、樹状細胞表面の活性化マーカー CD86 を指標に各種阻

害剤の効果を検証した結果を図 5 に示す。図に示すように、Amiloride の処理のみで CD86 の発現レベルが有意に減少しており、SSF は HA 抗原をマクロピノサイトーシスで細胞に取り込んで抗原シグナルを発現していることが判明した。

b. 局所免疫での IgA 抗体誘導、全身免疫での IgG 抗体誘導におけるクラススイッチ促進機序の解析

樹状細胞に取り込まれた抗原シグナルが、その後の T 細胞の活性化と B 細胞のクラススイッチの促進にどのように伝達され、抗体誘導の増幅に繋がるかを検討した。これらの中でも、T 細胞非依存性に鼻粘膜局所で樹状細胞から直接 B 細胞に抗原シグナルが伝達されて IgA 産生のクラススイッチが促進される系と、T 細胞依存性のシグナル伝達系が知られている。

図 6 に T 細胞非依存性の抗原シグナル伝達系に関与すると言われる因子群、BAFF、APRIL、TACI、BAFF-R を示している。調べた 4 種に因子の中で、BAFF の転写のみが図 7 に示すように HA+SSF によって増加していた。またこの実験では、HA 抗原以外に食物アレルギーワクチンを想定して、卵の主要な食物抗原である Ovalbumin (OVA) を添加した場合も検証しているが、HA と同様 OVA でも BAFF の発現は増加していた。なお、この実験ではアジュバント単独で樹状細胞を刺激することが報告されている Poly(I:C) を添加して Positive Control としている。Poly(I:C) は、抗原非存在下に単独で著明に樹状細胞を刺激してその効果は長時間持続することを確認している (データ非表示)。このことは、樹状細胞を刺激する図 2 に示したアジュバント群が、その副作用として自己免疫疾患を誘導することに関係してい

ることを示唆するかもしれない。

抗原を取り込んだ樹状細胞から T 細胞を介して抗原シグナルが伝達されるさいに関与するとされる MHC class I と MHC class II のシグナル伝達系を図 8 に示す。従来の研究で、HA+SSF で MHC class II のシグナル伝達が増強されることを報告していることから、今年度の研究では MHC class I を介する細胞性免疫系への関与を検証した。

図 9 に示すように樹状細胞の小胞体への抗原の取り込みに関与する因子の TAP1 の発現が有意に増加していた。HA+SSF 以外でも OVA+SSF でも同様に増加しており、この TAP1 の増加は Poly(I:C) でも認められた。

TAP1 を介して小胞体に取り込まれた抗原は抗原ペプチドにまで分解され、さらに抗原ペプチドは図 10 に示すように、樹状細胞の MHC class I 上に提示され、CD8⁺ T 細胞に抗原情報は伝達される。このように活性化された CD8⁺ T 細胞は、インターフェロン (IFN) γ を産生する細胞障害性 CD8T 細胞に分化する。抗原情報によって活性化された CD8T 細胞 (細胞障害性 CD8T 細胞) が産生されているかを次に検証した。BALB/c マウスに生理食塩水、HA 抗原、HA+SF-10、HA+Poly(I:C) のそれぞれを 3 回点鼻した 4 群から鼻腔内細胞を収集して、抗 CD8 陽性、抗 IFN γ 産生細胞を測定した結果を図 11 に示す。樹状細胞からの抗原情報が CD8T 細胞に伝達され、活性化を受けてインターフェロン (IFN) γ を産生している細胞障害性 CD8T 細胞の比率が棒で示されている。生理食塩水や HA 単独投与に比べて HA-SF-10 投与群と HA-Poly(I:C) 投与群では細胞障害性 CD8T 細胞が増加していることがわかる。さらに抗原情報を刷り込まれた CD8T 細胞の測定系として汎用されている OVA/MHC Tetramer を用いた測定を同様に実施した。

ここでは、BALB/c マウスに生理食塩水、OVA 抗原、OVA+SF-10、OVA+Poly(I:C) のそれぞれを 3 回点鼻した 4 群から鼻腔内細胞を収集して、図 12 に示すように抗 CD8 陽性 OVA/MHC Tetramer 結合細胞をカウントして棒にしめした。SF-10 は Poly(I:C) と同様に OVA 抗原を認識した細胞障害性 CD8T 細胞の有意な増加を示した。

以上から、SF-10 は抗原情報を T 細胞非依存性に鼻腔局所で B 細胞の情報を伝えると共に、T 細胞依存性の経路を介して MHC class I と MHC class II に抗原シグナルを伝達して、液性免疫と細胞性免疫の両方を活性化していることが示唆された。

D. 考察

本プロジェクトでは、安全性と抗体誘導の有効性を両立させるアジュバントとして、代謝回転の速い生体成分として肺サーファクタントに注目し、肺サーファクタントに類似した大量生産可能な人工合成肺サーファクタント SF-10 を完成させて、免疫系への過剰刺激を抑制した抗原運搬体としてのアジュバントを世界で最初に完成させた。さらにアジュバントの投与を自然感染ルートにすることで、生体が持つ様々な生体防御機能をフル動員することで、極めて有効な抗体誘導効果を実験した。これまでのアジュバントでは、安全性と有効性を両立させることは困難であったが、代謝回転の速い生体成分に着目することで、安全でしかも世界で最も強力な粘膜免疫アジュバントを完成させた。本プロジェクトでは、抗体誘導効果が強力であるのに、炎症反応や自己免疫反応が認められないかについて、その作用機序を解析する目的で実施された。

SF-10 アジュバントの作用機序の解析の結果、抗体誘導については粘膜局所の樹状