

incubated with the indicated antibodies for 1 h at 4 °C. Protein G-sepharose beads were added to collect the immunocomplexes for an additional 1 h of incubation. The pellets were washed three times with lysis buffer. The mitochondria and cytosol fractions were prepared as described previously.⁴⁵

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay. ChIP assays were performed as described previously,⁴⁶ using an EZ ChIP kit (Upstate Biotechnology Inc., Waltham, MA, USA). Briefly, after adding formaldehyde, A549 cells were suspended in SDS lysis buffer and the chromatin DNA was disrupted by sonication. For the immunoprecipitation, the lysate was incubated with anti-HSF-1 antibody, followed by immobilization on salmon sperm DNA/Protein G agarose. The protein/DNA complexes extracted with elution buffer were heated to 65 °C for 6 h to reverse cross-links, then digested with proteinase K. DNA fragments were amplified in PCR with the ChIP assay primers containing the heat shock element sites in human Hsp70 promoter. PCR primers for the ChIP assay were as follows: Hsp70 (-103/+7) (F) 5'-TGATTGGTCCAAGGAAGGCT-3' and (R) 5'-AAAAGGTAGTGGACTGTCCG-3'.

Reverse transcriptase-PCR. RT-PCR was carried out, using a Qiagen (Valencia, CA, USA) One-Step RT-PCR Kit. We used the following primer pairs to amplify. Hsp70, (F) 5'-ATGAAGCACTGGCCTTTCCA-3', (R) 5'-TTGTTCTGGC TGATGTCCTT-3'; Hsc70, (F) 5'-TGGAAGTATTGCTGGTCTCAA3', (R) 5'-AG AACCACCAACCAGGACAAT-3'; HSF-1, (F) 5'-TTCGACCAGGCGCATTT-3'; (R) 5'-AGAGCTGGCCACAGCATCA-3'; actin, (F) 5'-AGAGGCATCCTCACCTG A-3'; (R) 5'-CATCTCTTGGCTCGAAGTCCA-3'. The products were examined by agarose gel electrophoresis after 23 cycles.

RNA interference. The sequences of the sense strands used to generate specific siRNA were obtained as follows: HSF-1, 5'-AAGTACTTCAAGCACAAC AA-3', 5'-AAGAGTGAAGACATAAAGAT-3', 5'-AAGTCGTCAACAAGCTCATT-3'. The siRNAs were synthesized using the Silencer siRNA construction kit (Ambion; Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA). Double-stranded Hsp70 and control siRNA duplex were synthesized as followed by Qiagen: Hsp70-specific sequence, 5'-CCAUUGAGGAGGUAGAUUAdTdT-3'. A549 cells were transfected with each siRNA (10 nmol/l) using the Lipofectamine 2000 (Invitrogen; Applied Biosystems Inc.), and grown for 72 h to allow an effective decrease in the expression of the respective target molecules.

Quantification of apoptosis by flow cytometry. A549 cells were washed with Annexin V staining buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂), and incubated with CF488A-Annexin V and propidium iodide (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) in staining buffer for 30 min at 37 °C in the dark. Fluorescence was measured using a FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and the data were analyzed with CellQuest software (BD Biosciences).

JC-1 staining and quantification. A549 cells were cultured at 37 °C for 48 h on glass chamber slides and treated with ibuprofen and cisplatin at the specified concentrations for 48 h. Mitochondrial permeability transition was determined by staining the cells with 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1,3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin iodide (JC-1; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in the dark. The cells were subsequently washed with assay buffer according to the manufacturer's protocol and immediately imaged using a fluorescence microscope (Keyence Corporation, Osaka, Japan) with the red ($\lambda_{excitation}$: 560 ± 40 nm band pass filter, $\lambda_{detection}$: 630 ± 60 nm band pass filter) and green ($\lambda_{excitation}$: 470 ± 40 nm band pass filter, $\lambda_{detection}$: 535 ± 50 nm band pass filter) fluorescence channels. Flow cytometric analysis was assayed with the JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Kit (AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, USA) according to the manufacturer's directions, using a FACSCalibur, and the results were analyzed by CellQuest software.

In vitro caspase-9 activity determination. Caspase-9 activity was measured by a fluorometric assay in whole-cell lysates using Ac-Leu-Glu-His-Asp-MCA substrate (Peptide International Inc., Louisville, KY, USA). A549 cell extracts were mixed with Ac-LEHD-MCA in ICE standard buffer (100 mM HEPES pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM PMSF), and cleavage of the fluorogenic peptide substrate was monitored at 37 °C for 30 min by a SPECTRA max GEMINI EM (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA) fluorometer with excitation at 370 nm and emission at 460 nm.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This work was supported, in part, by a Grant-in-Aid (23591477) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

1. Tavaría M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1: 23–28.
2. Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 1999; 248: 30–43.
3. Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaualkhandi D, Sharif R, Dawra R *et al*. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreas adenocarcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 616–625.
4. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 570–574.
5. Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M *et al*. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 7099–7105.
6. Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* 1998; 79: 468–475.
7. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 277–288.
8. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI *et al*. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 1997; 272: 18033–18037.
9. Meriin AB, Yaglom JA, Gabai VL, Zon L, Ganiatsas S, Mosser DD *et al*. Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by Hsp72. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2547–2555.
10. Park HS, Cho SG, Kim GK, Hwang HS, Noh KT, Kim MS *et al*. Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7721–7730.
11. Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 2004; 23: 2907–2918.
12. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T *et al*. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 469–475.
13. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 476–483.
14. Zermati Y, Garrido C, Amselem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F *et al*. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 2001; 193: 247–254.
15. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leu Biol* 2007; 81: 15–27.
16. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ* 2004; 11: 390–402.
17. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CZ, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 2005; 280: 38729–38739.
18. Hosokawa N, Hirayoshi K, Nakai A, Hosokawa Y, Marui N, Yoshida M *et al*. Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct Funct* 1990; 15: 393–401.
19. Yokota S, Kitahara M, Nagata K. Benzylidene lactam compound, KNK437, a novel inhibitor of acquisition of thermotolerance and heat shock protein induction in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60: 2942–2948.
20. Westerheide SD, Kawahara TL, Orton K, Morimoto RI. Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *J Biol Chem* 2006; 281: 9616–9622.
21. Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaualkhandi D, Sharif R, Dawra R *et al*. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 616–625.
22. Phillips PA, Dudeja V, McCarroll JA, Borja-Cacho D, Dawra RK, Grizzle WE *et al*. Triptolide induces pancreatic cancer cell death via inhibition of heat shock protein 70. *Cancer Res* 2007; 67: 9407–9416.
23. Giardiello FM, Offerhaus GJ, DuBois RN. The role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer prevention. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1071–1076.
24. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 252–266.
25. Smalley WE, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 1997; 39: 1–20.

26. Shiff SJ, Koutsos MI, Qiao L, Rigas B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. *Exp Cell Res* 1996; **222**: 179–188.
27. Klampfer L, Cammenga J, Wisniewski HG, Nimer SD. Sodium salicylate activates caspases and induces apoptosis of myeloid leukemia cell lines. *Blood* 1999; **93**: 2386–2394.
28. Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL, Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest* 1995; **96**: 491–503.
29. Yao M, Zhou W, Sangha S, Albert A, Chang AJ, Liu TC *et al*. Effect of nonselective cyclooxygenase inhibition with low-dose ibuprofen on tumor growth, angiogenesis, metastasis, and survival in a mouse model of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 1618–1628.
30. Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 2000; **290**: 989–992.
31. Liou JY, Ghelani D, Yeh S, Wu KK. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce colorectal cancer cell apoptosis by suppressing 14-3-3 σ . *Cancer Res* 2007; **67**: 3185–3191.
32. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; **22**: 7265–7279.
33. Cho HJ, Kim JK, Kim KD, Yoon HK, Cho MY, Park YP *et al*. Upregulation of Bcl2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. *Cancer Lett* 2006; **237**: 56–66.
34. Bonay M, Soler P, Riquet M, Ballesti JP, Hance AJ, Tazi A *et al*. Expression of heat shock proteins in human lung and lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; **10**: 453–461.
35. Michils A, Redivo M, Zegers de Beyl V, de Maertelaer V, Jacobovitz D, Rocmans P *et al*. Increased expression of high but not low molecular weight heat shock proteins in resectable lung carcinoma. *Lung Cancer* 2001; **33**: 59–67.
36. Huang Q, Zu Y, Fu X, Wu T. Expression of heat shock protein 70 and 27 in non-small cell lung cancer and its clinical significance. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005; **25**: 693–695.
37. Suzuki K, Ito Y, Wakai K, Kawado M, Hashimoto S, Seki N *et al*. Serum heat shock protein 70 levels and lung cancer risk: a case-control study nested in a large cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; **15**: 1733–1737.
38. Zimmermann M, Nickl S, Lambers C, Hacker S, Mitterbauer A, Hoetzenecker K *et al*. Discrimination of clinical stages in non-small cell lung cancer patients by serum HSP27 and HSP70: A multi-institutional case-control study. *Clin Chim Acta* 2012; **413**: 1115–1120.
39. Singh U, Bonqcam-Rudloff E, Westermark B. A DNA sequence directed mutual transcription regulation of HSF1 and NFIX involves novel heat sensitive protein interactions. *PLoS One* 2009; **4**: e5050.
40. Guo F, Rocha K, Bali P, Pranpat M, Fiskus W, Boyapalle S *et al*. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Res* 2005; **65**: 10536–10544.
41. Ren A, Yan G, You B, Sun J. Down-regulation of mammalian sterile 20-like kinase 1 by heat shock protein 70 mediates cisplatin resistance in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2008; **68**: 2266–2273.
42. Wang G, Reed E, Li QQ. Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2004; **12**: 955–965.
43. Juergens RA, Brahmer JR. Adjuvant treatment in non-small cell lung cancer: where are we now? *J Natl Compr Canc Netw* 2006; **4**: 595–600.
44. Steel R, Doherty JP, Buzzard K, Clemons N, Hawkins CJ, Anderson RL. Hsp72 Inhibits Apoptosis Upstream of the Mitochondria and Not through Interactions with Apaf-1. *J Biol Chem* 2004; **279**: 51490–51499.
45. Yano M, Nakamura S, Shiota M, Endo H, Kido H. Gatekeeper role of 14-3-3 σ protein in HIV-1 gp120-mediated apoptosis of human endothelial cells by inactivation of Bad. *AIDS* 2007; **21**: 911–920.
46. Yano M, Nakamura S, Wu X, Okumura Y, Kido H. A novel function of 14-3-3 σ is a heat-shock-related molecular chaperone that dissolves thermal-aggregated proteins. *Mol Biol Cell* 2006; **17**: 4769–4779.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

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

木戸 博

はじめに

肺サーファクタント研究が進むにつれ、界面活性化物質としての作用以外にも他の生命現象に大きくかかわっていることが明らかとなってきた。本稿では、筆者の研究室で展開している肺サーファクタントの“粘膜アジュバント”作用を紹介する。

多くのワクチンが皮下注射、筋肉内注射であるが、この場合、血液中にIgG抗体とIgA抗体を誘導しても、病原体が侵入する気道や腸管粘膜で病原体の侵入を阻止する分泌型IgAの誘導を引き起こすことはない¹⁾²⁾。さらに上記のワクチンの場合、誘導されるIgGはTh2型のIgG1抗体が主体で、細胞性免疫に関与するTh1型のIgG2a抗体の産生は低く抑えられていることがマウスを

Mucosal adjuvant and Delivery system Route Systemic response Mucosal responses

1) 粘膜の樹状細胞刺激物質

Toxin-based adjuvants

CT	ON	+	+
mutant CT	N	+	+
HLT	ON	+	+
mutant HLT	N	+	+
CTA/HLTB	ON	+	+
mutant CTA/HLTB	N	+	+
mutant PTX	N	+	+
mutant STX	N	+	+
STXB	N	+	+

Cytokine-based adjuvants

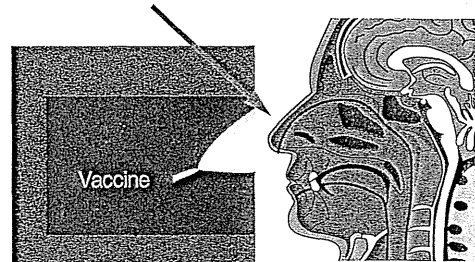
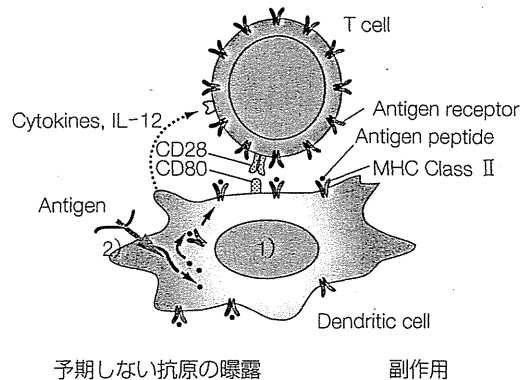
IL-1	N	+	+
IL-6	N	+	-
IL-12	N	+	+
Type I IFN	N	+	+

Innate immunity associated adjuvants

Lptn	N	+	+
RANTES	N	+	+
Defensin	N	+	-
CpG DNA	ON	+	+
Poly(I:C)	ON	+	+
Saponin (QS-21)	O	+	+

2) 粘膜の樹状細胞への抗原運搬体

ISCOM	ON	+	+
Liposome	N	+	+
Live attenuated vectors			
rSalmonella	O	+	+
rBCG	N	+	-
Chitosan	N	+	+
Mucosal DNA vaccine	ON	+	+
Edible vaccine	ON	+	+
Pulmonary Surfactant (SF-10)	N	+	+



アジュバントとしては、体内の半減期が短く速やかに代謝されることが望ましい

図1 これまでに報告されているおもな粘膜アジュバントと抗体誘導部位

O: 経口, N: 経鼻, +: 有効, -: 無効

(13頁カラー図譜参照)

(Yuki Y et al, 2003³⁾を改変引用)

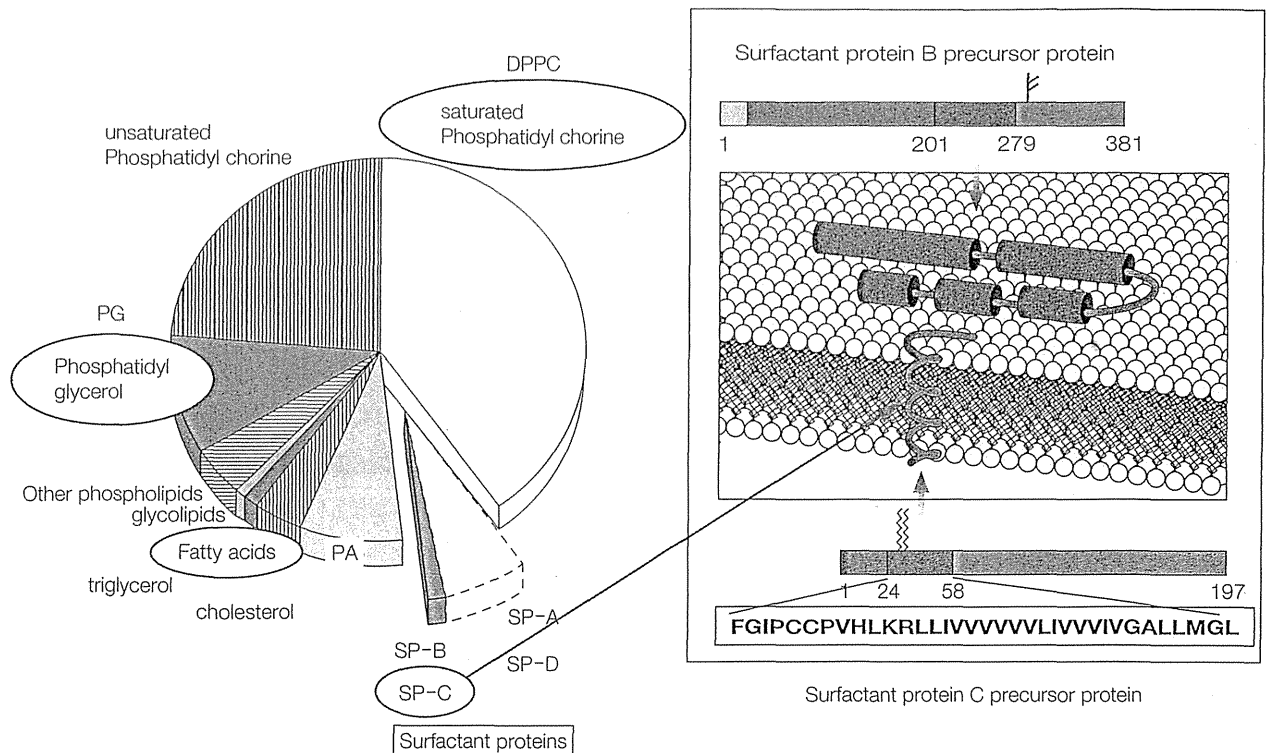


図2 肺サーファクタントの構成成分と粘膜アジュバントとしての有効構成成分
 肺サーファクタントの構成成分中で粘膜アジュバント活性に関与する成分を枠で囲んでいる。
 (14頁カラー図譜参照) (右図: Whitsett JA et al, *N Engl J Med* 347: 2141-2148より改変引用)

用いた実験で判明している。このような抗体産生パターンは、病原体の感染時に生体が示す獲得免疫のパターンと異なっており、生体防御の観点からも不十分な効果といわざるを得ない。自然感染に近い生体防御能を誘導する方法として、過去20年にわたり粘膜ワクチンの優位性が確認されてきたが、絶えず異物の侵入にさらされている気道や腸管粘膜では、異物を排除する機能とバリア機能が発達し、粘膜IgA抗体誘導効果が低く抑えられている。そこでこの問題を解決するためにさまざまな免疫増強物質(アジュバント)が開発されてきたが、その副作用³⁴⁾からいまだに実用化された粘膜アジュバントは無い。このような研究開発状況のなかで、肺の表面を覆う生体成分の肺サーファクタントにきわめて有効な粘膜アジュバント活性が見出され⁵⁶⁾、実用化研究が進んでいる。

粘膜アジュバント開発の現状と肺サーファクタントに由来する新規アジュバント

これまでに報告されている粘膜アジュバントを、粘膜

樹状細胞刺激物質と樹状細胞への抗原運搬物質の2種類に分類して図1に記載する⁷⁾。前者には、毒素とその活性部位変異体(ポリADPリボシル化酵素活性をもつコレラ毒素(CT)と大腸菌易熱毒素(LT)等)、抗体誘導サイトカイン(1型インターフェロン、IL-6、IL-12等)、自然免疫関連分子(CpG DNA, Ampligen [Poly (I:C)]等)が、後者の抗原運搬物質には、リボソーム、キトサン、肺サーファクタント等があげられる。前者は強力な粘膜アジュバントであるが、副反応としてのリスクが高く実用化には至っていない。とくにこれらのアジュバントは、抗原が存在しない状態でもアジュバント単独で抗原提示樹状細胞を活性化することから、自己免疫病を誘発する可能性が危惧されている。後者は、抗原を効率良く樹状細胞に運搬することで抗体を誘導するが、アジュバント自体に樹状細胞を刺激する作用はほとんどみられない。後者のなかでも生体成分である肺サーファクタントの効果的な抗原運搬作用が確認された⁵⁸⁾。

肺サーファクタントは、肺胞II型細胞やクララ細胞からつねに多量に産生される界面活性物質で、肺胞表面を

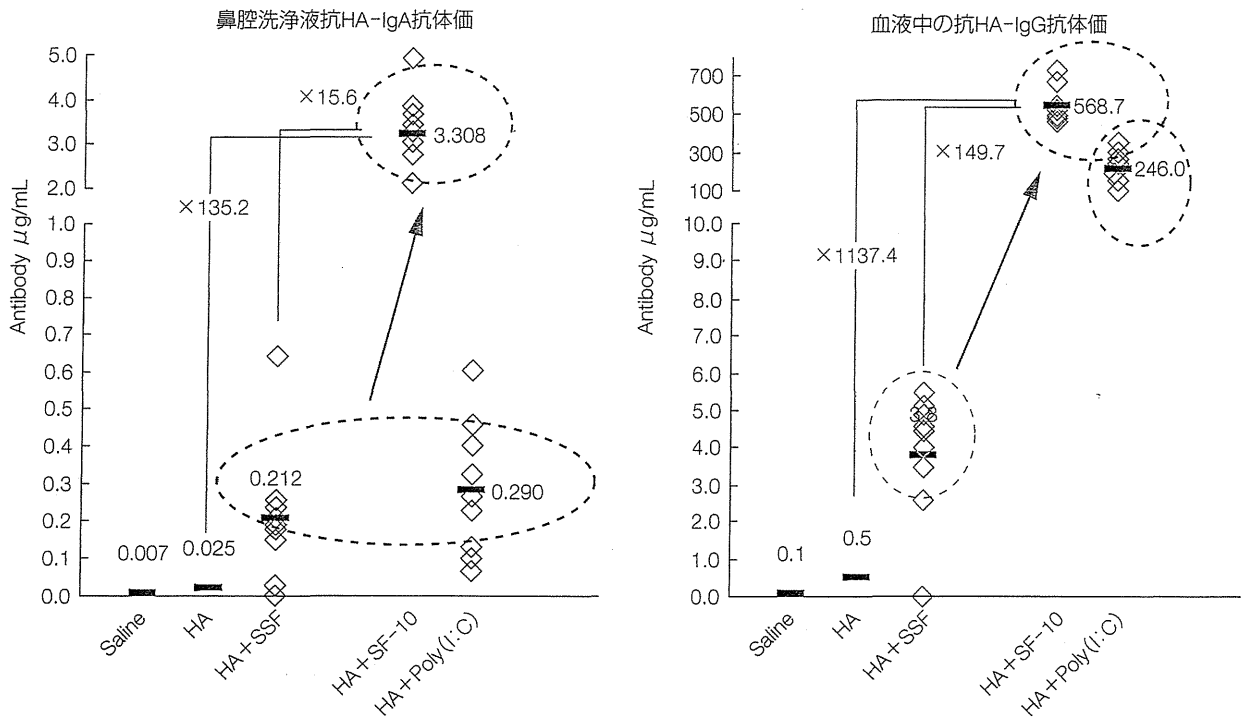


図3 人工合成粘膜アジュバント (SSF), 増粘剤添加 SF-10 アジュバント, Poly (I:C) アジュバントの抗体誘導効果の比較検討
6週齢のBALB/cマウス(雌)に, 生理食塩水 (saline), HAワクチン (HA価=0.1µg, タンパク量=0.2µg), 人工合成アジュバントSSF (リン脂質量2µg), SF-10 (リン脂質量2µg), Poly (I:C) (2µg)を図に示す組み合わせで経鼻接種した後, 2週間間隔でさらに2回追加経鼻免疫をおこない, 最後の免疫から2週間後に, マウスの鼻腔洗浄液中の抗HA-IgA抗体価と, 血液中の抗HA-IgG抗体価を測定した. 抗体誘導増加率を数値で示した. (Kimoto T et al, 2013¹⁰⁾より引用)

覆って肺の界面活性を低下させて呼吸を可能にしているが, 半減期は6~7時間と短く, 約50%が肺胞マクロファージと樹状細胞等に取り込まれて分解されている⁹⁾. 筆者らは, 肺サーファクタントのこのはやい代謝回と肺胞マクロファージと樹状細胞への選択的取り込みに注目した. 図2には肺サーファクタントを構成する組成のなかで, 粘膜アジュバント活性に必要な成分を示す. 肺サーファクタントは全重量の約80%がリン脂質, 10%がその他の脂質, 残り10%がタンパク質で構成される複合体であるが, これらの組成のなかで, ジパルミトイルホスファチジルコリン, ホスファチジルグリセロール, パルミチン酸, 肺サーファクタントタンパク質C (SP-C)が粘膜アジュバント活性に必須の成分であることを明らかにした. これらの情報をもとに, 疎水性が高く工業生産と製剤化に不向きなSP-Cの改良がおこなわれ, 「人工合成粘膜アジュバント」SSFが開発された⁸⁾. SSFにインフルエンザ抗原を加え, さらに鼻腔内の滞留時間

を増加するための増粘剤を添加したSF-10アジュバントが最近完成した¹⁰⁾.

SF-10アジュバントの抗体誘導効果

図3に粘膜アジュバントとして粘膜樹状細胞刺激物質のPoly (I:C)と抗原運搬効果物質としての人工合成肺サーファクタントSSF, SSFにさらに増粘剤を添加したSF-10の抗体誘導効果を示す¹⁰⁾. 図には示していないがSSFに添加した増粘剤単独では, 抗原単独の抗体誘導効果をわずかに後押しするが際立った効果はない. 図3に示すようにインフルエンザウイルスヘマグルチニン(HA)抗原だけでは, 鼻汁中の抗HA-IgA抗体と血液中の抗HA-IgG抗体の誘導は極わずかにしかみられないが, HA+SSF, HA+Poly (I:C), HA+SF-10で有意な鼻汁中の抗HA-IgA抗体と血液中の抗HA-IgG抗体の誘導が観察された. これまで国際的に報告のある鼻汁中の抗HA-IgA抗体の誘導効果は, HA+SSFやHA+

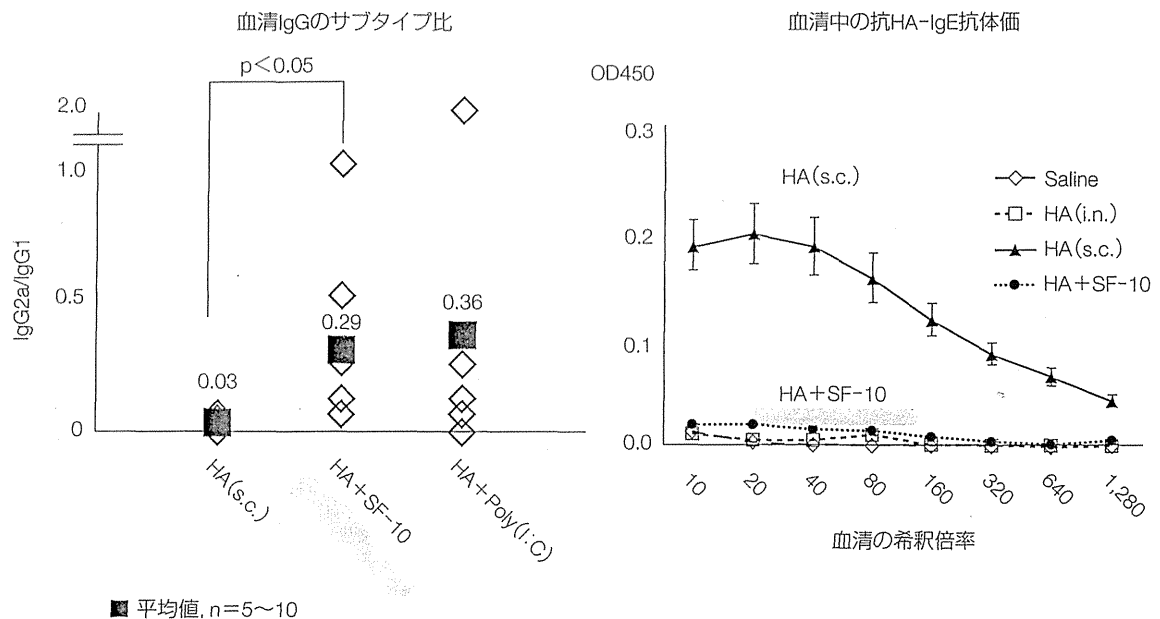


図4 皮下接種ワクチンと経鼻接種ワクチンで誘導される血中の抗インフルエンザHA-IgG抗体サブクラスの違い。経鼻接種HAワクチンにSF-10(リン脂質量2 μ g), Poly(I:C)(2 μ g)を添加した抗体誘導条件は図3と同じである。HAワクチン(HA価=0.1 μ g, タンパク量=0.2 μ g)の皮下注射(S.C.)は、2週間隔で2回おこなった。左に誘導された血清IgGのサブクラスの比を示す。右は血清中に誘導された抗HA-IgE抗体価を示す。

(Kimoto T et al, 2013¹⁰⁾より引用)

Poly(I:C)が示す程度の数百ngオーダーの報告がほとんどであるが、HA+SF-10ではこの値をさらに約15倍増強して、 μ gオーダーにまで抗体誘導が増強され、これまでに報告されたアジュバントのなかでも最も効果の高いアジュバントの一つといえる。このように、SF-10は鼻汁中の抗HA-IgA抗体と血液中の抗HA-IgG抗体の両方を誘導するが、SF-10アジュバント単独では粘膜樹状細胞を刺激することは無く、これまで調べた限りにおいて副反応に相当する作用はみられていない。

SF-10アジュバントにより血液中に誘導されたIgG抗体のサブクラスを図4左に示す¹⁰⁾。SF-10アジュバントは、血液中のTh1タイプのIgG2a抗体とTh2タイプのIgG1抗体の両方を誘導して、IgG2a/IgG1比は0.29と比較的自然感染に近いパターンを示した。HA+Poly(I:C)の場合も、IgG2a/IgG1比が0.36とTh1とTh2がともにバランス良く増加している。一方、現行のインフルエンザワクチン接種と同じHA単独の皮下投与群では、IgG2a/IgG1比が0.03で、Th2のみの反応が高くTh1タイプの反応がほとんどみられない。このようなTh2優位の環境下では、抗体誘導のクラススイッチは μ

$\rightarrow \gamma \rightarrow \epsilon$ と進んでHA抗原に対するIgE抗体の産生がみられ、アレルギーリスクの生じることがわかる。実際に、皮下投与群でみられる抗HA-IgE抗体の誘導に対して、Th1とTh2がバランス良く増加したHA+SF-10ではIgE抗体の産生がほとんどみられていない(図4右)。

おわりに

粘膜免疫は次世代の感染予防の切り札として注目されており、経鼻ワクチンは気道感染症の予防に最も有効な手段である。肺サーファクタントは、これまでに未熟児窮迫症候群の特効薬として過去数十年にわたり安全に使用されてきた歴史がある。この生体成分の肺サーファクタントの粘膜アジュバント効果を基盤にした粘膜免疫アジュバントSF-10は、現在有効なワクチン開発がおこなわれていない2歳以下の乳幼児にも適用可能なワクチンのためのアジュバントとして、今後実用化が強く望まれている。

文献

- 1) Clements ML et al: Serum and nasal wash

- antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild type virus. *J Clin Microbiol* 24 : 157-160, 1986
- 2) Tamura SI *et al* : Superior cross-protective effect of nasal vaccination to subcutaneous inoculation with influenza hemagglutinin vaccine. *Eur J Immunol* 22 : 477-481, 1992
 - 3) Mutsch M *et al* : Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 350 : 896-903, 2004
 - 4) Couch RB : Nasal vaccination, Escherichia coli enterotoxin, and Bell's palsy. *N Engl J Med* 350 : 860-861, 2004
 - 5) Mizuno D *et al* : Modified pulmonary surfactant is a potent adjuvant that stimulates the mucosal IgA production in response to the influenza virus antigen. *J Immunol* 176 : 1122-1130, 2006
 - 6) Nishino M *et al* : Influenza vaccine with Surfacten, a modified pulmonary surfactant, induces systemic and mucosal immune responses without side effects in minipigs. *Vaccine* 27 : 5620-5627, 2009
 - 7) Yuki Y *et al* : New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev Med Virol* 13 : 293-310, 2003
 - 8) Mizuno D *et al* : Surfactant protein C is an essential constituent for mucosal adjuvanticity of Surfacten, acting as an antigen delivery vehicle and inducing both local and systemic immunity. *Vaccine* 29 : 5368-5378, 2011
 - 9) Wright JR *et al* : Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir J* 136 : 426-444, 1987
 - 10) Kimoto T *et al* : Intranasal influenza vaccination using a new synthetic mucosal adjuvant SF-10 : induction of potent local and systemic immunity with balanced Th1 and Th2 responses. *Influenza Other Respir Viruses* 7 : 1218-1226, 2013

4. インフルエンザ感染症における粘膜免疫の重要性

徳島大学疾患酵素学研究センター特任教授 木戸 博

key words mucosal immunity, IgA, mucosal adjuvant, nasal vaccine, macrolide antibiotic clarithromycin

動 向

近年インフルエンザ感染は、新型インフルエンザの出現や高病原性鳥インフルエンザのヒト型への変異リスクから、パンデミック対策としてより効果的な予防法と治療法の開発が望まれている。特にインフルエンザ感染で死亡率の高い2歳以下の乳幼児に接種可能なワクチンが開発されていないことは大きな問題で、インフルエンザワクチンに関する国際学会では毎年開発の促進を呼びかけている。現行のインフルエンザワクチンは皮下(筋肉内)接種型で、主に血液中にIgG抗体を誘導して、肺炎と重症化防止に効果的に働いている。しかし、この現行ワクチンの場合、ウイルス侵入門戸の気道粘膜の分泌型IgA (secretory IgA: sIgA) 抗体産生効果や、気道粘膜の細胞性免疫増強効果はほとんどなく^{1, 2)}、感染予防と感染拡大防止効果の点では不十分である。そのため、ウイルス侵入門戸の粘膜免疫を誘導して強い感染予防効果を示す経鼻接種インフルエンザワクチンの開発が望まれている。現在、低温馴化型インフルエンザの経鼻接種生ワクチンが米国とヨーロッパで認可されている。しかし、発熱と共にウイルス増殖が止まるように設計された生ワクチンではあるが、基礎疾患に喘息や慢性気道炎症を伴う場合、

症状が重篤化することがあるため、接種は2歳から49歳までとされ、最も必要とされる年齢層での適用が認められていない^{3, 4)}。世界各国の研究所とワクチン製造メーカーは、安全で有効な粘膜ワクチン開発に向かって研究開発を行っているが、Th1/Th2免疫バランスを大きく乱すことのない安全で有効なアジュバント開発に力点が置かれ始めた。本稿では粘膜免疫の重要性、粘膜アジュバント開発の現状、粘膜免疫を増強するマクロライドについて、最近の報告を中心に概説する。

A. 感染感受性を決定している気道粘膜免疫

病原体の侵入門戸で感染防御を担う気道粘膜の分泌型sIgA抗体は、交叉免疫性が強く主要な初感染防御の機能を担っている⁵⁾。図1に、ヒト鼻汁中の抗インフルエンザ特異sIgA抗体価とインフルエンザの感染感受性との関係を示す⁶⁾。2005/2006年と2006/2007年のインフルエンザワクチン接種時に鼻汁を採取して、抗インフルエンザ特異的sIgA抗体価を測定した。翌年の5月にインフルエンザ感染の有無を調査した結果を示している。感染者の判定は、迅速診断キットで陽性と判定されたヒトをエントリーしており、擬陽

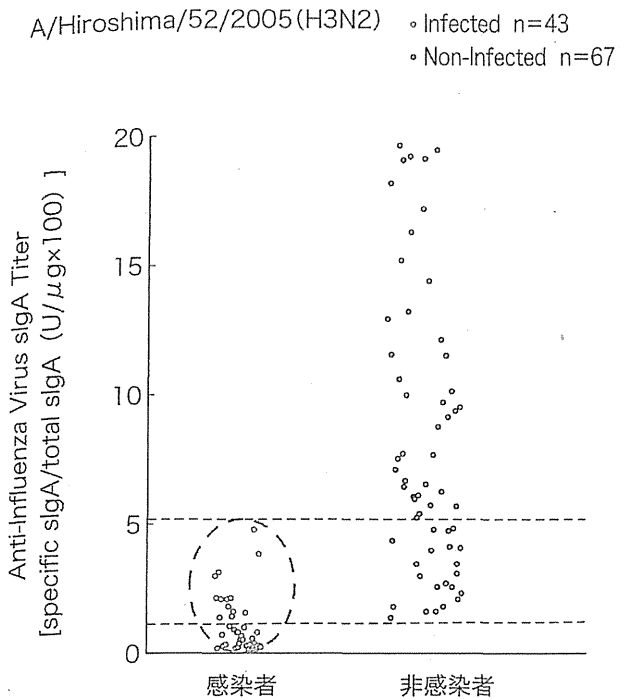


図1 インフルエンザ感染前の鼻汁中の抗インフルエンザ抗体価と感染感受性

2005/2006年, 2006/2007年のインフルエンザシーズンの10月にボランティアから鼻汁を採取し, インフルエンザ特異的sIgA抗体価を測定した. 翌年5月に, インフルエンザに感染したかを調査して相互の関係を調査した結果を示す. 縦軸は, 鼻汁中の全sIgA中に占める抗インフルエンザ特異sIgA量を示す.

性は非感染グループとして扱った. 縦軸は鼻汁の全IgA中に占めるインフルエンザ特異的sIgA抗体量を表示している. インフルエンザに感染したヒトは, 例外なく鼻汁中の抗インフルエンザsIgA抗体価が低く, 非感染者は抗体価が高く, 鼻汁の抗インフルエンザ特異抗体価の測定で感染リスクを判定できることを示している. なお感染リスクの基準値は, インフルエンザの亜型によって異なる. また, インフルエンザ感染者を対象としたRetrospective Study⁷⁾では, 感染者であってもその70%がシーズン前にワクチンを接種しており, 62.5%が皮下注射ワクチンの目標値であるhemagglutinin inhibition (HI) 価 ≥ 40 を示していた. しかし感染者の鼻汁中のsIgA抗体価は例外なく低値を示しており, 血液中のHI価や

IgG抗体価よりは気道粘膜のsIgA抗体価がインフルエンザの感染感受性を決めていることを示している.

B. 粘膜ワクチン開発

現行の皮下注射型インフルエンザワクチンは, 血液のIgG抗体を増加させて感染重症化を効果的に阻止するが, 気道粘膜のsIgA抗体を誘導する効果は極めて弱いことから, 感染予防効果は十分とはいえない^{8,9)}. 感染予防効果を示すsIgA抗体と感染重症化阻止効果を示す血液のIgG抗体を共に誘導する方法が経鼻接種インフルエンザワクチンである^{1,2,5)}. しかし, 気道粘膜は外界から絶えず異物が侵入する部位のため, 異物を効果的に排除する繊毛運動システムと, 異物に対する抗体誘導能を低く保つ仕掛けによって, 生体は生命の恒常性を保っている. そのため粘膜免疫誘導にはワクチン抗原以外に免疫増強剤としてのアジュバントを必要とする. これまでに報告されている粘膜アジュバントの多くは, 抗原提示細胞を刺激するアジュバントと, 抗原を抗原提示細胞に効果的運搬するアジュバントの2種類に分けることができる¹⁰⁾. 前者には, 毒素やその変異体 [ポリADPリボシル化酵素活性を持つコレラ毒素 (CT) と大腸菌易熱毒素 (LT) など], 抗体誘導サイトカイン (1型インターフェロン, IL-12など), 自然免疫関連分子 (CpG DNA, Ampligen [Poly(I)-Poly(C12U)], Proteosome-based adjuvantなど) が挙げられる. これらアジュバントの多くは, ワクチン抗原がなくてもアジュバント単独で抗原提示細胞を強く活性化する効果的なアジュバントであるため, ヒトによっては抗原提示細胞の活性化が予想外に進む場合が想定される. すなわち, 免疫活性化のコントロールが困難な場合で, 副作用として自己免疫等のアジュバント病のリスクを伴うと想定される. これに対して抗原運搬アジュバ

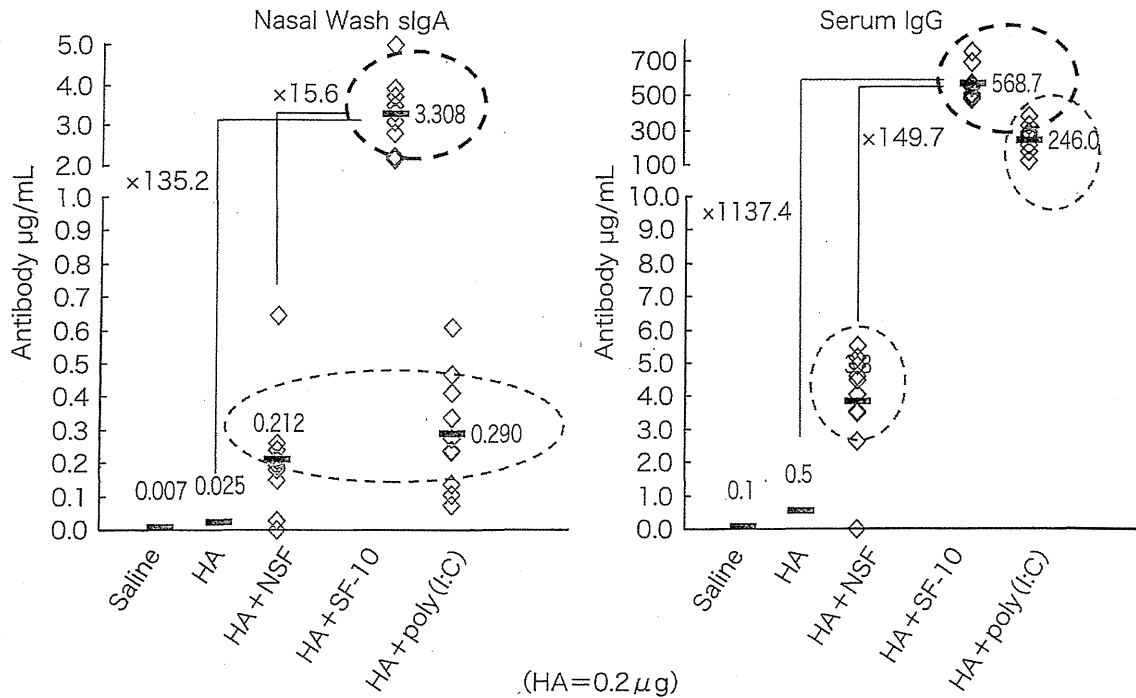


図2 抗原運搬型粘膜アジュバントと抗原提示細胞刺激型アジュバントの鼻汁中のインフルエンザ特異的sIgAと血液中のIgG抗体価の誘導効果の比較検討

BALB/c (雌, 6~8週齢) (1群10匹) にインフルエンザHA抗原としてインフルエンザA/New Caledonia/20/99 (H1N1) (蛋白量0.2µg/匹; HA量0.1µg/匹相当), HA (0.2µg/匹) +天然型肺サーファクタント (NSF, 2µg/匹), HA (0.2µg/匹) +人工合成肺サーファクタントSF-10 (2µg/匹), HA (0.2µg/匹) +poly (I:C) (2µg/匹) を2週間隔で3回経鼻投与して, 最終免疫の2週後の鼻汁中のインフルエンザ特異的sIgAと血液中のIgG抗体価の誘導を検討した. 生理食塩水 (saline) を陰性コントロールとした. 各シンボルはそれぞれの個体が示した抗体価を示し, 横線は平均値を示す.

ントの場合は, アジュバント単独で抗原提示細胞を活性化する危険性はなく, 抗原を効果的に抗原提示細胞に運搬することで抗体誘導を引き起こす. この自然感染に近いルートによる抗体誘導促進効果は比較的マイルドで, 安全性が高いと推定される. 抗原運搬アジュバントの中でも生体成分に由来する肺サーファクタントは, 体内半減期が6~7時間と短く, 抗原運搬後に免疫賦活化のスイッチをOFFにできる安全面での利点を持つ²⁾. 最近, 図2に示すように比較的マイルドな抗原運搬型肺サーファクタントアジュバントでありながら, poly (I:C) 等の抗原提示細胞刺激型アジュバントに匹敵した抗体誘導の著明な肺サーファクタント類似人工合成アジュバント, SF-10¹¹⁾ が報告されて注目されている.

抗原を強制的に体内投与する皮下 (筋肉内) 注

射型のインフルエンザワクチンの場合, Th2型の免疫系が強く活性化されて, 抗原特異性の高い高親和性IgG抗体が産生されるが, Th1/Th2バランスが崩れ, 時にクラススイッチがIgGからIgEに進んだ抗体産生が見られる¹¹⁾. 一方, 経鼻粘膜ワクチンの場合, 自然の異物侵入反応に類似した免疫系の賦活化が見られ, Th1型とTh2型が共に活性化され, Th1/Th2バランスが崩れることは稀である. この場合, 抗体産生系が一方的にTh2型に偏ってしまうことがなく, IgE産生もほとんど見られない¹¹⁾.

C. 粘膜免疫を賦活化するマクロライド系抗菌薬

タミフル, リレンザなどの抗インフルエンザ薬

(シアリダーゼ阻害剤)は、ウイルスの増殖サイクルを抑制して症状を改善するが、同時に体内ウイルス抗原量を減少させるため、獲得免疫誘導が不十分になることが明らかとなった^{12,13)}。特にその影響は、インフルエンザ抗原メモリーの少ない小児、乳幼児で強く、IgG, sIgA 抗体の産生量の低下が観察されるが、免疫系の活性化に比較的多くの抗原を必要とする粘膜sIgA 抗体誘導でその影響は大きい。このことは、次年度の再感染リスクの増大として表れる。最近、抗菌剤のマクロライドの中に、粘膜免疫増強作用を合わせ持つクラリスロマイシン (CAM) が見いだされて注目されている。服用したCAMは気道に高濃度分布するため、気道粘膜の抗原提示細胞が認識した抗原情報をB細胞に伝える因子のB-cell activating

factor of the TNF family (BAFF) の増加が観察された¹⁴⁾。したがって図3に示すごとく、CAMはT細胞非依存性抗体産生経路の中でBAFFの発現を増加させ、B細胞でのIgAクラススイッチに必要なactivation induced cytidine deaminase (AID) の発現量を増強していることが明らかになった。上記のCAMの作用は、免疫メモリーの弱い小児のインフルエンザ感染で著明である。表1に示すように、抗インフルエンザ薬の服用のない群 (No treatment) では、感染後5日後に鼻汁の抗インフルエンザIgA抗体は有意に増加したが、タミフル (OSV), リレンザ (ZNV) の服用者では有意な抗体価の増加は見られなかった¹⁵⁾。感染5日後の抗体価が ≥ 1 倍以上増加している人数 (%) で表すと、No treatment群では60~70%

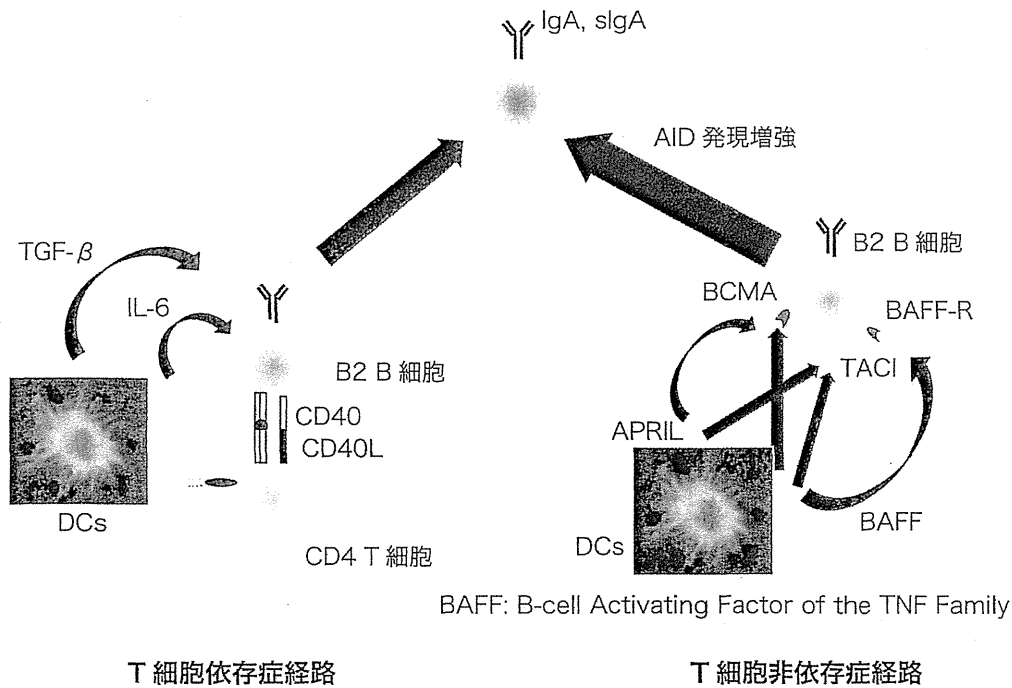


図3 粘膜におけるB細胞からのIgA抗体の産生機序とCAMの作用点 (Takahashi E, et al. Microbes Infect. 2010; 12: 778-83¹³⁾)

粘膜の抗体産生系におけるT細胞依存性経路とT細胞非依存性経路。抗原提示樹状細胞 (DC), B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF), the proliferation-inducing ligand (APRIL), BAFF receptor (BAFF-R), transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor (TACI), B-cell maturation antigen (BCMA), activation-induced cytidine deaminase (AID)を示す。今回の実験では、T細胞非依存性経路におけるCAMの効果を検証した結果、BAFFの発現増加によってB細胞でのAIDの発現が著明に増加してIgA抗体の産生増加が引き起こされたことが判明した。

の増加が見られたが、OSVでは42.9%、ZNVでは37~48%と有意に低下していた。一方、抗体価が ≥ 1 倍以上増加している人数は、OSV+CAM投与群で65~70%と有意に増加し、ZNV+CAMで50~60%と増大が見られた。これらの変化は、翌年の再感染率を示した図4によく反映されており、OSV、ZNV投与群でNo treatment群に比較して有意の増加した再感染率を、CAMの併用で低下させている。粘膜アジュバント効果をヒトで

評価する場合、抗体価が ≥ 4 倍以上増加したヒトの占める割合(%)で評価することが多いが、表に示すように ≥ 4 倍以上増加した人数は各群間で有意差は見られなかった。このことは、CAMはマイルドな粘膜アジュバントとして作用しており、経鼻接種ワクチンの粘膜アジュバントとして使用できるほど強力なアジュバントではないことを示している。むしろCAMはアジュバント病のリスクのないマイルドで安全な粘膜免疫増強剤として

表1 インフルエンザ罹患患者への投薬の違いによる鼻汁中の抗インフルエンザウイルス特異抗体誘導
2008/2009シーズンのインフルエンザ罹患小児に、非投薬(no treatment)、OSV投薬、OSV+CAM投薬、ZNV投薬、ZNV+CAM投薬が行われた。投薬前と5日間の投薬後の鼻汁中の抗インフルエンザウイルス特異sIgA抗体価、median(interquartile range)を示した。

Treatment	n	SIgA concentration				Percentage of patients with ≥ 1 -fold and ≥ 4 -fold increases in anti-IAV-specific SIgA concentration during treatment			
		Anti-IAV-specific SIgA(U/mg protein)				H1N1		N3N2	
		H1N1		H3N2		≥ 1 -fold	≥ 4 -fold	≥ 1 -fold	≥ 4 -fold
		Before	After	Before	After	(After/before)	(After/before)	(After/before)	(After/before)
No treatment	65	2.3(0.5-5.7)	3.1(1.2-7.8)*	2.2(0.6-3.8)	3.1(1.0-6.7) [¶]	61.5	26.2	69.2	15.4
OSV	70	1.3(0.6-5.9)	1.2(0.4-5.0)	1.0(0.4-2.8)	1.1(0.5-3.1)	42.9 [§]	18.6	42.9 [†]	14.3
OSV+CAM	20	0.9(0.3-1.4)	1.9(0.3-12.3)*	0.7(0.2-1.7)	1.5(0.3-7.6) [¶]	65.0 [#]	30.0	70.0 [†]	20.0
ZNV	27	3.8(1.7-12.3)	4.5(0.5-15.8)	2.0(1.4-3.8)	2.6(0.5-7.8)	37.0 [§]	18.5	48.1 [§]	11.1
ZNV+CAM	10	2.0(1.6-7.1)	6.3(2.2-19.5)	1.7(1.2-2.4)	4.3(1.8-11.6)	50.0	30.0	60.0	30.0

*p<0.05, [¶]p<0.01(初診時と比べて5日後の値が有意に増加), [§]p<0.05, [†]p<0.01(no treatmentに比較して有意差を認めた), [#]p<0.06 to 0.09, [†]p<0.05(OSVに比較して有意差を認めた)

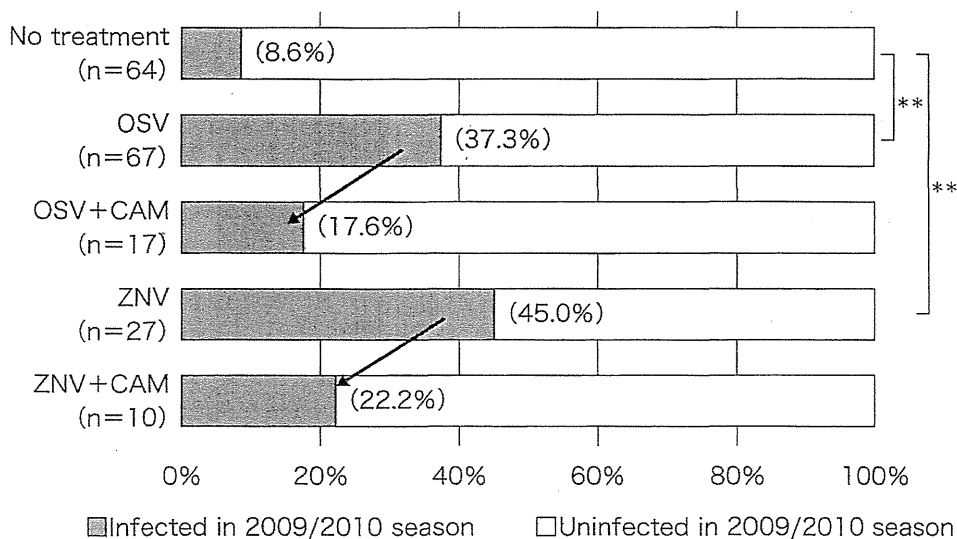


図4 インフルエンザに罹患した患者の翌シーズンにおけるインフルエンザ罹患状況(Shinahara W, et al. PLoS One. 2013; 8: e70060¹⁵⁾)

2008/2009シーズンのインフルエンザ罹患小児に、非投薬(No treatment)、OSV投薬、OSV+CAM投薬、ZNV投薬、ZNV+CAM投薬が行われた。これらの患児の翌2009-2010シーズンにおけるインフルエンザの罹患率を調査した。

位置付けることができる。

D. 今後の展望

2歳以下の乳幼児に投与可能な予防効果の強いインフルエンザワクチンの開発が急務で、世界のワクチン開発研究者は凌ぎを削っている。これらの状況の中で、安全性の高いSF-10アジュバントの治験が期待されている。インフルエンザ以外で乳児死亡率の高い気道感染症として、respiratory syncytial virus (RSV) が注目されている。RSVワクチン開発も近年急速に進展しており、近い将来実用化されると期待している。一方、マイルドな粘膜アジュバント効果と再感染率の低下を示したCAMの効果も、インフルエンザ以外の気道感染症でも証明されるか、今後の検討が期待されている。

文献

- 1) Clements ML, Betts RF, Tierney EL, et al. Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild type virus. *J Clin Microbiol.* 1986; 24: 157-60.
- 2) Mizuno D, Ide-Kurihara M, Ichinomiya T, et al. Modified pulmonary surfactant is a potent adjuvant that stimulates the mucosal IgA production in response to the influenza virus antigen. *J Immunol.* 2006; 176: 1122-30.
- 3) Belshe RB, Edwards KM, Vesikari T, et al. Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children. *N Engl J Med.* 2007; 356: 685-96.
- 4) Esposito S, Montinaro V, Groppali E, et al. Live attenuated intranasal influenza vaccine. *Hum Vaccine Immunother.* 2012; 8: 17-20.
- 5) Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med.* 2005; 11: 45-53.
- 6) 木戸 博, 水野 大, 木本貴士. 粘膜免疫機能とインフルエンザ感染. *小児内科.* 2010; 42: 1541-5.
- 7) Fujimoto C, Takeda N, Matsunaga A, et al. Induction and maintenance of anti-influenza antigen-specific nasal secretory IgA levels and serum IgG levels after influenza infection in adults. *Influenza Other Respi Viruses.* 2012; 6: 396-403.
- 8) Demicheli V, Jefferson T, Rivetti D, et al. Prevention and early treatment of influenza in healthy adults. *Vaccine.* 2000; 18: 957-1030.
- 9) Jefferson T, Rivetti D, Rivetti A, et al. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines in elderly people: a systematic review. *Lancet.* 2005; 366: 1165-74.
- 10) Yuki Y, Kiyono H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev Med Virol.* 2003; 13: 293-310.
- 11) Kimoto T, Mizuno D, Takei T, et al. Intranasal influenza vaccination using a new synthetic mucosal adjuvant SF-10: induction of potent local and systemic immunity with balanced Th1 and Th2 responses. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013; 7: 1218-26.
- 12) Sawabuchi T, Suzuki S, Iwase K, et al. Boost of mucosal secretory immunoglobulin A response by clarithromycin in paediatric influenza. *Respirology.* 2009; 14: 1173-9.
- 13) Takahashi E, Kataoka K, Fujii K, et al. Attenuation of inducible respiratory immune responses by oseltamivir treatment in mice infected with influenza A virus. *Microbes Infect.* 2010; 12: 778-83.
- 14) Takahashi E, Kataoka K, Indalao IL, et al. Oral clarithromycin enhances airway immunoglobulin A (IgA) immunity through induction of IgA class switching recombination and B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family molecule on mucosal dendritic cells in mice infected with influenza A virus. *J Virol.* 2012; 86: 10924-34.
- 15) Shinahara W, Takahashi E, Sawabuchi T, et al. Immunomodulator clarithromycin enhances mucosal and systemic immune responses and reduces re-infection rate in pediatric patients with influenza treated with antiviral neuraminidase inhibitors: A retrospective analysis. *PLoS One.* 2013; 8: e70060.

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（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）による委託業務として、香川征（国立大学法人徳島大学）が実施した平成26年度「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（契約書第1条で定めた委託業務題目）」の成果を取りまとめたものです。