

博士学位論文

正電荷リポソームによる粘膜免疫賦活化機構の解明および
経鼻投与型肺炎球菌ワクチンへの応用

Mechanisms of the mucosal adjuvant activity of the cationic liposomes
and their application to a nasal pneumococcal vaccine

高橋 佐慧子

目次

緒論	---1
略語一覧	---6
実験の部	---7
1) 実験材料	---7
2) 実験方法	---9
第一章 正電荷リポソームの有する粘膜アジュバント活性における 障害関連性分子の関与	
1) 序論	---20
2) 実験結果	---21
第一節 正電荷リポソームのアジュバント効果	
第一項 血清中における IgG 抗体産生及び各粘膜洗浄液における IgA 抗体産生	
第二節 正電荷リポソーム経鼻投与によるゲノム DNA の誘導	
第一項 鼻腔内における細胞死の誘導	
第二項 鼻腔内におけるゲノム DNA の漏出	
第三節 ゲノム DNA 経鼻投与時の抗体産生	
第一項 血清中 IgG 抗体産生及び各粘膜洗浄液中 IgA 抗体産生	
第四節 正電荷リポソームのアジュバント効果におけるゲノム DNA の関与	
第一項 DNase I 処理併用時の血清中 IgG 抗体産生及び各粘膜洗浄液中 IgA 抗体産生	
3) 考察	---28
第二章 正電荷リポソームによる抗原提示細胞への抗原送達効率の増強効果	
1) 序論	---31
2) 実験結果	---32
第一節 <i>In vitro</i> における樹状細胞への取り込み増強効果	
第一項 DC2.4 細胞における正電荷リポソームの毒性	
第二項 DC2.4 細胞における FITC-OVA の取り込み	
第三項 FITC-OVA の 4℃ と 37℃ における取り込み	

第四項 正電荷リポソームの取り込み経路	
第五項 FITC-OVA の取り込み経路	
第六項 正電荷リポソーム併用時の FITC-OVA 取り込み経路	
第七項 正電荷リポソームと FITC-OVA 併用時の取り込み状態	
3) 考察	---33
第三章 正電荷リポソームを用いた経鼻粘膜投与型肺炎球菌ワクチンの開発	
1) 序論	---43
2) 実験結果	---44
第一節 感染実験	
第一項 肺炎球菌感染防御効果	
第二節 PspA と正電荷リポソーム併用時の免疫応答	
第一項 正電荷リポソームと PspA 併用経鼻投与による IL-4、IL-17A、IL-6、INF- γ の産生	
第二項 正電荷リポソームと PspA 併用経鼻投与による血清中 IgG 抗体 及び各粘膜洗浄液中 IgA 抗体産生	
第三節 PspA の樹状細胞への取り込み	
第一項 <i>In vivo</i> における FITC-PspA の樹状細胞への取り込み	
3) 考察	---45
総括	---50
謝辞	---54
研究成果の掲載誌	---55
引用文献	---56

緒論

高度に発達した現代医学であるが、感染症による疾患の治療は困難を伴う。その証拠に世界保健機関(World Health Organization; WHO)の調査によると、2015年の死因において感染症が第2位(約17%)を占める¹⁾。これら感染症による死亡者数は、依然として増加傾向にある。その背景として、グローバル化によるヒト・モノの移動増加、急速な人口増加に伴う都市化の進行、開発による熱帯雨林帯へのヒトの侵入増加、および温暖化を代表とする気候変動などの環境的要因が挙げられる^{1,2)}。加えて、感染症の増加には免疫抑制療法の発達、エイズ患者の増加または薬剤耐性菌の増加などの医療的要因も関わっていると考えられている³⁾。故に、感染症の撲滅に向けた新たな機構を有する抗生剤や新しい視点からの感染症克服戦略の開発が望まれている。

これらの中に粘膜ワクチンがあり、世界中で盛んに研究が行われている。ワクチンは人類最大の発明の1つとされ、1798年のエドワード・ジェンナーによる天然痘ワクチンと1885年のルイ・パスツールによる狂犬病ワクチンを始まりとする⁴⁾。今日までに多くの感染症に対するワクチンが開発され、感染症予防に多大な貢献を果たしてきた⁵⁻⁷⁾。ワクチンは、① 病原体そのものあるいは弱毒化した病原体を用いた生ワクチン、② ホルマリン等で不活化した病原体を用いた不活化ワクチン、および③ 病原体自体ではなく、病原体由来抗原を利用したサブユニットワクチンの3つに分類される^{8,9)}(Table 1)。生ワクチンあるいは不活化ワクチンは病原体そのものの接種を必要とするため、副作用などの有害事象が避けられない¹⁰⁾。したがって近年、安全性の問題を解決すべく、サブユニットワクチンの研究開発が必要とされている。

Table 1. Classification of vaccines

1) Live vaccine	2) Inactivated vaccine	3) Subunit vaccine
Calmette-guerin bacillus (BCG) vaccine	Diphtheria-tetanus-pertussis-polio vaccine	Hepatitis B vaccine
Measles-rubella (MR) vaccine	Influenza virus vaccine	Pneumococcal vaccine
Measles vaccine	Pneumococcal vaccine	Meningococcal vaccine
Rubella vaccine	Poliovirus vaccine	Haemophilus influenzae type b vaccine
Varicella vaccine	Hepatitis A vaccine	
Mumps vaccine	Diphtheria-tetanus vaccine	
Rotavirus vaccine		
Yellow fever vaccine		

感染症予防に効果を上げてきたワクチンであるが、従来型のワクチン製剤には致命的な問題点が存在する。既存のほぼ全てのワクチンである注射型(筋肉注射

型または皮下注射型)のワクチンは、全身性(即ち血中循環中)の抗原特異的な免疫応答を誘導することで、感染に伴う病原微生物の体内からの排除と病態悪化の抑制を可能としている¹¹⁾。しかしながら、従来型ワクチンは多くの病原微生物の侵入経路あるいは感染部位である粘膜面での抗原特異的免疫誘導能が低いため、病原微生物の侵入を阻害、つまり感染そのものを抑えるという観点での防御効果は期待できない。言い換えると、既存のワクチンは感染成立後の防御効果しか期待できないという重大な欠陥を内包している¹¹⁾。

このような背景から、粘膜面において抗原特異的な免疫応答を誘導可能な粘膜ワクチンが次世代の感染症克服法として有望視されている。粘膜ワクチンは、経口、経鼻、経肛門、舌下または点眼など様々な経路を用いて経粘膜的にワクチンを接種するシステムであり、全身面だけでなく粘膜面においても免疫応答を誘導可能な利点を有している。従って粘膜ワクチンは、従来型のワクチンと比較し、粘膜面を介して感染が成立する多くの病原体に対して絶大な効果が期待できる¹¹⁾。また、注射型のワクチンとは異なり注射針が不要な非侵襲的投与方法であるため、医師でなくとも接種が可能である。さらに、医療廃棄物が少ないなど実用面からも利点が多い¹²⁾(Table 2)。

Table 2. Comparison of conventional vaccine with mucosal vaccine.

		Conventional vaccine	Mucosal vaccine
In terms of effect	Merit	Induced systemic immunity	Induced systemic immunity and mucosal immunity Induced mucosal immunity in out of injection site
	Demerit	unable to induce mucosal immunity	Insufficient effect when administered only antigen
In terms of practical use	Merit	Many empirical data	Non invasiveness Conveniently administration
	Demerit	Discarded medical waste The need for technique	The presence of physical barrier (mucus and glycocalyx) Stability (degradation by digestive enzyme)

粘膜組織は、脾臓およびリンパ節といった全身免疫を担う組織と異なったユニークな性質を備えている。中でも特徴的な性質として、IgA (Immunoglobulin A) 陽性形質細胞の存在が挙げられる。この粘膜組織に豊富に存在する IgA 陽性形質細胞から産生された二量体もしくは多量体 IgA は、上皮細胞に発現する poly immunoglobulin 受容体により管腔へ輸送され、分泌型 IgA となる。この分泌型 IgA 抗体が、病原体あるいは毒素などに結合することで粘膜面において感染防御機構を発現する¹³⁾(Figure 1)。粘膜組織では粘膜免疫応答を制御あるいは誘導するためのユニークなリンパ組織が発達しており、粘膜関連リンパ組織 (mucosa-associated lymphoid tissue; MALT) と呼ばれる。MALT としては、腸管関

連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue; GALT) や鼻腔関連リンパ組織 (nasopharynx-associated lymphoid tissue; NALT)などが知られている¹⁴⁾。これら MALT 上皮細胞層には管腔に存在する分子の取込を担う M 細胞が存在し、粘膜基底膜側に存在する樹状細胞へ抗原を受け渡すことで抗原特異的免疫応答が誘導される。ここでは、レチノイン酸、interleukin (IL)-4 や transforming growth factor (TGF)- β などにより IgA 陽性 B 細胞へのクラススイッチが誘導される。この IgA 陽性 B 細胞は、粘膜免疫循環帰巢経路 (common mucosal immune system; CMIS)により腸間膜リンパ節を介し血液循環に移行を経て全身の粘膜固有層へ分布される。粘膜固有層に達した IgA 陽性 B 細胞は、IL-5 や IL-6 などにより IgA 陽性形質細胞へ分化し、粘膜面に IgA を産生する¹⁵⁾。これらの特徴的な性質により、例えば経鼻投与ワクチンであっても全身の粘膜面に抗原特異的免疫応答を誘導できる。

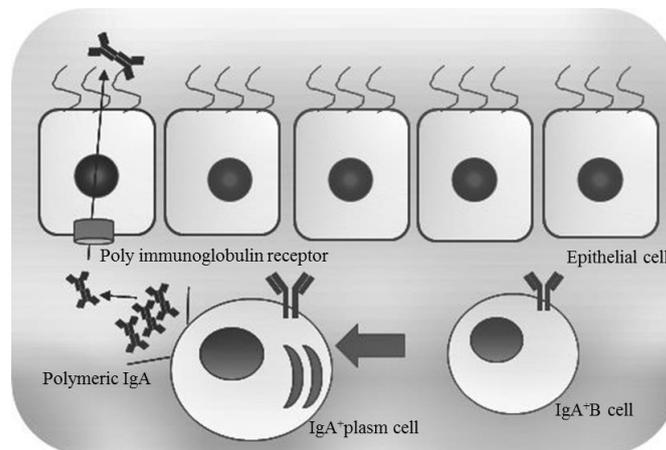


Figure 1. Induction of IgA antibody on mucosa.

上述のように、従来型のワクチンと比べ優位な点の多い粘膜ワクチンであるが、臨床応用されているものは少ない。日本国内においては、ロタウイルスに対する経口生ワクチンのみが認可され臨床応用されている¹⁶⁾。既に述べたように、生ワクチンは生きた病原体そのものを構成成分とするため、安全性に重大な懸念がある。従って、病原体の抗原を用いたサブユニット型粘膜ワクチンの開発が急務であるが、臨床応用には未だに至っていない。この要因として、粘膜面において抗原に対する特異的免疫応答を効果的かつ安全に誘導する方法論に乏しいことが挙げられる。粘膜面は食物を含むヒトに有用な外来抗原に大量に暴露される環境が故に、免疫寛容により本質的に免疫応答を誘導し難い¹⁷⁾。従って、粘膜アジュバントを用いて自然免疫を活性化する、もしくは抗原を粘膜樹状細胞に効率的に送達する必要がある。

これまでに国内外において、粘膜免疫を誘導する方法論が精力的に研究されている。自然免疫の活性化を利用した粘膜アジュバントでは、cholera toxin や

Escherichia coli (*E. coli*) heat-labile toxin があり、強力的に粘膜免疫を賦活化することが知られている¹⁸⁻²⁰。これらは病原体由来の毒素であるため、その毒性を回避するための変異体が開発されている^{18,19}。また、代表的な自然免疫受容体である toll-like receptors (TLRs)リガンドを粘膜アジュバントとして応用したものに CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODN)、polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt (poly(I:C))、flagellin などが報告されている^{21,22}。一方、粘膜樹状細胞への抗原送達を利用した粘膜ワクチンシステムでは、病原体が粘膜下へ侵入する際に用いる分子を利用する方法が考案されている。例えば、*Clostridium perfringens* enterotoxin を抗原との融合蛋白質として発現させ、経粘膜投与することにより、粘膜樹状細胞への抗原送達を介した粘膜免疫更新作用が報告されている²³(Table 3)。しかしながら、これら両者の方法論は共に、病原体由来の分子を利用しているがため、臨床応用を考えた際に抗原性あるいは副作用等の問題が懸念されている。このような背景から、サブユニット型粘膜ワクチンの開発は難しいのが現状である。従って、安全かつ効果的な粘膜ワクチンシステムの開発は、感染症予防あるいは治療の観点から社会的なニーズが高い。

Table 3. Various mucosal adjuvant

	Composition	Target	Immuno-enhancement
TLR ligands	muramyl dipeptide	TLR2	Th1 cells, Th2 cells
	polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt (poly(I:C))	TLR3	Th1 cells
	monophosphoryl lipid A	TLR4	Th1 cells, CTLs
	Flagellin	TLR5	Th1 cells, CTLs
	CpG	TLR9	Th1 cells, CTLs
Enterotoxins	cholera toxin	Gangliosides	Th2 cells, Th17 cells, CTLs
	<i>E. coli</i> heat-labile toxin	Gangliosides	Th1 cells, Th2 cells, Th17 cells, CTLs
Delivery system	OVA linked C-terminal fragment of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin	Dendritic cells	enhanced cellular uptake

これらの問題の解決のため、当教室では病原体由来成分を含まないサブユニット型粘膜ワクチンの開発を目指し研究を行ってきた。この中の1つとして、リポソームに着目したサブユニット型粘膜ワクチンの開発を進めている。リポソームは、生体適合性が高く抗原性が低く、また抗体あるいはペプチドなどの機能性分子をリポソーム表面に修飾することで免疫応答の制御を含む様々な機能性を付加することが容易である点などの利点がある。この過程である種の正電荷脂質である 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) と 3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbonyl] (DC-cho) から構成される正電荷リポソーム(DOTAP/DC-cho リポソーム)が経鼻投与型の粘膜アジュバントとして作用することを見だし報告してきた。即ち、正電荷リポソームをモデル抗原である卵白アルブミン(ovalbumin; OVA)とともに経鼻投与することにより粘膜およ

び全身の両面において抗原特異的な免疫応答を誘導可能であることを明らかにしてきた。この粘膜ワクチンシステムは、マウス *in vivo* において顕著な炎症あるいは体重減少などの毒性を示さないなど安全性も担保されることを確認している^{24,25}(Figure 2)。

しかしながら、正電荷リポソームの有する粘膜アジュバント活性の詳細は活性発現機構および実際に本粘膜ワクチンシステムが感染防御能を有するかについては未解明である。したがって、正電荷リポソームの有する粘膜アジュバント活性の発現機構を解明することで、非病原体成分を用いた効果的かつ高安全性を併せもったサブユニット型粘膜ワクチンシステムの感染症への臨床応用への道が拓けると考えられる。

そこで本研究では、正電荷リポソームの経鼻投与による粘膜および全身免疫の賦活化機構の解明を目指し、自然免疫の活性化および抗原分子の抗原提示細胞への送達効率の両面からの検討を行った。さらに、正電荷リポソームを用いた粘膜ワクチンシステムの感染症への有用性を明らかにすることを目的とした。

本博士論文は、第一章「正電荷リポソームの有する粘膜アジュバント活性における障害関連性分子の関与」、第二章「正電荷リポソームによる抗原提示細胞への抗原送達効率の増強効果」および第三章「正電荷リポソームを用いた経鼻粘膜投与型肺炎球菌ワクチンの開発」により構成されている。

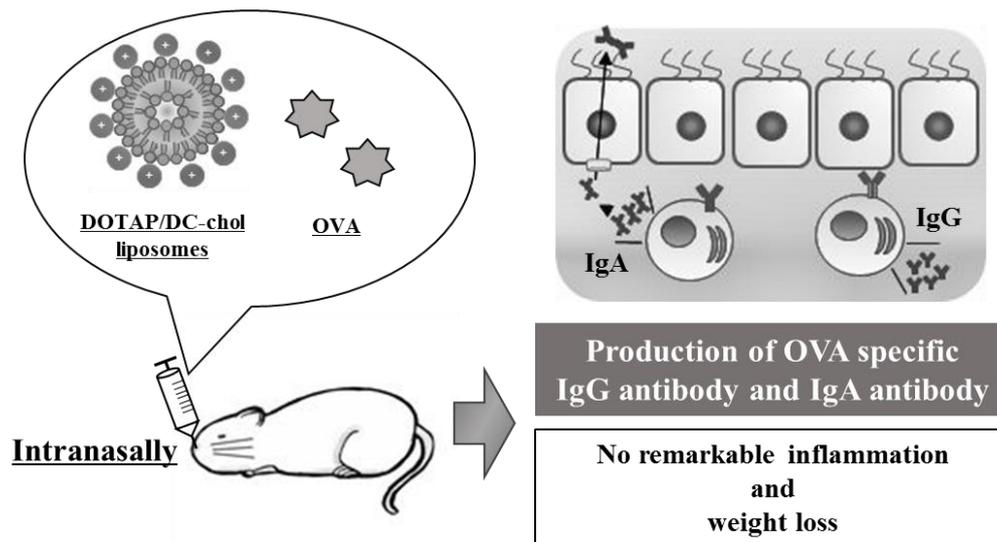


Figure 2. Intranasal immunization with DOTAP cationic liposomes combined with DC-Cholesterol induces potent antigen-specific mucosal and systemic immune responses.

略語一覽

ABC; ATP-binding cassette
BSA; Bovine serum albumin
CLRs; C-type lectin receptors
CMIS; Common mucosal immune system
CpG-ODN; CpG oligodeoxynucleotide
DAMPs; Damage-associated molecular patterns
DC-cholesterol; 3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]
DOTAP; 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
E.coli; *Escherichia coli*
ELISA; Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC; Fluorescein isothiocyanate
GALT; Gut-associated lymphoid tissue
dsDNA; Double-stranded DNA
IFN; Interferon
Irf3; Interferon response factor 3
IgA; Immunoglobulin A
IgG; Immunoglobulin G
IL-4; Interleukin-4
IL-6; Interleukin-6
IL-17A; Interleukin-17A
MALT; Mucosa-associated lymphoid tissue
MMP; Matrix metalloproteinase
NALT; Nasal-associated lymphoid tissue
NLRs; Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat protein
OVA; Ovalbumin
PBS; Phosphate-buffered saline
poly (I: C); Polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt
PRRs; Pattern recognition receptor
PspA; Pneumococcal surface antigen A
RLRs; Retinoic acid-inducible gene I like Receptor
Tfh ; T follicular helper
TLRs; Toll-like receptor
WHO; World Health Organization

実験の部

1) 実験材料

1-1) 実験動物

- ・ SPF 雌性 BALB/c マウスは、日本 SLC より購入し実験に使用した。

1-2) 細胞種

- ・ DC2.4 は、医科学研究所から購入し実験に使用した。

1-3) 試薬

1-3-1) 抗体

- ・ Goat anti-mouse IgG(H+L), human ads-HRP (Southern Biotech)
- ・ Goat anti-mouse IgG1, human ads-HRP (Southern Biotech)
- ・ Goat anti-mouse IgG2a, human ads-HRP (Southern Biotech)
- ・ Goat anti-mouse IgA-HRP (Southern Biotech)
- ・ Anti-CD11c antibody (BD Biosciences)

1-3-2) 各種試薬

- ・ DOTAP (Avanti Polar Lipids)
- ・ DC-Cholesterol (Avanti Polar Lipids)
- ・ Sodium nitroprusside (Sigma-Aldrich)
- ・ クロロホルム (WAKO)
- ・ D-PBS (-) (WAKO)
- ・ オボアルブミン 低エンドトキシン (WAKO)
- ・ DNase I (Roche)
- ・ TMB microwell peroxidase substrate (KPL Inc.)
- ・ 生理食塩水 (大塚製薬)
- ・ ポリオキシエチレン(20) ソルビタンモノオレエート (Tween 20) (WAKO)
- ・ 10× Red blood cell lysis buffer (BioLegend)
- ・ 注射用水 (大塚製薬)
- ・ 7-AAD viability staining solution (Biolegend)
- ・ Fc block reagent (anti-mouse CD16/CD32) (TONBO)
- ・ 分子生物学的用水 (Merck)
- ・ ドミトール (日本全薬工業)

- ・ ミダゾラム (サンド)
- ・ ブトルファノール酒石酸塩 (WAKO)
- ・ アンチセダン (日本全薬工業)
- ・ 塩化ナトリウム (WAKO)
- ・ 塩化カリウム (関東化学)
- ・ リン酸二水素カリウム (WAKO)
- ・ リン酸水素ナトリウム (VETEC)
- ・ 炭酸水素ナトリウム (WAKO)
- ・ 炭酸ナトリウム (WAKO)
- ・ Albumin from bovine serum, cohn fraction V, pH 7.0 (BSA) (WAKO)
- ・ リン酸 (WAKO)
- ・ Chlorpromazine (Sigma-Aldrich)
- ・ ゲニステイン (WAKO)
- ・ Methyl- β -cyclodextrin (Sigma-Aldrich)
- ・ Amiloride (Cayman Chemical Company)
- ・ Cytochalasin D (Sigma-Aldrich)
- ・ FITC-I (DOJINDO)
- ・ Alexa fluor 488-OVA (Life Technologies)
- ・ HW55 カラム (TOSOH)
- ・ 無水 DMSO (WAKO)

1-3-3) その他

- ・ Nunc™ cell-culture treated multidishes (Thermo scientific)
- ・ 96 穴 EIA プレート ハーフエリア 平底 高結合 (Greiner bio-one)
- ・ Clear flat-bottom immuno nonsterile 96-Well Plates (Thermo scientific)

2) 実験方法

2-1 第一章の実験方法

2-1-1) 投与用 5 mg/mL OVA ストック溶液の調整

OVA (Sigma-Aldrich)を秤量し、D-PBS (-) (WAKO) 上に移し、4°Cで一晩静置した。その後、0.22 μm シリンジフィルター (Membrane Solutions)でフィルター滅菌し、使用前まで-20°Cで保管した。

2-1-2) 正電荷リポソームおよび DiI 修飾正電荷リポソーム調整方法

DOTAP (Avanti Polar Lipids)を 10 mg/ml、DC-cholesterol (Avanti Polar Lipids)を 5 mg/ml となるようクロロホルムで溶かし、脂質のストック溶液とした。DOTAP:DC-cholesterol の molar ratio が 1:1 となるようにねじ付き試験管にはかりとり、エバポレーターを用いて溶媒であるクロロホルムを減圧留去し、デシケーターで 60 分以上乾燥させ lipid film を作成した。Lipid film に D-PBS (-) (WAKO) を加え 5 分間 vortex した。その後、0.1 μm 、0.2 μm フィルター (ADVANTEC)を 10 回通し、整粒した。その後、0.45 μm フィルター (IWAKI)で滅菌した溶液を正電荷リポソーム溶液とした。なお、DiI 修飾リポソームは、総脂質に対し molar ratio が 0.1%となるよう DiI 溶液を加え同様に作製したリポソームを DiI 修飾正電荷リポソームとし実験に使用した。

2-1-3) 三種混合麻酔及びメドトミジン拮抗薬の作製法

塩酸メドトミジン(ドミトール[®];日本全薬工業)を 3.75 ml、ミタゾラム (ミタゾラム「サンド」[®];サンド)を 4 ml、酒石酸ブトルファノール (ベトルファール[®];Meiji Seika ファルマ)を 5 ml、生理食塩水(日本薬局方 生理食塩液 大塚生食注;大塚製薬工場)を 37.25 ml をクリーンベンチ内で混合した溶液を三種混合麻酔として実験に使用した。塩酸アチパメゾール(アンチセダン[®];日本全薬工業)を 0.6 ml と生理食塩水 39.4 ml をクリーンベンチ内で混合した溶液をメドトミジン拮抗薬とし実験に使用した。

2-1-4) 採血法及び血清調整法

マウスをジエチルエーテルにて屠殺し、心臓採血により血液を回収した。回収した血液を、室温で 30 分、氷上で 60 分静置後、3000 g、10 分遠心し、上清を回収し、血清サンプルとした。

2-1-5) 鼻腔洗浄液回収法及び調整法

マウスをジエチルエーテルにて屠殺し、断頭し下顎を切除した。気道部より 26G 注射針 (TERUMO) をつけた 1 mL 注射筒内の PBS 250 μ l を流出し、エッペンに回収した。回収した溶液を 3000 g、10 分遠心し、上清を回収し、鼻腔洗浄液とした。

2-1-6) 肺胞洗浄液回収法及び調整法

マウスをジエチルエーテルにて屠殺し、頸部を切開し、気道を漏出させた後、気道に切り込みを入れた。先端に 1000 μ l 用チップの上から 200 μ l 用チップを装着したピペッターを切り込みに挿入し、1 ml PBS で 10 回ピペッティングし、エッペンに回収した。回収した溶液を 3000 g、10 分遠心し、上清を回収し、肺胞洗浄液とした。

2-1-7) 臍洗浄液回収法及び調整法

マウスをジエチルエーテルにて屠殺し、臍に 200 μ l 用チップを装着したピペッターを挿入し、PBS 100 μ l で 10 回ピペッティングしエッペンに回収した。これを 2 回繰り返した。回収溶液を 14000 rpm、5 分、4°C で遠心し、上清を回収し、臍洗浄液とした。

2-1-8) ELISA 法による抗原特異的 IgG, IgA 産生の測定

Sodium bicarbonate buffer (pH 9.5) でそれぞれ 25 μ g/ml に希釈した OVA を ELISA 用プレートの各 well に 50 μ l ずつ加え、4°C で 1 晩放置し、抗原をプレートに固相化した。各 well を PBST で 3 回洗浄し、過剰の抗原を除去後、1% BSA-PBST 200 μ l で 37°C にて 1 時間以上ブロッキングした。各 well を PBST で 3 回洗浄後、1% BSA-PBST で段階希釈した血清または粘膜洗浄液を 50 μ l 加え、4°C で 1 晩放置し、抗原特異的な抗体をプレートに固定した抗原と反応させた。各 well を PBST で 4 回洗浄後、1% BSA-PBST で 4000 倍希釈した goat anti-mouse IgG, human ads-HRP、もしくは goat anti-mouse IgG1, human ads-HRP、もしくは goat anti-mouse IgG2a, human ads-HRP、もしくは goat anti-mouse IgA, human ads-HRP のいずれかを 50 μ l ずつ加え、37°C で 1 時間反応させた。各 well を PBST で 5 回洗浄後、TMB 試薬 を 50 μ l 加え、10 分間反応させた後、1 N リン酸溶液を 50 μ l ずつ加え反応を停止し、450 nm および 650 nm の吸光度を測定した。

2-1-9) 正電荷リポソームの経鼻投与方法

BALB/c マウス 1 匹あたり 200 μ l の三種混合麻酔を腹腔内投与した。片鼻につき 5 μ l (200 nmol) ずつ、計 10 μ l (400 nmol) の正電荷リポソームまたはコントロールとして D-PBS (-) を経鼻投与した。その直後に片鼻につき 1.5 μ l (1.25 μ g) ずつ、計 3 μ l (2.5 μ g) の OVA を経鼻投与した。投与終了後、メデトミジン拮抗薬を 200 μ l ずつ腹腔内投与した。

2-1-10) 鼻粘膜組織の回収

マウスを頸椎脱臼で屠殺し、NALT 及び nasal Passage を 5 ml の PBS が入った 60 mm dish (Thermo) に採取した。アルミメッシュで濾過し 15 ml チューブに回収した。再度 PBS 5 ml で dish を洗浄し、同様な方法でチューブに回収し、鼻腔粘膜組織溶液として実験に用いた。

2-1-11) flow cytometry を用いた鼻腔粘膜組織中の死細胞測定

15 ml チューブに回収した鼻腔粘膜組織溶液を 4°C, 1500 g で 5 分間遠心分離後、上清を捨てた。タッピングし、ACK lysing buffer を 1 ml 加えた直後に PBS を加えた。4°C, 1500 g で 5 分間遠心分離後、上清を捨てた。タッピングし、10 ml の PBS を加え、4°C, 1500 g で 5 分間遠心分離後、上清を捨てた。タッピングし、500 μ l の PBS で再懸濁したのち、ナイロンメッシュを用いて濾液をエッペンに回収した。7-AAD を 5 μ l 加え、5 分後に FACS canto II (BD Biosciences) を用いて死細胞を測定した。

2-1-12) Hoechst 33258 を用いたゲノム DNA の定量法

15 ml チューブに 1 μ g/ml となるよう 1 mg/ml hoechst、10 \times tris-EDTA-sodium buffer、分子生物学的用水を入れた。この溶液を 1 well あたり 200 μ l 添加した。スタンダードとして付属の標品 DNA を 20 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng, 1000 ng となるよう添加した。2-2-5)の方法で回収した鼻腔洗浄液を 1 well あたり 10 μ l 添加した。遮光し 1 時間振盪後、460 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、ゲノム DNA の定量を行った。

2-1-13) 鼻腔におけるゲノム DNA の漏出

BALB/c マウス 1 匹あたり 200 μ l の三種混合麻酔を腹腔内投与した。片鼻につき 5 μ l (200 nmol) ずつ、計 10 μ l (400 nmol) の正電荷リポソームまたはコントロールとして D-PBS (-) を経鼻投与した。その直後に片鼻につき 1.5 μ l (1.25 μ g) ずつ、計 3 μ l (2.5 μ g) の OVA を経鼻投与した。投与終了後、メデトミジン拮抗薬を 200 μ l ずつ腹腔内投与した。0, 3, 6, 9, 16 時間後にマウスをジエチルエーテル

にて屠殺し、断頭し下顎を切除した。気道部より 26G 注射針 (TERUMO) をつけた 1 mL 注射筒内の PBS 250 μ l を流出し、エッペンに回収した。回収した溶液を 3000 g、10 分遠心し、上清を回収し、鼻腔洗浄液とし、15 ml チューブに 1 μ g/ml となるよう 1 mg/ml hoechst、10 \times tris-EDTA-natrium buffer、分子生物学的用水を入れた。この溶液を 1 well あたり 200 μ l 添加した。スタンダードとして付属の標品 DNA を 20 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng, 1000 ng となるよう添加した。2-2-5)の方法で回収した鼻腔洗浄液を 1 well あたり 10 μ l 添加した。遮光し 1 時間振盪後、460 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、ゲノム DNA の定量を行った。

2-1-14) NucleoSpin Tissue を用いたゲノム DNA 精製

BALB/c マウス (6 週齢、雌性) を頸椎脱臼で屠殺し、脾臓を 25 mg エッペン内に摘出した。回収した脾臓を細断した後、180 μ l buffer T1 を入れ vortex した。次に 25 μ l proteinase K を添加した。完全に分解されるまで (およそ一晩静置) 56 $^{\circ}$ C でインキュベートした。その後、室温で 10 分間インキュベートし、RNase を 20 μ l 加え、5 分間放置した。その後、vortex し、200 μ l buffer B3 を加え、vortex した。次に、70 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートしたのち、vortex した。210 μ l ethanol を加え、vortex し、サンプル分のカラムとコレクションチューブを用意し、溶液を入れた。11000 g で 1 分間遠心したのち、フロースルーとともにチューブを捨て、カラムを新しいチューブに取り付け、500 μ l buffer BW をカラムに入れた。11000 g で 1 分間遠心したのち、カラムを外し、フロースルーを捨て、600 μ l buffer B5 をカラムに入れた。11000 g で 1 分間遠心したのち、カラムを外し、フロースルーを捨て、11000 g で 1 分間遠心した。カラムをエッペンに取り付け、100 μ l 注射用水をアプライしたのち、室温で 1 分間放置し、11000 g で 1 分間遠心した。溶出された溶液をゲノム DNA 精製液とし、実験に使用した。

2-1-15) ゲノム DNA 経鼻投与時の抗体産生

BALB/c マウス一匹に対し、200 μ l の三種混合麻酔を腹腔内投与した。片鼻につきゲノム DNA を 5 μ l (2.5 ng または 25 ng または 250 ng) ずつ、計 10 μ l (5 ng または 50 ng または 500 ng) またはコントロールとして D-PBS (-) を経鼻投与した。その直後に片鼻につき 1.5 μ l (1.25 μ g) ずつ、計 3 μ l (2.5 μ g) の OVA を経鼻投与した。投与終了後、メデトミジン拮抗薬を 200 μ l ずつ腹腔内投与した。これを、day 0, day 7, day 14 で行い、day 21 に、マウスをジエチルエーテルにて屠殺し、心臓採血により血液を回収した。回収した血液を、室温で 30 分、氷上で 60 分静置後、3000 g、10 分遠心し、上清を回収し、血清サンプルとした。また、

気道部より 26G 注射針 (TERUMO)をつけた 1 mL 注射筒内の PBS 250 μ l を流出し、エッペンに回収した。回収した溶液を 3000 g、10 分遠心し、上清を回収し、鼻腔洗浄液とした。また、頸部を切開し、気道を漏出させた後、気道に切り込みを入れた。先端に 1000 μ l 用チップの上から 200 μ l 用チップを装着したピペッターを切り込みに挿入し、1 ml PBS で 10 回ピペッティングし、エッペンに回収した。回収した溶液を 3000 g、10 分遠心し、上清を回収し、肺胞洗浄液とした。また、マウスをジエチルエーテルにて屠殺し、臍に 200 μ l 用チップを装着したピペッターを挿入し、PBS 100 μ l で 10 回ピペッティングしエッペンに回収した。これを 2 回繰り返した。回収溶液を 14000 rpm、5 分、4°C で遠心し、上清を回収し、臍洗浄液とした。回収した血清及び粘膜洗浄液中の IgG 抗体及び IgA 抗体の抗体価を算出した。

2-1-16) DNase I 処理併用時の正電荷リポソームと OVA 経鼻投与における

血清中の IgG 抗体産生及び各粘膜洗浄液中の IgA 抗体産生

2-1-9)の方法で正電荷リポソームを経鼻投与した。これを day 0, day 7, day 14 で行い、day 21 にマウスをジエチルエーテルにて屠殺し、心臓採血により血液を回収した。回収した血液を、室温で 30 分、氷上で 60 分静置後、3000 g、10 分遠心し、上清を回収し、血清サンプルとした。また、気道部より 26G 注射針 (TERUMO)をつけた 1 mL 注射筒内の PBS 250 μ l を流出し、エッペンに回収した。回収した溶液を 3000 g、10 分遠心し、上清を回収し、鼻腔洗浄液とした。また、頸部を切開し、気道を漏出させた後、気道に切り込みを入れた。先端に 1000 μ l 用チップの上から 200 μ l 用チップを装着したピペッターを切り込みに挿入し、1 ml PBS で 10 回ピペッティングし、エッペンに回収した。回収した溶液を 3000 g、10 分遠心し、上清を回収し、肺胞洗浄液とした。また、マウスをジエチルエーテルにて屠殺し、臍に 200 μ l 用チップを装着したピペッターを挿入し、PBS 100 μ l で 10 回ピペッティングしエッペンに回収した。これを 2 回繰り返した。回収溶液を 14000 rpm、5 分、4°C で遠心し、上清を回収し、臍洗浄液とした。回収した血清及び粘膜洗浄液中の IgG 抗体及び IgA 抗体の抗体価を算出した。

2-1-17) 有意差検定

抗体産生の有意差は the Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc test を用いて検定した。死細胞、dsDNA 産生の有意差は pair t-test を用いて検定した。

2-2 2 章の実験方法

2-2-1) FITC-OVA の精製

pH 9 に調製した炭酸バッファーに 50 mg/ml で溶解させた OVA (sigma) と無水 DMSO に 5 mg/ml で溶解させた FITC-I (DOJINDO) を 10:1 となるように混合し、4°C で一晩静置した。その後、HW55 カラム (TOSOH) を用いてサイズ排除クロマトグラフィーにて未結合の OVA と FITC 結合 OVA を分離精製した。

2-2-2) フローサイトメトリーを用いた *in vitro* における抗原取り込み

DC2.4 細胞を 5×10^4 cells/ml で 24 well plate に播種し、1 日後、正電荷リポソーム 20 nmol/ml 添加したのち、1 分後に FITC-OVA 50 μ g/ml で添加し、37°C、CO₂ 5% で 1 時間相互作用させた。その後、100 μ g/ml heparin in PBS 500 μ l で 2 回洗浄した後、0.1 mM EDTA in PBS を 1 分間反応させ、細胞をシングルセルとした。その後、RPMI 1640 1ml 加え、細胞を回収した。回収した細胞を 4°C で、1500 rpm、5 分間遠心し、上清を取り除き、タッピング後、再度 100 μ g/ml heparin in PBS 500 μ l 加え、4°C で、1500 rpm、5 分間遠心した。これを 2 回繰り返し、PBS 500 μ l に再懸濁し、FACS canto II (BD Biosciences) にて蛍光強度を測定した。

2-2-3) 共焦点顕微鏡による正電荷リポソームと抗原の局在

DC2.4 細胞を 4×10^4 cells/ml で 24 well plate 内の PLL コートガラスプレート上に播種し、1 日後、正電荷リポソーム 20 nmol/ml 添加したのち、1 分後に FITC-OVA 50 μ g/ml で添加し、37°C、CO₂ 5% で 1 時間相互作用させた。その後、100 μ g/ml heparin in PBS 500 μ l で 2 回洗浄した後、4% PFA 1ml 加え、4°C で 1 時間固定した。再度、100 μ g/ml heparin in PBS で 2 回洗浄し、スライドガラスに 1 μ g/ml DAPI containing 90% glycerol in PBS で核を染色し、トップコートで固定し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000D; Olympus) で観察した。

2-2-4) 阻害剤を用いた取り込み経路の特定

DC2.4 細胞を 5×10^4 cells/mL で 24 well plate に播種し、1 日後、クラスリン介在性エンドサイトーシスの阻害剤としてクロルプロマジン (Sigma-Aldrich) を 50 μ M、カベオリン介在性エンドサイトーシス阻害剤としてゲニステイン (WAKO) を 20 nM、脂質ラフト介在性エンドサイトーシス阻害剤としてメチル- β -シクロデキストリン (Sigma-Aldrich) を 31.25 μ M、マクロピノサイトーシス阻害剤としてアミロライド (Cayman Chemical Company) を 50 μ M、ファゴサイトーシス阻害剤としてサイトカラシン D (Sigma-Aldrich) を 2.5 μ M を添加し 30 分、37°C、CO₂ 5% でインキュベートした。その後、正電荷リポソーム 20 nmol/ml 添加したのち、1 分後に FITC-OVA 50 μ g/ml で添加し、37°C、CO₂ 5% で 1 時間相互作用させた。

また、細胞の活動を停止させるため 4°C で 1 時間同様に作用させた。その後、100 µg/ml heparin in PBS 500 µl で 2 回洗浄した後、0.1 mM EDTA in PBS を 1 分間反応させ、細胞をシングルセルとした。その後、RPMI 1640 1ml 加え、細胞を回収した。回収した細胞を 1500 rpm、4°C、5 分遠心し、上清を取り除き、タッピング後、再度 100 µg/ml heparin in PBS 500 µl 加え、4°C で、1500 rpm、5 分間遠心した。これを 2 回繰り返し、PBS 500 µl に再懸濁し、FACS canto II (BD) にて各蛍光強度を測定した。

2-2-5) フローサイトメトリーを用いた正電荷リポソームと抗原の存在状況による抗原取り込み増強効果の変化

DC2.4 細胞を 5×10^4 cells/mL で 24 well plate に播種し、1 日後、正電荷リポソームと OVA 非共存在下条件として正電荷リポソームを 20 nmol/ml で添加し、37°C、CO₂ 5% で 4 時間相互作用させ、培地交換してから FITC-OVA 50 µg/ml で添加し 37°C、CO₂ 5% で 4 時間相互作用させた。また、正電荷リポソームと OVA 共存在下条件として PBS を添加し 37°C、CO₂ 5% で 4 時間相互作用させ、培地交換してから正電荷リポソーム 20 nmol/ml で添加したのち、1 分後に FITC-OVA 50 µg/mL で添加し、37°C、CO₂ 5% で 4 時間相互作用させた。その後、100 µg/mL heparin in PBS 500 µl で 2 回洗浄した後、0.1 mM EDTA in PBS を 1 分間反応させ、細胞をシングルセルとした。その後、RPMI 1640 1ml 加え、細胞を回収した。回収した細胞を 4°C で、1500 rpm、5 分遠心し、上清を取り除き、タッピング後、再度 100 µg/mL heparin in PBS 500 µl 加え、4°C で、1500 rpm、5 分間遠心した。これを 2 回繰り返し、PBS 500 µl に再懸濁し、FACS canto II (BD Biosciences) にて蛍光強度を測定した。各取り込み量を OVA 単独群で割った値を算出し、評価した。

2-2-6) 共焦点顕微鏡を用いた正電荷リポソームと抗原の存在状況による抗原取り込み増強効果の変化

DC2.4 細胞を 4×10^4 cells/ml で 24 well plate 内の PLL コートガラスプレート上に播種し、1 日後、正電荷リポソームと OVA 非共存在下条件として正電荷リポソームを 20 nmol/ml で添加し、37°C、CO₂ 5% で 4 時間相互作用させ、培地交換してから FITC-OVA 50 µg/ml で添加し 37°C、CO₂ 5% で 4 時間相互作用させた。また、正電荷リポソームと OVA 共存在下条件として PBS を添加し 37°C、CO₂ 5% で 4 時間相互作用させ、培地交換してから正電荷リポソーム 20 nmol/ml で添加したのち、1 分後に FITC-OVA 50 µg/mL で添加し、37°C、CO₂ 5% で 4 時間相互作用させた。その後、100 µg/mL heparin in PBS 500 µl で 2 回洗浄した後、4% PFA

1ml 加え、4°C で 1 時間固定した。再度、100 µg/ml heparin in PBS で 2 回洗浄し、スライドガラスに 1 µg/ml DAPI containing 90% glycerol in PBS で核を染色し、トップコートで固定し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000D; Olympus) で観察した。

2-2-7) 有意差

毒性検討は、one-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test を用い、細胞内取り込みに関する検討は、unpaired t-test with Welch's correction を用いて有意差を算定した。

2-3 第三章の実験方法

2-3-1) 感染実験

肺炎球菌は、PspA ファミリー1 のクレード 1、2 を発現した A66.1 セロタイプ 3 の肺炎連鎖球菌を用い、PBS で希釈した。PBS 群、PspA 単独群 (PspA 5 µg/ mouse)、正電荷リポソーム (400 nmol/ mouse) の経鼻投与を day 0, day 7, day 14 で行い、day 21 に 5.0×10^6 CFU/ mouse で上気道感染させ、マウスの生存率を 14 日間観察した。

2-3-2) 脾臓細胞回収

マウスから脾臓を摘出し、5 ml の RPMI 1640 の入った 60 mm dish 内でステンレスメッシュを用いてシングルセルにした。その後、別のステンレスメッシュを通して、15 ml チューブに移した。再度、60 mm dish に RPMI 1640 を 5 ml 加えよく、ピペティングし、ステンレスメッシュを用いて同じ 15 ml チューブに移した。1500 rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清を捨て、タッピングした。赤血球を溶血させるため、ACK lysing buffer を 1 ml 加え、1 分後に 9 ml の RPMI 1640 を加えた。次に、1500 rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清を捨て、タッピングし、10 ml の RPMI 1640 を加えた。再度、1500 rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清を捨て、タッピングし、5 ml の RPMI 1640 を加え細胞懸濁液を、脾臓細胞回収液とし実験に使用した。

2-3-3) ELISA 法を用いたサイトカイン定量

96 穴 EIA プレートに sodium bicarbonate buffer (pH 9.5) で 200 倍に希釈した各サイトカインの capture antibody を 25 µl ずつ加え、4°C で一晩静置した。PBST で 4 回洗浄した後、10% FCS in PBS を 150 µl 加え、室温で 1 時間インキュベートした。その後、PBST で 4 回洗浄し、10% FCS in PBS で希釈した細胞培養上清と各サイトカインスタンダードサンプルを 25 µl ずつ加え、4°C で一晩静置した。

PBST で 4 回洗浄した後に、200 倍に希釈した各 detection antibody を 25 μ l ずつプレートに加え、室温で 1 時間反応させた。PBST で 4 回洗浄し、10% FCS in PBS で 1000 倍に希釈した avidin-HRP を 25 μ l ずつ加え、室温で 30 分反応させた。その後、PBST で 5 回洗浄し、TMB 溶液を 50 μ l ずつ加え、遮光状態で 20-30 分間反応させ、1N リン酸で反応を止めた。プレートリーダーを用いて 450 nm と 570 nm の吸光度を測定し、定量した。

2-3-4) 正電荷リポソームと PspA 併用経鼻投与による IL-4、IL-17A、IL-6、INF- γ の産生

BALB/c マウス一匹に対し、200 μ l の三種混合麻酔を腹腔内投与した。片鼻につき正電荷リポソームを 5 μ l (200 nmol) ずつ、計 10 μ l (400 nmol) またはコントロールとして D-PBS (-) を経鼻投与した。その直後に片鼻につき 1.5 μ l (2.5 μ g) ずつ、計 3 μ l (5 μ g) の PspA を経鼻投与した。投与終了後、メデトミジン拮抗薬を 200 μ l ずつ腹腔内投与した。これを、day 0, day 7, day 14 で行い、day 21 に 2-3-2) の方法を用いて脾臓細胞を回収した。脾臓細胞を 10% FCS in RPMI 1640 で 4.4×10^6 cells/ml に調製し 48 well plate に 450 μ l で播種した。20 分後に、PspA を 0 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml となるよう 50 μ l で添加した。その後、37°C、CO₂ 5% で 72 時間培養し、1500 rpm、4°C で 5 分間遠心した細胞上清を回収した。回収した細胞上清を 2-3-3) の方法で IL-4、IL-17A、IL-6、INF- γ を定量した。

2-3-5) 正電荷リポソームと PspA 併用経鼻投与による血清中 IgG 抗体及び各粘膜洗浄液中 IgA 抗体産生

BALB/c マウス一匹に対し、200 μ l の三種混合麻酔を腹腔内投与した。片鼻につき正電荷リポソームを 5 μ l (200 nmol) ずつ、計 10 μ l (400 nmol) またはコントロールとして D-PBS (-) を経鼻投与した。その直後に片鼻につき 1.5 μ l (2.5 μ g) ずつ、計 3 μ l (5 μ g) の PspA を経鼻投与した。投与終了後、メデトミジン拮抗薬を 200 μ l ずつ腹腔内投与した。これを、day 0, day 7, day 14 で行い、day 21 に、マウスをジエチルエーテルにて屠殺し、心臓採血により血液を回収した。回収した血液を、室温で 30 分、氷上で 60 分静置後、3000 g、10 分遠心し、上清を回収し、血清サンプルとした。また、気道部より 26G 注射針 (TERUMO) をつけた 1 mL 注射筒内の PBS 250 μ l を流出し、エッペンに回収した。回収した溶液を 3000 g、10 分遠心し、上清を回収し、鼻腔洗浄液とした。また、頸部を切開し、気道を漏出させた後、気道に切り込みを入れた。先端に 1000 μ l 用チップの上から 200 μ l 用チップを装着したピペッターを切り込みに挿入し、1 ml PBS で 10 回ピペッティングし、エッペンに回収した。回収した溶液を 3000 g、10 分遠心し、上清を

回収し、肺胞洗浄液とした。また、マウスをジエチルエーテルにて屠殺し、膣に 200 μ l 用チップを装着したピペッターを挿入し、PBS 100 μ l で 10 回ピペティングしエッペンに回収した。これを 2 回繰り返した。回収溶液を 14000 rpm、5 分、4°C で遠心し、上清を回収し、膣洗浄液とした。回収した血清及び粘膜洗浄液中の IgG 抗体及び IgA 抗体の抗体価を算出した。

2-3-6) CD11c⁺樹状細胞における正電荷リポソーム併用時の PspA の取り込み

BALB/c マウス一匹に対し、200 μ l の三種混合麻酔を腹腔内投与した。片鼻につき正電荷リポソームを 5 μ l (200 nmol) ずつ、計 10 μ l (400 nmol) またはコントロールとして D-PBS (-) を経鼻投与した。その直後に片鼻につき 3.2 μ l (25 μ g) ずつ、計 6.4 μ l (50 μ g) の PspA を経鼻投与した。投与終了後、メデトミジン拮抗薬を 200 μ l ずつ腹腔内投与した。投与から 6 時間後に、鼻腔組織を PBS の入った 60 mm dish 中で、ステンレスメッシュを用いてシングルセルとした。その回収液を、ナイロンメッシュを通し、15 ml チューブへと移動した。1500 rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清を除去後、タッピングした。そこへ、ACK lysing buffer を 1 ml 加え、1 分後、9 ml の PBS を加えた。1500 rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清を除去後、タッピングした。500 μ l の 2% FBS and 0.09% azide in PBS を加え、1.5 ml チューブへ移動した。1500 rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清を除去後、タッピングした。100 μ l の 2% FBS and 0.09% azide in PBS で再懸濁し、anti-mouse CD16/CD32 を 1 μ l 加え、4°C で 30 分反応させた。その後、50 μ l ずつに分け、それぞれに APC-anti-mouse CD11c あるいは APC armenian Hamster IgG を 1 μ l 加えた。4°C で 30 分反応させた後、1500 g、4°C で 30 秒遠心し、上清を除去しタッピングした。2% FBS and 0.09% azide in PBS を 500 μ l 加え、1500 g、4°C で 30 秒遠心し、上清を除去しタッピングした。これを 3 回繰り返した細胞懸濁液を FACS canto II (BD)を用いて測定した。

2-3-7) 統計処理

マウス生存率は、t-test with Welch's correction, and Mantel-Cox test を用い、サイトカイン産生及び抗体産生の検討では、Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc test を用いて、PspA の取り込みは、student t test で有意差を検定した。

2-4) 本研究による法令等の遵守への対応

本研究における動物実験に関しては、東京薬科大学動物実験倫理委員会の実験指針を遵守し、動物実験委員会に申請し、P14-31, P15-80, P16-09, P17-26 の承認番号で承認を受けた後、ヘルシンキ宣言に基づき、動物愛護の精神を持って実

施した。また同様に、医薬品基盤研究所の実験指針を遵守し、#DS25-3R8 の承認番号で承認を受けた後、ヘルシンキ宣言に基づき、動物愛護の精神を持って実施した。

第一章 正電荷リポソームの有する粘膜アジュバント活性における障害関連性分子の関与

1) 序論

リポソームによるアジュバントの機序は、抗原の目的部位あるいは細胞への効率的な送達及び取り込みを誘導する機序と、免疫賦活化を誘導する機序という二つの機序があると考えられている。

加えて、正電荷リポソームは、粒子表面が正に帯電しているため細胞毒性を示し易いとも報告がある。

細胞が障害されると障害された細胞から放出される分子に障害関連分子パターン(Damage-associated molecular patterns (DAMPs))と呼ばれるものがある。DAMPsは、ゲノム DNA や IFN- γ などの細胞内核酸やサイトカインなどで、細胞外へ放出された DAMPs がパターン認識受容体(Pattern recognition receptors (PRRs))に結合することで自然免疫が活性化されることが知られている。

これらのことから、正電荷リポソームが細胞に軽度の障害を与え、障害された細胞から DAMPs が放出された結果自然免疫の活性化を誘導し、アジュバント効果をもたらしているのではないかと仮説を立てた。

そこで、本章では、正電荷リポソームを経鼻投与することにより鼻腔内で細胞死が誘導されているのかを検証し、DAMPs の一種であるゲノム DNA が正電荷リポソームのアジュバント活性に寄与しているのかについて比較検討を行った。

2) 実験結果

第一節 正電荷リポソームによるアジュバント効果

第一項 血清中における IgG 抗体産生及び各粘膜洗浄液における IgA 抗体産生

正電荷リポソームとモデル抗原として OVA を経鼻投与した場合の血清中における IgG 抗体と各粘膜組織回収液における IgA 抗体産生を検証した。その結果、血清及び鼻腔洗浄液において、OVA 単独投与群に比べ、OVA と正電荷リポソーム併用群において高い抗体産生が確認できた。加えて、肺胞洗浄液、膈洗浄液においても OVA と正電荷リポソーム併用群において OVA 単独投与群に比べ、高い抗体産生が誘導されることが明らかとなった(Figure 3)。

第二節 正電荷リポソーム経鼻投与によるゲノム DNA の誘導

第一項 鼻腔内における細胞死の誘導

BALB/c マウスに正電荷リポソームの経鼻投与を行い鼻腔内の細胞死について検証を行った。その結果、6 時間後において PBS 投与群に比べ、正電荷リポソーム投与群は有意に僅かに増加 (約 2.3%) することが明らかとなった(Figure 4)。

第二項 鼻腔内におけるゲノム DNA の漏出

BALB/c マウスに正電荷リポソームを経鼻投与し、その後の鼻腔内におけるゲノム DNA の漏出について検証した。その結果、PBS 投与群に比べ、正電荷リポソーム投与群では継時的なゲノム DNA 漏出が増加する事が明らかとなった。また、ゲノムの漏出は、3 時間から 16 時間の間で始まることが明らかとなった(Figure 5)。

第一項、第二項の結果から正電荷リポソームにより、鼻腔内に僅かな細胞障害を引き起こし、ゲノム DNA を漏出させることが示唆された。

第三節 ゲノム DNA 経鼻投与時の抗体産生

第一項 血清中 IgG 抗体産生及び各粘膜洗浄液中 IgA 抗体産生

BALB/c マウスにゲノム DNA を経鼻投与後の抗体産生について検証した。その結果、ゲノム DNA 併用時において OVA 単独投与群に比べ抗体価の上昇が認められたが、ゲノム DNA の増加と比例した抗体価の上昇は見られなかった。ゲノム DNA によるアジュバント効果は、5ng とわずかな量で OVA 特異的抗体価の誘導が可能であった(Figure 6)。

第四節 正電荷リポソームのアジュバント効果におけるゲノム DNA の関与

第一項 DNase I 処理併用時の血清中 IgG 抗体産生及び各粘膜洗浄液中 IgA 抗体産生

BALB/c マウスに正電荷リポソーム及びモデル抗原 OVA を経鼻投与後の抗体産生について検証した。その結果、DNase I 併用時することで、正電荷リポソームと OVA 併用時の血清 IgG 及び各粘膜洗浄液中 IgA が減少することを明らかにした(Figure 7)。

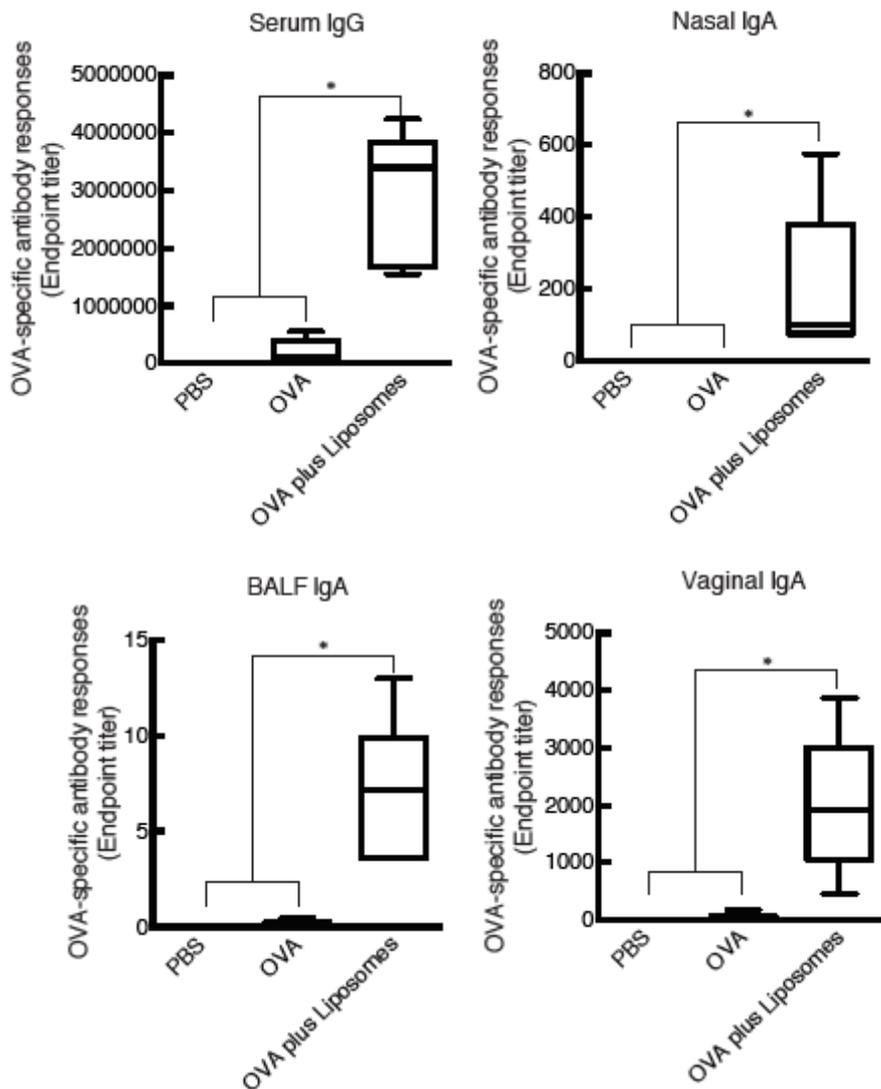


Figure 3. Induction of OVA-specific serum IgG and mucosal IgA responses in BALB/c mice immunized intranasally with OVA and cationic liposomes.

BALB/c mice were immunized intranasally with PBS, OVA (2.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) alone, or OVA (2.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) plus cationic liposomes (400 nmol/mouse) on days 0, 7 and 14. Serum, nasal washes, BALF and vaginal washes were collected on day 21. The anti-OVA IgG levels in serum and anti-OVA IgA level in nasal washes were detected by ELISA assay. Significance was evaluated by the Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc test.:* $P < 0.05$

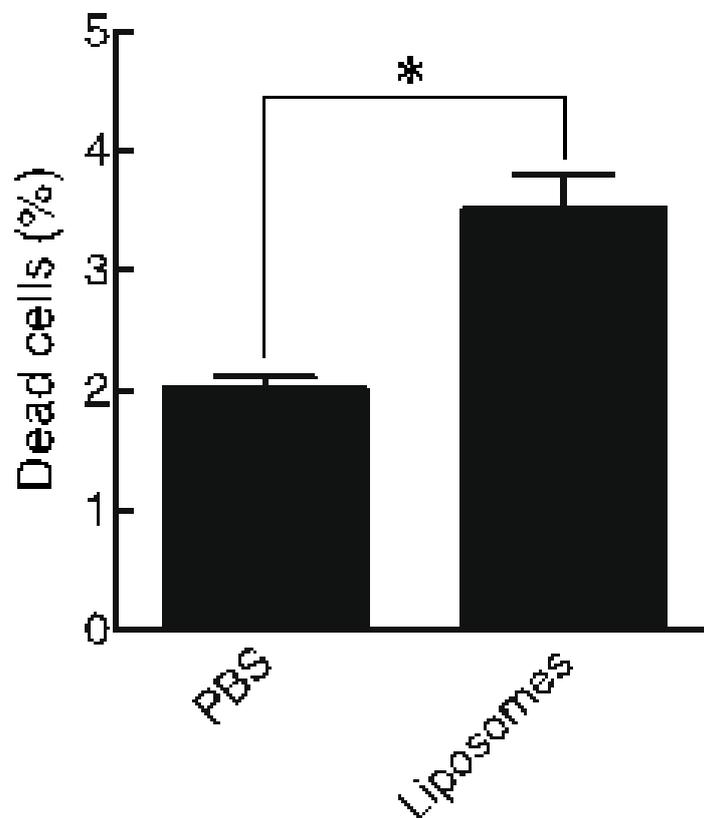


Figure 4. Induction of cell death in BALB/c mice administered intranasally with cationic liposomes after 6 hr.

BALB/c mice were administered intranasally with PBS or cationic liposome (400 nmol). After 6 hr, nasal tissues were collected, stained by 7-AAD. Death cell were counted by flow cytometry. * $p < 0.05$

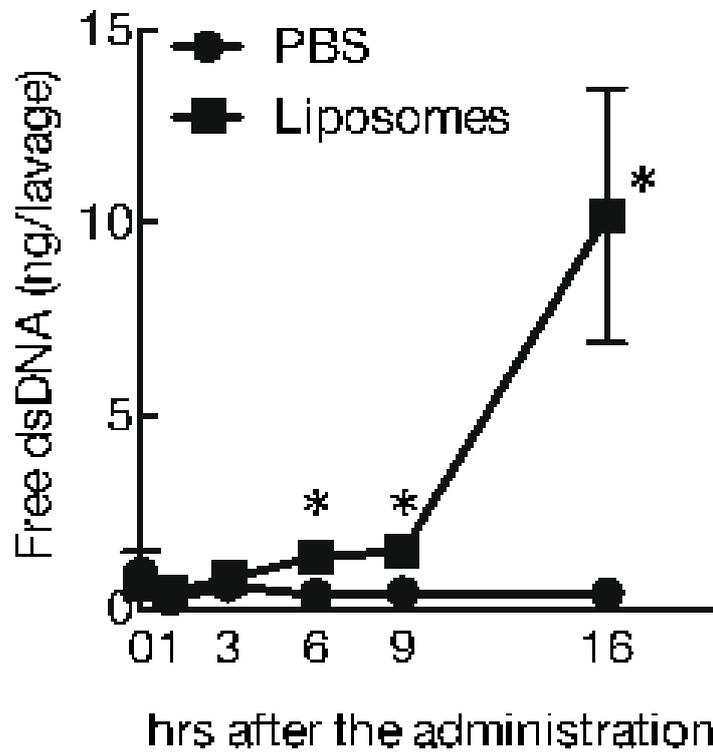


Figure 5. Time dependent change in leakage of genomic DNA after intranasal cationic liposomes.

BALB/c mice were administered intranasally with PBS or cationic liposomes (400 nmol). After 0 hrs, 3 hrs, 6 hrs, 9hrs or 16 hrs, nasal washes were collected and measurements of genomic DNA by hoeschst 33258. * $p < 0.005$

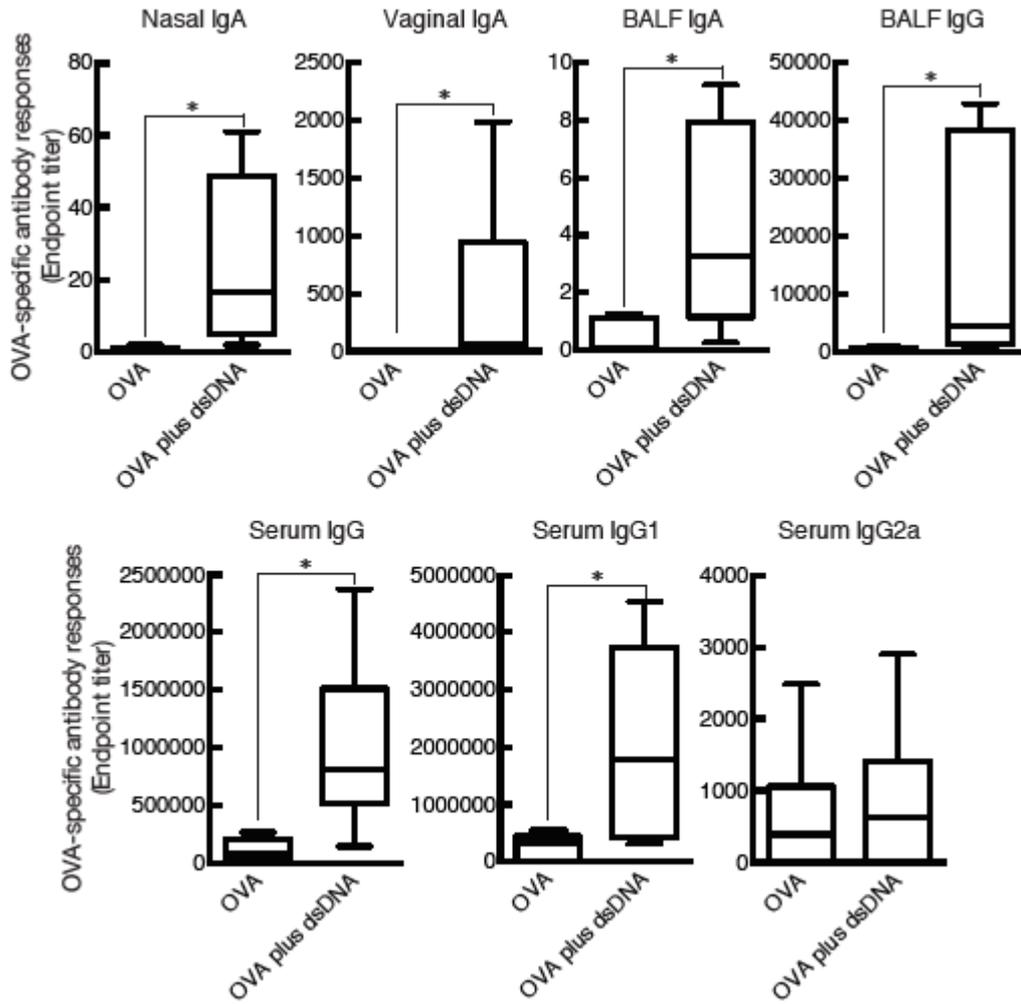


Figure 6. Induction of OVA-specific serum IgG and mucosal IgA responses in BALB/c mice immunized intranasally with OVA and genomic DNA (gDNA).

Mice were immunized intranasally with PBS, OVA (2.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) alone, or OVA (2.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) plus gDNA (5 ng/mouse) on days 0, 7 and 14. Serum, nasal washes, BALF and vaginal washes were collected on day 21. The anti-OVA IgG levels, the anti-OVA IgG1 levels and the anti-OVA IgG2a in serum and anti-OVA IgA level in nasal washes, BALF and vaginal washes were detected by ELISA assay. Significance was evaluated by the Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc test.:* $P < 0.05$

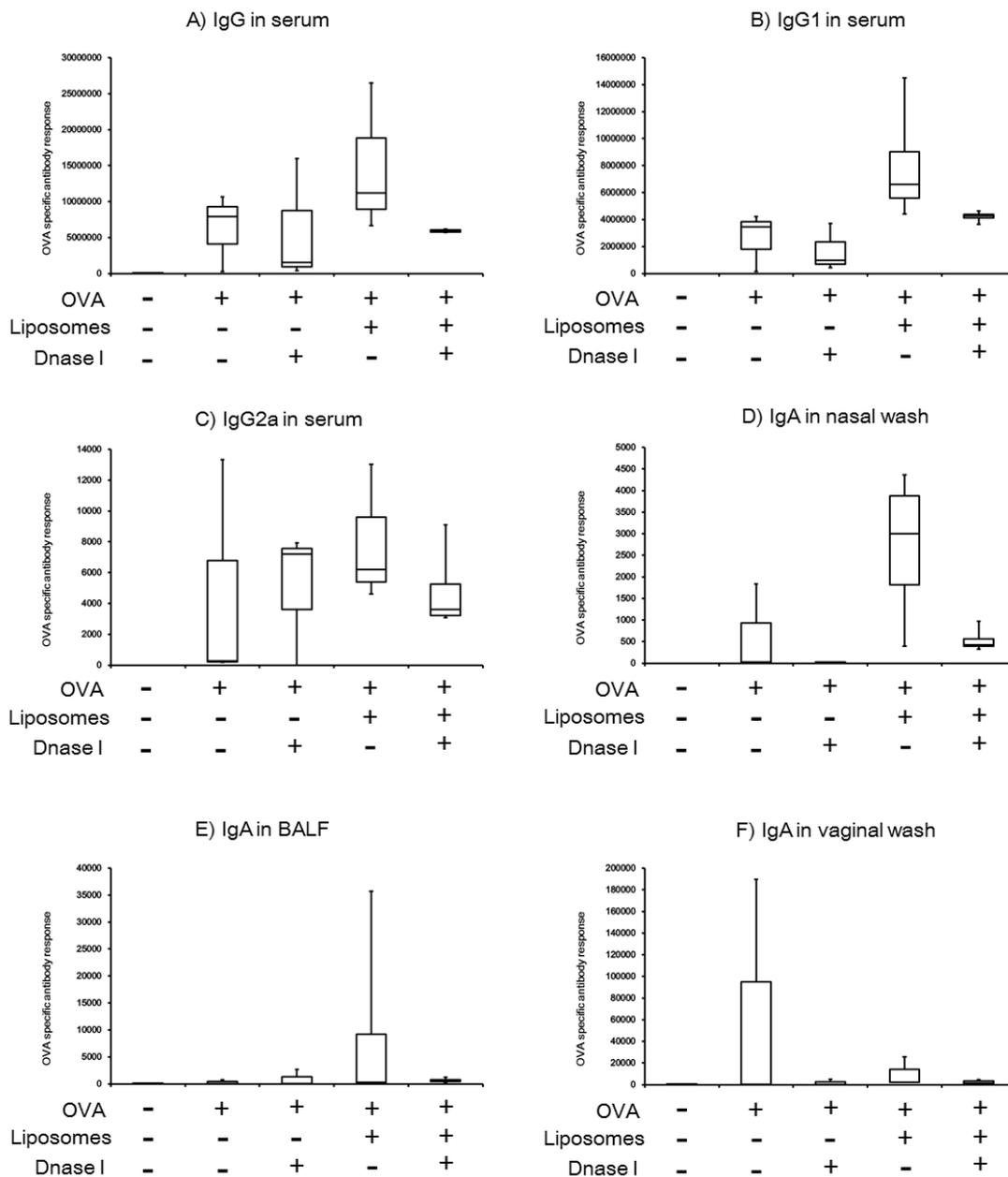


Figure 7. Induction of OVA-specific serum IgG and nasal tissue IgA responses in BALB/c mice immunized intranasally with OVA and cationic liposome with DNase I.

BALB/c mice were immunized intranasally with PBS, OVA (2.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) alone, or OVA (2.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) plus cationic liposomes (400 nmol/mouse) on days 0, 7 and 14. After 3 hour and 18hour mice were administered intranasally with DNase I or HBSS (+). Serum, nasal washes, BALF and vaginal washes were collected on day 21. The anti-OVA IgG levels, the anti-OVA IgG1 levels and the anti-OVA IgG2a in serum and anti-OVA IgA level in nasal washes, BALF and vaginal washes were detected by ELISA assay.

3) 考察

本章では、免疫学的な観点から正電荷リポソームが持つアジュバント効果の機序解明を試みた。

第一節では、モデル抗原として OVA を用い、正電荷リポソームが持つアジュバント効果について確認した。これまでの研究と同様に、正電荷リポソームと OVA の併用経鼻投与において、OVA 特異的な抗体産生の上昇が確認された。加えて、投与部位とは異なる肺及び膣においても OVA 特異的な IgA 抗体産生の上昇が正電荷リポソームと OVA の併用経鼻投与群において認められた (Figure 3)。投与部位とは異なる部位での IgA 抗体の産生は、粘膜免疫の特徴の一つである粘膜免疫帰巢経路を介して行われたと考えられる。鼻腔では、抗原の取り込み部位である誘導組織と IgA 抗体を産生する部位である実行組織が別々の場所に存在する。そのため、誘導組織で抗原情報を受け取った免疫担当細胞は、パイエル板や扁桃において IgA⁺細胞を刺激し、各粘膜組織へのホーミングに必要な $\alpha 4\beta 7$ インテグリンを発現した細胞へと変化し、各粘膜の実行組織へとホーミングする。正電荷リポソームをアジュバントとして用いた場合においても、粘膜帰巢経路を介することが可能であると示されたことで、侵襲性が低く投与が簡便な経鼻投与を用いることで、鼻腔における感染を防ぐだけでなく、膣感染症に対しても有効な手段となりうる可能性が示唆された。

第二節では、正電荷リポソーム経鼻投与によりゲノム DNA が誘導されるのかについて検討した。アジュバント効果を示す投与量である 400 nmol で正電荷リポソームを経鼻投与すると 6 時間後には僅かな細胞死が誘導される (Figure 4)。また、正電荷リポソーム投与後 3 時間後から 16 時間後にかけてゲノム DNA の漏出が認められた (Figure 5)。これらの知見から、正電荷リポソームにより鼻腔粘膜にごくわずかな細胞障害が誘導され、その結果ゲノム DNA が細胞外に漏出してくることが示唆された。

第三節では、正電荷リポソームを経鼻投与するとゲノム DNA が漏出してくることから、この漏出してきたゲノム DNA がアジュバント活性を持っているのではないかと仮定し、ゲノム DNA のアジュバント活性について評価した。ゲノム DNA を経鼻投与すると血清中 IgG 抗体産生及び各粘膜組織中 IgA 抗体産生も共に OVA 単独投与群に比べて上昇していた (Figure 6)。これらの知見から、ゲノム DNA はアジュバント効果を持ち、ごくわずかな 5 ng でも十分な抗体産生を誘導できることが明らかとなった。

第四節では、正電荷リポソームによるアジュバント効果がゲノム DNA により

引き起こしているのか否かについて評価した。正電荷リポソームと OVA を経鼻投与した後、DNase I 処理を行うと、血清中 IgG 抗体及び各粘膜組織における IgA 抗体の産生量が減少した (Figure 7)。

本章で得られた知見から、正電荷リポソームを経鼻投与すると粘膜面において軽度の細胞障害が引き起こされ、その結果ゲノム DNA が細胞外の鼻腔内に漏出し、そのゲノム DNA により自然免疫が誘導されアジュバント効果を示していることが示唆された (Figure 8)。

ゲノム DNA がアジュバント効果に寄与しているアジュバント物質には、水酸化アルミニウム塩を用いた Alum が存在する²⁸⁾。Alum の場合も同様に宿主細胞からのゲノム DNA の放出を起因とし、Th2 応答を誘導する機序として、interferon response factor 3 (Irf3) に依存した経路をたどることから、正電荷リポソームによる Th2 の応答も同様の経路を介しているのではないかと考えられた。

しかしながら、DNase I 処理だけでは完全に正電荷リポソームによるアジュバント活性が消失することはなかった (Figure 7)。正電荷リポソームによるアジュバント効果の機序は、ゲノム DNA により誘導されるだけではなく他の機序が関与していると考えられた。そこで、次章では、正電荷リポソームの抗原取り込みへの影響について比較検討した。

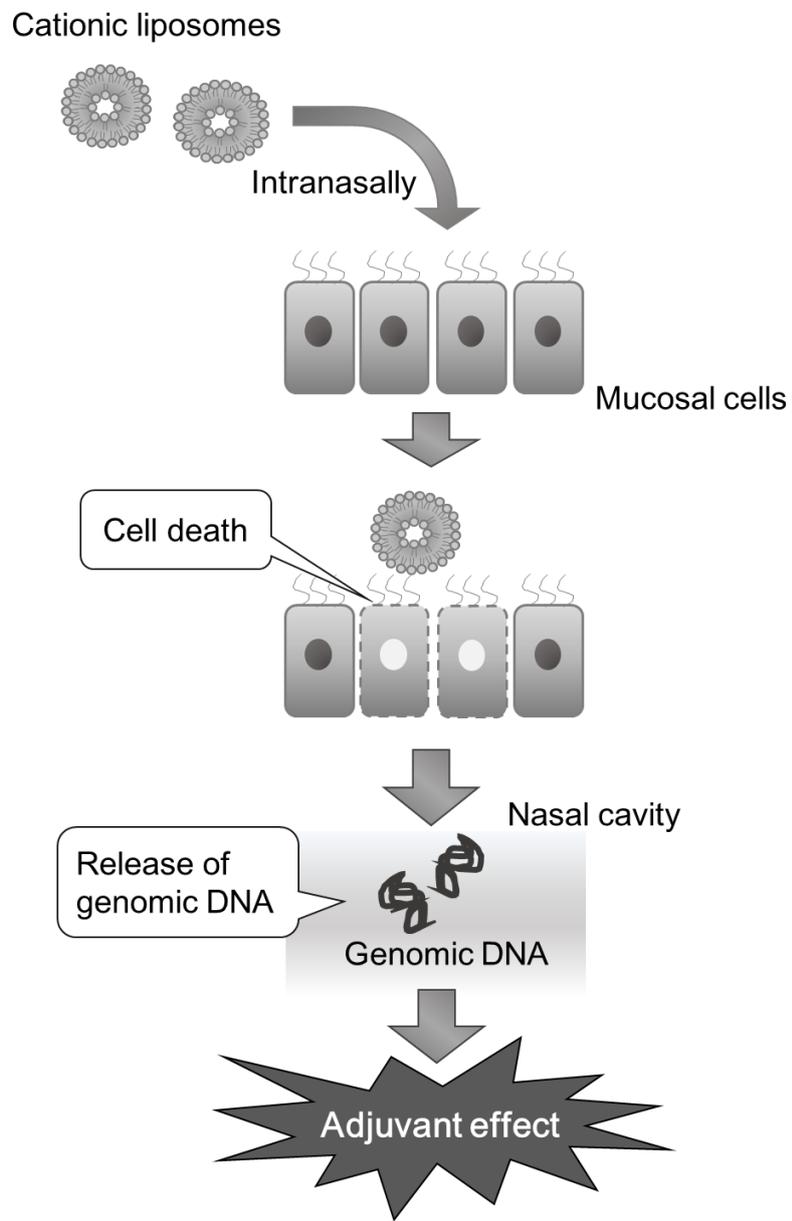


Figure 8. Mechanism of adjuvant effect by cationic liposome

第二章 正電荷リポソームによる抗原提示細胞への抗原送達率の増強効果

1) 序論

第一章から抗原と共に正電荷リポソームを経鼻投与することで正電荷リポソームがアジュバント効果を示す事、また、そのアジュバント効果の免疫学的な機序にはゲノム DNA が関与していることが明らかとなった。そこで、本章では、抗原の取り込みにおける正電荷リポソームの関与について検討した。

粘膜ワクチンにおいて抗原提示細胞への抗原の到達は重要である。粘膜面では抗原認識力が低いため、抗原提示細胞への効率的な抗原の送達が必要とされている。抗原提示の主たる細胞として、樹状細胞が存在する。樹状細胞は、外来抗原を取り込み、ペプチド断片化し細胞表面の MHC class II 上に提示し、T 細胞といった他の免疫細胞に抗原情報を提示している。このため、アジュバント効果を十分に発揮させるには、樹状細胞への抗原の効率的な到達が必要である。

本研究で用いている正電荷リポソームや他のアジュバント効果を示すリポソームの一般的なアジュバント効果の機序は、大きく分けて二つの機序によると考えられている。一つは、第一章で検討している自然免疫の賦活化能、もう一つは、目的部位への効率的な抗原の送達である。目的部位への効率的な送達方法として、ナノ粒子内に抗原を保持することで目的部位への送達量を促進する場合や、正電荷のナノ粒子においては、粒子の正電荷と細胞膜の負電荷による細胞内への抗原の取り込みを促進する場合など種々のナノ粒子によって様々である。

こういったナノ粒子が、細胞に取り込まれる経路にはエンドサイトーシス依存性の経路と非依存性の経路の二つが存在する。エンドサイトーシス依存性の経路として多くの粒子の取り込みに関与が報告されているクラスリン介在性エンドサイトーシス、次にカベオラが関与したカベオリン依存性エンドサイトーシス、クラスリンでもカベオリンでもない脂質ラフトを介した経路である脂質ラフト介在性経路がある。一方で、非エンドサイトーシス経路には、マクロピノサイトーシス、巨大分子の取り込みに関与しているファゴサイトーシスがある。どの経路を介してナノ粒子が取り込まれているのかは、種々によって異なっている²⁸⁻³⁰⁾。

そこで本章では、樹状細胞における正電荷リポソームによる抗原取り込み促進効果と正電荷リポソームによる抗原の細胞内への取り込み経路について検討した。

2)実験結果

第一節 *In vitro* における樹状細胞への取り込み増強効果

第一項 DC2.4 細胞における正電荷リポソームの毒性

樹状細胞の株化細胞である DC2.4 細胞における正電荷リポソームの毒性を評価した。その結果、200 nmol/ml 以上の濃度において 60%以下の細胞生存率となった。100 nmol/ml 以下で明らかな毒性がないことが明らかとなった(Figure 9)。

第二項 DC2.4 細胞における FITC-OVA の取り込み

DC2.4 細胞を用いて、正電荷リポソーム添加時の細胞内への抗原の取り込みについて比較検討した。その結果、抗原単独群での取り込みに対して、正電荷リポソーム併用群では、FITC-OVA の取り込みは 1.78 倍に増加した(Figure 10a)。また、共焦点顕微鏡を用いて同様に評価した。その結果、正電荷リポソーム併用時において、抗原の取り込みが上昇した(Figure 10b)。

第三項 FITC-OVA の 4℃と 37℃における取り込み

エンドソーム阻害条件である 4℃における抗原の取り込みについて比較検討した。その後、細胞を回収し、flow cytometry で抗原の取り込みについて評価した。その結果、4℃条件下では、抗原の取り込みが 37℃条件下に比べて 48%に有意に低下した(Figure 11a)。共焦点顕微鏡で同様に評価すると、4℃において抗原の取り込みが低下した(Figure 11b)。

第四項 正電荷リポソームの取り込み経路

第三項からエンドソーム阻害条件である 4℃で抗原の取り込みが阻害されることが明らかとなった。そこで、阻害剤を用いて正電荷リポソームの取り込み経路の同定を試みた。その結果、クロルプロマジン、メチル-β-シクロデキストリン及びサイトカラシン D 阻害条件下で取り込みが低下した。他の阻害剤においては取り込みに影響はなかった。よって、クラスリン介在性エンドサイトーシス

及び脂質ラフト介在性エンドサイトーシス及びファゴサイトーシスを介して正電荷リポソームは取り込まれていることが明らかとなった(Figure 12)。

第五項 FITC-OVA の取り込み経路

DC2.4 細胞における FITC-OVA の取り込み経路の同定を試みた。その結果、クロルプロマジン阻害条件下において低下した。他の阻害条件では取り込みに影響はなかった。よって、抗原はクラスリン介在性エンドサイトーシスを介して取り込まれていることが明らかとなった(Figure 13)。

第六項 正電荷リポソーム併用時の FITC-OVA 取り込み経路

正電荷リポソーム添加に伴う FITC-OVA 取り込み経路の同定を試みた。その結果、クロルプロマジン及びメチル- β -シクロデキストリン阻害条件下において抗原の取り込みが低下した。よって、正電荷リポソーム添加に伴う抗原の取り込み経路は、クラスリン介在性エンドサイトーシス及び脂質ラフト介在性エンドサイトーシスを介していることが明らかとなった(Figure 14)。

第七項 正電荷リポソームと FITC-OVA 併用時の取り込み状態

正電荷リポソームにより細胞が活性化された結果抗原の取り込みが上昇しているのか、正電荷リポソームと抗原が結合した結果、細胞内への取り込みが上昇しているのかを明らかとするため検討した。その結果、正電荷リポソームと抗原を別々に添加した場合において抗原の取り込みは抗原単独群に比べて 1.56 倍に増加したのに対し、正電荷リポソームと抗原が同時に存在する場合は、抗原単独群に比べて抗原の取り込みが 3.53 倍に増加した(Figure 15)。また、共焦点顕微鏡でも同様に評価すると、共培養条件において OVA の取り込みが増加し、抗原と正電荷リポソームが共局在していることが明らかとなった。

3) 考察

第一節において、正電荷リポソームは *in vitro* において抗原の取り込み促進効果を示した(Figure 10)。また、第一章、第一節において正電荷リポソームによりモデル抗原 OVA に対する抗体産生を誘導するアジュバント効果を示した。本章第一節により明らかとなった正電荷リポソームの抗原取り込み促進効果により、

樹状細胞内に抗原が増加した結果、樹状細胞表面への抗原提示が誘導される。それに伴い、ヘルパーT細胞といった他の免疫細胞への抗原提示が促され、第一章第一節で示された正電荷リポソームによるアジュバント効果をもたらしていると示唆された。

第二節において、正電荷リポソームは、クラスリン介在性エンドサイトーシスと脂質ラフト介在性エンドサイトーシスを介して取り込まれ(Figure 12)、また、抗原はクラスリン介在性エンドサイトーシスを介して取り込まれることが明らかとなった(Figure 13)。正電荷リポソーム併用した場合の抗原の取り込みは、クラスリン介在性エンドサイトーシスと脂質ラフト介在性エンドサイトーシスを介して取り込まれていた(Figure 14)。また、共焦点顕微鏡の結果から正電荷リポソームと抗原の挙動が一致していたこと(Figure 15)から、抗原は正電荷リポソームと同経路であるクラスリン介在性エンドサイトーシス及び脂質ラフト介在性エンドサイトーシスを介して取り込まれていると示唆された。

正電荷リポソームの取り込みは、クラスリン介在性エンドサイトーシス及び脂質ラフト介在性エンドサイトーシスにより取り込まれている(Figure 12)が、この脂質ラフト介在性エンドサイトーシスは、正電荷リポソームの構成脂質に DC-コレステロールが存在するためコレステロールが関与している脂質ラフトを介して取り込まれているものと考えられる。また、正電荷リポソームがクラスリン介在性エンドサイトーシスや脂質ラフト介在性エンドサイトーシスを介して取り込まれた要因として正電荷リポソームのサイズの影響が考えられる。今回用いた正電荷リポソームは、150 nm 前後の粒子であった。50-80 nm のサイズを取りこむカベオリン介在性エンドサイトーシスに対してクラスリン介在性エンドサイトーシスの場合では 100-150 nm の粒子を取り込むことが知られているため、これらの経路を介して取り込まれた要因は、粒子サイズによると考えられる³¹⁾。

共焦点顕微鏡の結果において、正電荷リポソームは細胞膜上に多く存在することが示された(Figure 12)。抗原共存在下においても膜表面と内部とに抗原の存在部位が分かっていた。この原因は、細胞培養時に存在する血清によりリポソームが一部凝集し、粒子サイズが大きくなった結果、細胞内取り込み能力が低下したため細胞膜上に多く存在する一因と考えられる。また、正電荷リポソームの取り込み経路として、ファゴサイトーシスの関与が認められたのに対し、正電荷リポソーム併用時の抗原取り込み経路を評価すると、ファゴサイトーシスの関与は確認できなかった。この要因も培養時に存在する血清と正電荷リポソームが凝集した結果、正電荷リポソームの粒子サイズが大きくなったことで、ファゴサイトーシスを介して正電荷リポソームが一部取り込まれたものと考えられる。

本章において、樹状細胞における正電荷リポソーム添加に伴う抗原の取り込み促進効果が明らかとなった。第一章、第二章により正電荷リポソームによりアジュバント効果の免疫学的な機序と抗原送達における機序が明らかとなった。そこで、次章では、正電荷リポソームが持つアジュバント効果の応用について肺炎球菌感染症モデルを用いて検討した。

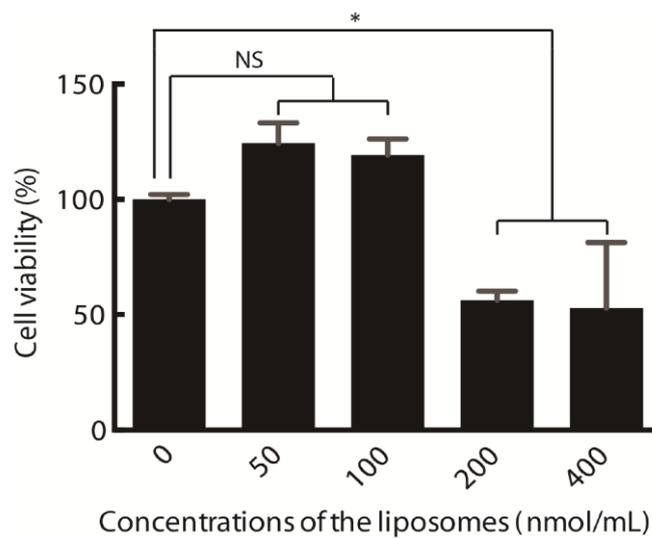
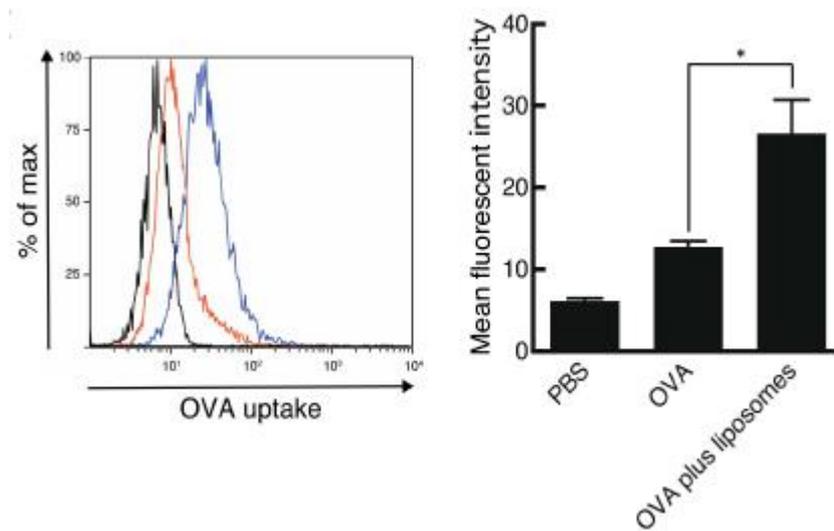
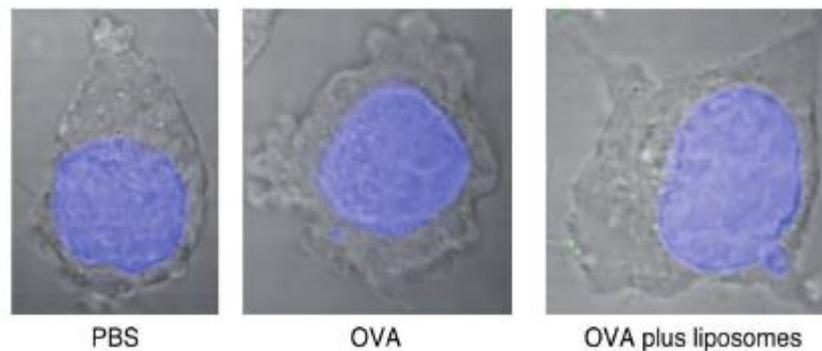


Figure 9. Cytotoxicity of the cationic liposomes on DC2.4 cells.

DC2.4 cells were cultured for 48 h in the presence or absence of various concentrations of the cationic liposome. The cell viabilities were then assessed by the MTT assay. The cell viability (%) was calculated on the basis of the ratio to the untreated group. The values are expressed as the mean \pm SD of triplicate cultures from three independent experiments. Significance was evaluated by a one-way ANOVA with Boferroni's post-hoc test: * $p < 0.05$, N.S.: not significant.



(a)



(b)

Figure 10. Antigen uptake by DC2.4 cells following co-culture with the cationic liposomes.

(a) DC2.4 cells were treated with vehicle (black), FITC-OVA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (orange), or FITC-OVA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in combination with cationic liposomes (20 nmol/mL) (blue) for 1 h. FITC-OVA uptake was then analyzed using flow cytometry as mean fluorescence intensities of the cells. The values are expressed as the mean \pm SEM of duplicate cultures from three independent experiments. Significance was evaluated by an unpaired t -test with Welch's correction: * $p < 0.05$, and (b). Images from confocal microscopy showing FITC-OVA uptake. FITC-OVA = green; DAPI = blue.

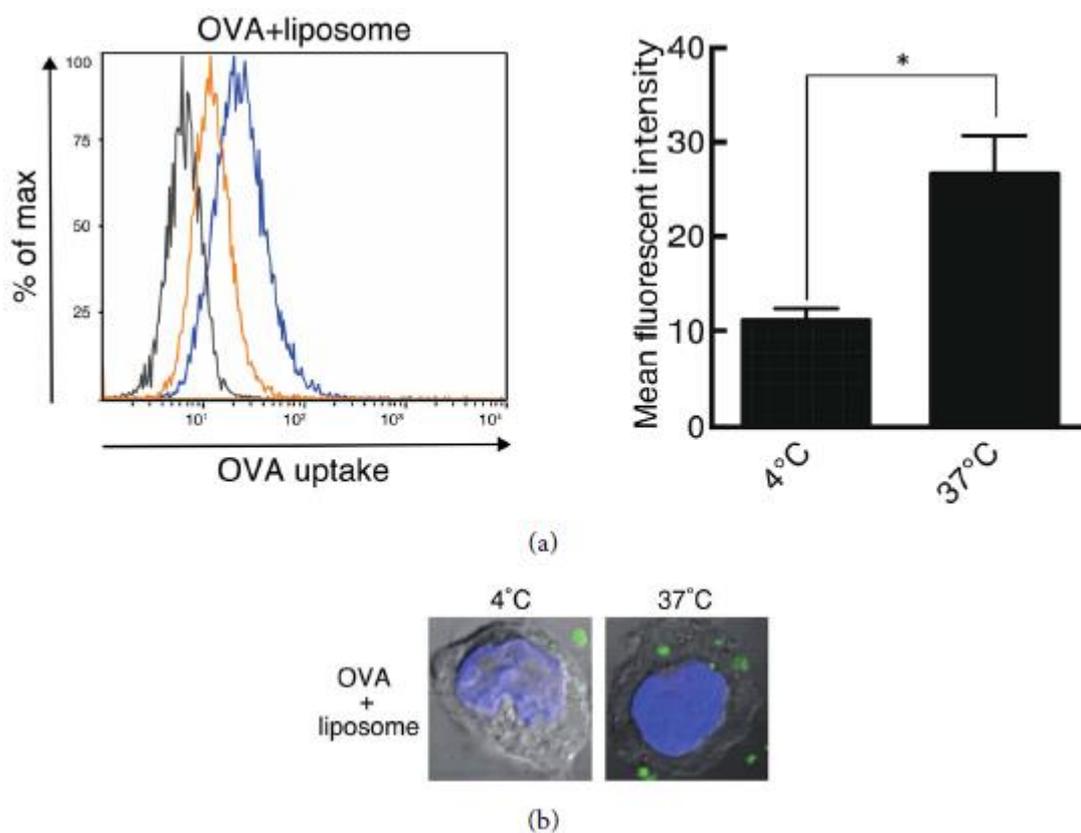


Figure 11. Effect of temperature on enhanced uptake of FITC-OVA by the cationic liposomes.

DC2.4 cells were treated with vehicle (black) or FITC-OVA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in combination with cationic liposomes (20 nmol/mL) for 1 h at 4°C (orange) or 37°C (blue). (a) FITC-OVA uptake was then analyzed using flow cytometry as mean fluorescence intensities of the cells. The values are expressed as the mean \pm SEM of duplicate cultures from three independent experiments. Significance was evaluated by an unpaired t -test with Welch's correction: $*p < 0.05$; (b) Confocal microscopy images for FITC-OVA uptake at different temperatures. FITC-OVA = green; DAPI = blue.

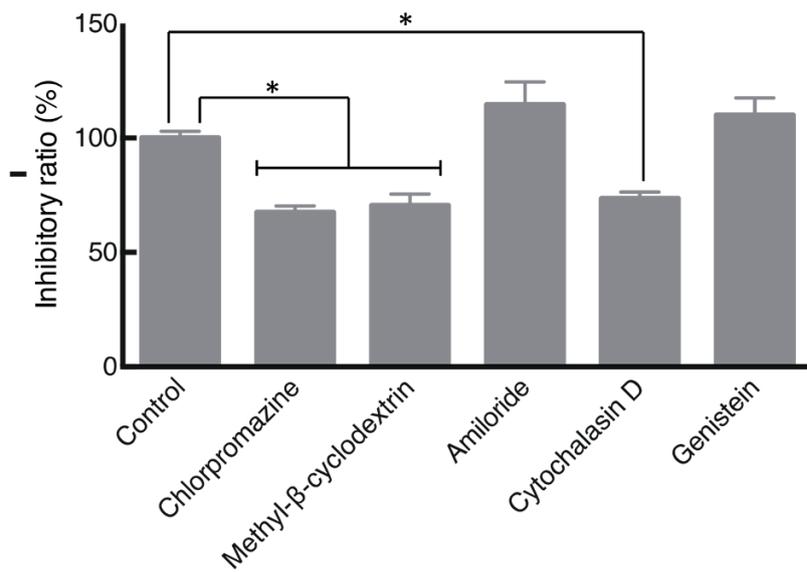
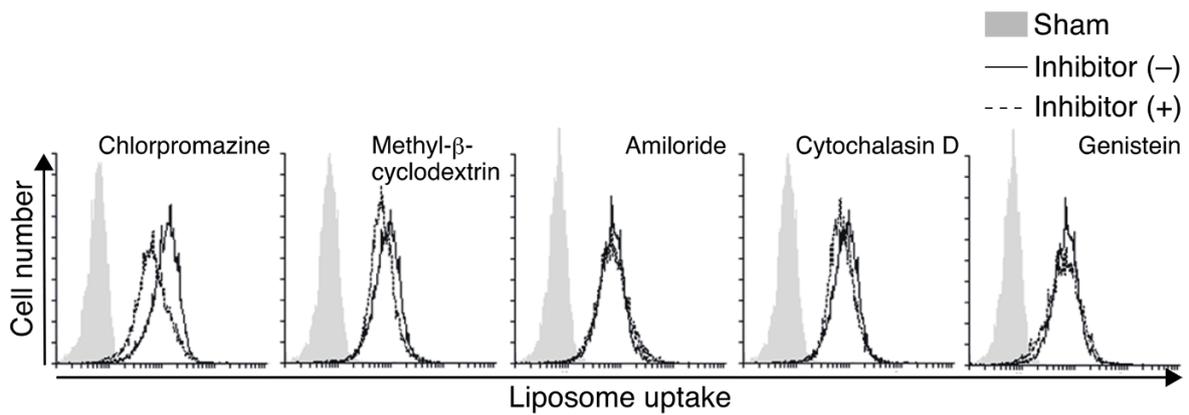


Figure 12. Mechanisms of uptake of cationic liposome by DC2.4 cells.

DC2.4 cells were pre-treated with various chemical inhibitors for endocytic pathways for 30 min at 37°C, and then treated with vehicle (black) or the cationic liposomes (20 nmol/mL) for 1 h at 37°C. The uptake of cationic liposome was further analyzed using flow cytometry as mean fluorescence intensities of the cells. The values are expressed as the mean \pm SEM of duplicate cultures from three independent experiments. Significance was evaluated by an unpaired *t*-test with Welch's correction: **p* < 0.05.

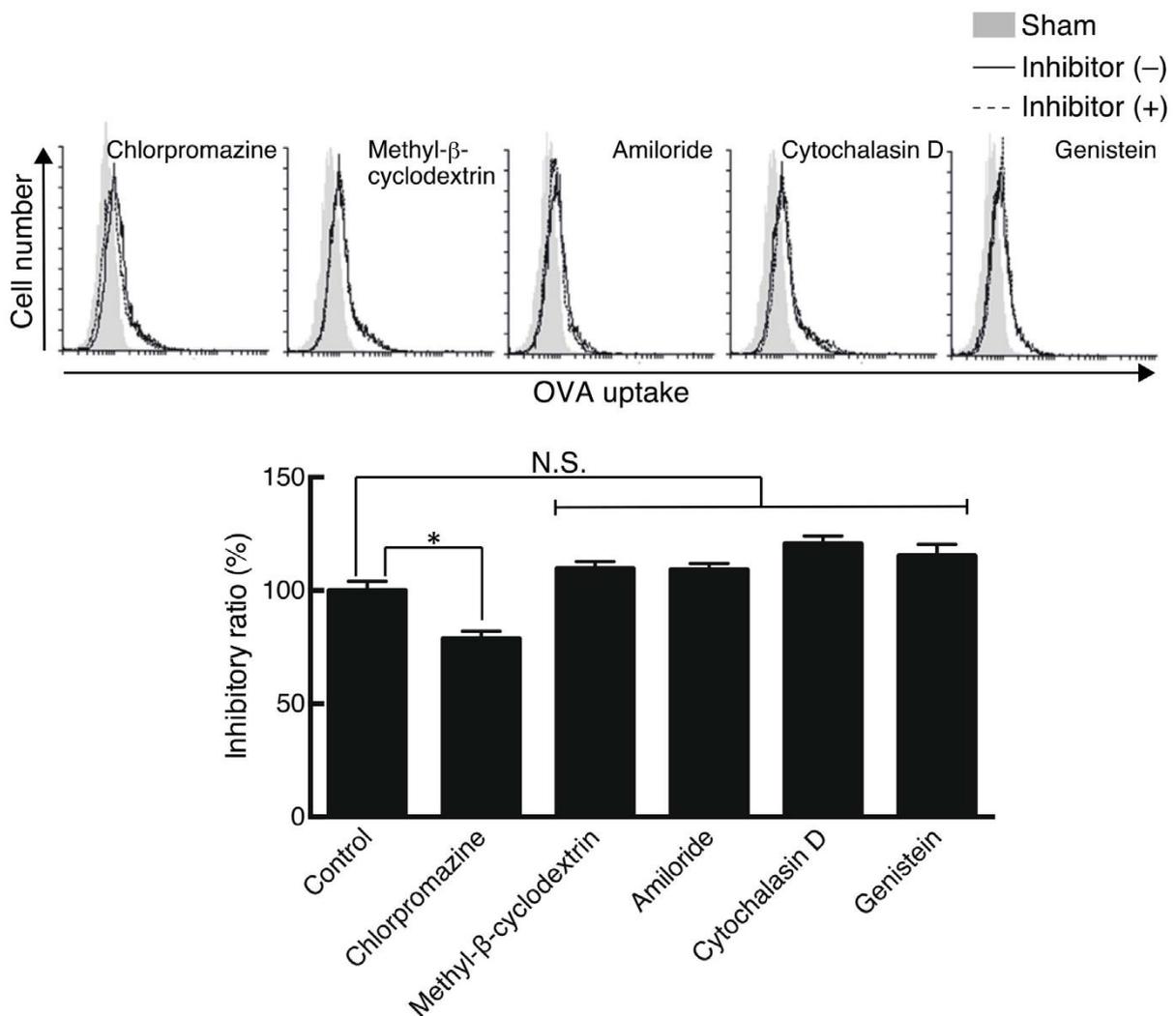


Figure 13. Mechanisms of uptake of FITC-OVA by DC2.4 cells.

DC2.4 cells were pre-treated with various chemical inhibitors for endocytic pathways for 30 min at 37°C, and then treated with vehicle or FITC-OVA (50 μg/mL) for 1 h at 37°C. FITC-OVA uptake was further analyzed using flow cytometry as mean fluorescence intensities of the cells. The values are expressed as the mean ± SEM of duplicate cultures from three independent experiments. Significance was evaluated by an unpaired *t*-test with Welch's correction: **p* < 0.05, N.S.: not significant.

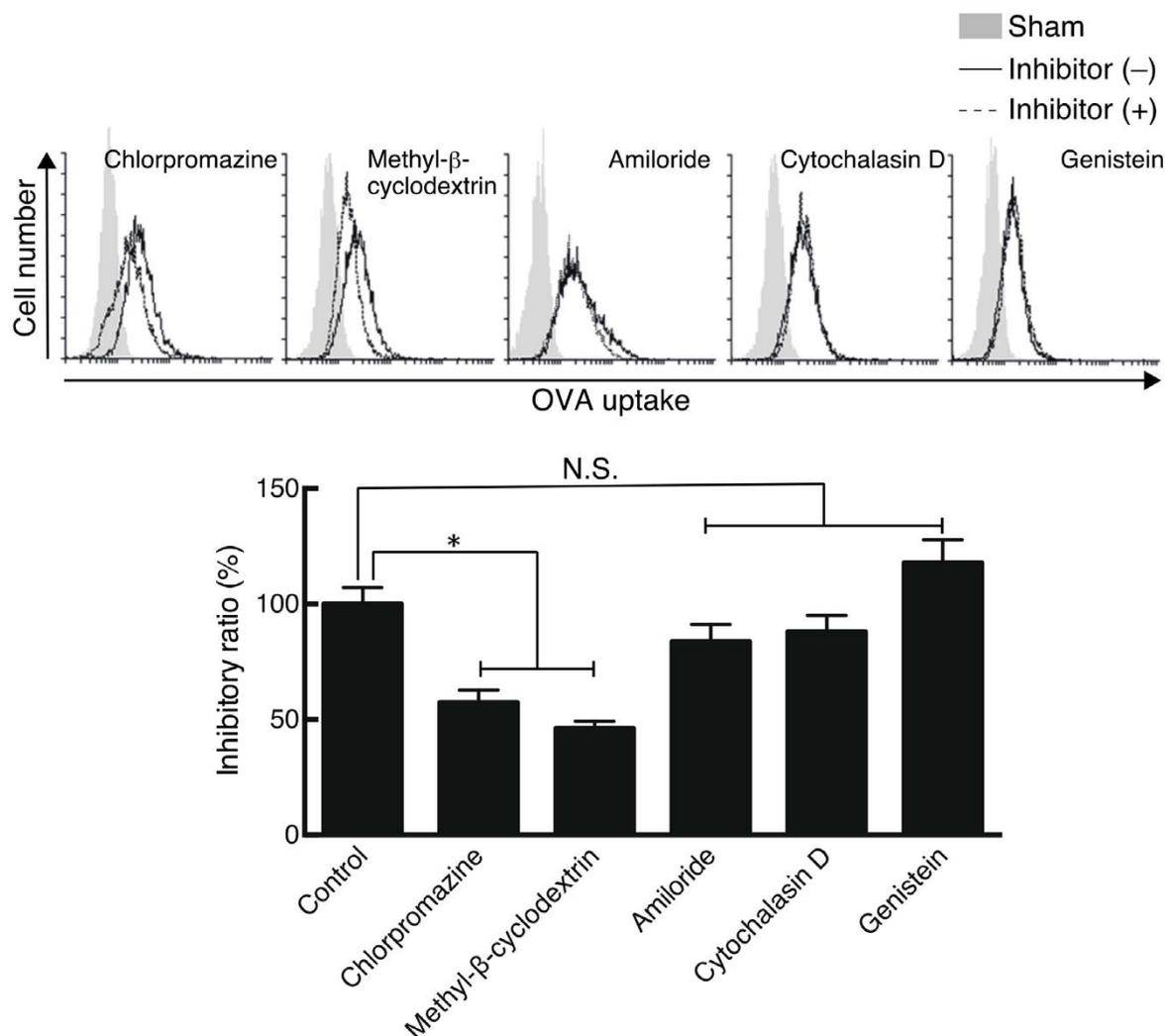
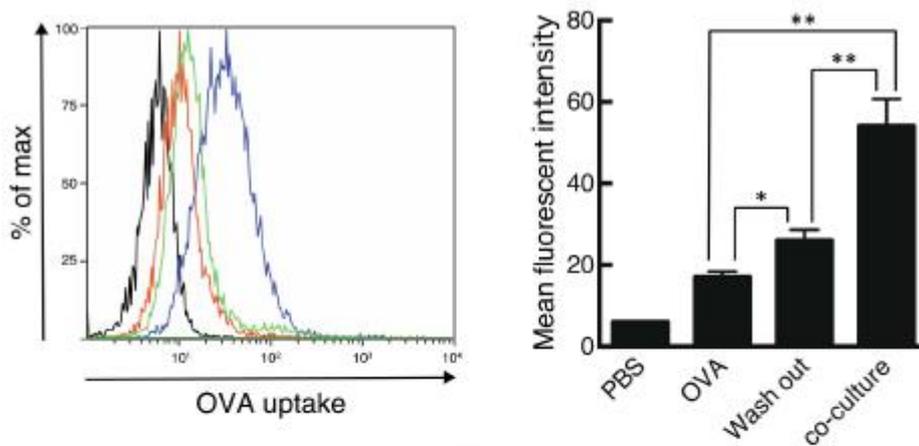
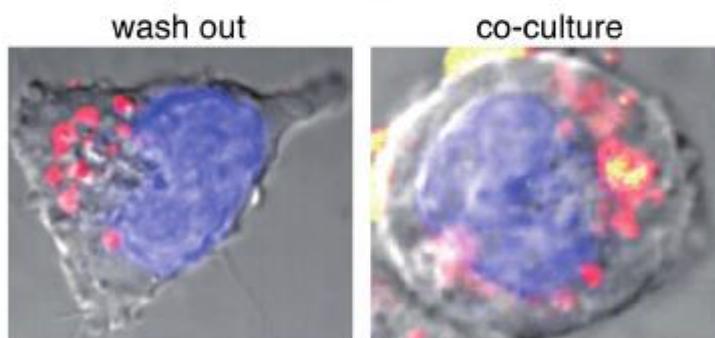


Figure 14. Effect of various chemical inhibitors of endocytic pathways on enhancement

FITC-OVA uptake by the cationic liposomes. DC2.4 cells were pre-treated with various chemical inhibitors of endocytic pathways for 30 min at 37°C, and then treated with vehicle (black), FITC-OVA (50 μg/mL) (orange), or FITC-OVA (50 μg/mL) in combination with cationic liposomes (20 nmol/mL) (blue) for 1 h at 37°C. FITC-OVA uptake was further analyzed using flow cytometry as mean fluorescence intensities of the cells. The values are expressed as the mean ± SEM of duplicate cultures from three independent experiments. Significance was evaluated by an unpaired *t*-test with Welch's correction: **p* < 0.05, N.S.: not significant.



(a)



(b)

Figure 15. Coexistence of FITC-OVA and the cationic liposomes is crucial for enhanced uptake of FITC-OVA.

(a) For co-culture experiment, DC2.4 cells were treated with vehicle (black), FITC-OVA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (orange), and FITC-OVA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in combination with cationic liposomes (20 nmol/mL) (blue) for 1 h at 37°C. For wash-out experiment, DC2.4 cells were treated with cationic liposomes (20 nmol/mL) for 4 h at 37°C. After washing the liposomes out, DC2.4 cells were incubated with FITC-OVA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 h at 37°C (green). FITC-OVA uptake and the cationic liposome uptake was then analyzed using flow cytometry as mean fluorescence intensities of the cells. The values are expressed as the mean \pm SEM of duplicate cultures from three independent experiments. Significance was evaluated by an unpaired *t*-test with Welch's correction: * $p < 0.05$, (b) confocal microscopy images for wash-out and co-culture experiments. FITC-OVA = green; DiI-liposome = red; DAPI = blue; co-localization of FITC-OVA and DiI-liposome = yellow.

第三章 正電荷リポソームを用いた経鼻粘膜投与型肺炎球菌ワクチンの開発

1) 序論

日本では、乳幼児のころから日本脳炎ウイルスに対するワクチンや麻疹ワクチンなど様々なワクチンを接種している。また、定期接種以外にもインフルエンザのワクチンや海外渡航の際にはその地域に特有のワクチンの接種を行っている。加えて、高齢者においては肺炎のリスクが高いため肺炎球菌感染症ワクチンの定期接種も始まっている。しかしながら、現在定期接種に用いられている 27 価莢膜ポリサッカライド型肺炎球菌ワクチンは、T 細胞に依存しない免疫応答を起こすため免疫記憶を誘導できず長期の免疫効果は期待できない。新たに承認された 13 価肺炎球菌結合型ワクチンは、T 細胞に依存した免疫応答を誘導できるが、従来のワクチンに比べ対応できる肺炎球菌の型が少なくまた生産コストも高い。肺炎球菌の血清型には 90 種が知られており、どちらのワクチンを用いてもすべての型を網羅することはできない。³³⁻³⁴⁾

こういった背景から新たな肺炎球菌に対応する抗原として pneumococcal surface antigen A (PspA)が注目されている³⁴⁻³⁶⁾。PspA は菌体表面に存在するリポ蛋白質で、マグネシウムイオンの運搬に関わる ATP-binding cassette (ABC)トランスポーターを構成している。PspA が欠損した肺炎球菌においては、宿主への付着性が低下し、酸化ストレスに対して感受性が上昇することから病原因子として働くことがわかっている。PspA は、すべての肺炎球菌に共通する抗原であり、PspA に対するワクチンが開発できればすべての血清型の肺炎球菌感染症への対応が可能となる。

これまでの研究によりモデル抗原に対する正電荷リポソームのアジュバント効果を誘導することを示してきた。しかし、正電荷リポソームにより誘導された抗原特異的な抗体が中和抗体として機能するのか、また、肺炎球菌感染症に対して有効な免疫応答が引き起こされているのかは不明である。

そこで本章では、肺炎球菌由来抗原である PspA を用いた正電荷リポソームのアジュバント効果について、感染実験、サイトカイン産生と抗体産生の面から評価し、考察を加えた。

2) 実験結果

第一節 感染実験

第一項 肺炎球菌感染防御効果

正電荷リポソームと肺炎球菌由来抗原である PspA によるワクチン効果について検討した。その結果、あらかじめ正電荷リポソームと PspA を経鼻投与した群において、マウス生存率の上昇が認められた(Figure 16)。

第二節 PspA と正電荷リポソーム併用時の免疫応答

第一項 正電荷リポソームと PspA 併用経鼻投与による IL-4、IL-17A、IL-6、INF- γ の産生

肺炎球菌由来抗原である PspA と正電荷リポソームによるサイトカイン誘導について検討した。その結果、正電荷リポソームと PspA を経鼻投与した群において、IL-4、IL-17A、IL-6、INF- γ の産生上昇が認められた(Figure 17)。

第二項 正電荷リポソームと PspA 併用経鼻投与による血清中 IgG 抗体及び各粘膜洗浄液中 IgA 抗体産生

正電荷リポソームを用いてモデル抗原に対する IgG 及び IgA 抗体産生について検討を行った。BALB/c マウスに PspA (5 μ g) と正電荷リポソーム (400 nmol) を day 0, 7, 14 にそれぞれ経鼻投与し、day 21 に、血清及び鼻腔洗浄液を回収した。各回収液中の PspA 特異的抗体を ELISA 法で測定し、endpoint 法にて抗体価を算出した。その結果、正電荷リポソーム併用群において高い抗体産生が認められた(Figure 18)。

第三節 PspA の樹状細胞への取り込み

第一項 *In vivo* における FITC-PspA の樹状細胞への取り込み

CD11c 陽性細胞における FITC-PspA の取り込みを flow cytometry を用いて評価した。その結果、PspA 単独群では FITC-PspA 陽性の細胞が 0.945%であったが、正電荷リポソームと PspA 併用群では 3.365%と有意に上昇していた (Figure 19)。

3) 考察

本章において、正電荷リポソームと PspA を併用することにより疾患モデルへの応用が可能であることが示された。

第一節において、肺炎球菌感染モデルにおいて十分な防御的効果を発揮した。第二節においては、Th1 サイトカインのみならず Th2 サイトカインの誘導も増強させることが明らかとなった。正電荷リポソームと PspA の経鼻投与により誘導された IL-4 は、Th0 細胞を Th2 細胞への分化を誘導するサイトカインであり、IgA 産生を増強させ、また、濾胞性ヘルパー T 細胞 (T follicular helper cell ; Tfh 細胞) に対してエフェクター分子として働く。その結果として B 細胞のクラススイッチ、記憶 B 細胞への分化、形質細胞への分化を誘導することが知られているサイトカインである。また、IL-17A は、ナイーブ T 細胞が IL-6、TGF- β 、IL-23 といったサイトカイン刺激を受けた Th17 細胞から産生される^{37,38)}。その結果、matrix metalloproteinase (MMP)や抗菌ペプチドの発現^{39,40)}を誘導し細菌感染防御や真菌感染防御に関与しているサイトカインとしても知られている。IL-6 は、炎症性サイトカインであり、IL-17A の産生に関与する Th17 細胞への分化を誘導していることが知られている。IFN- γ も炎症性サイトカインであり、他のサイトカインとはことなり Th0 細胞を Th1 細胞への分化を誘導する。

また、Th1 細胞あるいは Th2 細胞のどちらが優位であるのかによって免疫応答が異なってくる。血清中 IgG 抗体のサブクラスである IgG1、IgG2a は、PspA 単独群に比べ正電荷リポソーム併用群において有意に抗体産生が上昇している。これら二つのサブクラスのバランスにより Th1 免疫応答か Th2 免疫応答の優位性が判断できる。IgG1 及び IgG2a とともに大きく上昇しているため、正電荷リポソームによるアジュバント効果は、抗体産生を介した応答である Th2 免疫応答のみならずキラー T 細胞の活性化させる Th1 免疫応答をも誘導できると考えられる。加えて、細菌感染や感染防御に有効なサイトカイン産生を誘導することから、肺炎球菌といった感染症に対して有効なアジュバントである。さらに、Th17 細胞を活性化させることから、真菌感染症などに対するワクチン応用も可能となると考えられる⁴¹⁾。

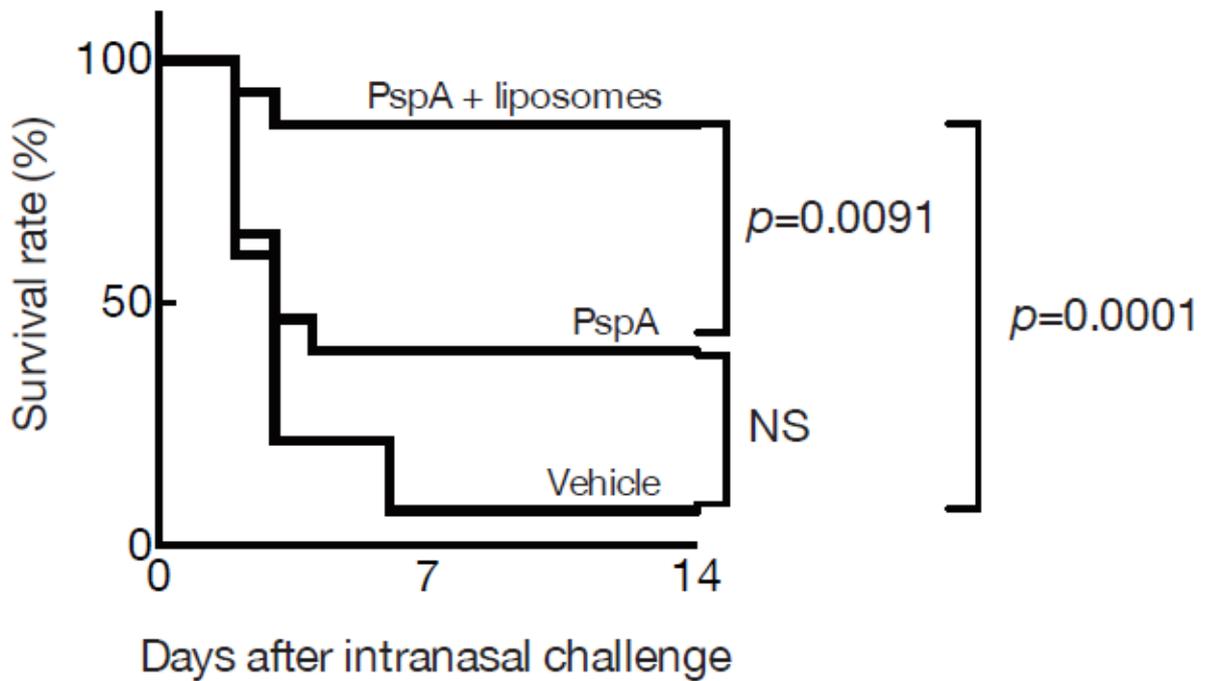


Figure 16. Pneumococcal vaccine by PspA and cationic liposomes.

Mice were divided into three groups for nasal immunization, and immunized with vehicle, PspA (5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$), or cationic liposomes (40 nmol/mouse) followed by PspA (5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) at a volume of 6.5 $\mu\text{l}/\text{nostril}$ once a week, for three consecutive weeks. One week after the last immunization, the mice were subjected to respiratory challenge with 5.0×10^6 CFU of *S. pneumoniae*. The survival of mice was monitored for 14 days after the infection.

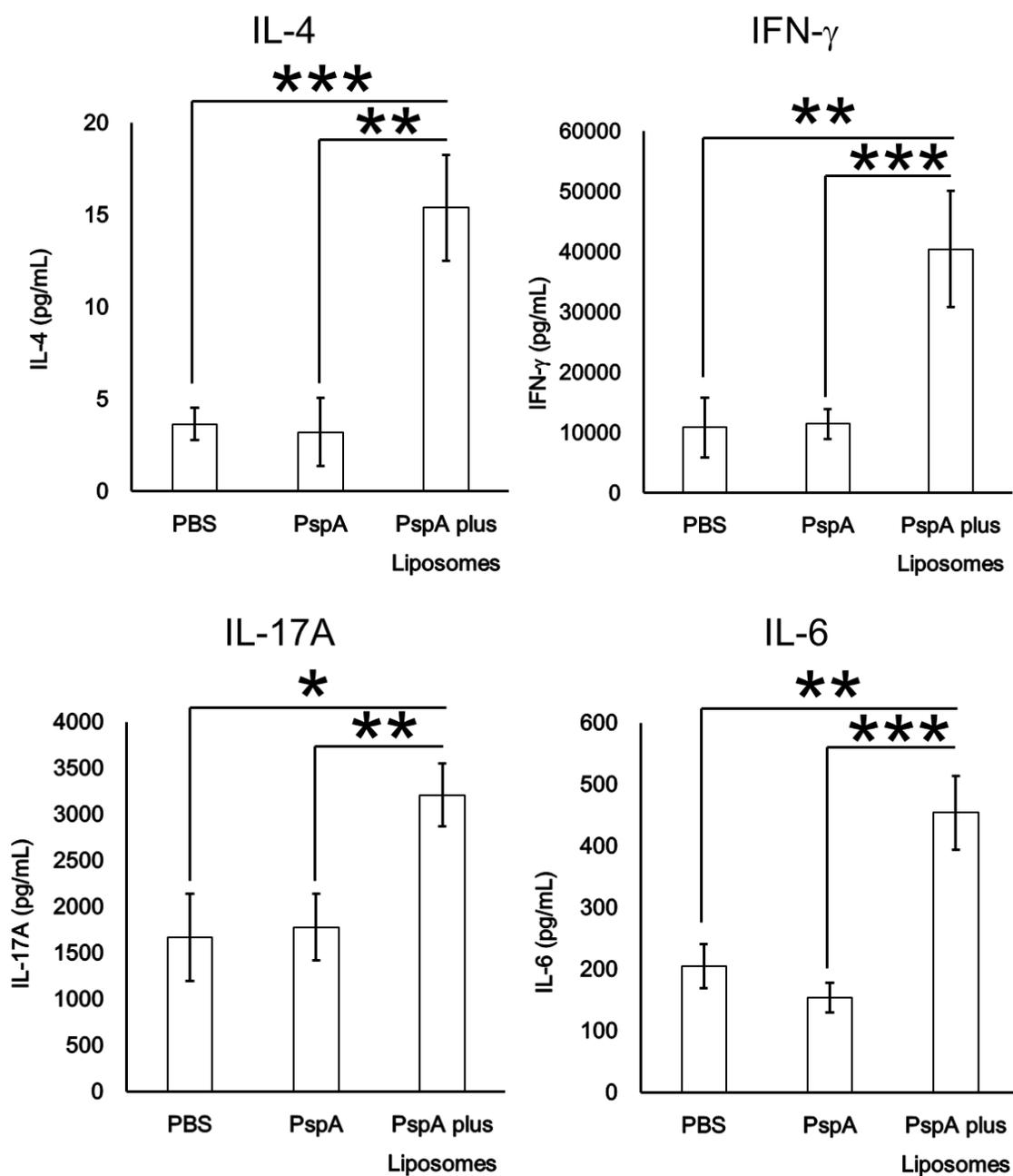


Figure 17. Induction of IL-4, INF- γ , IL-17A and IL-6 in BALB/c mice immunized intranasally with PspA and cationic liposomes.

BALB/c mice were immunized intranasally with PBS, PspA (5 μ g/mouse) alone, or OVA (2.5 μ g/mouse) plus cationic liposomes (400 nmol/mouse) on days 0, 7 and 14. Spleen cells were collected on day 21 by mice. Spleen cells were stimulated PspA (0, 0.5, 1, 10 μ g/ml). After 72 hrs, supernatant were collected and detected by ELISA assay.

*** p <0.002, ** p <0.01, * p <0.02

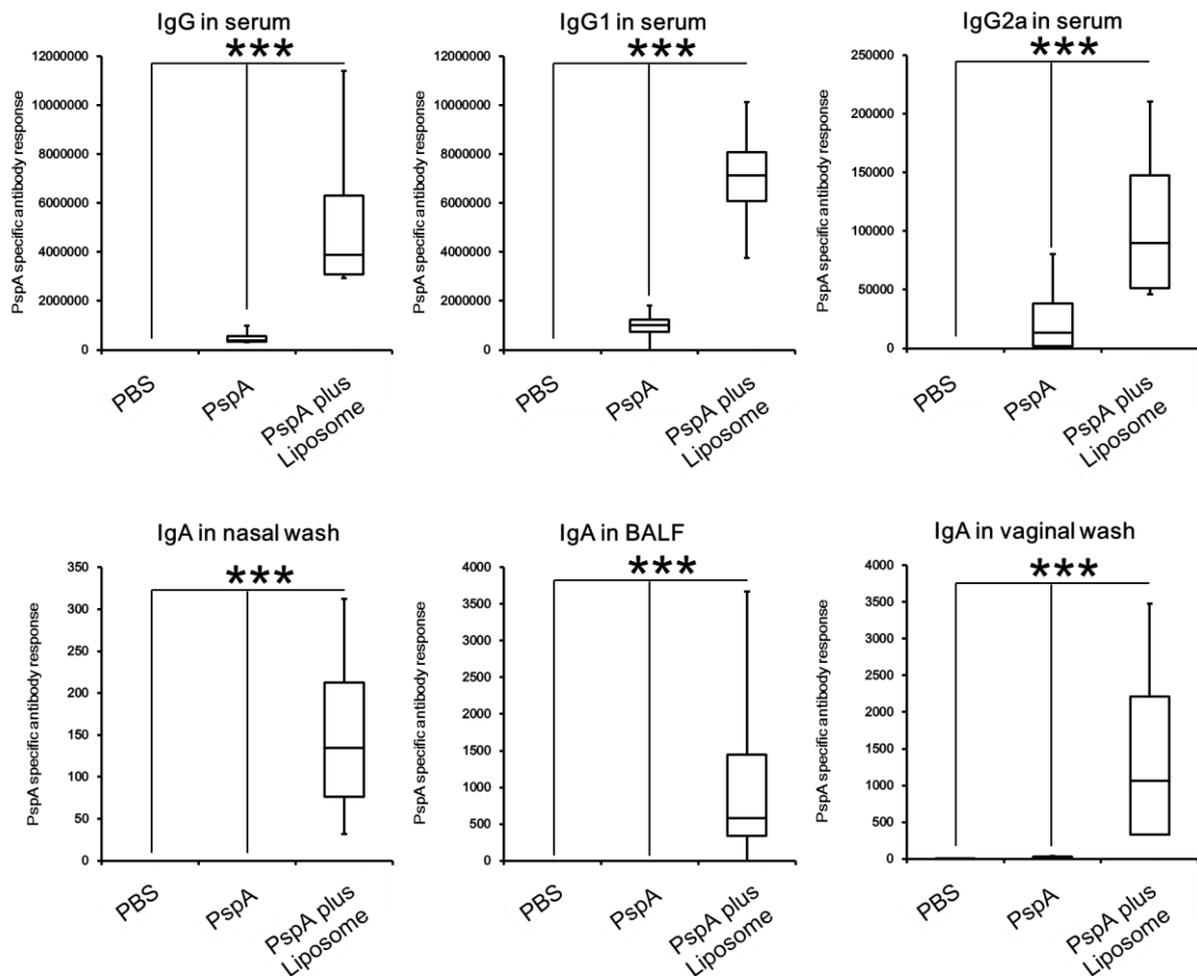


Figure 18. Induction of OVA-specific serum IgG, serum IgG1, serum IgG2a and nasal IgA, BALF IgA and vaginal IgA responses in BALB/c mice immunized intranasally with PspA and cationic liposomes.

BALB/c mice were immunized intranasally with PBS, PspA (5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) alone, or PspA (5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) plus cationic liposomes (400 nmol/mouse) on days 0, 7 and 14. Serum, nasal washes, BALF and vaginal washes were collected on day 21. The anti-OVA IgG levels in serum and anti-OVA IgA level in nasal washes, BALF and vaginal wash were detected by ELISA assay.

*** $p < 0.002$

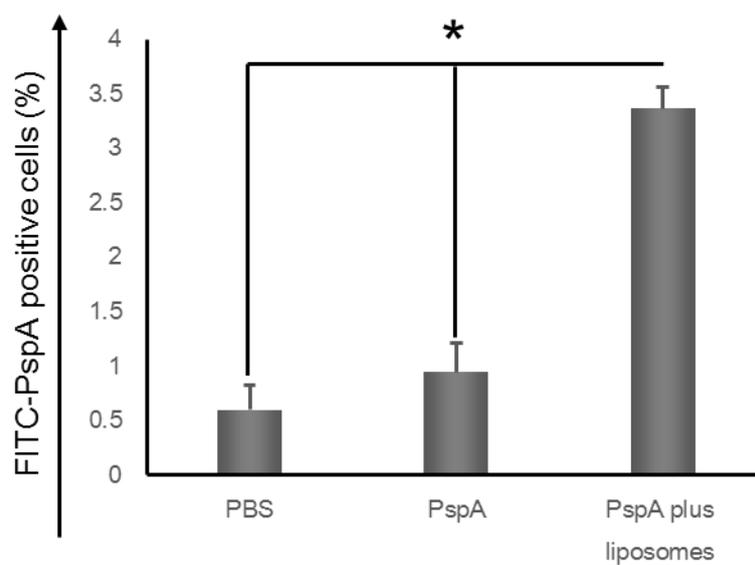


Figure 19. Antigen uptake by CD11c⁺ DCs in NALTs following intranasal administration of FITC-PspA plus the cationic liposomes.

BALB/c female mice were intranasally administered FITC-PspA (50 µg/mouse) alone, or FITC-PspA (50 µg/mouse) plus cationic liposomes. NALTs were collected 6 hrs after administration. The NALT cells obtained were stained with anti-mouse CD11c mAb. FITC-PspA uptake by DCs (based on CD11c⁺ gating) was analyzed by flow cytometry. * $p < 0.005$

総括

医療技術が進化した現代においても、高齢化社会の進行により感染症や悪性腫瘍による死因が増加している。悪性腫瘍や感染症は、ワクチンにより予防、治療が可能な疾患である。これら疾患の罹患率が高い高齢者や乳幼児は、副反応が起こりやすく、また、十分な免疫応答を誘導できず、ワクチン効果が不十分となりやすい。このため、安全で有効なワクチンの開発が必要とされている。

中でも、粘膜を介した粘膜ワクチンが注目されている。しかし、粘膜は抗原認識力が低いため抗原単独では十分な効果は発揮できない。そこで、アジュバントが必要とされ、開発されてきた。

当研究室では、DOTAP と DC-cholesterol を用いた正電荷リポソームが、モデル抗原である OVA に対してアジュバント効果を持つ事²⁸を示してきた。正電荷リポソームの粒子サイズに関係なくアジュバント効果を発揮するが、粒子自体は正電荷でなければアジュバント効果を発揮することはなかった。しかしながら、詳細な機序については明らかとなっていない。

そこで、本研究では、正電荷リポソームのもつアジュバント効果の機序とその応用について検討した。

第一章では、正電荷リポソームのアジュバント効果にゲノム DNA が関与しているのかについて明らかとするべく、正電荷リポソーム経鼻投与による鼻腔内へのゲノム DNA 漏出評価及びゲノム DNA のアジュバント活性の評価を行い、正電荷リポソームのアジュバント効果にゲノム DNA が関与しているのか検証し以下の知見を得た。

1. 正電荷リポソームによるアジュバント効果は、鼻腔だけでなく、膣や肺においても IgA 抗体を産生することを明らかとした。
2. 正電荷リポソームを経鼻投与することで軽度の細胞障害が起り、ゲノム DNA が鼻腔内に漏出することを明らかとした。
3. ゲノム DNA を経鼻投与すると、IgG 抗体及び IgA 抗体産生を誘導するアジュバント効果を示した。
4. 正電荷リポソームによるアジュバント効果は、DNase I 併用時に低下することを明らかとした。

以上正電荷リポソームのアジュバント効果には、ゲノム DNA が関与している

ことが示唆された。

第二章では、正電荷リポソームの樹状細胞への抗原取り込み効果について明らかとした。

1. *In vitro* において、正電荷リポソームは抗原の取り込みを増強した。
2. 正電荷リポソームはクラスリン介在性エンドサイトーシス及び脂質ラフト介在性エンドサイトーシスにより取り込まれていることが明らかとなった。
3. 抗原はクラスリン介在性エンドサイトーシスを介して取り込まれていることが明らかとなった。
4. 正電荷リポソーム添加による抗原の取り込みは、クラスリン介在性エンドサイトーシス及び脂質ラフト介在性エンドサイトーシスを介していることが明らかとなった。
5. 正電荷リポソームと抗原は相互作用し、細胞内に取り込まれていることが示された。

以上から正電荷リポソームは、抗原の取り込みを増強し、正電荷リポソームが取り込まれる経路を介して抗原の取り込みが誘導されていることが明らかとなった。また、抗原と正電荷リポソームが相互作用し細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。本研究とは異なる正電荷脂質を用いたリポソームにおいて、抗原提示細胞への抗原取り込みが増加し、その結果、抗原提示能が増強されたと報告があった⁴⁰。本研究で用いた正電荷リポソームも同様に抗原の取り込みを増加させた結果、抗原提示能を増強したと考えられる。しかしながら、抗原は今回用いた OVA のような負電荷の抗原ばかりではない。今後の課題として、正電荷の抗原を効率的に抗原提示細胞へ取り込ませるシステムを構築することでよりよいアジュバント開発へつなぐと考えられる。

第三章では、正電荷リポソームのアジュバント効果の機序について明らかとなったため、正電荷リポソームの疾患モデルへの応用を目的とし、肺炎球菌感染症モデルに対し、正電荷リポソームのアジュバントとしての有用性を評価した。

1. 正電荷リポソームにより肺炎球菌感染が抑制された。
2. 正電荷リポソームと PspA の併用経鼻投与により、IL-4、IL-17A、IL-6、INF- γ の産生が誘導された。
3. 正電荷リポソームと PspA の併用経鼻投与により、PspA 特異的 IgG 及び IgA 抗体の産生が誘導された。

以上の研究から正電荷リポソームは肺炎球菌感染症に対するアジュバント効果を有することが明らかとなった。

産生された IL-17A は、Th17 応答に関与し Th17 細胞を活性化させることから、肺炎球菌といった細菌感染症ではない、真菌感染症などに対するワクチン応用も可能となると考えられる⁴¹⁾。

以上の研究から、正電荷リポソームのアジュバント効果は、鼻腔内に軽度の細胞障害を引き起こした結果、ゲノム DNA を漏出させ、そのゲノム DNA がアジュバント効果を発揮していることが明らかとなった。また、正電荷リポソームによる抗原取り込みは、クラスリン介在性エンドサイトーシス及び脂質ラフト介在性エンドサイトーシスを介して取り込まれていることが明らかとなった。また、肺炎球菌感染症に対して正電荷リポソームは十分なアジュバント効果を示した。

本研究により、正電荷リポソームのアジュバント効果の機序が一部明らかとなり、また、感染症に対するアジュバント効果を正電荷リポソームが有することが明らかとなった。加えて、正電荷リポソームの経鼻投与によるアジュバント効果は、肺や膣といった部位においても IgA 抗体産生を誘導することも明らかとなった。

これらの正電荷リポソームによるアジュバント効果の利点を利用することで、ワクチン接種者の負担軽減が期待され、また、今後、様々な感染を起因とする疾患への応用拡大へとつなげたいと考える。

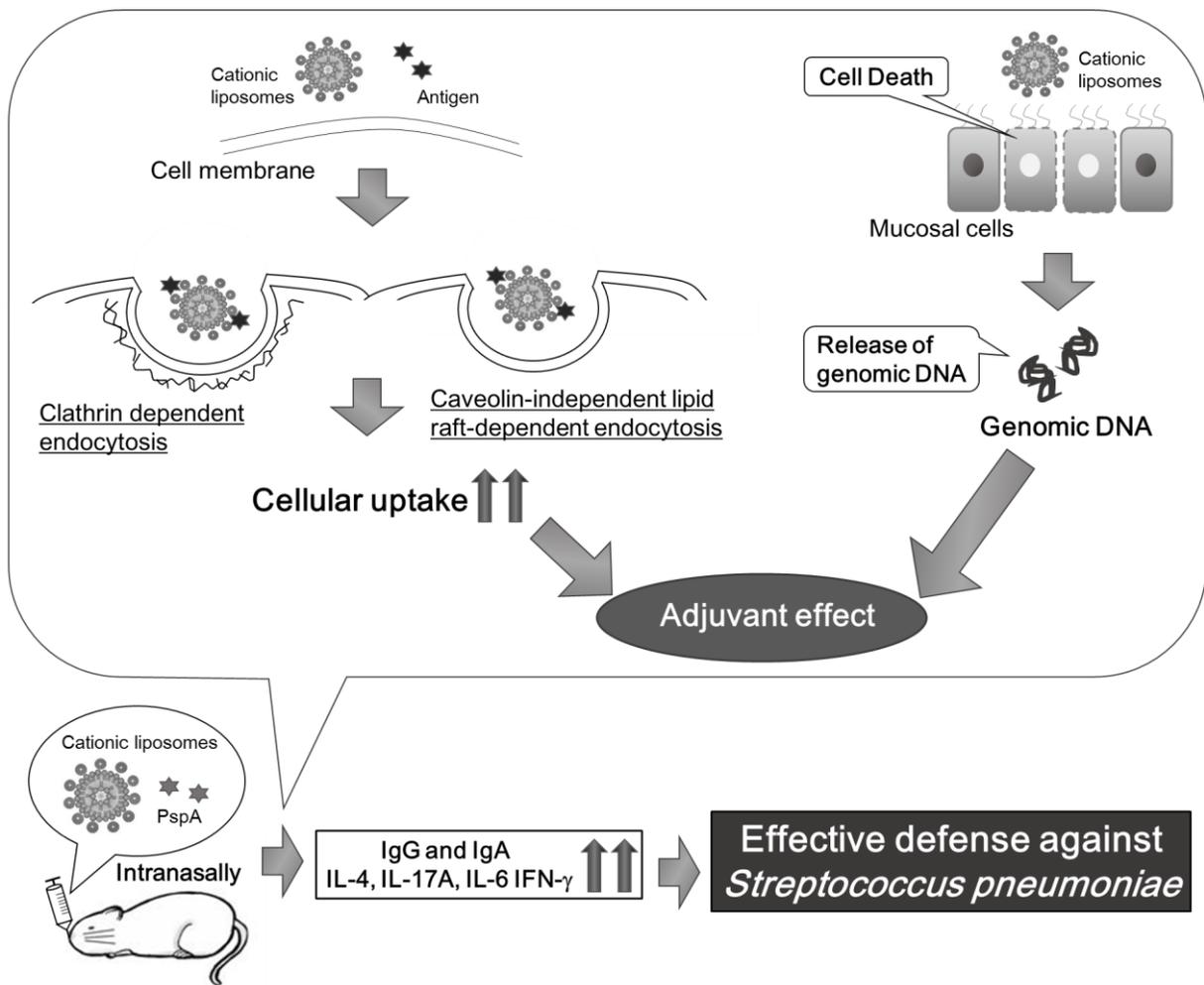


Figure 20. Summary of this thesis.

謝辞

終わりに望み、本研究の遂行並びに本論文の作成に関して、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました恩師、東京薬科大学薬学部、新楨幸彦名誉教授に深甚なる誠意を表します。

また、本研究の遂行並びに本論文の作成に関して数多くのご指導、御助言を賜りました東京薬科大学薬学部、根岸洋一准教授に心から感謝いたします。

本研究の推進並びに本論文の作成に関してご協力いただきました多田墨講師、高橋葉子助教をはじめとする薬物送達学教室の皆様にご心から御礼申し上げます。

本研究に関する知識、技術をご教授いただきました東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 炎症免疫学分野 清野宏教授、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 ワクチンマテリアルプロジェクト 國澤純先生、鈴木英彦先生に心から御礼申し上げます。

そして、実験に協力いただきました当時の卒論生、佐藤恵美学士、大島亮洋さん、棚澤佑哉さん、近江珠怜さんに心より御礼申し上げます。

研究室生活を共に過ごし、有意義な研究活動を行うにあたりましてご協力いただきました当時の同期、後輩の方々に感謝すると共に、これからのご活躍を心よりご期待申し上げます。

最後に、私の学生生活および研究活動を温かく見守ってくれた家族にこの場を借りて感謝いたします。

ありがとうございました。

研究成果の掲載誌

本博士学位申請論文は、以下の論文及び未発表結果の内容を総括したものである。

第一章

Rui Tada, Akihiro Ohshima, Yuya Tanasawa, Akari Ohmi, Saeko Takahashi, Yoichi Negishi, Hiroshi Kiyono, Jun Kunisawa, Yukihiro Aramaki,
Essential role of double-stranded host DNA released from dying cells by cationic liposomes in the mucosal adjuvant activity.
in preparation.

第二章

Saeko Takahashi, Rui Tada, Yoichi Negishi, Yukihiro Aramaki.
Mechanisms of enhanced antigen delivery to murine dendritic cells by the cationic liposomes
Open Journal of Immunology. 7(4); 85-101, (2017)

第三章

Rui Tada, Hidehiko Suzuki, Saeko Takahashi, Yoichi Negishi, Hiroshi Kiyono, Jun Kunisawa, Yukihiro Aramaki.
Nasal vaccination with Pneumococcal Surface Protein A in combination with cationic liposomes consisting of DOTAP and DC-chol confers antigen-mediated protective immunity against Streptococcus pneumoniae infections in mice.
Under revision.

引用文献

1. Fauci AS. Infectious diseases: considerations for the 21st century. *Clin Infect Dis*, **32**, 675–85, (2001).
2. Fauci AS, Touchette NA, Folkers GK. Emerging infectious diseases: a 10-year perspective from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *Emerg Infect Dis*, **11**, 519–25 (2005)
3. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, **46**, 155–64 (2008).
4. Theves G. [Smallpox: an historical review]. *Bull Soc Sci Med Grand Duche Luxemb*, **134**, 31-51 (1997).
5. Borges O, Lebre F, Bento D, Borchard G, Junginger HE. Mucosal vaccines: recent progress in understanding the natural barriers. *Pharm Res*. **27**, 211–223, (2010).
6. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*. **11**, S45–53, (2005).
7. Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* **6**, 148–158, (2006).
8. World Health Organization Vaccine Safety Basics e-learning course. <<http://vaccine-safety-training.org/types-of-vaccine-overview.html>>.
9. National institute of infectious disease. <<https://www.niid.go.jp/niid/ja/vaccine-j/249-vaccine/589-atpcs003.html>>
10. World Health Organization Vaccine Safety Basics e-learning course. “ADVERSE EVENTS: CLASSIFICATION”, <<http://vaccine-safety-training.org/adverse-events-classification.html>>
11. Azegami T, Yuki Y, Kiyono H. Challenges in mucosal vaccines for the control of infectious diseases. *Int Immunol*. **26**, 517-528 (2014)
12. Kunisawa J, Hirata S, Kiyono H. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Japan*. **76**, 11-17 (2016)
13. Kaetzel CS, Robinson JK, Chintalacharuvu KR, Vaerman, JP, Lamm M. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Proc Natl Acad. Sci USA*. **88**, 8796–8800 (1991).
14. Kunisawa J, Nochi T, Kiyono H. Immunological commonalities and distinctions between airway and digestive immunity. *Trends Immunol*. **29**, 505-513 (2008)

15. Mestecky J, Blumberg RS, Kiyono H, McGhee JR. The mucosal immune system. *Fundamental Immunology* 4th Ed.465, (2003).
16. National institute of infectious diseases. <<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/3377-rota-intro.html>> cited 15 May, 2013.
17. Mayer L, Shao L. Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat Rev Immunol.*, **4**, 407-419, (2004).
18. Freytag LC, Clements JD, Eliasson DG, Lycke N. Use of genetically or chemically detoxified mutants of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins as mucosal adjuvants. In *New Generation Vaccines*, 4th edn. 273–283, (2010)
19. Liang S, Hajishengallis G. Heat-labile enterotoxins as adjuvants or anti-inflammatory agents. *Immunol Invest.* **39**, 449–467 (2010).
20. Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev.* **56**, 622–647 (1992).
21. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol.* **12**, 592-605. (2012)
22. Robbins MA, Maksumova L, Pocock E, Chantler JK. Nuclear factor-kappaB translocation mediates double-stranded ribonucleic acid-induced NIT-1 beta-cell apoptosis and up-regulates caspase-12 and tumor necrosis factor receptor-associated ligand (TRAIL). *Endocrinology*, **144**, 4616-4625 (2003).
23. Suzuki H, Kondoh M, Kakutani H, Yamane S, Uchida H, Hamakubo T, Yagi K. The application of an alanine-substituted mutant of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin as a mucosal vaccine in mice. *Biomaterials* **33**, 317-324 (2012).
24. Aramaki Y, Fujii Y, Yachi K, Kikuchi H, Tsuchiya S. Activation of systemic and mucosal immune response following nasal administration of liposomes. *Vaccine* **12**, 1241-1245 (1994).
25. Tada R, Hidaka A, Iwase N, Takahashi S, Yamakita Y, Iwata T, Muto S, Sato E, Takayama N, Honjo E, Kiyono H, Kunisawa J, Aramaki Y. Intranasal Immunization with DOTAP Cationic Liposomes Combined with DC-Cholesterol Induces Potent Antigen-Specific Mucosal and Systemic Immune Responses in Mice. *PLoS ONE* **10**(10):e0139785, (2015).
26. Kunkel EJ, Butcher EC. Plasma-cell homing. *Nature Rev. Immunol.* **3**, 822–829 (2003).

27. Mora JR, Bono MR, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh LL, Roseblatt M, Von Andrian UH. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* **424** (6944), 88–93 (2003).
28. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, Lekeux P, Coban C, Akira S, Ishii KJ, Bureau F, Desmet CJ. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med.* **17**(8): 996-1002, (2011)
29. Korang-Yeboah M, Gorantla Y, Paulos SA, Sharma P, Chaudhary J, Palaniappan R. Polycaprolactone/maltodextrin nanocarrier for intracellular drug delivery: formulation, uptake mechanism, internalization kinetics, and subcellular localization. *Int J Nanomedicine* **10**, 4763-4781, (2015).
30. Bannunah AM, Vllasaliu D, Lord J, Stolnik S. Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: effect of size and surface charge. *Mol Pharm.* **11**, 4363-4373, (2014).
31. Yan M, Zhang Y, Qin H, Liu K, Guo M, Ge Y, Xu M, Sun Y, Zheng X. Cytotoxicity of CdTe quantum dots in human umbilical vein endothelial cells: the involvement of cellular uptake and induction of pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress. *Int J Nanomedicine* **11**, 529-524, (2016).
32. Chakraborty A, Jana NR. (2015) Clathrin to Lipid Raft-Endocytosis via Controlled Surface Chemistry and Efficient Perinuclear Targeting of Nanoparticle. *J Physl Chem Lett.* **6**, 3688-3697, (2015).
33. MSD, PNEUMOVAX®NP's attachments (2017)
34. Prevenar13 Suspension Liquid for Injection's attachments (2017)
35. Hollingshead SK, Becker R, Briles DE. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **68**, 5889 –5900, (2000).
36. Briles DE, Ades E, Paton JC, Sampson JS, Carlone GM, Huebner RC, Virolainen A, Swiatlo E, Hollingshead SK. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **68**, 796–800, (2000).
36. Kong IG, Sato A, Yuki Y, Nochi T, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kurokawa S, Okada K, Sato S, Briles DE, Kunisawa J, Inoue Y, Yamamoto M, Akiyoshi K, Kiyono H. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infecti Immun.* **81**, 1625-1634, (2013).

37. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J. Immunol.* **165**, 6107-6115, (2000).
38. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, **441**(7090), 231-234, (2006).
39. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötval J, Sjöstrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Lindén A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol.*, **162**(4): 2347-2352, (1999)
40. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis.*, **190**(3): 624-31, (2004).
41. Korsholm KS, Agger EM, Foged C, Christensen D, Dietrich J, Andersen CS, Geisler C, Andersen P. The adjuvant mechanism of cationic dimethyldioctadecylammonium liposomes. *Immunology*, **121**, 216–226, (2007)