

氏名（本籍）	<small>たかはし さえこ</small> 高橋 佐慧子（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 284 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	（主査） 准教授 根岸 洋一 教授 大野 尚仁 教授 瀬田 康生

論文内容の要旨

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、2015 年の死因において感染症が第 2 位(約 17%)を占める。故に、新しい感染症克服戦略の開発が望まれている。この中に粘膜ワクチンがあり、盛んに研究が行われている。長年、感染症予防に効果を上げてきたワクチンであるが、従来型のワクチンには致命的な問題点が存在する。既存の注射型ワクチンは、血中循環中の抗原特異的免疫応答を誘導することで、病原体の排除を可能としている。しかしながら、従来型ワクチンは多くの病原体の侵入経路である粘膜面での抗原特異的免疫誘導能が低いため、病原体の侵入を抑える効果は期待できない。したがって、粘膜面において抗原特異的免疫応答を誘導可能な粘膜ワクチンが次世代ワクチンとして期待されている。

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。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使用されている。生ワクチンは生きた病原体を構成成分とするため、安全性に懸念がある。従って、病原体自体を含まない抗原成分を用いたサブユニット型粘膜ワクチンの開発が安全性の観点から急務であるが、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。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。しかしながら、既存の方法論の多くは病原体由来の分子を利用しているため、副作用等が懸念される。

これらの問題の解決のため、当教室では病原体由来分子を用いないサブユニット型粘膜ワクチンの研究開発を行ってきた。この 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。この過程で正電荷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報告してきた。しかしながら、正電荷リポソ-

ムの有する粘膜アジュバント活性の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サブユニット型粘膜ワクチンシステム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。

【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分子パターンの関与

第一章では、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分子パターン(damage-associated molecular patterns; DAMPs)の関与について検討を行った。近年、ある種のアジュバントが投与局所において軽度の細胞死を誘導し、DAMPsである細胞内成分が漏出することにより自然免疫応答を誘導することが報告されている。また、当教室では正電荷リポソームが *in vitro* で細胞死を誘導することを報告してきた。これらの背景から、正電荷リポソームによる粘膜免疫賦活化において DAMPs が関与している可能性が考えられたため検討を行った。最初に、正電荷リポソームを経鼻投与後に投与局所である鼻粘膜組織で細胞死が誘導されているかを検討した。その結果、正電荷リポソームの経鼻投与群において鼻粘膜組織で優位に死細胞割の増加が認められた。そこで、DAMPs の一種が鼻腔中に漏出しているかを検討したところ、正電荷リポソーム投与群のみで鼻腔洗浄液中に DAMPs が検出された。

次に、正電荷リポソームの経鼻投与によって鼻腔内に漏出した DAMPs が、粘膜アジュバント活性に関与しているか否かを検討した。正電荷リポソームをモデル抗原であるオボアルブミン(OVA)と共に経鼻投与したのちに DAMPs 分解酵素で処理を行ったところ、OVA 特異的 IgA 産生が減弱した。これらの結果から、正電荷リポソームを経鼻投与すると鼻粘膜局所において軽度の細胞死が誘導されることにより細胞外に漏出した DAMPs によって正電荷リポソームによる粘膜アジュバント活性が発現することが示唆された。

【第二章】正電荷リポソームによる樹状細胞への抗原送達効率の増強作用

粘膜ワクチンシステムにおいては、粘膜固有層に存在する粘膜樹状細胞(mucosal dendritic cells; mDCs)へ抗原を送達することが必要となる。第二章では、正電荷リポソームの抗原送達キャリアとしての機能について検証を行った。当教室では既に、*in vivo* にて正電荷リポソームが mDCs への抗原送達効率を増強することを報告している。

そこで本研究では、正電荷リポソームによる抗原の DCs 取り込み増強機構の解明を目的とした。マウス樹状細胞株である DC2.4 細胞を FITC 標識 OVA と正電荷リポソーム存在下で培養したところ OVA の取り込み亢進が認められた。次に、この OVA 取り込み

における温度依存性を検討したところ、低温条件下にて OVA の取り込み促進の減少が見られた。この結果から、正電荷リポソームによる OVA の取り込み促進にはエンドサイトーシスが関与していることが示唆された。そこで種々のエンドサイトーシス阻害剤を用いて、経路の同定を試みた。その結果、正電荷リポソームによる樹状細胞の OVA 取り込み促進は、クラスリン介在性およびカベオリン非依存脂質ラフト依存性エンドサイトーシスが関与していることが示唆された(Fig.1)。さらに、OVA と正電荷リポソームが細胞内で共局在していること、および OVA と正電荷リポソームの培養系への同時添加が必須であることから、OVA と正電荷リポソームが複合体を形成することにより、上記の経路を介して取り込みが促進している可能性が示唆された。

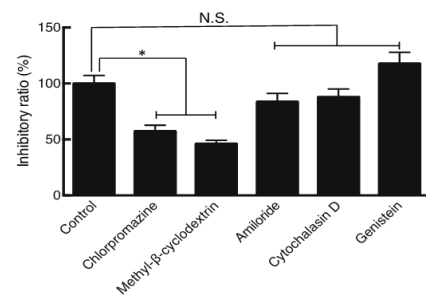


Fig. 1. Effect of various chemical inhibitors of endocytic pathways on enhancement FITC-OVA uptake by the cationic liposomes. DC2.4 cells were pre-treated with various chemical inhibitors of endocytic pathways for 30 min at 37°C, and then treated with FITC-OVA plus cationic liposomes for 1 h at 37°C. FITC-OVA uptake was analyzed using flow cytometry as mean fluorescence intensities of the cells. Significance was evaluated by an unpaired t-test with Welch's correction: * $p < 0.05$, N.S.: not significant.

【第三章】正電荷リポソームを用いた肺炎球菌ワクチンの開発

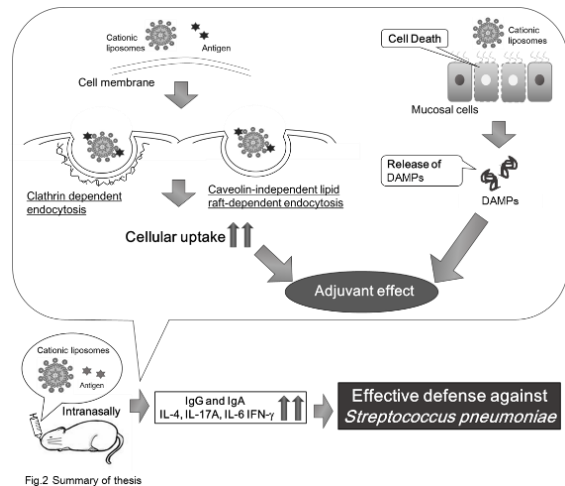
第三章では、正電荷リポソームを利用した本粘膜ワクチンシステムが実際に感染症に対する防御効果を示すか肺炎球菌感染モデルマウスを用いて検証した。肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*; *S. pneumoniae*) は最も病原性の高い細菌の1つであり、毎年五百万人が犠牲になっている。現在、いくつかの肺炎球菌ワクチンが臨床応用されているが、従来型ワクチンかつ血清型により構造の異なる莢膜多糖への免疫応答を利用しているためワクチン無応答株による肺炎球菌感染が増加し問題となっている。故に、肺炎球菌の血清型に依存しない粘膜ワクチンシステムの開発が望まれている。そこで本章では、本リポソームワクチンを利用した広域スペクトラムを有する肺炎球菌ワクチンの開発を試みた。

肺炎球菌抗原としてほぼ全ての *S. pneumoniae* 株に発現する肺炎球菌抗原を作製し利用した。作製した肺炎球菌抗原を正電荷リポソームとともに経鼻投与したところ、抗原特異的粘膜 IgA および血清 IgG 産生の促進がみられた。次に、本リポソームワクチンを経鼻投与にて免疫し、最終免疫から1週間目に *S. pneumoniae* を経鼻感染させた。その結果、肺炎球菌抗原を正電荷リポソームとともに経鼻投与した群において、有意に肺炎球菌感染による致死率が改善することが明らかになった。さらに、本粘膜ワクチンシステムでは肺炎球菌に対する感染防御機構として重要である肺における抗原特異的 IgG 産生促進および抗原特異的な interleukin-17A (IL-17A) 産生が誘導されていることも明らかとなった。これらの結果から、正電荷リポソームを粘膜アジュバントとして用いた本粘膜ワクチンシステムは、感染症防御機能を有することが示された。

【総括】

本研究により、正電荷リポソームの有する粘膜アジュバント活性は以下の2つの作用

によって発現していることが明らかになった。すなわち、正電荷リポソームは投与局所において軽度の細胞死を誘導し、細胞外へ DAMPs 漏出を起こす。この漏出した DAMPs によって自然免疫の活性化を誘導し、粘膜アジュバント活性を発現する。また、正電荷リポソームは抗原と複合体を形成することにより DC への抗原取り込みを促進することも明らかとなった。さらに本研究では本粘膜ワクチンシステムの応用することにより、非侵襲性肺炎球菌ワクチンを創成することができた



(Fig. 2)。本検討で得られた成果は、他の感染症あるいはワクチンによって治療あるいは予防可能な他の疾患にも有用であると考えられる。今後の更なる検討により、本粘膜ワクチンシステムを用いた疾患治療システムの開発が期待される。

【研究成果の掲載誌】

- (1) Mechanisms of enhanced antigen delivery to murine dendritic cells by the cationic liposomes. Open Journal of Immunology. 7(4); 85-101, (2017)

論文審査の結果の要旨

現在、感染症が死因の上位を占めることから、新たな感染症克服戦略として有用な粘膜ワクチン開発が望まれている。既存の注射型ワクチンは、血中循環中の抗原特異的免疫応答を誘導することで、病原体の排除を可能としているが、これら従来型ワクチンは多くの病原体の侵入経路である粘膜面での抗原特異的免疫誘導能が低いため、病原体の侵入を抑える効果は期待できない。そのような背景から、粘膜面における抗原特異的免疫応答を誘導可能とする粘膜ワクチンの開発が切望されている。本研究では、粘膜アジュバントとして機能する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解析、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、種々の検討を行った。

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を明らかにするために、正電荷リポソームの経鼻投与による鼻腔内へのゲノム DNA の漏出評価を行ったところ、正電荷リポソームの経鼻投与後に軽度の細胞障害が生じ、ゲノム DNA が鼻腔内に漏出することを示した。さらにゲノム DNA のアジュバント活性について検討したところ、鼻腔 IgA 抗体産生が誘導され、その効果は DNase I 併用時では顕著に減弱することが示された。以上のことから、正電荷リポソームを経鼻投与することで、アジュバント効果を誘導することが可能となり、その誘導機構の一つには、鼻腔におけるゲノム DNA の漏出が寄与していることを明らかとした。

第二章では、粘膜ワクチンシステムにおいては、粘膜固有層に存在する粘膜樹状細胞(mucosal dendritic cells; mDCs)へ抗原を送達することが必要となることから、正電荷リポソームの抗原送達キャリアとしての機能について検討した。これまでに、*in vivo*にて正電荷リポソームが mDCs への抗原送達効率を増強することを報告していることから、本章では、正電荷リポソームによる抗原の DCs 取り込み増強機構の解明を行った。モデル抗原として、FITC 標識 OVA を用いて、マウス樹状細胞株である DC2.4 細胞における抗原の取り込みについて調べたところ、正電荷リポソーム共存下による効率的な取り込み亢進が示された。また、その OVA の取り込みは低温条件下で阻害されたことから、正電荷リポソームによる OVA の取り込み亢進にはエンドサイトーシスが関与していることが示された。さらに詳細な OVA 取り込み経路を解析したところ、クラスリン介在性およびカベオリン非依存脂質ラフト依存性エンドサイトーシスが関与していることを明らかとした。共焦点顕微鏡観察の結果から、OVA と正電荷リポソームが細胞内で共局在していること、および OVA と正電荷リポソームの培養系への同時添加が必須であることから、正電荷リポソームは OVA と複合体を形成することで、上記の経路を介して取り込みを亢進している可能性を示した。

第三章では、正電荷リポソームを利用した本粘膜ワクチンシステムが実際に感染症に対する防御効果を示すか否かについて、肺炎球菌感染モデルマウスを用いて検討した。肺炎球菌抗原としてほぼ全ての *S. pneumoniae* 株に発現する pneumococcal surface protein A (PspA)を用いた。PspA 抗原を正電荷リポソームとともに経鼻投与することで、PspA 特異的粘膜 IgA および血清 IgG 産生誘導が可能となることを明らかとした。次に、本リポソームワクチンを経鼻投与にて免疫し、最終免疫から 1 週間目に *S. pneumoniae* を経鼻感染させた。その結果、PspA 抗原を正電荷リポソーム

とともに経鼻投与した群において、有意に肺炎球菌感染による致死率を改善できることを明らかとした。さらに、本粘膜ワクチンシステムでは肺炎球菌に対する感染防御機構として重要である肺における抗原特異的IgG産生亢進および抗原特異的なinterleukin-17A (IL-17A)産生を誘導できることも示した。以上の結果から、正電荷リポソームを粘膜アジュバントとして用いた本粘膜ワクチンシステムは、感染症防御機能を有することを明らかとした。さらに、IL-17Aは肺炎球菌感染だけでなく他の細菌および真菌感染などの防御応答にも重要であることから、種々の感染症ワクチンへの応用も可能となると考えられる。

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した。

以上、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、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行うとともに、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とした。本研究で得られた知見は、今後の新たな感染症に有用な粘膜ワクチン開発に有益な知見を与えるものである。よって本論文は博士（薬学）学位申請論文として相応しい研究内容と判断する。