

【アジュバントワークショップ 講演⑤】

「粘膜アジュバントとDDS研究の新展開」

東京大学医科学研究所炎症免疫学分野教授 清野宏

ただいまご紹介にあずかりました清野でございます。石井先生には、過分のご紹介ありがとうございます。

きょう、私のお話は、私どもが進めております粘膜免疫のユニーク性というものに立脚したワクチン開発ということで、我々の最近の進行状況をご紹介してみたいと思います。

粘膜免疫のユニーク性、それから柔軟性というのがきょうのシンポジウムの中でも出てきているわけですが、一つ大きな点は、こちらにお示ししてあるような粘膜面からワクチンを投与することによって、我々の生体が持っている第一線のバリアと言われる粘膜面、それから体の中、両方にきちっと免疫応答が誘導できるという利点があるわけです。

今までは腸管での粘膜免疫に立脚した経口ワクチン、それから先ほど石井（保之）先生のほうからもお話しがありましたけれども、呼吸器の粘膜免疫に立脚した経鼻ワクチンということになります。

その中でも、我々が今一つの目標としておりますのは、注射器、注射針が必要ないワクチンということを見ると、経口ワクチンというのが非常に魅力的であるということになってまいります。

経口ワクチンに関しましては、既に数年前に私たちの取り組みをこのフォーラムでもお話しをさせていただいたと思います。

その新しい経口ワクチンということでは、お米を食べるという発想から180度転換をして、新しいワクチンをつくる生産体、そしてお米は常温で長期間保存できるということを考えて、いわゆる冷蔵保存が不要なワクチンの貯蔵体、そして経口投与に使える医薬製剤としてのコメということで、M u c o R i c e という形で研究を展開しております。

これに関しましては、また別の機会にその後の進展をお話しをしていきたいと思っておりますけれども、植物工学とそれから粘膜免疫学が融合するというような形で、新しいワクチンの開発というところに結びついていくのではないかなというふうに思っております。

きょう、お話ししてみたいことは、一つ、新しい視点として、目もある意味

では直接外界に接しているということで、粘膜免疫の一部をなしているわけです。そこで、点眼で免疫誘導ができるのかということについて、最近の知見をご紹介します。としたいと思います。

目の粘膜免疫について検討については、昨年、卒業しました大学院生の長竹（貴広）君らが中心となって進めてまいりました。これはマウスですけれども、こちらにお示ししてありますように、眼窩領域と鼻腔領域を結んでいる涙管、涙道と言われているところに、リンパ節状の組織が存在しているということがわかってまいりました。これがこちらにお示ししてありますけれども、涙管関連リンパ組織ということで、TALTというふうに呼んでおります。

このTALTの詳細を検討してまいりますと、涙道側、もしくは涙管側のTALTをおおっている上皮細胞層のところに、腸管のパイエル板の上皮細胞に存在しているようなM細胞が存在しているということもわかってまいりました。

これをさらに電顕で検討してみますと、腸管のパイエル板に存在しているM細胞と同じような形態を持っている。一見眺めますと、上皮細胞層のところで、落とし穴になっているような状態のM細胞が存在しているということもわかってまいりました。

さらに、この細胞が実際に抗原を取り込むことができるのかということを検討してみますと、例えばサルモネラ菌にGFPの遺伝子を導入したもの、また目の感染ということで考えますと、緑膿菌ということになるわけですけれども、この緑膿菌にGFPの遺伝子を導入したもの、これを点眼で暴露してみますと、確かにTALTの上皮細胞層のところに存在しているM細胞から取り込まれるというような像も見えてまいりますし、確かにTALTの中に、この細菌群が取り込まれるということもわかってまいりました。

次に、このTALTと言われている新しく見つかった粘膜関連リンパ組織の中に、きちっと抗原に特異的な免疫応答を誘導できるような細胞群が存在しているかということを検討してみますと、確かにTALTの上皮細胞層の直下には、CD11c⁺の樹状細胞と言われているようなものが非常に高頻度で存在しているということもわかってまいりましたし、その直下にはB細胞領域、そしてT細胞領域と言われているような微小免疫構造があり、いわゆるパイエル板ですとか、鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）と言われているような粘膜免疫を担当するような誘導組織であろうということが示唆されてまいりました。

さらに、実際に点眼という形で、ワクチン抗原を投与して、抗原に特異的な

免疫応答が誘導できるかということになるわけですが、よく粘膜免疫の世界で使われる抗原でありますコレラトキシンを点眼という形で投与いたしますと、確かにTALTを中心として、例えばIgAのクラススイッチングに必要なAIDの発現が上昇してまいりますし、さらに涙道の粘膜固有層には非常にたくさんのIgA産生細胞が誘導されてくるということもわかってまいりました。

さらに、実際に抗原に特異的な抗体産生細胞が誘導されているか調べる為にELISPOT法を使って検討してみますと、こちらにお示ししてありますように、例えば涙道、それから鼻腔にきちっと抗原に特異的なIgA産生細胞が誘導されていますし、さらに全身系の免疫を代表するような脾臓には、抗原に特異的なIgG抗体産生細胞が誘導できています。つまり、点眼投与で、粘膜系と全身系、両方に抗原に特異的な免疫応答が誘導できているということがわかってまいりました。

さらに、抗原に特異的なCD4型のT細胞も、きちっとこのTALTの中に誘導できているということもわかってまいりました。例えば、CTのBサブユニットのテトラマーを使いますと、免疫前と比較すると、点眼免疫ということを行いますと、TALTの中に抗原に特異的なCD4⁺T細胞も誘導されているということがわかってまいりました。

そうしますと、顎顔面と言われているところにも非常に巧妙な粘膜免疫機構が存在しております。今までは経鼻ワクチンということで、鼻腔での粘膜免疫を中心とした可能性が検討されてきたわけですが、新しい可能性として、実用化ということに結びつくかどうかは別として、点眼という形でも粘膜免疫機構を介して、全身系と粘膜系に免疫応答が誘導できる。その中核として、Tear duct-Associated Lymphoid Tissue (TALT) というものが重要な役割を果たしているのではないかという可能性が示唆されてまいります。

次に、呼吸器の粘膜免疫機構を基盤とした経鼻ワクチンの開発について、紹介いたします。本日も、インフルエンザのワクチンということで、経鼻ワクチンということが議論されているわけですが、確かに鼻腔領域を眺めていきますと、NALTと言われているところに、きちっと抗原に特異的な免疫応答を誘導できるような細胞が集積しておりますし、そして上皮細胞層のところには、M細胞と呼ばれている吸入抗原を取り込むような細胞も存在しています。

さらに、鼻腔全体を眺めていきますと、例えば鼻腔領域の鼻介と言われてい

るような領域、ここにも最近、我々、いわゆるM細胞と言われているような抗原を取り込む細胞が存在しているということがわかってまいりました。そうしますと、鼻腔粘膜のところには、非常に多様な抗原を取り込むシステムが存在しているということで、経鼻免疫によって、非常に効果的に免疫応答が誘導できるということの一つの裏づけということになってまいります。

一方で、実際にこの経鼻ワクチンということを考えてときには、我々、乗り越えなければならない課題もあるわけです。例えば、経鼻ワクチンのときには、石井先生の最初の紹介のところでもお話しがありませんでしたが、嗅覚細胞、嗅覚を介して、中枢神経とつながっているということですから、経鼻投与という形で、いわゆるアジュバントも含めて生物活性のあるものを投与するということを考えてときには、そこへの影響ということを考えていかなければなりません。

それをどうやって克服できるのかということになってまいります。

その一つの可能性といたしまして、私どもの研究室では、幸、野地らを中心として、東京医科歯科大学の秋吉（一成）先生らのグループとの共同研究で、いわゆる今、がんペプチドワクチンに使われているシャペロン型のナノゲル、これを経鼻ワクチンに使えないかということを考えてみました。

ナノゲルに関しては既に、秋吉先生のほうからいろいろな論文が出ておりますので、時間の関係もありますので、詳細は述べませんが、もう一つ、我々が通常のナノゲルだけではなくて、もう一つ、一ひねりを加えてみようということを考えました。

つまり、鼻腔の粘膜上皮を考えてみますと、ここはいわゆるネガティブチャージであるということですから、このナノゲルをカチオン化することによって、ポジティブなチャージをつけることによって、より粘膜での付着性が向上するのではないかということを考えました。

その可能性が正しかったかどうかということを中心に検討してみようということで、浜松ホトニクスさんの塚田先生らの協力を得まして、ナノゲルに実際に抗原を封入いたしました。これは大阪府立大学の小崎（俊司）先生らのグループの協力を得まして、ボツリヌス菌のA鎖のC末端ワクチン抗原を封入したカチオン型のナノゲル、これを使いまして、実際にPETとCTを使って、経鼻ワクチンをした後のカチオン化したナノゲルの動態を追いかけてみました。

そうしますと、こちらにお示ししてありますように、ワクチン抗原単体の場

合には、大体1時間を過ぎてしまいますと、噴霧投与後ワクチン抗原が鼻腔の粘膜から消失してまいります。一方で、このカチオン化したナノゲルでワクチンを投与いたしますと、こちらでお示ししてありますけれども、10時間以上、鼻腔の粘膜上皮のところには張りついたような状態になっているということがわかってまいりました。

そうしますと、このカチオン化のナノゲルを使うことによって、ワクチン抗原を非常に長期間、鼻の粘膜に張りついたような状態をつくることができるということになってまいります。

では、次に、この張りついた状態から、抗原を鼻腔に存在する粘膜免疫担当細胞に抗原を渡すことができるのかということを検討してみました。

この検討には、カチオン化したナノゲルと、それから実際のワクチン抗原にそれぞれ異なる蛍光色素をつけておいて、そして鼻に投与して、実際にナノゲル、それからワクチン抗原が動態をとっているのかということを中心に検討してみました。

そうしますと、先ほどお話ししましたように、カチオン化したナノゲルを使うことによって、鼻腔の粘膜上皮層のところには非常に長期間ワクチン抗原を付着させておくことができますよということをお示ししましたけれども、確かにそのとおり、こちらにお示ししてありますように、鼻の粘膜面のところに非常に長期間付着しています。さらに、この付着している場所をもう少し拡大して眺めてまいりますと、大体6時間過ぎぐらいから、こちらにお示ししてありますように、だんだんだんだんワクチン抗原が上皮細胞層から粘膜固有層側にしみ出るように、到達しているということがわかってまいりました。さらに、きょうは時間がなくてお示ししませんけれども、これに並行して、鼻の上皮細胞層に存在している、もしくは粘膜固有層に存在している樹状細胞がどんどんどんどん集まってくるというようなこともわかってまいりました。

そうしますと、カチオン化したナノゲルはただ単にワクチン抗原を鼻の上皮細胞のところには付着させるだけではなくて、ゆっくりゆっくりとワクチン抗原を粘膜免疫系に渡すことができるのではないかということになってまいります。

では、実際にこれを使って、抗原に特異的な免疫応答を誘導できるのかということを検討してみました。

幸・野地らの検討によりますと、こちらにお示ししてありますように、カチオン化したナノゲルを使って経鼻免疫という形で免疫をいたしますと、確かに

鼻の粘膜の固有層のところに、たくさんのI g A産生細胞が誘導されてまいります。この産生細胞を実際に分離してまいりまして、そして検討してしますと、非常に高頻度で抗原に特異的な、この場合にはボツリヌス菌の毒素に対する特異的なI g A抗体産生細胞が誘導されています。それを反映するように、鼻腔の分泌液中には、非常に高いレベルで、抗原に特異的なI g A抗体が誘導されていますし、さらに鼻から免疫することによって、全身系にもきちっと抗原に特異的なI g G抗体を中心とした免疫応答が誘導できているということがわかってまいりました。

さらに、実際にこの誘導された抗体が毒素に対する中和効果があるかということも幸・野地らが検討しております。そうしますと、例えば腹腔内を通してボツリヌス菌の毒素を投与する、もしくは経鼻という形で粘膜面からボツリヌス菌毒素を投与する。そういう毒素暴露実験系をしてまいりますと、カチオン化ナノゲルでワクチンを投与した群では、非常に高いレベルで免疫応答が粘膜系とそれから全身系両方に誘導されていますので、毒素を腹腔内に投与しようが、経鼻から投与しようが、きちっとそれぞれの抗体が中和抗体として働いて、防御免疫として機能しているということがわかってまいりました。つまり、カチオン化したナノゲルを新しい経鼻ワクチンのデリバリー体ということで使う可能性が非常に強く示唆されてきたということになってまいります。

では、そのメカニズムな何かを検討してみますと、例えば、サーキュラーダイクロイズムアナライシスをしてみますと、このナノゲルに入れることによって、ワクチン抗原がシャペロンという形で保護されたような状態で粘膜免疫系に送達されているのではないかということも示唆されてまいりました。

そうしますと、こちらにお示ししてありますように、ワクチン抗原がシャペロン作用によって、粘膜免疫側に渡されて、そして樹状細胞が直ちにそれを取り込むというようなところも観察されてまいりますし、実際にこの細胞群を分離してまいりますと、CD11c細胞がほとんどのワクチン抗原を取り込んでいるということもわかってまいりました。

時間の関係もありますので、最後に安全性はどうかということで、経鼻ワクチンという形で投与したときには、嗅覚細胞から中枢神経に抗原が入っていくということが大きな問題として指摘されています。実際にこれを検討してみますと、こちらにお示ししてありますように、CT-Bの場合には、前から言われているように、確かに嗅覚球に非常に結合しているということが確認できま

す。一方で、このカチオン化ナノゲルで投与した場合には、抗原が嗅覚細胞のところまで到達していることはないということで、嗅覚細胞を介した脳への影響ということも少ないのではないかとということが示唆されてまいります。

ということで、この新しいカチオン化したナノゲルというものを使うことによって、新しい形での経鼻ワクチンということが考えられるのではないかとということになってくると思います。

最後に、この研究の中心的な役割を果たしてまいりました私どもの研究室の共同研究者をご紹介しますと終わりにしたいと思います。

このカチオン化したナノゲルということに関しましては、東京医科歯科の秋吉先生のグループと、私どもの研究室の幸・野地らを中心とした研究の一部をご紹介しますいただきました。

どうもご清聴ありがとうございました。（拍手）