

総 説

## 樹状細胞を活性化する経鼻 DNA アジュバントの開発

— 感染症・NCD 制御を目指す粘膜ワクチン —

片岡 宏介<sup>1)</sup> 土居 貴士<sup>1)</sup> 神 光一郎<sup>1)</sup> 上根 昌子<sup>1)</sup>  
伊藤 博夫<sup>2)</sup> 落合 (栗田) 智子<sup>3)</sup> 三宅 達郎<sup>1)</sup>

**概要：**WHO (2014) のレポートでは、2012 年全世界の総死亡数は 5,600 万人であり、その内訳として非感染性疾患 (NCD) によるものが約 3,600 万人<sup>\*1</sup>、感染症が約 950 万人と報告している<sup>\*2</sup>。超高齢社会のわが国においても、悪性新生物 (ガン)、心疾患、肺炎による死亡数は上位を占め、年々増加の一途をたどっており、「健康寿命の延伸」と「健康格差の縮小」はわが国の保健政策の課題となっている。

われわれはこれまで、粘膜からの病原微生物の侵入阻止ならびに侵入後の体内防御を可能とする粘膜ワクチンの研究を行ってきた。本稿では、粘膜ワクチンによって誘導される粘膜免疫応答と経鼻投与型 (経鼻) ワクチンの特性について述べたうえで、樹状細胞を活性化するサイトカイン Flt3 ligand を発現する DNA ベクターや、CpG オリゴデオキシヌクレオチドを併用した粘膜 DNA アジュバント (免疫賦活化剤) について、われわれのこれまでの研究開発について概説する。またそれらアジュバントを用いた経鼻ワクチンが、肺炎球菌感染下の老齢マウスにおいて、若齢マウスとかわらない免疫応答を誘導し肺炎球菌の定着を阻害することや、歯周病原細菌感染により誘発したアテローム性動脈硬化を経鼻ワクチンが抑制することを紹介する。

近い将来、粘膜ワクチンが、感染症だけでなく NCD をも制御し、わが国の「健康寿命の延伸」と「健康格差の縮小」という国家課題の克服と、世界的に進行する高齢社会の人々の QOL 向上に貢献するツールになりうることを期待する。

索引用語：粘膜免疫機構、粘膜ワクチン、粘膜 DNA アジュバント、樹状細胞

口腔衛生会誌 67 : 2-10, 2017

(受付：平成 28 年 8 月 6 日 / 受理：平成 28 年 9 月 9 日)

### 緒 言

#### 1. ユニークな「粘膜免疫機構」下での粘膜免疫応答

口・鼻腔からはじまる消化管・呼吸器などの粘膜面は、病原微生物をはじめとする抗原、アレルゲンに常時曝露されている。そういった状況下での粘膜は、病原微生物の侵入に対して監視・排除を担う<sup>1)</sup>一方、食物抗原やマイクロバイオーームとの共存・バランスを図る<sup>2)</sup>というユニークな生体応答、つまり「粘膜免疫機構」を作動させている。つまり「粘膜免疫機構」は、外界との恒常性を保ちつつ、第一線での監視・バリア機構としてわれわれの体を外敵から守っているのである<sup>2)</sup>。

従来の注射ワクチンは、全身系の免疫応答を引き起こ

せるが、粘膜部での抗原特異的分泌型 IgA 抗体の誘導は非効率的で困難なことが知られている。しかしながら、「粘膜免疫機構」を活用した「粘膜ワクチン」は、粘膜部での抗原特異的分泌型 IgA 抗体を効率的に誘導可能で、さらに全身系の免疫応答の誘導も期待できる (図 1)。つまり、粘膜を介する「粘膜ワクチン」は、病原微生物の粘膜部からの「侵入阻止」と、侵入後の体内からの「駆逐」という二段構えの免疫システムを効果的に作動させることができる。他にも粘膜ワクチンは、注射針や注射筒が不要のため無痛かつ器具の繰り返し使用による二次感染や医療事故を回避、医療廃棄物を排出しないことによる医療費削減、社会的インフラが崩壊した災害時でも簡便に接種できるといった理由などから、新

<sup>1)</sup> 大阪歯科大学口腔衛生学講座

<sup>2)</sup> 徳島大学大学院医歯薬学研究所予防歯学分野

<sup>3)</sup> 日本大学松戸歯学部微生物免疫学講座

<sup>\*1</sup> WHO : Global Action Plan for the Prevention and Control of NCDs 2013-2020, [www.who.int/nmh/events/ncd\\_action\\_plan/en/](http://www.who.int/nmh/events/ncd_action_plan/en/) (2016 年 9 月 8 日アクセス)。

<sup>\*2</sup> WHO : The 10 leading causes of death in the world 2012, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (2016 年 9 月 8 日アクセス)。

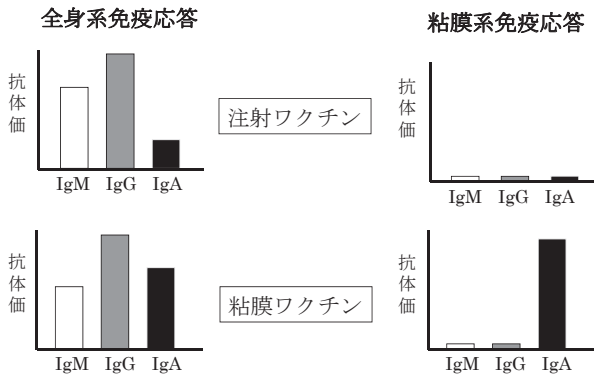


図1 注射ワクチンと粘膜ワクチンの免疫応答の比較 (概念図)

しい社会的貢献ツールとして「次世代型ワクチン」と期待されている。

## 2. 誘導および実効組織における粘膜免疫応答システム

粘膜面に投与されたワクチン抗原は、主に粘膜関連リンパ組織 (mucosa-associated lymphoid tissue: MALT) の粘膜上皮層に存在する M (microfold) 細胞の飲・食作用により取り込まれ、その直下に存在する典型的な抗原提示細胞である樹状細胞によって処理される。次に MALT に存在するナイーブなリンパ球は抗原提示によって活性化され、抗原特異的なエフェクター細胞へと分化する<sup>3)</sup>。代表的な MALT は、鼻腔では鼻咽頭関連リンパ組織 (マウスでは nasopharyngeal-associated lymphoid tissue: NALT, ヒトではワルダイエル扁桃輪)、消化管ではパイエル板をはじめとした腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue: GALT) が知られているが、これらは抗原特異的 IgA 抗体の誘導に必要な免疫担当細胞の分化・活性化を担う「誘導組織」である。MALT で抗原情報を受け取り、分化・活性化された抗原特異的ヘルパー T 細胞, IgA<sup>+</sup>B 細胞や傷害性 T 細胞は,  $\alpha 4 \beta 1$  インテグリンやケモカイン受容体 CCR10 を発現し, 血流や頸部リンパ節などのリンパ循環を経て, 鼻腔粘膜・腸管粘膜や上気管支, 唾液腺といった「実効組織」へとホーミングする (図 2)。そして, 「実効組織」においては, ヘルパー T 細胞からの刺激を受けた IgA<sup>+</sup>B 細胞は増殖, 形質細胞に分化し, 抗原特異的多量体 IgA 抗体 (おもに二量体) を産生する。これら多量体 IgA 抗体は粘膜上皮細胞の基底部に存在する多量体 Ig レセプターと結合し, エンドサイトーシスにより取り込まれた後, 上皮細胞を通過し管腔側粘膜面に分泌され (分泌型 IgA 抗体: SIgA), 病原性微生物の侵入に対する防御機能を作動する<sup>3)</sup>。このように「粘膜免疫応答システム」は, 誘導組織から実効組

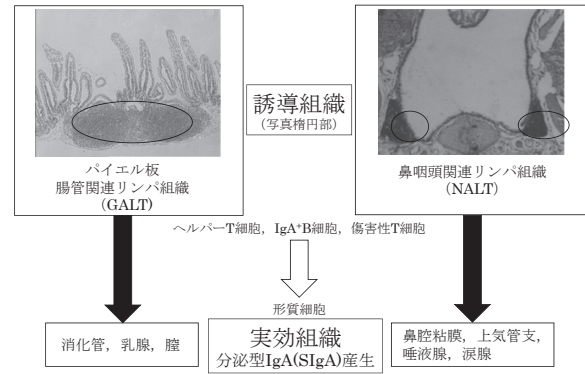


図2 粘膜免疫応答システム

織へのダイナミックな細胞移動メカニズムから成り立っている<sup>4)</sup>。

## 3. 粘膜アジュバントの必要性と DNA アジュバント

通常, 抗原の単独投与では感染防御に十分な免疫応答を誘導することは困難であり, 時には免疫寛容となる場合もある。ワクチンが十分な効果を発揮するためには自然免疫応答の活性化が極めて重要で<sup>5)</sup>, その活性化を担うのがアジュバント (免疫賦活化剤) である。つまりアジュバントは, Toll-like receptors (TLRs) や RIG-like receptors (RLRs) といった自然免疫受容体に認識されることで抗原提示細胞が活性化され, 獲得免疫応答を誘導する<sup>6,7)</sup>。アジュバントの開発研究で最もよく検討されている自然免疫受容体の一つは TLRs であり<sup>8)</sup>, その代表的な受容体の一つである TLR9 に対するリガンド CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) は, MyD88 依存性の細胞内伝達経路を活性化し, 最終的に I 型インターフェロンや炎症性サイトカインを誘導し, 強力なアジュバントとして働くことが動物実験で明らかにされている<sup>9,10)</sup>。

## 4. 経鼻ワクチンにより誘導される免疫応答の特性

経鼻ワクチンは, 誘導組織 NALT の免疫担当細胞の分化・活性化を促し, 口・鼻腔をはじめとした上気道関連粘膜部や全身系での免疫応答を効率よく誘導する<sup>11)</sup>。一方, 経口ワクチンは, 誘導組織 GALT の免疫担当細胞を通じて腸管や全身系の免疫応答を誘導する (図 2)。

これら NALT と GALT により誘導される免疫応答について, われわれは老齢マウス (1 年齢および 2 年齢) と若齢マウス (8 週齢) を用いた次の実験報告を行った<sup>12)</sup>。老齢マウスの GALT (腸パイエル板) では CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> ナイーブ T 細胞数が若齢マウスより有意に減少しているが, NALT では老齢マウスでの CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> ナイーブ T 細胞数の減少はみられず若齢マ

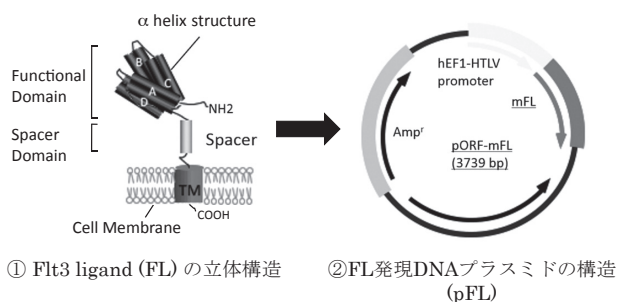


図3 樹状細胞を分化・活性化する FL と発現 DNA ベクター

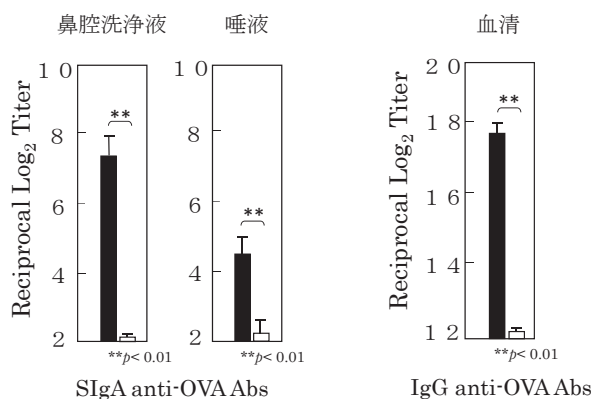


図4 経鼻 DNA アジュバント pFL 投与後の抗体産生  
 ■ pFL+OVA 抗原 (実験群)  
 □ FL 遺伝子をコードしない空プラスミド (pORF)+OVA 抗原 (対照群)  
 引用文献<sup>18)</sup>

ウスとの差は認められなかった<sup>12)</sup>。そこで、われわれは老齢マウス (1 年齢) と若齢マウス (8 週齢) に、抗原とともに粘膜アジュバントの一つであるコレラ毒素を経口または経鼻ワクチンとして投与したところ、若齢マウスでは経口、経鼻ワクチンにかかわらず抗原特異的免疫応答の誘導が認められた。しかし老齢マウスでは、経口ワクチンによる抗原特異的免疫応答はみられず、経鼻ワクチンを投与した老齢マウスの粘膜系および全身系の抗原特異的応答がみられ、またその誘導された抗体価は老齢、若齢マウス間で差は認められなかった<sup>12)</sup>。それ以外にも経鼻ワクチンを投与した老齢マウスの鼻腔粘膜、顎下腺といった実効組織における抗体産生細胞の数や脾臓および頸部リンパ節 CD4<sup>+</sup>T 細胞からの Th2 型サイトカイン (IL-4, 5, 6) 産生量に若齢マウスとの差は認められなかった。つまり、経鼻ワクチン投与による NALT が関連する一連の免疫応答は、加齢の影響を受けることが少ないと考えられた<sup>12)</sup>。これらの結果からわれわれは、高齢者にも投与できる安心かつ容易で、そしてワクチン

表1 経鼻 DNA アジュバントにより誘導された樹状細胞

アジュバント	全リンパ球中に占める割合 (%)			
	プラスミドベクター		アデノウイルスベクター	
	実験群 (pFL)	対照群 (pORF)	実験群 (AdeFL)	対照群 (AdeLuc)
実効組織				
鼻腔粘膜	11.0±4.3**	3.1±1.0	10.3±1.9**	3.5±1.8
顎下腺	18.5±5.6**	5.4±1.9	17.7±5.0**	3.3±2.1
誘導組織				
NALT	5.6±1.8*	1.9±0.8	2.7±2.3	2.5±1.0

\*\*p<0.01, \*p<0.05

プラスミドベクターでは、実験群には pFL+OVA, 対照群には FL 遺伝子をコードしない空プラスミド (pORF)+OVA, アデノウイルスベクターでは、実験群には AdeFL+OVA, 対照群には FL 遺伝子をコードしないアデノウイルスベクター (AdeLuc)+OVA を投与した。

効果の高い経鼻ワクチンの開発を目的とし、NALT 樹状細胞をターゲットにした新たな経鼻 DNA アジュバントの検討を行うこととした。

### NALT 樹状細胞を活性化する 経鼻 DNA アジュバント

サイトカイン Flt3 ligand (FL) は、ヒトでは 235 アミノ酸、マウスでは 231 アミノ酸からなる 4 本の α ヘリックス構造を有する I 型膜貫通タンパクであり (図 3-①), T リンパ球や骨髄内の間質細胞、線維芽細胞上に発現している。FL は、レセプターとの結合や生物活性という点ではマウスとヒトとの種特異性は特に認められていない<sup>13,14)</sup>。またプロテアーゼにより切断され遊離した可溶性アイソフォームは、造血幹細胞や骨髄球系・リンパ球系前駆細胞上のレセプターである III 型受容体チロシンキナーゼ Flt3 と結合し、造血細胞の分化・増殖や造血幹細胞の自己複製に深く関わっている<sup>15-17)</sup>。

われわれは NALT 樹状細胞を活性化させるために、実験群のマウスにサイトカイン FL を発現する DNA プラスミド (図 3-②: pFL, マウス FL 遺伝子を発現プラスミドに組み込んだもの) を粘膜アジュバントとし、卵白アルブミン (Ovalbumin: OVA) 抗原とともに週 1 回計 3 回経鼻投与し、抗原に対する特異的免疫応答を検討した。対照群 (アジュバントには FL 遺伝子をコードしていない空の DNA プラスミド pORF を使用) のマウスと比較した時、実験群の鼻腔洗浄液、唾液の抗原特異的 IgA 抗体価および血清における抗原特異的 IgG 抗体価の上昇が有意に認められた (図 4)。興味深いことに実験群の鼻腔洗浄液および血中 FL 量が増加してお

**表 2** アジュバント pFL 投与による脾臓および頸部リンパ節 CD4<sup>+</sup>T 細胞のサイトカイン産生

	抗原刺激により産生したサイトカイン量	
	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
脾臓		
実験群	780 $\pm$ 110	31.3 $\pm$ 1.1*
対照群	320 $\pm$ 146	17.2 $\pm$ 1.8
頸部リンパ節		
実験群	940 $\pm$ 180	56.0 $\pm$ 13.6*
対照群	680 $\pm$ 150	18.8 $\pm$ 9.9

\* $p < 0.05$

実験群には pFL+OVA, 対照群には FL 遺伝子をコードしない空プラスミド (pORF)+OVA を投与した. CD4<sup>+</sup>T 細胞は, OVA 抗原刺激後, サイトカイン量を ELISA 法により測定した.

り, さらに誘導組織 NALT や実効組織である顎下腺や鼻腔粘膜において, 樹状細胞数が有意に増加していることが認められた (表 1 左: プラスミドベクター). またその樹状細胞は分化・活性化を示す表面マーカーが多数発現し, 活性化した成熟樹状細胞であることが認められた<sup>18)</sup>. さらに実験群からの脾臓および頸部リンパ節における CD4<sup>+</sup>T 細胞からは, Th2 型サイトカイン (IL-4) の有意な産生が認められた (表 2). これらの結果より, pFL アジュバントを用いた経鼻ワクチンは, FL 産生することにより成熟樹状細胞が増加し, Th2 型免疫応答を誘導し, 粘膜部や全身系における抗原特異的抗体の上昇がみられたと考えられた<sup>18)</sup>.

### デリバリーシステムの改良による免疫誘導

次にわれわれは, アジュバント投与により引き起こされる自然免疫応答をさらに高めることを目的に, 粘膜アジュバントのデリバリーシステムの改良を試みた. すなわち, アデノウイルス発現ベクター (serotype 5) に FL 遺伝子を導入したもの (AdFL) をアジュバントとし, OVA 抗原とともにマウスに経鼻投与した. 対照群 (FL 遺伝子を外したアデノウイルスベクター: AdeLuc を使用) と比較して, 実験群のマウスの粘膜部では pFL 経鼻投与と同様の成熟樹状細胞数の有意な増加が認められ (表 1 右: アデノウイルスベクター), 粘膜部 (鼻腔洗浄液, 唾液) および全身系 (血清) での抗原特異的免疫応答の上昇が認められた. 面白いことに対照群と比べて, 実験群のマウスの脾臓および頸部リンパ節の CD4<sup>+</sup>T 細胞からは Th2 型サイトカイン (IL-4) だけでなく, Th1 型サイトカイン (IFN- $\gamma$ ) の有意な産生 (表 3) が認められた<sup>19)</sup>. さらにこの誘導された樹状細胞の解析を進め

**表 3** アジュバント AdeFL 投与による脾臓および頸部リンパ節 CD4<sup>+</sup>T 細胞のサイトカイン産生

	抗原刺激により産生したサイトカイン量	
	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
脾臓		
実験群	4.7 $\pm$ 1.0*	69.2 $\pm$ 11.0*
対照群	1.8 $\pm$ 0.3	31.4 $\pm$ 10.6
頸部リンパ節		
実験群	2.2 $\pm$ 0.4*	121.7 $\pm$ 24.5*
対照群	0.7 $\pm$ 0.3	27.5 $\pm$ 18.1

\* $p < 0.05$

実験群には AdeFL+OVA, 対照群には FL 遺伝子をコードしないアデノウイルスベクター +OVA を投与した. CD4<sup>+</sup>T 細胞は, OVA 抗原刺激後, サイトカイン量を ELISA 法により測定した.

たところ, 細胞分化シグナリングに関わる Notch-ligand の有意な発現が樹状細胞上に認められた<sup>20)</sup> ことから, AdFL アジュバントの経鼻投与により誘導される Th1 および Th2 型サイトカイン産生に関わる一連の免疫応答は, 樹状細胞-CD4<sup>+</sup>T 細胞間の Notch シグナルが関わっていることが示唆された<sup>20)</sup>. また, 細胞遊走に関連した C-C ケモカインレセプター CCR5 および CCR6 の発現が, 実験群のマウスの樹状細胞では有意に認められた<sup>21)</sup>. そこでわれわれは CCR5 および CCR6 発現をノックアウトしたマウスに同ワクチンを経鼻投与したところ, 粘膜および全身系における抗原特異的 IgA 抗体の誘導がみられなかったことから, 本ワクチンによる免疫応答の誘導には, 細胞遊走に関する CCR5 および CCR6 の樹状細胞上の発現が不可欠であることが明らかとなった<sup>21)</sup>.

### 肺炎球菌感染における経鼻ワクチン効果

次に pFL をアジュバントとした経鼻ワクチンによって誘導された抗原特異的抗体の感染防御機能を検討した. pFL とともに肺炎球菌の表面タンパク (PspA) 抗原を週 1 回, 計 3 回の経鼻投与をマウスに試みた. 対照群には, pORF をアジュバントとし PspA 抗原とともに経鼻投与した. ワクチン最終投与後 7 日目における, 鼻腔洗浄液および肺洗浄液中の抗 PspA 特異的 IgA 抗体価と, 血清中の抗 PspA 特異的 IgG 抗体価および IgA 抗体価は, 対照群よりも有意な上昇が確認された. ついでワクチン最終投与後 7 日目において肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae* WU2,  $1.8 \times 10^7$  CFU/20  $\mu$ l) を経鼻感染させ, 感染 48 時間後の肺, 鼻腔洗浄液, 血液中における肺炎球菌の生菌数を測定したところ, 実験

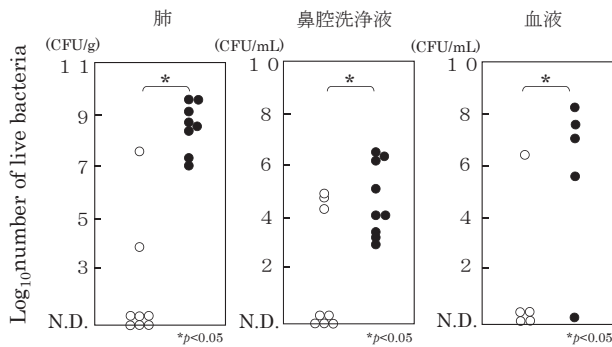


図5 pFL+PspA ワクチン投与後の肺炎球菌生菌数

1週間に1回、計3回pFL+PspA 経鼻投与(○), もしくはFL 遺伝子をコードしない空プラスミド(pORF)+PspA を経鼻投与(●)した。最終投与後7日目において肺炎球菌(WU2,  $1.8 \times 10^7$  CFU) チャレンジし48時間後の肺炎球菌数を測定した。

引用文献<sup>22)</sup>

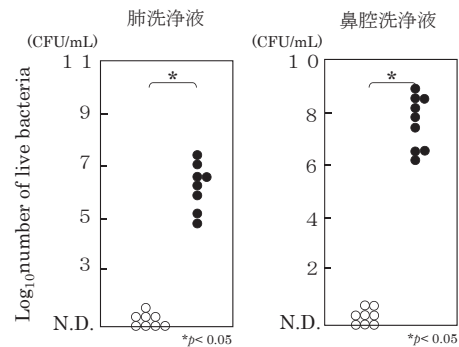


図6 pFL+PC ワクチン投与後の肺炎球菌生菌数

1週間に1回、計3回pFL+PC 経鼻投与(○), もしくはFL 遺伝子をコードしない空プラスミド(pORF)+PC を経鼻投与(●)した。最終投与後7日目において肺炎球菌(WU2) チャレンジし48時間後の肺炎球菌数を測定した。

引用文献<sup>24)</sup>

群の各部位において肺炎球菌生菌数の有意な減少が認められた(図5)<sup>22)</sup>。粘膜面に誘導された分泌型IgA抗体の感染防御における役割を検証するために、本ワクチンをIgA ノックアウト(IgA<sup>-/-</sup>)マウスに投与し、同じく感染実験を行ったところ、肺炎球菌生菌数の減少が認められなかったことから、本ワクチンで誘導される抗PspA 特異的IgA抗体は、同部の肺炎球菌定着阻害に重要な役割を果たしていることが示された<sup>23)</sup>。

さらにわれわれは、肺炎球菌の菌表層に存在するリン脂質(ホスホリルコリン; PC)を抗原とし、pFL アジュバントとともにマウスに経鼻投与した。対照群と比較して、肺洗浄液、鼻腔洗浄液そして血清中の抗PC 特異的IgA抗体およびIgM抗体の有意な上昇が確認された<sup>24)</sup>。PCの自然抗体として知られるT15イデオタイプ抗体は腹腔内に存在するCD5<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>(B-1B)細胞により産生されていることが報告されている<sup>25)</sup>。そこでわれわれの経鼻ワクチンで誘導された抗PC抗体の特性を調べることを目的に、まず鼻粘膜と肺、肺縦隔リンパ節、頸部リンパ節におけるB細胞の解析を行ったところ、興味深いことに実験群のすべての部位におけるB-1B細胞数が有意に増加していることが認められた。さらにT15イデオタイプ抗体は、肺炎球菌の感染防御に有効とされる報告もあること<sup>26)</sup>から、われわれはT15イデオタイプ抗体に対するモノクローナル抗体であるAB1-2抗体を使用し、AB1-2抗体との結合実験を試みた。鼻腔洗浄液と肺洗浄液中のIgMとIgA抗体はモノクローナル抗体AB1-2と濃度依存的に結合した<sup>24)</sup>ことから、本ワクチンの誘導する抗体がT15イデオタイプ抗体の可能性があり、肺炎球菌感染予防に有効であ

ることが予想された。次に本ワクチンを経鼻投与したマウスを用いて肺炎球菌感染実験を行ったところ、感染12時間後の肺および鼻腔における肺炎球菌生菌数は、対照群と比べ有意に減少していた<sup>24)</sup>(図6)。したがって、pFLとPCによる本経鼻ワクチンは粘膜部および全身系にT15イデオタイプ抗体を誘導し、肺炎球菌の定着阻害効果を発揮している可能性があることを示唆した。また近年、T15イデオタイプ抗体には、アテローム性動脈硬化のプラーク形成の抑制を示すことが報告されており<sup>27,28)</sup>、今後pFL+PC経鼻ワクチンにも同様の効果が期待される。したがって、本ワクチンは、肺炎球菌感染だけでなく、NCDの一つである動脈硬化症の予防にもつながる可能性があり、現在われわれは動脈硬化のモデルマウス(Apolipoprotein E-deficientマウス)を用いての検証を行っている。

### 加齢時の免疫応答におけるダブルアジュバント効果

次にわれわれは、加齢により免疫応答が低下した高齢者をターゲットに、経鼻ワクチンのための新規アジュバントの検証を行った。pFL単独アジュバントによるワクチン効果を増強する目的で、pFLと自然免疫受容体TLR9を認識する強力なアジュバントCpG ODN(K型)との併用を試みた。すなわち、このダブルアジュバントとOVA抗原を老齢マウス(2年齢)と若齢マウス(8週齢)に経鼻投与したところ、老齢マウスの膣洗浄液および唾液中の抗原特異的IgA抗体価、そして血清中の抗原特異的IgAおよびIgG抗体価が、若齢マウス(8週齢)と同程度か、または上まわる誘導をみた(図7)<sup>29)</sup>。さ

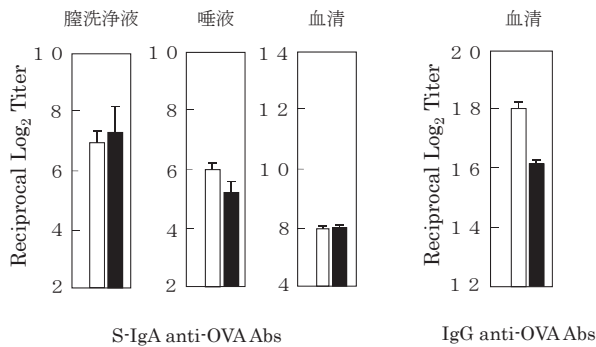


図7 若齢マウスと老齢マウスに経鼻ダブルアジュバント pFL+CpG ODN 投与後の各部における抗 OVA 特異的抗体産生

若齢マウス (□ 8 週齢) と老齢マウス (■ 2 年齢) に 1 週間に 1 回、計 3 回 pFL+CpG ODN+ OVA を経鼻投与した。最終投与後 7 日目において抗 OVA 抗体価を測定した。

引用文献<sup>29)</sup>

らに面白いことには、誘導されたすべての部位における抗体価が、25 週以上の長期にわたり継続維持されていることも確認された<sup>29)</sup>。

次に、肺炎球菌の PspA 抗原と本ダブルアジュバントの経鼻ワクチンを老齢マウスと若齢マウスに投与し、その後肺炎球菌感染させる実験を行った。感染後の肺炎球菌の定着阻害能は、若齢マウスと同レベルであることが認められた<sup>30)</sup>。以上のことから、本ダブルアジュバントによる経鼻ワクチンは、若齢マウスとかわらない抗体の上昇を老齢マウスに誘導し、長期の免疫応答を継続可能とするものであった。したがって、本経鼻ワクチンは、免疫機能が低下した高齢者にも適用に相応しい、肺炎球菌感染予防のための経鼻ワクチン候補になると考えられた。

### 歯周病誘因動脈硬化を制御する 経鼻ワクチンの可能性

近年、ガンやアレルギーに加えて非感染性疾患 (NCD) をはじめとした慢性疾患に対する治療用ワクチンの開発が精力的に行われている。例えば、コレステリルエステル転送タンパク (CETP) を標的抗原とした高脂血症<sup>31)</sup>、IL-1β を標的抗原とした 2 型糖尿病<sup>32)</sup>、アンジオテンシン I / II を標的抗原とした高血圧<sup>33)</sup> に対するワクチン開発が行われているが、そのほとんどは注射ワクチンである。そこでわれわれは、粘膜ワクチンもまた NCD の発症、進行そして治療に効果を有する可能性があると考え、最もアジュバント効果が高いとされるコレラ毒素を抗原とともに動脈硬化モデルマウス

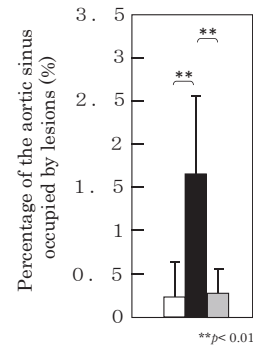


図8 マウス大動脈洞における形成プラークの面積率

□ 1 週間に 3 回、計 3 週間 PBS 静脈投与 (PBS 投与群)

■ 1 週間に 3 回、計 3 週間 *P. gingivalis* (10<sup>8</sup>CFU) 静脈投与 (*P. gingivalis* 感染群)

■ 経鼻ワクチン 3 回投与後、1 週間に 3 回、計 3 週間

*P. gingivalis* (10<sup>8</sup>CFU) 静脈投与 (ワクチン前投与群)

引用文献<sup>35)</sup>

(Apolipoprotein E-deficient : ApoE<sup>sp1</sup> マウス) に経鼻投与することにより、その検証を試みた。

2003 年 Lalla E. らは、動脈硬化モデルマウスが歯周病原細菌感染により動脈硬化が促進したことを報告している<sup>34)</sup>。われわれはまず、ApoE<sup>sp1</sup> マウスに *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 菌体を週 3 回計 9 回静脈経路で投与し、大動脈洞部のアテローム性のプラーク形成が促進されることを確認した (図 8; □ PBS 投与群, ■ *P. gingivalis* 感染群)<sup>35)</sup>。

次に、あらかじめ ApoE<sup>sp1</sup> マウスに *P. gingivalis* の表面タンパク抗原 (40kDa OMP) と粘膜アジュバントであるコレラ毒素を週 1 回計 3 回経鼻投与したワクチン前投与群を作製した。ワクチン最終投与後 7 日目において、ワクチン前投与群とワクチン投与していない群 (*P. gingivalis* 感染群) を *P. gingivalis* 感染した後、両群のアテローム性プラーク形成 (沈着) を比較検討した。その結果、ワクチン前投与群は *P. gingivalis* 感染群と比べ、大動脈洞部のアテローム性プラークの形成を有意に抑制した (図 8; ■ *P. gingivalis* 感染群, ■ ワクチン前投与群)<sup>35)</sup>。以上から、本ワクチンは *P. gingivalis* により誘発されたアテローム性プラークの形成阻害効果を有し、動脈硬化予防のツールになる可能性を示唆した。われわれは現在、同動物感染モデルを用いての CpG ODN (K 型) と pFL を併用した DNA ダブルアジュバントによるアテローム性プラーク形成の阻害効果を検討する計画を進めている。

## おわりに

粘膜部における免疫細胞や分子群，その相互作用に関する研究は盛んであるが，実用化に至っている粘膜ワクチンは今なお限られている。注射型ワクチンが主流を占める現在，われわれ研究者や医療従事者は冷静かつ着実に学術知見の集積を進め，予防・治療へと結びつく医学的基盤を築くことが重要であろう。感染症だけでなくNCDに対しても幅広く応用できる「粘膜免疫機構」を利用した粘膜ワクチン研究は，今後さらに高齢社会に向かう人類のQOL向上に大いに貢献すると考える。NCDおよび感染症の予防・治療に対して無痛の粘膜ワクチンを開発するとともに粘膜免疫機構の理解を一層深めることは重要な課題である。

これまで行ってきたわれわれの研究も今後はヒトへの応用を目指し，安全性・効率性の更なる検討を行っていく必要がある。

## 謝 辞

本総説の寄稿にあたり，粘膜免疫学を学ぶために留学の機会を与えていただいた大阪大学大学院歯学研究所予防歯科学教室の零石 總名誉教授，また一から粘膜免疫学を御教示くださり帰国後も多くの叱咤激励をいただいた米国アラバマ大学バーミングハム校ワクチンセンターおよび歯学部小児歯科学講座のJerry R. McGhee 名誉教授，藤橋浩太郎教授，そして東京大学医科学研究所の清野 宏教授，福山賀子博士そして関根伸一博士に深く感謝申し上げます。本稿で紹介した研究成果の大部分は藤橋浩太郎教授との共同研究による結果に基づいたものであることを最後に申し添えたい。

## 文 献

- Goto Y, Kurashima Y, Kiyono H: The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Rheumatol* 27: 388-396, 2015.
- Kurashima Y, Goto Y, Kiyono H: Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation. *Eur J Immunol* 43: 3108-3115, 2013.
- Fukuyama Y, Tokuhara D, Kataoka K et al.: Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity. *Expert Rev Vaccines* 11: 367-379, 2012.
- Brandtzaeg P: Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 25: 5467-5484, 2007.
- Palm NW, Medzhitov R: Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 227: 221-233, 2009.
- Pulendran B, Ahmed R: Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 124: 849-863, 2006.
- Pashin A, Valiante NM, Ulmer JB: Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med* 11 (4 Suppl): S63-68, 2005.
- Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* 1589: 1-13, 2002.
- Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A et al.: Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microb* 3: 352-363, 2008.
- Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R et al.: The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 10: 241-247, 2009.
- Holmgren J, Czerkinsky C: Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11 (4 Suppl): S45-53, 2005.
- Hagiwara Y, McGhee JR, Fujihashi K et al.: Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4<sup>+</sup>T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J Immunol* 170: 1754-1762, 2003.
- Lyman SD, James L, Johnson L et al.: Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 83: 2795-2801, 1994.
- Hannum C, Culpepper J, Campbell D et al.: Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 368: 643-648, 1994.
- Brasel K, McKenna HJ, Charrier PJ et al.: Flt3 ligand synergizes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic progenitor cells into the peripheral blood of mice. *Blood* 90: 3781-3788, 1997.
- Marakovskiy E, Brasel K, Teepe M et al.: Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 Ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 184: 1953-1962, 1996.
- Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P et al.: Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34<sup>+</sup> human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* 92: 3647-3657, 1998.
- Kataoka K, McGhee JR, Kobayashi R et al.: Nasal Flt3 ligand cDNA elicits CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Dendritic cells for enhanced mucosal immunity. *J Immunol* 172: 3612-3619, 2004.
- Sekine S, Kataoka K, Fukuyama Y et al.: A novel adenovirus expressing Flt3 ligand enhances mucosal immunity by inducing mature nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue dendritic cell migration. *J Immunol* 180: 8126-8134, 2008.
- Fukuyama Y, Tokuhara D, Sekine S et al.: Notch-ligand expression by NALT dendritic cells regulates mucosal Th1- and Th2-type responses. *Biochem Biophys Res Commun* 481: 6-11, 2011.
- Fukuyama Y, Tokuhara D, Sekine S et al.: Potential roles of CCR5<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> dendritic cells induced by nasal ovalbumin plus Flt3 ligand expressing adenovirus for mucosal IgA responses. *PLoS ONE* 8: e60453, 2013.
- Kataoka K, Fujihashi K, Oma K et al.: The nasal dendritic cell-targeting Flt3 ligand as a safe adjuvant elicits effective protection against fatal pneumococcal pneumoniae. *Infect Immun* 79: 2819-2828, 2011.

- 23) Fukuyama Y, King JD, Kataoka K et al.: Secretory IgA antibodies play an important role in the immunity to streptococcus pneumoniae. *J Immunol* 185: 755-762, 2010.
- 24) Tselmeg B, Kataoka K, Gilbert RS et al.: Mucosal immune features to phosphorylcholine by nasal Flt3 ligand cDNA-based vaccination. *Vaccine* 28: 12191-12198, 2011.
- 25) Masmoudi H, Mota-Santos T, Huetz F et al.: All T15 Id-positive antibodies (but not the majority of VHT15<sup>+</sup> antibodies) are produced by peritoneal CD5<sup>+</sup> B lymphocytes. *Int Immunol* 2: 515-520, 1990.
- 26) Briles DE, Forman C, Hudak S et al.: Anti-phosphorylcholine antibodies of the T15 idio type are optimally protective against *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med* 156: 1177-1185, 1982.
- 27) Caligiuri G, Khallou-Laschet J, Vandaele M et al.: Phosphorylcholine-targeting immunization reduces atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 50: 540-546, 2007
- 28) Binder CJ, Horkko S, Dewan A et al.: Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med* 9: 736-743, 2003.
- 29) Fukuiwa T, Sekine S, Kobayashi R et al.: A combination of Flt3 ligand cDNA and CpG ODN as nasal adjuvant elicits NALT dendritic cells for prolonged mucosal immunity. *Vaccine* 26: 4849-4859, 2008.
- 30) Fukuyama Y, King JD, Kataoka K et al.: A combination of Flt3 ligand cDNA and CpG oligodeoxynucleotide as nasal adjuvant elicits protective secretory-IgA immunity to *Streptococcus pneumoniae* in aged mice. *J Immunol* 186: 2454-2461, 2011.
- 31) Nilsson J, Wigren M, Shah PK: Vaccines against atherosclerosis. *Expert Rev Vaccines* 12: 311-321, 2013.
- 32) Spohn G, Schori C, Keller I et al.: Preclinical efficacy and safety of an anti-IL-1b vaccine for the treatment of type 2 diabetes. *Mol Ther Methods Clin Dev* 1: 14048, 2014.
- 33) Ambuhl PM, Tissot AC, Fulurija A et al.: A vaccine for hypertension based on virus-like particles: preclinical efficacy and phase I safety and immunogenicity. *J Hypertens* 25: 63-72, 2007.
- 34) Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA et al.: Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1405-1411, 2003.
- 35) Koizumi Y, Kurita-Ochiai T, Oguchi S et al.: Nasal immunization with *Porphyromonas gingivalis* outer membrane protein decreases *P. gingivalis*-induced atherosclerosis and inflammation in spontaneously hyperlipidemic mice. *Infect Immun* 76: 2958-2965, 2008.

著者への連絡先 : 片岡宏介 〒 573-1121 大阪府枚方市楠葉花園町 8-1 大阪歯科大学口腔衛生学講座  
TEL : 072-864-3059 FAX : 072-864-3159  
E-mail : kataoka-k@cc.osaka-dent.ac.jp



Development of Novel Nasal DNA Adjuvants Targeting NALT Dendritic Cell Activation  
-Challenge of Controlling NCDs as well as Infectious Diseases-

Kosuke KATAOKA<sup>1)</sup>, Takashi DOI<sup>1)</sup>, Koichiro JIN<sup>1)</sup>, Masako UENE<sup>1)</sup>, Hiro-O ITO<sup>2)</sup>,  
Tomoko OCHIAI-KURITA<sup>3)</sup> and Tatsuro MIYAKE<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Preventive and Community Dentistry, Osaka Dental University

<sup>2)</sup>Department of Preventive Dentistry, Tokushima University Graduate School of Dentistry

<sup>3)</sup>Department of Microbiology and Immunology, Nihon University,  
School of Dentistry at Matsudo

**Abstract:** According to reports from the World Health Organization in 2014, non-communicable diseases (NCDs) are responsible for the deaths of more than 36 million people (~63% of the global total) annually, while infectious diseases are responsible for another 9.5 million (about 20% of the global total). Similar rates are seen in Japan, which has a super-aging society with increasing mortality due to cancer, ischemic heart disease, and pneumonia. Japan is also faced with national issues such as “the extension of healthy life expectancy” and “the reduction of health disparities”, which are the ultimate objectives to be realized through improvements in the lifestyle and social environment. Health care policies and approaches have therefore tended to shift in focus from society to the individual.

To date, we have investigated some novel nasal adjuvants for the improvement of mucosal vaccine that could induce a mucosal immune system in order to prevent invasion by infectious agents and environmental antigens through the mucosal surfaces. In this review, we briefly summarize our findings regarding the development and verification of novel nasal DNA adjuvants to target the activation of nasopharyngeal-associated lymphoid tissue (NALT) dendritic cells for use as nasal vaccines.

In addition, we examined whether nasal vaccines using our newly developed nasal DNA adjuvants are effective at preventing pneumococcal infection in elderly as well as young mice, and whether nasal immunization with *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) outer membrane protein and cholera toxin as an adjuvant prevents atherosclerosis induced by *P. gingivalis* infection.

We hope that the results of this study will promote the development of mucosal vaccine including nasal vaccines capable of controlling NCDs as well as infectious diseases in the near future, which will promote successful outcomes to help improve the quality of life of human beings in a super-aging society.

J Dent Hlth 67: 2-10 2017

**Key words:** Mucosal immune responses, Mucosal vaccine, Mucosal DNA adjuvant, Dendritic cell

**Reprint requests** to K. KATAOKA, Osaka Dental University, 8-1, Kuzuha, Hanazono-cho, Hirakata, Osaka, 573-1121, Japan

TEL: 072-864-3059 / FAX: 072-864-3159 / E-mail: kataoka-k@cc.osaka-dent.ac.jp