

総 説

粘膜免疫学の基礎解明とそれを応用した粘膜ワクチン開発

野地智法 清野 宏

東京大学医科学研究所感染・免疫部門炎症免疫学分野

(〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1)

経口、経鼻投与型の粘膜ワクチンは、抗原特異的免疫応答を全身組織（例：血清 IgG）に加え、粘膜組織（例：分泌型 IgA）にも誘導する。一方で、従来までの注射型ワクチンは、粘膜組織での免疫応答は誘導しないことから、粘膜ワクチンは特に粘膜感染症に対する予防ワクチンとして最適とされている。本稿では、粘膜ワクチン開発に向けた最近の研究成果を、粘膜免疫システムのユニーク性ととも紹介する。

【はじめに】

2002年冬から2003年初夏にかけて、世界中で猛威を振るった重症急性呼吸器症候群（Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS）は、新型コロナウイルスの呼吸器への飛沫感染が原因の粘膜感染症として我々の記憶に新しい [11]。SARS に罹患すると、高熱に加え咳嗽、息切れ、呼吸困難が生じ、当時全国30か国で916人（患者数8422人）の犠牲者を出した。また我々は、20世紀にスペイン風邪（1917-1918年）、アジア風邪（1955年）、香港風邪（1965年）といった3度のインフルエンザ・パンデミック（大流行）を経験し、多大なる被害をこうむった [3]。昨今は、高病原性鳥インフルエンザ（H5N1型）のパンデミックが予想され、ワクチン開発を含めた予防対策が急がれている [3]。

一方、これら呼吸器感染症に加え、腸管出血性大腸菌（O157）による腸管感染症（食中毒）[7] も我々の記憶に新しく、1996年には、大阪府堺市で学校給食によって発生した集団食中毒で、7996人が発症し3人の犠牲者を生んだ。また日本ではなじみが薄いですが、コレラ菌によるコレラ感染症はアジア南部を中心に現在でも盛んであり、下痢と嘔吐による極度の脱水症状により、最悪の場合、死に至る重篤度の高い腸管感

染症の一つである [12]。このように、今日問題となっている感染症の殆どが、呼吸器や消化器を介した粘膜感染型といっても過言でなく、病原細菌・ウイルス側の感染メカニズムと、生体側の免疫防御メカニズムの正確な理解が、これらの感染症の発症を予防する上で非常に重要とされている。

【粘膜免疫システムを応用した粘膜ワクチン】

粘膜免疫システムは、粘膜面より侵入した外来抗原に対し、抗原特異的免疫応答を全身組織のみならず粘膜組織にも誘導する [5]。つまり、この粘膜免疫システムを応用した、「飲む」「吸う」といった投与方法からなる粘膜ワクチンは、病原細菌やウイルスの粘膜組織への侵入を阻止するのみならず、全身組織にも防御免疫を誘導することから、「局所」と「全身」の二段構えの免疫応答を誘導可能な万能ワクチンとして期待されている [5]。一方で、従来までの注射型ワクチンは、全身免疫システムのみを活性化させるため、粘膜局所での予防効果は全く期待できない。つまり、注射型ワクチンでは、粘膜感染症の発症後の重篤化を防ぐことは出来ても、感染そのものの予防する効果は全くないといっても過言でない。また粘膜ワクチンは、接

種に特別な技術を必要とせず、また苦痛を伴わないことから、体に優しいワクチンとしても人気が高く、アメリカでは2003年より経鼻インフルエンザワクチン（FluMist®）の臨床応用が開始されている。

〔消化管内での安定性ならびに長期保存性に優れたコメ型経口ワクチン〕

経口ワクチンは食餌性抗原と同様、消化管内に投与されることから、当然ペプシン等の各種消化酵素の分解対象と成り得る。食餌性タンパク抗原の場合、アミノ酸レベルに分解されることが、腸管上皮細胞からの栄養素としての体内吸収に必須であるが、ワクチン抗原の場合、抗原性・免疫原性を保持した状態で粘膜免疫システムに認識されることが、抗原特異的免疫応答を誘導する上で必要となる。我々が日常摂取する穀類の種子には、2種類のProtein body (PB) と呼称されるタンパク貯蔵器官（PB-I および PB-II）が存在し、中でもコメ種子には難消化性タンパク貯蔵器官として知られる PB-I が豊富に存在することが知られている [15]。我々は、このPB（特にPB-I）をワクチン抗原の発現媒体として応用することを着想し（図1）、コレラワクチン抗原として多用されているコレラ毒素Bサブユニット（CTB）をコメ種子内に発現させるための遺伝子導入を試みた。その結果、種子1粒（約20ミリグラム）あたり約30マイクログラムのCTBがPB内に蓄積したコメ型経口コレラワクチンを作成することに成功した [8]。予想通り、本ワクチンを試験管内でペプシン処理しても、その大半は分解されずに保持されることが明らかとなり、その高い安定性が実証された [8]。また、本ワクチンをマウスに経口投与することで、CTBに特異的な免疫応答が全身組織のみならず粘膜組織にも誘導されることも明らかとなった。さらには、コレラ毒素を用いたコレラ感染実験モデルにおい

ても、本ワクチンを事前に経口投与することで、コレラ感染症状の一つである下痢症状が効果的に抑制されることも実証され、本ワクチンの高い防御免疫誘導効果が確認された [8]。

また、コメをワクチン抗原の発現媒体として応用する利点として、コメの常温保存下での長期安定性も挙げられる。通常、ワクチンは凍結乾燥状態で冷蔵保存されるが、この冷蔵保存には年間2-3億ドル（約300億円）もの経費が必要とされる。我々が開発したコメ型経口ワクチンは、免疫原性を保持した状態で、少なくとも1.5年間の常温保存が可能であった [8]。また、コメのような食用食物をワクチン発現媒体として応用することは、大腸菌等の他の発現媒体を用いた場合と異なり、菌体成分からの発現タンパクの精製工程を必要とせず、ワクチン開発費が大幅に削減される可能性が高い。また経口ワクチンは、注射器・注射針を必要としないことから、医療廃棄物の処理問題の観点からも、環境に優しく二次感染の心配もない。このようなワクチンの安全性、安定性、経済性の向上は、特に大量のワクチンを必要とする発展途上国では最重要課題であり、今後これらの課題を克服したコメ型経口ワクチンのヒトならびに家畜での実用化に向けた評価が期待される。

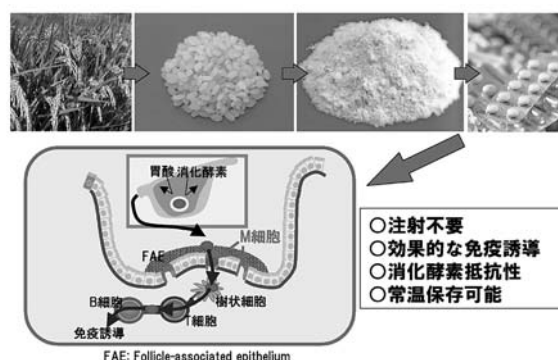


図1. コメ型経口ワクチン

コメ種子にワクチン抗原を発現蓄積させることで、ワクチン抗原の消化管内での安定性ならびに長期保存性が大幅に向上された。

【免疫誘導効果に優れたM細胞標的型粘膜ワクチン】

パイエル板は、マウスやラットなどのげっ歯類の小腸では散在的に8-12個程度、ヒトやブタ、ウシでは特に回腸終末部に帯状に発達する粘膜関連リンパ組織であり、腸管内に侵入した病原微生物などの外来抗原に対する免疫応答を誘導する場として、重要な役割を果たしている [5]。パイエル板を覆う上皮層 (Follicle-associated epithelium; FAE) は特殊に分化しており、そこには抗原取り込みを専門に行うM (Microfold) 細胞が散在している [10]。M細胞は隣接する吸収上皮細胞と比較して形態学的にユニークな特性を有しており、微絨毛が疎らで短く、また基底膜側にはリンパ球や樹状細胞などの免疫担当細胞を抱え込むポケット構造が発達している。M細胞はリソソームなどの細胞内小器官を発達させていないことから、取り込んだ外来抗原は、何ら分解修飾されることなく基底膜側へと輸送 (トランスサイトーシス) され、ポケット内の免疫担当細胞へと引き渡されることで、我々生体は抗原特異的免疫応答を誘導するためのプロセスを開始する。1977年にM細胞が発見されて以来、M細胞の抗原取り込みメカニズムの解明を目的とした研究が積極的に進められており、最近ではDNAマイクロアレイ等を駆使した包括的遺伝子解析技術により、PGRP-S、Sgna-1、AnnexinV、GP2といったM細胞特異的発現遺伝子が次々と同定されている [6, 2, 14, 13]。しかしながら、これまでのところ、これらの遺伝子のM細胞での機能的役割は明らかにされておらず、またM細胞での抗原取り込みメカニズムの詳細は全く解明されていない。

最近我々は、M細胞が上述したパイエル板などの粘膜関連リンパ組織を覆うFAEのみならず、遠く離れた絨毛上皮層にも存在することを見出し、絨毛M細胞と命名した [4]。しかしな

がら、パイエル板M細胞や絨毛M細胞の小腸上皮層における頻度は非常に少なく、粘膜ワクチンの効果を向上させるためには、ワクチン抗原を的確にM細胞へ送達させるための技術開発が必要不可欠と考えられてきた [1] (図2)。最近我々は、ワクチン抗原をM細胞へデリバリーを可能にするM細胞特異的モノクローナル抗体 (NKM 16-2-4) の樹立に成功した [9]。本抗体は、 α (1, 2) 型フコースを含むM細胞特異的糖鎖抗原を認識しており、パイエル板のM細胞の管腔側に強い陽性反応を示すのみならず、絨毛M細胞にも高い特異性を有していた [9]。実際、本抗体に化学結合させた各種感染症に対するワクチン抗原 (例、破傷風トキソイドやボツリヌストキソイド) を経口投与することで、効果的な抗原特異的免疫応答が全身組織のみならず粘膜組織に誘導できることが明らかとなった [9]。さらには、ボツリヌス毒素を用いたボツリヌス感染実験モデルにおいても、予め本M細胞標的型ボツリヌストキソイドを経口投与することで、100%の生存効果を保証できることも証明された。また本M細胞標的型ワクチンによる免疫誘導効果は、10倍量の同一ワクチン抗原の単独投与時よりも有為に高く、本抗体を用いてワクチン抗原をM細胞へ標的することで、ワクチン接種量を10分の1以下にまで低減可能であることも明らかとなった [9]。

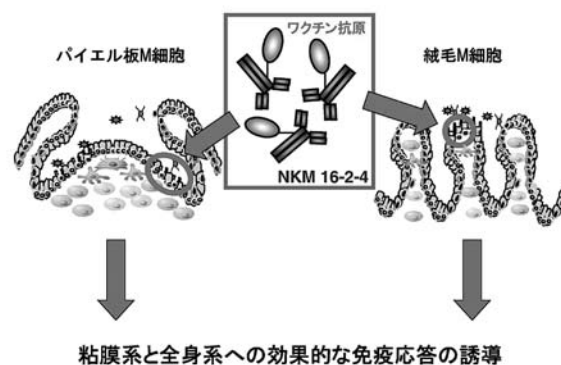


図2. M細胞標的型粘膜ワクチン

M細胞特異的モノクローナル抗体 (NKM 16-2-4) をデリバリー分子としたM細胞標的型粘膜ワクチンは、高いレベルの抗原特異的免疫応答を全身組織のみならず粘膜組織に誘導可能である。

【おわりに】

振興・再興感染症が猛威を振るう今日、それらに対するワクチン開発は殆ど進んでおらず、その予防法は皆無といっても過言でない。それは、「感染の場」である粘膜局所での予防免疫をこれまで軽んじてきた結果であり、事実、粘膜ワクチンの実用化に向けた道のりは長くて険しいのが現状である。本稿で紹介した「コメ型ワクチン」および「M細胞標的型ワクチン」といった2つの成果は、粘膜ワクチン開発に向けた序章に過ぎず、今後さらなる研究開発が必要不可欠である。またマウスでの研究成果を、ヒトへ実用化するためのトランスレーショナルリサーチも非常に重要である。粘膜ワクチン開発に向けた基礎研究が進むことで、家畜を対象とした粘膜ワクチン開発も加速することを期待したい。

【引用文献】

1. Brayden, D. J., Jepson, M. A. and Baird, A. W. 2005. Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov. Today* 10 : 1145-1157.
2. Hase, K., Ohshima, S., Kawano, K., Hashimoto, N., Matsumoto, K., Saito, H. and Ohno, H. 2005. Distinct gene expression profiles characterize cellular phenotypes of follicle-associated epithelium and M cells. *DNA Res.* 12 : 127-137.
3. Horimoto, T. and Kawaoka, Y. 2005. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 : 591-600.
4. Jang, M. H., Kweon, M. N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, C., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Rennert, P. D., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, Y. and Kiyono, H. 2004. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 : 6110-6115.
5. Kiyono, H., Kunisawa, J., McGhee, J. R. and Mestecky, J. 2008. The mucosal immune system, In *Fundamental Immunology* (5th edn) (Paul, W.E., ed.) Lippincott, Williams & Wilkins. (in press)
6. Lo, D., Tynan, W., Dickerson, J., Mendy, J., Chang, H. W., Scharf, M., Byrne, D., Brayden, D., Higgins, L., Evans, C. and O'Mahony, D. J. 2003. Peptidoglycan recognition protein expression in mouse Peyer's Patch follicle associated epithelium suggests functional specialization. *Cell Immunol.* 224 : 8-16
7. Moxley, R. A. 2004. Escherichia coli O157:H7: an update on intestinal colonization and virulence mechanisms. *Ani. Heal. Res. Rev.* 5 : 15-33.
8. Nochi, T., Takagi, H., Yuki, Y., Yang, L., Masumura, T., Mejima, M., Nakanishi, U., Matsumura, A., Uozumi, A., Hiroi, T., Morita, S., Tanaka, K., Takaiwa, F. and Kiyono, H. 2007. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 : 10986-10991.
9. Nochi, T., Yuki, Y., Matsumura, A., Mejima, M., Terahara, K., Kim, D. Y., Fukuyama, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Kawaoka, Y., Kohda, T., Kozaki, S., Igarashi, O. and Kiyono, H. 2007. A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific

- immune responses. *J. Exp. Med.* 204 : 2789-2796.
10. Owen, R. L. 1977. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. *Gastroenterology* 72 : 440-451.
 11. Peiris, J. S. Lai, S. T., Poon, L. L., Guan, Y., Yam, L. Y., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W. K., Yan, W. W., Cheung, M. T., Cheng, V. C., Chan, K. H., Tsang, D. N., Yung, R. W., Ng, T. K. and Yuen K. Y. SARS study group. 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 361 : 1319-1325.
 12. Sack, D. A., Sack, R. B., Nair, G. B. and Siddique, A. K. 2004. Cholera. *Lancet*. 363 : 223-233.
 13. Terahara, K., Yoshida, M., Igarashi, O., Nochi, T., Pontes, G. S., Hase, K., Ohno, H., Kurokawa, S., Mejima, M., Takayama, N., Yuki, Y., Lowe, A. W. and Kiyono, H. 2008. Comprehensive gene expression profiling of Peyer' s patch M Cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 180 : 7840-7846.
 14. Verbrugghe, P., Waelpuut, W., Dieriks, B., Waeytens, A., Vandesompele, J. and Cuvelier, C. A. 2006. Murine M cells express annexin V specifically. *J. Pathol.* 209 : 240-249.
 15. Yamagata, H. and Tanaka, K. 1986. The Site of Synthesis and Accumulation of Rice Storage Proteins. *Plant. Cell Physiol.* 27 : 135-145.

Fundamental elucidation of mucosal immune system for development of mucosal vaccine

Tomonori Nochi and Hiroshi Kiyono

Division of Mucosal Immunology, Institute of Medical Science, University of Tokyo
(4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, 108-8639, Japan)