




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第306号	氏名	野田謙二
審査委員会委員		主査氏名	藤原 淳 
		副査氏名	平松和史 
		副査氏名	猪股雅史 
<p>論文題目</p> <p>Nasal vaccination with P6 outer membrane protein and <math>\alpha</math>-galactosylceramide induces nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i>-specific protective immunity associated with NKT cell activation and dendritic cell expansion in nasopharynx</p> <p>(P6と<math>\alpha</math>-ガラクトシルセラミドによる経鼻ワクチンはNKT細胞の活性、樹状細胞の誘導を介してインフルエンザ菌防御免疫を誘導する)</p> <p>論文掲載誌名 Vaccine 28;5068-5074, 2010</p> <p>論文要旨</p> <p>インフルエンザ菌は中耳炎をはじめとする上気道感染症の代表的な起炎菌であるが、近年抗菌剤耐性菌株の増加により治療に抵抗する症例もあり、中耳炎予防ワクチンの開発が公衆衛生上、重要である。しかし、粘膜ワクチンによる効果的な免疫の賦活化のためには粘膜アジュバントが必要であり、今回免疫調節作用を有するNKT細胞のリガンドである<math>\alpha</math>-galactosylceramide (<math>\alpha</math>-GalCer) を粘膜アジュバントとして用いた経鼻ワクチンの実験を行なった。</p> <p>6-8週のBalb/cマウスに対し、インフルエンザ菌の外膜蛋白質であるP6と<math>\alpha</math>-GalCerの経鼻ワクチンを行い、P6特異的免疫応答について検討した。P6および<math>\alpha</math>-GalCerの経鼻ワクチンにより血清中P6特異的IgG、鼻腔洗浄液中P6特異的IgAの抗体価の有意な上昇を認め、鼻粘膜中のP6特異的IgA産生細胞数の増加が見られた。同ワクチン接種後、鼻咽腔からのインフルエンザ菌の排除が促進された。Th1型、Th2型のP6特異的サイトカインmRNAの発現およびサイトカイン産生細胞数の有意な増加を認め、nasal-associated lymphoid tissues (NALT) において樹状細胞、NKT細胞の増加が認められた。</p> <p>本研究は、P6と<math>\alpha</math>-GalCerによる経鼻ワクチンにより血中にIgG、鼻咽腔粘膜にIgAが誘導され、インフルエンザ菌防御免疫が誘導されることを明らかにした。NKT細胞の活性化による免疫応答がインフルエンザ菌防御免疫を効果的に誘導するという報告はこれまでにはなく、価値がある。</p> <p>将来の臨床応用が期待され、審査委員の合議により、本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 野田 謙二

## 論 文 題 目

Nasal vaccination with P6 outer membrane protein and  $\alpha$ -galactosylseramide induces nontypeable *Haemophilus influenzae*-specific protective immunity associated with NKT cell activation and dendritic cell expansion in nasopharynx

(P6 と  $\alpha$ -ガラクトシルセラミドによる経鼻ワクチンは NKT 細胞の活性、樹状細胞の誘導を介してインフルエンザ菌防御免疫を誘導する)

## 要 旨

【背景】インフルエンザ菌は中耳炎をはじめとする上気道感染症の代表的な起炎菌である。近年の抗菌剤耐性菌株の増加により治療に難渋するケースもあり、中耳炎予防ワクチンの開発が公衆衛生上、重要なものと考えられる。我々はこれまで、インフルエンザ菌外膜タンパクである P6 を用いた経鼻ワクチンが中耳炎予防ワクチンとして有用であることを動物実験にて明らかにしてきた。しかし、粘膜ワクチンによる効率的な免疫の賦活化のためには粘膜アジュバントが必要であり、有効で安全な粘膜アジュバントの開発が重要である。NKT 細胞は樹状細胞上の CD1d を介し活性化し、生体防御に関与している。また、NKT 細胞は樹状細胞の成熟を促すというユニークな機能も有している。NKT 細胞のリガンドである  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) の粘膜アジュバントとしての有効性が報告されている。本研究ではインフルエンザ菌外膜タンパクである P6 と  $\alpha$ -GalCer を用いた経鼻ワクチンによる抗原特異的免疫応答の誘導について検討した。

【方法】6-8週のマウスに対しインフルエンザ菌の共通抗原であるP6と $\alpha$ -GalCerの経鼻ワクチンを行い、P6特異的免疫応答について検討した。血清、鼻腔洗浄液中のP6特異的抗体価をELISAにて測定した。鼻粘膜、脾臓のP6特異的抗体産生細胞についてELISPOTにて測定した。インフルエンザ菌チャレンジにて経鼻ワクチンによる鼻咽腔インフルエンザ菌排除効果について検討した。CD4<sup>+</sup>T細胞における抗原特異的サイトカイン mRNA の発現について RTPCR にて検討した。サイトカイン産生 CD4<sup>+</sup>T細胞について細胞内サイトカイン染色にて検討した。経鼻ワクチンによる NALT への樹状細胞、NKT 細胞の誘導について免疫組織化学、フローサイトメトリーにて検討した。

【結果】P6 および $\alpha$ -GalCer の経鼻ワクチンにより血清中 P6 特異的 IgG、鼻腔洗浄液中 P6 特異的 IgA の抗体価の有意な上昇を認め、鼻粘膜中の P6 特異的 IgA 産生細胞数の増加が認められた。さらに、インフルエンザ菌チャレンジ後の鼻咽腔からのインフルエンザ菌の排除が促進された。また、Th1 型、Th2 型の P6 特異的サイトカイン mRNA の発現およびサイトカイン産生細胞数の有意な増加を認めた。NALT において樹状細胞、NKT 細胞の増加が認められた。

【考察】今回の研究において P6 と $\alpha$ -GalCer による経鼻ワクチンにより全身系 IgG、鼻咽腔粘膜 IgA が誘導され、インフルエンザ菌防御免疫を誘導することを明らかにした。NKT 細胞の活性化による免疫応答がインフルエンザ菌防御免疫を効率的に誘導することについては他に報告がなく、我々が初めて報告した。NKT 細胞は樹状細胞上の CD1d に結合した $\alpha$ -GalCer を認識すると活性化し、IFN- $\gamma$ 、IL-4 を産生する。それにより、樹状細胞の成熟を介して Th1 型、Th2 型の免疫反応を誘導し抗原特異的免疫応答を誘導する。NKT 細胞の活性化には樹状細胞との相互作用が必要であるが、今回の研究において経鼻ワクチンにより NALT において、樹状細胞、NKT 細胞が増加していたことから、上気道における NKT 細胞と樹状細胞の協調の場は NALT であることが示唆された。また、粘膜面での生体防御は IgA が重要な役割を担っているが、抗原特異的 IgA の産生には Th1 型、Th2 型サイトカインが重要である。今回の研究において P6 と $\alpha$ -GalCer の経鼻ワクチンにより P6 特異的 IgA の産生に必要な P6 特異的 Th1 型、Th2 型サイトカイン産生細胞数の増加を認めた。このことから $\alpha$ -GalCer をアジュバントとした NKT 細胞の活性化による免疫応答は非常に効率的であり、経鼻ワクチンへの応用が期待される。経鼻ワクチンへの応用については有効性のみならず安全性も重要となってくるが、本研究において $\alpha$ -GalCer の経鼻投与によるマウスでの有害事象は認めなかった。