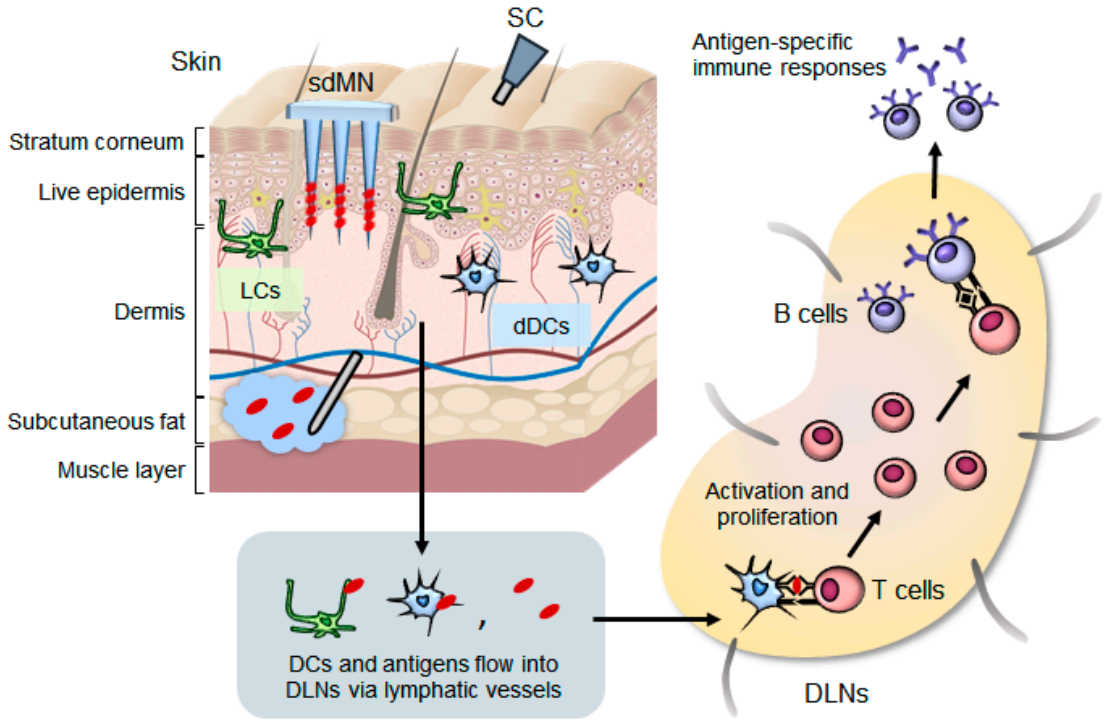
8　皮膚を標的とする免疫制御技術の開発	岡田　直貴

【目的】皮膚は、生体を外界環境から隔離・保護し、生体の水分保持や体温調節、外来異物の侵入防御など生命維持に必要不可欠な機能を司っている。角質層下の生きた表皮や真皮には、免疫学的バリアを構築するランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞といった多種多彩な抗原提示細胞が存在しており、外来異物に対する生体防御機構において重要な役割を担っている。さらに、生きた表皮を構成する細胞の 90%以上を占めるケラチノサイトは、異物の侵入を感知してサイトカイン・ケモカインなどの炎症メディエーターを産生し自然免疫応答の誘導に関わっている。我々は、これらの免疫担当細胞により形成される皮膚免疫システムを利用した経皮ワクチン製剤の開発を推進してきた。独自の自己溶解型マイクロニードルパッチ（sdMN）を用いた経皮ワクチン製剤は、従来の注射型ワクチン製剤と比較して抗原特異的免疫応答の誘導に優れており（Dose-sparing effect）、皮膚表層に抗原を投与する経皮ワクチン製剤には従来の注射型ワクチン製剤とは異なる特有の免疫応答誘導機序が存在することを想起させた。そこで本研究では、経皮ワクチン製剤の有効性・安全性に対する理論的・科学的根拠に資する情報収集として経皮免疫誘導機序の解明に取り組んだ。

【方法】マウスに Ovalbumin（OVA）装填 sdMN による経皮投与あるいは OVA 溶液の皮下投与を施し、誘導される血清中 OVA 特異的抗体価を ELISA により測定した。また、マウスに sdMN 貼付、皮内注射、または皮下注射を施し、適用部位の皮膚組織について、病理組織学的解析および遺伝子発現変動解析を実施した。さらに、各種投与経路により抗原接種したマウスにおける抗原提示細胞ならびに抗原特異的 T 細胞の挙動・活性化に関する免疫学的解析を行った。

【結果】sdMN を貼付した皮膚局所では、穿刺に伴う物理的な刺激によって炎症性サイトカインや Alarmin の遺伝子発現レベルが顕著に増大しており、これに伴って皮膚常在性樹状細胞の所属リンパ節への遊走が亢進し、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞が強力に感作・活性化されることを明らかとした。さらに、sdMN による経皮抗原送達は、皮下注射投与と比較して所属リンパ節における抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞のメモリーT 細胞への分化や胚中心形成を高めることも明らかとし、これら一連の免疫イベントによる B 細胞の活性化および抗体産生細胞への分化の促進が経皮ワクチン製剤の優れた抗原特異的抗体産生につながったと結論付けた。

sdMN を用いた経皮ワクチン製剤による免疫誘導機序予測



8. 皮膚を標的とする免疫制御技術の開発

岡田　直貴

大阪大学 大学院薬学研究科 ワクチン・免疫制御学プロジェクト

Key words：自己溶解型マイクロニードルパッチ，経皮ワクチン製剤，抗原提示細胞，T 細胞，遺伝子発現変動解析

緒　言

現在の社会は、新興・再興感染症パンデミックの脅威、バイオテロリズムの恐怖、感染症の危険が多い海外旅行者の増大、高齢化・高度医療に伴う日和見感染症の増加等、感染症に関連する多くの問題を抱えている。現在の COVID-19 の大流行は、感染症が国民の社会活動や医療の現場においていかに大きな負担・損失をもたらすものかを人々に如実に知らしめる結果となり、産官学の連携によって安心・安全な社会の形成に向けた万全の感染症予防対策の一刻も早い整備が求められている。このような社会背景に基づき、感染症対策において抗生物質などの陰に隠れていたワクチンが、根本的予防における唯一の手段として世界的に高い関心を集めており、短期間で大量のワクチンを供給できる製造技術・体制の構築と併せて、ワクチンの簡便性、汎用性、普及性、備蓄性を向上しうる製剤化技術の開発も重要な課題とされている。これまでに実用化されてきたワクチンの大半は注射剤形であり、接種に医療従事者を必要とする技術的な問題や、製造・輸送・保管に一貫した低温管理（コールドチェーン）が求められること、使用済み注射器などの適切な医療廃棄物の処理が必要であるなどの医療経済的な問題、などが残されている。

皮膚は、生体を外界環境から隔離・保護し、生体の水分保持や体温調節、外来異物の侵入防御など生命維持に必要不可欠な機能を司っている。皮膚は外側から角質層、生きた表皮、真皮の大きく 3 層に分けられ、最外の角質層は脱核した角質細胞が幾重にも重なり、細胞間隙をセラミドなどの角質細胞間脂質が埋めることで強固な物理的バリアを構築している。さらに角質層下の生きた表皮や真皮には、ランゲルハンス細胞（Langerhans cells：LCs）や真皮樹状細胞（Dermal dendritic cells：dDCs）といった免疫学的バリアを構築する多種多彩な免疫担当細胞群が存在しており［1〜3］、抗原提示細胞として外来異物に対する生体防御機構において重要な役割を担っている。また、生きた表皮を構成する細胞の 90%以上を占めるケラチノサイトは、異物の侵入を感知してサイトカイン・ケモカインなどの炎症メディエーターを産生し自然免疫応答の誘導に関わっている。しかしながら、従来の皮下注射型ワクチンはこれらの免疫担当細胞がほとんど存在しない皮下組織に抗原が送達されるため、皮膚に備わっている免疫機構を活かすことができない。そこで我々は、注射投与型ワクチンに代わる簡便性・利便性に優れる新規ワクチン手法として、皮膚免疫システムをターゲットとした経皮ワクチン製剤の開発に着手し、ワクチン抗原を生きた表皮や真皮へと送達可能なデバイスとして自己溶解型マイクロニードル（self-dissolving microneedle：sdMN）の有用性を評価してきた［4〜7］。本研究では、sdMN を活用した新規経皮ワクチン製剤を早期に実用化の段階まで押し上げるべく、安全性と有効性に対する科学的・理論的根拠となる経皮免疫誘導メカニズムの解明に取り組んだ。

方　法

1. MN の作製

Ovalbumin（OVA）溶液と、ヒドロキシエチルデンプン 70,000 溶液とを混合（1：1 w/w）し、sdMN を成形するための型に充填した。23℃で十分に乾燥させた後、コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液を塗布したポリエチレンテレフタレート（PET）シートと貼り合わせた。35℃で十分に乾燥させた後、sdMN を含む PET シートを型から分離させ、OVA 装填 sdMN（針長 430 μm、針数 9 本）を得た。同様の方法にて、Alexa Fluor 647 標識 OVA（AF647-OVA）あるい

は Fluorescein 標識 OVA（F-OVA）を装填した sdMN および placebo-sdMN を作製した。樹脂製 MN（plastic-MN）の作製は、紫外線硬化性樹脂を同様の型に充填し、十分に脱泡させた後、PET シートを貼り合わせた。紫外線照射装置により樹脂を硬化させた後、MN を含む PET シートを型から分離させて plastic-MN を得た。

2. 抗原投与

除毛したマウス背部皮膚に専用アプリケーターを用いて各種 MN を 5 分間貼付し、経皮投与を施した。また、除毛背部皮膚に 50 μL/site で皮内投与（ID）あるいは皮下投与（SC）した。

3. 蛍光免疫組織染色

マウス除毛背部皮膚に F-OVA 装填 sdMN（10 μg/patch）を貼付し、5 分後に皮膚を回収して凍結組織ブロックを作製した。6 μm に薄切した皮膚組織切片を ProLong® Gold antifade reagent with DAPI を用いて核染色・封入した。

胚中心（Germinal center : GC）の染色には、sdMN あるいは SC にて OVA を 1 回免疫した所属リンパ節（DLNs）を回収して凍結組織ブロックを作製した。8 μm に薄切した DLNs 組織切片をブロッキング処理後、蛍光標識した PNA（Peanut agglutinin）、抗 CD3 抗体、抗 IgD 抗体を用いて染色し、ProLong® Gold antifade reagent を用いて封入した。

4. 皮膚内抗原滞留性

マウス除毛背部皮膚に F-OVA 装填 sdMN（10 μg/patch）を貼付、あるいは F-OVA 溶液（10 μg/50 μL/PBS）を SC あるいは ID し、適用部位を経時的に *in vivo* 蛍光イメージング装置により撮影した。

5. 病理組織学的検査

抗原投与から 24 時間後の皮膚を回収し、パラフィン包埋後、薄切した皮膚組織を HE（Hematoxylin and eosin）染色ならびにギムザ染色に供した。

6. OVA 特異的抗体価

血清中 OVA 特異的抗体価は ELISA によって測定した。測定する血清サンプルは 1/2 連続希釈し、吸光度が 0.1 以上を示す最大希釈倍率を Reciprocal log 2 titer として表した。

7. 抗原特異的 T 細胞解析

OT-Ⅱマウス（B6. Cg-Tg（TcraTcrb）425Cbn/J）から CD4 陽性 T 細胞を単離し、eFluor 670 で蛍光標識した後、野生型マウスに 5×10^6cells/500 μL ずつ尾静脈内投与した。翌日、これらのマウスに OVA 装填 sdMN（20 μg/patch）の貼付、あるいは OVA 溶液（20 μg/50 μL）の SC を施した。OVA 投与 4 日後に DLNs を回収し、FCM 解析による eFluor 670 の蛍光強度減衰を指標に各移入 T 細胞の分裂増殖を評価した。また、OVA 投与 1 週間後に回収した DLNs 中の移入 OT-Ⅱ細胞の活性化・分化状態を FCM 解析した。

8. DC サブセット解析

マウス除毛背部皮膚に placebo-sdMN、AF647-OVA 装填 sdMN（10 μg/patch）を貼付、あるいは AF647-OVA 溶液（10 μg/50 μL）を ID または SC し、24 時間後に摘出した DLNs 中の DC サブセットならびに抗原捕捉細胞の頻度を FCM 解析した。

9. 皮膚組織内遺伝子発現変動解析

マウス除毛背部皮膚に OVA 装填 sdMN（20 μg/patch）、placebo-sdMN、または plastic-MN を貼付、あるいは OVA 溶液（20 μg/50 μL）を ID または SC した。24 時間後に適用皮膚を回収し、RNA 抽出および網羅的遺伝子発現解析（RNA-seq 解析）を大阪大学微生物病研究所遺伝情報実験センターゲノム解析室に委託した。

結果および考察

1. sdMN を貼付した皮膚における抗原滞留性および組織学的変化

マウス除毛背部皮膚に貼付した sdMN は、貼付 5 分後には針が完全に溶解しており（Fig. 1A）、装填された抗原（F-OVA）は、生きた表皮および真皮上層部において観察された（Fig. 1B）。したがって、sdMN を用いた経皮投与は LCs や dDCs が豊富に局在する皮膚表層に抗原を的確に送達可能なデバイスであることが示された。また、sdMN に

より経皮投与された F-OVA は 9 本の穿刺孔付近に検出され、時間経過に伴って徐々に消失したが投与 48 時間後まで蛍光が検出され、SC および ID と比較して抗原の皮膚内滞留性に優れることが明らかとなった（Fig. 1C）。これは、皮膚内の僅かな水分に溶解した sdMN 成分による粘性が、抗原の皮膚内拡散速度を低下させたためと考えられた。

sdMN 貼付によって皮膚組織に炎症性細胞（好中球、リンパ球、およびマクロファージ）の浸潤が観察され（Fig. 1D）、軽微な炎症の惹起が示唆された。一方、SC および ID においては皮膚組織像に顕著な変化は認められなかった。sdMN 貼付に伴う軽度炎症は、微小針穿刺の皮膚組織傷害に起因すると考えられ、この反応が内因性アジュバントとして免疫応答の増強に寄与する可能性が考えられた。

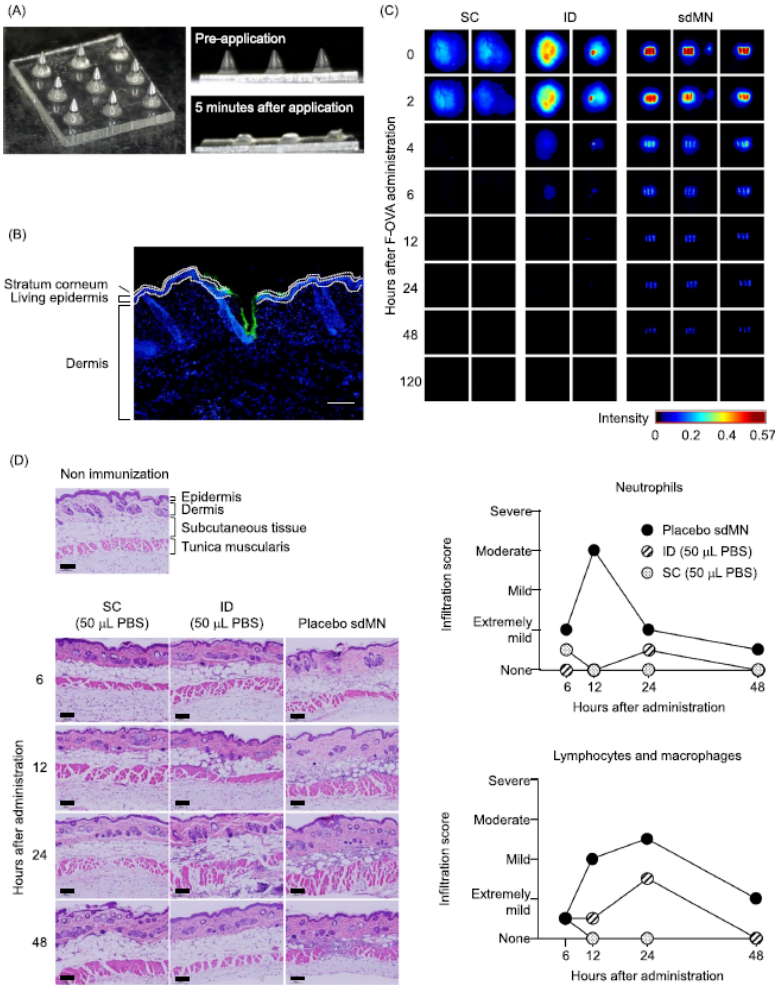


Fig. 1. Characteristics of OVA-loaded sdMN and histological evaluation of the skin.

A) The sdMN was loaded with antigen only at the needle tips. After application to the skin, the needle dissolved in 5 min by skin moisture. The loaded antigen could be delivered into the skin.

B) C57BL/6 mice were immunized with F-OVA (green) at the dorsal skin by the sdMN (430 μm). Collected skin samples were frozen with liquid nitrogen, and frozen sections were photographed using the fluorescence microscope. The nucleus was counterstained using DAPI (blue). White dotted lines indicate the surfaces of the stratum corneum, epidermis, and superficial dermis, respectively, from top to bottom.

C) F-OVA (10 μg) was administered by sdMN, ID or SC. Images were captured by the CRi Maestro EX system at the indicated time point after administration. The results are shown as fluorescence intensity. N = 2~3 per group.

D) Placebo-sdMN was applied to C57BL/6 mice or PBS was injected by SC or ID at dorsal skin. After 24 h, collected skins were assayed with HE staining and photographed using bright microscope. Representative photomicrographs demonstrating HE staining in skin sections are given (Scale bar: 100 mm in inset). N = 2 per group.

2. sdMN を用いた経皮免疫における抗原特異的免疫応答の特性

OVA-sdMN により経皮免疫したマウスでは SC 群と比較して迅速な OVA 特異的抗体価の上昇を示し（Fig. 2A）、さらには CD4 陽性細胞の枯渇によって抗体産生誘導がキャンセルされることも判明した（Fig. 2B）。したがって、sdMN を用いた経皮免疫による優れた抗体産生誘導には、皮膚内抗原滞留性向上に伴うリンパ管を介した DLNs への抗原流入の増大や、sdMN 貼付によって誘導された軽微な炎症による皮膚常在性 DC サブセットの活性化および抗原取り込み効率上昇、さらにはそれらの DC サブセットによる CD4 陽性ヘルパーT 細胞の効率的な活性化、などの関与が示唆された。

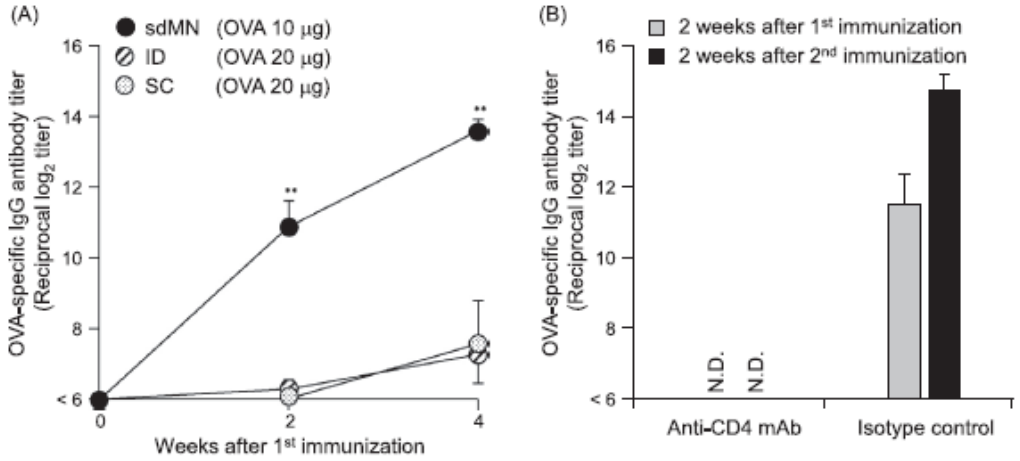


Fig. 2. Antigen-specific antibody production.

A) C57BL/6 mice were immunized using OVA-loading sdMN twice at 2 weeks interval. The OVA solution was injected subcutaneously or intradermally on the same schedule.

B) C57BL/6 mice were injected with either 100 μg anti-CD4 monoclonal antibody (mAb) or 100 μg rat IgG antibody (isotype control) on days 1, 2, and 3 and subsequently every 4 days. Sera collected from these mice were assayed to determine each OVA-specific IgG titer using ELISA. Data are expressed as mean ± SEM of results from 3 to 5 mice. **; $p < 0.01$ versus SC or ID by Tukey's test.

DLNs における OVA 特異的 CD4 陽性 T 細胞（移入 OT-Ⅱ細胞）を解析したところ、sdMN 群では活性化された T 細胞頻度が高く（Fig. 3A）、SC 群および ID 群と比較して分裂回数の多い T 細胞数が増加した（Fig. 3B）。すなわち、sdMN 群では抗原提示細胞から CD4 陽性ヘルパーT 細胞への抗原提示効率が亢進していることが示された。また、移入 OT-Ⅱ細胞を表面マーカーにより naïve T（T_N : $CD44^{low}$、$CD62L^+$）細胞、effector T（T_{EFF} : $CD44^{high}$、$CD127^-$、$CCR7^-$）細胞、effector memory T（T_{EM} : $CD44^{high}$、$CD127^+$、$CCR7^-$）細胞、および central memory T（T_{CM} : $CD44^{high}$、$CD127^+$、$CCR7^+$）細胞に分画したところ、sdMN 群では T_{EFF} 細胞の有意な増加が認められ（Fig. 3C）、抗原提示を受けた T 細胞が T_{EFF} 細胞へと効率よく分化したことが明らかとなった。また T 細胞サブセット全体から見ると、わずかではあるが T_{EM} 細胞への分化効率においても sdMN 群は SC 群よりも優れていた。したがって、一次免疫応答においては皮膚内への抗原送達（sdMN 群）が皮下への抗原投与（SC 群）よりも抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞を効率よく感作し、ヘルパーT 細胞への分化と活性化を促進することが示唆された。さらに、DLNs 内の GC 形成は sdMN 群にのみ認められ（Fig. 3D）、sdMN を用いた経皮免疫は従来の SC 注射免疫と比較して、抗原との反応性が高い高親和性抗体の産生を効率よく誘導できることが示唆された。

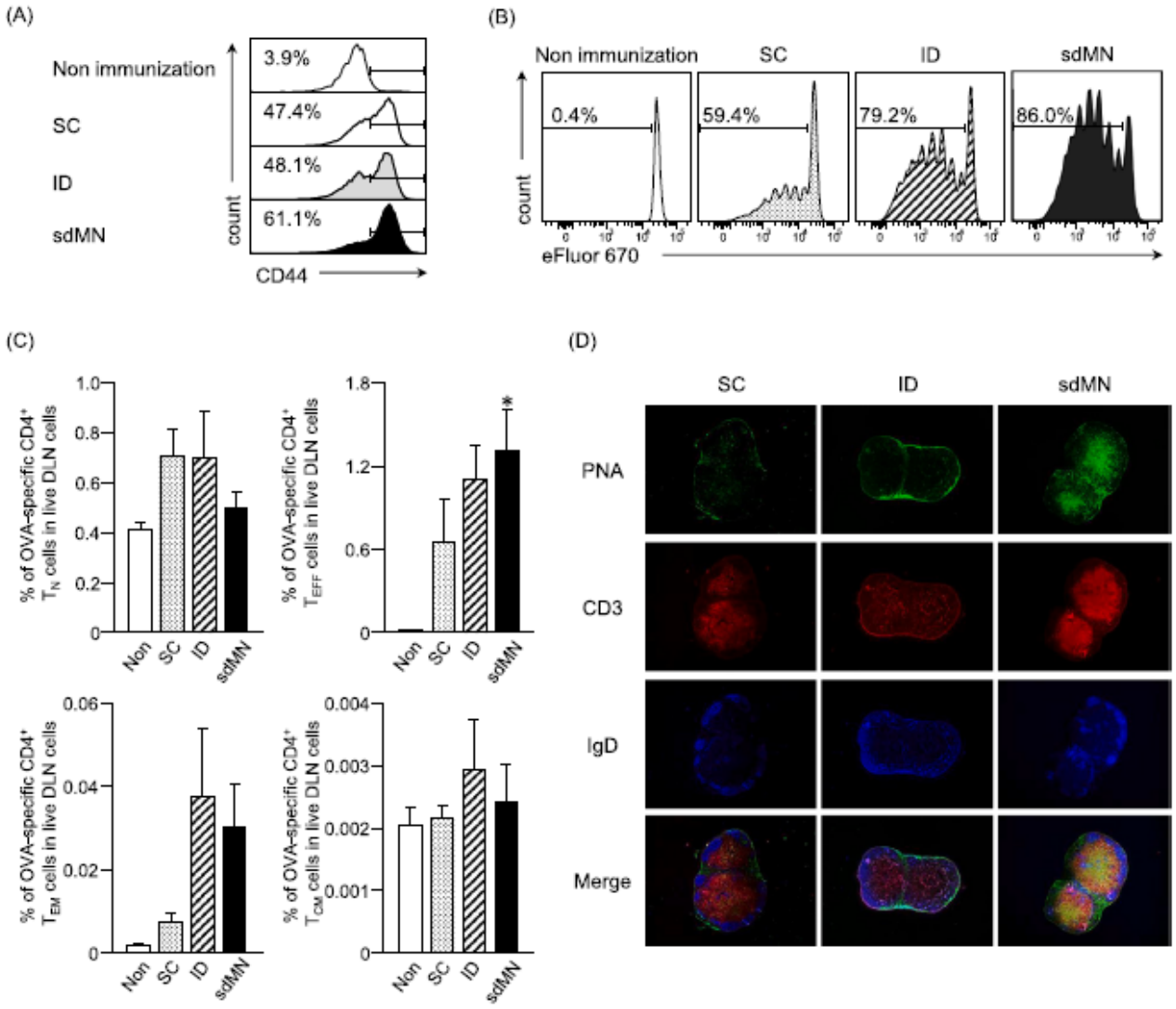


Fig. 3. Antigen-specific T cell responses and GC formation in DLNs.

WT mice (CD45.2, Thy1.2) were intravenously transferred with eFluor 670-labelled OT-II cells (CD45.1, Thy1.2). The next day, mice were immunized with 20 μg OVA by sdMN, ID or SC. Four days after immunization, (A) activated OVA-specific $CD4^+$ T cells with high CD44 expression and (B) cell division of transferred OT-II cells in the DLNs was analyzed using FACS. (C) DLNs cells were stained for T_{EFF}, T_{EM}, or T_{CM} to investigate the differentiation state of OVA-specific $CD4^+$ T cells. (D) C57BL/6 mice were immunized with 10 μg OVA by sdMN, ID, or SC. One week after immunization, DLNs were collected and GCs were stained by IgD (blue), T cell (red), and PNA (green).

3. sdMN を用いた経皮免疫に伴う DLNs における DC サブセット数の変化

各種経路により AF647-OVA を投与したマウスの DLNs における $AF647^-OVA^+$LCs および $AF647^-OVA^+$dDCs の数は、投与後早期（2 時間および 6 時間）では SC 群よりも ID 群および sdMN 群で多く、sdMN 群で最も顕著であった（Fig. 4）。したがって、抗原が皮膚組織内に投与されると、抗原を捕捉した皮膚常在性 DC サブセット（LCs、$CD207^+$ dDCs、$CD207^-$ dDCs）が比較的早い段階で DLNs に移動することが示唆された。また、リンパ節常在性 DC サブセット（$CD8\alpha^+$DCs、pDCs（plasmacytoid DCs）、Other $CD11c^+$ cells）数においても、sdMN 群で抗原捕捉細胞数が大幅に増加した。これは、sdMN を用いた経皮投与が、従来の注射投与よりも効率的に抗原を DLNs に送達でき、迅速な抗原提示を誘発する可能性があることを示唆した。

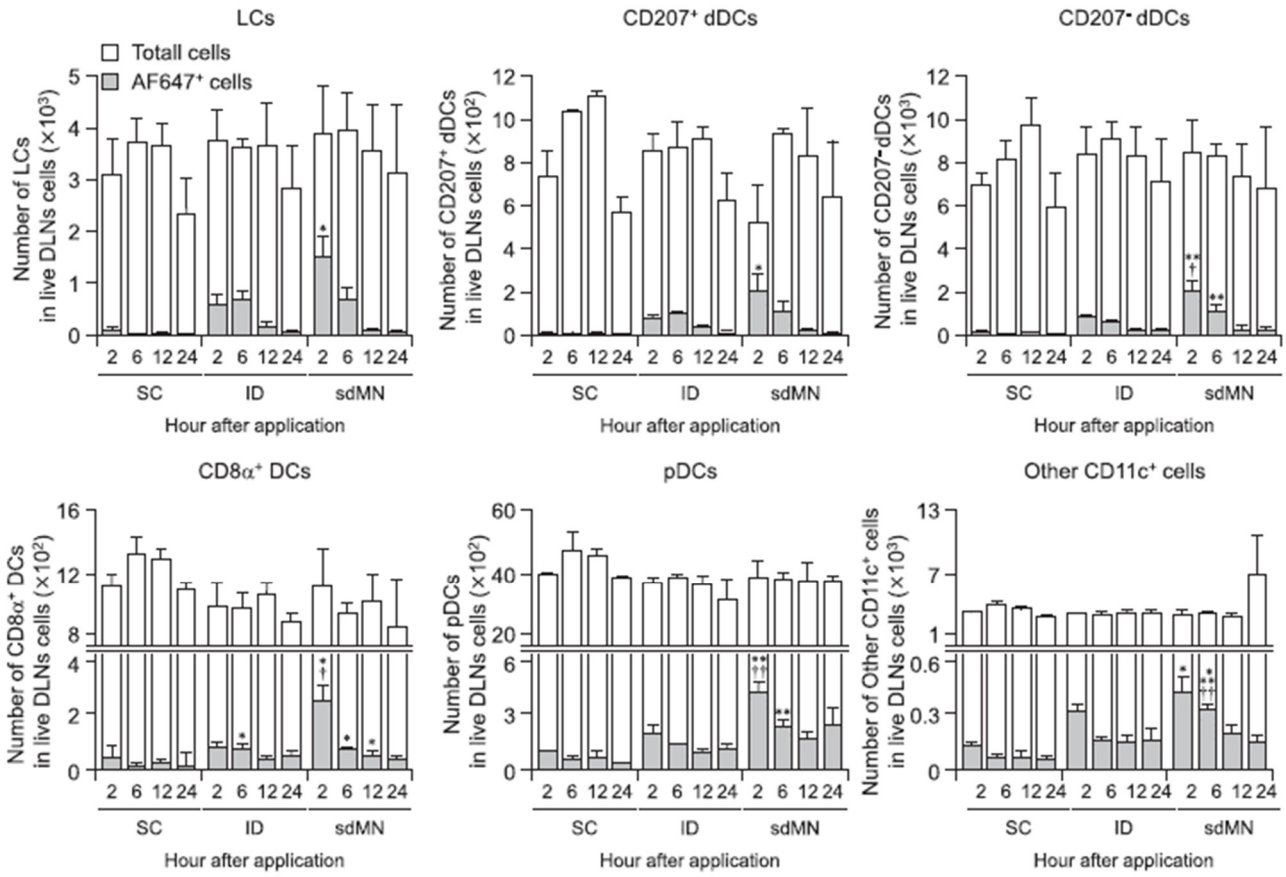


Fig. 4. Changes in the presence of various DCs in DLNs.

BALB/c mice were administered with 10 μg AF647-OVA by sdMN, SC, or ID. At the indicated time, the number of total subset cells (open bar) and AF647+ subset cells (solid bar) in DLNs were analyzed using FCM. Data are expressed as mean ± SEM of the results from 3 mice. *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, and ***; $p < 0.001$ versus SC, †; $p < 0.05$ and ††; $p < 0.01$ versus ID at the indicated time by one-way ANOVA with Tukey's test.

4. sdMN を貼付した皮膚における遺伝子発現変動

処置 24 時間後における皮膚内遺伝子発現変動を RNA-seq 解析したところ、SC 群および ID 群においては無処置群と同様の遺伝子発現プロファイルが認められた（Fig. 5A）。一方、OVA-sdMN 群、placebo-sdMN 群、plastic-MN 群は無処置群とは異なる類似した遺伝子発現パターンを示した。本結果より、MN 貼付に伴う遺伝子発現変動は抗原や MN 構成基剤の影響ではなく、微小針穿刺による物理的刺激（皮膚組織傷害）が要因であることが示唆された。さらにシグナルパスウェイ解析の結果、炎症部位への白血球誘引、Alarmin を認識するパターン認識受容体、DCs の成熟、転写因子 IRF の活性化に寄与する遺伝子群に顕著な発現上昇が認められた（Fig. 5B、C）。特に発現量が増加した遺伝子を優先して RT-qPCR によるバリデーションを実施したところ、IRF7 遺伝子発現量が無処置と比較して約 10 倍増加していた（Fig. 5D）。これらの結果より、MN を用いた経皮ワクチンにおいては、MN 貼付に伴う物理的刺激（皮膚組織傷害）によって皮膚細胞から炎症性サイトカインや Alarmin が産生・分泌され、これらの因子により遊走亢進・機能増進した皮膚常在性 DC サブセットが効率的な抗原特異的免疫応答の誘導に寄与していると考えられた。

現在、各種遺伝子改変マウスやキメラマウスを駆使することで、MN を用いた経皮ワクチン製剤の免疫応答誘導・維持に寄与する細胞・分子機構のさらなる解明を図っている。

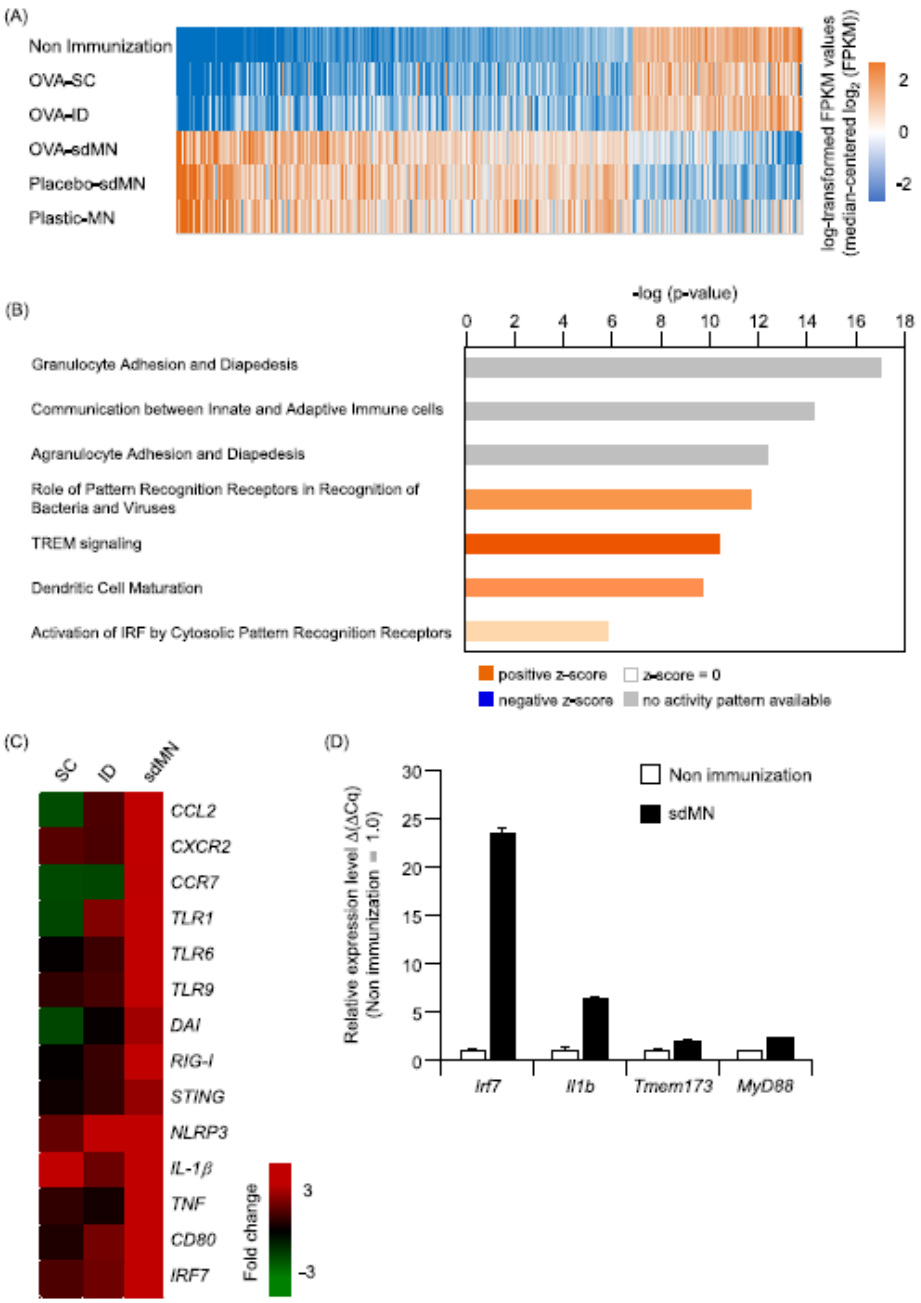


Fig. 5. Gene expression at OVA-sdMN application site

C57BL/6 mice were administered OVA-sdMN (10 μ g), placebo-sdMN, or plastic-MN transcutaneously. For comparison, OVA solution (10 μ g) was administered subcutaneously or intradermally. Each skin was collected 24 h after administration and subjected to RNA-sequence analysis.

A) Genes were normalized for those with an FPKM value of 0.1 or more, and genes whose expression was more than doubled, half, or less were represented by a heatmap.

B) Signal analysis was performed using the genes obtained from OVA-sdMN group.

C) In the signal analysis, genes whose expression fluctuations were particularly remarkable were selected, and their expression levels were compared with those in non-immunized group.

D) RNA was extracted from the skin 24 h after OVA-sdMN application, and cDNA was synthesized. RT-qPCR was performed using the TaqMan probe, focusing on genes that were highly expressed in the RNA sequence.

共同研究者・謝辞

本研究は、大阪大学大学院薬学研究科ワクチン・免疫制御学プロジェクト、富士フイルム株式会社の共同による成果であります。この場をお借りして御礼申し上げます。

文　献

1) Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. Semin. Immunol. 2005 Aug; 17(4): 273-83. PMID: 15953735 DOI: 10.1016/j.smim.2005.05.009

2) Sugita K, Kabashima K, Atarashi K, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. Clin. Exp. Immunol. 2007 Jan; 147(1): 176-83. PMID: 17177977 PMCID: PMC1810440 DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03258.x

3) Malissen B, Tamoutounour S, Henri S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. Nat. Rev. Immunol. 2014 Jun;14(6): 417-28. PMID: 24854591 DOI: 10.1038/nri3683

4) Matsuo K, Yokota Y, Zhai Y, Quan Y.-S, Kamiyama F, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. A low-invasive and effective transcutaneous immunization system using a novel dissolving microneedle array for soluble and particulate antigens. J. Control. Release 2012 Jul; 161(1): 10-7. PMID: 22306332 DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.033

5) Matsuo K, Hirobe S, Yokota Y, Ayabe Y, Seto M, Quan Y.-S, Kamiyama F, Tougan T, Horii T, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Transcutaneous immunization using a dissolving microneedle array protects against tetanus, diphtheria, malaria, and influenza. J. Control. Release 2012 Jun; 160(3): 495-501. PMID: 22516091 DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.04.001

6) Hirobe S, Azukizawa H, Hanafusa T, Matsuo K, Quan Y-S, Kamiyama F, Katayama I, Okada N, Nakagawa S. Clinical study and stability assessment of a novel transcutaneous influenza vaccination using a dissolving microneedle patch. Biomaterials 2015 Jul; 57: 50-8. PMID: 25913250 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.04.007

7) Ono A, Ito S, Sakagami S, Asada H, Saito M, Quan Y-S, Kamiyama F, Hirobe S, Okada N. Development of novel faster-dissolving microneedle patches for transcutaneous vaccine delivery. Pharmaceutics 2017 Aug; 9(3): 27. PMID: 28771172 PMCID: PMC5620568 DOI: 10.3390/pharmaceutics9030027