粘膜免疫システムを応用したワクチン開発

吉原晋太郎^{1,2)}, 清野 宏^{1,3,4,5)}

¹⁾ 東京大学医科学研究所特任教授部門粘膜免疫学部門

²⁾ 東京大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科

³⁾ カリフォルニア大学サンディエゴ校(UCSD)内科学講座

⁴⁾ 東京大学医科学研究所国際粘膜ワクチン開発研究センター

⁵⁾ 千葉大学医学研究院免疫発生学

広大な面積を有する気道粘膜や消化管粘膜は、微生物を含む無数の有益、および有害な抗原に継続的に曝露されている。多種多様な外来抗原に対して粘膜面では、上皮-間葉系細胞、免疫細胞、および共生微生物叢などから構成される粘膜マルチエコシステムが、互いにコミュニケーションを取りながら、調和のとれた生態系を形成し、「共生と排除」という相反する生体応答を巧みに誘導・制御していることが近年の研究から明らかとなってきた。

鼻咽頭および腸管に位置する二次リンパ組織である粘膜関連リンパ組織(MALT)は、抗原特異的免疫応答の開始地点となる重要な構造であり、抗原特異的T細胞およびB細胞の誘導のために必要な管腔側からの抗原補足、処理および提示機能を備えている。抗原提示により活性化されたリンパ球は、各種遠隔粘膜面への選択的な移行のため粘膜指向性分子(CCR9や $\alpha 4\beta 7$ など)を獲得し、それぞれの粘膜面で抗原特異的分泌型IgA(SIgA)抗体産生などに携わる。つまり、経鼻および経口免疫により、全身免疫誘導とともに、呼吸器、消化器、生殖器などの粘膜部位での抗原特異的な免疫応答を誘導する。

これらの基礎的知見を基盤とし、我々はカチオン化コレステリル基含有プルラン(cCHP) Nanogelを使用した新規経鼻ワクチンシステムを開発している。cCHP Nanogelに組み込まれたワクチン抗原は、嗅球を介した中枢神経への移行がなく、強力な抗原特異的粘膜および全身性免疫応答を誘導することを明らかにしてきた。cCHPベースのNanogelは、安全で効果的な経鼻ワクチンデリバリーシステムと考えられ、呼吸器感染症に対する次世代型粘膜ワクチンとして今後の開発が期待される。

キーワード：粘膜免疫，粘膜マルチエコシステム，粘膜ワクチン，経鼻ワクチン，カチオン化ナノゲル

The Mucosal Immune System for Vaccine Development

Shintaro Yoshihara^{1,2)}, Hiroshi Kiyono^{1,3,4,5)}

¹⁾ Division of Mucosal Immunology, IMSUT Distinguished Professor Unit, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan

²⁾ Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

³⁾ Division of Gastroenterology, Department of Medicine, CU-UCSD Center for Mucosal Immunology, Allergy and Vaccines (CU-UCSD cMAV), University of California, San Diego, CA, USA

⁴⁾ Division of Mucosal Vaccine, Research and Development Center for Mucosal Vaccines, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

⁵⁾ Department of Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan

Aero-digestive tract is continuously exposed to infinite beneficial and harmful antigens including microbe via the large surface of mucosal epithelium. The mucosal surface is thus equipped with multi-complexed but harmonized biological components including epithelial-mesenchymal cells, mucosal immunocompetent cells and commensal microbiota, which form “Mucosal multi-ecosystem” for handling numerous numbers of foreign antigens.

For the initiation of antigen-specific immune responses, nasopharyngeal- and gut-associated lymphoid tissues (NALT and GALT, respectively) equipped with the antigen sampling, -processing and -presentation system are immunologically organized inductive sites for the generation of antigen-specific T cells and B cells. During the antigen presentation process, these lymphocytes also acquired mucosal imprinting molecules (e.g., CCR9 and $\alpha 4\beta 7$) for their preferential migration to distant mucosal effector sites for the induction of antigen-specific secretory IgA (SIgA) antibodies. These evidences are the basic foundation for the development of mucosal vaccine. Nasal and oral vaccines thus induce antigen-specific immune responses at mucosal sites including the respiratory, digestive, and reproductive tracts, and simultaneously inducing antigen-specific immunity in the systemic compartment. We have been developing novel nasal vaccination system using cationic cholesteryl group-bearing pullulan (cCHP) nanogels. Vaccine antigens incorporated into cCHP nanogels induced potent antigen-specific mucosal and systemic immune responses without no brain deposition of antigen via olfactory bulb after nasal administration. Thus, cCHP based nanogel is a safe and effective nasal vaccine delivery system. We will present and discuss our progress on our efforts for the development of nasal vaccines against respiratory infectious diseases.

Key words: Mucosal immunity, Mucosal multi ecosystem, Mucosal vaccine, Nasal vaccine, cCHP nanogel

(2019年10月7日受稿, 2019年10月30日受理)

はじめに

呼吸器, 消化器, 生殖器といった広大な面積を有する粘膜面は, ヒトにとって「内なる外」とも表現される管腔構造を形成している。粘膜面 (上皮細胞および粘液) により隔てられた外界には微生物, 食餌性抗原, 吸引性抗原など, 生体にとって「非自己」である無数の外来異物が存在している。粘膜面は生理活動を行う上で必須の栄養, 酸素, 水分など有益な物質を体内に取り込み, その一方で病原性微生物など有害な物質の侵入を阻害する必要がある。そのため, それぞれの粘膜面において免疫学的な「寛容」と「排除」を両立させる独自の免疫系である粘膜免疫システムが発達し, 生体の6~8割の免疫細胞がこのシステムに関わっていると考えられている^{1,2)}。粘膜上皮-間葉系細胞, 免疫細胞, および共生微生物叢が互いに影響を及ぼし合って常に動的な恒常性を構築する調和のとれた生態系は, 平時は無菌状態である脾臓のような体の内部組織を中心とした全身免疫システムとは大きく異なっており, 我々は「粘膜マルチエコシステム」として提唱している³⁾。

粘膜から侵入する病原性細菌などに対する免疫応答

は, 感染防御機構として機能しているわけだが, 感染を水際で阻止するために, この機序を応用した方法が経鼻, 経口に代表される粘膜ワクチンである。現行ワクチンの多くは注射製剤による全身免疫応答誘導を目的としているため, 血液中や組織内に侵入した病原体に対する感染防御能力を発揮する一方で, 病原体の粘膜面を介した体内侵入そのものを防ぐことが出来ないという課題がある。粘膜ワクチンでは, 注射型ワクチンと同様の抗原特異的IgG抗体産生に代表される全身性免疫を効率よく誘導しながら, 抗原特異的分泌型IgA (SIgA) 抗体産生を中心とした粘膜面での免疫応答を誘導することが可能であり, 二段構えの防御システムを構築する^{1,4,5)}。既に, 弱毒化生ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチン (FluMist[®]) については欧米で臨床使用されている⁶⁾。

更に, 注射型ワクチン製剤の使用は, 注射器・注射針という医療用廃棄物の存在, 使用器具の使いまわしによる二次感染, 冷蔵保存設備の必要性などの理由で, インフラ面での課題がある発展途上国では深刻な課題となっている。故に, それらの問題を解決する粘膜ワクチン製剤が重要となる。

粘膜面における抗原取り込み能と, それに引き続く抗

原特異的な免疫応答を誘導する研究成果の集積が、各粘膜面を抗原投与のターゲットとした経口ワクチン、経鼻ワクチン開発を行っていく上での基盤となっている。本稿では特に経鼻ワクチンに重点をおいて、これまでの基礎的知見ならびに新規のワクチン開発の現況を含めて概説する。

粘膜ワクチンによる抗原特異的抗体産生と 粘膜指向性の獲得

粘膜面には二次リンパ組織である粘膜関連リンパ組織 (Mucosa-associated Lymphoid Tissue: MALT) が存在する^{7,8)}。通常のリンパ節と異なり、MALTには輸入リンパ管が存在しない代わりに、管腔側に面した上皮層に存在するM細胞が、トランスサイトシスによって細菌などの外界抗原を同組織内に取り込む。直下には抗原処理・提示を行うマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞が集簇し、取り込まれた抗原を貪食・処理する。周囲のナイーブT細胞に抗原提示を行い活性化させ、IgM陽性の抗原特異的B細胞を、より粘膜免疫防御に適したIgA陽性B細胞へとクラススイッチさせる^{1,7)}。MALTはそれぞれの粘膜面において独自の発達を遂げており、腸管粘膜関連リンパ組織 (Gut-associated Lymphoid Tissue: GALT)、マウス鼻腔底に存在しヒトWaldeyer 輪の働きに相当する鼻咽頭関連リンパ組織 (Nasopharynx-associated Lymphoid Tissue: NALT)、涙道関連リンパ組織 (Tear duct-associated Lymphoid Tissue: TALT) などの存在が

確認されている⁹⁾。

ワクチンの投与経路によって免疫応答部位は異なり、経口投与の場合は腸管粘膜での免疫が誘導され、経鼻投与の場合は鼻粘膜や気道粘膜での免疫が誘導される^{1,10,11)} (図1)。経口ワクチンの場合、抗原はGALTから取り込まれ、抗原刺激により活性化したT細胞やB細胞は、レチノイン酸の作用を受けて接着分子 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン及びケモカイン受容体CCR9といった腸管粘膜指向性分子群を発現する^{12~14)}。これらの分子群は、腸管壁の血管内皮細胞に発現する血管アドレシン接着分子-1 (MadCAM-1)、及び小腸に特異的に発現するケモカインリガンドCCL25にそれぞれ結合する分子であるため、一度腸間膜リンパ節を経て全身血流に入った活性化リンパ球が、再び免疫実行組織である腸管粘膜に遊走することに寄与していると考えられている¹⁵⁾。一方、経鼻ワクチンの場合、抗原はNALTから取り込まれ¹⁶⁾、抗原刺激により活性化したT細胞、B細胞は、 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンを発現するため、鼻粘膜血管内皮細胞に選択的に発現している血管細胞接着-1 (VCAM-1) の受容体として働くことで遊走に寄与することが示唆されている^{17,18)}。

経鼻ワクチンは呼吸器粘膜のみならず、生殖器 (膣) 粘膜にも局所免疫を誘導する^{17,18)}。膣粘膜における単純ヘルペスウイルス2型 (HSV-2) の侵入を防ぐ上で、膣粘膜のT細胞が産生するIFN- γ はウイルス排除における重要な役割を果たしている¹⁹⁾。通常株のHSV-2を野生型マウスに経膣感染させると死に至るが、ウイルスのDNA

図1 粘膜ワクチン投与による粘膜指向性の獲得。MALTで取り込まれた抗原は、粘膜固有層で樹状細胞などに取り込まれ、抗原提示によりリンパ球を活性化させる。NALTではリンパ球は $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンを発現し、GALTでは $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン、CCR9を発現する。一度全身血流に入った活性化リンパ球は、発現した粘膜指向性分子の寄与により、再び免疫実行組織に遊走する。

図2 経鼻ワクチン投与による腔粘膜での免疫能獲得のメカニズム。鼻粘膜で活性化された頸部リンパ節由来のリンパ球が、CCR5を発現する。抗原曝露部位とは離れた腔粘膜でCCL5発現が亢進し、活性化リンパ球が遊走し、INF- γ を産生する。

合成に参与するチミジンキナーゼを欠損させたHSV-2株 (HSV-2 TK⁻) はマウスに感染させても病気を発症することなく、抗原特異的な免疫応答を誘導することが出来る¹⁹⁾。我々の検討では、HSV-2 TK⁻を経鼻投与することで、腹腔内投与による全身免疫を行った場合と比較して、頸部リンパ節由来のCD4陽性T細胞が腔粘膜に多く集簇した²⁰⁾。更に、HSV-2 TK⁻を経鼻ワクチンにより免疫したマウスでは野生型マウスと比較し、通常株のHSV-2株感染後の生存率が高く、その生存率は抗CD4抗体を投与することにより明らかに低下した²⁰⁾。これらの結果から、経鼻ワクチン投与によって鼻粘膜面で活性化された頸部リンパ節由来のCD4陽性T細胞が、抗原曝露部位とは離れた腔粘膜面におけるHSV-2感染に対する免疫力を発揮していることが示唆された。

更に鼻粘膜で活性化されたリンパ球が、腔粘膜に遊走する分子レベルでのメカニズムについても検討している²¹⁾。ケモカイン受容体は7回膜貫通Gタンパク質共役型受容体であるが、百日咳毒素にはその情報伝達を遮断する作用がある²²⁾。経鼻的にHSV-2 TK⁻を投与することで腔、及び全身免疫である脾臓のいずれにおいても抗原特異的Tリンパ球によるINF- γ は増加したが、興味深いことに腔のケモカイン受容体を百日咳毒素の投与でブロックすることで、脾臓での抗原特異的Tリンパ球によるINF- γ 産生量は変わらないものの、腔粘膜でINF- γ 産生量は著明に減少した²¹⁾。このことから、粘膜指向性分子はケモカインであることが示唆された。HSV-2 TK⁻を経鼻ワクチンにより免疫したマウスの頸部リンパ節のケモカイン受容体発現を網羅的に解析し、発現が亢進していた分子群の中から、CCR5を欠損することで腔粘膜における抗原特異的INF- γ の産生が有意に低下することを見出した²¹⁾。

また、CCR5のリガンドであるCCL5の発現が腔粘膜で亢進していた²¹⁾。これらの結果から経鼻ワクチンによって、頸部リンパ節で活性化されたT細胞がCCR5を高発現し、腔粘膜で発現亢進しているCCL5依存的に遊走した抗原特異的Tリンパ球がINF- γ を産生することで、病原性を持つウイルスに対する粘膜面での免疫を発揮することが示唆された (図2)。今後、腔粘膜でCCL5発現が亢進するメカニズムなどについて更なる検討を予定している。

ドラッグデリバリーシステム (DDS) としての カチオン化型ナノゲル (cCHP Nanogel)

前述の通り、経鼻粘膜ワクチンのメリットには、注射針を用いない非侵襲的な投与形態、生体の第1線である粘膜免疫と全身免疫の誘導、活性化リンパ球の粘膜指向性に基づいた粘膜免疫誘導効果が挙げられる。その一方で、粘膜上皮細胞のターンオーバーや流動的な粘液によるワクチン抗原定着への影響、上皮細胞から産生される代謝・分解酵素の影響等のデメリットを考慮する必要がある。また過去には、不活化インフルエンザ抗原にアジュバントとして病原性大腸菌が産生する易熱性毒素を添加した経鼻ワクチンが開発されたが、臨床試験が行われた際に顔面神経麻痺の有害事象が報告された²³⁾。これは鼻腔内嗅神経を介した中枢神経への作用と考えられ、経鼻ワクチン投与における安全性については今後も十分に検討する必要がある。

我々は呼吸器粘膜免疫を利用した、上気道感染症に対する経鼻粘膜ワクチン用のデリバリーシステムとして、ナノサイズのカチオン化(正の電荷)粒子“cCHP Nanogel”の開発に、秋吉一成先生 (現：京都大学) の協力のもと取り組んできた²⁴⁾ (図3A)。cCHP Nanogelは一定の処理

図3 cCHP Nanogel (経鼻ワクチン)。A. cCHP Nanogelは一定の処理により、球状体 (～40nm) を自然に形成し、負電荷特性に応じて物質を内部に取り込む性質を持つコレステリル基含有プルランである。粘膜面で抗原を離し、抗原は粘膜下に集簇した樹状細胞に取り込まれる。B. cCHP Nanogelにボツリヌス毒素抗原を封入して経鼻投与した場合、12時間以上、抗原が鼻粘膜表面にとどまり、徐々に鼻粘膜固有層へ取り込まれていく²⁷⁾。

により、球状体 (～40nm) を自然に形成し、負電荷特性に応じて物質を内部に取り込む性質を持つコレステリル基含有プルランである。生体の粘膜面は負に帯電していることから²⁵⁾、cCHP Nanogelはその点でも効率的に鼻粘膜に吸着することが考えられる²⁶⁾。

無毒化させたボツリヌス毒素のワクチン抗原をcCHP Nanogelに封入してマウスに経鼻投与したところ、その他のアジュバント (抗原抗体反応を活性化させる非特異的免疫賦活剤) の添加なしに、血清中の抗原特異的IgG抗体価及び、粘膜面での抗原特異的IgA抗体価上昇が確認された²⁷⁾。一方で、ボツリヌス毒素のワクチン抗原を単体で経鼻投与しても抗原特異的抗体価は血清、粘膜面共に上昇しなかった²⁷⁾。また、cCHP Nanogelに抗原を封入して経鼻投与した場合、抗原単体で投与した時よりも長時間 (12時間以上) 抗原が鼻粘膜表面にとどまり、徐々に鼻粘膜固有層へ放出され、樹状細胞が集簇し抗原を補足する (図3B)。この際、嗅神経へのワクチン抗原移行は認められず、安全性についての利点が示唆された²⁷⁾。マウスを用いた実験系で一般的にアジュバントとして使用されることの多いコレラ毒素は経鼻投与した際に嗅神経移行がみられヒトへの応用は難しい²⁸⁾。一方で、cCHP Nanogelにはコレラ毒素などのアジュバント添加が不要であり、且つ高い免疫誘導効果を発揮するワクチンデリ

バリーシステムとしての応用に向けて開発研究が進んでいる。

肺炎球菌に対するcCHP Nanogelを用いたワクチン開発

そこで我々は、cCHP Nanogelを呼吸器感染症に対する経鼻ワクチンとして、内部に新規肺炎球菌ワクチン抗原を封入した経鼻肺炎球菌ワクチン開発を試みている²⁴⁾。現在、本邦では沈降13価肺炎球菌結合型ワクチンであるプレベナー7 (PCV7) 及びプレベナー13 (PCV 13)、23価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチンであるニューモバックスNP (PPSV 23) が一般的に使用され、全身免疫を誘導することで流行株による肺炎球菌感染の重症化を抑制している²⁹⁾。しかし、これらの注射型ワクチンでは粘膜面からの細菌侵入や定着を防ぐことができない点と、100種に近い肺炎球菌のサブタイプに個別に対応せざるを得ず、流行株の変遷にワクチンを対応させ続けなければならない点が課題として挙げられる。そこで、我々は米国アラバマ大学バーミングハム校のDavid E. Briles博士が率いる研究グループが同定した全ての肺炎球菌に共通する肺炎球菌表面タンパク質 (Pneumococcal surface protein A: PspA)^{30,31)}に着目し、cCHP Nanogel技術と融合した新規の肺炎球菌用経鼻ワクチン (cCHP-PspA Nanogel) の開発研究を推進している^{32,33)}。

図4 cCHP-PspA Nanogel (肺炎球菌経鼻ワクチン) 開発。A. マウスにcCHP-PspA Nanogelを経鼻投与したところ、血清中のPspA特異的IgG抗体価、鼻腔粘液中のPspA特異的SIgA抗体価が上昇した。PspAを単独で経鼻投与したマウスでは抗原特異的抗体価の上昇は認めなかった³³⁾。B. PspA単独投与群と比較して、cCHP-PspA Nanogel投与群では肺炎球菌感染による生存率が向上した³³⁾。C. Positron emission tomography (PET) 検査では、鼻粘膜表面にワクチン抗原が6時間とどまることが示された。また、嗅神経系への抗原移行は認めなかった³³⁾。

マウスにcCHP-PspA Nanogelを1週間おきに3回経鼻投与したところ、血清中のPspA特異的IgG抗体価、気管支及び鼻腔粘液中のPspA特異的SIgA抗体価が上昇したが、PspAを単独で経鼻投与したマウスではそれらの抗原特異的抗体価は上昇しなかった³²⁾(図4A)。また、PspA単独投与群と比較して、cCHP-PspA Nanogel経鼻投与群では肺炎球菌感染による生存率が向上した³²⁾(図4B)。霊長類であるカニクイザルにcCHP-PspA Nanogelを2週間おきに5回経鼻投与したところ、血清中PspA特異的IgG抗体価、気管支及び鼻腔粘液中のPspA特異的SIgA抗体価は上昇を示し、その後緩やかに減少を示しつつも8か月以上の期間持続した³³⁾。更に、最終免疫から9か月経過した時点で、経鼻ワクチンを単回投与を行うことでそれらの抗原特異的抗体価は速やかに上昇したことから、cCHP-PspA Nanogelにより記憶免疫誘導効果があることが示唆された³³⁾。Positron emission tomography (PET) 検査や組織学的解析結果より、cCHP-PspA Nanogelにより経鼻投与されたワクチン抗原は鼻粘膜表面に6時間以上もの間とどまり、危惧される嗅神経系への抗原移行は認めないことから(図4C)、安全についての優位性も確認されている³³⁾。cCHP-PspA Nanogelは肺炎球菌のサブタイプに関わらず抗原特異的な免疫防御効果を発揮する

次世代型経鼻ワクチンとして期待され、東大発ベンチャー企業であるHanaVax株式会社を立ち上げ、共同開発を進めているところである。

まとめ

経鼻ワクチンは、生体の第1線である粘膜面における抗原特異的SIgA抗体と、全身免疫である血清中の抗原特異的IgG抗体の両者を効率よく誘導できるワクチンシステムである。呼吸器感染症に対するcCHP Nanogelワクチンは効果的かつ安全性の高い次世代型の粘膜ワクチンとして期待される。粘膜面の二次リンパ組織を抗原特異的免疫応答の起点とし、活性化されたリンパ球に発現する粘膜指向性分子の発現・作用機序の解明を基盤とした、ワクチン開発の更なる発展が望まれる。

参考文献

- 1) 清野 宏：古くて新しい粘膜免疫：総論. 清野 宏編, 臨床粘膜免疫学. シナジー, 東京; 2010 : p.18-29.
- 2) Holmgren J, Czerkinsky C : Mucosal immunity and vaccines. Nat Med 2005 ; 11 : S45-S53.
- 3) Kurashima Y, Kiyono H : Mucosal ecological network

- of epithelium and immune cells for gut homeostasis and tissue healing. *Annu Rev Immunol* 2017 ; 35 : 119-147.
- 4) Yuki Y, Tokuhara D, Nochi T, et al : Oral MucoRice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralising immunity. *Vaccine* 2009 ; 27 : 5982-5988.
 - 5) Tokuhara D, Kurashima Y, Kamioka M, et al : A comprehensive understanding of the gut mucosal immune system in allergic inflammation. *Allergol Int* 2019 ; 68 : 17-25.
 - 6) Belshe RB, Mendelman PM, Treanor J, et al : The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenzavirus vaccine in children. *N Engl J Med* 1998 ; 338 : 1405-1412.
 - 7) Kiyono H, Fukuyama S : NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 2004 ; 4 : 699-710.
 - 8) Goto Y, Kiyono H : Epithelial barrier: An interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol Rev* 2012 ; 245 : 147-163.
 - 9) 清野 宏, 岡田和也 : 粘膜免疫システム—生体防御の最前線. *日本耳鼻咽喉科学会会報* 2011 ; 114 : 843-850.
 - 10) Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, et al : Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 1993 ; 74 : 185-195.
 - 11) Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, et al : Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 2004 ; 21 : 527-538.
 - 12) Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, et al : Human G protein-coupled receptor GPR-96/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med* 1999 ; 190 : 1241-1256.
 - 13) Mora JR, Bono MR, Manjunath N, et al : Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 2003 ; 424 : 88-93.
 - 14) Kim DY, Sato A, Fukuyama S, et al : The airway antigen sampling system: Respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J Immunol* 2011 ; 186 : 4253-4262.
 - 15) Springer TA : Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990 ; 346 : 425-434.
 - 16) Bentley AM, Durham SR, Robinson DS, et al : Expression of endothelial and leukocyte adhesion molecules interacellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cell adhesion molecule-1 in the bronchial mucosa in steady-state and allergen-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993 ; 92 : 857-868.
 - 17) Johansson EL, Wassén L, Holmgren J, et al : Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. *Infect Immun* 2001 ; 69 : 7481-7486.
 - 18) Imaoka K, Miller CJ, Kubota M, et al : Nasal immunization of nonhuman primates with simian immunodeficiency virus p55gag and cholera toxin adjuvant induces Th1/Th2 help for virus-specific immune responses in reproductive tissues. *J Immunol* 1998 ; 161 : 5952-5958.
 - 19) Iijima N, Linehan MM, Zamora M, et al : Dendritic cells and B cells maximize mucosal Th1 memory response to herpes simplex virus. *J Exp Med* 2008 ; 205 : 3041-3052.
 - 20) Sato A, Suwanto A, Okabe M, et al : Vaginal memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for protective T cell recruitment and prevention of genital HSV-2 disease. *J Virol* 2014 ; 88 : 13699-13708.
 - 21) Joo S, Kiyono H : Manuscript in submission.
 - 22) Cyster JG, Goodnow CC : Pertussis toxin inhibits migration of B and T lymphocytes into splenic white pulp cords. *J Exp Med* 1995 ; 182 : 581-586.
 - 23) Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, et al : Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 2004 ; 350 : 896-903.
 - 24) Nakahashi-Ouchida R, Yuki Y, Kiyono H : Cationic pullulan nanogel as a safe and effective nasal vaccine delivery system for respiratory infectious diseases. *Hum Vaccin Immunother* 2018 ; 14 : 2189-2193.
 - 25) Baldwin AL, Wu NZ, Stein DL : Endothelial surface charge of intestinal mucosal capillaries and its modulation by dextran. *Microvasc Res* 1991 ; 42 : 160-178.
 - 26) Ayame H, Morimoto N, Akiyoshi K : Self-assembled

- cationic nanogels for intracellular protein delivery. *Bioconjug Chem* 2008 ; 19 : 882–890.
- 27) Nochi T, Yuki Y, Takahashi H, et al : Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. *Nat Mater* 2010 ; 9 : 572–578.
- 28) Yuki Y, Kiyono H : Mucosal vaccines: Novel advances in technology and delivery. *Expert Rev Vaccines* 2009 ; 8 : 1083–1097.
- 29) URL: <https://www0.niid.go.jp/niid/idsc/iasr/39/461.pdf>
- 30) McDaniel LS, Scott G, Kearney JF, et al : Monoclonal antibodies against protease-sensitive pneumococcal antigens can protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med* 1984 ; 160 : 386–397.
- 31) McDaniel LS, Yother J, Vijayakumar M, et al : Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). *J Exp Med* 1987 ; 165 : 381–394.
- 32) Kong IG, Sato A, Yuki Y, et al : Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2013 ; 81 : 1625–1634.
- 33) Fukuyama Y, Yuki Y, Katakai Y, et al : Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal Immunol* 2015 ; 8 : 1144–1153.