

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19134

研究課題名(和文) polyI:CによるNALTでのワクチン特異的IgA誘導機構の解明

研究課題名(英文) The mechanisms by which polyI:C enhances IgA production in NALT

研究代表者

有木 宏美(Ariki, Hiromi)

北海道大学・医学研究科・助教

研究者番号：40515061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：予防効果を持つインフルエンザワクチンの開発には、適切なアジュバントの開発が必須である。しかし、アジュバントの抗体産生誘導機構については不明な点が多い。polyI:Cは二本鎖RNA合成アナログであり、IgA産生を強力に誘導するアジュバントである。そこで、polyI:Cの経鼻投与時において、鼻腔関連リンパ組織(nasal-associated lymphoid tissue:NALT)で誘導される免疫応答を中心に解析した。

研究成果の概要(英文)：The development of influenza virus prevention vaccines requires the proper selection of appropriate adjuvants. The mechanism by which poly I:C promotes antibody production has not been fully elucidated. PolyI:C is a synthetic analog for double-stranded RNA and intranasal inoculation with polyI:C strongly enhances IgA production in nasal mucosa. To uncover the mechanisms by which intranasal inoculation with polyI:C enhances IgA production, I investigated immune responses in nasal-associated lymphoid tissue after intranasal vaccination.

研究分野：免疫学

キーワード：TLR3 polyI:C CD103陽性樹状細胞 鼻腔関連リンパ組織

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは毎年世界中で流行し、乳児、高齢者においては死亡者も多数発生する感染症である。インフルエンザの予防にはワクチンが有効とされるが、現行の皮下注射によるワクチンでは血中の IgG を強く誘導し、インフルエンザウイルス感染による重症化を防ぐことに重点が置かれている。しかし、気道粘膜、鼻粘膜における IgA 誘導能は低いため、感染予防効果は弱い一方、経鼻投与ワクチンは鼻粘膜において IgA 産生を誘導し、予防効果が得られる。IgA は交差性があるため、ワクチンに用いた株と流行株が異なった場合でも予防効果を発揮することができる(表1)。現在、欧米で承認済みの経鼻インフルエンザワクチンは低温馴化ウイルスが使われており、高い予防効果がある一方、生ワクチンであるため副作用の点から最も防御されるべき高齢者、妊婦、乳児への接種は認められていない。そのため現行の不活化ワクチンを用いて経鼻投与し、IgA 産生誘導を引き起こす試みがなされている。しかし、不活化ワクチンは抗原性が低いため、単独投与では十分量の抗体産生を誘導できない。

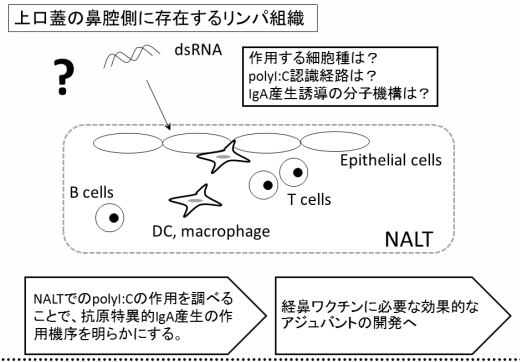
表1 インフルエンザワクチンの特徴

ワクチンの種類	投与経路	誘導される抗体		メリット	デメリット
		IgA	IgG		
スプリットワクチン (不活化、 現行ワクチン)	皮下注射	-	++	重症化防 止効果(+)	予防効果(-) ウイルス交差性(-)
低温馴化生ワクチン (日本未承認)	経鼻投与	++	++	感染予防効果 (+) ウイルス交差性 (+)	接種可能年齢2-49歳 生ワクチンである
スプリットワクチン	経鼻投与	++	++	感染予防効果あり ウイルス交差性あり	アジュバントが必要

スプリットワクチンを経鼻投与することで感染予防効果とウイルス交差性をもつIgA抗体の産生を誘導できる
→ただし、スプリットワクチンは抗原性が低いいためアジュバントが必要となる。

二本鎖 RNA の合成アナログである polyI:C や polyI:C12U(Ampligen)をアジュバントとしてワクチンと共に経鼻投与すると、予防効果を発揮するのに十分なIgA産生が誘導される。しかしながら polyI:C による IgA 産生誘導の分子機構は明らかとなっていない。鼻粘膜には鼻腔関連リンパ組織(nasal-associated lymphoid tissue: NALT)があり、口腔粘膜の免疫応答の場とされている(図1)。しかしながら、近年、飛躍的に研究が進んでいる腸管での粘膜免疫に比べて、NALTでの粘膜免疫応答はほとんど解析されていない。今後、予防を目的とした経鼻、経口ワクチンの開発において、NALTでの免疫機構の解明は非常に重要な課題となる。そこで本研究では polyI:C による NALT でのワクチン特異的 IgA 誘導機構を解明することを目的とする。本研究が達成されれば、今後経鼻ワクチンの重要性が増すとともに必要となってくるアジュバント開発に大いに寄与することができる。

図1. 鼻腔関連リンパ組織 Nasal associated lymphoid tissue(NALT)



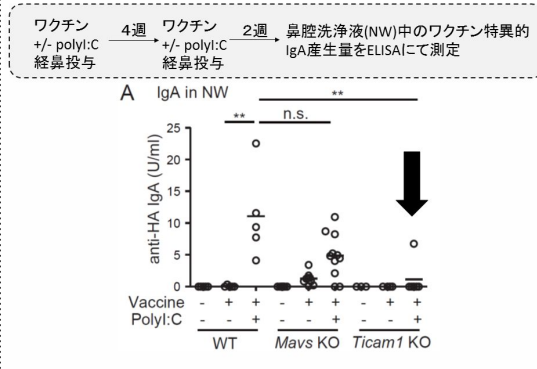
2. 研究の目的

野生型マウスにワクチンと polyI:C をともに投与すると、鼻洗浄液における抗原特異的 IgA 及び血中の IgG の産生増強が観察された(図2)。polyI:C の作用機構を明らかにするために polyI:C の認識(TLR3-TICAM1 経路と RIG-I/MDA5-MAVS 経路)に關与する TICAM1 と MAVS 欠損マウスを用いて抗原特異的抗体産生能を比較したところ、polyI:C による抗体産生増強は TLR3-TICAM1 経路に依存することが示唆された(図2)。NALTでのTLR3の発現はある細胞群に局限しており、このTLR3発現細胞群を欠くKOマウスではpolyI:CによるIgA産生増強は減弱していた。そこで今後はこのTLR3を発現している細胞群に着目し、TLR3-TICAM1経路が抗体産生を増強させる分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

野生型マウスにワクチンと polyI:C をともに投与すると、鼻洗浄液における抗原特異的 IgA 及び血中の IgG の産生増強が観察された(図2)。polyI:C の作用機構を明らかにするために polyI:C の認識(TLR3-TICAM1 経路と RIG-I/MDA5-MAVS 経路)に關与する TICAM1 と MAVS 欠損マウスを用いて抗原特異的抗体産生能を比較したところ、polyI:C による抗体産生増強は TLR3-TICAM1 経路に依存することが示唆された(図2)。NALTでのTLR3の発現はある細胞群に局限しており、このTLR3発現細胞群を欠くKOマウスではpolyI:CによるIgA産生増強は減弱して

図2. KOマウスにおけるpolyI:Cによる抗原特異的抗体産生への影響



いた。そこで今後はこの TLR3 を発現している細胞群に着目し、TLR3-TICAM1 経路が抗体産生を増強させる分子メカニズムを明らかにする。

(1) in vivo での polyI:C 取り込み細胞の同定
polyI:C を経鼻投与し、組織染色によって取り込み細胞を同定した。

(2) TLR3 シグナルによって発現誘導される分子の同定

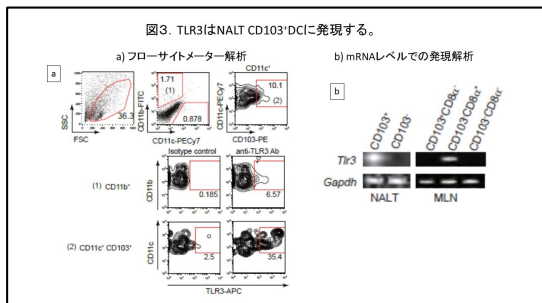
経鼻投与後、NALT において TLR3 依存的に発現誘導される分子を同定し、抗体産生誘導への寄与について、検討を行った。

(3) polyI:C 投与時の免疫細胞の活性化状況についての検討

経鼻投与後、NALT での免疫細胞の活性化状態をフローサイトメーターを用いて検討した。

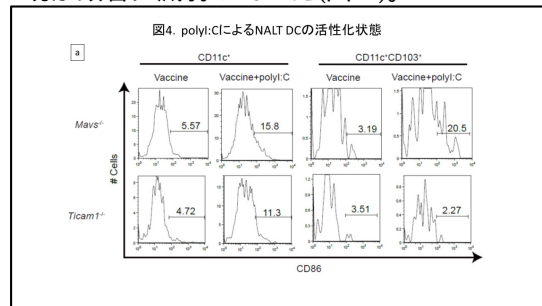
4. 研究成果

これまでの研究より、polyI:C のアジュバント作用は TLR3-TICAM1 経路に依存していたことから、NALT において TLR3 を発現している細胞を同定することとした。抗 TLR3 抗体を用いて、フローサイトメーター解析を行ったところ、CD103 を発現する樹状細胞 (dendritic cells: DCs) に TLR3 が高発現していた (図 3)。

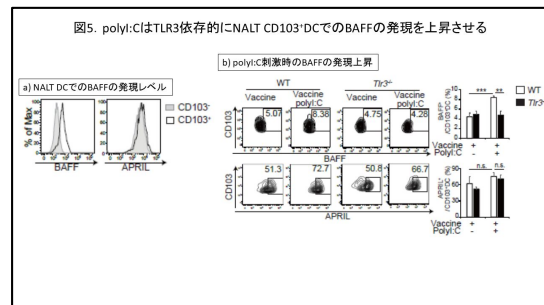


さらに、 $\gamma\delta$ T 細胞にも TLR3 の発現が見られた。次にこれらの細胞が経鼻投与された polyI:C を取り込むかについて検討を行った。Rhodamin-labeled polyI:C を経鼻投与し、経時的に NALT を採取し、組織染色を行ったところ、CD103⁺ DC と polyI:C が共局在し、TLR3 とも共局在した。以上のことから経鼻投与した polyI:C は NALT に存在する TLR3 陽性 CD103 陽性 DC に取り込まれることが明らかとなった。次に polyI:C による免疫細胞の活性化状態を検討した。polyI:C を経鼻投与し、24 時間後に NALT での DC, B 細胞, T 細胞の活性化状態をフローサイトメーターで解析を行った。polyI:C 投与によって DC, B 細胞の活性化は観察されたが、T 細胞はほとんど活性化していなかった。ノックアウトマウスを使用した実験から、DC の活性化は TLR3 依存的であり、特に CD103 陽性 DC

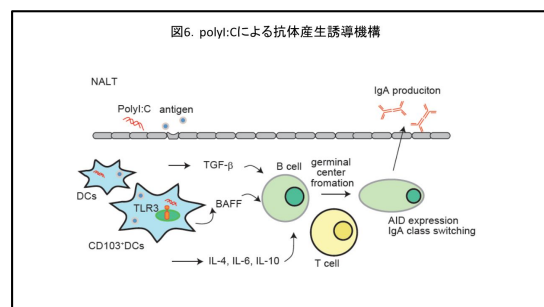
では TLR3 KO マウスで活性化マーカーの発現が顕著に減弱していた(図 4)。



DC に発現し、IgA クラススイッチを促進する分子として B cell activating factor (BAFF) や A proliferation-inducing ligand (APRIL) が知られている。そこで、これらの分子の発現を CD103⁺DC で検討したところ、BAFF が高発現していることが明らかとなった。さらに、polyI:C 刺激によって TLR3 依存的に BAFF の発現が上昇することが示された (図 5)。



以上の結果より、アジュバントである polyI:C は 1) NALT に存在する CD103⁺ DC の TLR3 依存的に BAFF の発現を誘導し、2) B 細胞に TGF- β シグナルを伝達させ、3) B 細胞において IgA クラススイッチを促進することが明らかとなった (図 6)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

1. Tumors unresponsive to PD-1/L1 blockade require safe adjuvant for therapeutic merit in vaccine immunotherapy. Seya T., Shime H., Takeda Y., Takashima K., Takaki H., Matsumoto M.

Vaccines 2018 (In press) (査読有り)

2. Mucosal immune response in nasal-associated lymphoid tissue upon intranasal administration by adjuvants. Takaki H*, Ichimiya S, Matsumoto M., Seya T*. * Corresponding author

Journal of Innate Immunity 2018 (In press) (査読有り)

3. Toll-like receptor 3 in nasal CD103+ dendritic cells is involved in immunoglobulin A production.

Takaki H*, Kure S, Oshiumi H, Sakoda Y, Suzuki T, Ainai A, Hasegawa H, Matsumoto M, Seya T*.

Mucosal Immunology, 2018, 11:82-96 * Corresponding author (査読有り)

4. cGAMP promotes germinal center formation and production of IgA in nasal-associated lymphoid tissue.

Takaki H*, Takashima K, Matsumoto M, Seya T*.

Medical Science (Basel) 2017, 5:E35 * Corresponding author (査読有り)

5. TLR3/TICAM-1 signal constitutively controls spontaneous polyposis through suppression of c-Myc in ApcMin/+ mice.

Ono J, Shime H, Takaki H, Takashima K, Funami K, Yoshida S, Takeda Y, Matsumoto M, Kasahara M, Seya T. *Journal of Biomedical Science* 2017 (in press)

6. Development of mouse models for analysis of human virus infections.

Takaki H*, Oshiumi H, Shingai M, Matsumoto M, Seya T*. * Corresponding author

Microbiol Immunol. 2017, 61:107-113. (査読有り)

7. The Anti-Oxidant Ergothioneine Augments the Immunomodulatory Function of TLR Agonists by Direct Action on Macrophages.

Yoshida S, Shime H, Funami K, Takaki H, Matsumoto M, Kasahara M, Seya T.

PLoS One. 2017, 12:e0169360. (査読有り)

8. Interferon-stimulated gene of 20 kDa protein (ISG20) degrades RNA of hepatitis B virus to impede the replication of HBV in vitro and in vivo.

Leong CR, Funami K, Oshiumi H, Mengao D, Takaki H, Matsumoto M, Aly HH, Watashi K, Chayama K, Seya T. *Oncotarget.* 2016, 7:68179-68193. (査読有り)

9. Cytokine responses to eye spray adjuvants for enhancing vaccine-induced immunity in chickens.

Takaki H, Sato H, Kurata R, Hikono H, Hiono

T, Kida H, Matsumoto M, Saito T, Seya T. *Microbiol Immunol.* 2016, 60:511-515. (査読有り)

〔学会発表〕(計1件)

1. Hiromi Takaki, Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya

PolyI:C-induced, TLR3/RIP3-dependent necroptosis backs up immune effector-mediated tumor elimination in vivo.

第44回日本免疫学会学術総会、札幌コンベンションセンター、2016年11月18-20日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有木(高木) 宏美 (TAKAKI, Hiromi)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号: 40515061

(2) 研究分担者