

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：平成 22 年度～平成 23 年度

課題番号：21390152

研究課題名（和文）ワクチントラフィックとシグナル伝達

研究課題名（英文）Intra- and inter-cellular vaccine-induced signaling pathways

研究代表者

石井 健（ISHII KEN）

独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号：00448086

研究成果の概要（和文）：

インフルエンザワクチンと一口に言ってもその形態によって弱毒化生ワクチン、不活化全粒子ワクチン、不活化スプリットワクチンの 3 種類に分類されるが、ウイルス感染免疫の研究に比べ各ワクチンによる免疫学的作用機序に関する詳細な検討はなされていなかった。今回、マウス、ヒト両方の実験系を用いて、スプリットワクチンでは自然免疫の活性化がほとんど見られないが、同じ不活化ワクチンでも、全粒子ワクチンでは、中のウイルスゲノム（RNA）が TLR7 を活性化して、高い免疫原性（抗原特異的 CD4T 細胞、B 細胞誘導能）を発揮することを示した。その効果に形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid DC; pDC)が必須で、TLR7 による I 型インターフェロンを介していること、生ワクチンはさらに RLR,NLR でもない未知の自然免疫シグナルを誘導することを示した（Koyama S et al Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med.* 2(25):25ra24. (2010)）。

次に、臨床でもっとも長く、そして頻繁に用いられているアラムアジュバント（ミョウバン）の自然免疫メカニズムの一端として、アラムが、好中球遊走、その好中球の細胞死、そして DNA を主成分とするネット状物質（neutrophil extracellular traps (NETs)）を放出させることを明らかにした。そしてその DNA がアラムのアジュバント効果、特に IgE の産生に重要で、炎症性樹状細胞（inflammatory DC）といわれる抗原提示細胞の細胞内 DNA 認識機構を介していることが明らかになった。実際 TBK1、IRF3 欠損マウスではアラムのアジュバント効果の一部が著名に減弱していた（Marichal T, et al DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med.* 2011 17(8):996-1002.）。

このようにアジュバント（因子）の分子メカニズムを免疫学的に明らかにできるようになり、ワクチンやアジュバントの開発研究において、その有効性や安全性の向上に寄与できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

Optimal vaccine efficacy requires not only a protective antigen, but also a strong immune activator as an adjuvant. Most viral vaccines, such as influenza vaccines and non-viral genetic vaccines (e.g., DNA vaccines), contain nucleic acids, which appear to act as essential “built-in” adjuvants. Specific receptors, including toll-like receptors (TLR), retinoic-acid-inducible protein I (RIG-I)-like receptors (RLR), and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLR), can detect specific nucleic acid patterns, such as sequence, structure and modification, which are also influenced by the immunized tissue, cell type, and intracellular localization. The resultant immune activation is uniquely regulated by intra- and inter-cellular signaling pathways, which are indispensable for the ensuing vaccine immunogenicity, such as antigen-specific T- and B-cell responses.

A variety of vaccine compositions for H1N1 influenza A virus infections are available; however, the key innate immune mechanisms controlling their immunogenicity remain unclear. Here we identified that plasmacytoid dendritic cells (pDC) and their type-I IFN-mediated intra- and inter-cellular signalling were essential for the induction of virus specific CD4 T and B cells following killed virion vaccination. While Toll-like receptor (TLR) 7, but not RIG-I-like- or NOD-like-receptors, mediated immunogenicity of both live and killed virion vaccines, a commonly used split vaccine failed to activate TLR7, resulting in no efficacy in naïve mice. pDC-activating adjuvant restored split vaccine immunogenicity in mice, but split vaccine alone was sufficient to recall memory responses in humans, underscoring the importance of the pDC-TLR7/9-type-I axis for priming, but not secondary immunization.

Aluminum-based adjuvants (alum) are widely used in human vaccination, although little is understood of their mechanisms of action. Here, we report that, in mice, alum causes the release of host cell DNA, which acts as a potent endogenous immunostimulatory signal mediating alum adjuvant activity. Furthermore, we show that host DNA signaling differentially regulates IgE and IgG1 production upon alum immunization. Indeed, we show support that host DNA induces primary B cell responses, including IgG1 production, through IRF-3 independent mechanisms, and inflammatory 'canonical' type 2 T cell responses associated with IgE isotype switching and effector tissue responses through IRF-3 dependent mechanisms. The finding that host cell DNA is a damage-associated molecular pattern relaying alum adjuvant activity may thus help in the comprehension of the mechanisms of action of current vaccines and in the design of novel adjuvants.

1. Aoshi T et al. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Curr Opin Virol*.2011, 1(4):226-232.
2. Marichal T et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat. Med*. 2011 17(8):996-1002
3. Koyama S, et al. Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med*. 2010 2(25):25ra24.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
平成 23 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
年度			
総計	9,200,000	2,760,000	11,960,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：6913

キーワード：ワクチン、アジュバント、自然免疫、インフルエンザ、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ワクチンは現存する医療技術の中で、その起源が最も古く、かつ有効なもののひとつであるが、近年の免疫学の発展と、遺伝子組み換え技術などの技術革新によって、より戦略的なワクチン設計が可能になってきている。

2. 研究の目的

本研究は1) ワクチンによって活性化される自然免疫受容体を介した細胞内、細胞間シグナル伝達(ワクチンシグナル)の分子レベルでの全容解明を目指し、さらに2) 生体内レベルでのワクチンのカイネティクス、取り込み、提示やエフェクター機構を細胞レベルで追跡(ワクチントラフィッキング)、また操作可能になることにより、多くの感染症、各種免疫疾患にも応用可能な次世代ワクチン開発への分子基盤を形成することを目的とする。

3. 研究の方法

「ワクチンシグナル」の解明の具体的な計画として、まず、市販のものを含めたインフルエンザワクチンを用いた In vitro, In vivo の実験を遂行する予定である。その理由として、インフルエンザウイルスの感染メカニズム、病態、獲得免疫の誘導メカニズムが明らかになってきたのはこの数年で、市販の物を含めたインフルエンザワクチンの自然免疫「ワクチンシグナル」や、ワクチンの免疫原性誘導のメカニズムはいまだに不明な点が多々あることが挙げられる。したがって、これらのメカニズムを「シグナル」の観点で、マウスを実験モデルとし、免疫学的、分子生物学的な手法を用いて解明する。

4. 研究成果

インフルエンザワクチンと一口に言ってもその形態によって弱毒化生ワクチン、不活化全粒子ワクチン、不活化スプリットワクチンの3種類に分類されるが、ウイルス感染免疫の研究に比べ各ワクチンによる免疫学的作用機序に関する詳細な検討はなされていなかった。今回、マウス、ヒト両方の実験系を用いて、スプリットワクチンでは自然免疫の活性化がほとんど見られないが、同じ不活化ワクチンでも、全粒子ワクチンでは、中のウイルスゲノム(RNA)がTLR7を活性化して、高い免疫原性(抗原特異的CD4T細胞、B細胞誘導能)を発揮することを示した。その効果に形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid DC;

pDC)が必須で、TLR7によるI型インターフェロンを介していること、生ワクチンはさらにRLR, NLRでもない未知の自然免疫シグナルを誘導することを示した(Koyama S et al Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med.* 2(25):25ra24. (2010))。

次に、臨床でもっとも長く、そして頻繁に用いられているアラムアジュバント(ミョウバン)の自然免疫メカニズムの一端として、アラムが、好中球遊走、その好中球の細胞死、そしてDNAを主成分とするネット状物質(neutrophil extracellular traps (NETs))を放出させることを明らかにした。そしてそのDNAがアラムのアジュバント効果、特にIgEの産生に重要で、炎症性樹状細胞(inflammatory DC)といわれる抗原提示細胞の細胞内DNA認識機構を介していることが明らかになった。実際TBK1、IRF3欠損マウスではアラムのアジュバント効果の一部が著名に減弱していた(Marichal T, et al DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med.* 2011 17(8):996-1002.)。

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3件)

1. Aoshi T, Koyama S, Kobiyama K, Akira S, Ishii KJ. "Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination." *Curr Opin Virol.* 1 (4) 2011, 226-32 (DOI 10.1016/j.coviro.2011.07.002)

2. Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, Kumagai Y, Kobiyama K, Tougan T, Sakurai K, Coban C, Horii T, Akira S, Ishii KJ. "Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes." *Sci Transl Med.* 2 2010 25ra24. DOI 10.1126/scitranslmed.3000759

3. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, Lekeux P, Coban C, Akira S, Ishii KJ, Bureau F, Desmet CJ. "DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity."

Nat Med 17 (8) 2011 996-1002
DOI 10.1038/nm.2403.

〔学会発表〕 (計 1 件)

Ishii KJ “Endo-and Exogenous Adjuvant
for Influenza Vaccination” Keystone
Symposia Pathogenesis of Influenza:
Virus-Host Interactions 5/26/2011 Hong
Kong

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 ()

研究者番号：

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：