

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 29 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791035

研究課題名(和文) TLR3リガンドによる分泌型IgA抗体誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanism for secretory IgA antibody induction by TLR3 ligand

研究代表者

相内 章 (Ainai, Akira)

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官

研究者番号：10572133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：経鼻インフルエンザワクチンにおいて、合成二本鎖RNAには、分泌型IgA抗体を誘導する高い粘膜アジュバント活性があることが知られている。インフルエンザウイルスの感染時にはウイルスゲノムがTLR7に認識されることから、TLR7リガンドも粘膜アジュバントになりうると考えた。しかしながら、TLR7リガンドの粘膜アジュバント活性は、合成二本鎖RNAの活性に満たないことが明らかになった。合成二本鎖RNAによる分泌型IgA抗体誘導機構を明らかにすることを目的として、研究を継続中である。

研究成果の概要(英文)：Synthetic double-stranded RNAs, TLR3 agonists, are known to be mucosal adjuvant to induce virus-specific secretory IgA antibodies in intranasal vaccination against influenza virus infection. On the other hand, TLR7 agonists may be mucosal adjuvants for intranasal vaccination, since influenza viral RNAs are recognized by TLR7 in a natural infection with influenza virus. However, mucosal adjuvant activities of TLR7 agonists were inferior to those of TLR3 agonists. At present, the mechanism for secretory IgA antibody induction by synthetic double-stranded RNAs as mucosal adjuvants is continuously investigated.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：合成二本鎖RNA アジュバント 経鼻インフルエンザワクチン 感染症

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスの自然感染を模倣する経鼻インフルエンザワクチンは、気道粘膜上に分泌型 IgA 抗体を誘導し感染自体を防御することから、有効なワクチン接種法として期待されている。不活化ワクチンを抗原として用いる場合には、ワクチンの免疫原性を増強し免疫応答を誘導する物質であるアジュバントの添加が効果的であり、これまでの研究から合成二本鎖 RNA が高い粘膜アジュバント活性を示すことが明らかにされている。自然免疫系における病原体認識機構の解明により、アジュバント活性を有する物質が自然免疫担当細胞を活性化するメカニズムが明らかになりつつある。しかしながら、合成二本鎖 RNA が粘膜アジュバントとして分泌型 IgA 抗体を誘導する作用機序は、明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、経鼻インフルエンザワクチンにおける合成二本鎖 RNA の粘膜アジュバント活性がどのようにもたらされるのか、合成二本鎖 RNA の受容体である TLR3 を発現する CD8 陽性樹状細胞に注目し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

経鼻インフルエンザワクチンの接種部位は鼻腔内となるため、鼻腔領域内の CD8 陽性樹状細胞を用いた解析を試みたが、回収できる細胞数が極めて少なく十分な解析を行うことができなかった。そのため、上述の目的に加えて、インフルエンザウイルス感染時にそのウイルスゲノムを認識する TLR7 のリガンドに、合成二本鎖 RNA 同様の粘膜アジュバント活性が認められるか検討することを新たな目的として追加した。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 経鼻インフルエンザワクチンにおける粘膜アジュバント活性の検討

BALB/c マウス 1 匹あたり、A/PR8 HA ワクチン 1 µg に対して TLR3 のリガンドである Poly(I:C)、TLR7 のリガンドである Imiquimod あるいはその他の候補化合物を 10、1 µg ずつの混合し、片鼻 6 µl (両鼻で計 12 µL) で滴下し、ワクチンの経鼻接種を行った。初回のワクチン接種から 3 週間後に同様のワクチン接種を行った。2 回目のワクチン接種から、2 週後に 1,000 plaque forming unit (pfu) のウイルスを滴下し上気道感染を行った (片鼻 2 µl ずつ、計 1,000 pfu/4 µl)。感染 3 日後に、安楽殺のうえ血清と鼻腔洗浄液の回収を行った。鼻腔洗浄液は、1% BSA を含む PBS(-) 1 ml で上気道を繰り返し 3 回洗浄することで回収した。鼻腔洗浄液中のウイルス価をブランクアッセイで測定した。また、血清中 IgG 抗体応答および鼻腔洗浄液中 IgA 抗体応答は、A/PR8 HA に対する ELISA により測定した。

マウスは、6~8 週齢の BALB/c マウス雌を一群 5 匹で利用した。動物への処置は国立

感染症研究所の定める動物実験実施規定に則り、苦痛を与えないように考慮した。

### 3-2. in vitro における樹状細胞の誘導

マウス大腿骨・頸骨から骨髓細胞を回収し、GM-CSF あるいは Flt3-Ligand の存在化で樹状細胞を誘導した。

### 3-3. 各組織における樹状細胞の単離・精製

マウスの上気道粘膜領域、あるいは脾臓から Collagenase A ならびに DNaseI 存在下で、細胞懸濁液を調整した。その後、磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて、CD4 陽性あるいは CD8 陽性の樹状細胞を精製した。

### 3-4. フローサイトメーターを用いた樹状細胞の評価

誘導あるいは単離・精製した樹状細胞に関して、抗 CD11c 抗体 (N418)、抗 CD45R 抗体 (RA3-6B2)、抗 CD3 抗体 (145-2C11)、抗 CD4 抗体 (RM4-5) および抗 CD8 抗体 (53-6.7) を用いて蛍光染色し、FACS Canto2 (BD) を用いて形質細胞様樹状細胞、CD4 あるいは CD8 陽性樹状細胞の割合を評価した。

### 3-5. 樹状細胞に対する合成二本鎖 RNA 刺激

誘導あるいは単離・精製した樹状細胞に対して、合成二本鎖 RNA Poly(I:C) を 10、1 あるいは 0.1 µg で添加し、培養後の上清を回収した。培養上清中の IFN-λ の量を ELISA (eBioscience) にて測定した。

## 4. 研究成果

TLR3 リガンドである合成二本鎖 RNA は、経鼻インフルエンザワクチンに粘膜アジュバントとして添加した時に、分泌型 IgA 抗体を強く誘導し感染を防ぐことが明らかになっている。インフルエンザウイルス感染時のウイルス複製の際に生じると考えられる二本鎖 RNA を模倣することで、このアジュバント活性がもたらされると考えた。またインフルエンザウイルスの感染の際には、そのウイルスゲノムが TLR7 に認識されることから、TLR7 リガンドも経鼻インフルエンザワクチンの粘膜アジュバントになりうる。そこで、既に検討済みであった Imiquimod に加えて、その他の TLR7 リガンド化合物の粘膜アジュバント活性を検討した。TLR7 リガンドも分泌型 IgA 抗体を誘導するものの、合成二本鎖 RNA Poly(I:C) と比較すると、分泌型 IgA 抗体誘導能つまり粘膜アジュバント活性は極めて弱いことが明らかになった。このことから、合成二本鎖 RNA 特異的に粘膜アジュバント活性を発揮する作用機序が存在すると考えられた。

粘膜アジュバントとして添加された合成二本鎖 RNA が、分泌型 IgA 抗体を誘導する作用機序は明らかになっていないため、受容体となる TLR3 を発現するとされる CD8 陽性樹状細胞が、鼻腔粘膜領域において果たす役割を明らかにすることを試みた。しかしながら、鼻腔領域内に存在する樹状細胞自体が極

めて少なかったことから、鼻腔領域内に存在する CD8 陽性樹状細胞を解析することは不可能であると判断した。そこで、in vitro で誘導した樹状細胞、あるいは脾臓から単離・精製した CD8 陽性樹状細胞を用いることとした。in vitro において誘導した樹状細胞には CD8 陽性の細胞群が認められなかったものの、脾臓からは CD8 陽性樹状細胞を単離・精製することができた。合成二本鎖 RNA 刺激によるサイトカイン応答を測定したところ、これまでの報告どおり IFN- $\gamma$  を発現することを確認した。

本研究では、標的とする鼻腔粘膜領域内に存在する CD8 陽性樹状細胞を解析することができなかった。解決策を模索したものの、当初の計画通り十分な実験を遂行することができなかった。改めて解析手段を見直し、今後も本研究を継続したい。

## 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5件)

- (1) Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Odagiri T, Tashiro M, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine. *J Med Virol.* 2012 Feb;84(2):336-44.
- (2) van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design. *Vaccine.* 2012 Aug 31;30(40):5893-900.
- (3) Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M, Sugiyama M, Fukuda Y, Ohta T, Sato K, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H, Toyama-Sorimachi N, Kohara H, Nagasawa T, Kaisho T. Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood.* 2012 Dec 6;120(24):4733-43.
- (4) Okada S, Hasegawa S, Hasegawa H, Ainai A, Atsuta R, Ikemoto K, Sasaki K, Toda S, Shirabe K, Takahara M, Harada S, Morishima T, Ichiyama T. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in a mouse model of bronchial asthma and H1N1 2009 infection. *Cytokine.* 2013 Aug;63(2):194-200.
- (5) Ainai A, Tamura S, Suzuki T, van Riet E, Ito R, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal vaccination with an inactivated whole influenza virus vaccine induces strong antibody responses

in serum and nasal mucus of healthy adults. *Hum Vaccin Immunother.* 2013 Sep;9(9):1962-70.

[学会発表](計23件)

- (1) 山本典生、浅沼秀樹、佐藤佳代子、中内美奈、高橋仁、許斐奈美、相内章、長谷川秀樹、田代真人 「細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響」 第60回日本ウイルス学会学会学術集会、2012年11月、大阪
- (2) 川口晶、鈴木忠樹、相内章、佐藤由子、信澤枝里、田代真人、長谷川秀樹 「喘息発作誘発モデルを用いたインフルエンザウイルス感染症の病態解析」 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪
- (3) 池田千将、伊藤良、相内章、鈴木忠樹、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹 「基礎免疫を有する個体に対する経鼻投与型インフルエンザワクチン効果」 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪
- (4) 泉地恭輔、相内章、鈴木忠樹、浅沼秀樹、長谷川秀樹 「経鼻投与型インフルエンザワクチンによるマウス母子免疫の解析」 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月、大阪
- (5) 鈴木忠樹、川口晶、相内章、田村慎一、伊藤良、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹 「インフルエンザワクチン経鼻接種により鼻腔内に誘導される分泌型IgA抗体の性状解析」 第16回日本ワクチン学会学術集会、2012年11月、横浜
- (6) 相内章、池田千将、伊藤良、鈴木忠樹、泉地恭輔、田村慎一、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹 「感染あるいはワクチン接種歴が経鼻投与型インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に対して与える影響」 第16回日本ワクチン学会学術集会、2012年11月、横浜
- (7) van Riet E, Ainai A, Ito R, Senchi K, Suzuki T, Tamura S, Tashiro M, Hasegawa H. Characteristics of IgA versus IgG human monoclonal antibodies cloned from human plasma cells induced upon intranasal H5N1 vaccination. 第16回日本ワクチン学会学術集会、2012年11月、横浜
- (8) Hasegawa H, Ainai A, Suzuki T, Tamura S, Tashiro M, Kurata T. Analysis of protective immune responses after intranasal administration of an inactivated whole-virion influenza vaccine in human. 第16回日本ワクチン学会学術集会、2012年11月、横浜

- (9) 浅沼秀樹、**相内章**、佐藤佳代子、許斐奈美、岸田典子、長谷川秀樹、山本典生、田代真人 「野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討」 第16回日本ワクチン学会学術集会、2012年11月、横浜
- (10) **Ainai A**, van Riet E, Tamura S, Suzuki T, Kawaguchi A, Ito R, Ikeda K, Senchi K, Asanuma H, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T, Hasegawa H. Antibody responses in serum and nasal mucus induced by the intranasal vaccination with a whole-virion inactivated vaccine of A(H5N1) virus in healthy human adults. 7<sup>th</sup> Vaccine & ISV, Oct 2013, Barcelona, Spain
- (11) Suzuki T, Kawaguchi A, **Ainai A**, Tamura S, Ito R, Tashiro M, Hasegawa H. Impact of the quaternary structure of human secretory-IgA on viral neutralization activity in upper respiratory tract. 7<sup>th</sup> Vaccine & ISV, Oct 2013, Barcelona, Spain
- (12) 泉地恭輔、**相内章**、鈴木忠樹、浅沼秀樹、梁明秀、長谷川秀樹 「母子免疫によるインフルエンザウイルス感染防御効果の解析」 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
- (13) 池田千将、伊藤良、**相内章**、鈴木忠樹、田村慎一、荒尾雄二郎、田代真人、浅沼秀樹、長谷川秀樹 「経鼻インフルエンザワクチンで誘導される抗体応答に基礎免疫が与える影響」 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
- (14) **相内章**、浅沼秀樹、鈴木忠樹、原田勇一、田村慎一、田代真人、長谷川秀樹 「経鼻インフルエンザワクチンにおけるワクチンの組み合わせが抗体応答に与える影響」 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
- (15) 川口晶、鈴木忠樹、**相内章**、佐藤由子、永田典代、田代真人、長谷川秀樹 「Nc/Nga マウスを用いた喘息発作によるインフルエンザ感染症重症化モデルの作製」 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
- (16) 原田勇一、中村一哉、浜本いつき、浅沼秀樹、**相内章**、田代真人、奥野良信、山本典夫 「マウスにおける細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析」 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
- (17) 長谷川秀樹、**相内章**、田村慎一、鈴木忠樹、浅沼秀樹、小田切孝人、田代真人、倉田 毅 「高病原性鳥インフルエンザウイルス A(H5N1)全粒子不活化ワクチンを用いた経鼻インフルエンザワクチンの効果」 第17回日本ワクチン学会学術集会、2013年12月、津
- (18) 鈴木忠樹、川口晶、**相内章**、田村慎一、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹 「経鼻インフルエンザワクチンにより鼻腔粘膜上に誘導される多量体 IgA 抗体のウイルス感染防御における役割」 第17回日本ワクチン学会学術集会、2013年12月、津
- (19) **相内章**、田村慎一、鈴木忠樹、小田切孝人、田代真人、倉田毅、長谷川秀樹 「経鼻インフルエンザワクチンにより誘導される抗体応答に年齢、性別あるいは副反応が与える影響」 第17回日本ワクチン学会学術集会、2013年12月、津
- (20) 原田勇一、中村一哉、浜本いつき、榎本匡志、浅沼秀樹、**相内章**、田代真人、山本典生 「マウスモデルを用いた細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析」 第17回日本ワクチン学会学術集会、2013年12月、津
- (21) Hasegawa H, **Ainai A**, Suzuki T, van Riet E, Tamura S, Ikeda K, Odagiri T, Tashiro M, Kurata T. Antibody responses in serum and nasal mucus induced by the intranasal vaccination with a whole-virion inactivated vaccine of A(H5N1) virus in healthy naïve human adults. Keystone Symposia 2014, Jan 2014, CO, USA
- (22) Suzuki T, Kawaguchi A, **Ainai A**, Tamura S, Ito R, Tashiro M, Hasegawa H. Impact of the quaternary structure of human Secretory-IgA on neutralization potency to Influenza A virus in upper respiratory tract. Keystone Symposia 2014, Jan 2014, CO, USA
- (23) Ikeda K, Ito R, **Ainai A**, Suzuki T, Tamura S, Arao Y, Tashiro M, Asanuma H, Hasegawa H. Antibody responses induced by intranasal vaccination of a whole inactivated influenza virus in mice previously infected or vaccinated. Keystone Symposia 2014, Jan 2014, CO, USA
- 〔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  
相内章(AINAI AKIRA)  
国立感染症研究所・インフルエンザウイル

ス研究センター・主任研究官  
研究者番号：10572133

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし