

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19390139
 研究課題名（和文） 核酸をベースとしたワクチン免疫源性誘導メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Mechanism of nucleic acid-based vaccine immunogenicity

研究代表者
 石井 健（ISHII KEN）
 大阪大学・微生物病研究所・准教授
 研究者番号：00448086

研究成果の概要：

本研究はDNAワクチンなどの核酸をベースとした免疫療法において、今まで知られていたTLR9を介したDNAの自然免疫反応やその後の獲得免疫などを含めた生体の防御反応にと比較して各々がどのような役割を担っているかを解明することを目的としている。

ワクチンの効果にはアジュバントになる分子または因子が必須であることが知られている。DNA ワクチンに関しては、プラスミドに存在する CpG モチーフという特殊な DNA 配列が Toll-like receptor 9 (TLR9) に認識されて起こる自然免疫の活性化がアジュバント効果を担っていると考えられていた。しかし、今回の研究でそのアジュバントの因子とは、CpG などの配列ではなく、DNA の右巻きの二重らせん構造（B-form DNA）であり、それが TLR9 を「介さずに」、細胞内で Tank-Binding Kinase 1 (TBK1) という酵素（シグナル伝達分子）が活性化されることで DNA ワクチンの効果が誘導されていることを遺伝子欠損マウスを使った実験で突き止めた。

さらに、骨髄移植の実験を用い、細胞ごとの TBK1 の役割を検討した結果①DNA ワクチンによる CD4T 細胞、B 細胞（抗体）の誘導には樹状細胞などの免疫細胞での TBK1 依存性の自然免疫活性化経路が重要であること、②細胞性免疫誘導のためには DNA が主に取り込まれる筋肉細胞などにおける、TBK1 依存性の自然免疫活性化シグナルが重要であることなどが明らかになった。最後に、最近 TLR に依存しない DNA のセンサー分子として発表された DAI（ZBP1）という分子の遺伝子欠損マウスを作製し、同様に DNA ワクチンを投与したが、TLR に依存しない DNA (B-DNA、DNA ワクチン) の認識に DAI は必須ではないことが判明、さらに未知の受容体分子の存在が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2008 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	3,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：ワクチン、アジュバント、DNA、TLR、樹状細胞、抗原提示

1. 研究開始当初の背景

免疫システムが核酸を認識し感染症や自己免疫疾患において重要な役割を担っていることが明らかになりつつある (Ishii and Akira Trends In Immunol. 2006 27:525-532)。応募者らは最近 TLR 非依存性に抗ウイルス作用を特徴とする自然免疫賦活化作用を持つ二本鎖 B 型 (右巻き螺旋) DNA の同定とその新規のシグナル伝達経路を解明したが (Ishii et al Nat. Immunol. 2006 7:40-4)、DNA ワクチンなどの核酸をベースとした免疫療法において、今まで知られていた TLR9 を介した DNA の自然免疫反応やその後の獲得免疫などを含めた生体の防御反応にと比較して各々がどのような役割を担っているかを解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は DNA ワクチンなどの核酸をベースとした免疫療法において、今まで知られていた TLR9 を介した DNA の自然免疫反応やその後の獲得免疫などを含めた生体の防御反応にと比較して各々がどのような役割を担っているかを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

まず、In vitro の実験系として、プラスミド DNA による樹状細胞などの抗原提示細胞を野生型、TBK1 欠損マウス由来の細胞を比較することにより、樹状細胞の成熟、活性化を検討する。In vivo の実験系として、DNA ワクチンには Beta-ガラクトシダーゼ蛋白をコードしたものをを用い、野生型、TBK1 欠損マウスに 100mg を 2 回免疫した後液性免疫の指標として抗原特異的 IgG (サブタイプ) の血中濃度、細胞性免疫の指標として抗原特異的 CD4 陽性ヘルパー T 細胞の IFN γ 産生、抗原特異的細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞の定量 (テトラマーアッセイ)、定性 (CTL アッセイ) を行う。また、DNA は筋肉にエレクトロポレーションにて投与するため、トランスフェクトされると予想される筋肉細胞や繊維芽細胞などの非免疫細胞の自然免疫活性化と、組織や血中に存在する樹状細胞などの抗原提示細胞の活性化のどちらが獲得免疫に重要な役割を担うか検証する必要がある。これは TLR9 が樹状細胞など免疫細胞に発現は限局しているのに対し、二重鎖 B 型 DNA による TLR 非依存性の自然免疫活性化はユビキタスであり、繊維芽細胞、筋肉細胞など

の非免疫細胞にも起こるという知見 (Ishii et al. Trends Immunol. 2006 27, 525-532) による。さらにこの実験により、ウイルス感染やそれを模倣するといわれている DNA ワクチンの細胞障害性 CD8 T 細胞の誘導に特異的なクロスプライミングのメカニズムの解明に迫れるものとして期待されることにもよる。

野生型マウスに TBK1 欠損マウスの骨髄移植、またはその逆の移植を行う。その後 DNA ワクチンを免疫後上記と同様に抗原特異的な液性、細胞性免疫を計測し、それぞれの細胞の自然免疫活性化がその後の獲得免疫にどのように関わっているかを検討する。

4. 研究成果

今回の研究でそのアジュバントの因子とは、CpG などの配列ではなく、DNA の右巻きの二重らせん構造 (B-form DNA) であり、それが TLR9 を「介さずに」、細胞内で Tank-Binding Kinase 1 (TBK1) という酵素 (シグナル伝達分子) が活性化されることで DNA ワクチンの効果が誘導されていることを遺伝子欠損マウスを使った実験で突き止めた。

さらに、骨髄移植の実験を用い、細胞ごとの TBK1 の役割を検討した結果①DNA ワクチンによる CD4T 細胞、B 細胞 (抗体) の誘導には樹状細胞などの免疫細胞での TBK1 依存性の自然免疫活性化経路が重要であること、②細胞性免疫誘導のためには DNA が主に取り込まれる筋肉細胞などにおける、TBK1 依存性の自然免疫活性化シグナルが重要であることなどが明らかになった (図 1)。

最後に、最近 TLR に依存しない DNA のセンサー分子として発表された DAI (ZBP1) という分子の遺伝子欠損マウスを作製し、同様に DNA ワクチンを投与したが、TLR に依存しない DNA (B-DNA、DNA ワクチン) の認識に DAI は必須ではないことが判明、さらに未知の受容体分子の存在が示唆された。

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 13 件)

1. Ishii KJ*, Akira S*. "Potential link between the immune system and metabolism of nucleic acids." *Curr Opin Immunol*. 2008 20(5):524-9. (*Corresponding author)

2. Koyama S, **Ishii KJ**, Coban C, Akira S. "Innate immune response to viral infection." *Cytokine*. 2008 43(3):336-41.
3. Takeshita F, **Ishii KJ***. "Intracellular DNA sensors in immunity." *Curr Opin Immunol*. 2008 20(4):383-8 (*Corresponding author)
4. **Ishii KJ***, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S. "Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections." *Cell Host Microbe*. 2008 3(6):352-63. (*Co-corresponding author)
5. Coban C, Koyama S, Takeshita F, Akira S, **Ishii KJ***. "Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines." *Hum Vaccin*. 2008 4(6). (*Corresponding author)
6. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, **Ishii KJ**, Akira S. "Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5." *Nat Immunol*. 2008 9(7):769-76.
7. **Ishii KJ***, Kawagoe T, Koyama S, Matsui K, Kumar H, Kawai T, Uematsu S, Takeuchi O, Takeshita F, Coban C, Akira S*. "TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines." *Nature*. 2008 451(7179):725-9. (*Co-corresponding author)

小山正平、審良静男、**石井健** 「細胞内 DNA 受容体」 *Medical Science Digest* 2009年 1月号

小山正平、審良静男、**石井健** 「ウイルス感染防御における TLR と RLR の役割」 *臨床免疫・アレルギー科* 50(6) 715 ~720、2008

青枝大貴、小山正平、チョバン・ジェヴァイア、**石井健** 「DNA ワクチンのあらたな免疫学的作用機序」 *医学のあゆみ*, 227(5) : 387-392, 2008.

小山正平、**石井健**、審良静男 「ワクチンとアジュバント」 *インフルエンザ*, 9(4) : 283-291, 2008.

石井健 「DNA ワクチン作用機序の鍵としての TANK-binding kinase-1(TBK1)」 *感染炎症免疫 Vol.38.(3)* 275-277(2008.09)

小山 正平、ジェバイア チョバン、審良 静男、堀井 俊宏、**石井健** 「ウイルスワクチン用のアジュバント」 *VIRUS REPORT Vol.5 No.1 74-81 2008*

[学会発表] (計12件)
招待のみ

1. Ishii KJ "Manipulation of vaccine immunogenicity by innate immune mechanisms" CVRDC-RIMD Symposium, Korea, Jan 2009
2. Ishii, KJ "Pivotal role of innate immune recognition and signaling pathways in vaccine immunogenicity" Symposium, Annual meeting of Japanese society of Biochemistry and Molecular Biology (BMB2008), Kobe, Japan, Dec. 2008
3. Ishii, KJ "TLR-based adjuvants and their molecular mechanisms" Vaccine forum, Osaka Japan. Dec 2008
4. Ishii, KJ "Innate immunity and vaccine development" Primate Research Forum, Tsukuba, Japan. Nov 2008
5. Ishii, KJ "Innate and adaptive immune recognition of DNA vaccines" 73rd Japanese Society of interferon and cytokine research symposium. Sapporo, Hokkaido Japan. July 2008
6. Ishii, KJ. "DNA vaccines and vaccine adjuvants" AJMITR conference, Hanoi, Vietnam, March, 2008
7. Ishii, KJ. "Immune recognition of nucleic acids and vaccine development" National Target Protein Research Program Symposium, Tokyo, Japan, Feb. 2008
8. Ishii, KJ. "Immune recognition of nucleic acids and vaccine development" Plenary talk, The 39th annual meeting of Japanese Society of Pediatric Infectious Diseases, Yokohama, Japan Nov. 2007.
9. Ishii, KJ "TLR9 recognition of DNA and hemozoin, and beyond." The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji island, Japan, Sep 2007.
10. Ishii, KJ. "Innate immunity and vaccine development" Bioscience seminar,

National Institute for Biomedical Innovation, Osaka, Japan Aug. 2007

11. Ishii, KJ. "Innate immunity and vaccine development" Bio business seminar, The Osaka Chamber of Commerce and Industry, Osaka, Japan, July. 2007

12. Ishii KJ "Innate Recognition Receptors and Signaling Pathways" Plenary talk, 1st International Congress of Society of Innate Immunity, Ankara, Turkey May 2007.

[図書] (計 4 件)

1- Ishii KJ and Akira S. "Nucleic Acids in Innate Immunity" Editor in chief. CRC press, 2008.

2- Ishii KJ, Koyama S and Akira S. "Overview: Innate immune response to nucleic acids" Immune response to gene therapy, edited by Roland Herzog, Wiley Publisher, 2008

3- Ishii KJ, Akira S. "Innate Immunity" Clinical Immunology 3rd Ed. Edited by Rich, Shearer, Fleisher, Schroeder, Weyand, Frew. 2007

4- Coban C, Ishii KJ, Akira S. "Immune intervention of human diseases through Toll-like receptors" Pharmaceutical Biotechnology edited by Carlos A. Guzman and Giora Feuerstein, Eureka and Landes Bioscience, 2007.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

特許の名称: 「Zc3ch12 機能抑制物質および自然免疫賦活剤を用いた

新規アジュバント」出願番号: 特願 2009-46990 出願人: 国立大学法人大阪大学、
発明者: 審良静男、竹内理、松下一史、石井 健

特許の名称: 「新規アジュバント」出願番号: 特願 2007-285737 出願人: 国立大学法人大阪大学、日本全薬工業 発明者: 審良静男、石井 健、チョバン ジェヴァイア、津久井利広

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井健 (ISHII KEN)

大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号: 00448086

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

審良静男 (AKIRA SHIZUO)

大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号: 50192919

堀井俊宏 (HORII TOSHIHIRO)

大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号: 80142305

Coban, Cevayir (COBAN CEVAYIR)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教
研究者番号: 00397712

武下文彦 (TAKESHITA FUMIHIKO)

横浜市立大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 60333572

小山正平 (KOYAMA SHOHEI)

東北大学・大学院医学系研究科・特別研究員
研究者番号: 99999999

川越龍方 (KAWAGOE TATSUKATA)

大阪大学・医学系研究科・大学院生
研究者番号: 99999999