

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07082

研究課題名(和文) RNA編集酵素ADAR1ノックアウトマウスによるワクチン開発の基盤確立

研究課題名(英文) A regulatory role of the double-stranded RNA editing enzyme ADAR1 for adaptive immune response

研究代表者

谷口 俊文 (Taniguchi, Toshibumi)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20724826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：2本鎖RNA編集酵素ADAR1の獲得免疫における役割を解明するため、活性化T細胞、B細胞、それぞれに特異的にADAR1を欠損させたマウスを利用して解析を行った。NP-CG/AlumやOVA/Alumで免疫後の脾臓やリンパ節における胚中心(GC)-Tfh細胞やGC-B細胞の出現頻度および高親和性IgG抗体やOVA特異的IgE抗体の産生は、活性化T細胞またはB細胞特異的にADAR1欠損マウスいずれにおいても著しく低下した。この結果からADAR1はT細胞とB細胞に対する内因的機能およびT-B細胞相互作用に深く関与し、獲得免疫システムにおいて極めて重要な役割を果たしている事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫後のリンパ球の機能分化や機能制御における詳細なメカニズムは未だ明らかでない。我々は獲得免疫にける機能が明らかでないADAR1について注目し、本研究により特にGC-Tfh細胞やGC-B細胞の機能にADAR1が重要な役割を果たすことを見出した。本研究の成果は、今後、GC-Tfh細胞とGC-B細胞の分化や機能の制御機構の研究および免疫システムの解明研究において意義があると考えられる。また本研究の成果はアレルギー性疾患やHIVなど有効なワクチンが存在しない感染症に対する効果的なワクチン療法の開発へとつながる点に社会的に意義がある。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the role of the double-stranded RNA editing enzyme ADAR1 (adenosine deaminase acting on RNA-1) in adaptive immunity, we have analyzed mice deficient in ADAR1 specifically for activated T cells or B cells. In both activated T-cell and B-cell-specific ADAR1-deficient mice, differentiation of Germinal Center (GC)-Tfh cells and GC-B cells after immunization with NP-CG / Alum or OVA / Alum was suppressed, and high affinity IgG antibody and OVA-specific IgE antibody were significantly reduced. These results indicate that ADAR1 plays an extremely important role in the adaptive immune system by acting endogenously on T cells and B cells and by being involved in T-B cell interactions.

研究分野：感染免疫学

キーワード：免疫応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

獲得免疫系において胚中心 (Germinal Center; GC) 形成および活性化 B 細胞による高親和性 IgG 抗体産生細胞への分化に対して濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfh) と B 細胞相互作用は極めて重要である。GC-Tfh 細胞は、GC 形成やメモリー B 細胞への転換など抗体産生に関わる重要な役割を担うことが明らかにされているが、いまだ、獲得免疫機構制御の詳細な機序は明らかでない。今までに我々は 2 本鎖 RAN 編集酵素 ADAR1 (adenosine deaminase acting on RNA-1) を B 細胞特異的に欠損させたマウスにおいて免疫後の胚中心形成が著しく抑制されることを見出し、ADAR1 は獲得免疫において極めて重要であることが考えられる。しかし、ADAR1 の獲得免疫における機能については明らかでない。

### 2. 研究の目的

本研究では ADAR1 の獲得免疫における役割を明らかにするために、GC-Tfh 細胞および GC-B 細胞に注目し、これが各細胞に対する ADAR1 の役割について遺伝子改変マウスを利用して免疫学的解析を行った。

### 3. 研究の方法

活性化 T 細胞特異的に ADAR1 を欠損させるために ADAR1 flox/flox マウスと OX40 遺伝子プロモーターを利用して Cre リコンビナーゼを発現させた (OX40-Cre) マウスを交配して OX40-Cre-ADAR1-KO マウス作製した。また、B 細胞特異的に ADAR1 を欠損させるために ADAR1 flox/flox マウスと CD20 遺伝子プロモーターを利用して Cre リコンビナーゼを発現させた (CD20-Cre) マウスを交配して CD20-Cre-ADAR1-KO マウス作製して以下の解析を行った。

#### 1) ヘルパー細胞の分化誘導における ADAR1 の機能の解明

OX40-Cre-ADAR1-KO マウスおよび野生型マウスより脾臓ナイーブ CD4 陽性 T 細胞をセルソーターで純化し、抗原提示細胞の存在下で抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体による刺激に加え、Th1、Th2、Th17 および Tfh 細胞の分化条件で培養した。5 日後に PMA/イオノマイシンにより再刺激後の細胞内サイトカイン量についてフローサイトメトリー法を用いて測定し、各 Th 細胞の分化能に対する ADAR1 の機能を解析した。

2) 免疫応答における GC-Tfh 細胞および GC-B 細胞分化に対する ADAR1 の役割を明らかにするために OX40-Cre-ADAR1-KO マウス、CD20-Cre-ADAR1-KO マウス、野生型マウスを抗原 NP-CG とアジュバント (Alum) を腹腔内投与して免疫し、経時的に脾臓における GC-Tfh 細胞および GC-B 細胞についてフローサイトメトリー法を用いて解析した。免疫後、経時的に血清 IgM や IgG1 抗体価を ELISA 法で測定した。

3) 疾患モデルにおける Tfh 細胞の機能と ADAR1 の役割の究明するために OX40-Cre-ADAR1-KO マウス、CD20-Cre-ADAR1-KO マウスおよび野生型マウスにおける OVA 抗原依存的アレルギーモデルを作製した。卵白アルブミン (OVA) /Alum で腹腔内投与により 2 回感作した後、抗原再暴露後まで継時的に血性 IgG1 や IgE 抗体価を ELISA 法で測定した。また、最終抗原感作後 7 日目に脾臓の GC-Tfh 細胞および GC-B 細胞についてフローサイトメトリー法で解析し、抗原再暴露後の肺組織における好酸球浸潤について病理学的解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) *In vitro* でナイーブ CD4+ T 細胞より Th1、Th2、Th17 および Tfh 細胞への分化を解析した。Th1、Th2、Th17 はそれぞれ、細胞内 IL-4、IFN $\gamma$ 、IL-17、IL-21 を測定。また GC-Tfh 細胞は *in vitro* で誘導困難であるため Tfh 細胞の発現頻度について解析した。各 Th 細胞の分化はいずれも野生型マウスと OX40-Cre-ADAR1-KO マウスで有意差を認めなかったことから、Th1、Th2、Th17 および Tfh 細胞に対して ADAR1 は関与しない可能性が考えられた。

(2) NP-CG 免疫後のマウスの Tfh 細胞における ADAR1 を解析した結果、野生型マウスに比較して OX40-Cre-ADAR1-KO マウスおよび CD20-Cre-ADAR1-KO マウスの脾臓中の GC-Tfh 細胞は有意に減少した。また IgM の産生に明らかな差を認めなかったが、高親和性 IgG 抗体産生は著しく有意に減少した。以上より、ADAR1 は GC-Tfh 細胞および GC-B 細胞の分化を制御することによって免疫システムにおいて極めて重要で基盤的な役割を果たしていると思われる。

(3) アレルギーモデルを解析した結果、OVA 感作後の OVA 抗原再暴露後までの血清 OVA 特異的 IgG1 および IgE 抗体価は野生型マウスに比較して OX40-Cre-ADAR1-KO マウスおよび CD20-Cre-ADAR1-KO マウスで有意に低下した。特に抗原再暴露後の IgE 産生が著しく抑制された。また NP-CG の免疫と同様に、OX40-Cre-ADAR1-KO マウスの脾臓で GC-Tfh 細胞および GC-B 細胞の減少を認めた。肺組織における好酸球浸潤は野生型マウスに比較して OX40-Cre-ADAR1-KO マウスで抑制された。一方、CD20-Cre-ADAR1-KO マウスにおける好酸球浸潤は野生型マウスより低下する傾向を認めたが、有意ではなかった。以上より、アレルギーモデルにおいても ADAR1 は GC-Tfh 細胞の分化や GC-B 細胞の分化および抗原特異的 IgE 抗体産生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(まとめ) 本研究より ADAR1 は獲得免疫において極めて重要な役割を果たすことが明らかになった。OX40-Cre-ADAR1-KO マウスおよび CD20-Cre-ADAR1-KO マウスで GC-Tfh 細胞と GC-B 細胞が著しく減少した。この結果からリンパ組織における胚中心の形成過程において、ADAR1 は、GC-

Tfh 細胞および GC-B 細胞の分化誘導に深く関与することが示された。以上より、ADAR1 は T 細胞および B 細胞の分化や機能を制御することによって免疫システムにおいて極めて重要で基盤的な役割を果たしていることが明らかになった。本研究の成果はアレルギー性疾患や HIV など有効なワクチンが存在しない感染症に対する効果的なワクチン療法の開発へとつながる点に意義があると思われる。今後、免疫ネットワーク形成メカニズムの解明を目指し、更に ADAR1 の研究を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Komatsu Kensuke, for The HIV-Associated Neurocognitive Disorders in Japanese (J-HAND) Study Group (The J-HAND Study Group), Kinai Ei, Sakamoto Maiko, Taniguchi Toshibumi, Nakao Aya, Sakata Tatsuro, Iizuka Akiko, Koyama Teppei, Ogata Toki, Inui Akihiro, Oka Shinichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Various associations of aging and long-term HIV infection with different neurocognitive functions: detailed analysis of a Japanese nationwide multicenter study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of NeuroVirology	6. 最初と最後の頁 208-220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13365-018-0704-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Shingo, Fujiwara Mariko, Inoue Chikako, Watanabe Masaharu, Takayanagi Shin, Taniguchi Toshibumi, Watanabe Akira, Ishiwada Naruhiko, Igarai Hidetoshi	4. 巻 139
2. 論文標題 Adverse Events after the Introduction of Quadrivalent Influenza Vaccine in Comparison with AH1pdm Vaccine (2009) in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 469 ~ 474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.18-00160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 谷口 俊文	4. 巻 55
2. 論文標題 特集 プロブレムから学ぶ感染症診療-すぐに役立つ厳選シナリオ30選 発熱+ の症状から診断する 発熱と腰痛	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 medicina	6. 最初と最後の頁 780 ~ 783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.11477/mf.1402225609">https://doi.org/10.11477/mf.1402225609</a>	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 築地 茉莉子, 山崎 伸吾, 谷口 俊文, 中村 貴子, 鈴木 貴明, 猪狩 英俊, 石井 伊都子	4. 巻 20
2. 論文標題 テノホビル血中濃度モニタリングにより血液透析導入HIV感染者へのツルバダ配合錠至適用量を検討した2症例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本エイズ学会誌	6. 最初と最後の頁 132 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takashi Ogasawara, Yuko Kohashi, Jun Ikari, Toshibumi Taniguchi, Nobuhide Tsuruoka, Haruko Watanabe-Takano, Lisa Fujimura, Akemi Sakamoto, Masahiko Hatano, Hirokuni Hirata, Yasutsugu Fukushima, Takeshi Fukuda, Kazuhiro Kurasawa, Koichiro Tatsumi, Takeshi Tokuhisa, Masafumi Arima	4. 巻 9
2. 論文標題 Allergic TH2 Response Governed by B-Cell Lymphoma 6 Function in Naturally Occurring Memory Phenotype CD4+ T Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.00750	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogasawara Takashi, Hatano Masahiko, Satake Hisae, Ikari Jun, Taniguchi Toshibumi, et al.	4. 巻 114
2. 論文標題 Development of chronic allergic responses by dampening Bcl6-mediated suppressor activity in memory T helper 2 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 E741 ~ E750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1613528114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinai Ei, for HIV-Associated Neurocognitive Disorders in Japanese (J-HAND study group), Komatsu Kensuke, Sakamoto Maiko, Taniguchi Toshibumi, Nakao Aya, Igari Hidetoshi, Takada Kiyonori, Watanabe Aki, Takahashi-Nakazato Ai, Takano Misao, Kikuchi Yoshimi, Oka Shinichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Association of age and time of disease with HIV-associated neurocognitive disorders: a Japanese nationwide multicenter study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurovirology	6. 最初と最後の頁 864 ~ 874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13365-017-0580-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Igari Hidetoshi, Watanabe Akira, Ichimura Yasunori, Sakurai Takayuki, Taniguchi Toshibumi, Ishiwada Naruhiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Quality control in QuantiFERON-TB gold in-tube for screening latent tuberculosis infection in health care workers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 211 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2016.12.006	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogasawara T, Hatano M, Satake H, Ikari J, Taniguchi T, Tsuruoka N, Watanabe-Takano H, Fujimura L, Sakamoto A, Hirata H, Sugiyama K, Fukushima Y, Nakae S, Matsumoto K, Saito H, Fukuda, Kurasawa K, Tatsumi K, Tokuhisa T, Arima M	4. 巻 114
2. 論文標題 Development of chronic allergic responses by dampening Bcl6-mediated suppressor activity in memory T helper 2 cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 E741-E750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1613528114.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Igari H, Watanabe A, Ichimura Y, Sakurai T, Taniguchi T, Ishiwada N.	4. 巻 23
2. 論文標題 Quality control in QuantiFERON-TB gold in-tube for screening latent tuberculosis infection in health care workers.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of infection and chemotherapy	6. 最初と最後の頁 211-213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2016.12.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishiwada N, Watanabe M, Murata S, Takeuchi N, Taniguchi T, Igari H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Clinical and bacteriological analyses of bacteremia due to <i>Corynebacterium striatum</i> .	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of infection and chemotherapy	6. 最初と最後の頁 790-793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2016.08.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 谷口俊文	4. 巻 33
2. 論文標題 【糖尿病フットケアの実際と可能性-チーム医療と集学的治療-】 糖尿病における足感染の治療	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 プラクティス	6. 最初と最後の頁 307-312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山岸 一貴, 渡辺 正治, 高柳 晋, 櫻井 隆之, 谷口 俊文, 猪狩 英俊, 山崎 伸吾
2. 発表標題 ナショナルデータベースサンプルデータを用いた抗菌薬使用状況の疫学調査
3. 学会等名 第92回日本感染症学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口 俊文, 山岸 一貴, 高柳 晋, 櫻井 隆之, 猪狩 英俊
2. 発表標題 ナショナルデータベースによる外来抗菌薬使用状況の疫学調査
3. 学会等名 第92回日本感染症学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡部 智貴, 築地 茉莉子, 谷口 俊文, 金田 暁, 猪狩 英俊
2. 発表標題 HIV感染症における保険薬局との病薬連携に関する検討 千葉県内の保険薬局を対象とした実態調査
3. 学会等名 第32回日本エイズ学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口俊文, 築地茉莉子, 櫻井隆之, 猪狩英俊
2. 発表標題 若年HIV感染者の骨密度低下に関連するリスク因子の検討
3. 学会等名 日本エイズ学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 布施 義也, 谷口俊文, 中山茂, 綿引一成, 吉田隆, 東和彦, 小野寺清隆, 大野光江, 三末高央, 小川優, 下条小百合, 小林健, 坂本浩輝
2. 発表標題 千葉県臨床検査技師会が行っている休日街頭HIV抗体検査の実施状況について
3. 学会等名 日本エイズ学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 築地茉莉子, 谷口俊文, 櫻井隆之, 中村貴子, 鈴木貴明, 猪狩英俊, 石井伊都子
2. 発表標題 HIV感染者の服薬アドヒアランスに影響を与える因子の検討
3. 学会等名 日本エイズ学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木内英, 小松賢亮, 坂本麻衣子, 谷口俊文, 中尾綾, 猪狩英俊, 渡邊愛祈, 高野操, 菊池嘉, 岡慎一
2. 発表標題 HIV関連神経認知障害(HAND)と精神疾患や薬物使用との関連(J-HAND研究)(第3報)
3. 学会等名 日本エイズ学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小松賢亮, 木内英, 坂本麻衣子, 谷口俊文, 中尾綾, 坂田達朗, 飯塚暁子, 小山徹平, 緒方稔, 乾啓洋, 岡慎一, J-HAND StudyGroup
2. 発表標題 HIV関連神経認知障害(HAND)における神経心理検査別の関連因子に関する検討(J-HAND研究)(第2報)
3. 学会等名 日本エイズ学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷口俊文、渡邊正治、櫻井隆之、山崎伸吾、藤原満里子、猪狩英俊
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌菌血症におけるフォローアップ血液培養の提出率
3. 学会等名 第32回日本環境感染学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤原満里子、谷口俊文、山崎伸吾、渡邊正治、櫻井隆之、市村康典、猪狩英俊
2. 発表標題 千葉大学病院におけるカルバペネム耐性腸内細菌科細菌のアウトブレイク対応とその効果
3. 学会等名 第32回日本環境感染学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山崎伸吾、藤原満里子、猪狩英俊、渡邊正治、谷口俊文、市村康典、櫻井隆之、高塚博一
2. 発表標題 抗菌薬適正使用ラウンド介入率がAntimicrobial Use Density およびDays of Therapy に与える影響
3. 学会等名 第32回日本環境感染学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 猪狩英俊、藤原満里子、山崎伸吾、渡邊正治、市村康典、櫻井隆之、谷口俊文、石和田稔彦
2. 発表標題 新採用医療従事者の4種（麻疹・風疹・水痘・ムンプス）ワクチン接種歴書面報告と抗体価測定結果
3. 学会等名 第32回日本環境感染学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷口俊文、櫻井隆之、市村康典、猪狩英俊
2. 発表標題 カンジダ血症におけるフォローアップ血液培養の提出率
3. 学会等名 第91回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 猪狩英俊、市村康典、櫻井隆之、谷口俊文、渡辺正治
2. 発表標題 データウェアハウスの二次利用による敗血症治療成績の検討
3. 学会等名 第91回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷口俊文
2. 発表標題 長期療養時代を迎えたHIV感染症の課題と展望
3. 学会等名 第65回日本感染症学会東日本地方会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	有馬 雅史  (Arima Masafumi)  (00202763)	獨協医科大学・医学部・准教授    (32203)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	幡野 雅彦  (Hatano Masahiko)  (20208523)	千葉大学・大学院医学研究院・教授       (12501)	