

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15日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790461

研究課題名（和文） リンパ組織における自然免疫依存症の動的免疫制御機構

研究課題名（英文） Immune induction mechanism by innate immune responses in vivo

研究代表者

青枝 大貴（AOSHI TAIKI）

医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：10324344

研究成果の概要（和文）：

インフルエンザワクチン及びインフルエンザ感染に対する獲得免疫誘導がどのような自然免疫反応に依存するのかを検討するため、関連するノックアウトマウスを用いて感染・免疫実験を行った。CD4T細胞や抗体誘導はTLR7に大きく依存していたが、IPS-1やASCには依存していなかった。また生ウイルス感染によるCD8T細胞誘導はいずれのノックアウトマウスでも正常だった。これらの結果は獲得免疫の誘導には自然免疫応答が重要であるが、抗体産生・CD4T細胞応答・CD8T細胞応答のそれぞれに必要な自然免疫応答は異なることを示唆しており、ワクチンによる獲得免疫誘導を考えた場合、獲得免疫に関与しない自然免疫反応はワクチンによる副反応の主体となっている可能性も考えられ、そのワクチンにとって適切な自然免疫を刺激することで効果と安全性を両立したワクチン開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined the role of innate immunity for inducing adaptive immune responses against live influenza infection and influenza vaccine immunization using various innate immune receptor/adaptor knock-out mice. Our results showed that CD4T and antibody responses were strongly dependent on TLR7 signaling in pDCs. In contrast, CD8T responses against live influenza virus infection were independent of either TLR7, IPS-1, or ASC. These result suggested that each effector arm of adaptive immune responses were differently regulated by innate immune responses. Our results indicate that more specific stimulation of appropriate innate immunity may help to reduce adverse effects associated with vaccination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：自然免疫

1. 研究開始当初の背景
近年の新興、再興感染症の出現やグローバル化、高齢社会に伴う感染リスク増大

などによって効果的なワクチンの開発は急務である。近年の自然免疫学分野における研究成果から、ワクチンを投与した際に誘導さ

れる自然免疫応答がその後の獲得免疫の効率的な誘導に重要であることが次々と報告されている。また以前より免疫反応の増強効果が証明されてきたアジュバントの多くが、そのメカニズムとして **Toll like receptors (TLRs)**、**RIG-I-Like Receptors (RLRs)**、**NOD-Like Receptors (NLRs)** などの自然免疫受容体のリガンドとして作用していることが明らかとなった。インフルエンザワクチンもその例外ではなく、これまでにまだ不十分ではあるものの、インフルエンザワクチンの種類によって刺激される自然免疫シグナルが異なり、また投与時の自然免疫シグナル(**TLR7**)の有無によりそのワクチンの免疫原性が制御されていることが示唆されていた。

また蛍光顕微鏡などを用いたイメージング研究により、リステリア感染時のマウス脾臓組織内での病原体と樹状細胞やT細胞との相互作用を動的に観察することで、リステリア感染時の脾臓では高度に組織化された各コンパートメント(T細胞領域や **marginal zone**)間でダイナミックな免疫系細胞の移動が起こり、そのことが防御免疫反応の誘導に重要であることが明らかとなっており、ワクチン及び感染で誘導される感染により誘導されるリンパ組織内のダイナミックな免疫系細胞の移動が防御免疫誘導に重要であることが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、**TLR7**に加えて、その他のインフルエンザウイルス感染およびインフルエンザワクチン免疫に際して重要な自然免疫シグナル・エフェクター分子・エフェクター細胞の全容を明らかにする。また、蛍光顕微鏡などを用いて、その免疫誘導に必須な自然免疫シグナル分子を欠損するノックアウトマウスと野生型マウスのリンパ組織内での免疫細胞間の相互作用を比較することで、自然免疫反応と獲得免疫反応をつなぎ、ワクチンの免疫原性発動に重要なリンパ組織における自然免疫シグナル依存的な細胞間相互作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

TLR7以外の重要な自然免疫シグナル分子を明らかにするために、野生型マウスを様々なインフルエンザウイルス(致死性、非致死性)やインフルエンザワクチン(不活化全粒子、不活化スプリットHAなど)で経鼻免疫し、ノックアウトマウスを用いて、感染/免疫実験を行い特異的なT細胞応答(サイトカイン産生、細胞障害活性、細胞増殖試験)、B細胞応答(抗体価、抗体アイソタイプ)がどのような影響を受けるかを、ELISA法、CTLアッセイ、テトラマー、CFSEアッセイなどで解析する。

4. 研究成果

(1)インフルエンザワクチン及びインフルエ

ンザ感染に対する獲得免疫誘導がどのような自然免疫反応に依存するのかを検討するため、関連するノックアウトマウスの感染・免疫実験を行った。**TLR7**や**IPS-1**のノックアウトマウスを用いた実験では、インフルエンザウイルス全粒子ワクチンによる抗体価上昇は、主に**TLR7**に依存し、**IPS-1**には依存していなかった(図1)。

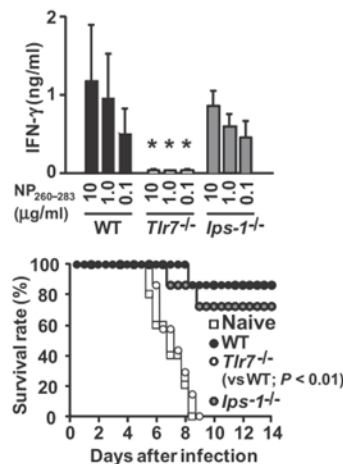


図1.不活化全粒子ワクチンの免疫原性は**TLR7**に依存し、**IPS-1**には依存しない。

(2)また、インフルエンザ感染による獲得免疫誘導にインフラマゾームの活性化が重要であるとの報告を検証するため、インフラマゾームの活性化に必須なアダプター分子である**ASC**のノックアウトマウスでも感染・免疫実験を行ったが、我々の実験系ではインフラマゾームの活性化は必ずしもインフルエンザウイルスによる獲得免疫誘導には必要でなかった(図2)。

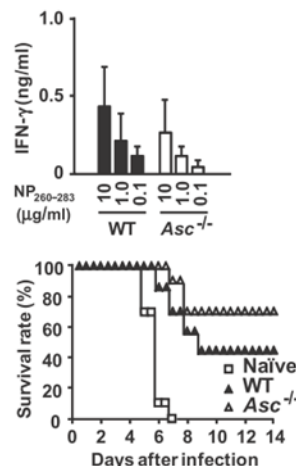


図2.不活化全粒子ワクチンの免疫原性は**ASC**には依存しない。

(3)不活化全粒子インフルエンザワクチンによる獲得免疫に必須な免疫細胞群を同定するために、さまざまなデブリーション抗体を

用いて実験したところ、pDC を取り除くと不活化全粒子ワクチンの免疫原性は著しく低下した。さらに prime/boost プロトコルにおいて priming 時に pDC を取り除くと免疫原性は著しく低下するが、boost 時に pDC を取り除いても免疫原性には全く影響が見られなかった。また、興味深いことに pDC デブレーション抗体による免疫原性の低下は live influenza 感染では認められなかった (図 3)。

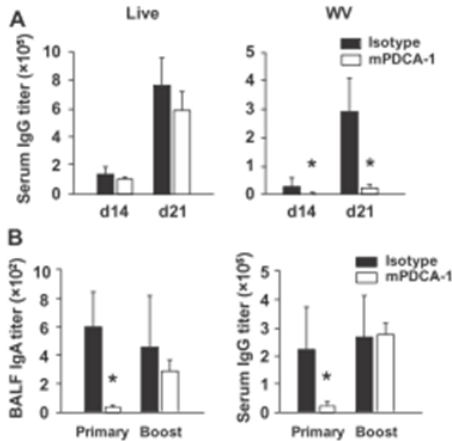


図3.不活化全粒子ワクチンによる抗体価誘導にはpDCが必要であるが、live influenza virus感染にはpDCは必要無い。

(4) ウイルス感染による CD8T 細胞応答はいずれの自然免疫応答にも依存していなかった (図 4)。

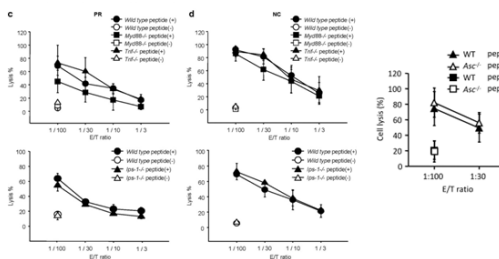


図4.Live influenza infectionによるCD8T細胞誘導はTLR7, IPS-1, ASCのいずれにも依存しない。

(5) 抗体価や CD4T 細胞応答とは異なり、live influenza virus 感染による CD8T 細胞応答には複数の自然免疫経路が関与することが示唆されたため、リステリア感染モデルにおいて CD8T 細胞応答を制御する免疫細胞群を同定する目的で Batf3 ノックアウトマウスを用いてリステリア特異的な CD8T 細胞応答を調べた。リステリア感染による CD8T 細胞応答は Batf3 依存的な CD8 α 陽性樹状細胞に大きく依存していた (図 5)。

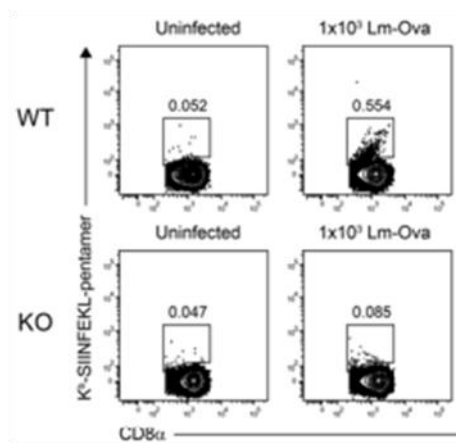


図5.リステリア感染によるCD8T細胞応答はBatf3依存のCD8 α 陽性樹状細胞に依存する。

(6) これらの結果は、獲得免疫の誘導には自然免疫応答が重要であるが、抗体産生・CD4T 細胞応答・CD8T 細胞応答のそれぞれに必要な自然免疫応答は異なることを示唆していた。ワクチンによる獲得免疫誘導を考えた場合、獲得免疫に関与しない自然免疫反応はワクチンによる副反応の主体となっている可能性も考えられ、そのワクチンにとって適切な自然免疫を刺激することで効果と安全性を両立したワクチン開発の可能性が示唆された。

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 Aoshi T, Koyama S, Kobiyama K, Akira S, Ishii KJ. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Curr Opin Virol.* 2011, 1(4):226-32. 査読有
DOI:10.1016/j.coviro.2011.07.002
- ② Edelson BT, Bradstreet TR, Hildner K, Carrero JA, Frederick KE, KC W, Belizaire R, Aoshi T, Schreiber RD, Miller MJ, Murphy TL, Unanue ER, Murphy KM. CD8 α (+) dendritic cells are an obligate cellular entry point for productive infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunity.* 2011, 35(2):236-48. 査読有
DOI:10.1016/j.immuni.2011.06.012
- ③ 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.* 2010, 2(25):25ra24. 査読有
DOI:10.1126/scitranslmed.3000759

- ④ 青枝大貴, 石井健. 自然免疫と次世代ワクチン開発. Drug Delivery System 27 巻1号 Page19-27(2012) 査読無
- ⑤ 青枝大貴, 石井健. ワクチンアジュバント. 日本臨床 69 巻 9 号 Page1547-1553(2011) 査読無
- ⑥ 青枝大貴, 石井健. ワクチンを考えるうえで必要な免疫の知識. 臨床検査 54 巻11号 Page1220-1229(2010) 査読無

[学会発表] (計1件)

- ① 第14回国際免疫学会議(2010年神戸). Aoshi T, Koyama S, Tanimoto T, Kumagai Y, Kobiyama K, Coban C, Akira S, Ishii KJ. WS/PP-069-01 Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes.

[図書] (計2件)

- ① 青枝大貴, 審良静男, 石井健, 羊土社、マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック. 10章. 生体防御機構-Toll-like receptors ノックアウトマウス、2011、182-199.
- ② 小山正平, 青枝大貴, シーエムシー出版、アジュバント開発研究の新展開 2.1 インフルエンザウイルスの内因性アジュバント、2011、60-65.

[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

青枝 大貴 (AOSHI TAIKI)

研究者番号：10324344

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：