



Title	Immunoadjuvant effects of polyadenylic : polyuridylic acids through TLR3 and TLR7
Author(s)	杉山, 孝弘
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48958
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	すぎ 杉 やま 山 たか 孝 ひろ 弘
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 8 1 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学 位 論 文 名	Immunoadjuvant effects of polyadenylic : polyuridylic acids through TLR3 and TLR7 (TLR3 と TLR7 を介する 2 本鎖 RNA polyadenylic : polyuridylic acid の免疫アジュバント効果)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 改 正 恒 康 (副査) 教 授 荒 瀬 尚 教 授 熊ノ郷 淳

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

核酸アジュバントは合成が容易なことから、アレルギー、感染症、腫瘍、自己免疫疾患の治療手段として有用と考えられている。核酸アジュバントとしては 1 本鎖 DNA の CpG-DNA、1 本鎖 RNA の polyuridylic acid (poly U)、2 本鎖 RNA の polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I : C)) がこれまでよく研究されており、それぞれの核酸アジュバントが異なる種類 toll 様受容体 (toll-like receptor : TLR) によって認識される。さらに異なる種類の TLR が異なる樹状細胞サブセットに発現しており、樹状細胞のサブセットによって認識する核酸アジュバントも異なることが知られている。一方、2 本鎖 RNA polyadenylic-polyuridylic acid (poly(A : U)) は、古くは副作用の少ない乳癌免疫療法として用いられており、また、HIV 抗原と共に poly(A : U) を投与すると、抗原特異的な抗体産生、T 細胞の増殖がおこることが知られている。しかしながら、poly(A : U) はどのような樹状細胞サブセットによって、どのように認識されているのかは検討されていなかった。そこで、今回我々は poly(A : U) の作用機序を各種 TLR メンバーノックアウトマウスから得た骨髓由来樹状細胞サブセットを用いて検討するとともに、poly(A : U) の抗原特異的反応を *in vivo* でも検討した。

〔方法ならびに成績〕

- (1) Flt3L (Fms like tyrosine kinase 3 ligand) で誘導した骨髓由来樹状細胞 (Flt3L induced DC) を poly(I : C) または poly(A : U) で *in vitro* において刺激し、培養上清中の IL-12p40、IFN- α を測定したところ、poly(I : C) は Flt3L induced DC から IL-12p40 のみを産生誘導したが、poly(A : U) は IL-12p40 と IFN- α の両方を産生誘導した。なお、この IL-12p40、IFN- α の産生誘導は poly(A : U) を RNase 処理することによって消失し、2 本鎖 RNA による効果であることが確認された。
- (2) Flt3L induced DC は通常型樹状細胞 (conventional DC : CDC) と形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC : PDC) の両方を含む heterogenic な細胞集団であるため、poly [A : U] の IFN- α 産生誘導は PDC によるものと考え、Flt3L induced DC から PDC と CDC をソーティングして poly(A : U) で刺激した。その結果、poly(A : U) は PDC のみから IFN- α を誘導し、CDC からは IFN- α を誘導しなかった。さらにこの PDC からの IFN- α 産生誘導は

TLR7 ノックアウトマウス由来の PDC では消失しており、poly(A : U) は PDC から TLR7 シグナルを介して IFN- α を産生誘導することが確認された。

- (3) (2)と同様にソーティングした PDC および CDC を poly(A : U) で刺激したところ、PDC、CDC いずれからでも IL-12p40 が産生誘導されていた。Poly(A : U) による PDC からの IL-12p40 産生誘導は TLR7 ノックアウトマウスで消失した。ここで、Flt3L-induced DC に含まれる CDC は、TLR7 を発現せず、TLR3 を強発現する CD24^{high} CDC と TLR3 を発現せず、TLR7 を強発現する CD11b^{high} CDC とに分けられる。そこで CDC をさらに CD24^{high} CDC と CD11b^{high} CDC をソーティングで分離し、それぞれの樹状細胞サブセットを poly(A : U) または poly(I : C) で刺激した。その結果、poly(I : C) は CD24^{high} CDC のみから IL-12p40 を誘導するが、poly(A : U) は CD24^{high} CDC と CD11b^{high} CDC の両方から IL-12p40 を誘導することが明らかとなった。さらに poly(A : U) による CD24^{high} CDC からの IL-12p40 産生誘導は TLR3 ノックアウトマウスで消失し、poly(A : U) による CD11b^{high} CDC からの IL-12p40 産生誘導は TLR7 ノックアウトマウスで消失していた。以上のことから、poly(A : U) による IL-12p40 産生誘導は PDC、CD11b^{high} CDC については TLR7 シグナル依存的に、CD24^{high} CDC については TLR3 シグナル依存的に起きていることが明らかとなった。
- (4) 最後に poly(A : U) を Ovalbumin (OVA) と混合して腹腔内注射し、1 週間後、脾臓中の CD8 陽性 T 細胞での OVA 特異的 MHC-classI 発現の増加、IFN γ の産生を見ることにより、poly(A : U) による樹状細胞から CD8 陽性 T 細胞への in vivo での cross presentation 能力を検討した。すると、poly(A : U) と OVA の腹腔内注射により、脾臓内抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の増殖は TLR3 シグナル、TLR7 シグナルの両方に依存していたが、脾臓内 CD8 陽性 T 細胞からの抗原特異的 IFN γ 産生は TLR3 シグナルのみに依存していた。さらに、IFN α/β ノックアウトマウスを用いてこれらの実験をしたところ、脾臓内での抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞増殖、抗原特異的 IFN γ 産生はいずれも野生型のマウスとほぼ同程度であり、poly(A : U) による cross presentation 効果に IFN- α は関与していないことが示唆された。

〔総括〕

2 本鎖 RNA の核酸アジュバント poly(A : U) のアジュバント効果を in vitro での樹状細胞サブセットからの IL-12p40 または IFN- α 産生誘導と in vivo での cross presentation 能力を指標として検討した。その結果、poly(A : U) は今まで知られていた別の 2 本鎖 RNA (poly(I : C)) とは異なり、TLR3 だけでなく、TLR7 をも介してアジュバント効果を発揮しており、さらにその機序は樹状細胞サブセットによって異なっていた。さらに in vivo での cross presentation 効果も TLR3 と TLR7 両方を介していた。本研究は 2 種類の TLR シグナルを利用する核酸アジュバントを発見し、その作用機序を検討したものであり、核酸アジュバントの臨床応用を考える足がかりとなるものである。

論文審査の結果の要旨

2 本鎖 RNA である polyadenylic acid : polyuridylic acid (poly(A : U)) は乳がん免疫療法のアジュバントとして有用であるだけでなく、HIV などの感染免疫のアジュバントとして利用できる可能性があることが報告されている。しかし、その作用機序は明らかではなかった。今回、申請者はこの poly(A : U) のアジュバント効果の作用機序を核酸系免疫アジュバント受容体として知られる TLR3 (toll like receptor3)、TLR7 のノックアウトマウス、または両方のダブルノックアウトマウスを利用して解析した。その結果、種々の in vitro 樹状細胞サブセットにおいて、サブセット特有の機構でサイトカイン産生を誘導することを明らかにした。すなわち、poly(A : U) は形質細胞様樹状細胞 (pDC) より TLR7 依存性に IL-12p40、IFN α を誘導し、CD11b 強陽性通常型樹状細胞 (cDC) より TLR7 依存性に IL-12p40 を、CD24 強陽性 cDC より TLR3 依存性に IL-12p40 を誘導した。また、in vivo では poly(A : U) は抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞の増殖と CD8 陽性 T 細胞からの IFN γ 誘導を引き起こした。これらの応答には TLR7 も関与していたが、特に TLR3 に強く依存していた。さらに、CD8 陽性 T 細胞の応答に重要であるとされている I 型インターフェロンは、poly(A : U) による CD8 陽性 T 細胞の応答にはあまり関与していないこと、すなわち何らかの未知の機能分子が関与している可能性も明らかにした。Poly(A : U) の作用機序の解明は、核酸系免疫アジュバントの効果的な臨床応用につながる研究であることから、博士 (医学) の学位授与に値する。