

|              |   |
|--------------|---|
| 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          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/48958">https://hdl.handle.net/11094/48958</a>   |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | すぎやまたかひろ<br>杉山孝弘  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)  |
| 学位記番号      | 第 21818 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<br>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<br>(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)<br>教授 改正 恒康<br><br>(副査)<br>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髄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) で誘導した骨髄由来樹状細胞 (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- $\alpha$  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- $\alpha$  の両方を産生誘導した。なお、この IL-12p40、IFN- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$  を誘導し、CDC からは IFN- $\alpha$  を誘導しなかった。さらにこの PDC からの IFN- $\alpha$  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- $\alpha$ 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<sup>high</sup>CDCとTLR3を発現せず、TLR7を強発現するCD11b<sup>high</sup>CDCとに分けられる。そこでCDCをさらにCD24<sup>high</sup>CDCとCD11b<sup>high</sup>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<sup>high</sup>CDCのみからIL-12p40を誘導するが、poly(A:U)はCD24<sup>high</sup>CDCとCD11b<sup>high</sup>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<sup>high</sup>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<sup>high</sup>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<sup>high</sup>CDCについてはTLR7シグナル依存的に、CD24<sup>high</sup>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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 産生はTLR3シグナルのみに依存していた。さらに、IFN $\alpha/\beta$ 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 $\gamma$ 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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\gamma$ 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。