



Title	パイエル板組織内共生菌アルカリゲネス由来 LPS/lipid Aのアジュバント応用に関する研究
Author(s)	Wang, Yun-Ju
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/88000">https://doi.org/10.18910/88000</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( WANG YUN-JU )

論文題名	パイエル板組織内共生菌アルカリゲネス由来 LPS/lipid A のアジュバント応用に関する研究
------	--

## 論文内容の要旨

*Alcaligenes* spp., including *A. faecalis*, is a gram-negative facultative bacterium uniquely residing inside the Peyer's patches. We previously showed that *A. faecalis*-derived lipopolysaccharides (*Alcaligenes* LPS) acts as a weak agonist of toll-like receptor 4 (TLR4) to activate dendritic cells (DCs) and shows adjuvant activity by enhancing IgG and Th17 responses to systemic vaccination. Here, I examined the efficacy of *Alcaligenes* LPS as a nasal vaccine adjuvant. Nasal immunization with ovalbumin (OVA) plus *Alcaligenes* LPS induced follicular T helper cells (Tfh cells) and germinal center (GC) formation in the nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) and cervical lymph nodes (CLNs), and consequently enhanced OVA-specific IgA and IgG responses in the respiratory tract and serum. In addition, nasal immunization with OVA plus *Alcaligenes* LPS induced OVA-specific T cells producing IL-17 and/or IL-10, whereas nasal immunization with OVA plus cholera toxin (CT) induced OVA-specific T cells producing IFN- $\gamma$  and IL-17, which are recognized as pathogenic type of Th17 cells. In addition, CT, but not *Alcaligenes* LPS, promoted the production of TNF- $\alpha$  and IL-5 by T cells. Nasal immunization with OVA plus CT, but not *Alcaligenes* LPS, led to increased numbers of neutrophils and eosinophils in the nasal cavity. Together, these findings indicate the benign nature of *Alcaligenes* LPS is an effective nasal vaccine adjuvant that induces antigen-specific mucosal and systemic immune responses without activation of inflammatory cascade after nasal administration.

Lipid A is responsible for biological effect of LPS and has been applied to adjuvant. Here, I also examined adjuvant activity and safety of chemically synthesized *Alcaligenes* lipid A. Mice subcutaneously immunized with OVA plus *Alcaligenes* lipid A showed increased levels of OVA-specific serum IgG antibody, comparing to immunization with OVA alone. In addition, *Alcaligenes* lipid A induced high levels of IL-17 production from splenic CD4<sup>+</sup> T cells, suggesting that *Alcaligenes* lipid A promoted antigen-specific Th17 cell responses as well as *Alcaligenes* LPS did in nasal immunization. Moreover, *Alcaligenes* lipid A had little side effects, such as weight loss and fever, reducing number of lymphocytes and platelets. *In vitro* stimulation with *Alcaligenes* lipid A upregulated expression of MHCII, CD40, CD80 and CD86 and enhanced the production of cytokine, IL-6, which are involved in inducing antibody production and Th17 cell responses, from murine bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). Also, in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), stimulation with *Alcaligenes* lipid A induced the production of cytokines, including IL-6 and IL-1 $\beta$ . These findings suggest that *Alcaligenes* lipid A is also a safe and applicable synthetic adjuvant for systemic vaccination.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( WANG YUN-JU 王 韻 茹 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	招へい教授	國澤 純
	副 査	教授	中川 晋作
	副 査	教授	近藤 昌夫

## 論文審査の結果の要旨

本論文においては、腸管リンパ組織であるパイエル板の組織内部に共生する細菌として同定されたアルカリゲネスの主要な菌体成分であるリポポリサッカライド (LPS) と、その活性中心であるリピドAのワクチンアジュバント効果を検討した。

まず、アルカリゲネスLPSの経鼻ワクチンアジュバントとしての有効性を検討した。モデル抗原であるニワトリ卵白アルブミン (OVA) とアルカリゲネスLPSを混合し経鼻免疫したところ、鼻咽頭関連リンパ組織と頸部リンパ節に濾胞性Tヘルパー細胞と胚中心形成が誘導され、鼻腔と血清中にOVA特異的IgAおよびIgG抗体の産生を増強させた。また、OVAとアルカリゲネスLPSの鼻腔免疫では、IL-17とIL-10を産生するOVA特異的T細胞が誘導されたが、実験的粘膜アジュバントであるコレラトキシンを用いたOVAの鼻腔免疫では、病原性Th17細胞と認識されているIFN- $\gamma$ とIL-17の両方を産生するOVA特異的T細胞が誘導されていた。さらに、コレラトキシンをアジュバントに用いた群では、T細胞からのTNF- $\alpha$ やIL-5といった炎症性サイトカインの産生も亢進していた。これらの結果と相関し、コレラトキシンをアジュバントとして用いた群では、鼻腔内の好中球と好酸球の数が増加していたが、アルカリゲネスLPS群ではそのような炎症像は観察されなかった。以上のことから、アルカリゲネスLPSは、鼻腔投与後に過剰な炎症を誘導することなく、抗原特異的な免疫応答と呼吸器ならびに全身性に誘導できる有効な経鼻ワクチンアジュバントであることが示された。

LPSの生物学的効果はリピドAが担っているが、菌によって構造が異なり、活性が変化することが知られている。上記のアルカリゲネスLPSの結果から、アルカリゲネスリピドAもアジュバントとして有望であると予想された。そこで、化学合成したアルカリゲネスリピドAをOVA と混合し皮下免疫した際の免疫応答を調べたところ、OVA 単独で免疫した群に比べ、OVA 特異的血清 IgG 抗体のレベルが上昇することが判明した。さらに、アルカリゲネスリピドAをアジュバントに用いることで、脾臓 においてOVA依存的にIL-17を高産生するT細胞が誘導されていた。加えて、アルカリゲネスリピドAは体重減少や発熱などの副作用を起こさず、血液中のリンパ球や血小板の減少も認められなかった。これらin vivoでの結果と相関し、アルカリゲネスリピドAによるマウス骨髄由来樹状細胞のin

vitroでの刺激は、MHCクラスII分子やCD40、CD80、CD86の発現上昇を誘導し、さらには抗体産生およびTh17細胞応答の誘導に関わるIL-6の産生を促進した。マウスの樹状細胞に対する作用と同様に、ヒト末梢血単核細胞においても、アルカリゲネスリピドAで刺激すると、IL-6 や IL-1 $\beta$  などのサイトカイン産生が誘導された。これらの知見は、化学合成したアルカリゲネスリピドAが安全で有効なアジュバントであることを示唆している。

以上、本研究は、アルカリゲネスの菌体成分のアジュバント効果について、LPSやリピドAを対象に免疫誘導効果や安全性を評価した研究として非常に優れたものであり、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。