

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 小張 真吾

横浜市立大学大学院医学研究科 小児発生成育医療学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科	微生物学	教授	梁 明秀
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	免疫学	准教授	西山 晃
副査	横浜市立大学附属病院	感染制御部	講師	加藤 英明

ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンは IL-33 を特異的に媒介し点鼻インフルエンザワクチンにおいてワクチンアジュバント効果を発揮する

ワクチンは歴史上最も成果をあげている医療技術の一つである。その有効性には疑う余地がないが、人類が感染症の脅威から遠ざかるにつれて徐々に有効性よりも安全性に主眼が置かれるようになった。免疫学の発展とともに、徐々に獲得免疫の機序についての解明が進み、弱毒生ワクチンから全粒子ワクチンを経て、現在のワクチン開発は獲得免疫に必要な抗原のみを使用したサブユニットワクチンが主流となっている。サブユニットワクチンは単体では免疫誘導能が弱く、原則として効果を強めるワクチンアジュバントを必要とする。しかしながらその作用機序には不明な点が多く、最も汎用されているワクチンアジュバントであるアルミニウム塩ですら、最近その詳細な免疫活性機序が明らかになった (Desmet CJ et al. , 2012; Marichal T et al. , 2011) 。様々なワクチンアジュバントが研究されているが、いまだ実用化に至ったものは少なく、また近年ではワクチンアジュバントそのものの安全性についても言及されることが多い。我々はワクチンアジュバントの候補物質として広く医薬品や食品、化粧品などに用いられているヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (HP- β -CD) の研究を続けてきた。HP- β -CD はすでに広く使用されているために安全面において他のワクチンアジュバント候補物質に比べて優位性を持つ。HP- β -CD は皮下注投与及び点鼻投与においてワクチンアジュバント効果を発揮することがこれまでの研究で明らかになっている (Onishi M et al. , 2015; Kusakabe T et al. , 2016) 。しかしながらワクチンの安全性が重要視される近年においては、そのワクチンアジュバント効果の免疫学機序についても基礎的研究が求められるようになった。我々はマウスを用いて HP- β -CD 点鼻投与の免疫学的機序について検討した。HP- β -CD を点鼻投与したマウスにおいて BALF や肺組織では IL-33 の発現が増加していた。BALF での IL-33 は投与された HP- β -CD の濃度依存性に増加した。BALF での IL-33 上昇は HP- β -CD 点鼻投与でのみ認められたのに対し、肺組織での IL-33 タンパク質及び mRNA の上昇は他の点鼻ワクチンアジュバント候補物質でも認められた。また、OVA をモデル抗原とし、*IL-33*^{-/-}マウスを用いた動物実験では、HP- β -CD 点鼻投与のワクチンアジュバント効果は *IL-33*^{-/-}マウスでは完全に消失したのに対し、HP- β -CD 皮下注投与のワクチンアジュバント効果は *IL-33*^{-/-}マウスと変化を認めなかった。この現象は他の点鼻ワクチンアジュバント候補物質には認められず、HP- β -CD 特有の現象と考えられた。さらに、HP- β -CD を加えたインフルエンザスプリットワクチンを *IL-33*^{-/-}マウス及び *IL-33*^{-/-}マウスに点鼻投与し、インフルエンザウイルス感染実験を行ったところ、*IL-33*^{-/-}マウスでは生存率が有意に低下し、HP- β -CD 点鼻投与が IL-33 を介してインフルエンザウイルス感染防御に寄与していることが示された。スプリットワ

クチンに対する抗体価を測定すると、*IL-33*^{-/-}マウスでは *IL-33*^{-/-}マウスに比べて抗体価が減少しているのが確認できた。IL-33 はもともとヒト喘息患者において同定され、アレルギー疾患において注目を集めるサイトカインであるが、ウイルス感染防御にも寄与すると近年報告されている (Marvie P et al. , 2010; Mehraj V et al. , 2016; Kim CW et al. , 2019) 。HP-β-CD は IL-33 を介して免疫防御能を誘導すると報告された初めての点鼻ワクチンアジュバント候補物質である。BALF 中に特異的に IL-33 を放出するのは HP-β-CD に特有の現象であり、他の点鼻ワクチンアジュバント候補物質では観察されなかった。遺伝子ノックアウトマウスの結果を踏まえると HP-β-CD 点鼻投与によって特異的に放出された IL-33 が血清及び BALF での抗体価産生に関与していると思われる。さらに、HP-β-CD による抗体価産生は IL-33 単一因子によって完全に制御されており、このような免疫系が生体において何のために存在しているのかは非常に興味深く、HP-β-CD は IL-33 による免疫制御を検討するための有用な物質と考えられた。また、同様のワクチンアジュバントであっても投与経路の違いによりその効果発現の機序は違うことが示され、粘膜面投与のワクチン研究が進む中で、投与経路ごとの免疫学的機序の解明が重要であることが示唆された。

審査に当たり、以上の論文用紙の説明の後に以下の質疑応答が行われた。

まず西山副査から以下の論評と質問がなされた。

- 1) 細胞傷害が同程度と考えられるのに、他のワクチンアジュバントと違い HP-β-CD が特異的に BALF 中に IL-33 を放出するのはなぜか。
- 2) IL-33 はアジュバント作用をもつということだが、半減期はどれくらいなのか、また短い場合にどのようにしてアジュバントを補助する機能をもつのか。

これらの論評、質問に対して、以下の回答を得た。

- 1) 細胞傷害が同程度にもかかわらず、IL33 が放出される現象に関しては今回の研究で一番重要かつ興味深い事象だと考えている。実際に細胞傷害を起こすことで IL-33 が放出されているのかについてまずは検討が必要だが、一般的に IL-33 は細胞核内にしか含まれていない。シクロデキストリンはコレステロールを破壊する作用をもち細胞膜に作用すると考えられるが、細胞質内には IL-33 は含まれておらず、何らかの方法で核内の IL-33 を核外に放出していることは確かである。この機序については IL-33 そのものの働きに関しても重要な視点だと思っているが、明確な機序については現段階では不明である。
- 2) IL-33 には様々な活性型があり、半減期については一概に決まっていない。一般的に IL-33 は 2 型自然リンパ球 (ILC2) を刺激して自然免疫応答を起こすサイトカインであり、アレルギー反応に関与していることがわかっている。そのため、IL-33 が放出されている間は一定の免疫応答が維持されると考えられる。実験で用いたリコンビ

ナント IL-33 は全長型であり，測定の実験系は IL-33 の活性型を区別することはできないため，実際にどのように免疫活性に関与しているかまでは検討できていない。

次に加藤副査から以下の論評と質問がなされた。

- 1) IL-33 は寄生虫疾患においてどういう役割をもつのか。
- 2) ST2 は IL-33 特異的なレセプターなのか，ST2KO マウスは IL-33 の働きを評価しているとみてよいのか。
- 3) ワクチンアジュバントとしてより細胞傷害を起こす方が望ましいということなのか。臨床においてダメージ関連分子パターン(DAMPs)は敗血症などで問題になることが多いがどう考えるか。
- 4) 皮下投与と点鼻投与でなぜここまで免疫反応が違うのか。

これらの質問に対して，以下の回答を得た。

- 1) 元々 IL-33 は ILC2 を活性化することで IL-5 を誘導し生体内に好酸球誘導を起こすことで寄生虫防御に役立っていたと考えられている。IL-33 だけではなく，アレルギーに関わるような好酸球誘導を起こす因子はもともと寄生虫防御機構であったと考えられているが，寄生虫疾患が減少した現代社会においては，人体に有害なアレルギー反応の原因となっているといわれている。
- 2) ST2 は IL-33 特異的なレセプターと考えられており，ST2KO マウスでの実験は IL-33 の働きを評価していると考えている。
- 3) ワクチンアジュバント研究において細胞傷害についてはよく問題になる論点である。細胞傷害という言葉にはネガティブなイメージがあるが，一般的に小児にもワクチンアジュバントとして使用されるアルミニウム塩も細胞傷害を起こすワクチンアジュバントと近年言われており，ほどよく細胞傷害を起こすというのが重要ではないかと言われている。全く免疫応答を起こさない物質は効果がないと考えられ，臨床でも局所反応や発熱があると抗体価上昇が良好に誘導されるという説もある。安全な範囲で細胞傷害を起こす，というのがワクチンアジュバント開発の要諦であると思われるが，一番難問であると今回の研究を通して感じている。
- 4) 投与部位に存在する細胞の違いや 投与後の輸送経路の違いが考えれる。具体的には，皮下投与では直接皮下に送り込まれるが，点鼻投与では粘膜面から浸透して取り込まれる点での違いが関係していると思われる。点鼻投与型ワクチンの開発が進む中で，送達システムは最も重要なポイントであり，今後の検討が必要と考えられる。

最後に，梁主査より以下の論評，質問がなされた。

- 1) これらの実験はすべて自身で施行したのか。
- 2) HP- β -CD のワクチンアジュバント効果に TLR などのパターン認識受容体やインフラマソームは関わっているのか。

- 3) IL-33 の働きについて、ILC2 と樹状細胞はどのように相互作用しているのか。
- 4) IL-33 が上昇しているが、好酸球誘導や IgE の上昇はどうか。
- 5) 鼻と肺投与では IL-33 上昇と好酸球誘導がみられるが、投与方法を変えれば違う結果になる可能性はあるのか。
- 6) インフルエンザウイルス感染実験において、感染防御には気道の IgA が重要と考えるが、今回の実験モデルではどうか。

これらの質問に対して、以下の回答を得た。

- 1) 肺組織の IL-33 蛋白質および mRNA の測定と、インフルエンザウイルス感染実験は共著者が担当した。それ以外の実験についてはすべて自分で施行した。
- 2) HP- β -CD 点鼻投与には MyD88 が関与しているため、Toll 様受容体(TLR)については一通りのノックアウトマウスで調べたが、関与はなかった。インフラマソームについては検討していない。
- 3) 本研究における ILC2 と樹状細胞の関係については明確でないため、今後検討予定である。HP- β -CD に点鼻投与した肺組織で ILC2 が増加していることは追加実験で確認できているが、その先の免疫機序については今のところ不明である。
- 4) HP- β -CD を点鼻投与したマウスの肺胞洗浄液をフローサイトメーターで検討したところコントロールと比較して好酸球が上昇していた。また OVA 抗原モデルでは OVA-IgE も上昇していた。以上により、安全性の観点からヒトへのそのままの応用は困難と考えている。
- 5) 鼻腔のみの投与や舌下投与など他の投与方法では全く違う免疫機序をきたす可能性があり、ワクチンアジュバント候補物質として今後の研究の余地がある。
- 6) OVA モデルでは BALF IgA の上昇を確認しているが、今回のインフルエンザウイルス感染実験では血清の total IgG しか測定できていない。本来であればスプリットワクチンに対する BALF IgA や血清 IgG1 や 2c などの IgG サブタイプも測定すべきだったと思われる。

以上のような質疑応答がなされた。本学位論文は、新規ワクチンアジュバント候補物質である HP- β -CD の点鼻投与における免疫機序の解明を行い、ワクチンへの適用性や安全性について科学的根拠を与える研究であり、学術的価値の高い研究と判断された。また申請者は本学位論文の内容を中心に幅広い質問に的確に答え、この課題について深い理解と洞察を持っていることを示した。以上より申請者は医学博士を授与されるにあたり相当であると判定した。