

学位論文の要旨

IL-33 Is Essential for Adjuvant Effect of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin
on the Protective Intranasal Influenza Vaccination.

(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)

Shingo Kobari

小張 真吾

March, 2021

(2021 年 3 月)

Department of Pediatrics

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 発生成育小児医療学

(Research Supervisor : Ken Ishii, project leader)

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 アジュバント開発プロジェクト

(研究指導教員：石井 健 プロジェクトリーダー)

(Doctoral Supervisor ; Syuichi Ito, Professor)

(指導教員：伊藤 秀一 教授)

学位論文の要旨

IL-33 Is Essential for Adjuvant Effect of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin on the Protective Intranasal Influenza Vaccination.

(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)

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00360/full>

1. 序論

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。

2. 実験材料と方法

マウスにおける点鼻ワクチンモデルを使用し、HP- β -CD の点鼻ワクチンアジュバントとしての作用機序について検討した。HP- β -CD を点鼻投与したのちに気管支洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) を回収し、重要な気道のサイトカインである IL-1 α 及び IL-33 を測定した。また、HP- β -CD 点鼻投与後の肺組織を回収し、免疫染色を行い発現サイトカイン及び発現細胞の同定を試みた。同様の検体を用いて肺組織のサイトカイン及び mRNA の定量測定を行った。また、卵白オボアルブミン(OVA)をモデル抗原として使用し、マウスにおけるワクチンモデルを構築し血清及び BALF 中の抗体価測定を行った。野生マウスでの抗体価のデータを元に、各種遺伝子ノックアウトマウスを使用して抗体価を比較し、HP- β -CD 点鼻投与の効果発現に必要なサイトカインを同定した。さらに、インフルエンザスプリットワクチンを抗原とし、インフルエンザウイルス感染モデルにおける HP- β -CD の点鼻ワクチンアジュバントの作用機序について検討した。

3. 結果

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。

4. 考察

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。

引用文献

Desmet CJ, and Ishii KJ. (2012), Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat Rev Immunol*, 12, 479-91.

Kim CW, Yoo HJ, Park JH, Oh JE, and Lee HK. (2019), Exogenous Interleukin-33 contributes to protective immunity via cytotoxic T-cell priming against mucosal influenza viral infection. *Viruses*, 11, doi: 10.3390/v11090840.

Kusakabe T, Ozasa K, Kobari S, Momota M, Kishishita N, Kobiyama K, Kuroda E, and Ishii KJ. (2016), Intranasal hydroxypropyl-beta-cyclodextrin-adjuvanted influenza vaccine protects against sub-heterologous virus infection. *Vaccine*, 34, 3191-3198.

Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mensil C, Sabatel C, Kobiyama K, Lekeux P, Coban C, Akira S, Ishii KJ, Bureau F, and Desmet CJ. (2011), DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med*, 17, 996-1002.

Marvie P, Lisbonne M, L'helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B, Preisser L, Bourd-Boittin K, Théret N, Gascan H, Piquet-Pellorce C, and Samson M. (2010), Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J Cell Mol Med*, 14, 1726-39.

Mehraj V, Jenabian MA, Ponte R, Lebouché B, Costiniuk C, Thomas R, Baril JG, LeBlanc R, Cox J, Tremblay C, and Routy JP (2016), The plasma levels of soluble ST2 as a marker of gut mucosal damage in early HIV infection. *AIDS*, 30, 1617-27.

Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y, Wijaya E, Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenberg A, Standley DM, Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, and Ishii KJ. (2015), Hydroxypropyl- β -cyclodextrin spikes local inflammation that induces Th2 cell and T follicular helper cell responses to the coadministered antigen. *J Immunol*, 194, 2673-82.

論文目録

主論文

[IL-33 Is Essential for Adjuvant Effect of Hydroxypropyl- \$\beta\$ -Cyclodextrin on the Protective Intranasal Influenza Vaccination.](#)

Kobari S, Kusakabe T, Momota M, Shibahara T, Hayashi T, Ozasa K, Morita H, Matsumoto K, Saito H, Ito S, Kuroda E, Ishii KJ.

Front Immunol. 2020 Mar 6;11:360. doi: 10.3389/fimmu.2020.00360. eCollection 2020.

参考論文

[Inhaled Fine Particles Induce Alveolar Macrophage Death and Interleukin-1 \$\alpha\$ Release to Promote Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Formation.](#)

Kuroda E, Ozasa K, Temizoz B, Ohata K, Koo CX, Kanuma T, Kusakabe T, **Kobari S**, Horie M, Morimoto Y, Nakajima S, Kabashima K, Ziegler SF, Iwakura Y, Ise W, Kurosaki T, Nagatake T, Kunisawa J, Takemura N, Uematsu S, Hayashi M, Aoshi T, Kobiyama K, Coban C, Ishii KJ.

Immunity. 2016 Dec 20;45(6):1299-1310.

[Intranasal hydroxypropyl- \$\beta\$ -cyclodextrin-adjuvanted influenza vaccine protects against sub-heterologous virus infection.](#)

Kusakabe T, Ozasa K, **Kobari S**, Momota M, Kishishita N, Kobiyama K, Kuroda E, Ishii KJ.

Vaccine. 2016 Jun 8;34(27):3191-3198.

[RNA is an Adjuvanticity Mediator for the Lipid-Based Mucosal Adjuvant, Endocine.](#)

Hayashi M, Aoshi T, Ozasa K, Kusakabe T, Momota M, Haseda Y, **Kobari S**, Kuroda E, Kobiyama K, Coban C, Ishii KJ.

Sci Rep. 2016 Jul 4;6:29165. doi: 10.1038/srep29165.

[DAMP-Inducing Adjuvant and PAMP Adjuvants Parallely Enhance Protective Type-2 and Type-1 Immune Responses to Influenza Split Vaccination.](#)

Hayashi T, Momota M, Kuroda E, Kusakabe T, **Kobari S**, Makisaka K, Ohno Y, Suzuki Y, Nakagawa F, Lee MSJ, Coban C, Onodera R, Higashi T, Motoyama K, Ishii KJ, Arima H.

Front Immunol. 2018 Nov 20;9:2619. doi: 10.3389/fimmu.2018.02619. eCollection 2018.

[Cyclic GMP-AMP Triggers Asthma in an IL-33-Dependent Manner That Is Blocked by Amlexanox, a TBK1 Inhibitor.](#)

Ozasa K, Temizoz B, Kusakabe T, **Kobari S**, Momota M, Coban C, Ito S, Kobiyama K, Kuroda E, Ishii KJ.

Front Immunol. 2019 Sep 26;10:2212. doi: 10.3389/fimmu.2019.02212. eCollection 2019.

[BLT1 mediates commensal bacteria-dependent innate immune signals to enhance antigen-specific intestinal IgA responses.](#)

Nagatake T, Hirata SI, Koga T, Kuroda E, **Kobari S**, Suzuki H, Hosomi K, Matsumoto N, Yanrismet Y, Shimojou M, Morimoto S, Sasaki F, Ishii KJ, Yokomizo T, Kunisawa J.

Mucosal Immunol. 2019 Sep;12(5):1082-1091.