



Title	アジュバント効果を発揮する「ポリイノシン酸-ポリシチジル酸」の二重鎖構造に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	中野, 哲郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13933号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77984
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Testuo_nakano_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 中 野 哲 郎

学 位 論 文 題 名

アジュバント効果を発揮する「ポリイノシン酸-ポリシチジル酸」
の二重鎖構造に関する研究

呼吸器感染症予防ワクチンの研究開発現場では、有効性が飛躍的に向上するワクチンの開発を目指し、全身性の免疫応答を誘導しつつ気道局所の粘膜免疫を誘導する経鼻ワクチンの研究開発が行われている。この粘膜ワクチンは皮下注射に比べて3倍以上の多量の抗原を必要とするため、限りある抗原量で粘膜ワクチンを大量生産するためにはアジュバントの併用が不可欠である。そのアジュバント候補の一つが二重鎖リボヌクレオチド(dsRNA)の「ポリイノシン酸-ポリシチジル酸」(PIC)である。本研究では、PICの実用化を目指し、その二重鎖構造に起因する物理化学的、生物学的特性を明らかにするとともに、PIC製造時および製品保管中に起こる二重鎖長の変化を抑制し、アジュバントとしての有効濃度範囲を拡大せしめる二重鎖構造を探索した。

第1章では、本研究の技術的背景を述べる。PICは、イノシン酸ホモポリマー(poly-I)とシチジル酸ホモポリマー(poly-C)が塩基対を介して右回りの二重らせんを形成した非天然型のdsRNAである。この構造体は、RNAウイルスが増殖する過程で出現する分子パターンであり、哺乳類の免疫システムはPICに強く応答する。このPICを配合した経鼻インフルエンザワクチンは、皮下注射と同じ抗原量で粘膜免疫を誘導しウイルス感染を防御することが動物モデルで確かめられている。その一方で、神経精神疾患や自己免疫疾患の動物モデルにおいて高用量のPIC投与がストレスとなり、それぞれの病態を増悪させることが報告されている。したがって、PICをワクチンアジュバントとして利用するためには、PICの有効域と毒性域を特定する必要がある。PICの免疫賦活化作用は約0.1 kbp以上の分子において認められ、その強さは二重鎖長に強く正相関することから、PICの薬理活性を安定化させる技術、すなわち二重鎖長制御技術の開発が課題となった。

第2章では、PIC製造工程内の二重鎖長の変動要因を解析し、poly-Iとpoly-C分子がアニーリング時に数珠つなぎに伸長する現象に帰することを示した。さらに、poly-I、poly-C分子の物理化学的特性の違いに着目して、PIC二重鎖の伸長反応を抑制し得る二重鎖長制御技術を探求した。様々な塩基長のpoly-I分子とpoly-C分子を組み合わせることで二重鎖の伸長と加熱冷却による収束の違い調べ、0.4 kbのpoly-C分子に対して0.13 kb以下のpoly-I分子を相補分子に選択することでPIC二重鎖長の伸長が効果的に抑制されることを見いだした。その代表例が0.4 kbのpoly-C分子と0.1 kbのpoly-I分子で組立てたuPIC100-400、および0.4 kbのpoly-C分子と0.05 kbのpoly-I分子で組立てたuPIC50-400である。逆の組合せ（長鎖poly-Iと短鎖poly-C分子）はPIC二重鎖の収束が不十分であったことから、poly-I分子の短鎖化が二重鎖の伸長抑制の鍵と考えられた。poly-I分子は、単独では棒状に近い二次構造をとり、PIC二重鎖形成時に立体構造を右らせんへ激しく変化させる。この事実を踏まえると、poly-I分子の短鎖化はアニーリング時に生じる分子内のねじれの解消に寄与した可能性が考えられた。次に、uPIC100-400の二重鎖構造が長期保存に耐えられるかどうかを調べるために、PIC400-400CA（0.4 kbのpoly-I、poly-C分子を

アニールし高温にさらして二重鎖長を約 0.4 kbp に揃えた PIC) を対照区とし、PBS (pH7.4) 溶液における 25℃の保存安定性試験を実施した。PIC400-400CA は 1 ヶ月目から統計的に有意な二重鎖長の減少が観察されたが、uPIC100-400 は、試験期間中の 4 ヶ月間、有意な二重鎖長の減少は認められなかった。poly-I 分子が非酵素的な加水分解を受けやすい RNA であることを踏まえると、uPIC100-400 分子の高い保存安定性は、poly-C 鎖に切断点がない二重鎖構造に帰する可能性が考えられた。

第 3 章では、第 1 章で作製した二重鎖構造の異なる PIC のアジュバント効果を調べるために、自然免疫における dsRNA のリガンドの応答性をリポーター細胞を用いて評価した。Toll 様受容体 3 (TLR3) は、特定の免疫担当細胞や線維芽細胞で発現し、主にエンドソームに局在するリガンドである。ヒト由来 TLR3 リポーター細胞とマウス由来 TLR3 リポーター細胞の評価において、同等塩基長の PIC 同士でも二重鎖を構成する poly-I 分子が 0.07 kb 以下であれば TLR3 の応答性が著しく低下することが判明した。種間の違いは認められなかった。一方、RNA ヘリカーゼ系のリガンド (RLR) の応答性は、poly-I 分子、poly-C 分子の塩基長の影響は受けないことが確かめられた。こうして明らかとなった poly-I 分子の塩基長が異なる PIC に対する TLR3 と RLR の応答の違いが *in vivo* のアジュバント活性にどのような影響をもたらすのか調べるために、PIC400-400CA と同等の TLR3、RLR 応答性が得られる uPIC100-400、および TLR3 の応答性のみが劣る uPIC50-400 を選抜し、マウスの感染実験に進んだ。

第 4 章では、経鼻インフルエンザワクチンの上気道感染マウスモデルを用いて PIC の二重鎖構造とアジュバント作用の関係について探求した。PIC400-400CA、uPIC100-400、uPIC50-400 の 3 つの短鎖 PIC、および長鎖 PIC を個別に配合した不活化インフルエンザワクチンをマウスに 2 回経鼻接種し、ウイルス感染後に誘導されるヘマグルチニン特異的 IgG、IgA 抗体価と鼻腔洗浄液中のウイルス価を測定した。uPIC100-400 添加区は、PIC400-400CA 添加区と同等のウイルス抑制効果を示し、IgA 抗体産生量は PIC400-400CA を上回った。これらの結果から、uPIC100-400 の二重鎖構造がアジュバントとして機能し、その活性は一般的な二重鎖構造に対して非劣性であることが実証された。これらのウイルス増殖抑制効果は免疫賦活化作用の強い長鎖 PIC よりも劣ったが、uPIC100-400 のアジュバント効果は配合量を 2 倍にすることで長鎖 PIC と同等に向上することがその後の研究で実証されている。一方で、uPIC50-400 はアジュバント効果が著しく劣る結果となった。uPIC100-400 と uPIC50-400 のアジュバント効果の違いから、経鼻不活化インフルエンザワクチンのアジュバント効果が TLR3 経路のシグナル伝達を介して発揮されることが示唆された。

第 5 章では、PIC 二重鎖構造と毒性との関連性を調べるために、poly-I 分子の塩基長が異なる 4 種の PIC および長鎖 PIC をマウス腹腔内に単回投与し、急性期の様子を比較した。腹腔内投与後に観察された毒性症状は二重鎖長を 0.4 kbp に短縮することで低減することが示された。また、より短い塩基長の poly-I 分子で構成される PIC の毒性はさらに低減し、uPIC100-400 分子の最小致死量 LD₀ は PIC400-400CA の 2 倍に上昇した。これらの結果から、uPIC100-400 の二重鎖構造は毒性の低減に寄与し、アジュバントとしての有効範囲が拡大することが示された。poly-I 分子の短鎖化による腹腔内投与毒性の低下効果は、リボヌクレアーゼによる二重鎖の切断長と関係することが酵素実験から推定された。

以上の研究により、PIC アニール時に生じる二重鎖長の伸長は、uPIC100-400 分子として提示した二重鎖構造を採用することで完全に解消することが示された。この構造は PIC の保存安定性を大きく改善することも明らかとなった。本研究を通して開発した PIC 二重鎖長の安定化技術は、PIC の有効域と毒性域の特定作業を加速し、経鼻インフルエンザワクチンの開発に貢献するものであり、本研究の成果が人々の健康増進に貢献し得るものと考えられる。