



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博 士 (農学)

氏名 中 野 哲 郎

審査担当者	主 査	教 授	曾 根 輝 雄
	副 査	教 授	園 山 慶
	副 査	教 授	石 塚 敏
	副 査	特任教授	松 本 美佐子 (青森大学)

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

本論文は英文 103 頁、図 20、表 8、6 章からなり、参考論文 1 編が付されている。

呼吸器感染症予防ワクチンの有効性の向上を目指し、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核酸(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ている。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)が二重らせんを形成した非天然型の dsRNA である。この PIC を配合した経鼻インフルエンザワクチンは、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一方で、高用量の PIC 投与が他の疾患の動物モデルの病態を増悪させることもあり、免疫賦活作用に関わる PIC の鎖長制御技術の開発が課題であることを示した。

第 2 章では、PIC 製造工程内の二重鎖長の変動が、核酸分子がアニーリング時に数珠つなぎに伸長することに起因することを示した。さらに、poly-I、poly-C 分子の物理化学的性質の違いに着目して、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 である。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) を対照区として PBS(pH7.4)溶液における 25℃、4 ヶ月間の保存安定性を比較した試験では、有意な二重鎖長の減少は認められなかった。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。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。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。

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することが実証された。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。

以上、本研究は鎖長の異なる核酸分子を用いた新たな PIC 製造法の有効性を示すとともに、製造された PIC 分子の保存安定性をも大きく改善することも明らかとなった。また本研究の成果は 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、人類の健康増進に貢献し得るものと考えられる。

よって、審査員一同は、中野哲郎が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。