

マウス脾臓 B 細胞の IgA 産生を指標とした 粘膜アジュバントとしての天然化合物の探索

山崎 (屋敷) 思乃, 宮本 (山口) 朋美, 柳橋 努,
田部井 美樹, 松永 孝之, 高津 聖志

Screening of natural compounds for mucosal adjuvant as indicator of IgA production from murine B lymphocytes

Shino YAMASAKI-YASHIKI, Tomomi YAMAGUCHI-MIYAMOTO,
Tsutomu YANAGIBASHI, Miki TABELI, Takayuki MATSUNAGA,
Kiyoshi TAKATSU

要 約

経鼻投与型インフルエンザワクチンは、粘膜上に分泌型の免疫グロブリン (Immunoglobulin; Ig) A 抗体 (以下, IgA と表記) を誘導するため, ウイルスの感染予防に有効である。しかし, 効率よく IgA を誘導するには粘膜免疫を活性化するアジュバント (免疫増強剤) が必要である。本研究では, B 細胞の *in vitro* での IgA 産生誘導機構を利用して, IgA 産生を増強するアジュバント活性を有する天然化合物をスクリーニングにより見出すことを目的とした。マウス脾臓 B 細胞を用いて, 粘膜アジュバントとして有効性が確認されている二本鎖 RNA である poly (I:C) による IgA 産生誘導系を見出し, これをもとに IgA 産生を指標としたスクリーニング系を構築した。新たに構築したこの評価系は, アジュバント候補化合物の探索に有用であると考えられる。

Summary

Nasal spray vaccine against influenza virus is effective for protection against infection with the virus by immunoglobulin (Ig) A secreted on the mucosal surface. To improve the efficiency of the vaccine, adjuvant is necessary for induction of appropriate mucosal immune response such as IgA secretion. In this study, we aimed to screen safe and efficient mucosal adjuvant candidates, which have ability to induce IgA secretion, among natural compounds. We found that poly (I:C) known as strong mucosal adjuvant induced IgA from murine splenic B lymphocytes by co-stimulated with retinoic acid (RA) and interleukin (IL)-5 *in vitro*. We developed screening culture system based on the IgA production mechanism by poly (I:C), RA and IL-5 using B lymphocytes. This screening culture system can be useful to search for an adjuvant candidate compound.

キーワード: 粘膜ワクチン, インフルエンザ, アジュバント, B 細胞, 抗体産生, IgA

Key words: Mucosal vaccine, Influenza, Adjuvant, B lymphocyte, Immunoglobulin production, IgA

インフルエンザ感染症の予防にはワクチンが最も有効な手段である。しかし, 現行の皮下注射型のワクチンでは全身系免疫に関わる IgG を血液中に誘導するが, ウイルスの感染防御に重要な IgA を粘膜上に誘導することができないため, 期待できる効果は感染の予防ではなく, 重症化の予防でしかない¹⁾。しかも, ワクチン株と流行株が異なる場合, その効果は極めて低くなる。一方, 粘膜上に分泌される IgA は異なる亜型のウイルスに対しても感染を防御することができることから, 粘膜免疫の活性化により IgA 産生を効率よく誘導する経鼻粘膜ワクチン接種が注目され

ている。しかし, 皮下注射型ワクチンと同じ成分を経鼻粘膜投与しても粘膜免疫は十分に活性化されず, ワクチン成分以外に粘膜免疫を増強する物質である「アジュバント (免疫増強剤)」が必要となる。

これまでに, 粘膜アジュバントとしてコレラ毒素などの細菌毒素に有効性が認められてきたが²⁾, 臨床試験において顔面神経麻痺が見られたことから使用は認められていない。また, 自然免疫に関わる Toll 様受容体 (Toll like receptor; TLR) 3 のリガンドで二本鎖 RNA の poly (I:C) に粘膜アジュバントとしての有効性が認められているが³⁾,

毒性などの問題からヒトでの応用には至っておらず、安全かつ効果的な粘膜アジュバントの開発が急務となっている。

そこで、本研究では、安全かつ効果的なアジュバントの開発を目指し、主に植物などに含まれ、極微量で生理活性をもたらす天然化合物に着目し、天然化合物に新たに粘膜アジュバントとしての活性を見出すこととした。特に、粘膜ワクチンではいかに粘膜上に IgA 産生を誘導するかが重要であることから、アジュバント活性として IgA 産生増強作用に着目し、B 細胞の IgA 産生を指標とした *in vitro* スクリーニング系を構築し、IgA 産生を増強する天然化合物のスクリーニングを実施することで、新規粘膜アジュバントを得ることを目的とした。

In vitro における B 細胞からの IgA 産生誘導には、① 数回の細胞分裂、② TGF- β (transforming growth factor- β) やレチノイン酸 (retinoic acid; RA), TNF (Tumor necrosis factor) ファミリーの BAFF (B cell activating factor) や APRIL (a proliferation-inducing ligand) などによる IgA クラススイッチ組換え、③ インターロイキン (interleukin; IL)-2 や IL-5 などのサイトカインによる IgA 産生細胞への分化の過程が必要である⁴⁻⁶⁾。これまでに、TLR4 リガンドであるリポ多糖 LPS と IL-5 の存在下、TGF- β あるいは RA により IgA 産生が誘導される培養系を中心に研究が進められてきた^{7,8)}。生体内では TLR3 リガンドである poly (I:C) をアジュバントとしてインフルエンザワクチンを経鼻的に接種すると IgA 産生を誘導するが、*in vitro* での poly (I:C) による IgA 産生誘導機構について検討した報告は調べた限りにおいてない。

このような背景から、効果的に IgA 産生を誘導するアジュバント化合物の探索には、細胞レベルで poly (I:C) 刺激により IgA が産生される条件を見出し、その機構を理解する必要がある。今回、我々はマウス脾臓 B 細胞を用いた poly (I:C) 刺激による IgA 産生誘導系を確立したので報告する。

実験方法

1. 実験試薬

LPS 及び RA は Sigma 社より、poly (I:C), loxoribine 及び CpG B は InvivoGen 社から購入した。組換えマウス IL-5 は R&D systems 社から、IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 及び TGF- β は Peprotech 社から購入した。ビオチン化抗マウス CD43 抗体 (clone: S7), 抗マウス Fc γ 受容体抗体 (clone: 2.4G2) 及びストレプトアビジン結合磁気ビーズは BD Biosciences 社から購入した。

2. 細胞及び細胞培養

マウス脾臓 B 細胞は BALB/c マウス (7-9 週令, 雌性) より調製した。BALB/c マウスは三協ラボサービスより購入し、1~3 週間の予備飼育の後、実験に供した。マウスをイソフルラン麻酔下頸椎脱臼にて安楽死させた後、脾臓を摘出し、スライドガラスですりつぶして脾臓細胞を調製した。脾臓細胞を塩化アンモニウム/カリウム (ACK) 緩衝液中に懸濁し、2 分間静置して赤血球を除去した。2% ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) を含む Hanks' balanced salt solution (HBSS) にて 1.0×10^8 cells/ml に懸濁し、抗マウス Fc γ 受容体抗体を添加して氷上で 15 分間置いた後、抗マウス CD43-ビオチン抗体を 50 倍希釈で添加して氷上で 30 分間静置した。2% FBS を含む HBSS 緩衝液にて洗浄後、ストレプトアビジン結合磁気ビーズと混合して 8°C にて 30 分間静置した。磁気細胞分離装置 IMag (BD Biosciences 社) により CD43 陰性細胞を精製し、これを脾臓 B 細胞とした。フローサイトメトリーによる純度解析の結果、95% 以上が B220 陽性の B 細胞であった。培地として 10% FBS, 100 U/ml のペニシリン, 100 μ g/ml のストレプトマイシン及び 55 μ M の 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640 培地 (GIBCO[®]) を使用し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

3. TLR リガンドやサイトカイン刺激による抗体産生の評価

TLR リガンドが抗体産生に及ぼす影響を調べるために、B 細胞を所定濃度の各種 TLR リガンドで刺激した後、96 ウェル平底培養プレートに 2.0×10^5 cells/well となるように細胞を播種し、7 日間培養した。また、poly (I:C) による IgA 産生の誘導条件を調べるために、B 細胞を poly (I:C), TGF- β , RA 及び IL-5 を単独で、あるいは複数の組み合わせで刺激し、96 ウェル平底培養プレートに 2.0×10^5 cells/well となるように細胞を播種し、7 日間培養した。このとき、各因子の濃度は、poly (I:C) 10 μ g/ml, TGF- β 0.5 ng/ml, RA 10 nM 及び IL-5 5 ng/ml に設定した。培養後、培養プレートを 200 \times g で 10 分間遠心分離することで培養上清を採取し、抗体濃度を測定した。

4. 抗体産生量の測定

培養上清中の IgM 及び IgA 濃度は、それぞれ Mouse IgM ELISA Quantitation Set 及び Mouse IgA ELISA Quantitation Set (Bethyl 社) を用い、添付のプロトコルに従って定量した。

5. スクリーニング系の構築

スクリーニング系の構築は、IgA 産生がある程度誘導され、かつ化合物の添加により IgA 産生の増加が確認で

きるように, poly (I:C), RA 及び IL-5 の添加濃度を検討することで行った.

結 果

1. TLR リガンドが抗体産生に及ぼす影響

TLR 3, 4, 7 及び 9 のリガンドである poly (I:C), LPS, loxoribine 及び CpG B による刺激が B 細胞の抗体産生に及ぼす影響を調べた. IgM 産生において, 大腸菌由来の LPS により IgM 産生を顕著に増大することがわかった (Fig. 1). また, IgA 産生においても, 同様に LPS 刺激により IgA 産生が増大した. 粘膜アジュバントとして有効性が確認されている poly (I:C) 単独での刺激下では, IgM 及び IgA 産生のいずれもコントロール群と比較して変化がなかった.

2. IgA クラススイッチ組換え誘導因子が抗体産生に及ぼす影響

B 細胞を用いた *in vitro* 培養系では, LPS と TGF- β あるいは RA との共刺激により B 細胞に IgA クラススイッチ組換えが誘導され, さらに IL-5 刺激が抗体産生量を増大することが知られている. そこで, poly (I:C) と IgA クラススイッチ誘導因子である TGF- β あるいは RA, IL-5 による共刺激が抗体産生に及ぼす影響を検討した. Poly (I:C) 刺激下において, IL-5 の有無にかかわらず, TGF- β 刺激により IgA 産生は抑制された (Fig. 2a). また, IL-5 は単独で IgA 産生を増大させるが, poly (I:C) と IL-5 あるいは RA と IL-5 の共刺激を加えても, IgA 産生のさらなる増大は認められなかった. 一方で, poly (I:C), RA 及び IL-5 の共刺激下において, IgA 産生量が有意に増大し (Fig. 2b), これらの共刺激が顕著な IgA 産生を誘導することが分かった.

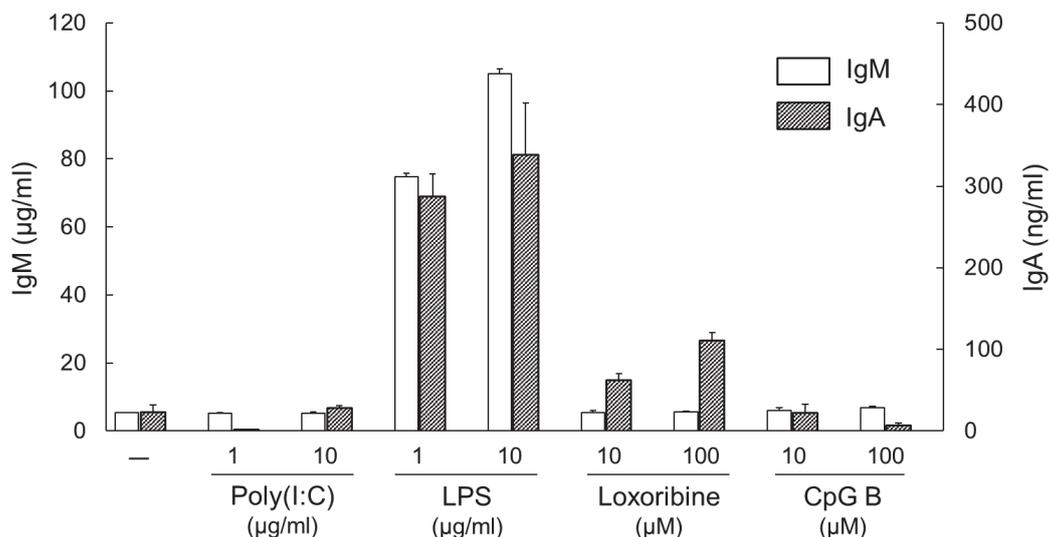


Fig. 1 Effects of stimulation with TLR ligands on production of IgM and IgA

Splenic B lymphocytes were stimulated with TLR ligands and cultured for 7 days. IgM and IgA concentrations in the supernatants were determined by ELISA. Error bars indicate the SD from the mean ($n = 3$).

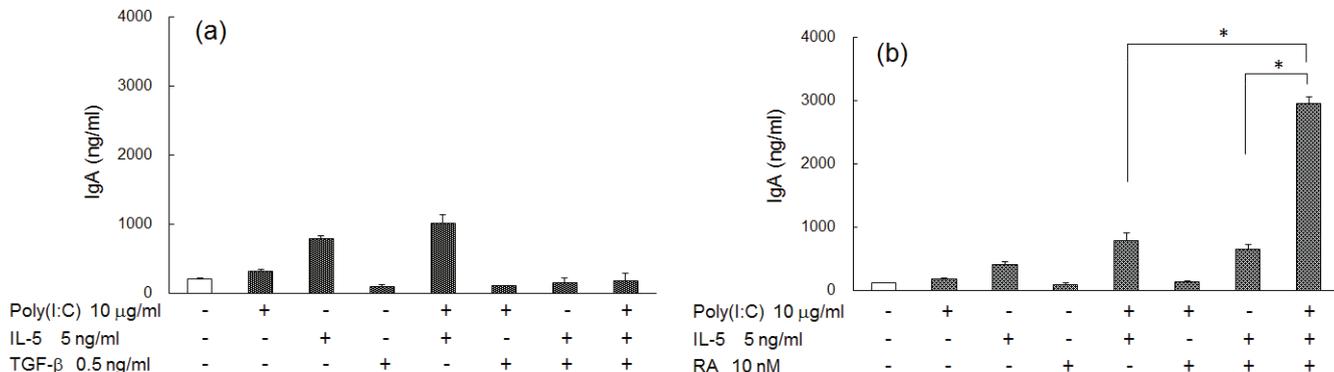


Fig. 2 IgA production induced by stimulation with poly (I:C)

(a) Splenic B lymphocytes were treated with poly (I:C), TGF- β and IL-5. (b) B lymphocytes were treated with poly (I:C), RA and IL-5. After culture for 7 days, IgA concentrations in the supernatant were determined by ELISA. Error bars indicate the SD from the mean ($n = 3$). * $P < 0.01$ (Student's t-test).

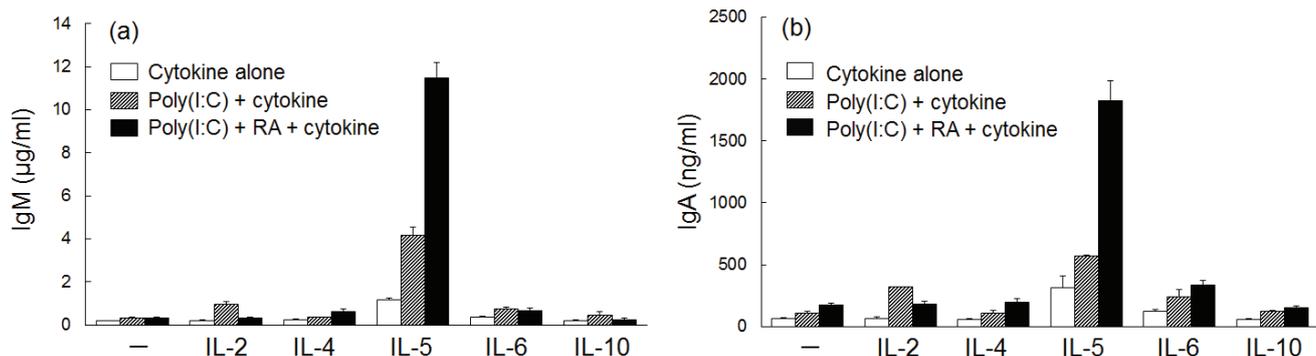


Fig. 3 Effects of cytokines on production of IgM and IgA by stimulation with poly (I:C) and RA

Splenic B lymphocytes were stimulated with poly (I:C), RA and several cytokines. After culture for 7 days, (a) IgM concentrations in the supernatants were determined by ELISA. (b) IgA concentrations in the supernatants were determined by ELISA. Error bars indicate the SD from the mean (n = 3).

3. サイトカインが抗体産生に及ぼす影響

Poly (I:C), RA 及び IL-5 の共刺激により IgA 産生が増強することが明らかとなったが, IL-5 以外のサイトカインとの共刺激が抗体産生にどのような影響を及ぼすかについても検討を行った. IL-2, IL-4, IL-6 及び IL-10 単独での刺激下では, IgM 及び IgA 産生の顕著な増加は認められなかった. 一方, IL-5 については, 単独, poly (I:C) との共刺激あるいは poly (I:C) と RA との共刺激のいずれにおいても, IgM 及び IgA 産生量が有意に増加した (Fig. 3).

4. IgA 産生誘導系を用いたスクリーニング系の構築

Poly (I:C) 及び IL-5 存在下, RA の濃度依存的に IgA 産生が誘導されることを利用し, poly (I:C), RA 及び IL-5 の濃度をそれぞれ 5 µg/ml, 1 nM 及び 5 ng/ml に設定することで, IgA 産生を指標とした粘膜アジュバントのスクリーニング系を構築した (データは示していない).

考 察

我々は, これまでに培養細胞を用いた *in vitro* での免疫評価系を構築し, 天然化合物をはじめとする様々な化合物の生活習慣病などに対する薬効評価を行ってきた⁹⁻¹²⁾. 安全かつ効果的な粘膜アジュバントの開発においても適切な *in vitro* 評価系を確立し, 各種化合物の粘膜アジュバントとしての有効性を評価できれば, 新たな作用機序を有するアジュバント化合物を獲得できる可能性が高い. そこで, 粘膜免疫において重要な因子である IgA の産生を指標とした *in vitro* 評価系を構築し, IgA 産生を増強する天然化合物のスクリーニングを行うことで効果的かつ安全な粘膜アジュバントの開発を進めてきた.

粘膜免疫に特徴的な IgA の産生誘導機構については, 腸管粘膜免疫においてはいくつかの知見が得られているが,

鼻腔粘膜における粘膜免疫応答機構に関しては明らかになっていない点が多い. 腸管粘膜における B 細胞の IgA 産生誘導の作用機序を例にとると, IgM 陽性 B 細胞に, T 細胞依存性経路では T 細胞からの刺激と TGF-β により, T 細胞非依存性経路では腸内細菌などによる TLR リガンドの刺激と RA, あるいは BAFF や APRIL により IgA クラススイッチが誘導されて IgA 陽性細胞となり, IL-2, IL-5 や IL-6 などのサイトカインが IgA 産生細胞への分化を誘導することが知られている⁴⁻⁶⁾. *In vitro* の検討において, ウイルス認識に関与しているといわれる TLR 3, 4, 7 及び 9¹³⁾ の TLR リガンドごとに IgM 及び IgA 産生には差異があり, LPS による刺激は IgM 及び IgA 産生を顕著に増強することがわかった (Fig. 1). この IgM 及び IgA 産生量の増加は, LPS 刺激による細胞増殖の促進により, もともと存在していた IgM 陽性細胞数及び IgA 陽性細胞数が増加した結果であり, IgA クラススイッチ組換えは誘導されていないものと推察される. 一方, poly (I:C) による細胞増殖はほとんど見られず, IgM 及び IgA 産生量はコントロール群と同程度であった.

In vivo において poly (I:C) がインフルエンザワクチンの粘膜アジュバントとしてワクチン抗原特異的な IgA を産生するが, その作用機序は明らかとなっていない. そこで, *in vitro* での B 細胞培養系において poly (I:C) による IgA クラススイッチ誘導に関与する各種因子による刺激を検討したところ, 興味深いことに, IgA 産生を誘導するのは, poly (I:C) と TGF-β との共刺激ではなく, poly (I:C) と RA 及び IL-5 の共刺激であることが明らかとなった (Fig. 2a, b). また, LPS と RA との共刺激系において, IL-2 と IL-5 は同程度に IgA 産生を増大させることが報告されているが⁸⁾, poly (I:C) と RA との共刺激系においては, IL-5 のみが顕著に IgA 産生を増加させた (Fig. 3b). さらに, poly (I:C) と RA との共刺激系では, それらの単独での刺激と比較して IgA 産生の増加は認められなかつ

たが, poly (I:C), RA 及び IL-5 の共刺激により有意に IgA 産生が増加した. これらの結果より, poly (I:C), RA 及び IL-5 の共刺激がB細胞のIgAクラススイッチ組換え誘導し, しかも, LPS と RA による IgA 産生誘導とは異なる機序で作用しているものと推察される. 一方で, 破傷風毒素ワクチンに poly (I:C) と RA とを併用することで, IgG 陽性細胞数が増加し, さらには抗体産生細胞への分化が促進され, IgG 産生が増大することが報告されている¹⁴⁾. 今後, poly (I:C), RA 及び IL-5 による IgA 産生誘導系において, IgA クラススイッチ組換え及び IgA 産生細胞への分化について, どの因子がどのように作用しているのかを明らかにしていく予定である.

本研究で確立した poly (I:C), RA 及び IL-5 の共刺激による IgA 産生誘導系をもとに, IgA 産生を指標として, これまでに100種類以上の天然化合物についてスクリーニングを行っている. いくつかの化合物に IgA 産生増強作用を見出しており, 本研究で構築した評価系は粘膜アジュバントの探索に応用できると考えられる. また, このスクリーニング系をもとに TLR リガンドなどの刺激を検討することで, 粘膜アジュバントとしての有効性の評価系としての利用に限らず, 例えば, 感染症予防や腸内環境の恒常性の維持に関わる腸管での IgA 産生を増強する食品成分の評価など, より広範囲の化合物の一次スクリーニング系として応用できると期待される.

謝 辞

本研究は, 一般財団法人化学及血清療法研究所, デンカ生研株式会社, 及び一般財団法人阪大微生物病研究会との共同研究「ワクチン用新規アジュバント開発のための基盤研究プロジェクト (代表者: 高津 聖志, 富山県薬事研究所)」として実施された. 各企業の方々に心より感謝申し上げます.

参考文献

- 1) Brandtzaeg P., Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions., *Scand J Immunol.*, **70** (6), 505-515 (2009)
- 2) Elson CO., Ealding W., Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin., *J Immunol.*, **132** (6), 2736-2741 (1984)
- 3) Ichinohe T., Watanabe I., Ito S., Fujii H., Moriyama M., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Chiba J., Kurata T., Sata T., Hasegawa H., Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection., *J Virol.*, **79**(5), 2910-2919 (2005)
- 4) Sonoda H., Matsumoto R., Hitoshi Y., Ishii T., Sugimoto M., Araki S., Tominaga A., Yamaguchi N., and Takatsu K., Transforming growth factor beta induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production., *J. Exp. Med.*, **170** (4), 1415-1420 (1989)
- 5) Coffman RL., Leberman DA., Rothman P., Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching., *Adv Immunol.*, **54**, 229-270 (1993)
- 6) Cerutti A., The regulation of IgA class switching., *Nat Rev Immunol*, **8** (6), 421-434 (2008)
- 7) Sonoda E., Hitoshi Y., Yamaguchi N., Ishii T., Tominaga A., Araki S., Takatsu K., Differential regulation of IgA production by TGF-beta and IL-5: TGF-beta induces surface IgA-positive cells bearing IL-5 receptor, whereas IL-5 promotes their survival and maturation into IgA-secreting cells., *Cell Immunol.*, **140** (1), 158-172 (1992)
- 8) Tokuyama H., Tokuyama Y., The regulatory effects of all-trans-retinoic acid on isotype switching: retinoic acid induces IgA switch rearrangement in cooperation with IL-5 and inhibits IgG1 switching., *Cell Immunol.*, **192**(1), 41-47 (1992)
- 9) 小笠原勝, 生谷尚士, 刈米アイ, 長井良憲, 松永孝之, がん細胞による免疫抑制を克服する天然薬物の探索, 富山県薬事研究所年報, **38**, 21-27 (2011)
- 10) 松永孝之, 小笠原勝, 高津聖志, 膵臓β細胞のリボース誘発細胞死に対する保護効果を有する天然物の探索, 富山県薬事研究所年報, **39**, 17-20 (2012)
- 11) 宮本 (山口) 朋美, 本田裕恵, 田村隆幸, 横田洋一, 松永孝之, シャクヤクの品種別薬理試験 (4) シャクヤクエキスの Prostaglandin E2 (PGE2) 産生抑制作用, 富山県薬事研究所年報, **40**, 33-38 (2013)
- 12) 本田裕恵, 宮本 (山口) 朋美, 横田洋一, 田村隆幸, 松永孝之, シャクヤクの品種別薬理試験 (5) シャクヤクエキスの IL-6 産生抑制効果に関する検討, 富山県薬事研究所年報, **40**, 39-45 (2013)
- 13) 植松智, 審良静男, TLR ファミリーとウイルス感染, ウイルス, **54**(2), 145-152 (2004)
- 14) Ma Y., Ross AC., Toll-Like receptor 3 ligand and retinoic acid enhance germinal center formation and increase the tetanus toxoid vaccine response, *Clin Vaccine Immunol.*, **16**(10), 1476-1484 (2009)