

研究報告書

「エクソソーム RNA 解析によるインフルエンザの予防・診断・治療基盤技術の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 11 月～2019 年 3 月

研究者: 押海 裕之

1. 研究のねらい

季節性インフルエンザは毎年流行し、一年あたり、わが国で数千人の死亡に繋がる深刻な感染症の一つである。その予防のために毎年ワクチンが接種されている。現在の日本で使われているインフルエンザワクチンは、ウイルスの HA タンパク質画分を精製したスプリットワクチンである。これは、予防効果があまり高くないことが知られている。そのためワクチンを接種したにも関わらずインフルエンザを発症し、亡くなるケースも多い。

インフルエンザワクチンには、現行のスプリットワクチンの他に、ウイルス粒子全体をホルマリンなどで固定した不活化全粒子ワクチンが存在する。これは、スプリットワクチンと比較すると予防効果が格段に高いことが知られている。そのため、2009 年の新型インフルエンザの流行時には、この全粒子ワクチンが予防のために作成された。日本では、全粒子ワクチンは 1960 年代頃まで使用されていたが、副反応の頻度が高いために、スプリットワクチンへと切り替えられた。

このような副反応が原因となりワクチンが切り替えられたり使用が見送られたりすることは、これまでも繰り返されている。最近のケースでは、子宮頸がんの予防のために開発された Human papillomavirus (HPV) ワクチンでは、副反応への恐怖心から定期接種であるにも関わらず、接種率が 1% に満たない状況になっている。

インフルエンザワクチンや HPV ワクチンなどのように、ウイルスの一部のタンパク質やウイルス粒子全体を用いた、いわゆる不活化ワクチンについて、よく現れる共通した副反応は、接種局所での発赤・疼痛・腫脹に加えて、全身の発熱である。しかし、ワクチンの副反応は全ての人に現れるわけではなく個人差がある。しかし、この個人差の原因は解明されていない。

副反応の問題は深刻であるにも関わらず、現在、副反応を未然に防ぐための方策としては、接種当日の体温測定や医師による問診のみであり、副反応リスクを調べる検査などの科学的な方法は全く存在しない。このような現状は、ワクチンの副反応についての懸念を解消して欲しいとの社会的要請を全く無視するものである。

そこで、本研究では、特に、インフルエンザワクチンの副反応に焦点を絞り、副反応が生じるメカニズムを解明することで、副反応リスクを予測する検査方法を開発することを目的として研究を進めた。

2. 研究成果

(1) 概要

ワクチンの副反応として知られる局所での炎症・発赤・疼痛と全身の発熱は、ワクチンの成分に対する自然免疫応答が原因である。特に、マクロファージなどが産生する炎症性サイトカインは、血管透過性を亢進したり、あるいは、内因性発熱物質として働いたりすることで副反応を誘導する。実施に、臨床試験でも副反応が現れる人では、血中の炎症性サイトカイン産生が上昇することが観察されている。

このような自然免疫のメカニズムとして、Zyxin と呼ばれていたタンパク質が、I 型インターフェロンや IL-6 などの炎症性サイトカイン産生に重要な役割をすることを発見し、そのメカニズムを解明した (Kouwaki T et al., Scientific Reports 2017)。また、自然免疫応答に影響を与える新たな因子としての細胞外小胞に着目し研究を進めたところ、肝細胞から放出される細胞外小胞がマクロファージによる NK 細胞活性化を制御することを発見した (Kouwaki T et al.,

Front. Immunol 2016)。

このような細胞外小胞が自然免疫を制御するメカニズムとして、microRNA が重要な役割をすることを発見したことから (Fukushima Y et al., BBRC 2018)、ヒトの血液中に含まれる microRNA について網羅的に解析をしたところ、miR-451a と呼ばれる microRNA が豊富に存在すること、これが、数ヶ月をかけてゆっくりと変動すること、また、細胞外小胞内の miR-451a が生体内でのマクロファージの自然免疫応答の強さを制御することを発見した (Okamoto M et al., JBC 2018)。これらの発見をもとに、インフルエンザワクチンを含む不活化ワクチンによる副反応を予測する方法として、血中の細胞外小胞内 microRNA をバイオマーカーとできることを発見し特許を出願した。

このような発見は、ワクチン接種後の副反応リスクを予め調べる検査キットとして今後臨床応用可能であると期待される。一方で、炎症性サイトカインはオプジーボなどのような抗腫瘍免疫の効果にも非常に重要であることを我々は発見しており (Tsukamoto H et al., Cancer Reports 2018)、がん免疫療法にも、我々の成果を応用していけると期待される。

(2) 詳細

「インフルエンザ感染とワクチン投与後のエクソソーム RNA の網羅的解析」

マウス動物モデルを用いたインフルエンザ感染実験では、感染群と非感染群のマウス血清から細胞外小胞を精製し、細胞外小胞内の microRNA を RNA-Seq 法により網羅的に解析したところ、感染により発現が変動する microRNA 群を同定した。また、健康人の血清から細胞外小胞を抽出し、その microRNA をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。これらの網羅的な解析結果から、miR-451a として知られる microRNA がヒト血清に非常に豊富に存在すること、これが、インフルエンザ感染やインフルエンザワクチンの成分に応答して発現が変動することを発見した。また、この miR-451a は、普段の生活では殆ど変動しないが、数ヶ月をかけて非常にゆっくりと変動し、その変動幅は、10 倍程度であることを明らかとした。

「エクソソーム内 RNA を指標とした新たなバイオマーカーの同定」

ワクチン成分に応答した炎症性サイトカインの産生量について、ヒト血清とマクロファージ細胞を用いて、その相関関係を上記の網羅的解析データを基に比較したところ、miR-451a が、マクロファージが産生する炎症性サイトカイン量と統計的に有意に相関することを発見した。また、miR-451a 以外の microRNA として、miR-5100, miR-7704 などが、炎症性サイトカイン産生量と非常に強い相関を示すことを明らかとした。

健康人6人の血清細胞外小胞内microRNAのマイクロアレイ解析



図 血中細胞外小胞内microRNAのマイクロアレイ解析

健康人6人から採血し、血清を調整後に細胞外小胞を調整した。細胞外小胞内のRNAを抽出し、microRNAを網羅的にマイクロアレイ法で解析した。

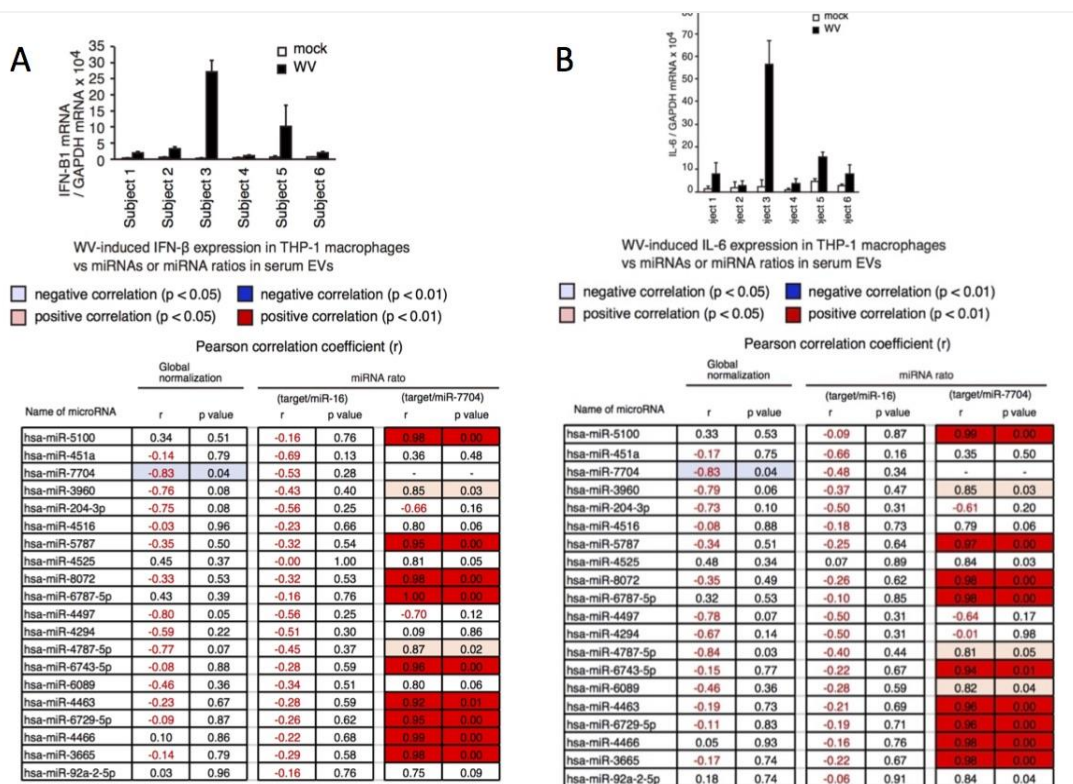


図 血中細胞外小胞内microRNAと炎症の強さとの相関

前の図のマイクロアレイ解析に用いた6人の健康人サンプルについて、その血清を用いてマクロファージを2日間培養した。マクロファージの培養液に、季節性インフルエンザ全粒子ワクチン (wv) を添加し、マクロファージから産生されるI型インターフェロン量(A)、IL-6量(B)を測定した。それぞれのサイトカインの産生量と、マイクロアレイで求めた血中細胞外小胞内microRNA量との相関を調べた。赤は正の相関を、青は負の相関を示す。Global normalizationは、全RNA量で、個々のmicroRNA量を補正した値。miRNA ratioは、miR-16またはmiR-7704との相対的な発現量を示す。(r:相関係数)

これらの相関が、生体内でも生じるかを調べるために、マウス動物モデルを用いて調べてみた。ワクチン接種前日にマウス尾静脈より採血し、血中細胞外小胞内 microRNA 量を測定した。その後、マウスにインフルエンザ全粒子ワクチンを接種し、接種後の炎症の強さを、IP-10量を指標として観察した。結果、血中細胞外小胞内 miR-451a 量は、副反応の原因となる炎症性応答の強さと有意に相関することを発見した。これは、血中の細胞外小胞内 microRNA が副反応を予測する検査のバイオマーカーとして有効であることを示唆する。

現在は、季節性インフルエンザワクチン接種について、ヒトでの臨床試験を実施中である。臨床試験に於いては、季節性インフルエンザワクチン接種前に採血し、血中細胞外小胞内 microRNA を測定する。そして、ワクチンを接種した後の副反応の有無と、microRNA 量との相関を調べる。

このような副反応リスクを検査する方法を体外診断用医薬品として承認を得るためには、そのメカニズムの解明が重要である。そこで、このメカニズムの解明に取り組んだ。

細胞外小胞は、microRNA を細胞から細胞へと伝達し、細胞間情報伝達を担う。そこで、血中の細胞外小胞が microRNA を生体内の細胞へと伝達できるかどうかを調べたところ、細胞外小胞はマクロファージや樹状細胞の細胞質内へと RNA を伝達できることを発見した。その

ため、マウス個体に於いて、血中細胞外小胞内 miR-451a 量は、脾臓の樹状細胞内の miR-451a 量と強く相関した。これは、血中の細胞外小胞が、miR-451a を脾臓の受容細胞内へと伝達することを示唆する。

miR-451a は 14-3-3ζ をターゲットとして、その機能を抑制しサイトカイン産生を抑制することが知られている。実際に、miR-451a が、ワクチン成分に応答したマクロファージ

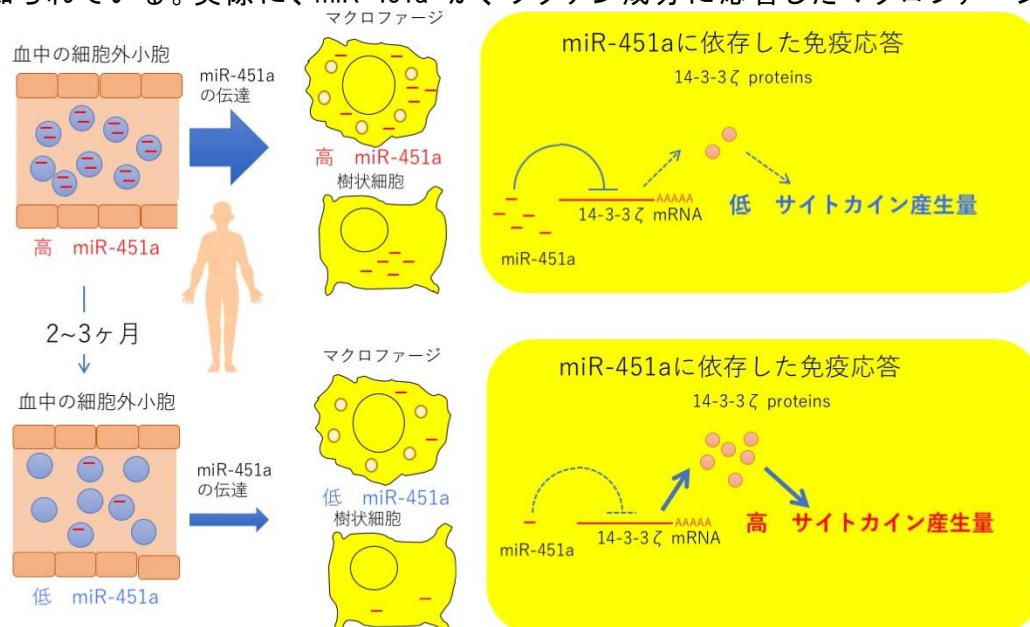


図 血中の細胞外小胞が炎症性サイトカイン産生量を制御するメカニズム

血中には多量の細胞外小胞が存在し、miR-451aを含む。このmiR-451a量は緩やかに変化する。細胞外小胞はmiR-451aを生体内の樹状細胞やマクロファージへと運ぶため、血中の細胞外小胞内miR-451a量に依存して、樹状細胞やマクロファージ内のmiR-451a量も変化する。取り込まれたmiR-451aは14-3-3ζの発現を抑制し、炎症性サイトカイン産生量を抑制する。

の炎症性サイトカイン産生を抑制したことから、血中の細胞外小胞が miR-451a を生体内のマクロファージや樹状細胞に運ぶことで、運ばれた miR-451a が 14-3-3ζ の発現抑制を介して炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。

血中の細胞外小胞のその他の microRNA である miR-5100 や miR-7704 についても、標的分子は未同定であるが、インフルエンザワクチンの成分に応答した炎症性サイトカイン産生を制御することが明らかとなった。

これらのことから、血中の細胞外小胞が、microRNA を介してマクロファージや樹状細胞などの炎症性サイトカイン産生を制御すること、そのため、これらの microRNA をバイオマーカーとして、炎症性サイトカインが原因となる副反応の有無を予測できると考えられる。

「インフルエンザ重症化メカニズムの解明」

インフルエンザの重症化の原因やメカニズムについては不明であるが、インフルエンザ感染により誘導される炎症性サイトカインによるサイトカインストーム説が提唱されている。インフルエンザウイルスは細胞内へと侵入すると RIG-I と呼ばれるウイルス認識センサーにより認識される。RIG-I はミトコンドリア外膜上に存在するアダプター分子である MAVS を介して I 型インターフェロンや炎症性サイトカイン産生の発現を誘導する。我々は、この RIG-I と MAVS との結合を仲介する分子として Zyxin 分子を発見した。Zyxin はインフルエンザウイルス感染時の炎症性サイトカインの産生を亢進した。このことから、インフルエンザの重症化には Zyxin 遺伝子の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) などが関与する可能性も考えられる。

3. 今後の展開

今回の研究から、ワクチン接種後副反応の原因となる過剰な炎症について、血中の細胞外

小胞内 microRNA が有用なバイオマーカーとなることを発見した。これを踏まえて、副反応を予め予測する診断法や検査キットを開発するために、現在臨床試験を実施中である。ワクチンとしては、現在普及している HA スプリットワクチンを用いているが、来年度以降は、HPV ワクチンなどの他の不活化ワクチンにも対象を広げ臨床試験を実施する予定である。これらの臨床試験で、副反応リスクが予測できることを実証することで、副反応のリスクを事前に予測する検査キットの開発や診断法の開発を行う。

HPV ワクチンによる副反応への懸念は、ワクチン接種率を大きく減少させている。HPV ワクチンの予防効果は 50%程度と推定されており、年間 1,000 人ほどの女性の命を救い、5,000 人ほどの子宮頸がんの発症を予防できると期待されている。しかし、接種率が 1%未満にまで低下しており、これら救われるべき人たちが取り残されている。そのため、本研究で得られた成果を HPV ワクチンなどの他のワクチンにも応用することで、副反応への懸念が無くなり、安全に安心してワクチンが接種できる時代が来ると期待される。

自動車などでは事故での怪我を防ぐためにチャイルドシートやシートベルトが義務化されている。ワクチンは感染症の予防のために非常に重要であるが、ある一定の割合で副反応が現れるのも事実である。ワクチンの副反応を予め予測できるようになれば、副反応リスクを予測する検査を推奨又は義務化することで、副反応頻度を減少させ、安全に安心してワクチンが接種できる時代が来ると期待される。

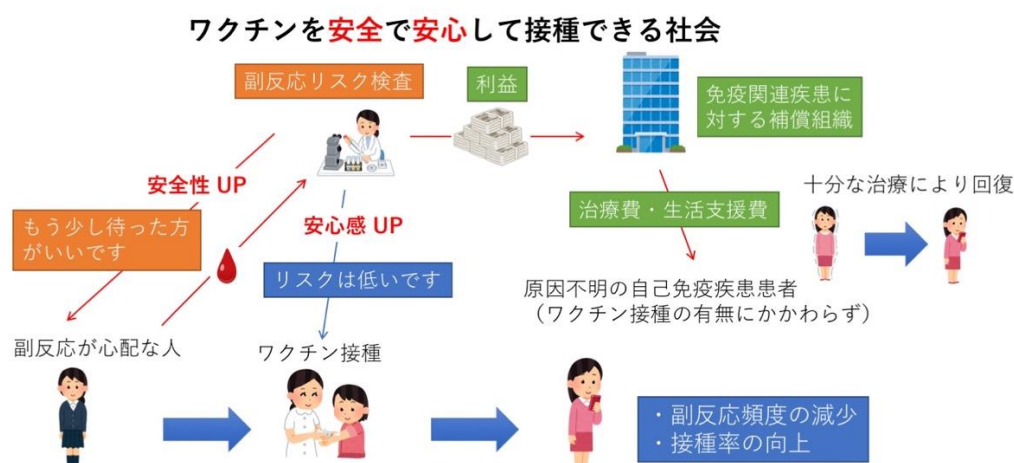


図 将来のワクチン行政への提言

インフルエンザワクチンやHPVワクチンなど、副反応への懸念から接種率が低下し、感染症による健康被害の増加が繰り返されている。副反応に対する懸念を解消して欲しいとの社会的要請に応えるため、副反応が生じるリスクを予め検査する方法を開発する。副反応への懸念がある人は、副反応リスクを予め検査し、リスクが高いと判断されれば接種を延期することができる。また、リスクが殆どないことが分かれば安心して接種できる。このような検査で得られたリスクを、原因不明の自己免疫疾患様の症状に苦しむ患者への支援にあてることで、十分な治療を受けることが可能となりより早い社会復帰が可能となる。

4. 自己評価

血液中の細胞外小胞内 microRNA の働きについては研究者の中でも意見が大きく分かっている。例えば、細胞外小胞が microRNA を細胞から細胞へと伝達することは既に広く唱えられているが、少なくない数の研究者が、そのような現象が存在しないと否定している。

本研究では、血中の細胞外小胞に焦点を絞り、miR-451a が非常に多量に含まれることを網羅的解析から明らかとした。一方で、細胞内には miR-451a が非常に少ないため、血中の細胞外小胞が、miR-451a を細胞内へと運ぶことで、細胞内の miR-451a 量を上昇させることを示した。しかし、このような現象は、細胞内に多く含まれ、細胞外小胞内には少ない miR-21 では観察されない。これは、例え細胞外小胞が miR-21 を細胞内へと運んだとしても、細胞内には既有多量の miR-21 が存在するために、細胞内 miR-21 量を変動させることができないことを意味する。これは、細胞外小胞が microRNA を細胞内へと伝達することが事実だとする研究者と事実でないとする研究者の一見した矛盾を説明できる。つまり、細胞外小胞は、上記の理由から、特定の

microRNAだけを運んでいるように見えるためである。これは細胞外小胞の研究の発展にとって非常に重要な概念になる。

ワクチンの副反応は、過剰な免疫応答と考えられてきた。過剰な免疫応答としては過敏反応（アレルギー）が知られる。過敏反応はゲル・クームスの分類による4種類の反応に分類されるが、何れも獲得免疫応答である。獲得免疫応答は抗原特異的な反応である。そのため、ワクチン接種当日から現れる接種局所での腫脹・発赤・疼痛を説明するには、ワクチン成分に対するIgEなどの特異抗体を予め持っていたとしか説明できない。しかし、ワクチンは未知の抗原、つまり初めての抗原を接種するのであり、上記の副反応が数%の人に現れることは全く説明できない。本研究では、自然免疫応答に着目し、1)血中の細胞外小胞内のmicroRNAが、ワクチン成分に対する自然免疫応答に強い影響を与えること、2)このmicroRNA量は日々の生活で緩やかに変動すること、3)このmicroRNAの変動量は、ワクチン成分に対する自然免疫応答の強さを変えること、を明らかにした。このことから、血中の細胞外小胞内のmicroRNAがワクチン成分に対する自然免疫としての炎症応答の強さに影響を与えると考えることで、ワクチン接種当日から現れる副反応に個人差があることを説明できる。現在、人での臨床試験を実施中であり、この仮説が正しいと検証できれば、ワクチン接種後の局所で生じる副反応が説明できるようになり、学術的な重要性は高い。

ワクチンに関する臨床試験を今年度実施しており、血中の細胞外小胞内のmicroRNAにより副反応を予測できるかどうかを検証することが可能である。当初の予定では、インフルエンザ全粒子ワクチンを用いる予定であったが、ワクチンメーカーなどの事情もあり、現状のHAワクチンでまず実証し、来年度以降に、全粒子ワクチンや、HPVワクチンなどの他のワクチンでも検証する予定である。

当初計画では、細胞外小胞内のRNAだけでなく、細胞外小胞のタンパク質成分との関連も調べる予定であったが、計画途中に、RNA成分が非常に重要であることが明らかとなったことから、タンパク質成分の比較は実施しなかった。

また、ワクチン接種後の重大な副反応であるギラン・バレー症候群などの発症予測については、未発表であるが、予測をする目処を得ており、今後、軽微な副反応と重大な副反応のリスク検査方法が開発できると期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Okamoto M, Fukushima Y, Kouwaki T, Daito T, Kohara M, Kida H, Oshiumi H. MicroRNA-451a in extracellular, blood-resident vesicles attenuates macrophages and dendritic cell responses to influenza whole-virus vaccine. *J. Biol. Chem.* 2018 293: 18585-18600.
2. Tsukamoto H, Fujieda K, Miyashita A, Fukushima S, Ikeda T, Kubo Y, Senju S, Ihn H, Nishimura Y, Oshiumi H. Combined Blockade of IL6 and PD-1/PD-L1 Signaling Abrogates Mutual Regulation of Their Immunosuppressive Effects in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* 78: 5011-5022. (IF = 9.13)
3. Fujikura D, Muramatsu D, Toyomane K, Chiba S, Daito T, Iwai A, Kouwaki T, Okamoto M, Higashi H, Kida H, Oshiumi H. *Aureobasidium pullulans*-cultured fluid induces IL-18 production, leading to Th1-polarization during influenza A virus infection. *J. Biochem* 2018 163: 31-38.
4. Kouwaki T, Okamoto M, Tsukamoto H, Fukushima Y, Matsumoto M, Seya T, Oshiumi H. Zyxin stabilizes RIG-I and MAVS interactions and promotes type I interferon response. *Sci. Rep.* 2017, 7: 11905
5. Kouwaki T, Fukushima Y, Daito T, Sanada T, Yamamoto N, Mifsud EJ, Leong CR, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Matsumoto M, Seya T, Oshiumi H. *Front. Immunol.*

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 押海裕之「ワクチン接種後副反応と血液中の細胞外小胞内 microRNA」
平成 30 年 3 月 14 日 4 大学感染症連携研究教育連合シンポジウム 招待講演
2. Oshiumi H and Okamoto M miR-451a in blood-circulating extracellular vesicles controls the innate immune response of macrophages. Keystone Symposium. (Canada) Feb. 20, 2018. Short Talk.
3. 押海裕之「インフルエンザ全粒子ワクチンに対する自然免疫応答での細胞外小胞の役割」
平成 29 年 6 月 30 日 第 27 回 日本生体防御学会学術集会 シンポジウム招待講演
4. 押海裕之「B 型肝炎ウイルスに対する自然免疫応答におけるエクソソームの役割」
平成 28 年 5 月 14 日 第 81 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
シンポジウム招待講演
5. 押海裕之「ウイルス感染症と自然免疫応答」
平成 27 年 12 月 6 日 皮膚科学会熊本地方会
シンポジウム招待講演