

1. インフルエンザウイルス認識機構とワクチン開発に関する研究

一戸 猛志

東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター 感染制御系 ウイルス学分野

細胞がウイルスの侵入をどう感知して、それがウイルス特異的な免疫応答の誘導にどう役立っているのか?を理解することは、効果的なワクチン開発に不可欠である。私たちはこれまでに、合成二本鎖 RNA の poly(I:C) が経鼻インフルエンザワクチンの効果的なアジュバントになることを明らかにしてきた。またインフルエンザウイルスの M2 タンパク質が、NLRP3 inflammasome を活性化させること、肺での inflammasomes の活性化や腸内細菌叢がインフルエンザウイルス特異的な免疫応答の誘導に必要であることを明らかにしてきた。これらは新しいインフルエンザワクチンの開発に役立つと期待される。

はじめに

インフルエンザ感染症は、我が国では毎年冬に流行が起り、高齢者での肺炎、幼児での脳症が致死性であり社会的な問題になっている。インフルエンザウイルスはその表面抗原として標的細胞への接着に必要なヘマグルチニン (HA) と、増殖したウイルスが細胞から遊離する時に必要なノイラミニダーゼ (NA) の 2 種類の糖タンパク質を持つ。これら HA と NA は同一の亜型内で毎年少しずつその抗原性を変化させるために (連続抗原変異, antigenic drift), ウイルスは巧みにヒトの免疫機構から逃れ流行し続ける。また 10 ~ 15 年くらいの周期で、鳥や豚など他の動物のインフルエンザウイルス遺伝子との組換えなどにより大きな変異を起こし (不連続抗原変異, antigenic shift), 新型のインフルエンザウイルスが出現する。2009 年にメキシコで発生した新型インフルエンザウイルスのパンデミック (世界的大流行) から明らかなように、我々は常に新型インフルエンザウイルスの出現と感染の危機にさらされてい

る²²⁾。また、どの型のインフルエンザウイルスがパンデミックを起こすのか予測できないため、新型インフルエンザウイルスに対するワクチンをあらかじめ準備しておくことは難しい。この問題を解決するひとつの方法として、異なる亜型に対しても感染防御効果 (交叉防御効果) が期待できるワクチンの開発がある。

Poly(I:C) 併用経鼻インフルエンザワクチン

インフルエンザウイルスに罹患したヒトは、その後数年間にわたって小さい変異のインフルエンザウイルスに再度感染しにくいことが疫学的に知られている (交叉防御効果)⁵⁾。この防御能は主にインフルエンザウイルスが自然感染した際に誘導される鼻粘膜上のウイルス特異的な分泌型 IgA 抗体によるものと考えられている³⁾。このように鼻粘膜上にウイルス特異的な分泌型 IgA 抗体を誘導するため、現行の不活化インフルエンザワクチン (HA ワクチン) を鼻腔内に噴霧して、粘膜免疫を誘導する試みが我が国を含むいくつかの国で続けられている。しかしインフルエンザウイルスに罹患した経験のない小児や免疫力が低下した高齢者においてはワクチンのみの接種では十分に粘膜免疫を誘導できない。この問題を解決するには、適当なアジュバントと共にこの不活化ワクチンを経鼻投与する必要がある。不活化経鼻インフルエンザワクチンの研究には、古くから粘膜ワクチンアジュバントとしてコレラトキシン (CT) や大腸菌易熱性毒素 (LT) が用いられてきた²⁹⁾。これらのアジュバントと共に HA ワクチンをマウスの鼻腔へ接種すると、鼻粘膜上に HA 特異的な分泌型 IgA 抗体を誘導でき、インフルエンザウイルスの感染を完全に防御できる。

連絡先

〒108-8639

東京都港区白金台 4-6-1

東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター

感染制御系 ウイルス学分野

TEL: 03-6409-2125

FAX: 03-6409-2134

E-mail: ichinohe@ims.u-tokyo.ac.jp

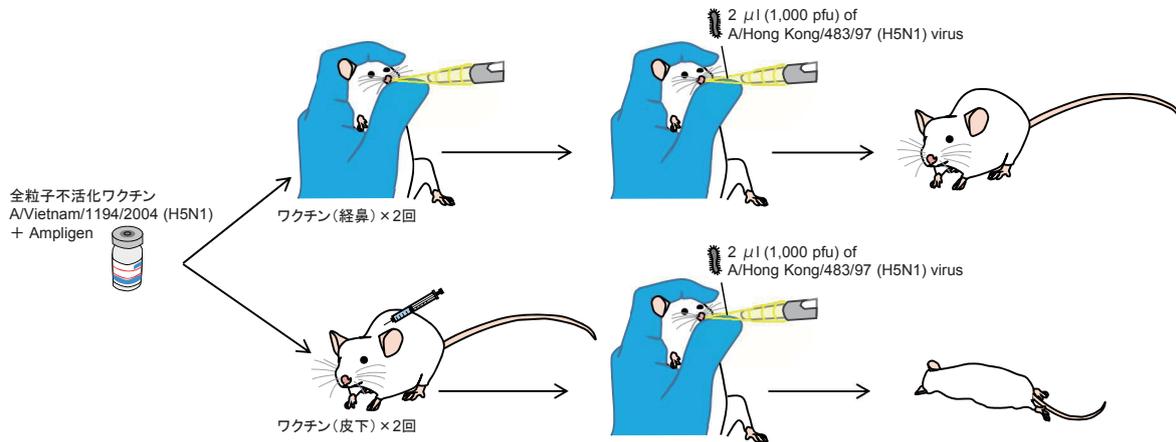


図1 Ampligen 併用経鼻インフルエンザワクチンの交叉防御効果

さらには同じ A 型のウイルスであればワクチン株とチャレンジウイルス株が異なる亜型の場合でも上気道粘膜の分泌型 IgA 抗体は変異ウイルスに交叉反応して、変異ウイルスに対する感染防御が可能となる³⁾。スイスでは 2000 年に LT アジュバントを用いた経鼻不活化ワクチンが認可されたが、経鼻ワクチンを受けた者にベル麻痺が生じたため²¹⁾、このワクチンはもはや臨床で使用されていない。我々は、I 型インターフェロンなどの自然免疫系がその後の獲得免疫応答の誘導に必要であることに着目し¹⁸⁾、Toll-like receptor 3 (TLR3) や RIG-I のリガンドである合成二本鎖 RNA [poly(I:C)] の^{2, 32)}、経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとしての効果について検討した。1 µg の HA ワクチンを 10 µg の poly(I:C) アジュバントと共に Balb/c マウスの鼻腔へ 4 週間隔で 2 回経鼻接種すると、アジュバントを用いない免疫群では抗体価の上昇が認められなかったが、poly(I:C) アジュバントを混合したワクチン接種群では HA 特異的な鼻腔洗浄液中の IgA 抗体、血清中の IgG 抗体価が上昇した¹⁵⁾。このマウスは、1,000 pfu のインフルエンザウイルス (A/PR8) の感染を完全に防御することができ (感染 3 日後の鼻腔洗浄液中にウイルスが全く検出されない)、ワクチン株 A/PR8 (H1N1) と同じ亜型の異なるウイルス A/Beijing (H1N1) や A/Yamagata (H1N1) の感染を完全に、異なる亜型の A/Guizhou (N3N2) ウイルスの感染を部分的に防御した¹⁵⁾。

合成二本鎖 RNA の poly(I:C) は、経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとして効果的であるが、核酸に対する自己抗体が誘導されることは望ましくない。そこで同じ合成二本鎖 RNA で、12 塩基に 1 塩基ミスマッチが導入されている (これにより、生体内の RNase で速やかに分解されることが期待できる) Poly I:Poly C12U (Ampligen[®]) のアジュバント効果を検討した。1 µg の全粒子不活化 NIBRG14 ワクチン (HA と NA が A/Vietnam/1104/2004 (H5N1) ウイルス由来で、他のウイルスタンパク質が A/

PR8 (H1N1) ウイルス由来のもの) と 10 µg の Ampligen アジュバントを Balb/c マウスの鼻腔へ 4 週間隔で 2 回経鼻接種すると、アジュバントを用いない免疫群と比較して、Ampligen を混合したワクチン接種群ではワクチン (NIBRG14) 特異的な鼻腔洗浄液中の IgA 抗体、血清中の IgG 抗体価が有意に上昇した¹¹⁾。NIBRG14 ワクチンと Ampligen を経鼻または皮下に 4 週間隔で 2 回免疫をして、2 週間後にワクチン株とは異なる A/Hong Kong/483/97 (H5N1) ウイルス (1,000 pfu) を経鼻的に感染させると、皮下接種ワクチン群ではすべてのマウスが死亡したが、経鼻ワクチン接種群では 80% のマウスが生存した (図 1)。カニクイザルに 3×10^5 pfu の A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) ウイルスを感染させた場合、感染 14 日目には重篤な肺炎を起こすが、NIBRG14 ワクチンと Ampligen を 3 回経鼻免疫したサルでは、ウイルス感染による癍痕 (scar) が観察されるだけであった (図 2)¹⁰⁾。これらのことから、合成二本鎖 RNA は、経鼻インフルエンザワクチンの有効なアジュバントになることが示唆された。

NLRP3 inflammasome による インフルエンザウイルス認識機構と獲得免疫応答の制御

ウイルスが細胞に感染すると、細胞はウイルスの侵入を感知して、抗ウイルス応答を開始させる。自然免疫受容体である Toll-like receptors (TLRs) や Retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) -like receptors (RLRs) によるウイルス認識機構はよく理解されているが、Nod-like receptors (NLRs) によるそれは不明である。NLR ファミリーの NLRP3 は、ウイルスや細菌、環境中の刺激物などさまざまな刺激により活性化され、アダプタータンパク質の ASC や未成熟型 caspase-1 (pro-Caspase-1) とともに、細胞質中で巨大なタンパク質複合体の NLRP3 inflammasome を形成する (図 3)。これにより活性化した caspase-1 は、細胞質内の未成熟型 IL-1β (pro-IL-1β) や

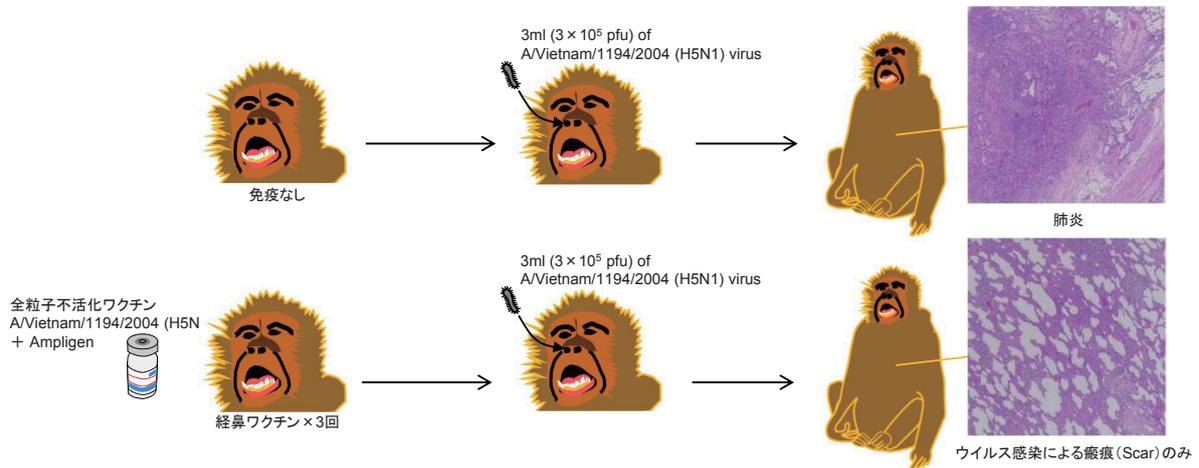


図2 カニクイザルにおける経鼻インフルエンザワクチンの効果 (文献 10 より改変して引用)

IL-18 (pro-IL-18) の成熟化と細胞外への分泌を促進させる²⁸⁾。

インフルエンザウイルスは、少なくとも3つの自然免疫受容体によって認識されている。TLR7 はエンドゾーム内でインフルエンザウイルスのゲノム RNA を認識する^{6, 20)}。細胞質中の RIG-I は、ウイルスのゲノム RNA を認識する^{19, 26)}。これとは対照的に、インフルエンザウイルス RNA は NLRP3 を活性化しない¹³⁾。インフルエンザウイルスによる NLRP3 inflammasome の活性化には、インフルエンザウイルス M2 タンパク質の H⁺ チャネル活性が必要である。M2 タンパク質は、トランスゴルジ内の H⁺ を細胞質中へ流出させて NLRP3 inflammasome を活性化させていた¹³⁾。弱酸性のトランスゴルジ内の pH を M2 タンパク質が中和することは、インフルエンザウイルス HA タンパク質の正しい立体構造を保つため (感染性のあるウイルス粒子を産生するため) に必要である。このことは宿主側が、効率的なウイルスの増殖に必要なウイルス側の戦略を逆手にとり、宿主のウイルス認識機構に利用している可能性を示唆している。他にも、ピコルナウイルス科の脳心筋炎ウイルス (EMCV)、ポリオウイルス、エンテロウイルス 71 型、ヒトライノウイルスの 2B タンパク質が NLRP3 inflammasome を活性化させること^{17, 31)}、RS ウイルス (respiratory syncytial virus) の SH タンパク質が IL-1 β の産生を促進させることが報告されており³⁰⁾、このような viroporin (ウイルスがコードするイオンチャネルタンパク質) は、RNA ウイルスが NLRP3 inflammasome を活性化させるメカニズムのひとつであると考えられる⁴⁾。

マウスにインフルエンザウイルスを感染させた場合、肺での inflammasomes の活性化と IL-1 β の産生は、インフルエンザウイルス特異的な B 細胞、T 細胞応答の誘導に必要である¹²⁾。しかしインフルエンザウイルス特異的な

免疫応答の誘導には、ASC や caspase-1 が必要であったが、NLRP3 は必要でなかった¹²⁾。このことは、ASC とともに inflammasome を形成する他の NLRs が存在し⁹⁾、それがインフルエンザウイルス特異的な免疫応答の誘導に必要である可能性を示唆している。インフルエンザウイルスに感染後、肺で inflammasome が活性化 (IL-1 β が産生) されると、抗原を捕捉した樹状細胞 (DCs) が効率よく所属リンパ節 (mediastinal lymph node) へ遊走する¹⁴⁾。感染細胞周囲にいる DCs (bystander DCs) 上の IL-1 シグナルが、インフルエンザウイルス特異的な CTL 応答に必須である²⁴⁾。

このように inflammasome の活性化による感染局所の炎症反応と IL-1 シグナルが、インフルエンザウイルス特異的な免疫応答の誘導必要であるが、インフルエンザウイルスには NLRP3 inflammasome の活性化を抑制する戦略がある。インフルエンザウイルスによる NLRP3 inflammasome の活性化には、ミトコンドリアの膜電位 (連結したミトコンドリア) が必要であるが¹⁶⁾、インフルエンザウイルス PB1-F2 タンパク質は、ミトコンドリア外膜上の Tom40 チャネルにより膜間スペースへ輸送され、ミトコンドリアの膜電位を低下 (連結したミトコンドリアを断片化) させることにより、NLRP3 inflammasome の活性化を抑制していた (図 3)³³⁾。

腸内細菌叢によるインフルエンザウイルス特異的な免疫応答の制御

腸内細菌が腸管免疫系の恒常性の維持に必要であることは良く知られているが²⁵⁾、他の粘膜での免疫応答に影響を及ぼしているかはあまり知られていない。我々は、マウスのインフルエンザウイルス感染モデルを用いて、ある特定の腸内細菌がインフルエンザウイルスに対する特異的な粘膜免疫応答の誘導に必要であることを明らかにした¹⁴⁾。

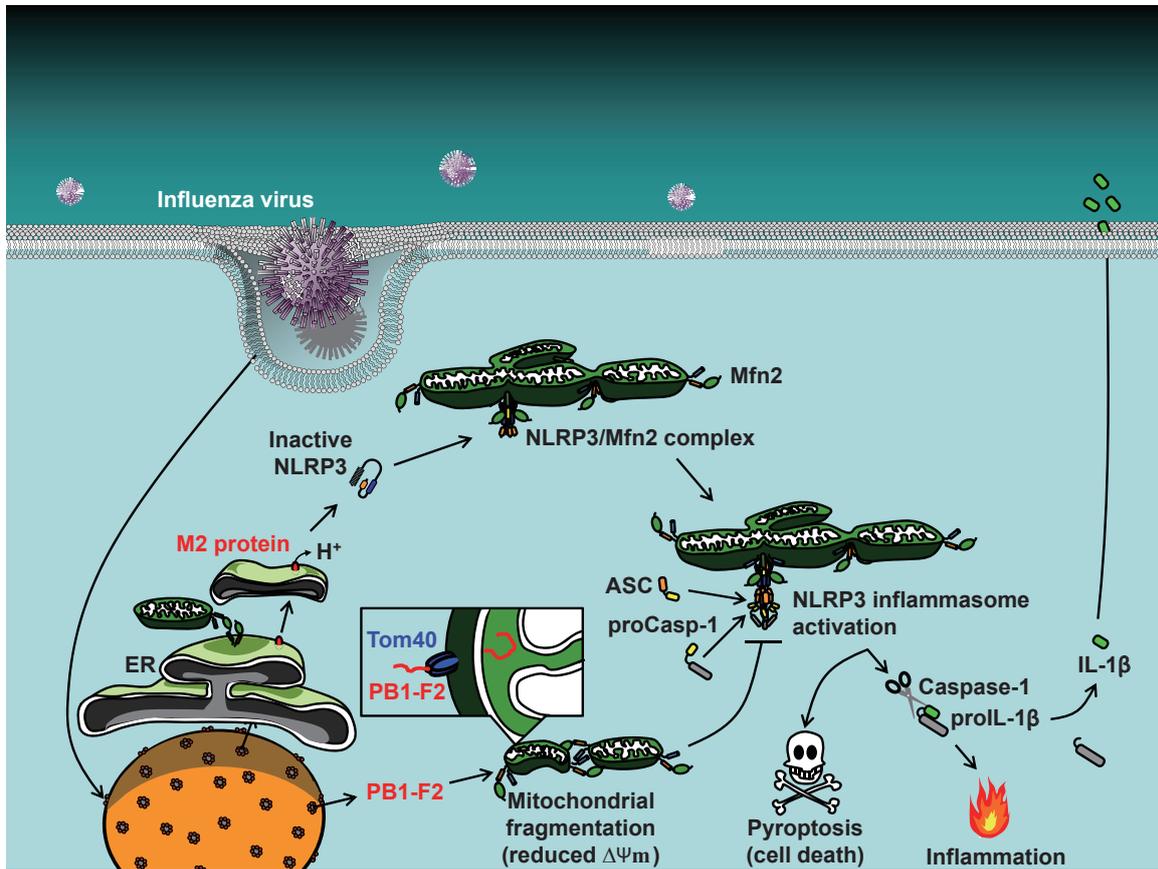


図3 インフルエンザウイルスによる NLRP3 inflammasome の活性化/抑制メカニズム

インフルエンザウイルス M2 タンパク質は、トランスゴルジ中の H^+ を細胞質中に流出させて NLRP3 を活性化させている。活性化した NLRP3 は、ミトコンドリア外膜タンパク質の mitofusin 2 (Mfn2) と相互作用して、これを足場にアダプタータンパク質の ASC や未成熟型 caspase-1 が集合し、NLRP3 inflammasome を形成する。これにより活性化した caspase-1 は、caspase-1 依存的な細胞死 (pyroptosis) や炎症性サイトカインの IL-1 β 、IL-18 の成熟化と分泌を促進させる。インフルエンザウイルス PB1-F2 タンパク質は、Tom40 チャンネルによりミトコンドリアの膜間スペースへ輸送され、ミトコンドリアの膜電位を低下 (ミトコンドリアの断片化) させることにより、NLRP3 inflammasome の形成を抑制している。

通常の滅菌水を飲んでいる C57BL/6 マウス (水マウス) の腸内細菌の 99% 以上はグラム陽性菌 (*Lactobacillus spp.*) である (図 4C)。このマウスに 4 種類の抗生物質 (vancomycin, neomycin, metronidazole, ampicillin) を含んだ水を 4 週間与えると、培養可能な腸内細菌の数は 1/6 程度に低下し (図 4B)、またその半数以上がグラム陰性菌 (*Enterobacter spp.*) となる (図 4C)。この抗生物質を 4 週間飲ませたマウス (抗生物質マウス) に非致死量のインフルエンザウイルス (10 pfu) を経鼻的に感染させて、感染 2 週間後のインフルエンザウイルスに対する免疫応答を解析すると、ウイルス特異的な血液中の IgG 抗体価、鼻腔洗浄液中の IgA 抗体価、脾臓のウイルス特異的 CD4T、CD8T 細胞応答、肺の CTL の数が低下した (図 4A)。これにより感染 9 日目の肺胞洗浄液中のウイルス量は、水マウスと比較して抗生物質マウスで有意に高くなる¹⁴⁾。

抗生物質マウスはあらゆる抗原刺激に対して不応答性の

免疫不全マウスか? 卵白アルブミン (OVA) と完全フロイントアジュバント (CFA) を footpad (皮下) へ注射すると、抗生物質マウスは水マウスと同程度の OVA 特異的な血液中の IgG 抗体価、膝窩リンパ節中の OVA 特異的 CD4T、CD8T 細胞応答を誘導できる (表 1)¹⁴⁾。このことから抗生物質マウスは免疫不全マウスではないことが示された。インフルエンザウイルスを経鼻的に感染させた際のウイルス特異的獲得免疫応答の誘導には、inflammasome の活性化が必要であるため¹²⁾、腸内細菌が制御する獲得免疫応答は、(1) inflammasome 依存的な応答、(2) 呼吸器に感染する病原体に特異的なものの 2 つの可能性が考えられた。これらの可能性を調べるために、HSV-2 (経膣感染後の獲得免疫応答の誘導に inflammasome の活性化を必要としない²⁷⁾) を経鼻的に感染させた際の免疫応答を解析すると、抗生物質マウスは水マウスと同程度のウイルス特異的 CD4T、CD8T 細胞応答を誘導できることが分かった (表 1)¹⁴⁾。

表1 抗生物質処理マウスにおける免疫応答のまとめ

抗原	dose	route	抗生物質マウスの免疫応答	文献
Influenza virus	10 pfu	i.n.	低下	14
Influenza virus	368 or 1×10^5 TCID ₅₀	i.n.	低下	1
HA	1:5 dilution of adult dose	s.c.	低下	23
LCMV	2×10^6 pfu	i.v.	低下	1
OVA + CFA	50 μ g	s.c.	正常	14
HSV-2	1×10^6 pfu	i.n.	正常	14
レジオネラ菌	1×10^6 cfu	i.n.	正常	14

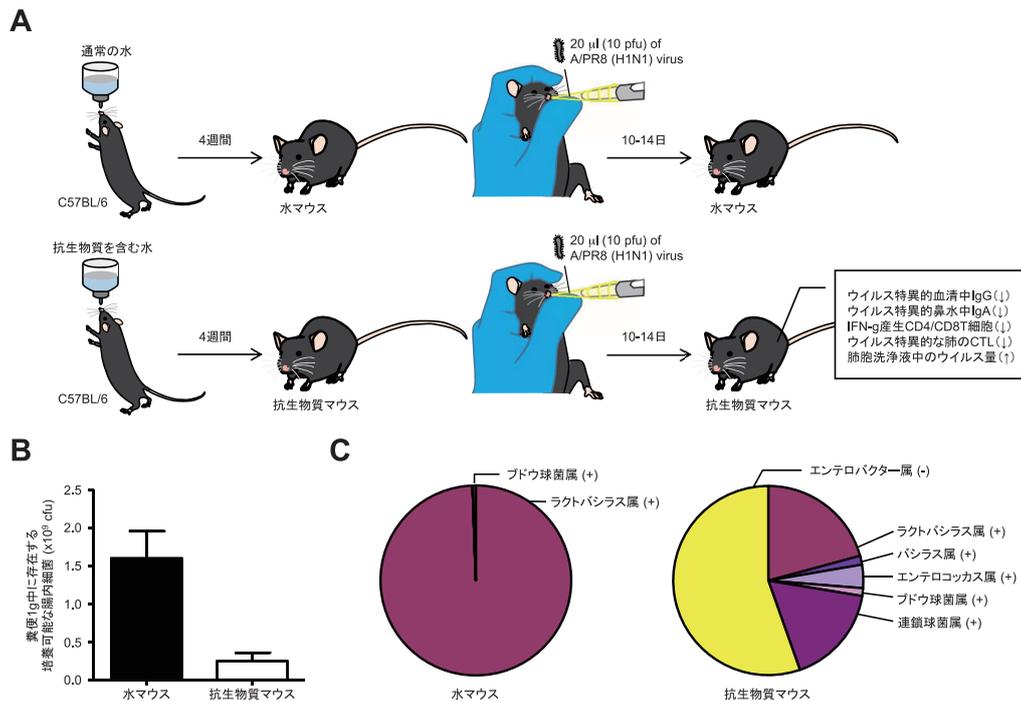


図4 抗生物質処理マウスにおけるインフルエンザウイルス特異的な免疫応答 (文献14より改変して引用)

図中の+と-はそれぞれ、グラム陽性菌とグラム陰性菌を示す

また4種類の抗生物質には耐性であり^{7,8)}、かつ経気道的に感染するレジオネラ菌 (*Legionella pneumophila*) を経鼻感染させても、抗生物質マウスは水マウスと同程度のレジオネラ菌に特異的なCD4T, CD8T細胞応答を誘導できた(表1)。これらの結果から、腸内細菌が制御する獲得免疫応答は inflammasome 依存的なものであり、かつ一般的にウイルス感染や呼吸器感染症に当てはまるものではなく、インフルエンザウイルスに特異的なものであることが示唆された。

Abtらは上気道のインフルエンザウイルス感染モデルだけでなく、LCMVを用いた全身の感染のモデルでも、LCMVに特異的な免疫応答(血清中の抗体価やCD8T細胞応答)の低下と、それに伴う脾臓のウイルス量の増加が認められることを示している(表1)¹⁾。またOhらは、無菌マウスや抗生物質処理マウスに三価インフルエンザHA

ワクチンを皮下接種すると、SPFマウスと比較してワクチン特異的な血清中のIgG抗体価が低下すること、無菌マウスや抗生物質処理マウスにフラジェリンがある細菌を戻すとTLR5依存的にワクチン特異的な血清中のIgG抗体価が回復することを示している(表1)²³⁾。

これらのことは腸内細菌叢が腸内環境だけでなく、距離的に遠く離れた肺でのインフルエンザウイルス特異的な免疫応答や全身の免疫応答にも深く関与していることを示している。実際にどのような腸内細菌が、肺でのインフルエンザウイルス特異的な免疫応答の誘導に役立っているかを明らかにするには今後のさらなる研究が必要で、これらはインフルエンザワクチンの効果を高める食品の開発に役立つ。

おわりに

これまで14年間の研究生活を振り返ると、自分は実に運がよく素晴らしい指導教員に恵まれ、素晴らしい研究環境で研究をさせていただけたのかが分かる。何も考えていなかった学部4年生の私が、ウイルス学研究に足を踏み入れることになったきっかけは、当時国立感染症研究所感染病理部の室長でいらっしゃった田村愼一先生が大阪大学へ栄転されるために開かれた退官記念パーティーにある。私の指導教授である東京理科大学の千葉丈先生（元感染病理部）がそのパーティーに出席され、そのパーティーに出席されていた国立感染症研究所感染病理部の長谷川秀樹先生とサイエンスの話で盛り上がったことがきっかけとなり、共同研究ということで私が大学院の修士に進学してすぐの7月から約5年間、感染病理部の長谷川秀樹先生のもとでお世話になることになった。感染病理部は学生の人数が少なかったこともあり、長谷川先生には基本的な分子生物学的な実験からマウスを用いた *in vivo* の実験、また論文の書き方などさまざまなことをマンツーマンで指導していただけた。村山庁舎では、P3A や P3A として稼働している P4A 施設での感染実験など大変貴重な体験をさせていただけたことは大変ありがたく、この場を借りて感謝申し上げたい。また連携大学院の研究生として私を感染病理部へ受け入れてくださった倉田毅先生、佐多徹太郎先生にも厚く御礼申し上げます。博士2年生のときにたまたまポストドク募集の掲示板でみつけてインタビューを受けた後、大学院卒業後に留学先としてお世話になることが決まった Yale 大学医学部免疫生物学部門の岩崎明子先生のラボは、学生もポストドクも関係なく全員が自由に発言できるラボミーティングの雰囲気が最高に素晴らしかった。同僚にも恵まれていろいろな免疫学的な実験方法を学ぶことができた。岩崎先生が何度もやり取りしてくださったエディターとのやり取りの手紙は私にとって一生の宝物だと思っている。留学生活は、最高の環境で実験だけに集中できた充実した2年間半であったことは大変ありがたいことである。九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野の柳雄介先生には、いったん免疫学に傾きかけた私の頭をウイルス学へ引き戻していただき、ウイルス学研究の面白さについて改めて気づかせていただけたと思っており感謝申し上げます。その後、当時33歳で東京大学医科学研究所の感染症国際研究センターで独立する機会を与えていただけたことはとても幸運で、センター長の河岡義裕先生をはじめ選考に携わっていただきました先生方には深く感謝申し上げます。医科研の研究環境は素晴らしく、医科研独特の自由な雰囲気は研究にも良い影響を与えている。同世代のウイルス仲間にも恵まれて、周りの先生方がいつもサポートイブであることは大変ありがたい。医科研に来て、河岡先生のご厚意でインフルエンザウイルスのリバースジェネティクスの

実験系を使わせていただけることになったので、今後はウイルスと宿主の両者を改変させて、自由な発想のもとユニークな研究を続けていけたらと思っている。

謝辞

本研究は、国立感染症研究所感染病理部の長谷川秀樹先生、Yale 大学医学部免疫生物学部門の岩崎明子先生、九州大学大学院医学研究院ウイルス学分野の柳雄介先生のご指導のもと行ってきた研究です。引用いたしました論文に掲載されております多くの先生方、同僚および学生の御指導・御協力によって遂行されたものであり、あらためてここに御礼申し上げます。最後に、名誉ある日本ウイルス学会杉浦奨励賞に御推薦くださいました東京大学医科学研究所の河岡義裕先生、川口寧先生、国立感染症研究所の長谷川秀樹先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, Doering TA, Alenghat T, Sonnenberg GF, Paley MA, Antenus M, Williams KL, Erikson J, Wherry EJ, Artis D. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity*. 37:158-70. 2012.
- 2) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 413:732-8. 2001.
- 3) Asahi Y, Yoshikawa T, Watanabe I, Iwasaki T, Hasegawa H, Sato Y, Shimada S, Nanno M, Matsuoka Y, Ohwaki M, Iwakura Y, Suzuki Y, Aizawa C, Sata T, Kurata T, Tamura S. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J Immunol*. 168:2930-8. 2002.
- 4) Chen IY, Ichinohe T. Response of host inflammasomes to viral infection. *Trends Microbiol*. 23:55-63. 2015.
- 5) Couch RB, Kasel JA. Immunity to influenza in man. *Annu Rev Microbiol*. 37:529-49. 1983.
- 6) Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 303:1529-31. 2004.
- 7) Edelstein PH. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J Clin Microbiol*. 14:298-303. 1981.
- 8) Fu KP, Neu HC. Correlation of netilmicin disk diffusion susceptibility and agar dilution susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 15:834-5. 1979.
- 9) Grenier JM, Wang L, Manji GA, Huang WJ, Al-Garawi A, Kelly R, Carlson A, Merriam S, Lora JM, Briskin M, DiStefano PS, Bertin J. Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. *FEBS Lett*. 530:73-8. 2002.
- 10) Ichinohe T, Ainai A, Ami Y, Nagata N, Iwata N, Kawa-

- guchi A, Suzaki Y, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Strayer DR, Carter WA, Chiba J, Tamura S, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal administration of adjuvant-combined vaccine protects monkeys from challenge with the highly pathogenic influenza A H5N1 virus. *J Med Virol.* 82:1754-61. 2010.
- 11) Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Ninomiya A, Imai M, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Chiba J, Sata T, Kurata T, Hasegawa H. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes Infect.* 9:1333-40. 2007.
 - 12) Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y, Flavell R, Iwasaki A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med.* 206:79-87. 2009.
 - 13) Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat Immunol.* 11:404-10. 2010.
 - 14) Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, Peaper DR, Ho JH, Murray TS, Iwasaki A. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:5354-9. 2011.
 - 15) 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.* 79:2910-9. 2005.
 - 15) Ichinohe T, Yamazaki T, Koshiba T, Yanagi Y. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:17963-8. 2013.
 - 17) Ito M, Yanagi Y, Ichinohe T. Encephalomyocarditis virus viroporin 2B activates NLRP3 inflammasome. *PLoS Pathog.* 8:e1002857. 2012.
 - 18) Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol.* 16:343-353. 2015.
 - 19) Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* 23:19-28. 2005.
 - 20) Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:5598-603. 2004.
 - 21) Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, Spyr C, Steffen R. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med.* 350:896-903. 2004.
 - 22) Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature.* 459:931-9. 2009.
 - 23) Oh JZ, Ravindran R, Chassaing B, Carvalho FA, Madhur MS, Bower M, Hakimpour P, Gill KP, Nakaya HI, Yarovinsky F, Sartor RB, Gewirtz AT, Pulendran B. TLR5-mediated sensing of gut microbiota is necessary for antibody responses to seasonal influenza vaccination. *Immunity.* 41:478-92. 2014.
 - 24) Pang IK, Ichinohe T, Iwasaki A. IL-1R signaling in dendritic cells replaces pattern-recognition receptors in promoting CD8(+) T cell responses to influenza A virus. *Nat Immunol.* 14:246-53. 2013.
 - 25) Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 14:141-53. 2014.
 - 26) Rehwinkel J, Tan CP, Goubau D, Schulz O, Pichlmair A, Bier K, Robb N, Vreede F, Barclay W, Fodor E, Reis e Sousa C. RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell.* 140:397-408. 2010.
 - 27) Sato A, Iwasaki A. Induction of antiviral immunity requires Toll-like receptor signaling in both stromal and dendritic cell compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:16274-9. 2004.
 - 28) Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 140:821-32. 2010.
 - 29) Tamura S, Hasegawa H, Kurata T. Estimation of the effective doses of nasal-inactivated influenza vaccine in humans from mouse-model experiments. *Jpn J Infect Dis.* 63:8-15. 2010.
 - 30) Triantafilou K, Kar S, Vakakis E, Kotecha S, Triantafilou M. Human respiratory syncytial virus viroporin SH: a viral recognition pathway used by the host to signal inflammasome activation. *Thorax.* 68:66-75. 2013.
 - 31) Triantafilou K, Kar S, van Kuppeveld FJ, Triantafilou M. Rhinovirus-induced calcium flux triggers NLRP3 and NLRC5 activation in bronchial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 49:923-34. 2013.
 - 32) Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.* 5:730-7. 2004.
 - 33) Yoshizumi T, Ichinohe T, Sasaki O, Otera H, Kawabata S, Mihara K, Koshiba T. Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat Commun.* 5:4713. 2014.

Innate recognition of influenza virus and vaccine development

Takeshi ICHINOHE

Division of Viral Infection, Department of Infectious Disease Control, International Research Center for Infectious Diseases, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan.

ichinohe@ims.u-tokyo.ac.jp

Understanding the mechanisms by which influenza viruses are recognized by the innate immune system to elicit a protective adaptive immune response is essential for the development of effective vaccines. We have demonstrated that synthetic double-stranded RNA poly(I:C) is an effective adjuvant for intranasal influenza vaccine. Furthermore, we found that influenza virus activated the NLR family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome via its M2 protein. Inflammasome activation in the lung coupled with priming signals from the commensal microbiota in the gut are essential for the generation of influenza virus-specific adaptive immune responses. These results provide a useful basis for developing effective vaccines against influenza viruses.