

201008001B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

新興・再興感染症に対するヒトM細胞標的型
粘膜ワクチン開発に関する研究

平成 20-22 年度 総合研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成 23 (2011) 年 5 月

—目次—

I. 構成員名簿	1
II. 総括研究報告書	
新興・再興感染症に対するヒト M 細胞標的型粘膜ワクチン開発 東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 炎症免疫学分野 清野宏	2
III. 分担研究者報告書	
i) ヒト M 細胞標的型粘膜ワクチン開発 東京大学医科学研究所 清野宏	8
ii) カニクイザルを用いたワクチン実験 (独) 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 保富 康宏	12
iii) インフルエンザワクチンの免疫原性に関する研究 (財) 阪大微生物病研究会 観音寺研究所 奥野良信	21
iv) B 細胞亜集団の文化・活性化機構の研究 (独) 医薬基盤研究所 免疫応答制御プロジェクト 紅露 拓	24
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	30
V. 研究成果の刊行物・別冊 (主なもの)	40

I. 構成員名簿

平成 20 年度～平成 22 年度 創薬基盤推進研究事業
新興・再興感染症に対するヒト M 細胞標的型粘膜ワクチン開発に関する研究

構成員名簿

	氏名	職名	所属	所属施設の所在地
主任	清野 宏	教授	東京大学医科学研究所 感染・免疫部門炎症免疫学分野	〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1
分担	保富 康宏	センター長	独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 免疫学	〒305-0843 茨城県つくば市八幡台 1-1
分担	奥野 良信	所長	一般財団法人 阪大微生物病研 究会観音寺研究所 基礎研究部 ウイルス学	〒768-0061 香川県観音寺市八幡町 2-9-41
分担	紅露 拓	プロジェク トリーダー	独立行政法人 医薬基盤研究所 免疫応答制御プロジェクト 免疫学	〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8

Ⅱ. 総括研究報告書

新興・再興感染症に対するヒト M 細胞標的型粘膜ワクチン開発に関する研究

研究代表者：清野 宏
東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

インフルエンザ等の粘膜感染症に対する効果的な予防ワクチンを注射型ワクチンとしてではなく「粘膜ワクチン」としてヒトで開発するために、ヒトまたはサル M 細胞へのワクチン抗原の送達技術を開発することは非常に重要である。本研究では、霊長類 (カニクイザル) のパイエル板およびヒトの扁桃を実験材料とし、カニクイザルとヒトの M 細胞を含む上皮細胞に反応性を有するモノクローナル抗体の作製を並列的に進め、数種のモノクローナル抗体の樹立に成功した。研究初年度 (平成 20 年度) に霊長類 (カニクイザル) のパイエル板およびヒトの扁桃を実験材料とし、上皮細胞層をレーザー マイクロダイセクションで切り取り、これを抗原として カニクイザルとヒトの M 細胞を含む上皮細胞に反応性を有するモノクローナル抗体の 5 種類のモノクローナル抗体の樹立に成功したが、これらはすべて個体特異的抗体であった。そこで平成 21 年度に、サル腸管から上皮細胞を精製して、再度モノクローナル抗体を樹立して得た抗体はサルの上皮細胞・FAE 特異的で且つ各個体間で共通な抗原を認識する抗体が 2 種得られた。このうち 1 種 3F11-7-1 は腸管組織培養下において M 細胞を含む FAE 上皮細胞にも反応性を示した。そこで、今年 (平成 22 年度) に、樹立した 3F11-7-1 抗体にインフルエンザスプリット HA ワクチン A/california/7/2009(H1N1) を結合させた M 細胞・上皮細胞標的粘膜ワクチン (HA として 0.7mg を含む) を調製し、粘膜アジュバンド無添加でカニクイザル 4 頭に 2 週間隔で 4 回経口投与して評価を行った。その結果、血清、糞便、鼻洗浄液の一部において抗原特異的 IgG または IgA 抗体が認められたが、有意な抗体価の上昇は認められなかった。有効な経口ワクチンインフルエンザワクチンの開発に向けて、粘膜誘導組織への標的方法として M 細胞を含めた上皮細胞特異的抗体のワクチン抗原送達効果は確認できたが、有効な免疫応答誘導にはアジュバンドの併用が必要と考えられた。

A. 研究目的

ヒト扁桃やサルの腸管を用いて M 細胞が豊富に存在する陰窩部の上皮層をレーザー マイクロダイセクション法により回収し、それをマウスに免疫することで、ヒトまたはサルの M 細胞特異的モノクローナル抗体の樹立を試みてきた。しかし、これらの抗体を解析する過程で、この方法ではヒト扁桃やサルの腸管とも各個体特異的抗体しかとれないことが判明したため、より豊富

な検体が得られるサル腸管から上皮細胞を精製し、個体共通抗原に対する抗体作成を試みた。その抗体の中でサル M 細胞を含む上皮細胞特異的で且つ各個体間で共通な抗原を認識するモノクローナル抗体 3F11-7-1 にインフルエンザ HA スプリットワクチンを結合させることで、経口インフルエンザワクチンの開発を試みた。

B. 研究方法

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚・運動機能医学講座耳鼻咽喉科学分野の山唄達也教授との共同研究のもと慢性扁桃炎や扁桃肥大の患者より扁桃組織を、また医薬基盤研究所霊長類センターの協力を得てカニクイザルの腸管を用いて、抗体を樹立した個体以外のから組織を作製し、抗体の特異性を検討した。ヒト扁桃組織、陰窩部の上皮層またはカニクイザルのパイエル板の濾胞上皮層をレーザーマイクロダイセクション法により回収しそれをマウスに免疫することで、ヒトまたはM細胞特異的モノクローナル抗体の樹立を試みた。別に複数のサル腸管からコラーゲナーゼ・ヘアルロニダーゼ処理、さらにパンクレチニン処理後、パーコールでリンパ系細胞を除き、マウスに免疫することでサルM細胞特異的モノクローナル抗体の樹立を試みた。最終的に後者の方法で得られたサルのM細胞を含むモノクローナル抗体3F11-7-1を精製し、阪大微研会から分与されたHAスプリットワクチンA/california/7/2009(H1N1)とアビジン-ビオチン法で結合させた。本品は医薬基盤研究所霊長類医学研究センターで用事調製され、カニクイザルに、1回1頭あたりHA0.7mgを3F11-7-1抗体と結合させたワクチンを、2週間間隔で4回経口投与し、その血清及び糞便、鼻洗浄液の免疫応答をELISA法で確認した。

(倫理面への配慮)

ヒト扁桃の使用は東京大学倫理委員会、マウスモノクローナル抗体作成は東京大学医学研究所動物実験委員会、カニクイザルの腸管の使用及びカニクイザルを用いた経口ワクチン実験は(独)医薬基盤研究所霊長類医学研究センターにおいて承認を得ている。

C. 研究結果

1. ヒト・サルM細胞また上皮細胞抗体の作成とその性質

ヒト扁桃組織陰窩部の上皮層またはカニクイザルのパイエル板の濾胞上皮層をレーザーマイクロダイセクション法により作製した抗原をもちいてマウスに免疫して、ヒトM細胞を含む扁桃上皮細胞特異的モノクローナル抗体(3-D2-1, Mouse IgM)および、カニクイザルのM細胞を含む腸管上皮細胞特異的モノクローナル抗体(6B-7-11, Mouse IgG1)及び3種のモノクローナル抗体(3-D2-1, 1D8-16-7, 2F5-7-1、すべて Mouse IgM)の作製に成功した。しかし得られたモノクローナル抗体はすべて、抗体を樹立した組織以外の個体からの上皮細胞には反応せず、個体特異的であった。そこで数種のサル腸管から精製した上皮細胞画分から再度抗体を樹立したところ、サル腸管上皮細胞FAEに共通の2種の抗体を得た。このうちの1種3F11-7-1(IgG1)は腸管組織培養2時間で、空腸及び回腸のM細胞を含んだFAE上皮細胞にも反応することが判明し、FAEにワクチンを標的する抗体として最適であると考えられた。

2. FAE・M細胞標的経口ワクチン

サルのFAE/M細胞特異的モノクローナル抗体3F11-7-1(IgG1)とHAスプリットワクチンA/california/7/2009(H1N1)の複合体を作製し、サルパイエル板の上皮細胞上での結合を2次抗体として、FITC標識HA抗体またはFITC標識マウスIgG抗体で確認したところ絨毛上皮細胞のみならず、M細胞を含むFAE上皮細胞にも結合していることが確認された。そこで、この抗体-HA複合体(3F11-7-1抗体1mg+HA0.7mg/頭/回)をカニクイザルに2週間間隔で4回経口免疫して、抗原特異的血清IgG/IgA、糞便IgA、鼻腔IgAをELISA法で測定した。投与前と最終免疫後1週間(7週目)の結果を比較すると、一部のサルではHA抗体が上昇傾向であるが、統計的に有意

な上昇は認められなかった。さらに経口免疫前にすでに抗原特異的抗体が認められていたが、本経口ワクチンの投与で2次免疫応答としての有意な抗体価の上昇は認められなかった。

D. 考 察

我々はこの数年抗原を安定な形状に発現し胃腸へ運び、腸管のM細胞等を介して効果的に粘膜誘導組織に送達させるためにコメにワクチンを発現し経口投与する方法 (*PNAS* 104: 10986-10991,2007) を開発し、最近サルに米型ワクチン (MuocRice-CTB) を経口投与することで、抗原 (例; コレラ毒素) 特異的免疫応答の誘導およびその中和効果の有効性を証明した (*J.Immunol.* 183;6538-6544,2009)。さらに、MuocRice-CTB はコレラ毒素のみならずコレラ菌の誘導する下痢を抑制し、誘導されたコレラ毒素に対する中和抗体の持続性について、初回経口免疫完了後6ヶ月間は維持される事が確認されている。さらに、追加免疫効果についても確認した (*PNAS* 107: 8794-8799,2010)。

我々がレーザーマイクロダイセクションを駆使して目的とする細胞を切り取り、これを抗原として樹立してきたヒト・サルのM細胞・上皮細胞に対するモノクローナル抗体5種類はすべてヒト・サルの個体特異的であることが判明し、再度、今度はサルのM細胞を含む上皮細胞を分離してこれを抗原として、カニクイザル一般のM細胞を含んだFAE上皮細胞に対するモノクローナル抗体3F11-7-1の樹立に成功した。

今回のサルでの経口免疫実験ではまったく粘膜アジュバントを添加していないが、我々が以前行ったマウスM細胞特異的抗体を用いるM細胞標的型経口ワクチン場合は粘膜アジュバントとしてコレラトキシン(CT)を加えている(*J. Exp. Med.* 204: 2335-2348, 2007)。しかしサルの場合、このCTに対するIgA抗体を糞便中に生

後すぐに獲得しており(*J.Immunol.* 183; 6538-6544,2009)、CTのアジュバント活性にはサルは有効でない可能性を考慮したため粘膜アジュバントとしてCTは併用しなかった。

こうして実施したM細胞を含むサル上皮細胞抗体にHAを結合させて作製した上皮細胞特異的経口ワクチンはサルの抗原特異的血清IgG/IgA抗体及び糞便、鼻洗浄液のIgA抗体誘導への顕著な増幅効果は認められなかった。

E. 結 論

M細胞を含めた上皮細胞特異的抗体のワクチン抗原送達効果をサルの腸管を用いて確認できたが、有効なワクチン特異的免疫応答誘導にはアジュバントの併用が必要と考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Terahara, K., Yoshida, M., Igarashi, O., Nochi, T., Pontes, G. S., Hase, K., Ohno, H., Kurokawa, S., Mejima, M., Takayama, N., Yuki, Y., Lowe, A. W., and **Kiyono, H.** Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M Cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 180: 7840-7846, (2008)

Gohda, M., Kunisawa, J., Miura, F., Kagiya, Y., Kurashima, Y., Higuchi, M., Ishikawa, I., Ogahara, I., and **Kiyono, H.** Sphingosine 1-phosphate regulates the egress of IgA plasmablasts from Peyer's patches for intestinal IgA responses. *J. Immunol.* 180: 5335-5343 (2008)

- Momoi, F., Hashizume, T., Kurita-Ochiai, T., Yuki, Y., **Kiyono, H.**, and Yamamoto Nasal vaccination with the 40-kilodalton outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* and a nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces long-term protective immunity with reduced levels of immunoglobulin E antibodies. *Infect. Immun.* 76: 2777-2784 (2008)
- Yuki, Y., Tokuhara, D., Nochi, T., Yasuda, H., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Kataoka, N., Nakanishi, U., Hagiwara, Y., Fujihashi, K., Takaiwa, F., and **Kiyono, H.** Oral Mucorice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralising immunity. *Vaccine* 27: 5982-5988 (2009)
- Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G.S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Yabashi, A., Waguri, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Iimura, M., Hamura, K., Fukuoka, S., Lowe, A.W., Itoh, K., **Kiyono, H.**, and Ohno, H. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*. 462: 226-230 (2009)
- Nochi, T., Yuki, Y., Katakai, Y., Shibata, H., Tokuhara, D., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Nakanishi, U., Ono, F., Mimuro, H., Sasakawa, C., Takaiwa, F., Terao, K., and **Kiyono, H.** A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing antibodies but does not influence pre-existing intestinal immunity. *J. Immunol.* 183: 6538-6544, (2009)
- Knoop, K.A., Kumar, N., Butler, B.R., Sakthivel, S.K., Taylor, R.T., Nochi, T., Akiba, H., Yagita, H., **Kiyono, H.**, and Williams, I.R. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J. Immunol.* 5738-5747 (2009)
- Nagatake, T., Fukuyama, S., Kim, D.Y., Goda, K., Igarashi, O., Sato, S., Nochi, T., Sagara, H., Yokota, Y., Jetten, A.M., Kaisho, T., Akira, S., Mimuro, H., Sasakawa, C., Fukui, Y., Fujihashi, K., Akiyama, T., Inoue, J., Penninger, J.M., Kunisawa, J., and **Kiyono, H.** Id2-, ROR γ t-, and LT β R-independent initiation of lymphoid organogenesis in ocular immunity. *J. Exp. Med.* 206 2351-2364 (2009)
- Obata, T., Goto, Y., Kunisawa, J., Sato, S., Sakamoto, M., Setoyama, H., Matsuki, T., Nonaka, K., Shibata, N., Gohda, M., Kagiya, Y., Nochi, T., Yuki, Y., Fukuyama, Y., Mukai, A., Shinzaki, S., Fujihashi, K., Sasakawa, C., Iijima, H., Goto, M., Umesaki, Y., Benno, Y., and **Kiyono, H.** Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 7419-7424 (2010)
- Tokuhara, D., Yuki, Y., Nochi, T., Kodama, T., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Nanno, M., Nakanishi, U., Takaiwa, F., Honda, T., and **Kiyono, H.** Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 8794-8799 (2010).
- Nochi, T., Yuki, Y., Takahashi, H., Sawada, S., Mejima, M., Kohda, T., Harada, N., Kong, I.G., Sato, A., Kataoka, N., Tokuhara, D., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Tsukada, H., Kozaki, S., Akiyoshi, K., and **Kiyono, H.** Nanogel antigenic protein-delivery system for

adjuvant-free intranasal vaccines. *Nat Mater*. 9: 572-578 (2010)

Fuglem, B., Jirillo, E., Bjerkås, I., **Kiyono, H.**, Nochi, T., Yuki, Y., Raida, M., Fischer, U., and Koppang, E.O. Antigen-sampling cells in the salmonid intestinal epithelium. *Dev Comp Immunol*. 34: 768-774 (2010).

Yuki, Y., Nochi, T., Harada, N., Katakai, Y., Shibata, H., Mejima, M., Kohda, T., Tokuhara, D., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Ono, F., Kozaki, S., Terao, K., Tsukada, H., and **Kiyono, H.** In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine that induces protective immunity against botulism in nonhuman primates. *J Immunol*. 185: 5436-5443 (2010)

Terahara, K., Nochi, T., Yoshida, M., Takahashi, Y., Goto, Y., Hatai, H., Kurokawa, S., Jang, M.H., Kweon, M.N., Domino, S.E., Hiroi, T., Yuki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Kobayashi, K., and **Kiyono, H.** *Biochem Biophys Res Commun*. 404: 822-828(2011)

2. 学会発表

国際学会

Nochi T, Yuki Y, **Kiyono H.** New generation of mucosal vaccine: Novel M cell-targeted oral vaccination is effective for the induction of antigen-specific immune responses, Annual Joint Meeting on Immunology Teaching and Research, Hanoi, Vietnam (2008)

Yuki, Y. D. Tokuhara D, Nochi, T, **Kiyono H.** Oral rice-based nontoxic mutant cholera toxin induces enterotoxin neutralizing immunity. The American Association of Immunologists(AAI) San Diego USA.(2008)

Nochi T, Yuki Y, **Kiyono H.** A subunit type of botulinum mucosal vaccine effectively induces protective immunity in nonhuman primates. The American Association of Immunologists (AAI) San Diego USA (2008)

Yuki Y, Tokuhara D, Nochi T, **Kiyono, H.** Oral MucoRice expressing double mutant cholera toxin A and B subunits induced the toxin specific neutralizing immunity Keystone Symposia Bangkok, Thailand (2008)

Yuki Y, Nochi, T. **Kiyono, H.** Oral MucoRice-CTB induces toxin-protective serum antibodies but does not influence natural intestinal immunity in nonhuman primates. Bangkok, Global Congress of Vaccine, Thailand (2009)

Yuki Y, Nochi T, **Kiyono H.** A novel nanosize protein-carrier for the development of adjuvant-free nasal vaccine The American Association of Immunologists, Seattle, USA (2009)

Yuki Y & **Kiyono H.** Oral rice-based cholera toxin B subunit vaccine protects mice from both live *Vibrio cholerae*- and Enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea The 3rd International conference on Plant-based Vaccine & Antibodies, Verona Italy (2009)

Yuki Y, Nochi T, **Kiyono H.** A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing Abs but does not influence natural intestinal immunity. The American Association of Immunologists, Baltimore, USA (2010)

Tokuhara D, Yuki, Y . **Kiyono H.** Secretary IgA responses induced by rice-based oral cholera toxin B subunit vaccine are solely

responsible for antibody-mediated long-standing cross-protection against *Vibrio cholerae*- and enterotoxigenic *Escherichia coli*- induced diarrhea. The American Association of Immunologists, Baltimore, USA (2010)

Yuki, Y. T. Nochi, T. **Kiyono H**: Exploit of Novel Delivery System with Nanogel for Development of Adjuvant-Free Nasal Vaccine. International conference of Immunology, Kobe. Japan (2010)

Yuki Y, Nochi T, **Kiyono H**: In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine. The 3rd World Congress of Vaccine. Beijing, China (2011).

国内学会

野地 智法, **清野 宏**, M 細胞の免疫生物学的基礎解明とそれを基盤とした M 細胞標的型粘膜ワクチン開発、日本食品免疫学会、東京、(2008)

幸 義和、徳原大介、野地智法、**清野 宏**：無毒化コレラ毒素 A 及び B サブユニットを発現する遺伝子組換え米型経口ワクチンの開発 日本ワクチン学会 熊本 (2008)

Yuki. Y, Nochi T, H. Kiyono: A needle- and adjuvant free-vaccination against botulinum neurotoxin type A: Nasal immunization of a nontoxic recombinant Hc induces protective immunity against botulism in nonhuman primates 日本免疫学会 京都 (2008)

徳原大介、幸 義和、野地智法、**清野 宏** コレラ毒素 B サブユニット発現コメ型経口ワクチンによるコレラ菌および毒素原性大腸菌に対する下痢予防効果の検証。日本ワクチン学会、札幌 (2009)

幸 義和、野地智法、徳原大介、**清野 宏** コレラ毒素 B サブユニット (CTB) 発現はカニクイザルへの経口投与により血清中に CT 特異的 IgG 抗体を誘導するが、自然抗体として腸管に存在する CT 特異的 SIgA 抗体の免疫応答には影響を与えない 日本ワクチン学会 札幌 (2009)

幸 義和、徳原大介、野地 智法、**清野 宏** 米型コレラ毒素 B 鎖ワクチンは分泌型 I g A を誘導することでコレラ菌による下痢を長期間防御する。日本細菌学会 横浜 (2010)

幸 義和、野地智法、秋吉一成、**清野 宏**：アジュバント不要ナノゲル型経鼻ワクチンの開発。日本ワクチン学会 東京 (2010)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

幸 義和、野地 智法、秋吉一成、**清野 宏**：ナノゲルを用いる粘膜ワクチン (出願日 2008/10/31) 特開2010-105968 PCT/JP2009/068647 ((出願日 2009/10/30)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ.分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 (創薬基盤推進研究事業)
分担研究報告書

新興・再興感染症に対するヒト M 細胞標的型粘膜ワクチン開発に関する研究

研究代表者：清野 宏
東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

本研究では、平成 21 年度に霊長類 (カニクイザル) の腸管から M 細胞も含んだ上皮細胞を精製して、モノクローナル抗体を樹立して得た抗体はサルの上皮細胞・パイエル板上皮細胞層 (FAE) 特異的で且つ各個体間で共通な抗原を認識する抗体が 2 種得られた。このうち 1 種 3F11-7-1 は腸管組織培養下の FAE 上皮細胞にも反応性を示した。そこで、最終年度において、樹立した 3F11-7-1 抗体にインフルエンザスプリット HA ワクチン A/california/7/2009(H1N1) を結合させた M 細胞・上皮細胞標的粘膜ワクチンを、調製した。本ワクチンはサルのパイエル板の M 細胞を含む上皮細胞に結合することを組織染色で確認できた。そこで、HA として 0.7mg を含む本ワクチンを、粘膜アジュバンド無添加でカニクイザル 4 頭に 2 週間隔で、4 回経口投与して、M 細胞・上皮細胞標的粘膜ワクチンの霊長類レベルでの評価を行った。対照として、PBS 投与群 2 頭、特異性を有しないマウスの IgG を結合した HA ワクチン群 4 頭に同様に経口投与を行った。その結果、血清、糞便、鼻洗浄液の一部において抗原特異的 IgG または IgA 抗体を検出できるが、有意な抗体価の上昇は認められなかった。なお、投与前の血清中の HA 抗体価を確認すると、有意な量 (2^{6-9} 抗体価) の抗体が存在し、使用したインフルエンザに既に感染している可能性が示唆された。このらの結果は経口での投与で有意なブースター効果が認められなかったと解釈され、今後は粘膜アジュバンドとの併用を検討する必要がある。

A. 研究目的

本研究の目的は M 細胞標的型粘膜ワクチンを開発することで、サル腸管から M 細胞を含む上皮細胞を精製し、サル腸管上皮細胞に対するモノクローナル抗体 3F11-7-1 を樹立したが、その抗体にインフルエンザ HA スプリットワクチンを結合させることで、経口インフルエンザワクチンの開発を試みた。

B. 研究方法

樹立したサル腸管上皮細胞に対するモノクローナル抗体 3F11-7-1 をプロテイン G カラムで精製し、阪大微研会から分与された HA スプリットワクチン A/california/7/2009(H1N1) とアビジン-ビ

オチン法で結合させた。本品がサル腸管組織と結合することを、サル腸管組織切片を用いて定法で確認したのち、医薬基盤研霊長類医科学研究センターで、カニクイザルに、1 回 1 頭あたり HA 0.7mg を 3F11-7-1 抗体と結合させたワクチンを、2 週間間隔で 4 回経口投与し、その血清及び糞便、鼻洗浄液の免疫応答を ELISA 法で確認した。

(倫理面への配慮)

カニクイザルを用いた経口ワクチン実験は (独) 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター及び東京大学医科学研究所動物実験委員会において承認を得ている。

C. 研究結果

調製された M 細胞を含むサル腸管上皮細胞に対するマウスモノクローナル抗体 3F11-7-1 と HA スプリットワクチン A/california/7/2009(H1N1)複合体のサルパイエル板の上皮細胞上での結合を 2 次抗体として、FITC 標識 HA 抗体と FITC 標識マウス IgG 抗体で確認した(図 1, 2)。絨毛上皮細胞のみならず、M 細胞を含む FAE 上皮細胞にも結合していることが確認された。

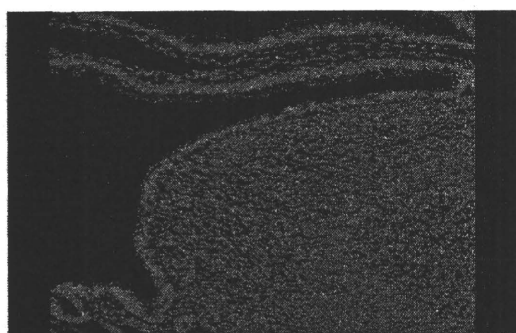


図 1. 抗体-HA 複合体のサルパイエル板への結合：2 次抗体は FITC-HA 抗体

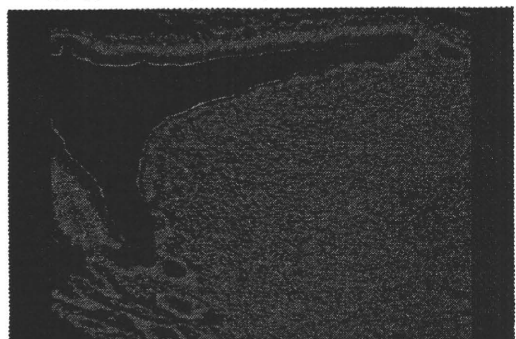


図 2. 抗体-HA 複合体のサルパイエル板への結合：2 次抗体は FITC-Mouse IgG 抗体

そこで、この抗体-HA 複合体 (3F11-7-1 抗体 1mg+HA0.7mg/頭/回) をカニクイザルに 2 週間間隔で 4 回経口免疫して、抗原特異的血清 IgG/IgA、糞便 IgA、鼻腔 IgA を ELISA 法で測定した。投与前と最終免疫後、1 週間(7 週目)の結果を表 I に示す。赤は上昇傾向を示している。一部のサルでは上昇傾向であるが、統計的に有意な上昇は認められなかった。さらに経口免疫前にすでに抗原特異的抗体が

認められていたが、本経口ワクチンの投与で有意な抗原特異的抗体価の上昇は認められなかった。

表 1. 経口免疫前後の抗原特異的抗体価の推移

	PBS		HA-Mouse IgG (対象群)				HA-Monkey FF-Ab (実験群)				
	No. 19	No. 20	No. 21	No. 22	No. 23	No. 24	No. 25	No. 26	No. 27	No. 28	
血清 IgG	免疫前	7	6	6	6	6	6	6	9	6	
	7W	7	7	6	6	6	6	7	6	7	
血清 IgA	免疫前	6	5	4	4	6	5	5	6	6	5
	7W	6	5	5	5	6	4	5	4	6	5
糞便 IgA	免疫前	1	4	1	2	2	1	1	1	2	1
	7W	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1
鼻腔 IgA	免疫前	2	1	<1	2	2	<1	2	<1	<1	4
	7W	<1	<1	<1	<1	1	3	1	<1	<1	1

D. 考 察

この実験にあたり、投与前に予め抗原特異的抗体価を測ったところ、特に血清において Log2 力価で 6 から 9 の抗体価が存在しており、すべてのサルにおいてインフルエンザ感染を経験している可能性が考えられた。実際、今回使用した HA ワクチンは 2009 年季節型 A/california/7/2009(H1N1) であり、すべてのサルが感染している可能性は十分にありうる。

M 細胞を含むサル上皮細胞抗体に HA を結合させて作製した上皮細胞特異的経口ワクチンの単独の投与ではサルの抗原特異的血清 IgG/IgA 抗体及び糞便、鼻洗浄液の IgA 抗体誘導への顕著な増強効果は認められなかった。

今回の実験ではまったく粘膜アジュバントを添加していないが、我々が以前行ったマウス M 細胞特異的抗体を用いる M 細胞標的型経口ワクチンの場合には粘膜アジュバントとしてコレラトキシン(CT)を加えている(*J. Exp. Med.* 204; 2335-2348, 2007)。しかし、サルの場合、この CT に対する IgA 抗体を糞便中に生後すぐに獲

得しており (*J.Immunol.* 183: 6538-6544,2009)、CTのアジュバント活性にはサルは有効でない可能性を考慮したため粘膜アジュバントとしてCTは併用しなかった。

E. 結論

有効な経口ワクチンインフルエンザワクチンの開発に向けては粘膜誘導組織への標的方法としてM細胞を含めた上皮細胞特異的抗体のワクチン抗原送達効果は確認できたが、有効な免疫応答誘導にはアジュバントの併用が必要と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tokuhara, D., Yuki, Y., Nochi, T., Kodama, T., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Nanno, M., Nakanishi, U., Takaiwa, F., Honda, T., and **Kiyono, H.** Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 8794-8799 (2010).

Nochi, T., Yuki, Y., Takahashi, H., Sawada, S., Mejima, M., Kohda, T., Harada, N., Kong, I.G., Sato, A., Kataoka, N., Tokuhara, D., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Tsukada, H., Kozaki, S., Akiyoshi, K., and **Kiyono, H.** Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines. *Nat Mater.* 9: 572-578 (2010)

Fuglem, B., Jirillo, E., Bjerkås, I., **Kiyono, H.**, Nochi, T., Yuki, Y., Raida, M., Fischer, U., and Koppang, E.O. Antigen-sampling cells in the salmonid intestinal epithelium. *Dev Comp Immunol.* 34: 768-774 (2010).

Yuki, Y., Nochi, T., Harada, N., Katakai, Y.,

Shibata, H., Mejima, M., Kohda, T., Tokuhara, D., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Ono, F., Kozaki, S., Terao, K., Tsukada, H., and **Kiyono, H.** In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine that induces protective immunity against botulism in nonhuman primates. *J Immunol.* 185: 5436-5443 (2010)

Terahara, K., Nochi, T., Yoshida, M., Takahashi, Y., Goto, Y., Hatai, H., Kurokawa, S., Jang, M.H., Kweon, M.N., Domino, S.E., Hiroi, T., Yuki, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y., Kobayashi, K., and **Kiyono, H.** Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 404: 822-828(2011)

2. 学会発表

Y. Yuki, T. Nochi, Y. Katakai, H. Shibata, D. Tokuhara, M. Mejima, S. Kurokawa, Y. Takahashi, H. Hatai, A. Chubachi, U. Nakanishi, K. Terao, **H. Kiyono.** A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing Abs but does not influence natural intestinal immunity. The American Association of Immunologists, Baltimore, USA (2010)

D. Tokuhara, Y. Yuki, T. Nochi, T. Kodama, M. Mejima, S. Kurokawa, Y. Takahashi, M. Nanno, F. Takaiwa, T. Honda, **H. Kiyono** Secretory IgA responses induced by rice-based oral cholera toxin B subunit vaccine are solely responsible for antibody-mediated long-standing cross-protection against *Vibrio cholerae*- and enterotoxigenic *Escherichia coli*- induced diarrhea. The American Association of Immunologists, Baltimore, USA (2010)

Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, T. Kohda, N. Harada, N. Kataoka, IG. Kong, A. Sato, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, H. Tsukada, S. Kozaki, K. Akiyoshi, **H. Kiyono**: Exploit of Novel Delivery System with Nanogel for development of adjuvant-free nasal vaccine. The 13th International conference of Immunology, Kobe. Japan (2010)

Y. Yuki, T. Nochi, N. Harada, Y. Katakai, H. Shibata, M. Mejima, T. Kohda, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, F. Ono, S. kazaki, K. Terao, H. Tsukada, **H. Kiyono**: In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine. The 3rd World Congress of Vaccine. Beijing, China (2011).

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

カニクイザルを用いたワクチン実験に関する研究

研究分担者：保富康宏
医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

研究要旨

感染症研究における実験動物としての霊長類は極めて重要であり、特にワクチン研究においては霊長類を用いた検討は必須となっている。霊長類において最も汎用されているのはカニクイザルであり、ヒトへの治験を行う前臨床として用いられる動物となっている。医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターは30年以上にわたり、原産地を明確にしたコロニーを維持繁殖させてきた。本研究ではサルエイズウイルス (SIV) と SPF カニクイザルを用いて新たな霊長類エイズモデルの感染系を作製し、新たなワクチン開発系の確立を検討した。SIVmac239 分子クローンをカニクイザルに接種したところ、慢性的な感染を示した。これら持続感染を示すカニクイザルにおいて SIV に対する ELISPOT を測定したところ、抹消のウイルス量に比例して、反応が誘導されていることが確認された。以上のことからカニクイザルにおいてもエイズ感染系が確立されるワクチン開発への利用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

感染症の病態解明やワクチン開発においては有効な動物モデルが必要である。ヒトエイズウイルス(HIV)はヒト以外ではチンパンジーに感染するが、エイズを発症することはない。このためにヒトと同様な病態を示すサルエイズウイルス(SIV)とアカゲザルの系を用いての研究が広く行われている。しかしながらアカゲザルの産地による病態の差異が認められること、安定的な供給を確保することが困難であるために、新たな動物モデルの開発が望まれている。本研究ではサルDタイプレトロウイルス(SRV/D)等の感染が無く、産地、系統が判明しているカニクイザルにおけるエイズウイルス感染症研究の可能性を検討し、ワクチン開発におけるカニクイザルの基盤的研究を試みた。

B. 研究方法

1. SIVmac239 の調製

SIVmac239 cDNA を含む pBR233 ベクターを霊長類由来株化細胞 COS-1 にトランスフェクトさせ、培養上清のウイルスを回収した。ウイルスの感染価を測定するために、カニクイザル胎児胸腺リンパ球由来の細胞 HSC-F に対する TCID₅₀ を測定した。

2. カニクイザル由来末梢血単核球細胞(PBMC)への SIV mac239 の感染

SIV 感染実験で用いる同一の動物種を用いてウイルスを増殖させた。カニクイザルの末梢血から密度勾配遠心法で分離した PBMC を CD8 除去し、マイトジェンの PHA-P で2日間刺激し、IL-2 で3日間増殖させたのち、ウイルスに感染させ6日後の培養液を SIV のストックとして保存した。この SIV ストックをインドネシア産、フィリピン産、マレーシア産のカニクイザルそれぞれから分離した CD8 除去リンパ球に感染/増殖させ、HSC-F に

に対する TCID₅₀ を測定した。

3. カニクイザルに対する SIVmac239 感染

インドネシア産、フィリピン産カニクイザル各 2 頭に 10⁴ TCID₅₀ 接種し、血漿中のウイルス量を Real-Time PCR にて測定した。

4. SIV 特異的 ELISPOT assay

自己の B-LCL に SIV 遺伝子 gag-pol および env を組み込んだワクシニアウイルスに感染させ、それを用いた ELISPOT assay をカニクイザル末梢血リンパ球にて行った。

5. SIV 特異的因子血清中抗体の測定

SIV 特異的抗体はウェスタンブロットならびに ELISA にて確認した。

6. 倫理面への配慮

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

1. SIVmac239 の感染価

Cos-1 にトランスフェクトさせ、回収したウイルスの HSC-F に対する TCID₅₀ は 10³-10⁴/ml であった。

2. カニクイザル由来 PBMC への SIVmac239 の感染

Gag P27 は感染 6 日目に最大値となった(図 1)。カニクイザル由来 PBMC の原産地の違いによる SIVmac239 の感染価への影響は、HSC-F に対する TCID₅₀ においてインドネシア産は 10^{5.42}/ml、フィリピン産は 10^{6.47}/ml、マレーシア産は 10^{6.10}/ml であった(図 2)。

3. カニクイザルに対する SIVmac239 感染

インドネシア産、フィリピン産カニクイザル各 2 頭(表 1)に SIVmac239 を接種したところ、インドネシア産、フィリピン産カニクイザル各 1 頭で非常に高いウイルス量が維持された持続感染が認めら

れた(図 3、4)。

5. SIV 接種カニクイザルにおける CD4+T 細胞数の変化

SIV 接種カニクイザルにおける CD4+T 細胞数の変化を見たところ、感染ザルでは徐々に細胞数は低下し、感染後 50 週では 500/ul 以下となりエイズ関連症候群 (ARC) レベルに低下した(図 5)。

6. SIV 接種カニクイザルにおける SIV 特異的免疫反応

SIV 特異的細胞性免疫反応はワクシニアウイルスを用いた ELISPOT assay にて確認された。持続感染を示すカニクイザルでは高い SIV 特異的細胞性免疫反応が誘導された(図 6)。SIV 特異的な抗体反応においても持続感染カニクイザルでも誘導が確認され(図 7)、SIV 感染カニクイザルにおいては SIV に対する免疫反応が十分誘導されていることが確認された。

D. 考 察

アカゲザルと SIV、SHIV の感染系はエイズウイルス感染症研究には非常に重要であり、世界中で用いられている。しかしながら、アカゲザルの系統差による病態の差違や、この系のみで研究を行うことによる資源の安定的供給の問題、さらには生物学的な質の向上、維持においても問題が生じている。動物実験に用いる霊長類として世界的に最も多用されているのはカニクイザルである。しかしながらカニクイザルを用いたエイズ研究の報告は極めて少なく、持続感染を示すのかも不明であり、もちろん発症等の病態の詳細も判明していない。医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターでは麻疹、EBV、CMV 等のヘルペスウイルスおよびマカク属で問題となる SRV/D の感染がないカニクイザルを繁殖育成している。また、これらのカニクイザルはフィリピン、インドネシア、マレーシアの各地域で産出されたものであり、交雑せずに系統を

保っている。このことから本研究で行う系統維持された SPF コロニーでのカニクイザルを用いた研究では新たな生物資源活用になるエイズワクチン開発研究を行える可能性が示唆された。

E. 結 論

カニクイザルを用いたエイズワクチン研究の基盤を構築した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida,T., Saito,A., Iwasaki,Y.,Iijima,S., Kurosawa,T., Katakai,Y., Yasutomi,Y.,Reimann,K.A., Hayakawa,T. and Akari,H. Characterization of natural killer cells in tamarins: a technical basis for studies of innate immunity. *Frontiers Microbiol.* 2011 in press
2. Xing, Li., Wang, J.C., Li, T-C., Yasutomi.Y., Lara,J., Khurdyakaov,Y., Schofield D., Emerson,S., Purcell,R., Takeda,N., Miyamura,T. and Holland,R.C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. *J.Virol.* 2011;85:1117-1124.
3. Chono,H., Matsumoto,K., Tsuda,H., Saito,N., Lee,K., Kim,S., Shibata,H., Ageyama,N., Terao,K., Yasutomi.Y., Mineno J., Kim,S., Inoue,M. and Kato,I. Acquisition of HIV-1 resistance in T lymphocytes using an ACA-specific E.coli mRNA interferase. *Human Gene Ther.* 2011;22:35-43.
4. Saito,A., Nomaguchi,M., Iijima,S., Lee,Y-J., Kono,K., Nakayama,E.E., Shioda,T., Yasutomi.Y., Adachi,A., Matano,T., Akari,H. A novel monkey-tropic HIV-1 derivative encoding only minimal SIV sequences can replicate in cynomolgus monkeys. *Micorbes Infect.* 2011;13:58-64.
5. Naruse,T.K., Zhiyong,C., Yanagida,R., Yamashita,T., Saito,Y., Mori,K., Akari,H., Yasutomi.Y., Matano,T. and Kimura,A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origine rhesus macaques. *Immunogenetics* 2010;62:601-611.
6. Okabayashi,S., Uchida,K., Nakayama,H., Ohno,C., Hanari,K., Goto,I. and Yasutomi.Y. Periventricular Leucomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (macaca fascicularis). *J.Comp.Pathol.* 2010 Epub
7. Yasuhiro Yasutomi. Establishment of Specific Pathogen-Free Macaque Colonies in Tsukuba Primate Research Center of Japan for AIDS research. *Vaccine* 2010;B75-B77.
8. Fujimoto,K., Takano,J., Narita,T., Hanari,K., Shimozawa,N., Sankai,T., Yoshida T., Terao,K., Kurata,T. and Yasutomi.Y. Simian Retrovirus type D infection in a colony of cynomolgus monkeys. *Comp.Med.* 2010;60:51-53.
9. Cueno,M.E., Karamatsu,K., Yasutomi, Y., Laurena,A.C. and Okamoto.T. Preferential expression and immunogenicity of HIV-1 Tat fusion protein expressed in tomato plant. *Transgenic Res.* 2010;19:889-895.
10. Mori,H., Yamanaka,K., Matsuo,K., Yasutomi.Y. and Mizutani,H. Administration of Ag85B showed therapeutic effects to Th2-type cytokine-mediated acute phase atopic dermatitis by inducing regulatory T cells. *Arch Dermatol.Res.* 2009;301;151-157.
11. Okabayashi, S., Ohnao,C. and Yasutomi.Y. Acute megakaryocytic leukemia (AMKL)-like disease in a Cynomolgus monkey (Macaca fascicularis). *J.Comp.Pathol.* 2009;140;212-216.
12. Morioka ,T., Yamanaka,K., Mori,H., Omoto,Y., Tokime,K., Kakeda,M.,

Kurokawa, I., Gabazza, E., Tsubura A., Yasutomi, Y. and Mizutani, H, IL-4/IL-13 antagonist DNA vaccination successfully suppresses Th2 type chronic dermatitis. *Br.J.Dermatol.* 2009;160:1172-1179.

13. Takano, J.I., Tachibana, H., Kato, M., Narita, T., Yanagi, T., Yasutomi, Y. and Fujimoto, K. DNA characterization of simian *Entamoeba histolytica*-like strains to differentiate them from *Entamoeba histolytica*. *Parasitol.Res.* 2009 :105:929-937.

14. Okabayashi, S., Ohno, C., Kato, M., Nakayama H., Yasutomi, Y. Congenital cystic adenomatoid-like malformation in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Vet. Path.* 2008;45:232-235.

15. Tsuchida, J., Yoshida, Y., Sankai, T. and Yasutomi, Y. Maternal behavior of laboratory-born, individually reared long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim.* 2008;47:29-34.

16. Yasui, F., Kai, C., Kitabatake, M., Inoue, S., Yoneda M., Yokochi, S., Kase, R., Sekiguchi, S., Morita, K., Hishima, T., Suzuki, H., Karamatsu, K., Yasutomi Y., Shida, H., Kidokoro, M., Mizuno, K., Matsushima K. and Kohara, M. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunol.* 2008;181:6337-6348.

17. Yasuhiro Yasutomi. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles presenting foreign epitopes as a novel vector of vaccine by oral administration. Holland, C.R., and Mitamura, T. Eds. *Structure-based study of viral replication.* World Scientific .2008;p539-p552.

2. 学会発表

「国内」

- 1) 松原明弘、清水裕也、加藤翔太、河岡義裕、保富康宏：IL-4 アンタゴニストを用いた Th 反応調節によるインフルエンザウイルス感染の制御 第 56 回日本ウイルス学会 岡山 10 月 26 日-28 日
- 2) 松原明弘、高村史記、清水裕也、保富康宏：SIVmac239 の Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖欠損株を用いた SIV DNA ワクチンの開発 第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日
- 3) 千代智子、関口敏、松原明弘、保富康宏、脇田隆宇、村井深、小原道法：HCV 遺伝子組み換えワクチニアウイルスの作製とワクチンとしての検討 第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日
- 4) 関口敏、千代智子、飛田良美、松原明弘、保富康宏、村井深、小原道法：HCV 遺伝子組み換えワクチニアウイルスの治療ワクチン効果 第 12 回日本ワクチン学会 熊本 11 月 8 日-9 日
- 5) Marni Cueno、唐松克夫、保富康宏、Antonio Laurena、岡本尚：Immunogenicity of HIV-1 Tat protein expressed in tomato. 第 56 回日本ウイルス学会 岡山 10 月 26 日-28 日
- 6) 岡林佐知、大野智恵子、保富康宏：実験用カニクイザルに認められた急性巨核芽球性白血病(AMKL)の一例 第 147 回日本獣医病理学会、栃木、2009 年 4 月 2 日~4 日
- 7) 岡林佐知、小野文子、羽成光二、大野智恵子、加藤美代子、保富康宏：実験用カニクイザルに見られた下垂体腫瘍の一例 第 56 回日本実験動物学会総会、埼玉県、2009 年 5 月 14 日
- 8) 松原明弘、高村史記、加藤翔太、保富康宏：SIVmac239 Env gp120 アスパラギン(N)結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する影響 第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年 10 月 25 日~27 日
- 9) 松原明弘、高村史記、草川茂、武部豊、森一泰、永井美之、保富康宏：SIVmac239