

Env gp120 アスパラギン結合型糖鎖の宿主免疫応答に対する影響 第 23 回日本エイズ学会、名古屋、2009 年 11 月 26 日～28 日

10) Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI : Administration of Ag85B showed therapeutic effects to allergic asthma by inducing Th1 response and Interleukin-17 第 38 回日本免疫学会、大阪、2009 年 12 月 1 日～3 日

11) 塩釜ゆみ子、松原明弘、河岡義裕、保富康宏 : ヘルパー T 細胞 (Th) 制御によるインフルエンザ感染病態とワクチン効果の検討第 13 回日本ワクチン学会 東京 2010 年 12 月 11 日～12 日

12) 保富康宏 : アジュバント分子組み込みエイズウイルスの開発 (シンポジウム) 第 24 回日本エイズ学会、東京、2010 年 11 月 24 日～26 日

13) 齊藤暁、河野健、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、保富康宏、俣野哲朗、明里宏文 : カニクイザル TRIM5 allele がサル指向性 HIV-1 の増殖に与えるインパクト第 24 回日本エイズ学会、東京、2010 年 11 月 24 日～26 日

14) 下澤律浩、高橋一郎、柴田宏昭、伊奈田宏康、野阪哲哉、保富康宏 : カニクイザル体細胞に由来する人工多能性幹細胞の作製第 57 回日本実験動物学会、京都、2010 年 5 月 12 日～14 日

「国際」

1) Nienke E. van Houten, Yasuhiro Yasutomi, and Masahiro Niikura : Protective Mucosal Immunity against a Model Viral Enteric Infection by a Generic Chimeric Hepatitis E Virus-like Particle Vaccine System. The American Society for Virology 28th Annual Meeting, Vancouver, 2009, July 11-15.

2) Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI : Administration of Ag85B showed therapeutic effects to allergic asthma

by inducing Th1 response and Interleukin-17.

9th International Conference on New trends in Immunosuppression & Immunotherapy 2010. February. 4-6.

3) Yusuke TSUJIMURA, Yasuhiro YASUTOMI : Therapeutic effects of Ag85B in allergic asthma by inducing not only Th1 response but also Interleukin-17, -22 production. 14th International Congress of Immunology. Kobe Japan, August 22-27, 2010.

4) Akihiro Matsubara, Kenta Watanabe, Mitsuo Kawano, Satoru Mizuno, Yusuke Tsujimura, Hiroyasu Inada, Masayuki Fukumura, Isamu Sugawara, Tetsuya Nosaka, Kazuhiro Matsuo, Yasuhiro Yasutomi: Intranasal immunization with replication-deficient recombinant human parainfluenza type 2 virus-Ag85B showed protective effects against *Mycobacterium tuberculosis* infection. TB Vaccines. A Second Global Forum, Tallinn, Estonia September 21-24, 2010.

5) Yasuhiro Yasutomi: Gene delivery of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) showed therapeutic effects to autoimmune myocarditis in mice. 2nd Annual International Congress of Cardiology, Shanghai, China, December 7-9, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許出願

(1) パラミクソウイルスベクターを用いた経鼻噴霧型結核ワクチン (PCT/JP2010/069435)

(2) パラインフルエンザ 2 型ウイルスベクター (hPIV2) を用いたアトピー性皮膚炎治療薬 (2009-235915)

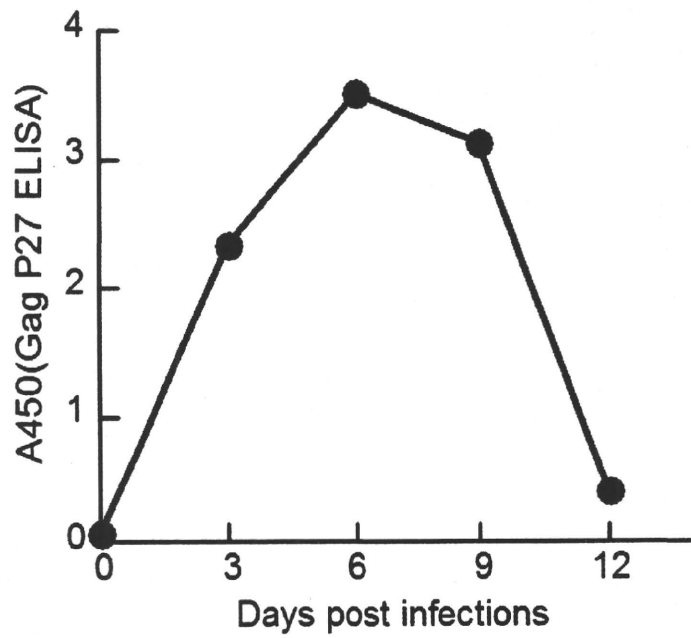


図1カニクイザルPBMCへのSIV感染

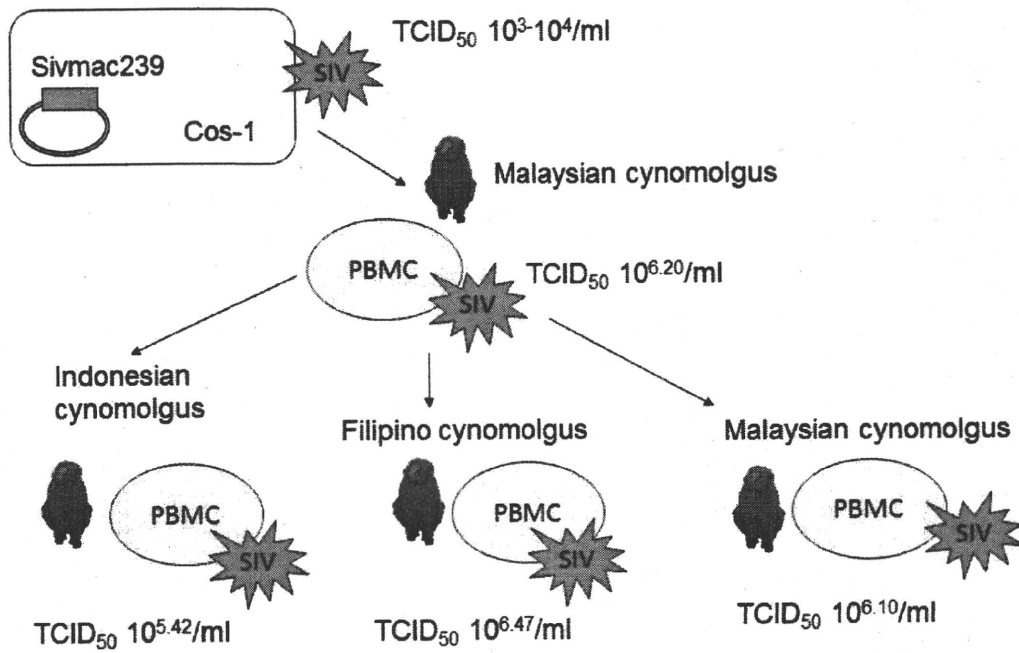


図2.各サルにおけるSIVmac239のTCID₅₀.

表1 SIVmac239接種カニクイザル

Monkey	抗原	接種量
#025(Philippine)	SIVmac239	1000TCID50
#028(Indonesia)		
#044(Philippine)		
#084(Indonesia)		

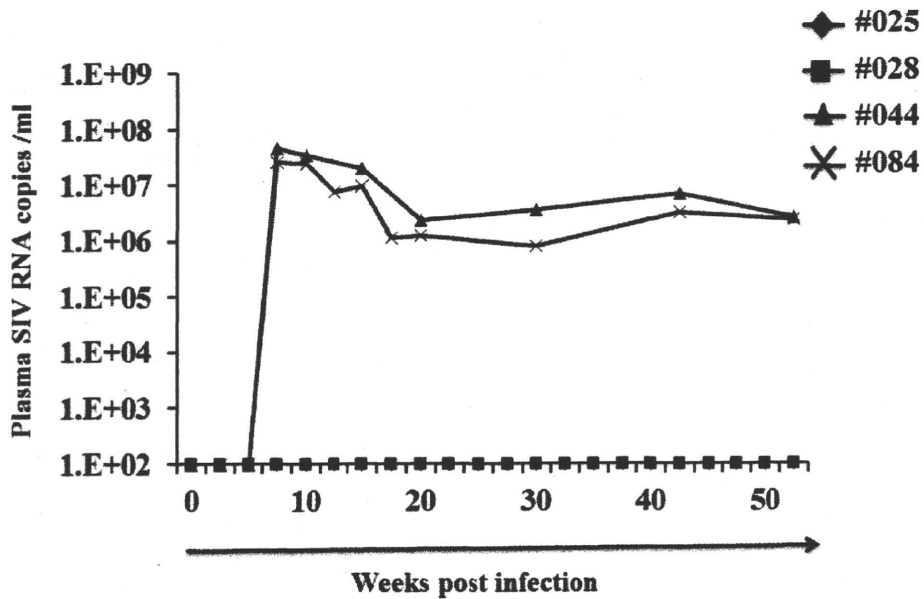


図3. SIV接種カニクイザルの血漿中ウイルスコピー数

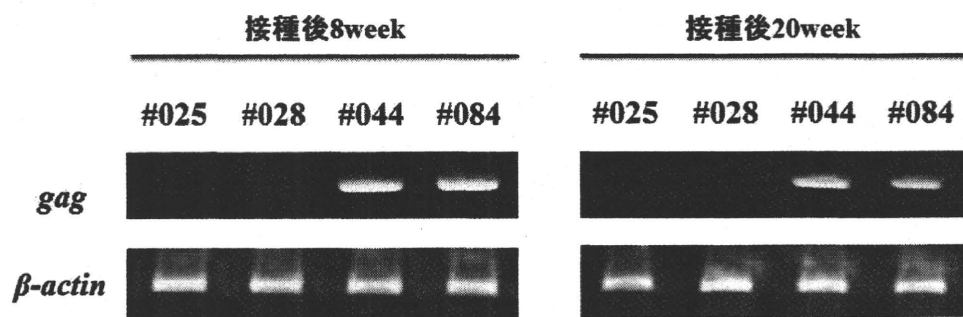


図4. SIV接種カニクイザルPBMCにおけるプロウイルスの検出

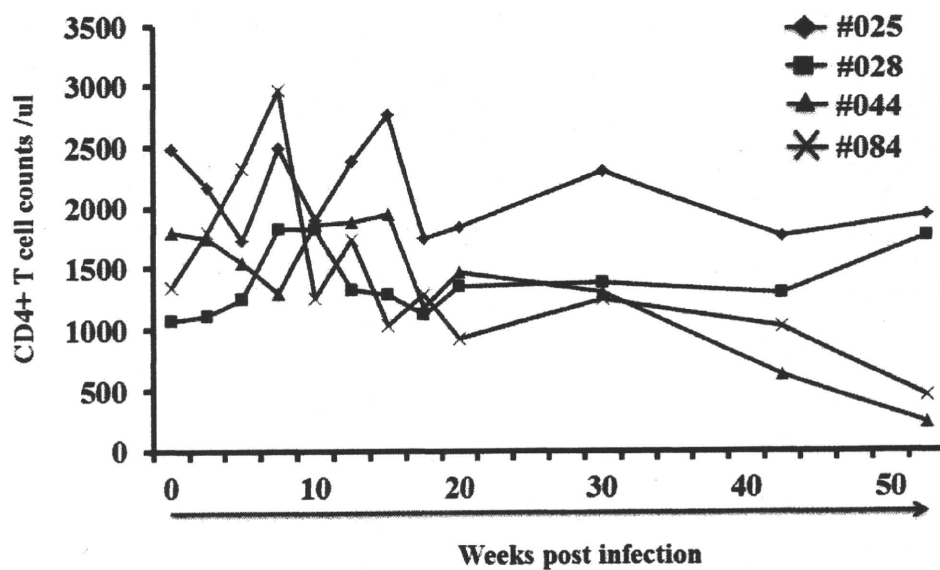


図5. SIV接種カニクイザルのCD4+T細胞の推移

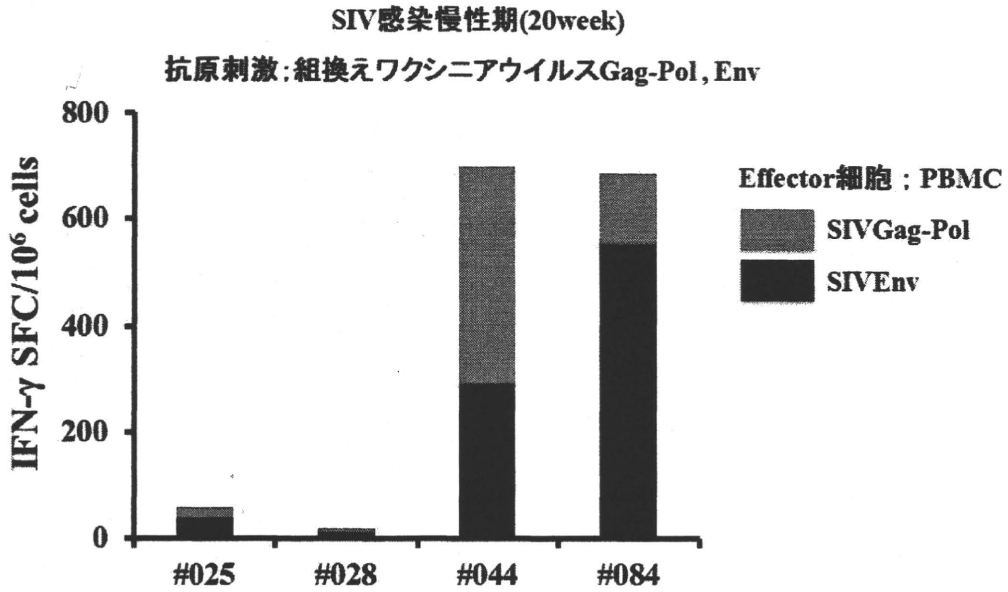


図6. SIV感染慢性期における細胞性免疫応答

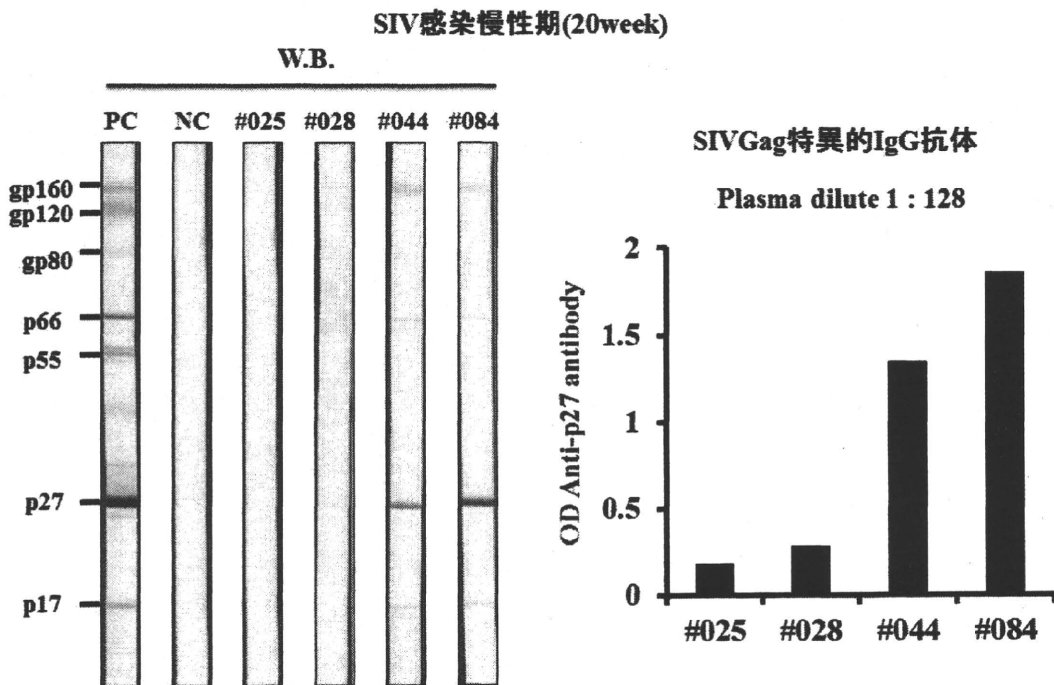


図7. SIV感染慢性期における液性免疫応答

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 (総括)

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

研究分担者：奥野良信

(財) 阪大微生物病研究会 観音寺研究所 所長

研究要旨

腸管粘膜に存在する M 細胞を標的とするインフルエンザワクチンの開発を目的とし、インフルエンザウイルスの至適抗原の検索、及びマウスにワクチンを腸管免疫した場合の免疫応答について調査した。その結果、以下のことが明らかになった。1) MDCK 細胞または発育鶏卵を基質とする季節性インフルエンザワクチン (全粒子、及び HA ワクチン) を作製し、BALB/c マウスに皮下接種した。2 回接種後の血清 HI 抗体価を測定した結果、MDCK 細胞由来ワクチンと鶏卵由来ワクチンの免疫原性は、ほぼ同等であると考えられた。

2) インフルエンザ HA ワクチンをマウスの腸管に直接免疫することにより、インフルエンザウイルス特異的な鼻粘膜 IgA や血中 IgG 抗体が誘導された。また、この免疫方法で誘導される IgA 抗体には、中和活性のあることが分かった。

今後、腸管へのデリバリーシステムを構築できれば、MDCK 細胞培養由来インフルエンザ HA ワクチンを抗原とする粘膜ワクチンの開発に結びつくと考えられた。

A. 研究目的

腸管粘膜に存在する M 細胞を標的とするインフルエンザワクチンの開発を目的とし、インフルエンザウイルスの至適抗原の検索を行った。また、インフルエンザ HA ワクチンをマウスの腸管に直接免疫することにより、インフルエンザウイルス特異的な鼻粘膜 IgA や血中 IgG 抗体の応答を調査した。

B. 研究方法

1) 至適抗原の検索

インフルエンザワクチンの至適抗原の検索を目的とし、イヌ腎臓細胞由来 MDCK 細胞と発育鶏卵でそれぞれ増殖させた季節性インフルエンザウイルス抗原の免疫原性の比較を以下の方法で行った。

無血清培地で培養した MDCK 細胞を

基質とし、2007/2008 シーズンの季節性インフルエンザワクチン株 (A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1), A/Hiroshima/52/2005 (H3N2), B/Malaysia/2506/2004) を培養して、それぞれの全粒子ワクチンとスプリットワクチンを作製した。同様に発育鶏卵を基質とし、この 3 株のウイルスの全粒子ワクチンとスプリットワクチンも作製した。これら 12 種類のワクチンを BALB/c マウスに皮下投与した。初回免疫から 3 週後に追加免疫を行い、さらに 1 週後に血清を得た後に、血清 HI 抗体価を測定した。

2) マウスにおける腸管免疫の応答に関する調査

A/Solomon Islands 株、A/Hiroshima 株、及び B/Malaysia 株の発育鶏卵由来 HA ワクチンをそれぞれ単味で BALB/c マウスに投与した。ゾンデを用いて胃内

に直接投与する方法によって 2~3 週間隔で 4 回免疫を行った。なお、最初の 3 回の免疫にはアジュバントとして精製百日咳毒素を添加した。

4 回目の免疫から 3 日後に、鼻腔洗浄液と血清を回収し、鼻腔洗浄液からはインフルエンザウイルス特異的 IgA-ELISA 抗体価を、血清からは特異的 IgG-ELISA 抗体価を調べた。

また、A/Solomon Islands 株については、サブクラスが IgA のインフルエンザウイルス特異的モノクローナル抗体を作製することを目的とし、上記のマウスから脾臓細胞を取り出し、定法に従って、抗インフルエンザウイルスモノクローナル (IgA) 抗体を作製した。得られたクローンについて、HI 試験、間接蛍光抗体法 (IFA)、中和試験、ELISA 試験を実施し、その性状解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の目的のために実施される動物実験計画は、(財) 阪大微生物病研究会観音寺研究所の動物実験委員会への申請をもとに、倫理面を含む審査・承認を受けた。また、本実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71 号平成 18 年 6 月 1 日) に基づく研究施設の動物実験ガイドラインに則り、動物の保定法・麻酔の方法・接種法・飼育観察法など、実験動物に対しての苦痛を可能な限り軽減できる方法で実施した。

C. 研究結果

1) 至適抗原の検索

A/Solomon Islands 株ワクチン免疫群血清の幾何平均 HI 抗体価は、MDCK 細胞由来全粒子で 88/鶏卵由来全粒子で 110, MDCK 細胞由来スプリットで 180/鶏卵由来スプリットで 390 であ

った。A/Hiroshima 株ワクチン免疫群血清の幾何平均 HI 抗体価は、MDCK 細胞由来全粒子で 80/鶏卵由来全粒子で 24, MDCK 細胞由来スプリットで 160/鶏卵由来スプリットで 310 であった。

B/Malaysia 株ワクチン免疫群血清の幾何平均 HI 抗体価は、MDCK 細胞由来全粒子で 44/鶏卵由来全粒子で 28, MDCK 細胞由来スプリットで 150/鶏卵由来スプリットで 110 であった。

2) マウスにおける腸管免疫の応答に関する調査

A/ Solomon Islands 株、A/Hiroshima 株、及び B/ Malaysia 株の HA ワクチンで腸管免疫されたマウスのインフルエンザウイルス特異的な鼻粘膜 IgA 抗体価と血清 IgG 抗体価を測定した。その結果、A/Solomon Islands ワクチン免疫群の鼻腔洗浄液の IgA-ELISA 抗体価は 2^7 、A/Hiroshima 株ワクチン免疫マウスでは 2^8 、B/Malaysia 株ワクチン免疫マウスでは 2^7 であった。いずれの抗体価も、我々が経験的に感染防御レベルとしている 2^5 の抗体価を超えていた。また、A/Solomon Islands 株ワクチン免疫群の血清の IgG-ELISA 抗体価は $2^{9.5}$ 、A/Hiroshima 株ワクチン免疫マウスでは 2^{12} 、B/Malaysia 株ワクチン免疫マウスでは 2^{11} であった。

A/ Solomon Islands 株インフルエンザ HA ワクチンで腸管免疫されたマウスから脾臓を取り出し、結果的に 20 種類のインフルエンザウイルス特異的 IgA モノクローナル抗体を得た。このうち、8 種類の抗体は、中和活性だけでなく、HA 活性と IFA も陽性であり、これらは HA 蛋白質に対する抗体であると考えられた。

D. 考察

MDCK 細胞由来ワクチン免疫群の平均抗体価を鶏卵由来ワクチン免疫群の

平均抗体価で除した値は、全粒子ワクチンで0.80～3.3、スプリットワクチンで0.46～1.4であった。全ての値が0.25～4の間（HI 価上下2管以内）に収まっていたことから、MDCK 細胞由来ワクチンと鶏卵由来ワクチンのマウスにおける免疫原性は、全粒子でもスプリットでもほぼ同等であると考えられた。

また、インフルエンザ HA ワクチンを直接腸管に免疫することにより、インフルエンザウイルス特異的な鼻粘膜 IgA や血中 IgG 抗体を誘導できること、及び、この免疫方法で中和活性を持つ IgA 抗体を誘導できることが本研究で明らかになった。このことから、インフルエンザワクチンを腸管免疫することにより、鼻粘膜上に中和活性をもつ IgA 抗体を誘導できると考えられる。

今後、腸管へのデリバリーシステムが構築できれば、インフルエンザ HA ワクチンを抗原とする粘膜ワクチンの開発に結びつくと考えられた。

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

E. 結論

インフルエンザ HA ワクチンを直接腸管に免疫することにより、インフルエンザウイルスに対する中和活性を持つ鼻粘膜 IgA を誘導することができた。

F. 健康危機情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

B 細胞亜集団の分化・活性化機構の研究

研究分担者：紅露 拓

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・プロジェクトリーダー

研究要旨

新規粘膜ワクチンの開発には粘膜免疫を増強するアジュバントの開発が必須となる。経粘膜ワクチンのメリットの一つに粘膜面交叉防御性 IgA 抗体の誘導が挙げられるが、この抗体の産生担当細胞や産生制御機構は詳しくわかっていない。本研究では粘膜免疫のエフェクター細胞としての B-1 細胞の性質と機能を詳しく解明し、B-1 細胞活性化アジュバントの探索やヒト B-1 細胞同定に向けた基盤技術の確立を目指した。その結果、B-1 細胞の分化決定が血球分化の極めて早い時期に行なわれること、種間を超えた B-1 細胞マーカーとして細胞内カルシウム動態やフォスファチジルコリン含有リポソーム染色性が使いうること、培養系により B-1 細胞活性化物質が評価できること、経鼻ワクチン反応に B-1 細胞が関与していることを明らかにし、新規粘膜ワクチンアジュバント開発の手がかりを得た。

A. 研究目的

B リンパ球はその機能や局在から大きく B-1 細胞と B-2 細胞に分けられる。B-2 細胞が T 細胞依存性に抗原特異的な免疫グロブリンの産生を行なうのに対して、B-1 細胞は感染の有無にかかわらず存在する自然抗体の産生や、T 細胞非依存性の抗体産生に関わるとされる。自然抗体は様々な病原体に広範な交叉反応性を示すことから、未知、あるいは変異型の病原体に対する防御としての有効性が注目される。また、腸管における抗体産生細胞の約半分が B-1 細胞由来であり、腸管免疫におけるエフェクター細胞としても重要であるがその役割については不明な点も多い。

本研究では粘膜ワクチンアジュバントの標的としての B 細胞亜集団の機能解明を目的として以下の研究を行った。

1) B-1 細胞初期分化機構の解析：B-1 細胞については独立した細胞系列であるか、

特定の抗原に対する B 細胞の活性化した表現型であるかの長い論争の末、2006 年に B-1 前駆細胞が同定された。しかし、どのような制御機構により B-1/B-2 分化が決定されるかはわかっていない。そこで最も初期の B-1 分化決定細胞を同定し、B-1 分化決定機構の解明を目指す。

2) B-1 細胞マーカーの検討：マウス B-1 細胞に対応するヒトの B 細胞亜集団が同定されていない。マウス B-1 細胞の細胞表面マーカーがヒトに当てはまるかどうかかわからないので、より B-1 細胞の機能に依存するマーカーを見つける。

3) B-1 細胞活性化物質の探索：B-1 細胞を活性化する物質は粘膜ワクチンアジュバントの候補となりうる。そこで試験管内で B-1 細胞に抗体産生を促す物質を探索する培養系を樹立する。

4) 鼻粘膜免疫における B-1 細胞の役割の解明：腸管粘膜での IgA 産生細胞の約半分が B-1 細胞由来と報告されているが、

経鼻ワクチン作用部位である鼻粘膜における抗体産生に B-1 細胞が関わっているかどうかは調べられていない。そこで B-1 細胞を欠損する Btk ノックアウトマウスを用いて鼻粘膜免疫における B-1 細胞の役割を検討する。

B. 研究方法

1) B-1 細胞初期分化機構の解析:

胎生 15 日目の BALB/c マウス肝臓および成獣骨髄細胞から血球系列マーカー陰性 (Lin⁻), c-kit⁺, IL-7R α ⁺細胞および Lin⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺(KSL)細胞を磁気ビーズ細胞分離法と蛍光標識セルソーターを用いて精製し、放射線照射 (1Gy) した C.B-17/ICR scid/scid マウスに静脈内移植した。移植後 4 週間後にマウスを安楽殺し、血清および腹腔細胞を回収した。血清中の IgM 抗体量および抗フォスファチジルコリン抗体価は ELISA 法により測定した。腹腔細胞は蛍光標識抗 CD19, IgM, CD23, CD5 の各抗体で染色し、フローサイトメータで B-1 細胞と B-2 細胞の数を測定した。

2) B-1 細胞マーカーの検討:

マウス腹腔細胞にカルシウムイオン蛍光指示薬 Indo-1 を浸透させた後、細胞表面マーカーを染色した。フローサイトメータを用いて抗 IgM 抗体刺激時の細胞内カルシウムイオン濃度の経時変化を測定し、細胞表面マーカーによる各リンパ球集団について解析した。

また、6-carboxyfluorescein (6CF) を 1M Tris pH 8.0 に溶解し、pH を 7.5 に調整したものに Distearoyl phosphatidyl choline からなるリポソームを懸濁し、6CF 内包リポソームを調製した。マウス腹腔細胞を上記リポソームおよび抗 CD19, 抗 CD23, 抗 CD5 の各蛍光標識抗体と反応させ、洗浄後フローサイトメータで解析した。

3) B-1 細胞活性化物質の探索:

マウス腹腔細胞より B-1 細胞以外の細

胞を磁気ビーズ法により除去した。具体的には腹腔マクロファージを FITC 標識 F4/80 抗体、T 細胞を FITC 標識抗 CD3e 抗体、B-2 細胞を FITC 標識抗 CD23 抗体、赤血球を FITC 標識 TER-119 抗体でそれぞれラベルし、抗 FITC 抗体結合マイクロビーズと反応させた。この細胞懸濁液を MACS 磁気カラムにかけ、標識されていない細胞画分を回収した。得られた B-1 細胞を様々な条件で培養し、7 日後にフローサイトメータにより細胞表面マーカーの解析、ELISA 法により培養上清中の抗体価の測定をそれぞれ行なった。

4) 鼻粘膜免疫における B-1 細胞の役割の解明:

B-1 細胞と自然抗体を欠損する Btk ノックアウトマウスおよび対照群、あるいは BALB/c nu/nu マウスおよび対照群をペントバルビタール系麻酔薬の腹腔内投与により麻酔し、HA 抗原として 1 μ g のインフルエンザスプリットワクチン原液 (A/Brisbane/59/2007(H1N1)) を 10 μ g の poly(I:C) あるいは最終濃度 0.5% の Chitosan とともに点鼻投与した。投与量は片鼻 5 μ l ずつとした。2 週間後に同様の処置を行ない、さらに 2 週間後にマウスを安楽殺し、血清および鼻腔洗浄液を回収した。一部の実験では 1 μ g の同じワクチンを同じスケジュールでアジュバントを併用せずに皮下投与した。

Btk ノックアウトマウスに B6.SJL マウス d15 胎児肝から精製した血球系列マーカー陰性、c-kit 陽性、IL-7 受容体 α 鎖陽性共通リンパ球前駆細胞 (CLP) を移植し、8 週間後に上記スケジュールにて経鼻インフルエンザワクチン投与を行なった

鼻腔洗浄液および血清サンプル中のインフルエンザウイルス HA 抗原に対する抗体価は希釈したスプリットワクチン原液をプレートに固相化した ELISA 法にて検出した。

(倫理面への配慮)

動物実験は医薬基盤研究所実験動物取扱規定に準じ、動物実験委員会の承認を受けた上で行ない、動物の苦痛が必要最小限となるよう配慮した。遺伝子組換え生物については医薬基盤研究所組換えDNA実験委員会の承認を得た上で、適切な封じ込め環境下で行なった。

C. 研究結果

1) B-1 細胞初期分化機構の解析：

共通リンパ球前駆細胞 (CLP) はすべてのリンパ球に分化するとされている細胞であり、B-1、B-2 共通の前駆細胞であると予想されたが、胎児 CLP を移植した SCID マウス内では主に B-1 細胞が分化した。胎児 CLP と成獣 CLP を IgH のアロタイプキメラとして混合移植すると成獣 CLP からは B-2 細胞が分化したが、同じ個体内で胎児 CLP はやはり B-1 細胞にしか分化しなかった。一方、KSL 細胞はその由来が胎児肝、骨髄細胞に関わらず B-1 細胞、B-2 細胞両方への分化が認められた。

2) B-1 細胞マーカーの検討：

Indo-1 による細胞内カルシウム濃度の測定がその他 7 色の蛍光染色と同時にこなえることが確認できた。IgM 架橋後 B-1 細胞は B-2 細胞と比べ早期に細胞内カルシウムイオンの上昇が認められた。

腹腔細胞を 6CF 封入フォスファチジルコリンリポソームで染色すると、CD19 陽性 CD23 陰性 CD5 陽性の B-1a 細胞の一部のみがラベルされ、CD19 陽性 CD23 陽性の B-2 細胞および CD19 陽性 CD23 陰性 CD5 陰性の B-1b 細胞は全くラベルされなかった。

3) B-1 細胞活性化物質の探索：

MACS 法で精製した B-1 細胞の純度は約 85% であった。この細胞を適当な培養条件で 7 日間培養すると CD138 陽性抗体

産生細胞が出現し、培養上清中に IgM 抗体が検出された。一方、生体投与時にアジュバント効果の見られる、poly (I:C)、chitosan またはアラムを添加したものでは poly(I:C)のみが IgM 産生を誘導した。4) 鼻粘膜免疫における B-1 細胞の役割の解明：

アジュバントに poly(I:C)を使い、インフルエンザワクチンを経鼻投与すると、対照群マウスでは鼻腔洗浄液中に抗 HA-IgA 抗体が検出されたが、Btk ノックアウトマウスでは検出されなかった。対照群では血清中に抗 HA IgG1, IgG3, IgA の各抗体が検出されたが、Btk ノックアウトマウスではいずれも検出されなかった。アジュバントに chitosan を用いてワクチン経鼻投与を行なった場合、対照群では鼻腔洗浄液中抗 HA IgA 抗体、血清 IgG1, IgG3, IgA 抗体が検出されたが、Btk ノックアウトマウスではこれらのうち血清抗 HA IgG1 抗体がわずかに検出されただけであった。

B6.SJL マウス胎児肝 CLP を移植した Btk ノックアウトマウスでは移植 8 週後に血清 IgM, IgG3 が C57BL/6 マウスと同等の価に上昇した。これらのマウスの経鼻免疫後の鼻腔洗浄液中には抗 HA IgA 抗体が無処置の Btk ノックアウトマウスと比べ有意に高く検出された。また、腹腔細胞中のドナー由来細胞 (CD45.1 陽性) のほとんどが B-1 細胞であった。

経鼻インフルエンザワクチン応答に T 細胞が関与しているか調べるためにヌードマウスに 1 µg のインフルエンザワクチンを 10 µg の poly(I:C)とともに経鼻投与した際には鼻腔洗浄液中の抗 HA IgA 抗体、血清中の抗 HA IgG, IgA 抗体は全く検出されなかった。

D. 考 察

本研究の成果により粘膜免疫のエフェクター細胞の一つである B-1 細胞について

て、様々な新しい知見が得られた。

これまでに報告されていた B-1 前駆細胞は分化段階としてはプロ B 細胞に属するものであったが、今回初めてより未熟な CLP の B-1/B-2 分化能が胎児と成獣で異なり、胎児 CLP が B-1 細胞分化に偏向していることを明らかにした。その分子機構は不明であるが、胎児 KSL は成獣 SCID マウス体内で B-1/B-2 両方に分化できることから、胎児肝の環境に B-1 分化決定を引き起こす因子があるものと考えられる。それが明らかになれば、B-1 細胞分化を人為的に制御し、粘膜ワクチンの効果を高める免疫増強剤の開発に繋がる可能性がある。

ヒトの B-1 細胞の同定にはマウスで定義された B-1 細胞の細胞表面マーカーが必ずしも当てはまるとは言えず、より機能面に着目した同定法を考える必要がある。B-1 細胞の機能的特徴は特定の抗原に対する抗原受容体を持ち、常に一定の抗原受容体シグナルが発生していることが挙げられる。そのため、抗原受容体架橋時には B-2 細胞と異なるカルシウムイオン流入カイネティクスが見られることが報告されている。今回、多色蛍光フローサイトメータを用い、細胞内カルシウムイオン濃度の測定を 7 色の蛍光抗体染色と同時にこなせることを実証し、細胞表面マーカーによる B 細胞分画ごとのカルシウムイオン動態を測定する技術基盤が確立された。また、マウス B-1 細胞の代表的認識抗原であるフォスファチジルコリンを含有する蛍光リポソームを用いて B-1a 細胞のみが標識されることを確認できたが、ヒト B-1 細胞もフォスファチジルコリン反応性のものが一定割合を占めると考えられる。リポソーム染色によりヒト B-1 細胞を標識できる可能性が示された。

B-1 細胞は抗原受容体シグナルに対する応答、サイトカイン受容体の発現など

B-2 細胞と異なる点が多く、その活性化機構も独特であると考えられる。粘膜免疫のエフェクター細胞としての B-1 細胞を考えると、B-1 細胞を活性化する物質は粘膜アジュバントの候補となりうる。そのような化合物を探索する実験系として今回確立された B-1 細胞培養系は B-1 細胞を直接活性化する物質のスクリーニングに好適である。反面、ほかの免疫担当細胞を介して間接的に B-1 細胞の活性化を誘導する物質は評価できないため、さらなる評価系の構築も必要である。

Btk ノックアウトマウスの経鼻インフルエンザワクチン投与に対する反応の欠損は、実際に B-1 細胞あるいは自然抗体がワクチンの作用機序に関与していることを初めて見いだしたものである。しかし、B-1 細胞が産生する IgM クラスの血中自然抗体がワクチンに対する獲得免疫応答に必要なのか、B-1 細胞そのものが鼻粘膜における IgA 抗体産生を担っているのかは特定できない。今後、Btk ノックアウトマウスへの野生型マウス血清移入実験や、鼻粘膜の組織学的解析による IgA 産生細胞の特定などを進める必要がある。特に、経鼻免疫反応が T 細胞依存性であることから B-2 細胞の関与も現時点では否定できない。いずれにしても B-1 細胞がワクチンアジュバントの標的となりうることを示した点で、経鼻ワクチンアジュバント開発を進める重要な手がかりが得られた。

E. 結 論

本研究により、以下の事柄が明らかとなった。

1. 胎児期の共通リンパ球前駆細胞は B-1 細胞分化決定しており、それは造血幹細胞から共通リンパ球前駆細胞に分化する間の胎児環境により誘導される。
2. ヒト B-1 細胞を同定する技術として、多色蛍光標識と細胞内カルシウム濃度測

定を組み合わせる方法、フォスファチジルコリン含有リポソームを用いる方法を確立した。

3. マウスB-1細胞を無血清培地で培養し、IgM産生を誘導する物質の評価を行う実験系を確立した。

4. 経鼻ワクチン投与にB-1細胞または自然抗体が必須の役割を持つことをBtkノックアウトマウスを用いて証明した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kouro, T., Ikutani, M., Kariyone, A., Takatsu, K. Expression of IL-5R α on B-1 cell progenitors in mouse fetal liver and involvement of Bruton's tyrosine kinase in their development. *Immunology letters* Vol.123, (2) pp. 169-178. (2009)

Kouro, T. & Takatsu, K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int Immunol* **21**, 1303-1309 (2009).

Takatsu, K., Kouro, T. & Nagai, Y. Chapter 6 interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. *Adv Immunol* **101**, 191-236 (2009).

2. 学会発表

KOURO Taku, IKUTANI Masashi, TERATANI Akie, NAGAI Yoshinori, TAKATSU Kiyoshi. B-1 cell-restricted differentiation of IL-7R $^{+}$ lymphoid progenitors from fetal liver. 第38回日本免疫学会学術集会, 平成20年12月1日~3日, 京都 (口頭発表)

IIDA Ryuji, TERATANI Akie, KOURO

Taku. B-1 cell lineage specification occurs between hematopoietic stem cell and prolymphocyte stages by differentiation environment. 第39回日本免疫学会学術集会 (大阪) 平成21年12月4日 (ポスター)

Participation of Bruton's tyrosine kinase in immune response to nasal influenza vaccination

KOURO Taku¹, IIDA Ryuji¹, NAGATAKE Takahiro², ARAKAWA Akemi¹, IKUTANI, Masashi³, KUNISAWA Jun², KIYONO Hiroshi², TAKATSU Kiyoshi³ (1. Lab. Immune Modulation, National Institute of Biomedical Innovation, 2. Dept. Microbiology and Immunity, The Institute of Medical Science, The Univ. Tokyo, 3. Dept. Immunobiology and Pharmacological Genetics, Univ. Toyama) 2010年 国際免疫学会 (ポスター)

B-1 cell lineage specification occurs between hematopoietic stem cell and prolymphocyte stages by differentiation environments.

IIDA Ryuji¹, ARAKAWA Akemi¹, IKUTANI Masashi², NAGAI Yoshinori², TAKATSU Kiyoshi², KOURO Taku¹, (¹Lab. Immune Modulation, Nat. Inst. Biomed. Innov., ²Dept. Immunology and Pharmacological Genetics, Univ. Toyama) 2010年 国際免疫学会 (口頭発表)

インフルエンザワクチン経鼻投与時の免疫応答機構の解析—ブルトン型チロシンキナーゼの関与 紅露 拓, 飯田隆治, 篠田香織, 服部祐紀, 高津聖志 2010年 日本ワクチン学会 (口頭発表)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

「B-1 細胞培養による自然抗体産生誘導物質のスクリーニング系」(出願予定)

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

特記すべきこと無し

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

< 雑 誌 >

研究代表者：清野 宏

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 <u>Kiyono, H.</u>	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., Kagiyama, Y., Kurashima, Y., Higuchi, M., Ishikawa, I., Ogahara, I., and <u>Kiyono, H.</u>	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., <u>Kiyono, H.</u> , 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
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 <u>Kiyono, H.</u>	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
Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G.S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T.,	Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response.	Nature	462	226-230	2009

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., <u>Kiyono,</u> <u>H.</u> , and Ohno, H.					
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.	183	5738-5747	2009
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 <u>Kiyono, H.</u>	Oral Mucorice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralising immunity.	Vaccine	27	5982-5988	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 <u>Kiyono, H.</u>	Id2-, RORgammat-, and LTbetaR-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.,	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

Matsuki, T., Nonaka, K., Shibata, N., Gohda, M., Kagiyama, Y., Nochi, T., Yuki, Y., Fukuyama, Y., Mukai, A., Shinzaki, S., Fujihashi, K., Sasakawa, C., Iijima, H., Goto, M., Umesaki, Y., Benno, Y., and <u>Kiyono, H.</u>					
Tokuhara, D., Yuki, Y., Nochi, T., Kodama, T., Mejima, M., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Nanno, M., Nakanishi, U., Takaiwa, F., Honda, T., and <u>Kiyono, H.</u>	Secretory IgA-mediated protection against <i>V. cholerae</i> and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> 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 <u>Kiyono, H.</u>	Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines.	Nat Mater.	9	572-578	2010
Fuglem, B., Jirillo, E., Bjerkås, I., <u>Kiyono, H.</u> , 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.,	In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine that induces protective immunity against botulism in nonhuman primates.	J Immunol.	185	5436-5443	2010

Ono, F., Kozaki, S., Terao, K., Tsukada, H., and <u>Kiyono, H.</u>					
Kayamuro, H., Yoshioka, Y., Abe, Y., Arita, S., Katayama, K., Nomura, T., Yoshikawa, T., Kubota-Koketsu, R., Ikuta, K., Okamoto, S., Mori, Y., Kunisawa, J., <u>Kiyono, H.</u> , Itoh, N., Nagano, K., Kamada, H., Tsutsumi, Y., and Tsunoda, S.	Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus.	J Virol.	84	12703-12712	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 <u>Kiyono, H.</u>	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
Kim, D.Y., Sato, A., Fukuyama, S., Sagara, H., Nagatake, T., Kong, I.G., Goda, K., Nochi, T., Kunisawa, J., Sato, S., Yokota, Y., Lee, C.H., and <u>Kiyono, H.</u>	The airway antigen sampling system: respiratory m cells as an alternative gateway for inhaled antigens.	J Immunol.	186	4253-62	2011

研究分担者：保富 康宏

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
.Yoshida, T., Saito, A., Iwasaki, Y., Iijima, S., Kurosawa, T., Katakai, Y., <u>Yasutomi, Y.</u> , Reimann, K.A., Hayakawa, T.	Characterization of natural killer cells in tamarins: a technical basis for studies of innate immunity.	Frontiers Microbiol.	in press		2011

and Akari,H.					
Xing, Li., Wang, J.C., Li, T-C., <u>Yasutomi,Y.</u> , 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.	85	1117-1124	2011
Chono,H., Matsumoto,K., Tsuda,H., Saito,N., Lee,K., Kim,S., Shibata,H., Ageyama,N., Terao,K., <u>Yasutomi,Y.</u> , 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.	22	35-43	2011
Saito,A., Nomaguchi,M. , Iijima,S.,Lee, Y-J., Kono,K., Nakayama,E.E , Shioda,T., <u>Yasutomi,Y.</u> , 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	13	58-64	2011
Naruse,T.K., Zhiyong,C., Yanagida,R., Yamashita,T., Saito,Y., Mori,K., Akari,H., <u>Yasutomi,Y.</u> , Matano,T. and Kimura,A.	Diversity of MHC class I genes in Burmese-origine rhesus macaques.	Immunogenetics	62	601-611	2010
Okabayashi,S., Uchida,K., Nakayama,H., Ohno,C., Hanari,K., Goto,I. and <u>Yasutomi,Y.</u>	Periventricular Leucomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (macaca fascicularis)	J.Comp.Pathol.	Epub		2010