

20114038A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究推進研究事業）

漢方薬によるワクチンアジュバント効果  
の検討と臨床応用

平成23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 済木 育夫

平成24年（2012年）5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 漢方薬によるワクチンアジュバント効果の検討と臨床応用 . . . . . 1  
済木 育夫

### II. 分担研究報告

1. 抗原特異的T細胞の誘導に及ぼす十全大補湯の増強効果とがんワクチン療法におけるアジュバントとしての応用に関する基礎的検討 . . . . . 7  
済木 育夫、小泉 桂一
2. 粘膜免疫システムを介した漢方アジュバントの作用メカニズムの解明 . . . . . 15  
清野 宏
3. 子宮頸癌前癌病変に対するヒトパピローマウイルス (HPV) 治療ワクチン開発における漢方アジュバントの有効性に関する研究 . . . . . 19  
川名 敬
4. 高齢者におけるインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント作用の短期効果の検討 . . . . . 25  
後藤 博三、済木 育夫、小泉 桂一
5. 漢方薬によるワクチンアジュバント効果の検討と臨床応用：漢方薬を投与された RA 患者におけるインフルエンザワクチン接種後の免疫応答 . . . . . 33  
小暮 敏明
6. 形成外科手術後の患者での皮膚創傷治癒に及ぼす補中益気湯の効果（予備的検討） . . . . . 39  
並木隆雄
7. 漢方薬による HPV ワクチンに対するアジュバント効果の検討と臨床応用 . . . . . 42  
斎藤 滋、日高 隆雄
8. 漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバント療法に関する臨床試験の計画及び統計解析に関する研究 . . . . . 45  
折笠 秀樹

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 49

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 53

## 漢方薬によるワクチンアジュバント効果の検討と臨床応用

主任研究者 濟木育夫 富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野 教授

### 研究要旨

本年度は、平成 22 年度の本事業において基礎研究より探索されたアジュバント効果を有する漢方薬に関して、高齢者およびリウマチ患者のインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討、ならびに子宮頸がんワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討を行った。その結果、十全大補湯は、抗体価の低い高齢者のインフルエンザワクチン接種後の抗体価上昇に好影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに、漢方薬を投与されたリウマチ患者におけるインフルエンザワクチン接種後の免疫応答の経過観察を行った結果、臨床的に有意な Seroconversion を認め、インフルエンザワクチン免疫応答に Positive に作用する可能性が示唆された。また、子宮頸がんワクチンに関しては、十全大補湯の併用試験を実施中である。一方で、漢方薬のアジュバント効果機序の詳細も同時に解析が進んでおり、将来的に種々ワクチンと漢方薬の併用療法構築の際における有用な情報を提供できる準備が整いつつある。最終年度は、この臨床研究の速やかな解析と本班の研究結果に対する総括を行う予定である。

### 分担研究者

清野 宏	東京大学医科学研究所炎症免疫学分野 教授	折笠秀樹	富山大学大学院バイオ統計学・臨床疫学 教授
川名 敬	東京大学医学部附属病院産科婦人科学 助教	小泉桂一	富山大学和漢医薬学総合研究所漢方診断学分野 准教授
後藤博三	富山大学大学院医学薬学研究部和漢診療学 准教授		
小暮敏明	社会保険群馬中央総合病院和漢診療科 部長		
並木隆雄	千葉大学大学院医学研究院和漢診療学講座 准教授		
斎藤 滋	富山大学大学院医学薬学研究部産科婦人科学 教授		
日高隆雄	富山大学大学院医学薬学研究部産科婦人科学 准教授		

### A. 研究目的

（平成 22 年度当初目的の変更はない。）

高齢化が進む中、高騰する医療費の削減や、感染症の罹患率低減、さらには近年のがん研究の進展を背景としてがんの発症抑制を目的とした、種々のワクチンが医療現場で利用されている。海外では、効率的にワクチンの効果を得るために、アジュバントを用いた製剤が広く用いられているが、

安全性を懸念する声もあり、国内では、アジュバントの使用はごく一部の製剤に限られている。このような中、新型インフルエンザ等の新興感染症に対するワクチンや、がん治療ワクチンの効果増強等のため、安全かつ効果的なワクチンアジュバントが強く求められている。一方、漢方薬の免疫に対する影響について、これまで我々は、自然免疫の活性化を介して薬効が発揮されることを数多く報告してきた（eCAM, 2008, 他 37 編）。漢方薬の獲得免疫に対する影響は未だ明らかでないが、最近我々は、漢方薬である十全大補湯が、がんワクチンを用いた抗原特異的な獲得免疫の誘導を促進し、抗がん効果の増強につながることを動物実験において明らかにした。この結果から、現在医療現場で用いられている漢方薬は、安全性の高い経口ワクチンアジュバントとして、速やかに応用できるものと期待している。そこで本研究では、現在医療現場で接種可能なワクチンを用いて、併用した際にそのワクチンの効果を増強する漢方薬を網羅的に探索する基礎研究を行うと共に、その有用性を臨床研究により評価する。これにより、既存のワクチンによる予防医療をより効果的・効率的に行うための漢方薬併用療法を、薬都・富山より提言するとともに、新規ワクチン開発時の未承認アジュバントの安全性リスクの回避による開発促進、抗原使用量減少による製造量の増加に資することを目的とする。具体的には、基礎研究と臨床研究を連関させながら遂行することで、漢方薬の中から、ワクチン抗原に対する (1) 特異的抗体の産生、(2) 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導、さらには (3) 交差反応性抗体の産生の増強が可能な漢方薬を網羅的に探索し、治療適応根拠に基づき、免疫力が低下した高齢者、およびリウマチ患者のインフルエンザならびに子宮頸がんワクチンアジュバントとして迅速に利用可能とする点にある。

なお、本総括研究報告書は研究組織全体の総括的な研究概要の報告とするため、分担研究の詳細は各分担研究報告書に記載する。

## B. 研究方法

1. 臨床研究①(高齢者およびリウマチ患者のインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討)

濟木、後藤、小暮、並木、小泉、折笠の分担報告の研究手法の項を参照のこと。

2. 臨床研究②(子宮頸がんワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討)

川名、齋藤、日高、折笠の分担報告の研究手法の項を参照のこと。

3. 基礎研究(ワクチンアジュバント効果を有する漢方薬のその機序解析)

濟木、清野、川名、小泉の分担報告の研究手法の項を参照のこと。

(倫理面への配慮)

本研究で用いる十全大補湯、補中益気湯および黄耆建中湯等の漢方薬はすでに医薬品として使用され、重篤な副作用の報告はない。仮に投与中に副作用が生じた際には、直ちに投与を中止し適切な処理を行う。この点に関して対象患者にはインフォームドコンセントを行い承諾を得た。なお、この臨床研究は富山大学倫理委員会から承認済みである。実験動物を用いた基礎研究に関しては、national animal welfare committee のガイドラインに従って行った。

## C. 研究結果

1. 臨床研究①(高齢者およびリウマチ患者のインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討)

濟木、後藤、小暮、並木、小泉、折笠

今回我々は、高齢者などのインフルエンザのハイリスクグループに対する漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバントとしての可能性を多面的に解析し、多施設において漢方薬非投与症例と比較検討する。本年度は、使用する漢方薬の検討と測定項目を確認するため、短期効果の検討を実施した。対象は富山県の長期療養型病床3施設に入院中の患者でインフルエンザワクチン接種予定者 S 病院 26 名、T 病院 13 名、Y 病院 7 名。S 病院、T 病院において高齢者を無作為に十全大補湯投与群と非投与群、補中益気湯投与群と非投与群の2群に分け、Y 病院では、漢方薬非投与による対象者のみを12週間経過観察した。インフルエンザワクチン接種前、接種後4週、8週、12週にHI価A(H1N1)、A(H3N2)、B(ビクトリア系統)を測定した。また、副反応に及ぼす影響の検討のため血中IgE-RIST、血液生化学検査を実施し、漢方薬投与群と非投与群を比較検討した。その結果、十全大補湯投与群、補中益気湯投与群、漢方薬非投与群のワクチン接種前と接種後4週、8週、12週のHI価とGMT値を比較検討したところ、3群間で各々差を認めなかった。しかし、接種前抗体価10以下で接種後抗体価40以上または接種前抗体価に比べて抗体価の上昇率が4倍以上を陽転と定義して、陽転率の推移を検討したところ、接種後4週のA(H3N2)の陽転率は十全大補湯投与群で非投与群と比較して上昇傾向( $P < 0.1$ )が認められた。このことから、十全大補湯は、抗体価の低い高齢者のインフルエンザワクチン接種後の抗体価上昇に好影響を及ぼしている可能性が示唆された。

また、リウマチ患者に対しての検討も行った。関節リウマチ(以下RA)は免疫異常を背景とした滑膜関節を病変の主座とする全身性の慢性炎症性疾患である。RAのコントロールは現在でも困難であるが、近年の生物学的製剤(以下Bio.製剤)の臨床応用

に伴いその治療戦略は大きく変化している。しかしながらRA自体の免疫異常ならびに種々の抗リウマチ薬による易感染性は臨床上の問題となっている。現在、RA患者ではインフルエンザワクチン接種が推奨されているが、インフルエンザワクチン予防接種の疾患活動性に及ぼす影響ならびに感染症予防効果の意義が、なお議論されている。そこで漢方薬を服用しているRA患者においてインフルエンザワクチン免疫応答がいかなるProfileを呈しているかを明らかにすることを目的として、45例(平成22年度)・56例(平成23年度)の漢方薬を投与されているRAを対象として3種類のSubunitについて観察研究を実施した。その結果、漢方薬が投与されているRA患者は、1)血清変換(Seroconversion)において健康人とほぼ同様であった、2)MTX投与群/非投与群で血清変換に差異は見られなかった、3)臨床的に有意な抗体価以上を呈する患者(Seroprotection)が多かった、4)インフルエンザワクチン接種前後でRAの疾患活動性の増悪は見られなかった、等の結果が得られた。以上からRA患者において漢方薬はRAの疾患活動性の抑制が期待されている一方で、インフルエンザワクチン免疫応答にPositiveに作用することが示唆された。平成24年度には長期的な抗体価の推移ならびにBio.製剤が投与されているRA患者に特化して免疫応答を明らかにする予定である。

2. 臨床研究②(子宮頸がんワクチンに対する漢方薬のアジュバント応用に向けた予備的検討)川名、齋藤、日高、折笠

子宮頸がん治療ワクチンに関しては、HPV16型E7が細胞表面に提示された乳酸菌Lactobacillus casei(乳酸菌E7ワクチン:GLBL101c)のGMP製剤を作成した。施設研究倫理委員会の承認を得て、第I/IIa相臨床試験を計画し、平成21年から臨床試験が

開始している。

(i) 安全性

全 10 例において、GLBL101c 内服に関連した有害事象は 1 つも認めなかった。血液生化学データでも内服に伴った変動は認めなかった。外部評価委員会の審査の結果、GLBL101c は極めて安全性の高い薬剤であることが示された。

(ii) 有効性

子宮頸部粘膜に E7-CMI (E7 特異的 IFN  $\gamma$  産生、GranzymeB 産生細胞) の誘導が 2cap/日投与のコホート 2 から明らかに確認されてきた。興味深いことに PBMC よりも cervical lymphocyte の方が E7-CMI が有意に高いことがわかった。4cap/日が E7-CMI を最も高いレベルで誘導された。また、5 週と比べ 9 週では 2 倍近い誘導が確認され、8 週の内服によりブースター効果が発揮されていることが確認された。しかし、6cap/日投与のコホート 4 では、3 例中 2 例はむしろ E7-CMI の誘導が低かった。

病理学的評価としては、1cap/日もしくは 2cap/日投与の 4 例は、CIN3 病変が残存し、円錐切除術を必要とした。4cap/日投与のコホート 3 では、3 例全例が CIN1-2 に退縮し、臨床的有効性が示され、手術を回避できた。これらの 3 例は試験終了後、投薬はなく経過観察中 (1.5-2 年経過) であるが全症例とも CIN3 の再発を認めない。

6cap/日投与のコホート 4 のうち、高い E7-CMI が cervical lymphocyte に誘導された 1 例は CIN2 に退縮した。E7-CMI の誘導が弱かった 2 例では CIN3 が消失せず後療法を必要とした。以上のことから E7 発現乳酸菌ワクチンは、ある程度の増強によって E7-CMI が量依存的に上昇したが、それ以上の高用量になると E7-CMI が減少し臨床効果も乏しくなることがわかった。このことより、E7-CMI をさらに増強し臨床効果を高めるためには、増量ではなく、アジュバント併用が必要であると考えられた。

HPV ワクチン (サーバリックス) 接種を行う女性を対象に、漢方薬が副作用軽減作用および抗体産生のアジュバント効果を持つかを検討中である。対象は 20 代の一般女性 40 人であり、無作為に十全大補湯エキス投与群と非投与群を割り付けし、ワクチン接種を行っている。調査項目は、症状日記を用いて副反応の軽減の有無：局所 (注射部位) の特定した症状 (疼痛、発赤、腫脹) および全身性の特定した症状 (疲労、筋肉痛、頭痛、胃腸症状、関節痛、発疹、発熱、蕁麻疹) を調査し、血液検体を用いて生化学検査 (BUN、Cre、GOT、GPT、 $\gamma$ -GTP) および免疫学的検査 (HPV 抗体価) の測定を行う。現在 20 名が 2 群に分かれ投与を開始し、残り 20 名の参加を開始するところである。今後、漢方薬による副作用への影響および抗体産生へのアジュバント効果の評価を行う予定である。

### 3. 基礎研究(ワクチンアジュバント効果を有する漢方薬のその機序解析)

済木、清野、川名、小泉

本研究では、前年度までにワクチン抗原に対するアジュバント効果が基礎研究で確認され、現在、臨床研究①および②で各種ワクチンと併用が行われている漢方薬、十全大補湯および補中益気湯に関して、その機序解析を免疫学的に検討した。

十全大補湯は、OVA 免疫時において、マクロファージの活性化を誘導し、抗原提示関連分子 (MHC class I、CD80) の発現、及び、細胞性免疫を担うサイトカイン (IL-12 p40) 産生を高めることが明らかとなった。十全大補湯をマウスに投与し回収した PEMs を、in vitro にて OVA パルスし固定化した後に、OVA 特異的 T-hybridoma である CD8-OVA1.3 細胞株を加え、PEMs における CD8-OVA1.3 細胞への抗原提示能及び活性化誘導能を検討した結果、十全大補湯投与により増強することが確認された。さらに、

in vitroにてOVAパルスしたPEMsにおいても、十全大補湯群におけるマクロファージのIL-12 p40産生が亢進しており、また、無添加群においても同等の産生が観察された。これは、in vivoでOVA免疫したマウス由来PEMs、及び更にin vitroにてOVA添加により再刺激を与えたPEMsのIL-12 p40の産生が、両者ともに十全大補湯投与群において亢進していた結果と総合し、十全大補湯はマクロファージにおけるIL-12 p40産生を増強することが示唆された。

補中益気湯に関しては、昨年度に行った研究から、IgA産生を増強する機能があることを見いだした。これらの知見をもとに、本年度は長期IgA応答、ならびにメモリー応答に対する影響を検討した。その結果、①経口ワクチン接種と同時に補中益気湯を投与した群では、1ヶ月余り抗原特異的IgA抗体の産生が増強すること、②経口ワクチン接種と同時に補中益気湯を投与した群で、ワクチン接種3ヶ月後に抗原を再投与した場合のメモリー応答には増強効果が認められないこと、③ワクチン接種後のみに補中益気湯を投与していた群では、メモリー応答だけが増強すること、が判明した。

さらに、臨床試験の結果をうけて、本年度からはE7発現乳酸菌ワクチンの有効性を高めるための研究を行っている。臨床試験では有効例を認めたが、高用量では有効性が低下する傾向が示された（後述）ことから、用量依存性ではなく、アジュバントによる効果の増強を考え、安全性が担保されている漢方薬に注目した。

マウス実験により、GLBL101cと漢方薬の併用経口投与を行った。1, 2, 4, 6週の4クールで経口投与し、7週で腸管リンパ球と脾臓リンパ球を採取し、E7-CMIを調べた。さらに粘膜アジュバントとして大腸菌リンボトキシン(LTB)を併用することも行った。十全大補湯と補中益気湯を食餌に混ぜてGLBL101cのマウス投与期間中連日内

服投与した。粘膜アジュバントである大腸菌トキシン(LTB)はGLBL101c投与の週に週1回投与した。十全大補湯、および補中益気湯をGLBL101cに併用した場合は、脾臓細胞ではE7-CMIがGLBL101cのみと比して上昇したことから全身性免疫へのアジュバント効果が示された。しかし腸管粘膜リンパ球では明らかな上昇とは言えなかった。

そこで、GLBL101cにLTBを添加した状態で十全大補湯、および補中益気湯を併用したところ、腸管粘膜リンパ球にGLBL101c単独よりも4-5倍高いE7-CMIが誘導された。また抗E7抗体も血清中、腸管洗浄液中に誘導された。とくにHETの誘導能が高いことがわかった。乳酸菌と漢方薬、粘膜アジュバントを併用することによってE7-CMIを粘膜リンパ球に誘導する作用が相乗的に増強された。

#### D. 考察

#### E. 結論

平成22年度の本事業において数十種類の漢方薬に対して検討を行った結果、強いワクチンアジュバント効果を有する十全大補湯、および補中益気湯の選択に基礎研究で成功した。本年度は、高齢者に対するインフルエンザワクチンに対する漢方薬のアジュバント効果に関する予備試験も終了し、無作為化比較臨床研究も実施中であり、基礎研究から橋渡しされた臨床研究も当初計画通り遂行している。さらに、臨床研究②、および③も実施中であり、本班全体の進行も予定通りである。なお、漢方薬のアジュバント効果機序の詳細も同時に解析が進んでおり、将来的に種々ワクチンと漢方薬の併用療法構築の際における有用な情報を提供できる準備が整いつつある。最終年度は、この臨床研究の速やかな解析と本班の研究結果に対する総括を行う予定である。

#### F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

各分担研究者の項を参照のこと

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

「乳酸菌 HPV ワクチンと漢方アジュバント併用投与による粘膜免疫誘導を介した子宮頸部前癌病変に相乗的治療効果」特許申請中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



## 抗原特異的 T 細胞の誘導に及ぼす十全大補湯の増強効果と がんワクチン療法におけるアジュバントとしての応用 に関する基礎的検討

研究分担者 済木育夫 富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野 教授  
小泉桂一 富山大学和漢医薬学総合研究所漢方診断学分野 准教授

### 研究要旨

がん抗原を用いて宿主にがん特異的な免疫反応を誘導し抗腫瘍効果を得る治療法、がんワクチン療法が、近年注目され研究されている。本治療法は、がん特異的であることから、強力かつ安全という利点がある。一方、がん抗原の免疫原性の弱さがその治療効果を妨げている要因となっている。

本研究では、このがんワクチン療法の効果を増強するアジュバントとして、漢方薬に着目した。代表的な補剤である十全大補湯は、自然免疫賦活作用に関して多くの報告がなされている。一方で、獲得免疫への影響に関しての報告はほとんど認められない。我々はがんワクチン療法に十全大補湯を併用することで、その抗腫瘍効果の増強及び作用メカニズムについて検討した。

### A. 研究目的

近年の目覚ましい医療の向上にも関わらず、がんの治療法は技術的、経済的にも依然として多くの問題を残しており、その臨床応用が著しく制限されている現状にある。

従って、より多くのがんの症例に有効で、副作用の少ない治療法の開発が求められている。こうした背景から、次世代の治療法として、生体が元来有するがん細胞を正常細胞と見分けて排除する腫瘍免疫機構を利用し、それを増幅・活性化することによってがんを抑圧しようとするがん免疫療法が注目されている。

本格的な腫瘍免疫に対する研究は 1953 年の Foley の実験を発端とする。化学発がん剤メチルコラントレンより誘発した肉腫を同系マウスに移植し、ある程度発育した

時点でその腫瘍を結紮除去すると、このマウスは同一腫瘍を再移植されても拒絶できることを報告した。ここに、宿主の免疫系ががん細胞に発現する抗原を認識し、拒絶反応を起こし得ることが示されたのである。しかし、その臨床応用においては効果が得られなかったことから、次第にがん抗原の存在が否定されるようになってきた。

そのため、70～80 年代では生物学的応答調節物質 (biological response modifier: BRM) のような、非特異的に免疫反応を賦活することにより抗腫瘍効果を得る治療法が、中心となって研究されてきた。しかし、1970 年代に始まった非特異的免疫賦活剤 (BCG、ピシバニール (OK432) など) は、作用機序が曖昧で、十分な治療効果が得られなかった。1980 年代半ばからは、免

疫学の発展により、がんに対する免疫機構が解明されるようになり、サイトカイン療法が生まれた。抗腫瘍エフェクター細胞を活性化する IL-2 や IL-12 などの調節性 サイトカインを用いる治療や、細胞傷害作用を発揮する IFN などの作用性サイトカインを用いる治療などが主に試されてきた。サイトカイン療法が臨床応用された当初は大量投与による抗腫瘍効果が期待されたが、発熱・ 血圧低下・ 肺水腫などの副作用が顕著であったのみで、明瞭な効果を得られることは少なく、適応範囲にも制限があり、むしろ副作用の大きさばかりが認知されるようになってしまった。

このような風潮の中、再びがん抗原が着目されるきっかけとなったのは、1991 年 Boon らの報告である。彼らは、悪性黒色腫の患者の体内にはがん細胞を認識し攻撃するがん抗原特異的 T 細胞が誘導されており、その標的となるがん細胞上の抗原分子を同定した。これをきっかけに、がん抗原を用いて、生体内にがん抗原特異的な免疫反応を誘発することによる治療法、がんワクチン療法が広く研究されるようになった。1998 年には、Rosenberg らを中心に、悪性黒色腫に対し、同定された抗原ペプチドを用いた免疫治療がいち早く行われ、その成果が報告されている。例として、WT1 抗原は、ほぼすべての白血病と、肺がん・ 乳がん・ 胃がんなどの多くの固形がんで高い発現が報告されており、また、がん細胞の変異によっても消失しにくいことから、がん免疫療法のターゲットとして極めて有望な抗原として、現在注目されているがん抗原の 1 つである。現在、大阪大学・ 高知大学など日本の複数の医療機関を含め、世界中でがんワクチン療法の第 I / II 相の臨床試験が実施されている。がんワクチン療法は、生体制御機構を応用することで抗腫瘍効果をえるという理想的な治療法であり、外科療法・ 化学療法・ 放射線療法の三大標準療

法を補完する、第四のがん治療戦略として注目されている。

一方で、がん細胞は正常細胞から派生したものより、がん抗原の免疫原性は極めて低いことが考えられ、その打開策として、強い免疫応答を誘導するための抗原補助剤、即ちアジュバントを用いることが検討されている。現在多くのがんワクチン療法の臨床治験においては、ミネラルオイルと界面活性化剤からなるフロイント不完全アジュバント (Freund' s incomplete adjuvant : FIA) が使用されている。FIA は抗原水溶液と油中水型のエマルジョンを形成し、生体内で抗原を徐放化してその作用を増強する。しかし、FIA は抗体産生誘導能力は強力であるが、がん抗原特異的 T 細胞などの細胞性免疫の誘導能は非常に弱いアジュバントである。実際、悪性黒色腫の少数例で腫瘍縮小効果が報告されてはいるものの、十分な効果は得られていない。従って、これらの問題点を克服し、がんワクチン療法の効果を高めるアプローチとして、IL-12 や GM-CSF との併用、複数のがん抗原ペプチドを投与するプロトコールや、改変ペプチドの開発など更なる改良が検討されている。漢方薬は、単剤単効な西洋薬に対し単剤多効であるという特徴があり、生体内に本来備わる免疫機構を調整することで、生体内の恒常性を維持し、さらに病態を改善していく性質をもつことから、広い領域での応用とその治療効果が期待されている。しかしながら、BRM としての役割が期待される一方で、漢方薬の獲得免疫系に対する作用については、2001 年に Dai らによって、十全大補湯投与により悪性黒色腫自然発症マウスにおける悪性黒色腫特異的な細胞傷害性 T 細胞の活性化が促進することが報告されているが、抗原特異的免疫誘導における詳細な作用メカニズムに関しては明らかとされていない。

よって本研究では、漢方薬が獲得免疫系

を惹起することで、がん抗原特異的 T 細胞を誘導する可能性、そして、がんワクチン免疫療法における新たな経口投与可能なアジュバントとしての、漢方薬（漢方アジュバント）の有用性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

フロイント不完全アジュバント (Freund's incomplete adjuvant; FIA) は Difco より購入した。Ovalbumin(OVA)は Sigma(St. Louis, USA)の製品で Grade V のものを実験に供した。RPMI1640 (GIBCO, USA) (GIBCO, USA) は、penicillin;100 unit/ml および streptomycin;100  $\mu$ g/ml (明治製菓, 東京)を添加し、以下の実験に用いた。なお、本研究において、細胞培養に用いた FCS はすべて 56  $^{\circ}$ C、30 分間の非働化処理を行った。In vitro 刺激に用いた抗 CD3 抗体は eBioscience(USA)より購入した。FACS 解析に用いた抗体である、抗 mouse CD16/32 (2. 4G2)、PerCP ラベル化抗 mouse CD3, CD4 抗体は BD Biosciences Pharmingen(USA)より、FITC ラベル化抗 mouse CD8, CD25, CD69 は eBioscience(USA)より、FITC ラベル化抗 CD30 抗体は Serotec Ltd(UK)より購入した。IL-2 の測定には Mouse IL-2 BD OptEIA ELISA Set、IL-4 の測定には Mouse IL-4 BD OptEIA ELISA Set (BD Biosciences Pharmingen(USA))を用い、IFN- $\gamma$  の測定には Ready-Set-Go! Mouse IFN- $\gamma$  ELISA Set (eBioscience(USA))を用いた。

### 2. 実験動物

日本エスエルシー株式会社（浜松）より、C57BL/6 マウス (H-2Kb; 6 週齢、雌性)を購入し、富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野動物実験室にて飼育した。給水と給餌は自由摂取とした。飼育および実験は本学実験動物センターのガイドライン

に従って実施した。

### 3. マウスへの OVA の免疫方法

OVA を BSS(-)に溶解し作製した OVA 溶液を、等量の FIA によりエマルジョン化 (OVA/FIA) した。C57BL/6 マウスへの免疫は、OVA/FIA を OVA 量 100  $\mu$ g /mouse で背部皮下に接種することで行った。

### 4. 漢方薬

十全大補湯 (TJ-48) (lot. 204004810) (Table. 1)は、株式会社ツムラ(東京)から購入した。上記のように OVA 免疫したマウスを、十全大補湯投与群と、その対照群として水投与群の 2 群に分別し、十全大補湯投与群には十全大補湯を濃度 1%に調整したものを連日自由摂取させた。飲水量から算出した 1 匹の 1 日あたりの漢方摂取量は約 40-45 mg であり、これは Ohnishi らの報告にある、大腸癌の肝転移抑制効果を示した投与量(40mg/day 強制経口投与)と合致していた。

### 5. in vivo 免疫と所属リンパ節の回収

OVA/FIA の接種日より漢方薬投与を開始し、8 日後に所属リンパ節のリンパ球 (以下 LNs) を回収した。各々一部を FACS 解析に用い、一部を in vitro にて活性化させたのち解析に用いた。

### 6. in vitro における抗 CD3 抗体刺激によるリンパ球の活性化の誘導

上記のように回収した LNs を  $1 \times 10^6$  cells/ 2 ml で播種した。抗 CD3 抗体 (eBioscience) (終濃度 1  $\mu$ g/ml)を添加し、72 時間後、上清を回収し各細胞が産生した各種サイトカインを ELISA にて測定、また、その細胞を FACS 解析に用いた。

### 7. FACS によるリンパ球活性化マーカーの発現および T 細胞ポピュレーションの解析

上記のように回収した LNs および in vitro にて活性化させた LNs を、それぞれ 2 % FCS、0.01 % NaN<sub>3</sub> を添加した PBS に懸濁し、抗 mouse CD16/32 (2.4G2) 抗体を 15 分間、4 °C で反応させた。その後、各抗体をそれぞれ添加し、再び 1 時間、4 °C で反応させたのち、FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson) を用いて FACS 解析を行った。

#### 8. OVA 抗原を用いた PEMs の in vitro 活性化の誘導

上記のように調整した PEMs を  $1 \times 10^7$  cells/ 2 ml で 3.5 cm dish に 2 枚播種した。1 枚は無刺激のまま解析に用い、1 枚には OVA を (終濃度 100  $\mu$ g/ ml) 添加することで再刺激した。48 時間後、上清を回収し、PEMs が産生した各種サイトカインを ELISA にて検討した。IL-12 p40 の測定には Mouse IL-12 p40 BD OptEIA ELISA Set (BD Biosciences Pharmingen(USA)) を用いた。(その他は前節に準ずる。) また、その細胞の表面抗原の発現は FACS にて解析した。

#### 9. 細胞

OVA257-264 と MHC class I (H-2Kb) 複合体を特異的に認識して IL-2 を分泌する T-hybridoma である CD8-OVA1.3 細胞 (34-36) は、大阪大学大学院薬学研究科・中西剛先生から供与された。本細胞の培養には 10% fetal calf serum (FCS)、50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (2-ME) を含む DMEM 培養液を用いた。

#### 10. マウス腹腔滲出マクロファージ (PEMs) の調整

マウスに十全大補湯を連日自由摂取にて投与し、7 日間目に 3% チオグリコレート溶液を腹腔内投与した。その後、十全大補湯の投与を継続し、11 日目にマウスを犠牲死させ、前節に準ずる方法で腹腔滲出マ

クロファージ (PEMs) を調整し、以下の実験に供した。

#### 11. OVA/LPF 溶液の調整

OVA を BSS に溶解した後、Lipofection® Reagent (以下 LPF) と 1:2 で混合し、30 分室温にてインキュベートしたものを用いた。

#### 12. 抗原提示実験

前述のように調整した腹腔滲出マクロファージ (PEMs) を AIM-V 培地に懸濁し、96-well plate に 1well あたり  $1 \times 10^5$  cells/ 100  $\mu$ l で播種し、5 % CO<sub>2</sub>、37 °C で培養した。1-2 時間後、上記のように調整した OVA/LPF 溶液を 100  $\mu$ l/ well で添加 (最終濃度 OVA 50  $\mu$ g/ml : LPF 20  $\mu$ g/ml) した。20 時間培養し抗原である OVA を取り込ませた後、その培養上清を回収し PEMs より産生されたサイトカインを ELISA にて検討した。続いて PBS にて洗浄し、0.05% グルタルアルデヒド (室温、5 分) にて PEMs を固定化、PBS にて 2 回洗浄したのち、CD8-OVA1.3 細胞を  $5 \times 10^5$  cells / 150  $\mu$ l/ well で播種した。24 時間培養後、上清を回収し、CD8-OVA1.3 細胞の産生する IL-2 を、ELISA にて定量した。

#### 8. 統計解析

統計的有意性は両側 Student' s t-test 及び Mann-Whitney' s test により解析し、 $p < 0.05$  を有意であると判断した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は富山大学のガイドラインに則り行った。

#### C. 研究結果

OVA と FIA を混合して作製したエマルジョン (OVA/FIA) をマウスに接種し、十全大補湯投与群とそのコントロールとして水投与群に分別した。両群ともに自由給水に

て連日投与し、8 日後に所属リンパ節よりリンパ球を回収し(LNs)、細胞表面上の抗原の発現を FACS にて解析した。リンパ球の活性化マーカーとして知られている CD25、CD30、CD69 の発現を調べた結果、CD69 の発現が、十全大補湯投与群において亢進していることが確認された(図 1.)。

続いて、回収した LNs を、in vitro にて抗 CD3 抗体を添加することにより活性化し、同様にしてその細胞表面上の抗原の発現を FACS にて解析した。T 細胞の特徴である CD3 抗原は、T 細胞受容体 (T cell receptor; TCR) と複合体を形成して抗原認識による細胞内への刺激の伝達を担っている。よって、抗 CD3 抗体を添加することで抗原提示と同様な刺激を与え、in vitro において T 細胞の活性化を誘導することができる。抗 CD3 抗体で刺激後における LNs の細胞表面上の活性化マーカーを FACS にて解析した結果、十全大補湯投与群において CD30 の若干の発現の亢進が観察された。また、未刺激および抗 CD3 抗体刺激後の LNs における CD4+・CD8+T 細胞の割合には、十全大補湯投与による影響は確認されなかった。

上記の抗 CD3 抗体で刺激した培養上清を回収し、LNs より産生されたサイトカインを ELISA にて定量した。IL-4・IFN- $\gamma$  産生に関しては、両群間ともに検出確認できなかった。一方、十全大補湯投与群で IL-2 の産生の亢進が確認された(図 2)。

また、OVA 免疫日より十全大補湯を連日投与したマウスより PEMs を回収し、PEMs を in vitro にて無刺激で培養、あるいは OVA の添加による再刺激により活性化を誘導し、細胞表面上の活性化マーカー、MHC 分子及び補助刺激分子の発現を FACS にて解析した。その結果、OVA 無刺激下では、PEMs の各活性化マーカー (CD25, CD30, CD69)、APC の抗原提示に用いられる MHC 分子(MHC class I , II ) 及び B7 補助刺激分子

(CD80, CD86) の発現は、十全大補湯投与による差異は観察されなかった。一方、OVA 刺激下においては、活性化マーカーである CD69、MHC class I 及び CD80 の発現が、十全大補湯投与群で増強していることが明らかとなった。

また、同様に培養上清中のサイトカイン産生を ELISA にて検討した。結果、PEMs の培養上清中の IL-4 産生は、OVA 刺激、無刺激いずれの条件においても確認できなかった。一方、IL-12 p40 の産生は、OVA 無刺激下にて十全大補湯投与群における産生の亢進が認められた。更に OVA 刺激することにより、十全大補湯投与による効果は顕著に認められた。また、IL-2 産生に関しては、OVA 無刺激下では認められなかったが、OVA 刺激下においては水投与群・十全大補湯投与群ともにその産生が観察され、更に十全大補湯投与群においてその産生の亢進が認められた。

#### D. 考察

#### E. 結論

抗原特異的 T 細胞は、TCR を介して、APC (がん細胞) の細胞膜表面上に発現する MHC class I と抗原ペプチド複合体を認識し活性化する。がん細胞特異的な T 細胞は、活性化の後、Fas ligand の発現やパーフォリン/グランザイムを放出し、がん細胞にアポトーシスを誘導する。よって、がん抗原特異的 T 細胞はがん排除機構における中心的なエフェクター細胞であり、がんワクチン療法において、宿主内にがん抗原特異的 T 細胞を誘導することは非常に有用であると思われる。本章では、十全大補湯が OVA 特異的 T 細胞の誘導を増強する可能性を、抗原提示を受ける側の T 細胞および抗原提示をする側のマクロファージ/APC のそれぞれに着目し解析した。

OVA を接種したマウスに十全大補湯を投与し、回収してきた T 細胞を、in vitro に

て抗 CD3 抗体の添加により刺激し、解析した結果、細胞表面上の活性化マーカー (CD30) の発現、及び、培養上清中の T 細胞が産生するサイトカインの一種である IL-2 が、対照群に対して明らかに増強していることを確認した。即ち、十全大補湯は、OVA 抗原特異的な T 細胞の活性化を増強することが明らかとなった。

OVA 接種日より十全大補湯投与を連日行ったマウスの PEMs を、in vitro にて OVA 添加により再刺激し、解析した結果、細胞表面上の活性化マーカー (CD69) の発現、及び MHC Class I、補助刺激分子 CD80 の発現の対照群に対する亢進が確認された。T 細胞の活性化を誘導するためには、APC 上の MHC class I あるいは MHC class II 分子の抗原ペプチドを、TCR を介した T リンパ球への第 1 シグナルに加えて、APC 上の CD80 及び CD86 抗原と T リンパ球に発現する CD28 及び CD152 (CTLA-4) 抗原を介した細胞内への第 2 のシグナルが必要であることが知られている。十全大補湯によるこれらの抗原提示関連分子の発現の亢進は、マクロファージを介した T 細胞の獲得免疫誘導の増強につながるということが考えられる。

また、PEMs を in vitro にて OVA 添加により再刺激した際に、その培養上清中に PEMs より産生されたサイトカインを ELISA にて検討した結果、IL-12 p40 及び IL-2 産生が対照群に対して増強することが観察された。

IL-12 は 1989 年に初めて B 細胞株培養上清より NK 細胞を活性化する因子として単離精製され、その後多様な生物活性が明らかにされてきた。IL-12 はマクロファージやその他の APC から産生され、NK 細胞や T 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生の誘導、活性化及び細胞傷害性の増強、その増殖の促進や、Th0 細胞からの Th1 ヘルパー細胞への分化とその増殖を促進するといった、細胞性免疫に関わる重要なサイトカインであるこ

とが知られている。がんワクチン療法においてもこの IL-12 との併用により抗腫瘍効果が増強することも報告されている。このように、十全大補湯は、マクロファージ/APC における抗原特異的な T 細胞の誘導能を増強する効果を有することが示唆された。

また、同様にして、in vitro にて OVA で再刺激したことにより、PEMs からの IL-2 産生が誘導され、更に十全大補湯投与群においてその産生が亢進するという結果を得た。IL-2 は主として活性化した T 細胞が産生するサイトカインであると言われており、マクロファージが IL-2 を産生するという報告は無い。しかし、マクロファージが IL-2 を産生した結果は非常に興味深い。近年、E. coli、yeast や zymosan を用いて DC を刺激すると IL-2 が産生され、ナイーブ T 細胞の分化を補助するという報告がなされている。また、IL-2 は T 細胞の増殖促進だけでなく、B 細胞・マクロファージ・NK 細胞の増殖及び活性化誘導の増強などに関わることが報告されており、中でも、がん細胞に対する傷害作用を有する LAK 細胞 (lymphokine activated killer cell) を in vitro にて誘導することから、その臨床効果が期待されている分子である。よって抗原提示細胞における IL-2 産生を誘導できればがんワクチンの抗腫瘍効果の増強が期待できる。

以上の結果より、十全大補湯は、OVA 免疫時において、マクロファージの活性化を誘導し、抗原提示関連分子 (MHC class I、CD80) の発現、及び、細胞性免疫を担うサイトカイン (IL-12 p40) 産生を高めることが明らかとなった。

十全大補湯をマウスに投与し回収した PEMs を、in vitro にて OVA パルスし固定化した後に、OVA 特異的 T-hybridoma である CD8-OVA1.3 細胞株を加え、PEMs における CD8-OVA1.3 細胞への抗原提示能及び活性化誘導能を検討した結果、十全大補湯投与

により増強することが確認された。さらに、*in vitro*にてOVAパルスしたPEMsにおいても、十全大補湯群におけるマクロファージのIL-12 p40産生が亢進しており、また、無添加群においても同等の産生が観察された。これは、*in vivo*でOVA免疫したマウス由来PEMs、及び更に*in vitro*にてOVA添加により再刺激を与えたPEMsのIL-12 p40の産生が、両者ともに十全大補湯投与群において亢進していた結果と総合し、十全大補湯はマクロファージにおけるIL-12 p40産生を増強することが示唆された。

なし

本研究班では、注射型ワクチンおよび経口ワクチンと漢方薬（補剤）の併用試験を実施中である。この臨床試験と本基礎研究により得た知見を詳細に解析していくことが、種々剤型のワクチンに対する漢方薬のアジュバントとしての併用療法構築に対して重要であると思われる。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

保科瑛子、犬寫明子、大江未来広、山田美幸、竹野伸洋、条美智子、櫻井宏明、柴原直利、済木育夫、小泉桂一

抗原提示試験による経口ワクチン亜糖苷路候補の探索と機序解明、第28回和漢医薬学会学術大会、富山、2011

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

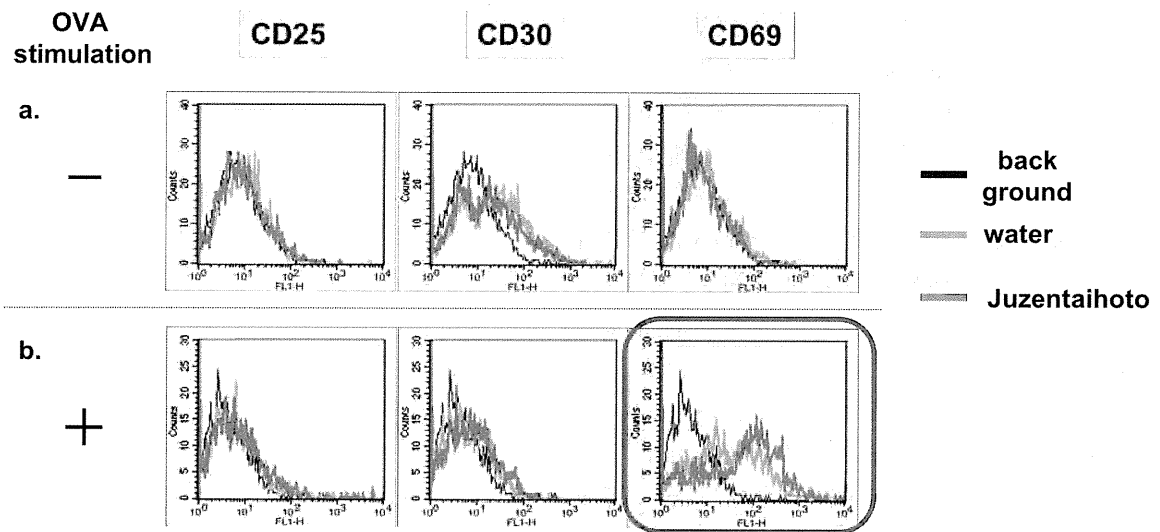
##### 1. 特許出願

なし

##### 2. 実用新案登録

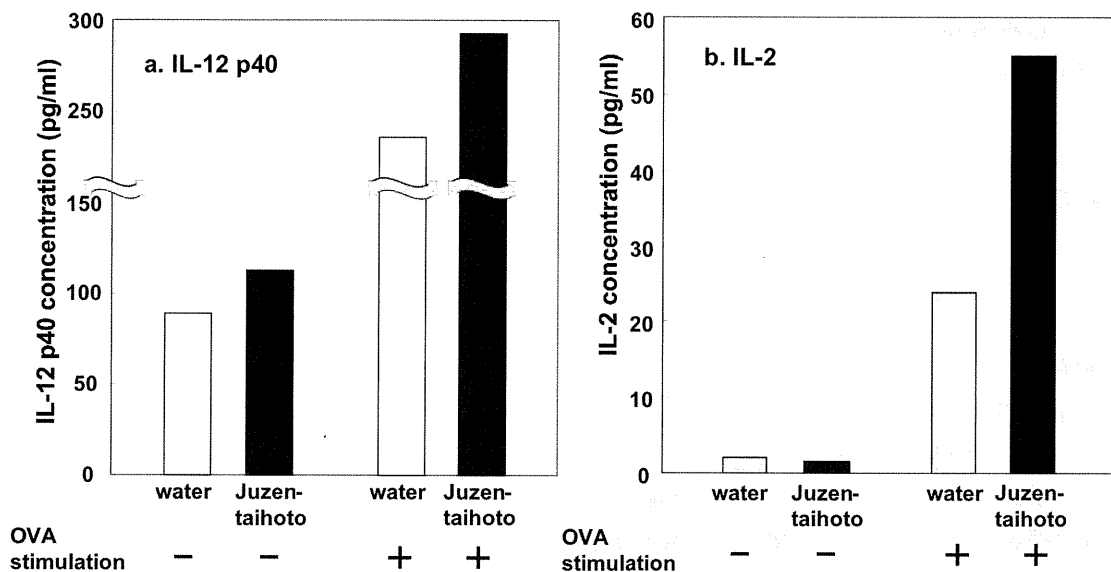
なし

##### 3. その他



**Figure 1. FACS analysis of PEMs activation derived from the OVA-immunized and Juzentaihoto-treated mice.**

Mice (n=3) were immunized by OVA/FIA with the orally administration of Juzentaihoto or water. 7days after, mice were injected thioglycollate medium intraperitoneally. 4days after the injection, PEMs were collected and cultured with (b) or without (a) OVA (100 µg/ml) for 48 h. The expression of the activation antigen (CD25, CD30 and CD69) on the PEMs were analyzed.



**Figure 2. Cytokine productions of PEMs derived from the OVA-immunized and Juzentaihoto-treated mice.**

Mice (n=3) were immunized by OVA/FIA with the orally administration of Juzentaihoto or water. 7days after, mice were injected thioglycollate medium intraperitoneally. 4days after the injection, PEMs were collected and cultured with (b) or without (a) OVA (100 µg/ml) for 48 h. IL-12 p40 (a) and IL-2 (b) included into the supernatants were measured by ELISA.



## 粘膜免疫システムを介した漢方アジュバントの 作用メカニズムの解明

研究分担者 清野 宏 東京大学医科学研究所炎症免疫学分野 教授

### 研究要旨

漢方薬の中には免疫調整作用を有するものがあることが知られているが、多くの漢方薬が内服であるのにも関わらず、最も影響を受けると予想される腸管免疫への作用についてはほとんど解明されていない。本研究では研究分担者の清野がこれまで進めてきた腸管免疫を始めとする粘膜免疫に関する先導的研究から得られた知的・技術基盤をもとに、アジュバント作用を中心に漢方薬の粘膜免疫に対する作用について明らかにする。昨年度に行った研究から、これまで脾臓などの全身系免疫に対し免疫調節機能があることが報告されている補中益気湯に IgA 産生を増強する機能があることを見いだした。これらの知見をもとに、本年度は長期 IgA 応答、ならびにメモリー応答に対する影響を検討した。その結果、①経口ワクチン接種と同時に補中益気湯を投与した群では、1ヶ月余り抗原特異的 IgA 抗体の産生が増強すること、②経口ワクチン接種と同時に補中益気湯を投与した群で、ワクチン接種3ヶ月後に抗原を再投与した場合のメモリー応答には増強効果が認められないこと、③ワクチン接種後のみに補中益気湯を投与していた群では、メモリー応答だけが増強すること、が判明した。

### A. 研究目的

いくつかの漢方薬は免疫調整作用があることが古くから知られているが、その作用メカニズムの多くは不明である。特に漢方薬の多くが内服処方なのにも関わらず、最も影響を受けると予想される腸管免疫に対する作用はほとんど未解明である。一方で研究分担者である清野はこれまでに粘膜免疫に関する先導的研究を遂行し、粘膜ワクチンの開発につながる多くの知的・技術基盤を構築している。また漢方薬と粘膜免疫に関連した研究としては、冬虫夏草をリード化合物とする FTY720 を用いた研究を遂行し、生体防御に関わる IgA の産生を始めとする腸管免疫制御機構に関する知見を得

ている。本事業においては、清野が有するこれらの研究基盤を用い、漢方薬の粘膜アジュバントへの応用について検討している。本事業の初年度である 22 年度においては、これまで免疫調節機能があることが報告されている漢方薬の中から、補中益気湯が腸管 IgA 応答を増強することを見いだした。これらの知見をもとに、本年度は補中益気湯による腸管 IgA 産生増強の長期的効果、ならびにメモリー応答に対する影響について検討した。

### B. 研究方法

1. 経口投与した抗原に対する特異的な免疫応答を検討する目的で、モデル抗原で

あるニワトリ卵白アルブミン (OVA, 1 mg/time/head) を粘膜アジュバントであるコレラトキシン(10  $\mu$ g/time/head)と共に経口投与した。投与は1週間に1回の頻度で行い、計3回投与した。メモリー応答を解析する目的で、最終免疫の3ヶ月後に再度、OVAとCTによる経口免疫を行った。

2. 補中益気湯の投与は週5回の頻度とし、一回当たりマウスに40 mg 経口投与した。作用機序を解明する目的で、免疫スケジュールの異なるタイミングで補中益気湯を投与する群を用意した。

3. 免疫後の各タイミングで糞便を回収し、ELISA法によりOVA特異的抗体反応を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は東京大学医科学研究所のガイドラインに則り行った。

#### C. 研究結果

1. 経口ワクチンの投与を週一回の頻度で計3回行った。昨年度の結果と同様、経口免疫を行っている期間に補中益気湯を投与した群で糞便中の抗原特異的IgAの産生を測定したところ、最終免疫の1週間後において抗体産生の増強が認められた。その後、補中益気湯の投与を行わずに抗体産生をモニタリングしていったところ、徐々に特異的IgA抗体量は減少していったが、補中益気湯による増強効果は約1ヶ月間持続した。最終免疫の2ヶ月後に抗体量を測定したところ、ほぼ検出限界以下となった。その後、1ヶ月間飼育した後、OVA+CTを再度経口投与してメモリー応答を測定したところ、抗原特異的IgA抗体は著しく増加したが、補中益気湯の増強効果は認められなかった。

2. 経口ワクチンの投与を週一回の頻度で計3回行った。この間は補中益気湯の投与を行わず、最終免疫の1週間後より補中益

気湯の投与を開始した。約3ヶ月間補中益気湯を投与し、その間に随時、糞便を回収し、抗原特異的IgAを測定したが、いずれの時も抗体産生の増強は認められなかった。これらのマウスにOVA+CTを再度経口投与してメモリー応答を測定したところ、抗原特異的IgA抗体は著しく増加し、補中益気湯を投与していた群ではさらに増強していた。

#### D. 考察

#### E. 結論

本年度による実験結果より、補中益気湯の同時投与による抗原特異的IgA抗体産生の増強効果は1ヶ月程度持続することが示された。その後、抗体量は減少していくが、そのスピードは補中益気湯の投与の有無に関わらず同程度であることから、免疫直後において高い抗体産生が誘導されたのが、長期にわたり抗体が検出された原因だと考えられる。一方で抗体産生がほぼ認められなくなった最終免疫の3ヶ月後に再度抗原を経口投与したところ、メモリー応答が惹起されIgA産生の著しい増加が認められた。この際、得られたIgA抗体価は補中益気湯の投与の有無に関わらず同程度であったため、免疫時のみに補中益気湯を投与しておいた場合はメモリー応答には影響を与えないことが示唆された。

上記の実験は、経口免疫を行った3週間の間のみ補中益気湯を投与した系であった。次の実験においては、経口免疫時には補中益気湯を投与せず、最終免疫の一週間後から補中益気湯の投与を開始した。補中益気湯がIgA抗体産生細胞へと分化した細胞に作用し、IgA産生を増強させているのであれば、このグループにおいても抗体価の上昇が認められるはずであるが、抗体価の増強は認められなかったことから、補中益気湯はIgA抗体産生細胞に作用しているのではなく、IgA抗体産生細胞を誘導する際に

作用していることが示唆された。

また興味深いことに免疫後の補中益気湯の投与群においては、抗体価の上昇が認められなかったものの、これらのマウスに抗原を再投与しメモリー応答を検討したところ、補中益気湯投与群において増強効果が認められた。これらのことから、抗原の投与時期に補中益気湯を投与しておくことで、免疫直後のIgA抗体産生だけでなく、メモリー応答も増強できることが示された。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fukuyama Y, Tokuhara D, Kataoka K, Gilbert RS, McGhee JR, Yuki Y, Kiyono H, Fujihashi, K., Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity. *Expert Rev. Vaccines* 11: 367-379, 2012
- 2) Yamamoto M, Pascual DW, Kiyono H., M Cell-targeted mucosal vaccine strategies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 354: 39-52, 2012
- 3) Kim DY, Sato A, Fukuyama S, Sagara H, Nagatake T, Kong IG, Goda K, Nochi T, Kunisawa J, Sato S, Yokota Y, Lee CH, Kiyono H, The airway antigen sampling system: Respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J. Immunol.* 186: 4253-4262, 2011 Cover page article
- 4) Okada K, Yamasoba T, Kiyono H., Craniofacial mucosal immune system: importance of its unique organogenesis and function in the development of a mucosal vaccine. *Adv. Otorhinolaryngol.* 72: 31-36, 2011
- 5) Goto Y, Kiyono H., Epithelial cell

microRNAs in gut immunity. *Nat Immunol.* 12:195-197. 2011

- 6) Terahara K, Nochi T, Yoshida M, Takahashi Y, Goto Y, Hatai H, Kurokawa S, Jang H-M, Kweon M-N, Domino SE, Hiroi T, Yuki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Kobayashi K, 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

- 1) Kiyono Hiroshi The 28th General Conference of the Japanese Association of Medical Science, Co-Chairman, the Session of “Gastrointestinal Immunity: Symbiosis and Immunity”, “Mucosal Vaccine as the New Generation of Vaccine” (Invited Speaker, April 2011, Tokyo, Japan)
- 2) Kiyono Hiroshi The 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Disease, US-Japan Cooperative Medical Science Program, “Mucorice and Nanoantibody for the Control of Intestinal Viral Infection” (June 2011, Stanford, USA.)
- 3) Kiyono Hiroshi The 15th International Congress of Mucosal Immunology, “The Mucosal Gateway System for Antigen-sampling and Homeostatic Niche” (Invited Speaker, July 2011, Paris, France)
- 4) Kiyono Hiroshi International Union of Microbiological Societies 2011, Current Topics of Human Vaccines Session, “Spick- and-Span for the

- Development of Transgenic-Rice (MucoRice) based Oral Vaccine” (Invited Speaker, September 2011, Sapporo, Japan) なし
- 5) Kiyono Hiroshi The 14th International Rhinologic Society and 30th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose, “Mucosal Chaperoning Vaccines for Upper Respiratory Tract Infections” (Invited Speaker, September 2011, Tokyo, Japan)
- 6) Kiyono Hiroshi The 38th Annual Meeting of The Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, “Intestinal Immune System for Microbiological Symbiosis and Vaccine Development” (Plenary Speaker, October 2011, Morioka, Japan)
- 7) Kiyono Hiroshi 25th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research, International Symposium on HIV and Mucosal Immunity, ” Spick-and-Span for the Development of MucoRice and Nanoantibody for the Control of Viral and Bacterial Infection” (Invited Speaker, December 2011, Tokyo, Japan)
- 8) Kiyono Hiroshi The 4th Tokyo Host Defenses Research Meeting, Plenary Lecture on “Uniqueness of the Mucosal Immune System for the Development of Oral Vaccine” (February 2012, Tokyo, Japan)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他