

oral vaccine development: Control of vitamin B9-mediated regulatory T cell function to enhance the vaccine antigen-specific IgA antibody responses, 4th Vaccine and ISV Annual Global Congress (2010年10月、Vienna, Austria)

7) Jun Kunisawa, Regulation of IgA antibody responses by immunological crosstalk with intestinal environmental factors, 第5回千葉大学 G-COE シンポジウム (招待講演、2010年12月、東京)

8) Jun Kunisawa, Immunological function of sphingosine 1-phosphate in the regulation of innate and acquired phases of intestinal IgA responses, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2010) (招待講演、2010年12月、神戸)

9) Jun Kunisawa, The uniqueness of mucosa-associated lymphoid tissues for the development of mucosal vaccine, BIT Life Sciences' 3rd World Congress of Vaccine (招待講演、2011年3月、北京、中国)

10) 國澤 純 次世代感染症ワクチンとしての粘膜ワクチン 第28回日本医学会総会、東京 (2011年4月、招待講演)

11) Jun Kunisawa, Eri Hashimoto, Izumi Ishikawa, and Hiroshi Kiyono, Dietary vitamin B9 is a survival factor of intestinal regulatory T cells, *Immunology* 2011, San Francisco, USA (May 2011)

12) Jun Kunisawa, Izumi Ishikawa, Eri Hashimoto, and Hiroshi Kiyono, A critical role of dietary vitamin B9 in the survival of intestinal regulatory T cells and consequent IgA responses, *International Congress of Mucosal Immunology* 2011, Paris, France (June,

2011)

13) Naoko Shibata, Takashi Obata, Yoshiyuki Goto, Shintaro Sato, Izumi Ishikawa, Jun Kunisawa, and Hiroshi Kiyono, Dendritic cells mediate the T cell retention in the interfollicular region of Peyer's patches, *International Congress of Mucosal Immunology* 2011, Paris, France (June, 2011)

14) Jun Kunisawa Lipids and vitamins in the regulation of gut immunity, *JAFI* 2011、東京 (2011年10月、招待講演)

15) 國澤 純 Immunological crosstalk with commensal bacteria in the regulation of intestinal IgA responses 消化管と短鎖脂肪酸 シンポジウム、東京 (2011年11月、招待講演)

16) 國澤 純 粘膜免疫からみたワクチン効果 第54回日本感染症学会中日本地方会学術集会、奈良 (2011年11月、招待講演)

17) Jun Kunisawa and Hiroshi Kiyono, Dietary vitamin B9 regulates regulatory T cell-mediated cellular and humoral immune responses in the intestine, 第40回日本免疫学会学術集会、千葉 (2011年12月)

18) Taichi Wake, Yosuke Kurashima, Jun Kunisawa, and Hiroshi Kiyono, Dietary vitamin B1 is required for the maintenance of naïve B cells but not intestinal IgA-secreting plasma cells, 第40回日本免疫学会学術集会、千葉 (2011年12月)

19) 國澤 純 冬虫夏草関連化合物 FTY720からの新展開—腸管における生体防御と恒常性維持における脂質とビタミンの役割— 第32回和漢医薬学総合研究所特別セ

ミナー、富山（2011年12月、招待講演）

20) 國澤 純 食品開発と創薬標的としての腸管免疫 京都大学 学際融合教育研究推進センター 生理化学研究ユニット第2回シンポジウム、京都（2012年6月13日、招待講演）

21) 國澤 純 冬虫夏草関連化合物 FTY720 を起点とした腸管免疫研究の最前線 第29回和漢医薬学会学術大会、東京（2012年9月3日、招待講演）

22) 國澤 純 腸内メタボリック環境を介した腸管免疫制御と疾患 第33回日本肥満学会 京都（2012年10月12日、招待講演）

23) Jun Kunisawa Lipids, vitamins, and nucleotides in the intestinal immunoregulation IEIIS2012 Satellite Symposium Infection, Inflammation, and Immunity、東京（2012年10月12日、招待講演）

24) Jun Kunisawa Lipids, vitamins, and nucleotides in the development and control of intestinal immune diseases Asia-Pacific Topic Conference、東京（2012年11月3日、招待講演）

25) 國澤 純 粘膜ワクチンの現状と今後に向けた新展開 第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜（2012年11月18日、招待講演）

26) 國澤 純 腸内環境を介した免疫制御とアレルギー・炎症との関連 東京小児アレルギー治療薬勉強会 東京（2013年1月10日、招待講演）

27) 國澤 純 腸内環境免疫ネットワークを介した免疫制御とアジュバント開発への展開 第6回次世代アジュバント研究会 大阪（2013年1月16日、招待講演）

28) 國澤 純 粘膜免疫のユニーク性と創薬への新展開 新適塾「未来創薬への誘い」第21回 大阪（2013年1月25日、招待講演）

29) 國澤 純 粘膜免疫の視点で見る微生物感染と共生 第28回奈良県感染症研究会 奈良（2013年2月2日、招待講演）

30) 國澤 純 粘膜組織における生体防御システムとしての上皮バリアと免疫制御 日本薬学会第133年会 横浜（2013年3月28日、招待講演）

31) 國澤 純 腸管免疫における脂質ネットワークを標的とした創薬戦略 日本薬学会第133年会 横浜（2013年3月30日、招待講演）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
該当事項なし
2. 実用新案登録
該当事項なし
3. その他
該当事項なし

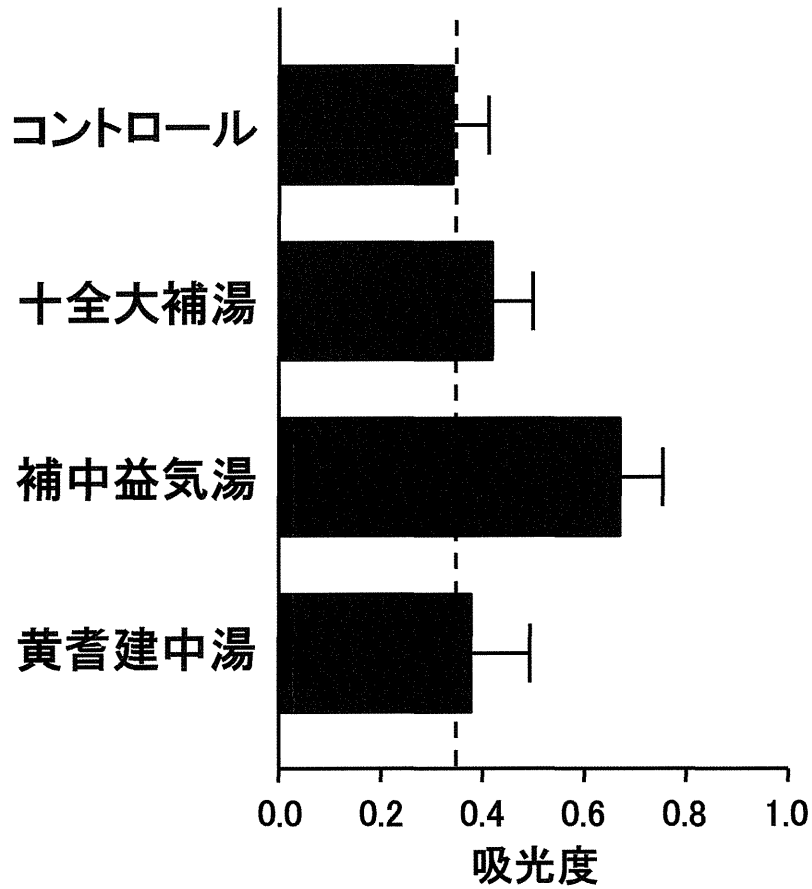


図1 週1回の頻度でニワトリ卵白アルブミン (OVA) を粘膜アジュバントであるコレラトキシンと共に3回経口免疫した。最終免疫の1週間後に糞便を回収し、OVA特異的IgA抗体をELISA法にて測定した。その間、週5回の頻度で各漢方薬を経口投与した。

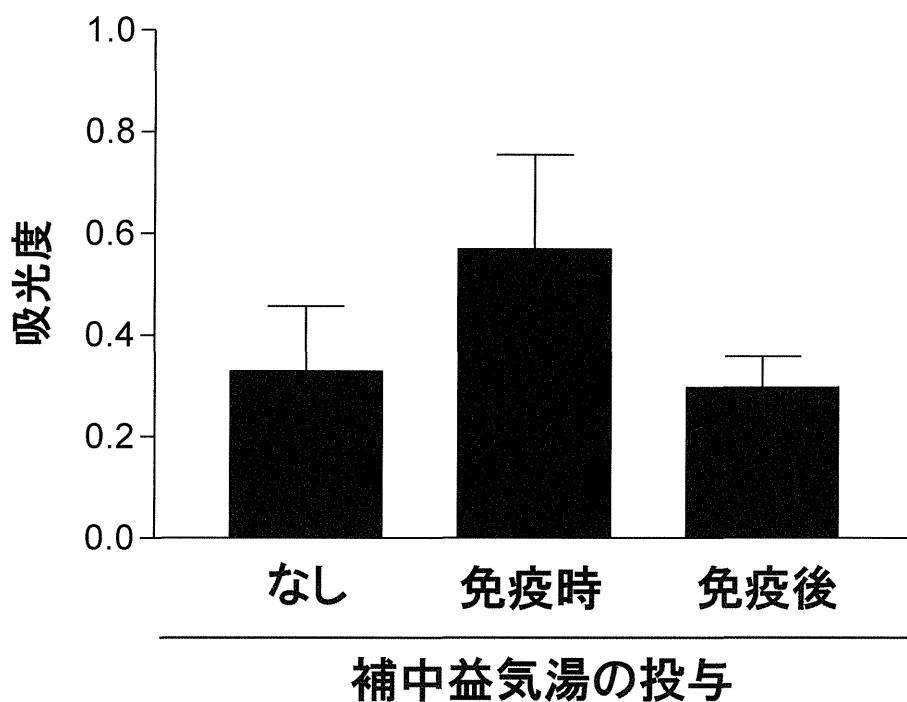


図2 週1回の頻度でニワトリ卵白アルブミン (OVA) を粘膜アジュバントであるコレラトキシンと共に3回経口免疫した。最終免疫の2週間後に糞便を回収し、OVA特異的IgA抗体をELISA法にて測定した。免疫期間中の2週間、補中益気湯を経口投与する群 (中央) と3回目の経口免疫後から2週間補中益気湯を投与する群 (右) を用意した。どちらの群も週5回の頻度で補中益気湯を投与した。

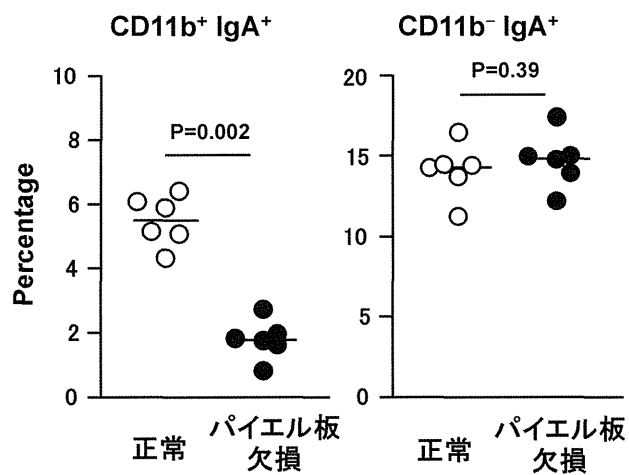


図3 胎生14.5日目に抗IL-7受容体阻害抗体を投与することでパイエル板を欠損させたマウス（●）とコントロール抗体を投与したマウス（○）の腸管から単核球を回収し、CD11bとIgAでFACS解析したところ、パイエル板欠損マウスでCD11b陽性IgA細胞の選択的な減少が認められた。

図4 CD11b⁻ IgA⁺ 細胞に比べCD11b⁺ IgA⁺細胞で高発現している遺伝子オントロジー

GO ACCESSION	GO Term	p-value	corrected p-value	Count in Selecti	% Count in Selecti	Count in Total	% Count in Total
GO 0044427	chromosomal part	3.91E-20	2.36E-15	144	4.123711	351	1.9954519
GO 0000279	M phase	2.31E-19	3.48E-15	123	3.5223367	286	1.6259239
GO 0022402	cell cycle process	1.55E-19	3.48E-15	160	4.5819016	411	2.3365548
GO 0022403	cell cycle phase	1.88E-19	3.48E-15	139	3.980527	339	1.9272314
GO 0007049	cell cycle	5.62E-19	6.77E-15	234	6.7010307	689	3.9169984
GO 0005694	chromosome	3.25E-18	3.26E-14	163	4.6678123	433	2.4616258
GO 0000278	mitotic cell cycle	2.83E-17	2.44E-13	110	3.1500573	257	1.4610574
GO 0000087	M phase of mitotic cell cycle	3.90E-16	2.93E-12	89	2.5486827	196	1.1142695
GO 0006996	organelle organization	1.37E-15	9.18E-12	332	9.507445	1133	6.4411597
GO 0048285	organelle fission	1.94E-15	1.17E-11	88	2.5200458	197	1.1199545

図2CD11b陽性とCD11b陰性IgA細胞を単離、精製しマイクロアレイ解析を行ったところ、CD11b陽性細胞で細胞周期に関わる分子の高発現が認められた。

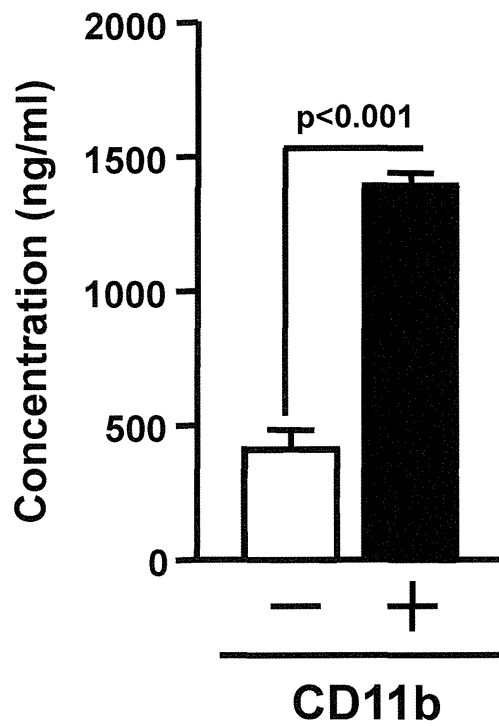


図5 CD11b陽性IgA細胞とCD11b陰性IgA細胞を単離、精製しin vitroで72時間培養した後の培養上清中のIgA量を測定したところ、CD11b陽性細胞で高いIgA産生が認められた。

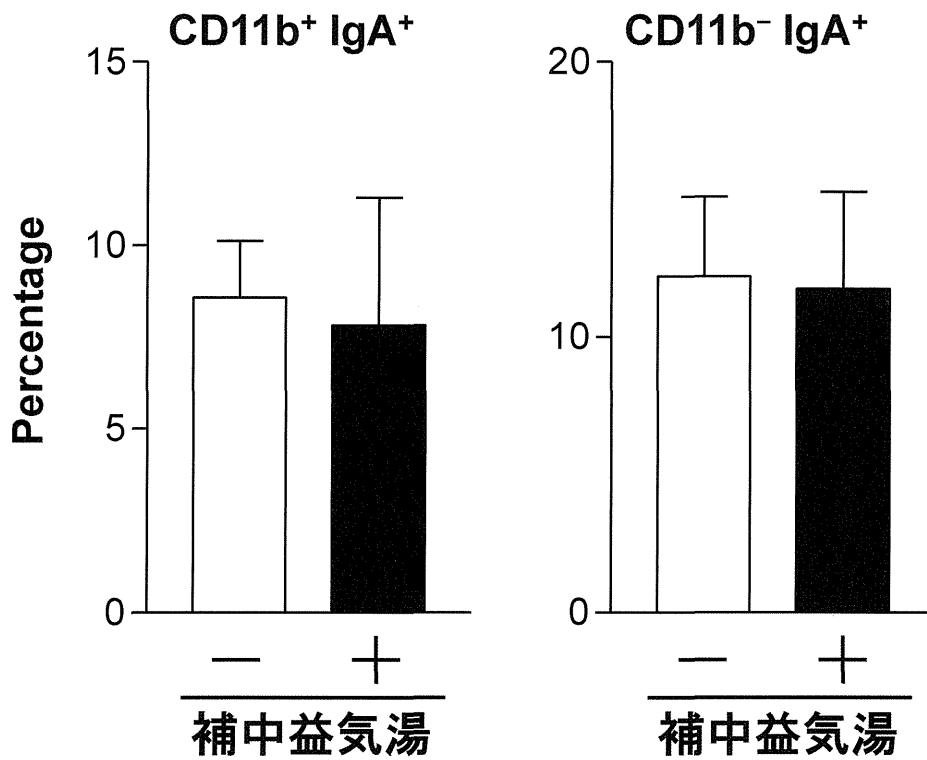


図6 コントロールマウス (□) と補中益気湯 (■) を投与したマウスの腸管から単核球を回収し、CD11bとIgAでFACS解析したところ、補中益気湯によるCD11b陽性IgA細胞への影響は認められなかった。

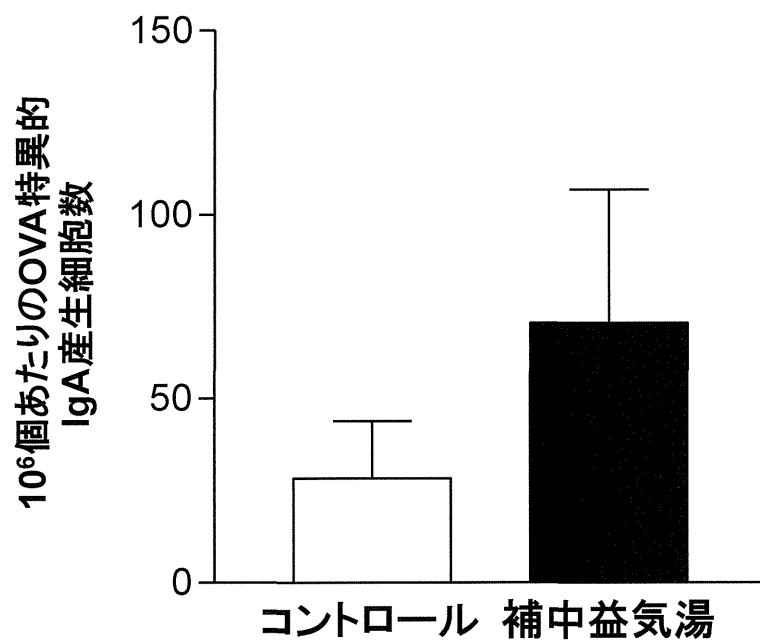


図7 週1回の頻度でニワトリ卵白アルブミン (OVA) を粘膜アジュバントであるコレラトキシンと共に3回経口免疫した。免疫の期間、週5回の頻度で補中益気湯を経口投与した。最終免疫の1週間後に小腸より単核球を回収し、ELISPOT法にてOVA特異的IgA産生細胞数測定した。

漢方薬ならびにその有効成分による マラリア感染免疫修飾機序の解明

研究分担者 平山謙二 長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野 済木

研究要旨

マラリア感染は媒介昆虫であるハマダラカによる感染型原虫スポロゾイトの皮膚からの侵入により起こる。原虫は血管内侵入後数分で肝臓のジヌソイドからクッパー細胞を通過し肝細胞内で増殖を開始する。増殖したメロゾイト原虫は5-6日で血液中に放出され今度は赤血球内に侵入しさらに増殖を繰り返す。脾臓が主な免疫応答の場と考えられるが、重症化すると重度の貧血や昏睡（脳マラリア）を発症し死に至ることがある。ここでは、脳マラリアのマウスモデルを用い、補中益気湯と十全大補湯の病態への影響を調べた。その結果、このモデルにおいて、いずれの漢方薬も神経症状を改善させ、特に十全大補湯では、脳マラリアでの死亡を減少させる効果のあることが示された。これらの薬剤投与による原虫血症の改善は見られなかったことから、この効果は病態と関係する免疫応答を修飾していることが推測された。

（平成24年度より本事業に参画のため、平成24年度分担報告書と同一内容である。）

A. 研究目的

脳マラリアは熱帯熱マラリアによる死亡原因となるマラリアの最も重篤な臨床型である。昏睡を主たる症状とし、その病態の特徴は脳内の微小塞栓と出血である。ヒトでの病態生理については明らかではないが、マウスマラリアのある実験系を用いた脳マラリアモデルでは、脳内での病的なインターフェロンガンマ産生性CD8陽性T細胞の活性化が病態と強い関連があるとされている。免疫調節作用を有する漢方薬により、マラリア感染の際の免疫応答が修飾され、脳マラリアモデルの病態に変化が起こるか否かについて検討した。

B. 研究方法

1. 6-8週令メスのC57Bl/6 (B6)マウスに、マラリアのチャレンジ感染7日前から

毎日と感染後5日間、40 mg/dayで蒸留水に溶解した十全大補湯(JTT)あるいは補中益気湯(HET)を経口投与した。陰性対照として蒸留水を同量飲ませたマウスを用意した。
2. 投薬7日目にマウスの腹腔に*Plasmodium berghei* ANKA感染赤血球10万個を感染させた。感染後18日間にわたって原虫血症、体重変化、神経症状スコア、昏睡の有無、生存率を観察した。血液中のリンパ球分画およびインターフェロンガンマのレベルのモニターも行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は長崎大学動物実験施設のガイドラインに則り行った。

C. 研究結果

2回の繰り返し実験を行い、以下の結果

が得られた。

1. JTT あるいは HET のいずれの内服投与群においても蒸留水投与群と原虫血症のレベルに相違は認められなかった。

2. 体重変化を観察すると感染 8 日目の体重減少が JTT 投与群で有意に抑制されていることが示された。また重篤度を示す皮膚反応でも、投与群がほぼ正常であるのに対し、蒸留水投与群ではほぼすべてが毛の逆立ちやふくらみを示し重篤度のスコアでも JTT および HET で有意差を示した。

3. 神経症状を歩き方の異常、運動麻痺、痙攣、昏睡をスコア化して比較すると重篤度と同様、蒸留水群と JTT 群の間で有意差をみとめた。

4. 感染後 8-10 日前後で起こる脳マラリアによる死亡を免れ、生き残ったマウスの生存率を比較したところ、蒸留水群に比較し多く生存する傾向があることが分かった。Kaplan Mayer 法による有意差については現在検討中である。

D. 考察

現在種々のタイプのマラリアワクチンが開発されているが、その中には経鼻や経口投与による伝播阻止ワクチンも含まれている。しかし粘膜免疫をねらったワクチンのマラリアでの有効性については異論も多い。もっとも大きな問題はマラリア感染の際の免疫応答が非常に複雑でいまだに、ワクチンが一体どのような免疫を付与すべきなのかが明らかでないことである。ここでは、脳マラリアというマラリアが引き起こす最も重篤な合併症のモデルに対する漢方薬の影響を見ることにより、病害制御に有効な免疫応答とは何かを探ろうと試みた。未熟なデータではあるが、病態を改善する明白なエビデンスを認めたことで、今後有効性の標的となる免疫応答についてさらに詳細な解析が必要になったと考える。

E. 結論

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) L Quoc Bao, N Tien Huy, Kikuchi M, Yanagi T, Senba M, Nasir Shuaibu M, Honma K, Yui K, Hirayama K, CD19(+) B cells Confer Protection Against Experimental Cerebral Malaria In Semi-immune Rodent Model. PLOS One, 2013 in press.

2) Men TT, Huy NT, Trang DT, Shuaibu MN, Hirayama K, Kamei K. A simple and inexpensive haemozoin-based colorimetric method to evaluate anti-malarial drug activity. Malar J. 2012 Aug 9;11:272. doi: 10.1186/1475-2875-11-272.

3) Omar AH, Yasunami M, Yamazaki A, Shibata H, Ofori MF, Akanmori BD, Shuaibu MN, Kikuchi M, Hirayama K. Toll-like receptor 9 (TLR9) polymorphism associated with symptomatic malaria: a cohort study. Malar J. 2012 May 17;11(1):168

2. 学会発表

1) Bao Quoc Lam, Huy Tien Nguyen, 柳哲雄、千葉正親、Mohammed Nasir Shuaibu, 菊池三穂子. Experimental rodent model of cerebral malaria resistance in semi-immune. 第 81 回日本寄生虫学会大会、平成 24 年 3 月、兵庫医科大学 (第 81 回日本寄生虫学会大会 プログラム集・抄録集, pp75, 2012)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

十全大補湯(JTT)と補中益気湯(HET)の 脳マラリアモデルマウスでの検討

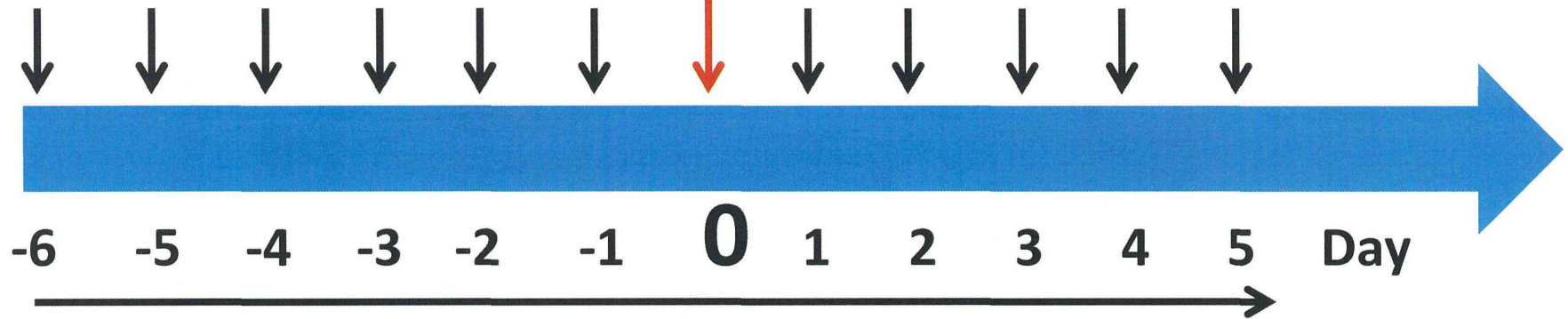
厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
H24年度 分担報告書

漢方薬ならびにその有効成分によるマラリア感染免疫修飾機序の解明

研究分担者 平山謙二 長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野

チャレンジ感染 10^5 Pb ANKA

40mg/day経口投与



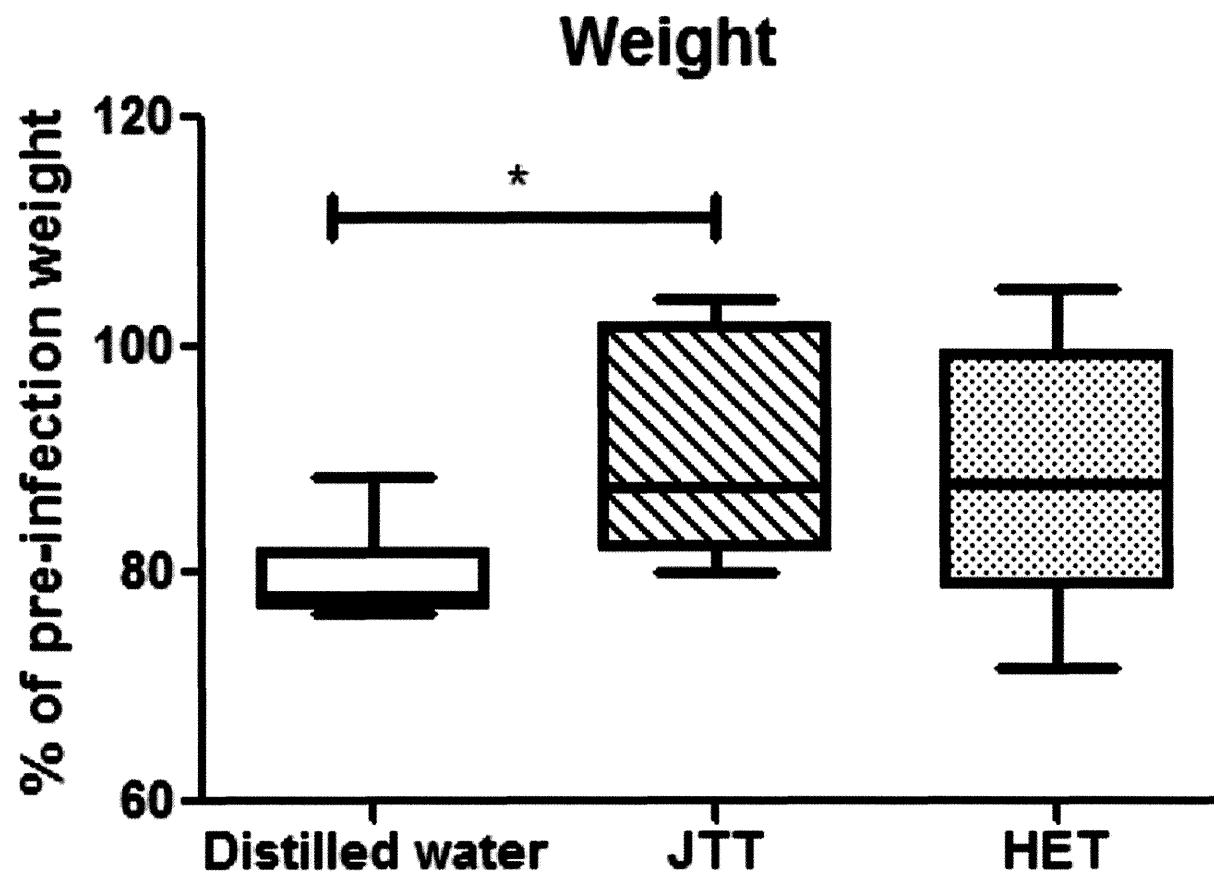
12日間連続投与:3つのグループ

-蒸留水

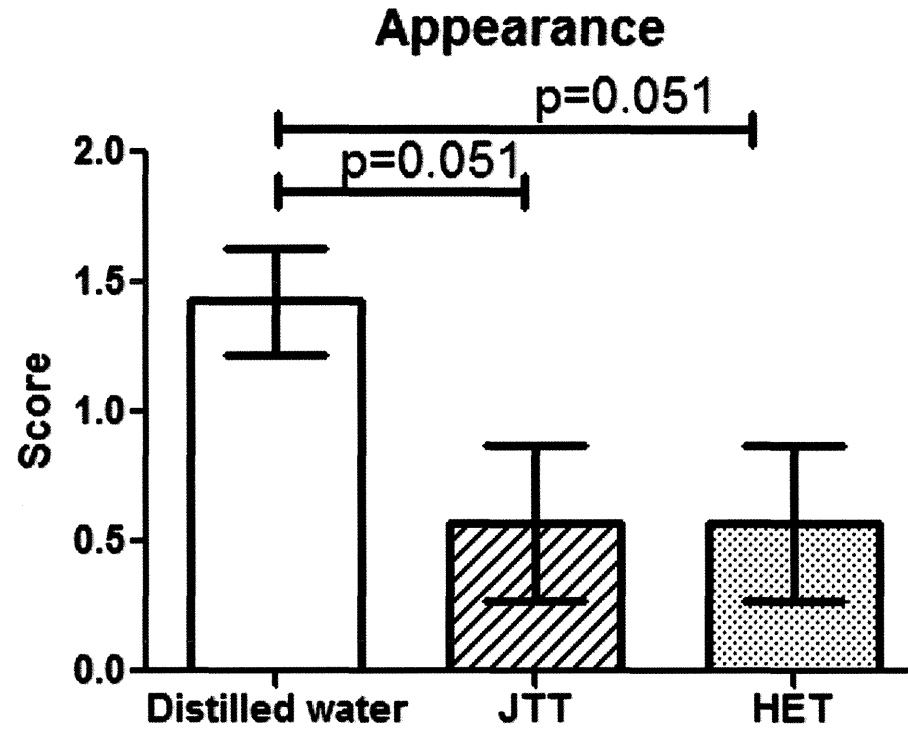
-十全大補湯 (JTT)

-補中益気湯 (HET)

感染8日目 体重変化

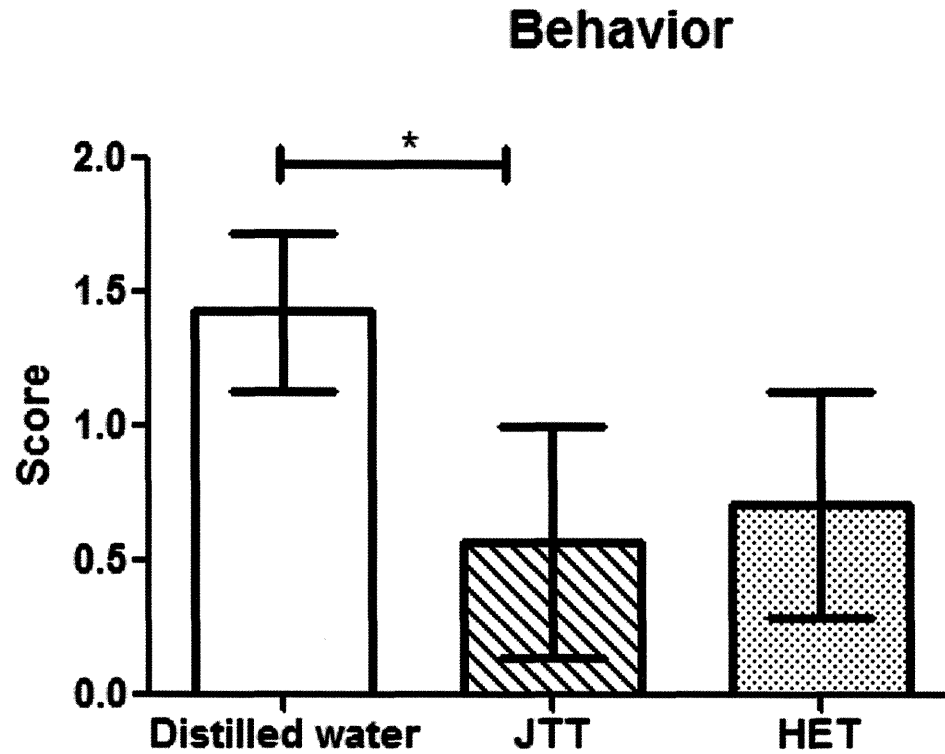


感染8日目 重篤度変化



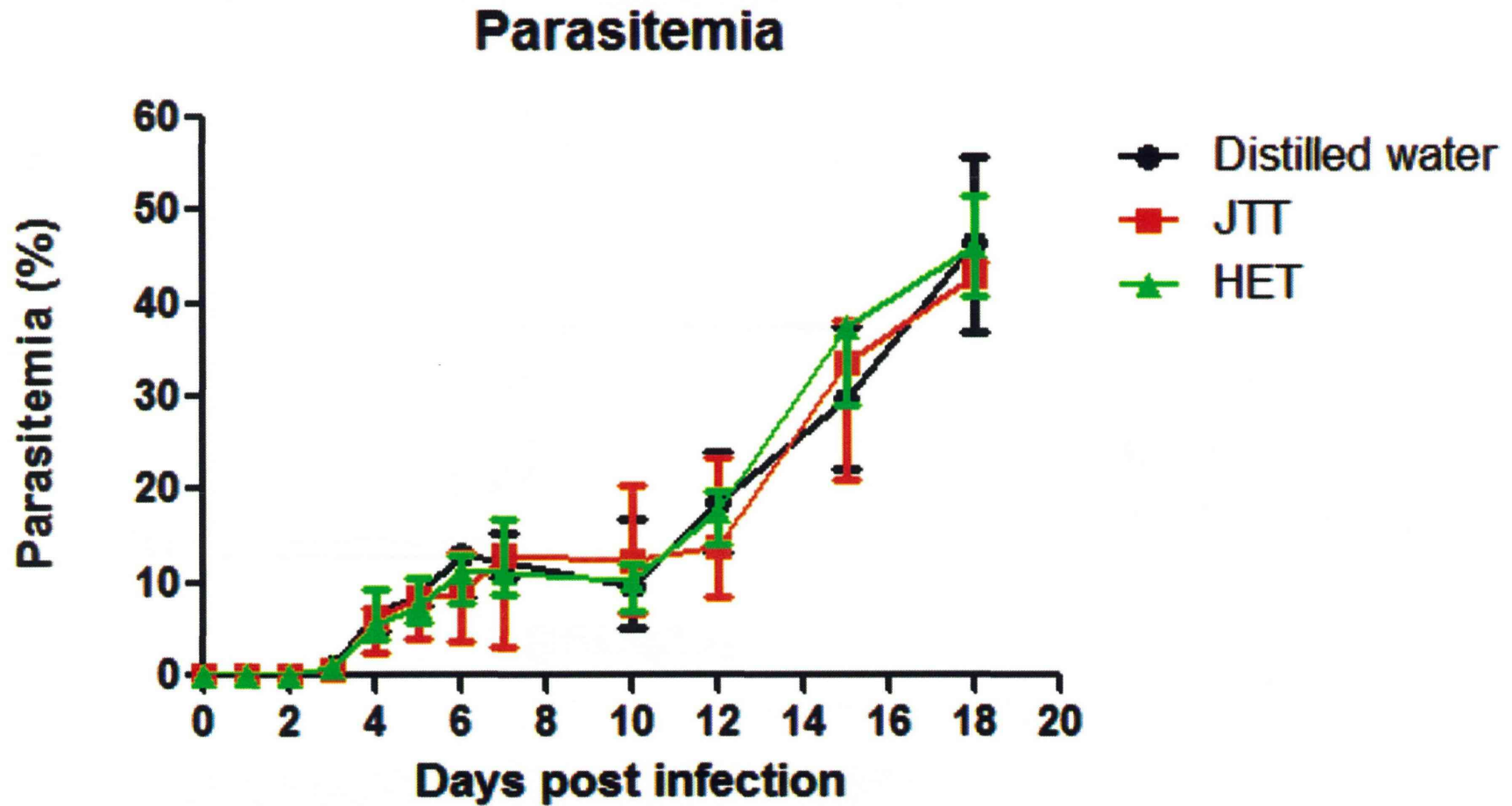
Appearance	Normal	0
	Coat ruffled	1
	Coat staring; panting	2

感染8日目 神経症状変化

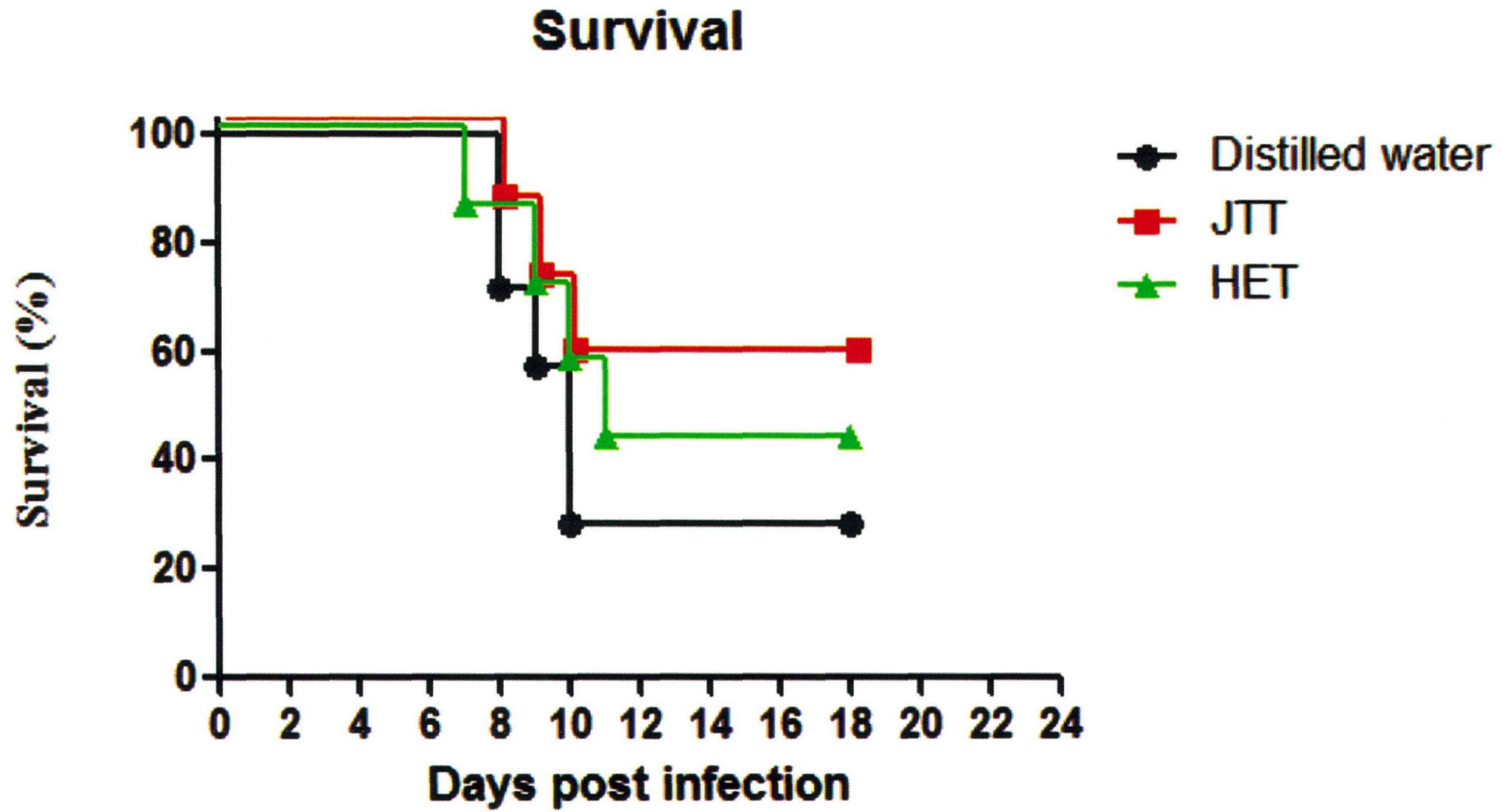


Behaviour (undisturbed)	Normal	0
	Hunched; wobbly gait	1
	Partial paralysis; immobile*†	2
	Convulsions; coma*	3

原虫血症の変化



感染後18日間の生存曲線



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小泉桂一、犬 寫明子、大江 未来広、柴原 直利、済木育 夫	トピックス：漢方薬 のワクチンアジュバ ント効果	山田 正仁	最新医学	最新医学社	大阪	2013	869-873

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Orawin Prangsaengtong, Jun Yeon Park, Akiko Inujima, Yoshiko Igarashi, Naotoshi Shibahara and Keiichi	Enhancement of lymphangiogenesis <i>in vitro</i> via the regulations of HIF-1 α expression and nuclear translocation by deoxyshikonin	Evid Based Complement Alternat Med		In press	2013
Sanphanya K, Wattanapitayakul SK, Prangsaengtong O, Jo M, Koizumi K, Shibahara N, Priprem A, Fokin VV, Vajragupta O	Synthesis and evaluation of 1-(substituted)-3-prop-2-ynylureas as antiangiogenic agents	Bioorg Med Chem Lett	22	3001	2012
Kato S, Koizumi K, Yamada M, Inujima A, Takeno N, Nakanishi T, Sakurai H, Nakagawa S, Saiki I	A phagocytotic inducer from herbal constituent, pentagalloylglucose enhances lipoplex-mediated gene transfection in dendritic cells	Biol Pharm Bull.	33	1878	2010
M. Kamioka, H. Kiyono, and J. Kunisawa	Herbal medicine-initiated approach s for the elucidation of immunologi cal network in the intestine	J Tradition Med		In press	2013

J. Kunisawa, M. Gohda, E. Hashimoto, I. Ishikawa, M. Higuchi, Y. Suzuki, Y. Goto, C. Panea, I. I. Ivanov, R. Sumiya, L. Aayam, T. Wake, S. Tajiri, Y. Kurashima, S. Shikata, S. Akira, K. Takeda, and H. Kiyono	Microbe-dependent CD11b ⁺ IgA ⁺ plasma cells in early-phase robust intestinal IgA responses in mice	Nat Commun	4	1772	2013
I. Kong, A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Okada, S. Sato, D. Briles, J. Kunisawa, Y. Inoue, M. Yamamoto, K. Akiyoshi, and H. Kiyono	Nanogel-based PspA Intranasal Vaccine Prevents Invasive Disease and Nasal Colonization by Pneumococcus	Infection and Immunity	81	1625	2013
S. Sato, S. Kaneto, N. Shibata, Y. Takahashi, H. Okura, Y. Yuki, J. Kunisawa, and H. Kiyono	Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells	Mucosal Immunol	in press		2013
Y. Kurashima, T. Amiya, T. Nochi, K. Fujisawa, T. Haraguchi, H. Iba, H. Tsutsui, S. Sato, S. Nakajima, H. Iijima, M. Kubo, J. Kunisawa, and H. Kiyono	Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors	Nat Commun	3	1034	2012
J. Kunisawa, E. Hashimoto, I. Ishikawa, and H. Kiyono	A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo	PLoS One	7	e32097	2012