

- (21) 水口賢司, 創薬に向けたバイオインフォマティクス研究について, 製薬協の研究開発委員会メンバーとの意見交換会, 東京, 2013. 1. 31 【一般講演】
- (22) 長尾知生子, 立体構造を用いたタンパク質-タンパク質相互作用の特異性決定残基の特徴付け, 第6回京阪奈セミナー, 京都, 2013. 3. 29 【一般講演】

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

システムワクチンによる粘膜アジュバント開発研究

研究分担者：清野 宏

東京大学医科学研究所 職名 所長・教授

研究要旨

次世代粘膜ワクチンである MucoRice-CTB は長期室温安定なコールドチェーンフリー、注射針・注射器不要な経口コメ型ワクチンであり、消化酵素抵抗性や長期間の防御免疫の誘導・維持効果のあることが動物実験で証明された。本研究では MucoRice-CTB の投与における防御免疫誘導・維持機構の分子基盤を理解し、その情報にもとずく新規粘膜免疫誘導・増強効果のある分子・バイオマーカーの同定を目指している。平成 24 年度は、MucoRice-CTB 経口投与後、抗原特異的抗体高産生を示すマウスの血清を採取し、マイクロ RNA アレーを行った。防御免疫誘導・維持に関連するマイクロ RNA 候補群の探索により、その標的・関連分子群の同定を目指している。さらに、MucoRice-CTB のヒトで POC 獲得に向けて、現在行われている、医師主導型臨床研究でのヒトの検体を用いるマイクロ RNA 解析の結果の基礎資料ともなる。

A. 研究目的

コメにワクチン抗原を発現させた MucoRice システムは抗原の消化酵素耐性付与に加え、常温で長期安定なワクチンである。抗原にコレラトキシン B 鎖 (CTB) を用いることで、コレラ菌のみならず、毒素原性大腸菌下痢症に対する交叉免疫も期待できる次世代型経口ワクチンである (Nochi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104:10986-91, 2007; Yuki et al., Vaccine 27:5982-88, 2009; Tokuhara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107:8794-99, 2010)。更に、長期間に及ぶ防御免疫の誘導・維持効果があることも動物実験で証明されている。この防御免疫誘導・維持は、

経口投与される MucoRice-CTB がパイル版の上皮に存在する M 細胞に取り込まれ、免疫担当細胞により抗原特異的血清 IgG と粘膜 IgA の産生を誘導することによって出来ると考えられている。しかしながら、MucoRice-CTB の経口投与後、誘導された中和抗体やメモリーリンパ球の維持機構の分子免疫メカニズムについてはまだ明らかになっていない。その解明は新規の粘膜アジュバント開発に向けての基盤的情報となる。

この分担研究で、我々は 防御免疫誘導・維持において、特定のバイオマーカーマイクロ RNA とそのターゲット遺伝子の分子免疫学的役割を解析している。平成 24 年度

には MucoRice-CTB 経口投与後、抗原特異的抗体高産生を示すマウスの血清を採取し、マイクロ RNA アレーを行った。システムズバイオロジー解析法を用いてバイオマーカーマイクロ RNA の解析を行っている。特定のバイオマーカーマイクロ RNA が同定されると、防御免疫誘導によって発現増加と減少されるターゲット遺伝子に対し発現増強 (agonists)、あるいは、阻害 (e.g., RNAi) 物質を新たな粘膜免疫調節因子・アジュバントとして開発していく予定である。

更に、このマイクロ RNA 解析の基礎データをベースとして、現在行っている医師主導の MucoRice-CTB 臨床研究からの検体を用いるマイクロ RNA 解析とそのバイオマーカー同定に向けての基礎資料とする。

B. 研究方法

Balb/c マウス (5 匹) に MucoRice-CTB 粉末剤 100 mg(CTB として 0.1 mg)を PBS 0.5 ml に溶かして、2 週間隔で 5 回経口免疫後、誘導される 抗原特異的血清 IgG/IgA 及び糞便分泌型 IgA の免疫誘導・維持効果を ELISA 法で確認した。コントロールグループ (5 匹) には、同じ量の通常米 (WT : 日本晴れ)の粉末剤を同条件で経口投与した。各グループのマウスから 350 μ l の血清を採取し、東レ株式会社にマイクロ RNA の解析を受託を依頼した。そのマイクロアレーでは、まず血清から分離した total RNA 内マイクロ RNA の純度と量を確認した後、各マイクロ RNA に特異的なチップのウェルで蛍光染色した RNA を反応させ、約 2,000 個のマイクロ RNA のシグナル強度を解析した。MucoRice-CTB と WT 米グループのマウス血清からのマイクロ RNA

に関して、それぞれのシグナル数値 (global normalization) を比較した。下記のウェブサイトで MucoRice-CTB 経口投与後増加したマイクロ RNA のバイオマーカー候補群のターゲット遺伝子を調べ、その内抗体産生に関与する B 細胞免疫に関連する可能性の高い分子の探索を行っている。

<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>

<http://www.targetscan.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

(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、東京大学医科学研究所、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

MucoRice-CTB 経口投与マウスからの血清や糞便サンプルでの抗原特異的抗体価を ELISA 法で調べた結果、 12.8 ± 0.5 (ロガリズム 2) の血清 IgG と 5.8 ± 1.1 (ロガリズム 2) の糞便 IgA が確認できた。一方、WT 米経口投与マウスからの血清と糞便サンプルには抗原特異的抗体はまったく無かった。

これらの結果をベースにして、MucoRice-CTB グループと WT 米グループの血清内マイクロ RNA の解析をマイクロアレーで行った。その結果、WT 米グル

ープと比べ、MucoRice-CTB グループの血清では、下記のように大幅に増加したマイクロ RNA 群 (43 種類) が見つかった。WT 米グループに比べ、それぞれの倍比率の平均値と標準エラーを括弧の中に示した。

一方、WT 米グループに比べ、MucoRice-CTB グループで減少したマイクロ RNA 群は 36 種類見つかった。

防御免疫に関連するマイクロ RNA の探索のために、MucoRice-CTB 経口投与後高く増加したマイクロ RNA 群を選び、そのターゲット遺伝子群の中で、以前に液性免疫・B 細胞免疫に関連すると報告された分子群を下記の分類で調べて示してみた。

A) B 細胞メモリー関連 (マイクロ RNA 13 種、ターゲット遺伝子 7 種)

B) イムノグロブリン A (IgA) クラススイッチ関連 (マイクロ RNA 6 種、ターゲット遺伝子 3 種)

従って、MucoRice-CTB 経口免疫後、上記のマイクロ RNA 群がバイオマーカーとして、もしくはターゲット遺伝子の発現増加もしくは減少に関与し、また防御免疫誘導・維持に結ぶリンカーとして、働くのではないかと予測され、今後検討していく予定である。

D. 考察

今後 MucoRice-CTB 経口免疫投与マウスの粘膜組織からバイオマーカーマイクロ RNA 候補群が実際に発現しているかをリアルタイム定量 PCR 法で確認する予定である。更に、マイクロ RNA を B 細胞もしくは細胞株内に導入し、ターゲット遺伝子の発現変化もしくは抗体産生などを調べていく。今後の臨床研究で MucoRice-CTB 経

口ワクチンによるバイオマーカーマイクロ RNA 同定のために重要な基礎資料となる。防御免疫誘導と共に発現の減少される特定のターゲット遺伝子における発現阻害物質 (e.g., RNAi) とその細胞特異的な伝達システムの技術的向上は新たな粘膜免疫調節因子・アジュバント開発に向けて重要な位置づけとなると考えられる。

E. 結論

コメ型ワクチンである MucoRice-CTB をマウスに経口投与した後、顕著に増加もしくは減少したマイクロ RNA 群を WT 米投与群と比べて解析した。相対的に高い発現を見せたマイクロ RNA 群の標的遺伝子達の中から抗体産生に関連する液性免疫に関連する遺伝子群を探索し、候補群を同定する事が出来た。

F. 健康危機情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kim DY, Fukuyama S, Nagatake T, Takamura K, Kong IG, Yokota Y, Lee CH, Kiyono H. Implications of nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) in the development of allergic responses in an allergic rhinitis mouse model. *Allergy* 67(4):502-9, 2012

Kunisawa J, Hashimoto E, Ishikawa I, Kiyono H. A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 7(2):e32094,

2012

Sato S, Kiyono H. The mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr. Opin. Virol.* 2(3):225-32, 2012

Yuki Y, Mejima M, Kurokawa S, Hiroiwa T, Kong IG, Kuroda M, Takahashi Y, Nochi T, Tokuhara D, Kohda T, Kozaki S, Kiyono H. RNAi suppression of rice endogenous storage proteins enhances the production of rice-based Botulinum neurotoxin type A vaccine. *Vaccine* 13:30(28):4160-6, 2012

Kunisawa J, Kiyono H. *Alcaligenes* is commensal bacteria habituating in the gut-associated lymphoid tissue for the regulation of intestinal IgA responses. *Front. Immunol.* 3:65, 2012

Tanaka S, Saito Y, Kunisawa J, Kurashima Y, Wake T, Suzuki N, Shultz LD, Kiyono H, Ishikawa F. Development of mature and functional human myeloid subsets in hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2ryKO mice. *J. Immunol.* 188(12):6145-55, 2012

Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J, Shibata N, Grunberg S, Sinha R, Zahm AM, Tardif MR, Sathaliyawala T, Kubota M, Farber DL, Collman RG, Shaked A, Fouser LA, Weiner DB, Tessier PA, Friedman JR, Kiyono H, Bushman FD,

Chang KM, Artis D. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* 336(6086):1321-5, 2012

Jeon SG, Kayama H, Ueda Y, Takahashi T, Asahara T, Tsuji H, Tsuji NM, Kiyono H, Ma JS, Kusu T, Okumura R, Hara H, Yoshida H, Yamamoto M, Nomoto K, Takeda K. Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathog.* 8(5):e1002714, 2012

Shibata T, Takemura N, Motoi Y, Goto Y, Karuppuchamy T, Izawa K, Li X, Akashi-Takamura S, Tanimura N, Kunisawa J, Kiyono H, Akira S, Kitamura T, Kitaura J, Uematsu S, Miyake K. PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells. *Int. Immunol.* 24(10):613-23, 2012

Kinoshita M, Kayama H, Kusu T, Yamaguchi T, Kunisawa J, Kiyono H, Sakaguchi S, Takeda K. Dietary folic acid promotes survival of Foxp3+ regulatory T cells in the colon. *J. Immunol.* 189(6):2869-78, 2012

Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, Tsutsui H, Sato S, Nakajima S, Iijima H, Kubo M, Kunisawa J, Kiyono H. Extracellular ATP mediates

- mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat. Commun.* 3:1034, 2012
- Nakajima-Adachi H, Koike E, Totsuka M, Hiraide E, Wakatsuki Y, Kiyono H, Hachimura S. Two distinct epitopes on the ovalbumin 323-339 peptide differentiating CD4⁺T cells into the Th2 or Th1 phenotype. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76(10):1979-81, 2012
- Kunisawa J, Kiyono H. Immune regulation and monitoring at the epithelial surface of the intestine. *Drug Discov. Today* 18(1-2):87-92, 2013
- Sato S, Kaneto S, Shibata N, Takahashi Y, Okura H, Yuki Y, Kunisawa J, Kiyono H. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol.* in press, 2013
- Kusu T, Kayama H, Kinoshita M, Jeon SG, Ueda Y, Goto Y, Okumura R, Saiga H, Kurakawa T, Ikeda K, Maeda Y, Nishimura J, Arima Y, Atarashi K, Honda K, Murakami M, Kunisawa J, Kiyono H, Okumura M, Yamamoto M, Takeda K. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine. *J. Immunol.* 190(2):774-83, 2013
- Kong IG, Sato A, Yuki Y, Nochi T, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kurokawa S, Okada K, Sato S, Briles D, Kunisawa J, Inoue Y, Yamamoto M, Akiyoshi K, and Kiyono H. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *Pneumococcus*. *Infect. Immun.* 81(5):1625-34, 2013
- Fukuyama Y, Tokuhara D, Sekine S, Aso K, Kataoka K, Davydova J, Yamamoto M, Gilbert RS, Tokuhara Y, Fujihashi K, Kunisawa J, Yuki Y, Kiyono H, McGhee JR, Fujihashi K. Potential Roles of CCR5(+) CCR6(+) Dendritic Cells Induced by Nasal Ovalbumin plus Flt3 Ligand Expressing Adenovirus for Mucosal IgA Responses. *PLoS One.* 8(4):e60453, 2013
2. 学会発表
国外
- Kiyono H. Gordon Research Conferences: Glycolipid & Sphingolipid Biology, Invited Speaker, "Role of glycolipid/S1P in the regulation of mucosal immunity", Lucca, Italy. April 2012
- Kiyono H. Molecular Immunology & Immunogenetics Congress 2012, Invited Speaker, "MucoRice: Rice-based Oral Vaccine Development", Antalya, Turkey. April 2012

Kiyono H. The 4th Microbial Pathogenesis & Immunity Symposium, Invited Speaker, “Mucosal Innate Immune System for Mutualism, Inflammation and Elimination”, Seoul, Korea. May 2012

Yuki Y, Kong IG, Sato A, Nochi T, Mejima M, Kurokawa S, Hiroiwa T, Fukuyama Y, Sawada S, Takahashi H, Akiyoshi K, Kiyono H: Adjuvant-free nanogel-based PspA nasal vaccine for the induction of protective immunity against Pneumococcus. The American Association of Immunologists (AAI) Boston, USA (2012)

Kiyono H. The 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Invited Speaker, “Molecular Understanding for Physiology and Pathology”, “Mucosal integrated immunological seesaw between mutualization and elimination in the intestine.”, Seoul, Korea. August 2012

Kiyono H. The 10th International Congress on Plant Molecular Biology, Invited Speaker, “MucoRice: Fusion of Mucosal immunology and plant biology led to the development of rice-based oral vaccine”, Jeju, Korea. October 2012

Kiyono H. The 35th General Meeting of Turkish Society of Microbiology, Invited Speaker, “Spick and Span in Intestinal

Immunity: From Mucosal Homeostasis to Vaccine Development”, Izmir, Turkey. November 2012

国内

Kiyono H. The Joint Symposium of the 7th International Symposium of the Institute Network, Invited Speaker, “Mucosal decisions for mutualism, inflammation and elimination”, Sendai, Japan. June 2012

清野宏. 第12回日本抗加齢医学会総会、招待講演者、基礎科学 5:腸内フローラ“粘膜免疫による腸内細菌共生制御機構”、横浜、2012年6月

清野宏. 第5回日本口腔検査学会総会・学術集会、招待講演者、“粘膜免疫：口腔から始まる最大の免疫システム”、東京、2012年8月

Kiyono H. STS Forum 9th Annual Meeting, Session B, Invited Speaker, Mucosal Vaccine for the Control of Infectious Diseases, Kyoto, Japan. October 2012

Kiyono H. The 34th Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health, Invited Speaker, Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine, “Spick-and-span in mucosal vaccine development”,

Sapporo, Japan. October 2012

清野宏. あいちサイエンスフェスティバル
2012 市民向け講演会「先端科学技術と社
会」, 招待講演者、“未知との遭遇：腸とい
う最大の免疫システム”, 名古屋、2012 年
10 月

Kiyono H. IEIIS 2012 Homeostatic
Inflammation Symposium, Invited
Speaker, “Mucosal integrated
immunological seesaw between
physiological and pathological
inflammation”, Tokyo, Japan. October
2012

清野宏. ポスト日本ワクチン学会シンポジ
ウム・サテライトシンポジウム「次世代感
染症ワクチンの開発をめざして」、招待講演
者、粘膜ワクチン開発へ向けて最先端研究
の動向”、東京、2012 年 11 月

清野宏. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 招
待講演者、トークレビュー：粘膜免疫最近
の展開, 神戸、2012 年 12 月

清野宏. 第 14 回神田川腎セミナー, 招待講
演者、粘膜免疫による共生と排除の統合的
制御、東京、2013 年 1 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

アジュバント安全性評価データベースの構築研究

中西憲司 兵庫医科大学

研究要旨：

ヒトやマウスは蠕虫に感染するとTh2型免疫応答を発動する。特に肺ではTh2細胞が産生するIL-5とIL-13の作用でいわゆる好酸球性肺炎、あるいは発見者に因んでLöfflerの肺好酸球症が起こる。これが伝統的な考え方である。今回、私達は以下に述べる通り全く異なるメカニズムで好酸球性肺炎が起こることを明らかにした。①寄生虫が感染した宿主の肺では、2型肺胞上皮細胞の数が増えるとともに、この細胞の核内でIL-33の発現が著明に増強される、②IL-33は肺内でⅡ型自然リンパ球(type II innate lymphoid cells; ILC2) の集積を誘導する、③IL-33刺激を受けたILC2が大量のIL-5とIL-13を産生する、④IL-5とIL-13の作用で肺好酸球症が起こる、⑤IL-33の発現を増強する物質は寄生虫成分のキチンである、⑥水酸化アルミニウム(Alum)でもIL-33の発現が増強される、⑦キチンもアラムもアジュバントであることから、Löfflerの肺好酸球症はアジュバント病である、⑧ステロイドを経鼻投与すると、キチンあるいはアラムで誘導されるIL-33の発現増強は阻止され、その結果肺好酸球症の発症も抑制される。

A. 研究目的

蠕虫に感染すると、われわれ動物は Th2 型免疫応答を発動する。この応答では Interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13 といった Th2 型サイトカインを産生するⅡ型ヘルパーT 細胞 (Th2 細胞) が司令塔となって防御にあたる。IL-4 の作用で IgE 応答が、IL-5 の作用で全身性の好酸球増多が起こる。面白いことに、Th2 応答が誘導される前 (感染後 3 日～4 日目頃) でも、肺の好酸球浸潤が起こる。このような肺炎はヒトでは Löffler 症候群といわれる。発症機序に関して、長年研究されてきたが、尚も詳細は不明である。私達は蠕虫感染で誘導される好酸球性肺炎の発症機序を解明する目的で

研究を進めてきた。私達が解明したかったことは、寄生虫感染で Th2/IgE 応答が起こるのは寄生虫虫体に含まれるアジュバントの作用であること、次にこのアジュバント成分だけでも肺好酸球症を誘導出来ること、最後にアジュバントで起こる肺好酸球症を阻止する方法を確立することである。本研究課題において、ワクチン効果を高めることを目的に使用されるアジュバントが、その投与ルートによっては好酸球性肺炎をおこす可能性があることを示すとともに、このようなアジュバントの副作用の抑制方法を同時に検討したので報告する。

B. 研究方法

野生型マウス、Rag2 遺伝子欠損マウス、IL-33 遺伝子欠損マウスに腸管寄生蠕虫 *Strongyloides venezuelensis*(*Sv*) 第 3 期幼虫を経皮感染させ、経時的に肺での好酸球浸潤と杯細胞増多を組織学的に、また 2 型肺胞上皮細胞の増加を Pro-surfactant C (Pro-SPC) 陽性細胞の数を調べることでそれぞれ検討した。あるいはキチンあるいはアルミニウム塩(Alum)を経鼻投与し、同様の検討を行った。また、これらの処置で肺内で IL-33 の産生が誘導されるかを免疫染色法、ELISA 法、RT-PCR 法などで検討した。さらに薬剤によって IL-33 の発現が抑制できるか検討した。

(倫理面の配慮)

動物実験は、関係法令を遵守し、「兵庫医科大学動物委員会」、「兵庫医科大学遺伝子組換え委員会」の承認・許可された実験を行なっている。

C. 研究結果

Strongyloides venezuelensis(*Sv*) の感染で起こる肺好酸球症の発症に IL-33 が必要か否かを明らかにするため、野生型と IL-33 欠損マウスとに *Sv* を経皮感染させたところ、前者では著明な肺好酸球症と杯細胞増多を認めたが、IL-33 欠損マウスでは軽度なものしか認めなかった。この結果から、*Sv* で起こる肺好酸球浸潤と杯細胞増多はともに IL-33 の作用によることが強く示唆された。次に、肺における IL-33 産生細胞の同定を試みたところ、IL-33 を核内に有する細胞が同時に Pro-SPC を細胞質に発現することが明らかとなった。この結果、II 型肺胞上皮細胞 (AT II) が IL-33 を産生

することが明らかになった。

次に *Sv* 感染前後の肺における IL-5 と IL-13 の発現を比較したところ、野生型マウスでは IL-5 と IL-13 の発現が増強していたが、IL-33 欠損マウスではその増強は軽微なことが明らかとなった。次に、IL-5 と IL-13 の産生細胞の同定はじめた。まず Th2 細胞であるか非 Th2 細胞であるかを決定するために、Rag2 遺伝子欠損マウスに *Sv* を感染させた。すると、両者ともに IL-5 と IL-13 の産生誘導が認められた。このことから非 Th2 細胞が IL-5 と IL-13 を産生することが明らかとなった。さらに様々な方法を駆使してこの IL-5 と IL-13 を産生する非 Th2 細胞の本体を検討したところ、この細胞が II 型自然リンパ球 (type II innate lymphoid cells; ILC2) であることが明らかとなった。

以上の結果から野生型マウスに *Sv* を感染すると、IL-33 の産生が増強され、おそらく IL-33 の作用で ILC2 の数が増大すると同時に IL-5 と IL-13 の産生が始まり、結果として好酸球増多と杯細胞増多が起こると考えられる。一方、IL-33 欠損マウスではこのような変化は起こらなかった。最後に T 細胞 (Th2 細胞) も B 細胞も保有しない免疫不全マウス (Rag2 欠損マウス) に *Sv* を感染させたところ、野生型マウスと同様に、AT II 細胞数が増加するとともに肺での IL-33 発現量が上昇し、肺内で ILC2 や好酸球数が増加して肺好酸球症を発症することが明らかになった。

最後に、虫体のどの成分がこのような作用を発揮するか検討したところ、キチンであることが明らかとなった。実際、キチンを野生型マウスに経鼻投与した場合も、AT

II の数が増え同時に IL-33 の産生が増強することが明らかになった。

即ち、寄生虫はその構成成分であるキチンの作用で、肺内で IL-33 の産生を誘導する。次に、Th2 細胞が誘導されなくても、この IL-33 に反応して ILC2 が誘導される。最後に、この IL-33 刺激を受けた ILC2 が IL-5 と IL-13 を産生して肺好酸球症を発症させる。このような肺好酸球症誘導はキチンのみならずアルミニウム塩 (Alum) でも IL-33 依存性に誘導された。またキチンや Alum による IL-33 誘導作用はステロイド薬によって抑制できた。今後は、肺好酸球症の生体防御における役割を明らかにしたい。

D. 考察

本研究により、生体の蠕虫感染認識機構の標的としてキチンが重要であることが明らかになり、キチンによる IL-33 産生を契機とした、その後の ILC2 と Th2 サイトカインによる Löffler の肺好酸球症発症メカニズムが解明された。この結果は、消化管寄生線虫のみならず、キチンを保有する多くの病原体に対する共通の宿主免疫応答の解明に繋がることが期待される。キチンは寄生虫成分アジュバントであり、ワクチンに通常用いられている Alum でも同じ現象が見られることから、キチンによる IL-33 誘導をステロイド薬で抑制できたことは、アジュバントの副作用抑制方法の開発に重要な知見になると考えられる。

E. 結論

寄生虫感染で誘導されるレフラーの肺好酸球症は IL-33 と ILC2 による自然免疫応答で

あることが明らかとなった。その要因の 1 つは寄生虫虫体アジュバント (キチン) による IL-33 遊離である。IL-33 産生の制御がアジュバントの副作用制御に重要である。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

(和文論文)

安田好文, 中西憲司. アレルギーとサイトカイン 医薬ジャーナル Vol. 49 No. 2 2013:683-687

安田好文, 中西憲司. 蠕虫の排除と自然免疫・獲得免疫. 臨床免疫・アレルギー科 2012;57(3):307-15

中平雅清, 中西憲司. サイトカインのすべて, インターロイキン 18) IL-18. 臨床免疫・アレルギー科 2012:57 (特別増刊): 125-36

安田好文, 中西憲司. 自然免疫による好酸球性肺炎発症機構. 医学のあゆみ 2012;243 (1):91-7

武藤太一郎, 安田好文, 中西憲司. 寄生虫感染と肺における Th2 型自然免疫応答. 実験医学 2012;30(19)3056-61

中平雅清, 中西憲司. アレルギーに対するサイトカイン I. IL-4. アレルギー・免疫 2012;19(12):12-21

(英文論文)

1. Matsumoto M, Sasaki Y, Yasuda K, Taki Y, Muramatsu M, Yoshimoto T, Nakanishi K. IgG and IgE collaboratively accelerate expulsion of *Strongyloides* 1 venezuelensis in a primary infection.

Infection and Immunity in press.

2. Fukuoka A, Futatsugi-Yumikura S, Tkahashi S, Kazama H, Lyoda T, Yoshimoto T, Inaba K, Nakanishi K, Yonehara S. Identification of a novel type 2 innate immunocyte with the ability to enhance IgE production. *Int Immunol*. 2013. Feb 14.

3. Takahashi S, Futatsugi-Yumikura S, Fukuoka A, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yonehara S. Fas deficiency in mice with the Balb/c background induces blepharitis with allergic inflammation and hyper-IgE production in conjunction with severe autoimmune disease. *Int Immunol*. 2013 May;25(5):287-93.

4. Tsutsui H, Nakanishi K. Immunotherapeutic applications of IL-18. *Immunotherapy* 2012 Dec;4(12) 1883-94

5. Yoshimoto T, Nakanishi K. Generation and characterization of mouse basophils from bone marrow and purification of basophils from spleen. *Curr Protoc Immunol* 2012;98: 3.24.1-3.24.16

6. Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii K, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakaishi K, Yoshimoto T. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:184-94

7. Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii K, Yoshimoto T, Akira S, Nakaishi K. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(9):3451-6

2. 学会発表

(国際学会)

1. Nakanishi K, Function of natural adjuvant of helminth in induction of pulmonary eosinophilic infiltration. The 34th NAITO CONFERENCE 2012. 10 Sapporo

(国内学会)

2. 武藤太一郎, 安田好文, 河越龍方, 松本真琴, 松下一史, 石井健, 善本知広, 審良静男, 中西憲司. ChitinはIL-33依存症に好酸球性肺炎を誘導する. 第81回日本寄生虫学会大会 2012.3 西宮

3. 松本真琴, 佐々木由紀, 安田好文, 善本知広, 中西憲司. 抗体によるヴェネズエラ糞線虫排除機構. 第81回日本寄生虫学会大会 2012.3 西宮

4. 中西憲司. アレルギーに関与する基礎免疫の進歩1-IL-18とIL-33で誘導されるアレルギー性炎症. (特別講演) 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012.5 大阪

5. 松本真琴, 佐々木由紀, 安田好文, 善本知広, 中西憲司. ヴェネズエラ糞線虫に対する抗体依存性排虫機構. 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2012.6 神戸

6. Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii K, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2012.6 神戸

7. Nakahira M, Nakanishi K. Requirement of GATA binding protein 3 for *Il13* gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells. 第77回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2012.6 神戸

8. 中西憲司. Type II Innate Cell とアレルギー性炎症. (シンポジウム) 第 42 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2012.7 長野
9. 安田好文, 武藤太一郎, 松本真琴, 中西憲司. 蠕虫感染による好酸球性肺炎は自然免疫応答で誘導される. 第 68 回日本寄生虫学会西日本支部大会 2012.10 奈良
10. 今井康友, 善本隆之, 中西憲司, 山西清文, 善本知広. IL-27 は Tc17 誘導を抑制して接触過敏症を減弱させる. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.11 大阪
11. 萌拔陽子, 久 育男, 中西憲司, 審良静男, 善本知広. アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける内因性 IL-33 の病因的役割. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.11 大阪
12. Futatsugi-Yumikura S, Matsushita K, Fukuoka A, Yoshimoto T, Yonehara S, Nakanishi K. Balb/c FasKO mice develop severe autoimmunity, allergy and highly activated Tfh cells. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012.12 神戸
13. Matsumoto M, Sasaki Y, Yasuda K, Muramatsu M, Honjo T, Yoshimoto T, Nakanishi K. Antibody-mediated expulsion of *Strongyloides venezuelensis* in a primary infection. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012.12 神戸
14. Muto T, Yasuda K, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishi K, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K. Chitin induces lung eosinophilia dependently on IL-33. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012.12 神戸
15. Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishi K, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012.12 神戸
16. Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T. Ragweed pollen-driven IL-33 contributes to the development of allergic rhinitis. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012.12 神戸
17. Fukuoka A, Futatsugi-Yumikura S, Takahashi S, Iyoda T, Yoshimoto T, Inaba K, Nakanishi K, Yonehara S. A novel type of type 2 innate immunocytes with ability to enhance IgE production found in Balb/c FasKO mice with allergic blepharitis. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012.12 神戸
18. 中西憲司. 蛋白抗原で免疫されたマウスを経気道的に同一抗原でチャレンジするとき IL-18 が共存すると気道過敏性と気道炎症が増強される. 第 35 回日本分子生化学会年会 2012.12 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

TLR2/TLR3 抗がん免疫アジュバントの開発研究

分担研究者 瀬谷 司 北海道大学大学院医学研究科 教授

研究要旨 TLR3 刺激剤として PolyI:C, TLR2 刺激剤として Pam2 リポペプチドを選択し、樹状細胞で発現上昇する遺伝子群から NK 細胞活性化、CTL 誘導に関与する因子を抽出する。抗がん免疫アジュバントのエフェクター候補を *in vivo* マウス系で評価する。既存の TLR のアゴニストと対比解析し、ヒトに使えるアジュバントのデータベースの確立を目指す。

A. 研究目的

本研究は、次世代の免疫医薬として期待されるアジュバントの開発研究(有効性)および審査行政(安全性)に寄与するバイオマーカー探索可能なデータベースを構築することを目的とする。この観点から BCG-CWS の標的・TLR2 と polyI:C の標的・TLR3 について有効性の分子基盤とエフェクター分子の評価を行った。

B. 研究方法

Pam2 リポペプチドの化学合成は業者委託で行った。ペプチド配列の異なる 30 種類のリポペプチドを抗原 (OVA) とともに WT と各種 KO マウスに投与し、投与マウスの血中サイトカイン、脾臓 mDC, リンパ球の EG7 細胞 (OVA 抗原を持つ) 障害活性を調べた。同様に polyI:C を OVA とともにマウスに免疫した。一方、KO マウスは MyD88^{-/-}, TICAM-1^{-/-}, IPS-1^{-/-}, IRF-3^{-/-}, IRF-7^{-/-}, IFNAR^{-/-} を用いた。これらを EG7 腫瘍の担がん実験と免疫エフェクター解析に用いた。脾臓樹状細胞の調整、NK 活性の測定、cross-priming 能の査定, OVA tetramer assay は既報に準じ

た。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

C. 研究結果

化学合成可能な TLR2 アゴニスト、Pam2 リポペプチドを用いて TLR2 刺激で発現上昇する遺伝子群 (Chip 抽出) から樹状細胞に働くが腫瘍増殖に働かないペプチド改変体を多数化学合成した。EG7 担がんマウスの系で NK, CTL の誘導活性と治療効果を見た。Pam2 に続くアミノ酸によって NK, CTL の誘導活性は異なり、樹状細胞とがん細胞の TLR2 がペプチド配列に異なった応答を示すことが示唆された。

PolyI:C が樹状細胞に誘導する分子群から cross-priming を発動するが鍵因子を抽出した。これらの機能をレンチウイルスベクターの gain-of-function, loss-of-function 系で査定し、cross-priming に関与するエフェクターを同定した。以下に結果をまとめる。

1. PolyI:C 投与マウスは急性期に NK 活性化を起動した。この応答に関与する分子として INAM の他 2 つのファミリーを査定中である。

2. PolyI:C は OVA に対する cross-priming を誘導した。Cross-priming 誘導能は CD8+ DC の TICAM-1 に依存し、MAVS は殆ど関与しなかった。

3. PolyI:C と OVA の投与マウス(EG7 担がん)は経時 6 日後以降に OVA 特異的 CTL を増殖させた。OT1 を使った ex vivo 系でも polyI:C 刺激後の脾臓 CD8+ DC が cross-priming を誘導すると判明した。CTL 誘導に CD8+ DC の TICAM-1 の関与が証明された。CTL 誘導には IRF-3 と IRF-7 が関与し、両方の KO で cross-priming は殆ど抑えられた。

4. TICAM-1 経路の cross-priming 誘導因子を siRNA とレンチベクターを使った過剰発現系で 2 つ同定した。これらの作用機構を検討している。

D. 考察

PolyI:C など RNA アジュバントは type I IFN と独立に CTL, NK 活性化を起動することが判明した。抗原を OVA から survivin2B ペプチド、survivin2B を含むマウス survivin キメラ蛋白に変えると CTL は誘導されなかった。ヒトの wild-type survivin2B 蛋白も CD4 T のみで CTL 誘導は現時点で確認できていない。CD4 T 細胞を活性化する抗原の選択が CTL 誘導に重要である。

TLR2 アゴニスト Pam2 リポペプチドは MyD88 依存的に cross-priming を誘導し、抗がん CTL の起動に関与する。これらのエフェクター誘導の根幹に TLR, RLR シグナルを始めとする樹状細胞・自然免疫のアジュバン

トが必須なことを本研究で確認した。

一般に polyI:C は毒性の問題が臨床への導入を阻んで来た。毒性の本体は cytokine storm で

ある。本研究はデータベース構築なのでエフェクター誘導パターンを TLR2, TLR3 刺激で比較検討する。新規アジュバントの開発はここで扱う問題ではないが、dsRNA の毒性の問題を解決する必要がある。Pam2 についてはペプチド配列が樹状細胞のみに働きがん細胞増殖に機能しない鍵になりうる。

MyD88, TICAM-1 経路が共に NK 活性化と cross-priming を誘導する、その分子機構は基礎研究でエフェクター誘導の profiling を含めて検討中の課題である。TLR によるマウス樹状細胞成熟化の分子基盤の解明と抗腫瘍活性起動の分子機構をデータベースから解明することを本研究の今後の検討課題とする。

E. 結論

樹状細胞は MyD88, TICAM-1 経路によって NK, CTL の起動を行うが副作用 (cytokinemia, がん細胞の増殖) を起こさないアジュバントの開発が望まれる。そのために樹状細胞のみにエフェクター誘導を起こさせる必要がある。2 つの TLR 系でエフェクター因子を同定し、2 つのアジュバント系の相違を比較する。Survivin2B 抗原とアジュバントを組み合わせたが、現在まだ 2B 特異的 CTL は検出されておらず、マウス移植がんを退縮するに至っていない。ヒトへの適用は今後の検討課題である。

G. 研究発表

a) 論文発表

Original articles

1. Abe, Y., K. Fujii, N. Nagata, O. Takeuchi, S. Akira, H. Oshiumi, M. Matsumoto, T. Seya, and S. Koike. 2012. Toll-like receptor 3-mediated antiviral response is important for protection against poliovirus infection in poliovirus receptor transgenic mice. *J. Virol.* 86: 185-194.
2. Shime H, M. Matsumoto, H. Oshiumi, S. Tanaka, A. Nakane, Y. Iwakura, H. Tahara, N. Inoue, and T. Seya. 2012. TLR3/TICAM-1 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 2066-2071.
3. Azuma M., T. Ebihara, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2012. Cross-presentation and antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C largely depend on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c+/CD8a+ dendritic cells. *Oncol Immunol.* 1: 581-594.
4. Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W, Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I, Komuro I. 2012. Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell.* 149: 1298-1313.
5. S. Yamazaki, S., A. Maruyama, K. Okada, M. Matsumoto, A. Morita, and T. Seya. 2012. Dendritic cells from oral cavity induce Foxp3⁺ regulatory T cells upon antigen stimulation. *PLoS ONE.* 7(12): e51665.
6. Toscano, F., Y. Estornes, F. Virard, A. Garcia-Cattaneo, A. Pierrot, B. Vanbervliet, M. Bonnin, M. J. Ciancanelli, S. Y. Zhang, K. Funami, T. Seya, M. Matsumoto, J. J. Pin, J. L. Casanova, T. Renno, and S. Lebecque. 2013. Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor. *J Immunol.* 190: 764-773.
7. Tatematsu, M., F. Nishikawa, T. Seya, and M. Matsumoto. 2013. TLR3 recognizes single-stranded RNA with incomplete stem structures. *Nat Commun.* (in press).
8. Enokizono, Y., H. Kumeta, K. Funami, M. Horiuchi, J. Sarmiento, K. Yamashita, D. Standley, M. Matsumoto, T. Seya, F. Inagaki. 2013. Structures and interface mapping of the Toll/Interleukin-1 receptor-domain-containing adaptor molecules involved in interferon signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* (in press).
9. Oshiumi, H., M. Miyashita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. Riplet ubiquitin ligase plays a pivotal role in TRIM25-mediated RIG-I activation and is targeted by Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog.* (in press).

Reviews

10. Oshiumi, H., M. Matsumoto, and T. Seya. 2012. Ubiquitin-mediated modulation of the cytoplasmic viral RNA sensor RIG-I. *J. Biochem. (Tokyo)* 151: 5-11.
11. Aly, H. H., K. Shimotohno, M. Hijikata, and T. Seya. 2012. In vitro models for the analysis of HCV life cycle. *Microbiol. Immunol.* 56: 1-9 (doi: 10.1111).
12. Seya T., H. Shime, and M. Matsumoto. 2012. TAMable tumor-associated macrophages in response to innate RNA sensing. *Oncol Immunology.* 1:

1000-1001.

13. Seya, T., H. Shime, H. Takaki, H. Oshiumi, and M. Matsumoto. 2012. TLR3/TICAM-1 signaling in RIP3 tumor necroptosis. *OncoImmunology*. 1: 917-923.

14. Oshiumi, H., H. H. Aly, M. Azuma, M. Matsumoto, and T. Seya. 2013. Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus. *Arch Immunol Ther Exp*. (in press).

15. Seya, T., M. Azuma, and M. Matsumoto. 2013. Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Exp Opin TherTargets*. (in press).

b) 学会発表

省略

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

アジュバント安全性評価データベースの構築研究
分担研究報告書

研究分担者 植松 智 東京大学医科学研究所国際粘膜ワクチン開発研究センター
自然免疫制御分野 特任教授

研究要旨：

粘膜固有層に存在する自然免疫細胞とそこに発現するアジュバント受容体としての自然免疫受容体の機能を解析し、新規粘膜ワクチン開発のための標的細胞及び粘膜アジュバントのスクリーニングを行う。また、自然免疫受容体を介して誘導される疾患を、アジュバント病ととらえ、病態メカニズムと治療法の開発を行う。

A. 研究目的

本研究課題は、マウスの腸管粘膜固有層に存在する自然免疫細胞群とそれらに発現している自然免疫受容体の機能を詳細に解析し、新規粘膜ワクチン開発のための標的細胞及び粘膜アジュバントのスクリーニングを行うものである。また、アジュバント標的となるアジュバント受容体、自然免疫受容体を介して誘導される疾患の病態モデルを解析し、アジュバント病としての免疫疾患の研究を行う。

B. 研究方法

研究計画として、1. マウス粘膜固有層の自然免疫細胞群の解析、2. 放射線腸障害におけるTLRの役割、の2つを進めて行く。

1. マウス粘膜固有層の自然免疫細胞群の解析腸管粘膜固有層のCD11c^{int}CD11b^{int}マクロファージの機能を解析する。これまでの解析から、CD4⁺マクロファージで、ケモカイン受容体のCX3CR1を特異的に発現していた。このマクロファージにおけるTLRの発現を検討する。

また、TLR刺激によって、どのようなサイトカ

インを産生するか検討を行う。更に、貪食能やCD4⁺T細胞に対する抗原提示能を調べる。更に、これまで機能を明らかにした2種類の腸管粘膜固有層に存在する樹状細胞と、その作用に関して機能の違いについて比較検討を行っていく。

また、腸管粘膜固有層のCD11c^{int}CD11b^{hi}好酸球の機能解析を行う。抗原提示能の有る無し、アジュバント受容体を介する活性化制御を検討し、様々な病態における役割を明らかにして行く。

2. 放射線腸障害におけるTLRの役割

放射線は、その電離・励起能力によって生体細胞内のDNAを損傷させる。軽度のDNA損傷は修復することができるが、それが不可能である場合にはDNAが損傷したまま分裂するか、もしくは細胞死を誘導する。腸管は非常に放射線感受性の高い臓器で、急性期の症候はgastrointestinal syndrome (GI syndrome)として知られており、5Gy以上の被曝で腸管上皮が障害され、吸収力低下による下痢や細菌感染のため腸炎を発症し重急性に死亡する。また、悪性腫瘍の治療目的に広範囲腹部照射をした際に、目

の外臓器の腸管が過剰照射されると、晩発性に反復性の出血性腸炎が誘発され、その後、慢性潰瘍や癒痕化、腸の狭窄、閉塞、穿孔などが起こる。これらの症状は、重篤かつ難治性の副作用として臨床的に解決すべき重大な問題と考えられている。しかしながら、放射線腸障害に関して、これまで自然免疫の観点から十分な解析はなされていない。急性と慢性の放射線腸炎モデルを用いて、放射線腸障害におけるアジュバント受容体であるTLRの役割を検討する。

(倫理面への配慮)

「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」並びに「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、東京大学医科学研究所にて設置されている遺伝子組換え安全委員会及び実験動物委員会の審査を受けた上で、研究活動を実施する。

C. 研究結果

本年度は、粘膜アジュバント標的細胞として、マウス小腸粘膜固有層の自然免疫細胞の解析を行った。CD4 と CX3CR1 を発現するマクロファージは TLR4,7,9 を発現しており、これらのリガンドに反応して、抑制性のサイトカインである IL-10 を産生し、IL-6 や IL-12 といった炎症性サイトカインを産生しなかった。

また、TLR リガンドで刺激を行っても、T cell の増殖能は低かった。また、TLR3 欠損マウスにおいてガンマ線誘導性の腸炎に抵抗性を示す事が分かった。ガンマ線照射後、陰窩では顕著な細胞死が起こるが、TLR3 欠損マウスでは抑制されていた。無

菌マウスにガンマ線を照射しても陰窩の細胞死に変化がなかったことから、ガンマ線照射後に TLR3 の内因性リガンドが出てくる事が考えられた。

D. 考察

粘膜固有層の常在マクロファージはアジュバント刺激を受けて、大量の IL-10 を産生したことから免疫抑制性の細胞でると考えられる。今後、CD4+T 細胞との共培養を行い、制御性 T 細胞の誘導を検討する必要がある。強力に抗原特異的制御性 T 細胞が誘導出来れば、TLR4,7,9 のリガンドをアジュバントとして用いて新しい免疫抑制療法の開発が可能と考えられる。

TLR3 欠損マウスの解析から、TLR3 が急性放射線腸炎の増悪因子であることが明らかになった。今後、内因性リガンドを同定することにより、TLR3 を活性化する新規アジュバント候補が明らかになるとともに、アジュバント受容体を活性化することによって病態を増悪させるアジュバント病としての放射線腸炎のメカニズムが明らかになると考えられる。

E. 結論

腸管粘膜固有層のCD11c^{int}CD11b^{int}マクロファージはIL-10を産生する抑制性の自然免疫細胞であった。

放射線腸炎はTLR3によって増悪することが明らかになった。内因性の物質がTLR3を介して、放射線腸炎の病態を形成することが分かった。

F. 健康危険情報

特になし

厚生労働科学研究補助金（創薬基盤推進研究事業）
研究分担報告書

研究分担課題
『評価法開発および DNA マイクロアレイ解析』

研究分担者： 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長
研究協力者： 斎藤益満 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官
 水上拓郎 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨 近年、新規ワクチン開発にはアジュバントの存在が必須であることが明らかとなった。しかしながら、アジュバントはその起源や作用機序などが多岐にわたり、他の創薬に比べその有効性及び安全性の指標（マーカー）が未開拓という点が挙げられる。そこで我々はアジュバントの有効性及び安全性の評価法の開発及びアジュバント安全性評価データベースの構築のために、小動物での生体反応及び遺伝子発現変動を医薬基盤研と共同で解析する。

まず共同研究を遂行するにあたり、各研究機関において同レベルで動物実験を実施可能にするために標準手順書(SOP)の作成を行った。この SOP に従い、2種類のアジュバント、水酸化アルミニウムゲル (Alum)、FCA(Freunds Complete Adjuvante)をラットの腹腔内、筋肉内に接種し、接種 6 時間後と 24 時間後のラットの体重測定、血液学検査、さらに数種類の組織（肝臓、腎臓、肺、脾臓、筋肉）を摘出した。血液学検査においては Alum と FCA 接種群とコントロール（無処置、生理食塩水接種）に優位な差が検出出来なかったものの、アジュバント接種 24 時間後のラットの体重が減少していることを明らかにした。また臓器由来の RNA から DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイリング解析を行った結果、Alum を接種したラットの肺、腎臓、脾臓、筋肉においては少数の遺伝子のみが発現変化が検出されたものの、肝臓においては多数の遺伝子が発現が顕著に変動することを明らかにした。また FCA を接種したラットにおいても同様な結果が得られた。現在、各アジュバント接種による遺伝子発現変化の詳細について解析し、アジュバントの有効性及び安全性を評価可能なマーカー遺伝子の探索を行っている。

A. 研究目的

近年の自然免疫学研究の発展により、ワクチン開発には免疫賦活化能を高めるアジュバントが必須であることが明らかになった。この発見が起爆剤となりアルミニウムアジュバントや MPL、スクワレンなどの新規アジュバントを添加するワクチンが開発された。また今後さらに多種多様なアジュバントが導入される可能性が強く示唆されている一方、その安全性・有効性評価法に関しては従来の試験法に依存している。

そこで我々はアジュバントの有効性及び安全性の新しい評価法の開発を目的に、アジュバント接種を行ったラットの各臓器における遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイを用いて解析を行った。

B. 研究体制と研究方法

浜口 (国立感染症研究所) : アジュバント投与、組織摘出、体重測定、血液学検査

石井 (医薬基盤研究所) : DNA マイクロアレイ解析、miRNA 解析

山田 (医薬基盤研究所) : DNA マイクロアレイ解析、バイオインフォマティクス、データベース構築

1) 試験動物 : Sprague-Dawley 系雄性 SPF ラットを購入し、1 週間の環境馴化期間をおき、本実験に使用した。アジュバント投与前には各ラットにバーコードで管理出来るように個体番号を与え、実験のシステム化を行った。

2) アジュバント : Alum と FCA を使用した。コントロールとして生理食塩水をしようした。

3) 投与量と投与ルート : 0.5mg/ml 濃度の Alum を腹腔内と筋肉内に 5ml と 0.5ml をそ