

れぞれラットに投与した（1群 2〜3匹）。**0.5mg/ml** 濃度の FCA を腹腔内と筋肉内に **0.5ml** と **0.1ml** をそれぞれラットに投与した（1群 2〜3匹）。

4）体重測定：ラットを購入後、1週間の環境馴化期間に一般状態に異常がなく、体重増加が順調な動物を使用した。またアジュバント投与前後の体重測定を行った。

5）検体採取：ペントバルビタール麻酔下のラットの心臓より採血した後、肺、肝臓、脾臓、腎臓、筋肉と摘出した。各組織は約 **50mg** 組織片にし、RNAlater 中で RNA を安定化した。

6）血液学検査：赤血球数、白血球数および血小板数などの血算は血球計算機（日本光電）で行った。

7）検体管理と輸送：一晩 RNAlater 中で保存された約 **50mg** 組織片をバーコード付のサンプルチューブに移し、DNA マイクロアレイ解析のサンプル調整を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

1）体重変化：Alum と FCA 接種後 6 時間のラットにおいて体重変化が認められなかったが、コントロール（無処置群、生理食塩水接種群）と比較し Alum 腹腔内接種後 24 時間のラットではおよそ **10%**、Alum 筋肉内接種後 24 時間のラットではおよそ **5%**、FCA 腹腔内接種後 24 時間のラットではおよそ **5%**、FCA 筋肉内接種後 24 時間のラットではおよそ **2%** の体重減少が認められた（Fig.1）。

2）血液学検査：Alum と FCA 接種後 6 時間と 24 時間後のラットより心採血を行い、白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン濃度（HGB）、ヘマトクリック（HCT）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）、赤血球分布幅（RDW）、血小板数（PLT）、血小板クリット（PCT）、平均血小板容積（MPV）、血小板分布幅（PDW）の測定を行った。その結果、コントロール（無処置群、生理食塩水接種群）と比較し、WBC、

RBC、PLT を含む全ての検査項目において、アジュバント接種後に特徴的な変動は認められなかった（Fig.2）。

3）DNA マイクロアレイ解析：Alum と FCA 接種後 6 時間と 24 時間後のラットより肝臓、肺、腎臓、脾臓、筋肉を採取し、各組織から抽出した RNA を用いて DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの解析を行った。その結果、肝臓においては Alum と FCA の接種によって多くの遺伝子発現が変動することを明らかにした。一方、肺、腎臓、脾臓、筋肉においては少数の遺伝子の発現変動が検出された。

FCA の接種 6 時間後の肝臓において劇的な遺伝子発現変動が検出され、接種 24 時間後においてはその遺伝子発現変動が抑制されることがわかった。一方、Alum の接種したラットの肝臓においては FCA と逆のパターンを示し、接種 6 時間後ではあまり遺伝子発現変動が検出されないものの、接種 24 時間後には顕著な遺伝子発現変動が確認された（Fig.3）。

### D. 考察

今回実験に用いた Alum は現在使用されている多数のワクチンに添加されており、安全性が担保されているアジュバントである。一方、FCA は毒性が強いためワクチンには使用されていないアジュバントと知られている。現在までに数多くのアジュバントが開発され、その有用性と安全性について検討が行われてきたが未だ明確にはされていない。

我々は本研究計画において、アジュバント接種後の体重変化、血液学検査、さらに DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変化の解析から、アジュバントの安全性と有効性を示すマーカー（遺伝子）の探索を行った。Alum 接種 24 時間後には顕著な体重変化が認められたことから、小動物における体重測定はアジュバントの安全性を評価出来る一つの方法であると考えられる。しかしながら血液学検査においては Alum と FCA を接種したいずれのラットにおいても顕著な変化が認められないことから、アジュバントの安全性を評価するには適していないことが示唆される。Alum と FCA 接種後に DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現変化を解析した結果、それぞれ

のアジュバント接種によって経時的遺伝子発現変化、アジュバント特異的遺伝子発現変化、さらに組織特異的遺伝子発現変化が認められたことから、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析はアジュバントの安全性と有効性の評価に有用であると考えられる。

今後さらに数種類のアジュバントについて同様な方法と解析から、アジュバントの安全性と有効性を示すマーカーの同定を行う。

#### E. 結論

近年、効果的なワクチンにはアジュバントが必須であることが明となったことから、今後多種多様なアジュバントの開発が予想される。そのためアジュバントの有用性と安全性を評価するための新しい方法が求められている。そこで、初年度の研究成果で得られた DNA マイクロアレイデータと今後数種類のアジュバント接種によって得られる DNA マイクロアレイデータを用いてデータベースを作成し、アジュバントの有用性と安全性を評価可能なマーカーが同定されることが期待出来る。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

斎藤益満、水上拓郎、倉光球、百瀬暖佳、石井健、浜口功、網羅的遺伝子発現解析を用いたアジュバント含有ワクチン安全性評価法の開発と展開、第 16 回日本ワクチン学会(横浜)、2012 年 11 月 (ポスター発表)

#### H. 知的所有財産の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

名称：「百日咳ワクチンの安全性評価法」

特許証番号：特許第 5 0 0 7 4 2 5 号

登録日：2012年6月8日

公開発行日：2012年8月22日

発明者：濱口功、加藤博史、山口一成

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

アジュバント遺伝子組み込みエイズウイルスの霊長類における免疫反応の解析

研究分担者 保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

研究協力者 岡村智崇 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 研究員

**研究要旨:** 抗酸菌の主要な分泌抗原の一つである Ag85B は、Th1 への誘導効果をもつことが知られ、近年、アジュバントへの応用研究が行われている。本研究では Ag85B の免疫増強効果および宿主免疫系の認識機構の解明を目的として、Ag85B 分子を組み込んだ弱毒エイズウイルスを作製し、生体内におけるウイルス動態および免疫反応を解析した。遺伝子欠損により高度に弱毒化された弱毒エイズウイルス(SHIV-NI)の遺伝子欠損部位に Ag85B 遺伝子を組み込み、Ag85B 発現弱毒エイズウイルス(SHIV-Ag85B)を構築し、これらのウイルスをカニクイザルに接種したところ、SHIV-Ag85B 接種サルでは、接種初期において血漿中のウイルス量および SHIV プロウイルスが検出限界以下となった。比較対象として用いた SHIV-NI 接種群では、接種後 12 週まで血漿中のウイルス量は検出され、またプロウイルスの持続感染が確認された。さらに接種後 37 週にこれら感染ザルに SHIV 強毒株 (SHIV89.6P) の攻撃接種を行ったところ、SHIV-Ag85B 接種サル 7 頭中 5 頭で、血漿中のウイルス量は検出限界以下となり完全に制御した。一方、SHIV-NI 接種サルでは、強毒株ウイルスを制御できなかった。また、感染初期のウイルス制御および強毒株接種後の防御機構について解析するため、IFN- $\gamma$  産生細胞数の測定を行ったところ、SHIV-Ag85B 接種サルでは SHIV-NI 接種サルと比較し、極めて強い細胞性免疫反応が確認された。以上の結果から、Ag85B 分子はアジュバント効果により弱毒エイズウイルスの免疫原性を高め、さらに強毒株に対する防御免疫反応を誘導したと考えられた。

認識機構の解明を試みた。

#### A. 研究目的

ワクチンの免疫原性を向上させる方法として、アジュバントの併用が多く例で検討されている。我々は、抗酸菌の主要抗原である Ag85B に着目し、新規ワクチンアジュバント物質としての可能性について検討し、Ag85B は強力な Th1 指向性のアジュバント活性をもつことを明らかにしてきた。本研究では Ag85B を細胞性免疫指向型アジュバントとして弱毒生ウイルスに組み込み、生ウイルスの免疫原性能の増強効果を明らかにし、さらには宿主免疫系の認

#### B. 研究方法

##### 1. SHIV-Ag85B の構築および *in vitro* assay

SHIV-Ag85B ウイルスの構造タンパクおよび Ag85B の発現を解析するため Western Blotting を行った。また、構築したウイルス複製能について、ヒトリンパ球およびサルリンパ球細胞株を用いて評価した。またウイルス継代による挿入遺伝子の保存状況を検討した。

##### 2. 免疫および攻撃接種スケジュール

構築した SHIV-Ag85B の免疫誘導能を解析す

るため、カニクイザルを用いて評価した。比較対照群として、親株 SHIV-NI を用いた。投与量は  $10^6$ TCID<sub>50</sub>、静脈内接種を行った。免疫後 37 週において、強毒株 SHIV89.6P を  $10^4$ TCID<sub>50</sub> で静脈内より攻撃接種した (図 2)。

### 3. 血漿中ウイルスコピー数および CD4+T 細胞数の測定

ウイルスコピー数は、血漿からウイルス RNA を抽出し、SIVgag 特異的 Primer および probe を用いて Real time PCR を行った。CD4+T 細胞数の算定には、CD3、CD4、CD8 抗体を用いて染色し、フローサイトメーターにて算定した。

### 4. SHIV プロウイルス遺伝子の検出

免疫動物の PBMC より DNA の抽出を行い、SIVgag 特異的 Primer を用いて PCR 法を行った。

### 5. ウイルス抗原特異的 IFN- $\gamma$ 産生細胞数の測定

採取した血液から PBMC の分離を行う。抗原刺激には、各個体より事前に樹立した B-LCL 細胞に SIVGag-pol、HIVEnv をそれぞれ発現する組換えワクシニアウイルスを感染させた感染細胞を用いた。PBMC を抗原刺激後、Monkey IFN- $\gamma$  ELISPOT Kit を用いて、SIV 抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞数を測定した。

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### 1. ウイルスの構築および *in vitro* assay

トランスフェクトした細胞より回収したウイルスは、各種抗体を用いて Western Blotting を行ったところ Gag、Env、Ag85B タンパクの発現をそれぞれ確認した (図 1)。構築した

SHIV-Ag85B のウイルス複製能は、親株 SHIV-NI とほぼ同じ複製能を有していることが明らかになった。また挿入した遺伝子の保存状況を PCR 法で検討したところ、Ag85B 遺伝子の保存が確認された (図 1)。また継代後も Ag85B タンパクの発現が認められた (図 1)。

### 2. SHIV-Ag85B, SHIV-NI 接種後の血漿中ウイルス量および CD4+T 細胞数

SHIV-Ag85B 接種サル血漿中のウイルス量は、SHIV-NI 接種サルと比較して低く、また早期に (接種後 4 週) 検出限界以下となった。CD4+T 細胞数については、両接種群とも大きな変化は無かった (図 3)。

### 3. SHIV-Ag85B, SHIV-NI 接種後のプロウイルスの検出

両接種群の PBMC をそれぞれ用いて SHIV ウイルス DNA の遺伝子検出を試みたところ、SHIV-Ag85B 接種サルでは感染初期のみウイルス遺伝子が検出され、接種後 8 週以降では全て検出限界以下となった。一方、SHIV-NI 接種サルでは、持続的に検出された (図 4)。

### 4. 攻撃接種後の血漿中ウイルス量

SHIV-Ag85B 接種後 37 週において強毒株 SHIV 89.6P 株の攻撃接種を行ったところ、SHIV-Ag85B 接種サルでは、7 頭中 5 頭で強毒株を完全に制御した。一方で SHIV-NI 接種サルでは、強毒株を制御できなかった (図 5)

### 5. ウイルス抗原特異的な細胞性免疫反応

SHIV-Ag85B 接種後 2 週、8 週および SHIV 89.6P 攻撃接種前、接種後 2 週の PBMC をそれぞれ用いて、ウイルス構造タンパク (SIVGagPol、HIVEnv) 特異的な IFN- $\gamma$ ELISPOT 反応を行ったところ、SHIV-Ag85B 接種群では、接種後 2 週および攻撃接種後 2 週において、極めて強い細胞性免疫反応が確認された (図 6)。

#### D. 考察

感染初期の免疫反応はその後の病態を規定する重要な要素と考えられている。ワクチンにおいても初期免疫反応を増強・調整することが感染症に対する初期免疫反応を制御すると考えられており、免疫反応を規定するアジュバントは重要な要素である。一方、弱毒生ワクチンは核酸を中心に弱毒生ワクチンそのものがアジュバント活性をもっているためにアジュバントによる免疫反応の制御という考えは従来見られなかった。本研究では遺伝子欠損により高度に弱毒化した弱毒エイズウイルスをモデルに、遺伝子欠損部位にアジュバントを組込んだ、アジュバント発現弱毒生ウイルスを用い、アジュバント活性の感染に対する影響を検討した。このウイルスは、ウイルス複製に伴ってウイルス自身がアジュバントを発現し、ウイルス複製部位においてアジュバントが発現するため、より効果的に抗原特異的な免疫増強効果を作用させることが期待される。

抗細菌分泌抗原 Ag85B はすでに単一の蛋白でありながら、多機能の生理活性を発揮し、特にウイルス排除に重要な Th1 型免疫応答を増強する事が報告されている。本研究において、SHIV-Ag85B 接種カニクイザルは、接種初期においてウイルスを検出限界以下に抑え、この機序にはウイルス特異的な強力な細胞性免疫反応の関連が示唆された。また SHIV89.6P 攻撃接種後においても強毒株ウイルスを制御し、また攻撃接種後 2 週における細胞性免疫反応は、攻撃接種前と比較して、極めて強い反応が確認された。一方、強毒株を制御できなかった SHIV-NI 接種群では、攻撃接種前後において、抗原特異的な細胞性免疫反応の増強が確認されなかった

ことから、エイズウイルスの制御機構には、強力な細胞性免疫反応が重要であることが推測された。

本研究ではアジュバント分子による初期免疫の制御・修飾が感染病態ならびに抗ウイルス免疫誘導に需要であることを示した。

#### E. 結論

Ag85B を発現するエイズ弱毒生ウイルスの構築に成功し、カニクイザルを用いた評価で免疫誘導増強効果を明らかにした。

#### F. 研究発表

##### 1.論文発表

- 1)Yoshida, T., Omatsu, T., Saito, A., Katakai, Y., Iwasaki, Y., Kurosawa, T., Hamano, M., Higashimo, A., Nakamura, S., Takasaki, T., Yasutomi, Y., Kurane, I. and Akari, H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Archiv. Virol.* in press
- 2) Tougan, T., Aoshi, T., Coban, C., Katakai, Y., Kai, C., Yasutomi, Y., Ishii, K. J. and Horii, T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum. Vac. Immunother.* 2012 in press
- 3) Karamatsu, K., Matsuo, K., Inada, H., Tsujimura, Y., Shiogama, Y., Matsubara, A., Kawano, M. and Yasutomi, Y. Single systemic administration of Ag85B of mycobacteria DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Asthma Allergy* 2012;5:71-79.
- 4) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E. E., Shioda, T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H. and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent

enhancement of HIV-1 mt replication in macaque cells.

Microve. Infect. in press

5) Yoshida,T., Omatsu,T., Saito,A., Katakai,Y., Iwasaki,Y., Iijima,S., Kurosawa,T., Hamano,M., Nakamura,S., Takasaki,T., Yasutomi,Y., Kurane.,I Akari,H. CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins Archives Virol 2012;15::363-368.

6) Tajiri,K., Imanaka-Yoshida,K., Matsubara,A., Tsujimura,Y., Hiroe,M., Naka,T.,Shimojo,N., Sakai,S., Aonuma,K. and Yasutomi,Y. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. J.Immunol 2012;189;2043-2053.

7) Uchdida,A., Sasaguri,H., Kimura,N., Tajiri,M., Ohkubo,T., Ono,F., Sakaue,F., Kanai,K., Hirai,T., Sano,T., Shibuya,K., Kobayashi,M., Yamamoto,M., Yokota,S., Kuboddera,T., Tomori,M., Sakaki,K., Enomoto,M., Hirai,Y., Kumagai,J., Yasutomi,Y., Mochizuki,H., Kuwabara,S., Uchihara,T., Mizusawa,H. and Yokakota,T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. Brain 2012;135;833-846.

8) Saito,A., Kono,K., Nomaguchi,M., Yasutomi,Y., Adachi,A., Shioda,T., Akari,H. and Nakayama,E. E. Geographical genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIMCyp in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). J.Gen.Virol. 2012;93:594-602.

9) Higashino,A., Sakate,R., Kameoka,Y., Takahashi,I., Hirata,M., Tanuma,R., Masui,T., Yasutomi,Y. and Osada,N. Whole-genome sequencing and analysis of the Malaysian cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) genome.

Genome Biol. 2012 Epub

10) Tachibana,S., Sullivan,SA., Kawai,S., Nakamura,S., Goto,N., Arisue,N., Palacpac,NMQ., Honma,H., Yagi,M., Tougan,T., Katakai,Y., Kaneko,O., Mita,T., Kita,K., Yasutomi,Y., Kim,HR., Sutton,PL., Shakhbatyan,R., Horii,T., Yasunaga,T., Bamwell,JW., Escalante,AA., Carlton,JM. And Tanabe,K. Plasmodium cynomolgi genome sequences provide insight into Plasmodium vivax and the monkey malaria clade. Nature Genetics 2012; 44:1051-105

2.学会発表

1) 渡邊健太、松尾和浩、保富康宏 : ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルスをベクターとした粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発 第 16 回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2012 年 11 月 17-18 日

2) 和田 剛、小原 道法、保富 康宏 : C 型肝炎モデルマウスを用いた治療用 DNA ワクチンの検討 第 16 回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2012 年 11 月 17-18 日

3) 和田 剛、小原 道法、保富 康宏 : HCV-DNA ワクチンの細胞性免疫誘導能と C 型肝炎モデルマウスを用いた治療効果についての検討 第 60 回日本ウイルス学会 大阪 2012 年 11 月 13-15 日

4) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏 : 強力な細胞性免疫を誘導する Ag85B 発現弱毒エイズウイルスの防御免疫機構の解析 第 60 回日本ウイルス学会 大阪 2012 年 11 月 13-15 日

5) Okamura,T., Matsuo,K., Yasutomi,Y. : Induction of protective immune responses against pathogenic AIDS virus infection in monkeys infected with non-pathogenic AIDS virus carrying an adjuvant molecule.

第 41 回日本免疫学会 神戸 2012 年 12 月 5 日  
-7 日

6) TSUJIMURA,Y., YASUTOMI,Y. : Suppressive effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, to inflammatory responses in human bronchial epithelial cells. 第 41 回日本免疫学会 神戸 2012 年 12 月 5 日-7 日

7) Tajiri,K., Imanaka-Yoshida,K., Hiroe,M., Shimojo,N., Sakai,S., Aonuma,K., Yasutomi,Y.: Suppressor of Cytokine Signaling 1 in Dendritic Cells Inhibits Myocardial Inflammation in Experimental Autoimmune Myocarditis. Basic Cardiovascular Sciences 2012 scientific sessions, 2012.7.23-26, New Orleans, USA

8) 田尻和子、下條信威、町野智子、酒井俊、今中一吉、田恭子、廣江道昭、保富康宏、青沼和隆 : スタチンは CD4 陽性 T 細胞の Th1/Th17 細胞への分化を抑制し心臓の炎症を制御する。第 16 回心血管内分泌代謝学会、2012.11.23-24、東京

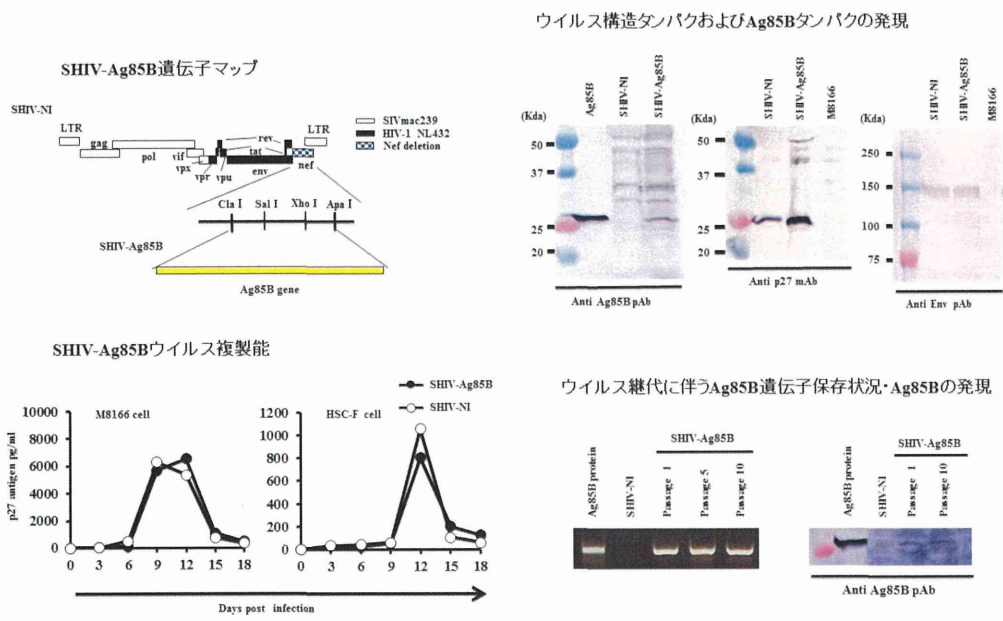


図1 SHIV-Ag85Bの構築および *in vitro* assay

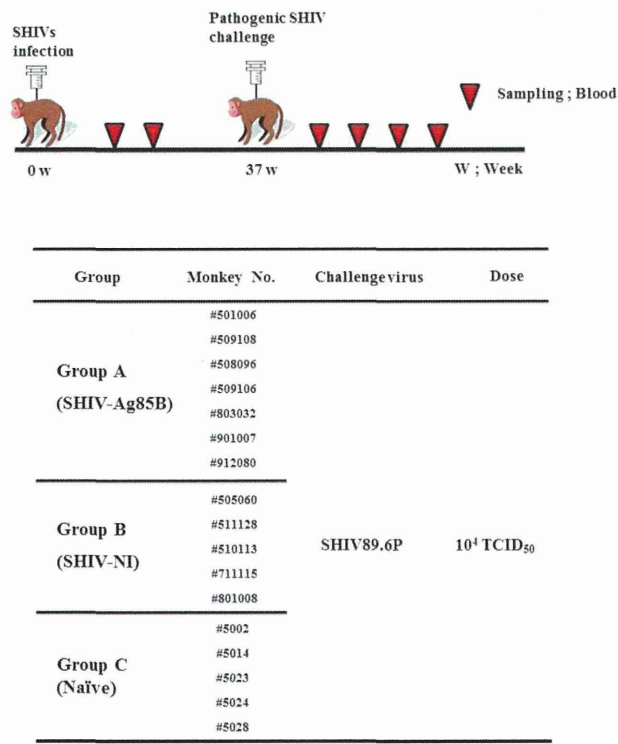


図2 実験スケジュール



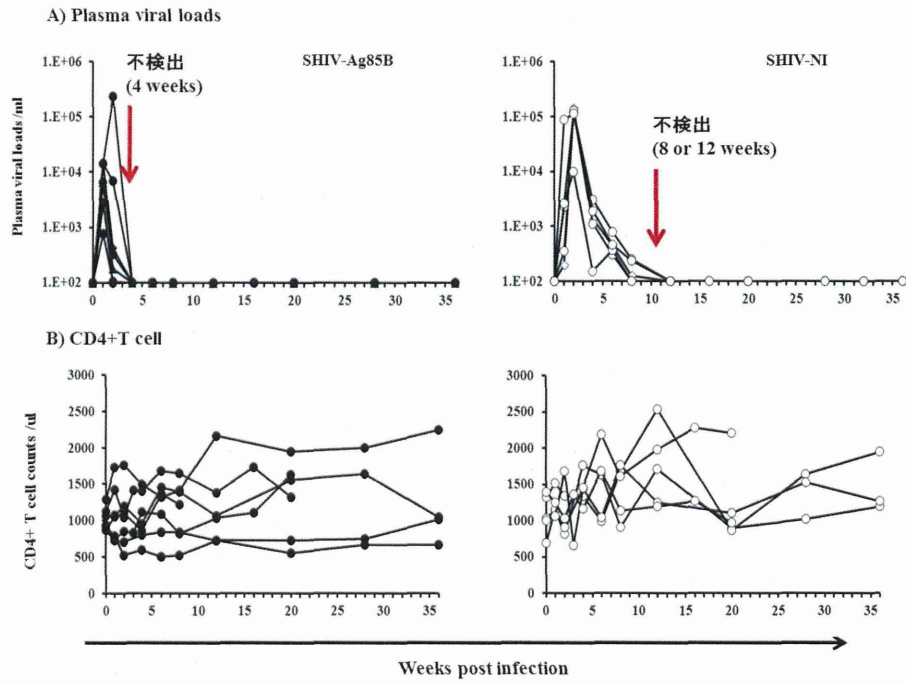


図3 SHIV-Ag85B ウイルス動態および CD4+T 細胞の変動

Detection of proviral DNA by PCR

Weeks	SHIV-Ag85B						SHIV-NI					
	#501006	#509108	#508096	#509106	#803032	#901007	#901280	#505060	#511128	#510113	#711115	#801008
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
28	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Undetectable at early stage
Persistent infection

+; ウイルス遺伝子検出  
 -; ウイルス遺伝子不検出

図4 SHIV プロウイルスの検出

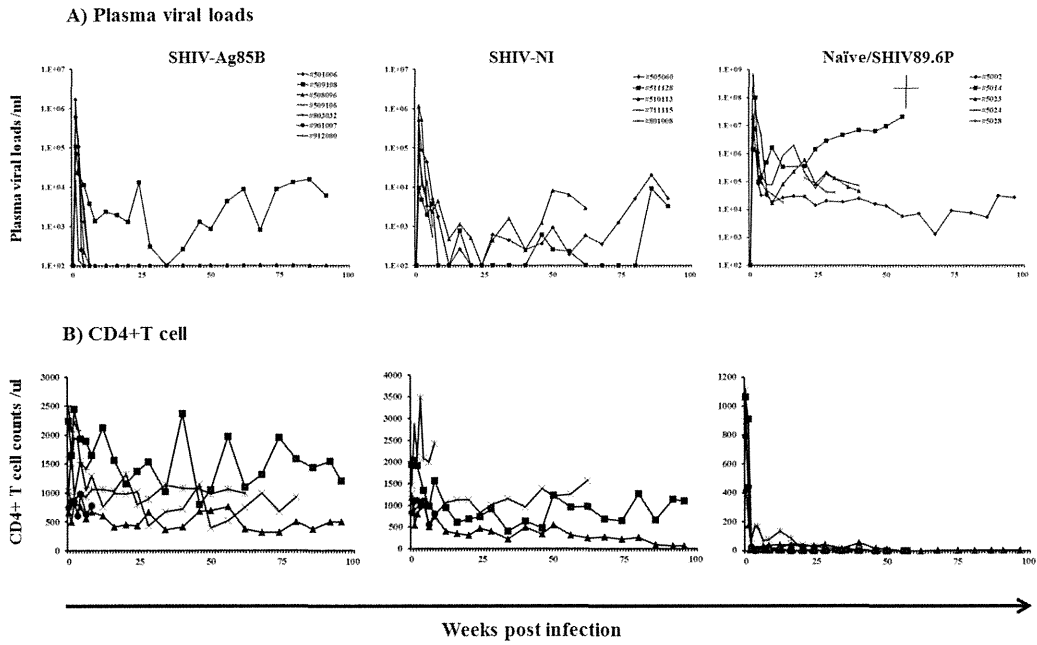


図5 SHIV89.6P 攻撃接種後のウイルス動態および CD4+細胞の変動

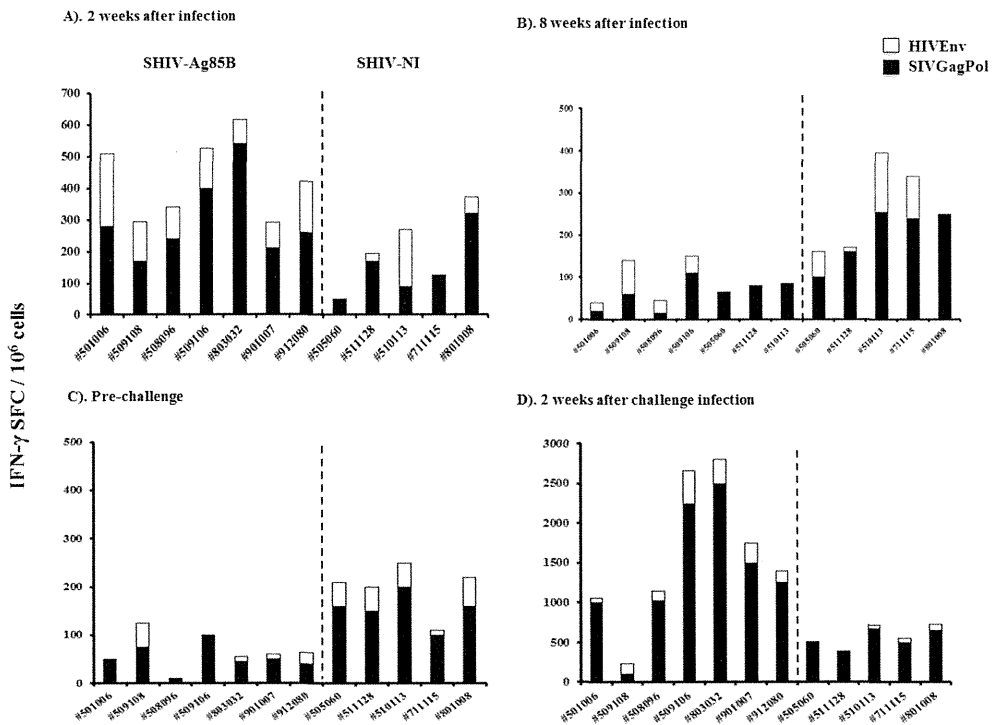


図6 SHIV-Ag85B 接種後および SHIV89.6P 攻撃接種後の細胞性免疫反応

Title: MicroRNA as biomarkers for adjuvant efficacy and toxicity

研究分担者 Daron Standley 大阪大学免疫学フロンティア研究センター  
免疫システム学 特任准教授

Names and affiliations:

Edward Wijaya<sup>1</sup>

Yoriko Suenari<sup>1</sup>

Bahtiyor Nosirov<sup>1</sup>

Shunsuke Teraguchi<sup>2</sup>

Alexis Vandenbon<sup>1</sup>

Daron M. Standley<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Systems Immunology, Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka, Japan.

<sup>2</sup> Laboratory of Host Defense, Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka, Japan.

Summary:

We employed computational approaches for the analysis of the role of serum microRNAs in immunization. Initially, we focused on 2 problems. First, we developed a method for identification of microRNAs in serum that can be used to predict adverse reactions and efficacy following vaccination. We employed the method on a study of individuals before treatment with an influenza vaccine, and identified a number of candidate microRNA biomarkers. We are now further optimizing the approach and analysing the results. Second, we analyzed microRNAs that were induced upon stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by 2 types of adjuvants. We specifically focused on functional annotation of induced miRNAs present within the intracellular and extracellular space.

#### A. 研究目的

The aim of this research is to investigate whether microRNAs can be used as biomarkers to predict the safety and efficacy of vaccines and vaccine adjuvants. If successful, we aim to

identify such microRNAs and elucidate the biological mechanisms of their function in the process of immunization.

#### B. 研究方法

We made use of 2 experimental

datasets for our analysis.

The first dataset consists of blood samples from 85 children (age 6 months to 19 years), taken before a first vaccination, before a second vaccination, and after a second vaccination with an influenza HA vaccine. At each time point, serum microRNA levels were measured using microarray technology. Additional features such as age, sex, body weight, as well as antibody titer before and after vaccination were also recorded. We used logistic regression to predict the outcome (fever incidence and antibody increase) of vaccination based on the pre-vaccination serum microRNA levels of each patient. To test the robustness of resulting model, bootstrapping was used. High-performance models are likely to reflect potential microRNA biomarkers for vaccination safety (fever incidence) and vaccination efficacy (antibody increase after vaccination).

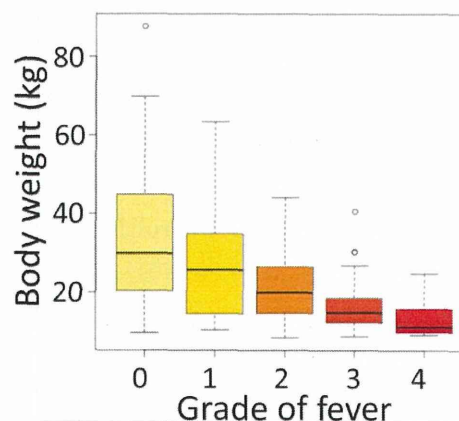
A second dataset consists of mRNA and microRNA levels measured before and after stimulation of PBMCs by CpG oligodeoxynucleotides (CpG-ODN). Changes in intracellular mRNA and microRNA levels, as well as extracellular microRNA levels were measured. We used various bioinformatics approaches for the functional analysis of induced genes and microRNAs. Our focus is especially on changes in extracellular microRNA levels, and their potential physiological roles in the immune

response following vaccination.

## C. 研究結果

### C.1 Identification of potential biomarkers for safety and efficacy of an influenza vaccine

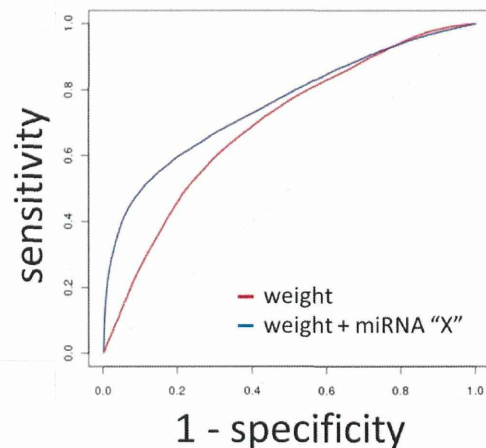
Our first analysis revealed that several pre-vaccination microRNAs in the serum of patients can be used to predict fever incidence after vaccination by an influenza HA vaccine. However, we also observed a clear correlation between fever incidence and low body weight and age (Fig. 1). Many of the microRNAs with high predictive power also exhibited a clear correlation with body weight. This suggested that their high predictive power might be an indirect consequence of their correlation with body weight.



**Figure 1: Children with lower body weight show a tendency to have more severe fever after vaccination.** Boxplots of the body weight of children with no (grade 0) to severe (grade 4) fever are

shown.

Because of these considerations, and because of the ease with which body weight can be measured, we subsequently focused our attention on microRNAs that, in combination with body weight, improve the predictive power of our model. For this purpose, we constructed models with 2 input features (each microRNA in combination with body weight) and compared their performance to a model based on body weight alone. This analysis revealed a small subset of microRNAs that, in combination with body weight, can be used to predict which patients would (or would not) develop fever following vaccination. An example is shown in Fig. 2; this microRNA (miRNA “X”) increases the ROC area under the curve (AUC) from 0.73 (for body weight alone) to 0.78 (combination of body weight and the microRNA). The model based on body weight in combination with this microRNA is estimated to have a 69.1 % accuracy in predicting fever outcome after vaccination, which is higher than a model based only on body weight (64 %). Similar results were obtained for the prediction of antibody titer increase.



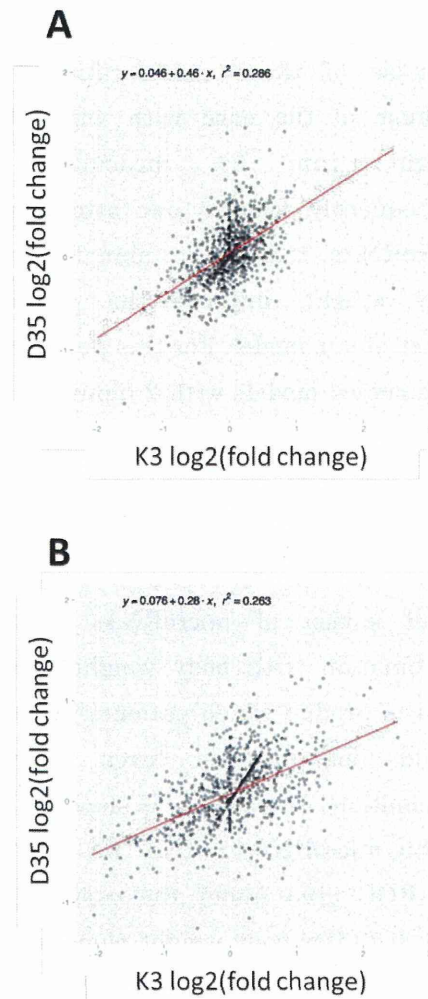
**Figure 2: Example ROC curve of a model based on body weight and miRNA “X” showing increased performance compared to a model based solely on body weight.** The shown curves represent the average performance on the test data of 100 bootstrap runs. The ROC curve is shown for a model based on body weight only (red), and a model based on body weight in combination with one of the high performing microRNAs (miRNA “X”) (blue).

We made attempts to further extend the models to include 3 or more features, e.g. combinations of 3 or more microRNAs, or body weight in combination with 2 or more microRNAs. However, such more complex models result not only in an exponential increase in the number of possible combinations of features, but also in an increase in parameters that have to be trained. In addition, we made attempts so combine our approach with next generation sequencing (NGS) data

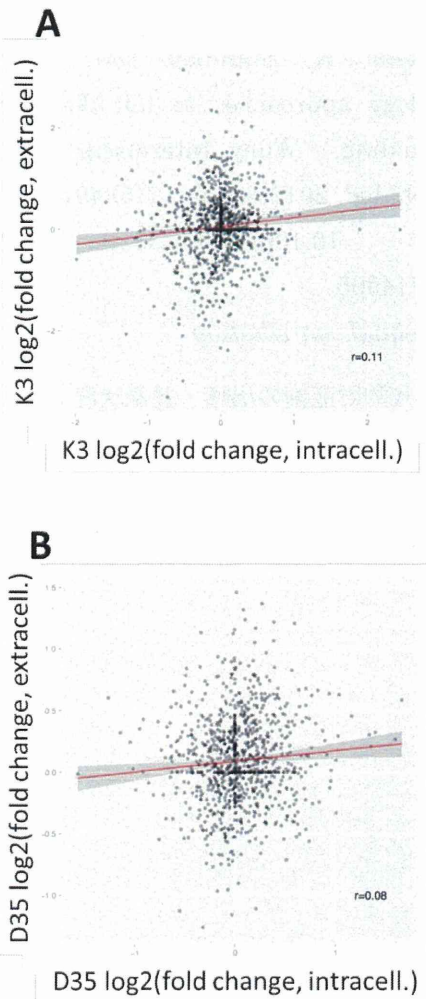
in order to extract candidate microRNAs present at sufficiently high levels in serum. However, at present, this data is not included in our results, because of a lack of samples.

### C.2 Functional analysis of genes and microRNAs induced after stimulation with CpG-ODN

A second analysis revealed that, in addition to mRNAs, a considerable number of microRNAs are induced and repressed upon stimulation with CpG-ODN. Stimulation leads not only to increasing levels of certain microRNAs within the cells, but also in the extracellular environment, and stimulation with 2 different CpG-ODNs resulted in roughly similar changes in RNA levels (Fig. 3). Surprisingly, we observed little correlation between the increase of microRNAs in the intracellular and in the extracellular space (Fig. 4), suggesting that some microRNAs might be specifically exported from the cells. Preliminary *in silico* functional analysis suggests that these microRNAs might be targeting the mRNAs of genes involved in specific regulatory pathways or functional processes, including processes related not only to immune responses, but also intercellular communication and the nervous system.



**Figure 3: Changes in mRNA and microRNA levels after stimulation with 2 types of CpG ODNs.** Changes after stimulation with K3 (X axis) and D35 (Y axis) are shown for mRNA ( $r^2:0.29$ ) (A) and microRNAs ( $r^2:0.26$ ) (B).



**Figure 4: Lack of correlation between changes in microRNA levels after stimulation in intracellular and extracellular fractions.** Changes are shown for K3 stimulation (A) and D35 stimulation (B), with changes in intracellular levels in the X axes, and changes in extracellular levels in the Y axes.

#### D. 考察

In the first part of our analysis, we focused on the predictive power of single

features (e.g. microRNAs, body weight, age, etc) to predict the outcome of vaccination in terms of safety and efficacy. Our analysis suggests that the feature with the most significant and robust predictive power is body weight: small children tend to have fever more often following vaccination than larger children. Although some serum microRNAs had comparable predictive power to that of body weight, these particular microRNAs showed a tendency to be correlated with body weight, suggesting that their correlation with fever incidence might be indirect. These microRNAs might play a role in development.

In a next step, we identified a set of microRNAs that, in combination with body weight, improve the prediction accuracy. Although the main predictive power of these “microRNA – body weight” models is due to body weight, microRNAs present an additional, independent contribution to performance, and might thus be candidate biomarkers for vaccination safety and efficacy. Importantly, the levels of these microRNAs in serum were not correlated with body weight.

At present, we are optimizing our approach and conducting functional analysis of these candidate microRNA biomarkers. In particular, using microRNA target prediction software, we are attempting to identify likely target

mRNAs regulated by these microRNAs. Enrichment of these target genes in particular biological pathways of functional processes might give an indication of the function of the microRNAs and their involvement in regulating immune responses following vaccination

For the second part of our analysis, the notion that a certain subset of induced microRNAs is exported from the cells in a specific way is novel, and has not been investigated in detail before. Exported microRNAs tend to be present within micro-vesicles or exosomes, which might be taken up by other cells. We are continuing our analysis based on the hypothesis that exported microRNAs might represent a form of intercellular communication. The fact that predicted target genes of extracellular microRNAs are enriched in certain pathways and biological processes supports this hypothesis.

#### E. 結論

Through the bioinformatics analysis of various datasets, we have identified a number of candidate microRNA biomarkers for the prediction of vaccine safety and vaccine efficacy, and we are analyzing potential underlying mechanisms by which these microRNAs play a role in the immune response following vaccination.

#### F. 研究発表

Vandenbon A \*, Teraguchi S \*, Akira S, Takeda K, Standley DM. "Systems biology approaches to toll-like receptor signaling.", Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2012 Sep-Oct;4(5):497-507.

doi: 10.1002/wsbm.1178. PMID: 22714995

\* : *equal contribution*

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



**研究要旨：**

Although alum and similar particulates induce type 2 immune responses, their mechanisms of action as a vaccine adjuvant are not thoroughly clarified. We've made a significant progress on the understanding of the particulate adjuvants' mechanism of action. We have investigated adjuvant mode of action of alum as well as others (i.e. hemozoin (malarial-derived crystal)) in comparison with other potent adjuvants such as CpG ODN.

**A. 研究目的**

Our aim is to understand by which mechanisms particulate adjuvants work. We aim to translate this information into the development of more potent and safer adjuvants. We've found that malarial metabolite hemozoin has adjuvant properties that could be used as veterinary vaccines in animals, especially against allergy. We, therefore, aim to understand underlying mechanisms of particulate hemozoin as well as other adjuvant's mechanisms of action.

**B. 研究方法**

1. Earlier (published in 2010, Coban et al, Cell Host Microbe, 2010), we've evaluated the adjuvant properties of malarial metabolite hemozoin in mouse models by using various types of model antigens. We further showed that synthetic hemozoin (sHZ) could be a potent vaccine adjuvant for dog allergy. The interesting point in these studies was

while sHZ induced IgG1 responses and acted as Th2 adjuvant in mice, it potentiated Th1 responses in dogs, suggesting species-specific immune responses. These data prompted us to study the importance of adjuvants and their mechanism of actions, which could lead us to find potent adjuvants for human use (Figure 1).

2. We further followed this research in monkeys by using malaria antigens (SERA vaccines) (Tougan et al, 2013, ref #4) (Figure 2).

3. Previously we reported that sHZ activates immune system TLR9-dependently (Coban et al., Journal of Experimental Medicine, 2005). Our further studies, however, revealed that adjuvant effect of sHZ was not TLR9-dependent, but MyD88-dependent. We are continuing these studies to understand

how crystals can use MyD88-dependent but TLR-independent pathways.

Our methodology is;

a) Use MyD88-deficient animals for immunizations (methods: ELISA, cellular responses)

b) Identify cell types responsible for the adjuvanticity (methods: q-PCR, PCR, FACS)

c) Perform adoptive transfer studies from WT mice to KO mice to confirm the function of candidate cells.

d) Follow antigens/adjuvants by using live imaging technology such as two-photon microscopy.

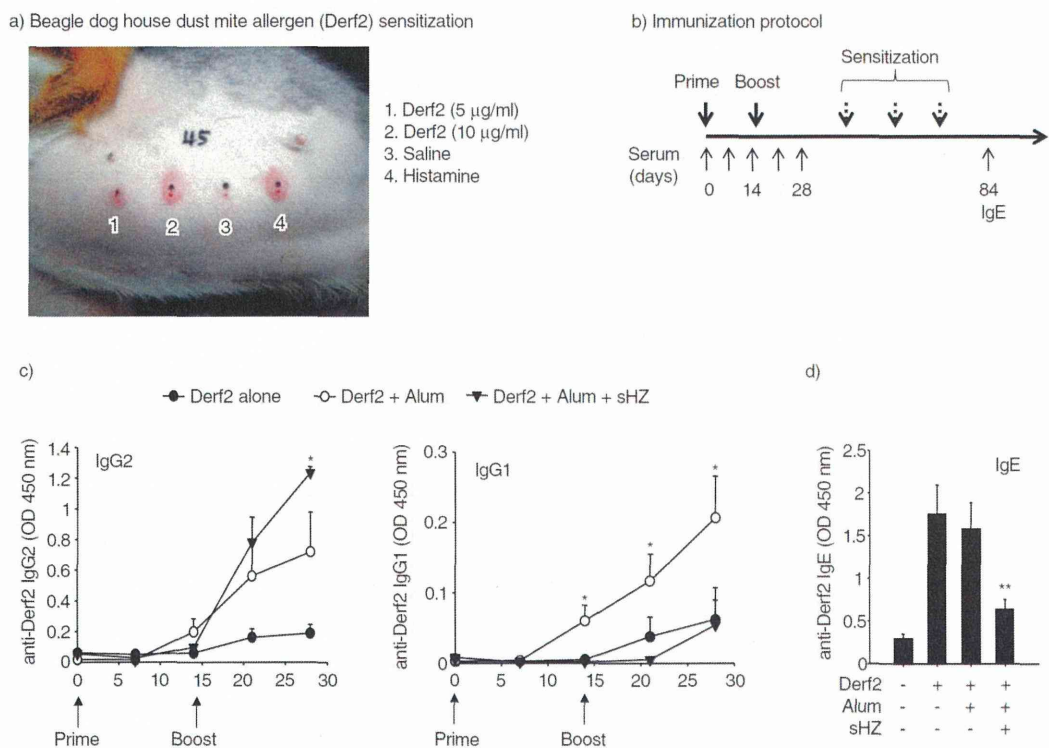


Figure 1. Hemozoin is a potent adjuvant in dog allergy vaccines.

(a) Successful sensitization of Beagle dogs with the Derf2 house dust mite allergen. Dogs were sensitized intradermally three times with a Derf2/alum mixture, before a skin test was carried out. Saline was used as negative control, while histamine was used as a positive control. Serum IgE responses correlated with the skin test reaction.

(b) Immunization and sensitization protocol. (c) IgG2 and IgG1 responses 2 weeks after the booster immunizations.

(d) IgE responses after sensitization with antigen. (b) and (d) were reproduced from *Coban et al., Cell Host Microbe, 2010* and *Coban et al., Allergy International, 2010*.

(倫理面への配慮)

All mice experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Animal Care and Use Committee of Research Institute for Microbial Diseases and Immunology Frontier Research Center of

Osaka University. All monkey experimental protocols were approved by the Animal Welfare and Animal Care Committee at TPRC, NIBIO. All animals were housed and handled in accordance with the Guidelines for Laboratory Animals at TPRC, NIBIO.

### C. 研究結果

a) In collaboration with Prof. K.J. Ishii and Prof. Horii, we have assessed the safety, immunogenicity and protective efficacy of SE36/AHG (a candidate malarial antigen for malaria vaccine) formulated with TLR9 ligand adjuvants K3 CpG oligodeoxyribonucleotides (K3 CpG ODN), D35 CpG ODN or synthetic hemozoin, in

two non-human primate models ( Tougan et al., 2013). Our results show that the novel vaccine formulation of K3 ODN with SE36/AHG demonstrated safety, potent immunogenicity, and efficacy in nonhuman primates, and this vaccine formulation may form the basis of a more effective malaria vaccine.

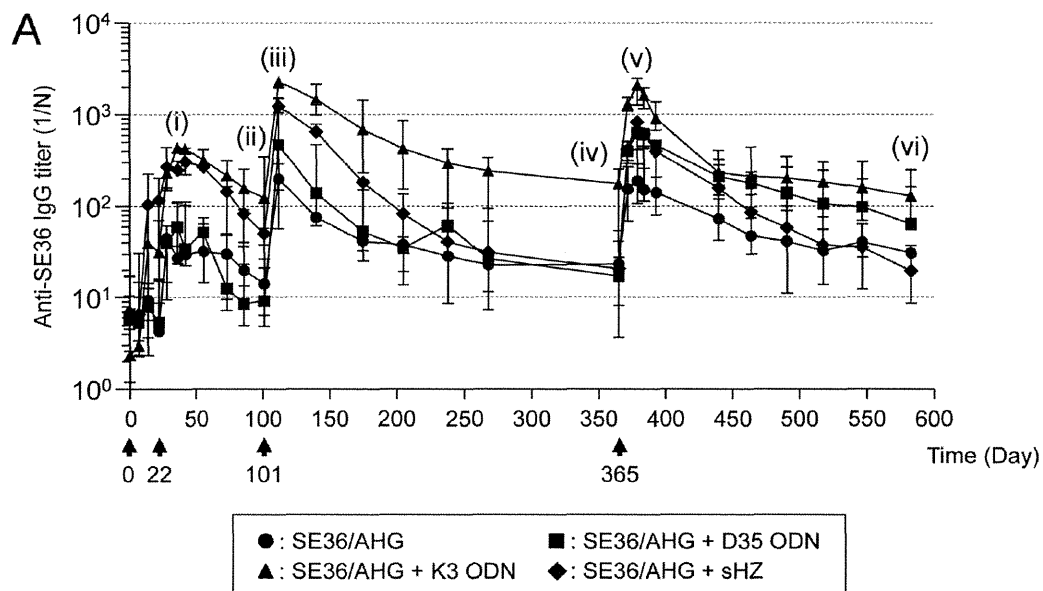


Figure 2. Synthetic hemozoin can be an adjuvant for malarial antigens in monkeys.

(A) Time-course of SE36-specific IgG antibody titer. *Cynomolgus* monkeys were administered the same dose on days 0, 22, 101 and 365 (arrows). Sera were collected on days 0, 7, 14, 22, 28, 36, 42, 56, 73, 86, 101, 112, 140, 175, 205, 238, 268, 365, 372, 379,

384, 393, 440, 464, 491, 518, 547 and 583. Closed circles, triangles, squares and diamonds show the median titers ( $n=3$ /group) of SE36/AHG, SE36/AHG with K3 ODN, SE36/AHG with D35 ODN and SE36/AHG with sHZ, respectively. Ranges are shown by bars. Figure was reproduced from *Tougan et al., 2013, ref. #4.*

b) By using *Plasmodium* infections as a model, we have identified the importance of an iron related molecule called Lipocalin 2 during chronic infectious conditions (Zhao et al., 2012). The conclusion we obtained from this study was that during malaria infection, Lipocalin 2 bolsters both host macrophage function and granulocyte recruitment and limits reticulocytosis and thus exerts its effects by maintaining iron homeostasis and

promoting innate and adaptive immune responses. We've reached several conclusions from this chronic infection model and hypothesizes that underlying chronic conditions may have an effect on the iron metabolism and adversely affect the vaccine responses. Therefore, our next goal is to understand whether this molecule is important for the creation of effective vaccines and/or adjuvants (Figure 3).

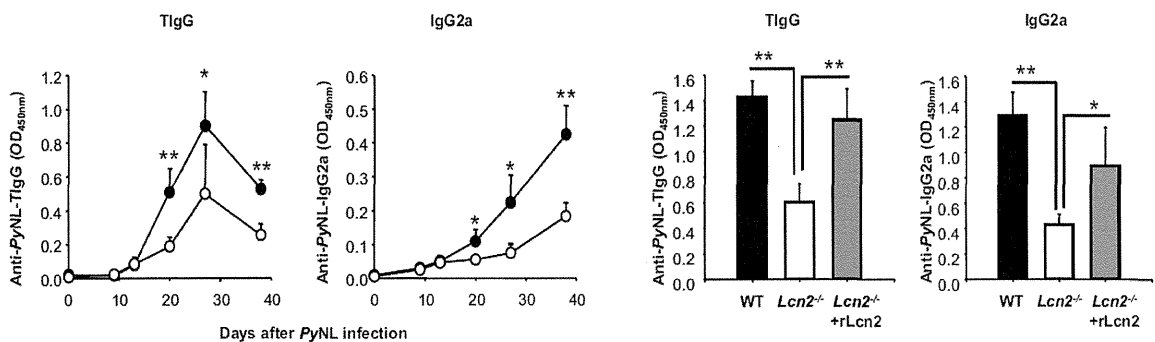


Figure 3. Lipocalin 2 Controls Iron Recycling during chronic infection (*PyNL* infection), which Helps to Boost Adequate Adaptive Immune Responses to Parasites. Parasite-specific antibody responses (total IgG and IgG2a) were measured from serum by ELISA at the indicated time points. *Lcn2*<sup>-/-</sup> mice were injected daily with mouse rLcn2 protein for 6 days from the day of infection. Serum parasite-specific total IgG and IgG2a responses were measured by ELISA at day 38 after infection, suggesting that Lipocalin 2 re-constitution could reverse the effects. Figure was reproduced from *Zhao et al., 2012, ref. #6.*

c) We have also used new detection system called whispering gallery mode (WGM) optical resonator (Kim et al., 2012) to be able to detect hemozoin crystals in aqueous medium. Using this

method we achieved detecting and measuring individual synthetic hemozoin nanocrystals dispersed in a solution or in air. We'd like to develop this new sensing technique to understand Ligand-receptor