

誘導能を増強させるために漢方アジュバントとして、補中益気湯 (HET) に加えて、ヒトでの使用経験のある粘膜アジュバントの可能性について基礎的な検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

(1) E7 発現乳酸菌経口薬 (GLBL101c) のヒトでの有効性の検討

HPV16 型 E7 が細胞表面に提示された乳酸菌 *Lactobacillus casei* (E7 発現乳酸菌ワクチン: GBL101c) を GMP 製造した製剤を作成した。第 I/IIa 相探索的臨床試験を開始している。GLBL101c は、最少量の 1cap/d から数例コホートを組みながら 6cap/d まで増量した。1 日 1 回 5 日間を 1 クールとして、1, 2, 4, 8 週の 4 クール内服した。HPV16E7 に対する細胞性免疫誘導能を解析した。子宮頸部粘膜内の粘膜リンパ球における細胞性免疫誘導能を ELISPOT 法により検討した。

内服治療による臨床的有効性を検討するために、5, 9 週で細胞診を施行し、9 週のエンドポイントで組織診、細胞診による病理学的評価を行った。また PBMC、cervical lymphocyte を採取して E7 特異的 IFN γ 産生細胞、GranzymeB 産生細胞 (E7-CMI) 数を調べた。

昨年度までに 1cap/日 1 例、2cap/日 3 例、4cap/日 3 例、6cap/日 3 例の 4 つの数例コホートを設定して、至適用量を検討したところ、4cap/日が至適量であることが、外部評価委員会で決定された。そこで、本年度は 4cap/日に固定し 7 例を追加した。この 7 例について、薬理効果として E7-CMI を子宮頸部リンパ球を用いて測定し、臨床効果としてエンドポイントの内服開始後 9 週での組織検査によって病変の退縮を評価した。CIN3 から CIN1 への退縮は CR、CIN3 から CIN2 への退縮は PR、CIN3 のままでは SD、浸潤癌への増悪は PD とした。

(2) 漢方アジュバントによる粘膜免疫誘導の増強効果の検討

E7 発現乳酸菌ワクチンの有効性を高めるために、粘膜免疫誘導能の増強を図る目的でアジュバント併用による相乗効果をマウスモデルで検討した。臨床応用されているアジュバントとして、漢方薬と alpha-GalCer の併用を考えた。

マウス実験により、GLBL101c に加え、漢方薬 (補中益気湯) と alpha-GalCer を併用した経口投与を行った。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。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析に関する共通指針」に則り、東京大学医学部の医学部研究倫理審査委員会の承認を得て、インフォームドコンセントのうえで、文書で同意を得た症例に対して研究を実施する。また、提供試料、個人情報などを厳格に管理・保存する。

C. 研究結果

(1) E7 発現乳酸菌経口薬 (GLBL101c) のヒトでの有効性の検討

1~6 cap/日への dose-escalation の検討では、4cap/日投与例の 3 例が E7-CMI を最も高いレベルで誘導された。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 (SD) し、円錐切除術を必要とした。E7-CMI が最も高いレベルであった 4cap/日投与例では、3 例全例が CIN1-2 (CR1 例、PR2 例) 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、介入せずに経過観察中であるが 2-2.5 年経過しても全症例とも CIN3 の再発を認めていない。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 (PR) 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 (SD)、後療法を必要とした。

これらの結果を効果安全性評価委員会で検討し、至適用量を 4 cap/日と設定し、その用量で更に 7 例の症例を追加した。4 cap/日の全 10 例の有効性を検討したところ、10 例中 7 例がエンドポイントの投与開始後 9 週で、CIN1-2 (CR4 例、PR3 例) に退縮した。さらに 13 週目にさらに 1 例が CIN2 (PR) に退縮した。エンドポイント (9 週) における奏効率 (CR+PR) は 70%となり、投与後 6 か月時点での奏効率は 80%となった。

全 17 例における薬理効果として、子宮頸部リンパ球中の E7-CMI 誘導能を臨床効果別にまとめたところ (CR+PR vs. SD)、SD (n=8) では E7-CMI が中央値 16.1 cells/10⁵cells であったのに対し、CR+PR (n=9) では、33.6 cells/10⁵cells となり、有意に E7-CMI が高くなっていることがわかった (Mann-Whitney 検定, p=0.001)。子宮頸部リンパ球中の E7-CMI が臨床効果を反映するバイオマーカーになりうることが示された。

(2) 漢方アジュバントによる粘膜免疫誘導の増強効果の検討

免疫賦活作用が知られている補中益気湯 (HET) と粘膜アジュバントである大腸菌トキシシン (LTB) をアジュバントとして、GLBL101c とともにマウス経口投与したところ、HET を GLBL101c に併用した場合に脾臓細胞では E7-CMI が上昇すること、GLBL101c に LTB と HET の両方を併用した場合に腸管粘膜リンパ球で高い E7-CMI が誘導されることを昨年度までに示してきた。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すると考えられたが、LTB は毒性の問題からヒトへの投与が難しい。そこで、本年度は、LTB に

代わって、ヒトでの使用経験のある alpha-GalCer を粘膜アジュバントとして用い、同様の検討を行った。マウスに 1mg/head の GLBL101c を経口投与する際に、alpha-GalCer と HET を併用することにより、GLBL101c 単独と比べて約 2 倍の E7-CMI 上昇が観察された (図 1)。粘膜リンパ球における GLBL101c+HET+alpha-GalCer による E7-CMI 誘導能は、GLBL101c+HET+LTB による誘導能よりも高いことがわかった (図 1)。

D. 考察

乳酸菌をベースに HPV16E7 癌蛋白質を発現させた抗 HPV 治療ワクチン (GLBL101c 内服) は、HPV 治療ワクチンとして、癌ワクチンとして新規の抗癌剤になりうる。子宮頸部における免疫学的有効性 (E7-CMI) が高い症例では、CIN3 に対する治療効果が示された。本年度の検討から、この薬理効果と臨床効果の間に相関性あることが示され、CIN3 の病変退縮が GLBL101c によるものである可能性が高い。特に、4cap/日 (1g/日) の 10 例では、投与開始から 6 か月後に CR4 例、PR4 例となり、奏効率 (CR+PR) が 80%となった。海外で行われた非介入観察研究の報告では、CIN3→CIN2 への 6 か月観察後の自然退縮率は 15%と言われている。本臨床試験では、プラセボ群を設定していないが、GLBL101c による退縮率 80%は明らかに薬剤依存的であると考えられた。

癌ワクチン療法では、安全性が高いものの、免疫寛容が問題となる。特に、経口投与では oral tolerance が危惧される。本研究では検討していないが、本治療薬の長期投与、大量投与はかえって E7 に対する特異的免疫寛容を誘導する可能性もある。そこで、E7-CMI 誘導を増強する戦略として、アジュバントを導入することを検討した。漢方薬は実地臨床で日常的に使われている薬であり、かつ多くのアジュバント効果が報告されている。中でも補中益気湯 (HET) は、昨

年度までの検討から最も有望であった。全身性免疫の誘導には HET のみでも相乗効果が示されたが、粘膜免疫誘導には、HET だけでは効果は乏しく、粘膜アジュバントが必要であることがわかった。そこで、今回の検討では、合成セラミドである alpha-GalCer を LTB の代わりに用いた。Alpha-GalCer は、抗原提示分子である CD1d によって提示され、NKT 細胞の特異的リガンドである。この併用によって、NKT 細胞が活性化され、NK 細胞、Th1 細胞、CTL が IFN γ によって活性化される。NKT 細胞系による腸管粘膜免疫が賦活化され、E7 に対する獲得免疫誘導が増強したと考えられた。Alpha-GalCer は、樹状細胞療法の活性化剤としてヒトでの投与経験も報告されていることから、今後のアジュバントとして漢方薬とともに実用化が期待される。

E. 結論

HPVE7 発現型乳酸菌 GLBL101c の経口投与は、粘膜免疫を介した世界初の癌ワクチンである。ヒトの子宮頸部における E7 特異的細胞性免疫誘導を伴い、病理学的有効性が得られていることから、薬理効果に伴った臨床効果と考えられた。GLBL101c の 4 cap/日投与における奏効率 80%は、明らかな臨床効果を考えられた。漢方や粘膜アジュバントの併用によって GLBL101c の投与量を減らすことができる可能性があり低コスト化や臨床的効果の増強が期待される。

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

- 1) Nagasaka K, Seiki T, Yamashita A, Massimi P, Subbaiah VK, Thomas M, Kranjec C, Kawana K, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Kozuma S, Banks L, A novel interaction between hScrib and PP1 γ downregulates ERK signaling and suppresses oncogene-induced cell transformation, *PLoS One*, in-press, 2013
- 2) Todokoro T, Furniss D, Oda K, Kawana K, Narushima M, Mihara M, Kikuchi K, Hara H, Yano T, Koshima I, Effective treatment of pelvic lymphocele by lymphaticovenular anastomosis, *Gynecol Oncol*, E-pub, 2013
- 3) Fujii T, Takatsuka N, Nagata C, Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Kawana K, Mitsuhashi A, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H, Association between carotenoids and outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study, *Int J Clin Oncol*, E-pub, 2013
- 4) Kojima S, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Taguchi A, Nagamatsu T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Oda K, Wada-Hiraike O, Yano T, Taketani Y, Fujii T, Schust DJ, Kozuma S, The prevalence of cervical regulatory T cells in HPV-related cervical intraepithelial neoplasia (CIN) correlates inversely with spontaneous regression of CIN, *Am J Reprod Immunol*, 69: 134-141, 2013
- 5) Kawana K, Adachi K, Kojima S, Kozuma S, Fujii T, Therapeutic human papillomavirus (HPV) vaccines: a novel approach, *Open Virol J*, 6: 264-269, 2012
- 6) Shirane A, Wada-Hiraike O, Tanikawa M, Seiki T, Hiraike H, Miyamoto Y, Sone K, Hirano M, Oishi H, Oda K, Kawana K,

- Nakagawa S, Osuga Y, Fujii T, Yano T, Kozuma S, Taketani Y, Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 424: 604-610, 2012
- 7) Taguchi A, Kawana K, Yokoyama T, Adachi K, Yamashita A, Tomio K, Kojima S, Oda K, Fujii T, Kozuma S; Adjuvant effect of Japanese herbal medicines on the mucosal type 1 immune response to human papillomavirus (HPV) E7 in mice immunized orally with *Lactobacillus*-based therapeutic HPV vaccine in a synergistic manner. *Vaccine*, 30: 5368-5372, 2012
- 8) Ikeda Y, Oda K, Nakagawa S, Murayama-Hosokawa S, Yamamoto S, Ishikawa S, Wang L, Takazawa Y, Maeda D, Wada-Hiraike O, Kawana K, Fukayama M, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Genome-wide single nucleotide polymorphism arrays as a diagnostic tool in patients with synchronous endometrial and ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 22: 725-731, 2012.

2. 学会発表

- 1) Kawana K, Current issues and future for prophylactic and therapeutic HPV vaccines, 第 10 回日本臨床腫瘍学会ワークショップ、7 月、大阪
- 2) 川名 敬、性感染症に対する粘膜免疫を介したワクチン開発、第 16 回日本ワクチン学会、11 月、東京
- 3) Kawana K, HPV-associated cancer and development of a novel anti-cancer HPV therapeutic vaccine; 19th International Charles Heidelberger Symposium, Feb,

Kagoshima

4) 川名 敬、HPV に対する腸管粘膜免疫を介した子宮頸癌治療ワクチンの開発、日本薬学会 133 年会、3 月、横浜

1) 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

名称：粘膜免疫賦活化剤及び HPV 感染症治療用経口医薬組成物

出願番号：特願 2012-138943

出願日：2012/6/20

出願人：国立大学法人東京大学

2. 実用新案登録

なし

3. その他

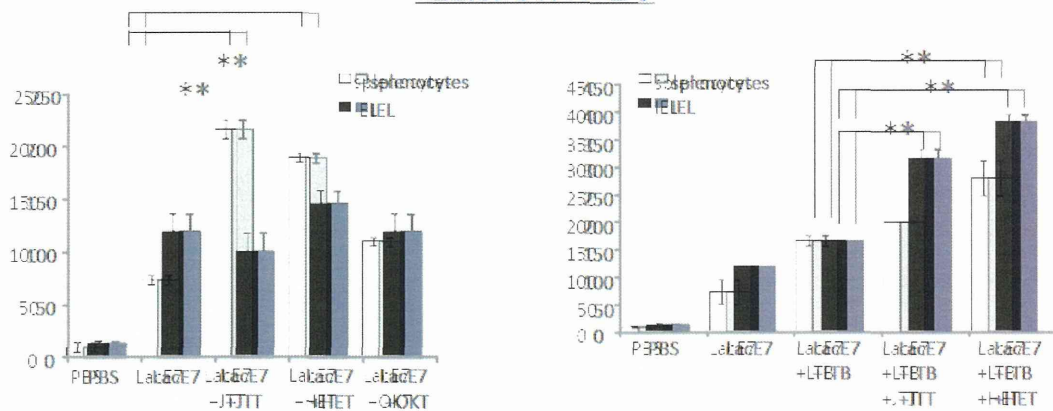
なし

図1. E7発現乳酸菌(GLB11016)と漢方薬+粘膜アジュバントLTB3による細胞性免疫誘導の増強効果 (E7特異的IFN産生細胞数)

脾臓リンパ球(全身免疫)

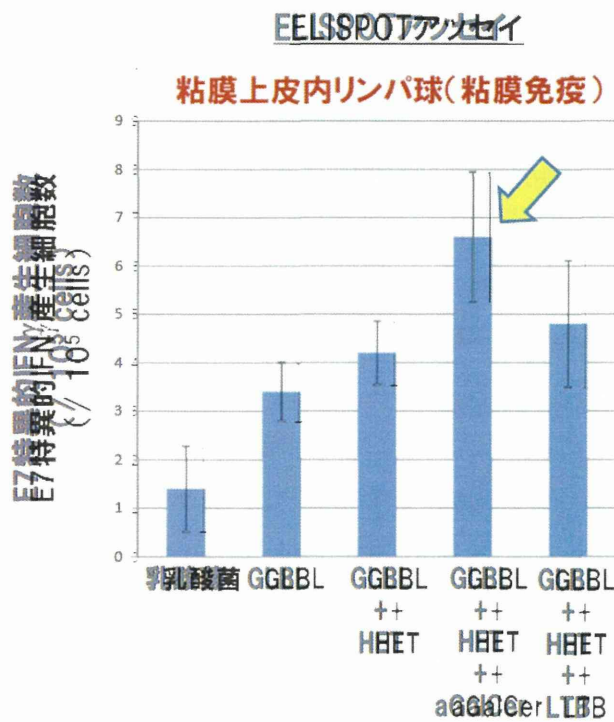
粘膜上皮内リンパ球(IEL)(粘膜免疫)

EEIS800アッセイ



- HETEが免疫誘導能が最も増進された
- LTB3が粘膜免疫誘導の増強に必要であった

図2. E7発現乳酸菌(GGBL101tc)と漢方薬+粘膜アジロバクト併用による相乗効果 (E7特異的FN産生細胞数)



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のが現状である。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ことを目的に研究を遂行している。本事業の3年度にあたる24年度は、これまでに得られた知見をもとに、腸管IgA産生を増強する補中益気湯の生体防御機能について検討した。その結果、IgA抗体産生量と関連したコレラ毒素の経口チャレンジに対する生体防御が認められた。さらに経口ワクチン投与時における漢方薬の全身免疫系への作用を検討したところ、腸管IgA産生を増強する補中益気湯は血清中IgG産生も増強することが判明した。さらに腸管IgA産生をほとんど増強しない十全大補湯においては、補中益気湯よりも強い血清中IgGの産生増強効果があることが判明した。これらの結果は補中益気湯が腸管免疫を介した生体防御システムを活性化できる優れた漢方アジュバントであること、また免疫系を活性化することが知られている漢方薬であっても、その標的となる組織が異なっており、漢方アジュバントとして用いる際にはそれらを考慮した利用が必要であることを示唆する重要な結果であると考えられる。

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 の産生やアレルギー発症を始めとする腸管免疫制御や免疫疾患との関連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。これまでの本事業における2年間の研究から、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でも補中益気湯が腸管 IgA 応答を増強すること、またその作用はワクチン投与時に同時に存在することが重要であることを見いだしている。これらの知見をもとに、本年度は経口ワクチン投与時の全身免疫系への影響について検討した。

B. 研究方法

1. 免疫と漢方薬の投与

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 μ 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。最終免疫の1週間後に血清を回収し、ELISA 法により OVA 特異的抗体反応を測定した。また補中益気湯や十全大補湯の投与は週5回の頻度とし、一回当たりマウスに 40 mg 経口投与した。

2. コレラ毒素に対する生体防御機能測定

経口免疫により誘導された IgA の生体防御機能を検討する目的に1の方法により免疫したマウスに 100 μ g のコレラ毒素を経口投与し、15 時間後の下痢症状を腸管に分泌された水分量を測定することで評価した。

（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

昨年度までの結果を受け、補中益気湯による腸管 IgA 産生増強の生体防御機能を解析した。定法に従い、コレラトキシンで経口免疫したマウスに 100 μ g の毒素チャレンジ実験を行った。通常の方法により免疫群においても非免疫群に比べ強い防御効果が認められたが、経口免疫期間に補中益気湯を経口投与していた群では、さらに優れた防御機能が示される傾向となった（図1）。さらに経口ワクチンの投与により誘導される全身免疫系への作用を解析する目的で、最終免疫の1週間後に血清を回収し、抗原特異的 IgG 抗体産生を ELISA 法で測定した。その結果、上述の腸管 IgA 抗体の産生を増強することが示されていた補中益気湯を投与した群では血清中の IgG 抗体価の増強は2倍程度であったのに対し、腸管での IgA 抗体の産生にはほとんど影響を与えない十全大補湯を投与した群においては、血清中 IgG 抗体価が約4倍に増強されていた（図2）。一方、腸管での IgA 抗体の産生に影響を与えなかった黄耆建中湯は血清中の IgG 抗体の産生にも作用は示さなかった。

D. 考察

本年度に得られた実験結果より、補中益気湯の同時投与による抗原特異的 IgA 抗体産生の増強により、コレラ毒素の経口チャレンジに対するある程度の生体防御増強効果が認められた。ただ今回の実験条件は補中益気湯を投与せず経口免疫だけを行った群においてもある程度強い防御効果が得られる条件であったことから、今後は低抗原量のワクチン接種でも有効なワクチン効果が得られるなど、より補中益気湯の有効性を示す実験データをそろえることで補中益気湯の漢方アジュバントとしての有用性を強く示すことでできるデータが得られるものとする。一方で補中益気湯の投与においては腸管での IgA 抗体の産生は増強され

ると同時に、全身免疫系の指標である IgG 抗体の産生の増強も認められた。以前の検討から腸管 IgA 抗体の産生増強は約 4 倍であったのに対し、IgG 抗体の産生増強効果は 2 倍であったのは、昨年度までの検討から補中益気湯の主要作用部位として考えられる腸管での免疫誘導組織であるパイエル板が主に IgA 産生の誘導を担っていることによるものと考えられる。今回の結果から考察すると補中益気湯に含まれる免疫増強因子の主成分はパイエル板において吸収された後、代謝され不活性型となり血中へ移行する、もしくは血中へ移行しない可能性が考えられる。

一方で腸管 IgA の産生増強においてはほとんど効果を示さなかった十全大補湯は、経口ワクチン投与時における全身免疫系の IgG 抗体の産生を増強することが出来た。このことは十全大補湯由来の免疫活性分子の主成分は、パイエル板ではなく通常の吸収上皮細胞を介して血中へと移行し、そこで効果を発揮したものと考えられる。また本研究班の臨床グループによる注射型ワクチンによるインフルエンザワクチンに対しても IgG 抗体価の増強が認められていることから、十全大補湯による全身系免疫応答の増強はワクチン抗原の投与ルートによらず認められるものと考えられ、特に既存の注射型ワクチンにおける漢方アジュバントとしてすぐに実用可能な候補漢方薬になると考える。

本年度の研究結果より、①補中益気湯は腸管 IgA 抗体の産生増強を誘導するが、全身系 IgG 抗体に対する作用は小さい、②十全大補湯は腸管 IgA 抗体に対する作用は弱い、全身系 IgG 抗体の産生に対しては増強効果を示す、ことが判明し、その作用の違いは各免疫増強成分の体内分布の違いによるものが考えられ、今後はこれらの視点からの解析も重要になると考える。

E. 結論

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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* 2013 May;81(5):1625-34.

2) Sato, S., Kaneto, S., Shibata, N., Takahashi, Y., Okura, H., Yuki, Y., Kunisawa, J., and Kiyono, H. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol*, 2012, (Epub ahead of print)

3) Kurashima, Y., Amiya, T., Nochi, T., Fujisawa, K., Haraguchi, T., Iba, H., Tsutsui, H., Sato, S., Nakajima, S., Iijima, H., Kunisawa, J., and Kiyono, H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nature Comm.* 3:1034, 2012

4) 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., and Artis, D. Innate lymphoid cells

promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science*, 336:1321-1325, 2012

5) Yamamoto, M., Pascual, DW., and Kiyono, H. M cell-targeted mucosal vaccine strategies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 354: 39-52, 2012

6) Fukuyama, Y., Tokuhara, D., Kataoka, K., Gilbert, RS., McGhee, JR., Yuki, Y., Kiyono, H., and Fujihashi, K. Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity. *Expert Rev. Vaccines* 11: 367-379, 2012

7) Goto, Y., and Kiyono, H. Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol Rev.* 245:147-163, 2012

8) Kunisawa, J., Kurashima, Y., and Kiyono, H. Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 64:523-53, 2012

9) Tanaka, S., Saito, Y., Kunisawa, J., Kurashima, Y., Wake, T., Suzuki, N., Shultz, LD., Kiyono, H., and Ishikawa, F. Development of mature and functional human myeloid subsets in HSC engrafted NOD/SCID/IL2r γ KO mice. *J. Immunol.* 188:6145-6155, 2012

10) Sato, S., and Kiyono, H. 2012. The Mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr. Opin. Virol.* 2:225-232.

11) Kumagai, T., and Kiyono, H. Immune regulation and monitoring at the epithelial surface of the intestine. *Vaccine*, 30:6338-6339, 2012

2. 学会発表

1) Kiyono Hiroshi, Molecular Immunology & Immunogenetics Congress 2012, MucoRice:

Rice-based Oral Vaccine Development (Invited Speaker, April 2012, Antalya, Turkey)

2) Kiyono Hiroshi, The 4th Microbial Pathogenesis & Immunity Symposium, Mucosal Innate Immune System for Mutualism, Inflammation and Elimination (Invited Speaker, May 2012, Seoul, Korea)

3) Kiyono Hiroshi, International Meeting of the Microbiological Society of Korea, Mucosal Integration of Mutualism and Elimination for Surface barrier System, (Invited Speaker, May 2012, Seoul, Korea)

4) Kiyono Hiroshi, The 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research "Molecular Understanding for Physiology and Pathology" Mucosal integrated immunological seesaw between mutualization and elimination in the intestine (Invited Speaker, August 2012, Seoul, Korea)

5) Kiyono Hiroshi, STS International Forum 9th Annual Meeting, Mucosal Vaccine for the Control of Infectious Diseases (invited Speaker, October 2012, Kyoto, Japan)

6) Kiyono Hiroshi, The 34th Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine (Invited Speaker, October 2012, Sapporo Japan)

7) Hiroshi Kiyono, A-IMBN Symposium, Spick-and-span in Mucosal Immunity: From Intestinal Homeostasis to Vaccine Development (Invited Speaker, October 2012, Jeju Seoul)

8) Hiroshi Kiyono, The 10th International Congress on Plant Molecular Biology, MucoRice: Fusion of Mucosal immunology

and plant biology led to the development of rice-based oral vaccine (Invited Speaker, October 2012, Jeju Seoul)

9) Hiroshi Kiyono, IEIIS 2012 Homeostatic Inflammation Symposium, Mucosal integrated immunological seesaw between physiological and pathological inflammation (Invited Speaker, October 2012, Tokyo Japan)

10) Hiroshi Kiyono, The 35th General Meeting of Turkish Society of Microbiology, Spick and Span in Intestinal Immunity: From Mucosal Homeostasis to Vaccine Development (Invited speaker, November 2012, Izmir, Turkey)

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

特記事項なし

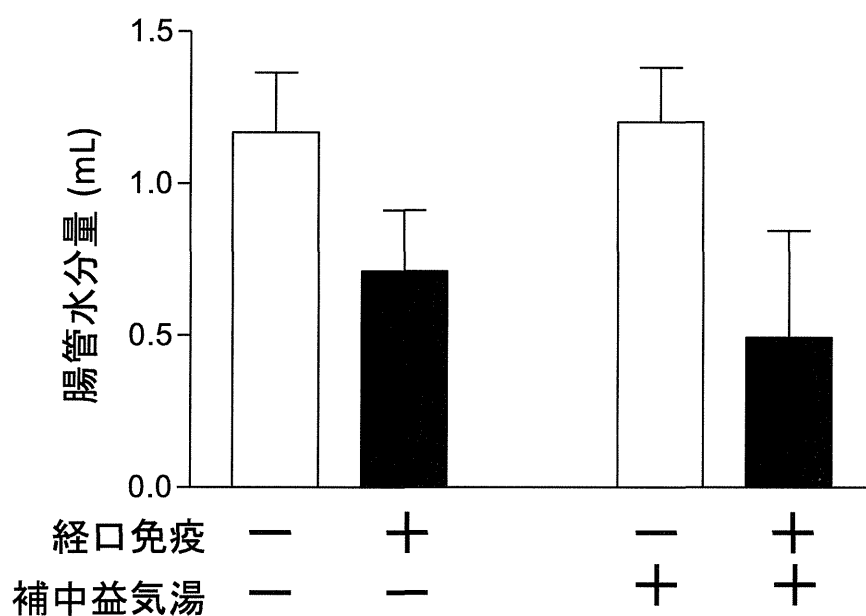


図1 各漢方薬を5日間投与したマウスに週1回の頻度でコレラトキシンを3回経口免疫した。最終免疫の1週間後に100 μ gのコレラトキシンを投与し、15時間後の腸管への水分漏出量を測定した。免疫期間中は週5回の頻度で補中益気湯を経口投与した。

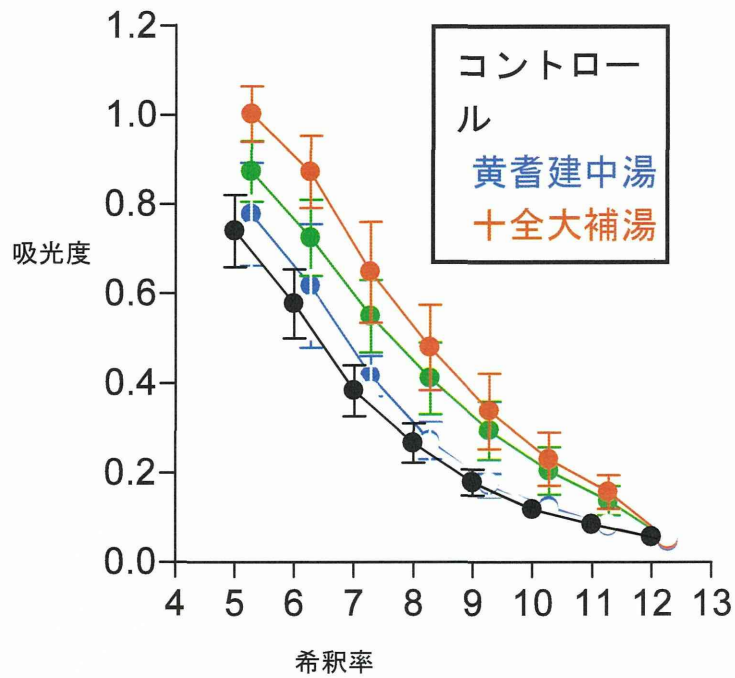


図2 各漢方薬を5日間投与したマウスに週1回の頻度でニワトリ卵白アルブミン(OVA)を粘膜アジュバントであるコレラトキシンと共に3回経口免疫した。最終免疫の1週間後に糞便(a)と血清(b)を回収し、OVA特異的IgA抗体をELISA法にて測定した。その間、週5回の頻度で各漢方薬を経口投与した。

経口ワクチンアジュバント開発に向けた樹状細胞の抗原提示能力を 亢進する生薬の網羅的な探索

研究分担者

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。

昨年度までに研究で、漢方薬の十全大補湯は、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の作用を有し、その抗腫瘍効果の機序としては、ワクチン抗原特異的な樹状細胞の抗原提示能力を亢進によるものであることが明らかとなった。

本研究では、漢方薬の構成生薬から増強効果を有する活性成分を同定し、生薬成分由来の新たなアクチンアジュバントを開発する目的で、富山大学和漢医薬学総合研究が構築した和漢薬標準ライブラリー（合計 112 種類の生薬を用いて、樹状細胞の 2 種類の主要組織適合遺伝子複合体（MHC class I および II）に対する抗原提示能力を亢進させる生薬を探索した。

A. 研究目的

経口ワクチン療法と粘膜免疫

ヒトは、約 80 年という長い人生の中で、毎日絶え間なく外界よりのさまざまな物質にさらされている。皮膚だけではなく、消化管や呼吸器、泌尿器などの粘膜組織を介して外界と接し、外来物質を接触や呼吸などによって無意識のうちに体内に取り込んでいる。絨毛組織を持つ粘膜組織は皮膚の約 200 倍もの面積を持ち、その値はテニスコート 1.5 面分に相当するとされている。また一日 3 度の食事を行い、食物由来の抗原を次々と口にしている。ほとんどの抗原は粘膜を介して侵入してくるため、体の粘膜面は非常に感染に侵されやすい。特に消

化管は、食物抗原に対しては強い免疫応答を起こさないようにしながらも、細菌やウイルスなどによる感染から生体を防御するという特徴のある機能が必要である。多くのウイルスや病原菌の侵入口である粘膜面には効果的な「粘膜免疫」が存在する。消化管、気道、泌尿器などの各粘膜は共通粘膜免疫機構（common mucosal immune system (CMIS)）により関連をもち、ある粘膜組織で誘導された IgA 産生細胞や細胞障害性 T 細胞 (CTL) は他の粘膜組織にもホーミングする。特に、分泌型 IgA 産生細胞は、腸管関連リンパ組織、鼻咽頭関連リンパ組織および気管支関連リンパ組織などの組織で誘導され、腸管粘膜固有層、呼吸

器粘膜固有層、乳腺、涙腺、唾液腺、泌尿生殖器へホーミングする。この際に、抗原により直接暴露された粘膜組織において最も強いホーミングがおこり、強い免疫応答がみられ、隣接する粘膜組織においても免疫応答がみられ、抗原特異的分泌型 IgA の応答や細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導することが知られている。この免疫応答が消化管で行われるシステムを利用し、感染症の予防のためにヒトや動物に抗原を経口投与することによって、生体に免疫防御機構を構築させる製剤が経口ワクチンである。経口ワクチンの抗原は消化管に到達後、大部分が胃で分解を受け、一部の抗原決定部位を保持した抗原はパイエル板の M 細胞においてエンドサイトーシスにより取り込まれ、腸管上皮下に存在するリンパ球や樹状細胞、マクロファージ等に運搬される。経口ワクチンは患者への投与が非常に簡便であり、投与の際の患者への精神的、身体的な負担が少なく、安全な投与が可能である。また、ワクチンを皮下や筋肉内に接種する方法に比較して、特殊な医療技術や、注射針などの高度で廃棄が困難な医療器具を必要としない。このため医師が少ないことに加えて医療技術が発達しておらず、重篤な感染症が現在でも問題になっている発展途上国での普及が期待されている。現在臨床で広く使用されている経口ワクチンとして、経口生ポリオワクチンや経口コレラワクチンがある。ポリオ（急性灰白髄炎）は紀元前 1500 年ころに患者についての最初の記録があって以降、何度も各地で大流行を繰り返し、多数の死者や後遺症として麻痺が残る患者を出した。経口生ポリオワクチンは 1956 年に Sabin により弱毒株を用いて開発され、世界中で用いられている。WHO が「経口ポリオワクチンの高い接種率の維持、5 歳以下のすべての子供に経口ポリオワクチンの投与を行う National immunization Day の実行」など、世界からのポリオ撲滅

を計画した。その結果 1988 年に 125 の国でポリオが存在していたが 2000 年には 24 カ国となり、ポリオ確認患者も 99% 減少した。現在では野生ポリオウイルスは日本を含めた先進国では根絶され、発展途上国においても発症件数は急速かつ大幅に減少し、人類に福音をもたらした。また、コレラに対しても経口ワクチンが開発されており、注射型のものより有効性が高く、有効期間も長いことから期待がもたれている。コレラは未だ世界の広い範囲で蔓延しており、日本国内に住む我々であっても、海外よりコレラ菌が持ち込まれて感染する可能性がある。このため海外渡航の際のコレラへの防衛策を徹底することは重要であり、その際に経口コレラワクチンは大きな役割を果たすことができ、既存の経口ワクチンの普及や、新しい経口ワクチンの開発は公衆衛生対策として優れた手段の一つといえる。

漢方薬

漢方薬は以前より、自然免疫を賦活する作用を持つことが数多く報告されている。その中でも、体力、気力を補い、病気に対する抵抗力を高める「補剤」は特に免疫活性化作用が注目されている。補剤の代表的なものに十全大補湯、補中益気湯、黄耆建中湯があげられる。十全大補湯については本研究室の Ohnishi らが、マウス大腸がん細胞による肝転移モデルにおいて、十全大補湯の経口投与により肝転移が抑制されることを報告し、その効果はマクロファージや T 細胞を介して発現することが明らかとなった。上述のように、漢方薬の自然免疫活性化は広く知られており、実際にインフルエンザ等の感染防御効果が報告されている。一方で、漢方薬の獲得免疫に対する影響に関しては未解明である。最近、我々は漢方薬が、ワクチン抗原特異的な獲得免疫誘導を促進することを見出した。さらに、投与ルートが経口である事を考えると、漢方薬

は粘膜アジュバントとしての応用の可能性が考えられる。したがって本研究では、将来的に臨床の場に迅速に応用できる安全性の高い経口ワクチンのアジュバントを開発する目的で、富山大学和漢医薬学総合研究が構築した和漢薬標準ライブラリー（合計112種類の生薬を用いて、樹状細胞の2種類の主要組織適合遺伝子複合体（MHC class I および II）に対する抗原提示能力を亢進させる生薬を探索した。

B. 研究方法

培養液

RPMI1640 (GIBCO) 培養液、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO USA) にペニシリン (penicillin, 0.1mg/ml、明治製菓 東京)、ストレプトマイシン (streptomycin、0.1mg/ml、明治製菓 東京) を添加し、ミリポアフィルター (0.22 μ m/径、Millipore、USA) にて濾過滅菌後用いた。培養細胞の継代、維持には FCS (終濃度 10%)、2-Mercaptoethanol (2-ME、GIBCO、USA) を加えて完全培地とした。なお、本研究に用いた FCS はすべて 56°C、30 分間の非働化処理を行った。ダルベッコ PBS (-) ニュスイは日水製薬株式会社 (東京) より購入した。

Class I 抗原提示試験

OVA エピトープペプチドと 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、37°C、5%CO₂ 環境下单相培養で *in vitro* にて継代、維持した。OVA を 5mg/ml となるように HBSS (-) に溶解した後、Lipofectin Reagent® (以下 LPF) と 1:2 で混合し、35 分間室温にてインキュベートし、OVA の最終濃度が 50 μ g/ml となるように AIM-V 培養液を加えて使用した。DC2.4 を AIM-V 培養液に懸濁し、96well plate に

1well あたり 4 \times 10⁴cells/50 μ l で播種し、5%CO₂、37°C で培養した。15 分後、漢方薬を 50 μ L ずつ添加し、1 時間半後、上記に準じた方法で調製した OVA-LPF 溶液を 100 μ l ずつ添加した。(最終濃度: 漢方薬または生薬エキス 200 μ g/ml、OVA50 μ g/ml、LPF20 μ g/ml)。5%CO₂、37°C で 24 時間培養し、抗原である OVA を取り込ませた PBS (-) で 1 回洗浄を行い、0.05%グルタルアルデヒド (室温、5 分) 処理により細胞を固定化し、PBS で 2 回洗浄したあと、CD8-OVA1.3 細胞を 4 \times 10⁴cells/200 μ l/well で播種した。5%CO₂、37°C で 24 時間培養後、上清を回収し、IL-2 を ELISA により定量した。

Class II 抗原提示試験

マウス小腸上皮細胞由来 MODE-K 細胞を IFN- γ 100 unit/ml で 3 日間培養後、MODE-K の培地を Mitomycin C 50 μ g/ml 入りの培地に交換し、45 分間培養した。トリプシンで細胞をはがし、96 穴プレートに 5 \times 10⁴/well でまき、2 時間培養後に、培地を除去し、lipofectin と 35 分間前培養した HEL (鶏卵由来リゾチーム蛋白) 入りの DMEM に交換した。5 時間培養後に、RPMI で 3 回洗浄、3A9 細胞を 5 \times 10⁴/well で播種し、24 時間後、プレートを遠心し、上清を回収した。ELISA で上清中の IL-2 を測定し、抗原提示を評価した。詳細は、Class I 抗原提示試験に準拠した。

統計解析

統計的有意性は両側 Student's t-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

112 種類におよぶ多数の生薬の探索結果から、対照群と比べて、樹状細胞の抗原特異的な MHC Class I 提示能を 2 倍以上亢進させる生薬として、オウバク、オウレン、オンジ、カッコン、カンキョウ、キョウカツ、クマザサ、コウボク、シャクヤク、シャゼンシ、ショウマ、シンイ、セキシヤク、ゾクダン、チョレイ、トウキ、ドクカツ、トチュウ、ニクジュヨウ、ビヤクシ、ビヤクジュツ、ブクリョウ、ボウコン、ホコツシ、マオウ、マンケイシ、ヤクチの 27 種類が探索された。特に、オンジ、コウボク、シンイ、セキシヤク、ブクリョウの 5 種類は、樹状細胞の MHC Class I の抗原提示能を極めて亢進させることが明らかとなった。

また、対照群と比べて、樹状細胞の抗原特異的な MHC Class I 提示能を 2 倍以上抑制させる生薬として、ウコン、キキョウ、ケイヒ、サンショウ、ジコッピ、チクセツニンジン、チョウトウコウ、ビワヨウ、ビンロウジの 9 種類であった(図 1)。

一方で、対照群と比べて、樹状細胞の抗原特異的な MHC Class II 提示能を 2 倍以上亢進させる生薬は見いだせず、サンシュユの 1.2 倍であった。MHC Class II 提示能を 2 倍以上抑制させる生薬として、クマザサが検索された。

D. 考察

E. 結論

これまでに、漢方方剤や生薬の免疫に対する影響は、in vitro および in vivo で数多く存在する。しかしながら、これらは抗原に対して非特異的な免疫応答に関する知見がほとんどであり、抗原特異的免疫な応答促進効果を示す生薬を明らかにしたのは、本研究が初めてである。

十全大補湯は、川芎、当帰、地黄、芍薬、蒼朮または白朮、人参、茯苓、甘草、黄耆および桂皮を加えて 10 種類の生薬により

構成された補剤である。樹状細胞の抗原特異的な MHC Class I 提示能を 2 倍以上亢進させる生薬 27 種類の中に、十全大補湯構成 10 生薬のシャクヤク、トウキ、ビヤクジュツ、ブクリョウの 4 種類 (1.7 倍のカンゾウを含めると 5 種類) も含まれていた結果となる。

昨年度までに、我々は、漢方薬の十全大補湯が、樹状細胞のがんモデルワクチン特異的な抗原提示を増強し、さらには、マウス担がんモデルにおけるワクチン効果を増強することを報告してきた。

この増強効果は、十全大補湯が樹状細胞の抗原提示を亢進させる 4-5 種類もの生薬で構成されていた結果であると思われる。

今後は、これら生薬から増強効果を有する活性成分を同定し、生薬成分由来の新たなアクチンアジュバントを開発する予定である。

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

Orawin Prangsaengtong, Jun Yeon Park, Akiko Inujima, Yoshiko Igarashi, Naotoshi Shibahara and Keiichi Koizumi, Enhancement of lymphangiogenesis in vitro via the regulations of HIF-1 α expression and nuclear translocation by deoxyshikonin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013, in press.

2. 学会発表

なし

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

なし

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
T. Kogure	Chaptor 4: Arth ralgia-Neuralgia	Edited by Debasis Bagchi, Hiroyoshi Moriyama and Siba P. Raychaudhuri	Edited by Health and Labour Sciences Research grant Research on the standardization of traditional Japanese medicine promoting integrated medicine	Textbook of Traditional Japanese medicine Part1: Kampo	Nikkei Printing	2012	147-149