

- 6) Kashiyama T, Oda K, Kawana K, Arimoto T, Kanetaka Y, Takazawa Y, Maeda D, Nakagawa S, Yano T, Kozuma S. Low-grade endometrial stromal sarcoma developing in a postmenopausal woman under toremifene treatment for breast cancer. *J Obstet Gynaecol Res.* 39: 424-429, 2013
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) Shoji K, Oda K, Kashiyama T, Ikeda Y, Nakagawa S, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Tanikawa M, Miyasaka A, Koso T, Matsumoto Y, Wada-Hiraike O, Kawana K, Kuramoto H, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Genotype-Dependent Efficacy of a Dual PI3K/mTOR Inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR Inhibitor, RAD001, in Endometrial Carcinomas. *PLoS One*, 7: e37431, 2012
- 11) 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.
- 12) Ochi H, Matsumoto K, Kondo K, Oki A, Furuta R, Hirai Y, Yasugi T, Takatsuka N, Maeda H, Mitsushashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Kanda T, Yoshikawa H; Do neutralizing antibody responses generated by human papillomavirus infections favor a better outcome of low-grade cervical lesions? *J Med Virol*, 84: 1128-1134, 2012
- 13) Matsumoto K, Hirai Y, Furuta R, Takatsuka N, Oki A, Yasugi T, Maeda H, Mitsushashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H; Subsequent risks for cervical precancer and cancer in women with low-grade squamous intraepithelial lesions unconfirmed by colposcopy-directed biopsy: Results from a multicenter, prospective, cohort study, *Int J Clin Oncol*, 17: 233-239, 2012
- 14) Yamamoto N, Mori R, Jacklin P, Osuga Y, Kawana K, Shibuya K, Taketani Y; Introducing HPV vaccine and scaling

- up screening procedures to prevent deaths from cervical cancer in Japan: A cost-effectiveness analysis. *Br J Obstet and Gynecol*, 119: 177-186, 2012
- 15) Inaba K, Arimoto T, Hoya M, Kawana K, Nakagawa S, Kozuma S, Taketani Y; Interstitial pneumonitis induced by pegylated liposomal doxorubicin in a patient with recurrent ovarian cancer. *Med Oncol*, 29: 1255-1257, 2012
- 16) Arimoto T, Nakagawa S, Oda K, Kawana K, Yasugi T, Taketani Y; Second-line chemotherapy with docetaxel and carboplatin in paclitaxel and platinum-pretreated ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer. *Med Oncol*. 29: 1253-1254, 2012
- 17) Kojima S, Kawana K, Fujii T, Yokoyama T, Miura S, Tomio K, Tomio A, Yamashita A, Adachi K, Sato H, Nagamatsu T, Schust DJ, Kozuma S, Taketani Y; Characterization of intraepithelial lymphocytes (IELs) residing in the cervical mucosa of patients with human papillomavirus (HPV)-infected intraepithelial neoplastic lesions. *Am J Reprod Immunol*, 66: 435-443, 2011
- 18) Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Kawana K, Yasugi T, Ikeda Y, Takazawa Y, Kozuma S, Taketani Y. Aromatase inhibitor anastrozole as a second-line hormonal treatment to a recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma: a case report. *Med Oncol*, 28: 771-774, 2011
- 19) Miura S, Kawana K, Schust DJ, Fujii T, Yokoyama T, Iwasawa Y, Nagamatsu T, Adachi K, Tomio A, Tomio K, Kojima S, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *J Virol*, 84: 11614-11623, 2010
- 20) Okuma K, Yamashita H, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Nakagawa K, Advanced age is a significant determinant of poor prognosis in patients treated with surgery plus postoperative radiotherapy for endometrial cancer. *J Obstet Gynecol Res*, 36: 757-763, 2010
- 21) Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, Fujii T, Tomio A, Miura S, Tomio K, Kojima S, Oda K, Sewaki T, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y: Oral immunization with *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocyte against HPV16 E7. *Vaccine*, 28: 2810-2817, 2010
- 22) Yamashita H, Okuma K, Kawana K, Nakagawa S, Oda K, Yano T, Kobayashi S, Wakui R, Ohtomo K, Nakagawa K. Comparison Between Conventional Surgery Plus Postoperative Adjuvant Radiotherapy and Concurrent Chemoradiation for FIGO Stage IIB Cervical Carcinoma: A Retrospective Study. *Am J Clin Oncol*, 33: 583-586, 2010
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; 19<sup>th</sup> 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
- 5) Kawana K, Development of novel HPV vaccines: broad-spectrum prophylactic and therapeutic、第 63 回日本産科婦人科学会、日韓シンポジウム、8 月、大阪
- 6) Kawana K, et al, Novel immunotherapy and the clinical trial for cervical cancer via mucosal immunity to human papillomavirus E7.、第 70 回日本癌学会、10 月、名古屋
- 7) 川名敬、日本エイズ学会日本性感染症学会合同シンポジウム：婦人科領域における性感染症～HPV ワクチンによる予防を含めて、第 24 回日本性感染症学会、12 月、東京
- 8) 川名 敬ら、CIN3 に対する乳酸菌 HPV 治療ワクチン臨床試験例の免疫学的解析、日本産科婦人科学会総会、東京、4 月
- 9) 川名 敬ら、子宮頸癌前癌病変に対する HPV E7 を標的にした癌ワクチン療法の臨床試験における有用性、日本癌治療学会、シンポジウム 20 癌免疫療法、京都、10 月
- 10) 川名 敬ら、子宮頸がん前癌病変に対する乳酸菌を利用した HPV 治療ワクチンの第 I/IIa 相臨床試験症例における有効性の免疫学的解析、日本癌学会、大阪、9 月。

#### H. 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

## 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おり、その多く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。本事業において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、粘膜ワクチンとしてアジュバント作用を有する漢方薬を検索し、その免疫学的有効性を明らかにすることを目的に研究を遂行した。本事業における3年間の研究において免疫調節機能があることが報告されている十全大補湯や補中益気湯、黄耆建中湯の解析を行い、①補中益気湯に経口ワクチンにより誘導される抗原特異的 IgA 抗体の産生増強効果があること、②経口ワクチン接種と同時に補中益気湯を投与した群では、1ヶ月余り抗原特異的 IgA 抗体の産生が増強すること、③経口ワクチン接種後の投与では増強効果がないものの、抗原を再投与しメモリー応答を惹起する際に補中益気湯を投与した群では IgA の産生増強効果が認められること、④経口ワクチンにより誘導される全身免疫系での抗原特異的 IgG 抗体の産生については、補中益気湯よりも十全大補湯のほうに強い増強効果があること、が判明した。これらの結果は、補中益気湯の漢方アジュバントとしての有効性を示すと共に、免疫系を活性化することが知られていた漢方薬であっても、その活性の対象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。本研究ではこれらの研究成果を中心に、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、その免疫学的有効性を明らかにすることを目的に3年間の事業を推進した。

## B. 研究方法

1. 十全大補湯や補中益気湯、黄耆建中湯を週5回の頻度でマウスに経口投与し(40 mg/head/time)、経口的に糞便、血清を回収し、その中に含まれるIgA量をELISA法で測定した。

2. 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、マウスにモデル抗原である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経口投与した。投与は1週間に1回の頻度で行い、免疫期間中も週5回の頻度で漢方薬を投与した。最終免疫の1週間後に糞便、ならびに単核球を回収し、それぞれELISA法とELISPOT法によりOVA特異的抗体反応を測定した。また同マウスの腸管組織におけるIgA抗体産生細胞である形質細胞を検出するために、IgAとCD138をマーカーに用いたフローサイトメトリーを行った。

3. 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2の方法により免疫したマウスに100  $\mu$ 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。

4. メモリー応答を解析する目的で、最終免疫の3ヶ月後に再度、OVAとCTによる経口免疫を行った。補中益気湯の作用機序を解明する目的で、免疫スケジュールの異なるタイミングで補中益気湯を投与する群を用意した。

(倫理面への配慮)

動物実験は東京大学医科学研究所のガイドラインに則り行った。

## C. 研究結果

1. 十全大補湯や補中益気湯、黄耆建中湯を週5回の頻度でマウスに経口投与し、経口的に糞便を回収し、その中に含まれるIgA量をELISA法で測定したところ、補中益気湯を投与した群で、非投与群の1.5倍(2週間投与)、約2倍(4週間投与)のIgA産生の増強が観察された。また十全大補湯を投与した群においても2週間投与において約2倍のIgA産生増強が観察されたが、4週間投与では変化が認められなかった。一方で黄耆建中湯を投与した群においては有意な差は認められなかった(図1)。

2. 経口投与したワクチン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)と粘膜アジュバントであるコレラトキシンを共に経口投与した。投与は1週間に1回の頻度で行い、免疫期間中も週5回の頻度で漢方薬を投与した。最終免疫の1週間後に糞便を回収し、OVA特異的IgAをELISA法にて測定したところ、補中益気湯を投与した群で糞便中のOVA特異的IgAの約4倍の産生増強が観察された(図2a)。さらに同マウスにおいては血清中のOVA特異的IgG産生も2倍に増強していた(図2b)。一方で、糞便中IgAの産生には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のOVA特異的IgG産生の約4倍の増強が認められた(図2b)。

3. これらの結果をもとに、補中益気湯による腸管IgA産生増強の生体防御機能との相関を解析した。上述の免疫マウスに100  $\mu$ gのコレラ毒素の経口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下痢の抑制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3）。

4. 同じく最終免疫の1週間後に腸管組織から単核球を回収し、OVA 特異的抗体産生細胞数を ELISPOT 法にて測定したところ、上記2のELISA法で検出したOVA特異的IgA抗体産生の結果と相関し、補中益気湯を投与した群において腸管においてOVA特異的抗体産生細胞数の増加が認められた（図4a）。またフローサイトメトリーにてCD138陽性IgA形質細胞の頻度を測定したところ、IgA産生形質細胞の全体にしめる割合、ならびに絶対数には変化が認められなかった（図4b、データは示さず）。

5. 経口ワクチンの投与を週一回の頻度で計3回行った後、補中益気湯の投与を行わずに抗体産生をモニタリングしていったところ、徐々に特異的IgA抗体量は減少していったが、補中益気湯による増強効果は約1ヶ月間持続した（図5中央）。最終免疫の2ヶ月後に抗体量を測定したところ、ほぼ検出限界以下となった（データは示さず）。そこで11週目にOVA+CTを再度経口投与してメモリー応答を測定したところ、抗原特異的IgA抗体は著しく増加したが、補中益気湯の増強効果は認められなかった（図5右）。

6. 経口ワクチンの投与を週一回の頻度で計3回行った。この間は補中益気湯の投与を行わず、最終免疫の1週間後より補中益気湯の投与を開始した。約3ヶ月間、補中益気湯を投与し、その間に随時、糞便を回収し、抗原特異的IgAを測定したが、いずれの時も抗体産生の増強は認められなかった（図6中央）。これらのマウスにOVA+CTを再度経口投与してメモリー応答を測定したところ、抗原特異的IgA抗体は著しく増加し、補中益気湯を投与していた群ではさらに増強していた（図6右）。

#### D. 考察

本検討から補中益気湯に腸管免疫の活性化、特に腸管での生体防御因子であるIgAの産生を増強する機能があることが判明した。漢方において「中」とは腹部を指し「補中」は「腹部を補う」という意味で食欲不振や胃弱に用いられている。今回の検討から、免疫学的観点からも補中益気湯が腹部（消化管）の免疫機能を増強させることは興味深い知見であると考ええる。

腸管免疫の活性化を行うことが判明した補中益気湯を投与したマウスにおいては、自然に産生されている腸管IgA量だけではなく、経口ワクチンの投与により誘導される抗原特異的IgA産生においても増強作用を示すことが判明した。自然型IgAは各種病原体に対する抵抗性を強めることが知られていることから、日常的な補中益気湯の投与により粘膜免疫を介した生体防御機能が強まることが期待される。さらに経口ワクチン投与時に補中益気湯を同時服用することで抗原特異的な免疫応答も4倍に増強した。これらの結果と相関しコレラ毒素の経口チャレンジ実験においても有効性を示唆する結果が得られたが、今回の実験条件では補中益気湯を投与していない免疫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補中益気湯を同時服用することで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での検証が必要になると考える。

一方で脾臓等の免疫機能を指標としたこれまでの検討から免疫調整機能があることが示されていた十全大補湯や黄耆建中湯は、腸管免疫に対してはそれほど影響を与えることはなかった。興味深いことに十全大補湯においては全身免疫系の指標の一つである血清中IgG増強作用が、経口ワクチン投与時においても認められた。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十全

大補湯の内服による 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であり、特に既存の注射型ワクチンにおいてはすぐに実用可能なものであると考える。

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

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

また興味深いことに免疫後の補中益気湯の投与群においては、抗体価の上昇が認められなかったものの、これらのマウスに抗原を経口で再投与しメモリー応答を検討したところ、補中益気湯投与群において増強効果が認められた。これらのことから、抗

原の投与時期に補中益気湯を投与しておくことで、免疫直後の IgA 抗体産生だけではなく、メモリー応答も増強できることが示された。

腸管における免疫誘導組織としてパイエル板が代表的組織として知られている。本事業からの結果から推察すると補中益気湯に含まれる免疫増強因子の主成分がパイエル板において吸収された後、IgA 抗体の産生誘導相において作用している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ものの全身免疫系での IgG 抗体増強作用を示した十全大補湯の場合、免疫活性分子の主成分はパイエル板ではなく、通常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可能性が考えられ、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) Tokuhara D, Yuki Y, Nochi T, Kodama T, Mejima M, Kurokawa S, Takahashi Y, Nanno M, Nakanishi U, Takaiwa F, Honda T, Kiyono H., Secretory IgA-mediated protection against V. cholerae and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic Escherichia coli by rice-based vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 8794-9, 2010

2) Nochi T, Yuki Y, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kohda T, Harada N, Kong IG, Sato A, Kataoka N, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Tsukada H, Kozaki S, Akiyoshi K, Kiyono H., Nanogel antigenic protein-delivery system for

- adjuvant-free intranasal vaccines. *Nat Mater* 9:572-8, 2010
- 3) Yuki Y, Nochi T, Harada N, Katakai Y, Shibata H, Mejima M, Kohda T, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Ono F, Kozaki S, Terao K, Tsukada H, Kiyono H., In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine that induces protective immunity against botulism in nonhuman primates. *J Immunol* 185: 5436-43, 2010
- 4) J. Kunisawa, and H. Kiyono, Analysis of intestinal T cell populations and cytokine productions. *Methods in Microbiology* (Edited by Stefan H.E. Kaufmann and Dieter Kabelitz). Academic Press, Oxford, pp. 183-193, 2010
- 5) Terahara K, Nochi T, Yoshida M, Takahashi Y, Goto Y, Hatai H, Kurokawa S, Jang H-M, Kweon M-N, Domino SE, Hiroi T, Yuki Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Kobayashi K, Kiyono H., Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404: 822-828, 2011
- 6) Goto Y, Kiyono H., Epithelial cell microRNAs in gut immunity. *Nat Immunol.* 12:195-197. 2011
- 7) Okada K, Yamasoba T, Kiyono H., Craniofacial mucosal immune system: importance of its unique organogenesis and function in the development of a mucosal vaccine. *Adv. Otorhinolaryngol.* 72: 31-36, 2011
- 8) Kim DY, Sato A, Fukuyama S, Sagara H, Nagatake T, Kong IG, Goda K, Nochi T, Kunisawa J, Sato S, Yokota Y, Lee CH, Kiyono H., The airway antigen sampling system: Respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J. Immunol.* 186: 4253-4262, 2011 Cover page article
- 9) Kumagai, T., and Kiyono, H. Immune regulation and monitoring at the epithelial surface of the intestine. *Vaccine*, 30:6338-6339, 2012
- 10) 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  $\gamma$  KO mice. *J. Immunol.* 188:6145-6155, 2012
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) Yamamoto. M., Pascual, DW., and Kiyono, H. M cell-targeted mucosal vaccine strategies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 354: 39-52, 2012
- 15) 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

16) 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

17) 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)

18) 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

#### H. 学会発表

1) Hiroshi Kiyono Symposium on Reduced uptake of Oral vaccines in the tropics from the perspective of mucosal immunology, "MucoRice and MucoNanogel: New Generation of Mucosal Vaccine" (Invited Lecture, June 2010, Sapporo, Japan)

2) Hiroshi Kiyono The 10th Awaji International Forum on Infection and

Immunity (United states-Japan Cooperative Medical Science Program 23rd Joint Meeting of the AIDS Panels, "Mucosal chaperoning nanogel vaccine for the induction of protective immunity" (lecture, September 2010, Awaji, Japan)

3) Hiroshi Kiyono 4th Vaccine and ISV Annual Global Congress, "Mucosal Nanogel-based chaperon vaccine for the induction of protective immunity" (lecture, October 2010, Vienna, Austria)

4) Hiroshi Kiyono Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals, "New Prospects on the Aerodigestive Immunity for Mucosal Vaccine Development" (Invited lecture, October 2010, Prato, Italy)

5) Hiroshi Kiyono Molecular Farming: Promises and Challenges, "Spick-and-Span in the development of Mucosal Vaccine: MucoRice- and Nanogel-based Vaccine for induction of Protective Immunity" (Invited lecture, January 2011, Seoul, Korea)

6) Kiyono Hiroshi The 28th General Conference of the Japanese Association of Medical Science, Co-Chairman, the Session of "Gastrointestinal Immunity: Symbiosis and Immunity", "Mucosal Vaccine as the New Generation of Vaccine" (Invited Speaker, April 2011, Tokyo, Japan)

7) Kiyono Hiroshi The 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Disease, US-Japan Cooperative Medical Science Program, "MucoRice and Nanoantibody for the Control of Intestinal Viral Infection" (June 2011, Stanford, USA.)

8) Kiyono Hiroshi The 15th International

Congress of Mucosal Immunology, “The Mucosal Gateway System for Antigen-sampling and Homeostatic Niche” (Invited Speaker, July 2011, Paris, France)

9) Kiyono Hiroshi International Union of Microbiological Societies 2011, Current Topics of Human Vaccines Session, “Spick-and-Span for the Development of Transgenic-Rice (MucoRice) based Oral Vaccine” (Invited Speaker, September 2011, Sapporo, Japan)

10) Kiyono Hiroshi The 14th International Rhinologic Society and 30th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose, “Mucosal Chaperoning Vaccines for Upper Respiratory Tract Infections” (Invited Speaker, September 2011, Tokyo, Japan)

11) Kiyono Hiroshi The 38th Annual Meeting of The Japanese Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, “Intestinal Immune System for Microbiological Symbiosis and Vaccine Development” (Plenary Speaker, October 2011, Morioka, Japan)

12) Kiyono Hiroshi 25th Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research, International Symposium on HIV and Mucosal Immunity, “Spick-and-Span for the Development of MucoRice and Nanoantibody for the Control of Viral and Bacterial Infection” (Invited Speaker, December 2011, Tokyo, Japan)

13) Kiyono Hiroshi The 4th Tokyo Host Defenses Research Meeting, Plenary Lecture on “Uniqueness of the Mucosal Immune System for the Development of Oral Vaccine” (February 2012, Tokyo, Japan)

14) Kiyono Hiroshi, Molecular Immunology & Immunogenetics Congress 2012,

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

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

16) 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)

17) 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)

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

19) 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)

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

21) 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)

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

23) 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

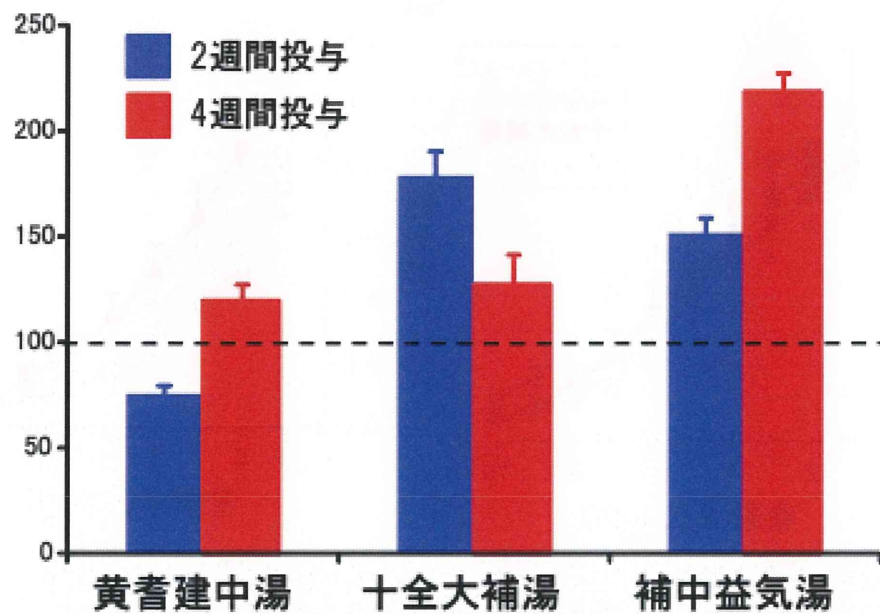


図1 各漢方薬(40 mg/head/time)を週5回の頻度で経口投与した際の糞便中IgA抗体量の相対値(コントロール群を100とする)

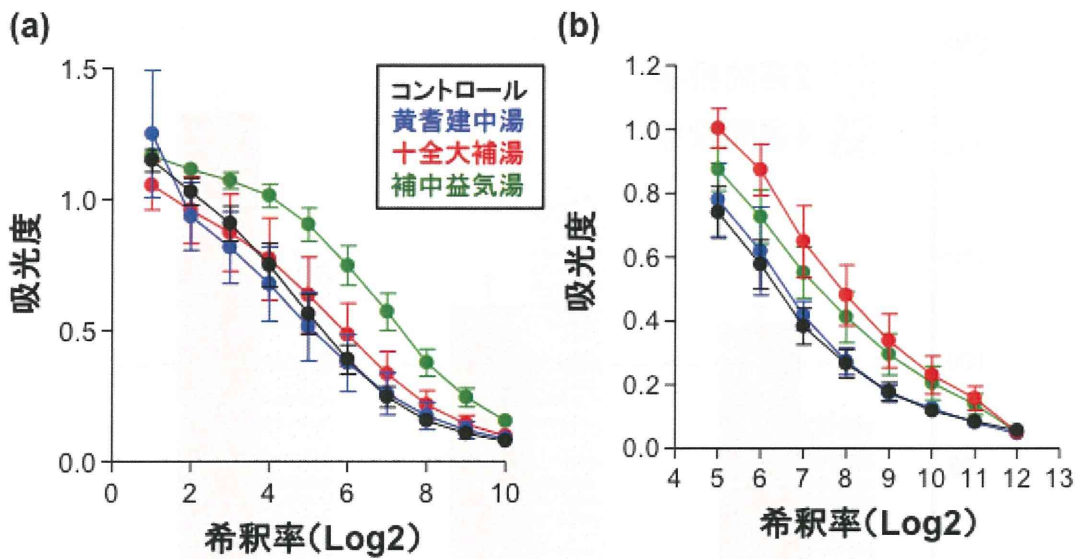


図2 各漢方薬を5日間投与したマウスに週1回の頻度でニワトリ卵白アルブミン(OVA)を粘膜アジュバントであるコレラトキシンと共に3回経口免疫した。最終免疫の1週間後に糞便(a)と血清(b)を回収し、OVA特異的IgA抗体をELISA法にて測定した。その間、週5回の頻度で各漢方薬を経口投与した。

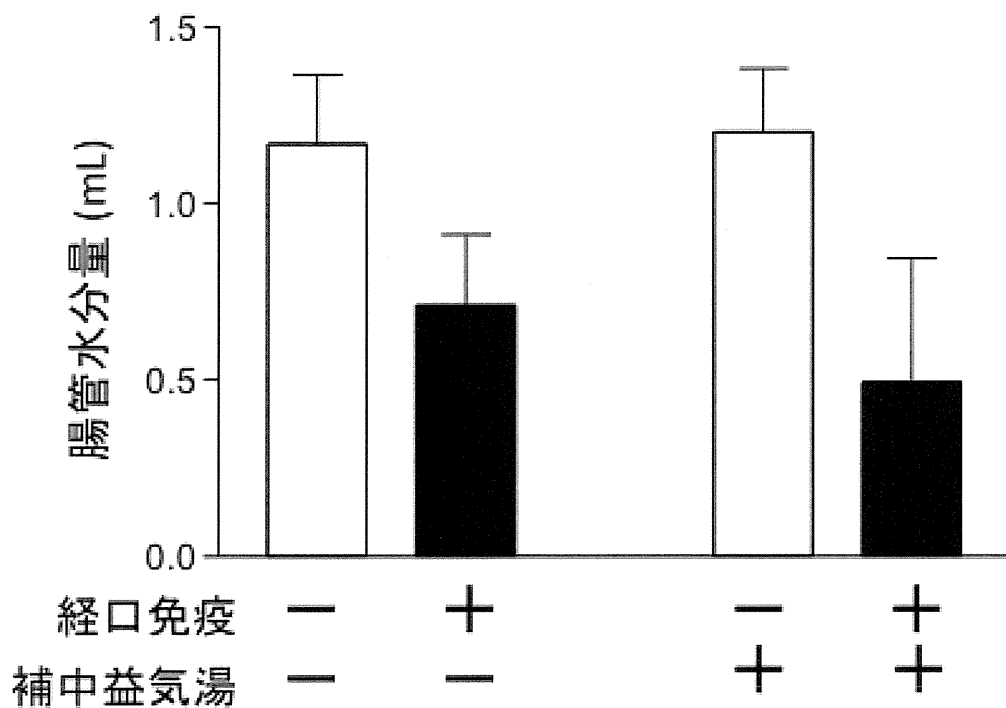


図3 各漢方薬を5日間投与したマウスに週1回の頻度でコレラトキシンを3回経口免疫した。最終免疫の1週間後に100  $\mu$ gのコレラトキシンを投与し、15時間後の腸管への水分漏出量を測定した。免疫期間中は週5回の頻度で補中益気湯を経口投与した。

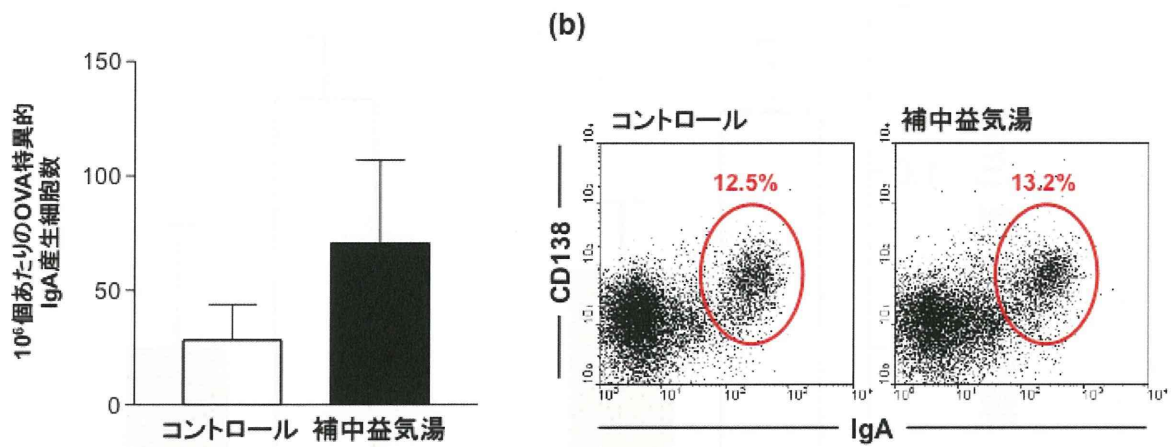
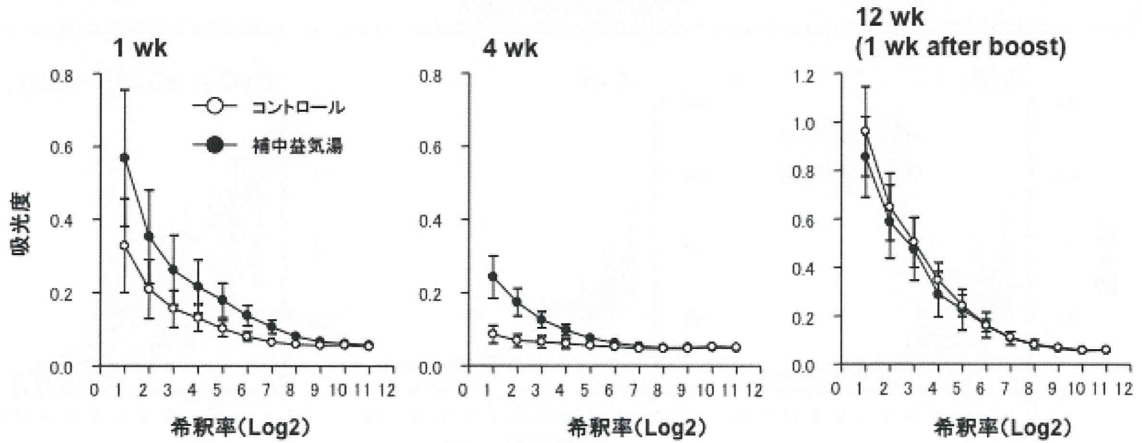
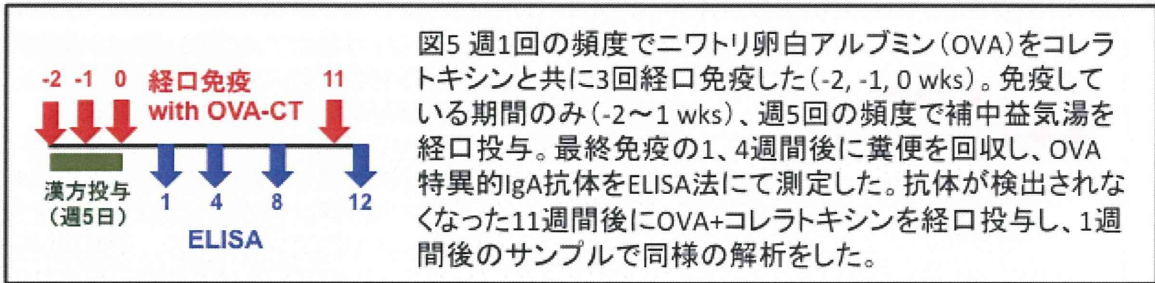


図4 各漢方薬を5日間投与したマウスに週1回の頻度でニワトリ卵白アルブミン (OVA) を粘膜アジュバントであるコレラトキシンと共に3回経口免疫した。免疫の期間、週5回の頻度で補中益気湯を経口投与した。最終免疫の1週間後に小腸より単核球を回収し、ELISPOT法にてOVA特異的IgA産生細胞数測定した(a)。また同細胞を用い、フローサイトメトリー法にてCD138陽性のIgA産生形質細胞の頻度を測定した。





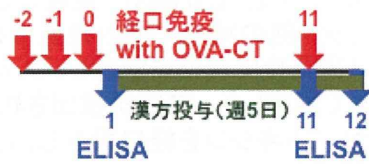
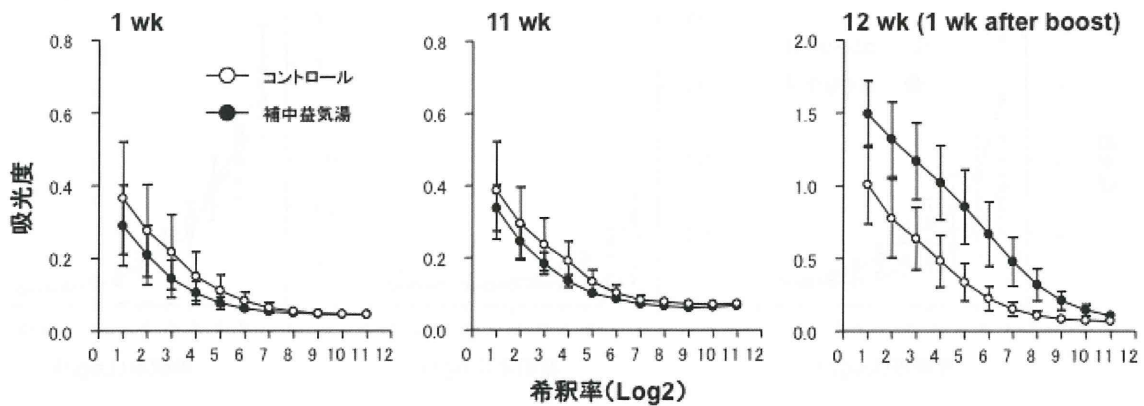


図6 週1回の頻度でニワトリ卵白アルブミン(OVA)を粘膜アジュバントであるコレラ毒素と共に3回経口免疫した(-2, -1, 0 wk)。最終免疫の1週間後(1 wk)に糞便を回収し、OVA特異的IgA抗体をELISA法にて測定した。その後、週5回の頻度で補中益気湯を経口投与開始(3~12 wks)。11週後に糞便を回収し、OVA特異的IgA抗体をELISA法にて測定(wk 11)。同時にOVA-CTで再度経口免疫し、その1週間後に再度糞便を回収し、OVA特異的IgA抗体をELISA法にて測定した(12 wk)。



## 十全大補湯のがんワクチンに対する ワクチンアジュバントとしての応用に関する基礎研究

### 研究分担者

済木 育夫 富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野 教授

小泉桂一 富山大学和漢医薬学総合研究所漢方診断学分野 准教授

### 研究要旨

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

2010-2011 年度までに研究で、漢方薬の十全大補湯が獲得免疫系を惹起することで、がん抗原特異的 T 細胞を誘導する可能性、そして、がんワクチン免疫療法における新たな経口投与可能なアジュバントとしての、漢方薬（漢方アジュバント）の有用性を検討した。その結果、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。

さらに 2012 年度は、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。その結果、十全大補湯構成 10 生薬のなかで、シャクヤク、トウキ、ビャクジュツ、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）が抗原提示能力を亢進させることで、十全大補湯はワクチンアジュバント効果を有することが明らかとなった。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ジュバントを開発する予定である。

### A. 研究目的

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

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

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

一方で、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。

本事業では、上記の十全大補湯とがんモデルワクチンの併用効果を担がんマウスモデルで検討し、その免疫学的な機序を解析した。さらに、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、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

### 1. 細胞株

マウスリンパ腫細胞 EG7 は、EL4 細胞にネオマイシン耐性遺伝子と共に OVA cDNA を導入した transfectant であり、MHC class I 分子上に OVA 由来エピトープペプチド (OVA257-264) を恒常的に提示している。EG7 細胞は、大阪大学大学院薬学研究科中川晋作先生・中西剛先生（現岐阜薬科大学）より恵与され、37℃、5%CO<sub>2</sub> 環境下单層培養で *in vitro* にて継代、維持した。

### 2. 実験動物

日本エスエルシー株式会社（浜松）より、C57BL/6 マウス (H-2Kb; 5 週齢、雌性) を購入し、富山大学和漢医薬学総合研究所病態制御部門病態生化学分野動物実験室にて飼育した。全ての実験において、1 週間の実験前飼育を行い、6 週齢のマウスを実験に用いた。給水と給餌は自由摂取とした。飼育および実験は本学実験動物センターのガイドラインに従って実施した。

### 3. がんモデル抗原 OVA 免疫の方法

本研究では、がんモデル抗原として OVA を用いた。OVA を HBSS (-) (GIBCO, USA) に溶解し作製した OVA 溶液を、等量の FIA によりエマルジョン化 (以後 OVA/FIA と表記する) した。C57BL/6 マウスへの免疫は、OVA/FIA を OVA 量として  $100 \mu\text{g}/\text{mouse}$  で背部皮下に接種することで行った。

### 4. 十全大補湯のワクチンアジュバントとしての評価

C57BL/6 マウスに OVA/FIA を接種し、7 日後にこれらのマウスの側腹部皮内に EG7 細胞 ( $5 \times 10^5 \text{cells}$ ) を接種した。十全大補湯は OVA ワクチンの接種日より実験終了日の 37 日目まで投与を行った。また同日より 4 日ごとに腫瘍径を測定し、下式に従って腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \{(\text{腫瘍の長径 ; mm}) \times (\text{腫瘍の短径 ; mm})^2\} \times 0.530$$

### 5. がんワクチン増強効果解析研究における OVA 免疫の方法

C57BL/6 マウスに OVA/FIA を接種し、7 日後に同所に免疫を行った。十全大補湯は 1 回目の OVA 接種日より開始し、実験終了日までの 21 日間投与を行った。

### 7. 血清採集の方法

ワクチンの接種を行い、2 回目の免疫より 14 日後 (1 回目の免疫より 21 日後) にジエチルエーテル麻酔下において下大静脈より採血を行った。採血の際には 25G のシリンジを用いた。採血したマウス全血を 1.5mL エッペンチューブに移し、30 分間室温に静置した。その後、3000rpm、20min、 $20^\circ\text{C}$  で遠心分離を行い、上清を採集し血清とした。

### 8. ELISA 法

ELISA 用 96-well plate に  $10\text{mg}/\text{mL}$  の OVA (Grade V) 溶液を  $100 \mu\text{L}$  ずつ添加し、 $4^\circ\text{C}$  で一晩反応させた。5 回の洗浄後、ブロッキング溶液を  $150 \mu\text{L}$  ずつ加え室温に 1 時間静置した。血清を希釈し、 $100 \mu\text{L}$  ずつプレートに添加し、室温にて 2 時間静置した。5 回の洗浄後、2 次抗体を添加し、1 時間静置した。洗浄後、TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine) を添加し、発色反応後、 $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2N) を加え、発色反応を停止させた。定量は  $450\text{nm}$  吸光度より算出した。

### 9. 脾臓細胞の回収

OVA ワクチンの接種を行い、2 回目の免疫より 14 日後にジエチルエーテル麻酔科において下大静脈を切除し脱血を行い犠牲死させ、その後、脾臓を摘出した。摘出した脾臓は臓器回収用 PBS にて 2 度の洗浄を行った後、プレパラートのすり合わせにより細胞を分離し 15mL の遠心管に採集した。遠心分離後、Lysis buffer を用いて溶血処理を行った。その後、3 回の洗浄を行い脾臓細胞として実験に用いた。

### 10. ELISpot アッセイ

96well の  $0.45 \mu\text{m}$  ポリビニリデンジフルオライド膜 (Immobilon-P, Millipore) を 70%エタノール処理後、抗マウス IFN- $\gamma$  抗体 (clone ; AN18) を  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  となるように加え  $4^\circ\text{C}$  で一晩反応させた。5 回の洗浄後、10%FCS 入りの RPMI を  $150 \mu\text{L}$  ずつ加え  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  インキュベーターでブロッキング処理を行った。脾臓細胞を  $2 \times 10^5$  個/ $100 \mu\text{L}$  になるように AIM-V に懸濁させ、ブロッキングを行ったプレート上に加えた。OVA (St. Louis, USA) は最終濃度が  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  となるように加え、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  インキュベーターにて 24 時間反応させた。その後、5 回の洗浄を行い、抗マウス IFN- $\gamma$  抗体 (clone ; R4-6A2) を  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  となるよう