

- 21) 石井健 「概論；宿主の生態バリア」 実験医学（増刊）編集 笹川千尋、柳雄介、大野博司、石井健 感染・共生・生態防御システム 2012 30(20): 134-137
- 22) 石井健 「概論；感染・共生・生体防御研究から生まれる新たな疾患予防、治療法のターゲット」 実験医学（増刊）編集 笹川千尋、柳雄介、大野博司、石井健 感染・共生・生態防御システム 2012 30(20): 172-175(13)
- 23) 城内直、石井健 「細胞外核酸の生物学的意義と臨床応用」 実験医学（増刊）編集 笹川千尋、柳雄介、大野博司、石井健 感染・共生・生態防御システム 2012 30(20): 209-216(14)
- 24) 青枝大貴、石井健 「ワクチン開発研究の展開」 免疫学 Update 南山堂 編集 審良 静男他 2012 p190-200
- 25) 青枝大貴、石井健 「自然免疫研究と次世代ワクチン」 医学のあゆみ 2012 243(1):122-128
- 26) 青枝大貴、石井健 「ワクチン」 免疫学コア講義 南山堂 編集 熊ノ郷淳他 2012 p262-271
- 27) 小檜山康司、石井健. 自然免疫メカニズムを利用するワクチンアジュバント開発. THE LUNG 2012 20(4):54-61.
- 28) 鉄谷耕平、石井健. アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政. ファームテクジャパン 2012,28(4): 45-52.
- 29) 鉄谷耕平、石井健. ワクチンアジュバントの現状と展望. レギュラトリーサイエンス学会誌 2012, 2(2): 149-158.

2. 学会発表

- 1) Kobiyama K, Ishii KJ. K3-SPG is a novel nanoparticulate CpG oligodeoxynucleotide complex with robust interferon induction and adjuvanticity. 2013 日本免疫学会総会・学術集会. 幕張. 2013.12.11-13.
- 2) Kobiyama K, Ishii KJ. A Dectin-1-assisted APC-targeting TLR9-agonist as an adjuvant. 15th International Congress of Immunology. MILAN, ITALY. Aug 22-27, 2013.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

発明人：石井健 小檜山康司 青枝大貴

発明の名称：免疫賦活活性を有するオリゴヌクレオチド含有複合体及びその用途

出願番号：特願 2013-1962062. 実用新案登録

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

結核ワクチンにおける粘膜免疫応答の解析

研究分担者	國澤 純	(独) 医薬基盤研究所	プロジェクトリーダー
研究協力者	長竹貴広	同上	研究員
	鈴木英彦	同上	プロジェクト研究員

研究要旨

本研究では、ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) に結核菌抗原 Ag85B を発現させた粘膜免疫誘導型新規結核ワクチン (rhPIV2-Ag85 ワクチン) の開発に関し、粘膜免疫学的な観点から免疫誘導メカニズムの解析と安全性の評価を行う。本事業の初年度である平成 25 年度は上記の目標達成に向け、rhPIV2-Ag85 ワクチンの基盤技術の導入を行った。さらに rhPIV2-Ag85 ワクチンにおける免疫学的解析に向けた基礎検討を行い、粘膜ワクチンの標的組織として着目している粘膜リンパ組織の解析から、代表的粘膜リンパ組織であるパイエル板依存的に誘導される高 IgA 産生細胞サブセットを同定した。またワクチン特異的な免疫応答の誘導において中核的な役割を担っている樹状細胞の解析から、パイエル板の樹状細胞は抗原提示細胞としてだけでなく、パイエル板の組織形成においても必要不可欠であることを明らかにした。

A. 研究目的

多くの病原微生物の侵入門戸となっている粘膜組織には、多種多様な免疫担当細胞から構成される粘膜免疫システムが構築されており、生体防御の中核的役割を担っている。これら粘膜免疫システムの有する生体防御機能を応用した粘膜ワクチンが実用されるようになってきた。粘膜ワクチンは、抗原を”吸わせる、飲ませる“といった方法により接種するワクチンで、すでに日本国内においても、ロタウイルスに対する 2 種類のワクチンが経口ワクチンとして上市されている。全身免疫系にのみ免疫応答を誘導できる従来の注射によるワクチン接種とは異なり、粘膜ワクチンは粘膜免疫と全身系免疫の両部位に免疫応答を誘導できることから、粘膜組織を初発感染部位とする病原体に対する優れたワクチンとして絶大な効果を発揮すると期待されている。

上述のように徐々に実用化のステージに入ってきている粘膜ワクチンであるが、呼吸器疾患である結核においても粘膜ワクチンの開発が期待

されている。結核は世界の 3 大感染症の一つであり、日本国内でも年間 2 万人以上の方が罹患している。すでに使用されている結核ワクチンとして BCG が存在するが、肺結核の主要な感染患者である成人に対して明確な予防効果は認められていないことから、新規ワクチン、特に肺結核を防御するための粘膜ワクチンの開発が必要急務とされている。

本事業においては、これまでに研究代表者である保富がマウスを用いた解析から経鼻結核ワクチンとしての有効性を示している結核菌抗原 Ag85B 発現ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) (rhPIV2-Ag85 ワクチン) について、研究分担者の國澤がこれまでに蓄積してきた粘膜免疫に関する知的・技術基盤を用い、rhPIV2-Ag85 ワクチンの粘膜免疫誘導メカニズムの解明と安全性の評価を行う

B. 研究方法

B-1. パイエル板欠損マウスの作製と腸管組織からの単核球回収・フローサイトメトリー解析

パイエル板欠損マウスは胎生 14 日目に抗 IL-7 受容体抗体を 500 μ g 腹腔内投与することで作製した。得られたパイエル板欠損マウス、ならびにコントロール抗体を投与したマウスの腸管から以下の方法で単核球を回収し、フローサイトメトリー法にて解析を行った。さらに Cell sorter により分取した 1.5×10^5 個の CD11b 陽性 IgA 陽性細胞もしくは CD11b 陰性 IgA 陽性細胞を SCID マウスに腹腔内移入した。移入 1 週間後に糞便を回収し、糞便中の IgA 量を ELISA 法で測定した。

単核球の回収のために、小腸組織からパイエル板を除去した後、2 cm の小片に切断し、0.5 mL の EDTA および 2% FCS を含む RPMI1640 培地中で 20 分間攪拌することで、上皮細胞と上皮内リンパ球を除去した。残った組織は、0.5 mg/mL のコラゲナーゼと 2% FCS を含む RPMI1640 培地中で 20 分間、3 回攪拌することで細胞懸濁液を得た。単核球分画はパーコール密度勾配遠心法にて回収した。

フローサイトメトリーにおける解析、もしくは Cell sorting による各細胞サブセットの分取のための染色においては、Fc block にて非特異的結合を阻害した回収細胞を、蛍光標識した抗 IgA 抗体と抗 CD11b 抗体と反応させた。生細胞と死細胞は Viaprobe により識別した。得られたサンプルをフローサイトメトリーにて測定、もしくは FACS Aria にて精製・分取した。

B-2. 樹状細胞欠損マウスにおけるパイエル板組織形成の解析

樹状細胞のパンマーカーである CD11c のプロモーター下流にジフテリア毒素受容体 (DTR) を発現するマウス (CD11c-DTR マウス、Jackson laboratory より購入) にジフテリア毒素を 500 ng 投与した。16 時間後にパイエル板を回収し、凍結組織切片を作製した。作製した切片を抗 CD4 抗体と抗 CD11c 抗体、抗 B220 抗体、peanut agglutinin

にて染色した後、T 細胞と樹状細胞、B 細胞、胚中心の分布を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。またその他の細胞については DAPI による各染色により、細胞の存在を確認した。

C. 研究結果

C-1. パイエル板依存的な高 IgA 抗体産生細胞の同定

粘膜ワクチンにおいて免疫誘導部位として機能すると予想される粘膜リンパ組織に依存的な免疫応答を解析する目的で、代表的な腸管リンパ組織であるパイエル板を欠損したマウスを作製し、粘膜ワクチンにおける主要エフェクター分子である IgA 抗体を産生する細胞を解析した。その結果、腸管固有層に存在する IgA 陽性細胞は CD11b の発現の有無により二つのサブセットに分類されること、そのうち CD11b 陽性 IgA 細胞がパイエル板欠損マウスで減少することを見いだした (図 1)。細胞の形態を解析したところ、CD11b の発現に関わらず同一であり、どちらのサブセットも抗体を産生する形質細胞としての表現型を示した (図 2)。一方で、それぞれを単離し、T 細胞や B 細胞を持たない SCID マウスに移入した後の IgA 抗体産生を比較したところ、CD11b 陽性細胞を移入した場合、CD11b 陰性細胞に比べ糞便中の IgA 産生量が多いことが判明した (図 3)。すなわち、腸管固有層に存在する CD11b 陽性 IgA 細胞はパイエル板依存的に誘導され、かつ CD11b 陰性 IgA 細胞に比べ IgA 抗体の産生能力が高いと考えられる。

C-2. パイエル板組織形成における樹状細胞の機能解析

粘膜ワクチンに対する免疫応答の誘導において、樹状細胞は抗原提示細胞として機能する。そのため樹状細胞は粘膜リンパ組織に多く存在し、抗原提示を介した免疫応答を誘導するが、これまでの研究からリンパ組織そのものの形成においても重要な働きをすることが示唆されている。そこで粘膜リンパ組織の形成における樹状細胞の役割を検討する目的で、ジフテリア毒素の投与に

より樹状細胞を選択的に除去できる CD11c-DTR マウスを用い、樹状細胞除去時におけるパイエル板の組織形成を解析した。ジフテリア毒素を投与した 16 時間後にパイエル板を観察したところ、樹状細胞の消失が認められた (図 4)。さらにその他の免疫担当細胞について解析したところ、CD4 陽性 T 細胞が減少し、同細胞が存在する濾胞間 T 細胞領域の縮小が認められた (図 4)。一方でパイエル板の濾胞領域の大部分を占める B 細胞や濾胞に観察される胚中心にはほとんど影響が認められなかった (図 4)。マクロ共焦点レーザー顕微鏡を用いた組織レベルでの解析から、樹状細胞が除去された状態でも T 細胞のパイエル板への移入には影響がない一方で、T 細胞がパイエル板濾胞間領域に移入した後の滞留のためには樹状細胞が必要であることが判明した (データは示さず)。

D. 考察

本研究においては、粘膜ワクチンにおいて免疫誘導の中核となる粘膜リンパ組織、さらにはその中で司令塔的機能を示す樹状細胞に焦点を当てた研究を遂行した。人為的にパイエル板を欠損させたマウスを用いた解析から、パイエル板依存的に誘導される CD11b 陽性 IgA 細胞を同定した。これまで粘膜組織において IgA 抗体を産生する細胞は単一の集団と考えられていた。実際に形態を観察すると CD11b の発現に関わらず IgA 陽性細胞は抗体を産生する形質細胞としての均一な形態を示していた。一方で、IgA 抗体の産生能力を比較したところ、CD11b 陽性 IgA 細胞は CD11b 陰性 IgA 細胞に比べ IgA 産生能が高いことが判明した。IgA 抗体は粘膜組織において生体外にあたる管腔に産生される唯一の抗原特異的分子であることから、粘膜ワクチンの開発において最も重要な生体防御分子であると言える。すなわち本研究から得られた知見は、粘膜リンパ組織が単なる免疫誘導の場としてだけではなく、抗体産生細胞の質的コントロールも行っていることを初めて提示したものであり、rhPIV2-Ag85 ワクチンの開発における新たな免疫誘導標的の存在を示したものと

える。

さらに粘膜ワクチンの免疫誘導過程において重要な抗原提示細胞である樹状細胞を人為的に欠損させた解析から、樹状細胞を欠損させたマウスのパイエル板においては T 細胞領域の形成不全が起こることが判明した。つまり樹状細胞は T 細胞への抗原提示を介した免疫誘導だけではなく、免疫誘導の場である粘膜リンパ組織の形成においても重要であることを示す結果である。これまでの検討から、樹状細胞は呼吸器リンパ組織の一つである誘導性気道リンパ組織の形成においても重要であることが報告されていることから rhPIV2-Ag85 ワクチンの誘導過程においても鍵となる反応と予想される。今後は IgA 高産生細胞も含めた呼吸器系リンパ組織との関連を明らかにすると共に、今年度に導入を完了した rhPIV2-Ag85 ワクチンへと発展的に応用していくことで、rhPIV2-Ag85 ワクチンによる免疫誘導メカニズムと安全性評価に関する新たな情報を提供できると期待される。

E. 結論

rhPIV2-Ag85 ワクチンシステムの導入とセットアップを終えた。また rhPIV2-Ag85 による免疫誘導システムの解明と安全性評価に向けた基礎検討を行い、粘膜リンパ組織依存的 IgA 高産生サブセットと樹状細胞を介した粘膜リンパ組織形成機構の存在を明らかにした。

F. 健康危険情報

総括、研究報告書にまとめて記入

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Kurashima, T. Amiya, K. Fujisawa, N. Shibata, Y. Suzuki, Y. Kogure, E. Hashimoto, A. Otsuka, K. Kabashima, S. Sato, T. Sato, M. Kubo, S. Akira, K. Miyake, J. Kunisawa*, and H. Kiyono*, Skin- barrier homeostasis through

- Cyp26b1-mediated inhibition of ATP-dependent mast cell activation by fibroblasts, **Immunity** (2014, accepted)
2. T. Nagatake, and J. Kunisawa*, Unique functions of mucosa-associated lymphoid tissues as targets of mucosal vaccines, **Curr Topics Pharmacol**, 2014 (in press)
 3. J. Kunisawa*, M. Gohda, E. Hashimoto, I. Ishikawa, M. Higuchi, Y. Suzuki, Y. Goto, C. Panea, I. I. Ivanov, R. Sumiya, L. Aayam, T. Wake, S. Tajiri, Y. Kurashima, S. Shikata, S. Akira, K. Takeda, and H. Kiyono, Microbe-dependent CD11b⁺ IgA⁺ plasma cells in early-phase robust intestinal IgA responses in mice, **Nat Commun** 4: 1772, 2013
 4. T. Obata, N. Shibata, Y. Goto, I. Ishikawa, S. Sato, J. Kunisawa*, and H. Kiyono*, Critical role of dendritic cells in T-cell retention in the interfollicular region of Peyer's patches, **J Immunol** 191: 942-8, 2013
 5. A. Lamichhane, H. Kiyono, and J. Kunisawa*, Nutritional components regulate the gut immune system and its association with intestinal immune disease development, **J Gastroenterol Hepatol** 28: 18-24, 2013
 6. J. Kunisawa* and H. Kiyono, Vitamin-mediated regulation of intestinal immunity. **Front in Immunol** 4:189, 2013
 7. M. Kamioka, H. Kiyono, and J. Kunisawa*, Herbal medicine-initiated approaches for the elucidation of immunological network in the intestine, **J Tradition Med** 30, 56-61, 2013
 8. J. Kunisawa* and H. Kiyono, Immune regulation and surveillance at the epithelial surface of the intestine. **Drug Discov Today** 18:87-92, 2013
 9. S. Kishino, M. Takeuchia, S.B. Park, A. Hirata, N. Kitamura, J. Kunisawa, H. Kiyono, R. Iwamoto, Y. Isobe, M. Arita, H. Arai, K. Ueda, J. Shima, S. Takahashi, K. Yokozeki, S. Shimizu, and J. Ogawa, Novel fatty acid metabolism in gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition, **Proc Natl Acad Sci USA** 110: 17808-17813, 2013
 10. S. Sato, S. Kaneto, N. Shibata, Y. Takahashi, H. Okura, Y. Yuki, J. Kunisawa, and H. Kiyono, Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells, **Mucosal Immunol** 6: 838-46, 2013
 11. Y. Fukuyama, D. Tokuhara, S. Sekine, K. Aso, K. Kataoka, J. Davydova, M. Yamamoto, R.S. Gilbert, Y. Tokuhara, K. Fujihashi, J. Kunisawa, Y. Yuki, H. Kiyono, J.R. McGhee, K. Fujihashi, Potential roles of CCR5⁺ CCR6⁺ dendritic cells induced by nasal ovalbumin plus Flt3 ligand expressing adenovirus for mucosal IgA responses, **PLoS One** 8: e60453, 2013
 12. I. Kong, A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Okada, S. Sato, D. Briles, J. Kunisawa, Y. Inoue, M. Yamamoto, K. Akiyoshi, and H. Kiyono, Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by pneumococcus, **Infection and Immunity** 81: 1625-34, 2013
2. 学会発表
 1. Jun Kunisawa, A diet-originated novel lipid mediator for the control of intestinal allergy, Annual International Workshop on Mucosal Immunology and Vaccine for Young Investigators, Shizuoka, Japan (26th April, 2013)
 2. 國澤純 脂質ネットワークを介した腸管免疫の制御と創薬への展開 千里ライフセミナーメタボローム研究の疾患への応用を目指して大阪(千里ライフサイエンスセミナー)(2013年5月26日)(招待講演)

3. 國澤純 Scientific integration から考える次世代ワクチン開発と創薬への展開 第 28 回ヘルペスウイルス研究会 淡路 (淡路夢舞台国際会議場) (2013 年 5 月 31 日) (招待講演)
4. 國澤純 東洋医学を起点とした粘膜免疫の基礎的解明と病態制御への展開 日本医科大学医学会 第 23 回公開シンポジウム 東京 (日本医科大学) (2013 年 6 月 15 日) (招待講演)
5. 國澤純 腸内環境ネットワークによる免疫制御とワクチン開発、創薬への展開 第 12 回 四国免疫フォーラム 香川 (徳島文理大学香川校) (2013 年 6 月 22 日) (招待講演)
6. 國澤純 腸内フローラと腸管免疫による疾患制御 第 13 回日本抗加齢医学会総会 横浜 (パシフィコ横浜) (2013 年 6 月 28 日) (招待講演)
7. 國澤純 腸内環境を介した免疫制御と炎症性腸疾患 第 34 回日本炎症・再生医学会 京都 (国立京都国際会館) (2013 年 7 月 2 日) (招待講演)
8. 國澤純 粘膜免疫のユニーク性に立脚した次世代型粘膜ワクチンの開発 第 29 回日本 DDS 学会学術集会 京都 (京都テルサ) (2013 年 7 月 5 日) (ランチョンセミナー)
9. 國澤純 腸管免疫ネットワークを標的とした創薬研究の最前線 第 5 回生命科学阿波おどりシンポジウム 徳島 (徳島大学) (2013 年 8 月 16 日) (招待講演)
10. Jun Kunisawa, Eri Hashimoto, Izumi Ishikawa, Yuji Suzuki, Risa Sumiya, Shiori Shikata, Hiroshi Kiyono, Microbe-dependent proliferating IgA-producing plasma cells mediate early-phase robust intestinal IgA responses in mice, 15th International Congress of Immunology, Milan, Italy (26th August, 2013)
11. Yosuke Kurashima, Takeaki Amiya, Kumiko Fujisawa, Shintaro Sato, Yuta Kogure, Kensuke Miyake, Jun Kunisawa, and Hiroshi Kiyono, Suppressive roles of skin fibroblasts in extracellular ATP-mediated mast cell activation, 15th International Congress of Immunology, Milan, Italy (26th August, 2013)
12. 國澤純 腸管リンパ組織内共生細菌を介した免疫制御と疾患 第 25 回微生物シンポジウム 静岡 (静岡県立大学) (2013 年 9 月 6 日) (招待講演)
13. 國澤純、腸内環境を介した免疫制御とワクチン開発、創薬の展開 日本大学獣医医学科学センターセミナー 藤沢 (日本大学) (2013 年 10 月 8 日) (招待講演)
14. 國澤純、腸内環境因子を介した免疫制御と疾患、創薬・ワクチンへの展開 第 9 回霊長類医学フォーラム つくば (文部科学省研究交流センター) (2013 年 11 月 14 日) (招待講演)
15. Jun Kunisawa Functional diversity of IgA-producing plasma cells in the intestine The 3rd CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology (POSTECH, Pohang, Korea, 3rd December, 2013) (invited)
16. Jun Kunisawa Peyer's patch-mediated and microbe-dependent intestinal IgA responses for the development of oral vaccine Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2013 (Makuhari Messe, Chiba, 12 December, 2013) (invited)
17. Ichiro Takahashi et al, Molecular and cellular analysis of symbiotic co-habitation with environmental bacteria in the colonic resident macrophages Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2013 (Makuhari Messe, Chiba, 11-13 December, 2013)
18. Takahiro Nagatake et al, Eye immune responses initiated by uniquely developing tear duct-associated lymphoid tissue Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2013 (Makuhari Messe, Chiba, 12 December, 2013)
19. Kasuki Kishida et al, PILR α negatively regulates DSS induced experimental colitis

Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2013 (Makuhari Messe, Chiba, 12 December, 2013)

20. Hidehiko Suzuki et al, C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin efficiently delivers the conjugated antigen to nasopharynx-associated lymphoid tissue and can be applied to nasal vaccine against pneumococcal infection Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2013 (Makuhari Messe, Chiba, 12 December, 2013)

21. Sachiko Akashi-Takamura et al, S1P1 is required for B cell receptor- and Toll-like receptor-mediated B cell activations Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2013 (Makuhari Messe, Chiba, 12 December, 2013)

22. Yosuke Kurashima et al, Retinoic acid metabolism regulates ATP/P2X7-mediated mast cell activation for the maintenance of skin homeostasis Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2013 (Makuhari Messe, Chiba, 12 December, 2013)

23. Mariko Kamioka et al, Fucosylation of Paneth cells is regulated by two forms of $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase, Fut1 and Fut2 Annual Meeting of the Japanese Society for

Immunology 2013 (Makuhari Messe, Chiba, 12 December, 2013)

24. 鈴木英彦、近藤昌夫、國澤純, Claudin-4 指向性分子を用いた肺炎球菌に対する粘膜ワクチンの開発、第7回次世代アジュバント研究会 大阪 (千里ライフサイエンスセンター) (2014年1月21日)

25. Hidehiko Suzuki, Masuo Kondoh, and Jun Kunisawa, The development of mucosal vaccine against *Streptococcus pneumoniae* using claudin-4 binder 第3回感染症若手フォーラム 長崎 (やすらぎ伊王島) (2014年2月13日-15日)

26. 國澤 純、腸管リンパ組織内共生による免疫制御と疾患 第87回日本細菌学会総会 東京(タワーホール船堀) (2013年3月26日) (招待講演)

27. Akira Hidaka, Rui Tada, Yuki Yamakita, Syoko Muto, Noriko Takayama, Emi Honjo, Naoko Iwase, Jun Kunisawa, Hiroshi Kiyono, and Yukihiro Aramaki A cationic liposome composed of DOTAP in combination with DC-cholesterol acts as a potent mucosal adjuvant in mice 第87回日本細菌学会総会 東京(タワーホール船堀) (2014年3月26日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

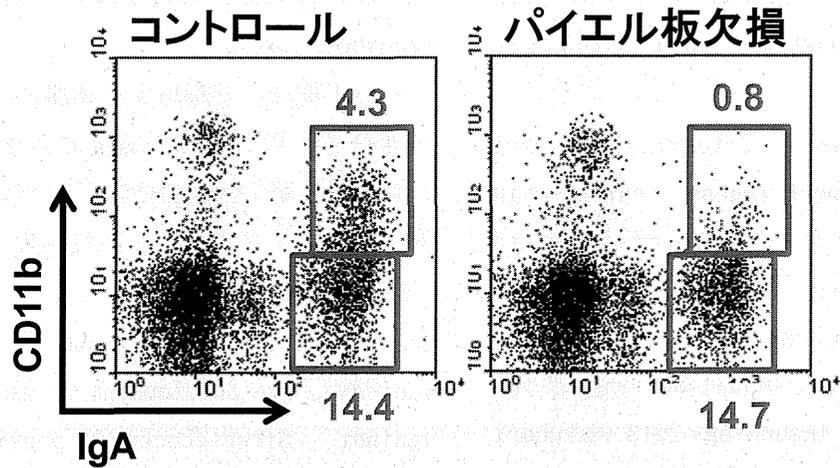


図1 胎生14.5日目に抗IL-7受容体阻害抗体を投与することでパイエル板を欠損させたマウス(右)とコントロール抗体を投与したマウス(左)の腸管から単核球を回収し、CD11bとIgAでFACS解析したところ、パイエル板欠損マウスでCD11b陽性IgA細胞の減少が認められた。

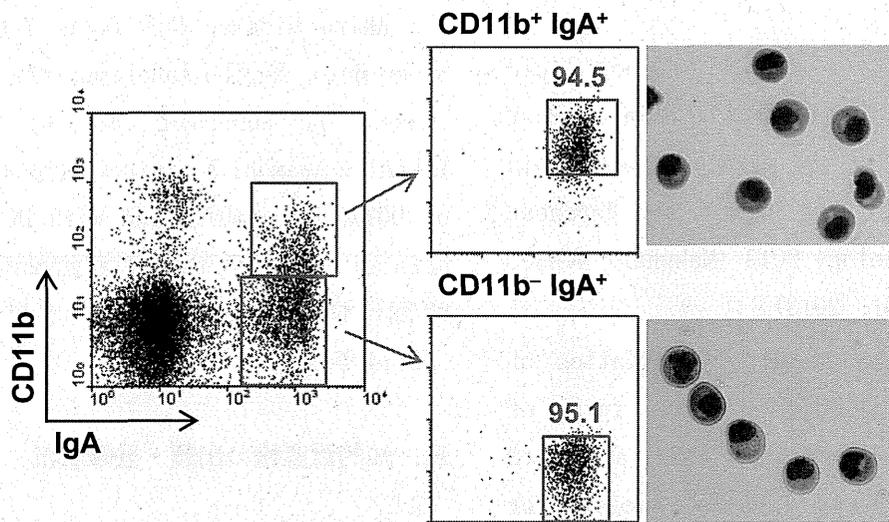


図2 Cell sortingにより腸管固有層より分離・精製した各分画の形態を観察したところ、CD11b陽性IgA細胞、CD11b陰性IgA細胞共に抗体産生細胞である形質細胞としての形態を示す細胞が均一に観察された。

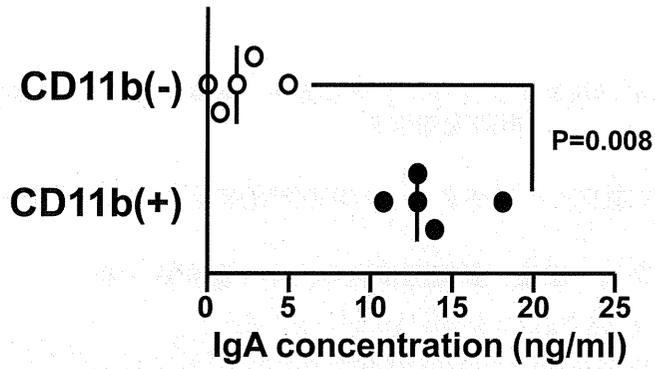


図3 Cell sortingにより腸管固有層より分離・精製したCD11b陽性IgA細胞とCD11b陰性IgA細胞をそれぞれSCIDマウスに移入した。移入1週間後に糞便中のIgA量をELISA法にて定量した。

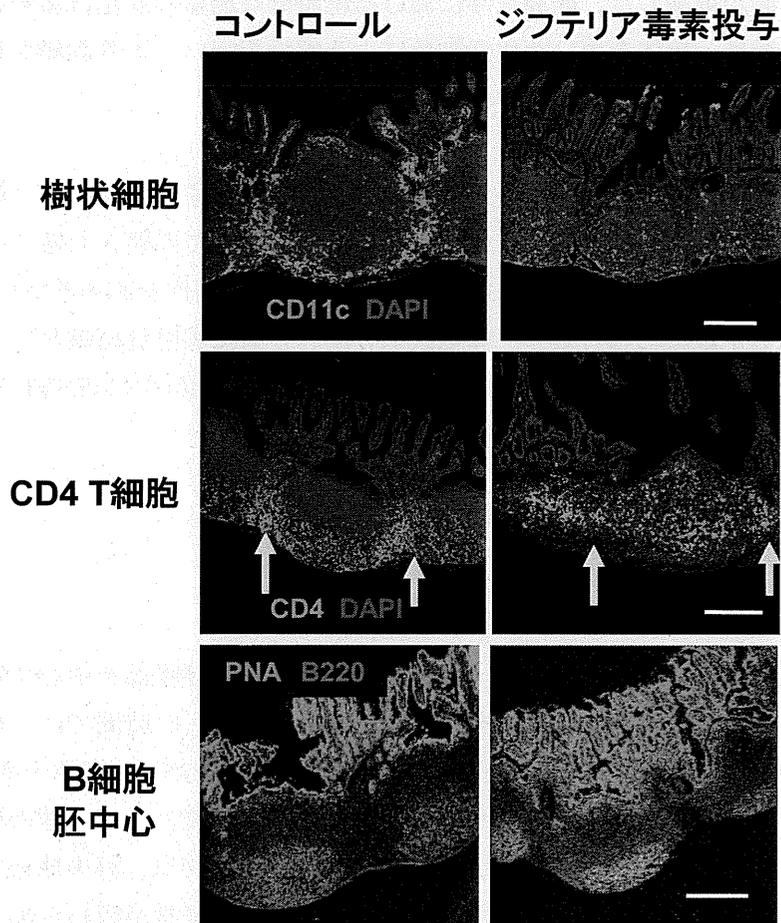


図4 CD11c-DTRにジフテリア毒素を投与するとパイエル板におけるCD11c陽性樹状細胞の消失が認められる(上段)。同一のパイエル板においては、CD4陽性T細胞の濾胞間領域(矢印)からの消失が認められるが(中段)、B220陽性B細胞やPNA陽性胚中心の形成にはほとんど変化がない(下段)。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

パラインフルエンザ 2 型ウイルスベクターの病理学的安全性に関する研究

研究分担者 伊奈田 宏康 鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究要旨

野生型パラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) をカニクイザルに経鼻投与し、投与後の 6 時間、12 時間、24 時間の時間経過とともに病理学的検討を行った。投与後 6 時間では粘膜上皮の反応がみられた。12 時間では好中球の浸潤が明らかとなった。24 時間ではさらに好中球主体の炎症細胞浸潤が増加した。経鼻投与における継時的な組織の変化は報告されていることが少ない。今後は、抗体を用いた免疫染色による解析を行い、より詳細な変化を継時的に検討し、hPIV2 ワクチンの安全性の検討を行う。

A. 研究目的

新規結核ワクチンでベクターとして用いられるパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) の安全性の検討が最終的な目的である。今まで、ワクチンの経鼻投与による鼻粘膜の変化を検討した報告はほとんどみられない。従って、本ワクチンの安全性を検討するに当たり、継時的な鼻粘膜の変化を検討する必要がある。そのため、最初に野生型 hPIV2 をカニクイザルに経鼻投与し、投与後の鼻粘膜の変化を継時的に病理学的に検討した。

B. 研究方法

カニクイザル (6~11 歳、2.8~3.5kg) を麻酔投与下、仰臥位で固定後、鼻腔より hPIV2 (1×10^7 TCID₅₀) を滴下し、10 分間保持した。投与後 0 時間 (コントロール) 6 時間、12 時間、24 時間後に解剖を行い、ホルマリン固定の後、HE 染色にて鼻粘膜の病理的解析を行った。鼻腔は骨で囲まれているため、通常の病理検体では脱灰処理をして標本作製する。しかし、抗体を使用し

た免疫染色による鼻粘膜の解析には、脱灰処理はその評価において問題となる。従って、病理学的検討の汎用性を高めるために、鼻粘膜を骨膜とともに周囲骨組織から丁寧に剥離し、脱灰処理を行わずに HE 染色を行った。

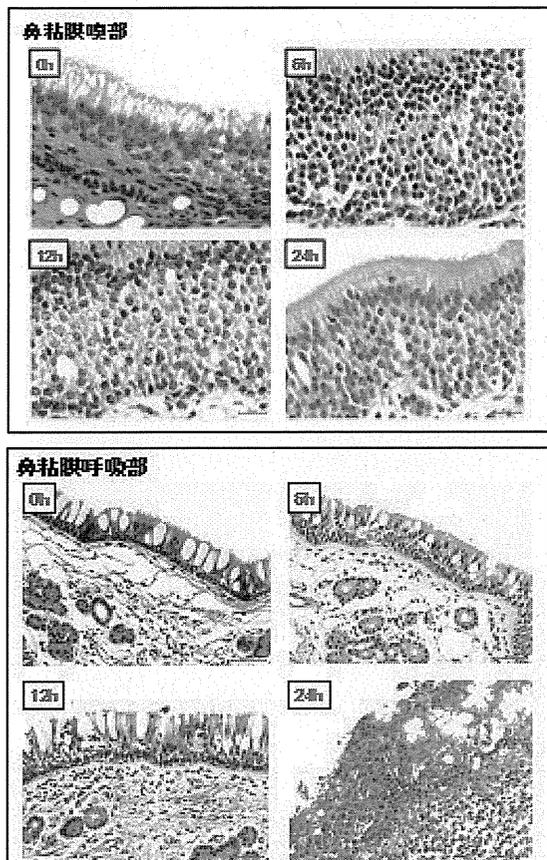
(倫理面への配慮)

特に問題ない。

C. 研究結果

鼻粘膜の呼吸部および嗅部を中心に解析を行った。経鼻投与後、6 時間では、鼻粘膜 (嗅部) では粘膜細胞の反応 (肥厚・増殖) が認められた。12 時間では、好中球の浸潤が認められた。24 時間では、好中球を主体とする高度の炎症細胞浸潤が認められた。コントロールでは、HE 染色にて鼻粘膜を構成する嗅細胞、支持細胞、基底細胞の区別は可能と思われるが、投与による粘膜の反応と思われる細胞増殖がどの細胞であるかは、明瞭な判別は困難であった。また、粘膜上皮層と基底膜の境界は明瞭で、炎症細

胞浸潤などによる明らかな粘膜の損傷（びらんや潰瘍形成など）はみられなかった。



D. 考察

hPIV2 の経鼻投与による鼻粘膜の反応(粘膜の肥厚・増殖)は、投与後 6 時間で生じていた。このことから、1) 反応した細胞の同定、2) 反応が開始する時間を検討など、免疫染色法やより短時間での観察が必要と考えられた。好中球を主体とする急性炎症のピークは 24 時間であった。一方で、炎症細胞浸潤により粘膜基底膜の損傷が生じていない可能性が考えられた。また、HE 染色による解析では、嗅細胞の損傷や神経線維の走行の乱れなどは確認できない。このため、ワクチン投与における安全性の検討には、特殊染色や免疫染色により、嗅細胞

や神経線維の走行の乱れなどの検討や、急性炎症の収束時期における解析、更に、もし嗅細胞や神経線維に影響が生じる場合は正常に修復されるか、検討する必要があると考えられた。

E. 結論

hPIV2 の経鼻投与による鼻粘膜の継時的な変化を、脱灰処理を行うことなく観察することができた。安全性の評価のために、より詳細な検討を行う必要があり、そのため免疫組織や特殊染色による解析、より短時間の解析と長期的な解析が必要である。現在、特殊染色、免疫染色の条件設定の検討が進行中であり、上記で示した解析や各種組換え hPIV2 ワクチンの安全性の検討を行う。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe K, Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K, Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine*. 2014 Jan 29. pii: S0264-410X(14)00087-5.

2. Kitagawa H, Kawano M, Yamanaka K, Kakeda M, Tsuda K, Inada H, Yoneda M, Sakaguchi T, Nigi A, Nishimura K, Komada H, Tsurudome M, Yasutomi Y, Nosaka T, Mizutani H. Intranasally administered antigen 85B gene vaccine in

non-replicating human Parainfluenza type 2 virus vector ameliorates mouse atopic dermatitis. PLoS One. 2013 Jul 3;8(7):e66614.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

遺伝子導入細胞の作製と最適なウイルス増殖法の開発

研究分担者 松尾 和浩 日本 BCG 研究所 研究第一部長

研究要旨 ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) の V または HN 遺伝子欠損型ウイルスベクター生産用のパッケージング細胞の樹立を行った。Vero 細胞株を用い、まず細胞のクローニングを行って、増殖能が高い Vero 細胞クローンを樹立した。この細胞にヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) の V または HN 遺伝子発現ベクターをそれぞれ導入し、トランスフェクタントでの V または HN 遺伝子の発現を確認した。それぞれの遺伝子導入 Vero 細胞のクローニングを行い、PCR 法により全長の V または HN 遺伝子を保持しているクローンを選択した。V 蛋白質の発現をウエスタンブロット法で確認し、7 個の V 蛋白質発現 Vero 細胞クローンが得られた。HN についても蛋白質の発現を確認中である。樹立した細胞での導入遺伝子の安定性、組換えウイルス生産量の評価、高生産法の検討を行っていく予定である。

A. 研究目的

結核は世界三大感染症の一つである。わが国では年間 2 万人以上が発症しており、主体は社会の中核をなす 20 歳代以降の世代である。治療法は確立されているが、長期の入院治療が必要とされ、社会復帰まで約 6 ヶ月を要する。さらに、薬剤耐性結核菌では治療に数年を要し、かつ致死率も高い。対策にはワクチンが必須となるが、現行の BCG を用いた結核予防では、限界がある。特に成人の肺結核を予防できるワクチンの開発が、強く望まれている。

ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) は、ヒトの呼吸器粘膜に感染性を示す病原性の低いウイルスである。結核菌抗原 Ag85B を組み込んだ hPIV2 を用い、新たな粘膜免疫誘導型ワクチンが作製されている。本ワクチンはマウスへの経鼻投与において BCG 以上に肺結核を抑制することを認め、また通常の遺伝子組換えウイルスワクチンと異なり、頻回接種によるベクターウイルスに対する反応もなく、強い免疫反応を誘導することがカニクイザルによって示されている。本研究において、hPIV2 ベクターを用いる技術を応用し、結核感染をコントロールできる新規ワクチンを開発することは、厚生労働行政上多大な利点を与え

る。本分担研究は、そのためのワクチン製造法開発に寄与するものである。

ウイルスベクターの安全性を担保するために、複製に必須な遺伝子を欠損させた非複製型ウイルスがよく使用されるが、その生産には欠損させた遺伝子を発現するパッケージング細胞が必要になる。本研究では、hPIV2 の V および HN 遺伝子を安定に発現する Vero 細胞株を樹立し、組換えウイルスを高生産できる系の開発を目的とした。

B. 研究方法

(1) 細胞および培地

ワクチン産生用に使用する細胞は、医薬基盤研究所より分与された Vero 細胞を用いた。培地は、無血清培地 OptiPRO SFM (Life technologies)、細胞の回収は、細胞剥離剤 TrypLE Express (Life technologies) を用いた。培養培地には抗生物質としてペニシリン・ストレプトマイシンを添加し、37°C、5%CO₂ 下で培養した。細胞凍結保存液として、セルバンカー-2 (血清不含、日本全薬工業(株)) を用いて-80°Cにて凍結保存した。

(2) 細胞のクローニング

細胞の濃度を測定し、直径60mm ディッシュ1枚当たり、細胞数が50、100、200 個になるように培地で希釈して培養する。1-2週間後、顕微鏡下で細胞のコロニーが確認できたら、他のコロニーと十分に離れたコロニーを選び、コロニーを囲むようにディッシュの底にマジックでマークする。培地を除き、PBS (-) で洗浄した後、クローニングシリンダー（日本ジェネティクス社製）及び細胞剥離剤を用いて各コロニーを回収した後、3代継代し、凍結細胞ストックを作製する。凍結細胞を作製する際に、一部細胞を取り分け、12 穴プレートに5.0 x 10e3/well で細胞を播き、培養開始6-12日目に細胞を回収した後、細胞数を測定することで増殖能を評価した。凍結細胞から培養する場合は、凍結細胞を融解し、培養培地10mL を入れた遠心チューブに凍結細胞液を加えて、遠心分離し、上清を除く。4mL の培養培地を加えて懸濁し、60mmディッシュに播種して培養を行った。また、細胞濃度およびviability の測定は、調製した細胞とトリパンブルー試薬（和光純薬）を混ぜ、血球計算盤にて生細胞、死細胞各々をカウントすることにより行った。

(3) 発現ベクターの構築

hPIV2のV及びHN遺伝子は、制限酵素サイト *XhoI* を付加したコドン最適化したDNAを合成し、pUC19 の *SmaI* サイトに挿入したもの (pUC-Vopt, pUC-HNopt) を合成委託した(ジーンデザイン社)。また、抗原遺伝子発現用ベクターpCAGGSは、医薬基盤研より分与されたものを使用し、薬剤選択ベクターpTK-neoは、Novagen 社から購入した。まず、pUC ベクターからVopt 及びHNopt 遺伝子を制限酵素 *XhoI* で切断して切り出し、pCAGGS ベクターの *XhoI* サイトに挿入して pCAGGS-Vopt 及び pCAGGS-HNopt を構築した (Vopt 及びHNopt 発現ベクター)。次に、薬剤選択ベクターpTK-neoの *BbsI* 及び *Bsu36I* サイトを切断してneomycin 耐性遺伝子カセット部分を回収した後、末端平滑化し、pCAGGS-VoptおよびpCAGGS-HNopt ベクターの末端平滑化 *SaII* サイトに挿入し、

VoptおよびHNopt 発現組換え細胞株樹立用ベクターpCXneo-VおよびpCXneo-HNを構築した (図1)。

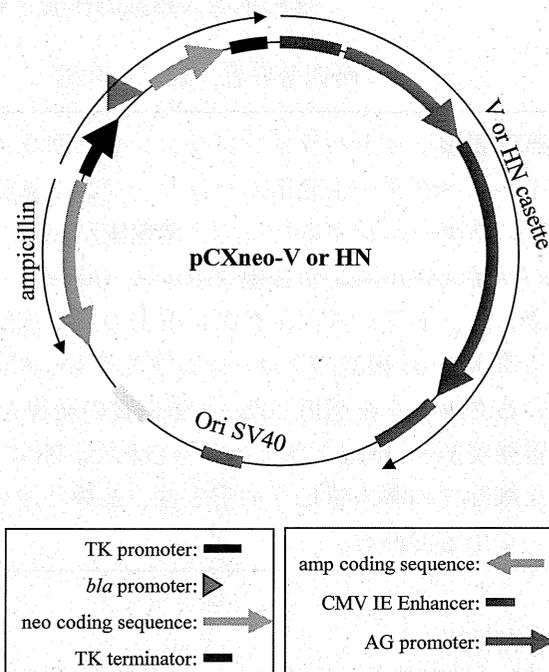


図1 VおよびHN発現ベクターの構造

(4) トランスフェクション

6 穴プレートに2.0-5.0 x 10e5/well の濃度でVero 細胞をまき、24 時間後に各種抗原発現ベクター2.0 μ g と X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche社製) 5.0 μ l の割合で200 μ l のOptiPRO SFM中で混合し、室温で15 分間反応させた溶液を各wellに加えてトランスフェクトした。

(5) 組換えVero 細胞のクローニング

トランスフェクション24 時間後の細胞を回収し、10cm ディッシュに継代する。継代24時間後に培地を捨て、G418 (0.75 mg/ml) 含有OptiPRO SFM に交換する。3-4日毎に培地交換を行い、2-3週間後、顕微鏡で細胞コロニーが確認できたら、他のコロニーと十分に離れたコロニーを選び、コロニーを囲むようにディッシュの底にマジックでマークする。培地を除き、PBS (-) で洗浄した後、クローニングシリンダー及び細胞剥離剤を用いて各コロニーを回収した後、24 穴プレート、6 穴プレート及び10cm

ディッシュと継代していくことで段階的にスケールアップを行い、最終的に凍結細胞ストックを作製した。

(6) Nested PCRによる導入遺伝子の検出

hPIV2のV及びHN遺伝子をネオマイシン耐性下で導入したVero細胞由来ゲノムDNAは、細胞継代時に微量をサンプリングしてInstaGene DNA精製マトリックス (Bio-Rad社製) を用いて抽出した。これを1st PCRのDNAテンプレートとする。VまたはHN遺伝子検出に用いたPCRプライマーセットは以下の配列を持つ。

1st sense primer:

TCGGCTTCTGGCGTGTGACC

1st antisense primer:

GCCCTCCCATATGTCCTTCCGAG

Nested sense primer:

CTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTC

Nested antisense primer:

GGCAGAGGGAAAAAGATCTCAGTGGT

1st PCRは、94°C/5分、[94°C/30秒、68°C/30秒、72°C/1分 (V) 又は2分 (HN)] x 35サイクル、72°C/5分で行った。Nested PCRは、1st PCR産物の1/50量をテンプレートにして94°C/5分、[94°C/30秒、66°C/30秒、72°C/1分 (V) 又は2分 (HN)] x 35サイクル、72°C/5分で行った。

また、ネオマイシン耐性遺伝子も同様にNested PCRにて確認を行った。プライマーセットは以下の通りである。

1st sense primer:

GTATCCGCTCATGAGACAATCG

1st antisense primer:

AAGAACTCCAGCATGAGATCCC

Nested sense primer:

CAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCG

Nested antisense primer:

ACGATTCCGAAGCCCAACCTT

1st PCRは、94°C/5分、[94°C/30秒、66°C/30秒、72°C/1分] x 35サイクル、72°C/5分で行った。Nested PCRは、1st PCR産物の1/50量をテンプレートにして94°C/5分、[94°C/30秒、66°C/30秒、72°C/1分] x 35サイクル、72°C/5分で行っ

た。

(7) ウエスタンブロット解析

組換えVero細胞を回収し、PBSに懸濁させた後、超音波処理して細胞破砕液を作製する。15,000 rpmで5分間遠心後、上清を回収する。総蛋白質量20 µgになるようにNuPAGE sample reducing agent (10 x)、LDS sample buffer (4x) (Invitrogen社製)と混合し、90°Cで10分間加熱処理してサンプルとした。電気泳動後のゲル中の蛋白質をPVDF膜に35Vで1時間転写した。PVDF膜を1% BSA/TBS溶液中、室温で30分間ブロッキングし、VおよびHN検出用モノクローナル抗体 (三重大より分与) と室温で1-2時間反応させる。TBSで洗浄後、0.2% NP-40/TBSで3回洗浄、最後にTBSで洗浄し、AP標識抗マウスIgG (サザンバイオテック社製) と室温で1時間反応させる。上記と同様に洗浄後、NBT/BCIPタブレット (Roche社製) を10 mlの水で溶かした溶液と反応させて発色を行った。

(7) 倫理面への配慮

遺伝子組換え体の第二種使用における拡散防止措置については、日本BCG研究所の機関承認済みである。

C. 研究結果

(1) Vero細胞のクローニング

効率よくワクチン製造を行うために、最も増殖能の良い細胞を選別する目的で、まずVero細胞のクローニングを行った。上記の方法で各細胞コロニーを分離・培養して凍結細胞ストックを作製した。その際に、一部細胞を取り分けて細胞増殖試験を行い、各コロニーの増殖能を比較したところ、コロニー間で数倍から十倍程度の差があった。#1が最もよく増殖しており、#6が最も悪く、#1の1/10程度であった(図2)。また顕微鏡下で細胞数を測定する際に、細胞の形状が均一でない株の存在が確認された。

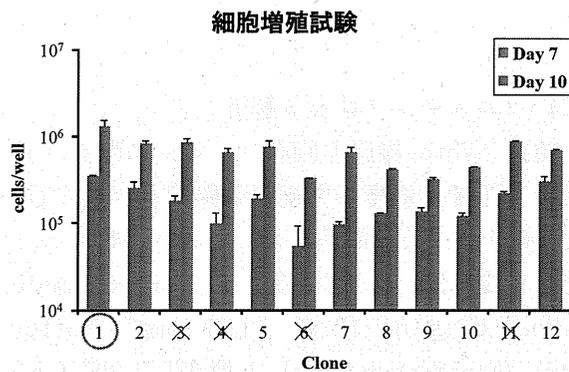


図2 Vero細胞クローンの増殖能の比較

各コロニーの凍結細胞を培養後、細胞を回収し、細胞増殖能とviabilityを測定した。その結果、最も増殖が悪かった#6を含めた細胞の形状が均一でなかった4株は、凍結細胞から全く増殖しなかった。直接、継代後に最も良い増殖能を示した#1は細胞数、viability共に良好であった(表1)。

表1 凍結保存Vero細胞クローンの生存率

	Number (x 10e4)	Viability (%)
1	770	90.80188679
2	224	89.6
3	ND	ND
4	ND	ND
5	846	95.48532731
6	ND	ND
7	1182	97.20394737
8	420	92.51101322
9	346	93.51351351
10	666	96.52173913
11	ND	ND
12	930	93.18637275

(2) VおよびHN遺伝子導入Vero細胞の構築
構築したウイルス由来抗原発現ベクターpCAGGS-VおよびpCAGGS-HNと、細胞株樹立用薬剤選択ベクターpCXneo-VおよびpCXneo-HNの導入遺伝子の発現を確認するため、Vero細胞にトランスフェクションし、48時間後に回収した細胞をウエスタンブロット解析した。その結果、V抗原の発現は確認できたものの(図3)HNの発現は確認できなかった(data not shown)。使用したHNモノクローナル抗体がHN蛋白質の高次構造を認識し、ウエスタン解析では検出で

きない可能性があったので、BSRT7/5細胞にトランスフェクト後、免疫染色を行って蛍光抗体法で調べたところ、HN抗原の発現が確認できた(図4)。

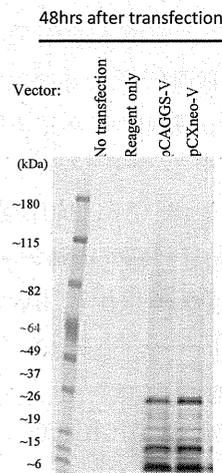


図3 V蛋白質のウエスタンブロット解析

BSRT7/5



BSRT7/5 (pCXneo-HN)



図4 蛍光抗体法によるHN遺伝子導入細胞(BSRT7/5細胞)でのHN蛋白質の発現

(3) VおよびHN遺伝子導入Vero細胞のクローニングとPCRおよびウエスタンブロット解析によるスクリーニング

VおよびHN遺伝子を発現する組換え細胞株樹立用薬剤選択ベクターをVero細胞にトランスフェクション法を用いて導入し、G418含有OptiPRO SFM培地で培養を行い、生育した細胞コロニーを継代した。

組換えVero細胞のクローニングを行う際に、抗原の発現を確認するには手間がかかるため、一次スクリーニングとして目的の遺伝子が組換えVero細胞株に導入されているかを確認できるPCR法の確立を行った。細胞株樹立用薬剤選択ベクターのベースとなっているpCAGGSベクターのマルチクローニングサイト近傍の塩基配列でnested PCR用プライマーをデザインし、全長のVおよびHN遺伝子が検出できるPCR法を確立した(図5)。VおよびHN遺伝子それぞれについてコロニーをスクリーニングし、Vについては64個中40個、HNについては55個中13個のPCR陽性クローンが得られた。

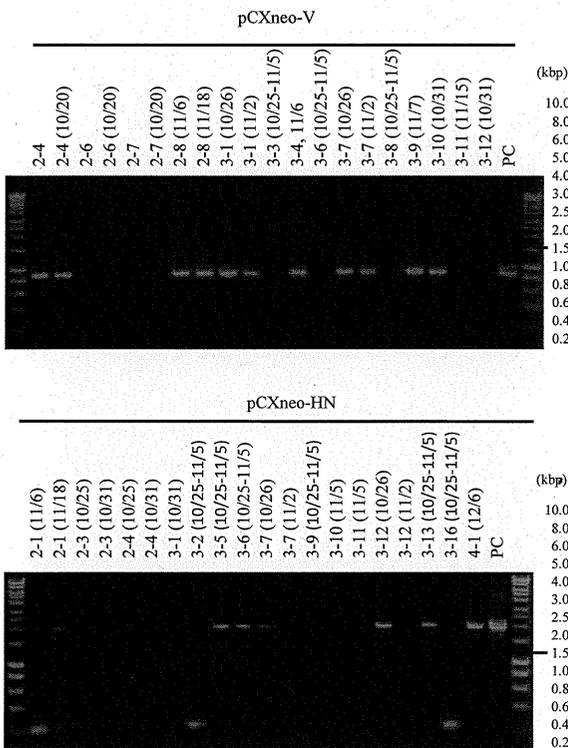


図5 Nested PCRによる導入遺伝子の検出
上段：V遺伝子、下段：HN遺伝子

V遺伝子導入細胞11クローンについて、細胞抽出液をウエスタンブロット法で解析したところ、8クローンでV蛋白質の発現が確認でき

(図6)、V遺伝子欠損型hPIV2ベクター生産用の候補細胞クローンを樹立できた。HN遺伝子導入細胞については、現在発現の確認を行っている。

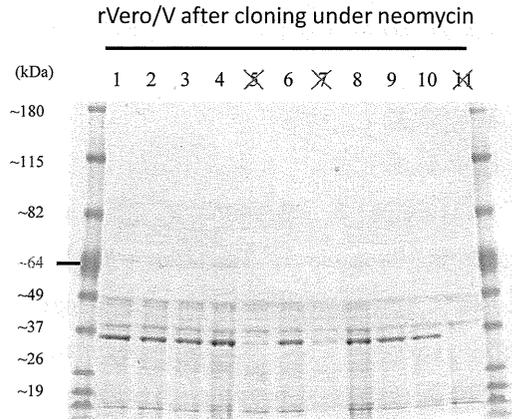


図6 ウエスタンブロットによるV遺伝子導入Vero細胞クローンでのV蛋白質発現解析

D. 考察

ネオマイシン耐性でのセレクション法により、hPIV2のVおよびHN遺伝子導入Vero細胞のスクリーニングを行った。Nested PCR法の導入により、効率的にクローンのスクリーニングが可能となった。V遺伝子(約0.7 kbp)に比べて、HN遺伝子(約1.7 kbp)でPCR陽性クローン取得率が低かったのは、導入遺伝子のサイズが大きいほど、細胞内で維持されにくいと考えられる。

V遺伝子発現が確認できた7クローンでのV蛋白質発現レベルは、クローン間で大きな差は認められなかったが、ゲノムに挿入された位置、コピー数等によって、導入された遺伝子の脱離しやすさに差がある可能性がある。マスターセルバンク作製のためにも、今後G418存在下、非存在下で継代を繰り返した際に、遺伝子および各蛋白質発現が維持されているかどうかを確認する必要がある。

E. 結論

hPIV2のVまたはHN遺伝子導入Vero細胞のクローニングを行い、PCR法により全長のVまたはHN遺伝子を保持しているクローンを取得した。V蛋白質の発現をウエスタンブロット法

で確認し、7 個の V 蛋白質発現 Vero 細胞クローンが得られた。HN についても蛋白質の発現を確認中である。今後、樹立した細胞での導入遺伝子の安定性、組換えウイルス生産量の評価、高生産法の検討等を行っていく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Watanabe K, Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K, Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. Vaccine, in press (2014).

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新規結核ワクチンの開発. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会, 2013 年, 津

(2) Watanabe K, Matsuo K, Yasutomi Y. Intranasal immunization with recombinant vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed mycobacteria-specific immunity. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年, 千葉

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

(平成25年度)

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
小檜山康司 石井健	TLR とレクチンの共同作用		臨床免疫・アレルギー科	科学評論社		2013	454-462
國澤 純	粘膜における免疫ホメオスタシス	谷口克 宮坂昌之 小安重夫	標準免疫学	医学書院	東京	2013	197-205