

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, <u>Inada H, Nosaka T, Matsuo K. and Yasutomi Y.</u>	Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization	Vaccine	32	1727-1735	2014
Wada T, Kohara M, <u>Yasutomi Y.</u>	DNA vaccine expressing the non-structural proteins of hepatitis C virus diminishes the expression of HCV proteins in a mouse model.	Vaccine	31	5968-5974	2013
Kitagawa H, Kawano M, Yamanaka K, Kakeda M, Tsuda K, <u>Inada H, Yoneda M, Sakaguchi T, Nigi A, Nishimura K, Komada H, Tsurudome M, Yasutomi Y, Nosaka T, Mizutani H.</u>	Intranasally administered antigen 85B gene vaccine in non-replicating human Parainfluenza type 2 virus vector ameliorates mouse atopic dermatitis.	PLoS One	8(7)	e66614	2013
Shimozawa N, Ono R, Shimada M, Shibata H, Takahashi I, <u>Inada H, Takada T, Nosaka T, Yasutomi Y</u>	Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species.	Differentiation	85	131-139	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tajiri K, Shimojo N, Sakai S, Machino-Ohtsuka T, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Tsujimura Y, Kimura T, Sato A, <u>Yasutomi Y</u> , Aonuma K.	Pitavastatin regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice.	Cardiovasc Drugs Ther.	27	413-424	2013
Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, <u>Yasutomi Y</u> , Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H	TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1	J Gen Virol.	94	1318-1324	2013
Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, <u>Yasutomi Y</u> , Kurane I, Akari H	Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection.	Arch Virol	158	1209-1220	2013
Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, <u>Yasutomi Y</u> , Ishii KJ, Horii T.	TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models.	Hum Vaccin Immunother.	9	283-290	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, <u>Yasutomi Y</u> , Matano T, Sato H, Adachi A	Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells.	Microbes Infect.	5	56-65	2013
Tsurudome M, Nakahashi M, Matsushima Y, Ito M, Nishio M, Kawano M, Komada H, <u>Nosaka T</u> .	Full conversion of the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the parainfluenza virus 5 fusion protein by replacement of 21 amino acids in its head region with those of the simian virus 41 fusion protein.	J Virol	87	8342-8350	2013
Hara K, Fukumura M, Ohtsuka J, Kawano M, <u>Nosaka T</u> .	Human Parainfluenza virus type 2 vector induces dendritic cell maturation without viral RNA replication/transcription.	Hum Gene Ther	24	683-691	2013
Nagai Y, Iwade Y, Hayakawa E, Nakano M, Sakai T, Mitarai S, Katayama M, <u>Nosaka T</u> , Yamaguchi T.	High resolution melting curve assay for rapid detection of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis.	J Infect Chemother	19	1116-1125	2013
Ono R, Masuya M, Nakajima H, Enomoto Y, Miyata E, Nakamura A, Ishii S, Suzuki K, Shibata-Minoshima F, Katayama N, Kitamura T, <u>Nosaka T</u> .	Plzf drives MLL-fusion-mediated leukemogenesis specifically in long term hematopoietic stem cells.	Blood	122	1271-1283	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, Nishikawa H, Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, <u>Nosaka T</u> , Shiku H, Katayama N.	Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: Potential utility for adoptive immunotherapy.	Exp Hematol	41	367-376	2013
高橋裕明、矢野拓弥、福田美和、山内昭則、大熊和行、 <u>庵原俊昭</u> 、中野貴司、松田 正、鳥越貞義、二井立恵、伊佐地真知子、渡辺正博、落合 仁、酒徳浩之、加藤 孝、前田一洋、奥野良信、神谷 齊	小児におけるインフルエンザHAワクチン接種量変更による効果と安全性の検討	感染症誌	87	195-206	2013
<u>庵原俊昭</u>	乳幼児へのインフルエンザワクチン接種量の増量について	小児内科	45 (11)	2037-2039	2013
<u>庵原俊昭</u>	予防接種Q&A インフルエンザ-対象	小児内科	45	535-536	2013
<u>庵原俊昭</u>	予防接種Q&A インフルエンザ-対象	小児内科	45	539-541	2013
矢野拓弥、前田千恵、赤地重宏、山寺基子、松野由香里、永井佑樹、小林章人、楠原 一、小林隆司、福田美和、中川由美子、高橋裕明、奈良谷性子、山内昭則、天野秀臣、西中隆道、 <u>庵原俊昭</u>	2013年9月に分離されたA(H1N1)pdm09ウイルスの性状—三重県	IASR	34	343-345	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kobiyama K, Aoshi T, Narita H, Kuroda E, Hayashi M, Tetsutani K, Koyama S, Mochizuki S, Sakurai K, Katakai Y, Yasutomi Y, Saijo S, Iwakura Y, Akira S, Coban C, <u>Ishii KJ</u> .	Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist	Proc Natl Acad Sci USA			2014 Feb 10
Kobiyama K, Jounai N, Aoshi T, Tozuka M, Takeshita F, Coban C and <u>Ishii KJ</u> .	Innate Immune Signaling by, and Genetic Adjuvants for DNA Vaccination	Vaccines	1	278-292	2013
Kuroda E, Coban C, <u>Ishii KJ</u>	Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects	Int Rev Immunol	32(2)	209-20	2013
Kobiyama K, Kawashima A, Jounai N, Takeshita F, <u>Ishii KJ</u> , Ito T, Suzuki K.	Role of Extrachromosomal Histone H2B on Recognition of DNA Viruses and Cell Damage	Front Genet	May 23;4	91	2013
Tang CK, Aoshi T, Jounai N, Ito J, Ohata K, Kobiyama K, Dessailly BH, Kuroda E, Akira S, Mizuguchi K, Coban C, <u>Ishii KJ</u>	The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant	PLoS One	8(3)	e60038	2013
Coban C, Kobiyama K, Jounai N, Tozuka M, <u>Ishii KJ</u>	DNA vaccines: A simple DNA sensing matter?	Hum Vaccin Immunother	2	9(10)	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, <u>J. Kunisawa*</u> , and H. Kiyono	Skin-barrier homeostasis through Cyp26b1- mediated inhibition of ATP-dependent mast cell activation by fibroblasts	<i>Immunity</i>			2014 (accept)
<u>J. Kunisawa</u> , 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	<i>Nat Commun</i>	4	1772	2013
S. Kishino, M. Takeuchia, S.B. Park, A. Hirata, N. Kitamura, <u>J. Kunisawa</u> , 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	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	110	17808- 17813	2013
T. Obata, N. Shibata, Y. Goto, I. Ishikawa, S. Sato, <u>J. Kunisawa*</u> , and H. Kiyono	Critical role of dendritic cells in T-cell retention in the interfollicular region of Peyer's patches	<i>J Immunol</i>	191	942-8	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	<i>Mucosal Immunol</i>	6	838-46	2013
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	<i>PLoS One</i>	8	e60453	2013
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	<i>Infection and Immunity</i>	81	1625-34	2013
T. Kusu, H. Kayama, M. Kinoshita, S. G. Jeon, Y. Ueda, Y. Goto, R. Okumura, H. Saiga, T. Kurakawa, K. Ikeda, Y. Maeda, J. I. Nishimura, Y. Arima, K. Atarashi, K. Honda, M. Murakami, J. Kunisawa, H. Kiyono, M. Okumura, M. Yamamoto, and K. Takeda	Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine	<i>J Immunol</i>	190	774-83	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Nagatake, and J. Kunisawa	Unique functions of mucosa-associated lymphoid tissues as targets of mucosal vaccines	<i>Curr Topics Pharmacol</i>			2014 (in press)
A. Lamichhane, H. Kiyono, and J. Kunisawa	Nutritional components regulate the gut immune system and its association with intestinal immune disease development	<i>J Gastroenterol Hepatol</i>	28	18-24	2013
J. Kunisawa and H. Kiyono	Vitamin-mediated regulation of intestinal immunity	<i>Front in Immunol</i>	4	189	2013
M. Kamioka, H. Kiyono, and J. Kunisawa	Herbal medicine-initiated approaches for the elucidation of immunological network in the intestine	<i>J Tradition Med</i>	30	56-61	2013
長竹貴広、 國澤 純	脂質を介した腸管免疫システムの制御	医学のあゆみ			2014 (印刷中)
鈴木英彦、 國澤 純	微生物の有する粘膜組織指向性を用いた粘膜ワクチンデリバリー開発への展望	薬学雑誌			2014 (印刷中)
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雑誌	9	214-217	2013
鈴木英彦、 國澤 純	ビタミンを介した腸管免疫の制御と疾患	細胞	45	12-16	2013
倉島洋介、 國澤 純、 清野 宏	粘膜マスト細胞と疾患	最新医学	68 卷 3 月 増刊号	704-727	2013
田尻 創、 清野 宏、 國澤 純	腸管免疫疾患における脂質メディエーター	遺伝子医学 MOOK	24	241-245	2013



解説

TLRとレクチンの共同作用*

小檜山康司^{**} 石井 健^{***}

Key Words : TLRs, CLR, innate immune response

はじめに

微生物はいくつもの成分を含む複合物であり、さまざまな構造をとっている。これら特徴的な成分、構造は免疫細胞に発現している自然免疫受容体によって認識される。宿主内では微生物を排除するための機構が働き、自然免疫受容体は主に炎症性サイトカインやケモカイン産生を惹起することで、獲得免疫応答を誘導している。自然免疫受容体であるToll-like receptors (TLRs) やC-type lectin receptors (CLRs) は、特異的に病原体の構成成分を認識し自然免疫応答を惹起する。近年、個々の病原体をいくつかの自然免疫受容体が認識し、異なるシグナルを活性化させることで、お互いの自然免疫応答を増強、または抑制することが報告されている。本稿では、自然免疫受容体、特にTLRsとCLRsによる自然免疫、獲得免疫応答の誘導における共同作用について解説する。

自然免疫と獲得免疫

宿主は、ウイルスや細菌、真菌などの病原体に対する免疫応答を有しており、自然免疫と獲得免疫に大別することができる。自然免疫応答は病原体感染後、迅速に誘導される生体防御反応であり、昆虫から哺乳類まで広く保存されている。一方で、獲得免疫応答は哺乳類などの高

等動物のみが有している機能であり、病原体の再感染に対する長期的な生体防御反応である。これらの免疫応答は密接にかかわっており、自然免疫応答なしに病原体特異的な獲得免疫応答の誘導は行われぬ。このことは新たなワクチン開発においても重要な点であり、実際にナイーブマウスに精製された抗原のみを投与した際には、抗原は抗原提示細胞に取り込まれ、抗原提示は行われるものの、抗原特異的抗体や、細胞性免疫応答は誘導されず、免疫寛容となってしまう。一方で、自然免疫シグナルが入ることで、抗原特異的免疫応答の誘導、さらには免疫記憶が形成される。これらのことから、現在ではワクチン開発において自然免疫応答を惹起することが重要視されており、自然免疫を強く誘導する成分(アジュバント)の開発研究が行われている。

自然免疫応答を誘導するために、宿主の細胞は自然免疫受容体(パターン認識受容体とも呼ばれる)を備えている。これまでに、多くの自然免疫受容体が報告されており、5つのグループに分けられている。TLRs, CLRs, RIG-I-like receptors (RLRs), nucleotide-binding oligomerization domain containing (Nod)-like receptors (NLRs), AIM2-like receptors (ALRs)である¹⁾。1990年代後半のTLRsの発見を機に、急速に自然免疫学研究が進み、詳細なシグナル伝達経路が明らかとさ

* Collaboration between the innate immune receptors.

** Kouji KOBAYAMA, Ph.D. & Ken J. ISHII, M.D., Ph.D.: 大阪大学免疫学フロンティア研究センターワクチン学研究室 [〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1]; Laboratory of Vaccine Science, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN

*** 独立行政法人医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト

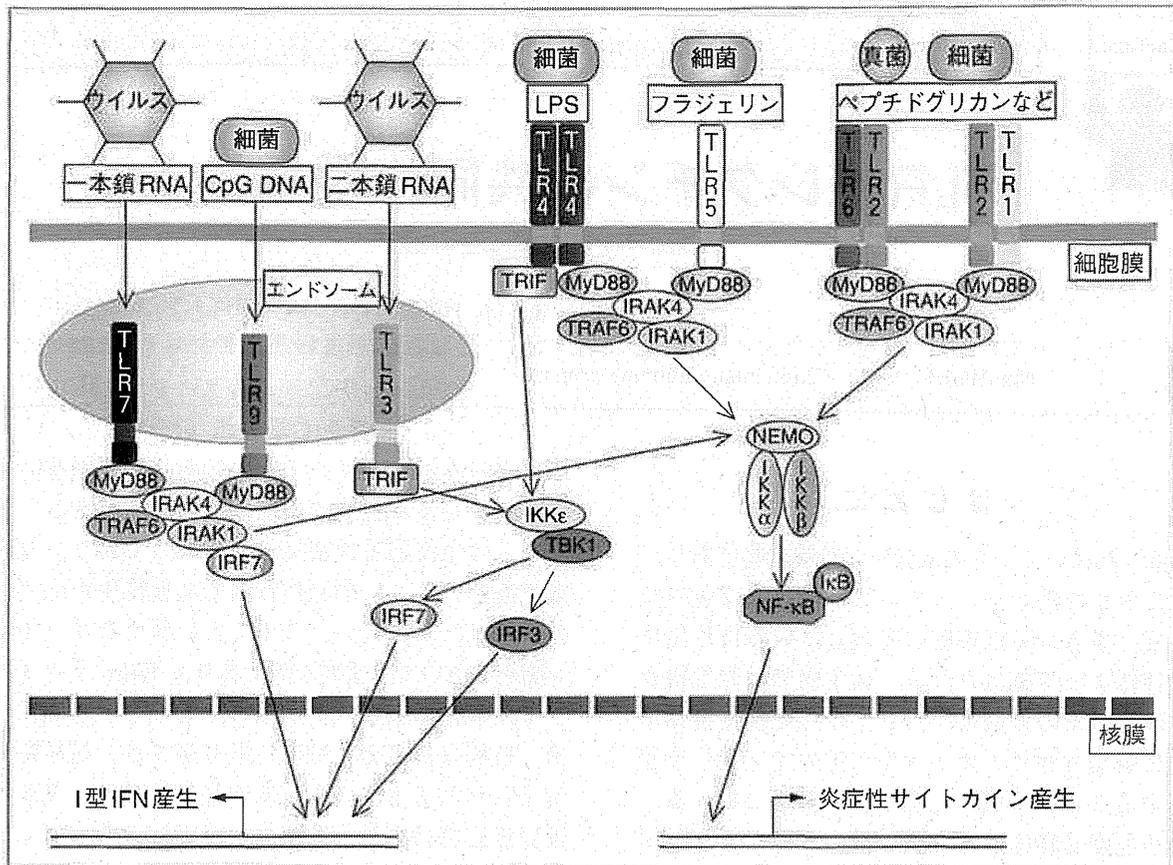


図1 TLRsの自然免疫シグナル

れ、生体反応への関与も明らかとなりつつある。また、活性化される自然免疫応答によって、その後誘導される獲得免疫応答にも特徴がある。TLRsのリガンドは主としてTh1型の免疫応答を誘導し、CLRのリガンドは主としてTh17型の免疫応答を誘導することが報告されている。Th2型の免疫応答を誘導するアルミニウムアジュバントはNLRsによって認識され、自然免疫応答を活性化することが報告されているが、獲得免疫応答誘導にはNLRsによる自然免疫応答は関与していないことが報告されている²⁾。これらの背景から、自然免疫応答を詳細に明らかにすることが、病原体排除、さらには新規ワクチン開発のために非常に重要であると考えられている。次に自然免疫受容体であるTLRsとCLRについて解説する。

TLRs

TLRsはショウジョウバエのToll遺伝子と相同

性が高いことからToll-like receptorsと名づけられた。TLRsはこれまでに13種類、ヒトでは10種類が同定されており、病原体のさまざまな成分(核酸、蛋白質、多糖、鞭毛など)を認識する³⁾。TLRsは主に免疫細胞である樹状細胞、マクロファージ、B細胞などに発現しており、病原体が感染後、その構成成分を認識することで自然免疫シグナルを活性化し、サイトカイン産生や共刺激分子などの発現を増強させる。結果として、抗原提示細胞が取り込んだ抗原を、ナイーブT細胞に提示することが可能となる。これにより強い獲得免疫応答を惹起することができる。

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6は細胞膜に局在しており、TLR3, TLR7/8, TLR9はエンドソーム膜に局在している(図1)。それぞれ認識できるリガンドが異なっており、そのことがさまざまな病原体に対する早期免疫応答の誘導、排除に役立っている。

TLR2はTLR1やTLR6とヘテロダイマーを形成

し、グラム陽性細菌や真菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやリポプロテイン、リポタイコ酸などを認識する。Macrophage-activating lipopeptide 2 (MALP-2) はTLR2とTLR6のヘテロダイマーによって認識され、また合成リポペプチドであるPam₂CSK₄はTLR2とTLR1のヘテロダイマーによって認識され自然免疫応答を活性化する。これらの自然免疫応答はアダプター分子であるmyeloid differentiation factor 88 (MyD88) によって制御されており、転写因子であるNF- κ Bを介してIL-6やTNF- α などの炎症性サイトカイン産生を誘導する。

TLR3はウイルス感染細胞内で複製された、ウイルス由来の二本鎖RNAをエンドソーム内で認識することで、自然免疫応答を活性化する。アダプター分子であるToll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF)を介し、転写因子であるIRF3をリン酸化することでI型インターフェロン(IFN)産生を誘導する。その結果として、強くTh1型免疫応答を誘導する。

TLR4はグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であるリポポリサッカライド(LPS)を認識することで自然免疫応答を活性化する。TLR4はMyD88, TRIF両方のアダプター分子を介してI型IFNや炎症性サイトカイン産生を惹起する。

TLR5は細菌の鞭毛中のフラジエリンという蛋白質を認識することでMyD88を介した自然免疫応答を活性化する。フラジエリンは強力にTh1型免疫応答のみを誘導するのではなく、Th2型免疫応答をも誘導することができることが報告されている。

TLR7/8はウイルス由来の一本鎖RNAや、合成低分子であるイミダゾキノリンなどを認識し、リガンドをエンドソーム内で認識後、MyD88を介して強力にI型IFN産生を誘導する。ヒトにおいては、TLR7とTLR8は発現している細胞が異なっており、両者に対するアゴニストを用いることで、樹状細胞やB細胞を活性化し、Th1型免疫応答、CTL反応、抗原特異的抗体産生を誘導することができる。

TLR9は細菌やウイルス由来の非メチル化CpG配列を含んだDNAを認識する。哺乳類のDNAは、CpGがメチル化修飾を受けているためにTLR9の

リガンドとして働かない。合成核酸であるCpG oligodeoxynucleotide (ODN)もメチル化修飾されていないために、強力に自然免疫応答を活性化することが可能である。TLR9はエンドソーム内でこれらリガンドを認識し、I型IFN産生を誘導する。CpG ODNは現在大きく4つのグループに分けることができ、K/B, D/A, C, Pがある。それぞれのCpG ODNは異なる配列、骨格を有しており、誘導される自然免疫応答も異なっている。K型のCpG ODNは単独でがんやアレルギーなどを含めたさまざまな疾患への治療が期待されており、現在も臨床試験が行われている⁴⁾。

CLRs

C-type lectin-likeドメイン(CTLD)を含む蛋白質はC-typeレクチンと呼ばれ、これまでに1,000種類以上のC-typeレクチンが報告されており、その多くは遺伝子上でクラスターを形成している。CTLDの主な機能はカルシウムイオン依存性に糖鎖と結合することである。いくつかのC-typeレクチンはCLRsとも呼ばれており、骨髄系細胞での発現が確認されている。CLRsの機能は多岐にわたっており、細胞接着や組織の再構築、補体の活性化、病原体の認識などさまざまである⁵⁾。

Dectin-1(ヒト: *CLEC7A*)はマクロファージ、樹状細胞、単球、好中球などの細胞膜上に発現しており、真菌の細胞壁成分である β -グルカンを認識することで自然免疫応答を誘導する。Dectin-1は細胞内モチーフとしてimmunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)モチーフ(YxxL/I配列)を一つ有しているためにhemITAMと呼ばれている(通常のITAMはタンデムに2つのモチーフが並んでいる)。Dectin-1がリガンドを認識するとアダプター分子であるspleen tyrosine kinase (Syk)をリン酸化することで、自然免疫応答を活性化し炎症性サイトカイン産生を誘導する⁶⁾。最近の報告で、Dectin-1は粒子状の β -グルカンを認識する際に、抑制性脱リン酸化酵素であるCD45とCD148を含まないクラスターを形成することで、自然免疫シグナルを活性化することが示された⁷⁾。可溶性の β -グルカンではこのクラスター形成が行われず、CD45とCD148によりSykのリン酸化が抑制され、自然免疫シグナルを誘導す

ることができない。Dectin-1による自然免疫応答活性化はTh1やTh17型の獲得免疫を誘導することができ、CTL反応をも誘導することが報告されている⁹⁾。Th17型免疫応答は真菌感染防御に重要であることが明らかとされており、Dectin-1による自然免疫応答が重要な役割を担っていると考えられる。

Dectin-2(ヒト; *CLEC6A*, マウス: *Clec4n*)は樹状細胞やマクロファージなどに発現しており、真菌の細胞壁成分である α -マンナンを認識することが知られている⁹⁾。Dectin-2は細胞内シグナル伝達モチーフを欠損しており、ITAMモチーフを有するFcR γ と結合することにより、自然免疫応答を活性化する。Dectin-2は真菌に対して、Th17型の免疫応答を誘導することが明らかとなっているが、アレルギー反応をも惹起することが報告されている。ハウスダストアレルギーの原因であるチリダニはDectin-2に認識されることで、Sykを介し、システイニルロイコトリエンの産生を誘導する⁹⁾。これら脂質性メディエーターは好酸球性または好中球性の肺の炎症を誘導し、Th2型のアレルギー反応を促進する¹⁰⁾。しかしながら、これらの獲得免疫反応をどのようにしてDectin-2が制御しているか、詳細は明らかとなっていない。

Mincle (macrophage-inducible C-type lectin) (*CLEC4E*)はマクロファージや好中球に低レベルで発現しているが、TLRsアゴニスト刺激によって、強く発現が上昇される¹¹⁾。Mincleは α -マンノースを含んだ真菌を認識することが知られている¹²⁾。一方で、結核菌感染にも関与していることが報告され、結核菌細胞壁成分である、トレハロースジマイコレート(TDM)を認識することが明らかとされた¹³⁾。TDMはコンプリートフロイントアジュバントの活性成分としても知られており、実際に結核菌のコンポーネントワクチンとともに投与することで、強いアジュバント活性(Th17型免疫応答の誘導)を示している¹⁴⁾。

TLRsとC-typeレクチン

TLRsの同定後、個々の自然免疫受容体のシグナル伝達に注目して研究が行われてきた。その結果として、新たにいくつかのTLRs以外の受容体が同定され、同時に詳細なメカニズムが明らか

かとなってきた。一方で、同じ病原体をいくつかの異なる自然免疫受容体が認識することも報告されており、お互いの自然免疫応答との関係には不明な点が多く残されていた。これまでに、いくつかのC-typeレクチンがTLRsを介した自然免疫応答を増強または、抑制することが報告されている。ここでは、TLRsとC-typeレクチンに着目し、自然免疫応答の制御に関して解説する。

β -グルカンの受容体であるDectin-1はTLRsとの関連が多く報告されている。実際に、ヒトの末梢血単核球を β -グルカンの一種であるCurdlanとともにTLR2またはTLR4のリガンドであるPam₃CSK₄, LPSで刺激をすることにより、相乗的にTNF- α やIL-10の産生が増強された¹⁵⁾。同様の結果がマウスのマクロファージを用いた実験によっても明らかとなっており、TLR2,4だけではなく、TLR5やTLR7, TLR9のリガンド刺激においても、 β -グルカンで細胞を同時刺激することでTNF- α 産生の増強が確認された¹⁶⁾。また、マウスのマクロファージを出芽酵母由来の β -グルカンとPam₃CSK₄で同時刺激することで、IL-12 p70の産生の抑制が確認されている¹⁷⁾。これは、 β -グルカン刺激によって、IL-12 p70のサブユニットであるp35の産生が抑制されていることが原因となっているが、詳細なメカニズムは明らかとなっていない。p35の産生が抑制されていると同時に、IL-6やIL-23の産生が β -グルカンとPam₃CSK₄共刺激によって促進されていることも報告されている¹⁷⁾。IL-6やIL-23はTh17細胞の誘導に必須なサイトカインであり、TLRs, CLR両方の自然免疫シグナルが活性化されることで、強くTh17型獲得免疫応答を誘導していると考えられる¹⁸⁾(図2)。実際に、真菌感染時にはCLRのみならずTLRsも認識に関与しているために、真菌を効率よく排除するために異なる自然免疫受容体が存在していると考えられる。また、TLR9のリガンドであるCpG ODNと真菌の β -グルカンの強刺激によって、IL-12 p70の産生がDectin-1依存的に抑制されていることも示されている¹⁹⁾。同様に、真菌由来の多糖がTLR9を介したIL-12 p40の産生を抑制することも報告されている²⁰⁾。最近の報告で、Dectin-1シグナルがサイトカインシグナル抑制因子(SOCS1)の発現を促進することが報告された²¹⁾。SOCS1はその名のとおりに、サイトカイン受容体か

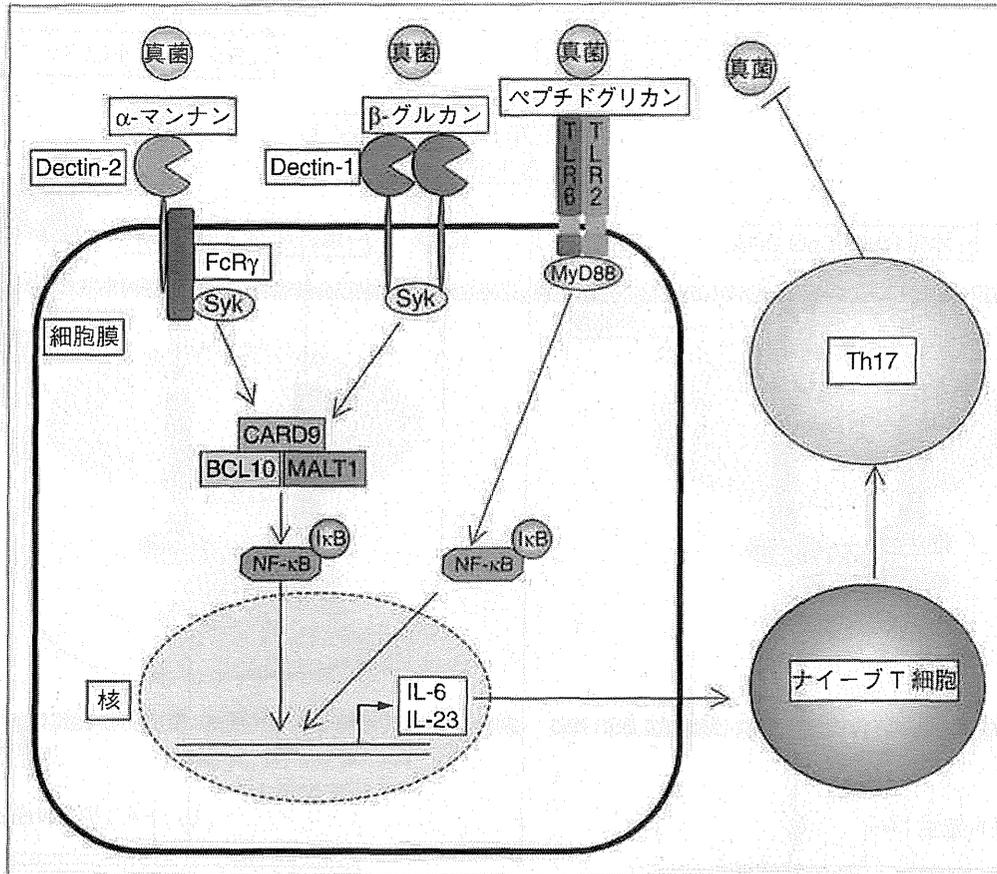


図2 CLRとTLRsによる自然免疫と獲得免疫の誘導

らのシグナル伝達を抑制する機能を有しており、TLR9アゴニスト刺激によるIL-12やIL-10の産生をも抑制することが明らかとされた²¹⁾。われわれも、まだ未発表ながらTLR9によるI型IFN産生がDectin-1シグナルによって、抑制されることを明らかとしている。これらの結果から、TLRsとDectin-1は真菌に対する自然免疫受容体として共同して働き、TLRsリガンドによるTh1型の免疫応答をDectin-1シグナルによってTh17型にシフトさせていることが考えられる。

Blood dendritic cell antigen 2 (BDCA-2, CD303)はヒトの形質細胞様樹状細胞(pDCs)に特異的に発現しているC-typeレクチンである。BDCA-2に対する抗体を用いて、BDCA-2を介したシグナル伝達を活性化することで、強く樹状細胞からのI型IFN産生が抑制されることが報告されている²²⁾。また、IFN遺伝子のmRNAレベルでの低下も確認されていることから、BDCA-2シグナルが少なくとも転写の前に抑制的に働いて

いることを示唆している²³⁾。これらのことから、BDCA-2に対する抗体は、I型IFNの産生亢進が病因に関与している全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患患者に対して、I型IFN産生を調節するための抗体医薬としても注目されている。

Dendritic cell immunoreceptor (DCIR)は単球やマクロファージ、樹状細胞での発現が確認されており、マンノースやフコースを基本とした多糖を認識することが知られている。ヒトDCIRもBDCA-2と同様の機能が報告されており、DCIRシグナル活性化によって、TLR8やTLR9リガンド刺激によるI型IFN産生を抑制することが報告されている²⁴⁾²⁵⁾。実際に、TLR9リガンド刺激によって、BDCA-2やDCIRの発現が低下していることも明らかとなっており、これらのシグナル伝達はお互いに制御し合っていると考えられる。一方で、BDCA-2とDCIRはHIV-1と結合することが報告されており、実際にHIV-1のgp120はBDCA-2と結合することにより、pDCからのIFN- α 産生を

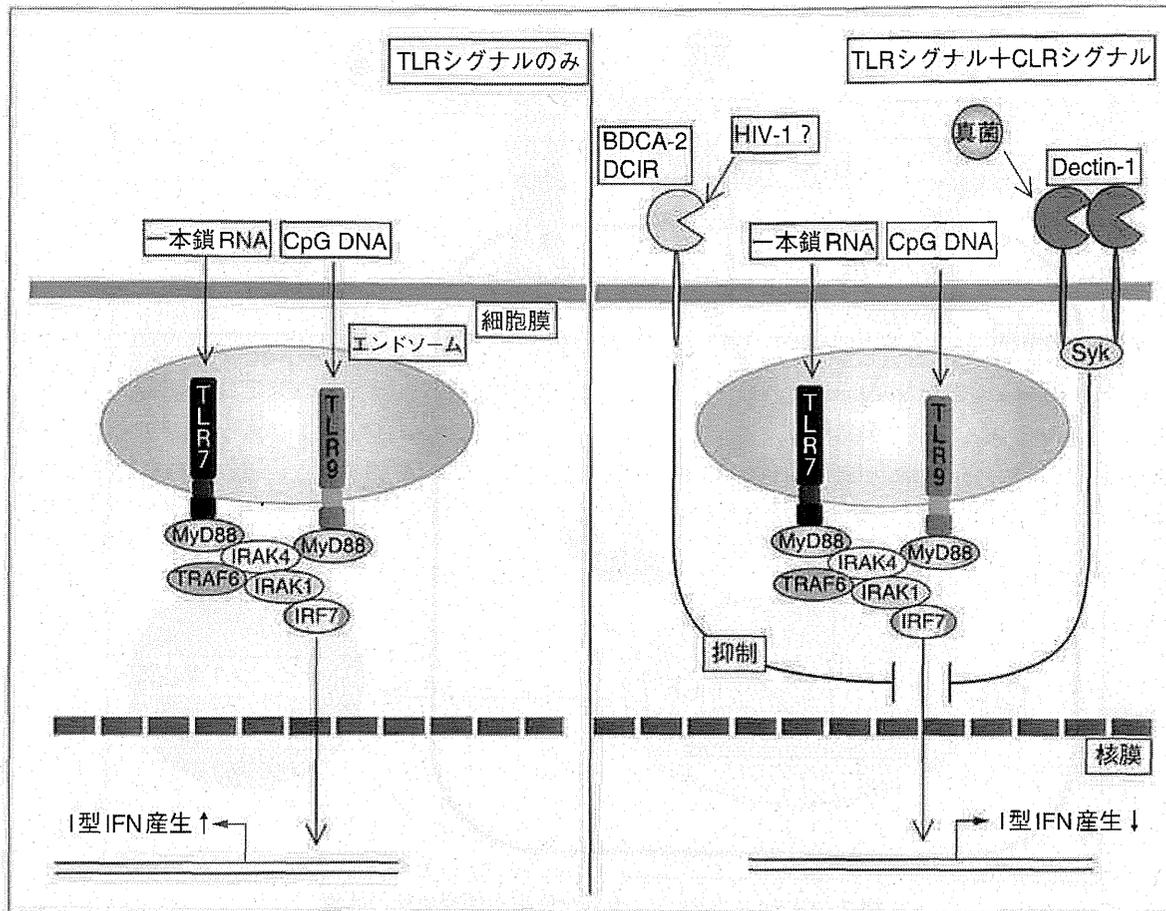


図3 CLRシグナルによるTLRsシグナルの抑制

抑制することが報告されている²⁶⁾²⁷⁾。これらの結果は、BDCA-1とDCIRはpDC上に発現し、TLRsリガンド刺激による自然免疫応答を抑制的に働いていることを示唆している(図3)。しかしながら、HIV-1感染や排除との関連など、不明な点は多く残されており、HIV-1の病態解明のためにも今後の研究成果が待たれる。

CLRsであるDEC-205(CD205)は、マウスでは主に樹状細胞やT細胞、B細胞にも発現しており、エンドサイトーシスなどに関与していることが考えられていたが、その機能に関しては不明な点が多く残されていた。最近の報告で、DEC-205がTLR9の合成リガンドであるK型のCpG ODNの細胞表面受容体であることが報告された²⁸⁾。TLR9はエンドソーム内に局在しており、長らくどのようにしてCpG ODNがエンドソームに取り込まれ、TLR9によって認識されるのか明らかとなっていなかった。K型のCpG ODNは骨格がホスホロチ

オエート化されており、DEC-205は直接結合すること、そしてDEC-205欠損細胞ではCpG ODNによる自然免疫応答の減弱が確認された(図4)。この結果は、今後CpG ODNを臨床で用いるためには重要な発見であり、DEC-205発現細胞にCpG ODNを効率的にターゲットすることで、新たな核酸医薬の開発にもつながることが期待される。

Ly49Qはimmunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif(ITIM)を有しており、ナチュラルキラー(NK)受容体ファミリーに属しているCLRsである。しかしながら、Ly49QはNK細胞に発現しておらず、pDCで強く発現していることが確認されている。Ly49Qの内因性のリガンドとして、自己のMHCクラスI分子が報告されていたが、pDCとMHCクラスIとの結合と自然免疫応答に関しては不明な点が残されていた²⁹⁾。最近の報告で、Ly49QによるMHCクラスIの認識が、pDCからのIFN-α産生に必須であることが明らかとされ

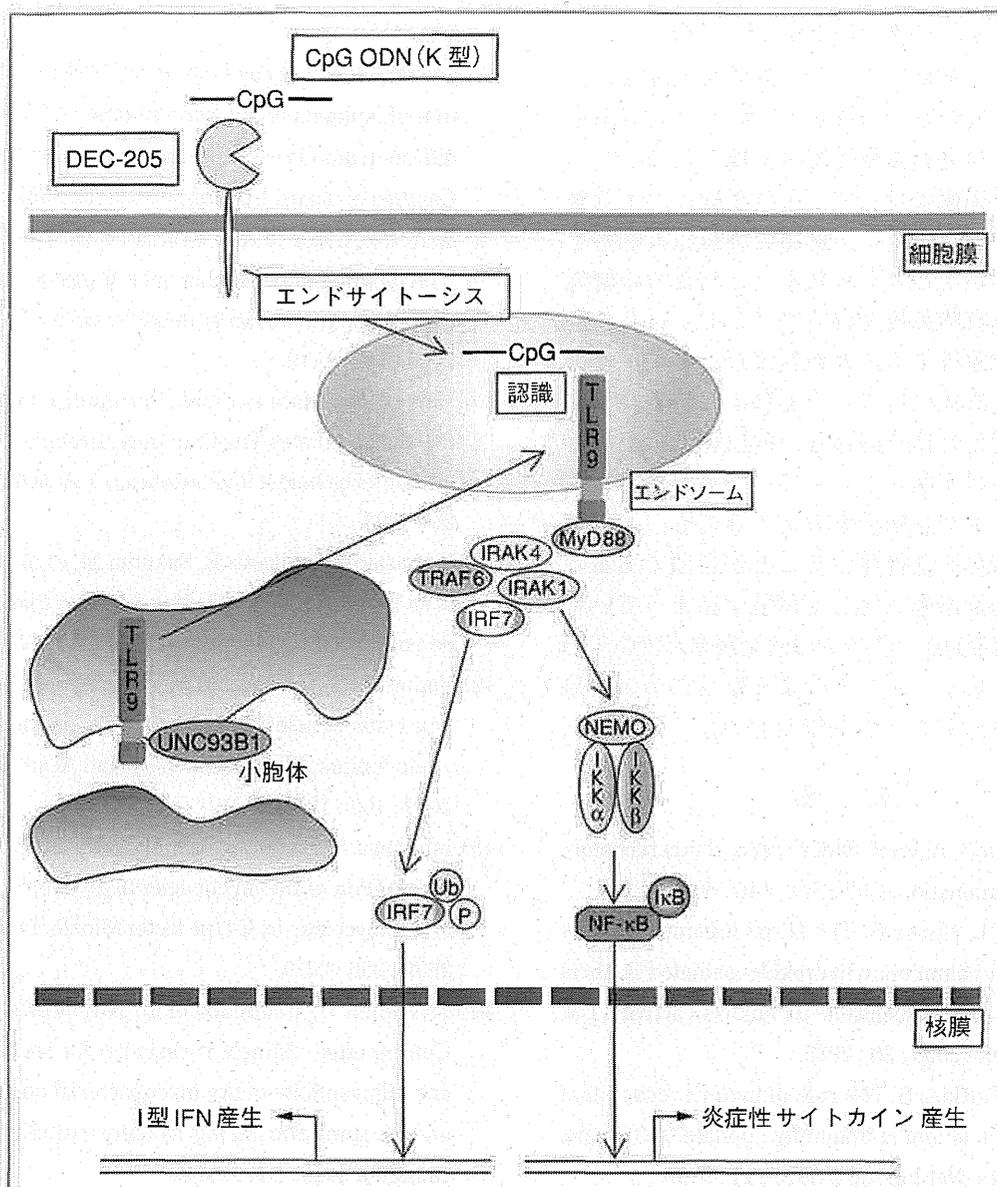


図4 CLRとTLRsによる共同作用

た³⁰⁾。実際に、CpG ODN刺激によるIFN- α の産生は、Ly49Qまたは、MHCクラスIの抗体を用いてお互いの結合を阻害することで抑制された。また、Ly49Qを欠損しているpDCでは、CpG ODN刺激による著しいIFN- α 産生の抑制が確認されており、同時にインフルエンザウイルスやサイトメガロウイルス感染後のIFN産生の抑制も確認されている。これらの結果は、Ly49QとMHCクラスIとの結合が、pDCによるサイトカイン産生をポジティブに制御していることを示唆している。また、サイトメガロウイルス感染などによって発現が低下するMHCクラスIが、pDCによる

抗ウイルス応答や、CTLの活性化を抑制することにも関係していると考えられる。

おわりに

さまざまな自然免疫受容体で病原体を認識することは、宿主側にいくつかのアドバンテージを与えることができる。①いくつかの受容体で認識することで、病原体による免疫のエスケープ機構に対抗することができる。たった一つの自然免疫受容体による認識は回避できても、いくつかの自然免疫受容体から回避するのは、病原体側からしても容易ではない、②宿主の遺伝

的多様性, ③より強い炎症性反応を誘導することができる, ④宿主にとって適切な炎症反応を誘導することが考えられる. このように, 宿主はいくつもの自然免疫受容体を備えることで, さまざまな場面に対して, より正確に, より強力に炎症反応を誘導し, 最適な獲得免疫応答を誘導できていると考えられる. これまでの研究は, 一つの自然免疫受容体に対して, いくつかの病原体を解析することが主流だったが, 今後は特定の病原体に対して, どのようにそれぞれの自然免疫受容体が関与し, 病原体から宿主を守っているのか明らかにしていく必要がある. 実際に, ワクチン開発を考えてみても, どの自然免疫受容体を活性化することが必須であるのか, 特定の病原体に対して理解が深まっていれば, より効果的なワクチンの開発が進んでいく. 今後の研究によって, そのようなワクチンの開発が達成されることを期待したい.

文 献

- 1) Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010 ; 140 : 805.
- 2) Franchi L, Nunez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* 2008 ; 38 : 2085.
- 3) Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010 ; 11 : 373.
- 4) Bode C, Zhao G, Steinhagen F, et al. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 2011 ; 10 : 499.
- 5) Kerrigan AM, Brown GD. Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol Rev* 2010 ; 234 : 335.
- 6) Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, et al. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 2005 ; 22 : 507.
- 7) Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature* 2011 ; 472 : 471.
- 8) Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, et al. Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity* 2010 ; 32 : 681.
- 9) Barrett NA, Maekawa A, Rahman OM, et al. Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. *J Immunol* 2009 ; 182 : 1119.
- 10) Barrett NA, Rahman OM, Fernandez JM, et al. Dectin-2 mediates Th2 immunity through the generation of cysteinyl leukotrienes. *J Exp Med* 2011 ; 208 : 593.
- 11) Yamasaki S, Ishikawa E, Sakuma M, et al. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat Immunol* 2008 ; 9 : 1179.
- 12) Yamasaki S, Matsumoto M, Takeuchi O, et al. C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 1897.
- 13) Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, et al. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med* 2009 ; 206 : 2879.
- 14) Schoenen H, Bodendorfer B, Hitchens K, et al. Cutting edge : Mincle is essential for recognition and adjuvant activity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J Immunol* 2010 ; 184 : 2756.
- 15) Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, et al. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol* 2008 ; 10 : 2058.
- 16) Dennehy KM, Ferwerda G, Faro-Trindade I, et al. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol* 2008 ; 38 : 500.
- 17) Dennehy KM, Willment JA, Williams DL, Brown GD. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. *Eur J Immunol* 2009 ; 39 : 1379.
- 18) Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009 ; 27 : 485.

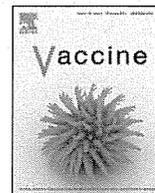
- 19) Huang H, Ostroff GR, Lee CK, et al. Distinct patterns of dendritic cell cytokine release stimulated by fungal beta-glucans and toll-like receptor agonists. *Infect Immun* 2009 ; 77 : 1774.
- 20) Nakamura K, Miyazato A, Xiao G, et al. Deoxy-nucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J Immunol* 2008 ; 180 : 4067.
- 21) Eberle ME, Dalpke AH. Dectin-1 stimulation induces suppressor of cytokine signaling 1, thereby modulating TLR signaling and T cell responses. *J Immunol* 2012 ; 188 : 5644.
- 22) Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 2001 ; 194 : 1823.
- 23) Rock J, Schneider E, Grun JR, et al. CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCgamma2. *Eur J Immunol* 2007 ; 37 : 3564.
- 24) Meyer-Wentrup F, Benitez-Ribas D, Tacke PJ, et al. Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production. *Blood* 2008 ; 111 : 4245.
- 25) Meyer-Wentrup F, Cambi A, Joosten B, et al. DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production. *J Leukoc Biol* 2009 ; 85 : 518.
- 26) Martinelli E, Cicala C, Van Ryk D, et al. HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 3396.
- 27) Lambert AA, Gilbert C, Richard M, et al. The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* 2008 ; 112 : 1299.
- 28) Lahoud MH, Ahmet F, Zhang JG, et al. DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 16270.
- 29) Tai LH, Goulet ML, Belanger S, et al. Recognition of H-2K(b) by Ly49Q suggests a role for class Ia MHC regulation of plasmacytoid dendritic cell function. *Mol Immunol* 2007 ; 44 : 2638.
- 30) Tai LH, Goulet ML, Belanger S, et al. Positive regulation of plasmacytoid dendritic cell function via Ly49Q recognition of class I MHC. *J Exp Med* 2008 ; 205 : 3187.

* * *



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization

Kenta Watanabe^{a,1}, Akihiro Matsubara^{a,b,1}, Mitsuo Kawano^c, Satoru Mizuno^{d,e}, Tomotaka Okamura^a, Yusuke Tsujimura^a, Hiroyasu Inada^f, Tetsuya Nosaka^c, Kazuhiro Matsuo^d, Yasuhiro Yasutomi^{a,b,*}

^a Laboratory of Immunoregulation and Vaccine Research, Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan

^b Division of Immunoregulation, Department of Molecular and Experimental Medicine, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu, Mie 514-8507, Japan

^c Department of Microbiology and Molecular Genetics, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu, Mie 514-8507, Japan

^d Research and Development Department, Japan BCG Laboratory, Kiyose, Tokyo 204-0022, Japan

^e The Research Institute of Tuberculosis, Kiyose, Tokyo 204-8533, Japan

^f Department of Pathology, Faculty of Pharmaceutical Science, Suzuka University of Medical Science, Suzuka, Mie 513-8670, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2013

Received in revised form

25 November 2013

Accepted 29 November 2013

Available online xxx

Keywords:

Human parainfluenza virus

Ag85B

Tuberculosis

Mucosal immunity

ABSTRACT

Viral vectors are promising vaccine candidates for eliciting suitable Ag-specific immune response. Since *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) normally enters hosts via the mucosal surface of the lung, the best defense against Mtb is mucosal vaccines that are capable of inducing both systemic and mucosal immunity. Although *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Guérin is the only licensed tuberculosis (TB) vaccine, its efficacy against adult pulmonary forms of TB is variable. In this study, we assessed the effectiveness of a novel mucosal TB vaccine using recombinant human parainfluenza type 2 virus (rhPIV2) as a vaccine vector in BALB/c mice. Replication-incompetent rhPIV2 (M gene-eliminated) expressing Ag85B (rhPIV2–Ag85B) was constructed by reverse genetics technology. Intranasal administration of rhPIV2–Ag85B induced Mtb-specific immune responses, and the vaccinated mice showed a substantial reduction in the number of CFU of Mtb in lungs and spleens. Unlike other viral vaccine vectors, the immune responses against Ag85B induced by rhPIV2–Ag85B immunization had an advantage over that against the viral vector. In addition, it was revealed that rhPIV2–Ag85B in itself has an adjuvant activity through the retinoic acid-inducible gene I receptor. These findings provide further evidence for the possibility of rhPIV2–Ag85B as a novel TB vaccine.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; BCG, *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Guérin; BEAS cells, bronchial epithelial cells; hPIV2, human parainfluenza type 2 virus; pLN, pulmonary lymph node; Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*; NHBE, normal human bronchial epithelial; rhPIV2–Ag85B, recombinant hPIV2 expressing Ag85B; TB, tuberculosis.

* Corresponding author at: Laboratory of Immunoregulation and Vaccine Research, Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, 1-1 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan. Tel.: +81 29 837 2053; fax: +81 29 837 2053.

E-mail addresses: yasutomi@nibio.go.jp, yasutomi@doc.medic.mie-u.ac.jp (Y. Yasutomi).

¹ These authors contributed equally to this work.

0264-410X/\$ – see front matter © 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.108>

1. Introduction

Recombinant viral vector vaccines have several advantages for preventing infection with pathogens [1]. The vaccines induce a full spectrum of immune responses including humoral and cellular immune responses. These immune responses can be initially induced at the viral vector infection site such as mucosal immune responses [2]. Moreover, the viral vector itself has adjuvant activities through the innate immune systems [3]. Pre-existing or post-priming immune responses against the vaccine vector itself, however, could be an obstacle to effective immune responses to recombinant Ag [4]. Negligible immune responses against vector viruses compared with recombinant vaccine Ags after immunization is considered most desirable for recombinant viral vaccines.

Please cite this article in press as: Watanabe K, et al. 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), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.108>

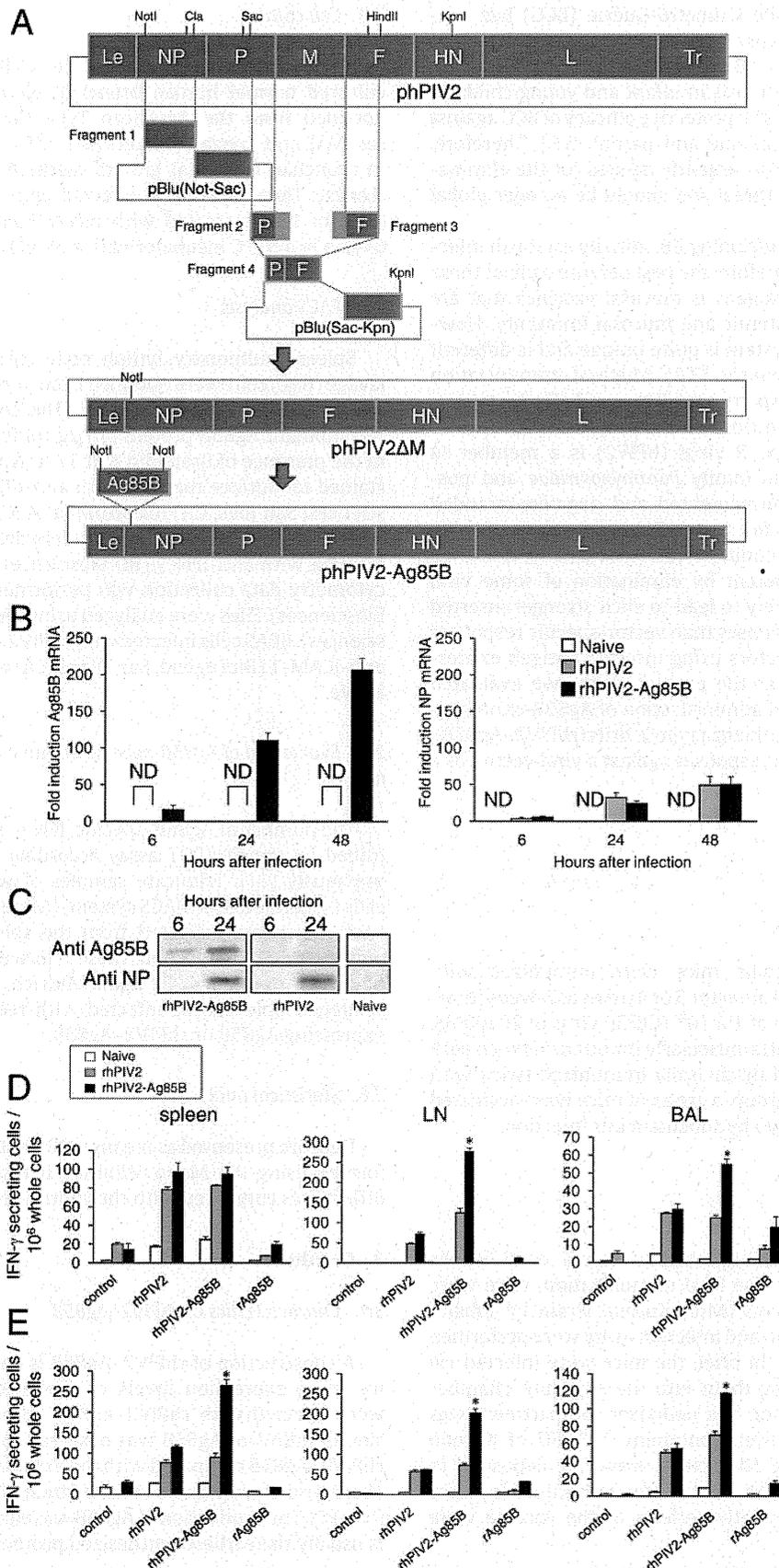


Fig. 1. Expression of Ag85B and advantageous effects in cellular immune response against Ag85B versus virus vector in immunized mice. (A) Construction of rhPIV2–Ag85B. (B) Expression of Ag85B (left panel) and NP (right panel) gene in BEAS cells infected with rhPIV2 or rhPIV2–Ag85B at each time point was determined by real-time PCR. Total RNA was extracted at 6, 24, and 48 h after infection. Fold increase of each target gene was normalized to β -actin, and the expression levels are represented as relative values to naïve cells. Error bars represent standard deviation. ND indicates non-detected. (C) Expression of Ag85B and NP proteins was detected by anti-Ag85B and anti-NP antibodies at 6 and 24 h after infection, respectively. (D and E) Mice were immunized 1 (D) or 2 (E) times with rhPIV2 or rhPIV2–Ag85B at a 2-week interval by intranasal

Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin (BCG) has substantially contributed to the control of tuberculosis (TB) for more than 80 years and affords about 80% protection against tuberculosis meningitis and miliary tuberculosis in infant and young children. However, it is well known that the protective efficacy of BCG against pulmonary TB in adults is variable and partial [5,6]. Therefore, development of new vaccines is urgently needed for the elimination of TB as a public health threat and should be a major global public health priority.

Many infectious diseases, including TB, initially establish infection on mucosal surfaces. Therefore, the best defense against these predominantly mucosal pathogens is mucosal vaccines that are capable of inducing both systemic and mucosal immunity. However, the mucosal immune system is quite unique and is different from systemic immune responses [7,8]. Mucosal immunization provides mucosal immune responses in all mucosal effector tissues in the concept of a common mucosal immune system [9].

Human parainfluenza type 2 virus (hPIV2) is a member of the genus *Rubulavirus* of the family *Paramyxoviridae* and possesses a single-stranded, nonsegmented and negative-stranded RNA genome. This virus does not have a DNA phase during its life cycle and can avoid genetic modifications. Additionally, this virus becomes replication-incompetent by elimination of some viral genes [10]. Moreover, it is likely to lead to elicit stronger inserted antigen-specific immune responses than vector-specific responses unlike other viral vaccine vectors using inserted antigen expression mechanisms of hPIV2. In the present study, we evaluated the effectiveness of intranasal administration of Ag85B-expressed non-replicating human parainfluenza type 2 virus (rhPIV2–Ag85B), which induces weak immune responses against a viral vector, as a novel mucosal TB vaccine.

2. Materials and methods

2.1. Immunization

Six-week-old BALB/c female mice were immunized with rhPIV2–Ag85B or rhPIV2 control vector 3 or 4 times at 2-week intervals by intranasal inoculation of 1×10^8 TCID50 virus in 20 μ l PBS. Another group of mice was intramuscularly immunized twice with Ag85B DNA vaccine [11] and intranasally immunized twice with rhPIV2–Ag85B. As a control group, a group of mice was vaccinated using 1×10^7 CFU of BCG Tokyo by subcutaneous injection.

2.2. Infection assay

Two weeks (rhPIV2–Ag85B-immunized mice) or 6 weeks (BCG-immunized mice) after the final immunization, mice were challenged with *M. tuberculosis* (Mtb) Kurono strain by inhalation. This bacterial preparation and infection assay were performed as previously described [12]. In brief, the mice were infected via the airborne route by placing them into the exposure chamber of a Glas-Col aerosol generator. The nebulizer compartment was filled with 5 ml of a suspension containing 10^6 CFU of Kurono strain so that approximately 50 bacteria would be deposited in the lungs of each animal. Eight weeks after Mtb infection, mice were sacrificed and the preventive effects of the vaccine were assessed.

inoculation ($n = 5$ per group). Spleen, pLN, and BAL cells were collected from immunized mice ($n = 5$ per group) 2 weeks after the final immunization for examination by an ELISPOT assay. These isolated cells were stimulated *in vitro* with syngeneic spleen cells infected with control rhPIV2, rhPIV2–Ag85B, or recombinant Ag85B protein (rAg85B) (10 μ g/ml final concentration) for 24 h. Error bars represent standard deviations. Statistically significant differences are indicated by asterisks (*, $P < 0.05$ compared to the group stimulated with rhPIV2).

2.3. Cell culture

Human bronchial epithelial cells (BEAS cells) and primary cultured normal human bronchial epithelial (NHBE) cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and Lonza (Walkersville, MD). These cells were grown in bronchial epithelial growth medium containing supplements (Lonza). These cells were infected with rhPIV2 or rhPIV2–Ag85B (MOI of 10) or treated with recombinant Ag85B (10 μ g/ml) for 6–48 h in a 37 °C incubator with a 5% CO₂ atmosphere.

2.4. FACS analysis

Spleen, pulmonary lymph node (pLN), and bronchoalveolar lavage (BAL) cells were obtained from immunized mice, and single-cell suspensions were prepared. The cells were incubated with recombinant Ag85B protein (10 μ g/ml final concentration) for 4 h in the presence of Brefeldin A at 37 °C with 5% CO₂. The cells were stained for surface markers with anti-CD3 and anti-CD4 (BD Biosciences, San Jose, CA) for 30 min at 4 °C, followed by fixation for 30 min at 4 °C in 2% paraformaldehyde. IFN- γ was detected by staining with anti-IFN- γ (BD Biosciences) for 30 min at 4 °C. Flow cytometry data collection was performed on a FACS Canto II (BD Biosciences). Files were analyzed using FACSDiva Software (BD Biosciences). BEAS cells infected with rhPIV2–Ag85B were stained with anti-ICAM-1 (BioLegend, San Diego, CA) and analyzed as described above.

2.5. Evaluation of Ag85B-specific immune responses by ELISPOT assay

The number of Ag85B-specific, IFN- γ -secreting cells was determined by the ELISPOT assay according to the method reported previously [11]. Triplicate samples of whole, CD4⁺, and CD8⁺ T cells (separated by a MACS system) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) collected from the spleen, pLN, and BAL were plated at 1×10^6 cells/well. These cells were stimulated by addition of 2×10^5 mitomycin C (Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO)-treated syngeneic spleen cells infected with recombinant vaccinia virus expressing Ag85B or rhPIV2–Ag85B.

2.6. Statistical analysis

Data are presented as means \pm SD. Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney *U* test. Statistically significant differences compared with the control are indicated by asterisks.

3. Results

3.1. Characteristics of rhPIV2–Ag85B

A construction of rhPIV2–Ag85B is shown in Fig. 1A. To examine gene expression levels of the inserted Ag85B, BEAS cells were infected with rhPIV2–Ag85B. Abundant and rapid expression of mRNA of Ag85B was observed in BEAS cells infected with rhPIV2–Ag85B compared with the expression of NP mRNA (Fig. 1B). These results were also confirmed by analysis of protein expression (Fig. 1C). The production of Ag85B was earlier than that of NP, which is usually the earliest synthesized protein in hPIV2 infection.