

ワクチン効果の判定と解析

研究分担者：保富康宏 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

結核ワクチンである BCG は成人の肺結核に対して明確な予防効果は認められない。粘膜より感染を示す病原体には、感染時の粘膜での免疫反応が感染防御等に重要であり、この粘膜免疫を誘導するためには抗原を適切に粘膜面に投与しなければならない。本研究ではパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) に結核抗原を組み込んだ新たな粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発を試みた。HPIV2 に結核菌分泌抗原 Ag85B 遺伝子を組み込んだ結核菌に対する組み換えワクチンを作製したところ、経鼻投与で肺結核を優位に抑制することが示された。また、HPIV2 ベクターには RIG-I を介する自然免疫誘導によるアジュバント効果も存在することが確認された。以上の事から HPIV2 を用いた経鼻結核ワクチンは新たなワクチンとなり得る可能性が示された。

A. 研究目的

新規の結核患者は世界中で毎年 800 万人発生しており、唯一のワクチンである BCG は、小児の結核性髄膜炎並びに粟粒結核に対しては防御効果を示すが、成人の肺結核に対して明確な予防効果は認められない。これらのことから、新規ワクチン開発は急務である。粘膜より感染を示す病原体には、感染時の粘膜での免疫反応が感染防御等に重要であり、この粘膜免疫を誘導するためには抗原を適切に粘膜面に投与しなければならない。つまり、肺結核の防御には適切な手法を用いてワクチン抗原を粘膜面へ投与することが重要である。本研究ではパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) に結核抗原を組み込んだ新たな粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発を目的とした。

B. 研究方法

1. 挿入抗原 Ag85B の確認：リバーシジェネティクス法にて作製した抗酸菌分泌抗原 Ag85B 組み込み HPIV2 (rHPIV2-Ag85B) を Vero 細胞に感染させ、Ag85B と NP タンパクおよび mRNA

の発現を確認した。

2. 感染防御試験：rHPIV2-Ag85B を経鼻投与にてマウスに 2 週間隔 2 ないし 4 回投与した。2 回投与群では Ag85B DNA ワクチンを筋肉内に 2 回投与した。対象には BCG を用いた。投与後、強病原性結核菌 Kurono 株を噴霧感染させ、8 週後の肺および脾臓内の結核菌を測定した (Fig. 1)。

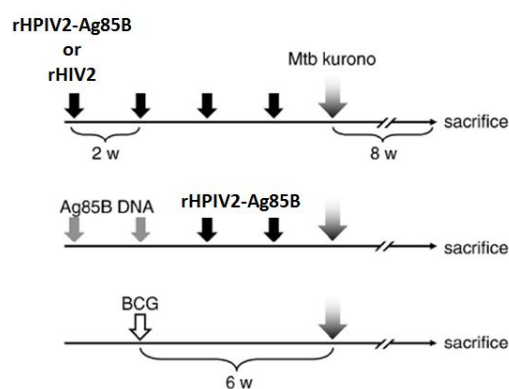


Fig. 1 マウスへの免疫

3. Ag85B 特異的免疫の誘導：上記免疫スケジュールでのマウスのマウス脾臓、肺リンパ節および肺胞洗浄液を用いた Ag85B 特異的 IFN- γ 細胞を ELISPOT にて測定した。

4. 結核菌特異的粘膜免疫の誘導：

rHPIV2-Ag85B を 2 週間隔で 3 回投与し、強病原性結核菌 Kurono 株を噴霧感染後に肺リンパ節細胞および肺胞洗浄液中の CD4⁺IFN- γ 陽性細胞を Facs にて調べた (Fig. 2)

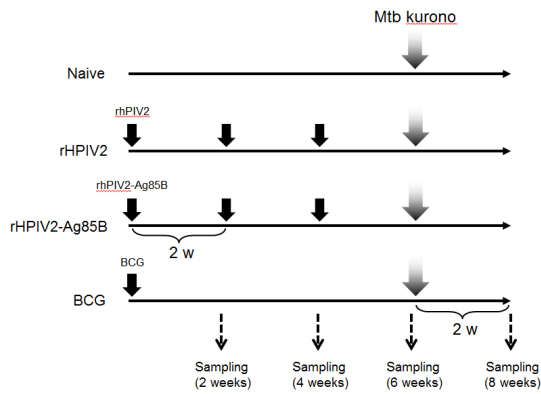


Fig. 2 マウスへの免疫

C. 研究結果

1. 挿入抗原 Ag85B の確認:挿入抗原である Ag85B はウイルス抗原である NP の発現が確認されない感染後 6 時間で細胞に発現が認められた。また、Ag85B mRNA の発現も NP より早く、また 4 倍以上の量が認められた (Fig. 3)

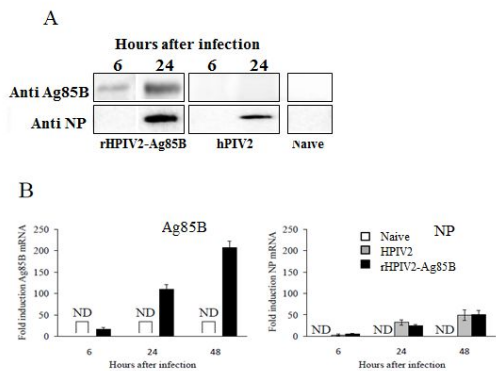


Fig. 3 rHPIV2-Ag85B 感染細胞におけるタンパク(A)とmRNA(B)

2. 高病原性結核菌に対する感染防御効果:脾臓における結核菌は rHPIV2-Ag85B 4 回経鼻投与マウスでわずかであるが有意な抑制効果が認められたが、rHPIV2-Ag85B 2 回、Ag85B DNA ワクチン 2 回投与群と BCG 群に有意な差は認められなかった。しかしながら、肺では rHPIV2-Ag85B は他の群に比べ著しく感

染防御効果が認められた (Fig. 4)

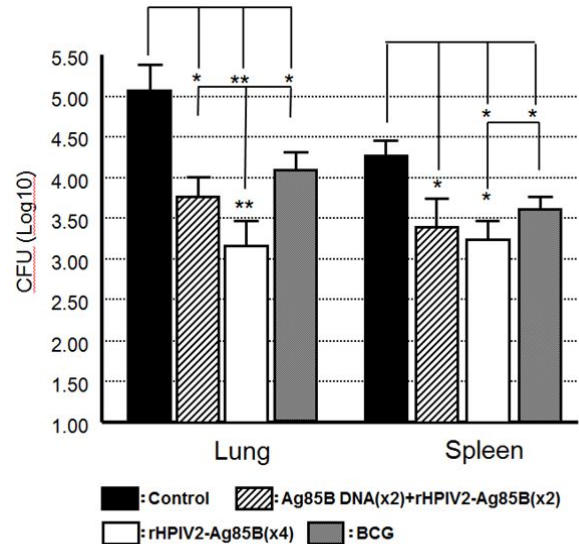


Fig. 4 免疫マウスにおける脾臓および肺における病原性結核菌の抑制効果

3. Ag85B 特異的免疫の誘導:免疫マウスにおいて Ag85B 特異的免疫反応は脾臓、肺リンパ節および肺胞洗浄液中の細胞の全てで確認された (Fig. 5)

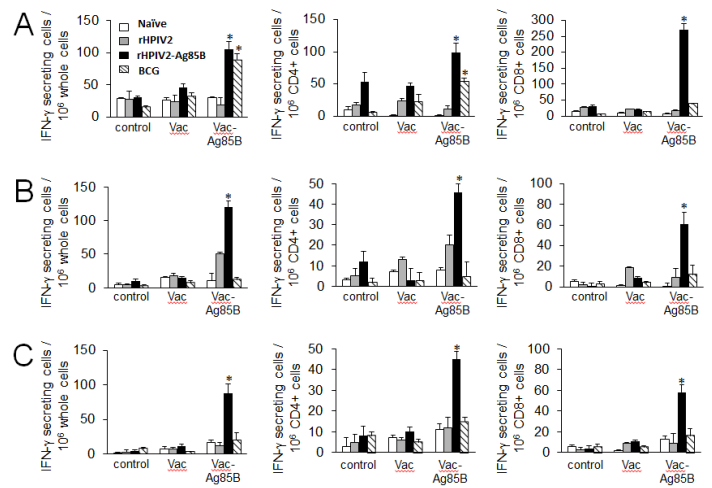


Fig. 5 免疫マウスにおける脾臓細胞(A)、肺リンパ節細胞(B)、肺胞洗浄液細胞(C)のAg85B特異的免疫反応の誘導

4. 結核菌特異的粘膜免疫の誘導: rHPIV2-Ag85B 経鼻投与マウスの肺リンパ節 (LN) と肺胞洗浄液中の Ag85B 特異的エフェクター細胞の浸潤を見たところ、LN では免疫に伴いエフェクター細胞は増加を示した。この様な変化は BCG 投与マウスでは認められなかった。一方、BAL では rHPIV2-Ag85B 免疫では変化を示さなかったが、結核菌の攻撃接種後、急激なエフェクター細胞の増加が認めら

れ、このような反応は BCG 免疫より著しく高いものであった (Fig. 6)。

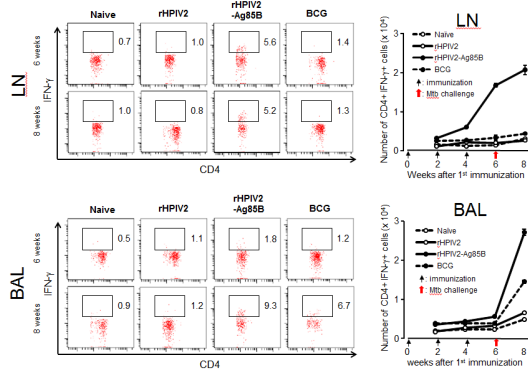


Fig. 6 免疫マウスにおける肺リンパ節細胞(LN)、肺胞洗浄液細胞(BAL)のAg85B特異的細胞の誘導

D. 考察

結核の唯一のワクチンである BCG は、小児の結核性髄膜炎並びに粟粒結核に対しては 80%の防御効果を示すが、成人の肺結核に対して明確な予防効果は認められない。これらのことから、新規ワクチン開発は急務であり、我が国はもとより、世界的に見ても重要な課題である。粘膜より感染を示す病原体には、感染時の粘膜での免疫反応が感染防御等に重要であり、この粘膜免疫を誘導するためには抗原を適切に粘膜面に投与しなければならない。つまり、肺結核の防御には適切な手法を用いてワクチン抗原を粘膜面へ投与することが重要である。HPIV2 は、ヒトの呼吸器粘膜に感染する病原性の低いウイルスである。近年、HPIV2 はリバーシジェネティック法で作製され、安全なウイルスベクターになり得ることが示された。本研究では、結核菌抗原 Ag85B を組み込んだ HPIV2 を用い新たな経鼻投与ワクチンを開発した。本ワクチンの特徴としてベクターウイルス抗原より大量かつ早期に挿入抗原が発現することから他のウイルスベクターと異なり、頻回投与が可能であると考えられる。本研究結果でも投与回数に比例しワクチン量が高いことが示された。また、経鼻投与ワクチンであることから粘膜免疫も期待できる。

以上本研究で用いた HPIV2 をベクターとして用いた結核ワクチンは新たなワクチンとしての可能性が示唆された。

E. 結論

HPIV2 ベクターを用いた結核ワクチンの開発に向けて多様な知見が得られた。

F. 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. and 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;32;1727-1735.
- 2) 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. and Ishii KJ. A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist. *Proc.Natl.Acad Sci. USA* in press
- 3) Wada T, Kohara M, Yasutomi Y. DNA vaccine expressing the non-structural proteins of hepatitis C virus diminishes the expression of HCV proteins in a mouse model. *Vaccine* 2013;31;5968-5974.
- 4) 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 8(7): e66614

- 5) Shimozawa N, Ono R, Shimada M, Shibata H, Takahashi I, Inada H, Takada T, Nosaka T, Yasutomi Y. Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species. *Differentiation*. 2013 85:131-139.
- 6) Tajiri K, Shimojo N, Sakai S, Machino-Ohtsuka T, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Tsujimura Y, Kimura T, Sato A, Yasutomi Y, Aonuma K. Pitavastatin regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2013, 27:413-424.
- 7) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, 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*. 2013 Jun;94(Pt 6):1318-24.
- 8) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Arch Virol*. 2013, 158:1209-20.
- 9) Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ, Horii T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(2) 283-290.
- 10) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes Infect*. 2013 5:56-65.
- ## 2. 学会発表
- 1) 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
- 2) TSUJIMURA Yusuke, YASUTOMI Yasuhiro. The recognition mechanisms of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, in vivo 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年, 千葉
- 3) 加藤誠一 保富康宏 松尾和浩. BCGウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチン第3回感染症若手フォーラム 長崎 2014
- 4) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 抗酸菌分泌抗原を組み込んだ弱毒エイズウイルスの霊長類カニクイザルにおける細胞性免疫反応の解析第61回日本ウイルス学会 神戸 2013年11月10日-12日
- 5) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 産地別SPFカニクイザルを用いたサル免疫不全ウイルスのエイズ病態に関する研究第27回日本エイズ学会 熊本 2013年11月20 - 22日
- 6) 保富康宏 インフルエンザウイルス感染におけるヘルパーT細胞 (Th) の病態への関与 「シンポジウム: もっと効くインフルエンザワクチンを目指して」 第54回日本臨床ウイルス学会 2013年6月8-9日 倉敷
- 7) 保富康宏 教育講演: 「ワクチン開発のストラテジー: HIVワクチン・結核ワクチン開発の経験から」 ワクチン開発に必要な研究を取り巻く環境の重要性 第17回日本ワクチン学会 2013年11月30日-12月1

日 津

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし。

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

粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発

結核菌抗原遺伝子組み込みパラインフルエンザ 2 型ウイルスの作製

分担研究者 野阪 哲哉 三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学分野 教授
河野 光雄 三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学分野 講師

研究要旨 ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) は非分節型マイナス鎖 RNA ウイルスであり、主に乳幼児に呼吸器系感染症を起こすが、ヒト成人における病原性は低いため、安全性の高いベクターとして有用である。我々は V 遺伝子を欠損させることによって hPIV2 ベクターを弱毒化、もしくは HN 遺伝子を欠損させることによって非増殖型に改変し、それらのベクターに結核菌抗原 Ag85B 遺伝子を組み込んだ組換えワクチンの作製を試みた。

A

・研究目的

hPIV2 は乳幼児における呼吸器感染症の病因ウイルスのひとつであるが、ウイルスの生活環がすべて細胞質で行われるので、宿主の染色体に影響を及ぼさず、また、成人には再感染を起こすが、重篤な疾患は引き起こさないため、ベクター化した場合、安全性が高い。さらにその増殖性を減少もしくは廃絶することによって、より安全なウイルスベクターとして利用可能となる。特筆すべきことは、他のベクターと比較して導入遺伝子の発現効率が極めて高いことである。当研究においては、HN 又は V 遺伝子を欠損させた hPIV2 を作製し、結核菌抗原 Ag85B 遺伝子を搭載することによって、経気道感染可能な新規遺伝子組換え結核ワクチンを作製することが目的である。そして、現在の厚生労働行政上の大きな課題のひとつである成人結核を予防し、結核の根絶に向けた貢献をしていくことが目標である。

B . 研究方法

(組換えウイルスワクチン創生のためのコンストラクトの作製)

hPIV2 ゲノム RNA は逆転写酵素にて cDNA に変換し、プラスミド DNA として取り扱う。種々の欠損型 hPIV2 ベクターを作製する。

(組換えウイルスの作製)

培養細胞中で T7 RNA polymerase を用いて上記プラスミドを再度 RNA ゲノムに変換し、ウイルス RNA polymerase と欠損させたウイルス遺伝子産物をトランスに補填することにより遺伝子組換えウイルス粒子を作製する (リバーシジェネティクス法)。

(組換えウイルス作製に必要なヘルパー細胞の作製)

T7 RNA polymerase を発現する BHK 細胞または Vero 細胞にさらに hPIV2 V 蛋白を恒常的に発現させた細胞株を樹立し、組換えウイルス産生に用いる。

(倫理面への配慮)

本分担研究は、ベクター産生のための基礎研究の段階であり、臨床検体も扱わないが、ヒトへの投与などを計画する場合は、事前に三重大学の研究倫理審査委員会からの承認を得る予定である。また、関連共同実験である臨床検体を用いた疫学的解析実験に関しては、すでに三重大学の研究倫理審査委員会の承認を得ている (乳幼児の上気道炎・下気道炎におけるパラインフルエンザ 2 型ウイルス感染の探索、承認 No 2325;成人健常者におけるパラインフルエンザ 2 型ウイルス抗体の探索、承認 No 2319)。組換え DNA 実験委員会の承認 (V 遺伝子欠損型パライ

インフルエンザ 2 型ウイルス(PIV2)ワクチンゲノム cDNA の構築、医-623(変 1); 非増殖型(HN 遺伝子欠損型)パラインフルエンザ 2 型ウイルス(PIV2)を用いた新規ワクチン開発、医-626(変 2))も得られている。動物実験に際しては三重大学動物実験規約を遵守し、事前に詳細な実験計画を申請する。

C. 研究結果

phPIV2 V、phPIV2 V(EGFP)、phPIV2 V(Ag85B)、phPIV2 V(E1726D)(AERAS より供与された 4 種の遺伝子を一括発現するコンストラクト)、phPIV2 HN、phPIV2 HN(EGFP)、phPIV2 HN(Ag85B)、phPIV2 HN(E1726D)を作製した(図 1、図 2)。また、ワクチン用組換えウイルス(hPIV2 V、hPIV2 V(EGFP)、hPIV2 V(Ag85B))を保富グループと共同で作製した(図 1)。hPIV2 HN(EGFP)、hPIV2 HN(Ag85B)については、三重大学単独で作製した(図 2)。hPIV2 V 系ウイルス作製のために必要な構成的 V 蛋白発現 BSRT7/5 細胞(T7 RNA polymerase 産生 BHK 細胞)も樹立した。

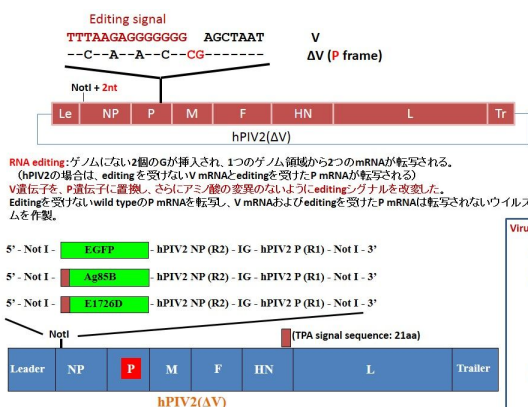


図1. hPIV2ΔV系コンストラクトならびに作製したウイルス

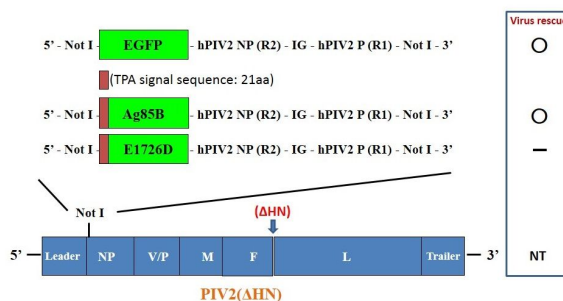


図2. hPIV2ΔHN系コンストラクトならびに作製したウイルス

D. 考察

以上の結果は概ね本研究が順調に進行していることを示すが、V 欠損型 hPIV2 はウイルスの収量が悪く、そのため、宿主細胞のインターフェロンシグナルに関する STAT 蛋白の分解に関わる V 蛋白の C 末端 17、34、48 アミノ酸のみを欠失させた V 遺伝子と、P 遺伝子を別々に発現するゲノム構造をもつ hPIV2(P+V C)およびそのゲノムに上記遺伝子を導入したプラスミドも作製した。これらからのウイルス作製は保富グループと共同で行っている。

E1726D 発現ウイルスに関しては、収量が悪く、その作製条件等を検討する必要があると考えられ、分割して発現させる方法も試している。組換えウイルスの収量を上げるには、導入遺伝子それぞれに対する至適ベクターを選択する必要がある。

E. 結論

HN 遺伝子又は V 遺伝子を欠損させた hPIV2 ベクターを作製し、結核菌抗原である Ag85B を発現する組換えウイルスを産生した。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsurudome M, Nakahashi M, Matsushima Y, Ito M, Nishio M, Kawano M, Komada H, Nosaka T. Full conversion of the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the parainfluenzavirus 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.

Recombinant Ag85B vaccine by

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Hara K, Fukumura M, Ohtsuka J, Kawano M, Nosaka T. 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, Nosaka T, Yamaguchi T. High resolution melting curve assay for rapid detection of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Chemother* 19: 1116-1125, 2013.

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 Jul3; 8(7): e66614.

Ono R, Masuya M, Nakajima H, Enomoto Y, Miyata E, Nakamura A, Ishii S, Suzuki K, Shibata-Minoshima F, Katayama N, Kitamura T, Nosaka T. Plzf drives MLL-fusion-mediated leukemogenesis specifically in long term hematopoietic stem cells. *Blood* 122: 1271-1283, 2013.

Watanabe K, Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K, Yasutomi Y. taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization. *Vaccine* 32: 1727- 1735, 2014.

Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, Nishikawa H, Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, Nosaka T, Shiku H, Katayama N. Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: Potential utility for adoptive immune-therapy. *Exp Hematol* 41: 367-376, 2013.

Shimozawa N, Ono R, Shimada M, Shibata H, Takahashi I, Inada H, Takada T, Nosaka T, Yasutomi Y. Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species. *Differentiation* 85: 131-139, 2013.

2. 学会発表

Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nosaka T. Conversion of the parainfluenza virus 5 F protein to a simian virus 41 HN-specific protein by amino acid substitutions. 15th International Negative Strand Virus Meeting. June 16-21, 2013, Granada, Spain.

小笠良一、野阪哲哉. *MLL* 融合遺伝子による造血細胞の癌化には Plzf を介した異常な自己複製機構が重要である. 第 65 回 日本細胞生物学会大会. シンポジウム 幹細胞研究の新展開 ~ 組織発生から病態まで ~ 6/19-21, 2013, 名古屋.

鶴留雅人、伊藤守弘、西尾真智子、河野光雄、駒田洋、大塚順平、野阪哲哉. *パラインフルエンザウイルスの HN 蛋白と F 蛋白の機能的相互作用の解析.* 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. ミニシンポジウム ウィルス エントリー 11/10-12, 2013, 神戸.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

**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)**

「粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発」

平成25年度 分担研究報告書

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)感染状況に関する研究

研究分担者：庵原 俊昭(国立病院機構三重病院)

研究協力者：菅 秀、中村 晴奈、長尾 みづほ(国立病院機構三重病院)

矢野 拓弥、西中 隆道(三重県保健環境研究所)

研究要旨

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)は乳幼児には感冒様疾患を起こすが、成人には病原性はあまりないといわれている。hPIV2をベクターとした粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンを開発する際、健常人におけるhPIV2特異的抗体価に関する血清疫学、および上気道感染や下気道炎の症状のある小児においてどの程度、hPIV2が病態に関与しているかを把握しておくことが重要である。本邦におけるhPIV2感染に関する詳細な臨床ウイルス学的文献的報告は乏しく、今回の研究を計画するに至った。本年度は、臨床検体解析のための体制整備を行ない、呼吸器感染小児からの検体採取、保存およびクリニカルデータシートによる臨床情報集積を開始した。2013年11月以降に三重病院小児病棟に入院となった患者の中で、呼吸器症状を呈しかつ本研究に関するインフォームドコンセントを取得可能であった症例は現在まで47名であった。男性25名、女性22名で、年齢別症例数は、0歳16名、1歳11名、2歳5名、3歳3名、4歳4名、5歳3名、6歳3名、7歳1名、10歳1名であった。診断名は、気管支炎13名、肺炎13名が最も多く、その他細気管支炎、気管支喘息、インフルエンザ、上気道炎などであった。

A. 研究目的

ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) は乳幼児には感冒様疾患を起こすが、成人には病原性はあまりないといわれている。hPIV2 をベクター化し、外来遺伝子を組む込むことにより、粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンを開発する際、健常人における hPIV2 特異的抗体価に関する血清疫学、および上気道感染や下気道炎の症状のある小児においてどの程度、hPIV2 が病態に関与しているかを把握しておくことが重要である。本邦における hPIV2 感染に関する詳細な臨床ウイルス学的文献的報告は乏しく、今回の研究を計画するに至った。

本研究では、呼吸器感染の症状のある小児の起因ウイルスとして頻度の高いもの数種類と並行して、hPIV2 の感染の有無を PCR にて探索する同時に、近縁ウイルスである hPIV1、hPIV3、hPIV4 も探索し、感染実態を把握する。患者基本情報及び臨床情報も併せて解析を実施し、病態との関連を明らかにすること、健常小児におけるパラインフルエンザ特異的抗体価を測定し、日本における血清疫学を明らかにすること、を目的とする。

B. 研究方法

(1) 呼吸器症状を有する小児における、感染ウイルスの検出、同定

2013 年 11 月より咳嗽、発熱、喘鳴などの症状を呈して国立病院機構三重病院小児病棟に入院した小児より、スワブ採取棒を用いて咽頭粘液を採取した。BD ユニバーサルバイラルトランスポート (ベクトンディッキンソン、日本) に浸漬した後、速やかに -80 で保存した。検体の解析は、三重大学医学系研究科病態解明医学講座 (野阪哲哉教授) で実施する。RNA 抽出は

TRIzol Plus RNA Purification Kit を用いて行い、RT-PCR にて主な気道ウイルス (RS ウイルス、ライノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、インフルエンザウイルス(Flu)A 型、Flu B 型、hPIV1、hPIV2、hPIV3、hPIV4) の検出を行う。

(2) hPIV2 感染症における臨床的特徴の解析

検体採取可能であった症例においては、年齢、性別、発症月、主症状、診断名、臨床検査データ、治療内容、合併症、転帰などの臨床情報を収集した。クリニカルデータシートを作成し、診療録より情報を収集した。

(3) ヒトパラインフルエンザウイルス感染の血清疫学的解析

hPIV1、hPIV2、hPIV3、hPIV4 の特異的抗体価の測定を行う。0 から 15 歳の健常小児の保存血清を使用して、赤血球凝集抑制(HI)抗体価測定を実施する。また、母体から新生児への移行抗体解析のために、臍帯血および母体血における HI 抗体価の測定も実施する。抗体価測定は三重県保健環境研究所で実施する。

(倫理面への配慮)

当研究は三重病院倫理審査委員会(受付番号 23-24)にて承認を受けた。

(1) 対象となる個人の人権の擁護

本研究では、被験者の氏名、住所などの個人情報は収集しない。被験者の同定や照会は、匿名化 ID を用いて行われる。すべての関係者は個人情報保護のため最大限の努力を払う。

(2) 対象となる個人への利益と不利益

被験者に直接的な利益はない。検体採取に侵襲性を有するため肉体的、精神的苦痛の不利益が生じる可能性がある。

(3) 対象となる個人から理解、同意を得る方法
文書による説明および文書による同意を得る。具体的には、研究の目的・背景、研究方法及び

スケジュール、この研究の成果によって医療にどのように貢献できるか、本研究に参加することによる利益おとび不利益、人権、プライバシーの保護、研究協力の任意性と撤回の自由、研究計画書などの開示、費用負担および謝礼に関する事項、研究についての問い合わせ・連絡先、などについて説明する。被験者が小児等の理由で意志の確認が困難な場合は、保護者その他の代理人を代諾者として、同意を得る。研究内容については各主治医から対象者には文書で充分説明の上同意を得て実施している。

C. 研究結果

(1) 2013年11月以降に三重病院小児病棟に入院となった患者の中で、呼吸器症状を呈しかつ本研究に関するインフォームドコンセントを取得可能であった症例は現在まで47名であった。症例の臨床的特徴を以下に記載する。男性25名、女性22名で、年齢別症例数は、0歳16名、1歳11名、2歳5名、3歳3名、4歳4名、5歳3名、6歳3名、7歳1名、10歳1名であった。診断名は、気管支炎13名、肺炎13名が最も多く、その他細気管支炎、気管支喘息、インフルエンザ、上気道炎などであった。

47名採取された咽頭ぬぐい液から、現在ウイルス検出、同定を行っている過程である。

(2) ヒトパラインフルエンザウイルス感染の血清疫学的解析に関しては、現在当院での保存血清を中心に検体の確保を行っている。年齢別抗体保有率解析のため、0から15歳の各年齢20検体、また母体から新生児への移行抗体解析のため、臍帯血50検体、母体血50検体をペアで準備中である。

今後、三重県保健環境研究所においてHI抗体価測定を実施する。

D. 考察

ヒトパラインフルエンザウイルスは世界中に分布し、全年齢において急性呼吸器感染症を引き起こす¹⁾。特に乳幼児においては、軽度の上気道感染症から致死的下気道感染症まで幅広い疾病の原因ウイルスとして重要である。しかしながら、特異的抗ウイルス薬が存在しないこと、ワクチンが存在しないこと、培養細胞を用いたhPIV分離が容易ではなくPCR法による遺伝子検出もあまり積極的に行われていないこと、などの理由から本邦におけるhPIV感染(症)の実態は十分に把握されていない。

三重県における呼吸器系ウイルスの感染症発生動向調査では、2009年から2012年において呼吸器系疾患患者検体からRT-PCR法で17.3%にhPIVが検出されており²⁾、呼吸器感染ウイルスとしてのhPIVの臨床的重要性が示唆されている。

hPIV2をベクター化した粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの臨床応用に関して、安全性を評価、検討するためには、ワクチン接種対象となりうる年齢層のヒトにおけるhPIV2の感染疫学、臨床ウイルス学的検索が必須である。本研究では、呼吸器症状を呈して入院に至った小児より咽頭粘液を採取して、RT-PCR法によりウイルス検出を試みた。検体採取は、0歳から10歳の幅広い年齢層の小児において実施することができ、また気管支炎、肺炎といった重症下気道感染症から上気道炎などの比較的軽度の感染症までの幅広い病像を示す患者を対象とすることが可能であった。クリニカルデータシートを作成し、臨床ウイルス学的解析も可能な体制を整え情報集積も開始しており、今後RT-PCR法によるウイルス検出、同定結果と合わせて検討を行う予定としている。さらに、健常人における感

染疫学を明らかにするために、HI 法を用いた hPIV2 特異的抗体保有率を年齢別に明らかにすることも重要であり、現在 0 歳から 15 歳までの血清を使用した解析を進めている。

E. 結論

臨床検体解析のための体制整備を行ない、呼吸器感染小児からの検体採取、保存を開始した。ベクターウイルスである hPIV2 の国内における感染状況を、臨床ウイルス学的、血清疫学的手法を用いて明らかにすることで、本ワクチンの研究開発のための基礎的データを提供し、結核感染症制御に貢献することが可能になると考える。

(参考文献)

1) Karron RA, Collins PL: Parainfluenza viruses. Fields Virology 6th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer / Lippincott Williams & Wilkins, 996-1023, 2013

2) 矢野拓弥、前田千恵、楠原一、赤地重宏、松野由香里、山寺基子、岩出義人、片山正彦、山口哲夫：三重県におけるパラインフルエンザウイルスの動向。三重保環研年報 57:53-56, 2012

F. 研究発表

1 . 著書、論文

1) 高橋裕明、矢野拓弥、福田美和、山内昭則、大熊和行、庵原俊昭、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

2) 庵原俊昭：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 45:2037-2039, 2013

3) 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、庵原俊昭：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

2 . 学会

1) 菅 秀、長尾みづほ、藤澤隆夫、庵原俊昭：リアルタイムデータベースを用いたインフルエンザ症に入院症例の解析。第 116 回日本小児科学会学術集会 2013.4.19-21 広島

2) 中村晴奈、長尾みづほ、浅田和豊、菅 秀、谷口清州、藤澤隆夫、庵原俊昭：多施設でのインフルエンザ入院症例の経年的検討。第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会 2013.10.27 - 28 札幌

3) 長尾みづほ、二井立恵、伊佐地真知子、菅秀、藤澤隆夫、庵原俊昭：インフルエンザワクチン接種後の局所の腫脹について。第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会 2013.10.27 - 28 札幌

4) 二井立恵、伊佐地真知子、庵原俊昭、高橋裕明、前田一洋、奥野良信：小児のインフルエンザワクチン接種量変更後の HI 抗体価の検討（接種回数と接種時期）。第 17 回日本ワクチン学会学術集会 2013.11.30-12.1 津

G . 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等・再興感染症研究事業）
分担研究報告書（平成 25 年度）

ワクチンベクターに対する自然免疫応答および安全性の検討

石井 健 医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクトプロジェクトリーダー

研究要旨：唯一の結核ワクチンとして BCG が用いられているが、成人の肺結核では予防効果が明確には認められておらず、新たなワクチンの開発が望まれている。ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) は病原性の低いウイルスであり、ウイルスベクターとして期待されているが、一部の遺伝子が I 型インターフェロン産生を抑制するなど、自然免疫との関与も報告されている。本研究では、結核菌抗原 Ag85B を組み込んだ用いた新規ワクチン rhPIV2-Ag85B のウイルスベクターに対する、自然免疫応答の解析と安全性の検討をする事を目的とする。

A. 研究目的

新たな結核菌ワクチンである rhPIV2-Ag85B は従来のワクチンである BCG より強く肺結核を抑制する事が、マウスを用いた研究によりあきらかとなっている。また、カニクイザルにおいても効果が高い結果が得られている。この hPIV2 は病原性が低く、ウイルスベクターとして有用である事が知られているが、一部の遺伝子が自然免疫応答を抑制するなど、ヒトでの応用へ向けて解析すべき事が残されている。本研究では、新規結核ワクチンのウイルスベクターである hPIV2 の自然免疫応答および安全性の検討を目的とする。

B. 研究方法

本研究では、種々の自然免疫関連遺伝子を欠損させたマウス胚性繊維が細胞 (MEF) を作製し、hPIV2 を感染させることによって誘導され得る自然免疫応答を、アレイを用いて網羅的に検討するとともに、詳細な自然免疫応答のメカニズムをあきらかにする。また、hPIV2 の V 遺伝子が自然免疫応答を抑制する事が報告されている。実際に、V 遺伝子の自然免疫応答への関与をあきらかとするために、レポーター遺伝子アッセイを行った。

(倫理面への配慮)

使用された実験動物は、医薬基盤研究所動物実験委員会規程に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減等に配慮した指針に従って実験を行った。ヒト細胞に関しては、医薬基盤研究所倫理委員会の承認を得た上で、倫理面に配慮し、実験を行った。

C. 研究結果

自然免疫応答を解析するために、種々の自然免疫関連遺伝子を欠損している MEF の作製を行った。これら MEF を使用して、現在は感染実験をすすめている。また、hPIV2 の V 遺伝子を細胞に強発現させ、その後の自然免疫応答をレポーター遺伝子アッセイにて検討したが、顕著な抑制を確認する事は出来なかった。

D. 考察

本研究で新たに自然免疫関連遺伝子欠損の MEF を作製した。今後はこの MEF を用いて、ウイルスベクターによる自然免疫応答をあきらかにすることで、実際に起こりうるであろう、生体反応を検討する。また、レポーター遺伝子アッセイでは、V 遺伝子の自然免疫抑制効果が確認出来なかった。この結果を明確にする為に、再度実験を行うとともに、自然免疫関連遺伝子との相互作用を免疫沈降法を用いて検討する。

E. 結論

今回の研究により、新たに種々の遺伝子欠損の MEF の作製に成功した。この細胞を用いて、次年度で詳細な自然免疫活性化のメカニズムを検討して行く。また、V 遺伝子による自然免疫抑制効果が確認出来なかったため、V 遺伝子と自然免疫応答に関しても、詳細な解析を行っていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 11) 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, Ishii KJ. Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014 Feb 10.
- 12) Ono C, Ninomiya A, Yamamoto S, Abe T, Wen X, Fukuhara T, Sasai M, Yamamoto M, Saitoh T, Satoh T, Kawai T, Ishii KJ, Akira S, Okamoto T, Matsuura Y. Innate Immune response induced by baculovirus attenuates transgene expression in Mammalian cells. *J Virol*. 2014;88(4):2157-67.
- 13) Kobiyama K, Jounai N, Aoshi T, Tozuka M, Takeshita F, Coban C and Ishii KJ. "Innate Immune Signaling by, and Genetic Adjuvants for DNA Vaccination" *Vaccines* 2013, 1, 278-292; doi:10.3390/vaccines1030278.

- 14) Kuroda E, Coban C, Ishii KJ. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *Int Rev Immunol.* 2013;32(2):209-20.
- 15) Halder SK, Matsunaga H, Ishii KJ, Akira S, Miyake K, Ueda H. Retinal cell type-specific prevention of ischemia-induced damages by LPS-TLR4 signaling through microglia. *J Neurochem.* 2013 126(2):243-60.
- 16) Palacpac NM, Ntege E, Yeka A, Balikagala B, Suzuki N, Shirai H, Yagi M, Ito K, Fukushima W, Hirota Y, Nsereko C, Okada T, Kanoi BN, Tetsutani K, Arisue N, Itagaki S, Tougan T, Ishii KJ, Ueda S, Egwang TG, Horii T. Phase 1b randomized trial and follow-up study in Uganda of the blood-stage malaria vaccine candidate BK-SE36. *PLoS One.* 2013 28;8(5):e64073.
- 17) Kobiyama K, Kawashima A, Jounai N, Takeshita F, Ishii KJ, Ito T, Suzuki K. Role of Extrachromosomal Histone H2B on Recognition of DNA Viruses and Cell Damage. *Front Genet.* 2013 May 23;4:91.
- 18) Tang CK, Aoshi T, Jounai N, Ito J, Ohata K, Kobiyama K, Dessailly BH, Kuroda E, Akira S, Mizuguchi K, Coban C, Ishii KJ. The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant. *PLoS One.* 2013;8(3):e60038. doi:10.1371/journal.pone.0060038.
- 19) Coban C, Kobiyama K, Jounai N, Tozuka M, Ishii KJ. DNA vaccines: A simple DNA sensing matter? *Hum Vaccin Immunother.* 2013 2;9(10).
- 20) Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, Komatsu K, Akira S, Kawai T. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23388631.
- 21) Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:168.
- 22) Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ, Horii T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum Vaccin Immunother.* 2013 9(2). [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23291928.
- 23) Shiraishi K, Hamano M, Ma H, Kawano K, Maitani Y, Aoshi T, Ishii KJ, Yokoyama M. Hydrophobic blocks of PEG-conjugates play a significant role in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon. *J Control Release.* 2013 165(3):183-90.
- 24) Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii KJ, Coban C. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. *Cell Host Microbe.* 2012 12(5):705-16.
- 25) Nakayama T, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody responses in young children. *Vaccine.* 2012 30(52):7662-6.
- 26) Tetsutani K, Ishii KJ. Adjuvants in influenza vaccines. *Vaccine.* 2012 30(52):7658-61.
- 27) Shoji M, Tachibana M, Katayama K, Tomita K, Tsuzuki S, Sakurai F, Kawabata K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. Type-I IFN signaling is required for the induction of antigen-specific CD8(+) T cell responses by adenovirus vector vaccine in the gut-mucosa. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 425(1):89-93.
- 28) Desmet CJ, Ishii KJ. Nucleic acid sensing at the

- interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2012 12(7):479-91.
- 29) Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions. *Vaccine.* 2012 30(26):3885-90.
- 30) 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, 2013 60(40):454-462
- 31) 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
- 32) 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): 172-17513)
- 33) 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): 209-21614)
- 34) 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
- 35) 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
- 36) 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
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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
- 8) Kobiyama K, Ishii KJ. K3-SPG is a novel nano-particulate 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.
- 9) 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

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）

「粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発」

研究報告書

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 µg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、2cmの薄片に切断し、0.5mM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、0.5mg/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である。

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 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 (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 pneumonia 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

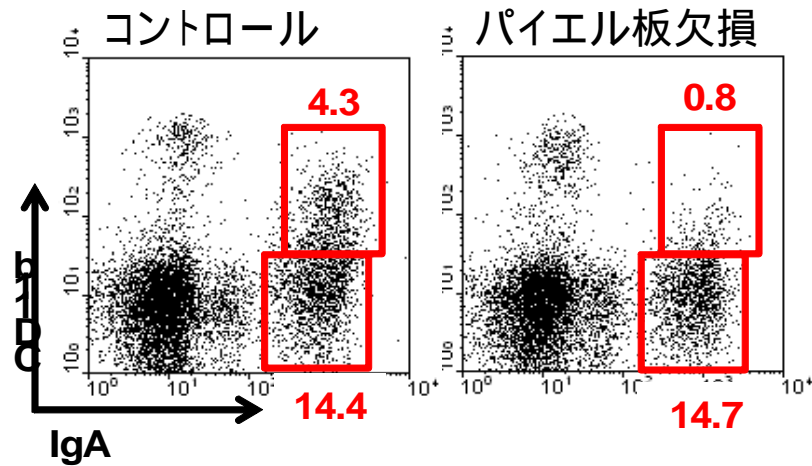


図1 胎生14.5日目に抗IL-7受容体阻害抗体を投与することでパイエル板を欠損させたマウス(右)とコントロール抗体を投与したマウス(左)の腸管から単核球を回収し、**CD11b**と**IgA**でFACS解析したところ、パイエル板欠損マウスで**CD11b**陽性**IgA**細胞の減少が認められた。

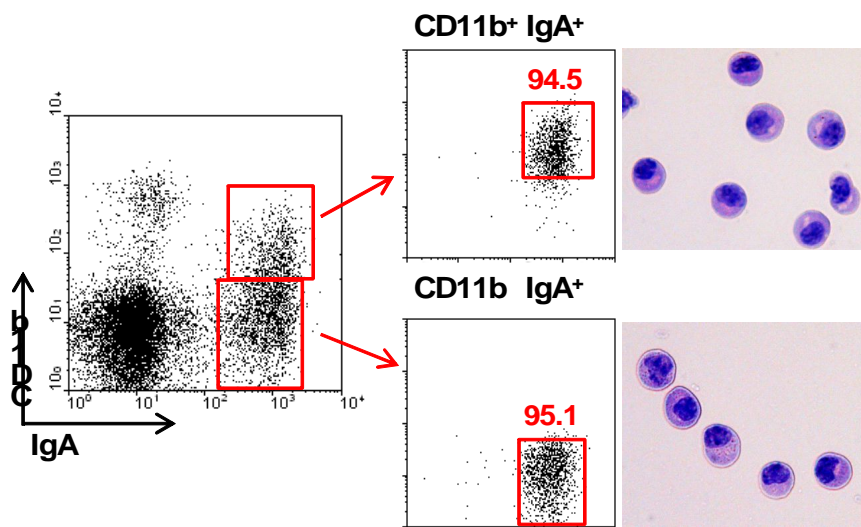


図2 Cell sortingにより腸管固有層より分離・精製した各分画の形態を観察したところ、**CD11b**陽性**IgA**細胞、**CD11b**陰性**IgA**細胞共に抗体産生細胞である形質細胞としての形態を示す細胞が均一に観察された。

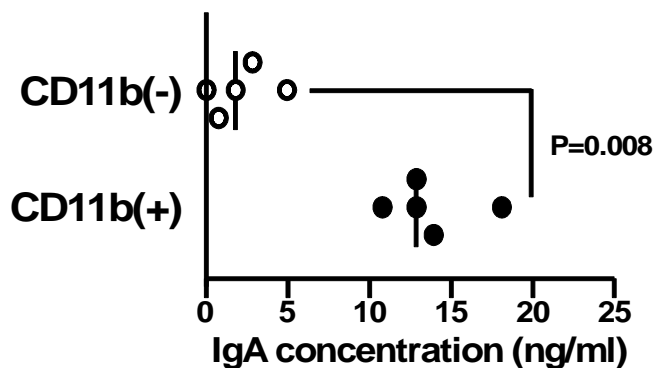


図3 Cell sortingにより腸管固有層より分離・精製したCD11b陽性IgA細胞とCD11b陰性IgA細胞をそれぞれSCIDマウスに移入した。移入1週間後に糞便中のIgA量をELISA法にて定量した。

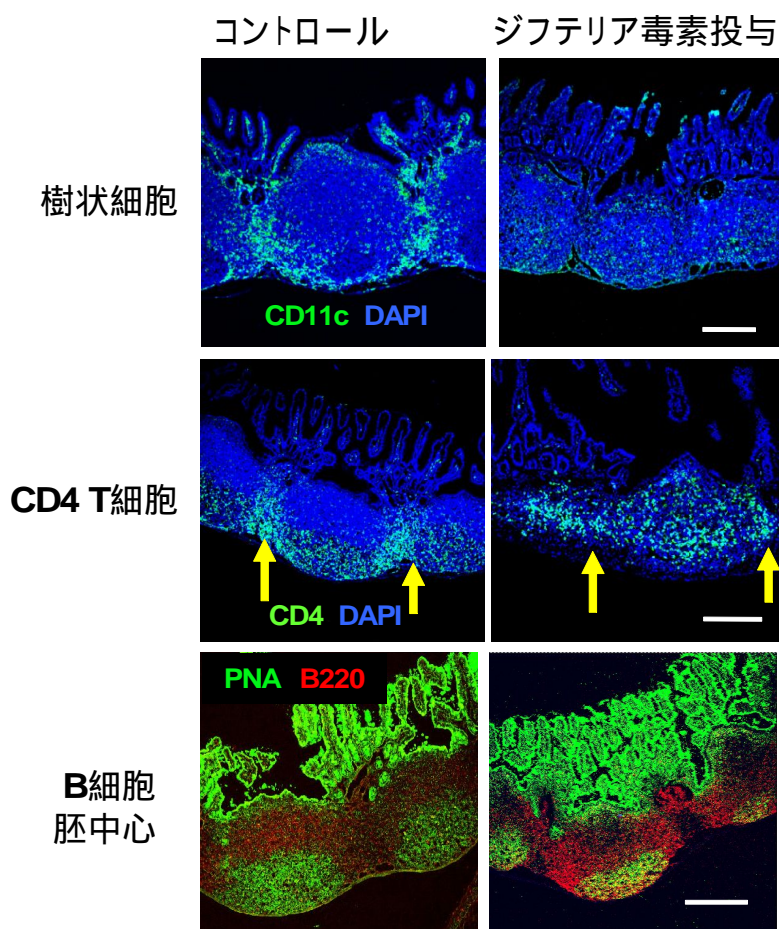


図4 CD11c-DTRにジフテリア毒素を投与するとパイエル板におけるCD11c陽性樹状細胞の消失が認められる(上段)。同一のパイエル板においては、CD4陽性T細胞の濾胞間領域(矢印)からの消失が認められるが(中段)、B220陽性B細胞やPNA陽性胚中心の形成にはほとんど変化がない(下段)。

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学的解析を行った。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

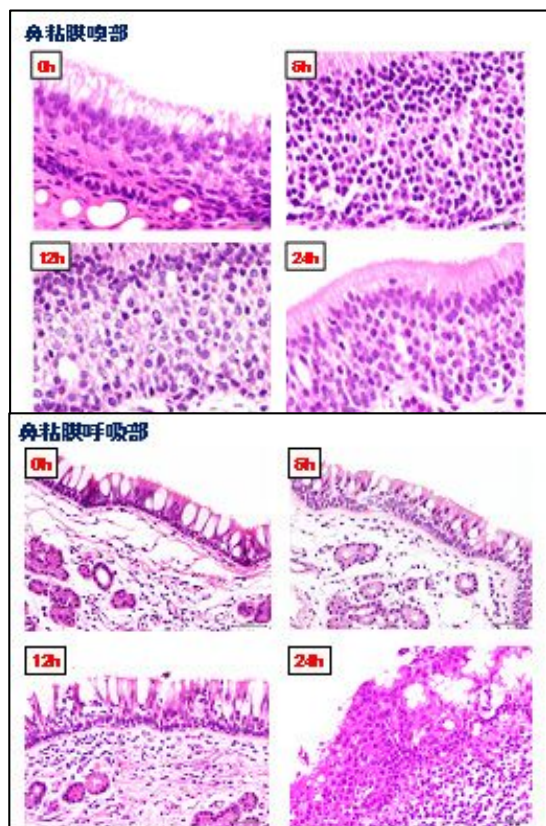
を高めるために、鼻粘膜を骨膜とともに周囲骨組織から丁寧に剥離し、脱灰処理を行わずに HE 染色を行った。

(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℃、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℃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 5.0×10^3 /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プルー試薬 (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 *Xho*I を付加したコドン最適化したDNAを合成し、pUC19の *Sma*I サイトに挿入したものの (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 *Xho*I で切断して切り出し、pCAGGSベクターの *Xho*I 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 *Bbs*I 及び *Bsu*36I 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に、末端平滑化し、pCAGGS-VoptおよびpCAGGS-HNoptベクターの末端平滑化 *Sa*II 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)。

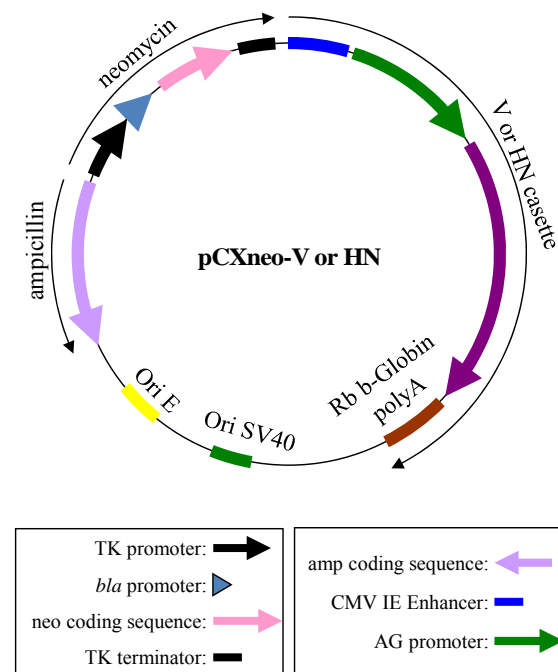


図1 VおよびHN発現ベクターの構造

(4) トランスフェクション

6穴プレートに $2.0-5.0 \times 10^5$ /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 $2.0 \mu\text{g}$ とX-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche社製) $5.0 \mu\text{l}$ の割合で $200 \mu\text{l}$ 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 /5分、[94 /30秒、68 /30秒、72 /1分 (V) 又は2分 (HN)] x 35サイクル、72 /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 /5分、[94 /30秒、66 /30秒、72 /1分 (V) 又は2分 (HN)] x 35サイクル、72 /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 /5分、[94 /30秒、66 /30秒、72 /1分] x 35サイクル、72 /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 /5分、[94 /30秒、66 /30秒、72 /1分] x 35サイクル、72 /5分で行った。

(7) ウェ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碎液を作製する。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。

(8) 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。

	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

表1 凍結保存Vero細胞クローンの生存率

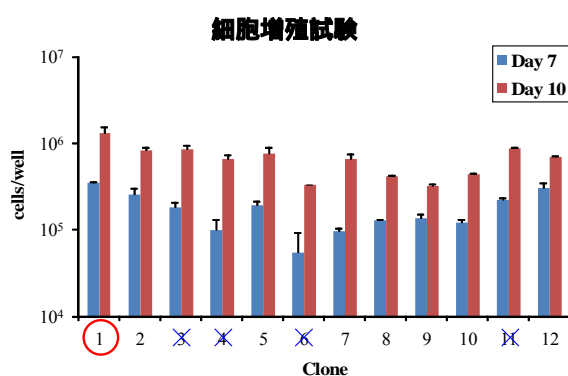


図2 Vero細胞クローンの増殖能の比較

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)。

(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)。

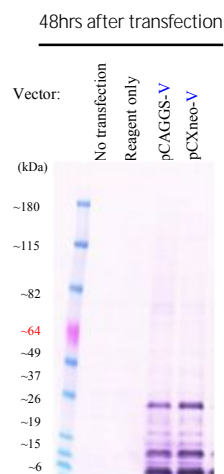


図3 V蛋白質のウエスタンブロット解析

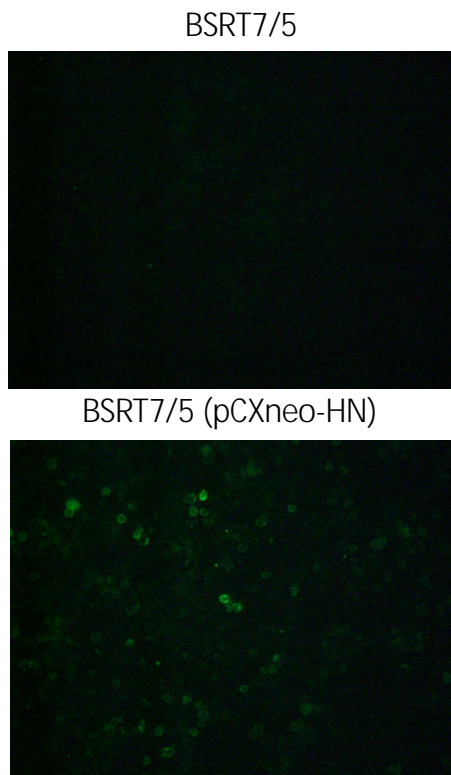


図4 蛍光抗体法によるHN遺伝子導入細胞 (BSRT7/5細胞) でのHN蛋白質の発現

(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。

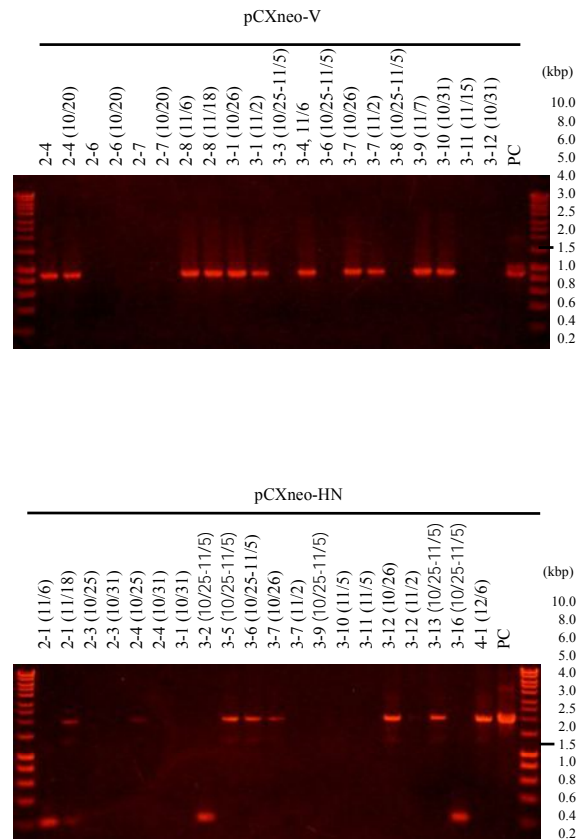


図5 Nested PCRによる導入遺伝子の検出
上段：V遺伝子、下段：HN遺伝子

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。

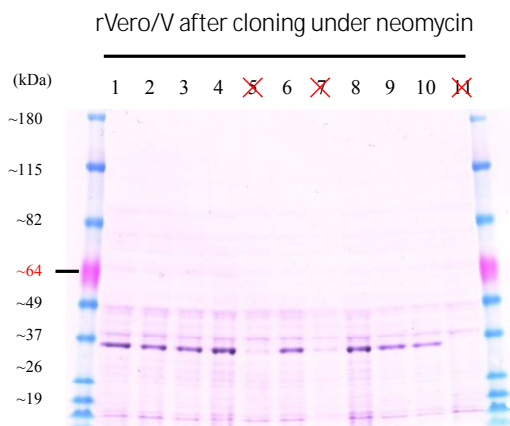


図6 ウェスタンブロットによるV遺伝子導入Vero細胞クローンでのV蛋白質発現解析

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落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

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