

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

平成 26 年度分担研究報告書

システムワクチンによる粘膜アジュバント開発研究

研究分担者：東京大学医科学研究所

教授 清野 宏

特任助教 朴 恩正

研究要旨

次世代粘膜ワクチンである Mucorice-CTB は長期室温安定なコールドチェーンフリー、注射針・注射器不要な経口コメ型ワクチンであり、消化酵素抵抗性や長期間の防御免疫の誘導・維持効果のあることが動物実験で証明された。本分担研究では、Mucorice-CTB のマウス投与を通じ防御免疫誘導・維持機構の分子基盤を理解し、その情報に基づく新規粘膜免疫誘導・増強効果のある分子・バイオマーカーの同定を行い Mucorice-CTB の臨床応用に向けての研究を推進する。平成 26 年度は、Mucorice-CTB 経口投与後、抗原特異的抗体産生と防御免疫誘導・維持に関連するマイクロ RNA 候補群の発現を粘膜免疫関連組織で確認し、その標的・関連分子群の究明を行った。さらに、平成 27 年度に始まる Mucorice-CTB のヒトでの医師主導型臨床治験（Phase I）に向けて準備を進めており、本動物実験の結果は臨床検体のマイクロ RNA 解析の成果の重要な基礎資料ともなる。

A. 研究目的

コメにワクチン抗原を発現させた Mucorice システムは抗原の消化酵素耐性付与に加え、常温で長期安定なワクチンである。抗原にコレラトキシン B 鎖(CTB)を用いることで、コレラ菌のみならず、毒素原性大腸菌下痢症に対する交叉免疫も期待できる次世代型経口ワクチンである (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104:10986-91, 2007; Vaccine 27:5982-88, 2009; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107:8794-99, 2010)。更に、長期間に及ぶ防御免疫の誘導・維持効果があることも動物実験で証明されている。(J. Immunol. 15:183(10):6538-44, 2009) この防御免疫誘導・維持は、経口投与される Mucorice-CTB がパイエル板の上皮に存在

する M 細胞に取り込まれ、免疫担当細胞により抗原特異的血清 IgG と粘膜 IgA の産生を誘導することによって出来ると考えられている。しかしながら、Mucorice-CTB の経口投与後、誘導された中和抗体やメモリーリンパ球の維持機構の分子免疫メカニズムについてはまだ明らかになっていない。その解明は新規の粘膜アジュバント開発に向けての基盤的情報となる。

この分担研究で、我々は 防御免疫誘導・維持において、特定のバイオマーカーマイクロ RNA とそのターゲット遺伝子の分子免疫学的役割を解析している。平成 26 年度には、Mucorice-CTB の経口投与におけるマイクロ RNA とその標的分子・関連分子群の発現調節作用の分子機構と、その相互作用への関与も含めた、抗原特異的粘膜防御免疫誘導・維持に関する解

明を目指した研究を行っている。

B. 研究方法

1) MucoRice-CTB 経口免疫

MucoRice-CTB 粉末剤 100 mg (CTB として 0.1 mg) を PBS 0.5 ml に溶かして、Balb/c マウスに 2 週間隔で 4 回経口免疫した。コントロールグループには、同じ量の通常米 (WT: 日本晴れ) の粉末剤を同条件で経口投与した。

2) Luciferase reporter assay

Luciferase 遺伝子発現システムを含有する pGL3 遺伝子ベクターに Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 遺伝子の 3' -UTR 配列をクローニングした。HEK293T 細胞株に pGL3/AhR3' -UTR プラスミドと miR-375 を co-transfection (lipofectamine 2000) させ、24~48 時間細胞培養後 luciferase activity をルミノメータ (Lumat LB9507) にて測定した。コントロールは scrambled miRNA または AhR3' - UTR-mutant (配列内結合遺伝子変換) を用いた。

3) Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

TSLPR-WT または TSLPR-欠損マウスに MucoRice-CTB を 4 回経口投与後、抗原特異的全身型血清 IgG と分泌型粘膜 IgA 抗体の産生を ELISA で解析した。

4) Cholera toxin challenge assay

MucoRice-CTB の 4 回経口投与した TSLPR-WT または TSLPR-欠損マウスに 25 μ g のコレラ毒素を経口投与させた。14 時間後下痢を確認した後マウスの腸内水分含量を測定した (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104:10986-91, 2007)。

(倫理面への配慮)

本研究の目的のために実施される動物実験計画は、東京大学医科学研究所、動物実験委員会への申請をもとに、倫理面を含む審査・承認を受けた。また、本実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関

する基本指針」(文部科学省告示第 71 号平成 18 年 6 月 1 日) に基づく研究施設の動物実験ガイドラインに則り、動物の保定法・麻酔の方法・接種法・飼育観察法など、実験動物に対しての苦痛を可能な限り軽減できる方法で実施した。

C. 研究結果

MucoRice-CTB 経口免疫後、miR-375 発現上昇が小腸組織で確認され、さらに、その一つの標的分子だと予想される AhR 遺伝子の発現低下が小腸組織特異的に確認された。AhR が miR-375 の標的分子であることを証明するために、pGL3-AhR3' -UTR を transfection した HEK293T 細胞株での luciferase reporter assay を行った。その結果、コントロール (scrambled miRNA) に比べて miR-375 の処理した細胞で luciferase activity が半分程度に減少した。ターゲット遺伝子のネガティブコントロールである pGL3-AhR3' -UTR-mutant を transfection した場合、miR-375 処理による luciferase activity 減少はなかった。従って、AhR が miR-375 の標的分子であることが証明され、MucoRice-CTB 経口免疫後バイオマーカー miR-375 の遺伝子調節作用によって AhR の発現減少が抗原特異的の免疫反応の誘導に関与すると考えられる。

一方、抗原提示細胞 (B 細胞、樹状細胞等) の活性化分子であり、粘膜アジュバント候補としても考えられている thymic stromal lymphopoietin (TSLP) (Nat. Immunol. 11:289-93, 2010、Eur. J. Immunol. 42:353-63, 2012) の発現が、MucoRice-CTB の経口投与後、小腸上皮組織で顕著に増加されることが分かった。また我々は、TSLP レセプター (TSLPR) 欠損マウスを用いて、TSLP-TSLPR 相互作用系が、抗原特異的分泌型 IgA 抗体産生が誘導され、コレラ毒素暴露による下痢発症緩和に必要なことを強く示唆する結果を得ている。

更に、MucoRice-CTB の実用化に向けては、コメ型経口ワクチン GMP 生産施設に

関する確認申請は平成 26 年に承認され、本年度は治験用原薬の製造が行われている。また、平成 27 年 1 月 23 日に PMDA との対面助言を行い、平成 27 年 7 月に東大医科研附属病院で実施予定の医師主導型 Phase I 臨床試験（治験）の準備を行っている。

D. 考察

MucoRice-CTB の経口投与後マイクロ RNA（例、miR-375）の標的分子（例、AhR）の発現調節作用が、TSLP-TSLPR のシグナリングに直接的な影響を与えるのではないかと考えられている。その仮説を基にして、抗原特異的粘膜防御免疫誘導・維持に関する分子的機構の解明を目指した研究を行っている。さらに、miR-375 をはじめとする新規分子群のヒトでの検証を進め、抗原特異的分泌型 IgA 産生誘導への関わりを検討した。MucoRice-CTB の治験では 1g（CTB 3mg）、3g（CTB 9mg）、6g（CTB 18mg）粉末製剤を 3 ドーズで投与が予定されており、投与前後の血清検体を用いて、マイクロ RNA アレイによる網羅的解析を実施予定であり、miR-375 を含むマイクロ RNA の増減とワクチンによる免疫応答の相関を含めてバイオマーカーになりうるマイクロ RNA を検索していく予定である。

E. 結論

コメ型ワクチンである MucoRice-CTB をマウスに経口投与した後、全身系と粘膜系組織で顕著に増加したマイクロ RNA バイオマーカー（e.g., miR-375）とその標的分子（e.g., AhR）、それから関連分子シグナリング経路（e.g., TSLP-TSLPR）が発見された。現在、このバイオマーカー群が MucoRice-CTB 経口免疫による一連の免疫応答ループとして、抗原特異的免疫応答性誘導・維持のために働くのではないかと予測され、今後検討していく予定である。

F. 健康危機情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Journals (Refereed)

1. Abe, M., Yuki, Y., Kurokawa, S., Mejima, M., Kuroda, M., Park, E.J., Scheller, J., Nakanishi, U. and **Kiyono, H.** 2014. A rice-based soluble form of a murine TNF-specific llama variable domain of heavy-chain antibody suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J. Biotechnol.* 10:175:45-52.
2. Hiyama, S., Iijima, H., Shinzaki, S., Inoue, T., Shiraishi, E., Kawai, S., Araki, M., Kato, M., Hayashi, Y., Nishida, T., Fujii, H., Mukai, A., Shibata, N., Sato, S., **Kiyono, H.**, Gotoh, K., Motooka, D., Nakamura, S., Iida, T., Tsujii, M., and Takehara, T. 2014. Peyer's patches play a protective role in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy in mice. *Inflamm Bowel Dis.* 20:790-799.
3. Masahata, K., Umemoto, E., Kayama, H., Kotani, M., Nakamura, S., Kurakawa, T., Kikuta, J., Gotoh, K., Motooka, D., Sato, S., Higuchi, T., Baba, Y., Kurosaki, T., Kinoshita, M., Shimada, Y., Kimura, T., Okumura, R., Takeda, A., Tajima, M., Yoshie, O., Fukuzawa, M., **Kiyono, H.**, Fagarasan, S., Iida, T., Ishii, M., and Takeda, K. 2014. Generation of colonic IgA-secreting cells in the cecal patch. *Nat Commun.* 5:3704.
4. Kurashima, Y., Amiya, T., Fujisawa, K., Shibata, N., Suzuki, Y., Kogure, Y., Hashimoto, E., Otsuka, A., Kabashima, K., Sato, S., Sato, T., Kubo, M., Akira, S., Miyake, K., Kunisawa, J., and **Kiyono, H.** 2014. The enzyme cyp26B1 mediates inhibition of

- mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis. *Immunity*. 40:530-541.
5. Kunisawa, J., Hashimoto, E., Inoue, A., Nagasawa R., Suzuki, Y., Ishikawa, I., Shikata, S., Arita, M., Aoki, J. and **Kiyono, H.** 2014. Regulation of intestinal IgA responses by dietary palmitic acid and its metabolism. *J. Immunol.* 193:1666-1671
 6. Okura, H., Sato, S., Kishikawa, S., Kaneto, S., Nakashima, T., Yoshida, N., Takayanagi, H. and **Kiyono, H.** 2014. Runx2-I isoform contributes to fetal bone formation even in the absence of specific N-terminal amino acids. *PLoS One.* 9(9):e108294.
 7. Goto, Y., Obata, T., Kunisawa, J., Sato, S., Ivanov, I., Lamichhane, A., Takeyama, N., Kamioka, M., Sakamoto, M., Matsuki, T., Setoyama, H., Imaoka, A., Uematsu, S., Akira, S., Domino, S., Kulig, P., Becher, B., Renauld, J-C., Sasakawa, C., Umesaki, Y., Benno, Y. and **Kiyono, H.** 2014. Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science* 345(6202):1254009.
 8. Nakajima-Adachi, H., Kikuchi, A., Fujimura, Y., Shibahara, K., Makino, T., Goseki-Sone, M., Kihara-Fujioka, M., Nochi, T., Kurashima, Y., Igarashi, O., Yamamoto, M., Kunisawa, J., Toda, M., Kaminogawa, S., Sato, R., **Kiyono, H.** and Hachimura, S. 2014. Peyer's patches and mesenteric lymph nodes cooperatively promote enteropathy in a mouse model of food allergy. *PLoS One.* 9(10):e107492.
 9. Tokuhara, D., Nochi, T., Matsumura, A., Mejima, M., Takahashi, Y., Kurokawa, S., **Kiyono, H.** and Yuki Y. 2014. Specific expression of apolipoprotein A-IV in the follicle-associated epithelium of the small intestine. *Dig. Dis. Sci.* 59:2682-2692
 10. Sato, A., Suwanto, A., Okabe, M., Sato, S., Nochi, T., Imai, T., Koyanagi, N., Kunisawa, J., Kawaguchi, Y. and **Kiyono, H.** 2014. Vaginal memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for protective T cell recruitment and prevention of genital HSV-2 disease. *J Virol.* 88(23):13699-13708.
 11. Suenaga, F., Ueha, S., Abe, J., Kosugi-Kanaya, M., Wang, Y., Yokoyama, A., Shono, Y., Shand, F. H., Morishita, Y., Kunisawa, J., Sato, S., **Kiyono, H.** and Matsushima, K. 2015. Loss of lymph node fibroblastic reticular cells and high endothelial cells is associated with humoral immunodeficiency in mouse graft-versus-host disease. *J Immunol.* 194(1):398-406.
 12. Tsai, S-H., Kinoshita, M., Kusu, T., Kayama, H., Okumura, R., Ikeda, K., Shimada, Y., Takeda, A., Yoshikawa, S., Obata-Ninomiya, K., Kurashima, Y., Sato, S., Umemoto, E., **Kiyono, H.**, Karasuyama, H. and Takeda, K. 2015. The ectoenzyme E-NPP3 negatively regulates ATP-dependent chronic allergic responses by basophils and mast cells. *Imunnity* 42(2):279-293.
 13. Mejima, M., Kashima, K., Kuroda, M., Takeyama, N., Kurokawa S., Fukuyama Y., **Kiyono H.**, Itoh, K., Mitsui, T., and Yuki, Y. 2015. Determination of genomic location and structure of the transgenes in marker-free rice-

based cholera vaccine by using whole genome resequencing approach. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 120:35-48

14. Kashima, K., Mejima, M., Kurokawa, S., Kuroda, M., **Kiyono, H.** and Yuki, Y. 2015. Comparative whole-genome analyses of selection marker-free rice-based cholera toxin B-subunit vaccine lines and wild-type lines. *BMC Genomics* 16(1):48.
15. Fukuyama, Y., Yuki, Y., Katakai, Y., Harada, N., Takahashi, H., Takeda, S., Mejima, M., Joo, S., Kurokawa, S., Sawada, S., Shibata, H., Park, EJ., Fujihashi, K., Briles, D., Yasutomi, Y., Tsukada, H., Akiyoshi, K., **Kiyono, H.** 2015. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal Immunol.* (in press)
16. Kishida, K., Kohyama, M., Kurashima, Y., Kogure, Y., Wang, J., Hirayasu, K., Suenaga, T., **Kiyono, H.**, Kunisawa, J. and Arase, H. Negative regulation of DSS-induced experimental colitis by PILR α . 2015. *Int. Immunol.* (in press)
17. Tada, R., Hidaka, A., Iwase, N., Takahashi, S., Yamakita, Y., Iwata, T., Muto, S., Sato, E., Takayama, N., Honjo, E., **Kiyono, H.** and Kunisawa, J. 2015. Intranasal immunization with DOTAP cationic liposomes combined with DC-cholesterol induces potent antigen-specific mucosal and systemic immune responses in mice, *PLOS ONE* (submitted)
18. Lamichhane, A., Goto, Y., Kamioka, M. Sato, S., Honda, K., Kunisawa, J. and **Kiyono H.**

2015. IL-10-producing CD4+ T cells negatively regulate fucosylation of epithelial cells in the gut. *Scientific Reports* (in revision)

Reviews (Refereed)

1. Fujihashi, K., Sato S., and **Kiyono, H.** 2014. Mucosal adjuvants for vaccines to control upper respiratory infections in the elderly. *Exp. Gerontol.* 54:21-6.
2. Kurashima, Y. and **Kiyono, H.** 2014. New era for mucosal mast cells: their roles in inflammation, allergic immune responses and adjuvant development. *Exp. Mol. Med.* 46:e83.
3. Azegami, T., Yuki, Y., and **Kiyono, H.** 2014. Challenge in mucosal vaccines for the control of infectious diseases. *Intern. Immunol.* 26:517-528.
4. Lamichhane, A., Azegami, T. and **Kiyono, H.** 2014. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine* 32(49):6711-6723.
5. Azegami, T., Itoh, H., **Kiyono, H.** and Yuki, Y. 2015. Novel transgenic rice-based vaccines. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 63:87-99.
6. Kunisawa J. and **Kiyono H.** Vitamins mediate immunological homeostasis and diseases at the surface of the body. 2015. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 15(1):25-30.
7. Sato, S., **Kiyono, H.** and Fujihashi, K. 2015. Mucosal immunosenescence in the gastrointestinal tract: A mini-review. *Gerontology* (in press)

JAPANESE JOURNALS,
REVIEWS

1. Fukuyama, Y., and **Kiyono, H.** 2014. Development for the new generation of mucosal vaccine. The Medical Frontline (SAISHIN-IGAKU), Saishinigaku-sha, 69(4):62-69.
2. Azegami, T. and **Kiyono, H.** 2014. Mucosal immunology. Journal of Clinical and Experimental Medicine (IGAKU NO AYUMI), Ishiyaku Publishers, Inc. 249(5):396
3. Kashima, K., Yuki, Y. and **Kiyono, H.** 2014. Challenge on developing novel oral vaccines. BIO INDUSTRY, CMC Publishing CO., LTD. 31(6):4-10
4. Takasato, Y., Kurashima, Y., **Kiyono, H.** and Kunisawa, J. 2014. Current status in the development of new generation of anti-allergic mucosal vaccine. BIO INDUSTRY, CMC Publishing CO., LTD. 31(6):55-60
5. Goto, Y. and **Kiyono, H.** 2014. Regulation of intestinal epithelial cell glycosylation by innate lymphoid cells. Molecular Gastrointestinal Medicine 11(4):86-88 (Sentan-igaku-sha)
6. Kurashima Y., **Kiyono, H.** and Kunisawa, J. 2014. Purinergic signaling mediates mast cell activation in the intestinal inflammation Seikagau, The Japanese Biochemical Society, 86(6): 798-802.
7. Goto, Y. and **Kiyono, H.** Regulation of epithelial

glycosylation for the development of intestinal barrier system. 2015. Experimental Medicine, (JIKKEN-IGAKU), YODOSHA, 33(4):544-549.

2. 学会発表

SKIL Future Forum -Science Leads to Safe Life-” Fusion of Medical, Plant and Engineering Science Led to the Creation of Rice-based Vaccine, MucoRice” Invited Speaker, April, 2014. Tokyo, Japan.

Seminar for Knowledge of Hub, National University Joint Usage-Research Center, Invited Speaker, “Can We Prevent Infectious Diseases by Rice?” April, 2014. Tokyo, Japan.

7th International Immunonutrition Workshop -Eating for Preventing-, Invited Speaker, “Mucosal Connections between Microbial Ecology and Immunity for the Homeostasis and Inflammatory Responses”, May, 2014. Carovigno, Italy.

The 13th Shikoku Immunology Forum 2014, Special Lecture, “Development of Mucosal Immunology Driven Rice-based Vaccine “MucoRice” by the Fusion Research of Medical, Agricultural and Engineering Sciences”, June, 2014. Tokushima, Japan.

The 38th Aso Symposium 2014. Invited Speaker, “Reciprocal Cooperation of Intra-tissue Commensal Bacteria, Innate Lymphoid Cells and Mast Cells for the Integrated Mucosal Immunoregulation”, July, 2014. Kumamoto, Japan.

JSI organized Public Lecture Series Meneki Fushigi Mirai 2014. Invited Speaker, “Oral Vaccine, MucoRice

Fighting against the Diarrhea”, August, 2014. Tokyo, Japan.

The 2nd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum, (IIMVF), “Trends in Immunological Memory and Vaccine Development”, Organizer and Speaker, “Mucosal Immunity and Vaccine Development” August, 2014. La Jolla, USA.

BD Science Seminar 2014. “The Frontline of Immunology” Chairman. August, 2014. Tokyo, Japan.

The 26th Symposium on Microbial Sciences ~The Symphony of Microbial Science and Medical care~ “Innate Lymphoid Cells Regulate Intestinal Epithelial Cell Fucosylation for Symbiosis and Elimination” Invited Speaker. September 2014. Tokyo, Japan.

The 65th Kanto Region Otorhinolaryngology Allergy Discussion Group. Invited Speaker, Development of Next Generation Vaccine based on Mucosal Immunology~Future of Mucosal Vaccine” September, 2014. Tokyo, Japan.

Novo Nordisk Innovation Summit 2014, Organizer and Speaker, “Mucosal Links between Innate-epithelial Cells and Commensal Flora for the Development of New Immune-prevention and -therapy” October, 2014. Tokyo, Japan.

10th Research Symposium on Human Natural Defense System in Conjunction with PRAMS 2014 in Commemoration of the 10th Anniversary of The Airway Mucus Institute “ Epithelial Biology for Human Natural Defense” Invited Speaker, “Mucosal Connections Between Airway and Reproductive Immunity”. October, 2014. Seoul, Korea.

The 1st International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine

Development 2014. “Mucosal Innate Immune System and Vaccine Development” Chair and Speaker. October, 2014. Tokyo, Japan.

11th Nestlé International Nutrition Symposium on “Nutrition and the Human Gut Microbiome” 2014. Invited Speaker, “Cross-talk between the Mucosal Immune System and Environmental Factors” October, 2014. Lausanne, Switzerland.

ACR/ARHP Annual Meeting, Invited Speaker, “Microbial Molding of Mucosal Immunity” November, 2014. Boston, USA.

The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Symposium 2 “Next Generation Vaccine Development” Invited Speaker, “Rice-based Oral Vaccine “MucoRice” for the Control of Enteric Diarrheal Disease” November, 2014. Yokohama, Japan.

8th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2014) Invited Speaker, Special Lecture, “Rice Protein Body and Cationic Nanogel as Antigen Delivery Vehicle for Mucosal Vaccines” Matsuyama, December, 2014. Ehime, Japan.

Science Council of Japan and The Pharmaceutical Society of Japan Symposium “Advancing the Knowledge of Immunology for Disease Treatments.”, Invited Speaker, “Syringe/needle-and cold chain-free oral Vaccine MucoRice” January, 2015. Tokyo, Japan.

The 3rd Medical Advisor Workshop, The Academy of Clinical Dentistry, “Mucosal Immunity: The Adaptation of oral-Digestive Immune System for Vaccine Development”, February, 2015. Tokyo, Japan.

The 34th Shirokane Symposium, The 50th Anniversary of Founding of the Kitasato University School of

pharmacy, "The Mucosal Immune System for Symbiosis and Elimination" Febreuary, 2015. Tokyo, Japan.

"2015 Seminar for the Quality and Safety Improvements of Dental Practice" Kanagawa Dental Association, "Innovative Oral Vaccine : MucoRice", March, 2015. Kanagawa, Japan.

World Immune Regulation Meeting - IX, Chairman and Invited Speaker, "Mucosal Innate Lymphoid Cells and Mast Cells for the Regulation of Symbiosis and Inflammation" March, 2015. Davos, Switzerland.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

アジュバント安全性評価データベースの構築研究

中西憲司 兵庫医科大学

研究要旨

IL-33 は組織傷害によって遊離されて周囲に危険を知らせるアラームとして知られている。昨年度までに我々は蠕虫感染やケラチノサイト特異的 IL-33 過剰発現によって、IL-33 が 2 群自然リンパ球 (ILC2) を誘導、刺激して大量の Th2 サイトカイン IL-5, IL-13 を産生させ、好酸球性の炎症を引き起こすことを明らかにした。しかし、IL-33 がどのような機序でその発現がコントロールされているかは不明である。そこで、本研究では組織傷害時に遊離する因子を含むと考えられる組織抽出液中の IL-33 誘導活性を調べた。その結果、肺や肝臓組織抽出液中には IL-33 誘導活性を持つタンパク因子の存在が明らかとなった。

A. 研究目的

ある種の蠕虫感染時には肺に Löffler 症候群といわれる特徴的な好酸球浸潤が認められる。この好酸球浸潤は、感染によって誘導・産生された IL-33 が ILC2 を誘導、活性化することで獲得免疫系非依存性に誘導されることを、我々はこれまでの研究で明らかにしてきた。また、肺だけでなく IL-33 の皮膚における役割を解明するため皮膚ケラチノサイト特異的に IL-33 を過剰発現するトランスジェニックマウス (IL-33KCTg) を作成し、皮膚での IL-33 過剰発現が ILC2/好酸球を誘導してアトピー様の皮膚炎を引き起こすことを明らかにした。このように上皮細胞由来の IL-33 が好酸球性炎症の発症に重要であることが明らかにな

ったが、上皮細胞で IL-33 の発現が上昇するメカニズムは未だ不明である。寄生虫が肺を通過する際には出血を伴う肺の組織傷害が認められること、IL-33KCTg マウスでは搔爬行動のみられる部位に皮膚炎が認められることから、われわれは組織傷害が IL-33 発現上昇に重要であると考えた。IL-33 の産生は IL-33 発現細胞のネクローシスによる遊離だけにとどまらず、さらに *Il133* mRNA 発現の上昇もみられることから、組織中の何らかの因子が組織傷害に伴って遊離され、IL-33 発現誘導活性を示すと考えられる。そこでマウス組織抽出液中の IL-33 誘導活性を調べ、その活性因子の性状についてまだ初歩的であるが検討を行った。

B. 研究方法

野生型および IL-33KO マウス由来の肺や肝臓の組織抽出液をマウス肺に投与し、IL-33 発現誘導活性を調べた。また、種々の培養細胞に添加し、in vitro でも IL-33 誘導活性を示すか検討した。さらに抽出液中の活性因子についてその性状を調べるために加熱やプロテアーゼの影響を検討した。

(倫理面の配慮)

動物実験は、関係法令を遵守し、「兵庫医科大学動物委員会」、「兵庫医科大学遺伝子組換え委員会」、の承認・許可された実験を行なっている。

B. 研究結果

肺抽出液をマウス肺に経鼻投与したところ、予想通り *IL33* mRNA 発現の上昇がみられた。また免疫染色によってタンパクレベルでも IL-33 発現が増加していることが確認できた。この現象は IL-33KO マウス由来組織抽出物でも認められ、さらに肝臓抽出液でも同様に認められた。また抽出液でヒト中皮細胞株である MET5A やマウス線維芽細胞を刺激したところ、*IL33* mRNA 発現が誘導された。この活性は、抽出液をプロテアーゼや熱で処理すると認められなくなることから、タン

パク質成分が活性を担っていると考えられた。

C. 考察

IL-33 は組織傷害時に細胞内から遊離されて周囲の細胞に危険の到来を知らせる警報因子アラミンとして知られている。今回の研究では肺組織抽出液によって IL-33 の発現が上昇することから、組織中の何らかの因子によって IL-33 の発現が誘導されることがわかった。このことは IL-33 が組織傷害によって一時的に細胞から遊離された後、同様に組織から遊離された因子によって IL-33 の発現を回復、あるいは増幅するシステムの存在を示唆している。これによって新たな危険に備えることができ、さらに強い反応を引き起こすこともできると考えられる。この IL-33 誘導因子の存在は、上皮のホメオスターシスのみならず、生体防御やアレルギー応答に重要な役割を果たすと考えられる。

D. 結論

今回の研究で、組織傷害に伴う IL-33 発現誘導因子の存在が明らかとなり、これが組織傷害後の IL-33 産生増強に関与することが明らかとなった。

E. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

和文論文

1. 安田好文, 中西憲司. 線虫・真菌などのキチンによる IL-33 産生の誘導とアレルギー. 臨床免疫・アレルギー科 2014; 61(5):552-559.

英文論文

1. Jing S, Oshima T, Muto T, Yasuda K, Fukui H, Watarai J, Nakanishi K, Miwa H. Epithelial-derived nuclear IL-33 aggravates inflammation in the pathogenesis of reflux esophagitis. *J Gastroenterol* 2014;25129514.
2. Muto T, Fukuoka A, Kabashima K, Ziegler SF, Nakanishi K, Matsushita K, Yoshimoto T. The role of basophils and pro-allergic cytokines TSLP and IL-33, in cutaneously-sensitized food allergy. *Int Immunol* 2014;26(10):539-49.
3. Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, Yumikura S, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yamanishi K. Immediate-type contact hypersensitivity is reduced in interleukin-33 knockout mice. *J Dermatol Sci* 2014;74(2):159-161.
4. Ohashi K, Yoshimoto T, Kosaka H, Hirano T, Iimuro Y, Nakanishi K, Fujimoto J.

Interferon γ and plasminogen activator inhibitor 1 regulate adhesion formation after partial hepatectomy. *Br J Surg* 2014;101(4):398-407.

5. Futatsugi-Yumikura S, Matsushita K, Fukuoka A, Takahashi S, Yamamoto N, Yonehara S, Nakanishi K, Yoshimoto T. Pathogenic Th2-type follicular helper T cells contribute to the development of lupus in Fas-deficient mice. *Int Immunol*. 2014 Apr;26(4):221-31.

2. 学会発表

(国際学会)

1. Yoshimoto Tomohiro, Muto Taichiro, Fukuoka Ayumi, Nakanishi Kenji, Matsushita Kazufumi. The roles of basophils, TSLP and IL-33 in food allergy following epicutaneous sensitization. 3rd Food Allergy and Anaphylaxis Meeting 2014. 10, Dublin, Ireland.

(国内学会)

1. Nakanishi K. IL-33-stimulated type II innate lymphoid cells induce eosinophilia in the lungs of intestinal nematode-infected mice. 78th JSICR 2014. 6, Sapporo.
2. 安田好文、松本真琴、中西憲司、善本知広. Strongyloides venezuelensis 感染により誘導された ILC2 による生体防御機構の解析. 第 70 回日本寄生虫学会西日本支部大会 2014. 10, 神戸.
3. Muto T, Fukuoka A, Nakanishi

- K, Matsushita K, Yoshimoto T.
The role of basophils and pro-
allergic cytokines, TSLP and
IL-33, in cutaneously-
sensitized food allergy. 第 43
回日本免疫学会学術集会
2014.12, 京都
4. 安田好文、武藤太一郎、今井康
友、中西憲司. アルミニウムアジ
ュバントによる好酸球性炎症にお
ける IL-33 の役割. 第 8 回次世代
アジュバント研究会 2015.1, 豊
中.
 5. 安田好文、松本真琴、中西憲司、
善本知広. Role of Th2
cytokines in Strongyloides
venezuelensis infection-
induced lung eosinophilic
inflammation. 第 8 回寄生虫感染
免疫研究会 2015.2, 吹田.
 6. 安田好文、松本真琴、中西憲司、
善本知広. Strongyloides
venezuelensis 感染による好酸球
性肺炎発症機序における Th2 サイ
トカインの役割. 第 84 回日本寄
生虫学会大会 2015.3, 三鷹.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中
(発明の名称)なし
(発明者)なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書（平成 26 年度）

アジュバント安全性評価データベースの構築研究

松本 美佐子、北海道大学大学院医学研究科、准教授

研究要旨:アジュバントデータベースの構築について MALP2s と RNA アジュバントを database にエントリーした。PolyI:C を用いて、細胞性免疫の起動を survivin 抗原と WT1 抗原+アジュバントの併用効果を担がんマウス実験の治療モデルで行った。PolyI:C の抗がん免疫能を確認したが治療用の抗原ががん退縮に重要と判った。

A. 研究目的

本研究は、次世代の免疫医薬として期待されるアジュバントの開発研究（有効性）および審査行政（安全性）に寄与するバイオマーカー探索可能なデータベースを構築することを目的とする。この観点から BCG-CWS の標的・TLR2 と polyI:C の標的・TLR3 について有効性の分子基盤とエフェクター分子の評価を行った。

B. 研究方法

PolyI:C は invivogen の試薬を用いた。長さの異なる polyI:C を抗原（OVA）とともに WT と各種 KO マウスに投与し、投与マウスの血中サイトカイン、脾臓 mDC, リンパ球の EG7 細胞（OVA 抗原を持つ）障害活性を調べた。同様に polyI:C を WT1 DB126 ペプチド、また

は Survivin2B ペプチドとともにマウスに免疫した。一方、KO マウスは MyD88^{-/-}, TICAM-1^{-/-}, IPS-1^{-/-}, IRF-3^{-/-}, IRF-7^{-/-}, IFNAR^{-/-} を用いた。これらを C1498 腫瘍（抗原陽性）の担がん実験と免疫エフェクター解析に用いた。脾臓樹状細胞の調整、NK 活性の測定、cross-priming 能の査定, OVA tetramer assay は既報に準じた。

（倫理面への配慮）

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行った。

C. 研究結果

PolyI:C 単独でがん特異的 CTL 誘導が担がんマウスで弱く検出された。しかし、Db126, または Survivin 2B ペプチドでは polyI:C のアジュバント付与にも拘わらず CTL 誘導は増強さ

れなかった。一方、OVA+polyI:C では SL8 テトラマーアッセイで強い CTL 誘導が検出された。従って、蛋白抗原では強い CTL 誘導が起動されるが、単価エピトープのペプチドでは CTL 誘導は polyI:C を用いても増強されない、と結論づけられた。今後抗原を多価にするなどの工夫が抗がんアジュバントを有効にするために必要と結論された。

D. 考察

PolyI:C など RNA アジュバントは type I IFN と独立に CTL, NK 活性化を起動することが判明した。抗原を OVA から survivin2B ペプチド、survivin2B を含むマウス survivin キメラ蛋白に変えると CTL は誘導されなかった。ヒトの wild-type surviving 蛋白も CD4 T のみで CTL 誘導は現時点で確認できていない。CD8 エピトープのみのペプチドでなく、CD4 T 細胞をも活性化する抗原の選択が CTL 誘導に重要である。また、アジュバントの種類を TLR2 から TLR3 に替えてもこの問題は解決せず、抗原の選択ががん免疫の起動に重要との結果であった。

E. 結論

アジュバントのデータベースに Pam2 リポペプチドと polyI:C を含む

RNA アジュバントをエントリーした。担がんマウス系とともに CTL を誘導したが、がん退縮は抗原に依存することが判明した。RNA アジュバントはバイオマーカー探索が終了してからエントリーの予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takaki, H., H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. Dendritic cell subsets involved in type I IFN induction in mouse measles virus infection models. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 53:329-333. Review
2. Nakai, M., T. Seya, M. Matsumoto, K. Shimotohno, N. Sakamoto, and H. H Aly. 2014. The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B cells with low replication efficacy. *Viral. Immunol.* 27(6):285-294.
3. Ishii A, K. Funami, M. Tatematsu, T. Seya, and M. Matsumoto. 2014. Endosomal localization of Toll-like receptor 8 confers distinctive proteolytic processing on human myeloid cells. *J. Immunol.* 193(10):5118-5128.
4. Kasamatsu J., M. Azuma, H. Oshiumi, Y. Morioka, M. Okabe, T. Ebihara, M. Matsumoto, and T. Seya. 2014. INAM plays a critical role in IFN-

- γ production by NK Cells interacting with polyinosinic-polycytidylic acid-stimulated accessory cells. *J. Immunol.* 193(10):5199-5207.
5. Leong, C. R., H. Oshiumi, M. Okamoto, M. Azuma, H. Takaki, M. Matsumoto, K. Chayama K, and T. Seya. 2015. A MAVS/TICAM-1-independent IFN-inducing pathway contributes to regulation of hepatitis B virus replication in the mouse hydrodynamic injection model. *J Innate Immun.* 7(1):47-58.
 6. Kasamatsu, J., S. Takahashi, M. Azuma, M. Matsumoto, A. Morii-Sakai, M. Imamura, T. Teshima, A. Takahashi, Y. Hirohashi, T. Torigoe, N. Sato, and T. Seya. 2015. PolyI:C and mouse surviving artificially embedding human 2B peptide induce a CD4⁺ T cell response to autologous survivin in HLA-A*2402 transgenic mice. *Immunobiology.* 220(1):74-82.
 7. Maruyama A., H. Shime, Y. Takeda, M. Azuma, M. Matsumoto, and T. Seya. 2015. Pam2 lipopeptides systemically increase myeloid-derived suppressor cells through TLR2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 457(3):445-450.
 8. Matsumoto, M., M. Tatematsu, F. Nishikawa, M. Azuma, N. Ishii, A. Morii-Sakai, H. Shime, and T. Seya. 2015. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production *in vivo*. *Nat. Commun.* 6:6280.
 9. 志馬寛明、松本美佐子、瀬谷司 dsRNAによるTAM, MDSCの腫瘍免疫抑制作用から活性化作用への変換 臨床免疫・アレルギー科 Vol.61, No. 6, 613-620, 2014
 10. 立松恵、瀬谷司、松本美佐子 自然免疫受容体TLR3により認識されるRNA構造の解明 生化学vol.86, No. 4, 523-527, 2014
 11. 瀬谷司、志馬寛明、松本美佐子、腫瘍浸潤マクロファージのRNA応答 細胞工学 33(12), 2014
2. 学会発表
1. 志馬寛明、松本美佐子、瀬谷司. RNA アジュバントによる Ly6G 陽性細胞を介した抗がん作用. 第18回日本がん免疫学会総会. 2014年8月1日. 松山 (ひめぎんホール)
 2. Shime H, M. Matsumoto, and T. Seya. Ly6G+ cell-mediated growth retardation of tumor in RNA adjuvant therapy. 第37回日本癌学会学術総会. 2014年9月25日. 横浜 (パシフィコ横浜)
 3. Maruyama A, Shime H, M. Matsumoto, and T. Seya. TLR2 signal enhances

survival and immune-suppressive activity of MDSCs (同上)

4. 立松恵、小布施力史、瀬谷司、松本美佐子. TLR3 を介したシグナル伝達における LRR59 の機能解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25 日. 横浜 (パシフィコ横浜)

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

アジュバント安全性評価データベースの構築研究

植松 智・東京大学医科学研究所国際粘膜ワクチン開発研究センター自然免疫制御分野
特任教授

研究要旨：粘膜固有層に存在する自然免疫細胞とその細胞に発現するアジュバント受容体の機能を解析し、新規粘膜ワクチン開発のための標的細胞及び粘膜アジュバントのスクリーニングを行う。

A. 研究目的

本研究課題は、マウスの腸管粘膜固有層に存在する自然免疫細胞群とそれらに発現している自然免疫受容体の機能を詳細に解析し、新規粘膜ワクチン開発のための標的細胞及び粘膜アジュバントのスクリーニングを行うものである。また、アジュバント標的となるアジュバント受容体、自然免疫受容体を介して誘導される疾患の病態モデルを解析し、アジュバント病としての免疫疾患の研究を行う。

B. 研究方法

1. 粘膜免疫応答を誘導する新規ワクチンアジュバントの開発

我々はこれまで、腸管粘膜固有層の CD11c^{high}CD11b^{high}樹状細胞が、抗原特異的なIgAを産生することを明らかにしている。CD11c^{high}CD11b^{high}樹状細胞は、レチノイン酸合成酵素Raldh2を発現しており、特異的にIgAを誘導できることがわかっている。我々は、樹状細胞において、Raldh2を誘導できる物質のスクリーニングを行い、抗原

特異的IgAを誘導できるアジュバントとして作用するかを検討する。

2. アジュバント病としての放射線障害の病態解析

昨年、TLR3 欠損マウスの解析から、TLR3 が急性放射線腸炎の増悪因子であることを明らかにした。そして、TLR3阻害薬が急性放射線腸障害を軽減することが分かった。今年度はTLR3阻害剤の溶解試験、毒性試験、安定性試験を行った。

（倫理面への配慮）

マウスの解析においては遺伝子組み換え生物を用いた研究を行うので、「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」並びに「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、部局にて設置されている遺伝子組換え安全委員会及び実験動物委員会の審査を受けた上で、研究活動を実施する。

C. 研究結果

1. 粘膜免疫応答を誘導する新規ワクチンアジュバントの開発

我々は様々な病原体成分を集め、一般的な

樹状細胞を刺激し、Raldh2 を誘導できる因子をスクリーニングした。そして、細菌の成分である Factor X が特異的に Raldh2 を誘導できることが分かった。Factor X を単独でアジュバントとして用いて筋肉内に免疫をしても IgA は誘導出来なかった。ところが、TLR9 のリガンドである CpG DNA と Factor X をアジュバントとして用いることにより、腸管粘膜に抗原特異的な IgA を誘導できることが分かった。

2. アジュバント病としての放射線障害の病態解析

TLR3 阻害剤の溶解試験、毒性試験、安定性試験をカナダのベンチャー企業とともにを行った。結果、TLR3 阻害剤は非常に溶解性がよく、毒性は低く、安定であることが分かった。

D. 考察

Factor X は、遠隔部位で免疫したにもかかわらず、腸管で抗原特異的な IgA を誘導できた。今後、IgA 誘導機構や感染防御における効果の検討が必要と考えられる。

TLR3 阻害剤の有効性が明らかになった。今後、治療薬として治験等考慮に入れ研究を進めていく必要がある。

E. 結論

Factor X は、IgA 産生を可能とする新規粘膜アジュバントとなり得る。

TLR3 阻害剤は溶解性がよく、毒性が低く安定な有用な薬剤であることが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 20) Reynolds LA, Harcus Y, Smith KA, Webb LM, Hewitson JP, Ross EA, Brown S, Uematsu S, Akira S, Gray D, Gray M, MacDonald AS, Cunningham AF, Maizels RM. MyD88 Signaling Inhibits Protective Immunity to the Gastrointestinal Helminth Parasite *Heligmosomoides polygyrus*. *J Immunol*. 2014 Sep 15;193(6):2984-93. doi: 10.4049/jimmunol.1401056.
- 21) Goto Y, Obata T, Kunisawa J, Sato S, Ivanov II, Lamichhane A, Takeyama N, Kamioka M, Sakamoto M, Matsuki T, Setoyama H, Imaoka A, Uematsu S, Akira S, Domino SE, Kulig P, Becher B, Renauld JC, Sasakawa C, Umesaki Y, Benno Y, Kiyono H. Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science*. 2014 Sep 12;345(6202):1254009. doi:10.1126/science.1254009.
- 22) Atif SM, Lee SJ, Li LX, Uematsu S, Akira S, Gorjestani S, Lin X, Schweighoffer E, Tybulewicz VL, McSorley SJ. Rapid CD4+ T-cell responses to bacterial flagellin require dendritic cell expression of Syk and CARD9. *Eur J Immunol*. 2014 Nov 27. doi: 10.1002/eji.201444744.
- 23) Maruyama K, Fukasaka M, Uematsu S, Takeuchi O, Kondo T, Saitoh T, Martino M, Akira S. 5-azacytidine-induced protein 2 (AZI2) regulates bone mass by fine-tuning osteoclast survival. *J Biol Chem*. 2015 Feb 17.

pii: jbc.M114.631374. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

16) Satoshi Uematsu. The 2nd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum. Aug 24; San Diego, USA.

17) Satoshi Uematsu. Novo Nordisk Innovation Summit. Oct 1; Tokyo, Japan.

18) The 1st International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014. Oct 20; Tokyo, Japan.

19) The 1st Symposium of Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammation. Dec 18; Berlin, Germany.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

U.S. Patent Number : 61/859,814

出願日 2013年07月30日

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（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書（平成 26 年度）

アジュバント安全性評価データベースの構築研究

－インフルエンザワクチンを用いた新規アジュバント安全性評価法の開発－

研究分担者 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長
研究協力者 水上 拓郎 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長
研究協力者 百瀬 暖佳 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

研究要旨：近年、新興・再興感染症をはじめ、様々なワクチンが開発されているが、ワクチンの効果を増強し抗原量を節約する目的や、ドラッグデリバリーとしてのワクチンアジュバントの開発が期待されている。しかし新規アジュバントに関しては安全性評価法を含めた整備が遅れている。そこで我々は、アジュバントの安全性を評価する方法として、既存の毒性試験のみではなく、遺伝子発現プロファイルの変動を指標とした新規安全性試験法を適応することで、安全性の評価や予測が可能か検討する事とした。

市販されているインフルエンザワクチン(4社)を購入し、ラット(Fischer344)に5mLのワクチンを接種した。1日後の体重及び血液検査を実施した所、何れの接種群において有意差はなかったが、Luminex システムを用いて18個のバイオマーカーの発現変動を検討した結果、7個の遺伝子に関しては有意な発現変化が認められた。以上の実験より、これまでに同定したバイオマーカーはロット毎のHAワクチンの活性の違いを反映する高感度な指標である事が示唆された。そこで、マウスを用いて市販されているHAワクチンに本邦で承認されているアルミニウムアジュバントやCpGアジュバント等を添加し、18個のバイオマーカーの発現上昇が認められるかを検討した。その結果、アルミニウムアジュバントを接種したHAワクチンに関しては、遺伝子発現変動が認められないにも関わらず、CpGアジュバントを添加したHAワクチンに関しては12個の遺伝子に関して有意な発現変化が認められた。以上の結果より、我々の同定したインフルエンザワクチンの安全性を評価するバイオマーカーはHAワクチン及びアジュバントの安全性評価に関しても有効である事が明らかとなった。