

A. 研究目的

ワクチンは公衆衛生上、感染症予防において非常に重要なツールとなっている。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。本邦では、以前よりアルミニウムアジュバントが広く沈降製剤として用いられ、その安全性と有効性が認められて来ている所であるが、パンデミックインフルエンザ対策として H5N1 インフルエンザワクチンに AS03 というアジュバントが特例承認され、またヒトパピローマウイルス感染症予防の為に子宮頸癌ワクチンには AS04 というアジュバントが承認されている。これ以外にも様々なアジュバントが開発され、有効性は認められているものの、安全性に関する懸念が残っていた。

そこで、我々研究班では、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が検討する事とした。我々は過去3年に渡り、アジュバント投与したラット・マウスの遺伝子発現プロファイルを取得して来た。一方、アジュバントはワクチンと混和して接種されるものである事を考えると、アジュバント添加ワクチンとして評価する方法の検索も必要と考えられる。

そこで我々は国民的関心も高く、比較的多くの人口構成集団に接種されているインフルエンザワクチンに注目し、試験法の開

発を試みる事とした。

B. 研究方法

市販されているインフルエンザワクチン(4社)を購入し、一般試験法の異常毒性否定試験法に従い、ラット(Fischer344)を用いて5mLのワクチンを接種した。接種後1日目の組織を採材し、ISOGEN(ニッポンジーン社)で溶解し、RNAを抽出し、Luminexシステムを用いて同定した約18個のバイオマーカーで発現変化を調べた。

次に、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変化が認められるかを検討した。

(倫理面への配慮)

当該実験に関しては国立感染症研究所動物実験指針に基づいて実施された。

C. 研究結果

4社のHAワクチンを接種し1日後の体重及び血液検査を実施した所、有意差はないものの、B社ワクチンを接種したラットの体重減少が軽微であったが認められた。その他のパラメーターの変動(血液・生化学)は認められなかった。そこで、接種後1日目のラットの肺を分取し、RNAを精製した後、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(図1)。その結果、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、これまで同定したバイオマーカーは全粒子ワクチンのみではなく、

HA ワクチンの微妙な活性の違いをも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 (BALB/c) に HA ワクチンとアルミニウムアジュバント或は CpG アジュバントを添加した混和ワクチンを接種した。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 (Data not shown)、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 (図 2)。

以上の結果より、我々の同定したバイオマーカーは、アジュバントの安全性評価に有効である事が示唆された。

D. 考察

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。また、アジュバントに関しては広く用いられ、安全性が評価されているアルミニウムアジュバント添加では大きな発現上昇は認められず、一方、CpG アジュバントに関しては、12 個の遺伝子バイオマーカーの発現上昇が認められた。以上の結果より、アジュバント添加による免疫活性増強度及び毒性の増強度を測定する事が可能である可能性が示唆された。今後は、どの程度の発現上昇が安全性に影響を与えるかの設定を、全粒子ワクチンや安全性に関し懸念が認められた為、開発中止となったアジュバントなどを用いて検討し、安全性評価の基準等の策定が可能か検討する。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

24) Momose H, Mizukami T, Kuramitsu M, Takizawa K, Masumi A, Araki K, Furuhashi K, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Establishment of a New Quality Control and Vaccine Safety Test for Influenza Vaccines and Adjuvants Using Gene Expression Profiling. *PLoS One*. In press

25) Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Araki K, Sugamura K, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I. Identification of TL-Oml, an adult T-cell leukemia (ATL) cell line, as reference material for quantitative PCR for human T-lymphotropic virus 1. *J Clin Microbiol*. 2015; 53: 587-596.

26) Mizukami T, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Araki K, Furuhashi K, Ishii KJ, Hamaguchi I, Yamaguchi K. System vaccinology for the evaluation of influenza vaccine safety by multiplex gene detection of novel biomarkers in a preclinical

study and batch release test. *PLoS One*. 2014; 9: e101835.

含有インフルエンザHAワクチンへの応用.
第8回次世代アジュバント研究会 大阪
2015年1月

27) Kasama Y, Mizukami T, Kusunoki H, Peveling-Oberhag J, Nishito Y, Ozawa M, Kohara M, Mizuochi T, Tsukiyama-Kohara K. B-cell-intrinsic hepatitis C virus expression leads to B-cell-lymphomagenesis and induction of NF- κ B signalling. *PLoS One*. 2014; 9: e91373.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2. 学会発表

20) 水上 拓郎, 百瀬 暖佳, 倉光 球, 滝澤 和也, 斎藤 益満, 古畑 啓子, 荒木 久美子, 石井 健, 浜口 功. トキシコゲノミクスを応用した新規ワクチンアジュバント添加・インフルエンザワクチンの安全性試験法の開発. 第41回日本毒性学会学術年会 神戸 2014年7月

21) Takuo Mizukami. System Vaccinology Enables to Evaluate the Safety of the Influenza Vaccine and the Adjuvant with a Multiplex Gene Detection System of Novel Biomarkers in the Pre-Clinical Study and Lot Release Test. Workshop 4: Adjuvant Profiling in Keystone Symposia, Seattle, Washington USA. 2014年10月

22) 百瀬暖佳, 水上拓郎, 倉光 球, 安藤 栄里子, 立花滋博, 滝澤和也, 益見厚子, 永田伴子, 浜口 功. 遺伝子発現解析による安全性評価法の構築とアジュバント

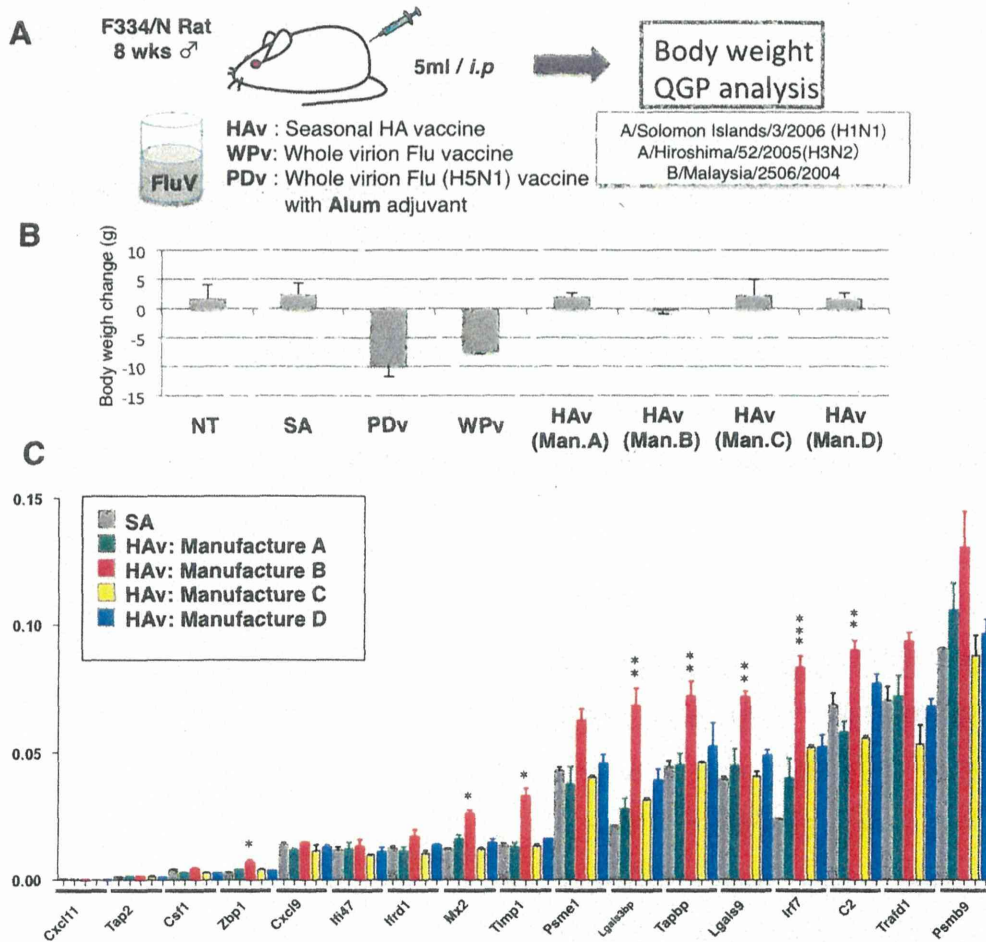


図1：インフルエンザ HA ワクチン (HA_v) のバイオマーカーを用いた安全性評価。A. 一般試験法の異常毒性否定試験に準じて 5mL の HA_v を投与し、体重測定を行うと共に、QGP 法を用いて 18 個のバイオマーカーを一括して測定する。B. 4 社から購入した HA_v 接種群における体重減少に有意差は認められないが、製造所 B は軽微ながらも体重の減少傾向が認められた。C. バイオマーカーでこれらの変化を詳細に調べると、製造所 B の HA_v 接種個体は 7 個のバイオマーカーでは有意な差が認められた。NT:無処置, SA:生理食塩水, PD_v:パンデミック H5N1 ワクチン, WP_v: 全粒子ワクチン, HA_v: HA ワクチン。

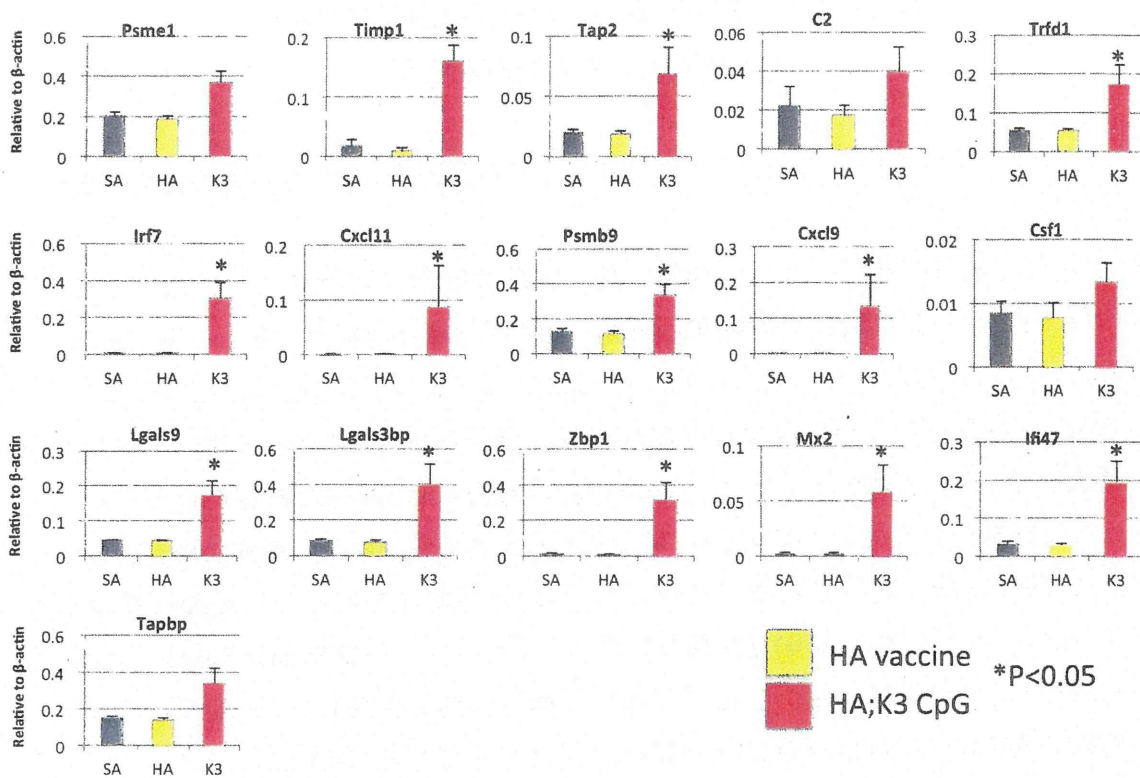


図2：アジュバント添加インフルエンザHAワクチン(HAv)のバイオマーカーを用いた安全性評価。CpGアジュバントK3を添加したHavでは、約12個のバイオマーカーで有意な発現上昇が認められた。SA:生理食塩水, HA: HAワクチン, K3: CpG-K3添加HAv。

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）

アジュバント遺伝子組み込みエイズウイルスの霊長類における免疫反応の解析

研究者分担者 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

研究協力者 岡村智崇 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 研究員

研究要旨：抗酸菌の主要抗原である Ag85B は、強力な細胞性免疫指向性のアジュバント活性をもつことが明らかである。本研究では Ag85B を細胞性免疫指向型アジュバントとして弱毒生ウイルスに組み込み、弱毒生ウイルスの免疫原性の増強効果を明らかにすることを目的とした。これまでの研究で、Ag85B 遺伝子を組込んだ Ag85B 発現弱毒エイズウイルス(SHIV-Ag85B)を接種したカニクイザルは、強毒株 SHIV89.6P の攻撃接種を制御することを明らかにした。本年度は SHIV-Ag85B 接種サル免疫誘導能について詳細に検討した。SHIV-Ag85B を接種したサルのウイルス RNA およびプロウイルスは接種初期より血漿中および細胞内(PBMC)において、それぞれ不検出となった。これらのサルは接種初期において、ウイルス抗原特異的 IFN- γ 産生 CD8+エフェクターメモリーT 細胞の強力な誘導が認められた。一方、SHIV-NI を接種したサルでは持続的なウイルス感染が認められた。これらのサルは接種初期より持続的な細胞性免疫反応が確認されたが、SHIV-Ag85B 接種サル群と比較して低値を示した。次に非持続感染 SHIV-Ag85B 接種サルにおいて、強毒株 SHIV89.6P を攻撃接種したところ、7 頭中 6 頭において血漿中ウイルス RNA を制御し、さらに 6 頭中 3 頭において細胞内 SHIV プロウイルスについても不検出を確認した。これら 6 頭は攻撃接種後初期に IFN- γ 産生エフェクターメモリーCD8+T 細胞の強力な再誘導が確認された。一方、SHIV-Ag85B 接種サル 1 頭および持続感染が認められた SHIV-NI 接種 5 頭では、強毒株接種後のウイルス制御は不完全であったが、これらのサルで誘導された IFN- γ 産生エフェクターメモリーCD8+T 細胞数は低値を示すことが確認された。これらの結果から SHIV-Ag85B 接種後のウイルス制御には、抗原特異的エフェクターメモリーT 細胞の誘導が関連していることが明らかとなった。また、強毒株 SHIV のウイルス制御群においても、攻撃接種後初期における抗原特異的エフェクターメモリーT 細胞の強力な再誘導が重要であることが推測された。

A. 研究目的

抗酸菌の主要な分泌抗原の一つである Ag85B は、細胞性免疫の誘導効果をもつことが知られ、アジュバント物質として応用が検討されている。本研究の目的は、Ag85B を細胞性免疫指向型アジュバントとして弱毒生ウイルスに組み込み、弱毒生ウイルスの免疫原性能の増強効果を明らかにすることとした。

これまでの研究で、Ag85B 遺伝子を組込んだ Ag85B 発現弱毒エイズウイルス (SHIV-Ag85B) を接種したカニクイザルは、強毒株 SHIV89.6P の攻撃接種を制御することを明らかにした。本年度においては SHIV-Ag85B 接種サルウイルス動態と免疫反応の関連性を明らかにし、さらに強毒株接種後の防御免疫能を詳細に検討した。

B. 研究方法

1. 実験スケジュール。

カニクイザル 7 頭に SHIV-Ag85B を接種し、接種後 9 カ月に強毒株 SHIV89.6P を静脈内より攻撃接種を行った。比較対照として、SHIV-NI 接種サル 5 頭および Control カニクイザル 5 頭を用いた (図 1)。

2. 血漿中のウイルス量および CD4+T 細胞数の測定。

血漿中ウイルス量は感染サルの血漿からウイルス RNA を抽出し、SIVgag 特異的 Primer および probe を用いて Real time PCR を行った。CD4+T 細胞数は血液を CD 抗体 (CD3、CD4、CD8) にて染色し、

フローサイトメーターを用いて算定した。

3. SHIV プロウイルス量の検出。

経時的に採取した PBMC および鼠頸部リンパ節より DNA の抽出を行った。SIVgag 特異的 Primer を用いて Nested-PCR 法もしくは SIVgag 特異的 Primer および probe を用いて Real time PCR を行った。

4. ELISPOT 法を用いた IFN- γ 産生細胞数の測定。

SHIV-Ag85B 接種後および強毒株 SHIV 接種後に経時的に血液を採取し、PBMC の分離を行う。抗原刺激には各個体より事前に樹立した B-LCL 細胞に SIVGagpol、HIVEnv をそれぞれ発現する組換えワクシニアウイルスを感染させた抗原提示細胞を準備し、この細胞と PBMC の共培養を行った。培養後、Monkey IFN- γ ELISPOT Kit を用いて、ウイルス抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数を測定した。

5. フローサイトメーターを用いた IFN- γ 産生細胞の測定およびメモリー分画の解析。

経時的に採取した血液より採取した PBMC を上記と同じ方法で抗原刺激を行った。刺激後、CD 抗体 (CD3/CD4/CD8/CD28/CD95/IFN- γ) を用いて染色し、フローサイトメーターによる抗原特異的 IFN- γ 産生細胞およびメモリー分画を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では動物実験、組換え DNA 申請

等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

1. SHIV-Ag85B のウイルス量の検出。

SHIV-Ag85B 接種 7 頭の血漿中ウイルス量は接種後 1 か月以内に検出限界以下となり、また SHIV プロウイルスも同様に検出限界以下であった(図 2)。一方、SHIV-NI 接種サルの血漿中のウイルス量は接種後 3 か月まで検出され、また SHIV プロウイルスは常時検出された (図 2)。

2. SHIV-Ag85B 接種後の細胞性免疫反応。

SHIV-Ag85B 接種初期から経時的に IFN- γ 産生細胞の検出を行ったところ、SHIV-Ag85B 接種群では接種後 2 週において極めて強い反応が確認され、その反応は急速に消失することが確認された (図 3)。一方、SHIV-NI 接種群では接種初期から持続的に反応が認められたが、低値を示した (図 3)。

3. 抗原特異的な IFN- γ 産生メモリーT 細胞反応。

誘導された抗原特異的 IFN- γ 産生細胞について、フローサイトメーターを用いて詳細な解析を行ったところ、IFN- γ 産生細胞は CD8+T 細胞主体であることが確認された。また、この CD8+T 細胞集団は、エフェクターメモリー (CD28-CD95+) の分画 (%) の割合が高いことが認められた (図 4)。

4. SHIV89.6P 攻撃接種後の血漿中ウイル

ス量および CD4+T 細胞数。

強毒株 SHIV89.6P の攻撃接種を行ったところ、SHIV-Ag85B 接種群において、7 頭中 6 頭で攻撃接種後 3 か月以内に強毒株を完全に制御した。一方、SHIV-NI 接種サルでは、強毒株を制御できなかった (図 5)。

5. SHIV89.6P 攻撃接種後の強毒株 SHIV プロウイルス量の検出。

攻撃接種 4 か月後の PBMC および鼠径リンパ節より抽出した DNA を用いて、強毒株 SHIV プロウイルスの定量を試みた。結果、SHIV-Ag85B 接種群では 7 頭中 3 頭において、PBMC および鼠径リンパ節共に検出限界以下であった。SHIV-NI 接種群および Control 群においては、全て SHIV プロウイルス量が定量された (図 5)。

6. 強毒株 SHIV 接種後の細胞性免疫反応

強毒株 SHIV 接種後、強毒株 SHIV を制御した SHIV-Ag85B 接種サル 6 頭は、強毒株接種初期に IFN- γ 産生細胞の強力な誘導が確認された。また、その免疫反応はウイルス量の不検出と共に急速に消失した (図 6)。さらに、強毒株接種初期に誘導された IFN- γ 産生細胞は、エフェクターメモリー (CD28-CD95+) CD8+T 細胞 (%) の割合が高いことが認められた (図 7)。一方、強毒株を制御できなかった 6 頭 (SHIV-NI 接種サル 5 頭および SHIV-Ag85B 接種サル 1 頭) の IFN- γ 産生エフェクターメモリー CD8+T 細胞数は、強毒株接種初期において制御したサル群より低値を示した (図 6、7)。

D. 考察

高度に弱毒化した遺伝子欠損弱毒エイズウイルスをモデルに、遺伝子欠損部位にアジュバント分子 Ag85B を組込んだ、Ag85B 発現弱毒エイズウイルスを開発し、霊長類モデルを用いて評価を行った。

本年度は、SHIV-Ag85B 接種後および強毒株 SHIV89.6P 攻撃接種後のウイルス動態と免疫反応について解析した。SHIV-Ag85B 接種後のウイルスは、血漿中および PBMC 細胞内では検出限界以下であった。このウイルス制御機構を精査したところ、接種初期において、IFN- γ 産生エフェクターメモリーCD8+ T 細胞が誘導され、この反応はウイルス不検出と共に反応の消失が確認された。一方、持続感染する SHIV-NI 接種サルでは、同様に IFN- γ 産生エフェクターメモリーCD8+ T 細胞が誘導されたが、その反応は SHIV-Ag85B 接種群よりも低値を示した。これらの結果、抗原特異的 IFN- γ 産生エフェクターメモリーCD8+ T 細胞の誘導は、ウイルスの制御に関連していることが示唆された。

強毒株 SHIV を制御した SHIV-Ag85B 接種サル 6 頭は、攻撃接種初期において IFN- γ 産生エフェクターメモリーCD8+ T 細胞の再誘導が確認された。これらの反応は SHIV-Ag85B 接種初期に認められた反応よりも、数倍高い再誘導であった。しかし、血漿中および細胞内のウイルスを完全に制御した 3 頭と血漿中ウイルス量のみ制御した 3 頭との間で、免疫誘導

能の差は認められなかった。一方、強毒株を制御できなかった 6 頭 (SHIV-NI 接種サル 5 頭および SHIV-Ag85B 接種サル 1 頭) より誘導された IFN- γ 産生エフェクターメモリーCD8+ T 細胞数は低値を示し、また、攻撃接種後 12 週において顕著な細胞性免疫反応が認められたが、強毒株ウイルスの完全な制御には至らなかった。これらの結果、強毒株接種初期における強力な細胞性免疫反応 (抗原特異的エフェクターメモリーT 細胞の誘導) の再誘導が重要であることが推測された。

今後は、SHIV-Ag85B 接種サルで誘導された細胞性免疫反応の免疫誘導機構について、*in vitro*、*in vivo* の両面から解析を行う予定である。

E. 結論

Ag85B を発現するエイズ弱毒生ウイルスは、強力な抗原特異的なエフェクターメモリーCD8+ T 細胞を誘導し、強毒株 SHIV89.6P の防御免疫にも寄与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuyama Y., Yuki Y., Katakai Y., Harada N., Takahashi H., Takeda S., Mjima M., Joo S., Kurokawa S., Sawada S., Shibata H., Park E.J., Fujihashi K., Briles DE., Yasutomi Y., Tsukada H., Akiyoshi K. and Kiyono H. Nanogel-based pneumococcal surface protein A nasal vaccine induces microRNA-associated Th17 cell

responses with neutralizing antibodies against *Streptococcus pneumoniae* in macaques. *Mucosal Immunology* 2015 E-pub

2. Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y, Yanagisawa K, Kimura N. Diabetes mellitus accelerates A β pathology in brain accompanied by enhanced GA β generation in nonhuman primates *PLoS One* *in press*

3. Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y, Wijaya E], Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenberg A], Standley DM], Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin spikes local inflammation that induce Th2 and Tfh responses to the coadministered antigen. *J. Immunol.* 2015 *in press*

4. 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.

5. 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* 2014;111;3086-3091.

6. Tsujimura Y, Inada H, Yoneda M, Fujita T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, on allergic inflammation in the lung. *PLoS One* 2014;9: E-pub

7. Saito N, Chono H, Shibata H, Ageyama N, Yasutomi Y. and Mineo J. CD4(+) T cells modified by the endoribonuclease MazF are safe and can persist in SHIV-infected rhesus macaques. *Mol Ther. Nucleic Acids* 2014: E-pub

8. Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, Yasutomi Y, Aonuma K, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation. *J. Am. Heart Assoc.* 2014 E-pub

9. Tachibana SI, Kawai S, Katakai Y, Takahashi H, Nakade T, Yasutomi Y, Horii T, Tanabe K. Contrasting infection susceptibility of the Japanese macaques and cynomolgus macaques to closely related malaria parasites, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium cynomolgi*. *Parasitol. Int.* 2014 E-pub

2. 学会発表

1. 加藤 誠一、岡村 智崇、張 險峰、向井 徹、井上 誠、五十嵐 樹彦、志田 壽利、松尾 和浩、保富 康宏

BCG ウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチンの評価

第 62 回 日本ウイルス学会学術集会

2014年11月10日～12日パシフィコ横浜
会議センター

2. Tsujimura Yusuke, Yasutomi Yasuhiro :
Suppressive effect of Mycobacteria
major secretion protein, Ag85B, to
innate immune response is depending on
the interaction with RIG-I. 第43回日本
免疫学会総会

2014年12月10日～12月12日、京都国際
会議場

3. 藤城（伊藤）康世、鯉江洋、柴田宏昭、
岡林佐知、片貝祐子、Boran Osman、金山喜
一、保富康宏、揚山直英：再生医療評価系
としてのカニクイザルMSCを用いた細胞標
識の解析。第61回日本実験動物学会学術総
会。2014年5月15-17日。北海道、札幌市

4. 塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：新規
実験動物としての *Tupaia Belangeri* の飼
育および繁殖について 第157回 日本獣
医学会学術集会 平成26年9月9日～9月
12日

北海道、札幌

5. 塩釜ゆみ子、小原道法、保富康宏：C型肝
炎ウイルスに対するDNAワクチンと組み換
えワクシニアウイルスを用いた
Prime/Boost法による肝炎ウイルス特異的
免疫賦活化効果の検討第18回 日本ワク
チン学会学術集会 平成26年12月6日～
12月7日 福岡国際会議場

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 2014年11月6日

「NOVEL RECOMBINANT BCG VACCINE」

出願番号：12832210.4

2. 2014年11月13日

特許出願 : 特願2014-229283

発明の名称：C型肝炎の治療及び／又は予
防用医薬組成物

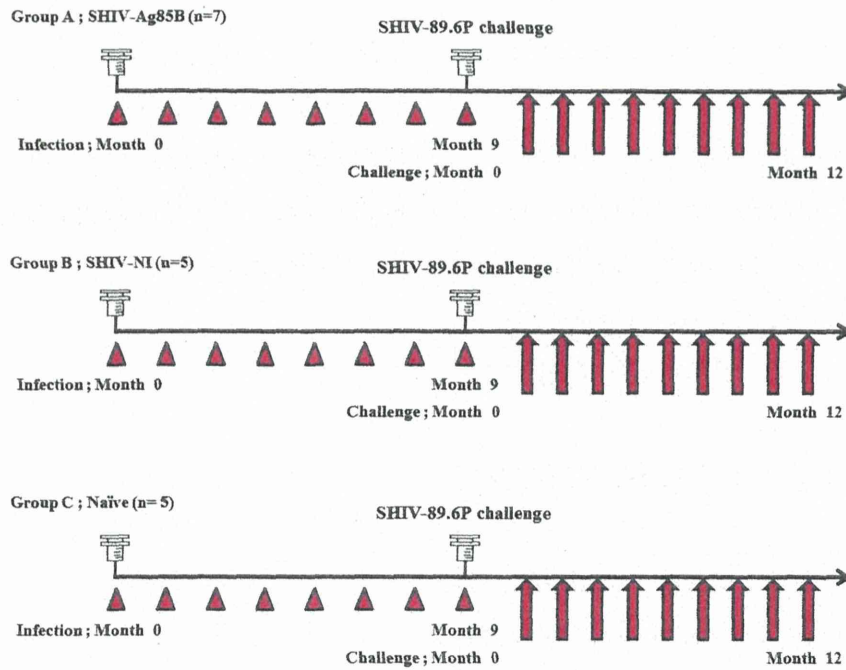
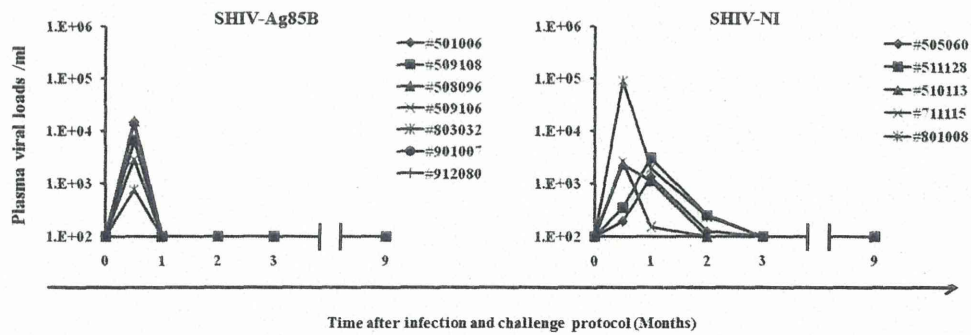


図1 実験スケジュール。

A. Plasma viral loads



B. Proviral DNA

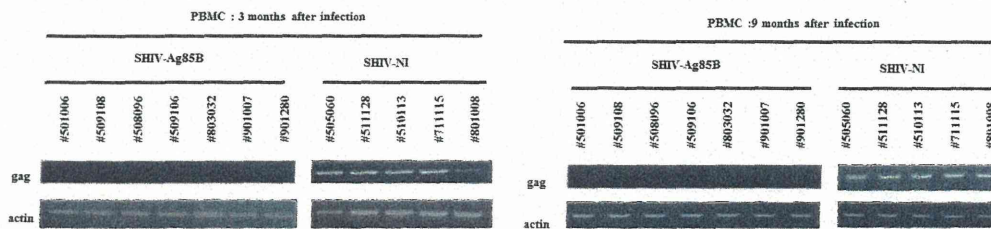


図2 SHIV-Ag85B ウイルス動態。(A) SHIV-Ag85B 接種後の血漿中のウイルス量。(B) PBMC における SHIV プロウイルスの検出(ウイルス接種後3か月および9か月)。

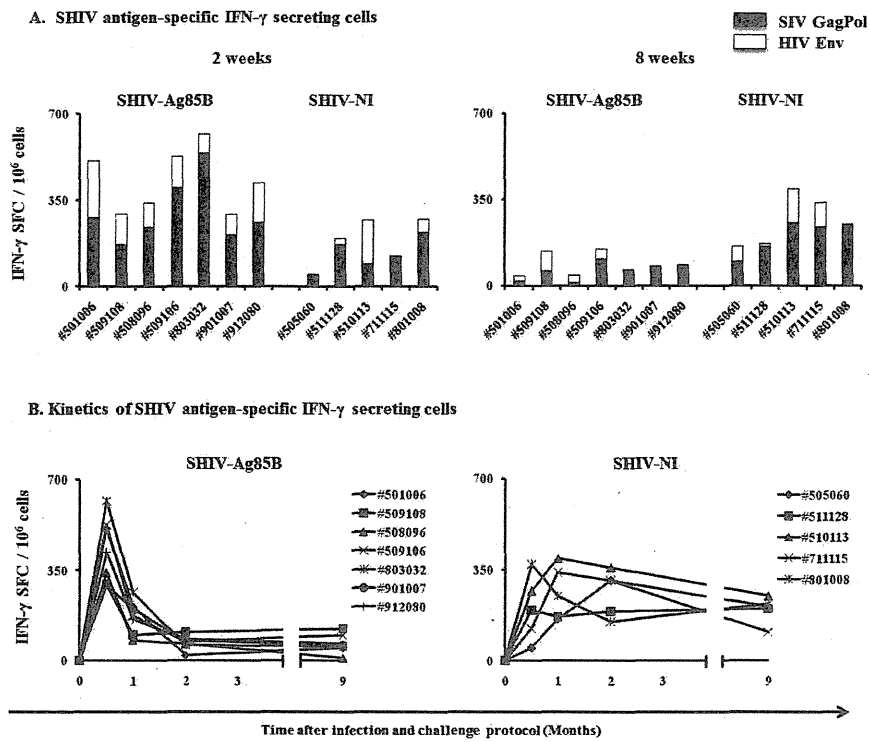


図3 SHIV-Ag85B 接種後のウイルス抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数。(A)ウイルス接種後2週および8週における IFN- γ 産生細胞数。(B)ウイルス接種後の IFN- γ 産生細胞数の推移。

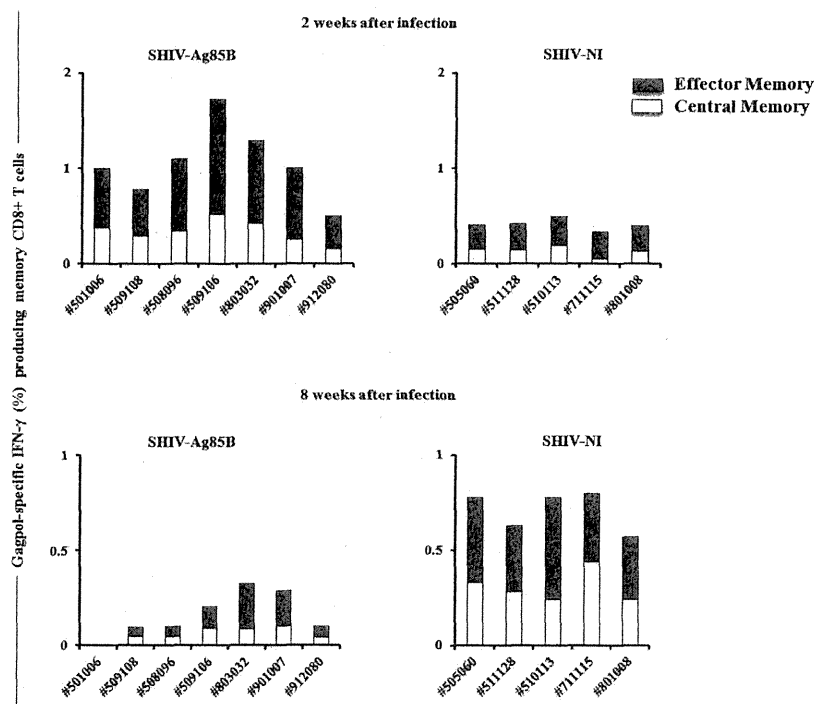


図4 SHIV-Ag85B 接種後2週および8週における IFN- γ 産生 CD8+T 細胞のメモリー分画。

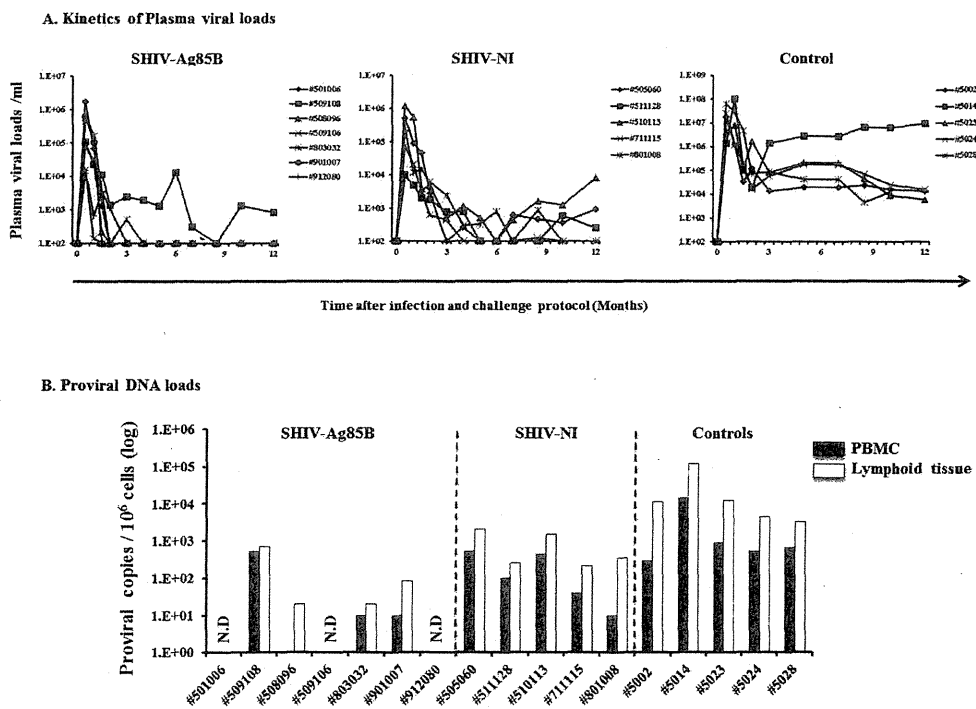


図5 SHIV89.6P 攻撃接種後におけるウイルス動態。(A)強毒株 SHIV89.6P の血漿中ウイルス量。(B)攻撃接種9か月における PBMC およびリンパ節における

SHIV プロウイルス量。

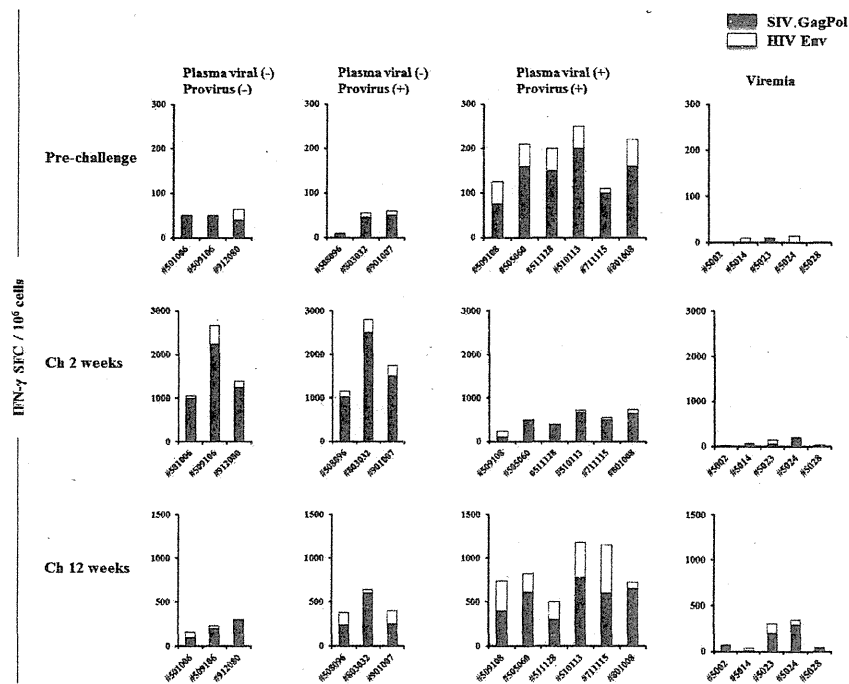


図 6 SHIV89.6P 攻撃接種後におけるウイルス抗原特異的 IFN- γ 産生細胞数。

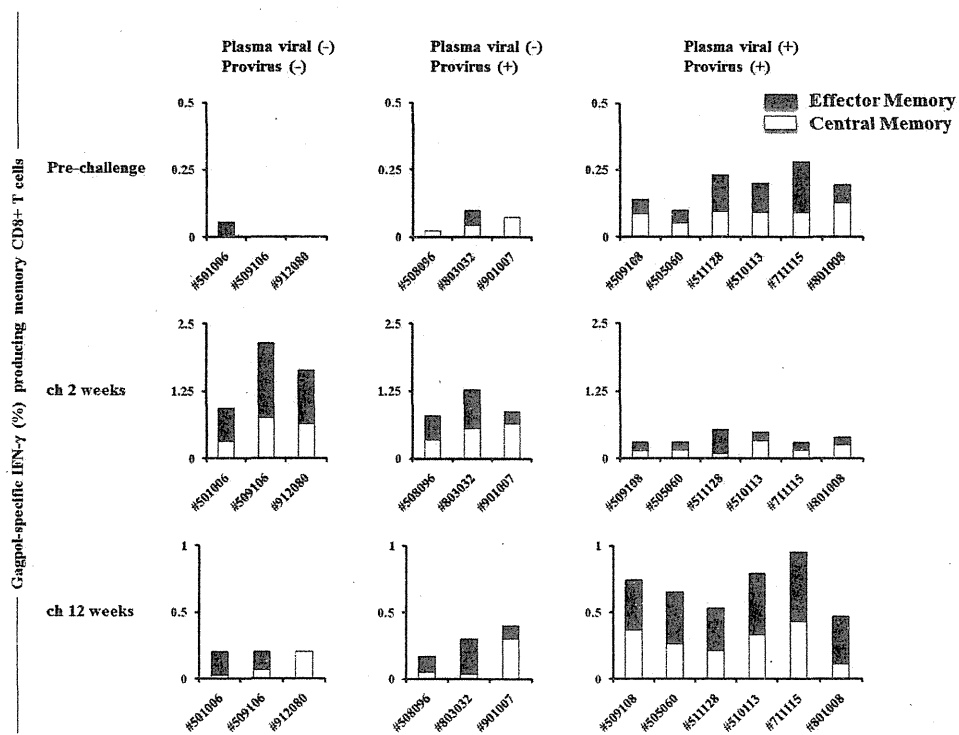


図 7 SHIV89.6P 攻撃接種後における IFN- γ 産生 CD8+T 細胞のメモリー分画。

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

**Evaluating adjuvant efficacy and safety through analysis of serum miRNA
and
immune cell gene expression levels□**

研究分担者 Daron M Standley

京都大学ウイルス研究所 細胞生物学研究部門 高次生体情報研究分野 特定教授
大阪大学免疫学フロンティア研究センター 免疫システム学 特任教授

Edward Wijaya, Bahtiyor Nosirov, Joel Billaud,

Kazuo Yamashita, Li Songling and Daron M. Standley

Laboratory of Systems Immunology, Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka, Japan.

Summary:

We report our accomplishments in several areas. First, we studied the dynamics of gene expression in various immune cell types in response to adjuvant administration. Second, we work on the characterization of long non-coding RNA role in T regulatory (Treg) cell development and maintenance. Next, as a step toward biomarker discovery, we looked at the target genes of circulating miRNAs and found that they preferentially target immune-related genes. Finally we report two new state-of-the-art servers, the first for antibody 3D modeling and the second for prediction of RNA binding sites on proteins.

A. 研究目的

Our group is collaborating with immunologists, toxicologists and other bioinformaticians to develop a comprehensive Adjuvant Database. The goal of this database is to describe the mode of action of adjuvant administration at various levels. To this end we are carrying various collaborative research projects and also developing novel computational methods.

Collaborative projects include: quantification of gene expression profiles after adjuvant administration in 10 different immune cell types; determining the specificity of long noncoding RNA in various T cell lineages, including regulatory T cells (Tregs); interaction of miRNA target prediction with gene expression data. We also describe two recent modeling methodologies: Kotai

Antibody Builder for 3D modeling of antibodies from sequence and aaRNA for predicting RNA binding sites on proteins. Both tools are currently the state-of-the-art in their field.

B. 研究方法

For adjuvant gene expression analysis we analyzed samples from lymph nodes (LN), liver (LV) and spleen (SP), induced with twenty adjuvants after local (i.d.) injection and systemic (i.p.) injection in mouse. For each sample we considered genes with fold change > 2 in their expression values. For analysis of large intergenic noncoding RNA (lincRNA) in Tregs, we used RNA-Seq data taken from mouse cells obtained from the development and differentiation of T-cell lineages (GEO: GSE48138). For integration of circulating miRNA and gene expression data, Immune response in silico (IRIS) microarray [GEO:GSE22886] was used (Abbas, et al., *Genes Immun* (2005)). Mouse microarray data was obtained from a set of orthologous genes (Shay, et al., 2013), covering 6 main immune cell types (T cell, B cell, NK cell, Monocyte, Dendritic cell and Neutrophil). The Kotai Antibody Builder technology (Shirai, et al., 2014; Yamashita, et al., 2014) and aaRNA (Li, et al., 2014) have been described previously.

C. 研究結果

C.1 Analyzing gene expression responses to adjuvants.

Our primary interest was to examine the impact of adjuvant administration on the dynamics of ten immune cell types.

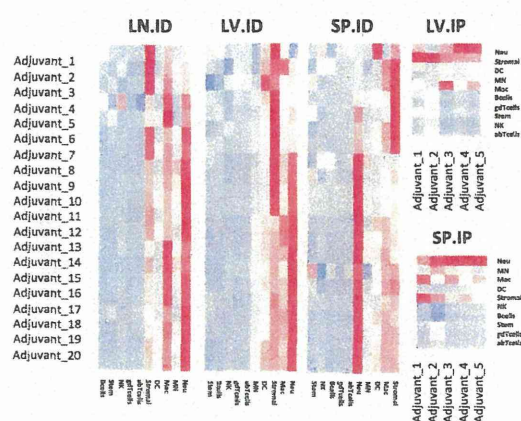


Figure 1. Dynamics of cell type expressions upon adjuvant administration.

Making use of the ImmGen profile (<https://www.immgen.org/>), we estimated the response of the cell types. Our finding (Figure 1) showed that in all tissues (LN, LV, SP), neutrophils are most responsive to the adjuvant administrations, followed by stromal cell and macrophages.

C.2 Characterizing the role of lincRNA in Treg development and maintenance.

The role of lincRNA as key regulators affecting both development and

regulation of immune cells is gaining attention. Nevertheless little is known about the role of lincRNAs in Tregs.

We analyzed lincRNA expression and coding gene profiles in samples obtained from the development and differentiation of T-cell lineages. Our result (Figure 2) showed that lincRNAs are expressed in Treg cells more than coding genes.

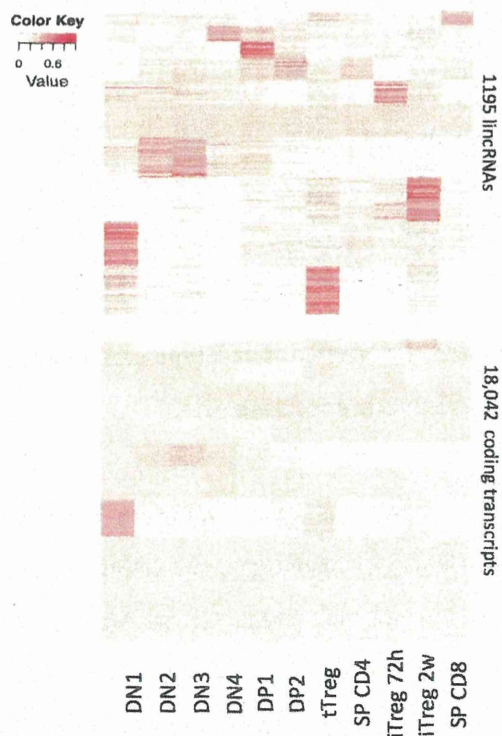


Figure 2. Lineage specificity of lincRNAs and coding genes in various Treg developmental stages. Color density expressed the expression level in raw read count. (Data source GEO: GSE48138).

We further calculated tissue a specificity

score for each transcript using Jensen-Shannon (JS) divergence. This specificity metric (ranging from 0 to 1) quantifies the similarity between transcript patterns across Treg lineages. Hence, a perfect Treg-specific pattern will have a JS score 1. As shown in Figure 3, lincRNAs are skewed toward Treg specificity more than coding genes.

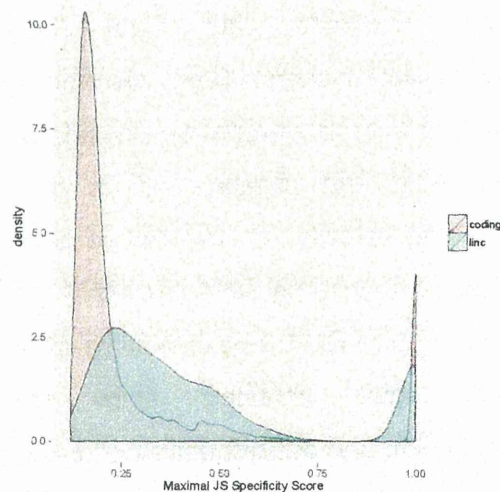


Figure 3. Tissue-specific expression. Shown here are distributions of maximal tissue specificity scores calculated for each transcript in lincRNA (blue) and coding genes (red).

Subsequently, we investigated the lineage distance among T cells. We considered samples from DP2 (double positive Tcell) and CD4 and CD8 cells in SP (single positive) thymic cells followed by tTreg (thymus derived) and induced Treg (iTreg) cells. As shown in Figure 4, we

found that lincRNA in SP_CD4 cells are closely related to DP2 cells, iTregs at 72hrs are close to SP_CD4 cells and SP_CD8 cells. Furthermore, SP_tTregs are somewhat related, albeit weakly, to SP_CD8 cells (Figure 4).

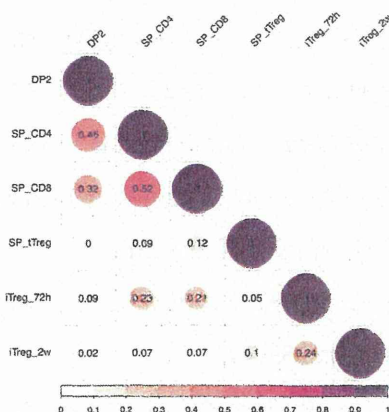


Figure 4. Lineage distances among various T-cell based on lincRNA profiles. Computed based on Spearman correlation rho-statistics. (Data source GEO: GSE48138).

C.3 Integration of circulating miRNA and gene expression data for target mRNA prediction

Here, we investigated targets of circulating miRNAs. Specifically, we examined the intersection between circulating miRNA targets and target gene expression in immune cells. By setting a threshold in gene expression levels, a set of 1600 immune-related genes was defined. We found this set of genes was

more likely to be targeted by circulating miRNAs than non-circulating miRNAs. This result was highly significant (p -value $< 10^{-5}$), and independent of the algorithm used to predict the target genes. Furthermore, we observed that a) immune genes have more miRNA binding sites than non-immune genes and b) circulating miRNAs have more target genes than non-circulating miRNAs. A biological explanation of this finding is still under investigation.

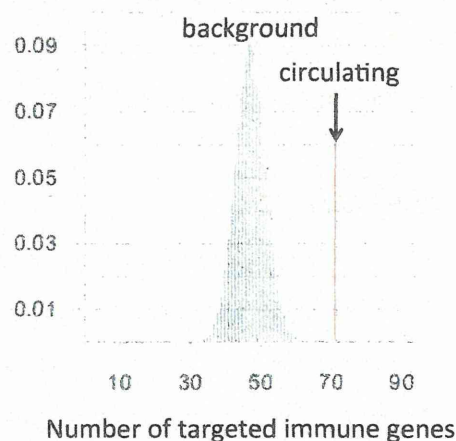


Figure 5. Circulating miRNAs preferentially target immune-related genes.

C.4 Kotai Antibody Builder and aaRNA

In related work, we have released two online servers. Kotai Antibody Builder is a 3D modeling server (Yamashita, et al., 2014) for antibodies that was found to be the most accurate in a blind test (Shirai, et al., 2014). aaRNA is a tool for predicting RNA binding sites on proteins that was also shown to be more accurate than any

tested method (Li, et al., 2014).

E. 結論

In summary, we are working on various challenging studies in order to enhance the practical utility of the Adjuvant Database for immunological studies. Specifically, these collaborations and novel methods will enhance quantitative and biologically relevant analysis of responses to adjuvants in humans. We have considered various data types: microarray, RNA-Seq, miRNA and 3D structure. This, in turn, will facilitate our discovery of effective and safe adjuvants.

F. 研究発表

1. Onishi M, Kuroda E, Kobiyama K, Ozasa K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y, Wijaya E, Yoshinobu I, Noriyuki N, Hiroshi Y, Vandenbon A, Standley DM, Coban C, Aoshi T, and Ishii KJ. “Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin spikes local inflammation that induces Th2 cell and T-follicular helper cell responses to the coadministered antigen.” *Journal of Immunology*, 2015, 194(6):2673-82.
2. Yamashita K, Ikeda K, Amada K, Liang S, Tsuchiya Y, Nakamura H, Shirai H, Standley DM, “Kotai Antibody Builder: automated high-resolution structural modeling of antibodies.” *Bioinformatics*, 2014, 30(22):3279-80.
3. Li S, Yamashita K, Amada KM, Standley DM, “Quantifying sequence and structural features of protein-RNA interactions.” *Nucleic Acids Res.* 2014 (15):10086-98.
4. Morikawa H, Ohkura N, Vandenbon A, Itoh M, Nagao-Sato S, Kawaji H, Lassmann T, Carninci P, Hayashizaki Y, Forrest ARR, Standley DM, Date H, Sakaguchi S, and the FANTOM Consortium. “Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(14):5289-94.
5. Uehata T, Iwasaki H, Vandenbon A, Matsushita K, Hernandez-Cuellar E, Kuniyoshi K, Satoh T, Mino T, Suzuki Y, Standley DM, Tsujimura T, Rakugi H, Isaka Y, Takeuchi O, Akira S. “Malt1-induced cleavage of Regnase-1 in CD4+ helper T cells regulates immune activation”, *Cell*, 2013, Volume 153, Issue 5, 1036-1049.
6. Vandenbon A, Kumagai Y, Teraguchi S, Amada KM, Akira S, Standley DM. “A Parzen window-based approach for the detection of locally enriched transcription factor binding sites”. *BMC Bioinformatics*, 2013, Volume 14, 26.
7. Takemura N, Kawasaki T, Kunisawa J, Sato S, Lamichhane A, Kobiyama K, Aoshi T, Ito J, Mizuguchi K,