

- Karuppuchamy T, Matsunaga K, Miyatake S, Mori N, Tsujimura T, Satoh T, Kumagai Y, Kawai T, Standley DM, Ishii KJ, Kiyono H, Akira S, Uematsu S. "Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome". *Nat Commun.*;5:3492.
8. Enokizono Y, Kumeta H, Funami K, Horiuchi M, Sarmiento J, Yamashita K, Standley DM, Matsumoto M, Seya T, Inagaki F. "Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor molecules involved in interferon signalling". *Proc Natl Acad Sci. USA*; 110(49):19908-19913.
9. Kawasaki T, Takemura N, Standley DM, Akira S, Kawai T. "The second messenger phosphatidylinositol-5-phosphate facilitates antiviral innate immune signalling". *Cell Host Microbe*;14(2):148-158.
10. Li, S., *et al.* Quantifying sequence and structural features of protein-RNA interactions. *Nucleic Acids Res* 2014;42(15):10086-10098.
11. Shay, T., *et al.* Conservation and divergence in the transcriptional programs of the human and mouse immune systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013;110(8):2946-2951.
12. Shirai, H., *et al.* High-resolution modeling of antibody structures by a combination of bioinformatics, expert knowledge, and molecular simulations. *Proteins* 2014;82(8):1624-1635.
13. Yamashita, K., *et al.* Kotai Antibody Builder: automated high-resolution structural modeling of antibodies. *Bioinformatics* 2014;30(22):3279-3280.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
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

Coban Cevayir、大阪大学免疫学フロンティア研究センター、特任准教授

#### 研究要旨：

Particulate adjuvants have been known to induce type 2 immune responses, but how this happens is not understood well. In the current project, we have investigated adjuvant properties of synthetic hemozoin (malarial-derived crystal structures of heme) on several important infectious disease models such as influenza vaccination and made a progress about its mode of action. We have confirmed that GLP grade synthetic hemozoin could be a good adjuvant in various animals including ferrets, dogs and non-human primates. Although many particulates contain adjuvant properties when synthesized in certain sizes, however, it seems that mode of action of each particulate adjuvant differs.

#### A. 研究目的

In this project, we aim to develop more potent and safer adjuvants. Because currently the only “in human use” adjuvant is aluminum based salts which is in particulate nature, thus, we specifically aim to understand by which mechanisms particulate adjuvants exert their mode of action. Recent advances on the understanding of the mode of action of Alum adjuvant, which alum employs its Th2 type adjuvanticity via utilization of TBK1/IRF3 axis, suggested that particulate adjuvants could be successful and be manipulated for better safety and

potency profile.

Our previous results have shown that synthetic hemozoin particles have adjuvant properties that could be used as veterinary vaccines in animals, especially against dog allergy or against influenza in ferrets or malaria vaccine in non-human primates (Coban *et al.*, 2010, *Cell Host Microbe*; Onishi *et al.*, 2014, *Vaccine*; Tougan *et al.*, *Hum Vaccines*, 2013). We’ve recently obtained a progress for the production of GMP-lot sHZ (in collaboration with Nihon Zenoaq Inc.) and have been addressing its mode of action.

## B. 研究方法

We employed below research method(s) in FY2014:

1. In collaboration with Nihon Zenoaq, we produced GLP-grade, evenly distributed, around 1  $\mu\text{m}$  in size, sterile sHZ particles with good adjuvant potency and reproducible production quality.

2. Evaluation of the mechanism of action of sHZ's adjuvant properties. We combined immunological and bioinformatics methods to understand mode of action of sHZ.

3. Evaluation of other adjuvants with Vaccine Science Laboratory.

倫理面への配慮)

In FY2014, we mainly performed mice experiments which were conducted in accordance with the guidelines of the Animal Care and Use Committee of Research Institute for Microbial Diseases and Immunology Frontier Research Center of Osaka University.

## C. 研究結果

1) GLP-lot sHZ production was completed (in collaboration with Nihon Zenoaq). We achieved to produce evenly distributed, around 1  $\mu\text{m}$  size, sterile sHZ particles with good adjuvant potency and reproducible production quality (Fig. 1).



Figure 1. GLP grade sHZ.

In collaboration with Prof. Kawaoka of

Tokyo University, using GLP-lot sHZ, we showed that mice immunized twice with sHZ-adjuvanted inactivated H1N1pdm09 or H5N1 virus elicited higher virus-specific antibody responses than did mice immunized with non-adjuvanted counterparts. Furthermore, mice immunized with sHZ-adjuvanted inactivated viruses were better protected from lethal challenge with influenza viruses than were mice immunized with non-adjuvanted inactivated vaccines. Thus, sHZ improves immunogenicity of inactivated influenza viruses, and is thus a promising adjuvant for inactivated whole virion influenza vaccines (Fig. 2) (Uraki *et al.*, 2014, *Vaccine*).

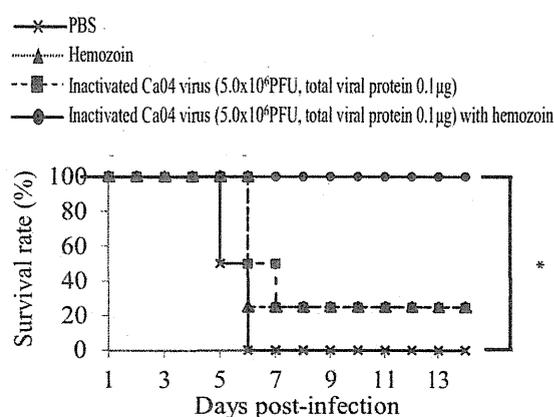


Figure 2. Protection against influenza by sHZ-adjuvanted vaccination.

2) We've combined immunological and bioinformatics methods to understand mode of action of sHZ. Previously we reported that adjuvant effect of sHZ was MyD88-dependent. We have continued these studies to understand how crystals could interact with MyD88-dependent, but TLR-independent pathways. Graduate student Muge Ozkan has been working on the mode of action of sHZ. One of the approaches is to investigate sHZ's effect on a single cell level by using new

imaging technologies such as Raman microscopy (Hobro et al, 2015, Analyst). We have used Raman spectroscopy as a label-free method to investigate the biochemical changes occurring in macrophages during the first few hours of hemozoin uptake. We think that these label-free Raman imaging can be used to answer some questions regarding the role of hemozoin in the immune response (Fig. 3).

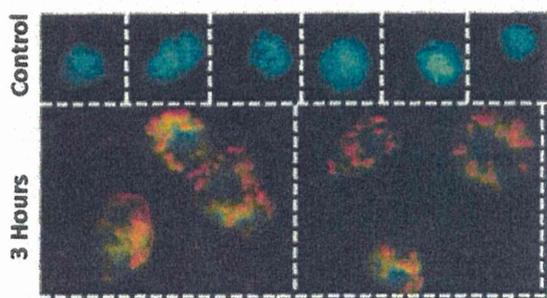


Figure 3. Label-free Raman imaging of macrophages after sHZ exposure.

Bioinformatics analysis to deeply understand this mode of action of sHZ is under way. Our studies will be finalized within this year.

3) In collaboration with Vaccine Science Laboratory and NIBIO Adjuvant Project we delineated other adjuvants's mode of action. Regarding this, recent work have suggested that locally injected hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD), increases antigen uptake by CD11c DCs which then facilitates the generation of Tfh cells. Then, MyD88 dependent signaling pathways and DAMPs induced TBK1 dependent signaling pathways are induced, thus leading adaptive immune responses (Figure 4, Onishi et al., 2015, *J. Immunology*).

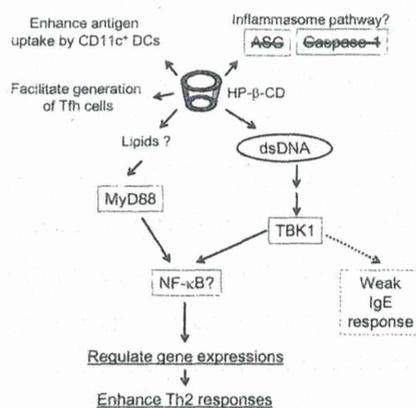


Figure 4. Mode of action of adjuvant property of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD).

#### D. 考察

Our goal in the Adjuvant Project is to seek safer and better adjuvants for human use. To do this, understanding mode of action of adjuvants is vital. In FY2014, characterization of cyclodextrin as a vaccine adjuvant has been revealed that it induces unique Th2 responses, enhancing Ag-specific IgG titers, including IgG1 and IgG2c titers, while the adjuvanticity is largely dependent on Tfh cells. Unlike alum, cyclodextrin induces little IgE production suggesting cyclodextrins could be alternative to Alum in humans.

Alternative imaging technologies could be used to understand mode of action of adjuvants. Therefore, label-free Raman imaging of single immune cell have a great potential to provide new information on this.

#### E. 結論

Within FY2014, we have achieved great progress to develop GLP-lot synthetic hemozoin ready to use at least for veterinary applications. Our current work on the mode of action of sHZ is rapidly progressing. Our findings together with

other adjuvants such as cyclodextrins, will open new ways to create safer and potent adjuvants in near future.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### Books

1) Kuroda E, Coban C, Ishii KJ. Chapter 10. Particulate and immunity. Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application (Edited by Misturu Akashi, Takami Akagi, Michiya Matsusaki), Nanomedicine and Nanotoxicology (Springer), pp 193-204, ISBN: 978-4-431-55138-6 (Print) 978-4-431-55139-3 (Online), 2014.

#### Journals

28) 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, Vandebon A, Standley DM, Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, 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, Mar 15; 194(6):2673-82.

29) Hobro AJ, Pavillon N, Fujita K, Ozkan M, Coban C, Smith NI. Label-free Raman imaging of the macrophage response to the malaria pigment hemozoin. *Analyst*, 2015, Mar 16; 140(7):2350-9.

30) Uraki R, Das SC, Hatta M, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Ozawa M, Coban

C, Ishii KJ, Kawaoka Y. Hemozoin as a novel adjuvant for inactivated whole virion influenza vaccine. *Vaccine*, 2014, Sep 15;32(41):5295-300.

31) Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, Haseda Y, Shimizu M, Kohyama M, Kobiyama K, Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshioka Y, Ishii KJ, Coban C. Olfactory Plays a Key Role in Spatiotemporal Pathogenesis of Cerebral Malaria. *Cell Host Microbe*, 2014, 15(5): 551-63.

### 2. 学会発表

1) Ozkan M, Onishi M, Ishii KJ, Coban C. Investigation of Potential and Mechanism of Hemozoin as Vaccine Adjuvant. (1-G-W12-8-O/P-2014E-0589) (Oral Poster). The 43<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, December, 10-12<sup>th</sup>, 2014, Kyoto, JAPAN.

2) Lee MSJ, Maruyama K, Akira S, Coban C. Investigation of molecular mechanisms of malaria-induced bone disorder. (3-I-W52-8-O/P-2014E-0522) (Oral Poster). The 43<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, December, 10-12<sup>th</sup>, 2014, Kyoto, JAPAN.

3) Coban C, Onishi M, Ozkan M, Ishii KJ. Potential and Mechanism of Hemozoin as Vaccine Adjuvant. (Poster). The Modes of Actions of Vaccine Adjuvants, Keystone Symposia, October 8-13, 2014, Seattle, WA, USA.

- 4) Coban C. Imaging malaria immunopathology. The 13<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara, September 23-26, 2014, Nara, JAPAN.
- 5) Coban C. Host-Pathogen Interactions during Malaria Infection. The University of Tokyo, Major in Animal Life Sciences, Dept. of Animal Resource Sciences, July 10, 2014, Tokyo, JAPAN.
- 6) Coban C. Host-Pathogen Interactions in the Context of Malaria. The 2<sup>nd</sup> International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress (MIMIC-II 2014), April 27- 30, 2014, Antalya, TURKEY.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

JP 2014-066193 (2014-03-27, JP). C. Coban, Y. Yoshioka, T. Aoshi, K.J. Ishii. *Diagnosis and medical treatment for cerebral malaria.*

2. 実用新案登録

None

3. その他

None

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

「アジュバント安全性評価データベースの構築研究」

研究報告書

## 粘膜アジュバントに対する宿主免疫応答の解析

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、アジュバント安全性評価に向けたデータベース構築に向け、粘膜アジュバントの開発と宿主免疫応答の解析を進めた。特に本事業において昨年度同定した IgA 抗体を高産生する細胞に関する知見を発展させた研究として食餌性脂質に着目した研究を遂行した。現在、多くの食用油が市販されているが、各食用油の脂肪酸組成の違いに着目した研究を遂行した。その結果、パーム油が腸管での IgA 抗体の産生を増強する働きがあることを見だし、その責任脂肪酸としてパルミチン酸を同定した。パルミチン酸は IgA 抗体産生細胞に直接的に作用し IgA 抗体の産生を促進すると共に、組織内でセリンパルミトイル転移酵素の働きによりスフィンゴ脂質へと代謝された後、IgA 抗体産生細胞の増殖を誘導することを明らかにした。これら食餌性脂質を起点にしたユニークな粘膜アジュバントの開発と宿主免疫応答の解析を独自に進めるのと同時に、本事業の班員が参加するアジュバント安全性データベースの開発に向けた会議に定期的に参加し、粘膜免疫学的観点からの情報提供とディスカッションを行った。

## A. 研究目的

近年、抗原を“吸わせる、飲ませる”といった方法でワクチンを投与する粘膜ワクチンが世界的に実用化されてきている。日本国内においても 2012 年に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。粘膜ワクチンは、多くの病原微生物の侵入門戸となっている粘膜組織における初発感染防御だけではなく、病原体が感染した後の生体防御を担う全身免疫系にも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、より汎用性の高いワクチンとして開発を進めていくためには優れたアジュバントの開発が必要不可欠である。研究分担者である國澤はこれまでに、粘膜ワクチンの主要エフェクター分子である IgA 抗体に着目した研究を遂行してきた。特に昨年度の本事業における研究から、IgA 抗体を高産生する新しい細胞サブセットを同定した (Nat Commun, 2013)。さらにこれら IgA 抗体を高産生するサブセットが腸管リンパ組織と腸内細菌に依存して誘導されることを見いだした。これに関連した研究として、我々はゲノム解析技術を駆使した腸内フローラの解析から主要腸管リンパ組織であるパイエル板の組織内部のみに検出される共生細菌として *Alcaligenes* を同定した。*Alcaligenes* はパイエル板樹状細胞の活性化を介し IgA 誘導性サイトカインの産生を促進することを報告している (Mucosal Immunol, 2013; Proc Natl Acad Sci USA, 2010)。

本事業においては上記の知見を基盤に、腸内フローラと並び重要な腸内環境因子である栄養成分のうち油に着目した研究を遂

行し、粘膜アジュバントのシーズ分子となりうる脂質型アジュバントの開発を進めると同時に、それらに対する宿主免疫応答を明らかにすることで、有効性と安全性に優れた粘膜アジュバントの開発に向けた情報を獲得することを目的とする。さらにこれらの情報をアジュバントデータベースに反映させる。

## B. 研究方法

### B-1. マウスの飼育と薬剤処理

雌性 BALB /c マウスは日本クレアから購入した。大豆油またはパーム油を含むマウス用餌はオリエンタル酵母工業にて作製した。全てのマウスは、無菌の餌および水を自由に与えた。各餌で飼育した 2 ヶ月後に糞便を回収し、ELISA 法にて IgA 抗体量を測定した。セリンパルミトイル転移酵素活性を阻害する実験においては、ミリオンシ (Sigma-Aldrich, 1 mg/kg) を腹腔内に連日 4 日間投与した。

### B-2. 経口免疫

胃酸を中和するために経口免疫 30 分前に炭酸水素ナトリウムを経口投与した。その後、マウスに 1 mg のニワトリ卵白アルブミン (OVA, Sigma-Aldrich) と 10  $\mu$ g のコレラトキシン (List Biological Laboratories) を混合した液を経口投与した。この経口免疫は 1 週間おきに計 3 回行い、最終免疫の 1 週間後に糞便を回収し OVA 特異的 IgA 抗体価の測定を ELISA 法にて行った。

### B-3. 細胞の単離

パイエル板からの細胞の単離は 0.5 mg/mL のコラゲナーゼ (和光純薬) を含む 2% ウシ胎児血清 (FCS) 入り RPMI 1640 培地にてパイエル板組織を 15 分間 3 回攪拌

することで得た。腸管粘膜固有層からの細胞の単離は、パイエル板を除去した小腸および大腸を2cm片に切断した後、1mM EDTA及び2%FCSを含むRPMI1640中で攪拌した。さらに細断した各組織を15分間3回コラゲナーゼ(大腸1.6 mg/mL、小腸0.8 mg/mL)で攪拌した。回収した細胞から単核球分画を40%および75%の不連続パーコール密度遠心法により回収した。

#### B-4. フローサイトメーター解析

回収した細胞を抗CD16/32抗体(Fc block)と反応させた後、蛍光標識したB220とIgA(Biolegend)に特異的な蛍光抗体で染色した。ViaProbe(BD Biosciences)を死細胞の識別に用いた。フローサイトメトリー分析および細胞の分取はそれぞれFACSCantoIIとFACS Aria(BD Biosciences)を用いて行った。

#### B-5. 培養系を用いた抗体産生機能解析

IgA陽性B220陰性のIgA抗体を産生する形質細胞をCell sortorを用いて回収した。10<sup>5</sup>個の細胞を各濃度のパルミチン酸と共に培養した。96時間後の培養上清を回収し、ELISAによって培養上清中のIgAの量を測定した。

### C. 研究結果

#### C-1. 腸管 IgA 抗体産生に与える食用油の影響

腸管 IgA 産生に対する食用油の影響を調べるために4%の大豆油(対照群)またはパーム油を含む食餌でマウスを2ヶ月間飼育し、その後の糞便中 IgA の量を測定した。その結果、パーム油を含む餌で飼育したマウスにおいて、大豆油を含む餌で飼育したマウスよりも高い糞便中 IgA 量が検出された(図1)。

パーム油はパルミチン酸およびオレイン酸を多く含むことを特徴としているが、オレイン酸を同レベルで含有している菜種油を含む餌で飼育したマウスでは、腸管 IgA 抗体の産生増強は認められなかった(データは示さず)。これらのことからパルミチン酸が腸管 IgA 産生を増強させる脂肪酸であると考えられた。

#### C-2. 腸管 IgA 抗体産生に与えるパルミチン酸の影響

次にパルミチン酸による腸管 IgA 抗体に対する作用を検討する目的で、コントロール油である大豆油にパーム油と同レベルになるようにしたパルミチン酸を加えた。パルミチン酸を加えた大豆油(大豆油+パルミチン酸)を含む餌で2ヶ月間飼育したマウスにおいても、パーム油の場合と同様の糞便中の IgA 抗体の増加が認められた(図2)。これらの結果から、パルミチン酸が腸管の IgA 抗体の産生増強において重要な脂肪酸であると考えられる。

#### C-3. 各種食用油を与えたマウスにおける経口ワクチン効果

各種食用油で飼育したマウスにおける経口ワクチン効果について検討した。前述の実験と同様、大豆油、パーム油、大豆油+パルミチン酸のそれぞれを含む餌でマウスを2ヶ月間飼育した後、モデル抗原であるニワトリ卵白アルブミン(OVA)と粘膜アジュバントであるコレラトキシンを混合したものをマウスに経口免疫した。これらのマウスの糞便中におけるOVA特異的IgA抗体価を測定したところ、パーム油もしくは大豆油+パルミチン酸を含む餌で飼育したマウスにおいて抗体価の増加が認められた(図2)。

#### C-4. IgA 抗体産生におけるパルミチン酸の直接的な作用

上記の結果を踏まえ、IgA 抗体産生細胞に対するパルミチン酸の直接作用について検討した。腸管から IgA 抗体産生細胞を精製し、4日間パルミチン酸と共に培養した。培養上清中の IgA 抗体量を測定したところ、パルミチン酸の濃度に依存した IgA 抗体産生の増強効果が認められた (図 3)

#### C-5. セリンパルミトイル転移酵素依存的な大腸 IgA 抗体産生細胞の増加

腸管組織におけるパルミチン酸の影響を検討する目的で、大豆油+パルミチン酸を含む餌で飼育したマウスの小腸と大腸における IgA 抗体産生細胞をフローサイトメトリーにて測定した。小腸においては食用油による差は認められなかったのに対し、大腸においては大豆油+パルミチン酸の群で IgA 抗体産生形質細胞の増加が認められた (図 4)。同様に OVA の経口免疫により誘導される OVA 特異的 IgA 形成細胞の数も大豆油+パルミチン酸を含む餌で飼育したマウスの大腸において増加していた (データは示さず)。

パルミチン酸は生体内において、セラミドやスフィンゴシン、スフィンゴシン 1 リン酸を含むスフィンゴ脂質に変換される。これらのスフィンゴ脂質は細胞増殖や生存、遊走を制御することが知られている。そこで次にパルミチン酸による IgA 抗体産生細胞増加におけるスフィンゴ脂質への代謝の影響を検討した。そのためにパルミチン酸からスフィンゴ脂質への変換代謝に重要なセリンパルミトイル転移酵素を阻害した際の影響を調べた。その結果、セリンパルミトイル転移酵素阻害剤であるミリオシンを投与したマウスの大腸においては、パルミチン酸増加による大腸の IgA 抗体産生細胞

の増加は認められなかった (図 4)。

#### D. 考察

本事業における研究から、腸管の IgA 抗体産生を増強する脂肪酸としてパルミチン酸を同定した。このパルミチン酸による腸管 IgA 抗体の産生増強には、少なくとも 2 つの異なる経路が存在することを示した。一つは抗体産生する形質細胞に直接作用し抗体産生を増強させる経路である。もう一つはパルミチン酸が腸管組織においてスフィンゴ脂質に代謝された後、IgA 抗体産生細胞の増加を誘導する。

第一の経路に関し、IgA 抗体ではなく IgG 抗体を産生する細胞とパルミチン酸を共培養した場合においても、IgA の場合と同様の抗体産生増強効果が認められた (データは示さず)。このことからパルミチン酸は抗体のタイプに関わらず抗体産生を増強出来ると考えられる。一方でマウスの各組織におけるパルミチン酸を定量したところ、大豆油+パルミチン酸を含む餌で飼育したマウスにおいて、小腸や大腸においてはパルミチン酸の増加が認められたが、血液中では増加が認められなかった (データは示さず)。これらを考えると実際の生体においては食餌性のパルミチン酸の増加は腸管局所でのみ影響を与え、その結果、腸管での IgA 抗体が増強されたものと考えられる。

第二の経路に関し、セリンパルミトイル転移酵素を介したパルミチン酸からスフィンゴ脂質への代謝経路の関与を提示した。スフィンゴ脂質は様々な生理機能を持つことが知られている。例えば、セラミドは細胞骨格、細胞周期、およびアポトーシスを調節する。またスフィンゴシン 1 リン酸は細胞の遊走を制御することが知られており、我々の以前の研究でもスフィンゴシン 1 リン酸が IgA 抗体産生細胞の腸管組織への遊

走を制御していることを示している。すなわちスフィンゴ脂質が細胞の増加、生存、遊走を制御することで、大腸組織におけるIgA 抗体産生細胞の増加を誘導したことが考えられる。

これらの経路に加えて、パルミチン酸は樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に作用し、抗原提示の促進やIL-6、TNF  $\alpha$  といったサイトカインの産生に影響を与えることが知られており、これら抗原提示細胞を介したIgA 抗体産生増強の経路も考えられる。

今後は本研究から得られた知見をもとに、パルミチン酸を基盤とした新たな粘膜アジュバントの可能性について検証を進めていきたいと考える。

## E. 結論

食用油として用いられているパーム油に腸管IgA 抗体産生増加効果があることを見だし、その責任脂肪酸の一つがパルミチン酸であることを発見した。さらにその作用機序として、パルミチン酸がIgA 抗体産生細胞に直接作用し、抗体産生を増強させる経路と、パルミチン酸がスフィンゴ脂質に代謝された後、IgA 抗体産生細胞の増加を誘導する経路が存在することを明らかにした。

## 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 J. Kunisawa\*, M. Arita, T. Hayasaka, T. Harada, R. Iwamoto, R. Nagasawa, S. Shikata, T. Nagatake, H. Suzuki, E. Hashimoto, Y. Kurashima, Y. Suzuki, H. Arai, M.

Setou, and H. Kiyono, Dietary  $\omega$ 3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to 17,18-epoxyeicosatetraenoic acid in the gut. *Sci Rep* (2015, in press)

- 2 Y. Kurashima, H. Kiyono, and J. Kunisawa\*, Pathophysiological role of extracellular purinergic mediators in the control of intestinal inflammation, *Mediators of Inflammation* (2015, in press)
- 3 J. Kunisawa\* and H. Kiyono, Vitamins mediate immunological homeostasis and diseases at the surface of the body, *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* (2015, in press)
- 4 Y. Goto, T. Obata, J. Kunisawa, S. Sato, I. I. Ivanov, A. Lamichhane, N. Takeyama, M. Kamioka, M. Sakamoto, T. Matsuki, H. Setoyama, A. Imaoka, S. Uematsu, S. Akira, S. E. Domino, P. Kulig, B. Becher, J. Renauld, C. Sasakawa, Y. Umesaki, Y. Benno, and H. Kiyono, Innate lymphoid cells govern intestinal epithelial fucosylation, *Science* 345(6202): 1254009, 2014
- 5 A. Sato, A. Suwanto, M. Okabe, S. Sato, T. Nochi, T. Imai, N. Koyanagi, J. Kunisawa, Y. Kawaguchi, and H. Kiyono, 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, 2014
- 6 J. Kunisawa\*, E. Hashimoto, A. Inoue, R. Nagasawa, Y. Suzuki, I. Ishikawa, S. Shikata, M. Arita, J. Aoki, and H. Kiyono, Regulation of intestinal IgA responses by dietary palmitic acid and its metabolism, *J Immunol* 193: 1666-1671, 2014
  - 7 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, The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis, *Immunity* 40:530-41, 2014
  - 8 長竹貴広、國澤純 腸管組織における多元的免疫制御システムと食物アレルギー *医学のあゆみ* (印刷中)
  - 9 鈴木英彦、國澤純 粘膜免疫の特異性に着目したワクチンマテリアルの開発 *感染・炎症・免疫* (印刷中)
  - 10 鈴木英彦、國澤純 CD11b 陽性 IgA 産生細胞の誘導と機能 *臨床免疫・アレルギー科* 62: 552-556, 2014
  - 11 倉島洋介、佐藤健、清野宏、國澤純 DAMPs によるマスト細胞の活性化と疾患 *臨床免疫・アレルギー科* 62: 675-679, 2014
  - 12 長竹貴広、國澤純 脂質を介した腸管免疫システムの制御 *医学のあゆみ* 248, 1019-1024, 2014
  - 13 鈴木英彦、國澤純 粘膜免疫システム
- の多面的機能を応用したワクチン開発の現状と未来 The Frontiers in Life Sciences 「生命科学からの創薬へのイノベーション」 57-62, 2014
- 14 鈴木英彦、近藤昌夫、八木清仁、清野宏、國澤純 微生物の有する粘膜組織指向性を用いた粘膜ワクチンデリバリー開発への展望 *薬学雑誌* 134, 629-634, 2014
  - 15 近藤昌夫、國澤純 上皮細胞を標的とした創薬研究の新展開 *薬学雑誌* 134, 613, 2014
  - 16 高里良宏、倉島洋介、清野宏、國澤純 抑制型免疫システムを応用した次世代型抗アレルギーワクチンの開発 *Bioindustry* 6, 55-60, 2014
2. 学会発表
    1. 國澤純、粘膜免疫のユニーク性を標的としたワクチンの開発の最前線 日本薬学会第 135 年会 神戸 (神戸学院大学) (2015 年 3 月 28 日)
    2. 鈴木英彦、國澤純、Claudin-4 を標的とした経鼻ワクチンの開発 日本薬学会第 135 年会 神戸 (神戸学院大学) (2015 年 3 月 27 日)
    3. Jun Kunisawa, Lipid-mediated immune network in the development of intestinal allergy 第 88 回 日本薬理学会年会 名古屋 (名古屋国際会議場) (2015 年 3 月 20 日)
    4. 國澤純、腸管免疫ネットワークの学術的解明と創薬・ワクチン開発への展開 第 7 回 鈴鹿病態薬学研究会 三重 (鈴鹿医療科学大学) (2015 年 2 月 25 日)
    5. 國澤純、腸内環境因子を介した免疫制

御の基礎的解明と免疫創薬への応用  
千里ライフサイエンスセミナー – ア  
カデミア創薬の進展 – 大阪 (千里ラ  
イフサイエンスセンター) (2015年2  
月13日)

6. Takahiro Nagatake, Makoto Arita, Ryo Iwamoto, Takahiro Hayasaka, Takashi Harada, Tetsuya Honda, Naomi Matsumoto, Michiko Shimojou, Risa Nagasawa, Shiori Shikata, Eri Hashimoto, Yosuke Kurashima, Yuji Suzuki, Hidehiko Suzuki, Kenji Kabashima, Hiroyuki Arai, Mitsutoshi Setou, Hiroshi Kiyono, and Jun Kunisawa, Dietary  $\omega$ 3 fatty acid-originated 17,18-epoxyeicostetraenoic acid prevents the development of allergic inflammation in the gut and skin 6<sup>th</sup> Phospholipase A2 and Lipid Mediators, Tokyo, Japan (10 - 12 February, 2015)
7. 國澤純、腸内環境を介した免疫制御とワクチン開発・免疫創薬への展開 第19回 関西大学先端科学技術シンポジウム 大阪 (関西大学) (2015年1月23日)
8. Takahiro Nagatake, Naomi Matsumoto, Michiko Shimojou, Hidehiko Suzuki, Satoshi Fukuyama, Shintaro Sato, Kentaro Ogami, Yusuke Tsujimura, Mitsuo Kawano, Tetsuya Nosaka, Hiroshi Kiyono, Yasuhiro Yasutomi, and Jun Kunisawa, Immunological and organogenesis diversity of mucosa-associated lymphoid tissues for the development of mucosal vaccine 第8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) (2015年1月20日)

9. 鈴木英彦、米満美紀、長竹貴広、池上浩司、瀬藤光利、清野宏、近藤昌夫、國澤純、Claudin-4 標的型肺炎球菌ワクチンの開発と鼻腔の物理的機能の免疫誘導に与える影響の検討 第8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) (2015年1月20日)
10. Sachiko Akashi-Takamura, Natsuko Yamakawa, Takuma Shibata, Yosuke Kurashima, Jun Kunisawa, Hiroshi Kiyono, Kazuhiro Suzuki, Junichi Kikuta, Masaru Ishii, and Kensuke Miyake, MD-1 influences a binding between S1P1 and BCR 第43回日本免疫学会学術集会、京都 (国立京都国際会館) (2014年12月10-12日)
11. Aldina Suwanto, Ayuko Sato, Shintaro Sato, Tomonori Nochi, Jun Kunisawa, and Hiroshi Kiyono, Vaginal resident memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for early clearance of genital HSV-2 infection 第43回日本免疫学会学術集会、京都 (国立京都国際会館) (2014年12月10-12日)
12. Satoshi Ueha, Fumiko Suenaga, Jun Abe, Mizuha Kosugi, Yusuke Shono, Jun Kunisawa, Shintaro Sato, Hiroshi Kiyono, and Koji Matsushima, Loss of lymph node fibroblastic reticular cells and high endothelial cells underlies humoral immunodeficiency in mouse GVHD 第43回日本免疫学会学術集会、京都 (国立京都国際会館) (2014年12

- 月 10-12 日)
13. Jun Kunisawa Functional Diversity of IgA-producing Plasma Cells for the Development of Mucosal Vaccine The 1<sup>st</sup> International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014 (University of Tokyo, Tokyo, 21 October, 2014)
  14. 國澤純、脂質—免疫ネットワークを起点にした免疫疾患の解明と創薬研究への展開 第 87 回 日本生化学会 京都 (国立京都国際会館) (2014 年 10 月 16 日)
  15. 國澤純、東洋医学を起点とした粘膜免疫制御メカニズムの解明と創薬への展開 日本生薬学会第 61 回年会 福岡 (福岡大学) (2014 年 9 月 13 日)
  16. 國澤純、粘膜免疫のユニーク性に基づく粘膜ワクチンの開発・免疫創薬への新展開 第 30 回 日本 DDS 学会 東京 (慶応義塾大学) (2014 年 7 月 31 日)
  17. 國澤純、腸内環境因子を介した免疫制御の解明と創薬・ワクチン開発への展開 第 18 回 腸管出血性大腸菌感染症研究会 京都 (同志社大学寒梅館) (2014 年 7 月 15 日)
  18. Yoshifumi Kotani, Jun Kunisawa, and Hiroshi Kiyono, The mechanism underlying the IgA enhancement of Lactobacillus pentosus strain b240 in the gut immune system FOCIS 2014, Chicago, US (25 - 28 June, 2014)
  19. 國澤純、東洋医学を起点とした粘膜免疫制御メカニズムの解明と創薬への展開 第 65 回 日本東洋医学会学術総会 東京 (東京国際フォーラム) (2014 年 6 月 28 日)
  20. Jun Kunisawa Commensal Bacteria and Diet in the Control of Intestinal Immunosurveillance and Diseases 18th Annual Meeting of Intestinal Microbiology (University of Tokyo, Tokyo, 12 June, 2014)
  21. 國澤純、腸内環境ネットワークを介した免疫制御とヘルスサイエンス 第 14 回日本抗加齢医学会総会 大阪 (大阪国際会議場) (2014 年 6 月 6 日)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

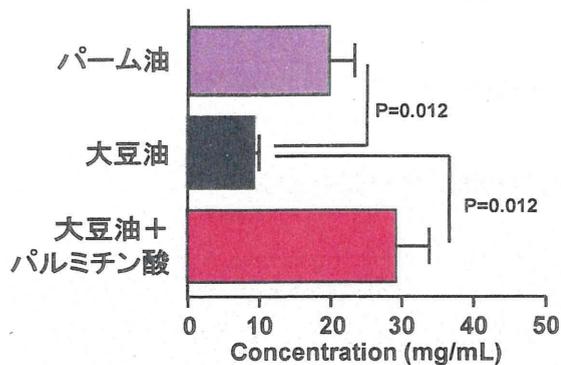


図 1

各食用油を4%含む餌で2ヶ月間飼育した後の糞便中IgA量をELISA法にて測定した。

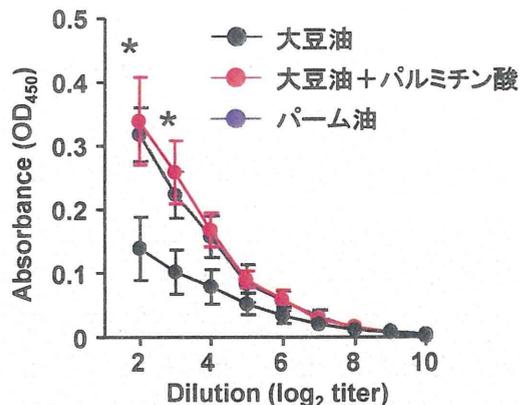


図 2

各食用油を4%含む餌で2ヶ月間飼育したマウスにOVAとコレラトキシンを経口免疫した際に産生された糞便中のOVA特異的IgA抗体価をELISA法にて測定した。

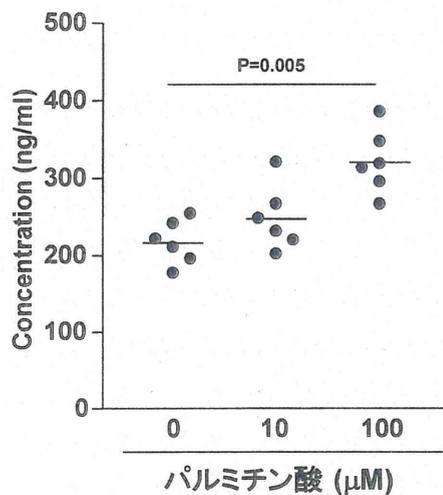


図 3

小腸から単離、精製したIgA抗体産生細胞を各濃度のパルミチン酸と培養した。4日後の培養上清中のIgA量をELISA法にて測定した。

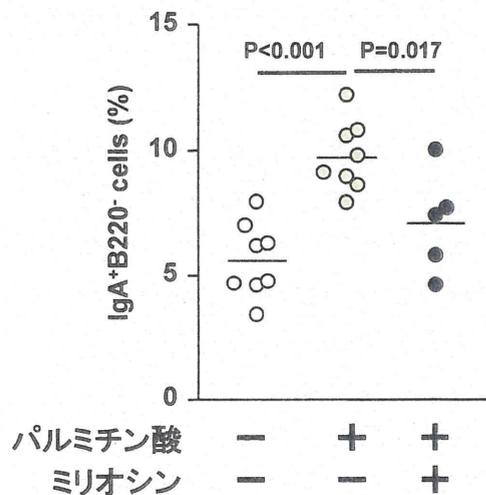


図 4

各食用油を4%含む餌で2ヶ月間飼育したマウスの大腸から細胞を単離し、IgA陽性B220陰性の形質細胞の割合をフローサイトメトリーで測定した。セリンパルミトイル転移酵素を阻害した群においてはミリオシンを投与した。

結核菌由来のアジュバント成分の解析

研究分担者 山崎 晶 九州大学生体防御医学研究所教授

**研究要旨：**結核菌は古くから強いアジュバント活性を有することが知られていたが、その作用機序は長年不明であった。近年申請者らは、結核菌を認識する新規受容体として、C型レクチン受容体 Mincle を発見し、そのリガンドとしてトレハロースジミコール酸を同定した。さらに、新たなリガンドの探索を実施し、アジュバント活性を有する複数の新規糖脂質を同定した（Cell Host Microbe, 2013）。また、新規結核菌受容体 MCL を同定した（Immunity, 2013）。Mincle、MCL の受容体の結晶構造を明らかにし（PNAS, 2013）、新たな合成リガンドを理論的な設計が可能となった（Chem Commun 2015）。また、ヒト Mincle は糖脂質のみならず、グリセロ脂質を認識することを明らかにした（J Biol Chem 2014）。以上の結果から、これら新規受容体を介する新たな作用メカニズムに基づくアジュバント（免疫賦活剤）の創成が期待される。本研究では、古くから丸山ワクチンの主成分として知られていたリポアラビノマンナンの作用機序を解析した結果、その受容体として C 型レクチン受容体 Dectin-2 を同定した（Immunity, 2014）。

**A. 研究目的**

結核菌を含む結核菌の細胞壁は、様々な免疫賦活活性を有する構成成分に富む。なかでも、マンノース付加リポアラビノマンナンは結核菌をはじめ病原性をもつ結核菌にみられ、宿主の免疫応答に対し多面的な効果を発揮すること、また丸山ワクチンの主成分でもあることから、これまで精力的に研究されてきた。これまで多くの受容体候補が報告されてきたが、そのいずれもリポアラビノマンナンのもつ多様なアジュバント活性や免疫調節機構を説明するには不十分であった。こうした背景を踏まえ、本研究では、リポアラビノマンナンを認識する真の宿主受容体を同定することを目的とした。

**B. 研究方法・結果**

**1. Dectin-2 はマンノース付加リポアラビノマンナンを介し結核菌を認識する**

リガンドの認識を蛍光により検出できるインジケーター細胞を用いて、Dectin-2 が結核菌を認識するかどうか調べた。Dectin-2 は Mincle と同

様に、強毒株である結核菌 H37Rv 株やワクチン株であるウシ型結核菌 BCG を認識したが、Dectin-2 のリガンドは Mincle のリガンドであるトレハロースジミコール酸とは異なっていた。ウシ型結核菌 BCG の成分の分画において、水性画分のみが Dectin-2 に対する活性を示した。結核菌のもつ親水性成分のうちリポアラビノマンナンはもっとも豊富なリポグリカンであることから、結核菌に由来するリポアラビノマンナンを用いて Dectin-2 発現インジケーター細胞を刺激したところ、このインジケーター細胞は活性化され、Dectin-2 がリポアラビノマンナンを認識することが明らかになった。

さまざまな菌株を用いた検討により、Dectin-2 はマンノース付加リポアラビノマンナンをもつ菌株を認識するが、キャップ構造を欠くりポアラビノマンナンをもつ菌株は認識しないことがわかった。また、マンノース付加リポアラビノマンナンを  $\alpha$  マンノシダーゼにより処理してマンノースを取り除くと Dectin-2 に対する活性は失われた。さらに、マンノースの結合に重要な EPN 配列

をガラクトース結合型のQPD配列に置換したインジケーター細胞を用いることにより、Dectin-2によるマンノース付加リポアラビノマンナンおよび結核菌の認識はそのEPNモチーフに依存していることが確認された。以上の結果から、Dectin-2はマンノース付加リポアラビノマンナンを介して結核菌を認識し、Dectin-2とマンノース付加リポアラビノマンナンの相互作用にはマンノース付加リポアラビノマンナンのキャップ構造およびDectin-2のマンノースとの結合能の両方が必要であることがわかった。

## 2. リポアラビノマンナンは樹状細胞のサイトカインの産生を Dectin-2 に依存して誘導する

樹状細胞は骨髄系細胞のなかで Dectin-2 をもっとも豊富に発現することから、骨髄に由来する樹状細胞を用いてリポアラビノマンナンの刺激によるサイトカインの産生について検討した。リポアラビノマンナンはトレハロースジミコール酸と同様に、MIP-2、TNF、インターロイキン6などの炎症性サイトカインの産生をその濃度に依存して誘導した。Dectin-2 ノックアウトマウスの骨髄に由来する樹状細胞においてはリポアラビノマンナンにより誘導されるサイトカインの産生は消失したが、トレハロースジミコール酸を介するサイトカインの産生は変化しなかった。ウシ型結核菌 BCG の感染による TNF あるいはインターロイキン6の産生については、Dectin-2 に非依存的な産生は残存したものの、野生型マウスと比較して Dectin-2 ノックアウトマウスの骨髄に由来する樹状細胞においては部分的に減少した。これらのことから、Dectin-2 が樹状細胞におけるリポアラビノマンナンによる炎症性サイトカインの産生に決定的な意味をもつことが示された。

アラビノマンナン-Dectin-2 経路の抗炎症作用に焦点をあて、マンノース付加リポアラビノマンナンが炎症性サイトカインにくわえ、抗炎症性サイトカインであるインターロイキン10の産生を Dectin-2 に依存して誘導することも見い出

された。他方、トレハロースジミコール酸あるいはリポ多糖ではインターロイキン10あるいはインターロイキン2の産生は誘導されなかった。さらに、ウシ型結核菌 BCG の感染におけるインターロイキン10あるいはインターロイキン2の産生は、TNF とは対照的に、Dectin-2 ノックアウトマウスの骨髄に由来する樹状細胞ではほぼ完全に障害された。また、キャップ構造を欠くりポアラビノマンナンをもつ *Mycobacterium abscessus* は、MIP-2 の産生は誘導したのに対し、インターロイキン10あるいはインターロイキン2の産生は誘導できなかった。これらの結果から、結核菌に応答したインターロイキン10あるいはインターロイキン2の産生において、Dectin-2 が中心的な役割をはたしていることが示唆された。

## 3. リポアラビノマンナンは生体において有害な炎症を惹起しない

リポアラビノマンナンが炎症反応を惹起するかどうか、生体にマンノース付加リポアラビノマンナンを投与することにより検討した。まず、マウスにリポアラビノマンナンあるいはリポ多糖を気管から投与し、気管支肺胞洗浄液における炎症細胞の浸潤およびサイトカインの産生について評価した。野生型マウスにおいてリポ多糖は TNF の産生や細胞の浸潤を有意に増加させたが、リポアラビノマンナンは顕著な炎症反応は誘導しなかった。Dectin-2 および Mincl の共通のサブユニットである Fc 受容体γ鎖を欠損したマウスにマンノース付加リポアラビノマンナンを投与しても、野生型マウスと比べて明らかな差はみられなかった。

静脈からの投与において、トレハロースジミコール酸の投与では、既報のとおり、炎症性の肺の腫脹および肺における肉芽腫の形成が確認された。それに対して、同量のマンノース付加リポアラビノマンナンの投与では肺の腫脹や肉芽腫の形成は惹起されなかった。これらの結果から、リポアラビノマンナンは、トレハロース

ジミコール酸やリポ多糖などほかの病原細菌関連分子パターン（pathogen-associated molecular pattern : PAMP）と比べ、肺に強い炎症をひき起こさないことが示された。

#### 4. リポアラビノマンナンは生体外において抗原提示能を増強する

リポアラビノマンナンのアジュバント活性について生体外において評価した。樹状細胞の成熟に対する効果を調べるため、リポアラビノマンナンにより刺激した骨髄に由来する樹状細胞における補助刺激分子の発現について評価した。すると、リポアラビノマンナンは野生型の骨髄に由来する樹状細胞において CD40 および CD80 の発現を亢進させたが、Dectin-2、あるいは、Dectin-2 および MinCLE の共通のサブユニットである Fc 受容体  $\gamma$  鎖が存在しないとその効果はみられず、リポアラビノマンナンが Dectin-2 に依存して樹状細胞の成熟を促進することが示された。

リポアラビノマンナンによる刺激に対する樹状細胞のもつ抗原提示能について調べた。骨髄に由来する樹状細胞と卵白アルブミンに特異的な OT-II T 細胞受容体トランスジェニックマウスに由来する T 細胞との共培養系において、OT-II T 細胞の抗原に特異的なインターロイキン 17 の産生はマンノース付加リポアラビノマンナンにより処理した樹状細胞と共培養した際に有意に増強した。他方、Dectin-2 を欠損した樹状細胞を用いると、この増強効果は著明に減弱した。共培養上清におけるインターロイキン 10 の濃度は抗原の濃度に依存して上昇し、リポアラビノマンナン-Dectin-2 経路により刺激された樹状細胞の存在のもと、インターロイキン 10 を産生する T 細胞が分化したことが示唆された。

以上から、生体外におけるリポアラビノマンナンによる刺激は樹状細胞のもつ抗原提示能を増強し、Dectin-2 に依存してインターロイキン 17 の産生を促進することが示唆された。

#### 5. リポアラビノマンナンによる免疫は Dectin-2 を介して実験的自己免疫性脳脊髄炎の発症を誘導する

生体外においてリポアラビノマンナンによる Dectin-2 の活性化によりインターロイキン 17 の産生の誘導が確認されたことから、Th17 細胞に依存性の自己免疫疾患のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎について調べた。リポアラビノマンナンをアジュバントとしてマウスに投与すると、野生型マウスはすべて実験的自己免疫性脳脊髄炎を発症したのに対し、Dectin-2 ノックアウトマウスはまったく発症しなかった。この知見から、リポアラビノマンナンに対するほかの受容体は、生体において Dectin-2 の欠損を代償できないことがわかった。

さらに、免疫したマウスから鼠径、腰部、腋窩リンパ節を採取し、リンパ節細胞を生体外において抗原により刺激したところ、野生型マウスに比べ Dectin-2 ノックアウトマウスにおいてはインターロイキン 17、インターフェロン  $\gamma$ 、GM-CSF の産生がみられず、抗原に特異的な T 細胞の応答は完全に障害されることがわかった。これらの結果から、リポアラビノマンナンは生体においてもアジュバント活性を示し、Dectin-2 はリポアラビノマンナンのアジュバント活性において必須の受容体であることが示された。

（倫理面への配慮）

「遺伝子組換え生物などの使用などの帰省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、九州大学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した。

#### C. 考察

Dectin-2 が結核菌の細胞壁の構成成分であるリポアラビノマンナンの機能的な受容体であることを示した。リポアラビノマンナンは Dectin-2

により認識され、有害な炎症を惹起することなく、アジュバントとしてT細胞を介する獲得免疫応答を増強することが判明したことから、本経路は理想的なアジュバントのリードとなり得ると考えられる。Dectin-2 および Mincle は、Fc 受容体鎖、さらに、その下流のシグナル伝達経路を共有する。しかし、マンノース付加リポアラビノマンナン-Dectin-2 経路がトレハロースジミコール酸-Mincle 経路とは異なる免疫応答を誘導する分子機構は、いまだに不明である。今後、この特異的な経路の解明を進めることにより、有害な炎症を最小限に抑えて獲得免疫応答の増強を促進する有用なアジュバントの開発につながることを期待される。

#### D. 結論

リポアラビノマンナンは生体で強いアジュバント活性を有することを見出し、その作用を担う必要不可欠な受容体として、Dectin-2 を同定した。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Miyake Y, Oh-hora M, Yamasaki S. C-type lectin receptor MCL forms complex with Mincle to facilitate its protein expression and signaling. *J. Immunol.* in press
- 2) Motomura Y, Kanno S, Asano K, Tanaka M, Hasegawa Y, Katagiri H, Saito T, Hara H, Nishio H, Hara T, Yamasaki S. Identification of pathogenic cardiac CD11c+ macrophages in Nod1-mediated acute coronary arteritis. *ATVB*, in press
- 3) van der Peet PL, Gunawan C, Torigoe S, Yamasaki S, Williams SJ. Corynomycolic acid-containing glycolipids signal through the pattern recognition receptor Mincle. *Chem Commun (Camb)*, 51: 5100-3. 2015.
- 4) Wilson GJ, Marakalala MJ, Hoving JC, van Laarhoven A, Drummond RA, Kerscher B, Keeton R, van de Vosse E, Ottenhoff THM, Plantinga TS, Alisjahbana B, Govender D, Besra GS, Netea MG,

Reid DM, Willment JA, Jacobs M, Yamasaki S, van Crevel R, Brown GD. The C-type lectin receptor CLECSF8 (CLEC4D) is a key component of anti-mycobacterial immunity. *Cell Host Microbe*, 17:252-9, 2015

- 5) Kanno S, Nishio H, Tanaka T, Motomura Y, Murata K, Ihara K, Onimaru M, Yamasaki S, Kono H, Sueishi K, Hara T. Activation of an innate immune receptor, Nod1, accelerates atherogenesis in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *J Immunol.* 194:773-80, 2015
- 6) Behler F, Maus R, Bohling J, Knippenberg S, Kirchhof G, Nagata M, Jonigk D, Izykowski N, Mägel L, Welte T, Yamasaki S, Maus UA. Macrophage-inducible C-type lectin Mincle-expressing dendritic cells contribute to control of splenic Mycobacterium bovis BCG infection in mice. *Infect Immun.* 83:184-96. 2015
- 7) Nakamura Y, Sato K, Yamamoto H, Matsumura K, Matsumoto I, Nomura T, Miyasaka T, Ishii K, Kanno E, Tachi M, Yamasaki S, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K. Dectin-2 deficiency promotes Th2 response and mucin production in the lungs after pulmonary infection with Cryptococcus neoformans. *Infect Immun.* 83: 671-81. 2015
- 8) Phongsisay V, Iizasa E, Hara H, Yamasaki S. 3-O-sulfo- $\beta$ -D-galactose moiety of endogenous sulfoglycolipids is a potential ligand for immunoglobulin-like receptor LMIR5. *Mol Immunol.* 63:595-9. 2015
- 9) Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-hora M, Akashi K, Yamasaki S. Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity* 41:402-13. 2014
- 10) Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, Komiya C, Ochi K, Shirakawa I, Hamaguchi M, Nishimura S, Manabe I, Matsuda T, Kimura K, Inoue H, Inagaki Y, Aoe S, Yamasaki S, Ogawa Y. Macrophage-

- inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat. Commun.* 5:4982. 2014
- 11) Nakagawa Y, Sakuma T, Nakagata N, Yamasaki S, Takeda N, Ohmuraya M, Yamamoto T. Application of oocyte cryopreservation technology in TALEN-mediated mouse genome editing. *Exp Anim.* 63:349-55. 2014
- 12) Giordano M, Roncagalli R, Bourdely P, Chasson L, Buferne M, Yamasaki S, Beyaert R, van Loo G, Auphan-Anezin N, Schmitt-Verhulst AM, Verdeil G. The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:11115-20. 2014
- 13) Phongsisay V, Iizasa E, Hara H, Yamasaki S. LMIR5 extracellular domain activates myeloid cells through Toll-like receptor 4. *Mol. Immunol.* 62:169-77. 2014
- 14) Hattori Y, Morita D, Fujiwara N, Mori D, Nakamura T, Harashima H, Yamasaki S, Sugita M. Glycerol monomycolate is a novel ligand for the human, but not mouse macrophage inducible C-type lectin, Mincle. *J. Biol. Chem.* 289:15405-12. 2014
- 15) Yamasaki S. Clec12a: Quietening the Dead. *Immunity* 40:309-11. 2014
- 16) Kawai Y, Ouchida R, Yamasaki S, Dragone L, Tsubata T, Wang JY. LAPTM5 promotes lysosomal degradation of intracellular but not the cell surface CD3 $\zeta$ . *Immunol. Cell Biol.* 92:527-34. 2014
- 17) Roncagalli R, Hauri S, Fiore F, Liang Y, Chen Z, Sansoni A, Kanduri K, Joly R, Malzac A, Lahdemaki H, Lahesmaa R, Yamasaki S, Saito T, Mallisen M, Aebersold R, Gstaiger M, Malissen B. Quantitative proteomic analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the surface receptor CD6 as a LAT-independent TCR signaling hub. *Nat. Immunol.* 15:384-92. 2014
- 18) Toyonaga K, Miyake Y, Yamasaki S. Characterization of the receptors for mycobacterial cord factor in Guinea pig. *PLoS One* 9:e88747. 2014
- 2.学会発表
- 1) Sho Yamasaki, Adjuvant recognition through C-type lectin receptors, The 22nd International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, Kobe, 2014.6.2-3
- 2) Sho Yamasaki, Immune responses to pathogens through C-type lectin receptors, The 9<sup>th</sup> International Symposium of the Institute Network, Osaka, 2014.6.19-20
- 3) Sho Yamasaki, Adjuvant recognition through C-type lectin Receptors, 2014 Cold Spring Harbor Asia Conference on Frontiers of Immunology in Health and Diseases, Suzhou, China, 2014.9.2-6
- 4) Sho Yamasaki, Recognition of bacterial adjuvants through C-type lectin receptors, The 13<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, Nara, 2014.9.23-26
- 5) Sho Yamasaki, Immune regulation through C-type lectin receptors. Novo Nordisk Innovation Summit, Tokyo, 2014.10.1-2
- 6) Sho Yamasaki, Immune responses against glycolipids through C-type lectin receptors, The 87<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Biochemical Society, Kyoto, 2014.10.15-18
- 7) Sho Yamasaki, Recognition of mycobacterial adjuvants through C-type lectin receptors, 8th Vaccine and ISV Congress, Philadelphia, USA, 2014. 10. 26-28
- 8) Sho Yamasaki, Immune regulation through C-type lectin receptors, The 24<sup>th</sup> Hot Spring Harbor International Symposium, Fukuoka, 2014. 11. 7-8
- 9) 山崎 晶, 細胞死に伴って放出される内因性アジュバントの同定, 新学術領域研究「細胞死を起点とする生体制御ネットワークの解明」キックオフシンポジウム, 東京, 2014.11.13
- 10) 山崎 晶, 結核菌を認識する受容体と免疫応答, 感染症研究グローバルネットワークフォー