

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26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：現在、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確認出来ておらず、新しいワクチンの開発が望まれている。ウイルスベクターとして期待さ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、開発中の結核菌ワクチンrhPIV2-Ag85Bは従来のワクチンと比べ効果が高い。しかしながら、PIV2の一部の遺伝子が自然免疫応答、特にI型インターフェロン産生を抑制するなど、自然免疫応答との関連も報告されている。本研究では、新規ワクチンベクターであるhPIV2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

現在開発中の結核菌ワクチン rhPIV-Ag85B は従来のワクチンである BCG に比べ強力に肺結核を抑制する事がマウスを用いた研究により明らかとされている。また非ヒト霊長類であるカニクイザルにおいてもワクチンとしての効果が得られている事からヒトへの応用も期待されている。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と考えられているが、一部の遺伝子が自然免疫応答を抑制するなど、ヒトへの応用へ向けて詳細な作用機序の解析が必要である。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 による自然免疫活性化の作用機序解析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、hPIV による自然免疫応答

を明らかとするために、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芽細胞 (MEF) の作製およびマウス骨髄細胞から樹状細胞を分化させ、hPIV2 感染によって誘導される自然免疫応答の詳細なメカニズムを明らかとする。実際には作製した MEF および樹状細胞に hPIV を感染させ 24 時間後の I 型インターフェロンおよび炎症性サイトカインである IL-6 および KC を測定した。また、本実験には RNA を認識する自然免疫受容体である Toll 様受容体 (TLR)7 およびアダプター分子 MyD88 の欠損マウス、TLR 非依存的自然免疫活性化に重要なアダプター分子である IPS-1 の欠損マウスを用いた。

（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。

C. 研究結果

種々の遺伝子欠損細胞 (MEF および樹状細胞)を用いて、hPIV2 を感染させその後の自然免疫応答を調べたところ、hPIV は細胞により異なる自然免疫受容体に認識される事で、自然免疫応答特に I 型インターフェロン産生を誘導している事が明らかとなった。さらに、炎症性サイトカインに関しては、細胞によって複数の自然免疫受容体が関与している事が示された。

D. 考察

本研究では細胞によって異なる自然免疫受容体を介して、hPIV が自然免疫応答を活性化している事を明らかにした。さらに誘導されるサイトカインも異なる自然免疫受容体によって制御されている事が示唆された。今後は、今回用いた自然免疫欠損マウスに新規結核菌ワクチン hPIV-Ag85B を投与し、その後の獲得免疫応答 (血清抗体価および細胞性免疫)を評価する事で、実際に生体反応に必須な自然免疫応答および細胞の同定を行う。

E. 結論

今回の研究により、hPIV が細胞の違いにより異なる自然免疫受容体または複数の自然免疫受容体によって認識される事で、自然免疫応答を活性化している事を明らかとした。これらの結果をふまえ、次年度では実際に獲得免疫応答に重要な自然免疫受容体及び、免疫担当細胞を同定する事で、

新規結核ワクチンの生体内における作用機序の解析を行う。さらに、V 遺伝子欠損 hPIV2 を用いて、V 遺伝子による自然免疫応答の抑制と、それに伴う獲得免疫誘導能も検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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, Vandenbon A, Standley DM, Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Spikes Local Inflammation That Induces Th2 Cell and T Follicular Helper Cell Responses to the Coadministered Antigen. *J Immunol.* 2015 Mar 15;194(6):2673-82.
- 2) Koo CX, Kobiyama K, Shen YJ, LeBert N, Ahmad S, Khato M, Aoshi T, Gasser S, Ishii KJ. RNA Polymerase III Regulates Cytosolic RNA:DNA Hybrids and Intracellular MicroRNA Expression. *J Biol Chem.* 2015 Mar 20;290(12):7463-73.
- 3) Temizoz B, Kuroda E, Ohata K, Jonai N, Ozasa K, Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type II IFN. *Eur J Immunol.* 2015 Apr;45(4):1159-69.
- 4) Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, Kusuba N, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Nakajima S, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Ishii KJ, Tsutsui H, Yagita H,

- Iwakura Y, Kubo M, Ng Lg, Hashimoto T, Fuentes J, Guttman-Yassky E, Miyachi Y, Kabashima K. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1064-9.
- 5) Piao Z, Akeda Y, Takeuchi D, Ishii KJ, Ubukata K, Briles DE, Tomono K, Oishi K. Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice. *Vaccine*. 2014 Sep 29;32(43):5607-13.
- 6) 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.
- 7) 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 Jul 10;9(7):e101835.
- 8) Hemmi M, Tachibana M, Tsuzuki S, Shoji M, Sakurai F, Kawabata K, Kobiyama K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. The early activation of CD8⁺ T cells is dependent on type I IFN signaling following intramuscular vaccination of adenovirus vector. *Biomed Res Int*. 2014;2014:158128.
- 9) Yagi M, Bang G, Tougan T, Palacpac NM, Arisue N, Aoshi T, Matsumoto Y, Ishii KJ, Egwang TG, Druilhe P, Horii T. Protective epitopes of the *Plasmodium falciparum* SERA5 malaria vaccine reside in intrinsically unstructured N-terminal repetitive sequences. *LoS One*. 2014 Jun 2;9(6):e98460.
- 10) 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 May 14;15(5):551-63.
- 11) Onishi M, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Coban C, Ishii KJ. Hemozoin is a potent adjuvant for hemagglutinin split vaccine without pyrogenicity in ferrets. *Vaccine*. 2014 May 23;32(25):3004-9.
- 12) Imanishi T, Ishihara C, Badr Mel S, Hashimoto-Tane A, Kimura Y, Kawai T, Takeuchi O, Ishii KJ, Taniguchi S, Noda T, Hirano H, Brombacher F, Barber GN, Akira S, Saito T. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. *Nat Commun*. 2014 Apr 10;5:3566.
- 13) Lam AR, Le Bert N, Ho SS, Shen YJ, Tang ML, Xiong GM, Croxford JL, Koo CX, Ishii KJ, Akira S, Raulet DH, Gasser S. RAE1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by STING-dependent DNA sensor

pathways in lymphoma. *Cancer Res.* 2014
Apr 15;74(8):2193-203.

2. 学会発表

- 1) Kuroda E, Ishii KJ. Particulate-induced systemic IgE production is mediated by DAMPs released from alveolar macrophages. 22nd International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe. June 2-3, 2014.
- 2) Kobiyama K, Ishii KJ. K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonist targets macrophages and dendritic cells in the draining lymph node to exert its adjuvanticity. 22nd International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe. June 2-3, 2014.
- 3) Kobiyama K, Ishii KJ. Differential roles of antigen presentation and DNA adjuvanticity in immunogenicity of DNA vaccine. 2014 DNA Vaccine Conference. San Diego, California, USA. Jul 21-23, 2014.
- 4) Aoshi T, Nakatsu N, Igarashi Y, Ito J, Kishishita N, Yamada H, Mizuguchi K, Ishii KJ. Adjuvant Database Project: comprehensive transcriptome analysis in animal models. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 5) Coban C, Onishi M, Ozkan M, Ishii KJ. Potential and mechanism of Hemozoin as vaccine adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 6) Hayashi M, Aoshi T, Petrovsky N, Ishii KJ. AdvaxTM, a formulation of delta inulin microparticles, is a non-canonical adjuvant that induces distinct immune response depending on the property of vaccine antigen. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 7) Kobiyama K, Kitahata Y, Ishii KJ. K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonistic ligand works as a potent IFN inducer and CTL adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 8) Kobiyama K, Kitahata Y, Ishii KJ. Antigen free systemic monotherapy by nano-particulate TLR9 agonist induces CTL responses for the tumor regression. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 9) Kuroda E, Ozasa K, Kobiyama K, Ishii KJ. Particulate-induced systemic IgE production is mediated by DAMPs released from alveolar macrophages. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 10) Ozkan M, Onishi M, Ishii KJ, Coban C. Investigation of Potential and Mechanism of Hemozoin as Vaccine adjuvant. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.

11) Temizoz B, Kuroda E, Kobiyama K, Ishii KJ. Synergistic activity of TLR9- and STING-agonists in innate and adaptive Type-II IFN production. 第43回 日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.

招待講演

- 1) 2014年4月27~30日 23th.National Congress of Immunology 「Good and Bad Inflammation During Vaccination」
- 2) 2014年5月14日 熊本大学 最先端研究セミナー（リエゾンラボ研究会）
「Adjuvant Innovation for influenza and cancer vaccination」
- 3) 2014年6月1日 第40回神戸薬科大学卒業研修講座「ワクチン開発研究の最前線 安全安心なワクチンを目指して」
- 4) 2014年7月2日~4日 第41回日本毒理学学会学術年会 教育講座 座長「がんワクチン開発の現状と課題」シンポジウム 座長「ワクチンの安全性評価」
- 5) 2014年7月11日 京都府立医科大学 特別講義「ワクチン、アジュバントの基礎と臨床：細胞死とマクロファージの役割」
- 6) 2014年8月25日~26日 第2回免疫記憶 - ワクチン国際研究会シンポジウム
「Innovation and renovation of vaccine adjuvant」
- 7) 2014年9月11日~12日 第21回日本免疫毒理学学会学術年会 「ワクチンの副作用は予測できるか？安全なアジュバントとバイオマーカー開発の新展開」
- 8) 2014年9月18日 日本生物科学研究所

第二研究会「アジュバント開発研究の最前線“免疫の種差と動物ワクチン”」

- 9) 2014年9月25~26日 第73回日本癌学会学術総会「次世代アジュバントの開発研究」
- 10) 2014年10月8日~13日 Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA.
「Nucleic Acids as “Built-in” or “Inducible” Adjuvant during Vaccination」
- 11) 2014年10月16日 「医薬品等区分」俯瞰に関するワークショップ「次世代ワクチン<アジュバント>」
- 12) 2014年10月18日 第87回日本生化学会大会「RNA Polymerase-IIIは細胞質のRNA:DNAハイブリッドと細胞内miRNA発現を制御する」
- 13) 2014年10月18日~19日 第46回日本小児感染症学会総会・学術集会「過去の歴史から学ぶこれからのワクチン開発と戦略」
- 14) 2014年10月20日~21日 The 1st International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014 (東京大学) 「Nucleic acids as ‘built-in’ or ‘inducible’ adjuvant during vaccination」
- 15) 2014年11月6~7日 The 2014 Fall Conference of The Korean Association of Immunologists 「New mechanism of action and potential biomarkers for vaccine adjuvant」
- 16) 2014年11月10日~12日 第62回日本ウ

イルス学会学術集会シンポジウム「次世代のワクチン開発～Next generation vaccine development」 「New mechanism of action and potential biomarkers for vaccine adjuvant」

- 17) 2014年12月4日～5日 第12回日本糖鎖科学コンソーシアム(JCGG)シンポジウム「新規アジュバント開発に向けて」
- 18) 2014年12月4日～5日 第27回日本バイオセラピー学会学術集会「がん免疫療法に資する核酸医薬を基盤としたアジュバントの開発」
- 19) 2015年2月3日 琉球大学 講義「アジュバント開発研究の新展開：安全でよく効くワクチンを目指して」
- 20) 2015年3月25日～28日 日本薬学会第135年会「アジュバント開発研究の最前線：データベースを駆使した安全性、有効性のバイオマーカー」

特願 2014-235934 「異なる核酸アジュバントの組み合わせによる新規 Th1 誘導性アジュバントおよびその用途」平成 26 年 11 月 20 日、石井 健・黒田 悦史・Temizoz Burcu

PCT/JP2014/084772 「免疫賦活活性を有する核酸多糖複合体の抗腫瘍薬としての応用」平成 26 年 12 月 26 日、石井 健・青枝 大貴・小檜山 康司

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

特願 2013-196206, PCT/JP2014/074835
「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」平成 26 年 9 月 19 日、石井 健・小檜山 康司・青枝 大貴・武下 文彦・粕谷 祐司・丹羽 貴子・小泉 誠