

# 第8回 次世代アジュバント研究会 プログラム・講演要旨集

## The 8th Meeting of Japanese Vaccine Adjuvant Research Consortium

2015 年 1 月 20 日 (火)

千里ライフサイエンスセンター 5F ライフホール (大阪府吹田市)

January 20, 2015

Life Hall, Senri Life Science Center, Suita, Osaka

主催：次世代アジュバント研究会、独立行政法人医薬基盤研究所

共催：厚生労働省研究班「ワクチンアジュバントの安全性等評価

データベース構築等に関する研究」

(研究代表者 医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクトリーダー 石井健)

## 第8回 次世代アジュバント研究会プログラム

受付開始 (9:00)

### 1. 開会・挨拶 (9:30)

### 2. 講演第一部 (9:35)(言語:日本語)

<座長: 国立感染症研究所血液・安全性研究部長 濱口 功、医薬基盤研究所 山田 弘>

#### 【O-01】「薬事承認に向けたワクチン開発の課題」

○紀平 哲也

厚生労働省医薬食品局 総務課

#### 【O-02】「アジュバントデータベース及びアジュバントガイドラインについて」

○石井 健<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 独立行政法人 医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト

<sup>2</sup> 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター

#### 【O-03】「国際的産官学民連携による結核ワクチンの開発」

○保富 康宏<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター

<sup>2</sup> 三重大学 大学院 医学系研究科病態解明医学講座免疫制御分野

### 4. ポスターセッション※/コーヒープレイク※※ (10:20 から)

※ポスターは、9時から発表時間前までに指定の場所へ掲示して下さい。ポスターの撤去は、当日の13時30分までをお願いします。それ以降の掲示物は、主催者の判断により廃棄させていただきます。

※※ロビーにホットコーヒーと紅茶をご用意しております。セルフサービスをお願いします。

## 5. 講演第二部 (11:15)(言語:英語)

<座長: 医薬基盤研究所 國澤 純、東京大学医科学研究所 植松 智>

### 【O-04】「Understanding the mode of action of GSK Adjuvant Systems through translational research」

○Arnaud Didierlaurent

GlaxoSmithKline Vaccines, Belgium

### 【O-05】「Modern Adjuvants for Next Generation Vaccines and Therapy」

○Steven G. Reed

IDRI, USA

### 【O-06】「アルファウイルス様粒子を用いたワクチン開発」

○赤畑 渉

VLP Therapeutics

### 【O-07】「BK-36 マラリアワクチンに対する CpG アジュバントの効果について」

○堀井俊宏

大阪大学、微生物病研究所、分子原虫学分野

### 【O-08】「B リンパ球に発現する CD22/Siglec-2 を標的とした免疫増強化合物の開発」

○鏑田武志

東京医科歯科大学難治疾患研究所

## 6. 閉会挨拶(12:55)

## 7. 閉会(13:00)

### 連絡事項と注意

(1) 建物内は原則として全面禁煙です。

建物内は、屋内外を問わず、原則として全ての場所で禁煙です。ただし、7階に喫煙場所がございますので、ご用の際はご利用ください。

(2) 携帯電話は電源を切るかマナーモードに。

講演中は、他の聴講者の迷惑となりますので携帯電話は電源を切るかマナーモードをお願いします。

# 目次

第8回 次世代アジュバント研究会プログラム .....	2
-----------------------------	---

要旨目次 .....	4
------------	---

## 口頭発表要旨

### 【0-01】「薬事承認に向けたワクチン開発の課題」

○紀平 哲也

厚生労働省医薬食品局 総務課 ..... 12

### 【0-02】「アジュバントデータベース及びアジュバントガイドラインについて」

○石井 健<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 独立行政法人 医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト

<sup>2</sup> 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター ワクチン学 ..... 13

### 【0-03】「国際的産官学民連携による結核ワクチンの開発」

○保富 康宏<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター

<sup>2</sup> 三重大学 大学院 医学系研究科病態解明医学講座免疫制御分野 ..... 15

### 【0-04】「Understanding the mode of action of GSK Adjuvant Systems through translational research」

○Arnaud Didierlaurent

GlaxoSmithKline Vaccines, Belgium ..... 16

### 【0-05】「Modern Adjuvants for Next Generation Vaccines and Therapy」

○Steven G. Reed

IDRI, USA ..... 17

### 【0-06】「アルファウイルス様粒子を用いたワクチン開発」

○赤畑 渉

VLP Therapeutics ..... 18

### 【0-07】「BK-36 マラリアワクチンに対する CpG アジュバントの効果について」

○堀井俊宏<sup>1</sup>、江副幸子<sup>4</sup>、鉄谷耕平<sup>2,3</sup>、五味康行<sup>5</sup>、吉井洋紀<sup>5</sup>、佐藤秀昭<sup>6</sup>、東岸任弘<sup>1</sup>、  
青枝大貴<sup>2,3</sup>、名井陽<sup>1</sup>、石井健<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> 大阪大学、微生物病研究所、分子原虫学分野

<sup>2</sup> (独) 医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト

<sup>3</sup> 大阪大学免疫学フロンティア研究センター ワクチン学

<sup>4</sup> 大阪大学医学部附属病院 未来医療開発部 未来医療センター



<sup>5</sup> (財)阪大微研 観音寺研究所 瀬戸センター 研究開発部門 研究技術部

<sup>6</sup> (株) ジーンデザイン ..... 19

【0-08】「B リンパ球に発現する CD22/Siglec-2 を標的とした免疫増強化合物の開発」

○松原直子<sup>1</sup>、竹松弘<sup>2</sup>、石田秀治<sup>3</sup>、鏑田武志<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京医科歯科大学難治疾患研究所

<sup>2</sup> 京都大学医学研究科

<sup>3</sup> 岐阜大学応用生命科学部 ..... 20

**ポスター発表要旨**

【P-01】新規 pH 感受性担体によるアジュバントの増強効果

○坂口奈央樹<sup>1</sup>、弓場英治<sup>2</sup>、小岩井一倫<sup>1</sup>、木本知明<sup>1</sup>、河野健司<sup>2</sup>、大島英彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup> テルモ株式会社

<sup>2</sup> 大阪府立大学大学院 工学研究科 ..... 21

【P-02】ワクチンアジュバントなど核酸医薬品に用いられる合成オリゴヌクレオチドの分析

○南海浩一・斎藤恵美・井上 聡・佐藤秀昭・湯山和彦

(株)ジーンデザイン ..... 22

【P-03】 Chemical library screening for the finding of new adjuvant target on C-type lectin receptor, Mincle

○Atsushi Furukawa<sup>1</sup>, Aya Toji<sup>1</sup>, Daiki Mori<sup>2</sup>, Takanori Matsumaru<sup>1</sup>, Yuki Okabe<sup>1</sup>, Kenji Toyonaga<sup>2</sup>, Yasunobu Miyake<sup>2</sup>, Kota Kodama<sup>3</sup>, Toyoyuki Ose<sup>1</sup>, Sho Yamasaki<sup>1</sup>, Katsumi Maenaka<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

<sup>2</sup> Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

<sup>3</sup> Open innovation center, Hokkaido University ..... 23

【P-04】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

○安田好文、武藤太一郎、今井康友、中西憲司

兵庫医科大学 免疫学・医動物学 ..... 24

【P-05】ヒト型結核菌青山 B 株由来熱水抽出物 Z-100 は nucleotide-binding oligomerization domaincontaining 2 (Nod2) 依存的な NF- $\kappa$ B 活性化を誘導する

○勝沼 功吉、吉長 幸嗣、大平 裕太、江田 留奈、佐藤 陽紀、堀井 孝幸、田中 貴男、  
武井 峰男、瀬戸 孝一

ゼリア新薬工業株式会社 中央研究所 ..... 25

【P-06】 CpG オリゴデオキシヌクレオチドの立体制御による免疫誘導作用の変化

○鳥飼祐介

株式会社新日本科学..... 26

【P-07】 Large-scale sequencing and in silico identification of neutralizing antibody/virus complexes

○Kazuo Yamashita<sup>1</sup>, Joël Billaud<sup>2</sup>, Dimitri Schmitt<sup>1</sup>, and Daron M Standley<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>2</sup>Institute for Virus Research, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan..... 27

【P-08】 RNA-binding protein networks involved in immune regulation

○Edward Wijaya<sup>1</sup>, Bahtiyor Nosirov<sup>2</sup>, Songling Li<sup>2</sup>, Kazuo Yamashita<sup>2</sup>, and Daron M Standley<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Virus Research, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

<sup>2</sup>WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan..... 28

【P-09】 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

○鈴木 英彦<sup>1</sup>、米満 美紀<sup>1</sup>、長竹 貴広<sup>1</sup>、池上浩司<sup>2</sup>、瀬藤光利<sup>2</sup>、清野 宏<sup>3</sup>  
近藤 昌夫<sup>4</sup>、國澤 純<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>独立行政法人 医薬基盤研究所 ワクチンマテリアルプロジェクト

<sup>2</sup>浜松医科大学医学部 解剖学講座 細胞生物学分野

<sup>3</sup>東京大学医科学研究所 炎症免疫学分野/国際粘膜ワクチン研究開発センター

<sup>4</sup>大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野 ..... 29

【P-10】 Development of a new vaccine strategy to induce antigen-specific immune responses in intestine

○Kouta Matsunaga<sup>1</sup>, Naoki Takemura<sup>1,2</sup>, Kouji Kobiyama<sup>3,4</sup>, Taiki Aoshi<sup>3,4</sup>, Ken J Ishii<sup>3,4</sup>, Satoshi Uematsu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Innate Immune Regulation, International Research and Development Center for Mucosal Vaccines, Institute of Medical Science, The University of Tokyo

<sup>2</sup>Department of Mucosal Immunology, School of Medicine, Chiba University

<sup>3</sup>Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation

<sup>4</sup>Laboratory of Vaccine Science, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University ..... 30

【P-11】 インフルエンザワクチン臨床試験における血清 miRNA マーカーの可能性

○伊東 純一<sup>1</sup>、石井 健<sup>1,2</sup>、水口 賢司<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 医薬基盤研究所 バイオインフォマティクスプロジェクト

<sup>2</sup> 大阪大学 免疫学フロンティアセンター ワクチン学 ..... 31

- 【P-12】 Effective characterisation of adjuvant transcriptomes for biomarker and target discovery  
 ○<sup>2</sup>Lokesh P. Tripathi<sup>1</sup>, Junichi Ito<sup>1</sup>, Taiki Aoshi<sup>1,2</sup>, Ken J. Ishii<sup>1,2</sup> and Kenji Mizuguchi<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), 7-6-8 Asagi, Saito, Ibaraki, Osaka  
<sup>2</sup> Immunology Frontier Research Center (IFReC), Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka..... 32
- 【P-13】 A Systems Biology Framework for the identification of the molecular basis of immune adjuvanticity  
 ○Philip Prathipati<sup>1</sup>, Taiki Aoshi<sup>1,2</sup>, Ken J. Ishii<sup>1,2</sup> and Kenji Mizuguchi<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), 7-6-8 Asagi, Saito, Ibaraki, Osaka  
<sup>2</sup> Immunology Frontier Research Center (IFReC), Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka..... 33
- 【P-14】 Immunological and organogenesis diversity of mucosa-associated lymphoid tissues for the development of mucosal vaccine  
 ○Takahiro Nagatake<sup>1</sup>, Naomi Matsumoto<sup>1</sup>, Michiko Shimojou<sup>1</sup>, Hidehiko Suzuki<sup>1</sup>, Satoshi Fukuyama<sup>2,3</sup>, Shintaro Sato<sup>2</sup>, Kentaro Ogami<sup>4</sup>, Yusuke Tsujimura<sup>4</sup>, Mitsuo Kawano<sup>5</sup>, Tetsuya Nosaka<sup>5</sup>, Hiroshi Kiyono<sup>2</sup>, Yasuhiro Yasutomi<sup>4</sup> and Jun Kunisawa<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Laboratory of Vaccine Materials, National Institute of Biomedical Innovation  
<sup>2</sup>Division of Mucosal Immunology and International Research and Development Center for Mucosal Vaccines, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo  
<sup>3</sup>Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, University of Tokyo  
<sup>4</sup>Laboratory of Immunoregulation and Vaccine Research, Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation  
<sup>5</sup>Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Medicine, Mie University ..... 34
- 【P-15】 粒子状物質により誘導される肺特異的免疫反応～なぜ粒子状物質の吸入によりアレルギー性炎症が誘導されるのか？～  
 ○黒田悦史<sup>1</sup>、石井健<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>大阪大学 免疫学フロンティア研究センター ワクチン学  
<sup>2</sup>医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト ..... 36
- 【P-16】 Synergistic activity of TLR9- and STING-agonists in innate and adaptive Type-II IFN induction

○Burcu Temizoz,<sup>1</sup> Etsushi Kuroda,<sup>1</sup> Keiichi Ohata,<sup>1</sup> Nao Jonai,<sup>2</sup> Koji Ozasa,<sup>2</sup>

Kouji Kobiyama,<sup>2</sup> Taiki Aoshi,<sup>2</sup> Ken J. Ishii<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka, Japan

<sup>2</sup>National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan ..... 37

**【P-17】 安全性評価モデルのアジュバント遺伝子発現情報への適用に向けて**

○五十嵐芳暢、中津則之、山田弘

独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト ..... 38

**【P-18】 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含有インフルエンザ HA ワクチンへの応用**

○百瀬暖佳<sup>1</sup>、水上拓郎<sup>1</sup>、倉光 球<sup>1</sup>、安藤栄里子<sup>2</sup>、立花滋博<sup>2</sup>、滝澤和也<sup>1</sup>、益見厚子<sup>1</sup>、永田伴子<sup>2</sup>、浜口 功<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立感染症研究所 血液・安全性研究部

<sup>2</sup>財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所 ..... 39

**【P-19】 Recognition of bacterial glycolipid through multiple pattern recognition receptors**

○Masahiro Nagata<sup>1</sup>, Rieko Doi<sup>1</sup>, Eri Ishikawa<sup>1</sup>, Sho Yamasaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Molecular Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University ..... 41

**【P-20】 Critical role of TSLP-TSLPR interaction in inducing antigen-specific IgA responses upon Th2-type adjuvant intranasal immunizations.**

○JOO Sunyi<sup>1,2</sup>, FUKUYAMA Yoshiko<sup>1</sup>, KURASHIMA Yosuke<sup>1</sup>, YUKI Yoshikazu<sup>1</sup>, PARK Eun Jeong<sup>1</sup> and KIYONO Hiroshi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

<sup>2</sup>Department of Pathology, Immunology and Microbiology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo ..... 42

**【P-21】 Nanogel-based PspA nasal vaccine induces microRNA-associated protective immunity in nonhuman primates**

○Yoshiko Fukuyama<sup>1</sup>, Yoshikazu Yuki<sup>1</sup>, Yuko Katakai<sup>2</sup>, Haruko Takahashi<sup>3</sup>,

Shinichi Sawada<sup>3</sup>, Sunyi Joo<sup>1</sup>, Eun Jeong Park<sup>1</sup>, Kazunari Akiyoshi<sup>3</sup> and Hiroshi Kiyono<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Division of Mucosal Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

<sup>2</sup> Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation

<sup>3</sup> Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering,

Kyoto University ..... 43

- 【P-22】 Functional role of MARCKS-like protein (MLP) in murine Peyer's patch M cells  
 ○Shintaro Sato<sup>1,3</sup>, Satoshi Kaneto<sup>1</sup>, Eun Jeong Park<sup>1</sup>, and Hiroshi Kiyono<sup>1,3</sup>  
<sup>1</sup>Division of Mucosal Immunology  
<sup>2</sup>International Research and Development Center for Mucosal Vaccines, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo  
<sup>3</sup>CREST, JST. .... 44
- 【P-23】 Vaginal resident memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for early clearance of genital HSV-2 infection  
 ○Aldina Suwanto<sup>1,2</sup>, Ayuko Sato<sup>1</sup>, Manami Okabe<sup>1</sup>, Shintaro Sato<sup>1,3,4</sup>, Tomonori Nochi<sup>5</sup>, Jun Kunisawa<sup>1,3,6</sup>, Hiroshi Kiyono<sup>1,4</sup>  
<sup>1</sup>Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo  
<sup>2</sup>Department of Medical Genome Science, Graduate School of Frontier Science, The University of Tokyo  
<sup>3</sup>International Research and Development Center for Mucosal Vaccines, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo  
<sup>4</sup>Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency  
<sup>5</sup>Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University  
<sup>6</sup>Laboratory of Vaccine Materials, National Institute of Biomedical Innovation ..... 45
- 【P-24】 Mechanism of Action of Hemozoin as Vaccine Adjuvant  
 ○OZKAN Muge<sup>1</sup>, OONISHI Motoyasu<sup>2</sup>, ISHII Ken J.<sup>2,3</sup>, COBAN Cevayir<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Laboratory of Malaria Immunology, Immunology Frontier Research Center (IFReC), Osaka University, Osaka, Japan  
<sup>2</sup>Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), Osaka, Japan  
<sup>3</sup>Laboratory of Vaccine Science, Immunology Frontier Research Center (IFReC), Osaka University, Osaka, Japan..... 46
- 【P-25】 アジュバントデータベースプロジェクト：動物モデルによる網羅的遺伝子発現解析  
 Adjuvant Database Project: comprehensive transcriptome analysis in animal models  
 ○青枝大貴<sup>1a,2,\*</sup>、中津則之<sup>1b</sup>、五十嵐芳暢<sup>1b</sup>、伊東純一<sup>1c</sup>、岸下奈津子<sup>1a</sup>、山田弘<sup>1b</sup>、水口賢司<sup>1c</sup>、石井健<sup>1a,2</sup>  
<sup>1</sup>医薬基盤研究所、<sup>a</sup>アジュバント開発プロジェクト、<sup>b</sup>トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト、<sup>c</sup>バイオインフォマティクスプロジェクト  
<sup>2</sup>大阪大学免疫学フロンティア研究センター、ワクチン学

*現所属: BIKEN 次世代ワクチン協働研究所 / BIKEN 次世代ワクチン開発研究センター .....	47
---	----

【P-26】 BIKEN 次世代ワクチン開発センター/BIKEN 次世代ワクチン協働研究所における取り組み ○青枝大貴、江副浩和、長谷田泰成 BIKEN 次世代ワクチン開発センター/BIKEN 次世代ワクチン協働研究所 .....	49
---	----



## □頭発表要旨

### ・【0-01】「薬事承認に向けたワクチン開発の課題」

- ・ ○紀平 哲也
- ・ 厚生労働省医薬食品局 総務課

我が国では一時期停滞していた感染症ワクチンの導入が近年一気に進み、新規のワクチンや混合ワクチンの開発が数多く進められている。また、疾患の治療を目的とした特異的な免疫の賦活化による、いわゆる治療用ワクチンの開発も行われている。ワクチン製剤の導入にあたっては、薬事承認の段階において、品質、有効性及び安全性の評価が行われ、その後、定期接種への追加等により、医療現場への導入が進められることとなる。

現在、ワクチン製剤として臨床使用されている主成分の種類としては、弱毒生ワクチン、不活化ワクチン、トキソイド、組換え蛋白等がある。製剤学的な観点からは、担体と結合させた抗原、ウイルス様粒子や各種アジュバントが利用されたワクチン製剤が承認されており、DNA ワクチン等も開発が進められている。

一般に、医薬品の品質保証においては、主成分や製剤の種類によらず、供給される製品の品質が一定の範囲にあることが求められる。そのためには、最終製品の品質を確認するだけでなく、製造される施設設備、原材料の品質、製造方法、製造過程における製造条件・操作条件等について開発段階で十分に検討され、各種条件により製造した際のデータに基づいて、諸条件を設定・規定することが求められる。GMP（医薬品の製造管理及び品質管理の基準）や承認規格として管理される項目は、それらのうちの重要な事項を法的に管理するものであるが、それらに合致することのみにより品質が保証されるものではなく、供給者・製造者の責任の下で製造管理・品質管理が適切に行われることが重要である。

有効性及び安全性については、ワクチン製剤の評価においては、抗原や製剤の種類にかかわらず、臨床試験においてその有効性・安全性を確認することが最も重要となる。欧米で開発される新規ワクチンでは、数千人規模で発症予防・重症化予防効果を検討する臨床試験が通例実施されている。一方、国内では大規模臨床試験が実施されることは少ない。

定期接種の対象となりうるワクチンの多くは、定期接種導入後には、健康な方を対象に百万人／年の単位で接種される可能性があることから、薬事承認の段階で臨床試験において有効性・安全性をどこまで確認することが求められるのか、また、公衆衛生学的なワクチンの導入の必要性和有用性を評価するためにどのような取組みが必要となるのか、ワクチン製剤の評価における今後の課題である。



・【0-02】「アジュバントデータベース及びアジュバントガイドラインについて」

- ・ ○石井 健<sup>1,2</sup>
- ・ <sup>1</sup> 独立行政法人 医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト
- ・ <sup>2</sup> 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター ワクチン学  
<http://www.nibio.go.jp/adjuvant/index-j.html>  
<http://adjuvantdb.nibio.go.jp/>

<アジュバントデータベース>

2011年度のノーベル医学生理学賞が、アジュバントの作用機序に関する自然免疫や樹状細胞研究に授与された。その臨床応用の対象は感染症の枠を超え、がん、アレルギー、アルツハイマー病など非感染性疾患に広がっており、アジュバントの開発は世界的に競争が増している。日本でも免疫学を中心とする基礎研究は盛んなものの、次世代のワクチン、ことにアジュバントとなると開発研究は遅れがちである。現在、医薬基盤研究所が中心となり「有効」かつ「安全な」アジュバント開発研究で世界のトップに立つことを目標に、アジュバントの評価方法の指標（バイオマーカー）の同定を目的としたアジュバントデータベースの構築、および新規アジュバント開発を行っている。国内外で学会、招待講演での発表が増え、世界的な認知度が上がってきている。また、アジュバント開発研究を基礎から臨床へとつなぐ分担研究が連携よく遂行され成果が出始めている。今年度までの進捗状況および平成27年度以降重点的に取り組む事項を下記に示す。

1) アジュバントデータベースが完成し、バリデーションが終了した。マウス、ラットにおいてアジュバント投与後の遺伝子発現プロファイルを獲得し、その安全性を既存のトキシコゲノミクスデータの遺伝子プロファイルとの比較解析にて検証することが可能になった。平成27年度以降は上市済みもしくは開発中を含めたアジュバントのデータ作成を続け、企業、PMDAなどが安全性・有効性を評価し得るデータベースの構築に取り組むとともに、倫理面へ配慮を行いながら、臨床検体とのリンクを行っていく。各分担研究者が開発中のアジュバントのデータベース化も進んでいる。

2) ヒトにおける臨床研究も体制が整い、各分担研究者が行う臨床研究、治験、患者サンプルなどが続々と集まりデータベース化の目処が立った。特に、アジュバント入りワクチンの臨床試験で得られた血清サンプルなどを用いて、免疫学的解析やマイクロ(mi)RNAの網羅的解析を行った結果、ワクチンによる発熱(安全性)、抗体価(有効性)の予測できる可能性があるmiRNAマーカーの同定に成功した。また、インフルエンザワクチンの有効性の評価を血清miRNAで行った。さらには他のアジュバント入りワクチンの治験サンプル血清、ワクチンでの副作用が疑われる患者血清、関連する炎症性疾患、自己免疫疾患患者の血清におけるmiRNAバイオマーカーの測定解析を行った。平成27年度以降はさらに臨床研究のデータを増やし、データベース化を進め、アジュバントの安全性、有効性の評価指標の同定を目指す。

3) 新規のアジュバント開発：マラリアワクチンにおける新規核酸アジュバント候補としてTLR9のリガンドであるヒト型CpG-ODNを開発し、平成25年2月に医師主導治験(スクリーニング)を開始し、平成26年度中に第1a相治験第一段階を終了した。第2世代のDDS機能付核酸アジュバントの開発に成功し、特許取得、論文(PNAS)掲載、そして国内製薬企業に導出を行った。結果該当企

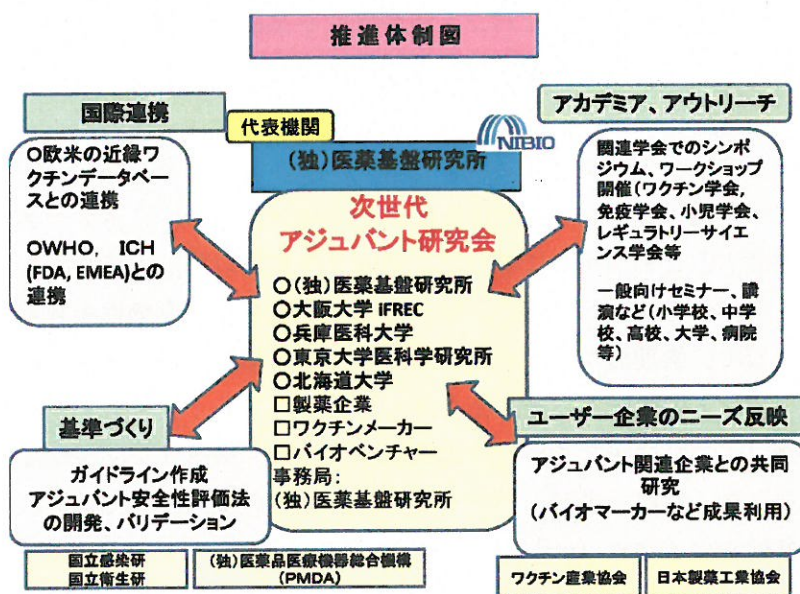
業と共同でJSTの大型プロジェクトに採択された。さらに新たな非粒子、水溶性を含めた新規アジュバントを20種以上同定し、いくつかはその作用機序も解明した。

### ＜アジュバントガイドライン＞

医薬基盤研究所を中心として平成19～22年度「感染症予防ワクチンの非臨床及び臨床試験ガイドライン」とその「Q&A」が作成された。平成23年度には、「パンデミックインフルエンザに備えたプロトタイプワクチンの開発等に関するガイドライン」が作成された。その後、平成24年度には、実用化が進んでいる経鼻接種インフルエンザワクチンに関して、検討を行いガイドライン案が作成された。

平成25年度からは開発が強く期待されるアジュバント添加あるいは遺伝子組換え技術を応用したワクチンのために国内外の調査を行い、我が国発の国際的に適用可能なガイドライン作成のために各製剤に関する研究をおこなっている専門家との研究班会議を開催し、情報収集をおこなっている。

特に、WHOのアジュバント添加ワクチンのガイドライン最終版が平成25年12月に公開されたことから、今後、本研究班のアジュバント添加ワクチンのガイドライン案の検討を進める上で十分に参考になると考えられる。平成26年度は、このような状況の中で、国際的に適用可能なアジュバント添加ワクチンガイドラインの草案を作成した。このガイドラインを作成することは、海外との連携・競争においても重要な役割を担うことが期待される。



図：アジュバント開発研究の産学官連携推進体制

・【0-03】「国際的産官学民連携による結核ワクチンの開発」

- ・ ○保富 康宏<sup>1,2</sup>
- ・ <sup>1</sup>独立行政法人 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター
- ・ <sup>2</sup>三重大学 大学院 医学系研究科病態解明医学講座免疫制御分野

ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) はヒトの呼吸器粘膜に感染をするウイルスであるが病原性は極めて低い。この HPIV2 は 2000 年に河野らによりリバーシジェネティックスにより作製されることが報告された。演者は当初このベクターを用いて呼吸器粘膜に対する遺伝子治療用ベクターとしての開発を検討したが、近年の感染症の増加に伴い、ワクチンベクターとしての開発を 2007 年から「知的クラスター」の支援および「スーパー特区」の枠組みで開始した。呼吸器系への感染症に対するワクチンとして世界 3 大感染症であり、わが国でも年間 2 万に以上の発症を認める結核を対象にした。研究により新たな結核ワクチンの可能性が示され始めた時、最初に支援を示唆したのは結核ワクチン開発を目的とする NPO 法人 AERAS (ワシントン) であった。その後企業側として日本 BCG および大日本住友製薬との共同研究が開始され、結核ワクチン開発を目的とし新会社、クリエイトワクチンが設立された。結核ワクチンの開発には霊長類を用いた治験がフェーズ II まで必須とされているが、医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターでは高度感染症施設が本年度より稼働している。このことは今後の開発に必須となる。さらに Bill & Melinda Gates 財団より、この施設に対して結核ワクチン開発の拠点となるような支援の表明が届いている。また、NPO として RESULTS や Stop TB パートナースhipからも多くの力を借りている。

以上の様に結核のような世界的に課題となる感染症に対しては産・官・学・民の協調が非常に重要であり、さらにはその枠組みは国内のみならず国際的である必要があると思われる。



•【0-04】「Understanding the mode of action of GSK Adjuvant Systems through translational research」

- ○Arnaud Didierlaurent
- GlaxoSmithKline Vaccines,Belgium

The concept of adjuvantation is almost 100 years old with the introduction of aluminum salts in vaccines. It is known today that adjuvants enhance and modulate the immunogenicity of the vaccine antigen by mimicking natural immune defense triggers and by stimulating innate immune cells. Research on adjuvants was initiated at GSK more than 20 years ago, and the Adjuvant System (AS) concept was introduced, e.g. the combination of two or more components with immunomodulatory abilities. Different families of AS have been tested in different vaccine candidates and experiments on the mode of action of AS have provided scientific insights as to how immune response and reactogenicity can be impacted.

Key learnings from several years of mode of action studies will be presented. One focus will be on the Adjuvant System AS01 that contains both monophosphoryl lipid A (MPL) and the saponin QS-21 and is used in several candidate vaccines including the RTS,S malaria and zoster candidate vaccines. Our multidisciplinary, cross-species analysis of AS01 mode of action shows that combination of immunostimulants resulted in the induction of novel pathways associated with improved vaccine response. It also highlights a key role for early IFN-gamma in the AS01 adjuvant effect.

• 【0-05】 「Modern Adjuvants for Next Generation Vaccines and Therapy」

- ○Steven G. Reed
- IDRI,USA

The design, selection, preclinical and clinical development of tuberculosis (TB) vaccine candidates capable of boosting immune responses induced by BCG or latent TB infection will be described. Critical to the success of such a vaccine will be inclusion of a safe and effective adjuvant. No defined, synthetic adjuvants are components of approved vaccines. However, safe and effective adjuvants for prophylactic and therapeutic vaccine use are emerging from the identification and optimizing formulations of small molecules. Effectively engaging macrophages and dendritic cells (DC), leading to T cell responses is essential for developing a new generation of T cell vaccines (e.g. TB, malaria, HIV), as well as for improving the quality and duration of antibody responses (influenza, HIV). The most advanced approaches to new adjuvant development consist of using TLR ligands (TLRL), to provide synergism between the formulation and the TLRL. Based on the success of the endotoxin derived natural product, MPL®, a TLR4L, a number of synthetic molecules have been developed and formulated into promising adjuvants. Position, number, and length of acyl chains present in the TLR4L all influence responses by human antigen-presenting cells (APC). Formulation dramatically influences the nature of the immune response induced. We have developed formulations of our lead TLR4L, GLA, and have evaluated a variety of these, including oil/water emulsions, micellar, niosomal, alum-adsorbed, and liposomal, in clinical trials and in a variety of preclinical models. When properly formulated, GLA-based adjuvants enhance Th1 type responses in both mice and humans, as well as induce more rapid immune responses against viral pathogens. Thus, it appears that selective molecular synthesis and formulation may lead to a new generation of TLR4L-based adjuvants with improved qualities over natural products.

・【0-06】「アルファウイルス様粒子を用いたワクチン開発」

・ ○赤畑 渉

・ VLP Therapeutics

ウイルス様粒子 (Virus Like Particle、VLP) は、正常のウイルスと同様の粒子構造を持つが、ウイルスゲノムを含まないため感染性をもたない。このため、安全で効果的なワクチン候補として、近年、様々な分野で VLP を用いたワクチン開発が進んでいる。アルファウイルスに属するチクングンヤウイルスは、2005年から東南アジアを中心に流行しており、そのワクチン開発においても VLP ワクチンが有効であると証明され (Akahata et. al. *Nat Med*, 2010)、現在、臨床試験が行われている (Chang et. al. *Lancet*, 2014)。我々は、このアルファウイルス VLP の表面に外来抗原を提示させることにより、抗原特異的抗体を誘導し、様々なワクチンに応用できる新しい技術を開発している (inserted alphavirus VLP, i- VLP)。この i- VLP は、1つの VLP 上に240個の外来抗原を、高度な対称性と密度を保ちつつ提示することができる。そのため、免疫個体において、B細胞による抗原認識が効率よく行われ、抗原特異的抗体の産生量を非常に高める特徴を持つ。

我々は、この i- VLP の技術をマラリアワクチン開発に応用した。マラリア原虫は、複雑なライフサイクルを持つためにワクチン開発が難しいことが知られている。我々は、蚊を媒介として人に感染する際のスポロゾイトの表面蛋白質、circumsporozoite protein (CSP) を標的とした、感染初期の前赤血球段階で感染を抑えるワクチン開発を目指した。様々な長さの CSP のエピトープを i- VLP に挿入し、マウスおよびサルに接種を行った。それらの動物の CSP に対する血清抗体価を ELISA により測定、また、マウスマラリアモデルを用いて感染防御効果の評価を行い、このワクチンの有効性を確認した。今回の発表では、これらのデータ及び、2015年に予定している i- VLP マラリアワクチンの臨床開発について紹介したい。

・【0-07】「BK-36 マラリアワクチンに対する CpG アジュバントの効果について」

- ・ ○堀井俊宏<sup>1</sup>、江副幸子<sup>4</sup>、鉄谷耕平<sup>2,3</sup>、五味康行<sup>5</sup>、吉井洋紀<sup>5</sup>、佐藤秀昭<sup>6</sup>、東岸任弘<sup>1</sup>、  
青枝大貴<sup>2,3</sup>、名井陽<sup>1</sup>、石井健<sup>2,3</sup>
- ・ <sup>1</sup>大阪大学、微生物病研究所、分子原虫学分野
- ・ <sup>2</sup>医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト
- ・ <sup>3</sup>大阪大学免疫学フロンティア研究センター ワクチン学
- ・ <sup>4</sup>大阪大学医学部附属病院 未来医療開発部 未来医療センター
- ・ <sup>5</sup>(財)阪大微研 観音寺研究所 瀬戸センター 研究開発部門 研究技術部
- ・ <sup>6</sup>(株) ジーンデザイン

BK-SE36 マラリアワクチンは熱帯熱マラリア原虫の SERA5 蛋白質の N-末端ドメインの組換え蛋白質に水酸化アルミニウムゲルを加えた、凍結乾燥製剤である (BK-SE36/AHG)。本ワクチンは日本における Phase Ia (成人男性) 及びウガンダにおける Phase Ib (6-35 歳男女) を成功裡に終了し、その後のフォローアップ研究により補助的なデータながら、72%の発症防御 (マラリア発症) 効果を得た。一方でフォローアップ時のワクチン接種群における免疫応答と感染防御 (赤血球期マラリアの感染防御) の関係が得られ、ワクチン接種により抗体価が 150 ユニットを超えて上昇した場合には 1 年間の感染防御効果があることを示唆する重要なデータを得た。感染防御効果は発症防御効果より遥かに高い利点である。本研究の目的は、核酸アジュバントである CpG を BK-SE36 に添加し、免疫応答を高めた次世代マラリアワクチン (トラベラーズ) の臨床開発である。

マウス、及び、カニクイザルによる動物実験の後、2013-2014 年に大阪大学附属病院未来医療センターにて本邦初の核酸医薬を含む BK-SE36 /CpG の Phase Ia (First in human) を実施した。最終報告書は準備中であるが、安全性が示されるとともに、BK-SE36 単独に比べて約 3-5 倍の抗体価の上昇を見た。CpG の安価な生産コスト (¥50/ドーズ) から、単にトラベラーズのみならず流行地域においてもより効果的なマラリアワクチンとなる可能性がある。今後は BK-SE36/AHG と BK-SE36/CpG 両ワクチンによる誘導抗体の抗体価、IgG サブクラス、エピトープ認識、サイトカインの誘導及びマラリア原虫に対する効果などを解析することにより、これら誘導抗体の性状の同一性と CpG 添加による優位性を確立し、BK-SE36 /CpG ワクチンの日本、及びアフリカでの高次臨床試験をめざす。

・【0-08】「B リンパ球に発現する CD22/Siglec-2 を標的とした免疫増強化合物の開発」

・ ○松原直子<sup>1</sup>、竹松弘<sup>2</sup>、石田秀治<sup>3</sup>、鏑田武志<sup>1</sup>

・ <sup>1</sup>東京医科歯科大学難治疾患研究所

・ <sup>2</sup>京都大学医学研究科

・ <sup>3</sup>岐阜大学応用生命科学部

CD22 は Siglec-2 と呼ばれる Siglec family 分子の 1 つで、B リンパ球 (B 細胞) などの免疫細胞に発現する。CD22 は細胞外領域で  $\alpha$  2,6 シアル酸を特異的に認識する。また、細胞内領域には immunoreceptor tyrosine-based inhibition モチーフ (ITIM) が存在し、SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1 (SHP1) などのファスファターゼと会合することで、B 細胞抗原受容体 (BCR) を介するシグナル伝達を負に制御する。CD22 のリガンドである  $\alpha$  2,6 シアル酸は B 細胞などで多量に発現し、CD22 は B 細胞表面上で同じ細胞が発現するリガンド (シスリガンド) と恒常的に結合していることが示されている。これまでに、 $\alpha$  2,6 シアル酸を欠損するマウスなど種々の変異マウスなどの解析から、CD22 のシスリガンドが CD22 の機能を促進するという知見と、それとは逆に、抑制するという知見があり、その詳細は不明であった。

我々は、CD22 に特異的に、しかも、高親和性に結合する合成シアル酸誘導体の開発を行ってきた。その 1 つ GSC718 は CD22 に対して IC<sub>50</sub> が約 100nM と  $\alpha$  2,6 シアル酸に比べて約 1 万倍以上高い親和性で結合する。GSC718 をマウス B 細胞に作用させると、BCR を介するシグナル伝達を負に制御する。この知見は、GSC718 が CD22 とシスリガンドとの反応を阻害することにより、CD22 の抑制性機能を増強し、その結果 BCR シグナル伝達が低減されることを示し、CD22 のシスリガンドが CD22 の機能を抑制することが示唆される。一方、GSC718 を LPS などの TLR リガンドとともにマウス B 細胞に加えて培養すると、B 細胞の増殖が増強する。CD22 は TLR リガンドによる B 細胞の増殖も阻害することが示されているので、CD22 のシスリガンドは BCR シグナル伝達と TLR リガンドへの増殖反応について、CD22 の機能をそれぞれ抑制および促進していることが明らかで、B 細胞の活性化経路によって正反対に制御することが強く示唆される。さらに、以上の結果から GSC718 は BCR シグナル伝達を低減する一方で B 細胞の TLR リガンドへの増殖反応を増強するという免疫増強作用があることが明らかとなった。

免疫応答の際に抗原への親和性が極めて低い B 細胞も抗原によく応答することが知られているので、実際の免疫応答の際には BCR シグナルのレベルが低くても B 細胞は十分に応答すると考えられる。一方、B 細胞の TLR が抗体産生で重要な役割を果たすことが示されている。したがって、GSC718 は抗体産生応答を増強するものと予想される。CD22 はもっぱら B 細胞に発現し、マクロファージなどの炎症細胞には発現しない。したがって、CD22 を標的とすることで、B 細胞応答を増強し、炎症をおこさずに免疫応答を増強できると期待される。免疫増強剤は、ワクチンのアジュバントとして重要であるが、現在単離されている免疫増強作用を持つ化合物のほとんどは炎症誘導などによる副作用のためにヒトに用いることができない。このため、炎症をおこさない免疫増強剤が開発できれば、安全なワクチンの開発に貢献できる。



## ポスター発表要旨

- ・【P-01】新規 pH 感受性担体によるアジュバントの増強効果
- ・       ○坂口奈央樹<sup>1</sup>、弓場英治<sup>2</sup>、小岩井一倫<sup>1</sup>、木本知明<sup>1</sup>、河野健司<sup>2</sup>、大島英彦<sup>1</sup>
- ・       <sup>1</sup>テルモ株式会社
- <sup>2</sup>大阪府立大学大学院 工学研究科

### 【緒言】

治療ワクチンは、がんや感染症の新たな治療法として注目を集めている。抗原を樹状細胞のサイトゾルにデリバリーすることで、クロスプレゼンテーションと呼ばれる機構を通じ、治療に有用な細胞性免疫を効率の良く誘導可能であることが報告されている。デリバリーの手法としては、エンドソームエスケープが良く知られており、弱酸性の pH に応答して生体膜を破壊する機能により、抗原をサイトゾルへデリバリーすることが報告されている。さらに、CTD への記載や安全性を考慮すれば、GMP で提供され、かつ注射実績のある材料を使用することも重要と考える。

そこで我々は、GMP で製造され、かつ注射実績のある材料を用いて、抗原のサイトゾルへのデリバリーを可能とする技術の構築を行い、治療ワクチンへの応用を検討した。

### 【結果、考察】

材料のスクリーニングを行ったところ、リン脂質の一種である Dilauroyl-phosphatidylcholine (DLPC) と、デオキシコール酸の複合体 (DLPC-デオキシコール酸複合体) が、pH 6.5 以下の弱酸性に応答し、生体膜を破壊することが明らかとなった。さらに、DLPC-デオキシコール酸複合体と、抗原を含む溶液を単純に混合し、培養細胞に添加したところ、抗原をサイトゾルへ効率良く送達することが可能であった。物性を評価した結果、DLPC-デオキシコール酸複合体は、表面電位：約-30mV、平均粒子径：約 10nm、PDI：0.14 であり、負に帯電した均一で小さな粒子であることが明らかとなった。

次に、DLPC-デオキシコール酸複合体を、治療ワクチンに応用することを検討した。PBS に分散させた DLPC-デオキシコール酸複合体を、モデル抗原の OVA タンパク質と混合した後、C57BL/6 マウスの皮下に 1 回投与した。1 週間後の脾臓において、クラス I ペプチドの SIINFEKL にて刺激し、IFN- $\gamma$  産生細胞を ELISPOT 法により検出した。その結果、抗原とアジュバント (CpG-ODN や LipidA) のみを投与した場合に比べて、抗原、アジュバント、DLPC-デオキシコール酸複合体の 3 者を混合したものを投与した場合、非常に多数の spot が形成された。DLPC-デオキシコール酸複合体により、アジュバントの細胞性免疫を誘導する活性が増強されたものと考えられる。また、アジュバントを含めずに、抗原と DLPC-デオキシコール酸複合体のみを投与した場合、spot の形成は確認されず、DLPC-デオキシコール酸複合体そのものは、細胞性免疫を誘導する能力を有していないことが明らかとなった。DLPC-デオキシコール酸複合体によるアジュバントの増強効果は、成熟刺激の入った樹状細胞において、クロスプレゼンテーションを促進することにより、効率の良く細胞性免疫を誘導したのと考えられる。

以上より、DLPC-デオキシコール酸複合体は、アジュバントを増強するワクチン添加物として有用であり、または、LipidA や CpG を含む DLPC-デオキシコール酸複合体は、強力に細胞性免疫を誘導するワクチン添加物であり、治療ワクチンの実現に資するものと考えられる。

・【P-02】 ワクチンアジュバントなど核酸医薬品に用いられる合成オリゴヌクレオチドの分析

- 南海浩一・斎藤恵美・井上 聡・佐藤秀昭・湯山和彦
- ㈱ジーンデザイン

核酸医薬品とは、疾患ターゲットに対して有用な機能を持つようにヌクレオチドの順序を設計し、化学合成により製造した数個～百数十個程度のヌクレオチドが繋がったオリゴヌクレオチドである。いろいろな核酸医薬品が知られているが、最近ではワクチンアジュバントとしての開発も活発である。

現在当社の最大の合成スケールは1 バッチ 100g程度であり、凍結乾燥は 200g 程度を一度に行うことが出来る。この当社最大スケールの施設は、国内に拠点を持つオリゴヌクレオチドメーカーでは唯一医薬品製造業(無菌医薬品)の許可を得ている施設である。一方小スケールの製造においては少量多品種の製造を行うことが可能な設備を有しており、合成には自社開発の合成機を用いている。さらに、各種修飾による高機能化核酸の製造および製造開発も行っており、小スケール製造から核酸医薬品(治験薬)の GMP 製造までを一貫して行う体制を整えている。

このような製造および製造開発を行っていく中で分析技術の開発も勿論重要である。オリゴヌクレオチドの主な分析として、純度分析では HPLC 分析(逆相およびイオン交換)が、確認試験では質量分析が行われている(図1)。また、オリゴヌクレオチド特有の分析として配列確認があり、質量分析法を用いて行われている(図2)。今回の発表では当社が行っているオリゴヌクレオチドの分析について紹介する。

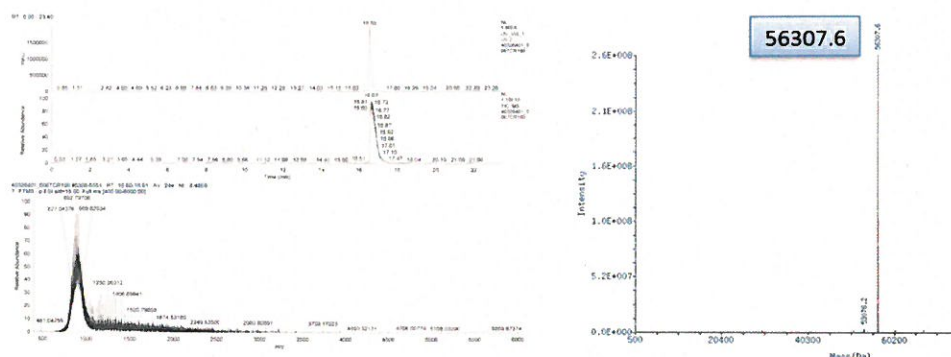


図1. 質量分析の例 (190mer DNA, 分子量 56309.14).

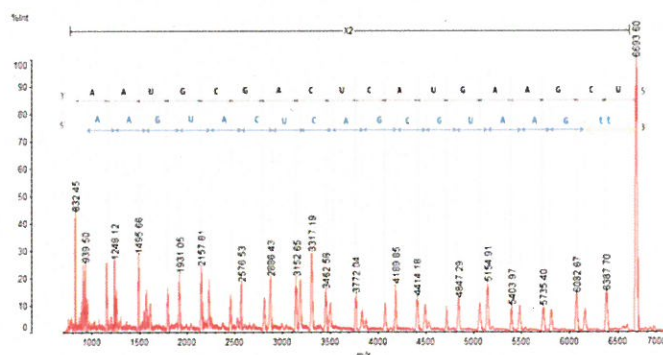


図2. RNA の配列解析例 (配列: UCGAAGUACUCAGUGUAGtt, tt は DNA) .

配列は文献【S.M. Elbashir *et al.*, *NATURE*, **411**, 494-498 (2001)】に記載のもの。

- **[P-03]** Chemical library screening for the finding of new adjuvant target on C-type lectin receptor, Mincle
- ○Atsushi Furukawa<sup>1</sup>, Aya Toji<sup>1</sup>, Daiki Mori<sup>2</sup>, Takanori Matsumaru<sup>1</sup>, Yuki Okabe<sup>1</sup>, Kenji Toyonaga<sup>2</sup>, Yasunobu Miyake<sup>2</sup>, Kota Kodama<sup>3</sup>, Toyoyuki Ose<sup>1</sup>, Sho Yamasaki<sup>1</sup>, Katsumi Maenaka<sup>1</sup>
- <sup>1</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
- <sup>2</sup> Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
- <sup>3</sup> Open innovation center, Hokkaido University

Efficient and low side-effect adjuvants are required for the development of split and peptide vaccines. TDM is well-known adjuvant and recently discovered to be the ligand of C-type lectin receptors, Mincle and MCL (1, 2). Our crystal structural analysis of Mincle and MCL indicated that hydrophobic loops close to carbohydrate recognition domains might be involved in the recognition of lipid of TDM(3). Although TDM is available in animal experiment as adjuvant, it has problems such as high locality and inflammation for clinical development. This problem might be due to cytotoxicity of the micelle formation of TDM. To avoid the problem, we performed chemical library screening to find new compounds that bind to Mincle and subsequently activate immune cells.

We performed *in silico* screening (Program: Autodock, Library: Open innovation center for Drug Discovery in Tokyo University) using the crystal structure of Mincle (PDB ID: 3WH2) to screen the Mincle-binding candidate compounds. We selected top 500 high score compounds from 200,000 compounds by *in silico* screening for further experiments. We evaluated the binding affinity of each compound to Mincle by Surface Plasmon Resonance analysis. As the results, 5 compounds positively bind to Mincle. Now we are performing further experiment to find new adjuvant activity compounds.

#### Reference

1. Ishikawa E, *et al.* (2009) Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med.*
2. Miyake Y, *et al.* (2013) C-type Lectin MCL Is an FcRγ-Coupled Receptor that Mediates the Adjuvanticity of Mycobacterial Cord Factor. *Immunity.*
3. Furukawa A, *et al.* (2013) Structural analysis for glycolipid recognition by the C-type lectins Mincle and MCL. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

・【P-04】 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

- ・ ○安田好文、武藤太一郎、今井康友、中西憲司
- ・ 兵庫医科大学 免疫学・医動物学

アルミニウムアジュバント (Alum) は抗原に対する免疫応答を増強し、ワクチンの効果を高める添加剤として用いられている。その作用機序として集積した好中球などから遊離した DNA が重要な役割を果たすと提唱されている。一方で、Alum は免疫部位に好酸球を誘導して炎症を起こすが、そのメカニズムは知られていない。我々は Alum が投与部位で IL-33 を遊離させ、その IL-33 の働きで好酸球が集積することを見出した。また甲殻類や昆虫、真菌や寄生虫の成分であるキチン粒子によっても同様に IL-33 依存性の好酸球性炎症がおこることを明らかにした。Alum やキチンを腹腔内投与すると、腹水中の IL-33 が短時間で一過性に増加した。その後、IL-5 や IL-13 といった Th2 サイトカインが増加し、好酸球の集積が確認できた。IL-33 や IL-33 受容体である ST2 欠損マウスではこれらの反応は著しく減少していた。逆に、Alum やキチンの代わりに IL-33 を腹腔内投与すると、Alum 投与と同様の反応を誘導できた。この IL-33 に反応して IL-5 や IL-13 を産生する細胞を調べたところ、Alum やキチンを投与したマウスでは腹腔中に ILC2 が集積しており、これらの細胞が IL-5 を産生することが確認できた。Alum の免疫増強作用における IL-33 の役割を検討したところ、IL-33 欠損マウスでも Alum/抗原免疫による抗原特異的抗体産生に影響がないことがわかった。以上の結果より、Alum やキチンは投与部位に IL-33 遊離と ILC2 集積を引き起こし、その結果として好酸球性炎症を誘導することが明らかとなった。この現象はアジュバントによる副反応の一つと考えられ、IL-33 遊離を引き起こさないアジュバントの開発がより副反応の少ないアジュバント開発に重要であると考えられる。

- ・【P-05】 ヒト型結核菌青山 B 株由来熱水抽出物 Z-100 は nucleotide-binding oligomerization domaincontaining 2 (Nod2) 依存的な NF- $\kappa$ B 活性化を誘導する
- ・ ○勝沼 功吉、吉長 幸嗣、大平 裕太、江田 留奈、佐藤 陽紀、堀井 孝幸、田中 貴男、  
武井 峰男、瀬戸 孝一
- ・ ゼリア新薬工業株式会社 中央研究所

自然免疫において主要な担当細胞である DC やマクロファージから産生されるサイトカインは抗腫瘍応答に関与していることが知られている。また、このようなサイトカイン産生を制御するものの一つとして結核菌からの抽出物が古くから知られているが、その有効成分ならびに生物活性は抽出方法によりそれぞれ異なっている。Z-100 はヒト型結核菌青山 B 株の熱水抽出により調製された水溶性抽出物であり、現在、子宮頸癌における放射線治療後の補助化学療法として、Phase III 臨床試験を実施中である。一方、その作用メカニズムは未解明の部分が多く、作用機序を明らかにする必要がある。今回は、特に Z-100 の低分子量画分に着目し、その生物活性について報告する。

初めに、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞から産生される Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) を指標として Z-100 の効果を検討した。その結果、Z-100 の単独刺激と比較し、IFN- $\gamma$  存在下での Z-100 共刺激は TNF- $\alpha$  産生を顕著に増加させた。さらに、遺伝子発現解析の結果、IFN- $\gamma$  が RAW264.7 細胞において nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (Nod2) の発現を増加させることが明らかとなった。次に、Nod2 siRNA を導入することで Nod2 の発現誘導を抑制した結果、IFN- $\gamma$  及び Z-100 の共刺激による TNF- $\alpha$  産生量は有意に減少した。一方で、Z-100 の低分子量画分 (Z-100Fr I) には Nod2 アゴニスト muramyl dipeptide (MDP) を構成するムラミン酸及びアミノ酸が検出された。さらに、Z-100Fr I 及び MDP は Z-100 と同様に IFN- $\gamma$  共存下で RAW264.7 細胞からの TNF- $\alpha$  産生を増加させ、マウス Nod2 安定発現レポーター細胞 (HEK-Blue-mNOD2 細胞) に対して Nod2 依存的な nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) の活性化を誘導させた。

これらの結果は、結核菌の熱水抽出物である Z-100 が低分子量の活性成分として MDP 様分子を含み、マクロファージに対し Nod2 依存的な NF- $\kappa$ B の活性化を誘導することを示しており、癌免疫療法において Z-100 が自然免疫応答を惹起する可能性を示唆している。本発表は、Z-100 の生物活性の一部として、低分子量画分に着目し取り上げたものであり、現在、高分子量画分での生物活性の研究も進めている。



・【P-06】 CpG オリゴデオキシヌクレオチドの立体制御による免疫誘導作用の変化

- ・ ○鳥飼祐介
- ・ 株式会社新日本科学

【目的】

TLR9 のリガンドである CpG オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) は、Th1 優位な免疫誘導を起こすことから、様々な医薬品への応用が期待されている。一方で、CpG ODN をはじめとしたオリゴ核酸は、生体内の核酸分解酵素の影響を受けやすいことや細胞膜透過性が低いことなどの課題を有することから、未だ実用化には至っていない。この課題を解決する方法の 1 つに、核酸のホスホジエステル結合をホスホロチオエート化する方法があるが、これにより立体異性 (Sp 体あるいは Rp 体) が生じることになる。この立体異性が異なった特性を示すことが報告<sup>1)</sup>されているが、免疫誘導効果の *in vivo* 評価については未だ不明な点が多い。本研究では、独自配列設計の立体制御した部分ホスホロチオエート修飾 CpG ODN を用いて、ホスホロチオエート化 CpG ODN の立体制御が免疫誘導効果に及ぼす影響を評価した。

【方法】

独自に配列設計した 4 種の部分ホスホロチオエート化 CpG ODN (配列名 SBL001~004) について、ホスホロチオエート化部位の全てを Sp 体に制御した Full Sp 体およびホスホロチオエート化部位の全てを Rp 体に制御した Full Rp 体をそれぞれ調製した。免疫誘導効果の評価として、OVA あるいは Flu HA ワクチンを抗原としたマウス免疫原性試験 (皮下投与) による血中 IgG 産生評価に加えて、HEK-Blue hTLR9 Cells による TLR9 結合活性、カニクイザル血清を用いた PAGE による血清中安定性、カニクイザル PBMC を用いた ELSA による IFN- $\alpha$  産生量および BALB/c マウスの脾臓細胞を用いた BrdU 法による細胞増殖活性評価から成る *in vitro* 試験も実施した。

【結果】

OVA あるいは Flu HA ワクチンを抗原としたマウス免疫原性試験における IgG 産生について、いずれの配列においても、Full Rp 体よりも Full Sp 体の方が優位であり、ホスホロチオエート修飾 CpG ODN の立体制御が *in vivo* 免疫誘導効果に顕著に影響を及ぼすことが確認された。また、*in vitro* 試験においては、異性体間の差が認められない項目はあるものの、基本的に Full Rp 体よりも Full Sp 体の方が優位な結果が確認されており、*in vitro* 評価項目を含めた複合的な効果に基づき、マウス免疫原性試験において Full Sp 体で優位な結果が得られたものとする。今後は、CpG ODN の塩基配列に関わる最適化研究は勿論のこと、Sp 体への立体制御を基本にしたホスホロチオエート化部位の最適化研究も、実施していく予定である。

【Reference】

- 1) *Oligonucleotides* 13, 491-499 (2003)

• **[P-07]** Large-scale sequencing and in silico identification of neutralizing antibody/virus complexes

- ○Kazuo Yamashita<sup>1</sup>, Joël Billaud<sup>2</sup>, Dimitri Schmitt<sup>1</sup>, and Daron M Standley<sup>1,2</sup>
- <sup>1</sup>WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan
- <sup>2</sup>Institute for Virus Research, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

It has recently become possible through immunoglobulin-specific next-generation sequencing (Ig-seq), to obtain mRNA sequences for large numbers ( $10^3$ - $10^6$ ) of antibodies from peripheral B-cells (reviewed in Georgiou et al, Nature Biotechnol 2014). One of the major remaining challenges is to interpret such enormous genetic data in terms of antigen specificity. Currently there is no software available to analyze Ig-seq data other than conventional sequence alignment programs or alignment tools that map antibody sequences back to their germline components. Here, we describe novel bioinformatics tools to identify the phenotypes of antibodies from sequence and predict their viral epitopes by managing big data. We first will make use of our state-of-the-art *in silico* structure-informed multiple sequence alignment technology (K Katoh and DM Standley Mol Biol Evol (2014)), which can quickly cluster sequences according to their complementary determining regions (CDRs). We then carry out rapid antibody 3D modeling (H Shirai et al, Proteins 2014; K Yamashita, et al, Bioinformatics 2014) for clusters of interest. Finally, provide refinement tools for building high-resolution structural models which can be used for docking antibody-epitope complexes. We present preliminary data from human B-cells and validate the speed and accuracy of the pipeline. In the future, we will apply our methodology to the identification of antibodies against influenza, dengue fever, herpes simplex, and adenovirus viruses.

• **[P-08] RNA-binding protein networks involved in immune regulation**

- ○Edward Wijaya<sup>1</sup>, Bahtiyor Nosirov<sup>2</sup>, Songling Li<sup>2</sup>, Kazuo Yamashita<sup>2</sup>, and Daron M Standley<sup>1,2</sup>
- <sup>1</sup>Institute for Virus Research, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan
- <sup>2</sup>WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Gene expression in immune cells is tightly controlled at both transcriptional and post-transcriptional levels. At the post-transcriptional level, multiple RNA-binding proteins (RBPs) work in combination to increase or decrease the stability of target mRNAs. We are developing novel computational methods to uncover networks of RBPs that regulate immune responses by controlling mRNA stability. Here we introduce three *in silico* pipelines that make use of emerging experimental data from next-generation sequencing and mass spectrometry in the public domain or provided by our experimental collaborators. The first pipeline (RURBP) is RBP-centered and is designed to identify new RBPs from mass spectrometry data. Such in-cell protein-RNA interaction experiments have a high false-positive rate, so further analysis is needed to refine the list of potential binding partners. RURBP takes a list of putative binding partners of the query RBP (qRBP) and assesses the probability that the putative binders are functionally related to or can physically interact with the qRBP. The second pipeline (mRBP) is mRNA-centered and is designed to identify novel RBPs. Here, we start with a query mRNA (qRNA) of interest and align the 3' UTR region against recently-published RNA sequence motifs obtained from cross-linking immunoprecipitation (CLIP)-based experiments. We then expand the number of possible RBPs by homology modeling and finally validate the predicted interactions by robust RNA-RBP docking (S Li et al. NAR (2014)). The last pipeline (miRNA Voyager) is designed to identify serum micro-RNA (miRNA)-mRNA interactions related to immune cell regulation. The pipeline utilizes miRNA target prediction and human immune cell gene expression data to re-weight putative mRNA targets for a set of query miRNAs.



・【P-09】 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

- ・ ○鈴木 英彦<sup>1</sup>、米満 美紀<sup>1</sup>、長竹 貴広<sup>1</sup>、池上浩司<sup>2</sup>、瀬藤光利<sup>2</sup>、清野 宏<sup>3</sup>、  
近藤 昌夫<sup>4</sup>、國澤 純<sup>1,3</sup>
- ・ <sup>1</sup>独立行政法人 医薬基盤研究所 ワクチンマテリアルプロジェクト
- ・ <sup>2</sup>浜松医科大学医学部 解剖学講座 細胞生物学分野
- ・ <sup>3</sup>東京大学医科学研究所 炎症免疫学分野/国際粘膜ワクチン研究開発センター
- ・ <sup>4</sup>大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野

現在の感染症ワクチンは注射型ワクチンが主流となっており、効果的に全身免疫を誘導するが、多くの病原体の侵入門戸である粘膜組織での免疫誘導が乏しいため、粘膜組織での初発感染を予防する効果は低い。一方で、‘飲む・吸う’ワクチンである「粘膜ワクチン」は全身・粘膜免疫の双方を誘導可能であり、かつ侵襲性も低いことから、有効性と実用性に優れたワクチンとして注目されている。優れた粘膜ワクチン効果を得るためには、免疫誘導組織である粘膜関連リンパ組織へワクチンを送達する必要がある。これまでに、我々は粘膜関連リンパ組織の上皮細胞上にタイトジャンクション構成分子である claudin-4 が高発現していることに着目し、claudin-4 結合分子である C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE) をデリバリー分子として用いた経鼻ワクチンの開発を行っている。本研究では C-CPE を用いた経鼻肺炎球菌ワクチンの有効性を示すと共に、本ワクチン効果における線毛機能や粘液といった物理的機能の影響を検証した。

まず、肺炎球菌共通抗原である PspA (Pneumococcal surface protein A) と C-CPE の融合タンパク質 (PspA-C-CPE) を作製した。PspA-C-CPE は鼻腔関連リンパ組織の上皮細胞への強い結合性を示した。その効果を反映し、PspA-C-CPE をマウスに経鼻投与することにより全身・粘膜面での PspA 特異的免疫応答の誘導が見られた。さらに肺炎球菌の呼吸器感染モデルを用いた検討から、PspA-C-CPE により誘導される抗原特異的免疫応答は、肺炎球菌の呼吸器感染に対して十分な感染防御効果を示すことが判明した。次にチューブリングルタミン酸化修飾欠損により線毛機能の異常や粘液排出の異常が見られる Ttll1 (Tubulin tyrosine ligase-like family, member 1) 欠損マウスに PspA-C-CPE を投与した際の免疫応答を検討した。Ttll1 欠損マウスの鼻腔上皮細胞における claudin-4 の発現には変化は認められなかったが、PspA-C-CPE の経鼻免疫により誘導される鼻腔組織での抗原特異的免疫応答が低下していた。これらの結果から、線毛や粘液の機能が C-CPE による経鼻ワクチンの効果に影響を与える重要な因子であることが示唆された。今後は、経鼻ワクチンデリバリーの開発における物理的機能の関与を明らかにするために、Ttll1 欠損マウスにおける PspA-C-CPE による免疫誘導機能の減弱メカニズムを解明していく予定である。

- **【P-10】 Development of a new vaccine strategy to induce antigen-specific immune responses in intestine**
- ○Kouta Matsunaga<sup>1</sup>, Naoki Takemura<sup>1,2</sup>, Kouji Kobiyama<sup>3,4</sup>, Taiki Aoshi<sup>3,4</sup>, Ken J Ishii<sup>3,4</sup>, Satoshi Uematsu<sup>1,2</sup>
- <sup>1</sup>Division of Innate Immune Regulation, International Research and Development Center for Mucosal Vaccines, Institute of Medical Science, The University of Tokyo
- <sup>2</sup>Department of Mucosal Immunology, School of Medicine, Chiba University
- <sup>3</sup>Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation
- <sup>4</sup>Laboratory of Vaccine Science, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University

Intestinal dendritic cells (DCs) have a unique capacity to induce antigen (Ag)-specific immune responses, including IgA production and Th responses, in intestine through the production of retinoic acid. Retinoic acid is synthesized from retinal by retinal dehydrogenase (RALDH), which is specifically expressed by intestinal DCs, but not by non-intestinal DCs in peripheral tissues. Therefore, peripheral immunization typically fails to induce Ag-specific immune responses in intestine. This study aimed to develop a new vaccine strategy that effectively induces protective immune responses in intestine by activating peripheral DCs to express RALDH. We observed that *Aldh1a2* mRNA expression of splenic DCs was strongly induced by stimulation with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), which is critical for the development of intestinal DCs. Whereas immunization of mice with Ag-loaded intestinal DCs induced Ag-specific IgG in sera as well as Ag-specific IgA in feces, immunization with splenic DCs induced only Ag-specific IgG in sera. Interestingly, GM-CSF-stimulated splenic DCs induced not only Ag-specific IgG in sera but also Ag-specific IgA in feces. In addition, intestinal DCs induced Ag-specific Th1 and Th17 cells in intestine, but neither of them were induced by splenic DCs. On the other hand, GM-CSF-stimulated splenic DCs induced Ag-specific Th1 cells, but not Th17 cells, in intestine. Thus, these results suggest that peripheral immunization could induce Ag-specific immune responses in intestine if vaccine contains the molecule that enable non-intestinal DCs to express RALDH. We are currently searching other adjuvant molecule that also induces RALDH expression in non-intestinal DCs.

・【P-11】 インフルエンザワクチン臨床試験における血清 miRNA マーカーの可能性

- ・ ○伊東 純一<sup>1</sup>、石井 健<sup>1,2</sup>、水口 賢司<sup>1</sup>
- ・ <sup>1</sup>医薬基盤研究所 バイオインフォマティクスプロジェクト
- ・ <sup>2</sup>大阪大学 免疫学フロンティアセンター ワクチン学

マイクロ RNA (miRNA) は 20-25 塩基長のノンコーディング RNA であり、遺伝子発現制御を介して様々な細胞機能に携わることが知られている。近年、miRNA は細胞内のみならず血清などの流体組織からも安定して抽出できることが示され、バイオマーカーとしての可能性に注目が集まっている。アジュバントデータベースプロジェクトでは、様々なアジュバントワクチン臨床試験から集めた血清サンプル中の miRNA 発現量を網羅的に測定し、バイオインフォマティクス技術を駆使して、アジュバントワクチンの安全性、有効性の指標となるような血清 miRNA マーカーの探索を行っている。本発表では、二つのインフルエンザワクチン臨床試験から得られた血清 miRNA 発現データの解析の結果を報告する。

(1) H5N1 型インフルエンザワクチン臨床試験

20 歳未満の被験者を対象とした H5N1 型インフルエンザワクチン臨床試験の結果、およそ半数の被験者で高熱が観測された。そのような予期せぬ高頻度の発熱を未然に予測できるバイオマーカーを探索するため、我々は先の研究で 85 名の被験者の血清 miRNA 発現プロファイルを複数の統計手法を用いて解析し、高い識別率で発熱を判別できる miRNA を複数同定した。今年度 (2014 年) に行われた同アジュバントワクチンの追加臨床試験から新たに得られた血清 miRNA 発現プロファイルを解析することにより、同定した miRNA の発熱マーカーとしての可能性を検証した。

(2) H1N1 型インフルエンザワクチン臨床試験

海外で行われた 20 歳以上の被験者を対象とした H1N1 型インフルエンザワクチン臨床試験の結果、HA 抗原ワクチン投与群と比較して、アジュバントワクチン (HA 抗原に新型アジュバントを添加したもの) 投与群では抗体価の有意な改善が認められた。幸いにも有害事象は観測されていない。我々は得られた 20 名の被験者の血清サンプルを、「抗体価上昇」と「投与ワクチンの種類」の二つの因子を考慮して、複数のグループに分類した。次に、各グループの血清 miRNA 発現プロファイルを比較することにより、「インフルエンザワクチンの有効性」と「アジュバントの効果」のそれぞれと関連性の高い miRNA を同定した。更に、それら miRNA の標的遺伝子特定や関連パスウェイ推定を行うことにより、本インフルエンザワクチンの作用機序と miRNA の因果関係を調査した。

• [P-12] Effective characterisation of adjuvant transcriptomes for biomarker and target discovery

- ○Lokesh P. Tripathi <sup>1</sup>, Junichi Ito <sup>1</sup>, Taiki Aoshi <sup>1,2</sup>, Ken J. Ishii <sup>1,2</sup> and Kenji Mizuguchi <sup>1</sup>
- <sup>1</sup> National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), 7-6-8 Asagi, Saito, Ibaraki, Osaka
- <sup>2</sup> Immunology Frontier Research Center (IFReC), Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka

Adjuvants are compounds added to a vaccine formulation to enhance their immunogenicity. However, very few adjuvants are licensed for use in humans (four by the FDA, five by the European Medicines Agency) and in most instances, the mechanisms of adjuvant action remain poorly understood.

Therefore, it is necessary to establish a standard method for evaluating adjuvants, which should be useful to predict immunological outcomes and facilitate the development of novel adjuvants. In an attempt to characterise and evaluate diverse adjuvants, comprehensive mice transcriptomes of 7 different adjuvants were captured using gene expression microarrays.

In this study, we employed bioinformatics approaches to understand the functional relevance of the genes associated with adjuvants. First, we identified adjuvant-featured genes that were differentially expressed in the individual adjuvant-administered mice relative to control mice by using unsupervised learning technique. Subsequently, we retrieved the PPIs for the differentially-regulated genes corresponding to each adjuvant cluster and inferred PPI networks using TargetMine, an integrated database for drug and target discovery. Next, we investigated the expanded gene sets for the enrichment of specific biological themes (KEGG and Reactome pathways, Gene ontology [GO] term associations).

Our analysis was able to highlight specific pathways the components of which were activated or repressed in response to specific adjuvants. For instance, mice that were administered with complete Freund's adjuvant (FCA) displayed elevated expression of genes that were mapped to enriched KEGG pathway "TNF signaling pathway", which is consistent with the role of FCA in activating TNF signalling. Likewise, we identified genes and pathways that were specifically modulated by individual adjuvants. Our analysis also highlighted biological processes that appeared to be influenced by multiple adjuvants, thereby provided detailed insights into the basal mechanisms underlying the mode of action of different adjuvants. Our findings are crucial from the point of biomarker discovery and identification of potentially therapeutic targets that could facilitate the development of newer vaccines and therapeutic strategies for improved clinical outcomes.

- **【P-13】** A Systems Biology Framework for the identification of the molecular basis of immune adjuvanticity

- ○Philip Prathipati <sup>1</sup>, Taiki Aoshi <sup>1,2</sup>, Ken J. Ishii <sup>1,2</sup> and Kenji Mizuguchi <sup>1</sup>
- <sup>1</sup> National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), 7-6-8 Asagi, Saito, Ibaraki, Osaka
- <sup>2</sup> Immunology Frontier Research Center (IFReC), Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka

Immunological adjuvants together with vaccines induce the strong innate immune response which is essential to elicit the antigen specific robust adaptive immune responses. At the same time, some adjuvants also induce systemic host responses including hematological parameter changes of myeloid leukocytes, lymphocytes, and platelets, etc. But the molecular basis of these phenotypic changes induced by immunological adjuvants administration remains poorly understood. Gene expression signatures which are an intermediate phenotype between gene sequence and complex traits can facilitate the identification of the factors or master regulators that drive the host responses upon administration of the immune adjuvants.

Using weighted gene coexpression analysis (WGCNA) and gene set enrichment analysis (GSEA) we investigate, via a systems biology approach called phenotypic anchoring, the gene signatures, the molecular mechanisms, the master regulatory genes, and potential biomarkers associated with rat hematological data related to adjuvant administration such as myeloid leukocytes, lymphocytes and platelets counts.

- **[P-14] Immunological and organogenesis diversity of mucosa-associated lymphoid tissues for the development of mucosal vaccine**

- ○Takahiro Nagatake<sup>1</sup>, Naomi Matsumoto<sup>1</sup>, Michiko Shimojou<sup>1</sup>, Hidehiko Suzuki<sup>1</sup>, Satoshi Fukuyama<sup>2,3</sup>, Shintaro Sato<sup>2</sup>, Kentaro Ogami<sup>4</sup>, Yusuke Tsujimura<sup>4</sup>, Mitsuo Kawano<sup>5</sup>, Tetsuya Nosaka<sup>5</sup>, Hiroshi Kiyono<sup>2</sup>, Yasuhiro Yasutomi<sup>4</sup> and Jun Kunisawa<sup>1,2</sup>
- <sup>1</sup>Laboratory of Vaccine Materials, National Institute of Biomedical Innovation
- <sup>2</sup>Division of Mucosal Immunology and International Research and Development Center for Mucosal Vaccines, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo
- <sup>3</sup>Division of Virology, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, University of Tokyo
- <sup>4</sup>Laboratory of Immunoregulation and Vaccine Research, Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation
- <sup>5</sup>Department of Microbiology and Molecular Genetics, Graduate School of Medicine, Mie University

Mucosal vaccine induces antigen-specific immune responses in both mucosal and systemic compartments. Accumulating evidence reveals important roles of mucosa-associated lymphoid tissues (MALTs) in the initiation of antigen-specific immune response against mucosal vaccine. Molecular and cellular requirements of MALT organogenesis and their programs are different among Peyer's patches (PPs) in the small intestine, nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) in the nasal cavity, and tear duct-associated lymphoid tissue (TALT) in the lacrimal sac. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> lymphoid tissue inducer cells can be divided into 3 subsets (i.e., PP<sup>+</sup>, NALT<sup>+</sup>, and TALT-inducer cells). PP-genesis-associated genes, including interleukin-7 receptor  $\alpha$ , *cxc5* and lymphotoxin  $\alpha$  were highly expressed by PP-inducer cells but not NALT<sup>+</sup> and TALT-inducer cells. PP-inducer cells expressed the tissue genesis associated transcription factors, Id2 and ROR $\gamma$ t, whereas NALT-inducer cells expressed Id2 but not ROR $\gamma$ t, and TALT-inducer cells expressed neither Id2 nor ROR $\gamma$ t. Indeed, organogenesis of TALT was independent from Id2 and ROR $\gamma$ t, whereas NALT required Id2 but not ROR $\gamma$ t.

Unlike these programmed MALT genesis, inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) is a tertiary lymphoid tissue that develops independent from Id2 and ROR $\gamma$ t, but requires microbial stimulation and/or chronic inflammation. We found that iBALT formation was induced by nasal administration with type 2 human parainfluenza virus (hPIV2) that is currently being developed as a mucosal vaccine delivery vehicle for tuberculosis vaccine. Expression of MHC class II in lung macrophages was also positively regulated by hPIV2. We further found that the hPIV2-mediated iBALT formation and induction of MHC class II were mediated by lymphotoxin  $\beta$  receptor.

Taken together, we provide evidence that MALT organogenesis is operated by programmed and inducible systems. Further, these organogenesis are different among MALTs. Uniqueness of molecular and cellular mechanisms of iBALT organogenesis may lead to the creation of new mucosal vaccine strategy for the induction of antigen-specific immune response against inhaled antigen.



・【P-15】 粒子状物質により誘導される肺特異的免疫反応

～なぜ粒子状物質の吸入によりアレルギー性炎症が誘導されるのか？～

- ・ ○黒田悦史<sup>1</sup>、石井健<sup>1,2</sup>
- ・ <sup>1</sup>大阪大学 免疫学フロンティア研究センター ワクチン学
- ・ <sup>2</sup>医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト

アレルギー性疾患の増加は社会問題の一つとなっており、その原因の解明と効果的な治療法の開発が急務とされている。アレルギー性疾患の増加の要因としては、アレルゲンの増加、感染症の減少（衛生仮説）、食生活の変化、生活環境における化学物質の増加などが考えられており、化学物質の増加に関しては、産業の発達とともに産出されてきた様々な微小粒子状化学物質（ディーゼル粒子、黄砂など）のアレルギー性疾患への関与が示唆されている。さらに最近では微小粒子状物質の一つである Particulate Matter 2.5 (PM2.5) が健康被害を引き起こすとしてその影響が懸念されている。粒子状物質はアレルゲンとは異なり、それ自身は抗原とはならない。しかしながら粒子状物質を抗原とともに感作することで、その抗原に対する免疫応答を増強させるアジュバント効果を有することが知られている。興味深いことに、粒子状物質の多くがアレルギー反応の原因となる Th2 型免疫反応を誘導することが報告されており、粒子状物質による Th2 アジュバント効果と近年のアレルギー性疾患の増加との関連が示唆されている。しかしながら、粒子状物質がどのような機構で免疫反応を活性化し、Th2 型免疫反応を誘導するかについては明らかにされていない。

本研究では、粒子状物質であるアルミニウム塩やシリカ、酸化ニッケル粒子をマウスの肺に注入することで誘発されるアレルギー性炎症について解析を行った。粒子を気管内注入し、抗原を曝露することで多量の抗原特異的な IgE が誘導された。IgE の誘導は MyD88 および IL-1 シグナル依存性であった。粒子の肺への注入により、ダメージ関連分子パターン (DAMPs) として宿主の DNA や IL-1 $\alpha$  が誘導され、これらが肺の炎症や IgE 産生誘導に関与していた。興味深いことに、IL-1 $\alpha$  は粒子で刺激された肺胞マクロファージの細胞死により誘導されるが、その他の組織マクロファージからは誘導されず、組織特異性の反応を示した。

これらの結果から、粒子状物質によって肺に特異的に誘導される DAMPs が肺の炎症や IgE の誘導に関与していることが示唆された。



• **[P-16]** Synergistic activity of TLR9- and STING-agonists in innate and adaptive Type-II IFN induction

- ○Burcu Temizoz,<sup>1</sup> Etsushi Kuroda,<sup>1</sup> Keiichi Ohata,<sup>1</sup> Nao Jonai,<sup>2</sup> Koji Ozasa,<sup>2</sup>  
Kouji Kobiyama,<sup>2</sup> Taiki Aoshi,<sup>2</sup> Ken J. Ishii<sup>1,2</sup>
- <sup>1</sup>Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka, Japan
- <sup>2</sup>National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan

TLR9 ligand, CpG oligodeoxynucleotide (ODN), is one of the clinically-tested adjuvants that can induce type 1 immunity. Recently, cyclic dinucleotides, known as bacterial second messenger, have been demonstrated to be a potent agonistic ligand for STING to induce type I IFN production. Cyclic GMP-AMP (cGAMP), one of the recently identified mammalian cyclic dinucleotides, has been reported to act as an adjuvant. Several concerns, however, are raised that currently available CpG ODN (K-type) is a weak inducer of type-I and type-II IFNs, and that STING-ligands are shown to induce type 2 immune responses, rather than type 1 immunity, thereby limiting their potential therapeutic applications. In this study, we found synergistic activity of TLR9- and STING-agonists in innate and adaptive Type-II IFN (IFN $\gamma$ ) induction, resulting in a potent type 1 vaccine adjuvant and a immuno-therapeutic agent in explanted tumor model. Our in vitro studies in human and mouse PBMC suggest that the synergic effect between CpG ODN (K3) and cGAMP, culminated in IFN $\gamma$  production by NK cells, was partly due to the Th1-inducing cytokines, including IL-12 produced by both cDCs and pDCs. As a result, intramuscular immunization of mice with the combination of protein antigen, CpG ODN and cGAMP resulted in the induction of significantly higher antigen specific Th1 and CD8<sup>+</sup> T cell responses, than those immunized with CpG ODN alone. Furthermore, type 2 immune responses that are induced by cGAMP immunization, are significantly suppressed in the combination immunization. Finally, by using the syngenic mouse tumor models, we show that intra-tumoral injection of CpG ODN and cGAMP has reduced the tumor size significantly better than those treated alone. In conclusion, combination of CpG ODN and cGAMP is better than the singular use, as not only a potent type 1 adjuvant for vaccines that requires strong cellular immune responses, but also a vaccine free anti-tumor agent, by activating not only mouse, but also human cells towards synergistic IFN $\gamma$  production. Thus, further mechanistic and optimization studies are required for clarifying the therapeutic potential of the combination.

・【P-17】 安全性評価モデルのアジュバント遺伝子発現情報への適用に向けて

- ・ ○五十嵐芳暢、中津則之、山田弘
- ・ 独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト

アジュバントデータベースプロジェクトでは、各種アジュバントによる動物実験やヒトサンプルの遺伝子発現情報を網羅的に解析したデータベースを構築している。特に、アジュバント単体を投与したラット肝臓等の遺伝子発現情報は、アジュバントの副作用や毒性メカニズムを評価するために有用である。一方、これまでトキシコゲノミクスプロジェクトでは、薬剤を投与したラット肝臓や腎臓の遺伝子発現情報を用いた毒性予測モデルを構築してきた。これら毒性予測モデルにアジュバント投与の遺伝子発現情報を適用することによって、アジュバント単体の安全性や毒性、作用機序メカニズムを評価できる可能性がある。本報告では上記毒性予測モデルに改良を加え、外部データによって再評価したモデルと、その予測モデルにアジュバント投与の遺伝子発現情報を適用した例について紹介する。

・【P-18】 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含有インフルエンザ HA ワクチンへの応用

- 百瀬暖佳<sup>1</sup>、水上拓郎<sup>1</sup>、倉光 球<sup>1</sup>、安藤栄里子<sup>2</sup>、立花滋博<sup>2</sup>、滝澤和也<sup>1</sup>、益見厚子<sup>1</sup>、永田伴子<sup>2</sup>、浜口 功<sup>1</sup>
- <sup>1</sup> 国立感染症研究所 血液・安全性研究部
- <sup>2</sup> 財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所

【目的】

ワクチンの安全性評価法として、ワクチン接種した動物に見られる生体変化が一つの指標になっている。一方、DNA マイクロアレイ技術の進展に伴い、ワクチンの毒性に関連する遺伝子群の特定を行うことが可能となってきた。これまでに我々は、ラットにおいて、インフルエンザ全粒子ワクチン投与にตอบสนองして発現が亢進するマーカー遺伝子を 17 個同定している。今回はインフルエンザワクチンの毒性参照品、および高濃度 HA 原液を用い、我々が同定したマーカー遺伝子の発現解析と、生体変化を指標とする従来の動物試験法との相関性の検討と感度比較を行った。また施設間差の検討を行った。さらに、細胞培養由来 HA ワクチンと virosome アジュバント含有 HA ワクチンを用い、これらの安全性評価に対する遺伝子発現解析法 応用の可能性について検討した。

【方法】

ワクチンは、毒性参照品(マウス白血球数減少試験用)、国内メーカー4 社より提供頂いた高濃度 HA 原液、国産の発育鶏卵由来 HA ワクチン、および、海外で製造販売承認がなされている培養細胞由来 HA ワクチンと virosome アジュバント含有 HA ワクチンを用いた。毒性参照品と高濃度 HA 原液は 2 倍の段階希釈を行った。これらをラットの腹腔内に 5ml 投与し、1 日目の体重、末梢白血球数、血小板数を測定した。また、肺組織を採取し、bDNA を用いたマーカー遺伝子の一括発現解析を行った。

【結果】

従来法との相関性、感度比較のため、接種後 1 日目の体重変動、末梢白血球数、血小板数を検討した。毒性参照品ではいずれも濃度依存的な減少を認めたが、高濃度 HA 原液では濃度依存的な減少は認められなかった。一方、マーカー遺伝子の発現解析では高濃度 HA 原液接種群(最終小分け製品の 2~4 倍相当)で発現上昇を認めるものがあつた。マーカー遺伝子の発現パターンの類似性から系統樹を作成したところ、3 個のクラスターが形成された。すなわち、毒性参照品(1, 0.5U/mL)、毒性参照品(0.25U/mL)と高濃度 HA 原液(4 倍相当)、高濃度 HA 原液(1~2 倍相当)と生理食塩水であつた。

また、施設間差の検討のため、感染研と秦野研で得られたデータを比較したところ、データの相関性は見られたが、回帰直線の傾きは 0.9~1.1 より外れていた。

新規製法ワクチンの安全性評価への適応可能性を検討するため、培養細胞由来 HA ワクチンと virosome アジュバント含有 HA ワクチンを試験品とし、発育鶏卵由来 HA ワクチンとの比較検討を行った。従来法では培養細胞由来 HA ワクチンと国産 HA ワクチンで有意差がなく、マーカー遺伝子の発現亢進も認められなかった。一方、virosome アジュバント含有 HA ワクチンでは有意な体重減少を認めた。マーカー遺伝子の発現解析においても、17 遺伝子中 10 遺伝子で発現量が有意に亢進し、従来法との相関が認められた。

## 【考察・結論】

ワクチン接種動物における生体反応と遺伝子発現変動の間には相関が見られ、マーカー遺伝子の発現解析がインフルエンザワクチンの安全性評価に適用できる事が示された。また、遺伝子発現解析法は従来法と比較して高感度であり、ワクチンに応答した微細な生体変化を感知できると考えられる。これまでの安全性評価法に加え、我々の構築した遺伝子発現解析を適応することによって、簡便、迅速でより信頼性の高いトレンド解析が可能になると期待される。ただし、異なる施設ではデータの相関性はあるものの測定値に乖離が見られることから、施設毎の母集団作製、または標準品等の設定が必要であることが考えられた。最後に、virosome 含有 HA ワクチンにおいて発現が亢進した 10 遺伝子は、アジュバントの安全性評価にも適応できる可能性が示唆された。

• **[P-19]** Recognition of bacterial glycolipid through multiple pattern recognition receptors

• ○Masahiro Nagata<sup>1</sup>, Rieko Doi<sup>1</sup>, Eri Ishikawa<sup>1</sup>, Sho Yamasaki<sup>1</sup>

• <sup>1</sup>Division of Molecular Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

Gram-negative bacteria have been known to synthesize several glycolipids. Here, we demonstrate that C-type lectin receptor (CLR) recognizes glycolipid derived from *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Lipids derived from *H. pylori* were separated into 39 fractions by high-performance liquid chromatography (HPLC). We found that two subfractions, which are *H. pylori* glycolipid (HPG) 1 and HPG2, have strong ligand activity.

Only HPG2 activated macrophages to produce TNF. HPG2 also activated invariant natural killer T (iNKT) cells in liver mononuclear cells (MNCs) examined by CD69 upregulation.

Furthermore, both HPG1 and HPG2 functions as adjuvant to induce Th17 response in the coculture of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) with CD4<sup>+</sup> T cells from OT-II mice.

Finally, we investigated the function of CLR against *H. pylori* infection *in vivo*. Deficiency led to an increase of bacterial number in stomach at 2 weeks after infection.

These results suggest that *H. pylori* possesses a dual ligand for CLR and iNKT TCR. This finding further provides a new insight of the synergistic immune responses by DCs and iNKT cells against same PAMPs via different receptors.

- **[P-20] Critical role of TSLP-TSLPR interaction in inducing antigen-specific IgA responses upon Th2-type adjuvant intranasal immunizations.**

- ○JOO Sunyi<sup>1, 2</sup>, FUKUYAMA Yoshiko<sup>1</sup>, KURASHIMA Yosuke<sup>1</sup>, YUKI Yoshikazu<sup>1</sup>,  
PARK Eun Jeong<sup>1</sup> and KIYONO Hiroshi<sup>1,2</sup>
- <sup>1</sup>Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology,  
The Institute of Medical Science, The University of Tokyo
- <sup>2</sup>Department of Pathology, Immunology and Microbiology, Graduate School of Medicine,  
The University of Tokyo

There are currently great interest and demand in developing the mucosal vaccine and adjuvant to prevent life-threatening microbial infections. The adaptive humoral immune defense at mucosal surfaces is dominantly mediated by secretory IgA (SIgA) antibodies. Therefore, strategy to elicit antigen (Ag)-specific SIgA responses, may be crucial for designing efficacious mucosal vaccines. However, molecular pathways underlying the induction and maintenance of IgA antibody responses by mucosal immunizations are largely unknown. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is an interleukin 7 (IL-7)-like cytokine and is predominantly expressed by epithelial cells of thymus, skin, lung, intestine, and tonsils, as well as stromal cells, mast cells, and dendritic cells (DCs). TSLP has important roles in conditioning DCs to drive Th2 differentiation and is increased in immunopathologies associated with dysregulated Th2-type cytokine production. On the other hand, it has additionally been reported to promote antibody class switch recombination (CSR) in humans. However, there is no evidence to date for TSLP-mediated regulation of IgA CSR in the context of mucosal immunizations. In this study, we found that TSLP expression was up-regulated in the mucosal tissues of mice nasally immunized with antigen plus Th2-type adjuvant, suggesting of the TSLP-TSLPR interaction as a potential cue of mediating mucosal immunity. To demonstrate whether TSLP-TSLPR interaction mediates humoral immune responses upon mucosal immunizations, we first examined Ag-specific antibody production in WT or TSLPR-KO mice nasally immunized. Interestingly, Ag-specific IgA, but not IgG responses in both serum and mucosal secretion were significantly reduced in the TSLPR-KO mice compared to WT mice following nasal immunization with antigen plus Th2-type adjuvant, although there was no significant difference in total IgG or IgA titers in the steady state between both mice. To further understand the mechanism by which TSLP signaling in DCs mediate Ag-specific IgA CSR in B cells, we next analyzed CD11c+ DCs isolated from the WT or TSLPR-KO mice immunized. These results demonstrate TSLP-TSLPR pathway is critical in mediating Ag-specific SIgA responses upon mucosal immunizations in vivo. We believe that better understandings of the precise roles of TSLP signaling in humoral immunity upon mucosal immunizations may help to develop more beneficial mucosal vaccines and adjuvant.



- **【P-21】 Nanogel-based PspA nasal vaccine induces microRNA-associated protective immunity in nonhuman primates**
- ○Yoshiko Fukuyama<sup>1</sup>, Yoshikazu Yuki<sup>1</sup>, Yuko Katakai<sup>2</sup>, Haruko Takahashi<sup>3</sup>,  
Shinichi Sawada<sup>3</sup>, Sunyi Joo<sup>1</sup>, Eun Jeong Park<sup>1</sup>, Kazunari Akiyoshi<sup>3</sup> and Hiroshi Kiyono<sup>1</sup>
- <sup>1</sup> Division of Mucosal Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo
- <sup>2</sup> Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation
- <sup>3</sup> Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

We previously demonstrated a cationic type of cholesteryl group-bearing pullulan based nanogel containing pneumococcal surface protein A (PspA-nanogel) induced both protective Th2-mediated Ag-specific systemic and mucosal antibody (Ab) responses and Th17 cell-mediated immunity. In this study, we examined whether PspA-nanogel nasal vaccine could induce PspA-specific protective immunity and cytokines-related miRNA expression in nonhuman primates. When cynomolgus macaques were nasally immunized with 25 µg of PspA-nanogel/dose, increased levels of Th2 cell dependent PspA-specific serum and broncho alveolar lavage fluid (BALF) IgG, and nasal wash (NW) secretory IgA (SIgA) Ab responses with elevated Th17 cell immunity were seen when compared with control macaques nasally immunized with 25 µg of PspA alone or PBS. MicroRNA (miRNA) analysis of serum and nasal tissues from these PspA-nanogel immunized macaques revealed specific elevation of miR-181a and miR-326 which have been shown to corresponding to Th2 and Th17 responses, respectively. These results suggest that these two miRNAs are also associated with non-human primate Th2 and Th17 cell responses after nasal vaccination with PspA-nanogel vaccine which accounted for the induction of protective immunity against pneumonia.

• [P-22] Functional role of MARCKS-like protein (MLP) in murine Peyer's patch M cells

- ○Shintaro Sato<sup>1,3</sup>, Satoshi Kaneto<sup>1</sup>, Eun Jeong Park<sup>1</sup>, and Hiroshi Kiyono<sup>1,3</sup>
- <sup>1</sup>Division of Mucosal Immunology
- <sup>2</sup>International Research and Development Center for Mucosal Vaccines, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo
- <sup>3</sup>CREST, JST

The mucosal immune response is triggered by antigen uptake from the lumen across the mucous and epithelial cell layers to organized mucosa-associated lymphoid tissues such as Peyer's patches (PPs) in the small intestine. This antigen uptake is mediated mainly by microfold cells (M cells) via transcytosis action. To investigate the molecular biology of PP M cells, we previously identified MARCKS-like protein (MLP) and Gp2 as M-cell-specific molecules. Further study revealed that GP2 acts as the scaffold receptor for the fimbrial protein of bacteria such as *E. coli* and *Salmonella* Typhimurium on M cells. Although MLP is known as a substrate for protein kinase C (PKC), the biological role of MLP in M cells is still unknown.

To address this issue, we generated intestinal epithelial cell-specific MLP conditional knockout (MLP<sup>IEC-KO</sup>) mice. The expression of MLP was completely abolished in the apical epithelial surface of PPs in these mice. Matured M cells, defined by the GP2 expression and the unique ultra-architectures of shorter microvilli and pocket-like formation, could be found in MLP<sup>IEC-KO</sup> mice, indicating that MLP is not involved in the development and differentiation of M cells. When the sampling ability of M cells in MLP<sup>IEC-KO</sup> mice were examined, orally-administered fluorescence-nanoparticles were equally taken up into PPs. However, uptake of *Yersinia enterocolitica*, but not *S. Typhimurium* was markedly lower in MLP<sup>IEC-KO</sup> mice than in control mice.

Since *Yersinia* outer proteins such as YadA and invasin have been known to interact with  $\beta 1$  integrin on M-cell surfaces, we further examined whether MLP regulates integrin molecules by *in vitro* assay. MLP-introduced MODE-K cells enhanced the cellular response to fibronectin, which is the ligand for  $\alpha 5 \beta 1$  integrin. On the other hand, mutated MLP, which lacked PKC phosphorylation sites, had no effect to enhance the response to fibronectin. In addition, phosphatase inhibitor treatment canceled the responsiveness to fibronectin of MLP-expressing cells, suggesting that movement of MLP between the plasma membrane and cytoplasm, depending on the phosphorylation status of MLP, is required to activate integrin molecules. Taken together, our findings suggest that MLP regulates the activity of  $\alpha 5 \beta 1$  integrin in M cells, depending on its phosphorylation status, and contributes to the uptake of *Y. enterocolitica*.

- **[P-23]** Vaginal resident memory T cells induced by intranasal vaccination are critical for early clearance of genital HSV-2 infection
- ○Aldina Suwanto<sup>1,2</sup>, Ayuko Sato<sup>1</sup>, Manami Okabe<sup>1</sup>, Shintaro Sato<sup>1,3,4</sup>, Tomonori Nochi<sup>5</sup>, Jun Kunisawa<sup>1,3,6</sup>, Hiroshi Kiyono<sup>1,4</sup>
- <sup>1</sup>Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo
- <sup>2</sup>Department of Medical Genome Science, Graduate School of Frontier Science, The University of Tokyo
- <sup>3</sup>International Research and Development Center for Mucosal Vaccines, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo
- <sup>4</sup>Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency
- <sup>5</sup>Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University
- <sup>6</sup>Laboratory of Vaccine Materials, National Institute of Biomedical Innovation

Protective immunity against genital pathogens causing chronic infections such as herpes simplex virus type 2 (HSV-2) or human immunodeficiency virus requires the induction of cell-mediated immune responses locally in the genital tract. Intranasal immunization with a thymidine kinase-deficient (TK<sup>-</sup>) mutant of HSV-2 effectively induces HSV-2-specific IFN $\gamma$ -secreting memory T-cell production and protective immunity against intravaginal challenge with wild-type HSV-2. However, the precise mechanism by which intranasal immunization induces protective immunity in the distant genital mucosa more effectively than does systemic immunization is unknown. Here, we showed that intranasal immunization with live HSV-2 TK<sup>-</sup> induced the production of effector T cells and their migration to, and retention in, the vaginal mucosa, whereas systemic vaccination barely established a local effector T cell pool, even when it induced the production of circulating memory T cells in the systemic compartment. The long-lasting HSV-2-specific local effector T cells induced by intranasal vaccination provided superior protection against intravaginal wild-type HSV-2 challenge by starting viral clearance at the entry site earlier than with intraperitoneal immunization. Thus, intranasal immunization is an effective strategy for eliciting high levels of cell-mediated protection of the genital tract by providing long-lasting Ag-specific local effector T cells without introducing topical infection or inflammation.

• **[P-24] Mechanism of Action of Hemozoin as Vaccine Adjuvant**

- ○OZKAN Muge<sup>1</sup>, OONISHI Motoyasu<sup>2</sup>, ISHII Ken J.<sup>2, 3</sup>, COBAN Cevayir<sup>1</sup>
- <sup>1</sup>Laboratory of Malaria Immunology, Immunology Frontier Research Center (IFReC), Osaka University, Osaka, Japan
- <sup>2</sup>Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), Osaka, Japan
- <sup>3</sup>Laboratory of Vaccine Science, Immunology Frontier Research Center (IFReC), Osaka University, Osaka, Japan

Natural hemozoin (nHZ) is a dark crystal synthesized from monomeric heme by Plasmodium parasites during malaria. Besides naturally occurring hemozoin, it is possible to synthesize hemozoin artificially (referred as sHZ). Synthetic hemozoin (sHZ) previously described as a biologically active compound and can modulate immune responses. We are now using a clinical lot (GLP lot) hemozoin synthesized by an altered acid-catalyzed hematin anhydride method results in homogeneous crystals. Although chemical, magnetic and optical properties are identical with the nHZ, we further investigated the underlying mechanism of sHZ's adjuvant properties. As we described previously (Coban et al., Cell Host Microbe 2010, 7(1):50-61), the adjuvanticity of sHZ was TLR9-independent but MyD88-dependent. Further in vivo studies concerning upstream molecules of MyD88 (involving IL1R, IL33, ST2, IL18 and IL18R and designated knock out mouse) indicated that none of the described molecules are involved in the adjuvanticity of sHZ. It is known that several other particulate adjuvants like alum cause release of host DNA that further contributes to its adjuvanticity. We similarly found that sHZ immunization together with DnaseI treatment abolishes immune responses and hereby we describe that sHZ can also cause host DNA release, and TBK1 is involved in the adjuvanticity. Our comprehensive analysis of immune-cell interaction upon immunization with sHZ indicated that in MyD88<sup>-/-</sup> mice B-cell responses are reduced. Therefore we conclude that accumulation of sHZ crystals around B-cell follicle border is important for the adjuvanticity.

・【P-25】 アジュバントデータベースプロジェクト: 動物モデルによる網羅的遺伝子発現解析

Adjuvant Database Project: comprehensive transcriptome analysis in animal models

- ・ ○青枝大貴<sup>1a,2,\*</sup>、中津則之<sup>1b</sup>、五十嵐芳暢<sup>1b</sup>、伊東純一<sup>1c</sup>、岸下奈津子<sup>1a</sup>、山田弘<sup>1b</sup>、水口賢司<sup>1c</sup>、石井健<sup>1a,2</sup>
- ・ <sup>1</sup>医薬基盤研究所、<sup>a</sup>アジュバント開発プロジェクト、<sup>b</sup>トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト、<sup>c</sup>バイオインフォマティクスプロジェクト
- ・ <sup>2</sup>大阪大学免疫学フロンティア研究センター、ワクチン学
- ・ \*現所属: BIKEN 次世代ワクチン協働研究所 / BIKEN 次世代ワクチン開発研究センター
- ・ Taiki Aoshi<sup>1,2,\*</sup>, Noriyuki Nakatsu<sup>1</sup>, Yoshinobu Igarashi<sup>1</sup>, Junichi Ito<sup>1</sup>, Natsuko Kishishita<sup>1</sup>, Hiroshi Yamada<sup>1</sup>, Kenji Mizuguchi<sup>1</sup>, and Ken J Ishii<sup>1,2</sup>
- ・ <sup>1</sup>National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), Osaka, Japan
- ・ <sup>2</sup>Immunology Frontier Research Center (iFReC), Osaka University, Japan
- ・ \*Current address: BIKEN Innovative Vaccine Research Alliance Laboratories / BIKEN center for innovative vaccine research and development

Emulsion and Aluminum based adjuvants such as MF59, AS03, and AS04 has been used for vaccines against infectious diseases. Many other adjuvants derived from innate immune receptor agonistic ligands are under clinical trials. Adjuvants have been categorized as additives for vaccine formulation, however, recent understanding of the mechanisms of adjuvants demonstrates that adjuvant is an important active component of vaccine, and has to be evaluated fully in detail for their mode of action. Because broad range of chemicals and substances showed adjuvant activities, currently there is no standardized way to characterize and evaluate the host biological response upon adjuvant administration.

Recently, we started the adjuvant database project. In mouse and rat, each adjuvant was administered via different routes (such as i.p., i.d., i.m.), and 6 and 24 hours after administration, major organs' mRNA (such as liver and spleen) were analysed GeneChip (Affimetrix). We also established our standard operating procedure (SOP) for the sample preparation and data acquisitions.

Currently about 20 common adjuvants were administered in animals and being in process as the core reference adjuvants. Our data suggest that this adjuvant database can provide useful information to understand the mechanism of a new adjuvant, and to predict the host responses to the adjuvants and the adjuvanted vaccines, which are also useful for preclinical evaluation of many adjuvants.

This work is supported by Health and Labour Sciences Research Grants, JAPAN.

「アジュバント安全性評価データベースの構築研究会」厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）代表：石井健」



・【P-26】BIKEN 次世代ワクチン開発センター/BIKEN 次世代ワクチン協働研究所における取り組み

- ・ ○青枝大貴、江副浩和、長谷田泰成
- ・ BIKEN 次世代ワクチン開発センター/BIKEN 次世代ワクチン協働研究所

ワクチンは免疫のしくみを介して生体に作用することで感染症を予防でき、これまでの天然痘やポリオの克服に代表されるように最も成功した医療技術の一つである。近年の免疫学のめざましい発展によって、ワクチンの作用メカニズムを分子や細胞の言葉によって説明することが可能になりつつあるが、未だに不明なことも多い。さらに最近では感染症の枠組みをこえて、アレルギー、自己免疫疾患、がん、生活習慣病に対しても「ワクチン」によるアプローチが期待されるようになっている。

次世代のワクチンは a) 高い安全性、b) 確実な有効性、c) 接種や投与の簡便性、の 3 つの要件を満たすことが必要であり、この 3 つの要件を満たした次世代ワクチンを開発するためには、科学的な知見に基づいた 1) 優れたワクチン抗原 T 細胞エピトープ、2) 標的となる抗原提示細胞、3) 標的疾患に対して適切なアジュバント、の探索・同定が必須である。BIKEN 次世代ワクチン協働研究所(青枝グループ:仮称)では、感染症やがんモデルにおける、T 細胞エピトープの探索、抗原提示における免疫細胞間相互作用の理解、A/D 型 CpG 核酸アジュバントの開発・改良、の 3 つのテーマについて研究を進め、ワクチンと生体免疫システム間の相互作用の深い理解に基づいた「次世代ワクチン」の開発に貢献したい。

第8回 次世代アジュバント研究会プログラム・講演要旨集

The 8h Meeting of Japanese Vaccine Adjuvant Research Consortium

(January 20, 2015, Senri Life Science Center, Suita, Osaka) Programme and Abstracts

Copyright © 2015 All rights reserved (不許無断転載)

出版：2015年1月20日

発行：独立行政法人医薬基盤研究所内 第8回 次世代アジュバント研究会事務局