

第12回次世代アジュバント研究会

12th Meeting of the Japanese Vaccine Adjuvant Research Consortium

2019年1月22日(火)/ January 22, 2019

千里ライフサイエンスセンター / Senri Life Science Center, Osaka, Japan

主催：国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

次世代アジュバント研究会

AMED 創薬基盤推進研究事業「革新的技術に裏打ちされた有効かつ安全な次世代アジュバント開発」研究班 (研究代表者 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 理事長 米田 悦啓)

協賛：国立研究開発法人日本医療研究開発機構

<Organizer>

- ◆National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)
- ◆Japanese Vaccine Adjuvant Research Consortium
- ◆Research Committee "Development of the next-generation adjuvants with innovative evaluation systems for safety and efficacy" supported by Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) Grant

<Supporting organization>

- ◆Japan Agency for Medical Research and Development



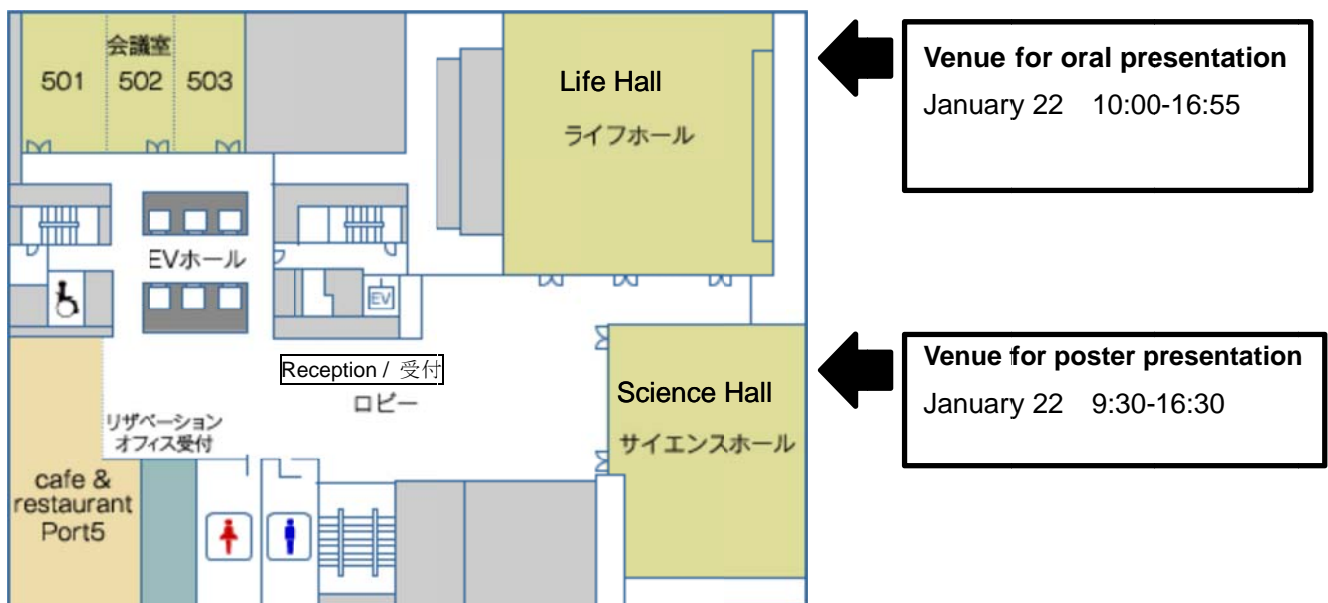
Contents / 目次

Program / プログラム..... P2 ~ P6

Abstracts for oral presentation / 講演要旨..... O-01 ~ O-10

Abstracts for poster presentation / ポスター発表要旨..... P-01 ~ P-21

Venue / 会場



Notice / 注意

- (1) Smoking is allowed only in the designated room on the 6th floor.
喫煙される方は、6階の喫煙場所をお願いします。館内のそれ以外の場所での喫煙は禁じられています。
- (2) Please turned off your cell phone or put them on vibrate during the presentations.
講演中は、携帯電話は電源を切るかマナーモードにしてください。

Program for oral presentation / 講演プログラム

■ Registration (9:30)

1. Meeting of the Japanese Vaccine Adjuvant Research Consortium (10:00 ~ 16:55)

◆Opening remarks (10:00~10:05)

Koichi Yamanishi / The research foundation for microbial disease of Osaka University

◆Part 1 (10:05 ~ 11:05)

< session chair > Jun Kunisawa / NIBIOHN

Etsushi Kuroda / NIBIOHN

【O-01】 10:05~10:35

「Sensing of herpes simplex virus by the host immunity and immune evasion by the virus」

Yasushi Kawaguchi / The University of Tokyo

【O-02】 10:35~11:05

「The application of glycolipid-mediated NKT cell activation for a pneumococcal vaccine」

YUKI KINJO / The Jikei University School of Medicine and National Institute of Infectious Diseases

◆Part 2 (11:05 ~ 11:55)

< session chair > Ken J. Ishii / The University of Tokyo

Norifumi Iijima / NIBIOHN

【O-03】 11:05~11:35

「Harnessing the intrinsic adjuvant properties of aldehydic adducts」

Quentin Sattentau / University of Oxford

11:35~11:55

Ken J. Ishii / The University of Tokyo

Jun Kunisawa / NIBIOHN

2. Lunch Break(11:55 ~ 12:50)

3. Poster session (12:50 ~ 13:50)

◆Please feel free to come to Science Hall. Poster presenters will stand by their poster and be prepared to answer questions from attendees.

◆Part 3 (13:50 ~ 14:50)

< session chair > Yasuhiro Yasutomi / NIBIOHN

Satoshi Uematsu / Osaka City University Graduate School of Medicine

【O-04】 13:50~14:20

「The novel strategies for developing biologics based on the immunogenicity in human」

Teruhito YASUI / NIBIOHN

【O-05】 14:20~14:50

「Severe mechanisms of virus infection from the aspect of host nuclear system」

Yumiko Imai / NIBIOHN

◆Part 4 (14:50 ~ 15:20)

< session chair > Ken J. Ishii / The University of Tokyo

Takato Kusakabe / NIBIOHN

【O-06】 14:50~15:00

「Near-Infrared Laser Adjuvant for Influenza Vaccine」

Yoshifumi Kimizuka / National Defense Medical College

【O-07】 15:00~15:10

「Co-administration of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin in seasonal influenza vaccine showed the antigen-dose sparing effect: A phase 1 clinical study」

Akane Watanabe / Osaka University

【O-08】 15:10~15:20

「Studies on native type BCG-CWS: Immunoreactivity of B-OMS (JBL-107) as a novel adjuvant for immunotherapy」

Kazuhiro Matsuo / Japan BCG Laboratory

4. Poster session & Coffee break (15:20 ~ 15:50)

◆Please feel free to come to Science Hall. Poster presenters will stand by their poster and be prepared to answer questions from attendees.

◆Please help yourself to some coffee at the lobby.

◆Part 5 (15:50 ~ 16:50)

< session chair > Yumiko Imai / NIBIOHN

Teruhito YASUI / NIBIOHN

【O-09】 15:50~16:20

「Amphiregulin-producing pathogenic memory T helper-2 cells drive airway fibrosis via activation of eosinophils」

Kiyoshi Hirahara / Chiba University

【O-10】 16:20~16:50

「Development of adjuvant: Approach to improve the efficacy of intranasal influenza Vaccine」

Kiyoshi Takatsu / Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

◆ Closing remarks (16:50~16:55)

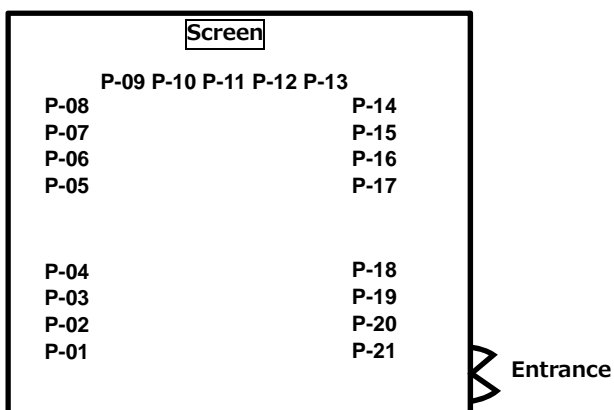
Jun Kunisawa / National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)

Program for poster presentation / ポスター発表プログラム

【 January 22, 2019 (9:30 ~ 16:30)】

■ **Poster session** : Poster presenters will stand by their poster and be prepared to answer questions from attendees from 12:50 to 13:50.

<Poster Layout > Science Hall



【P-01】

Studies on native type BCG-CWS: B-OMS (JBL-107) 1.Preparation of B-OMS
Akihiro Nakaya / Japan BCG Laboratory

【P-02】

Studies on native type BCG-CWS: B-OMS (JBL-107) 2. Formulation of B-OMS
Yasushi Chuma / Japan BCG Laboratory

【P-03】

Studies on native type BCG-CWS: B-OMS (JBL-107) 3. Physicochemical property / structure of B-OMS
Yukihiro Shibuya / Japan BCG Laboratory

【P-04】

Studies on native type BCG-CWS: B-OMS (JBL-107) 4. Immunoreactivity of B-OMS as a novel adjuvant for immunotherapy
Kazuhiro Matsuo / Japan BCG Laboratory

【P-05】

Protein modification using oligosaccharides functioning as adjuvants
Noriyuki Yuasa / Tokyo chemical industry co. Ltd.

【P-06】

Co-administration of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin in seasonal influenza vaccine showed the antigen-dose sparing effect: A phase 1 clinical study.
Akane Watanabe / Osaka University

【P-07】

Near-Infrared Laser Adjuvant for Influenza Vaccine

Yoshifumi Kimizuka / National Defense Medical College

【P-08】

Chemically synthesized Alcaligenes lipid A augments nasal vaccine effects to prevent pneumococcal infection

Ken Yoshii / National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)

【P-09】

Enhancement of nasal immune responses by mucociliary dysfunction to cholera toxin-based nasal vaccine

Huangwenxian Lan / National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)

【P-10】

Potency of polymyxin B as mucosal adjuvant against inactivated influenza virion

Takashi Odagiri / Iwate Medical University

【P-11】

ZBP1 governs neutrophil-mediated inflammation in influenza virus infection via IL-1 α

Masatoshi Momota / National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)

【P-12】

Application of D35 adjuvant containing lipid nanoparticles to tumor treatment

Yoshihiko Tanimoto / Osaka University

【P-13】

The combination of DAMP-inducing and PAMP adjuvants parallelly induces type-2 and type-1 immune responses

Tomoya Hayashi / National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)

【P-14】

Vaccine-induced IgG1 blocks effector function of IgG2 in influenza vaccine

Meito Shibuya / Osaka University

【P-15】

Intrinsic MyD88 signalling in B cells controls IFN γ -mediated early IgG2c class switching in response to a particulate adjuvant

Michelle Sue Jann Lee / Osaka University

【P-16】

Molecular interaction between IL-1 alpha and genomic DNA released under the cell death by Alum

Kou Hioki / National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)

【P-17】

Adjuvant activity of combination protamine, a cationic nuclear protein, and nucleic acid adjuvants

Saori Hodokami / National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)

【P-18】

Priming immunization with whole-virion influenza vaccines is essential for induction of ADCC activities of virus-specific antibodies

Kayoko Sato / National Institute of Infectious Diseases

【P-19】

Evaluation of effectiveness and safety of CpG-ODN G9.1 as mucosal adjuvant for nasal influenza vaccines

Koichiro Tateishi / National Institute of infectious Diseases

【P-20】

Comprehensive analysis for the immunogenicity in human to explore vaccine targets

Takeharu Minamitani / National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)

【P-21】

Characteristics of human Tetanus Neurotoxin antibody

Karin Kiyose / National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)

Abstract of oral presentation / 講演要旨 【O-01】

Sensing of herpes simplex virus by the host immunity and immune evasion by the virus / 宿主免疫による単純ヘルペスウイルスの認識機構とウイルスによる免疫回避機構

Yasushi Kawaguchi / 川口 寧

Division of Molecular Virology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo /

東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 ウイルス病態制御分野

Abstract

単純ヘルペスウイルス (HSV: herpes simplex virus) は、ヒトに、脳炎、口唇ヘルペス、眼疾患、皮膚疾患、性器ヘルペス、新生児ヘルペス等、多様な疾患を引き起こす。HSV 感染症に対しては、抗ウイルス剤が開発されているが、脳炎や性器ヘルペスに対してはその効果は限定的であり、ワクチンも未だ開発されていない。その研究の歴史は古く、1920 年頃から精力的に研究され、数あるウイルスの中で最も研究が進展しているウイルスの 1 つである。HSV 感染症の大きな特徴は、潜伏感染と回帰発症を繰り返し、宿主に終生存続することにある。年複数回の回帰発症が長年続くということは、HSV が高度な免疫回避機構を獲得していることが示唆されるが、生体レベルで HSV の免疫回避機構を実証した研究はほとんど無い。HSV の免疫回避機構の解析は、HSV にとって真に都合の悪い宿主免疫応答の同定に繋がり、未だ開発されていない HSV ワクチン開発戦略へ有用な情報を提供すると考えられる。本講演では、HSV の宿主免疫回避機構を中心に、宿主免疫による HSV の認識機構を交え、我々の最新の知見を紹介する。

Abstract of oral presentation / 講演要旨 【O-02】

The application of glycolipid-mediated NKT cell activation for a pneumococcal vaccine / 糖脂質による NKT 細胞活性化の肺炎球菌ワクチンへの応用

YUKI KINJO / 金城 雄樹

Department of Bacteriology, The Jikei University School of Medicine / 東京慈恵会医科大学細菌学講座

Jikei Center for Biofilm Science and Technology, The Jikei University School of Medicine / 東京慈恵会医科大学バイオフィーム研究センター

Department of Chemotherapy and Mycoses, National Institute of Infectious Diseases / 国立感染症研究所真菌部

Abstract

肺炎は主な死因の一つであり、その原因菌として最も多いのが肺炎球菌である。肺炎球菌は成人及び小児にて肺炎のみならず、髄膜炎や菌血症などの侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) を引き起こす。肺炎球菌の莢膜多糖に対する抗体が感染防御に重要であることから、現在、成人では 23 価多糖体ワクチン、小児では 13 価多糖体の結合型ワクチン (PCV) を定期接種に用いている。小児にて PCV 導入後、ワクチン血清型による IPD の劇的な減少を認めた。しかし、肺炎球菌は約 100 種類の血清型が存在し、近年 PCV に含まれない非ワクチン血清型による IPD が増加していることから、新規ワクチンの開発が求められている。

私達は血清型を超えた肺炎球菌感染防御効果をもたらす新規ワクチンの開発をめざし、全ての血清型の肺炎球菌に存在する表層蛋白をワクチン抗原として用いた。また、アジュバント効果を期待して、リンパ球の natural killer T (NKT) 細胞を活性化する糖脂質を用いた。肺炎球菌蛋白・糖脂質経鼻ワクチン接種マウスでは、蛋白抗原特異的 IgG 抗体の産生が誘導され、肺炎球菌感染に対する防御効果をもたらした。また、非ワクチン血清型の肺炎球菌感染及びインフルエンザ続発性肺炎球菌感染に対しても防御効果を認めると共に、本ワクチンによる肺炎球菌感染防御効果が長期間持続することを明らかにした。本発表では、新規肺炎球菌ワクチンとして有望な蛋白ワクチンに対する糖脂質のアジュバント作用について紹介したい。

Harnessing the intrinsic adjuvant properties of aldehydic adducts

Quentin Sattentau

University of Oxford

Abstract

Proteins undergo a multitude of post-translational modifications, amongst which oxidative modification by reactive and non-reactive adducts is common. Many of these adducts are associated with immune-mediated disease, including inflammatory, degenerative and allergic conditions resulting from their immune modulating activity. However, specific adducts may also be harnessed to enhance protein immunogenicity, potentially serving as adjuvants for vaccine use. We have studied a specific group of aldehydic adducts, and have demonstrated that they impart intrinsic adjuvanticity to otherwise weakly or non-immunogenic proteins. Of particular interest are adducts produced by treatment with glycolaldehyde and malondialdehyde, that trigger robust T and B cell responses to the adducted antigens in the absence of extrinsic adjuvants. Mass spectrometry reveals that aldehydic groups are adducted to specific amino acid side chains, particularly those of lysine. Immunization of mice with aldehyde-adducted proteins drives an enhanced helper T helper type-2 (Th2) response associated with altered T cell epitope immunodominance. Analysis of the effects of aldehyde-modified proteins on dendritic cell uptake reveals minimal enhancement, and no evidence for canonical pro-inflammatory dendritic cell maturation. Moreover, direct presentation of aldehyde-adducted peptides to T cells results in enhanced T cell activation. We therefore propose that the mechanism of enhancement of adaptive immunity by aldehydic adducts is likely to result from enhanced antigen presentation, potentially via stabilization of the peptide-MHC-TCR interaction. Taken together these results suggest that targeted aldehydic adducts on protein or peptide vaccine antigens may serve as intrinsic adjuvants, bypassing the requirement for exogenous adjuvants and their associated inflammatory risks

Abstract of oral presentation / 講演要旨 【O-04】

The novel strategies for developing biologics based on the immunogenicity in human / ヒト免疫原性を基盤としたバイオリジクス開発戦略

Teruhito YASUI, PhD / 安居 輝人

Laboratory of Infectious Diseases and Immunity

Laboratory of Immunobiologics Evaluation

Center for Vaccine & Adjuvant Research (CVAR)

The National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN) /

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 感染症制御プロジェクト/ワクチン・アジュバント研究センター免疫バイオリジクスプロジェクト

Abstract

ワクチンや抗体に代表される生物製剤（バイオリジクス）において、その医薬品効果の「方向性」と「強度」はアジュバントに制御され、「特異性」はヒト免疫原性に支配されていることが知られている。本来抗体医薬品は、ヒトにおける免疫原性を有さない（免疫学的不活化）を前提とし、一方、ワクチン製剤は、アジュバントによる免疫応答の強度増強、ワクチンコンポーネントによる免疫原性の特異性発揮（免疫学的活性化）をもって、製剤として成立する。しかしながら、バイオリジクスの最適化において、免疫原性の適切な制御が開発諸問題の一つとして挙げられる。その両製剤開発段階において、実験動物による試験評価が必須であるが、ヒト-実験動物間における免疫原性多様性の差異は、バイオリジクス開発の障害になり得る。そこで、ヒト免疫原性を考慮したバイオリジクス開発戦略は、それら開発の迅速化、適正化に重要な鍵となると考えられる。今回は、両製剤シーズ探索において「感染症」に焦点を当て、1) ワクチンコンポーネント探索、2) 治療抗体シーズ探索を可能にする2つのコア技術を紹介する。本探索技術は、探索リソースにヒト検体を用い、免疫原性試験といった免疫学的手法と、網羅的探索を行うための分子生物学的手法を融合した結果、ヒト免疫応答に即した創薬シーズのレパートリー集積と選択を可能にした。さらにヒト免疫応答成立機構について、抗原特異的反応性の多様性形成過程を網羅的に解析できることより、将来的なヒト免疫原性予測の可能性についても言及したい。

Abstract of oral presentation / 講演要旨 【O-05】

Severe mechanisms of virus infection from the aspect of host nuclear system /
宿主核内システムから見たウイルス感染症の重症化機構

Yumiko Imai / 今井 由美子

Laboratory of the Regulation for Intractable Infectious Diseases, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 感染症制御ワクチンプロジェクト

Abstract

ウイルスは宿主因子を利用・略奪して増殖します。インフルエンザウイルスはRNA ウィルスですが、宿主の核内でウイルスゲノムの転写・複製を行うので、宿主の核内システムはインフルエンザウイルスの増殖やウイルス感染症の病態形成に重要な役割を担っていると考えられます。私たちは、核内のRNA輸送やエピゲノム応答に焦点を当てた研究を行っています。今回私共の最近の研究をご紹介します、これらを基にした創薬の可能性について言及させていただきたいと思います。

Near-Infrared Laser Adjuvant for Influenza Vaccine /

インフルエンザワクチンにおける近赤外光レーザーアジュバント

Yoshifumi Kimizuka¹, Satoshi Kashiwagi²

君塚善文¹、柏木哲²

1) National Defense Medical College, Division of Infectious Diseases and Respiratory Medicine

2) Massachusetts General Hospital, Gordon Center for Medical Imaging

1) 防衛医科大学校 内科学講座(感染症・呼吸器)

2) ハーバード医科大学マサチューセッツ総合病院、ゴードン医用画像センター

要旨 (Abstract)

【背景】発表者らは、光という物理的エネルギーをアジュバントとして利用することに着目し、これまでワクチン接種部位の短時間で安全な近赤外光照射がワクチン増強効果を持つことを明らかにしてきた。今回、この作用機序の解明のため、インフルエンザマウスモデルを用いて検討した。

【方法・結果】光源として連続波 1064nm ダイオード励起固体レーザー(Nd:YO₄)を用いた。C57BL/6 を背景とする複数種の遺伝子改変マウスを用い、皮膚所属リンパ節への樹状細胞遊走、インフルエンザ全粒子ワクチン接種後の抗インフルエンザ抗体価およびインフルエンザ感染後生存率を比較したところ、近赤外光照射によるアジュバント効果には皮内樹状細胞サブセットの中で Lang⁻CD11b⁻ migDC, Lang⁺ migDC, monocyte-derived CCR2⁺ DC が関与することを明らかにした。また、近赤外光照射によりマウス皮内に CCL20 や CCL2 など特定のケモカイン発現が起き、樹状細胞の活性化に関与することが示唆された。更に、骨髄誘導マスト細胞への近赤外光照射で活性酸素種が産生されること、野生型マウスへの抗酸化物質の投与やマスト細胞欠損マウス(*Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}*)で近赤外光のアジュバント効果が減弱すること、*Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}* の皮内にマスト細胞を移植し再構成することでアジュバント効果が復活することから、皮内マスト細胞が活性酸素種の産生を介して下流のアジュバント効果に寄与していることを明らかにした。

【結論】近赤外光を用いたインフルエンザワクチン増強効果には、マスト細胞内の活性酸素種の産生を介して皮内ケモカインの発現を活性化し、特定の遊走性樹状細胞集団の所属リンパ節への遊走を促進する機序が示唆された。

Co-administration of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin in seasonal influenza vaccine showed the antigen-dose sparing effect: A phase 1 clinical study.

Akane Watanabe¹, Sumiyuki Nishida¹, Takato Kusakabe², Masatoshi Momota², Etsushi Kuroda², Ken Ishii², Atsushi Kumanogoh¹

1) Department of Respiratory Medicine and Clinical Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University. 2) Laboratory of Adjuvant Innovation, Center for Vaccine and Adjuvant Research, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition.

Background: Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β CyD) functions as an immune adjuvant. When HP- β CyD is co-administered with the seasonal influenza vaccine, it is expected to enhance the vaccine-induced immune response without an allergic reaction and to reduce an antigen in a single dose. To investigate the feasibility of a seasonal influenza vaccine formulated with HP- β CyD (FluCyD-vac) and its advantage in immunogenicity compared to a standard seasonal influenza vaccine (Flu-vac), we conducted a phase 1 clinical study. **Methods:** We designed a single-blinded, randomized study. Healthy volunteers aged 20 to 64 years were assigned at a ratio of 2:1 to FluCyD-vac or Flu-vac. The primary end points included safety and immune responses including hemagglutinin inhibition (HAI) titer. All subjects received a vaccine subcutaneously one time. Flu-vac was the tetravalent inactivated flu vaccine composed of 15 μ g of HA. FluCyD-vac, which was also the tetravalent inactivated flu vaccine, contained 9 μ g of HA and 20% W/V of HP- β CyD. **Results:** In total, 36 healthy volunteers were enrolled from October to November during the 2017-2018 season (FluCyD-vac, n = 24; Flu-vac, n = 12). The most commonly reported vaccine-related adverse events (AEs) was a mild local skin reaction at a vaccine site (FluCyD-vac, 22/24, 91.7%; Flu-vac, 12/12, 100%, $p = 0.543$). Although some systemic vaccine-related AEs such as headache and fatigue, all of which were limited to G1 and G2, occurred in both treatment groups, no subjects experienced serious AEs. The proportion of each systemic AE was not statistically significant (all systemic AEs: FluCyD-vac, 58.3%; Flu-vac, 66.7%, $p = 0.727$). The immunogenicity of FluCyD-vac was assessed by the geometric mean titer ratio (GMTR) of post-HAI titer to pre-HAI titer. In the FluCyD-vac group, the GMTR of A/H1N1, A/H3N2, B/Victoria, and B/Yamagata were 4.12, 4.24, 2.59, and 2.83, respectively. In the Flu-vac group, these were 4.24, 4.24, 2.38, and 2.12, respectively. **Conclusion:** FluCyD-vac was well tolerated in healthy adults without any serious AEs. FluCyD-vac, despite reducing HA antigens to 60%, showed comparable immunogenicity to that of the standard Flu-vac in all of 4 strains. The use of HP- β CyD as an immune adjuvant in the seasonal influenza vaccine is advantageous for the antigen-dose sparing. Clinical trial information: UMIN000028530

Abstract of oral presentation / 講演要旨 【O-08】

Studies on native type BCG-CWS: Immunoreactivity of B-OMS (JBL-107) as a novel adjuvant for immunotherapy / 天然型 BCG-CWS—B-OMS (JBL-107) の研究：免疫療法を標的とした B-OMS の新規アジュバントとしての免疫活性

Kazuhiro Matsuo¹, Akihiro Nakaya¹, Yukihiro Shibuya¹, Yasushi Chuma¹, Hideyasu Kiyohara¹, Shuichi Kishimoto², Shoji Fukushima² and Makoto Sunagawa¹

松尾和浩¹、中谷彰洋¹、渋谷幸広¹、中馬康志¹、清原秀泰¹、岸本修一²、福島昭二²、砂川 洵¹

¹Japan BCG Laboratory and ²Kobe Gakuin University

¹日本ビーシージー製造㈱、²神戸学院大学

BCG-CWS (*Bacillus Calmette Guerin*-cell wall skeleton) cancer immunotherapy has been studied since 1970's, and several clinical efficacies were reported. It has been known that CWS has three layers membrane composed of mycolic Acid (MA), arabinogalactan (AG), peptidoglycan (PG), and is not dissolved in water nor any organic solvent. Until now, structure and physicochemical property of CWS particle have hardly been reported. SMP-105 type (105-type) CWS, which had high purity, prepared by the reported method showed low water-dispersibility. To improve the dispersibility, we modified its preparation process and obtained a new product named BCG outer membrane skeleton (B-OMS) which has a different surface structure of particle from the conventional CWS. Physicochemical analyses of B-OMS revealed that AG moieties are exposed on the particle surface in aqueous condition despite containing the same chemical component as previously reported CWS. Depending on this character, B-OMS is novel material which shows different property from the 105-type CWS.

In this report, we investigated immunoreactivity of the B-OMS in *in vitro* and *in vivo* studies. Oil in water (o/w) emulsion of B-OMS and corresponding vehicle emulsion were rapidly incorporated into RAW cells in one hour whereas B-OMS API did not show uptake in the same period. Therefore, we tested *In vitro* bioactivity of the B-OMS emulsion and observed enhanced cytokine production both in RAW cells and in some dendritic cell lines. Such difference of *in vitro* activity may be due to the AG exposed on the surface of oil emulsion particle of B-OMS. Toll-like receptor (TLR) reporter assay showed that all of raw material BCG cells, refined BCG cells, B-OMS, its intermediate product and washings did not show any TLR-4-agonist activity and B-OMS and relating compounds reacted with TLR-2. As for *in vivo* activity, B-OMS and 105-type CWS showed similar profile in both interferon- γ production in intraperitoneally inoculated mice and onset of adjuvant arthritis in rat. In a preliminary study, the implantation rate of Meth-A sarcoma in mice was reduced when the cells were inoculated with B-OMS emulsion. In addition, the lyophilized formulation of B-OMS with an ovalbumin (OVA) cytotoxic T cell epitope peptide successfully induced OVA-specific CD8⁺ T cells in intradermally inoculated mice. These data suggest that the B-OMS formulation would be expected as a novel candidate adjuvant for immunotherapy.

Amphiregulin-producing pathogenic memory T helper-2 cells drive airway fibrosis via activation of eosinophils / 好酸球性気道炎症において線維化誘導-病原性ヘルパーT細胞が誘導する組織線維化の形成機構について

Kiyoshi Hirahara / 平原 潔

Department of Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University /
千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学

Abstract

常に外界と接している臓器のひとつである気道は、細菌やウイルスといった外来抗原の暴露をうける危険に恒常的に曝されていることから、気道粘膜における適切な免疫反応は生体防御において重要である。一方で、気道での異常な免疫応答は、気管支喘息など慢性アレルギー性疾患の原因となる。

気管支喘息は、好酸球をはじめとする様々な炎症細胞が気道周囲へ浸潤し、気道壁の肥厚、気管支腺の肥大増生、組織線維化という気道のリモデリングがおこった結果、非可逆的な気道の閉塞や気道過敏性の亢進が誘導される、下気道を中心とした慢性炎症疾患である。しかし、慢性アレルギー性疾患における気道の組織線維化の機序について、その詳細は不明であった。

我々は、組織線維化を起こす「線維化誘導-病原性記憶T細胞」を新たに発見した。「線維化誘導-病原性記憶T細胞」が分泌する生理活性タンパク質のAmphiregulinが、好酸球からのOsteopontin分泌を誘導し、組織の線維化を引き起こす。「線維化誘導-病原性記憶T細胞」から分泌されるAmphiregulinを介した好酸球からのOsteopontin産生は、新たな組織線維化の誘導メカニズムで、難治性アレルギー疾患の有効な治療の標的になることが期待される。

気管支喘息における組織線維化は、患者のQOLの著しい低下の原因となるが、根治的治療法は一切なく革新的な治療の開発が急務である。我々の研究が、この難治性の病態に対する新規治療法開発の一助になれば幸いである。

参考文献: Morimoto, Y., **Hirahara, K.**, Kiuchi, M., Wada, T., Ichikawa, T., Kanno, T., Okano, M., Kokubo, K., Onodera, A., Sakurai, D., Okamoto, Y., Nakayama, T.: Amphiregulin-producing pathogenic memory T helper-2 cells instruct eosinophils to secrete Osteopontin and facilitate airway fibrosis. *Immunity* (2018)

Abstract of oral presentation / 講演要旨 【〇-10】

Development of adjuvant: Approach to improve the efficacy of intranasal influenza Vaccine / 経鼻インフルエンザワクチンのためのアジュバント開発

宮本（山口）朋美¹，柳橋努¹，本田裕恵¹，渡邊康春²，長井良憲^{2,3}，高津聖志^{1,2}

¹ 富山県薬事総合研究開発センター；² 富山大学大学院医学薬学研究部（医学）免疫バイオ・創薬探索研究講座，³ 富山県立大学工学部医薬品工学科

皮下注射型インフルエンザワクチンの投与はインフルエンザ発症や重篤化を予防できるが，感染そのものを防御できないと云われている。経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチン（以下，「経鼻ワクチン」）は，粘膜免疫と分泌型 IgA 交叉抗体の産生を惹起し感染局所でウイルス感染を防御できると考えられ，次世代ワクチンとして期待されている。しかし，経鼻ワクチンのみの投与では効果が十分でなく，有効なワクチン効果を惹起するにはアジュバントないし粘稠剤が必要不可欠である。我々は安全で有効なアジュバントの開発を目的として，ワクチンメーカー及び富山大学と共同で過去 7 年余り研究を推進している。本講演では我々のアプローチと一部の結果を紹介したい。

（1）LPS 刺激マウス B 細胞による IgA 産生を増強する活性を指標に，約 600 種類の化合物を用いて *in vitro* で一次スクリーニングした。21 種類の化合物が IgA 産生を増強した。（2）21 種類の化合物が *in vivo* でアジュバント活性を示すか評価した。BALB/c マウスにインフルエンザウイルス HA 抗原と候補化合物を 2 週間間隔で 2 回経鼻投与し，最終投与 2 週間後の鼻腔洗浄液中の IgA 抗体価を測定した。ワクチン特異的な IgA 抗体の産生を強く誘導する 5 種類の化合物を見出した。（3）5 種類の化合物に関しインフルエンザウイルス感染に対する防御の増強効果を検討した。BALB/c マウスに B 型 HA 抗原と候補化合物を 3 週間隔で 2 回経鼻投与した。最終投与の 2 週間後にワクチン株と同じインフルエンザウイルスを外鼻腔より攻撃接種し，感染 3 日後の鼻腔洗浄液中のウイルス価（TCID₅₀）を比較した。3 種類の化合物に感染防御の増強効果を認めた。（4）マウスの感染実験において高い防御効果を示した化合物について，カニクイザルを用いた感染実験によりアジュバント効果を検証した。化合物をワクチンと併用した経鼻投与群で，3 頭全てにおいてウイルス価が検出値以下であった。いずれの化合物も実験期間中に有害事象は観察されなかった。

試験管内で B 細胞による IgA 産生増強効果を指標に化合物をスクリーニングし，最終的にワクチンとの経鼻投与によりアジュバント活性を示す化合物を選択した。アジュバント候補化合物はワクチンとの経鼻投与により，インフルエンザウイルスを感染局所で防御できることを示した。

本研究会で報告する内容は（一般財団法人） 阪大微生物病研究会及びデンカ生研株式会社との共同研究の成果である。

Studies on native type BCG-CWS: B-OMS (JBL-107)

1. Preparation of B-OMS

天然型 BCG-CWS: B-OMS (JBL-107)の研究

1. B-OMS の調製

Akihiro Nakaya, Yukihiro Shibuya, Yasushi Chuma, Kazuhiro Matuso and Makoto Sunagawa

中谷彰洋、渋谷幸広、中馬康志、松尾和浩、砂川 洵

R & D department, Japan BCG Laboratory

日本ビーシージー製造(株) 研究開発部

BCG-CWS (*Bacillus Calmette Guerin*-Cell Wall Skeleton) cancer immunotherapy has been studied since 1970's, and several clinical efficacies were reported. It has been known that CWS is three layer membrane composed of Mycolic Acid (MA), Arabinogalactan (AG), Peptidoglycan (PG), and is not dissolved in water nor any organic solvent. Until now, structure and physicochemical property of CWS particle have hardly been reported. SMP-105 type (105-type) CWS, which was high purity, prepared by the reported method¹⁾ showed low water-dispersibility. To make progress in development of pharmaceutical product, the improvement of dispersibility is important.

In the native state of CWS in water, hydrophilic AG is exposed on its surface but the surface structure is easily changed depending on the condition because of the unstable very thick membrane. It was considered that the low hydrophilicity of 105-type CWS was due to decrease of AG exposure on the surface of CWS particle and the change of surface structure gradually occurred during the multi-steps in 105-type CWS preparation process. We aimed to obtain native type BCG-CWS exposing AG on its surface, that is B-OMS (BCG-Outer Membrane Skeleton, JBL-107), using *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 as a raw material just like SMP-105.

As a result, the preparation process of B-OMS was established by disruption of the purified BCG cell body obtained by wash to remove the extracellular attached components. The disrupted particle was easily processed to pure native type CWS (B-OMS) by short-steps. As expected, B-OMS showed high water dispersibility and stronger *in vitro* activity than 105-type CWS in both RAW and BC-1 cells.

These results suggest that AG exposure on the surface of particle not only enhance the hydrophilicity, but also the *in vitro* activities of B-OMS.

1) Uenishi *et al.*, **Chem. Pharm. Bull.**, 55(6), 843-852 (2007).

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-02】

Studies on native type BCG-CWS: B-OMS (JBL-107)

2. Formulation of B-OMS

天然型 BCG-CWS: B-OMS (JBL-107)の研究

2. B-OMS の製剤

Yasushi Chuma, Yukihiro Shibuya, Akihiro Nakaya, Kazuhiro Matsuo and Makoto Sunagawa

中馬康志、渋谷幸広、中谷彰洋、松尾和浩、砂川 洵

R & D Department, Japan BCG Laboratory

日本ビーシージー製造(株) 研究開発部

As for the BCG-CWS formulation, oil-in-water (o/w) emulsion was reported¹⁾. Although B-OMS, which was excellent in dispersibility in water, was possible to prepare various types of formulations such as aqueous suspension, we selected o/w emulsion formulation and its lyophilized formulation in consideration of the reported clinical efficacy.

First, by the same preparation method as reported SMP-105 formulation²⁾, B-OMS emulsion was obtained easily and had higher stability. To obtain safer and more stable formulation of B-OMS, a lot of prescription were examined. As the results, squalene, polysorbate 80, citrate buffer, dibutylhydroxytoluene (BHT) and mannitol were selected as additives. It was also found that in the case of B-OMS emulsion, the amount of oil, which might be related to the efficacy and safety, was able to be reduced.

The obtained o/w emulsion composed of those additives was extremely stable. Amazingly, it was able to be stored at room temperature for several days. This phenomenon, which was similar to the fact that B-OMS aqueous suspension was stabilized by the AG exposure on the surface of B-OMS particle itself, suggested the exposure of AG on the surface of oil particle in the o/w emulsion.

In vitro bioactivity of BCG-CWS o/w emulsion has not been reported until now. The bioactivity of the B-OMS emulsion was examined *in vitro* using RAW cells and TNF- α induction activity was found. In the simple bilayer system of water and oil such as *in vitro* examination of oil paste containing B-OMS and oil, surfactant in using RAW cells, TNF- α induction activity was also found. These results strongly suggest the exposure of AG on the surface of oil particle in B-OMS emulsion.

1) Yoo YC *et al.*, **Arch. Pharm. Res.**, 25(4), 522-527(2002).

2) Murata, **Cancer Sci.**, 99(7), 1435-1440(2008)

Studies on native type BCG-CWS: B-OMS (JBL-107)

3. Physicochemical property / structure of B-OMS

天然型 BCG-CWS: B-OMS (JBL-107)の研究

3. B-OMS の物理化学的特性／構造

Yukihiro Shibuya, Yasushi Chuma, Akihiro Nakaya, Kazuhiro Matsuo and Makoto Sunagawa

渋谷幸広、中馬康志、中谷彰洋、松尾和浩、砂川 洵

R & D Department, Japan BCG Laboratory

日本ビーシージー製造(株) 研究開発部

Studies on Active Pharmaceutical Ingredients (API) and formulation (o/w emulsion) of B-OMS suggested that AG was exposed on the particle surface. However, both are qualitative evaluations, and establishment of quantitative evaluation methods are desired. In addition, the different structure of B-OMS and 105-type CWS is needed to be clarified.

The AG exposed structure of B-OMS API and o/w emulsion were confirmed by high binding affinities with lectin (Concanavalin A) and anti-BCG antibody. The exposing degree of AG was evaluated by measuring of zeta potential related to surface charge of particle. When B-OMS was treated in water with heating and/or addition of surfactant, it was changed to low water dispersible CWS, that was 105-type CWS, and it was also found that the change was irreversible. It was known that two MA moieties in BCG-CWS were associated in water to form laminate structure¹⁾, but its strength has not been reported. It was confirmed that there existed of two types of association, reversible weak association and irreversible strong association (aggregation), by using Auramine O staining. B-OMS was decolorized but 105-type CWS was not done. As for the oil particle structure in o/w emulsion, AG was exposed on the surface of oil particle due to the surfactant-like activity of hydrophobic MA and hydrophilic AG moieties.

In summary, B-OMS is a native type BCG-CWS possessing the structure in which AG is exposed on the particle surface of both API and o/w emulsion.

1) Uenishi *et al.*, *J. Microbiol. Methods*, 77(2), 139-144 (2009).

Studies on native type BCG-CWS: B-OMS (JBL-107)

4. Immunoreactivity of B-OMS as a novel adjuvant for immunotherapy

天然型 BCG-CWS: B-OMS (JBL-107)の研究

4. 免疫療法を標的とした、B-OMS の新規アジュバントとしての免疫活性

**Kazuhiro Matsuo¹, Akihiro Nakaya¹, Yukihiro Shibuya¹, Yasushi Chuma¹, Hideyasu Kiyohara¹,
Shuichi Kishimoto², Shoji Fukushima² and Makoto Sunagawa¹**

松尾和浩¹、中谷彰洋¹、渋谷幸広¹、中馬康志¹、清原秀泰¹、岸本修一²、福島昭二²、砂川 洵¹

¹R&D Department, Japan BCG Laboratory and ²Kobe Gakuin University

¹日本ビーシージー製造(株) 研究開発部、²神戸学院大学

B-OMS/JBL-107 has a different surface structure of particle from conventionally called CWS, on which AG are exposed on the particle surface in aqueous condition despite containing the same chemical component as previously reported CWS. Depending on this character, B-OMS is novel material which shows completely different physicochemical property from the 105-type CWS.

In this report, we investigated immunoreactivity of the B-OMS in *in vitro* and *in vivo* studies. O/W emulsion of B-OMS and corresponding vehicle emulsion were rapidly incorporated into RAW cells in one hour whereas B-OMS API did not show uptake in the same period. *In vitro* bioactivity of BCG-CWS o/w emulsion has not been reported until now. The bioactivity of the B-OMS emulsion was examined *in vitro* using RAW cells. TNF- α induction activity was found. Similar enhancement of interleukin-12 production was observed in some dendritic cell lines. Such difference of *in vitro* activity may be due to the AG exposed on the surface of oil emulsion particle of B-OMS. Toll-like receptor (TLR) reporter assay showed that all of raw material BCG cells, refined BCG cells, B-OMS, its intermediate product and washings did not show any TLR-4-agonist activity and B-OMS and relating compounds reacted with TLR-2. As for *in vivo* activity, B-OMS and 105-type CWS showed similar profile in both interferon- γ production in intraperitoneally inoculated mice and onset of adjuvant arthritis in rat. In a preliminary study, the implantation rate of Meth-A sarcoma in mice was reduced when the cells were inoculated with B-OMS emulsion. In addition, the lyophilized formulation of B-OMS with an ovalbumin (OVA) peptide recognized with cytotoxic T cell successfully induced OVA-specific CD8⁺ T cells in intradermally inoculated C57BL/6 mouse. These data suggest that the B-OMS formulation would be expected as a novel candidate adjuvant for immunotherapy.

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-05】

Protein modification using oligosaccharides functioning as adjuvants

アジュバント作用を持つ糖鎖を用いたタンパク質分子の修飾

Noriyuki Yuasa, Kento Kawamura, Yuji Matsuzaki

湯浅徳行, 川村健人, 松崎祐二

Tokyo chemical industry co. Ltd., Department of Glycotechnology

東京化成工業株式会社 糖鎖技術部

要旨

東京化成工業は、有機合成試薬を中心として、近年は糖鎖合成試薬にも注力している。しばしば、その不均一性や異種抗原 (α Gal や Neu5Gc) の付加が問題となる抗体医薬品に対して、弊社合成糖鎖試薬と糖転移酵素を用いた試みとして、不均一な糖鎖構造を持つ抗体医薬分子に単一構造の糖鎖を転移することに成功している (図1)。このような、細胞培養技術による生産では達成することが難しい単一構造の糖鎖を持った抗体分子は、糖鎖が重要な役割を果たす ADCC 活性や CDC 活性の詳細な解析に活用が期待されている。

今回我々は、自然抗体を持つため、Uri Galili らによりワクチンアジュバントとしての応用が検討されている α Gal ($\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}$, 図2) エピトープと自己抗体上に付加されると抗炎症効果を示すこと知られている $\alpha 2,6$ シアル酸 ($\text{Neu5Ac}\alpha 2-6\text{Gal}$) 構造を、ヒト血清アルブミン (HSA) をモデルタンパク質として有機化学的および酵素化学的手法を用いた作成を試みたので報告する。本法は結合数の制御や自然界に存在しない糖鎖ミミックの結合も可能であり、合成糖鎖を組み合わせることで様々な均一糖鎖・タンパク質複合体を作成可能となると期待される。

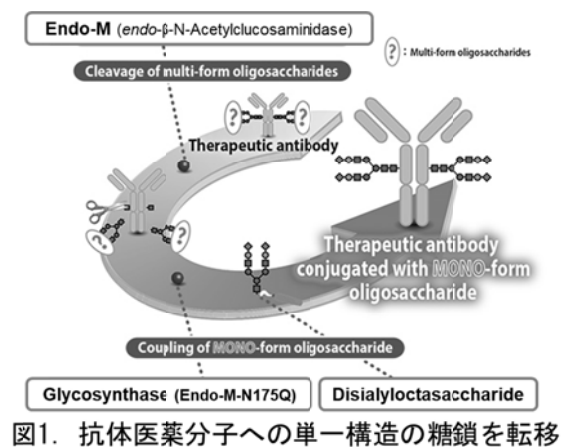


図1. 抗体医薬分子への単一構造の糖鎖を転移

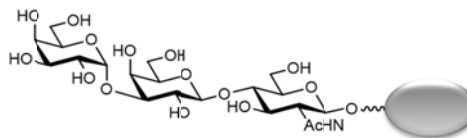


図2. α Gal エピトープ [$\text{Gal}\beta(1-3)\text{Gal}\beta(1-4)\text{GlcNAc}$]

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-06】

Co-administration of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin in seasonal influenza vaccine showed the antigen-dose sparing effect: A phase 1 clinical study.

Akane Watanabe¹, Sumiyuki Nishida¹, Takato Kusakabe², Masatoshi Momota², Etsushi Kuroda², Ken Ishii², Atsushi Kumanogoh¹

1) Department of Respiratory Medicine and Clinical Immunology, Graduate School of Medicine, Osaka University. 2) Laboratory of Adjuvant Innovation, Center for Vaccine and Adjuvant Research, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition.

Background: Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β CyD) functions as an immune adjuvant. When HP- β CyD is co-administered with the seasonal influenza vaccine, it is expected to enhance the vaccine-induced immune response without an allergic reaction and to reduce an antigen in a single dose. To investigate the feasibility of a seasonal influenza vaccine formulated with HP- β CyD (FluCyD-vac) and its advantage in immunogenicity compared to a standard seasonal influenza vaccine (Flu-vac), we conducted a phase 1 clinical study. **Methods:** We designed a single-blinded, randomized study. Healthy volunteers aged 20 to 64 years were assigned at a ratio of 2:1 to FluCyD-vac or Flu-vac. The primary end points included safety and immune responses including hemagglutinin inhibition (HAI) titer. All subjects received a vaccine subcutaneously one time. Flu-vac was the tetravalent inactivated flu vaccine composed of 15 μ g of HA. FluCyD-vac, which was also the tetravalent inactivated flu vaccine, contained 9 μ g of HA and 20% W/V of HP- β CyD. **Results:** In total, 36 healthy volunteers were enrolled from October to November during the 2017-2018 season (FluCyD-vac, n = 24; Flu-vac, n = 12). The most commonly reported vaccine-related adverse events (AEs) was a mild local skin reaction at a vaccine site (FluCyD-vac, 22/24, 91.7%; Flu-vac, 12/12, 100%, $p=0.543$). Although some systemic vaccine-related AEs such as headache and fatigue, all of which were limited to G1 and G2, occurred in both treatment groups, no subjects experienced serious AEs. The proportion of each systemic AE was not statistically significant (all systemic AEs: FluCyD-vac, 58.3%; Flu-vac, 66.7%, $p=0.727$). The immunogenicity of FluCyD-vac was assessed by the geometric mean titer ratio (GMTR) of post-HAI titer to pre-HAI titer. In the FluCyD-vac group, the GMTR of A/H1N1, A/H3N2, B/Victoria, and B/Yamagata were 4.12, 4.24, 2.59, and 2.83, respectively. In the Flu-vac group, these were 4.24, 4.24, 2.38, and 2.12, respectively. **Conclusion:** FluCyD-vac was well tolerated in healthy adults without any serious AEs. FluCyD-vac, despite reducing HA antigens to 60%, showed comparable immunogenicity to that of the standard Flu-vac in all of 4 strains. The use of HP- β CyD as an immune adjuvant in the seasonal influenza vaccine is advantageous for the antigen-dose sparing. Clinical trial information: UMIN000028530

Near-Infrared Laser Adjuvant for Influenza Vaccine

インフルエンザワクチンにおける近赤外光レーザーアジュバント

Yoshifumi Kimizuka¹, Satoshi Kashiwagi²

君塚善文¹、柏木哲²

1) National Defense Medical College, Division of Infectious Diseases and Respiratory Medicine

2) Massachusetts General Hospital, Gordon Center for Medical Imaging

1) 防衛医科大学校 内科学講座(感染症・呼吸器)

2) ハーバード医科大学マサチューセッツ総合病院、ゴードン医用画像センター

要旨

【背景】発表者らは、光という物理的エネルギーをアジュバントとして利用することに着目し、これまでワクチン接種部位の短時間で安全な近赤外光照射がワクチン増強効果を持つことを明らかにしてきた。今回、この作用機序の解明のため、インフルエンザマウスモデルを用いて検討した。

【方法・結果】光源として連続波 1064nm ダイオード励起固体レーザー(Nd:YO₄)を用いた。C57BL/6 を背景とする複数種の遺伝子改変マウスを用い、皮膚所属リンパ節への樹状細胞遊走、インフルエンザ全粒子ワクチン接種後の抗インフルエンザ抗体価およびインフルエンザ感染後生存率を比較したところ、近赤外光照射によるアジュバント効果には皮内樹状細胞サブセットの中で Lang⁻CD11b⁻ migDC, Lang⁺ migDC, monocyte-derived CCR2⁺ DC が関与することを明らかにした。また、近赤外光照射によりマウス皮内に CCL20 や CCL2 など特定のケモカイン発現が起き、樹状細胞の活性化に関与することが示唆された。更に、骨髄誘導マスト細胞への近赤外光照射で活性酸素種が産生されること、野生型マウスへの抗酸化物質の投与やマスト細胞欠損マウス(*Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}*)で近赤外光のアジュバント効果が減弱すること、*Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}* の皮内にマスト細胞を移植し再構成することでアジュバント効果が復活することから、皮内マスト細胞が活性酸素種の産生を介して下流のアジュバント効果に寄与していることを明らかにした。

【結論】近赤外光を用いたインフルエンザワクチン増強効果には、マスト細胞内の活性酸素種の産生を介して皮内ケモカインの発現を活性化し、特定の遊走性樹状細胞集団の所属リンパ節への遊走を促進する機序が示唆された。

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-08】

Chemically synthesized *Alcaligenes* lipid A augments nasal vaccine effects to prevent pneumococcal infection / 化学合成されたアルカリゲネスリピドAは経鼻ワクチン効果を増強し肺炎球菌感染症を防止する

Ken Yoshii^{1,2}, Koji Hosomi¹, Atsushi Shimoyama³, Hidehiko Suzuki¹, Takahiro Nagatake¹, Koichi Fukase³, Hiroshi Kiyono⁴, Jun Kunisawa^{1,2,4,5,6} / 吉井 健^{1,2}, 細見 晃司¹, 下山 敦史³, 鈴木 英彦¹, 長竹 貴広¹, 深瀬 浩一³, 清野 宏⁴, 國澤 純^{1,2,4,5,6}

¹Laboratory of Vaccine Materials, Center for Vaccine and Adjuvant Research, and Laboratory of Gut Environmental System, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)/国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 ワクチン・アジュバント研究センターワクチンマテリアルプロジェクト・腸内環境システムプロジェクト ²Graduate School of Medicine, Osaka University/大阪大学大学院医学系研究科 ³Graduate School of Science, Osaka University/大阪大学大学院理学研究科 ⁴International Research and Development Center for Mucosal Vaccines, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo/東京大学医科学研究所国際粘膜ワクチン開発研究センター ⁵Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Dentistry, Osaka University/大阪大学大学院薬学・歯学研究科 ⁶Kobe University Graduate School of Medicine/神戸大学大学院医学研究科

We previously identified *Alcaligenes* as predominant bacteria inside Peyer's patches (PPs) but not in the lumen or lamina propria. Our subsequently studies showed that *Alcaligenes*-derived lipopolysaccharide (LPS) stimulated dendritic cells (DCs) to enhance the production of IgA-enhancing cytokines, including IL-6, and therefore promoted antigen-specific immune responses including IgA antibody and Th17 responses without excessive inflammation. In this study, we chemically synthesized *Alcaligenes* lipid A, an active part of LPS, and examined its efficacies as an adjuvant in nasal vaccine against *Streptococcus pneumoniae* infection. Mice were intranasally immunized with pneumococcal surface protein A (PspA, as vaccine antigen for *S. pneumoniae*) together with chemically synthesized *Alcaligenes* lipid A. Mice immunized with PspA together with *Alcaligenes* lipid A showed higher levels of PspA-specific IgA antibody in nasal wash and BALF compared with mice immunized with PspA alone. Consistent with this result, germinal center formation was detected in the nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) of mice immunized with PspA together with *Alcaligenes* lipid A. Additionally, PspA-specific IgG antibody was also induced in serum of mice immunized with PspA together with *Alcaligenes* lipid A. We finally examined whether PspA-specific immune responses induced by *Alcaligenes* lipid A could be sufficient to protect against *S. pneumoniae* infection. Challenge of *S. pneumoniae* into the respiratory tract led to loss of body weight and survival rate in mice immunized with PspA alone. In contrast, all mice immunized with PspA together with *Alcaligenes* lipid A survived with little body weight loss. These findings suggest that *Alcaligenes* lipid A can be applied to mucosal adjuvant to enhance nasal vaccine efficacy against respiratory bacterial infection including *S. pneumoniae*.

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-09】

Enhancement of nasal immune responses by mucociliary dysfunction to cholera toxin-based nasal vaccine

Huangwenxian Lan^{1,2}, Hidehiko Suzuki¹, Takahiro Nagatake¹, Koji Hosomi¹, Koji Ikegami³, Mitsutoshi Setou⁴, and Jun Kunisawa^{1,2,5,6,7}

¹Laboratory of Vaccine Materials and Laboratory of Gut Environmental System, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN), ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, ³Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, ⁴Department of Cellular & Molecular Anatomy, Hamamatsu University School of Medicine, ⁵Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology and International Research and Development Center for Mucosal Vaccines, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, ⁶Kobe University Graduate School of Medicine, ⁷Graduate School of Medicine and Graduate School of Dentistry, Osaka University.

Mucosal tissues equip physical barriers such as mucus layer and ciliary function of epithelium. Tubulin tyrosine ligase-like family member 1 (Ttl1) is essential for normal respiratory ciliary function, and its deficiency (Ttl1-KO) leads to mucus accumulation in nasal cavity. In this study, we found an enhanced antigen-specific respiratory immune response in Ttl1-KO mice due to longer antigen retention on the respiratory epithelium when we used cholera toxin (CT) as a mucosal adjuvant. When we intranasally immunized mice with pneumococcal surface protein A (PspA, as vaccine antigen) together with CT, higher level of PspA-specific IgA antibody was found in nasal wash and plasma cells in nasal passage in Ttl1-KO mice compared with Ttl1-hetero (He) mice. In order to address whether the higher immune responses in Ttl1-KO mice is caused by the accumulation of mucus in the nasal cavity, we treated Ttl1-KO mice with mucus removal before immunization, showing that the mucus removal did not affect the enhanced immune induction against vaccine antigen and thus suggesting that the mucociliary dysfunction is a key factor for the higher immune responses in Ttl1-KO mice. Indeed, we observed PspA retention time on the respiratory epithelium of Ttl1-KO mice was longer than Ttl1-He mice. Consistently, Ttl1-KO mice showed higher PspA uptake to dendritic cells in nasopharynx-associated lymphoid tissue. Taken together, these results suggest that, the mucociliary dysfunction of Ttl1-KO mice enhances the antigen-specific IgA immune response of CT-based nasal vaccine, since the antigen retention time was extended.

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-10】

Potency of polymyxin B as mucosal adjuvant against inactivated influenza virion

不活化インフルエンザウイルス粒子に対するポリミキシン B の粘膜アジュバント効果

Takashi Odagiri, Naoto Yoshino, Yutaka Sasaki, Yasushi Muraki

小田切 崇、吉野 直人、佐々木 裕、村木 靖

Division of Infectious Diseases and Immunology, Department of Microbiology, School of Medicine,
Iwate Medical University

岩手医科大学 医学部 微生物学講座 感染症学・免疫学分野

【背景・目的】粘膜に効果的な防御免疫を誘導するためにはワクチン抗原と共に粘膜アジュバントを接種する必要がある。我々は、卵白アルブミン（OVA）などのタンパク分子を用いた実験で、*Bacillus* 属の細菌が産生するポリミキシン B（PMB）、コリスチン、サーファクチンの 3 種の環状リポペプチド（環状ポリペプチドに脂肪鎖が結合した化合物）が粘膜アジュバント効果をもつことを見出した。さらにこれらの化合物がアジュバント効果を発揮するためには、1) 環状リポペプチドとタンパク分子の複合体形成による抗原デリバリー効率の向上、2) 環状リポペプチド単体が肥満細胞に作用することによるヒスタミンの放出と獲得免疫増強に関与するサイトカインの産生、が重要であると報告した。環状リポペプチドのアジュバント効果はタンパク分子でしか確認されていない。そこで本研究ではインフルエンザウイルス粒子に対する PMB のアジュバント効果を検討した。【方法】不活化全粒子インフルエンザウイルスを単独（単独群）または PMB と併用（併用群）でマウスに 0 週および 4 週の 2 回経鼻免疫した。また、同じスケジュールで不活化ウイルスを皮下接種（皮下群）した。最終免疫から 2 週後に粘膜分泌液（鼻腔洗浄液および気管洗浄液）中および血漿中のウイルス特異的 IgA、IgG を ELISA で測定した。さらに、最終免疫から 2 週後に致死量のマウス馴化インフルエンザウイルスを経鼻接種した。【結果】粘膜分泌液中のウイルス特異的 IgA 抗体価は単独群より併用群で有意に高かった。皮下群では特異的 IgA は検出されなかった。一方、3 群間で血漿中の IgG 抗体価に有意差はなかった。ウイルス接種後、皮下群 > 単独群の順で体重の減少率は大きかったが、併用群では体重の減少は観察されず、単独群に比べ有意に体重減少を抑制した。以上より、PMB の粘膜アジュバント効果が不活化ウイルス粒子でも確認された。【考察】 PMB とタンパク分子との複合体は PMB の脂肪鎖とタンパク分子が非共有結合することで形成されと考えられる。本研究においては PMB とウイルス粒子との複合体形成を確認している。したがって、抗原デリバリー効率は検討していないものの、鼻粘膜でのウイルス粒子の取り込みの向上に PMB が寄与していると思われる。PMB は OVA などのタンパク抗原と不活化ウイルス粒子のいずれの形状のワクチン抗原にもアジュバント効果を発揮すると予想され、汎用性の高いアジュバントになり得ると考えられた。

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-11】

ZBP1 governs neutrophil-mediated inflammation in influenza virus infection via IL-1 α

Masatoshi Momota^{1,3}, Patrick Lelliott⁴, Takato Kusakabe^{1,3}, Atsuko Kubo¹, Koji Kobiyama⁵, Etsushi Kuroda^{1,3}, Yumiko Imai², Cevayir Coban⁴, and Ken. J. Ishii^{1,3}.

¹Laboratory of Adjuvant Innovation, and ²Regulation of Intractable Infectious Diseases, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Osaka 567-0085, Japan;

³Laboratory of Vaccine Science, and ⁴Malaria immunology, World Premier International Immunology Frontier Research Center, Osaka 565-0871, Japan;

⁶La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA 92037.

Keywords: influenza, necroptotic cell death, NLRP3 inflammasome, IL-1 α/β , neutrophils,

In influenza A virus (IAV) infection, IL-1 plays an important role in both protective and pathological immunity, however, the precise immunological mechanism by which the production of IL-1 α and IL-1 β is regulated during lethal and/or non-lethal IAV is unknown. Recent evidence suggest that Z-DNA binding protein-1 (ZBP1) is involved in IAV-induced cell death and IL-1 β induction, however, the involvement of the NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome is unclear, and ultimately it remains controversial if ZBP1 contributes toward protective, or pathological immunity.

Here, we show that during influenza infection, IL-1 α is a critical upstream factor for the induction of further IL-1 β . IL-1 α/β were released after IAV induced cell death, which was controlled by ZBP1 but not NLRP3 inflammasome activation. Indeed, mice lacking NLRP3, ASC or Caspase-1/11 had no phenotype, while those lacking either IL-1 receptor (IL-1R) or ZBP1 displayed higher viral load and mortality than wild type mice due to reduced IL-1 α/β secretion in lung. Conversely, when mice were infected intratracheally, to mimic highly pathogenic infection, ZBP1 deficiency protected mice from acute pulmonary inflammation. These pathological and detrimental roles of ZBP1 mirrors its essential role in recruitment and infiltration of neutrophils to the lung, and in resultant inflammation and neutrophil extracellular trap (NET) formation.

Collectively, these results indicate that ZBP1 is essential not only for IAV-induced cell death, but also IL-1 α production in vitro and in vivo in the absence of NLRP3 inflammasome machinery. As a result, ZBP1 controls IL-1-dependent, neutrophil-mediated pulmonary inflammation, leading to reciprocal outcomes, protective immunity or immunopathology, depending on the type, kinetics, and target host tissue of IAV infection.

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-12】

Application of D35 adjuvant containing lipid nanoparticles to tumor treatment

D35 アジュバント含有脂質ナノ粒子の腫瘍治療への応用

Yoshihiko Tanimoto¹, Lisa Munakata², Akio Osa³, Jie Meng¹, Yasunari Haseda¹, Shohei Koyama³, Ryo Suzuki², Taiki Aoshi¹.

谷本佳彦¹, 宗像理紗², 長彰翁³, 孟潔¹, 長谷田泰成¹, 小山正平³, 鈴木亮², 青枝大貴¹.

¹Vaccine Dynamics Project, BIKEN Innovative Vaccine Research Alliance Laboratories, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

²Faculty of Pharma-Science, Teikyo University

³Graduate School of Medicine, Osaka University

¹大阪大学 微生物病研究所 BIKEN 次世代ワクチン協働研究所 ワクチン動態プロジェクト

²帝京大学 薬学部

³大阪大学大学院 医学系研究科

D35 は A タイプの免疫賦活 CpG オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) であり、形質細胞様樹状細胞 (pDC) から IFN- α を多く誘導する。また、B、C、P タイプなど他の CpG ODN と違い、D35 は天然型ホスホジエステルのバックボーンを持つことから高い安全性と優れた効果を持つと考えられる。これらの特徴から D35 は腫瘍に対しても安全性の高い免疫賦活化剤として機能し抗腫瘍効果を発揮することが期待される。本研究では、D35 と脂質を複合体化した Lipid Nano Particle (D35LNP) を作製し、抗腫瘍効果を評価した。D35LNP はオリジナルの D35 に比べて pDC から TLR9 依存的に IFN- α をより強く誘導した。また、D35LNP 投与によって MC38 皮内腫瘍の顕著な増殖抑制がみられた。この増殖抑制効果は、オリジナルの D35 では見られず、抗 CD8 抗体で処理することで消失した。腫瘍組織の mRNA を評価すると、D35LNP 治療によって Th1 関連遺伝子や特定の TCR レパトア遺伝子の増幅が認められた。腫瘍組織切片を解析すると D35LNP 投与により腫瘍内への CD8T 細胞の浸潤が多く認められた。さらに、抗 PD-1 抗体との併用治療効果もみられた。これらのことから D35LNP は腫瘍に対する免疫賦活化剤として作用し CD8T 細胞を活性化する抗腫瘍薬となり得ることが示唆された。

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-13】

The combination of DAMP-inducing and PAMP adjuvants parallelly induces type-2 and type-1 immune responses

DAMP 誘導アジュバントと PAMP アジュバントの併用は 2 型および 1 型免疫応答を誘導する

Tomoya Hayashi

林 智哉

National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

医薬基盤・健康・栄養研究所

Abstract

Recently, it was reported that 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CyD), a common pharmaceutical additive, can act as a vaccine adjuvant to enhance protective type-2 immunogenicity to co-administered seasonal influenza split vaccine by inducing host-derived damage-associated molecular patterns (DAMPs). However, like most other DAMP-inducing adjuvants such as aluminum hydroxide (Alum), HP- β -CyD may not be sufficient for the induction of protective type-1 (cellular) immune responses, thereby leaving room for improvement. Here, we combined HP- β -CyD with a humanized TLR9 agonist (K3 CpG-ODN), a potent type-1 inducing PAMP adjuvant. These combination parallelly induced both type-2 and type-1 immune responses. Moreover, the induction of IgE by HP- β -CyD was suppressed by the addition of K3 CpG-ODN. HP- β -CyD and K3 CpG-ODN-adjuvanted influenza HA split vaccination protected the mice against lethal challenge with high dose of influenza virus, which could not be rescued by the singular-adjuvanted vaccine. Further experiments using gene deficient mice revealed that type-2 and type-1 immune responses enhanced by the combined adjuvants were dependent on TBK and TLR9, respectively, indicating their parallel signaling pathways. Taken together, these results may offer the potential clinical application of the combination of DAMP-inducing and PAMP adjuvants to improve the vaccine immunogenicity and efficacy by enhancing both type-2 and type-1 immune responses in a parallel manner.

Reference:

- (1) M. Onishi *et al.*, *J. Immunol.*, 194, 2673-2682 (2015).
- (2) T. Kusakabe *et al.*, *Vaccine*, 34, 191-198 (2016)

Vaccine-induced IgG1 blocks effector function of IgG2 in influenza vaccine

インフルエンザワクチンにおける IgG サブクラスの競合と感染防御への影響評価

Meito Shibuya^{1,2}, Taiki Aoshi^{2,3}, Yasuo Yoshioka^{1,2,3}

澁谷銘人^{1,2}、青枝大貴^{2,3}、吉岡靖雄^{1,2,3}

¹Grad. Sch. of Pharm. Sci., Osaka Univ., ²RIMD, Osaka Univ., ³The Research Foundation for Microbial Diseases, Osaka Univ.

¹大阪大学薬学研究科 創薬ナノデザイン学、²大阪大学微生物病研究所 BIKEN 次世代ワクチン協働研究所、³一財) 阪大微生物病研究会 BIKEN 次世代ワクチン開発研究センター

要旨

現行のインフルエンザワクチンでは、ワクチン株と流行株が異なると十分なワクチン効果を期待できない。そのため、同一亜型内の別株（ヘテロローガスな株）に対して交差反応性を示すワクチンの開発が期待されている。ヘテロローガスな感染防御においては、非中和型の抗体と FcγR を介した抗体依存性細胞傷害（ADCC）が重要であり、IgG サブクラスの中でも特に、IgG2 の重要性が報告されている。しかしワクチンにおいては、IgG1 も産生されるため、抗原への結合を IgG2 と競合することで、ヘテロローガスな感染防御を阻害する可能性も考えられる。そこで我々は、アジュバントの違いがワクチンの交差反応性に及ぼす影響を検討すると共に、抗体のサブクラスが混在することで感染防御に与える影響を検討した。本検討では H1N1 の同一亜型株として Cal 株および PR8 株を用い、アジュバントとして水酸化アルミニウム Alum および TLR9 リガンドである CpG 核酸を用いた。まず Cal 株由来スプリットワクチンとアジュバントをマウスに免疫し、ヘテロローガスな PR8 株に対する特異的抗体価を測定した。その結果、Alum 群、CpG 群ともに同程度の抗原特異的 IgG が検出され、Alum 群で IgG1 が、CpG 群で IgG2c の上昇が認められた。また、MDCK 細胞を用いて PR8 特異的中和抗体価を測定したところ、Alum 群、CpG 群ともに中和抗体価は検出されなかった。さらにワクチン後、PR8 を致死量で感染させたところ、中和抗体価が検出されないにも関わらず、CpG 群で体重減少の抑制、生存率の上昇が認められるなどの交差反応性を示した。一方で、CpG 群と同程度の Total IgG が検出されているにも関わらず、Alum 群では感染防御が観察されなかった。次に、抗体のサブクラスが混在することで感染防御に与える影響を評価する目的で、CpG 群由来の血清（CpG 血清）と Alum 群由来の血清（Alum 血清）を混合し、混合血清中の PR8 特異的 IgG2c 抗体価を測定した。その結果、Alum 血清が高濃度になるにつれ、CpG 血清由来 IgG2c の PR8 に対する結合が阻害され、検出可能な抗体価の減少が認められた。次に、in vivo でも同様の阻害を評価するため、CpG 血清と Alum 血清を混合し、PR8 と共に経鼻投与した。その結果、Alum 血清を高濃度で混合している群では、Alum 血清非混合群に比べ、体重減少および生存率の低下が認められた。以上の結果より、CpG アジュバントにより、非中和型 IgG2c の産生が上昇し、ADCC によって、ヘテロローガスな感染に交差反応性を示すことが明らかとなった。また、IgG1 が混在することで、IgG2c による感染防御が阻害されたことから、IgG2 のみを産生上昇させるアジュバントがヘテロローガスな感染には有用であると考えられた。

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-15】

Intrinsic MyD88 signalling in B cells controls IFN γ -mediated early IgG2c class switching in response to a particulate adjuvant

Michelle Sue Jann Lee¹, Yayoi Natsume-Kitatani², Burcu Temizoz³, Etsushi Kuroda^{3,4}, Wataru Ise⁵, Takeshi Inoue⁵, Tomohiro Kurosaki⁵, Kenji Mizuguchi², Shizuo Akira⁶, Ken J Ishii^{3,4}, and Cevayir Coban¹

¹ Laboratory of Malaria Immunology, Immunology Frontier Research Center (IFReC), Osaka University, Osaka, Japan

² Laboratory of Bioinformatics, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Osaka, Japan

³ Laboratory of Vaccine Science, IFReC, Osaka University, Osaka, Japan

⁴ Laboratory of Adjuvant Innovation, Center for Vaccine and Adjuvant Research, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Osaka, Japan

⁵ Laboratory of Lymphocyte Differentiation, IFReC, Osaka University, Osaka, Japan

⁶ Laboratory of Host Defense, IFReC, Osaka University, Osaka, Japan

Adjuvants improve the potency of vaccines, but the modes of action (MOAs) of most adjuvants are largely unknown. Toll-like receptor (TLR)-dependent and -independent innate immune signaling through the adaptor molecule MyD88 has been shown to be pivotal to the effects of most adjuvants; however, MyD88's involvement in the TLR-independent MOAs of adjuvants is poorly understood. Here, using the T-dependent antigen NIPOVA and a unique particulate adjuvant called synthetic hemozoin (sHZ) we show that MyD88 is required for early germinal center formation and enhanced antibody class-switch recombination (CSR). Using cell-type-specific MyD88 knockout mice, we found that IgG2c class switching, but not IgG1 class switching, was controlled by intrinsic MyD88 signaling in B cells. Notably, interferon gamma (IFN γ) produced by various cells including T cells, NK cells and dendritic cells was the primary cytokine for IgG2c CSR and B-cell intrinsic MyD88 is required for IFN γ production. Moreover, IFN γ receptor (IFN γ R) deficiency abolished sHZ-induced IgG2c production. Recombinant IFN γ administration rescued IgG2c CSR impairment in mice lacking B-cell intrinsic MyD88 upon immunization with sHZ adjuvant. Together, our results show that intrinsic MyD88 signaling in B cells is involved in the MOA of certain particulate adjuvants and enhance our specific understanding of adjuvants and vaccines.

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-16】

Molecular interaction between IL-1 alpha and genomic DNA released under the cell death by Alum

Kou Hioki^{1,2}, Burcu Temizoz^{1,2}, Etsushi Kuroda^{1,2}, Ken J. Ishii^{1,2}

¹Laboratory of Vaccine Science, WPI Immunology Frontier Research Center (IFReC), Osaka University, Japan

²Center for Vaccine and Adjuvant Research (CVAR), National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)

Abstract

Recently, the number of patients who are suffering from allergic inflammation, including allergic asthma or rhinitis has been increased. Although the reason is unclear, it is suggested that environmental factors are the cause of allergic inflammations. Particulate matter 2.5 (PM2.5) and Asian yellow sand dust are well-known inflammatory particle, and these fine particles are known to induce pulmonary inflammation when they are deeply inhaled in the lung. It is important to note that these fine particle work as an adjuvant and induce allergic immune responses.

Adjuvants are the reagents that enhance the immune response to coadministered antigen(s), and aluminium salts (referred to as Alum) is one of well-known vaccine adjuvants. Alum is categorized into particle adjuvant, but the mode of action of particle adjuvants are still unclear.

Once particle adjuvants are inhaled, they are deposited in the lung, and then induce allergic lung inflammation. In allergic inflammation, serum immunoglobulin E (IgE) against allergen, which is known to be as a mediator of allergic responses, is increased. Therefore, IgE is an important marker for allergic diseases. Some particle adjuvants such as alum and silica are known to preferentially increase the IgE level. However, it is also unclear that underlying mechanisms by which particle adjuvants induce allergic responses. Damage-associated molecular patterns (DAMPs), including DNA, are reported as factors for the adjuvanticity of Alum, and released DAMPs under the cell death are thought to activate the innate immune cells and subsequently adaptive immune cells.

Recently, we revealed that Interleukin-1alpha (IL-1 α), which is released under the cell death after alum stimulation, works as a DAMP as same as DNA. We also found that IL-1 α is released in the lung after administration of alum into the lungs, and released IL-1 α involved in IgE production in vivo.

In this study, we investigated the interaction of IL-1 α which are released as DAMPs after alum stimulation, and we hypothesized that IL-1 α binds to DNA and DNA-IL-1 α complex work as effective adjuvant for the activation of immune cells.

Adjuvanticity of combination protamine, a cationic nuclear protein, and nucleic acid adjuvants

カチオン性核タンパク質 プロタミンと核酸アジュバントの併用による効果

Saori Hodokami^{1,2}, Takato Kusakabe^{1,2}, Masatoshi Momota^{1,2}, Etsushi Kuroda^{1,2} and Ken J Ishii^{1,2}
程上紗央里^{1,2}、日下部峻斗^{1,2}、百田匡寿^{1,2}、黒田悦史^{1,2}、石井健^{1,2}

¹ Adjuvant Innovation, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

² Laboratory of Vaccine Science, Immunology Frontier Research Center (IFReC), Osaka University

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 アジュバント開発プロジェクト

大阪大学免疫学フロンティア研究センター ワクチン学分野

アジュバントは、ワクチンの効果を増強させるために添加される物質であり、アルミニウム塩や核酸、オイルアジュバントなどが用いられている。中でも核酸アジュバントは高い免疫賦活能を有する一方、生体内で分散しやすく、酵素による分解を受けやすいため、免疫細胞により効率的に取り込ませるシステムの開発が望まれている。一方、プロタミンはアルギニンを主成分としたカチオン性タンパク質であり、核酸と静電的に相互作用し複合体を形成する。さらに、食品の保存料や医薬品としての使用実績があり、生体適合性に優れるタンパク質である。そこで、本研究では核酸アジュバントにプロタミンを添加することにより、核酸アジュバントの免疫賦活化効果が増強されるか否かを検討した。

まず、プロタミン（硫酸塩・塩酸塩）と STING リガンド、または K3 CpG-ODN を種々の混合比で調製し、マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞および腹腔滲出マクロファージに添加後のサイトカイン産生量を測定した。その結果、TNF- α および IL-12p40 の産生量はプロタミン添加の影響を受けなかったことから、*in vitro* においてはプロタミンの併用により核酸アジュバントの効果は変化しないことが示唆された。そこで、モデル抗原に OVA を用い、核酸アジュバントおよびプロタミンと混合してマウス投与し、血清中の抗原特異的 IgG1 および IgG2c 量と脾細胞を OVA で刺激後のサイトカイン産生を調べた。その結果、今回の検討においてはプロタミンの併用による核酸アジュバントの免疫賦活化効果の増強はみられなかった。今後はプロタミンと核酸アジュバントの相性も考慮し、両者の混合比、混合方法の再検討等を行っていく。

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-18】

Priming immunization with whole-virion influenza vaccines is essential for induction of ADCC activities of virus-specific antibodies

インフルエンザワクチン特異的 ADCC 抗体の産生誘導には全粒子ワクチン初回免疫が必要である

Kayoko Sato, Hideki Asanuma

佐藤佳代子、浅沼秀樹

Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases

国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター

要旨

インフルエンザワクチンにはウイルス粒子をホルムアルデヒドで固定した全粒子ワクチンとウイルス粒子をさらにエーテルで処理し脂質膜を除去し部分的に HA 成分を精製したスプリットワクチン（以下 HA ワクチン）がある。これまでに我々は、追加免疫を行った場合全粒子ワクチンはスプリットワクチンと比べて、avidity の高いワクチン特異的抗体及び抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を持つ抗体を産生誘導することを報告してきた。これらの抗体誘導のメカニズムを詳細に解明するために、初回免疫に焦点を当てた検討を行った。全粒子ワクチンは、初回免疫または追加免疫のいずれかにより、HA ワクチンよりも avidity の高い IgG 抗体を産生誘導した。一方、ADCC 活性を持つ抗体の産生誘導は、全粒子ワクチンを用いて初回免疫を行った場合にのみ誘導され、初回免疫を HA ワクチンで行うと全粒子ワクチンで追加免疫を行っても誘導されないことがわかった。ADCC 活性を持つ抗体は BALB/c マウスでは IgG2a であることから、インフルエンザワクチンによる抗体産生誘導時の IgG サブクラスの決定は初回免疫時の応答が必須であると考えられる。一方 affinity maturation は初回免疫、追加免疫のどちらの過程でも誘導されると考えられることから、インフルエンザワクチンは初回免疫と追加免疫で異なる機構により抗体産生を誘導している可能性が示された。このように、投与時期による抗体産生誘導機構の違いを評価することは今後のアジュバント開発に際し有益な知見を得ることが期待される。

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-19】

Evaluation of effectiveness and safety of CpG-ODN G9.1 as mucosal adjuvant for nasal influenza vaccines

CpG-ODN G9.1 の経鼻インフルエンザワクチンにおける有効と安全性の評価

Koichiro Tateishi^{1,2}, Kayoko Sato¹, Eita Sasaki¹, Takuo Mizukami¹, Junichi Maeyama¹, Sumiko Iho³, Saburo Yamamoto⁴, Norio Yamamoto⁵, Kohtaro Fujihashi^{6,7}, Hideki Asanuma¹

立石 恒一郎^{1,2}、佐藤 佳代子¹、佐々木 永太¹、水上 拓郎¹、前山 順一¹、伊保 澄子³
山本 三郎⁴、山本 典生⁵、藤橋 浩太郎^{6,7}、浅沼 秀樹¹

¹National Institute of infectious Diseases, ²Japan Agency for Medical Research and Development, ³University of Fukui, ⁴JAPAN BCG Laboratory, ⁵Juntendo University,

⁶The University of Tokyo, ⁷The University of Alabama at Birmingham

¹ 国立感染症研究所、² 国立研究開発法人日本医療研究開発機構、³ 福井大学、

⁴ 日本 BCG 製造株式会社、⁵ 順天堂大学、⁶ 東京大学、⁷ アラバマ大学バーミングハム校

我々はこれまで、福井大学と共に開発した新規アジュバントである CpG ODN G9.1 (G9.1) の経鼻インフルエンザワクチンへの応用に向けた研究を行ってきた。G9.1 はホスホジエステル結合のみで構成された A(D)タイプの CpG ODN であるが、他の A(D)タイプの CpG ODN よりも高い免疫増強効果を有することが明らかとなっている。これまでの研究で、G9.1 をスプリット型のインフルエンザワクチンとともに経鼻投与すると、G9.1 を添加しない場合と比較して高い防御効果が認められ、鼻腔中にはそれと関連した特異的分泌型 IgA 応答が認められた。このことから G9.1 はインフルエンザワクチンとともに経鼻投与することで、高い粘膜免疫増強効果があることが明らかとなった。また、この増強効果を他の粘膜アジュバントと比較した結果、Poly(I:C)やK(B)タイプの CpG ODN と同等の免疫誘導能を有することも明らかとなった。一方、安全性を評価することを目的とし、G9.1 を経鼻投与後の肺における Type I IFN 関連遺伝子群の発現と IFN- α 産生能を検討した。その結果、有意な Type I IFN 関連遺伝子群の発現は認められるものの、Poly(I:C)やK(B)タイプの CpG ODN よりも、発現が有意に低いことが明らかとなった。また投与 24 時間後の肺では IFN- α の産生が認められなかった。以上の結果は G9.1 には高い特異抗体誘導能を有している一方で、炎症反応は弱いことを示唆しており、G9.1 が高い有効性だけでなく、高い安全性を有する粘膜アジュバントである事が示唆された。

Abstract of poster presentation / 発表要旨 【P-20】

Comprehensive analysis for the immunogenicity in human to explore vaccine targets
ワクチンターゲット探索へ向けた網羅的ヒト免疫原性解析

Takeharu Minamitani^{1,2}, Rika Furuta³, Ken-Ichi Imadome⁴ and Teruhito Yasui^{1,2}
南谷武春^{1,2}、古田里佳³、今留謙一⁴、安居輝人^{1,2}

¹ Laboratory of Infectious Diseases and Immunity, NIBOHN, ² Laboratory of Immunobiologics Evaluation, CVAR, NIBIOHN, ³ Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center, ⁴ Department of Advanced Medicine for Infections, NCCHD

1 医薬基盤・健康・栄養研究所 感染症制御プロジェクト、2 ワクチン・アジュバント研究センター 免疫バイオリジクスプロジェクト、3 日本赤十字社近畿ブロック血液センター、4 国立成育医療研究センター 高度感染症診断部

要旨

感染症予防に用いられるワクチンは、ヒト免疫系を効率的に活性化し、免疫記憶を誘導する一方で、副反応は最小限に抑えることが重要である。このことから、近年では、いくつかの抗原を組み合わせたコンポーネントワクチンの開発が進んでいる。コンポーネントワクチンに用いる抗原には、ヒトにおいて免疫原性を持つタンパク質が用いられる。しかしながら、多くの病原体では、ヒト体内において免疫原となる因子について広く明らかにされていない。そこで我々は、ヒト血中抗体の抗原への反応性を指標として、免疫原性を網羅的に検出する PathogScan 法を新規に開発した。本発表では、サイトメガロウイルス (CMV) のヒト免疫原性解析を試みたので報告する。UniProt に登録された CMV 全系統の全 ORF を分割し、各ペプチドに対応する遺伝子配列から、ペプチド断片を提示する M13 バクテリオファージライブラリを作製した。このファージライブラリを、ヒト血清抗体によって免疫沈降し、各 CMV タンパク質の検出頻度を次世代シーケンサーによって解析した。この検出頻度をヒト免疫原性の指標として、遺伝情報統計学的解析を行った。ヒト血清は、CMV 陰性を 93 検体、CMV 陽性を 25 検体 (健常人 9, 先天性 CMV 感染症 15, CMV 血球貪食症候群 1) を用いた。その結果、CMV 陽性健常人において検出されたタンパク質を分類した結果、約 4 割がウイルス構成成分であった。また、これまで高抗体価抗原として知られている pp65 (UL83) も検出され、PathogScan 法の有用性が強く示唆された。先天性 CMV 感染症、および CMV 血球貪食症候群由来血清は抗 CMV 抗体価が高値であり、特異的な CMV タンパク質が高頻度で検出された。さらに、CMV 陽性健常人検体と CMV 関連疾患検体では、検出されるタンパク質の傾向が異なることが明らかとなった。これらの結果から、CMV をターゲットとする液性免疫反応の免疫原性が明らかとなった。今後、検出されたタンパク質の細胞性免疫誘導能を検討することで、CMV コンポーネントワクチンの候補となり得るか検討する予定である。

Characteristics of human Tetanus Neurotoxin antibody

ヒト抗破傷風毒素抗体の単離と多様性解析

Karin Kiyose, Takeharu Minamitani and Teruhito Yasui

清瀬かりん、南谷武春、安居輝人

Laboratory of Infectious Diseases and Immunity, Laboratory of Immunobiologics Evaluation, CVAR, NIBIOHN

医薬基盤・健康・栄養研究所 感染症制御プロジェクト、ワクチン・アジュバント研究センター 免疫バイオリジクスプロジェクト

要旨

近年、ワクチンアジュバント開発の進展により、ワクチン接種有効率の著しい向上が認められる一方、発症後対処療法の必要性が示唆されている。特に、感染症においては、免疫グロブリン製剤の適用に加えて、抗体医薬品での特異的、かつ効果的な治療が不可逆的損傷の阻止に有効と考えられている。しかしながら、治療法開発におけるシーズ探索は、未だ十分に行われていない。さらに、抗体医薬品開発の基盤となるヒト免疫原性、特にヒト抗体多様性成立メカニズムの解明には至っていない。本研究会では、ヒト免疫原性成立機構の解明、および抗体医薬品シーズ探索法の開発を目的として、ヒト末梢血より破傷風毒素 (TeNT) に対するヒト抗体クローンを単離し、その性状を解析したので報告する。

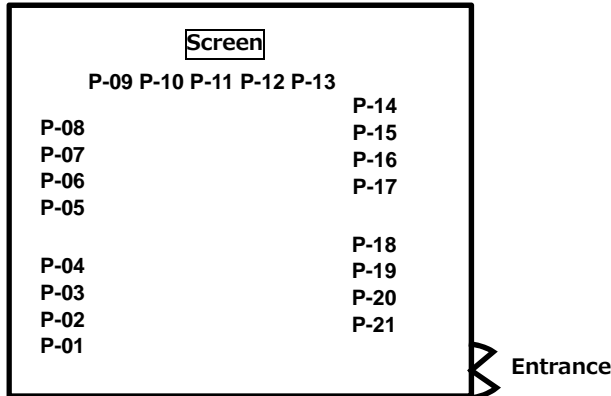
健康人ボランティアより提供いただいた末梢血から末梢血単核球 (PBMC) を分離した。Epstein-Barr ウイルス (EBV) により PBMC 中 B 細胞を不死化した後、14 日後、培養上清を ELISA に供した。ELISA では、大腸菌で産生、精製した TeNT サブユニットドメインタンパク質、Hc、Hn、Lc に対する反応性を検出した。ELISA 陽性クローンは、次世代シーケンサーにて抗体遺伝子配列を決定した。さらに、組換え抗体を作製した後、機能性試験に供した。PBMC 中の TeNT 抗体クローンの頻度は、抗ヒト CD40 抗体で活性化した後、培養上清を ELISA することによって検討した。

ヒト PBMC より抗 TeNT 抗体クローンを 15 種類単離した。各ドメインへの反応性を検討した結果、Hc, 11 種類、Lc, 3 種類、Lc-Hn mix, 1 種類であった。培養上清を用いた機能性試験では、Hc 依存性 GT-1b 結合阻害、Lc 依存性 Vamp2 切断阻害活性を有するクローンが、それぞれ 2 種類、1 種類認められた。さらに GT-1b 結合阻害は、組換え抗体においても活性保持が確認された。PBMC 中 TeNT 抗体クローンの頻度は、EBV 感染によって 10^6 PBMC に 1 細胞程度の検出であったのに対し、CD40 刺激における検出感度は 5 倍程度で認められた。

今回我々が構築した抗体シーズ探索法を用いて、TeNT に対する機能的抗体 3 種類が同定された。さらに本法では、末梢血中 TeNT 抗体クローンの約 20% が探索できることが明らかとなった。本開発技術は、ワクチン接種後評価における抗体濃度、中和活性のみならず、抗体クローン出現頻度、及び抗体の質的变化といった新たな評価基準を付加する可能性を強く示唆している。

ポスター発表 <Poster Layout>

【掲示時間】平成 31 年 1 月 22 日 (火) 9:30~16:30
※うち、ポスターセッション 12:50~13:50
【掲示場所】サイエンスホール



- P-1 Akihiro Nakaya (Japan BCG Laboratory)
- P-2 Yasushi Chuma (Japan BCG Laboratory)
- P-3 Yukihiro Shibuya (Japan BCG Laboratory)
- P-4 Kazuhiro Matsuo (Japan BCG Laboratory)
- P-5 Noriyuki Yuasa (Tokyo chemical industry co. Ltd.)
- P-6 Akane Watanabe (Osaka University)
- P-7 Yoshifumi Kimizuka (National Defense Medical College)
- P-8 Ken Yoshii (NIBIOHN)
- P-9 Huangwenxian Lan (NIBIOHN)
- P-10 Takashi Odagiri (Iwate Medical University)
- P-11 Masatoshi Momota (NIBIOHN)
- P-12 Yoshihiko Tanimoto (Osaka University)
- P-13 Tomoya Hayashi (NIBIOHN)
- P-14 Meito Shibuya (Osaka University)
- P-15 Michelle Sue Jann Lee (Osaka University)
- P-16 Kou Hioki (NIBIOHN)
- P-17 Saori Hodokami (NIBIOHN)
- P-18 Kayoko Sato (National Institute of Infectious Diseases)
- P-19 Koichiro Tateishi (National Institute of infectious Diseases)
- P-20 Takeharu Minamitani (NIBIOHN)
- P-21 Karin Kiyose (NIBIOHN)

Today's Program

○12th Meeting of the Japanese Vaccine Adjuvant Research Consortium (10:00-16:55)

10:00-10:05	Opening remarks : Koichi Yamanishi / The Research Foundation for Microbial Disease of Osaka University
10:05-10:35 (30min)	Yasushi Kawaguchi / The University of Tokyo
10:35-11:05 (30min)	YUKI KINJO / The Jikei University School of Medicine
11:05-11:35 (30min)	Quentin Sattentau / University of Oxford
11:35-11:55 (20min)	Ken Ishii / The University of Tokyo Jun Kunisawa / The National Institute of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)

11:55-12:50 Lunch

12:50-13:50 Poster Session

13:50-14:20 (30min)	Teruhito YASUI / The National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)
14:20-14:50 (30min)	Yumiko Imai / The National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)
14:50-15:00 (10min)	Yoshifumi Kimizuka / National Defense Medical College
15:00-15:10 (10min)	Akane Watanabe / Osaka University
15:10-15:20 (10min)	Kazuhiro Matsuo / Japan BCG Laboratory
15:20-15:50 (30min)	Coffee break & poster session
15:50-16:20 (30min)	Kiyoshi Hirahara / Chiba University
16:20-16:50 (30min)	Kiyoshi takatsu / Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research
16:50-16:55	Closing remarks : Jun Kunisawa / The National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN)

第12世代アジュバント研究会 プログラム・講演要旨集

Program and Abstracts (January 22, 2019, Senri Life Science Center, Osaka, Japan)

Copyright © 2019 All rights reserved(不許複製・禁無断転載) 出版:2019年1月22日

発行: 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチン・アジュバント研究センター事務局