

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

粘膜ワクチン開発の基礎となるアジュバントに関する研究

平成 13-15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成 16 年（2004 年）4 月

目 次

I.	研究総括報告書	
	粘膜ワクチン開発の基礎となるアジュバントに関する研究	1
II.	分担研究報告書	
1.	経鼻アジュバントとしての mCT の有効性と安全性	
	清野 宏	11
2.	<i>Bacillus brevis</i> によるキメラ型 (mCTA/LTB)アジュバント の生産	
	高木 広明	19
3.	CT のアジュバント活性部位の同定	
	濱端 崇	23
4.	気道の異なる部位における IgA および IgG 抗体の分布と 濃度	
	田村 慎一	27
5.	大腸菌を用いた mCT の大量生産系の確立	
	駒瀬 勝啓	29
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV.	研究成果の刊行物・別刷	39

総括研究報告書

「粘膜ワクチン開発の基礎となるアジュバントに関する研究」

主任研究者氏名： 清野 宏 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨：『感染と免疫』の原点に立ち返ると殆どすべての病原微生物は体外と体内環境の接点となっている鼻腔・口腔にはじまり呼吸器、消化器、泌尿生殖器を被っている広大な粘膜面を介して侵入して体内を攪乱する。そこで、我々は生体の第一線の防御バリアとして機能している粘膜免疫機構を有効に応用した次世代ワクチンとして期待される『粘膜ワクチン』の開発に向けて粘膜免疫システムの解明を中心に、先導的な研究を進めてきた。本研究計画では「粘膜ワクチン」実現化に不可欠と言われる粘膜アジュバント、もしくは粘膜免疫調節因子と呼ばれる粘膜免疫機能を増強させる分子・物質の開発を目指した基礎研究を展開してきた。例えば、我々が開発した無毒化変異型CT (mCT) の自然免疫・獲得免疫での粘膜免疫における免疫増強作用メカニズムについて分子・細胞レベルでの解明を進め、無毒化アジュバント活性ペプチドの合成も試みてきた。さらに実用化に向けて効率良いmCT産生システムの開発も異なる発現ベクター（例：*Bacillus brevis*, HPD31-M3, *E. coli*, pTrc99A）を駆使して、その実用化へ向けて研究を推進した。さらに、世界に先駆けて、mCTAサブユニットと易熱性毒素Bサブユニットを合体させた第二世代粘膜アジュバントとして期待されるキメラ型 mCTA/LTB の開発に成功した。その安全性と免疫増強効果を小実験動物レベルで確認することも出来た。これらの一連の成果は粘膜アジュバント開発に関連した粘膜免疫機構の基礎的解明にも貢献し、3年間の研究期間に50編の論文を免疫、感染、ワクチン関係国際学術誌（平均インパクトファクター約6.0）に報告し、高い評価を得た。

分担研究者：

高木 広明 株式会社プロテインエクスプレス 常務取締役

濱端 崇 国立国際医療センター研究所 室長

田村 慎一 大阪大学・微生物病研究所 客員教授

駒瀬 勝啓 北里研究所・生物製剤研究所 部門長

合成ペプチドの開発を進め、粘膜アジュバント実用化に向けた基礎研究を推進し次の研究・開発への道筋をつけた。

B. 研究方法：本研究計画では粘膜免疫と感染症研究の領域で先導的立場にある東京大学、大阪大学、国立国際医療センター研究所、北里研究所、ヒゲタ研究所（プロテインエクスプレス）からなる産学協同研究開発体制をプラットフォームとして『粘膜ワクチン』の実現化へ向けた「粘膜アジュバント」を中心とした基礎研究を平成13年度から15年度まで推進した。清野班は第一世代粘膜アジュバントmCTと第二世代粘膜アジュバントmCTA/LTBに関して安全性と粘膜免疫増強効

A. 研究目的：粘膜ワクチン実現化に向けて不可欠と言われる「粘膜アジュバント」開発に向けての基礎研究を進めた。そこで、我々が開発してきた無毒化変異型CT(mCT)を中心として、その改良型、キメラ分子(mCTA/LTB)、

果について培養系と小動物（マウス）を使って検討を進めた。田村班は、mCTの脳毒性など副作用についての検討とmCTとmCTA/LTBによる感染防御免疫誘導効果についての解析を行った。高木班は、無毒化毒素由来アジュバント(mCT・mCT/LTB)の実用化に向けて*B. brevis* 大量生産システム系の確立を目指した。駒瀬班は、無毒化毒素由来アジュバントの大量生産系確立に向けてmCT用大腸菌発見ベクタープラスミットの開発を試みた。濱端班は、より安全で効果のある毒素由来アジュバント開発に向けて、CTアジュバント合成ペプチド作成の研究を展開した。

C.研究結果：粘膜アジュバントとして期待されている mCT は大腸菌発現ベクター(pUC119)を使って産生してきたが、その回収率は低い。そこで、*B. brevis* 発現ベクター(HPD31-M3)のシステムを応用した大量培養系の確立に向けて研究を進めた。また、その発現システムを利用して世界に先駆けてmCTAとLTBキメラ分子(mCTA/LTB)という第二世代粘膜アジュバント開発に成功した。一方で、大腸菌発現用プロモーターの選択・改良とCT遺伝子のシグナル配列を改良する事で大腸菌を使つてのmCT産生向上にも道筋をつけた。さらに、CTのアジュバント活性を担う部位の特定を試み、その合成ペプチドの利用について検討してきた。

平成13年度

プロテインエクスプレス・高木班は、*B. brevis* 発現ベクターシステムを応用し mCTA/LTBキメラ型アジュバントの開発に成功した。その粘膜アジュバント効果を確認するために、東京大学医科学研究所（清野班）と大阪大学微生物病研究所（田村班）で同時に動物実験

を開始した。ワクチン抗原として清野グループは破傷風類毒素(TT)そして田村班のグループはインフルエンザを使って検討を進めた。ワクチン抗原と mCTA/LTB を混合したものを実験用マウスに経鼻免疫して抗原特異的免疫応答の誘導を粘膜系と全身系免疫機構で解析し、その免疫増強効果を確認することができた。

平成14年度

mCTA/LTBキメラ分子の安全性を腸管結紮ループ試験、cAMP誘導性試験、ADPリボシルトランスフェラーゼ試験、CHO試験などの *in vivo*, *in vitro* 両実験系を駆使して検討し、確認した。北里グループが改良した大腸菌発現ベクターを応用した変異型 CT (mCT) 発現用プラスミドの設計・構築に成功し、大腸菌を使つた mCT の大量生産が可能となった。さらに、mCT (E112K)併用インフルエンザ経鼻ワクチンにより、感染防御効果のある抗原特異的上気道 IgA と IgG 誘導が確認できた。

平成15年度

最終年度は、2年間の基礎的解析結果を基盤としてヒトへの応用化に向けての実験を展開した。新規粘膜アジュバントである mCT と、キメラ型 mCTA/LTB には抗原特異的 IgA 誘導効果だけでなく傷害性 T 細胞免疫誘導性を確認する事が出来た。また、毒素由来 Th1型・Th2型アジュバント効果に B サブユニット部分が関与する可能性が示唆された。これらの結果を踏まえてヒトへの応用化を目指して、まずサル系の系を使って最初に mCT の粘膜アジュバント効果を検討する実験を開始した。数匹ではあるが、ヒトに近い霊長類においても粘膜アジュバント効果が期待される興味ある結果を得ている。

D.考察：3年間の本研究計画が終了するにあたり、国内・国際共同研究から下記の成果を上げることが出来た。

- 1) コレラ毒素 (CT) に粘膜アジュバント効果があることに注目し、生命・遺伝子工学の手法を導入して無毒化変異型 CT (mCT) を開発してきた。その免疫増強効果を確認し、さらにワクチン抗原 (例、破傷風類毒素、インフルエンザ、ジフテリア、ペロ毒素、Streptococcus) と併用して経鼻免疫することにより、感染防御免疫が誘導できることを確認した。
- 2) mCT の粘膜アジュバント効果を老化マウスで確認することが出来た。
- 3) mCT 開発で得られた結果を基盤として、CT に匹敵する病原性大腸菌由来易熱性毒素 (LT) 各々の利点を人工的合体させた第2世代粘膜アジュバント候補であるキメラ型mCT/LTB の開発に成功した。その安全性と感染防御免疫誘導能も確認した。さらに、実用化に向けた大量産生系の確立にも成功した。
- 4) キメラ型毒素 (CTA/LTB・LTA/CTB) を駆使してその粘膜アジュバント効果について検討し、各々のBサブユニットに Th1 型・Th2 型免疫応答誘導能が依存する事を強く示唆する結果を得た。これらの成果を踏まえて、ヒトへの実用化を目指して、第一世代粘膜アジュバントmCT の霊長類での検討を開始する事ができた。これらの結果からも分かる様に、本研究計画をとおして第一世代としての mCT そして第二世代としての mCTA/LTB の開発とその粘膜アジュバントとしての検討が大きな成果だろ

う。「粘膜ワクチン」の実現化に向けて、現在までに大きく分けて2つの粘膜アジュバント開発研究の流れがある。コレラ菌由来のコレラ毒素(CT)と大腸菌由来の易熱性毒素(LT)には、粘膜免疫の主役である分泌型IgA誘導増強効果がある事が1980年代に報告された。そこで、そのアジュバント効果を維持しながら毒素原性の欠損した無毒化変異型毒素の開発が日欧米を中心として進められている。現在までに生物活性の中心であるADPリボシルトランスフェラーゼが存在するCTAもしくはLTAのサブユニットに遺伝子改変やアミノ酸置換を導入した様々なmCTやmLTが報告されている。例えば、1990年代後半からLTAに遺伝子改変を導入した様々なmLT(例：R7K, S63K, R192G, LTR72, E112K)が米国のClements (Infect. Immun 63 : 1617, 1995) やイタリアのRappuoli (J. Exp. Med. 187 : 1123, 1998)らのグループが中心となって研究が進んでいる。一方、mCTに関しては、我々の研究グループが先導的役割を果たしており、他の追随を許してこなかった。特にS61FとE112Kに関しては毒性が欠損した有効な粘膜アジュバントとして内外の評価を受けている。さらに、mCTの改良型分子としてmCTAとLTBのキメラ分子(mCTA/LTB)の開発が世界に先駆けて行う事が出来た。つまりLTBがCTBより宿主細胞膜分子への結合部位が多いという事実をもとにして、よりアジュバント効果が高く毒性の欠損していると考えられるmCTA/LTBキメラ型粘膜アジュバントを作成する事でヒトへの応用に向け開発・研究の道をさらに広げていく事が出来た。

E.結論：第一世代粘膜アジュバントであるm

CTに関しては、培養系と小動物を駆使した実験系によりその粘膜免疫増強効果の確認とその細胞・分子レベルでのメカニズムの解明が進んだ。その結果を基盤としてヒトへの応用性を検討する為にヒトにより近い霊長類での検討を開始しており、一部のサルではその粘膜免疫増強効果が認められており、今後の展開が期待される。一方、当研究班が日本発で開発したキメラ型mCTA/LTB に関しては、その粘膜アジュバント効果をマウスモデルで確認した。さらにその一連の実験効果からmCTA/LTB には感染阻止効果のある免疫応答誘導賦活作用がある事も確認できた。今後はその結果を基盤としてその細胞・分子レベルでの免疫増強効果の解明とヒトへの応用に向けた研究を推進する大きな道筋をつけていく予定である。

F.健康危険情報：特になし

G.研究発表（発表論文リスト）

1. Saito, M., Otake, S., Ohmura, M., Hirasawa, M., Takeda, K., Mega, J., Takahashi, I., Kiyono, H., McGhee, J.R., Takeda, Y. and Yamamoto, M. 2001. *Protective immunity to Streptococcus mutans induced by nasal vaccination with surface protein antigen and mutant cholera toxin adjuvant.* J. Infect. Dis. 183: 82-826.
2. Byun, Y., Ohmura, M., Fujihashi, K., Yamamoto, S., McGhee, J.R., Udaka, S., Kiyono, H., Takeda, Y., Kohsaka, T. and Yuki, Y. 2001. Nasal immunization with *E. coli* verotoxin 1 (VT1)-B subunit and a nontoxic mutant of cholera toxin elicits serum neutralizing antibodies. *Vaccine* 19: 2061-2070.
3. Hodge, L.M., Marinaro, M., Jones, H.P., McGhee, J.R., Kiyono, H. and Simecka, J.W. 2001. IgA responses and IgE associated inflammation along the respiratory tract after mucosal but not systemic immunization. *Infect. Immun.* 69: 2328-2338.
4. Kim, J-K., Takahashi, I., Okuda, Y., Itakura, M., McGhee, J.R. and Kiyono, H. 2001. T cell receptor dynamism of mucosal and systemic CD4⁺T cells in the course of an immune response to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Infect. Dis.* 184: 43-51.
5. Kim, J-K., Takahashi, I., Kai, Y. and Kiyono, H. 2001. Influence of enterotoxin on mucosal intranet: selective inhibition of extrathymic T cell development in intestinal intraepithelial lymphocytes by oral exposure to heat-labile toxin. *Eur. J. Immunol.* 31: 2960-2969.
6. Jones, H.P., Hodge, L.M., Fujihashi, K., Kiyono, H., McGhee, J.R. and Simecka, J.W. 2001. The pulmonary environment promotes Th2 cell responses after nasal-pulmonary immunization with antigen alone, but Th1 responses are induced during instances of intense immune stimulation. *J. Immunol.* 167:4518-4526.
7. Ohmura, M., Yamamoto, M., Kiyono, H., Fujihashi, K., Takeda, Y. and McGhee, J.R. 2001. Highly purified mutant

- E112K of cholera toxin elicits protective lung mucosal immunity to diphtheria toxin. *Vaccine* 20: 756-762.
8. Hagiwara, Y., Iwasaki, T., Asanuma, H., Sato, Y., Sata, T., Aizawa, C., Kurata, T., and Tamura, S-I. 2001. Effects of intranasal administration of cholera Toxin (or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain. 2001. *Vaccine* 19: 1652-1660.
 9. Yuki, Y., Byun, Y., Fujita, M., Jaurigue, M., Izutani, W., Suzuki, T., Udaka, S., Fujihashi, K., McGhee, J.R. and Kiyono, H. 2001. Production of a recombinant hybrid molecule of cholera toxin-B-subunit and protelipid-protein-peptide for the treatment of experimental encephalomyelitis. *Biotech.Bioeng.* 74: 62-69.
 10. Kunisawa, J., Nakanishi, T., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Nagagawa, S., Kiyono, H., and Mayumi, T. 2001. Novel antigen delivery system using Fusogenic liposome for the induction of mucosal and systemic immune responses. *J. Immunol.* 167(3): 1406-1412.
 11. Fujihashi, K., Dohi, T. Rennert, P.D., Yamamoto, M., Koga T., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 2001. Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 3310-3315.
 12. Yura, M., Takahashi, I., Serada, M., Koshino, T., Nakagami, K., Yuki, Y. and Kiyono, H. 2001. Role of MOG-stimulated Th1 type "light-up"(GFP+) CD4+ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Autoimmunity* 17: 17-25.
 13. Yura, M., Takahashi, I., Terawaki, S., Hiroi, T., Kweon, M-N, Yuki, Y. and Kiyono, H. 2001. Nasal administration of cholera toxin (CT) suppresses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Vaccine* 12: 134-139.
 14. Dohi, T., Rennert, P.D., Fujihashi, K., Kiyono, H., Shirai, Y., Kawamura, Y.I., Browning, J.L. and McGhee, J.R. 2001. Elimination of colonic patches with lymphotoxin β receptor-Ig prevents Th2 cell-type colitis. *J.Immunol.* 167: 2781-2790.
 15. Sakaue, G., Shimaoka, M., Fukuoka, T., Hiroi, T., Inoue, T., Sakaguchi, T., Sawa, Y., Morishita, T., Kiyono, H. and Mashimo, T. 2001. NF-kB "decoy" suppresses cytokine expression and thermal hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *Neuroreport* 12: 2079-2084.
 16. Simizu, M., Minakuchi, K., Tsuda, A., Hiroi, T., Tanaka, N., Koga, J. and Kiyono, H. 2001. A role of stem cell factor and *c-kit* signaling for the organogenesis of intestine: regulation of fetal intestinal epithelial cell adhesion

- to fibronectin. *Exp. Cell Res.* **266**: 311-322.
17. Hiroi, T., Goto, H., Someya, K., Yanagita, M., Honda, M., Yamanaka, N. and Kiyono, H. 2001. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with rBCG-V3F1 induces a long-term V3J1-peptide-specific neutralizing immunity in Th1 and Th2 deficient conditions. *J. Immunol.* **167**:5862-5867.
 18. Imaoka, H., Shimaoka, M., Matsuura, N., Nishimura, M., Ohta, N. and Kiyono, H. 2001. Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophag activation, and TGF- β 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Anesth Analg.* **92**: 428-436
 19. Ohta, N., Shimaoka, M., Imanaka, H., Nishimura, M., Tanaka, N. and Kiyono, H. 2001. Steroid attenuates ventilator-induced lung injury. *Crit. Care Med.* **29**: 1012-1016.
 20. Asahi, Y., Yoshikawa, T., Watanabe, I., Iwasaki, T., Hasegawa, H., Sato, Y., Shimada, S., Nanno, M., Matsuoka, Y., Ohwaki, M., Iwakura, Y., Suzuki, Y., Aizawa, C., Sata, T., Kurata, T., and Tamura, S. 2002. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor-knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. 2002. *J. Immunol.* **168**: 2930-2938.
 21. Kweon, M-N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., F.W. van Ginkel, Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., McGhee, J.R., and Kiyono, H. 2002. A non-toxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE Ab. *J. Infect. Dis.* **186**: 1261:1269.
 22. Fukuyama, S., Hiroi, T., Yokota, Y., Rennert, P.D., Yanagita, M., Kinoshita, N., Terawaki, S., Shikina, T., Yamamoto, M., Kurono, Y. and Kiyono, H. 2002. NALT organogenesis is independent of the IL-7R, L α 1b2/LT β R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3⁺CD4⁺CD45⁺ cells. *Immunity* **17**:31-40.
 23. Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J. and Kiyono, H. 2002. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160 enapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses. *J.Immunol.* **170**: 495-502.
 24. Watanabe, I., Hagiwara, Y., Kadowaki, S., Yoshikawa, T., Komase, K., Aizawa, C., Kiyono, H., Takeda, Y., McGhee, J.R., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T. and Tamura, S. 2002. Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). *Vaccine* **20**: 3443:3455.
 25. Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K.,

- Takahashi, M., Watanuki, M., Tanaka, R., Tanaka, T., Hamabata, T., Yamasaki, S., and Takeda, Y. 2001. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 infection in infant rabbits. *Infect. Immun.* 69: 1101-1108.
26. Kawahara, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Hiroi, T., Kiyono, H., Matsumoto, S., Yamada, T., Yamamoto, N. and Honda, M. 2002. Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. *Vaccine* 21: 158-66.
27. Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., Yamamoto, H. and Ishikawa, H. 2002. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J. Immunol.* 168: 57-64.
28. Hamabata, T., Tanaka, T., Shima, T., Ozawa, A., Sato, T. and Takeda, Y. 2002. Genetic variation in the flanking regions of Shiga toxin 2 gene in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 isolated in Japan. 2002. *FEMS Microb. Lett.* 215: 229-236.
29. Hamabata, T., Liu, C. and Takeda, Y., 2002. Positive and negative regulation of water channel aquaporins in human small intestine by cholera toxin. 2002. *Microbial Pathogen* 32: 271-277.
30. Kunisawa, J., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Hiroi, T., Nakagawa, S., Kiyono, H. and Mayumi, T. 2002. Lack of antigen-specific immune responses in anti-IL-7 α antibody-treated Peyer's patch-null mice following intestinal immunization with microencapsulated antigen. *Eur. J. Immunol.* 32: 2347-2355.
31. Ohta, N., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kinoshita, N., Jang, M-H., Miyazaki, J. and Kiyono, H. 2002. IL-15 induced CD8 $\alpha\beta$ ⁺ NK1.1⁺ T cells in the development of small intestinal inflammation in T3bIL-15 Tg mice. *J. Immunol.* 169: 460-468.
32. Kinoshita, N., Hiroi, T., Ohta, N., Fukuyama, S., E.J.Park and Kiyono, H. 2002. Autocrine IL-15 mediates intestinal epithelial cell death via the activation of neighboring intraepithelial NK cells. *J. Immunol.* 169: 6187-6192.
33. Kweon, M-N., Takahashi, I., Yamamoto, M., Jang, M-H., Suenobu, N. and Kiyono, H. 2002. Development of antigen-induced interocolitis in SCID mice reconstituted with spleen-derived memory type CD4⁺ CD45RB⁺ T cells.

- Gut 50: 299-306.
34. Yanagita, M., Shimabukuro, Y., Nozaki, T., Yoshimura, N., Watanabe, J., Koide, H., Terakura, M., Saho, T., Takedachi, M., Jang, M-H., Kiyono, H. and Murakami, S. 2002. IL-15 up-regulates iNOS expression and no production by gingival epithelial cells. *Biochem. Biophysical. Res. Commun.* 297: 329-334.
 35. Takahashi, I., Matsuda, J., Gapin, L., DeWinter, H., Kai, Y., Tamagawa, H., Kronenberg, M. and Kiyono, H. 2002. Colitis-related public T cells are selected in the colonic lamina propria of IL-10 deficient mice. *Clin. Immunol.* 102 (3): 237-248
 36. Ueta, M., Kweon, M-N., Sano, Y., Sotozono, C., Yamada, J., Koizumi, N., Kiyono, H. and Kinoshita, S. 2002. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 129: 464-470.
 37. Suenobu, N., Kweon, M-N and Kiyono, H. 2002. Nasal vaccination induces the ability to eliminate *Candida* colonization without influencing the pre-existing antigen-specific IgE Abs: a possibility for the control of *Candida*-related atopic dermatitis. *Vaccine* 20: 2972-2980.
 38. Kweon, M-N, and Kiyono, H. 2002. CD40L in auto immunity and mucosally induced tolerance. *J. Clin. Invest.* 109: 171-173.
 39. Yoshikawa, T., Suzuki, Y., Nomoto, Akio., Sata, Tetutarō, Kurata, T., Tamura, S. 2002. Antibody responses and protection against influenza virus infection in different congenic strains of mice immunized intranasally with adjuvant-combined A/Beijing/262/95(H1N1). *Vaccine* 21: 60-66
 40. Boyaka, P.N., Ohmura, M., Fujihashi, K., Koga, T. Yamamoto, M., Kweon, M-N, Takeda, Y., Jackson, R.J., Yuki, Y. and Kiyono, H. 2003. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J. Immunol.* 170: 454-462.
 41. Hagiwara, Y., McGhee, J.R., Fujihashi, K., Kobayashi, R., Yoshino, N., Kataoka, K., Etani, Y., Kweon, M-N., Tamura, S., Kurata, T., Takeda, Y., Kiyono, H. and Fujihashi, K. 2003. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4+T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J. Immunol.* 15: 1754-1762.
 42. Yuki, Y. and Kiyono, H. 2003. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev. Med. Virol.* 13: 293-310
 43. Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, J-K., Ohta, N., Iwatani, K., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kawano, S., Sasaki, Y., Hori, M., Takeda, K., Akira, S. and Kiyono, H.

2003. Development of colitis in STAT6-deficient TCR $\alpha^{-/-}$ mice: A potential of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4+ $\beta\beta$ T cells. *Am.J.Pathol.* 162: 263-271.
44. Kobayashi, M., Kweon, M-N., Kuwata, H., Schreiber, R.D., Kiyono, H., Takeda, K., and Shizuo, A. 2003. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes Chronic enterocolitis in myeloid cell-specific STAT3-deficient mice. *J.Clin.Invest.* 111:1297-1308.
45. Tamagawa, H., Takahashi, I., Furuse, M., Yoshitake-Kitano, Y., Tsukita, S., Itoh, T., Matsuda, H. and Kiyono, H. 2003. Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer's patches: Preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region. *Lab. Invest.* 83: 1045-1053.
46. Jan, M-H., Kweon, M-N., Hiroi, T. Yamamoto, M., Takahashi, I. And Kiyono, H. 2003. Induction of cytotoxic T lymphocyte responses by cholera toxin-treated bone marrow-derived dendritic cells. *Vaccine* 21: 1613-1619.
47. Kweon, M-N. and Kiyono, H. 2003. Eosinophilic gastroenteritis: a problem of the mucosal immune system? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3: 79-85.
48. Park, E.J., Takahashi, I., Ikeda, J., Kawahara, K., Okamoto, T., Kweon, M-N, Fukuyama, S., Groh, V., Spies, T., Obata, Y., Miyazaki, J. and Kiyono, H. 2003. Clonal expansion of double-positive (DP) IELs by MICA expressed in mouse small intestinal epithelium. *J. Immunol.* 171:4131-4139.
49. Hanagata, H., Shida, O., and Takagi, H. 2003. Taxonomic homogeneity of a salt-tolerant lactic acid bacteria isolated from shoyu mash. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49: 95-100C
50. Kawamura, YI., Kawashima, R., Shirai, Y., Kato, R., Hamabata, T., Yamamoto, M., Furukawa, K., Fujihashi, K., McGhee, JR., Hayashi, H., and Dohi, T. 2003. Cholera toxin activates dendritic cells through dependence on GM1-ganglioside which is mediated by NF-kB translocation. 2003. *Eur. J. Immunol.* 33: 2305-3212.
51. Sato, T., Shimizu, T., Watarai, M., Kobayashi, M., Kano, S., Hamabata, T., Takeda Y, Yamasaki S. Genome analysis of a novel Shiga toxin 1 (Stx1)-converting phage which is closely related to Stx2-converting phages but not to other Stx1-converting phages. *J. Bacteriol.* 185: 3966-3971, 2003.
52. Ito, R., Ozaki-Asahi, Yasuko., Yoshikawa, T., Hasegawa, H., Sato, Y., Suzuki, Y., Inoue, R., Morishima, T., Kondo, N., Sata, T., Kurata, T., Tamura, S. 2003. Roles anti-hemagglutinin IgA and IgG antibodies in different sites of the respiratory tract of vaccinated mice in preventing lethal influenza pneumonia. *Vaccine* 21: 2362-2371
53. Shimizu, K., Asahara, T., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Ozawa, A., and Takeda Y. 2003. Development of

a lethal Shiga toxin-producing
Escherichia coli-infection mousemodel
using multiple mitomycin C treatment.
Microbial Pathogen. 35: 1-9.

54. Shimizu, T., Hamabata, T., Yoshiki, A.,
Hori, T., Ito, S., Takeda, Y. and
Hayashi, H. 2003. An association of
27- and 40-kDa molecules with
glycolipids that bind A-B bacterial
enterotoxins to cultured cells.
Biochimi. Biophys. Acta 1612:186-194

分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

経鼻アジュバントとしてのミュータントコレラ毒素 (mCT) の有効性と安全性

分担研究者 清野 宏 東京大学医科学研究所・炎症免疫分野

研究協力者 藤橋 浩太郎 吉野 直人 萩原由加利・アラバマ大学バーミンハム校

研究要旨

アジュバントは粘膜ワクチン開発のために必須であり、その有効性と安全性が大きな課題となっている。そこで、新規粘膜アジュバントとして期待される無毒化ミュータントコレラ毒素 (mCT) の経鼻ワクチンへの応用を踏まえ、その有効性と安全性の臨床前実験をアカゲザルを用いて行った。抗原はHIV-1のgp120を用い、粘膜アジュバントmCT E112Kと共に経鼻免疫したところ、抗原特異的抗体が血清中と粘膜分泌液中に誘導された。また今後の安全性検討を踏まえて嗅球組織における毒性を神経成長因子 (Nerve Growth Factor- β 1, NGF- β 1) の発現を指標に検討したところ、mCT E112Kによる毒性は確認できなかった。

A. 研究目的

生体の第一線の防御バリアーとして機能している粘膜免疫機構を有効に応用した次世代ワクチンとして期待される『粘膜ワクチン』の開発は内外で注目されている。特に経鼻ワクチンは、各種のワクチン抗原を用いた動物実験において優れた成績を収め、既存のワクチンに比して多くの利点を有するため、臨床応用への期待が高まっている。粘膜免疫応答の誘導には、アジュバントを用いることが効果的であり、必須条件といっても過言ではない。しかし、細菌外毒素に代表される粘膜アジュバントを用いた経鼻ワクチンはその有効性に反し、嗅神経上皮への結合そしてそれに引き続く嗅球及び脳神経系への影響が懸念され、事実、初期臨床試験ではベル麻痺（片側性顔面筋不全麻痺または完全麻痺）などの副作用が確認されている。そこで有効で安全な粘膜アジュバントの開発のため、我々

が開発した無毒化mCT E112Kに着目し、その臨床応用への可能性をその有効性と安全性を踏まえ、アカゲザルを用いて検討した。

B. 研究方法

抗原はHIV-1gp120 (100 μ g) を用い、異なる量 (25または100 μ g) のmCT E112Kを粘膜アジュバントとした単純混和液をアカゲザルに0、7、14、28、42、56日に経鼻投与した。コントロール群には同様の免疫日程で、gp120単独または、gp120と自然型CTの混和液を経鼻免疫した。最終免疫より7-14日後に血清及び粘膜分泌液を採取し、抗原特異抗体価をELISA法にて測定した。神経組織における炎症の有無は嗅球組織を分離し、その凍結組織切片におけるNGF- β 1の発現によって確認した。

C. 研究結果

ワクチン抗原としてHIV-1 gp120を用い、25

μgのmCTとともに経鼻免疫を行ったところ、血清中や粘膜分泌液中における顕著な抗原特異的抗体価は誘導されずそのアジュバント効果は確認できなかった(図1)。一方、100 μgのmCTを経鼻アジュバントとして用いた群では、顕著な抗原特異的IgGとIgA抗体価の上昇が血清中に認められた(図1)。これは自然型CTを用いた場合に誘導される免疫応答と比して遜色のないことが明らかとなった。また、粘膜分泌液中の抗原特異的IgA抗体価の上昇も認められた。特筆すべき点として、経鼻洗浄液、血清中に誘導されたgp120特異抗体にはHIV-1ウィルスに対する中和活性があることも判明した。これらの結果は、経鼻免疫によるmCTの粘膜アジュバント活性がヒトに近いアカゲザルにおいても効果的であり、その臨床応用への可能性を強く示唆する者である。次に、脳神経系に与える影響についても検討を加えるため、嗅球組織における脳・神経細胞組織の炎症の指標となるNGF-β1の発現を調べた。抗原であるgp120単独投与群やmCTを経鼻アジュバントとして用いた群では嗅球にはNGF-β1の発現が誘導されず、毒性が低いことが示唆された。これに反し、自然型CT投与群では顕著なNGF-β1の発現が認められた。これらの事実は、mCTが経鼻アジュバントとして有効であり、かつ脳神経系への影響がきわめて少なくその安全性を強く示唆している。

D. 考察

現在まで、mCTに代表される無毒化した細菌外毒素を粘膜アジュバントとして用いた場合の有効性が報告されているが、マウスなどの実験小動物に限られている。臨床応用に向

けた経鼻アジュバントの開発には、その有効性と安全性という2つの重要な課題を同時に乗り越えなければならない。今回我々が示したアカゲザルを用いたmCTの経鼻アジュバントとしての有効性と安全性は、ヒトに近い霊長類(サル)を用いた初めての報告であり、ヒト臨床試験への可能性を強く裏付けるものである。またmCTの経鼻アジュバントとしての有効指摘濃度が100 μgであり、25μgでは無効であることが明らかになったことも有意義といえよう。つまり、アカゲザルにおける有効指摘濃度からmCTをヒト臨床試験に用いる場合の有効指摘濃度が容易に導き出せるからである。

E. 結論

粘膜ワクチンのためのmCT E112Kはヒト臨床応用に向けた有効性と安全性を兼ね備えた経鼻アジュバントの第一候補の1つである。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. Saito, M., Otake, S., Ohmura, M., Hirasawa, M., Takeda, K., Mega, J., Takahashi, I., Kiyono, H., HcGhee, J.R., Takeda, Y. and Yamamoto, M. 2001. *Protective immunity to Streptococcus mutans induced by nasal vaccination with surface protein antigen and mutant cholera toxin adjuvant.* J. Infect. Dis. **183**: 82-826.
2. Byun, Y., Ohmura, M., Fujihashi, K.,

- Yamamoto, S., McGhee, J.R., Udaka, S., **Kiyono, H.**, Takeda, Y., Kohsaka, T. and Yuki, Y. 2001. Nasal immunization with *E. coli* verotoxin 1 (VT1)-B subunit and a nontoxic mutant of cholera toxin elicits serum neutralizing antibodies. *Vaccine* 19: 2061-2070.
3. Hodge, L.M., Marinaro, M., Jones, H.P., McGhee, J.R., **Kiyono, H.** and Simecka, J.W. 2001. IgA responses and IgE associated inflammation along the respiratory tract after mucosal but not systemic immunization. *Infect. Immun.* 69: 2328-2338.
 4. Kim, J-K., Takahashi, I., Okuda, Y., Itakura, M., McGhee, J.R. and **Kiyono, H.** 2001. T cell receptor dynamism of mucosal and systemic CD4⁺T cells in the course of an immune response to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Infect. Dis.* 184: 43-51.
 5. Kim, J-K., Takahashi, I., Kai, Y. and **Kiyono, H.** 2001. Influence of enterotoxin on mucosal intranet: selective inhibition of extrathymic T cell development in intestinal intraepithelial lymphocytes by oral exposure to heat-labile toxin. *Eur. J. Immunol.* 31: 2960-2969.
 6. Jones, H.P., Hodge, L.M., Fujihashi, K., **Kiyono, H.**, McGhee, J.R. and Simecka, J.W. 2001. The pulmonary environment promotes Th2 cell responses after nasal-pulmonary immunization with antigen alone, but Th1 responses are induced during instances of intense immune stimulation. *J. Immunol.* 167:4518-4526.
 7. Ohmura, M., Yamamoto, M., **Kiyono, H.**, Fujihashi, K., Takeda, Y. and McGhee, J.R. 2001. Highly purified mutant E112K of cholera toxin elicits protective lung mucosal immunity to diphtheria toxin. *Vaccine* 20: 756-762.
 8. Hagiwara, Y., Iwasaki, T., Asanuma, H., Sato, Y., Sata, T., Aizawa, C., Kurata, T., and **Tamura, S-I.** 2001. Effects of intranasal administration of cholera Toxin (or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin) B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin on the brain. 2001. *Vaccine* 19: 1652-1660.
 9. Yuki, Y., Byun, Y., Fujita, M., Jaurigue, M., Izutani, W., Suzuki, T., Udaka, S., Fujihashi, K., McGhee, J.R. and **Kiyono, H.** 2001. Production of a recombinant hybrid molecule of cholera toxin-B-subunit and protelipid-protein-peptide for the treatment of experimental encephalomyelitis. *Biotech.Bioeng.* 74: 62-69.
 10. Kunisawa, J., Nakanishi, T., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Nagagawa, S., **Kiyono, H.**, and Mayumi, T. 2001. Novel antigen delivery system using Fusogenic liposome for the induction of mucosal and systemic immune responses. *J. Immunol.* 167(3): 1406-1412.
 11. Fujihashi, K., Dohi, T. Rennert, P.D., Yamamoto, M., Koga T., **Kiyono, H.** and

- McGhee, J.R. 2001. Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 3310-3315.
12. Yura, M., Takahashi, I., Serada, M., Koshino, T., Nakagami, K., Yuki, Y. and **Kiyono, H.** 2001. Role of MOG-stimulated Th1 type "light-up"(GFP⁺) CD4⁺ T cells for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Autoimmunity* 17: 17:25.
13. Yura, M., Takahashi, I., Terawaki, S., Hiroi, T., Kweon, M-N, Yuki, Y. and **Kiyono, H.** 2001. Nasal administration of cholera toxin (CT) suppresses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Vaccine* 12: 134:139.
14. Dohi, T., Rennert, P.D., Fujihashi, K., **Kiyono, H.**, Shirai, Y., Kawamura, Y.I., Browning, J.L. and McGhee, J.R. 2001. Elimination of colonic patches with lymphotoxin β receptor-Ig prevents Th2 cell-type colitis. *J.Immunol.* 167: 2781-2790.
15. Sakaue, G., Shimaoka, M., Fukuoka, T., Hiroi, T., Inoue, T., Sakaguchi, T., Sawa, Y., Morishita, T., **Kiyono, H.** and Mashimo, T. 2001. NF-kB "decoy" suppresses cytokine expression and thermal hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *Neuroreport* 12: 2079-2084.
16. Simizu, M., Minakuchi, K., Tsuda, A., Hiroi, T., Tanaka, N., Koga, J. and **Kiyono, H.** 2001. A role of stem cell factor and *c-kit* signaling for the organogenesis of intestine: regulation of fetal intestinal epithelial cell adhesion to fibronectin. *Exp. Cell Res.* 266: 311-322.
17. Hiroi, T., Goto, H., Someya, K., Yanagita, M., Honda, M., Yamanaka, N. and **Kiyono, H.** 2001. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with rBCG-V3F1 induces a long-term V3J1-peptide-specific neutralizing immunity in Th1 and Th2 deficient conditions. *J. Immunol.* 167:5862-5867.
18. Imaoka, H., Shimaoka, M., Matsuura, N., Nishimura, M., Ohta, N. and **Kiyono, H.** 2001. Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophag activation, and TGF- β 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Anesth Analg.* 92: 428-436
19. Ohta, N., Shimaoka, M., Imanaka, H., Nishimura, M., Tanaka, N. and **Kiyono, H.** 2001. Steroid attenuates ventilator-induced lung injury. *Crit. Care Med.* 29: 1012-1016.
20. Kweon, M-N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., F.W. van Ginkel., Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., McGhee, J.R., and **Kiyono, H.** 2002. A non-toxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE Ab. *J. Infect. Dis.* 186: 1261:1269.
21. Fukuyama, S., Hiroi, T., Yokota, Y., Rennert, P.D., Yanagita, M., Kinoshita, N., Terawaki, S., Shikina, T., Yamamoto, M., Kurono, Y.

- and **Kiyono, H.** 2002. NALT organogenesis is independent of the IL-7R, L α 1b2/LT β R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3⁻CD4⁺CD45⁺ cells. *Immunity* 17:31-40.
22. Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J. and **Kiyono, H.** 2002. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses. *J.Immunol.* 170: 495-502.
23. Watanabe, I., Hagiwara, Y., Kadowaki, S., Yoshikawa, T., Komase, K., Aizawa, C., **Kiyono, H.**, Takeda, Y., McGhee, J.R., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T. and Tamura, S. 2002. Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). *Vaccine* 20: 3443:3455.
24. Kawahara, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Hiroi, T., **Kiyono, H.**, Matsumoto, S., Yamada, T., Yamamoto, N. and Honda, M. 2002. Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. *Vaccine* 21: 158-66.
25. Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., **Kiyono, H.**, Yamamoto, H. and Ishikawa, H. 2002. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J.Immunol.* 168: 57-64.
26. Kunisawa, J., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Hiroi, T., Nakagawa, S., **Kiyono, H.** and Mayumi, T. 2002. Lack of antigen-specific immune responses in anti-IL-7 α antibody-treated Peyer's patch-null mice following intestinal immunization with microencapsulated antigen. *Eur. J. Immunol.* 32: 2347-2355.
27. Ohta, N., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kinoshita, N., Jang, M-H., Miyazaki, J. and **Kiyono, H.** 2002. IL-15 induced CD8 $\alpha\beta$ ⁺ NK1.1⁺T cells in the development of small intestinal inflammation in T3b⁻IL-15 Tg mice. *J. Immunol.* 169:460-468.
28. Kinoshita, N., Hiroi, T., Ohta, N., Fukuyama, S., E.J.Park and **Kiyono, H.** 2002. Autocrine IL-15 mediates intestinal epithelial cell death via the activation of neighboring intraepithelial NK cells. *J. Immunol.* 169: 6187-6192.
29. Kweon, M-N., Takahashi, I., Yamamoto, M., Jang, M-H., Suenobu, N. and **Kiyono, H.** 2002. Development of antigen-induced interocolitis in SCID mice reconstituted with spleen-derived memory type CD4⁺

- CD45RB⁺T cells. *Gut* 50: 299-306.
30. Yanagita, M., Shimabukuro, Y., Nozaki, T., Yoshimura, N., Watanabe, J., Koide, H., Terakura, M., Saho, T., Takedachi, M., Jang, M-H., **Kiyono, H.** and Murakami, S. 2002. IL-15 up-regulates iNOS expression and no production by gingival epithelial cells. *Biochem. Biophysical. Res. Commun.* 297: 329-334.
 31. Takahashi, I., Matsuda, J., Gapin, L., DeWinter, H., Kai, Y., Tamagawa, H., Kronenberg, M. and **Kiyono, H.** 2002. Colitis-related public T cells are selected in the colonic lamina propria of IL-10 deficient mice. *Clin. Immunol.* 102 (3): 237-248
 32. Ueta, M., Kweon, M-N., Sano, Y., Sotozono, C., Yamada, J., Koizumi, N., **Kiyono, H.** and Kinoshita, S. 2002. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 129: 464-470.
 33. Suenobu, N., Kweon, M-N and **Kiyono, H.** 2002. Nasal vaccination induces the ability to eliminate *Candida* colonization without influencing the pre-existing antigen-specific IgE Abs: a possibility for the control of *Candida*-related atopic dermatitis. *Vaccine* 20: 2972-2980.
 34. Kweon, M-N, and **Kiyono, H.** 2002. CD40L in auto immunity and mucosally induced tolerance. *J. Clin. Invest.* 109: 171:173.
 35. Boyaka, P.N., Ohmura, M., Fujihashi, K., Koga, T. Yamamoto, M., Kweon, M-N, Takeda, Y., Jackson, R.J., Yuki, Y. and **Kiyono, H.** 2003. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J. Immunol.* 170: 454-462.
 36. Hagiwara, Y., McGhee, J.R., Fujihashi, K., Kobayashi, R., Yoshino, N., Kataoka, K., Etani, Y., Kweon, M-N., Tamura, S., Kurata, T., Takeda, Y., **Kiyono, H.** and Fujihashi, K. 2003. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4⁺T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J. Immunol.* 15: 1754-1762.
 37. Yuki, Y. and **Kiyono, H.** 2003. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev. Med. Virol.* 13: 293-310
 38. Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, J-K., Ohta, N., Iwatani, K., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kawano, S., Sasaki, Y., Hori, M., Takeda, K., Akira, S. and **Kiyono, H.** 2003. Development of colitis in STAT6-deficient TCR $\alpha^{-/-}$ mice: A potential of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4⁺ β T cells. *Am.J.Pathol.* 162: 263-271.
 39. Kobayashi, M., Kweon, M-N., Kuwata, H., Schreiber, R.D., **Kiyono, H.**, Takeda, K., and Shizuo, A. 2003. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40