

200400590A

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開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成17年（2005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開発に関する研究	
	清野 宏	1
II.	分担研究報告書	
	1. 粘膜アジュバント開発へ向けての基礎研究	
	清野 宏	17
	2. 経鼻不活化インフルエンザワクチンの抗体応答に及ぼす CpG-ODN の増強効果	
	田村 慎一	21
	3. ペプチド型アジュバントの開発	
	竹田 美文、濱端 崇	25
	4. <i>B. brevis</i> 発現系を使ったキメラ型アジュバント作成	
	高木 広明	29
	5. TLR をターゲットとした新規粘膜アジュバント開発	
	竹田 潔	33
	6. 新規無毒化コレラ毒素アジュバントによる粘膜免疫応答の誘導に関する研究	
	萩原 由香利	39
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	43
IV.	研究成果の刊行物・別刷	49

# 総括研究報告

厚生労働省科学研究費（新興・再興感染症研究事業）

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開発に関する研究

主任研究者	清野 宏	（東京大学医科学研究所 教授）
分担研究者	田村 慎一	（大阪大学微生物病研究所 客員教授）
	竹田 美文	（（株）シネサイエンス 所長）
	濱端 崇	（国立国際医療センター研究所 室長）
	高木 広明	（（株）プロテイン・エクスプレス）
	竹田 潔	（九州大学生体防御医学研究所 教授）
	萩原 由香利	（（社）北里研究所・生物製剤研究所）

研究要旨：粘膜ワクチン開発の基礎となるアジュバント開発に向けての基礎研究に関して、初年度は大きく分けて三つの柱的研究計画目的達成に向けての実験を推進した。つまり、1. CT由来無毒化変異型CT（mCT）の実用化へ向けての研究、2. ペプチド型合成アジュバント開発基礎研究、3. 自然免疫標的型粘膜アジュバント開発基礎研究である。mCTに関しては、ヒトへの応用を目指して霊長類での検討を進めた。さらに、安全性を追求する目的でmCTの改良型開発へ向けて2点変異型の作成とその生物活性検討も開始した。ペプチド型合成アジュバントについては、変異型を含めたCTのアジュバント活性中心を同定する為のin vitro、in vivo 両実験系の立ち上げを始めた。自然免疫標的型アジュバントに関しては、まだ未解明な腸管免疫における自然免疫の役割を明らかにする基礎的研究とTLR9標的とした粘膜アジュバント効果についての検討を進めた。

A. 研究目的

グローバル化する最近、未だに記憶に新しいSARSをはじめとして新興・再興感染症が先進国・開発途上国を問わず猛威を振るう状況にある。殆どの病原微生物は呼吸器、消化器、生殖器を被っている粘膜を介して侵入してくる。その粘膜面での侵入阻止と体内での効果的な免疫を誘導し、「二段構えの防御免疫」を宿主に確立するには「粘

膜ワクチン」が効果的である。しかし、その実現化に向けては粘膜免疫を活性化する「安全性があり且つ免疫増強効果のあるより良い「粘膜アジュバント」の開発が不可欠である。初年度は、当研究所が開発してきた無毒化変異型CT(mCT)とキメラ型アジュバント(mCT-A/LT-B)の実用化に向けた臨床試験開始への基礎・応用研究両方を推進する目的で研究を進めてきた。

## B. 研究方法

### 1. CT由来無毒化変異型CT(mCT)の実用化 へ向けての基礎研究

#### 1) 霊長類での粘膜アジュバント効果の検討

米国アラバマ大学バーミングハム校とカリフォルニア大学デイビス校共同研究者の協力を得て、霊長類としては Rhesus macaque を使った。指標ワクチン抗原としては HIVgp120(100 $\mu$ g)を使い、無毒化変異型 CT(25-100 $\mu$ g)と混合し、週に一回ずつ5-6週にわたり経鼻免疫した。対照群としては gp120 に自然型 CT を混合したものとワクチン抗原単独で経鼻免疫した2群をおいた。抗原特異的免疫応答については ELISA 法と ELISPOT 法を併用して、抗原特異的 IgG と IgA 抗体と抗体産生細胞誘導効果を検討した。さらに、ウイルスに対する中和効果についても p24 産生抑制効果を指標に検討した。抗原特異的 Th1 型・Th2 型 誘導能についても ELISPOT 法を使い解析した。

#### 2) 新規無毒化コレラ毒系アジュバント開発 へ向けての研究

1) dmCT の作製 ; mCT E112K 発現プラスミドの小胞体残留シグナル KDEL 配列上に、変異部位を挿入した特異的プライマーを用いた PCR を行い KDEL 配列上に変異を導入した発現プラスミドを作製した。このプラスミドを大腸菌 DH5 $\cdot$  に形質転換し、培養、集菌後、菌を TEN に懸濁、超音波破碎し、遠心により上清を回収した。上清を D-Galactose Immobilized Column (PIERCE) にかけて dmCT を精製した。

2) dmCT の細胞内輸送の観察 ; 消化管上

皮のモデルとして汎用されるヒト大腸ガン細胞株 T84 を用い、蛍光標識した dmCT を細胞に取り込ませ native CT との細胞内輸送の違いを観察した。

3) dmCT の生物活性 ; CT 活性は ADP-ribosyltransferase 活性、Y-1 細胞 assay により評価した。また *in vivo* での活性をマウス腸管ループ法により評価した。

4) dmCT のアジュバント活性 ; 卵白アルブミン (OVA) を抗原としてマウスに経鼻免疫して評価した。C57BL/6 マウスに OVA 100 ug を dmCT 0.5 ug と共に、1週間間隔で3回経鼻接種し、最終免疫から1週間後に血漿および粘膜分泌液を採取し、OVA 特異的抗体価の測定をおこなった。

OVA 特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞応答の解析 ; 経鼻免疫したマウスの脾臓および頸部リンパ節より調整した CD4<sup>+</sup> T 細胞の OVA 特異的細胞増殖活性および OVA 特異的サイトカイン産生を測定した。

### 2. ペプチド型合成アジュバント開発基礎研究

野生型ホロ CT (nCT)、A サブユニット (nCTA) および B サブユニット (CTB)、112 番目のグルタミン酸をリジンに変異させ無毒化した変異ホロ CT (mCT) およびその A サブユニット (mCTA) を His-Tag ベクターで発現させ、Ni-カラムで精製し、さらに His-Tag を切断して再度カラム精製し、Polymixin B カラムによりエンドトキシンを除去し最終サンプルとした。これらの毒性を、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞伸長アッセイにより測定・比較した。また卵白アルブミン (OVA) を添加し、各分子の毒性に変化があるかどうかを調べた。

CT のマウス経口投与アジュバント開発のための予備実験として、Shimizu ら (Microb. Pathogen. 35:1-9, 2003) の 0157:H7 マウス感染系を用い、Bulb/c マウス雄 4 週齢に無毒化大腸菌 0157:H7 ワクチン候補株  $10^{10}$  cfu にアジュバントとして CT を 10  $\mu$ g 添加し 1 週間間隔で 2 回経口投与したマウスに、ストレプトマイシンを 1 週間飲水投与した後、次いでストレプトマイシン耐性を付与した大腸菌 0157:H7 強毒株をチャレンジし、生死を観察することにより感染防御効果を検討した。また同じマウス実験系で、0157:H7 ワクチン候補株  $10^{10}$  cfu にアジュバントとして CT を 0  $\mu$ g, 0.1  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g 加え経口投与し、投与後 60 日まで数日ごとに便を採取し、便中に含まれる抗 0157 IgA 抗体および抗 CT IgA 抗体を ELISA 法により測定した。

### 3. 自然免疫標的型粘膜アジュバント開発基礎研究

#### 1) TLR 9 標的粘膜アジュバント開発へ向けての基礎研究

マウス： BALB/c マウス (6-8 週齢の雌) を用いた。

ワクチン： A/New Caledonia/20/99 (A/NC) (H1N1) ウイルスの精製標品とウイルス由来のエーテル・ホルマリン処理ワクチン (スプリットワクチン) は、(財) 阪大微研より提供して頂いた。不活化全ウイルス粒子ワクチンは、精製ウイルスを 0.2%ホルマリン処理することにより作成した。

CpG-ODN： non-CpG ODN (tgg atc cag cat gtc aga)、ODN 1826 (tcc atg acg ttc ctg acg tt)、CG-30 (acc gat aac gtt gcc ggt gac ggc acc acg) ( 、5002 (tcc atg acg ttc ttg

atg tt)、5004 (感染症研究所、山本三郎先生より提供)。

(tcc atg tcg ttc ttg atg tt)、5006 (tcc atg tcg ttt ttg ttg tt) を用いた。

免疫： 麻酔条件下で、BALB/c マウス (6w, 雌) の左右鼻孔に、3 週間隔で 2 回、ワクチン・CpG ODN 混合液を滴下投与した。

鼻洗浄液・血清材料： 1 群 5 匹のマウスに、麻酔条件下で、CpG ODN 添加ワクチンを左右鼻孔から 1  $\mu$ l ずつ点鼻投与し、3 週間後同様に免疫した。2 回目投与後 10 日目のマウスより、麻酔条件下で全採血して血清材料とした。次に、マウスの上頭部をはずして 1 ml PBS で鼻腔を洗浄し、それを鼻洗浄液とした。

抗体測定材料： 血清； 麻酔条件下で免疫マウスの心臓から全採血し、その血清を分離して IgA 及び IgG 抗体応答測定の材料とした。

抗体応答： IgA 及び IgG 抗体価を ELISA 法により測定した。固相にはウイルスから分離・精製した HA 分子を用いた。鼻洗浄液については 2 倍希釈系列を、また、血清については 4 倍希釈系列をつくり、固相のプレートに添加された。その抗原・抗体複合物に、ビオチン標識ヤギ抗マウス IgA あるいは IgG が、次にアビジン-ALP、最後に pNP が添加された。それぞれのサンプルの抗体価は、非免疫マウス鼻洗浄液あるいは血清の希釈系列の ALP 活性に基づく吸光度の平均値+2SD を cut-off 値として決定した。

#### 2) 粘膜免疫における自然免疫についての基礎研究

正常マウスの大腸の粘膜固有層には少数のマクロファージや樹状細胞が存在している。これらの細胞を大腸組織より単離す

ることは極めて困難であって、これらの細胞の機能解析ができなかった。われわれは、この細胞群の単離法を確立し、高純度のマクロファージや樹状細胞を培養できるようになった。正常マウスの大腸の粘膜固有層由来の細胞は、IL-12などの炎症性サイトカインを産生しない。

一方、慢性腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウスや Stat3 変異マウスの大腸の粘膜固有層では、たとえ慢性腸炎を発症する前の若いマウスでも、マクロファージや樹上細胞の数が極めて増加しており、さらにこれらの細胞は IL-12 などの炎症性サイトカインを産生することを明らかにした。この結果は、正常マウス大腸の粘膜固有層に存在するマクロファージや樹状細胞は、何らかの分子機構により不応答性になっていて過剰な炎症反応を抑制していることを示唆している。そこで、この分子機構を正常マウスと IL-10 ノックアウトマウスの細胞間で遺伝子発現の差を DNA microarray で解析する。そして得られた候補遺伝子をマクロファージに導入し、サイトカイン産生の変化を解析する。

本実験計画では、主に実験動物ならびに分離した細胞、細胞株を使用して各種アジュバントの検討に使用する。実験用動物使用にあたっては、国立大学実験動物施設協議会指針ならびに各参加研究機関での実験動物扱い指針に基づいた実験を行った。

## C. 研究結果

### 1. CT 由来無毒化変異型 CT(mCT)の実用化へ向けての基礎研究

#### 1) 霊長類での粘膜アジュバント効果の検討

##### 1. 抗体誘導効果：無毒化変異型 CT を添加

した経鼻ワクチンを投与した群では、血清中に抗原特異的 IgG 抗体が誘導されていた。さらに抗原特異的 IgA 抗体が腸管洗浄液をはじめとして各種分泌液中も誘導されていた。同様に、全身系と粘膜系組織に高頻度で各々のアイソタイプの抗原特異的抗体産生細胞が認められた。その抗体価と抗体産生細胞数は、粘膜アジュバント効果が知られている CT 添加群と遜色がなかった。

2. 中和効果：経鼻ワクチン接種したサルの上清と分泌液を試験管内でウイルス HIV-1LAI と反応させ、M8166 細胞に感染させたところ、対照群由来血清・分泌液（非接種群、抗原単独接種群）に比較して顕著な感染阻止効果が認められた。

3. Th 細胞誘導効果：無毒化変異型 CT を添加した経鼻ワクチン投与群の末梢血、脾臓、各種粘膜関連組織からリンパ球を分離・培養し、同一抗原で再感作したところ、Th2 型サイトカインの産生が確認された。

4. 安全性試験：粘膜アジュバントによる嗅覚細胞を介した中枢神経系への影響を検討するために、経鼻ワクチン投与後の嗅覚部位での NGF- $\beta$ 1 産生について検討した。自然型 CT 混合投与群では NGF- $\beta$ 1 の産生が認められたが、無毒化変異型 CT 混合投与群では、顕著な変化が認められなかった。

#### 2) 新規無毒化コレラ毒系アジュバント開発へ向けての研究

1. dmCT の細胞内輸送：; nCT では細胞内に取り込まれた後、Golgi から小胞体 (ER) に輸送される様子が観察されたのに対して、dmCT E112K/KDEV では細胞内には取り込まれたものの Golgi に蓄積され ER には輸送されなかった、また dmCT E112K/KDGL は細

胞内への取り込まれ方が nCT と比較して速度が遅く、Golgi までは輸送されるものの、蓄積せずに細胞表面に再分布している様子が観察された

2. CT の生物活性; ADP-ribosyltransferase 活性において 2 種の dmCT は何れも mCT E112K と同様 ADP-ribosyltransferase 活性が認められなかった。Y-1 細胞 assay においては、nCT の毒性を 1 としたとして比較した場合に、dmCT E112K/KDEV は 1/2083 に dmCT E112K/KDGL は 1/2778 にまで減毒していた。さらに、マウス腸管ループ法では何れの dmCT も mCT E112K と同様に腸管への液の貯留を誘導しなかった。

3. 粘膜アジュバンド活性: 経鼻免疫したマウスにおける血漿中での OVA-特異的抗体応答を測定した結果、何れの dmCT でも nCT と同程度の高い OVA-特異的 IgG 応答を誘導できた。この値は、mCT E112K と比較して優位に高かった。次に、この血漿中 OVA-特異的 IgG サブクラスを測定したところ、dmCT E112K/KDGL は native CT と同様高い IgG2a の誘導が見られたのに対して、dmCT E112K/KDEV は先に特異的に Th2-type の応答を誘導することが報告されている mCT E112K と同様 IgG2a の誘導は低かった。次に粘膜面での OVA-特異的 IgA 応答を測定した結果、評価をおこなった nasal wash、fecal extract、saliva のすべてにおいてダブル mCT は native CT と同程度の OVA-特異的 IgA を誘導した。

4. T 細胞系応答の解析: ダブル mCT は native CT に匹敵する高い細胞増殖活性が見られた。さらに、脾臓と頸部リンパ節より調整した CD4<sup>+</sup> T 細胞からの OVA-特異的 Th1-および Th2-type サイトカインの産生

を測定した結果、Th2-type サイトカインの産生においては全ての dmCT で native CT と同程度であったが、一方 Th1-type サイトカインの産生においては、dmCT E112K/KDGL は高い IL-2 および IFN- $\gamma$  産生を認めたのに対して、dmCT E112K/KDEV では mCT E112K と同様に有意に低かった。

## 2. ペプチド型合成アジュバンド開発基礎研究

CHO 細胞アッセイにより各サブユニット分子の毒性を比較したところ、mCT、mCTA および CTB の毒性は検出限界以下であり、nCTA は nCT の 1/10<sup>4</sup> 程度の毒性であった。また OVA をこのアッセイ系に 100  $\mu$ g/ml という高濃度で添加しても、各分子の細胞毒性には全く影響しなかった。

0157:H7 ワクチン候補株に CT アジュバンドを投与した群としなかった群では、0157:H7 強毒株をチャレンジした際の感染防御効果（生存率）に有意な差は見られなかった。

CT の量を変え、0157:H7 ワクチン候補株とともにマウスに経口投与した実験では、糞便中の抗 CT IgA 抗体は、CT 0.1  $\mu$ g の群では全く検出できなかったが、1  $\mu$ g および 10  $\mu$ g の群では投与後 10 日前後から出現し始め、30 日前後でピークを迎え、その後徐々に減衰した。一方、抗 0157 IgA 抗体は、投与後 14 日前後から出現し始め、CT 0  $\mu$ g および 0.1  $\mu$ g 投与群では 30 日から 40 日でピークを迎えその後減衰したが、CT 1  $\mu$ g および 10  $\mu$ g 投与群では、抗体の力価に有意な上昇は見られなかったものの、40 日を過ぎても減衰せずむしろ緩やかに上昇を続ける傾向が見られた。

## 3. 自然免疫標的型粘膜アジュバンド開発基



## 基礎研究

### 1) TLR 9 標的粘膜アジュバント開発へ向けての基礎研究

1. スプリットワクチンの経鼻投与による抗体応答に及ぼす CpG ODN の応答増強効果 : 1  $\mu$ g のスプリットワクチンのみ、また、CpG モチーフを含まない non-CpG ODN 添加ワクチンの経鼻投与では、鼻洗浄液の IgA 抗体も血清中の IgG 抗体も共に低レベルであった。一方、マウス型の CpG ODN (1826, CG-30, 5002) 添加ワクチンに対しては、鼻洗浄液 IgA の中程度の増強活性が、また、血清の IgG の高い増強活性が認められた。マウス・ヒト型の CpG ODN (5006) 添加ワクチンに対しては、用いた CpG ODN の中で最も高い IgA 増強活性と高い IgG 増強活性が認められた。しかしながら、その増強活性は、鼻洗浄液 IgA、血清の IgG 抗体共に、CTB\* をアジュバントとして用いた場合よりも多少低かった。

2. 不活化全ウイルス粒子ワクチンの経鼻投与による抗体応答に及ぼす CpG ODN の応答増強効果 : 0.1  $\mu$ g の不活化全ウイルス粒子ワクチンのみを経鼻投与で、高いレベルの鼻洗浄液の IgA 抗体と血清中の IgG 抗体が誘導された。この不活化全ウイルス粒子ワクチンにマウス・ヒト型の CpG ODN (5006) を添加しても、鼻洗浄液の IgA 抗体と血清中の IgG 抗体のさらなる応答増強は認められなかった。これら抗体応答のレベルは、0.1  $\mu$ g のスプリットワクチンに 0.1  $\mu$ g の CTB\* を添加した場合よりも多少低かった。

### 2) 粘膜免疫における自然免疫についての基礎研究

これまでに STAT3 をマクロファージで特異的に欠失させたマウスを作製し、STAT3 がマクロファージの機能抑制、さらには生体レベルで慢性炎症の抑制に必須であることを明らかにした。そして、病原体構成成分を認識する Toll-like receptor (TLR) ファミリーが、STAT3 非存在下でマクロファージの異常活性化による慢性腸炎発症のトリガーとなることを、TLR4/STAT3 二重変異マウスの解析により明らかにした。さらに、IL-10 刺激によりマクロファージで誘導される Bcl-3 が、TLR 刺激依存性 noTNA-a 産生を特異的に抑制していることを明らかにした。

今年度は、大腸粘膜固有層に存在するマクロファージの機能を解析した。その結果正常マウスの大腸粘膜固有層マクロファージは、TLR 刺激依存性の炎症性サイトカインの産生が認められないが、慢性腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウスや STAT3 変異マウス由来の細胞は TLR 刺激依存性に炎症性サイトカインを産生した。そこで正常マウスと IL-10 ノックアウトマウスの大腸粘膜固有層マクロファージ間で TLR 応答性が異なる分子機構を解析するため、両者間で遺伝子発現の差を DNA マイクロアレイで解析した。その結果、Bcl-3 と同じ I $\kappa$ B ファミリーに属する I $\kappa$ BNS が Bcl-3 とともに正常大腸菌固有層マクロファージに特異的に発現していることを見出した。I $\kappa$ BNS をマクロファージに発現させると、LPS 刺激依存性の IL-6 産生が特異的に減少していた。さらに I $\kappa$ BNS を発現した細胞では、NF- $\kappa$ B の DNA 結合機能に障害が認められた。さらに、I $\kappa$ BNS は IL-6 プロモーターに

p50NF- $\kappa$ B サブユニットと共に恒常的に会合していることがクロマチン免疫沈降法の解析から明らかになった。さらに RNAi による I $\kappa$ BNS のノックダウンマクロファージでは、LPS 刺激依存性の IL-6 産生が特異的に増加していた。

#### D. 考察

##### 1. CT 由来無毒化変異型 CT(mCT)の実用化へ向けての基礎研究

###### 1) 霊長類での粘膜アジュバント効果の検討

当研究班が開発してきた無毒化変異型 CT 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あることが明らかになった。さらに、誘導された抗原特異的抗体には中和効果があることも確認され、今後は他のウイルス、細菌由来ワクチン抗原においても同様な感染阻止効果のある免疫応答を惹起できる粘膜アジュバント効果があるか検討を進めていく必要がある。さらに、実用化を考えたとき、経鼻免疫だけではなく経口免疫も視野に入れなければならない。そこで、経口アジュバント効果についても今後さらなる検討をして行く必要がある。

###### 2) 新規無毒化コレラ毒系アジュバント開発へ向けての研究

経鼻ワクチンは抗原と粘膜アジュバントの混合物を鼻腔に噴霧するだけで免疫応答を誘導でき、針を使用しないことから痛みを伴わず、投与する側にも安全なワクチンである。この粘膜ワクチン開発の鍵を握っているのが有効で安全な粘膜アジュバントの開発である。

nCT や nLT の強力な粘膜アジュバント効果は周知されており、活性が維持されている mCT が報告されている。また最近なり、マウスとサルを用いた実験において CT が嗅神経等の中枢神経系に取り込まれ神経障害を認める所見が得られ、新たに安全性が懸念されている。我々は、これまでに mCT E112K や mCT E112K の A サブユニットと nLT の B サブユニットのキメラである mCTA/LTB のアジュバント活性について検討してきた。

本研究では、CT の COOH-末端 KDEL 配列に変異を導入することにより、CT の細胞内輸送が変化し、中枢神経へ移行しないような変異体が作製出来るのではないかという仮説を立て dmCT を作製した。さらに、KDEL 配列への変異では、減毒が期待できないことから E112K との dmCT とした。

その結果、nCT では細胞内に取り込まれた後、Golgi から小胞体(ER)に輸送される様子が観察されたのに対して、dmCT E112K/KDEV では細胞内に取り込まれたものの、Golgi に蓄積されて ER には輸送されなかった。また dmCT E112K/KDGL は細胞への取り込み方が nCT と比較して顕著に遅く、Golgi までは輸送されるものの、蓄積せずに細胞表面に再分布している様子が観察された。この結果より dmCT の細胞内輸送は nCT とは明らかに異なっており、神経細胞での輸送も異なることが期待された。さらに mCT E112K に匹敵する安全性が確認された。

一方で、アジュバント活性に関しては、dmCT は経鼻免疫の非常に有効なアジュバントである可能性が示された。

従来検討を行ってきた mCT E112K や mCTA E112K/LTB の場合、nCT の 10 倍量で同等の免疫応答を誘導できた。ところが、今回作成した dmCT は nCT と等量で同等の免疫応答を誘導することができた。

## 2.ペプチド型合成アジュバント開発基礎研究

昨年度の本研究の報告書において、nCT と mCT の各サブユニットの OVA 抗原を用いたマウス経鼻投与によるアジュバント活性は、nCT および nCTA が高い活性を示し、mCT、mCTA、CTB の活性は低かったこと、また tetanus toxoid (TT) を抗原とした同様の実験では nCTA のアジュバント活性は CTB と同程度まで低下したことを報告し、OVA がキャリアタンパクとして nCTA の免疫細胞への供給を促進した可能性を示唆した。そこで今回は、CT の毒性を鋭敏に測定できるアッセイ系である CHO 細胞伸長試験を用いて、上記 nCT あるいは mCT 由来の各分子の毒性を測定するとともに、さらに OVA の添加が毒性の増強をもたらすか否かを検討した。nCTA の毒性は nCT の  $1/10^4$  程度であったが、これは nCTA は通常濃度では CHO 細胞内にエンターできないが、非常に高濃度になると偶発的にエンターすることが出来、毒性を発揮するようになるためと考えられる。逆に言うと、CTB と GM1 の結合による CTA の細胞内への誘導は、 $10^4$  の濃度差に匹敵する効率の良さであると言える。また OVA の添加が毒性に全く影響を与えなかったことから、nCTA がマウス経鼻投与で抗 OVA 抗体価を増強したのは、in vivo で OVA が免疫細胞への nCTA の誘導あるいは結合を特異的に促進した結果であるという可能性が示唆される。今後は樹状細胞やマクロファージなどの免疫細胞を対象に、nCTA アジュバントの作用メカニズムを検討したい。

CT のアジュバント活性を動物実験によっ

て検討している文献は枚挙に暇がないが、ほとんどは皮下、腹腔内、経鼻、経皮といった投与ルートを用いており、経口投与の報告は非常に少ない。しかしこのペプチド型アジュバントの目標が、「食べる・飲む・吸う」ワクチンにアジュバントとして利用することであり、特に現在、有効なワクチンが少ない腸管感染下痢症への応用も期待されることを考えると、腸管内局所で強い免疫反応が誘導できることが理想的で、従ってワクチン及びアジュバントは経口投与により腸管に供給されることが望ましい。今回の実験結果からは、CT は抗体価を上げるよりもむしろ抗体産生の持続に有効である可能性が示唆されるが、アジュバントの効果は抗原の種類によって異なる可能性も考えられる。今後さらにマウスの匹数を増やし、観察日数も延長するとともに、他の腸管病原性微生物の抗原等でも検討する必要がある。

## 3.自然免疫標的型粘膜アジュバント開発基礎研究

### 1) TLR9 標的粘膜アジュバント開発へ向けての基礎研究

CpG ODN は、抗原提示機能を持った細胞に存在する TLR9 のリガンドとして作用し、抗原提示細胞の機能を高めることによって、共存する抗原に対する特異免疫応答を高めることが知られている。本実験結果において、CpG ODN が経鼻不活化スプリットワクチンに対する抗体応答を増強することが示された。特に、ヒトにもマウスにも共通に免疫増強能力のある CpG ODN (5006) が比較的強いアジュバント活性があるという結果は、これがヒトでの経鼻ワクチン

実用化の際の有用なアジュバントの候補の一つになることを示唆している。

一方、CpG ODN が経鼻不活化全ウイルス粒子ワクチンに対しては抗体応答を増強する活性がないことが示された。これと関連して、不活化全ウイルス粒子には単鎖 RNA がウイルスの遺伝子として含まれており、これが TLR7 のリガンドとしてアジュバント作用を発揮することが示唆されている。従って、不活化全ウイルス粒子は自身が有する単鎖 RNA のアジュバント作用により、高いレベルの抗体応答を誘導すると考えられる。この時、TLR9 経由で働く CpG ODN が共存してもそのアジュバント作用は発揮されないらしい。

また、TLR3 経由で働く 2 重鎖 RNA (poly I:C) を用いた時にも、CpG ODN を用いた場合とほぼ同様の結果がえられた。従って、TLR3、TLR7、TLR9 経由で働くリガンドは、粘膜ワクチンのアジュバントとしてほぼ同等の活性を有していること、また、これらは相互に相加的あるいは相乗的には働かないことが示唆された。

いずれにしても、ガングリオシド GM1 経由で作用する CTB\*のアジュバント作用は、TLR3 経由で働く 2 重鎖 RNA (poly I:C)、TLR7 経由で働く単鎖 RNA 及び TLR9 経由で働く CpG ODN のアジュバント作用よりも、その投与量ベースで比較した時、多少高いことが明らかになった。

## 2) 粘膜免疫における自然免疫についての基礎研究

正常大腸粘膜固有層マクロファージに恒常的に発現している IkBNS がマクロファージ系細胞において、IL-6 産生の抑制に

特異的に関与していることが明らかになった。Bcl-3 も大腸粘膜固有層マクロファージに恒常的に発現していることから、この細胞では、IkBNS、Bcl-3 の核に発現する IkB ファミリー分子が、TLR 応答性をそれぞれ負に制御していることが明らかになった。

## E. 結論

### 1. CT 由来無毒化変異型 CT(mCT)の実用化へ向けての基礎研究

#### 1) 霊長類での粘膜アジュバント効果の検討

現在までに、一連のマウス実験成績から粘膜アジュバント効果が実証されていた無毒化変異型 CT をヒトに近い霊長類で試験し、その抗原特異的免疫増強効果を確認することが出来た。さらに、経鼻免疫の際に問題となる嗅覚細胞を基点とする中枢神経系への影響についても、NGF- $\beta$ 1 の産生に大きな影響を及ぼさないなど、安全性に関しても期待できる結果を得た。しかし、実用化に向けては、安全性に関してさらなる詳細な検討が必要である。

#### 2) 新規無毒化コレラ毒系アジュバント開発へ向けての研究

dmCT E112K/KDEV および dmCT E112K/KDGL は、有効で安全に使用できる経鼻免疫アジュバントとなる可能性が示唆された。

### 2. ペプチド型合成アジュバント開発基礎研究

nCTA は OVA を抗原としたマウス経鼻投与では nCT と同程度のアジュバント活性を示

したが、CHO 細胞に対する毒性は nCT の  $1/10^4$  程度であった。nCTA は経鼻投与アジュバントの有力な候補になり得ると考える。CT を経口アジュバントとしてマウスに投与した結果、大腸菌 0157:H7 無毒化株を抗原とした場合、0157:H7 強毒株のチャレンジに対する感染防御効果および糞便中の抗 0157 抗体価に有意差は見られなかったが、抗 0157 抗体の保持を助長する傾向が見られた。

### 3. 自然免疫標的型粘膜アジュバント開発基礎研究

#### 1) TLR 9 標的粘膜アジュバント開発へ向けての基礎研究

CpG ODN (5006) はスプリットワクチンに対する抗体応答を増強した。一方、それ自身で免疫原性の高い不活化全ウイルス粒子・ワクチンに対して CpG ODN は抗体応答を増強せず、また、この全ウイルス粒子単独による抗体応答増強のレベルは、CpG ODN によるスプリットワクチンに対する抗体応答増強のレベルに近かった。その増強のレベルは CTB\* に依る増強のレベルよりも多少低かった。

#### 2) 粘膜免疫における自然免疫についての基礎研究

大腸の粘膜固有層に局在する自然免疫系細胞は、TLR 刺激に应答しない。そしてその不応答機構の破綻が慢性炎症性腸炎の発症のトリガーとなりうる。正常では、核に発現する I $\kappa$ B ファミリー分子 Bcl-3、I $\kappa$ BNS がそれぞれに特異的に TLR 刺激依存性のサイトカイン産生を負に制御し、過剰な炎症の誘導を抑制している。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 発表論文

1. Yoshino, N., Lu, X-S. F., Fujihashi, K., Hagiwara, Y., Kataoka, K., Lu, D., Hirst, L., Honda, M., F.W. van Ginkel., Takeda, Y., Miller, C. J., Kiyono, H., and McGhee, J.R. 2004. A novel adjuvant for mucosal immunity to HIV-1 gp120 in nonhuman primates. *J. Immunol.* 173: 6850-6857
2. Hino, A., Kweon, M-N., Fujihashi, K., McGhee, J.R., and Kiyono, H. 2004. Pathological role of large intestinal IL-12p40 for the induction of Th2-type allergic diarrhea. *Am. J. Pathol.* 164: 1327-1333
3. Jang, M-H., Kweon, M-N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, G., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, Y., and Kiyono, H. 2004. Intestinal Villous M Cells: A new antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Asso. Sci.* 101:6110-5
4. Shikina, T., Hiroi, T., Iwatani, K., Jan, M-H., Fukuyama, S., Tamura, M., Kubo, T., Ishikawa, H. and Kiyono, H. 2004. IgA class switch occurs in the organized nasopharynx and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. *J. Immunol.* 172:

6259-6264

5. Yamamoto, M., Kweon, M-N., P-D, Rennert, Hiroi, T., Fujihashi, K., McGhee, R-J., and Kiyono, H. 2004. Role of gut-associated lymphoreticular tissues in antigen-specific intestinal IgA immunity. *J. Immunol.* 173: 762-769
6. Ohmura-Hoshino, M., Yamamoto, M., Yuki, Y., Takeda, Y., and Kiyono, H. 2004. Non-toxic Stx derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for mucosal immunity. *Vaccine* 22: 3751-3761
7. Nochi, T., Yuki, Y., Terahara, K., Hino, A., Kunisawa, J., Kweon, M-N., Yamaguchi, T., and Kiyono, H. 2004. Biological role of Ep-CAM in the physical interaction between epithelial cells and lymphocytes in intestinal epithelium. *Clin. Immunol.* 113: 326-339
8. Mizushima, T., Ito, T., Kishi, D., Kai, Y., Tamagawa, H., Nezu, R., Kiyono, H., and Matsuda, H. 2004. Therapeutic effects of a new lymphocyte homing reagent FTY720 in interleukin-10 gene-deficient mice with colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 10:182-192.
9. Ueta, M., Nochi, T., Jang, M-H., Park, E-J., Igarashi, O., Hino, A., Kawasaki, S., Shikina, T., Hiroi, T., Kinoshita S., and Kiyono, H. 2004. Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. *J. Immunol.* 173: 3337-3347
10. Kiyono, H., and Fukuyama, S. 2004. NALT-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. 2004. *Nature Rev. Immunol.* 4: 699-710
11. Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y. 2004. Probiotic Bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 72: 2240-2247
12. Nusrin S, Khan GY, Bhuiyan NA, Ansaruzzaman M, Hossain MA, Safa A, Khan R, Faruque SM, Sack DA, Hamabata T, Takeda Y, Nair GB. 2004. Diverse CTX phages among toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated between 1994 and 2002 in an area where cholera is endemic in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 42:5854-5856
13. Tamura S-I and Kurata T. 2004. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *J J Infect Dis* 56: 236-247
14. Hokuno, T., Ikegami, M., Yoshida, M., Takeda, K., Akira, S., Perl, A. T., Hull, W. M. and Whisett, J. A. 2004. Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia. *J. Clin. Invest.* 113:28-37
15. Into, T., Kiura, K., Yasuda, M., Kataoka, H., Inoue, N., Hasebe, A., Takeda, K., Akira, S. and Shibata, K.

2004. Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma Fermentas* induces apoptotic cell death after NK-kB activation. *Cell Microbiol.* 6:187-199
16. Akazawa, T., Masuda, H., Saeki, Y., Matsumoto, M., Takeda, K., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Takahashi, T., Asuma, I., Akira, S., Toyoshima, K. and Seya, T. 2004. Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* 64:757-764
17. Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K. and Raz, E. 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126:520-528
18. Inoue, H., Ogawa, W., Ozaki, M., Haga, S., Matsumoto, M., Hashimoto, N., Kido, Y., Mori, T., Sakaue, H., Iguchi, H., Hiramatsu, R., Keroith, D., Takeda, K., Akira, S. and Kasuga, M. 2004. Role of stat3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat. Med.* 10:168-174
19. Liu, B., Mori, I., Hossain, M. J., Dong, L., Takeda, K. and Kimura, Y. 2004. Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Gen. Virol.* 85:423-428
20. Robben, P. M., Mordue, D. G., Truscott, S. M., Takeda, K., Akira, S. and Sibley, L. D. 2004. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J. Immunol.* 172:3686-3694
21. Yukawa, K., Hoshino, K., Kishino, M., Mune, M., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Tanaka, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K. and Akira, S. 2004. Deletion of kinase domain in death-associated protein kinase attenuates renal tubular cell apoptosis in chronic obstructive uropathy. *Int. J. Mol. Med.* 13:515-520
22. Weiss, D. S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S. and Zychlinsky, A. 2004. Toll-like receptor are temporally involved in host defense. *J. Immunol.* 72:4463-4469
23. Li, Y., Ishii, K., Hisaeda, H., Hamano, S., Shang, M., Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Henmi, H., Takeda, K., Akira, S., Iwakura, Y. and Himeno, K. 2004. IL-18 gene therapy develops

- Th1-type immune responses in *Leishmania major*-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther.* 11:941-948
24. Ikushima, H., Nishida, T., **Takeda, K.**, Ito, T., Yasuda, T., Yano, M., Akira, S. and Matsuda, H. 2004. Expression of Toll-like receptor 2 and 4 is down-regulated after operation. *Surgery* 135:376-385
25. Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Miyagi, K., Kinjo, T., Yara, S., Koguchi, Y., Miyazono, A., Shibuya, K., Iwakura, Y., **Takeda, K.**, Akira, S. and Saito, A. 2004. Interferon- $\gamma$  production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. *Microbes. Infect.* 6:339-349
26. Gorogawa, S., Fujitani, Y., Kaneto, H., Hazama, Y., Watada, H., Miyamoto, Y., **Takeda, K.**, Akira, S., Magnuson, M. A., Yamasaki, Y., Kajimoto, Y. and Hori, M. 2004. Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic beta-cell-specific STAT3 knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319:1159-1170
27. Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., **Takeda, K.** and Akira, S. 2004. The roles of two I $\kappa$ B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* 199:1641-1650
28. Kishino, M., Yukawa, K., Hoshino, K., Kimura, A., Shirasawa, N., Otani, H., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Maeda, Y., Ichinose, M., **Takeda, K.**, Akira, S. and Mune, M. 2004. Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates tubular cell apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15:1826-1834
29. Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, T., Yamamoto, S., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saito, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Muta, T., **Takeda, K.** and Akira, S. 2004. Regulation of Toll-IL-1 receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I $\kappa$ Bz. *Nature* 430:218-222
30. Okamoto, M., Furuichi, S., Nishioka, Y., Oshikawa, T., Tano, T., Ahmed, S. U., **Takeda, K.**, Akira, S., Ryoma, Y., Moriya, Y., Saito, M., Sone, S. and Sato, M. 2004. Expression of Toll-like receptor-4 on Dendritic cells is significant for anticancer effect of Dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of OK-432, a Streptococcal preparation. *Cancer Res.* 64:5461-5470
31. Sato, N., Takahashi, N., Suda, K., Nakamura, M., Yamaki, M., Ninomiya, T., Kobayashi, Y., Takada, H., Shibata, K.,



- Yamamoto, M., **Takeda, K.**, Akira, S., Noguchi, T. and Udagawa, N. 2004. MyD88 but not TRIF is essential for osteoclastogenesis induced by lipopolysaccharide, diacyl lipopeptide, and IL-1. *J. Exp. Med.* 200:601-611
32. Nakasone, C., Kawakami, K., Hoshino, T., Kawase, Y., Yokota, K., Yoshino, K., **Takeda, K.**, Akira, S. and Saito, A. 2004. Limited role for interleukin-18 in the host protection response against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect. Immune.* 72:6176-6180
33. Yang, R., Murillo, F. M., Cui, H., Blosser, R., Uematsu, S., **Takeda, K.**, Akira, S., Viscidi, R. P. and Roden, R. 2004. Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived Dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J. Virol.* 78:1152-1160
34. Vossenkamper, A., Went, T., Alvarado-Esquivel, C., **Takeda, K.**, Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lonchner, M., Forster, I. And Liesenfeld, O. 2004. Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii* but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *Eur. J. Immunol.* 34:3197-3207
35. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Awad, S., Satoh, T., Katayama, I., **Takeda, K.**, Akira, S., Kaneda, Y. and Nishioka, K. 2004. In vivo transfection of a cis element decoy against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates IgE-mediated late-phase reaction in an atopic dermatitis mouse model. *Gene Ther.* 11:1753-1762
36. Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M. H., Satoh, T., Kaneda, Y., **Takeda, K.**, Akira, S. and Nishioka, K. 2004. In vivo transfection of a cis element decoy against of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. *Gene Ther.* 11:1763-1771
37. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, T., Awada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., **Takeda, K.**, Akira, S. and Maeda, M. 2005. The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15:73-78
38. Yamamoto, M., **Takeda, K.** and Akira, S. 2004. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.* 40:861-868
39. **Takeda, K.** and Akira, S. 2004. TLR signaling pathway. *Semin Immunol.* 16:3-9
40. **Takeda, K.** and Akira, S. 2004. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Dermatol. Sci.* 34:73-82

41. Akira, S. and Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 4:499-511
42. Takeda, K. and Akira, S. 2004. Toll-like receptor: ligands and signaling. *Innate Immune Response to Infection.* 257-270
43. Takeda, K. and Akira, S. 2004. Biological roles of the STAT family in cytokine signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology* 166:97-121
44. Akira, S. and Takeda, K. 2004. Function of Toll-like receptor: lessons from KO mice. *C. R. Biol.* 327:581-589
45. Takeda, K. and Akira, S. 2005. Toll-like receptor in innate immunity. *Int. Immunol.* 17:1-14

# 分担研究報告書

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

粘膜アジュバント開発へ向けての基礎研究

分担研究者：清野 宏（東京大学医科学研究所）

研究協力者：吉野直人（岩手医科大学細菌学教室）

藤橋 浩太郎（アラバマ大学バーミングハム校教授）

要旨：コレラ毒素の粘膜アジュバント効果はよく知られている。その特性を生かし我々が開発を進めてきた無毒化変異型（mCT）のヒトへの応用性を検討する為に、霊長類を使った検討を進めた。サルにワクチン候補抗原と mCT（25 - 100 µg）を経鼻投与したところ、抗原特異的 IgG を血清中に誘導した。抗原特異的 IgA 抗体も各種分泌液中に誘導された。この結果を裏付けるように、抗原特異的 IgG と IgA 抗体産生細胞が、各々全身系と粘膜系組織に高頻度で存在していた。また、誘導された抗体には中和活性も認められた。一方、経鼻免疫で問題となる、嗅覚細胞を介した中枢神経系への影響については、自然型毒素に比較して顕著な影響はなかった。抗原特異的 Th 細胞の誘導も確認されており、ヒトに近い霊長類においても無毒化変異型 CT の粘膜アジュバント効果が確認された。

A.研究目的：昨今問題になる新興・再興感染症の殆どは呼吸器、消化器、生殖器粘膜を介した病原微生物の侵入から始まる。その粘膜面に巧妙かつ柔軟性に富んだ粘膜免疫機構が存在することが証明され、その機構を応用した「粘膜ワクチン」の開発が期待されている。「粘膜ワクチン」は現行の注射型ワクチンに比較して、粘膜面と全身系両方の免疫を作動させた二段構えの防御免疫を誘導できる事が明らかになり、益々その応用性が期待されている。しかしながら、その実現化に向けては、効果的な粘膜免疫担当組織へのワクチン抗原デリバリー法や、粘膜免疫増強効果を有しているアジュバントの開発が重要である事がわかってきた。

そこで、本研究班では従来から知られているコレラ毒素(CT)の粘膜アジュバント効果に注目し、その生物学的特性を維持し尚且つ毒性の欠損した無毒化変異型 CT やその進化型とも言えるキメラ型アジュバントの開発を進めてきた。本年度は、小動物実験でその粘膜アジュバント効果が証明されている無毒化変異型 CT に関して、ヒトへの応用性を踏まえて、霊長類での粘膜アジュバント効果を検討した。

B.研究方法：米国アラバマ大学バーミングハム校とカリフォルニア大学デイビス校共同研究者の協力を得て、霊長類としては Rhesus macaque を使った。指標ワクチン