

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。

#### C.結果：

- 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血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。

#### D.考察：

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いけない。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。

#### E.結果：

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かめることが出来た。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、安全性につい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。

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 proposal 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 antige-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* posses 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

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

分担研究者 田村 慎一 大阪大学微生物病研究所 客員教授

研究要旨 抗原提示細胞上の Tol-like receptor 9 のリガンドとして作用し、共存する抗原に対する特異免疫応答を高める CpG-ODN の、経鼻不活化インフルエンザワクチンのアジュバントとしての能力を検討した。CpG ODN はインフルエンザの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は抗体応答を増強しなかった。

A. 研究目的

我々はこれまで経鼻不活化インフルエンザワクチンの実用化を目指して、コレラ菌の毒素派生物 (CTB\*) をアジュバントとした経鼻不活化インフルエンザワクチンの開発に取り組んできた。この経鼻ワクチンによって、インフルエンザの主要な防御抗原であるウイルス表面の糖タンパク質、ヘマグルチニン (HA) に対する血清の IgG 抗体のみならず、気道の分泌型 IgA 抗体の誘導が増強されることが明らかになっている。これによってインフルエンザの発症が阻止されるばかりでなく、ウイルス性肺炎の発症も阻止される。さらに、気道の IgA 抗体は多量体であり、単量体の IgG 抗体よりも交叉反応性が高く、変異ウイルスの流行の防御に有効であることが示されている。この IgA 抗体は皮下注射によっては誘導されず、ここに経鼻不活化インフルエンザワクチン開発の意義がある。しかしながら最近、スイスの BERNA 社が我々の発想を活用した大腸菌易熱性毒素併用経鼻不活化インフルエンザワクチンを実用化し市販した結果、一部のヒトに顔面麻痺の症状が発生することが明らかになり、経鼻ワクチンのアジュバントとしてコレラ毒素派生物を使用することが困難になった。そこで我々は、新たな有効且つ安全な粘膜アジュバントの探索をすることになった。

CTB\* のアジュバント作用は、抗原提示機能を持った細胞 (APC) の受容体 (GM1 ガングリオシド) に CTB が結合することによって APC の働きを亢進させることに依っており、そのことが共存するワクチンに対する抗体応答の増強を引き起こす。このような innate immunity の増強を介したワクチンに対する獲得免疫の増強機構は、Toll-like receptor (TLR) を介した他の多くの

アジュバント物質にも当てはまると考えられた。

そこで本研究では、TLR9 を介して作用する CpG-ODN の経鼻不活化インフルエンザワクチンのアジュバント作用を CTB\* のそれと比較検討した。

B. 研究方法

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 tcc ttc ttg atg tt)、5006 (tcc atg tcc 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 抗体応答測定のための材料とした。

**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。

### C. 研究結果

(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の経鼻投与で、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。

### D. 考察

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 経路で働く 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 経路で働く 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 経路で働くリガンドは、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 経路で作用する CTB\* のアジュバント作用は、TLR3 経路で働く 2 重鎖 RNA (poly I:C)、TLR7 経路で働く単鎖 RNA 及び TLR9 経路で働く 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。

### E. 結論

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。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Tamura S-I and Kurata T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa.

J J Infect Dis 56, 236-247, 2004

2. 学会発表  
なし

H. 知的財産の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許習得       なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他         なし

ペプチド型アジュバントの開発

分担研究者 竹田美文 実践女子大学生生活科学部・教授  
分担研究者 濱端 崇 国立国際医療センター研究所・室長

研究要旨： CT のペプチド型アジュバント開発に向け、まず CT のアジュバント活性を担う部位を同定するため、nCT, mCT, nCTA, mCTA および CTB を精製し、CHO 細胞を用いて毒性試験を行った。mCT, mCTA, CTB の CHO 細胞毒性はバックグラウンドレベルであった。nCT の CD50 は 0.2 ng/ml で、nCTA の毒性はその 1/10<sup>4</sup> 程度であった。また CT を経口アジュバントとして用いるための予備的実験として、大腸菌 0157:H7 の無毒化ワクチン候補株を抗原とし CT をアジュバントとしてマウスに経口投与し、その後強毒 0157:H7 株をチャレンジし感染防御効果を調べたところ、CT アジュバントの有無による有意差は見られなかった。そこで同じ投与実験系を用いて、糞便中に含まれる抗 0157 LPS 抗体価を調べたところ、非アジュバント群と比較して CT アジュバント群では、抗 0157 抗体価に有意差はなかったが、抗体価の保持を助長する傾向が見られた。

A. 研究目的： コレラ毒素 (CT) が強い粘膜アジュバント活性を有することはよく知られているが、そのメカニズムは不明である。CTB のみでは弱いアジュバント活性がホロ毒素の微量の混入により飛躍的に上昇することや、1 アミノ酸置換により毒性を減弱させた変異 CT でもアジュバント活性を有することから、本研究では CTA の構造的特徴がアジュバント活性を担うという仮説に基づき、CT 分子のアジュバント活性を担う部位の同定を試み、さらにその部分のみの合成ペプチドによる新規粘膜アジュバント開発に向けた基礎的データを得ることを目的とする。このようなペプチド型のアジュバントは、CT 特有の下痢毒性を持たないため安全で、かつ人工合成できるため安価で供給することが可能であると考えられ、本邦のみならず開発途上国における感染症予防に多大な貢献が期待できる。

B. 方法： 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<sup>10</sup> cfu にアジュバントとして CT を 10 µg 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<sup>10</sup> cfu にアジュバントとして CT を 0 µg, 0.1 µg, 1 µg, 10 µg 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。

(倫理面への配慮)

動物実験は当研究所の動物取扱規程に準拠して行われ、倫理的に特段の問題はないと考える。

C. 結果： 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 µg/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 アジュバント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。

D. 考察： 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。

E. 結論： 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効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。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y. Probiotic Bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0157:H7. *Infect. Immun.* 72: 2240-2247, 2004.
- 2) Nusrin S, Khan GY, Bhuiyan NA, Ansaruzzaman M, Hossain MA, Safa A, Khan R, Faruque SM, Sack DA, Hamabata T, Takeda Y, Nair GB. 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, 2004.



## 2. 学会発表

- 1) 朝原 崇、清水健介、野本康二、田中隆一郎、濱端 崇、竹田 美文：マウス腸内における腸管出血性大腸菌（STEC）の病原遺伝子発現に及ぼすビフィズス菌定着の影響。第77回日本細菌学会総会、2004年4月、大阪。
- 2) 清水 健、濱端 崇、竹田美文、林 英生。なぜStx2を産生する腸管出血性大腸菌の方が病原性が強いのか -Stx1とStx2の違いについて-。第51回毒素シンポジウム、2004年7月、長崎。

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

*B. brevis* 発現系を使ったキメラ型アジュバント作成

分担研究者 高木広明 株式会社プロテイン・エクスプレス

研究要旨

アジュバントの新領域である粘膜アジュバントの開発は内外で注目を受けている。そこで低毒性で粘膜アジュバント活性の強いキメラ蛋白質（mCT 改良型：mCTA/LTB）の設計を行い、*B. brevis* 宿主-ベクター系を用いた発現、生産、精製方法の検討を行っている。本年度は霊長類を対象とした、有効試験用としてキメラ蛋白質を 40mg 製造し、代表研究者に送付した。

A. 研究目的

*B. brevis* 宿主-ベクター系は蛋白質を分泌生産する能力に優れ、グラム陽性菌であるためエンドトキシンを産生しない等の利点がある。この *B. brevis* を用いた異種タンパク質分泌発現系を用いて毒性が低く粘膜アジュバント活性の強い分子を生産する目的で、変異型コレラトキシンと易熱性大腸菌のエンテロトキシンを組み合わせたキメラ蛋白質 mCTA/LTB の分子設計を行い、分泌発現に成功した。その後、単離精製したキメラ蛋白質について検討した結果、粘膜アジュバントとしての活性を有しており、新規なワクチンアジュバントになる可能性が高いと判断された。そこで、本系の工業化を目標としたプロセスの開発を行っている。

B. 研究方法

*B. brevis* の宿主-ベクター系を用いてキメラ蛋白質（mCTA/LTB）を大量生産し、工業スケールに適したプロセスデザインの開発を行った。キメラ蛋白質発現プラスミド

（pNCM02 chimera）を構築し（図 1）、このプラスミドが導入された *B. brevis* 形質転換株についてキメラ蛋白質安定生産株の選抜を行った。安定化されたキメラ蛋白質生産株を元に working cell を作製し、3L jar レベルでのキメラ蛋白質の生産を行った。

C. 研究結果

*B. brevis* (pNCM02-chimera) の working cell を元に、2SLN 培地 2L を用いた 3L jar を 5 基使用し、キメラ蛋白質を生産した。本生産における培養条件は 1vvm, 32℃, 68hr, 200rpm である。キメラ蛋白質の精製は図 2 に示したスキームに従い行った。除菌後の培養上清、約 9L より 40mg のキメラ蛋白質を製造した（図 3）。出荷サンプルの濃度は 0.5mg/ml、エンドトキシン濃度は 50~200 EU/ml であった。

D. 考察

*B. brevis* の宿主-ベクター系を用いたキメラ蛋白質（mCTA/LTB）は、培養上清中に生産され、図 2 に示した方法に従い、immobilized D-galactose 樹脂を用いた精製

法により簡便に他の夾雑蛋白質がなく精製できる。しかしながら、精製最終工程でのエンドトキシン除去工程である UF100K 膜処理の回収率が約 50% という低い値であることが問題として上げられる。プロセス全体のパイロジェンフリー化をすることで、より高回収率のプロセスが完成できると考えている。

### E. 結論

*B. brevis* の宿主-ベクター系を用いて、キメラ蛋白質 (mCTA/LTB) を分泌生産することに成功しており、精製キメラ蛋白質は粘膜ア

ジュバントとしての活性を十分に有していた。工業スケールへとスケールアップ (培養、精製) することを前提として、安定生産菌株を用いて 3L jar によるキメラ蛋白質パイロット生産を行い、本年度分の霊長類試験用に供する 40mg のキメラ蛋白質を代表研究者に送付した。

### G. 研究発表

特になし。

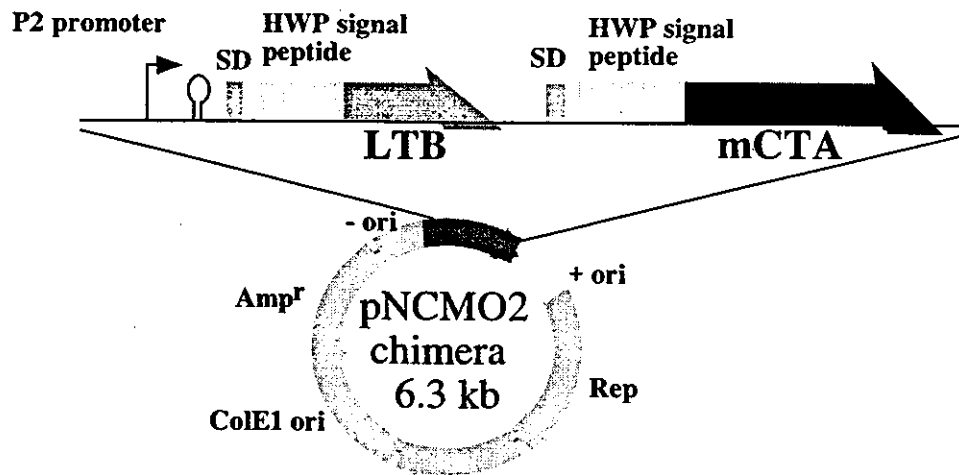


図 1. pNCMO2-chimera プラスミドの構築

working cell: *B. brevis* (pNCM02 chimera)

Medium: 2SLN medium

3L iar MDL : 200 rpm. 32 °C. 1vvm. 68 hr

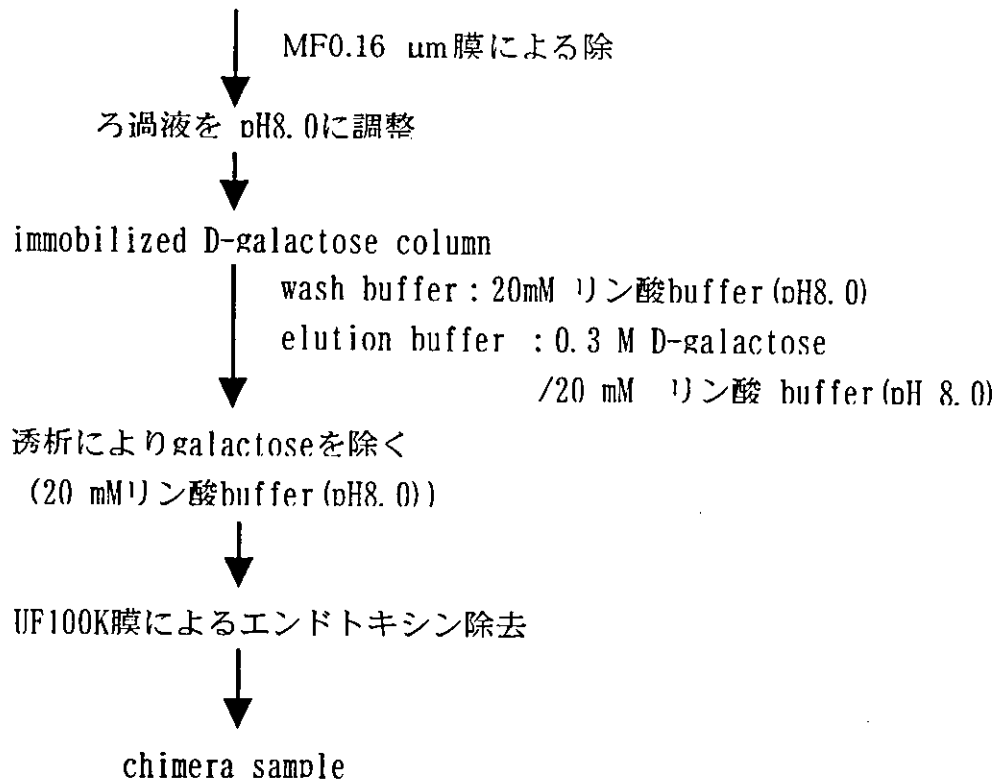


図 2. chimera 分子の精製スキーム

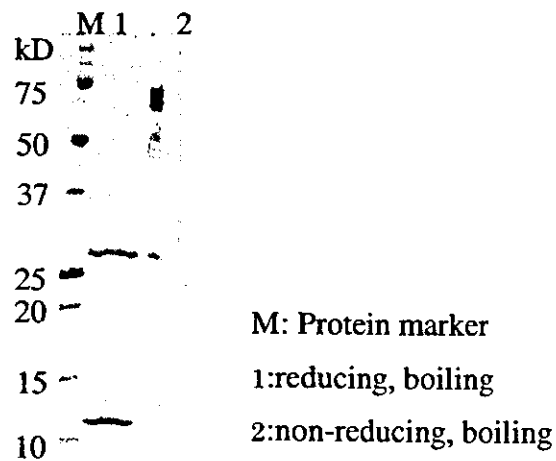


図 3. 製造品の SDS-PAGE 分析 (5 · 1/ lane)

TLRをターゲットとした新規粘膜アジュバント開発

分担研究者 竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所教授

研究要旨：大腸粘膜固有層に局在するマクロファージの機能を解析した。この細胞は、脾臓など他の組織由来のマクロファージと異なり、TLR リガンドに応答しない。しかし、慢性大腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウス由来の細胞は TLR リガンドに反応した。このメカニズムを解析するため、DNA microarray により両細胞間での遺伝子発現の差を解析した。その結果、正常の大腸粘膜固有層に局在する細胞特異的遺伝子として IkbNS を同定した。IkbNS をマクロファージ系細胞に発現させると、LPS 刺激依存性の IL-6 産生が特異的に阻害された。RNAi によるノックダウンでは、逆に IL-6 産生が特異的に上昇した。これらの結果から、IkbNS は大腸粘膜に局在する自然免疫系の細胞において IL-6 産生と選択的に阻害していることが明らかになった。

#### A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される慢性炎症性腸疾患は、現在その病因・病態が明らかにされておらず、有効な治療法も確立されていない難治性の疾患である。マクロファージの活性を負に制御することが知られているサイトカイン IL-10 の遺伝子欠損マウスが慢性腸炎を発症することから、このマウスはヒトの慢性炎症性腸疾患のモデル動物としてよく利用され、病態の詳細な解析が行われてきた。また、種々の薬剤による腸炎誘導モデルにおける IL-10 の作用が、IL-10 の発現上昇や、抗 IL-10 抗体によるブロック実験などにより解析され、また、IL-10 遺伝子の発現誘導による慢性腸炎の治療効果も実験動物で確かめられてきた。このように、IL-10 が慢性腸炎の発症を抑制することは明らかになっている。しかし、IL-10 がいかなる分子機構で生体において慢性腸炎を抑制するかは全く理解されていない。慢性炎症性腸疾患は、現代増加の一途をたどる疾患のひとつで、その病因・病態の解明、さらにその治療法の確立が待ち望まれている。

申請者は、マクロファージにおいて IL-10 のシグナル伝達に Stat3 が必須であることを見出し、Stat3 をマクロファージ特異的に欠損させると、マクロファージが異常に活性化され、IL-10 欠損マウスと同様の慢性腸炎を発症することを見出した。このことは、生体における慢性炎症性腸疾患の発症には、マクロファージの異常活性化が直接関与しており、IL-10 が生体

で炎症抑制に働く主要な標的細胞はマクロファージであることを示している。これらの事実から、IL-10 および自然免疫系に属するマクロファージ系細胞の活性調節機構に標的をしぼることにより、慢性炎症性腸疾患の発症機序を解明できるものと考えている

そこで、生体で慢性炎症性腸疾患の誘因となるマクロファージをはじめとする自然免疫系の細胞の活性がいかなる分子機構で制御されているかを明らかにしていくことを目的とする。この分子機構を解明することにより、自然免疫系細胞の活性抑制機構からみた慢性炎症性腸疾患の病因の解明をめざす。この成果は、自然免疫系の細胞の機能制御を可能にするばかりでなく、クローン病や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患の病因・病態の解明、さらには画期的な治療対策の考案にも役立つことが期待される。

#### B. 研究方法

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

ファージや樹状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。

#### (倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極大苦痛の軽減を行うよう配慮している。

### C. 研究結果

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 がマクロファージでの IL-10 シグナルに必須であり、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の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 刺激依存性の TNF- $\alpha$  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 とともに正常大腸粘膜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 p50 NF- $\kappa$ 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

以上の結果から、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 I $\kappa$ BNS 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、I $\kappa$ BNS、Bcl-3 の核に発現する I $\kappa$ B 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

大腸の粘膜固有層に局在する自然免疫系細胞は、TLR 刺激に応答しない。そしてその不応答機構の破綻が慢性炎症性腸疾患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

#### 1. 論文発表

1. Hokuto, I., Ikegami, M., Yoshida, M., Takeda, K., Akira, S., Perl, A. T., Hull, W. M., and Whitsett, J. A.: Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia. *J. Clin. Invest.* 113, 28-37 (2004).
2. Into, T., Kiura, K., Yasuda, M., Kataoka, H., Inoue, N., Hasebe, A., Takeda, K., Akira, S., and Shibata, K.: Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF- $\kappa$ B activation. *Cell. Microbiol.* 6, 187-199 (2004).
3. Akazawa, T., Masuda, H., Saeki, Y., Matsumoto, M., Takeda, K., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Takahashi, T., Azuma, I.,

- Akira, S., Toyoshima, K., and Seya, T.: Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* 64, 757-764 (2004).
4. Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., and Raz, E.: Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126, 520-528 (2004).
  5. Inoue, H., Ogawa, W., Ozaki, M., Haga, S., Matsumoto, M., Hashimoto, N., Kido, Y., Mori, T., Sakaue, H., Iguchi, H., Hiramatsu, R., Leroith, D., Takeda, K., Akira, S., and Kasuga, M.: Role of Stat3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat. Med.* 10, 168-174 (2004).
  6. Liu, B., Mori, I., Hossain, M. J., Dong, L., Takeda, K., and Kimura, Y.: Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Gen. Virol.* 85, 423-428 (2004).
  7. Robben, P. M., Mordue, D. G., Truscott, S. M., Takeda, K., Akira, S., and Sibley, L. D.: Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J. Immunol.* 172, 3686-3694 (2004).
  8. 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.: Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates renal tubular cell apoptosis in chronic obstructive uropathy. *Int. J. Mol. Med.* 13, 515-520 (2004).
  9. Weiss, D. S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S., and Zychlinsky, A.: Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J. Immunol.* 172, 4463-4469 (2004).
  10. Li, Y., Ishii, K., Hisaeda, H., Hamano, S., Zhang, M., Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Hemmi, H., Takeda, K., Akira, S., Iwakura, Y., and Himeno, K.: 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 (2004).
  11. Ikushima, H., Nishida, T., Takeda, K., Ito, T., Yasuda, T., Yano, M., Akira, S., and Matsuda, H.: Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is down-regulated after operation. *Surgery* 135, 376-385 (2004).
  12. Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Miyagi, K., Kinjo, T., Yara, S., Koguchi, Y., Miyazato, A., Shibuya, K., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Interferon-g production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. *Microbes Infect.* 6, 339-349 (2004).
  13. 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.: Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic beta-cell-specific STAT3 knockout mice. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 319, 1159-1170 (2004).
  14. Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S.: 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 (2004).
  15. Kishino, M., Yukawa, K., Hoshino, K., Kimura, A., Shirasawa, N., Otani, H., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Maeda, M., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Mune, M.: 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 (2004).
16. Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Yamamoto, S., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saito, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Muta, T., Takeda, K., and Akira, S.: Regulation of Toll/IL-1 receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I $\kappa$ B $\zeta$ . *Nature* 430, 218-222 (2004).
  17. 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.: 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 (2004).
  18. Yang, R., Murillo, F. M., Lin, K.-Y., Yutzy IV, W. H., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., and Roden, R. B. S.: Human papillomavirus type-16 virus-like particles activate complementary defense responses in key dendritic cell subpopulations. *J. Immunol.* 173, 2624-2631 (2004).
  19. 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.: MyD88 but not TRIF is essential for osteoclastogenesis induced by lipopolysaccharide, diacyl lipopeptide, and IL-1 $\alpha$ . *J. Exp. Med.* 200, 601-611 (2004).
  20. Nakasone, C., Kawakami, K., Hoshino, T., Kawase, Y., Yokota, K., Yoshino, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Limited role for interleukin-18 in the host protection response against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect. Immun.* 72, 6176-6180 (2004).
  21. Yang, R., Murillo, F. M., Cui, H., Blosser, R., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., and Roden, R. B.: Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J. Virol.* 78, 11152-11160 (2004).
  22. Vossenkamper, A., Went, T., Alvarado-Esquivel, C., Takeda, K., Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lochner, M., Forster, I. and Liesenfeld, O.: 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 (2004).
  23. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Awad, S., Satoh, T., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., Kaneda, Y., and Nishioka, K.: 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 (2004).
  24. Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M. H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. *Gene Ther.* 11, 1763-1771 (2004).
  25. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive



- nephropathy. *Int. J. Mol. Med* 15, 73-78 (2005).
26. Yamamoto, M., Takeda, K., and Akira, S.: TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.* 40, 861-868 (2004).
  27. Takeda, K., and Akira, S.: TLR signaling pathway. *Seminar Immunol.* 16, 3-9 (2004).
  28. Takeda, K., and Akira, S.: Microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Dermatol. Sci.* 34, 73-82 (2004).
  29. Akira, S., and Takeda, K.: Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499-511 (2004).
  30. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors: ligands and signaling. *Innate Immune Response to Infection* 257-270 (2004).
  31. Takeda, K., and Akira, S.: Biological roles of the STAT family in cytokine signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology* 166, 97-121 (2004).
  32. Akira, S., and Takeda, K.: Functions of Toll-like receptors: lessons from KO mice. *C. R. Biol.* 327, 581-589 (2004).
  33. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14 (2005).
2. 学会発表
1. Kiyoshi Takeda, Role of TIR domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling pathways. International Workshop on The Immune System; Development, Activation, and Manipulation, 2004. 2. 16-17, Tokyo
  2. Kiyoshi Takeda, Regulation of chronic intestinal inflammation by innate immune cells. (invited) 13<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 2004. 7. 2, Osaka
  3. Kiyoshi Takeda, Innate immune recognition by Toll-like receptors (Organizer) Surface Barrier Immunology Study Group (SBARIS) 1<sup>st</sup> Meeting 「Innate Immunity at Mucosal Surface」 2004. 7. 9-10, Tokyo
  4. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors (Invited) The 3<sup>rd</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2004. 8. 29-9. 2, Hyogo, Japan
  5. Kiyoshi Takeda, Toll-like receptors for mucosal immunity (Invited) 2004 KOSEF-JSPS Asian Science Seminar, Development of Mucosal Vaccines, 2004. 10. 24-27, Seoul, Korea
  6. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immunity by Toll-like receptors (invited) International Mini-Symposium: Advanced Research on Innate Immunity, 2004. 11. 12, Kumamoto, Japan
  7. Kiyoshi Takeda, Evolution and integration of innate immune recognition systems: The Toll-like receptors (Symposium; Invited) The 8<sup>th</sup> conference of the International Endotoxin Society, 2004. 11. 15-18, Kyoto, Japan
  8. Kiyoshi Takeda, Involvement of Toll-like receptor-mediated activation of innate immunity in mycobacterial infection. 40<sup>th</sup> anniversary of Japan-US, Program for Tuberculosis and Leprosy panel, 2004. 12. 9, Kyoto, Japan
  9. 竹田潔, Toll-like receptorによる自然免疫応答の制御, 第2回九州大学生体防御医学研究所・東京大学医科学研究所, 「感染・免疫・ゲノム」合同シンポジウム, 2004. 7. 6, 東京
  10. 山本雅裕, 竹田潔, 審良静男, Toll-like receptor を介した細胞内シグナル伝達機構と遺伝子発現制御, 第25回日本炎症・再生医学会, 2004. 7. 13, 東京
  11. 竹田潔, Toll-like receptorによる自然免疫系の活性化機構 (シンポジウム, 招待講演) 第17回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 2004. 11. 25, 北九州
  12. 竹田潔, 遺伝子改変による免疫系シグナル伝達機構の解析 (免疫学会受賞講演) 第34回日本免疫学会学術集会, 2004. 12. 1-3, 札幌
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

新規無毒化コレラ毒素アジュバンドによる粘膜免疫応答の誘導に関する研究

分担研究者 萩原 由加利 （社）北里研究所・生物製剤研究所

**研究要旨** コレラ毒素（nCT）は有効な粘膜アジュバンドであるが、経鼻投与した場合に中枢神経系に取り込まれる可能性が報告されている。そこで nCT の細胞内輸送に関連する A サブユニットの COOH-末端に存在する小胞体残留シグナル KDEL 配列（リジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシン）と毒素活性中心の 2 カ所に変異を導入した 2 種のダブル変異 CT（dmCT E112K/KDEV, dmCT E112K/KDGL）を作製し、その安全性と有効性を検討した。dmCT の細胞内輸送の観察、CT 活性、アジュバンド活性、T 細胞系免疫応答等を解析した結果、これらは細胞内輸送能に変化を示し、神経細胞への移行も nCT と異なる可能性が示唆された。また、高い安全性とアジュバンド活性を保持していたことから、経鼻免疫の安全で有効なアジュバンドになる可能性が示された。

A. 研究目的

粘膜ワクチンは感染症制御のための有効で安全な次世代ワクチンとして期待されている。しかし十分な分泌型 IgA（s-IgA）を粘膜上皮に誘導するためにはワクチン抗原をアジュバンドと共に投与する必要がある。コレラ菌の産生するコレラトキシン（nCT）や毒素原性大腸菌の産生する易熱性毒素（nLT）は、粘膜上に効率よく s-IgA を誘導する強力なアジュバンドとして知られているが、実際にワクチンに用いるにはその毒性が問題となる。この点を改善するために遺伝的手法により毒性を減じ、且つ免疫増強活性が維持されている変異 CT（mCT）の開発を進めている。しかし、最近になりタンパク抗原と CT を経鼻接種したところ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、CT 併用経鼻ワクチンの安全性が懸念されている。そこで中枢神経へ移行しない mCT を作製するために、CT の細胞内輸送に関与する A サブユニットの COOH-末端の小胞体残留シグナル KDEL 配列（リジン-アスパラギン酸-グルタミン酸-ロイシン）に着目した。そして、すでにその安全性および有効性が確認されている mCT E112K（A サブユニットの 112 番目をグルタミン酸からリジンに置換）にこの変異を導入し、2 種のダブル mCT（dmCT E112K/KDEV, dmCT E112K/KDGL）を作製し、その安全性と有効性を検討した。

B. 研究方法

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 DH5α 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 のアジュバンド活性；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 μg を dmCT 0.5 μg 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。
- 5) 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。

（倫理面への配慮）

動物実験は当研究所の動物取り扱い規定に準拠して飼育し、取り扱いにおいては苦痛を軽減するよう配慮した。

C. 研究結果

- 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

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。

#### D. 考察

経鼻ワクチンは抗原と粘膜アジュバンド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ドの開発である。

nCT や nLT の強力な粘膜アジュバンド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 のアジュバンド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この仮説を立て 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、アジュバンド活性に関しては、dmCT は経鼻免疫の非常に有効なアジュバンド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。

#### E. 結論

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ドとなる可能性が示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Yoshino N, Lu FX, Fujihashi K, Hagiwara Y, Kataoka K, Lu D, Hirst L, Honda M, van Ginkel FW, Takeda Y, Miller CJ, Kiyono H, McGhee JR. A novel adjuvant for mucosal immunity to HIV-1 gp120 in nonhuman primates. *J Immunol.* 2004, 173:6850-7.

##### 2. 学会発表

(1) Nontoxic CT Mutant (E112K) With Second Mutated In The COOH-Terminal KDEL Of The A Subunit Are Effective Mucosal Adjuvants, Hagiwara Y, Kataoka K,