

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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成 18 年（2006 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	9
	2. 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	13
	3. <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	17
	4. ペプチド型アジュバントの開発	
	竹田 美文、 濱端 崇	19
	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	23
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV.	研究成果の刊行物・別刷	35

総括研究報告

厚生労働科学研究費（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・感染免疫大部門・炎症免疫学分野 教授）

分担研究者 萩原 由香利（（社）北里研究所・生物製剤研究所 係長）
高木 広明（（株）プロテイン・エクスプレス 副社長）
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）
竹田 潔（九州大学生体防御医学研究所 教授）

研究要旨：本研究計画では我々が開発してきた無毒化変異型 (mCT) とキメラ型 (mCT-A/LT-B) 粘膜アジュバントの実用化に向けた基礎研究を推進してきた。その目的達成に向けて三本柱の研究体制で相補的・横断的研究を展開している。一つの柱は無毒化変異型 (mCT) とキメラ型 (mCT-A/LT-B) アジュバントを中心として、そのさらなる有効性・安全性を追求した改良型の開発も含めた応用性について、マウス・サルの実験系を駆使した基礎的検討を進めている（清野・萩原）。次に、そのヒトへの応用性を旨とした臨床試験開始に向けて、無毒化変異型 (mCT) とキメラ型 (mCT-A/LT-B) の大量発現系システムの確立ならびにフィールド準備に向けた TR 型研究も進んでいる（高木・竹田（美））。第三の柱としては、近年注目されている TLR を中心とした自然免疫系分子群を標的としたアジュバントや CT 免疫増強部位ペプチド型アジュバントなどを探索する基礎研究を進めている [竹田（潔）・濱端]。つまり、無毒化変異型 (mCT) とキメラ型 (mCT-A/LT-B) 粘膜アジュバントの実用化に向けての応用基礎研究を展開しながら、次世代ともいえる改良型また自然免疫分子標的型粘膜アジュバント開発へ向けての基礎研究を同時進行し、目的達成を目指している。

A. 研究目的

インフルエンザ、鳥インフルエンザ、SARS、エイズ、バイオテロに代表される新興・再興感染症に対する粘膜ワクチンの開発は、これらの感染源が主に粘膜面を介して侵入してくるという点からも重要であり、その開発は急務である。粘膜面に有効な抗原特異免疫応答を誘導するためには、ワクチン抗原と粘膜アジュバントの併用が必須であり、その開発が粘膜ワクチン実現化に向けて鍵を握っている。しかしながらその有効性と安全性を兼ね備えた理想的な粘膜アジュバントの開発は未だ達成されておらず、本研究はヒトへの応用に向け安全性のより高い、有効な粘膜アジュバントの開発を目指すものである。本研究計画では我々が開発してきた無毒化変異型 (mCT, PNAS 94:5267, 1997) や、その進化型であるキメラ型 (mCT-A/LT-B, JID 186:1261, 2002) についてヒトへの応用を目指し、マウス・サルを使った有効性・安全性の検討を進めるだけでなく、改良型や自然免疫関連分子標的型など次世代粘膜アジュバントの開発を目指した基礎研究も展開している。

B. 研究方法

- 1) mCT のボツリヌス毒素 (BoNT/A) 粘膜ワクチン開発への応用性検討：A 型ボツリヌス類毒素 (BoNToxoid/A:20 μ g) と mCT E112K (5 μ g) を混合し、経鼻ワクチンとしてマウスに週一回、4 週間投与した。最終経鼻免疫後、鼻洗浄液、唾液、糞便抽出液を採取し、ELISA 法で BoNT/A 特異的抗体誘導を検討した。さらに、脾臓、鼻腔粘膜固有層、腸管粘膜固有層から細胞を分離し、ELISPOT 法にて BoNT/A 特異的抗体産生細胞誘導を単個細胞レベルで解析した。さらに当研究班が開発した BoNT/A 経口投与致死誘導モデルを駆使して、A 型ボツリヌス毒素特異的免疫応答による防御効果を検討した。
- 2) 改良型ダブルミュータント CT の開発研究：経鼻免疫による中枢神経系への移行などの副作用を抑制し、より安全性の高い粘膜アジュバント開発に向けて、CT の細胞内輸送に関与する A2 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種のダブルミュータント 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。

- 3) *B. choshinensis* 発現系を応用したキメラ型アジュバント作製：キメラ発現プラスミド (pNCM02 chimera) を保有する *B. choshinensis* 形質転換株から蛋白質安定生産株の選抜を行ない、ワーキングセルを作成した。ワーキングセルを用いて、3L jar レベルでのキメラ蛋白質の生産条件と精製条件を検討し、動物試験用試作品を調製した。
- 4) ペプチド型アジュバント開発へ向けての基礎研究：CT 分子のアジュバント活性部位をペプチドレベルで同定するために、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て調整した。それを動物実験に使い粘膜アジュバント効果を検討した。
- 5) TLR をターゲットとした新規粘膜アジュバント開発へ向けた基礎研究：アジュバント開発へ向けた基礎データを集積する目的で TLR を介した活性調整機構の解析を開始した。自然免疫系の活性・抑制制御機構を解析するためのモデルとして、自然免疫系の活性制御機構の破綻により慢性大腸炎を発症する、自然免疫系特異的 Stat3 欠損マウス、IL-10 ノックアウトマウスを用いて解析を行った。

(倫理面への配慮)

本実験計画の動物実験に関しては、国立大学実験動物施設協議会指針などにに基づき、各研究機関での動物取り扱い指針に準拠して行われた。

C. 研究結果

- 1) mCT のボツリヌス毒素 (BoNT/A) 粘膜ワクチン開発への応用性検討：mCT を粘膜アジュバントとして A 型ボツリヌス類毒素 (BoNToxoid/A) とともにマウスに経鼻免疫したところ、効果的に

BoNT/A 特異的 IgG を血清中に誘導した。さらに、腸管分泌液をはじめとした各種分泌液中に BoNT/A 特異的 IgA を誘導することにも成功した。また、これら抗体特異的抗体産生パターンを反映するように、脾臓や腸管粘膜固有層から分離した細胞群には、各々 BoNT/A 特異的 IgG 産生細胞と IgA 産生細胞が高頻度で検出された。BoNT/A 特異的抗体誘導が確認されているこれらのマウスと BoNT/A を使って、従来型の注射投与ならびに我々が開発した経口投与モデルによってその中和効果を検討したところ、十分な防御効果を確認することが出来た。

- 2) 改良型ダブルミュータント CT の開発研究：ダブルミュータントコレラ毒素 (dmCT) E112K/KDEV および dmCT E112K/KDGL の中枢神経系への安全性を検討するために、化学標識した dmCT を用いてマウスの中枢神経系への取込み・蓄積を検討した。その結果、天然型 CT (nCT) では嗅脳への蓄積が認められたのに対して、dmCT E112K/KDEV と dmCT E112K/KDGL はともに有意に低かった。また、dmCT の抗原特異的細胞傷害誘導能についても検討を加えた結果、dmCT E112K/KDGL は nCT と同程度の抗原特異的 CD8⁺ T 細胞活性を示した。
- 3) *B. choshinensis* 発現系を応用したキメラ型アジュバント作製：2SLN 培地 2L を用い、通気量と回転数は 1vvm, 200 rpm の条件で 32°C, 68 時間培養が最も生産性が高かった。培養液を、限外ろ過 (0.16 μm) で除菌した。ろ過液を pH 8.0 に調整し、固定化 D-galactose column に吸着、20 mM リン酸バッファー (pH 8.0) で洗浄後 0.3 M D-galactose / 20 mM リン酸バッファーで溶出した。100 KD UF 膜により D-galactose および培地や水由来のエンドトキシンを除去し、試作品とした。12 L の培養により 125 mg の精製標品を得た。
- 4) ペプチド型アジュバント開発へ向けての基礎研究：CT のペプチド型アジュバント開発に向け、CT のアジュバント活性を担う部位を同定するため、nCT, mCT, nCT-A, mCT-A および CT-B を精製した。これらをアジュバントとし、OVA を抗原としてマウス経鼻投与実験を行ったところ、nCT あるいは nCT-A をアジュバントとして加えたグループにのみ強い免疫が惹起された。nCT および mCT を用いて GM1-ELISA を行ったところ、両分子の GM1 への結合性は同等

であった。また Native-PAGE により nCT, mCT, nCT-A, mCT-A および CT-B の移動度を比較したところ、nCT に比べ mCT が、また mCT-A に比べ mCT-A が、若干遅れて泳動されるものの、ほぼ同じ移動度を示す事がわかった。

- 5) TLR をターゲットとした新規粘膜アジュバント開発へ向けた基礎研究：アジュバント受容体である TLR を介した自然免疫系の活性化の制御機構を解析した。特に、腸管粘膜免疫系の自然免疫系の活性制御機構を解析するため、正常マウスと慢性大腸炎を発症する 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、I κ B ファミリーに属する I κ BNS が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 κ BNS の生理機能を解析するためノックアウトマウスを作製したところ、I κ BNS ノックアウトマウス由来のマクロファージでは、TLR 刺激により誘導される遺伝子の中で、IL-6 などの NF- κ B 依存性に 3 時間以降に遅れて誘導されてくる遺伝子の発現が有意に上昇していた。また TLR 刺激による NF- κ B の活性が遷延化し、刺激後 3 時間でも NF- κ B の活性が残存していた。

D. 考察

新興・再興感染症の予防という視点から、現在の世界的社会情勢を考慮した時に急務と考えられるバイオテロ対策につながる粘膜ワクチン開発への mCT の応用性を示唆する結果が得られたことは非常に重要であり、今後の展開が期待される。また、現在までボツリヌス毒素に対する防御免疫誘導の有無検討には、毒素注射投与モデルが頻繁に使われてきた。本研究では世界に先駆けてボツリヌス毒素経口投与致死誘導モデル開発に成功し、そのモデルは同毒素が実際に腸管粘膜を介して取り込まれ致命的麻痺症状が誘発される実態を反映していることを示した。食物・飲料水介在型伝搬毒素として腸管粘膜を介して取り込まれる A 型ボツリヌス毒素に対する防御効果のある粘膜免疫応答が誘導出来ることが、本研究で開発されたボツリヌス毒素経口投与致死誘導モデルを駆使して個体レベルで確認され、mCT を粘膜アジュバントとして併用したボツリヌス毒素対策用粘膜ワクチン開発への扉を開く事が出来た。

mCT の改良型として期待される A2 サブユニット COOH 末端 KDEL 配列に変異を導入したダブルミュータント (dmCT) について、経鼻免疫時に危惧される脳毒性について検討したところ嗅神経上皮へ

の取り込みは認められるが、嗅脳への蓄積は認められず、その安全性について意義のある結果が得られた。今後はその結果を基盤としてさらなる安全性についての検討を進めていく必要がある。さらに、dmCT には CTL 活性誘導増強効果があることも確認され新規粘膜アジュバント候補として期待される。

mCT と並んで実用化が期待されるキメラ型アジュバントに関しては、大量産生システムの確立に向けて方向性を示す結果を得ることが出来た。3 L ジャーファーマンター規模での *B. choshinensis* の宿主-ベクター系を用いたキメラ分子 (mCT-A/LT-B) の生産・精製を行い、安定して標品を得ることができるようになった。簡便な精製工程で夾雑蛋白質がなく、エンドトキシンの少ない品質の試作品が得られたことにより、実用レベルでの製造フローが構築できたと考えている。

次世代粘膜アジュバント開発へ向けた基礎研究では自然免疫系免疫応答調整・制御分子として I κ B ファミリーに属する I κ BNS が同定され、同分子が遺伝子レベルで免疫担当細胞活性化の制御に関与することが明らかとなった。同分子が腸管粘膜等に存在する免疫担当細胞の異常応答を制御する機構に関与していることも示唆されており、これを標的とした粘膜免疫調節因子の開発も考えていく必要があるであろう。

E. 結論

粘膜アジュバント開発に向けて、1) 無毒化変異型 (mCT) とキメラ型 (mCT-A/LT-B) を中心として、そのさらなる有効性・安全性を追求した改良型の開発ならびに、その応用性に関するマウス・サルの実験系を駆使した基礎的検討 (清野・萩原)。2) ヒトへの応用性を目指した臨床試験開始に向けた、無毒化変異型 (mCT) とキメラ型 (mCT-A/LT-B) の大量発現系システムの確立ならびにフィールド準備に向けた TR 型研究 (高木・竹田 (美))。3) 近年注目されている TLR を中心とした自然免疫系分子群を標的としたアジュバントや CT 免疫増強部位ペプチド型アジュバントなどを探索する基礎研究 [竹田 (潔)・濱端] に代表される三本の柱研究が相補的・横断的に進み着実に成果を上げていく。今後も無毒化変異型 (mCT) とキメラ型 (mCT-A/LT-B) 粘膜アジュバントの実用化に向けての応用基礎研究を展開しながら、次世代型ともいえる改良型ならびに自然免疫分子標的型粘膜アジュバントの開発へ向けての基礎研究を同時進行し、目的達成を目指していく。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kobayashi R, Kohda T, Kataoka K, Ihara H, Kozaki S, Pascual DW, Staats HF, Kiyono H, McGhee JR, and Fujihashi K. A novel neurotoxoid vaccine prevents mucosal botulism. *J. Immunol.* 174: 2190-2195, 2005.
- Ohmura M, Yamamoto M, Tomiyama-Miyaji C, Yuki Y, Takeda Y, and Kiyono H. Nontoxic Shiga toxin derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for the augmentation of antigen-specific immune responses via dendritic cell activation. *Infect. Immun.* 73: 4088-4097, 2005.
- van Ginkel FW, Jackson RJ, Yoshino N, Hagiwara Y, Metzger DJ, Connell TD, Vu HL, Martin M, Fujihashi K, and McGhee JR. Enterotoxin-based mucosal adjuvants alter antigen trafficking and induce inflammatory responses in the nasal tract. *Infect Immun.* 73:6892-902, 2005.
- Kweon MN, Yamamoto M, Rennert PD, Park EJ, Lee AY, Chang SY, Hiroi T, Nanno M, and Kiyono H. Prenatal blockage of lymphotoxin β receptor and TNF receptor p55 signaling cascade resulted in the acceleration of tissue genesis for isolated lymphoid follicles in the large intestine. *J. Immunol.* 174: 4365-4372, 2005.
- Nonaka S, Naito T, Chen H, Yamamoto M, Moro K, Kiyono H, Hamada H, and Ishikawa H. Intestinal gamma delta T cells develop in mice lacking thymus, all lymph nodes, Peyer's patches, and isolated lymphoid follicles. *J. Immunol.* 174: 1906-1912, 2005.
- Ueta M, Hamuro J, Kiyono H, and Kinoshita S. Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331: 285-294, 2005.
- Kai Y, Takahashi I, Ishikawa H, Hiroi T, Mizushima T, Matsuda C, Kishi D, Hamada H, Tamagawa H, Ito T, Yoshizaki K, Kishimoto T, Matsuda H, and Kiyono H. Colitis in mice lacking the common cytokine receptor gamma chain is mediated by IL-6-producing CD4⁺ T cells. *Gastroenterology* 128: 922-934, 2005.
- Hino A, Fukuyama S, Kataoka K, Kweon MN, Fujihashi K, and Kiyono H. Nasal IL-12p70DNA prevents and treats intestinal allergic diarrhea. *J. Immunol.* 174: 423-7432, 2005.
- Kunisawa J, and Kiyono H. A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defense. *Cell Mol. Life Sci.* 62:1308-1321, 2005.
- Yuki Y, Hara-Yokoyama C, Guadiz AA, Uda S, Kiyono H, and Chatterjee S. Production of a recombinant cholera toxin B subunit-insulin B chain peptide hybrid protein by *Brevibacillus choshinensis* expression system as a nasal vaccine against autoimmune diabetes. *Biotechnol. Bioeng.* 92:803-809, 2005.
- Kunisawa J, Fukuyama S, and Kiyono H. Mucosa-associated lymphoid tissues in the aerodigestive tract: their shared and divergent traits and their importance to the orchestration of the mucosal immune system. *Curr. Mor. Med.* 5:557-572, 2005.
- Takagi H, Hiroi T, Yang L, Tada Y, Yuki Y, Takamura K, Ishimitsu R, Kawauchi H, Kiyono H, and Takaiwa F. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induce oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102:17525-17530, 2005.
- Ishikawa H, Kanamori Y, Hamada H, and Kiyono H. Development and function of organized gut-associated lymphoid tissues. In: Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, and Mayer L. editors. *Mucosal Immunology* 3rd Ed. Amsterdam, ELSEVIER; 385-406, 2005.
- Kweon MN, and Kiyono H. Allergic diseases in the gastrointestinal tract Mucosa-associated lymphoid tissues in the aerodigestive tract. In: Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, and Layer L. editors. *Mucosal Immunology* 3rd Ed. Amsterdam, ELSEVIER; 1351-1360, 2005.

- Igarashi O, Nochi T, Terahara K, and Kiyono H. Linkage between innate and acquired immunities at the mucosa. International Congress Series 1285:84-93, 2005.
- Wieland CW, Florquin S, Maris NA, Hoebe K, Beutler B, Takeda K, Akira S, and van der Poll T. The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung. J. Immunol. 175:6042-6049, 2005.
- Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, Matsumoto K, Takeuchi O, and Akira S. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. Nat. Immunol. 6:1087-1095, 2005.
- Yukawa K, Tanaka T, Owada-Makabe K, Tsubota Y, Bai T, Maeda M, Takeda K, Akira S, and Iso H. Reduced prepulse inhibition of startle in STAT6-deficient mice. Int. J. Mol. Med. 16:673-675, 2005.
- Matsukawa A, Kudo S, Maeda T, Numata K, Watanabe H, Takeda K, Akira S, and Ito T. Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. J. Immunol. 175:3354-3359, 2005.
- Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, and Akira S. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. Immunity 23:19-28, 2005.
- Ohkawara T, Takeda H, Nishihira J, Miyashita K, Nihiwaki M, Ishiguro Y, Takeda K, Akira S, Iwanaga T, Sugiyama T, and Asaka M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. Clin. Exp. Immunol. 141:412-421, 2005.
- Weiss DS, Takeda K, Akira S, Zychlinsky A, and Moreno, E. MyD88, but not Toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. Infect. Immun. 73:5137-5143, 2005.
- Yang S, Takahashi N, Yamashita T, Sato N, Takahashi M, Mogi M, Uematsu T, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Takeda K, Akira S, Takada H, Udagawa N, and Furusawa K. Muramyl dipeptide enhances osteoclast formation induced by lipopolysaccharide, IL-1 β , and TNF- α through nucleotide-binding oligomerization domain 2-mediated signaling in osteoblasts. J. Immunol. 175:956-964, 2005.
- Shindou H, Ishii S, Yamamoto M, Takeda K, Akira S, and Shimizu T. Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A: lyso-platelet-activating factor acetyltransferase is MyD88 and TRIF independent. J. Immunol. 175:1177-1183, 2005.
- Kitching AR, Turner AL, Wilson GR, Semple T, Odobasic D, Timoshanko J R, O'sullivan KM, Tipping PG, Takeda K, Akira S, and Holdsworth SR. IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. J. Am. Soc. Nephrol. 16: 2023-2033, 2005.
- Yang R, Murillo FM, Delannoy MJ, Blosser RL, Yutzy WH, 4th, Uematsu S, Takeda K, Akira S, Viscidi RP, and Roden RB. B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR4-MyD88. J. Immunol. 174:7912-7919, 2005.
- Yang R, Wheeler CM, Chen X, Uematsu S, Takeda K, Akira S, Pastrana DV, Viscidi RP, and Roden RB. Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate

- immunity in cervical cancer. *J. Virol.* 79:6741-6750, 2005.
- Xu AW, Kaelin C B, **Takeda K**, Akira S, Schwartz MW, and Barsh GS. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J. Clin. Invest.* 115:951-958, 2005.
- Yukawa K, Iso H, Tanaka T, Tsubota Y, Owada-Makabe K, Bai T, **Takeda K**, Akira S, and Maeda M. Down-regulation of dopamine transporter and abnormal behavior in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 15:819-825, 2005.
- Kumanogoh A, Shikina T, Suzuki K, Uematsu S, Yukawa K, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yamamoto M, Takamatsu H, Ko-Mitamura EP, Takegahara N, Marukawa S, Ishida I, Morishita H, Prasad DV, Tamura M, Mizui M, Toyofuku T, Akira S, **Takeda K**, Okabe M, and Kikutani H. Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: Defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity* 22:305-316, 2005.
- Hirovani T, Lee PY, Kuwata H, Yamamoto M, Matsumoto M, Kawase I, Akira S, and **Takeda K**. The nuclear I κ B protein I κ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* 174: 3650-3657, 2005.
- Araki A, Kanai T, Ishikura T, Makita S, Uraushihara K, Iiyama R, Totsuka T, **Takeda K**, Akira S, and Watanabe M. MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J. Gastroenterol.* 40:16-23, 2005.
- Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, Haro T, Kakumitsu H, Yoshie M, Yamamoto M, **Takeda K**, Matsuda T, Akira S, Ogawa K, and Harada M. Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling. *Stem Cells* 23: 252-263, 2005.
- Yukawa K, Kishino M, Goda M, Liang X M, Kimura A, Tanaka T, Bai T, Owada-Makabe K, Tsubota Y, Ueyama T, Ichinose M, Maeda M, **Takeda K**, and Akira S. STAT6 deficiency inhibits tubulointerstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15:225-230, 2005.
- Akamine M, Higa F, Arakaki N, Kawakami K, **Takeda K**, Akira S, and Saito A. Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73:352-361, 2005.
- 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.
- Takeda K**. Toll-like receptors and their adaptors in innate immunity. *Cur. Med. Chem. AIAA.* 4:3-11, 2005.
- Takeda K**, and Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17:1-14, 2005.
- Takeda K**. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 11:51-55, 2005.
- Kuwata K, Matsumoto M, Atarashi K, Morishita H, Hirovani T, Koga R, and **Takeda K**. I κ BNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24:41-51, 2006.
- Ogawa A, Tagawa T, Nishimura H, Yajima T, Abe T, Arai T, Taniguchi M, **Takeda K**, Akira S, Nimura Y, and Yoshikai Y. Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas-dependent apoptosis in Peyer's patch and liver

at an early stage after bile duct ligation in mice. Gut 5:105-113, 2006.

Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Yang B, Seoh JY, Kiyono H, and Miyasaka M. CCR7 is critically important for migration of immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. J. Immunol. 176:803-810, 2006.

Duverger A, Jackson RJ, van Ginkel FW, Fischer R, Tafaro A, Leppla SH, Fujihashi K, Kiyono H, McGhee JR, and Boyaka PN. *Bacillus anthracis* edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens. J. Immunol. 176:1776-1783, 2006.

2. 学会発表

Chan SY, Rennert PD, Yamamoto M, Igarashi O, Kiyono H, and Kweon MN. Essential role of draining and mesenteric lymph nodes for the induction of mucosal immune responses by transcutaneous vaccination. 第35回日本免疫学会総会・学術集会 横浜 神奈川県 12月 2005.

Nagatake H, Fukuyama S, Kim DY, Takamura K, and Kiyono H. Unique chemokine receptors expression between NALT and Peyer's patch inducer cells. 第35回日本免疫学会総会・学術集会 横浜 神奈川県 12月 2005.

Hiroi T, Yoda M, Jang MH, Terahara K, Igarashi O, Takada K, Miyasaka M, Hirasawa M, and Kiyono H. Regulation of T cell unresponsiveness by CD11c⁺ eosinophils in the intestinal lamina propria. 第35回日本免疫学会総会・学術集会 横浜 神奈川県 12月 2005.

Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Gohda M, Shimizu M, and Kiyono H. Spingosine-1-phosphate-dependent and-independent migration pathway for large intestinal intraepithelial lymphocytes following microbial stimulation. 第35回日本免疫学会総会・学術集会 横浜 神奈川県 12月 2005.

Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Guo Z, Hirata T, Hiroi T, Umemoto E, Yang BG, Kipp M, Kiyono H, and Miyasaka M. Antigen presentation and migratory properties of novel intestinal lamina propria dendritic subsets. 第35回日本免疫学会総会・学術集会 横浜 神奈川県 12月 2005.

Kawahara K, Hiroi T, Igarashi O, Yoda M, Kiyono H, and Takahashi I. Characterization of environmental sensor components of the colon. 第35回日本免疫学会総会・学術集会 横浜 神奈川県 12月 2005.

Hagiwara Y, Hino A, Komase K, Suzuki Y, Kiyono H, McGhee JR, and Fujihashi K. Induction of CD8-Positive (CD8⁺) Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Responses By Nontoxic Double Mutant CT (E112K/KDGL) Adjuvant. 12th International Congress of Mucosal Immunology, Boston, USA, June 2005.

Hagiwara Y, Hino A, Kataoka K, Komase K, Kiyono H, McGhee J.R and Fujihashi K. Nasal application of a Nontoxic Double Mutant Of CT (E112K/KDGL) Induces CD11c⁺ Dendritic Cells. 第35回日本免疫学会総会・学術集会 横浜 神奈川県 12月 2005.

清水 健、濱端 崇、竹田美文、林 英生、太田敏子. 腸管出血性大腸菌が産生する志賀様毒素の認識性の解析. 第78回日本細菌学会総会 東京都 4月 2005.

清水 健、濱端 崇、川上怜美、林 英生、太田敏子. 志賀様毒素の受容体認識決定領域の解析. 第52回毒素シンポジウム 仙台 7月 2005.

Takeda K. The roles of STATs in inflammatory responses: Lessons from the knockout mouse. (symposium, invited), American Thoracic Society 2005, San Diego, USA. May 2005.

Takeda K, and Matsumoto M. Toll-like receptor-dependent innate immune responses in mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program. 40th Tuberculosis and

Leprosy Research Conference, Seattle, USA.
July 2005.

Takeda K. Regulation of Toll-like receptor-mediated gene expression by nuclear I κ B proteins. The 6th EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting, Heidelberg, Germany. September 2005.

竹田 潔. Toll-like receptors and pathogen recognition (Symposium, invited) 第 78 回日本細菌学会総会 東京 4 月 2005.

竹田 潔. Toll-like receptor と結核感染 (シンポジウム) 第 80 回日本結核病学会 埼玉 5 月 2005.

竹田 潔. 自然免疫シグナルの制御機構 (ワークショップ、招待講演) 第 5 回日本蛋白質科学会年会 福岡 7 月 2005.

竹田 潔. Toll-like receptor を介した自然免疫系の制御 (特別講演) 第 45 回日本リンパ網内系学会総会 福岡 7 月 2005.

竹田 潔. 自然免疫系と炎症性腸疾患 (シンポジウム、招待講演) 第 42 回日本消化器免疫学会総会 東京 8 月 2005.

Takeda K. Regulation of innate immune responses against intracellular pathogen infection (Symposium) 第 35 回日本免疫学会学術集会 横浜 12 月 2005.

桑田 啓貴、竹田 潔. Regulation of Toll-like receptor dependent gene induction by nuclear I κ B protein I κ BNS. 第 35 回日本免疫学会学術集会 横浜 12 月 2005.

古賀 律子、濱野 真二郎、松本 真琴、久枝 一、審良 静男、姫野 國介、竹田 潔. Involvement of Toll-like receptor-dependent activation of innate immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. 第 35 回日本免疫学会学術集会 横浜 12 月 2005.

松本 真琴、桑田 啓貴、山本 雅裕、審良 静男、吉開 泰信、竹田 潔. The role of Toll-like receptor signaling in mycobacterial infection. 第 35 回日本免疫学会学術集会 横浜 12 月 2005.

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

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（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・感染免疫大部門・炎症免疫学分野）

研究協力者：藤橋 浩太郎（アラバマ大学バーミングハム校 免疫ワクチンセンター）
小崎 俊司（大阪府立大学 獣医環境科学分野）

研究要旨：本研究計画の中で開発してきた無毒化変異型 (mCT) とキメラ型 (mCT-A/LT-B) アジュバントの実用化へ向けての基礎研究を推進してきた。本年度はバイオテロなどへの使用が危惧されている食物・飲料水介在型伝搬毒素であるボツリヌス毒素に対する効果的防御免疫誘導効果について検討を進めた。その評価系として、腸管粘膜を介したボツリヌス毒素投与致死誘導モデルの開発に成功した。A型ボツリヌス類毒素をワクチン抗原として mCT と混合し経鼻ワクチンとして投与すると全身系と粘膜系に毒素特異的 IgG と IgA 抗体が誘導された。さらに、経鼻ワクチン接種マウス群に対してA型ボツリヌス毒素を注射・経口投与すると、神経麻痺・筋弛緩などの症状発症が抑制された。つまり、mCT 混合型A型ボツリヌス類毒素経鼻ワクチンにより、毒素中和効果のある免疫誘導が可能であることが確認された。

A. 研究目的

鳥インフルエンザ、エイズ、バイオテロに代表される新興・再興感染症に対する粘膜ワクチンの開発は、これらの感染源が主に粘膜面を介して侵入してくるという点からも重要であり、その開発は急務である。粘膜面に有効な抗原特異免疫応答を誘導するためには、ワクチン抗原と粘膜アジュバントの併用は必須であり、その開発が粘膜ワクチン実現化に向けて鍵を握っており、本研究計画では我々が開発してきた無毒化変異型 (mCT, PNAS 94:5267, 1997) や、その進化型であるキメラ型 (mCT-A/LT-B, JID 186:1261, 2002) についてヒトへの応用を目指し、マウス・サルを使った有効性・安全性の検討を進めている。本年度は、有効性・安全性が動物実験で確認されている mCT について、昨今の世界情勢を考えたときに急務であるバイオテロ対策用粘膜ワクチン開発への応用性についての検討を進めた。

B. 研究方法

- 1) ボツリヌス毒素経口投与致死誘導モデル開発：前処理として空腹時マウスに 7.5% Sodium bicarbonate isotonic 液を経口投与した。その後、異なる濃度のA型ボツリヌス毒素 (BoNT/A: 25ng-2500ng) を経口投与し、麻痺・致死を指標として経口 LD₅₀ を検討した。
- 2) A型ボツリヌス毒素特異的免疫応答誘導：A型ボツリヌス類毒素 (BoNT/A: 20 μg) と mCT (5 μg) を混合し、経鼻ワクチンとしてマウスに週一回、4週間投与した。最終経鼻免

疫後、鼻洗浄液、唾液、糞便抽出液を採取し、ELISA 法で抗原特異的抗体誘導を検討した。さらに、脾臓、鼻腔粘膜固有層、腸管粘膜固有層から細胞を分離し、ELISPOT 法にて抗原特異的抗体産生細胞誘導を単個細胞レベルで解析した。

(倫理面への配慮)

本実験計画の実験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東京大学をはじめとする協同研究機関での実験動物取り扱い指針に基づいた実験を行った。また、毎年秋には同大学研究所として動物慰霊祭を実施している。

C. 研究結果

現在までボツリヌス毒素に対する防御免疫誘導の検討には、毒素注射投与モデルが頻繁に使われてきた。本研究では世界に先駆けてボツリヌス毒素経口投与致死誘導モデル開発に成功した。例えば、1群6匹のマウスを使用した実験により、A型ボツリヌス毒素 (BoNT/A: 2500ng) が経口 LD₅₀ 値を示し、その2回投与により全マウスが神経麻痺を伴う致死を引き起こした。

mCT を粘膜アジュバントとしてA型ボツリヌス類毒素 (BoNT/A) とともにマウスに経鼻免疫したところ、効果的に BoNT/A 特異的 IgG を血清中に誘導した。さらに、腸管分泌液をはじめとして各種分泌液中に BoNT/A 特異的 IgA を誘導することにも成功した。また、これら抗体特異的抗体産生パターンを反映するように、脾臓や腸管粘膜固有層から分離した細胞群には高頻度で、各々 BoNT/A 特異的

IgG 産生細胞と IgA 産生細胞が高頻度で検出された。BoNT/A 特異的抗体誘導が確認されているこれらのマウスとA型ボツリヌス毒素 BoNT/A を使って、従来型の注射投与ならびに我々が開発した経口投与モデルによってその中和効果を検討したところ、十分な防御効果を確認することが出来た。

D. 考察

昨年度はヒトに近い霊長類において mCT を経鼻アジュバントとして用いた場合の安全性に関して嗅覚細胞レベルではあるが、その副作用の可能性を否定する結果を得ておりヒトへの応用性の可能性が示唆された。そこで、本年度の研究により新興・再興感染症の予防という視点から、現在の世界的社会情勢を考慮した時に急務と考えられるバイオテロ対策につながる粘膜ワクチン開発への mCT の応用性を示唆する結果が得られたことは非常に重要性であり、今後の展開が期待される。また、現在までボツリヌス毒素に対する防御免疫誘導の有無検討には、毒素注射投与モデルが頻繁に使われてきた。本研究では世界に先駆けてボツリヌス毒素経口投与致死誘導モデル開発に成功した。本モデルは、同毒素が実際に腸管粘膜を介して取り込まれ致死的麻痺症状が誘発される実態を反映している。食物・飲料水介在型伝搬毒素として腸管粘膜を介して取り込まれる A 型ボツリヌス毒素に対する防御効果のある粘膜免疫応答が誘導出来ることが、本研究で開発されたボツリヌス毒素経口投与致死誘導モデルを駆使して個体レベルで確認され、mCT を粘膜アジュバントとして併用したボツリヌス毒素対策用粘膜ワクチン開発への扉を開く事が出来た。

E. 結論

mCT の粘膜アジュバントとしての有用性について、バイオテロなどへの使用が危惧されている食物・飲料水介在型伝搬毒素であるボツリヌス菌毒素に対する防御免疫誘導効果について検討を進めた。その評価系として、腸管粘膜を介したボツリヌス毒素投与致死誘導モデルの開発に成功した。A 型ボツリヌス類毒素をワクチン抗原として mCT と混合し経鼻ワクチンとして投与すると全身系と粘膜系に毒素特異的 IgG と IgA 抗体が誘導された。さらに、ボツリヌス毒素経口投与致死誘導モデルを駆使して mCT により誘導・増強された A 型ボツリヌス毒素特異的抗体には毒素中和効果があることが個体レベルで検証できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi R, Kohda T, Kataoka K, Ihara H, Kozaki S, Pascual DW, Staats HF, Kiyono H, McGhee JR, and Fujihashi K. A novel neurotoxicoid vaccine prevents mucosal botulism. *J. Immunol.* 174:2190-2195, 2005.

Ohmura M, Yamamoto M, Tomiyama-Miyaji C, Yuki Y, Takeda Y, and Kiyono H. Nontoxic Shiga toxin derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for the augmentation of antigen-specific immune responses via dendritic cell activation. *Infect. Immun.* 73:4088-4097, 2005.

Kweon MN, Yamamoto M, Rennert PD, Park EJ, Lee AY, Chang SY, Hiroi T, Nanno M, and Kiyono H. Prenatal blockage of lymphotoxin β receptor and TNF receptor p55 signaling cascade resulted in the acceleration of tissue genesis for isolated lymphoid follicles in the large intestine. *J. Immunol.* 174:4365-4372, 2005.

Nonaka S, Naito T, Chen H, Yamamoto M, Moro K, Kiyono H, Hamada H, and Ishikawa H. Intestinal gamma delta T cells develop in mice lacking thymus, all lymph nodes, Peyer's patches, and isolated lymphoid follicles. *J. Immunol.* 174:1906-1912, 2005.

Kai Y, Takahashi I, Ishikawa H, Hiroi T, Mizushima T, Matsuda C, Kishi D, Hamada H, Tamagawa H, Ito T, Yoshizaki K, Kishimoto T, Matsuda H, and Kiyono H. Colitis in mice lacking the common cytokine receptor gamma chain is mediated by IL-6-producing CD4⁺ T cells. *Gastroenterology* 128:922-934, 2005.

Ueta M, Hamuro J, Kiyono H, and Kinoshita S. Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331:285-294, 2005.

Hino A, Fukuyama S, Kataoka K, Kweon MN, Fujihashi K, and Kiyono H. Nasal IL-12p70DNA prevents and treats intestinal allergic

diarrhea. *J. Immunol.* 174:423-7432, 2005.

Kunisawa J, and Kiyono H. A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defense. *Cell Mol. Life Sci.* 62:1308-1321, 2005

Yuki Y, Hara-Yokoyama C, Guadiz AA, Udaka S, Kiyono H, and Chatterjee S. Production of a recombinant cholera toxin B subunit-insulin B chain peptide hybrid protein by *Brevibacillus choshinensis* expression system as a nasal vaccine against autoimmune diabetes. *Biotechnol. Bioeng.* 92:803-809, 2005.

Kunisawa J, Fukuyama S, and Kiyono H. Mucosa-associated lymphoid tissues in the aerodigestive tract: their shared and divergent traits and their importance to the orchestration of the mucosal immune system. *Curr. Mor. Med.* 5:557-572, 2005.

Takagi H, Hiroi T, Yang L, Tada Y, Yuki Y, Takamura K, Ishimitsu R, Kawauchi H, Kiyono H, and Takaiwa F. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induce oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102:17525-17530, 2005.

Ishikawa H, Kanamori Y, Hamada H, and Kiyono H. Development and function of organized gut-associated lymphoid tissues. In: Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, and Mayer L. editors. *Mucosal Immunology 3rd*. Amsterdam, ELSEVIER; 385-406, 2005.

Kweon MN, and Kiyono H. Allergic diseases in the gastrointestinal tract Mucosa-associated lymphoid tissues in the aerodigestive tract. In: Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, and Layer L. editors. *Mucosal Immunology 3rd* Ed. Amsterdam, ELSEVIER; 1351-1360, 2005.

Igarashi O, Nochi T, Terahara K, and Kiyono H. Linkage between innate and acquired immunities at the mucosa. *International Congress Series* 1285:84-93, 2005.

Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi

T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Yang B, Seoh JY, Kiyono H, and Miyasaka M. CCR7 is critically important for migration of immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.* 176:803-810, 2006.

Duverger A, Jackson RJ, van Ginkel FW, Fischer R, Tafaro A, Leppla SH, Fujihashi K, Kiyono H, McGhee JR, and Boyaka PN. *Bacillus anthracis* edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens. *J. Immunol.* 176:1776-1783, 2006.

2. 学会発表

Kiyono H. Intestinal villous M cells and eosinophils for regulation of mucosal immune responses. RCA-JSI International Symposium on Immunology 2005. Yokohama June 2005.

Kiyono H. Ontogeny of mucosal immune tissues. The 12th International Congress of Mucosal Immunology Boston, Massachusetts, USA. June 2005.

Kiyono H. Dynamics of mucosal antigen sampling for the induction of antigen-specific immunity. The 36th DGFI-SSI Annual Meeting. Kiel, German. September 2005.

Chan SY, Rennert PD, Yamamoto M, Igarashi O, Kiyono H, and Kweon MN. Essential role of draining and mesenteric lymph nodes for the induction of mucosal immune responses by transcutaneous vaccination. 第35回日本免疫学会総会・学術集会 横浜 神奈川県 12月 2005.

Nagatake H, Fukuyama S, Kim DY, Takamura K, and Kiyono H. Unique chemokine receptors expression between NALT and Peyer's patch inducer cells. 第35回日本免疫学会総会・学術集会 横浜 神奈川県 12月 2005.

Hiroi T, Yoda M, Jang MH, Terahara K, Igarashi O, Takada K, Miyasaka M, Hirasawa M, and Kiyono H. Regulation of T cell unresponsiveness by CD11c⁺ eosinophils in the intestinal lamina propria. 第35回日本免疫学会総会・学術集会 横浜 神奈川県 12月 2005.

Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Gohda M, Shimizu M, and Kiyono H. Spingosine-1-phosphate-dependent and-independent migration pathway for large intestinal intraepithelial lymphocytes following microbial stimulation. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 横浜 神奈川県 12 月 2005.

Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Guo Z, Hirata T, Hiroi T, Umemoto E, Yang BG, Kipp M, Kiyono H, and Miyasaki M. Antigen presentation and migratory properties of novel intestinal lamina propria dendritic subsets. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 横浜 神奈川県 12 月 2005.

Kawahara K, Hiroi T, Igarashi O, Yoda M, Kiyono H, and Takahashi I. Characterization of environmental sensor components of the colon. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 横浜 神奈川県 12 月 2005.

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 ダブルミュータントコレラ毒素 (dmCT) E112K/KDEV および dmCT E112K/KDGL は低毒性で高い粘膜アジュバンド活性を持つ。これら dmCT の中枢神経系への安全性を検討するために、化学標識した dmCT を用いてマウスの中枢神経系への取込み・蓄積を検討した。その結果、天然型 CT (nCT) では嗅脳への蓄積が認められたのに対して、dmCT E112K/KDEV と dmCT E112K/KDGL はともに有意に低かった。また、dmCT の抗原特異的細胞傷害誘導能についても検討を加えた結果、dmCT E112K/KDGL は nCT と同程度の抗原特異的 CD8⁺ T 細胞を誘導した。dmCT E112K/KDEV と dmCT E112K/KDGL はともに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唆された。

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、ワクチン抗原を粘膜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毒素 (nCT) や毒素原性大腸菌の産生する易熱性毒素 (nLT) は、粘膜面に効率よく 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。しかしながら、実際にヒトへの応用を考えた場合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。ところが、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 種のダブルミュータント 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。

B. 研究方法

1) dmCT の中枢神経系への取込みの観察: C57BL/6 マウスに acridinium-標識した nCT, dmCT E112K/KDEV または E112K/KDGL を経鼻接種し、嗅神経細胞および

嗅脳への dmCT の取込み・蓄積を測定した。

2) dmCT による細胞傷害活性誘導の測定: 卵白アルブミン (OVA) 100 μg を dmCT E112K/KDEV, E112K/KDGL, nCT または mCT E112K 0.5 μg 共に 1 週間間隔で 3 回経鼻免疫し、最終免疫から 1 週間後に spleen および頸部リンパ節 (CLN) を採取し、E. G7-OVA 細胞を用いて OVA-特異的 CD8⁺ T 細胞傷害活性を測定した。

3) 抗原特異的 CD8⁺細胞傷害活性 T 細胞による IFN-γ 産生: 上記と同様の方法で経鼻免疫したマウスの spleen および CLN より CD8⁺ T 細胞を調整した。Mytomicin C 処理した E. G7-OVA 細胞とともに 5 日間培養することにより in vitro で刺激した。その後、抗 IFN-γ mAb をコートした 95 穴ナイロンメンブレンプレート上で 24 時間培養し、OVA-特異的 CD8⁺IFN-γ 産生 T 細胞を ELISPOT assay により検出し、スポット数をカウントした。

4) OVA ペプチド MHC class I テトラマー解析: 経鼻免疫したマウスの spleen と CLN よりシングル細胞を調整した。細胞を、PE-標識 H-2kb OVA-Tetramer (SIINFEKL) と APC-標識 抗-CD8 mAb で染色し、FACS Calibur によりフローサイトメトリー解析した。

5) 経口アジュバンド活性: 12 時間絶食させた C57BL/6 マウスに、OVA 1mg を nCT, mCT E112K, dmCT E112K/KDEV または dmCT E112K/KDGL 10 μl とともに経口ゾンデを用いて経口投与し、1 週間間隔で合計 3 回投与した。最終免疫から 1 週間後に、血清および粘膜分泌液を採取し、OVA 特異的抗体価の測定を行った。

(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 の中枢神経系への取込みと蓄積: 5 および 0.5 μg の acridinium-標識 nCT, dmCT E112K/KDEV, dmCT E112K/KDGL を経鼻投与した結果、嗅脳および嗅神経/上皮への CT の取り込みは用量依存的であった。経鼻免疫に使用している用量である 0.5 μg の投与では、嗅神経/嗅上皮への取込が認められるものの、嗅脳への取込は認められなかった。10 倍量の 5 μg を投与した場合、nCT で嗅脳への取込みが見られたものの、dmCT では有意に低下または検出されなかった。従って dmCT は用量依存的に嗅神経/上皮に吸着はするが、嗅脳へは nCT と比べて輸送されないか、非常に輸送されにくいことが示唆された。
- 2) dmCT による抗原特異的細胞障害性 CD8^+ T 細胞 (CTL) 活性の誘導: dmCT E112K/KDGL では spleen と CLN で共に nCT と同等の強い OVA-特異的 CD8^+ CTL 活性が見られた。それに対し、dmCT E112K/KDEV では有意に低く、nCT の 50-60%程度の活性であった。また、この実験を CD4^+ T 細胞、 CD8^+ T 細胞、NK 細胞のそれぞれを取り除いた条件で行った結果、 CD8^+ T 細胞 depletion のみで特異的に CTL 活性が消失したことから、この反応は CD8^+ T 細胞特異的であることが証明された。
- 3) 抗原特異的 CD8^+ 細胞障害活性 T 細胞による $\text{IFN-}\gamma$ 産生: dmCT E112K/KDGL では $\text{IFN-}\gamma$ 産生 OVA-特異的 CD8^+ T 細胞の有意な増加が認められた。このレベルは nCT で免疫した場合と同等であった。一方、dmCT E112K/KDEV では spleen のみで $\text{IFN-}\gamma$ 産生 OVA-特異的 CD8^+ T 細胞の誘導が見られたものの、CLN では全く認められなかった。
- 4) OVA ペプチド MHC class I Tetramer 解析: OVA ペプチドテトラマー解析の結果、アジュバントを併用したグループでは OVA 単独で免疫した場合と比較して、spleen と CLN で共に Tetramer $^+$ 、 CD8^+ T 細胞の数が有意に増加していた。特に、nCT 次いで dmCT E112K/KFGL で免疫したグループでは顕著な増加が見られた。
- 5) 経口アジュバント活性: 経口免疫したマウスの血漿中での OVA-特異的抗体応答を測定した結果、何れの dmCT で免疫した場合にも OVA-特異的 IgM 応答は nCT と同等であったものの、OVA-特異的 IgG および IgA

応答は nCT と比較して有意に低かった。また、糞抽出液中の OVA-特異的 s-IgA 応答も dmCT では nCT と比較して有意に低かった。

D. 考察

本研究では、有効で安全に使用できる経鼻ワクチンアジュバントの開発を目的としている。nCT や nLT が強力な粘膜アジュバントであることは周知されており、活性が維持されている mCT が報告されている。また、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、懸念された。そこで、本研究では CT の A サブユニットの COOH 末端 KDEL 配列 (小胞体残留シグナル) に変異を導入することにより、中枢神経系への取込を回避した mCT を作成できるのではないかと考え、更なる安全性とアジュバント活性の向上を目指して、前年度までに 2 種類の dmCT、dmCT E112K/KDEV と E112K/KDGL を作成し、その生物学的毒性、培養細胞での細胞内局性、マウスでの経鼻アジュバント効果について既に報告した。

そこで今回は、まず dmCT を感度のよい化学標識し、マウスに経鼻接種した際の脳神経系に対する取り込み・蓄積を検討した。その結果、細胞への吸着能力はいずれの dmCT でも nCT と同等であることから、嗅神経/上皮への取り込みは認められたものの、dmCT では嗅脳への蓄積が認められなかった。CT を経鼻アジュバントとした場合の中枢神経系への安全性が懸念されているが、これら dmCT を用いることによりその危険を回避することが可能であると思われる。

また、前年度までに dmCT の抗原特異的 CD4^+ T 細胞応答について報告してきたが、その結果、血清抗原特異的 IgG サブクラス産生と抗原特異的 CD4^+ T 細胞からの Th1-型サイトカイン産生に、dmCT E112K/KDEV と E112K/KDGL の間で差が認められ、CTL 活性等に違いが予測されたことから、今回抗原特異的 CD8^+ T 細胞応答について解析した。dmCT E112K/KDGL は nCT と同等の抗原特異的 CD8^+ CTL 活性を示した。そしてこれは $\text{IFN-}\gamma$ 産生抗原特異的 CD8^+ T 細胞の増加と関連していた。一方、dmCT E112K/KDEV は既報の dmCT E112K と同様、抗原特異的 CD8^+ T 細胞応答の誘導は見られなかった。このようなアジュバントの性質の違いを利用することにより、目的に合った免疫応答を誘導することが可能になるとと思われる。

dmCT は経鼻アジュバントとしては十分な効果が得ら

れるものの、今回行った経口アジュバン活性の測定では、十分な効果が得られなかった。しかしながら、血漿抗原特異的 IgM 応答は nCT と同等であったことから、免疫回数や投与量を増やす等の工夫により有効性を向上させる可能性は期待できると考えている。また、dmCT は現行 *E. coli* で生産しており、40~50 µg/l 程度の収量しか得られない。そこで本アジュバントについても今後は臨床応用を視野に入れて *B. brevis* での系での大量生産系への移行を考える必要がある。

E. 結論

dmCT は神経系への蓄積、輸送が nCT と異なる事が示され、神経細胞に蓄積されないことが示唆された。また、dmCT E112K/KDGL は抗原特異的 CD4⁺ T 細胞活性のみならず、抗原特異的 CD8⁺ T 細胞活性も誘導しうる、経鼻免疫の有望な経鼻アジュバントとなる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

van Ginkel FW, Jackson RJ, Yoshino N, Hagiwara Y, Metzger DJ, Connell TD, Vu HL, Martin M, Fujihashi K, and McGhee JR. Enterotoxin-based mucosal adjuvants alter antigen trafficking and induce inflammatory responses in the nasal tract. *Infect. Immun.* 73:6892-902, 2005.

2. 学会発表

Hagiwara Y, Hino A, Komase K, Suzuki Y, Kiyono H, McGhee JR, and Fujihashi K. Induction of CD8-Positive (CD8⁺) Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Responses By Nontoxic Double Mutant CT (E112K/KDGL) Adjuvant. 12th International Congress of Mucosal Immunology, Boston, USA, June 2005.

Hagiwara Y, Hino A, Kataoka K, Komase K, Kiyono H, McGhee JR, and Fujihashi K. Nasal application of a Nontoxic Double Mutant Of CT (E112K/KDGL) Induces CD11c⁺ Dendritic Cells.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究要旨：第二世代キメラ型アジュバント（mCT-A/LT-B）の、*B. brevis* 宿主-ベクター系を用いた工業的製造法の確立化を目標として、生産、精製方法の検討を行った。分泌生産されたキメラ分子は、簡便な精製工程で夾雑蛋白質がなく、エンドトキシンの少ない品質の試作品が得られたことにより、実用レベルでの製造フローが構築できた。

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ており、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。

B. brevis を用いて、第二世代キメラ型アジュバント mCT-A/LT-B（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分子）の分泌発現に成功した。この系で作製された分子のマウスでの経鼻アジュバント効果が確認され、さらに、毒性が欠損していること、低 IgE 誘導性であり神経細胞への影響が低いことなどにより、より安全性が高いことが示された。

そこで、第二世代キメラ型アジュバントのヒトへの応用を目指して、本系による工業的製造法の確立化を目標としたプロセスの開発を行い、基礎研究や動物実験のための試料の調製を行った。

B. 研究方法

キメラ発現プラスミド（pNCM02 chimera）（図 1）を保有する *B. brevis* 形質転換株から蛋白質安定生産株の選抜を行ない、ワーキングセルを作成した。ワーキングセルを用いて、3L jar レベルでのキメラ蛋白質の生産条件と精製条件を検討し、動物試験用試作品を調製した。

C. 研究結果

2SLN 培地 2L を用い、通気量と回転数は 1vvm, 200 rpm の条件で 32℃, 68 時間培養が最も生産性が高かった。培養液を、限外ろ過（0.16 μm）で除菌した。ろ過液を pH 8.0 に調整し、固定化 D-galactose column に吸着、20 mM リン酸バッファー（pH8.0）で洗浄後 0.3 M D-galactose / 20 mM リン酸バッファーで溶出した。100 KD UF 膜により D-galactose および培地や水由来のエンドトキシンを除去し、試作品とした。12 L の培養により 125 mg の精製標品を得た（図 2）。

D. 考察

3 L ジャーファーメンター規模での *B. brevis* の宿主-ベクター系を用いたキメラ分子（mCTA/LTB）の生産・精製を行い、安定して標品を得ることができるようになった。簡便な精製工程で夾雑蛋白質がなく、エンドトキシンの少ない品質の試作品が得られたことにより、実用レベルでの製造フローが構築できたと考えている。

今後、より高い生産性や収率が可能となる技術改良が必要である。

E. 結論

B. brevis の宿主-ベクター系を用いて、キメラ分子の工業スケールでの製造目指し 3 L ジャーファーメンター培養・精製試験を行い、125mg の精製キメラ分子を試作し