

E112K/KDGL あるいは陽性コントロールとして nCT 10  $\mu$ g と共に、1 週間間隔で 3 回経口投与した。陽性コントロールである nCT では、OVA-特異的血漿 IgM、IgG、IgA、および糞便抽出液 IgA が誘導されたのに対して、dmCT では何れも誘導が認められなかった。一方、OVA-特異的抗体産生細胞誘導の解析において、nCT よりは低いものの脾臓では有意な OVA-特異的 IgM 抗体産生細胞が、そしてパイエル板と腸管粘膜固有層では OVA-特異的 IgA 産生細胞が検出された。

そこで次に、アジュバントの用量を増やし OVA 1 mg を dmCT E112K/KDEV、dmCT E112K/KDGL あるいはコントロールとして nCT 20  $\mu$ g と共に、1 週間間隔で 4 回経口投与した。その結果、dmCT E112K/KDGL 群において有意な OVA-得意的血漿 IgM、IgG および糞便抽出液 IgA の誘導が認められた。しかしながら、これらの応答は nCT との比較では優位に低かった。OVA-特異的抗体産生細胞誘導の解析においては、脾臓では dmCT E112K/KDGL 群で OVA-特異的 IgM および IgA 産生細胞が高頻度で検出され、腸管膜リンパ節、パイエル板、腸管粘膜固有層では dmCT E112K/KDGL 群で nCT 群に匹敵する頻度で OVA-特異的 IgA 抗体産生細胞が検出された。

更にアジュバントの用量を増やし、OVA 1 mg を dmCT E112K/KDEV、dmCT E112K/KDGL または nCT 50  $\mu$ g と共に、1 週間間隔で 4 回経口投与した結果、OVA-特異的血漿 IgG および糞便抽出液 IgA とともに、20  $\mu$ g のアジュバントで免疫した場合と比較して低下している傾向が見られた。

#### D. 考察

本研究では、既に有効で安全に使用できる 2 種の dmCT E112K/KDEV と E112K/KDGL の経口アジュバント活性について検討を行った。これら 2 種のアジュバントは、CT が細胞内に取り込まれる際の逆行性輸送に関与する、CT-A サブユニットの COOH-末端 KDEL 配列にアミノ酸置換を導入することにより、近年その危険性が危惧されていた CT の中枢神経系への蓄積を回避することに成功したアジュバントである。一方でこのアジュバントは、非常に高いアジュバント活性を保持しており、経鼻投与では nCT に匹敵するアジュバント活性を示した。そこで、本研究では dmCT の

経口アジュバント活性を検討した。

経粘膜的に免疫を行った場合にも、投与経路の違いにより粘膜組織からの S-IgA の発現パターンに違いがある。経鼻免疫の場合、気道、唾液の他腔分泌液中で高濃度の S-IgA が検出されることから、インフルエンザを始め HIV ウイルスや B 型、C 型肝炎ウイルスへの応用が期待される。経口免疫では腸管分泌液と乳汁中に高濃度で S-IgA が検出されることから、コレラなど消化管経由の感染症への応用が期待できる。従って、粘膜ワクチンと言っても目的に応じた正しい投与経路の選択が必要不可欠である。

OVA を抗原として 10、20、50  $\mu$ g の nCT または dmCT E112K/KDEV、dmCT E112K/LDGL と共に経口投与した。20  $\mu$ g および 50  $\mu$ g の dmCT E112K/KDEV または dmCT E112K/KDGL をアジュバントとして経口免疫することにより、有意なレベルの抗原特異的血漿 IgM および IgG 抗体、そして糞便抽出液 IgA 抗体が誘導された。しかしながら、これらの応答は陽性コントロールである nCT と比較して有意に低かった。更に、50  $\mu$ g の dmCT E112K/KDGL で免疫した時、有意な血漿抗原特異的 IgA 抗体が誘導された。

また、抗原特異的抗体産生細胞の検討では、dmCT E112K/KDGL で免疫したマウス群において腸管膜リンパ節、パイエル板および腸管粘膜固有層で高頻度の抗原特異的 IgA 産生細胞が検出された。以上の結果より、dmCT E112K/KDGL は有効な経口アジュバントとなる可能性が示唆された。

今回の検討では、抗原特異的抗体応答の誘導が低かったものの、ELISPOT アッセイで高頻度の抗原特異的抗体産生細胞の検出が認められたことから、今後更なる検討を進め免疫方法の工夫次第では、有効な抗体応答を誘導できる可能性が示唆された。

#### E. 結論

dmCT の経口アジュバントとしての有効性について検討を行った。その結果、陽性コントロールとしての nCT には及ばなかったものの、dmCT E112K/KDGL は全身系と粘膜局所において抗原特異的抗体応答を誘導することができた。従って、dmCT E112K/KDGL は有望な経口アジュバントと

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

**Hagiwara Y**, Kawamura YI, Kataoka K, Rahima B, Jackson RJ, Komase K, Dohi T, Boyaka PN, Takeda Y, Kiyono H, McGhee JR, and Fujihashi K. A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking. *J. Immunol.* 177 : 3045-3054. 2006.

### 2. 学会発表

Yoshino N, Kanekiyo M, Okamura T, **Hagiwara Y**, Someya K, Matsuo K, Ami Y, Yamamoto N, Sato S, and Honda M. Replication-deficient vaccinia virus DIs recombinant as an effective and safe mucosal vaccine for immunodeficiency virus. XVI International AIDS conference. Toronto Canada. 8/13-18. 2006.

吉野直人、萩原由加利、菅野祐幸、堤玲子、野田公俊、佐藤成大. リンゴポリフェノール併用によるコレラ毒素アジュバントの毒性軽減と抗原特異的抗体産生. 第10回日本ワクチン学会. 大阪. 10/21-22. 2006.

**Hagiwara Y**, Kiyono H, McGhee JR, and Fujihashi K. Double mutant of nontoxic cholera toxin dmCT E112K/KDGL provides potent oral adjuvant activity. 第36回日本免疫学会総会・学術集会. 大阪. 12/11-13. 2006.

## 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

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）  
分担研究報告書

*Brevibacillus chochinensis* 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

*Brevibacillus chochinensis* を用いたキメラ型 mCT-A// LT-B の工業的製造法の確立を目標として、凍結乾燥工程を加えた生産、精製方法の検討を行った。作製した乾燥精製標品は 1A5B 構造を保持しており、非凍結乾燥品と同等の生物活性を有していると推定された。基礎研究、動物試験用に凍結乾燥試料 150 mg を供給した。

A. 研究目的

*Brevibacillus choshinensis* 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. choshinensis* により作製されたキメラ分子 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、JTD 186: 1261, 2002）の粘膜アジュバンドとしての有効性や安全性は本研究により明らかにされてきた。

キメラ型 mCT-A/LT-B の実用化に向けた工業的製造法の確立と、基礎研究や動物実験のための試料の調製を担当している。本年度は、キメラ分子の保存、流通時の品質保証、および投与時の品質管理を目的に、製造フローに凍結乾燥工程を加えた試料調整を検討した。

B. 研究方法

キメラ発現プラスミド（pNCMO2 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 レベルでのキメラ分子を生産精製した。

2SLN 培地 2 L を用い、通気量と回転数は 1vvm, 200 rpm の条件で 32°C, 68

時間培養した。培養液を、pH 8.0 に調整し、精密ろ過による除菌を行った。固定化 D-galactose column を用い、キメラ分子の精製を行った(図 1)。

C. 研究結果

凍結乾燥工程を加えた製造フローを図 1 に示した。凍結乾燥した試料は 1A5B 構造を有していた。

合計 36 L の培養により 150 mg の精製標品を作製し、基礎研究や動物実験に提供した。

D. 考察

3 L ジャーファーメンター規模での *B. choshinensis* 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。加えて、凍結乾燥を行っても高次構造を保持したキメラ標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。

### E. 結論

*B. choshinensis* 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を目指し、3 Lジャーフェーマンター培養・精製試験を行い、150 mg の精製キメラ分子を試作した。

### G. 研究発表

なし。

### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

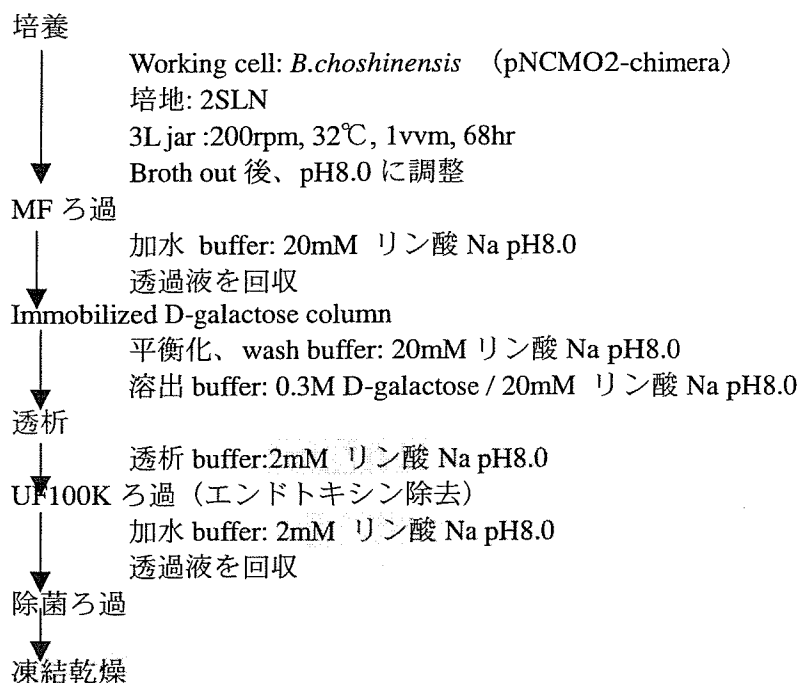


図1. キメラ型 mCT-A/LT-B 製造フロー

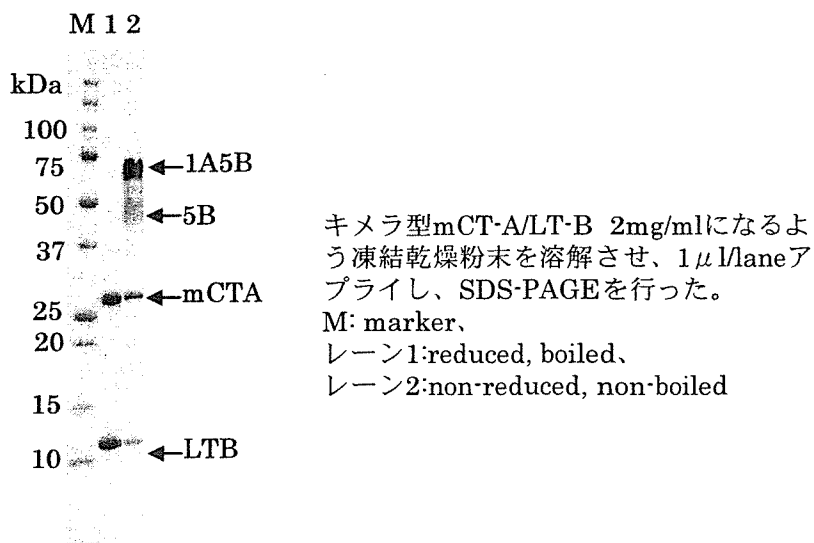


図2 キメラ型mCT-A/LT-BサンプルのSDS-PAGE

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担報告書

ペプチド型アジュバントの開発

分担研究者 竹田美文 (株)シネ・サイエンス研究所・所長  
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 由来分子のアジュバント活性を評価するマウス経鼻投与系を、OVA を抗原とし、アジュバントとして nCT、mCT、CTB に加え、mCT の B サブユニットを毒素原性大腸菌の易熱性毒素の B サブユニットと組換えたキメラ型 mCTA/LTB を用いて検証した。その結果、mCTA/LTB をアジュバントとして加えたグループでは、血清 IgG および IgA、鼻洗浄液 IgA および糞便 IgA において nCT と同様の強い抗 OVA 抗体が惹起された。一方 mCT および CTB を用いたグループでは、OVA 単独群と比較すると高い抗 OVA 免疫が得られたが、nCT や mCTA/LTB を用いた群よりは抗体価は低かった。この結果から、単純に ADP-リボース転移酵素活性が消失している分子がアジュバント活性も低いわけではなく、B サブユニットのレセプターへの結合様式に依存するアジュバント活性が存在することが示唆された。

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型 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。

現在まで我々の得たマウス経鼻投与実験結果では、野生型 CT(nCT)とその A サブユニット、すなわち毒素活性である ADP-リボース転移酵素活性を保持している分子は強いアジュバント活性を示すが、毒素活性を消失している無毒化変異型 CT (mCT) やその A サブユニット、および B サブユニットのアジュバント活性は低かった。この結果は Yamamoto ら (J Exp Med 185:1203-1210, 1997) の報告に反する。そこで本研究では、Kweon ら (J Infect Dis 186:1261-1269, 2002) が報告したキメラ毒素アジュバント

mCTA/LTB を用い、mCT のアジュバント活性の再評価を試みた。

B. 方法

野生型ホロ CT (nCT)、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型ホロ CT (mCT)、mCT の A サブユニット (mCTA) と毒素原性大腸菌の易熱性毒素 (LT) の B サブユニット (LTB) を組換えたキメラ型 (mCTA/LTB: 東京大学医科学研究所 清野宏博士、幸義一博士より供与)、および CT の B サブユニット (CTB) (nCT のみ 1 回 1 匹あたり 1  $\mu$ g、その他は 10  $\mu$ g) をアジュバントとし、卵白アルブミン (OVA、100  $\mu$ g) とともにマウス (C57BL/6、雌、5 週齢) に 1 週間間隔で 3 回経鼻投与し、最終投与から 2 週間目に血液、便、鼻洗浄液を採取した。血液は 4°C に一晩静置し、遠心分離した上清に NaN<sub>3</sub> を 0.1% になるように加え血清サンプルとした。鼻洗浄液は遠心分離で固形物を除いた。便は重量の 2 倍の PBS に懸濁し、遠心分離した上清をサンプルとした。

OVA (100  $\mu$ g/ml) を固層化した 96 穴プレートに、2 倍希釈列にした上記サンプルをアプライし、1 時間、37°C に静置した。0.05% Tween-20/PBS (PBST) で 5 分、3 回洗浄した後、2,000 倍希釈の HRP-conjugated goat anti-mouse IgG または IgA をアプライし 1 時間、37°C に静置した。PBST で 5 分、3 回洗浄後、ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により発色反応を行ない、A405 を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立国際医療センター研究所の動物取扱規程に準拠して行われ、特段の問題は生じなかった。

### C. 結果

OVA 抗原に対する各毒素分子のアジュバント活性をマウス経鼻投与で比較したところ、図1に示すように、血清 IgG、血清 IgA、鼻洗浄液 IgA および糞便 IgA いずれにおいても nCT が高いアジュバント活性を示し、また mCT および CTB はほぼ同程度の低い活性を示した。これらのデータは昨年度までの我々のデータを再現するものであった。一方 mCTA/LTB は、血清 IgA ではアジュバント効果が見られなかったものの、血清 IgG、鼻洗浄液 IgA および糞便 IgA では nCT に匹敵するアジュバント活性を示した。実際、血清 IgG のデータの統計学的検定を行って見たところ、mCT 群および CTB 群と nCT 群および mCTA/LTB 群の差は有意であり ( $P < 0.01$ )、また、nCT 群と mCTA/LTB 群の間には有意差は見られなかった ( $P > 0.05$ )。

### D. 考察

今回得られたマウス経鼻投与による結果で特筆すべきは、mCTA/LTB キメラ型の高いアジュバント活性である。血清 IgG に関しては、この結果は Kweon ら (*J Infect Dis* 186: 1261-1269, 2002) の報告を完全に再現している。この論文中には mCT (E112K) のデータがないので、mCT と mCTA/LTB のアジュバント活性の比較は本結果が初めてである。また同文献では血清 IgA の抗体価も nCT と mCTA/LTB は同程度に高いと報告されているが、これは本結果では再現できなかった。実験個体数が少なかった (個体間のばらつきが大きかった)、あるいは IgA 検出系の感度が低かった可能性が考えられる。

CT と LT は相同性の高い下痢毒で、毒性も同じ ADP-リボース転移酵素活性に由来している。CT のみならず LT も、当然粘膜アジュバントの有望な候補として研究されてきている。CT と LT のアジュバント活性が公平に比較されている文献は残念ながら多くはないが、比較している文献では、LT のアジュバント活性の方が強いという報告が多い (例えば Douce et al. *Infect Immun* 65: 2821-2828, 1997 など)。その原因として、CTB は GM1 に高い特異性を以て結合するのに対し、

LTB が GM1 だけでなく他のリポ多糖に対しても広い結合スペクトラムを持つ (Bockstrom et al. *Mol Microbiol* 24:489-497, 1997) ことなどが予想されている。CTB でも、変異導入により GM1 結合活性を保持したまま免疫刺激性や毒性を消失させることが出来るという報告もある (Aman et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 8536-8541, 2001) ので、B サブユニットのレセプター結合様式がアジュバント活性に大きく寄与する可能性がある。これは Rappuoli ら (*Immunol Today* 20: 493-500, 1999) の総説、すなわち、CT のアジュバント活性は、毒性すなわち ADP-リボース転移酵素活性、B サブユニットのレセプターへの結合、ホロ毒素の構造、の3つの要因が複合的に寄与しているという仮説を強く裏付けるものである。今後 CT/LT に由来する新規アジュバントを開発するには、上記3者のバランスを考慮しつつ、動物実験により試行錯誤を重ねる必要があると思われる。

### E. 結論

CT 由来分子のアジュバント活性を評価するマウス経鼻投与系を、OVA を抗原とし、アジュバントとして nCT、mCT、mCTA/LTB、CTB を用いて検証した。その結果、mCTA/LTB をアジュバントとして用いると、血清 IgG および IgA、鼻腔洗浄液 IgA および糞便 IgA において nCT と同様の強い抗 OVA 免疫が惹起された。一方 mCT および CTB をアジュバントに用いたグループでは、OVA 単独群と比較すると有意に高い抗 OVA 免疫が得られたが、nCT や mCTA/LTB を用いた群と比較すると抗体価は有意に低かった。この結果から、単純に ADP-リボース転移酵素活性が消失している分子がアジュバント活性も低いわけではなく、B サブユニットのレセプターへの結合様式、毒素分子の構造・配列的特徴および ADP-リボース転移酵素活性の3つの要素が複合的にアジュバント活性を決定することが示唆された。

### 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

Safa A, Bhuyian NA, Nusrin S, Ansaruzzaman A, Alam M, Hamabata T, Takeda Y, Sack DA,

Nair GB. Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes. J. Med. Microbiol. 55 : 1563-1569, 2006.

## 2. 学会発表

清水 健、佐藤壽男、川上怜美、太田敏子、濱端 崇. 志賀様毒素の病原性と受容体親和性との関連. 第 79 回日本細菌学会総会. 金沢. 3 月. 2006.

清水 健、川上怜美、佐藤壽男、濱端 崇、太田敏子、野田公俊. 志賀様毒素の分泌機構の解析. 第 53 回毒素シンポジウム. 北杜. 7 月. 2006.

Shimizu T, Kawakami S, Sato T, Sasaki T, Higashide M, Hamabata T, Ohta T, Noda M. Analysis of the secretion of Shiga-like toxin in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 第 40 回日米医学協力委員会コレラ・細菌性腸管感染症部会日米合同会議. 岐阜. 11 月. 2006.

## 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

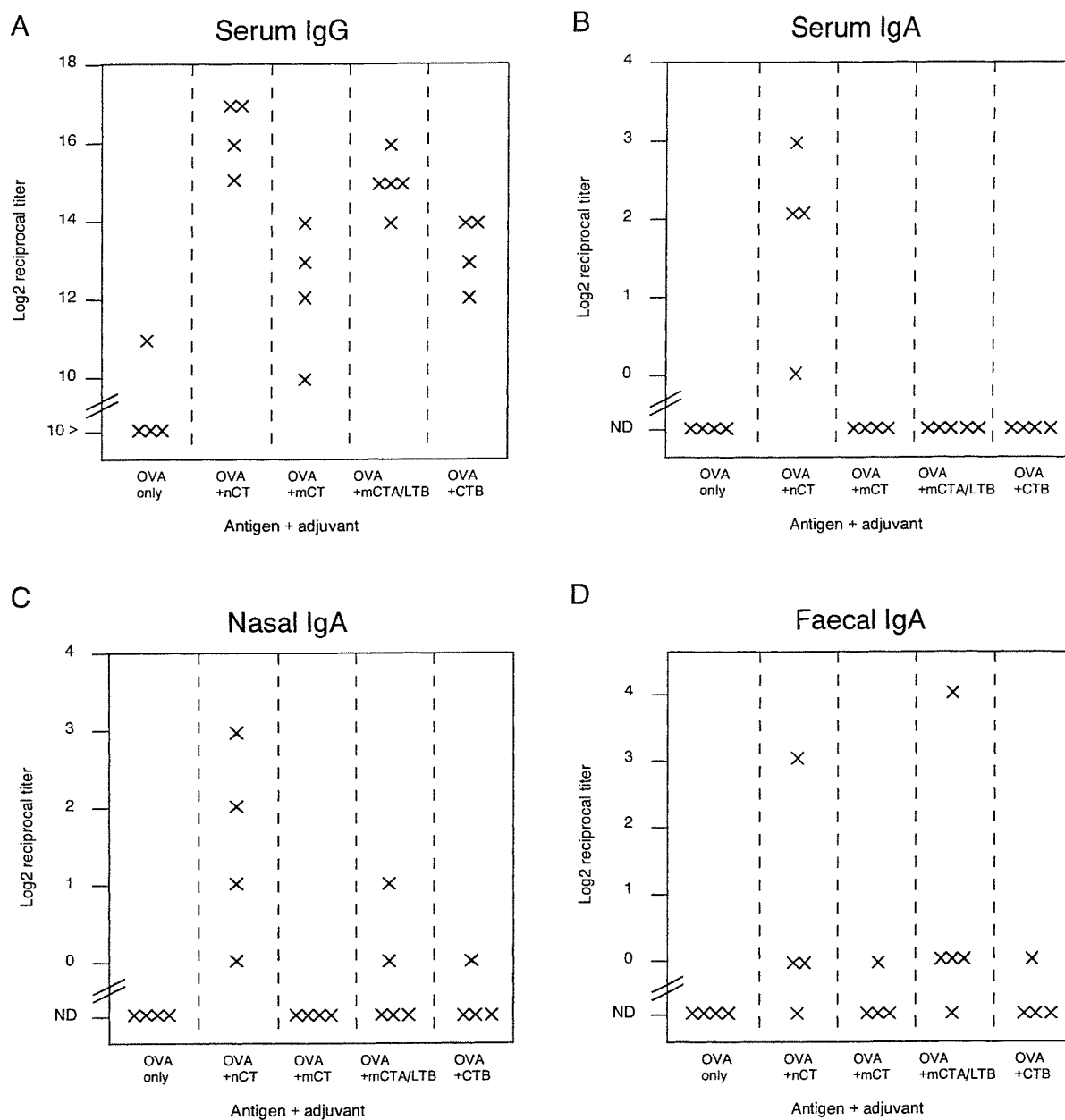


図1. 異なるCT由来アジュバントのOVA特異的抗体価に与える影響。A: 血清IgG. B: 血清IgA. C: 鼻洗浄液IgA. D: 糞便IgA. ND: 検出限界以下 (Not Detected)。



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：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。その結果、TLR を介した NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子が存在し、遅期誘導型遺伝子の発現を核に発現する I $\kappa$ B 分子 I $\kappa$ BNS が抑制することを見出した。さらに、早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子の発現誘導機構を解析した。早期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が常に開いており転写制御因子が刺激後迅速にアクセスしやすい構造となっている。一方、遅期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激により構造変換を受けて開き、転写制御因子がアクセスできるようになる。このことが、遺伝子発現に時間を要する原因であることが明らかになった。さらに、遅期誘導型遺伝子のプロモーターのクロマチン構造変換に関わる分子として、I $\kappa$ BNS と同じ I $\kappa$ B 分子 I $\kappa$ Bzeta を同定した。今後も、自然免疫系の活性制御機構を解析し、新規アジュバントの開発に向けた基礎的基盤を提供したい。

A. 研究目的

自然免疫系が、Toll-like receptor (TLR) ファミリーメンバーにより、病原微生物の生体内侵入を感知し、自然免疫系の活性化のみならず抗原特異的な獲得免疫系の活性化をも誘導することが、明らかになってきた。さらに、TLR は、CpG DNA や complete Freund's adjuvant (CFA) などアジュバントを認識することも明らかになっている。しかし、TLR を介した自然免疫系の活性化は、その制御機構が破綻すると、慢性炎症性腸疾患などの慢性炎症を引き起こすことも明らかになっている。そこで新規のより効果的なアジュバントの開発に向けた基礎的基盤を提供するため、自然免疫系の活性制御機構を解析し、新規アジュバントによる自然免疫系のより効果的な活性制御技術の開発に資することを、本研究の目的とする。

B. 研究方法

自然免疫系の活性制御機構を解析する過程で、大腸に局在する自然免疫担当細胞は、TLR 刺激に不応答になっていることを見出し、さらにこれら細胞に選択的に発現している遺伝子として I $\kappa$ BNS を同定した。そして、I $\kappa$ BNS の機能解析から、TLR 刺激による NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型と遅期誘導型があり、I $\kappa$ BNS は遅期誘導型の遺伝子発現を NF- $\kappa$ B の活性を制御す

ることにより抑制していることを見出している。そこで、自然免疫系の活性制御機構をさらに解析するため、TLR 刺激による NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子発現に早期誘導型と遅期誘導型に分かれる分子機構を解析した。まず、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、TRIF 依存性のシグナルが入る状態で早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子発現を解析した。さらに、早期誘導型遺伝子として MIP2 遺伝子、遅期誘導型遺伝子として Lcn2 遺伝子を代表とし、各遺伝子プロモーターへの転写制御因子群のリクルートをクロマチン免疫沈降法で解析した。また、各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。また、同じ核に発現する I $\kappa$ B 分子 I $\kappa$ Bzeta の遅期誘導型遺伝子の発現誘導における役割を解析した。

（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、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

MyD88 欠損マクロファージでは、TLR 刺激に

よる NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子の発現は障害されている。しかし、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 刺激すると TRIF 依存性の一見無意味なシグナルが活性化される。そこで、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、早期誘導型と遅期誘導型の各遺伝子の mRNA の発現誘導をリアルタイム PCR 法で解析した。その結果、遅期誘導型の遺伝子は MyD88 欠損マクロファージでは全く誘導されないが、早期誘導型の遺伝子はかなり減弱しているもののかすかに誘導された。このかすかな早期誘導型遺伝子の発現は、MyD88/TRIF 二重欠損マクロファージでは全く認められなかった。このように、早期誘導型遺伝子は、極めて発現誘導されやすく、一見無意味なシグナルが入ることによって、かすかに誘導されることが明らかになった。

次に、早期誘導型、遅期誘導型遺伝子としてそれぞれ MIP2, Lcn2 遺伝子を代表として取り上げ、各遺伝子プロモーターへの、NF- $\kappa$ Bp65 サブユニット、RNA polymerase II, TBP のリクルートをクロマチン免疫沈降法により解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターへのこれら転写制御因子群のリクルートは刺激後 180 分より認められ、MyD88 欠損マクロファージでは全く認められない。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターへは、刺激後 15 分ときわめて早い時間から認められ、さらに MyD88 欠損マクロファージでも有意に認められた。この結果から、早期誘導型遺伝子プロモーターは、転写制御因子がきわめてアクセスし易い状態であることが明らかになった。

そこで、次に各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターではヒストン H3 のメチル化は認められず、TLR 刺激 180 分から観察された。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターでは、メチル化が刺激以前から常に見られた。この結果から、早期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が常に開いた状況にあり、その結果転写制御因子がアクセスし易く、遺伝子発現が早期に誘導されることが明らかになった。一方、遅期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激によって構造変換を受け、転写制御因子がアクセスされやすくなること、そしてこのことが、遺伝子発現が遅れるメカニズムであることが明らかになった。

次に、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造変換に関与する分子について解析を行

った。これまでに IkBNS と同じ核に発現する IkB 分子である IkBzeta が遅期誘導型遺伝子の発現に関与していることを示したきた。実際、IkBzeta 欠損マクロファージでは、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現が障害されている。IkBzeta は TLR 刺激により早期に誘導される遺伝子の一つである。そこでマクロファージに IkBzeta を常時発現させ、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現を解析した。IkBzeta を発現させたマクロファージでは、遅期誘導型遺伝子の発現誘導が早く観察されるようになった。また、遅期誘導型遺伝子プロモーターへの転写制御因子のリクルート、メチル化の誘導も早く観察されるようになった。これらの結果から、IkBzeta は、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造を変換させることにより遺伝子発現の誘導に関与していることが明らかになった。

#### D. 考察

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- $\kappa$ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類される。遅期誘導型の遺伝子プロモーターはクロマチン構造が閉じていて、TLR 刺激により構造変換を受け、転写制御因子がアクセスする。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造は常に開いている。このことが、早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子群に分けられるメカニズムであることが考えられる。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変換に IkBzeta が関与することも明らかになった。しかし、IkBzeta 自身には、クロマチン構造を変換させる酵素活性はない。IkBzeta と相互作用し、クロマチン構造を変換させる分子の同定をさらに行っていきたい。このように、自然免疫系の活性制御機構を解析し、その制御技術基盤を確立し、有効なアジュバントの創出に寄与したい。

#### E. 結論

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- $\kappa$ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類されるが、この相違は各遺伝子プロモーターのクロマチン構造の違いによることが明らかになった。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変換に IkBzeta が関与することも明らかになった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 論文発表

- Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, **Takeda K**, and Watanabe M. Bone marrow retaining colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* 2007. (in press)
- Koga R, Hamano S, Kuwata H, Atarashi K, Ogawa M, Hisaeda H, Yamamoto M, Akira S, Himeno K, Matsumoto M, and **Takeda K**. TLR-dependent induction of IFN- $\beta$  mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177 : 7059-7066. 2006.
- Yamamoto M, Okamoto T, **Takeda K**, Sato S, Sanjo H, Uematsu S, Saitoh T, Yamamoto N, Sakurai H, Ishii KJ, Yamaoka S, Kawai T, Matsuura Y, Takeuchi O, and Akira S. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7 : 962-970. 2006.
- Uematsu S, Jang MH, Chevrier N, Guo Z, Kumagai Y, Yamamoto M, Kato H, Sougawa N, Matsui H, Kuwata H, Hemmi H, Goban C, Kawai T, Ishii KJ, Takeuchi O, Miyasaka M, **Takeda K**, and Akira S. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c<sup>+</sup> lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 7 : 868 – 874. 2006.
- Yoshimatsu T, Kawaguchi D, Oishi K, **Takeda K**, Akira S, Masuyama N, and Gotoh Y. Non-cell-autonomous action of STAT3 in maintenance of neural precursor cells in the mouse neocortex. *Development* 33 : 2553-2563. 2006.
- Miyatsuka T, Kaneko H, Shirai T, Matsuoka TA, Yamamoto K, Kato K, Nakamura Y, Akira S, **Takeda K**, Kajimoto Y, Yamasaki Y, Sandgren EP, Kawaguchi Y, Wright CV, and Fujitani Y. Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation. *Genes Dev.* 20 : 1435-1440. 2006.
- Takegagara N, Takamatsu H, Toyofuku T, Tsujimura T, Okuno T, Yukawa K, Mizui M, Yamamoto M, Prasad DV, Suzuki K, Ishii M, Terai K, Moriyama M, Nakatsuji Y, Sakoda S, Sato S, Akira S, **Takeda K**, Inui M, Takai T, Ikawa M, Okabe M, Kumanogoh A, and Kikutani H. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 8 : 615-622. 2006.
- Nakamura K, Miyagi K, Koguchi Y, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, Akamine M, Fujita J, Kawamura I, Mitsuyama M, Adachi Y, Ohno N, **Takeda K**, Akira S, Miyazato A, Kaku M, and Kawakami K. Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen. *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47 : 148-154. 2006.
- Yu Q, Tang C, Xun S, Yajima T, **Takeda K**, and Yoshikai Y. MyD88-dependent signaling for IL-15 production is important for the development of CD8 $\alpha\alpha$  and TCR $\gamma\delta$  intestinal intraepithelial T lymphocytes. *J. Immunol.* 176 : 6180-6185. 2006.
- Inoue H, Ogawa W, Asakawa A, Okamoto Y, Nishizawa A, Matsumoto M, Teshigawara K, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Notohara K, Katayose K, Okamura H, Kahn CR, Noda T, **Takeda K**, Akira S, Inui A, and Kasuga M. Role of hepatic STAT3 in brain insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab.* 3 : 267-75. 2006.
- Kinoshita D, Hirota F, Kaisho T, Kasai M, Izumi K, Bando Y, Mouri Y, Matsushima A, Niki S, Han H, Oshikawa K, Kuroda N, Maegawa M, Irahara M, **Takeda K**, Akira S, and Matsumoto M. Essential role of I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. *J. Immunol.* 176 : 3995-4002. 2006.
- Santos LL, Milenkovski GP, Hall PH, Leech M, Sharma L, Takeda K, Akira S, Kitching AR, and Morand EF. IL-18 is redundant in T-cell responses and in joint inflammation in antigen-induced arthritis. *Immunol. Cell Biol.* 84 : 166-173. 2006.
- Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, **Takeda K**, Fukai F, Mizuguchi J, and Yoshimoto T. IL-27 suppresses

CD28-mediated IL-2 production through Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J. Immunol.* 176 : 2773-2780, 2006.

染防御機構, 第71回インターフェロンサイトカイン学会, 2006.7.7-8, 兵庫

## 2. 学会発表

1. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. Awaji Forum, 2006.9.3-6, Hyogo, Japan
2. Kiyoshi Takeda, Innate immune responses against mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program, 41<sup>st</sup> Tuberculosis and leprosy research conference, 2006.7.19-21, Kagoshima, Japan
3. Kiyoshi Takeda, Role of TLR in innate and acquired phase of IBD. 2006 SMI Annual Meeting, 2006.6.1, San Francisco, USA
4. Kiyoshi Takeda, Nuclear I $\kappa$ B protein-mediated regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa (symposium), 第36回日本免疫学会学術集会, 2006.12.11-13, 大阪
5. 香山尚子, 竹田潔, Epigenetic regulation of Toll-like receptor-dependent gene expression. 第36回日本免疫学会学術集会, 2006.12.11-13, 大阪
6. 財賀大行, 竹田潔, Lipocalin 2 mediates anti-mycobacterial immune responses. 第36回日本免疫学会学術集会, 2006.12.11-13, 大阪
7. 古賀律子, 竹田潔, IFN-beta-dependent innate immune response against *Trypanosoma cruzi*, 第36回日本免疫学会学術集会, 2006.12.11-13, 大阪
8. 竹田潔, 自然免疫系によるトリパノソーマ原虫の感染制御機構, 第59回日本寄生虫学会, 2006.10.28, 福岡
9. 竹田潔, 自然免疫系の活性制御機構 (シンポジウム), 第2回食品免疫学会, 2006.10.23, 東京
10. 竹田潔, 自然免疫系の活性制御機構 (特別講演), 第43回補体シンポジウム, 2006.8.19, 福岡
11. 竹田潔, 粘膜免疫の今後の展望 (イブニングセミナー), 第43回日本消化器免疫学会総会, 2006.8.3-4, 青森
12. 竹田潔, 自然免疫系による炎症制御, 日本動脈硬化学会, 2006.7.13-14, 東京
13. 竹田潔, I型IFNによる細胞内寄生性原虫の感

## 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

## 研究成果の刊行に関する一覧

Tamagawa H, Hiroi T, Mizushima T, Ito T, Matsuda H, and **Kiyono H**. Therapeutic effects of roxithromycin in interleukin -10-deficient colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2007. (in press)

Kunisawa J, Takahashi I, and **Kiyono H**. Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol. Rev.* 2007. (in press)

Kunisawa J, Kurashima Y, Gohda M, Higuchi M, Ishikawa I, Ogahara I, and **Kiyono H**. Sphingosine 1-phosphate regulates peritoneal B cell trafficking for subsequent intestinal IgA production. *Blood* 2007. (in press)

Kim N, Knisawa J, Kweon MN, Eog Ji G, and **Kiyono H**. Oral feeding of *Bifidobacterium bifidum* (BGN4) prevents CD4<sup>+</sup> CD45RB (high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. *Clin. Immunol.* 2007. (in press)

Maddaloni M, Staats HF, Mierzejewska D, Hoyt T, Robonson A, Callis G, Kozaki S, **Kiyono H**, McGhee JR, Fujihashi K, and Pascual DW. Mucosal vaccine targeting improves onset of mucosal and systemic immunity to botulinum neurotoxin A. *J. Immunol.* 177 : 5524-5432. 2006.

Nochi T, and **Kiyono H**. Innate immunity in the mucosal immune system. *Curr Pharm Des.* 12 : 4203-4213. 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.

**Hagiwara Y**, Kawamura YI, Kataoka K, Rahima B, Jackson RJ, Komase K, Dohi T, Boyaka PN, **Takeda Y**, **Kiyono H**, McGhee JR, and Fujihashi K. A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking. *J. Immunol.* 177 : 3045-3054. 2006.

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

Fukuyama S, Nagatake T, Kim DY, Takamura K, Park EJ, Kaisho T, Tanaka N, Kurono Y, and

**Kiyono H.** Uniqueness of lymphoid chemokine requirement for the initiation and maturation of NALT organogenesis. *J. Immunol.* 177 : 4276-4280. 2006. (Cutting Edge)

Safa A, Bhuyian NA, Nusrin S, Ansaruzzaman A, Alam M, **Hamabata T**, **Takeda Y**, Sack DA, and Nair GB. Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes. *J. Med. Microbiol.* 55 : 1563-1569. 2006.

Koga R, Hamano S, Kuwata H, Atarashi K, Ogawa M, Hisaeda H, Yamamoto M, Akira S, Himeno K, Matsumoto M, and **Takeda K.** TLR-dependent induction of IFN- $\beta$  mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177 : 7059-7066. 2006.

Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, **Takeda K**, and Watanabe M. Bone marrow retaining colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* 2007. (in press)

Yamamoto M, Okamoto T, **Takeda K**, Sato S, Sanjo H, Uematsu S, Saitoh T, Yamamoto N, Sakurai H, Ishii KJ, Yamaoka S, Kawai T, Matsuura Y, Takeuchi O, and Akira S. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7 : 962-970. 2006.

Uematsu S, Jang MH, Chevrier N, Guo Z, Kumagai Y, Yamamoto M, Kato H, Sougawa N, Matsui H, Kuwata H, Hemmi H, Goban C, Kawai T, Ishii KJ, Takeuchi O, Miyasaka M, **Takeda K**, and Akira S. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c<sup>+</sup> lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 7 : 868 – 874. 2006.

Yoshimatsu T, Kawaguchi D, Oishi K, **Takeda K**, Akira S, Masuyama N, and Gotoh Y. Non-cell-autonomous action of STAT3 in maintenance of neural precursor cells in the mouse neocortex. *Development* 33 : 2553-2563. 2006.

Miyatsuka T, Kaneko H, Shirai T, Matsuoka TA, Yamamoto K, Kato K, Nakamura Y, Akira S, **Takeda K**, Kajimoto Y, Yamasaki Y, Sandgren EP, Kawaguchi Y, Wright CV, and Fujitani Y. Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation. *Genes Dev.* 20 : 1435-1440. 2006.

Takegagara N, Takamatsu H, Toyofuku T, Tsujimura T, Okuno T, Yukawa K, Mizui M, Yamamoto M, Prasad DV, Suzuki K, Ishii M, Terai K, Moriyama M, Nakatsuji Y, Sakoda S, Sato S, Akira S, **Takeda K**, Inui M, Takai T, Ikawa M, Okabe M, Kumanogoh A, and Kikutani H. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 8 : 615-622. 2006.

Nakamura K, Miyagi K, Koguchi Y, Kinjo Y, Uezu K, Kinjo T, Akamine M, Fujita J, Kawamura I, Mitsuyama M, Adachi Y, Ohno N, **Takeda K**, Akira S, Miyazato A, Kaku M, and Kawakami K.

Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen. *Cryptococcus neoformans*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 47 : 148-154. 2006.

Yu Q, Tang C, Xun S, Yajima T, **Takeda K**, and Yoshikai Y. MyD88-dependent signaling for IL-15 production is important for the development of CD8 $\alpha\alpha$  and TCR $\gamma\delta$  intestinal intraepithelial T lymphocytes. J. Immunol. 176 : 6180-6185. 2006.

Inoue H, Ogawa W, Asakawa A, Okamoto Y, Nishizawa A, Matsumoto M, Teshigawara K, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Notohara K, Katayose K, Okamura H, Kahn CR, Noda T, **Takeda K**, Akira S, Inui A, and Kasuga M. Role of hepatic STAT3 in brain insulin action on hepatic glucose production. Cell Metab. 3 : 267-75. 2006.

Kinoshita D, Hirota F, Kaisho T, Kasai M, Izumi K, Bando Y, Mouri Y, Matsushima A, Niki S, Han H, Oshikawa K, Kuroda N, Maegawa M, Irahara M, **Takeda K**, Akira S, and Matsumoto M. Essential role of I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. J. Immunol. 176 : 3995-4002. 2006.

Santos LL, Milenkovski GP, Hall PH, Leech M, Sharma L, **Takeda K**, Akira S, Kitching AR, and Morand EF. IL-18 is redundant in T-cell responses and in joint inflammation in antigen-induced arthritis. Immunol. Cell Biol. 84 : 166-173. 2006.

Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, **Takeda K**, Fukai F, Mizuguchi J, and Yoshimoto T. IL-27 suppresses CD28-mediated IL-2 production through suppressor of cytokine signaling 3. J. Immunol. 176 : 2773-2780. 2006.

吉田理人、五十嵐脩、寺原和孝、清野宏. 繊毛 M 細胞の形態と機能. 臨床免疫. 45 : 236-242. 2006.

廣井隆親、塚越百合子、清野宏. 粘膜系好酸球様樹状細胞による免疫寛容制御感染と免疫 221-230 2007.



研究成果の刊行物・別刷

# Mucosal Vaccine Targeting Improves Onset of Mucosal and Systemic Immunity to Botulinum Neurotoxin A<sup>1</sup>

Massimo Maddaloni,\* Herman F. Staats,<sup>†</sup> Dagmara Mierzejewska,<sup>‡</sup> Teri Hoyt,\* Amy Robinson,\* Gayle Callis,\* Shunji Kozaki,<sup>§</sup> Hiroshi Kiyono,<sup>||</sup> Jerry R. McGhee,<sup>||</sup> Kohtaro Fujihashi,<sup>||</sup> and David W. Pascual<sup>2\*</sup>

Absence of suitable mucosal adjuvants for humans prompted us to consider alternative vaccine designs for mucosal immunization. Because adenovirus is adept in binding to the respiratory epithelium, we tested the adenovirus 2 fiber protein (Ad2F) as a potential vaccine-targeting molecule to mediate vaccine uptake. The vaccine component (the host cell-binding domain to botulinum toxin (BoNT) serotype A) was genetically fused to Ad2F to enable epithelial binding. The binding domain for BoNT was selected because it lies within the immunodominant H chain as a  $\beta$ -trefoil (Hc $\beta$ tre) structure; we hypothesize that induced neutralizing Abs should be protective. Mice were nasally immunized with the Hc $\beta$ tre or Hc $\beta$ tre-Ad2F, with or without cholera toxin (CT). Without CT, mice immunized with Hc $\beta$ tre produced weak secretory IgA (sIgA) and plasma IgG Ab response. Hc $\beta$ tre-Ad2F-immunized mice produced a sIgA response equivalent to mice coimmunized with CT. With CT, Hc $\beta$ tre-Ad2F-immunized mice showed a more rapid onset of sIgA and plasma IgG Ab responses that were supported by a mixed Th1/Th2 cells, as opposed to mostly Th2 cells by Hc $\beta$ tre-dosed mice. Mice immunized with adjuvanted Hc $\beta$ tre-Ad2F or Hc $\beta$ tre were protected against lethal BoNT serotype A challenge. Using a mouse neutralization assay, fecal Abs from Hc $\beta$ tre-Ad2F or Hc $\beta$ tre plus CT-dosed mice could confer protection. Parenteral immunization showed that the inclusion of Ad2F enhances anti-Hc $\beta$ tre Ab titers even in the absence of adjuvant. This study shows that the Hc $\beta$ tre structure can confer protective immunity and that use of Hc $\beta$ tre-Ad2F gives more rapid and sustained mucosal and plasma Ab responses. *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 5524–5532.

**B**otulism occurs from the infection by *Clostridium botulinum* or by ingestion of its neurotoxin complex, resulting in flaccid paralysis (1, 2). Due to its potency, the illicit dissemination of botulinum neurotoxins (BoNT)<sup>3</sup> poses a major threat to the unprotected populace. Of the seven serotypes, serotypes A, B, and, to a minor extent, E are typically associated with botulism in humans, whereas serotype C mostly affects domestic animals (1, 2). The toxins are each naturally synthesized as a single 150-kDa polypeptide, requiring posttranslational proteolysis to yield a ~50-kDa fragment or L chain, containing the catalytic activity, and a 100-kDa component or H chain (~100 kDa), con-

taining the translocation domain in the N terminus and the cell-binding domain in the C terminus (Hc). Upon binding to the target cell, the translocation domain in the N terminus translocates the L chain to the cytosol, and the L chain endopeptidase activity inactivates a group of proteins (termed SNARE proteins) required for release of acetylcholine at the neuromuscular junction resulting in flaccid paralysis (3–6).

The current vaccine is a pentavalent one with as little as 10% of the toxoid preparation representing neurotoxic (7), suggesting that much of the immune response induced by the vaccine is directed against vaccine components that will not contribute to protection against BoNT lethal challenge. Because formalin is used to inactivate BoNT to produce the toxoids for vaccine formulation, such chemical modification of the toxins results in a considerably altered tertiary structure (8) needed to elicit neutralizing Abs (9–11). Thus, better formulations are needed. To this end, structural analysis of the catalytic and binding sites of *C. botulinum* BoNT serotype B reveals that the Hc is structurally subdivided into a N-terminal subdomain, forming a jelly-roll motif, and a C-terminal subdomain, forming  $\beta$ -trefoil structure (5). We hypothesize that this  $\beta$ -trefoil structure contains the important neutralizing epitopes. In fact, in a previous study, neutralizing Abs against Hc BoNT serotype A (BoNT/A) exhibited two major protective epitopes, BoNT/A<sub>455–661</sub> and BoNT/A<sub>1150–1289</sub>, which conferred ~75% protection, and one minor protective epitope, BoNT/A<sub>780–939</sub>, which conferred 28% protection (9). The neutralizing epitope BoNT/A<sub>1150–1289</sub> conferred 75% protection and spanned about two-thirds of the  $\beta$ -trefoil region. Taken together, these results hint that the intact  $\beta$ -trefoil structure would be a potential candidate for an optimized vaccine.

Replication-deficient adenovirus vectors (12) and other viruses (13) have been experimentally used to correct genetic deficiencies, but these viral vectors have remained, in large part, immunogenic.

\*Veterinary Molecular Biology, Montana State University, Bozeman, MT 59717;

<sup>†</sup>Department of Pathology, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710;

<sup>‡</sup>Department of Food Chemistry, Institute of Food Research, Polish Academy of Science, Olsztyn, Poland; <sup>§</sup>Laboratory of Veterinary Epidemiology, Graduate School of Agriculture and Biological Sciences, Osaka Prefecture University, Sakai-shi, Osaka, Japan; <sup>||</sup>Department of Microbiology and Immunology, Division of Mucosal Immunology, Institute for Medical Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan; and

<sup>||</sup>Department of Microbiology and Department of Pediatric Dentistry, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294

Received for publication April 5, 2006. Accepted for publication July 21, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> This work was supported by Public Health Service Grants DE-13812, AI-56286, AI-18958, DE-12242, AI-43197, and DC-04976, and in part by Montana Agricultural Station and the U.S. Department of Agriculture Formula Funds. The Veterinary Molecular Biology flow cytometry facility was supported in part by the Center of Biomedical Research Excellence P20 RR-020185 from the National Institutes of Health/National Center for Research Resources.

<sup>2</sup> Address correspondence and reprint requests to Dr. David W. Pascual, Veterinary Molecular Biology, P.O. Box 173610, Montana State University, Bozeman, MT 59717-3610. E-mail address: dpascual@montana.edu

<sup>3</sup> Abbreviations used in this paper: BoNT, botulinum neurotoxin; Hc $\beta$ tre,  $\beta$ -trefoil structure of Hc for BoNT; Ad2F, adenovirus 2 fiber protein; AFC, Ab-forming cell; CFC, cytokine-forming cell; CM, complete medium; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; CT, cholera toxin; LN, lymph node. sIgA, secretory IgA.

Despite this condition, adenovirus vectors retain the advantage of transfecting the airway epithelium (14, 15). However, examination of the adenovirus components shows that adenovirus adhesion is mediated by the interaction between its attachment or fiber protein and receptors on the cell surface (15). Study of adenovirus (16) and reovirus (17) attachment proteins reveals that they share a common feature in that they are homotrimeric to form a high-energy structure that springs open upon binding its cell receptor, thus triggering a series of events ultimately leading to the entry of the virus into the cell. Therefore, it may be possible that adenovirus 2 fiber protein (Ad2F) could potentially be used in lieu of the intact virus for mucosal targeting.

In an effort to improve the current BoNT vaccine, we adopted a two-prong approach to create a mucosal vaccine against BoNT/A. First, we questioned whether the  $\beta$ -trefoil structure, which is responsible for the cell-binding activity, would be sufficient to elicit neutralizing Abs because this structure is maintained in all serotypes, as well as in tetanus toxoid (18). Accordingly, our vaccine includes this  $\beta$ -trefoil structure. In addition, we hypothesize that a fusion protein between this  $\beta$ -trefoil structure from BoNT/A genetically fused to adhesin Ad2F attachment protein may enhance its immunogenicity and uptake by the common mucosal immune system.

In this study, we showed that the addition of the mucosal-targeting molecule, Ad2F, enhanced onset of plasma and mucosal Ab responses. Both vaccines (with and without Ad2F) conferred complete protection from systemic challenge with as much as 20,000 LD<sub>50</sub> of the native BoNT/A. Upon evaluation of mucosal Abs to the immunodominant Hc as a  $\beta$ -trefoil (Hc $\beta$ tre) structure, mice dosed with Hc $\beta$ tre-Ad2F showed the best protection against the BoNT/A complex.

## Materials and Methods

### DNA manipulations

As shown by others (19), initial attempts to express the *C. botulinum* gene encoding the Hc BoNT/A gene in yeast failed to yield any protein. Consequently, a synthetic gene encoding for Hc BoNT/A amino acids R864 to L1295 (GenBank accession no. X52066) was designed for optimized expression in the yeast *Pichia pastoris*. Factors taken into account for the synthetic gene were yeast codon bias, the reduction of *C. botulinum* A/T content, and the necessity for not depleting any particular tRNA pools. The Hc $\beta$ tre spans from position S1096 to L1295, as predicted by others (18). To clone the Hc $\beta$ tre domain, we included 15 more amino acids upstream from the predicted Hc $\beta$ tre beginning with K1076 to L1295 to facilitate proper folding of the relevant domain.

To clone the Hc BoNT/A gene into the expression vector, the synthetic gene encoding for Hc BoNT/A was amplified with primers containing *EcoRI* and *Sall* restriction sites. Likewise, to clone the Hc $\beta$ tre, this gene was amplified from the synthetic Hc BoNT/A using primers containing *EcoRI* and *Sall* restriction sites. In both cases, the 5' primers containing the *EcoRI* site also provided an ATG initiation codon embedded into an optimal Kozak's sequence. The PCR products were cloned into a pCRII TOPO cloning vector (Invitrogen Life Technologies), excised with *EcoRI* and *Sall*, and cloned into the *P. pastoris* expression vector pPICZ B cut with *EcoRI* and *XhoI*. Such a vector is designed to provide a C-terminal histidine tag for subsequent protein purification. Adenovirus 2 fiber was amplified from genomic adenovirus 2 DNA (a gift from Dr. J. Chroboczek, European Molecular Biology Laboratory, Grenoble, France). Attempts to express the entire Ad2F were unsuccessful; thus, only the C-terminal region, starting from G378 to E582, was cloned. This region encompasses 1) a short stretch of amino acids rich in Gly (4 of 15), 2) the region containing the trimerizing domain, and 3) the region containing the globular domain, commonly referred to as the "knob," which is important for interacting with the coxsackievirus/adenovirus receptor on the cell surface (15). This region proved to be easily expressed in *P. pastoris*, even when fused to a variety of Ags or fluorescent proteins.

To make Hc $\beta$ tre-Ad2F, Hc $\beta$ tre was amplified with primers generating *EcoRI* and *Sall* ends cloned and excised with *EcoRI* and *Sall*. The mentioned region of Ad2F was amplified with primer generating *Sall* and *KpnI* ends, cloned, and excised with the corresponding enzymes. The vector

pPICZ B was cut with *EcoRI* and *KpnI*. Finally, Hc $\beta$ tre-Ad2F was assembled via a tripartite ligation. Primers were designed to allow in-frame junction between the different components and the formation of a flexible joint between Hc $\beta$ tre and the Ad2F. To make Red2-Ad2F, a similar strategy was adopted. Red2 gene was amplified with primers generating *EcoRI* and *Sall* ends using pDsRed2 (BD Biosciences) as template, and fused to Ad2F as described. These constructs were transformed into *P. pastoris* by electroporation.

### Protein expression, purification, and FACS analysis

Recombinant proteins were produced by shifting the carbon source from glycerol to methanol, as required with *P. pastoris*. Briefly, yeast cells were cultured in yeast nitrogen base-glycerol until OD 0.5–1.0. Cells were then harvested by centrifugation and resuspended in yeast nitrogen base-methanol for 36–48 h. Pelleted biomass was either used right away or stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until needed. Cells were disrupted with a bead-beater in ice, and debris were cleared by centrifugation, followed by filtration through a 1.2- $\mu\text{m}$  prefilter, then by filtration through a 0.45- $\mu\text{m}$  filter under vacuum. The cleared supernatant was then applied to a Talon column (BD Biosciences), as per the manufacturer's instruction. Purified proteins were eluted, titrated, and loaded onto a 12% polyacrylamide gel. Recombinant Hc $\beta$ tre proteins were analyzed by Coomassie-stained SDS-PAGE to assess the quality of the protein. The Red2-Ad2F was blotted and probed with a commercial rabbit anti-Red2 Abs (BD Biosciences).

### Recombinant Ad2F-binding assay

The mouse fibroblast L929 cells, human HeLa cells, and human 293 cells (American Type Culture Collection) were grown according to the complete medium (CM): RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies), 10% FBS (Atlanta Biologicals), 10 mM HEPES buffer, 10 mM nonessential amino acids, 10 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin. Confluent cells were detached by trypsinization, washed, and resuspended in FACS buffer (10 g/L of Dulbecco's PBS (Sigma-Aldrich) plus 2% FBS). Cells were incubated with 25  $\mu\text{g}$  of Red2-Ad2F or Red2 (BD Clontech), and incubated at room temperature for 45 min. Cells were washed once with 3 ml of FACS buffer and resuspended in 200  $\mu\text{l}$  of FACS buffer. Bound fluorescence was analyzed with a FACSCalibur (BD Biosciences).

### Histological preparation

Mice were nasally dosed with 50  $\mu\text{g}$  Red2-Ad2F, and after 90 min, mice were euthanized to harvest heads. The skin, tongue, and lower jaw were removed, and the remaining portion was embedded into OCT (Sakura Finetek) with the top of turbinates oriented in the bottom of plastic cryomold to avoid cutting teeth. Turbinates were then snap frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Turbinate frozen sections were cut at  $-30^{\circ}\text{C}$  in a Leica Cryocut 1850 (Leica Microsystems) using Instrumedics CryoJane Tape Transfer System and a D profile tungsten carbide cryostat knife (Delaware Diamond Knives) to retain the undecalcified bone with epithelial lining on a slide. Frozen sections were air dried 30 min, then cover-slipped unfixed using Prolong Gold ready-to-use Anti-Fade Reagent with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probes).

### Immunizations

Specific pathogen-free BALB/c mice were obtained from the National Cancer Institute and maintained in the Animal Resources Center at Montana State University (Bozeman, MT). All mice were kept under pathogen-free conditions in individually ventilated cages under HEPA-filtered, barrier conditions and fed sterile food and water ad libitum. The mice were free of bacterial and viral pathogens, as determined by Ab screening and by histopathologic analysis of major organs and tissues. Mice between age 5 and 8 wk were immunized nasally with 50  $\mu\text{g}$  of Hc $\beta$ tre or Hc $\beta$ tre-Ad2F plus 5  $\mu\text{g}$  of cholera toxin (CT; List Biological Laboratories), and boosted with their respective vaccines on days 7 and 14 postprimary immunization with 2  $\mu\text{g}$  of CT. For i.m. immunizations, BALB/c mice were immunized with equimolar amounts of Hc $\beta$ tre Ag, which represented 50  $\mu\text{g}$  of Hc $\beta$ tre-Ad2F and 25  $\mu\text{g}$  of Hc $\beta$ tre on days 0, 7, and 14 with or without 1.0  $\mu\text{g}$  of CT given at the anterior tibial tuberosity to ensure delivery into the muscle (20).

### ELISA to detect BoNT/A $\beta$ -trefoil Abs

Standard ELISA protocols were followed to quantitate the Abs induced to BoNT/A Hc $\beta$ tre. Recombinant BoNT/A Hc $\beta$ tre (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was used to coat Maxisorp microtiter plates (Nunc) overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Immune plasma, fecal extracts, or nasal washes from individual mice were evaluated for their

activity against the Hc $\beta$ tre. Fecal samples were extracted from the supernatants of 10% (w/v) suspension of sample and PBS with 50  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich). Nasal washes were collected by intubation of the trachea to access the nasopharyngeal cavity. An ~1-inch long tygon tubing (internal diameter 0.010 inches, outside diameter 0.030 inches; Cole-Parmer) was attached to a 1.0-ml syringe, an approach used to avoid any blood contamination of the nasal washes. A total of 200  $\mu$ l of PBS was inserted via the trachea, and the exudate from the nares was collected into microfuge tubes. Cells and debris were removed by centrifugation for 10 min at 10,000  $\times$  g. HRP-goat anti-mouse IgA, IgG, IgG1, IgG2a, and IgG2b (Southern Biotechnology Associates) or biotinylated rat anti-mouse IgE mAb (BD Pharmingen) plus HRP-goat anti-biotin Abs (Vector Laboratories) were used for detection. Following 90 min of incubation at 37°C and a washing step, the specific reactivity was determined by the addition of an enzyme substrate, ABTS (Moss) at 100  $\mu$ l/well. Absorbance was measured at 415 nm on a Kinetics Reader model EL312 (Bio-Tek Instruments). Endpoint titers were defined as the highest reciprocal of dilution of sample giving an absorbance at OD<sub>415</sub> above 0.100 OD units above negative controls after 1 h of incubation at 25°C. For total IgE ELISA, a similar protocol was followed as for Ag-specific ELISA already described, but wells were coated with rat anti-mouse IgE mAb (2.0  $\mu$ g/ml; BD Pharmingen). After blocking, serial dilutions (beginning at 2<sup>5</sup>) of individual serum were done and added to coated wells in duplicate and incubated overnight at 4°C. After washing wells, 2.0  $\mu$ g/ml biotinylated rat anti-mouse IgE was incubated for 2 h at 37°C, washed, then incubated with 1/500 dilution of HRP-goat anti-biotin for 1 h at 37°C. Wells were developed, as described, and a specific amount of IgE was extrapolated from a standard curve derived from wells incubated with an IgE anti-trinitrophenyl mAb (BD Pharmingen).

#### Lymphocyte isolation

Lymphocytes were isolated from nasal passages, submaxillary glands, small intestinal lamina propria, Peyer's patches, mesenteric lymph nodes (LN), spleens, nasal-associated lymphoreticular tissue, and head and neck LN. Splenic, Peyer's patch, mesenteric LN, nasal-associated lymphoreticular tissue, and head and neck LN mononuclear cell suspensions were obtained by conventional methods using dounce homogenization (21, 22) and yielding >95% viability by trypan blue exclusion. To isolate mononuclear cells from nasal passages and submaxillary glands, the tissues were minced and suspended in medium containing 300 U/ml *Clostridium histolyticum* type IV collagenase (Worthington Biochemical), followed by two 30-min digestions at 37°C or a single digestion for 45 min, respectively, in spinner flasks. The small intestinal lamina propria samples were isolated, as previously described (21, 22). After incubation, the digestion mixtures were passed through Nitex mesh (Fairview Fabrics) to remove undigested tissues. Mononuclear cells were subjected to Percoll (Amersham Biosciences) density gradient centrifugation, and the cells were interfaced between 40 and 75% Percoll (21, 22). Viability of >95% was noted for lymphocytes isolated from each tissue, as determined by trypan blue exclusion.

#### B cell Ab ELISPOT

Ab-forming cells (AFC) were enumerated using IgA and IgG Ag-specific ELISPOT assays similar to those previously described (21–23). Mixed cellulose ester membrane-bottomed microtiter plates (MultiScreen-HA; Millipore) were coated with 5.0  $\mu$ g/ml recombinant Hc BoNT/A in sterile PBS. For total IgA or IgG AFC determinations, wells were coated with 5  $\mu$ g/ml goat anti-mouse IgA or IgG (Hc-specific) Abs (Southern Biotechnology Associates) in sterile PBS overnight at 25°C. The plates were blocked at 37°C for 2 h in CM. A total of 100  $\mu$ l of cells from each tissue at varying concentrations was added to the wells, and the plates were incubated at 37°C overnight. Cells were removed, and the plates were washed, as previously described (21–23). For detection of AFC responses, 100  $\mu$ l of 1.0  $\mu$ g/ml goat anti-mouse IgG and IgA-HRP conjugates (Southern Biotechnology Associates) were added to the wells, and the plates were incubated overnight at 4°C. After washing, the wells were developed with 100  $\mu$ l of AEC (Moss), and the reaction was allowed to continue until spots developed (~30 min). The reaction was stopped with H<sub>2</sub>O, the plates were allowed to dry overnight, and AFC were enumerated by counting under a low-power dissecting microscope (Leica).

#### Cytokine ELISPOT

Groups of BALB/c mice (5–10/group) were euthanized 3 wk after the last immunization to collect spleens. Total splenic, head and neck LN, and mesenteric LN mononuclear cells (5  $\times$  10<sup>6</sup>/ml) were resuspended in CM, and restimulated with 10  $\mu$ g/ml recombinant Hc BoNT/A, OVA (tissue-culture grade; Sigma-Aldrich), or media in the presence of 10 U/ml human

IL-2 (PeproTech) for 2 days at 37°C. Cells were washed and resuspended in CM. Stimulated lymphocytes were then evaluated by IFN- $\gamma$ , IL-4-, IL-5-, IL-6-, and IL-10-specific ELISPOT assays, precisely as previously described (22, 24).

#### BoNT intoxication challenge and mouse neutralization assay

To assess the protective value of the Hc $\beta$ tre vaccine, BALB/c mice were immunized nasally with equimolar doses of Hc $\beta$ tre or Hc $\beta$ tre-Ad2F with or without CT as adjuvant, as previously described. For the first experiment, one group of mice was immunized nasally with 2  $\mu$ g of BoNTToxoid/A (List Biological Laboratories) plus 2  $\mu$ g of CT on days 0, 7, 14, and 21. Mice were monitored for Ab titers to Hc $\beta$ tre, Hc BoNT/A, and BoNT/A. On day 63 or day 96, mice were challenged i.p. with ~20,000 or 2000 LD<sub>50</sub> BoNT/A (2  $\times$  10<sup>8</sup> mouse LD<sub>50</sub>/mg, Lot no. A121004-01; Metabiologics), respectively, in 200  $\mu$ l of PBS containing 0.2% gelatin, as previously described (23). Mice were monitored hourly for the first 6 h and then daily for signs of morbidity, including difficulty breathing and lack of mobility. Mice were euthanized when signs of morbidity were observed.

To determine whether nasal immunization with Hc $\beta$ tre immunogens was able to induce protective Abs in mucosal secretions against BoNT/A, we picked a mouse neutralization assay using BoNT/A complex (3.8  $\times$  10<sup>7</sup> mouse LD<sub>50</sub>/mg, batch no. MA0305, lot no. A121005-01; Metabiologics). In this assay, filter-sterile fecal extracts from naive or day 21 samples were combined with BoNT/A complex (1/2 final dilution of fecal extract) and incubated at room temperature for 30 min before i.p. injection into naive BALB/c mice. As a positive control, some of the naive fecal extracts were spiked with immune sera from mice immunized nasally with Hc BoNT/A plus CT at a final dilution of 1/110. If the anti-Hc $\beta$ tre Abs in the fecal extracts were able to neutralize BoNT/A in the complex, the mice would not exhibit BoNT/A intoxication. If the fecal extracts did not contain BoNT/A-neutralizing Abs, the mice would exhibit signs of BoNT/A toxicity, including shortness of breath and immobility. Mice were monitored twice daily for up to 5 days. Morbid mice were euthanized in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee of both institutions.

#### Statistical analysis

An ANOVA, followed by Tukey's method, was used to evaluate differences between variations in Ab titers, Ab AFC, and cytokine-forming cell (CFC) levels and discerned to the 95% confidence interval. The Kaplan-Meier method (GraphPad Prism; GraphPad) was applied to obtain the survival fractions following intoxication with BoNT/A or the BoNT/A complex. Using the Mantel-Haenszel log rank test, the *p* value for statistical differences between surviving BoNT/A challenge and Hc $\beta$ tre plus CT, Hc $\beta$ tre-Ad2F plus CT, Hc $\beta$ tre alone, Hc $\beta$ tre-Ad2F alone, or BoNTToxoid plus CT vaccinated mice or fecal extracts derived from vaccinated and naive mice were discerned at the 95% confidence interval.

## Results

### Recombinant Ad2F exhibits cell-binding activity

We hypothesized that the addition of a mucosal-targeting ligand, i.e., Ad2F, would possibly enhance vaccine uptake. To test for this response, several recombinant proteins were produced for this study (Fig. 1A). The Hc fragment of the *C. botulinum* neurotoxin A (Hc BoNT/A) is a small molecule subdomain corresponding to the binding domain for Hc referred to as the  $\beta$ -trefoil (Hc $\beta$ tre) structure. A fusion protein between the Hc $\beta$ tre and the Ad2F referred to as the Hc $\beta$ tre-Ad2F was also assessed. Finally, a fusion between the Red2 fluorescent protein and Ad2F referred to as Red2-Ad2F was used. The recombinant Hc, Hc $\beta$ tre, and Hc $\beta$ tre-Ad2F migrated with the expected molecular mass of 58, 27.8, and 50 kDa, respectively, as determined by SDS-PAGE (Fig. 1B) or 60 kDa for Red2-Ad2F, as assessed by Western blot (Fig. 1C). To assess whether the Ad2F could bind to the mucosal epithelium, binding studies to human HeLa and 293A cells were performed using the Red2-Ad2F (Fig. 1D). The Red2-Ad2F was able to bind to both HeLa and 293A cells, but not the recombinant Red2. Neither Red2-Ad2F nor Red2 were able to bind to mouse L cells, suggesting that the Ad2F was indeed functional. To test whether this protein could bind to mouse epithelium, BALB/c mice were nasally dosed with Red2-Ad2F and after 90 min, nasal passages were evaluated for protein binding. As depicted in Fig. 1E, the