

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

粘膜ワクチン開発の基礎となるアジュバント開発に関する研究

平成 16 年度～平成 18 年度 総合研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成 19 年（2007 年）4 月

目 次

I.	総合研究報告書 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 清野 宏 1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表 33
III.	研究成果の刊行物・別冊 47

総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症 研究事業)
(総合)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 感染免疫部門 炎症免疫学分野 教授

研究要旨

粘膜免疫機構を基盤とした次世代ワクチン開発すなわち「経鼻・経口ワクチン」の具現化に向けては、効果的で安全な「粘膜アジュバント」と「粘膜ワクチンデリバリー法」の開発が必須である。その目的達成に向けて、三本柱の研究体制で計七機関の研究者が相補的・横断的研究を展開してきた。一つの中心的な柱はコレラ毒素の粘膜免疫増強効果に着目し無毒化変異型(mCT)、第二世代のキメラ型(mCTA/LTB)そして第三世代として二重変異型(dmCT) アジュバントを開発し、その効果と安全性について評価・検討を進めてきた。一部に関してはヒトへの応用化もふまえてヒトに近い霊長類を使い、ウイルス抗原に対する抗原特異的免疫誘導経鼻アジュバント効果を確認することが出来た。さらに、病原細菌由来毒素(例、ボツリヌス毒素)に対する中和効果を有する抗原特異的抗体誘導増強効果があることがマウス実験系を使い確認出来た。つまり、毒素由来無毒化アジュバントにはウイルスと細菌感染両方に対する抗原特異的防御免疫誘導増強効果が明らかになった。第三世代の二重変異型アジュバントについては、免疫増強効果はもとより安全性も確認された。経鼻アジュバント効果だけではなく、その汎用性に関して特に経口アジュバント効果を示唆する結果も得られ、今後の霊長類での検討が期待される。二本目の柱の研究としてはヒトへの応用性を目指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 型研究を進める事が出来た。特にキメラ型に関しては実用レベルでの製造フローが構築できた。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新規アジュバントや 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新しい粘膜アジュバント開発に向けてその基盤形成が進んだ。

分担研究者 : 萩原 由加利 (社団法人北里研究所・生物製剤研究所 係長)
: 高木 広明 (株式会社 プロテイン・エクスプレス 副社長)
: 竹田 美文 (株式会社 シネ・サイエンス研究所 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)
: 田村 慎一 (大阪大学微生物病研究所 客員教授)

研究協力者 : 吉野 直人(岩手医科大学細菌学教室 講師)
: 藤野浩太郎(アラバマ大学バーミングハム校 教授)
: 小崎 俊司(大阪府立大学 獣医環境科学分野 教授)

A. 研究目的

今や世界的な問題である新興・再興感染症の殆どは呼吸器、消化器、生殖器粘膜を介した病原微生物の侵入から始まる。その粘膜面に巧妙かつ柔軟性に富んだ粘膜免疫機構が存在することが証明され、その機構を応用した「粘膜ワクチン」の開発が期待されている。「粘膜ワクチン」は現行の注射型ワクチンと比較して、粘膜面と全身系両方の免疫を作用させた二段構えの防御免疫を誘導できる事が明らかになり、益々その応用性が期待されている。しかしながら、その実用化に向けては、経口・経鼻投与されたワクチン抗原に対して免疫増強効果を有している粘膜アジュバントや粘膜免疫担当組織へのワクチン抗原デリバリー法の開発が重要である。

そこで本研究計画では我々が開発してきた無毒化変異型アジュバント(mCT)を基盤として、その進化型であるキメラ型(mCT-A/LT-B)そして第三世代である二重変異型(dmCT)を開発し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きた。さらに、一部のアジュバント(例、キメラ型)に関しては実用化試験をふまえて大量生産系の確立を進めた。また近年明らかとなってきた自然免疫系 TLR を標的としたアジュバント開発に向けて基礎的基盤形成を推進した。

B. 研究方法

B-1 毒素由来無毒化粘膜アジュバント開発研究:

1) 無毒化変異型 (mCT) に関する研究 : 小動物実験でその粘膜アジュバント効果が証明されている無毒化変異型 CT (mCT) に関して、ヒトへの応用性を踏まえて、霊長類で

の粘膜アジュバント効果を検討した。米国アラバマ大学バーミングハム校とカリフォルニア大学デイビス校の協同研究者の協力を得て、霊長類としては Rhesus macaque を使った実験を進めた。試験用ワクチン抗原としては HIVgp120 (100 μ g) を使い、mCT (25 - 100 μ g) と混合し、週に1回づつ 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 (nCT) 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。

2) mCT の病原細菌由来抗原に対する粘膜アジュバント効果の検討 : 経鼻アジュバントとして有効性・安全性が確認されている無毒化変異型アジュバントに関して細菌由来病原性抗原に対する免疫誘導・増強効果について検討した。そこで食物・飲料水介在型伝播毒素の一つであるボツリヌス菌に対する粘膜アジュバント効果を調べた。そこで A 型ボツリヌス類毒素 (BoNToxoid/A:20 μ g) と mCT(5 μ g) を混合し、経鼻ワクチンとしてマウスに週1回、4 週間投与した。最終経鼻免疫後、鼻洗浄液、唾液、糞便抽出物を採取し、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。

3) キメラ型(mCT-A/LT-B)に関する検討 : 本研究計画で第二世代として開発されたキメラ型(mCT-A/LT-B)アジュバントの粘膜アジュバントとしてのヒトへの応用性・安全性を検討する

ためには霊長類における腸管免疫・上気道免疫機構の基礎的解明が不可欠である。そこで、医薬基盤研究所霊長類医科学センターの協力を得てパイエル板やNALTについての同定や分離法の確立を始めた。

4) dmCTの安全性に関する検討：dmCTの毒性評価はADP-リボシルトランスフェラーゼ活性、Y-1細胞アッセイにより行った。また *in vivo* での毒性をマウス腸管ループ法により評価した。dmCTの中樞神経系への取込みについては、C57BL/6マウスにacridinium-標識したnCT、dmCT E112K/KDEVまたはE112K/KDVLを経鼻接種し、嗅神経細胞および嗅脳への取込み・蓄積を測定した。

5) dmCTの経鼻アジュバント活性：C57BL/6マウスに卵白アルブミン(OVA) 100 µgを抗原としてdmCT E112K/KDEV、dmCT E112K/KDGLまたは陽性コントロールとしてnCT 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行った。

6) 経鼻免疫により誘導される抗原特異的T細胞性免疫応答の解析：経鼻免疫したマウスの脾臓および頸部リンパ節よりCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞を分離し、抗原特異的応答を測定した。

7) dmCTの経口アジュバント活性：C57BL/6マウスに抗原としてOVA 1mgをnCT、dmCT E112K/KDEVまたはdmCT E112K/KDGL 10~50 µgと混合して、1週間間隔で3~5回

経口投与した。最終免疫から1週間後、血漿および糞便抽出液を採取し、ELISA法によりOVA-特異的抗体応答を測定した。

8) 粘膜ワクチンデリバリー法開発研究：粘膜ワクチン開発に向けては、効果的にワクチン抗原を選択的に粘膜面に送達する方法の開発も必要であり、粘膜上皮細胞指向性のあるアデノウイルスが感染機構として有するアデノウイルス2ファイバー(Ad2F)タンパクに注目し、米国研究グループとの共同で、より安全なリコンビナント分子を使った粘膜デリバリー効果について検討を開始した。

B-2 毒素由来無毒化粘膜アジュバント大量培養系確立に向けた検討：

B. choshinensis 宿主-ベクター系を用いて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。キメラ分子発現プラスミド(pNCMO2 chimera)を構築し、このプラスミドを保有する*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、動物試験用試料を調製した。

B-3 ペプチド型アジュバント開発に向けた検討：

野生型ホロCT(または自然型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型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・精製し、His-Tag

切断後 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、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。

各 CT 由来分子を、SDS-PAGE および native PAGE で泳動し、泳動パターンを確認・比較した。また nCT と mCT の GM1 への結合性の差を調べるため、nCT、mCT、CTB、陽性対照群としてコレラ菌由来の CT、大腸菌組換え体由来の CT および *Brevibacillus chosinensis* 組換え体由来の CT を用い、GM1 を固層化した 96 穴プレートを用いて ELISA を行った。

各 CT 由来分子 (10 μ g、nCT のみ 1 μ g) を卵白アルブミン (OVA、100 μ 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 1 週間目に血液、便、鼻洗浄液を採取し、OVA に対する血清 IgG、鼻洗浄液 IgA および糞便 IgA を ELISA により測定した。さらに同実験に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) を加え、nCT、mCT および CTB とのアジュバント活性の比較を行った。

B-4 自然免疫系 TLR を標的とした新規粘膜アジュバント開発に向けた検討:

自然免疫系の活性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た。

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-6、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。その結果、核に発現する I κ B 分子 I κ BNS が、正常マウスの細胞に選択的に発現していることを見いだした。I κ BNS をマクロファージ系細胞株に発現させると、LPS 刺激による TNF- α 産生は抑制しないが、IL-6 産生を抑制することを見いだした。そこで、I κ BNS の生理機能を明らかにし、この個体レベルでの役割を明らかにするため、ノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析した。

さらに、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- κ 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況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 κ B 分子 I κ B ζ 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。

C. 研究結果

C-1 毒素由来粘膜アジュバント開発に向けた研究成果：

1) mCT の霊長類での粘膜アジュバント効果：無毒化変異型アジュバント (mCT) 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 (gp120) 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にも誘導されていた。さらに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-1_{LAI} 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。

2) mCT による病原細菌由来毒素抗原に対する粘膜アジュバント効果：mCT を粘膜アジュバントとして A 型ボツリヌス類毒素

(BoNT_{Toxoid/A}) と共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マウスに A 型ボツリヌス毒素(BoNT/A)を投与すると、十分な防御効果を確認することができた。

3) キメラ型(mCT-A/LT-B)の霊長類での検討に向けた基礎研究：カニクイサルの小腸を開き胃側から大腸にむけて粘膜面を精査していくと、回腸部に向けてパイエル板の頻度が高いことが明らかになった。さらに、実態顕微鏡下でパイエル板を同定し、分離することに成功し、現在各種細胞の分離法確立を進めている。さらに電顕法を駆使してパイエル板ドーム上皮細胞層における抗原取り込み細胞である M 細胞の同定にも成功している。さらにアデノイドの同定と分離についても手法を確立し、現在有効な細胞分離法の開発を進めている。

4) mCT の安全性に関する評価：ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性測定において 2 種の dmCT は共に活性が認められなかった。Y-1 細胞アッセイにおいては、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。マウス腸管ループ法では何れの dmCT も腸管への液の貯留を誘導しなかった。

acridinium-標識した dmCT を用いての中樞神経系への取込みと蓄積の評価においては、経鼻免疫により 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。

5) dmCT の経鼻アジュバント活性：経鼻免疫したマウスにおける血漿中 OVA-特異的抗体応答を測定した結果、dmCT は共に nCT と同程度の高い OVA-特異的 IgG 応答を誘導した。血漿 OVA-特異的 IgG サブクラスの解析では、dmCT E112K/KDGL は nCT 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、評価を行った鼻腔洗浄液、糞便抽出液、唾液の解析を行った全ての粘膜面において、dmCT は nCT と同程度の OVA-特異的 IgA を誘導した。

6) 経鼻免疫により誘導される抗原特異的 T 細胞性免疫応答の解析：dmCT は nCT に匹敵する高い細胞増殖活性を誘導した。さらに、脾臓と頸部リンパ節より調整した CD4⁺ T 細胞からの OVA-特異的サイトカイン産生は、Th2-type サイトカインの産生においては、両 dmCT で nCT と同程度であった。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- γ 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。次に、dmCT による抗原特異的細胞障害性 CD8⁺ T 細胞 (CTL) 活性の

誘導の誘導を調べた。dmCT E112K/KDGL は脾臓と頸部リンパ節で共に 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。

7) dmCT の経口アジュバント活性：経口免疫したマウスにおけ抗原特異的抗体応答を測定した結果、dmCT E112K/KDGL 群において有意な OVA-特異的血漿 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。

8) Ad2F を使った粘膜ワクチンデリバリー法の開発：アデノウイルス2ファイバー(Ad2F)タンパク C 末側をイースト発現系 (*Pichia pastosis*) に発現させた。さらに、in vivo と in vitro を使ったその抗原送達能を検討する目的で Ad2F に蛍光色素遺伝子 (Red2 gene) を会合させたキメラ分子 Ad2-Red2 を構築し、その発現をタンパクレベルで確認した。さらに、呼吸器上皮細胞特異的に同キメラタンパクが結合することを確認した。つまり、上皮細胞株 (HeLa, 293A) には効率よく結合するが、線維芽系細胞株には全く結合しない。

C-2 キメラ型アジュバント大量産生系の確立：

2SLN 培地 2 L を用い、通気量と回転数は 1vvm, 200 rpm の条件で 32^h, 68 時間培養が最も生産性が高かった。培養液を、pH 8.0 に調整後、精密ろ過により除菌した。ろ過液を固定化 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。透析後、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、凍結乾燥した。試作品はいずれもエンドトキシン濃度が 200 EU/ml 以下で、315 mg の精製標品を供給した。

C-3 無毒化変異型・キメラ型を基盤としたペプチド型アジュバント開発研究 :

CHO 細胞アッセイにより各サブユニット分子の毒性を比較したところ、mCT、mCTA および CTB の毒性は検出限界以下であり、nCTA は nCT の 1/10⁴ 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。

nCT および mCT のホロ毒素およびサブユニット分子のアクリルアミドゲル電気泳動の結果、SDS-PAGE (還元条件) では nCT と mCT、あるいは nCTA と mCTA には全く違いは見られなかった。一方、native-PAGE では、nCT に比べ mCT が、また mCTA に比べ mCTA が、それぞれ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。

nCT と mCT の GM1 に対する結合能を GM1-ELISA により確認したところ、両者間に有意な差は見られず、コレラ菌、大腸菌、*B. chosinensis* 由来の CT とほぼ同じ結合能を示した。

OVA 抗原に対する各 CT 由来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、血清 IgG、鼻洗浄液 IgA とともに nCT 群および nCTA 群のみが高い抗 OVA 抗体価を示し、mCT 群および CTB 群が中等度、mCTA 群は OVA のみの群と同程度の低い抗体価を示した。糞便 IgA はいずれも検出限界以下であった。また mCTA/LTB のアジュバント活性を同じ OVA-マウス経鼻投与系で nCT、mCT および CTB と比較した結果、nCT に匹敵するアジュバント活性を示し、これは mCT 群および CTB 群より有意に高い (P<0.01) 値であった。

C-4 自然免疫系 TLR を標的とした新規粘膜アジュバント開発に向けた基礎研究 :

これまでに STAT3 をマクロファージで特異的に欠失させたマウスを作製し、STAT3 がマクロファージでの 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- α 産生を特異的に抑制していることを明らかにした。

さらに、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 κ B ファミリーに属する I κ 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 κ 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 κ BNS を発現した細胞では、NF- κ B の DNA 結合能に障害が認められた。さらに、I κ BNS は IL-6 プロモーターに p50 NF- κ 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 κ 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。

さらに、I κ BNS の生理機能を解析するため、I κ BNS ノックアウトマウスを作成した。I κ BNS ノックアウトマウスは正常に出生し、外見上異常は認めなかった。I κ BNS ノックアウトマウスより腹腔マクロファージを単離、あるいは骨髓由来樹状細胞を分化させ、TLR 刺激による TNF- α 、IL-6、IL-12 産生を解析した。その結果、I κ BNS ノックアウトマウスでは、TNF- α 産生に変化はないが、IL-6、IL-12 産生が有意に亢進していた。次にこれら遺伝子の mRNA の発現誘導を real time RT-PCR 法で解析した。TNF- α mRNA の誘導は刺激後 1 時間以内に認められるが、この誘導パターンには正常マウスと I κ BNS ノ

ックアウトマウス間で変化はなかった。IL-6 mRNA は刺激後 3 時間から誘導がみられるが、3 時間までは両マウス間で差はなかった。正常マウスでは 3 時間以降 mRNA の発現量は低下するが、I κ BNS ノックアウトマウスでは mRNA 量は高いままであった。他の遺伝子にも刺激後 1 時間以内の早期に誘導されてくる遺伝子(IL-1 β , IL-12p19 など)と遅れて時間以後に誘導される遺伝子(IL-12p40, IL-18 など)があるが、早期に誘導される遺伝子群の発現誘導パターンは両マウス間で差がないが、遅れて誘導されてくる遺伝子群は 5 時間以降 I κ BNS ノックアウトマウスで有意に発現が高かった。

次に、TLR 刺激によるまた TLR 刺激による NF- κ B の活性化をゲルシフト法、および NF- κ B p65 の細胞内局在により解析した。その結果、I κ BNS ノックアウトマウスでは NF- κ B の活性が遷延化し、刺激後 3 時間でもまだ NF- κ B の活性が残存していることが明らかになった。次に、TNF- α 、IL-6 プロモーターへの NF- κ B p65 の会合をクロマチン免疫沈降法で解析した。TNF- α プロモーターへの p65 の会合は刺激後 1 時間をピークに観察され、これは正常マウスと I κ BNS ノックアウトマウスの間で差は認められなかった。一方 IL-6 プロモーターへの p65 の会合は刺激後 3 時間をピークに正常マウスでは認められた。I κ BNS ノックアウトマウスでも 3 時間までは正常マウスと同様に p65 の会合が誘導されたが、3 時間以降正常マウスでは p65 の会合が減少していくのに対し、I κ BNS ノックアウトマウスでは持続したままであった。これらの結果から、I κ BNS は刺激後遅れて誘導されてくる遺伝子のプロモーターにおいて選択的に NF- κ B

の活性を抑制することにより、遺伝子発現を抑制していることが明らかになった。さらに個体レベルでも、LPS 投与によるエンドトキシンショックに対する感受性が高くなり、また dextran sodium sulfate の経口投与による腸管炎症に対する感受性も極めて高くなっていた。

MyD88 欠損マクロファージでは、TLR 刺激による NF- κ 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- κ 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、早期誘導型遺伝子のプロモーターへ

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、早期誘導型遺伝子のプロモーターは、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

D-1 毒素由来粘膜アジュバント開発に向けた研究の成果の検討と今後の展望：

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。そこで、ボツリヌス菌由来毒素に対する抗原特異的免疫応答誘導・増強効果を検討した。その評価系統として、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・飲料水介在型伝播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事が、本研究で開発されたボツリヌス毒素経口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。

第二世代粘膜アジュバントとして開発された

キメラ型(mCT-A/LT-B)について、その応用性を検討するために霊長類での腸管免疫機構ならびに呼吸器粘膜免疫機構の基礎的基盤形成を医薬基盤研究所霊長類医科学センターの協力を得て開始することが出来た。特に同キメラ型については経口アジュバントとしての有効性・安全性についても検討する為、腸管免疫機構の詳細な解明が必要である。そこで、小腸でのパイエル板の同定と分離法を確立することが出来た。さらに、パイエル板ドーム上皮細胞層に抗原取り込み細胞である M 細胞の存在を確認し、現在その細胞の分離・精製法の確立を目指している。つまり、M 細胞に特異的膜タンパクを同定し、標的分子として応用し、そこに我々が開発してきたキメラ型(mCT-A/LT-B)アジュバントを連結させた新規粘膜免疫誘導システムとしての応用性を視野に入れて研究を推進している。

経粘膜ワクチンは抗原と粘膜アジュバントの混合物を鼻から噴霧あるいは飲むだけで免疫応答を誘導でき、針を使用しないことから痛みを伴わず、投与する側にも安全なワクチンである。この粘膜ワクチン開発の鍵を握っているのが有効で安全な粘膜アジュバントの開発である。Native CT (nCT)やnative LTの強力な粘膜アジュバント効果は周知されているが、その強力な毒性故に臨床応用は困難である。また最近、マウスとサルを用いた実験においてnCT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報告されたことから、安全性が懸念されている。本研究では、nCT-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、2種類のdmCT、dmCT E112K/KDEVとdmCT E112K/KDGLを作成し、その有効性および安全性を評価した。

第一に安全性の評価においては、2種類のdmCTは既に安全な粘膜アジュバントとして我々が報告しているmCT E112Kと同レベルまで減毒されていた。特に、CTは消化管上皮細胞に作用して重篤な下痢を起こす毒素であるが、その下痢を実験的に再現したマウス腸管ループアッセイにおいて、液の貯留が全く認められなかった。dmCTをマウスに経鼻接種した際の脳神経系に対する取り込み・蓄積の検討では、細胞への吸着能力はいずれのdmCTでもCT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樞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。

次にdmCTの経鼻アジュバント活性を検討したところ、dmCTは共に非常に高い経鼻アジュバント活性を保持しており、nCTに匹敵するアジュバント活性を示した。そこで、抗原特異的CD4⁺T細胞応答を解析した結果、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、dmCT E112K/KDEVはmCT E112Kと同様Th2-有意な抗原特異的応答を誘導するのに対し、dmCT E112K/KDGLはnCTと同様Th1もTh2も共に強く誘導

することが示唆された。この結果は、血漿抗原特異的IgGサブクラス産生のパターンからも裏打ちされた。さらに、抗原特異的CD8⁺T細胞応答について解析した結果、dmCT E112K/KDGLはnCTと同等の抗原特異的CD8⁺CTL活性を示し、IFN- γ 産生抗原特異的CD8⁺T細胞の増加と相関していた。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思われる。

最後にdmCTの経口アジュバント活性を検討した。その結果、陽性コントロールのnCTよりは低いものの、dmCT E112K/KDGL投与群で有意な血漿中で抗原特異的IgMおよびIgG応答、そして糞便抽出液中で抗原特異的IgA応答を誘導することができ、さらに抗原特異的抗体産生細胞の解析において、腸管膜リンパ節、パイエル板、腸管粘膜固有層において抗原特異的IgA産生細胞が高頻度で検出されたことから、dmCT E112K/KDGLは有効な経口アジュバントになる可能性が示唆された。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分泌型IgA(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、コレラ等消化管を経由して感染する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。本研究を通じて、有用な粘膜アジュバントを開発できたことから、次世代粘膜ワクチンの成功に向け、臨床への応用を目指したいと考えている。

無毒化変異型 (mCT) やキメラ型 (mCT-A/LT-B) の粘膜アジュバント効果をさらに増強する事も踏まえて、アデノウイルスの気道上皮細胞指向性を使ってアデノウイルス2ファイバータンパク(Ad2F)粘膜抗原デリバリー法の開発を目指した研究も開始し、現在 Ad2F にワクチン抗原を発現させたキメラタンパクによる免疫誘導効果についても検討し、その有効性を示唆する知見を得ている。

D-2 実用化に向けたキメラ型アジュバント大量生産系確立について：

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 (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。

D-3 mCT と mCT-A/LT-B の研究成果に基づいたペプチド型アジュバント開発研究の今後について：

本研究開始以前のデータでは、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、また破傷風類毒素 (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から、OVA がキャリアーとなって nCTA の免疫細胞への供給を促進した可能性を示唆されていた。

CHO 細胞伸長試験による 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 細胞内にエントリーできないが、非常に高濃度になると偶発的にエントリーすることが出来、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た。マウス経鼻投与実験では、やはり mCTA はアジュバント活性を示さなかった。このことから、CTA に粘膜アジュバント活性を担う構造／配列的特徴があるという仮説は棄却せざるを得ない。むしろ nCTA にアジュバント活性があることから、CT のアジュバント活性は、毒性の本体である ADP-リボース転移酵素活性に大きく依存していることが強く示唆された。

一方、mCTA/LTB キメラ毒素は、nCT に匹敵する高いアジュバント活性を示し、それは mCT や CTB のアジュバント活性より有意に高かった。mCTA/LTB と mCT の違いは B サブユニットだけである。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。文

献的には、LTのアジュバント活性の方が強いという報告が多く、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。したかつて本結果は、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寄与する可能性を示唆する。

本研究以前の知見および本研究で得られた知見を総括すると、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・配列、の3つの要因が複合的に寄与しているという結論になる。アジュバントの実用化に際しては、毒性を利用することは出来ないため、後者2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。

D-4 自然免疫系 TLR を標的とした新規粘膜アジュバント開発に向けた基盤形成と展望 :

大腸粘膜固有層に局在する自然免疫担当細胞は、通常過剰な炎症反応を抑制するため、TLR刺激に不応答になっていること、そしてそのメカニズムの一端として、核に発現するIkBNSが、自然免疫系の細胞においてNF-kBの活性を抑制することにより、遅期誘導型の遺伝子発現を抑制し、個体レベルで炎症抑制に関与していることが明らかになった。

また、自然免疫系の細胞でTLR刺激によ

りNF-kB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

E-1 粘膜アジュバントとしての mCT, mCT-A/LT-B, dmCTの開発 :

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(mCT)をヒトに近い霊長類で試験し、その抗原特異的免疫増強効果を確認する事が出来た。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・飲料水介在型伝播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。

本研究計画を通して、第二世代粘膜アジュバントとして開発されたキメラ型(mCT-A/LT-B)について、そのヒトへの応用性を検討するために霊長類での腸管免疫機構ならびに呼吸器粘膜免疫機構の基礎的基盤形成を医薬基盤研究所霊長類医科学センターの協力を得て開始することが出来た。その成果をふまえてキメラ型(mCT-A/LT-B)ならびに改良型である二重変異型 (dmCT) についても霊長類での検討に向けた準備が進められている。また、新世代粘膜抗原デリバリー法開発の目的でアデノウイルス2ファイバータンパク(Ad2F)の有用性を強く示唆する基礎データを得ることが出来た。

中枢神経系への安全性を強化した mCT 開発を目的に、有効で安全なアジュバントとして既に報告している mCT E112K の A サブユニット COOH-末端小胞体残留シグナル KDEL に第2のアミノ酸置換を導入した二重変異型 dmCT E112K/KDEV と dmCT E112K/KDGL を作成した。そして、その有効性および安全性を評価した結果、dmCT E112K/KDGL は、経鼻および経口投与のための有効で安全な粘膜アジュバントになる可能性が示唆された。

E-2 実現化に向けたキメラ型アジュバントの大量産生系の確立：

キメラ型アジュバント (mCT-A/LT-B) の *Brevibacillus choshinensis* 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、実用レベルでの製造フローが構築できた。基礎研究や動物実験のため、キメラ分子試料を調製した。

E-3 無毒化変異型・キメラ型の基盤形成をもととしたペプチド型アジュバントの開発：

mCTA は本実験では全くアジュバント効果を発揮せず、CTA のペプチド配列がアジュバント活性を担うという仮説は棄却された。また nCTA は ADP-リボース転移酵素活性は有するが宿主細胞に結合する B サブユニットを持たないため、経鼻投与アジュバントの候補になり得る。mCTA/LTB は nCT と同程度の強いアジュバント活性を示し、mCT よりもすぐれたアジュバントと言える。CT (および LT) 由来分子のアジュバント活性は、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・配列、の3つの要因が複合的に関与していると考えられた。

E-4 自然免疫系 TLR を標的とした新規粘膜アジュバント開発に向けた基盤形成：

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 κ B 分子 I κ BNS が選択的に 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。自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- κ 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。ホロ毒素の構造・配列、の3つの要因が複合的に関与していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoshino N, Lu XS F, **Fujihashi K**, **Hagiwara Y**, Kataoka K, Lu D, Hirst L, Honda M, FW van Ginkel, **Takeda Y**, Miller CJ, **Kiyono H**, and McGhee JR. A novel adjuvant for mucosal immunity to HIV-1 gp120 in nonhuman primates. *J. Immunol.* 173 : 6850-6857. 2004.

Hino A, Kweon MN, **Fujihashi K**, McGhee JR, and **Kiyono H**. Pathological role of large intestinal IL-12p40 for the induction of Th2-type allergic diarrhea. *Am. J. Pathol.* 164 : 1327-1333. 2004.

Jang MH, Kweon MN, 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**. Intestinal Villous M Cells: A new antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Asso. Sci.* 101 : 110-6115. 2004.

Shikina T, Hiroi T, Iwatani K, Jan MH, Fukuyama S, Tamura M, Kubo T, Ishikaw H, and **Kiyono H**. 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. 2004.

Yamamoto M, Kweon MN, Rennert PD, Hiroi T, **Fujihashi K**, McGhee JR, and **Kiyono H**. Role of gut-associated lymphoreticular tissues in antige-specific intestinal IgA immunity. *J. Immunol.* 173 : 762-769. 2004.

Ohmura-Hoshino M, Yamamoto M, Yuki Y, Takeda Y, and **Kiyono H**. Non-toxic Stx derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for mucosal immunity. *Vaccine* 22 : 3751-3761. 2004.

Nochi T, Yuki Y, Terahara K, Hino A, Kunisawa J, Kweon MN, Yamaguchi T, and **Kiyono H**. Biological role of Ep-CAM in the physical interaction between epithelial cells and lymphocytes in intestinal epithelium. *Clin. Immunol.* 113 : 326-339. 2004.

Mizushima T, Ito T, Kishi D, Kai Y, Tamagawa H, Nezu R, **Kiyono H**, and Matsuda, H. Therapeutic effects of a new lymphocyte homing reagent FTY720 in interleukin -10 gene-deficient mice with colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 10 : 182-192. 2004.

Ueta M, Nochi T, Jang MH, Park EJ, Igarashi O, Hino A, Kawasaki S, Shikina T, Hiroi T, Kinoshita S, and **Kiyono H**. Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. *J. Immunol.* 173 :

3337-3347. 2004.

Kiyono H, and Fukuyama S. NALT-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. 2004. *Nature Rev. Immunol.* 4: 699-710. 2004.

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* O157:H7. *Infect. Immun.* 72 : 2240-2247. 2004.

Nusrin S, Khan GY, Bhuiyan NA, Ansaruzzaman M, Hossain MA, Safa A, Khan R, Faruque SM, Sack DA, **Hamabata T**, **Takeda Y**, and 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.

Tamura S, and Kurata T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *J. Infect. Dis.* 56 : 236-247. 2004.

Hokuno T, Ikegami M, Yoshida M, **Takeda K**, Akira S, Perl AT, Hull WM, and Whisett JA. Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia. *J. Clin. Invest.* 113 : 28-37. 2004.

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 Fermentas* induces apoptotic cell death after NK-kB activation. *Cell Microbiol.* 6 : 187-199. 2004.

Akazawa T, Masuda H, Saeki Y, Matsumoto M, **Takeda K**, Tsujimura K, Kuzushima K, Takahashi T, Asuma I, Akira S, Toyoshima K, and Seya, T. Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* 64 : 757-764. 2004.

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.

Inoue H, Ogawa W, Ozaki M, Haga S, Matsumoto M, Hashimoto N, Kido Y, Mori T, Sakaue H, Iguchi H, Hiramatsu R, Keroith D, **Takeda K.**, Akira S, and Kasuga M. Role of stat3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat. Med.* 10 : 168-174. 2004.

Liu B, Mori I, Hossain MJ, 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.

- Robben PM, Mordue DG, Truscott SM, **Takeda K**, Akira S, and Sibley LD. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J. Immunol.* 172 : 3686-3694. 2004.
- 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 kinase domain in death-associated protein kinase attenuates renal tubular cell apoptosis in chronic obstructive uropathy. *Int. J. Mol. Med.* 13 : 515-520. 2004.
- Weiss DS, Raupach B, **Takeda K**, Akira S, and Zychlinsky A. Toll-like receptor are temporally involved in host defense. *J. Immunol.* 72 : 4463-4469. 2004.
- Li Y, Ishii K, Hisaeda H, Hamano S, Shang M, Nakanishi K, Yoshimoto T, Henmi H, **Takeda K**, Akira S, Iwakura Y, and Himeno K. 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.
- Ikushima H, Nishida T, **Takeda K**, Ito T, Yasuda T, Yano M, Akira S, and Matsuda H. Expression of Toll-like receptor 2 and 4 is down-regulated after operation. *Surgery* 135 : 376-385. 2004.
- Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Miyagi K, Kinjo T, Yara S, Koguchi Y, Miyazono A, Shibuya K, Iwakura Y, **Takeda K**, Akira S, and Saito A. 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.
- Gorogawa S, Fujitani Y, Kaneto H, Hazama Y, Watada H, Miyamoto Y, **Takeda K**, Akira S, Magnuson MA, Yamasaki Y, Kajimoto Y, and Hori M. Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic beta-cell-specifics STAT3 knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319 : 1159-1170. 2004.
- 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 κ B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* 199 : 1641-1650. 2004.
- Kishino M, Yukawa K, Hoshino K, Kimura A, Shirasawa N, Otani H, Tanaka T, Owada-Makabe K, Tsubota Y, Maeda Y, Ichinose M, **Takeda K**, Akira S, and Mune M. 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.
- Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S,