

200829049A

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

有効かつ安全なインフルエンザ粘膜ワクチンの確立を目指した
新規アジュバントシステムの開発

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 角田 慎一

平成21年4月

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

有効かつ安全なインフルエンザ粘膜ワクチンの確立を目指した
新規アジュバントシステムの開発

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 角田 慎一

目次

- I. 総括研究報告
有効かつ安全なインフルエンザ粘膜ワクチンの確立を
目指した新規アジュバントシステムの開発 角田慎一1
- II. 分担研究報告
新規サイトカインアジュバントの開発 吉岡靖雄17
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表26
- IV. 研究成果の刊行物・別刷27

有効かつ安全なインフルエンザ粘膜ワクチンの確立を目指した 新規アジュバントシステムの開発

研究代表者 角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所
創薬プロテオミクスプロジェクト サブプロジェクトリーダー

研究要旨

本研究は、新型インフルエンザ等の新興・再興感染症に対する有効かつ安全な粘膜ワクチンの確立を目的に、独自の機能性サイトカイン創製技術を駆使することにより「宿主の粘膜面及び全身に抗原特異的な体液性・細胞性免疫を惹起できる機能性サイトカインアジュバントの創出」を図るものである。粘膜ワクチンは、1.全身で体液性・細胞性免疫が誘導できるのみならず、病原体侵入の場である粘膜面でも抗原特異的な体液性免疫(IgA 抗体産生)が誘導可能であり、2.段構えの防御網を構築できること、2.従来までのワクチンと異なり、吸う・飲むといった非侵襲的投与であって、注射による二次感染の危険性がないことなどから、先進国・発展途上国を問わず理想的な感染症の予防/治療法になり得る。しかし一方で粘膜ワクチンでは、一般的に抗原提示の効率が低いことから、抗原単独の投与では十分な免疫を誘導できないことが知られている。そこで本研究では、有効な粘膜ワクチンを開発するための基盤技術開発を目的に、各種サイトカインの粘膜ワクチンアジュバントとしての有用性を評価し、そのメカニズムを解析すること、さらに独自のサイトカイン改変技術を駆使することにより、粘膜ワクチン効果を安全かつ効率よく増強できる機能性サイトカインアジュバント創製を試み、最終的には、これらの技術により構築したアジュバントシステムについて、インフルエンザ感染・増殖の阻害効果を評価する計画である。

これらの目標に向けて、本年度は、経鼻粘膜ワクチンアジュバントとして有効なサイトカインの選択を目的に、TNFをモデルとして、高機能化サイトカイン創製法の確立、TNFスーパーファミリーサイトカイン、およびインターロイキンファミリーサイトカインからの有望なアジュバント候補のスクリーニング等を行った。

これらの研究は、新興再興感染症に対する有効な予防法の開発に寄与することで厚生労働行政に貢献するとともに、未だ不明な点が多い粘膜免疫システムに関する有用な知見を提供するものと期待できる。

研究代表者

角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロ
テオミクスプロジェクト

研究分担者

吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センタ
ー

A. 研究目的

近年、感染症に対する粘膜面での一次的防御(IgA 産生)、さらに全身での二次的防御(IgG 産生、CTL 誘導)

の両者を誘導可能な粘膜ワクチンに大きな期待が寄せられている。しかし、粘膜ワクチンは一般的に抗原提示の効率が低く、抗原単独の投与では十分な免疫を誘導することができない。従って、抗原特異的な粘膜免疫を効率よく誘導できる方法論の開発がキーポイントとなる。本観点から申請者は、独自の機能性サイトカイン変異体創製技術および抗体プロテオミクス技術を駆使することで、1.安全かつ効率的に免疫系を活性化しうる新規アジュバントの創製、2.抗原を粘膜リンパ組織へ効率よく抗原を送達し得る方法の開発を目指している。これま

で粘膜ワクチンアジュバントとしてコレラトキシン(CT)が世界的に有望視されてきたが、重篤な副作用を伴うことが明らかとなり、臨床応用も断念された。この点申請者らは、全身面・粘膜面での病原体特異的免疫誘導の根幹を担うサイトカイン TNF- α をアジュバントとして用いると、重篤な副作用なく、粘膜免疫を効率よく誘導可能であることを見出した。そこで本研究では、種々の TNF スーパーファミリー、およびインターロイキンファミリー分子の中から、粘膜ワクチンアジュバントとしての有用な分子を探索するとともに、粘膜免疫制御における機能を解析することを試みる。さらに、独自の機能性サイトカイン創製技術(Yamamoto et al. Nat. Biotechnol. 2004, Shibata et al. J. Biol. Chem. 2008)により、安定性や生物活性の向上など、より安全かつ効率的な粘膜ワクチン用の機能性サイトカインアジュバントが創製できるものと考えられる。これら技術を応用した新規粘膜アジュバントシステム構築を目指す。

B. 研究方法

1. ファージ表面提示法を用いたレセプターサブタイプ指向性 TNF 変異体の創製

TNF 変異体発現ファージライブラリの作製

PCRによって、TNF 中に6つのアミノ酸を NNS 配列に置換したライブラリを作製した。PCR 産物を PCR purification kit で精製することで、6 個のアミノ酸をコードする配列が NNS 配列に置換された TNF 構造変異体ライブラリ遺伝子を得た。この TNF 構造変異体ライブラリ遺伝子を HindIII および Not I で処理し、予め HindIII および Not I で処理したファージミドベクター pY03'-FLAG と T4 ligase を用いて 16°C、18 時間 ライゲーション反応を行った。得られた ライゲーション産物を PCR purification kit で精製した後、大腸菌の形質転換に用いた。

ファージライブラリの作製

大腸菌ライブラリを 50 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地で OD600=0.4 まで培養し、M13KO7 ヘルパーファージ (Invitrogen™ Life Technologies) を添

加した。110rpm 30 分間、250rpm 30 分間培養後、3,000rpm 10 分間遠心し、得られたペレットに 100 μ g/mL アンピシリン、50 μ g/mL カナマイシン (Sigma-Aldrich, Inc.) 含有 2YT 培地を添加し、6 時間培養することで、ファージを産出した。この TG1 培養液を氷冷し、12,000rpm 10 分間遠心した後、回収した上清に氷冷した PEG8,000 (和光純薬株式会社)、2.5M NaCl を 1/5 volume 加え、1 時間静置後、12,000rpm 15 分間遠心した。得られたファージペレットを NTE buffer (100mM NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA) に懸濁し、0.45 μ m のフィルターを通し、精製ファージライブラリ溶液とした。

タイターの測定

2%グルコース含有 2YT 培地で OD600 = 0.3 まで培養した TG1 に対して、10 倍希釈で段階希釈したファージ溶液を添加し、37°C 1 時間培養した。培養液の一部に 50 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、クローンディスクに播種し一晩培養した。各希釈段階でのコロニー数を計測することで、ファージタイターを算出した。

コンペティティブバインディングによる TNFR2 指向性 TNF 変異体の濃縮

TNF 変異体発現ファージライブラリ溶液をランニング緩衝液 HBS-EP (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20; GE Healthcare) で 1.0×10^{11} CFU/mL になるように希釈し、インプットライブラリとした。ファージ溶液 100 μ L に対して、種々濃度に調整したヒト TNFR1 Fc キメラ (hTNFR1:Fc; R&D systems) を 100 μ L 添加し、4°C で 2 時間反応させた。その後、各混合溶液を TNFR2:Fc を固相化したセンサーチップ CM3 (GE Healthcare) に流速 3 μ L/min で 100 μ L インジェクションした。リンスコマンドにより洗浄後、流速 20 μ L/min で 2 回再生液 20 μ L をインジェクションし、回収したファージ溶出液に 1mM Tris-HCl pH 8.0 を 40 μ L、2%グルコース含有 2YT 培地を 420 μ L 添加し、その 50 μ L を用いてタイターチェックを行った。残りのファージを再度 TG1 に感染させ、増幅させてプラスミ

ドを回収した。精製したプラスミドを TG1 ヘレクトロポレーションにより導入した後、ファージを産出し、再度同様のパンニング操作を行ったものを 2nd パンニングとした。

TNF 変異体を含む培養上清の作製

パンニングで溶出したファージを TG1 に感染させ、得られたコロニーを 96well plate に回収し、一晚培養した。2%グルコース、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン含有 2YT 培地 100 μL を新たに添加した plate に、一晚培養した培養液 10 μL を添加し OD600 = 0.4~0.5 まで培養した。3,000 rpm 20 分間遠心した後、上清を捨て 1mM IPTG、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン含有 2YT 培地 100 μL を添加し、37°C 8 時間培養した。再び 3,000 rpm 20 分間遠心し、上清を回収して ヒト TNFR1 およびヒト TNFR2 に対する結合力を ELISA にて検討した。

BIAcore を用いた各 TNF 変異体の各 TNF レセプターに対する結合力の測定

BIAcore biosensor (BIAcore 2000, GE Healthcare) を用いて各変異体の hTNFR1 および hTNFR2 に対する親和性を測定した。各 TNF サンプルは、タンパク質濃度として 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から、4.9 ng/mL にランニング緩衝液 HBS-EP で適宜希釈し、60 μL (3min) インジェクション後、180 秒ランニング緩衝液を流すことで結合反応と解離反応における相互作用を計測した。各速度パラメーターの算出は BIA evaluation 3.0 program を用いて行った。

TNFR1 を介した生物活性の評価 (HEp-2 細胞に対する細胞傷害性試験)

HEp-2 細胞は 10%ウシ胎児血清 (FCS) および抗生物質 (1% Antibiotic - Antimycotic (100 \times), liquid (GIBCO BRL)) を含む RPMI-1640 にて継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96well plate に 4×10^4 cells の HEp-2 細胞を播種し、37°C、飽蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 2 時間培養を行った後、予め、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ シクロヘキシミド含有 10% FCS-RPMI にて段階希釈したサンプル 100 μL を加え

た。18 時間培養を行った後、25%グルタルアルデヒドにて細胞を固定した。洗浄後 0.05%メチレンブルー溶液で細胞を染色し、plate を洗浄・風乾した後、0.3 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度 (測定波長 655 nm、対照波長 415 nm) を測定し、比活性を評価した。標準品には、recombinant human TNF (peprotech, Inc.) を用いた。

TNFR2 を介した生物活性の評価 (TNFR2/Fas preadipocyte に対する細胞傷害性試験)

TNFR2/Fas preadipocyte は、10%FCS、抗生物質および、Blasticidin HCl (Invitrogen, Inc.) を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む D-MEM (Sigma-Aldrich, Inc.) にて継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96well plate に 1.5×10^4 cells/50 μL の TNFR2/Fas preadipocyte を播種し、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ シクロヘキシミド含有培養液にて段階希釈したサンプルを 50 μL 添加した。37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 48 時間培養を行った後、生細胞数測定試薬 SF (Nacalai Tesque) 10 $\mu\text{L}/\text{well}$ を加え、37°C で 1 時間培養し、吸光度 (測定波長 450 nm、対照波長 650nm) を測定することで、細胞傷害活性を評価した。

2. アジュバント効果を有するサイトカインのスクリーニング

免疫方法

BALB/c マウス (6~8 週齢、雌性) に、TNF スーパーファミリーおよびインターロイキンファミリーのサイトカインあるいはコレラトキシン B サブユニット (CTB; List Biological Laboratories) をニワトリ卵白アルブミン (OVA)、あるいはリコンビナント HA 蛋白質 (H1N1 ニューカレドニア株; Protein Sciences, Meriden, CT) と混合して、非麻酔条件下で経鼻的に投与した。投与スケジュールは OVA については 1 週間間隔で 3 回、4 週間間隔で 2 回行った。

サンプルの回収

血清サンプルは、最終免疫から 1 週間後に眼底採血

を行い、11000 rpm、10分遠心操作を行うことにより回収した。唾液は、ピロカルピン塩酸塩(和光特級)をPBSに溶解して終濃度0.2 mg/mlとなるように調製し、BALB/cマウスに1ml/mouseで腹腔内投与を行うことで回収した。糞便を100 mg/mLとなるようにPBSを加え、4℃、2時間激しく攪拌し、得られた懸濁液を14000 rpm、4℃、20分遠心し、上清を回収して糞便抽出液とした。腫洗浄液は、マウス腹腔内を100 μL PBSで洗浄後、14000 rpm、20分、4℃遠心操作を行うことにより調製した。

HA特異的抗体産生能の評価(HA specific Ig ELISA)

リコンビナントHA(2 μg/mL, in 50 mM Bicarbonate Buffer)をELISAプレートに加え、4℃で一晩放置することで固相した。PBSで2倍希釈したBlock Aceでブロッキング(室温、1時間)した後、各濃度に調製したサンプルを加えてインキュベートした(室温、2時間; IgG、37℃、2時間; IgA)。これらのプレートを0.05% Tween含有PBS(PBST)あるいは、0.05% Tween含有TBS(TTBS)で洗浄後、各濃度に調製したHRP標識IgG抗体およびビオチン標識IgA抗体(Southern Biotech)を加えてインキュベートした(室温、2時間; IgG、37℃、2時間; IgA)。プレートを洗浄した後、1/2500に希釈したHRP標識ストレプトアビジン(ZyMed)を加え、さらに室温で1時間反応させた。再度、洗浄操作を行い最後に蒸留水で洗浄した後、TMBZ基質液を添加した。2N H₂SO₄を添加することにより発色反応を停止させ、吸光波長450 nm、副波長690 nmにおける吸光度を測定した。

2. TNF-K90R およびアデノウイルスベクターの有用性評価

免疫方法

BALB/cマウス(6~8週齢、雌性)への経鼻免疫は、サイトカインあるいはコレラトキシンBサブユニット(CT-B; List Biological Laboratories)をインフルエンザウイルス抗原HA(Protein science, 1 μg/mouse)と混合投与し、非麻酔条件下で行なった。尚、投与スケジュール

は4週間間隔で2回行った。

各サンプルの回収

最終免疫から2週間後に眼底採血を行い、11000 rpm、10分遠心操作を行うことにより血清を回収した。OVA特異的抗体産生能の評価(OVA specific Ig ELISA): OVA(10 μg/mL, in 50 mM Bicarbonate Buffer)をELISAプレートに加え、4℃で一晩放置することで固相した。PBSで2倍希釈したBlock Aceでブロッキング(室温、1時間)した後、各濃度に調製したサンプルを加えてインキュベートした(室温、2時間; IgG、37℃、2時間; IgA)。これらのプレートを0.05% Tween含有PBS(PBST)あるいは、0.05% Tween含有TBS(TTBS)で洗浄後、各濃度に調製したHRP標識IgG抗体およびビオチン標識IgA抗体(Southern Biotech)を加えてインキュベートした(室温、2時間; IgG、37℃、2時間; IgA)。プレートを洗浄した後、1/2500に希釈したHRP標識ストレプトアビジン(ZyMed)を加え、さらに室温で1時間反応させた。再度、洗浄操作を行い最後に蒸留水で洗浄した後、TMBZ基質液を添加した。2N H₂SO₄を添加することにより発色反応を停止させ、吸光波長450 nm、副波長690 nmにおける吸光度を測定した。尚、抗体価は非免疫マウスよりも吸光度が0.1以上高い最大希釈倍率をReciprocal Log₂ Titerで表した。

HA特異的抗体産生能の評価(HA specific Ig ELISA)

HA(2 μg/mL, in 50 mM Bicarbonate Buffer)をELISAプレートに加え、4℃で一晩放置することで固相した。PBSで2倍希釈したBlock Aceでブロッキング(室温、1時間)した後、各濃度に調製したサンプルを加えてインキュベートした(室温、2時間; IgG、37℃、2時間; IgA)。これらのプレートを0.05% Tween含有PBS(PBST)あるいは、0.05% Tween含有TBS(TTBS)で洗浄後、各濃度に調製したHRP標識IgG抗体およびビオチン標識IgA抗体(Southern Biotech)を加えてインキュベートした(室温、2時間; IgG、37℃、2時間; IgA)。プレートを洗浄した後、1/2500に希釈したHRP標識ストレプトアビジン(ZyMed)を加え、さらに室温で1時間反応させた。再度、洗浄操作を行い最後に蒸留水で洗浄

した後、TMBZ 基質液を添加した。2N H₂SO₄ を添加することにより発色反応を停止させ、吸光波長 450 nm、副波長 690 nm における吸光度を測定した。尚、抗体価は非免疫マウスよりも吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率を Reciprocal Log₂ Titer で表した。

ベクターの作製、精製、および力価測定

アデノウイルスベクター (Adv) は、水口らが開発した改良 *in vitro* ligation 法に準拠して作製した。本研究では、Cytomegalovirus プロモーター制御下にホタルルシフェラーゼを発現する Adv を構築した。作製した各種 Adv は、293 細胞を用いて増幅し、塩化セシウム密度勾配遠心法にて精製した。また、Adv 粒子数 (vector particle: VP) の測定は Maizel らの方法に準拠した。

活性基を有する Tat ペプチド、R8 ペプチドの合成と Tat-Adv、R8-Adv の作製

Tat ペプチド (GRKKRRQRRRPPQ)、R8 ペプチド (RRRRRRRR) に活性基を付与した Tat-NHS、R8-NHS を作製した。Adv の Tat、R8 ペプチド修飾は、Adv1 粒子あたりのカプシドタンパクに存在するリジン残基に対して 25 倍モル量に相当する Tat-NHS、R8-NHS を Adv 懸濁液 (final 2x10¹¹ VP/ml) と混合し、300 rpm で攪拌しながら 37°C で 45 分間反応させることにより行った。

Tat-Adv、R8-Adv の *in vitro* 遺伝子導入効率の評価

未修飾 Adv、Tat-Adv あるいは R8-Adv を 300~10000 VP/cell で用いて B16BL6 細胞、CT26 細胞、A549 細胞に遺伝子導入した。24 時間培養した後、これらの細胞における導入遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) の発現を指標に遺伝子導入効率を評価した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

1. ファージ表面提示法を用いたレセプターサブタイプ指向性 TNF 変異体の創製

最初に、有効なワクチンアジュバントとなりうるサイトカインを創製する目的で、レセプターサブタイプ指向性を有する構造変異サイトカインの簡便な創製技術の確立を試みた。構造変異 TNF 発現ファージライブラリの中から TNFR2 指向性 TNF 変異体をスクリーニングするため、コンペティティブパンニングを試みた。パンニング後に得られた個々のファージクローンから、可溶性 TNF をそれぞれ作製し、ヒト TNFR1 及びヒト TNFR2 に対する結合力を ELISA により評価した (図 1)。その結果、通常のパンニングでは TNFR2 だけでなく、TNFR1 にも強い親和性を示すクローンが数多く回収されていたのに対して、コンペティティブパンニングを行うことで、TNFR2 選択的に結合するクローンが効率良く濃縮されていることを確認した。特に黒色で示したクローンは、TNFR2 への結合親和性が wtTNF と比較して同程度であり、かつ TNFR1 への結合性が著しく低下しており、TNFR2 指向性が飛躍的に向上していた。以上の結果より、構造変異 TNF 発現ファージライブラリを最適条件で TNFR1:Fc と複合体形成させ、TNFR2 に対してコンペティティブパンニングを行うことで、ライブラリの中から効率良く TNFR1 へ強く結合するクローンを除くことができることが判明した。

スクリーニングにより最終的に得られた 8 種類の候補クローンのアミノ酸配列と各レセプターに対する結合力を表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance : SPR) にて評価した結果を表 1 に示した。TNFR1 に対する結合特性を比較すると、全ての変異体において解離定数 KD 値の大幅な増大が確認され、TNFR2 に対しては、wtTNF と同等以上の結合力を保持していることが判明した。また、いずれの変異体も R31、R32 が wtTNF と同じ配列であり、L29 も保存される傾向にあった。また非常に興味深いことに、A145、E146、S147 は、アスパラギン酸に富む配列を含む傾向にあった。以上の事実は、これらアミノ酸残基が TNFR1 への結合親和性低下のみならず、逆に TNFR2 への結合力維持・増強に重要であることを具体的に示したものである。

続いて、TNFR2 指向性変異体の候補タンパク質のヒト TNFR1 およびヒト TNFR2 を介した生物活性を HEP-2

細胞、TNFR2/Fas preadipocyte に対する細胞傷害性を指標に評価した(表2)。その結果、これら変異体はヒト TNFR1 を介した生物活性をほとんど示さなかったのに対して、ヒト TNFR2 を介した生物活性は wtTNF とほぼ同程度の活性を保持していることが判明した。中でもクローン R2-9 は、TNFR2 への作用選択性が wtTNF と比較して 18 万倍も増強しており、優れた TNFR2 指向性アゴニストであることが判明した。以上のように、ファージ表面提示法を有効活用することにより、レセプターサブタイプ指向性を有するサイトカイン構造変異体を創製しうることが明らかとなった。今後はワクチンアジュバントとして有効な種々の機能性サイトカイン創製を試みる予定である。

次に、粘膜アジュバントとして有効なサイトカインを見出すことを目的に、TNF スーパーファミリーサイトカインに焦点を絞り、粘膜免疫誘導能を有するサイトカインを探索した。16 種類の TNF スーパーファミリーサイトカインを各々 OVA と共に経鼻免疫することで、粘膜免疫誘導能に優れたサイトカインをスクリーニングした(図2)。血清中の OVA 特異的 IgG 量を ELISA により検討した結果、OVA 単独投与群では、全く抗体産生が認められないのに対し、ポジティブコントロールとして用いた CTB では高い抗体産生が認められた。一方、TNF スーパーファミリーサイトカインでは、OVA 単独投与群と比較して高い OVA 特異的 IgG 産生を示すサイトカインが見出された。また、鼻洗浄液を用いて鼻粘膜での IgA 産生を測定した結果においても、IgA 産生誘導を効率よく誘導しうるサイトカインが見出された(図3)。

一方、TNF 以外のサイトカインから粘膜アジュバントとして有効なサイトカインを見出すため、インターロイキンファミリーの、粘膜 IgA 抗体および細胞性免疫誘導特性を体系的に評価した。全部で 26 種類のリコンビナントインターロイキンを、HA と共に経鼻免疫し、血清中の HA 特異的 total IgG, IgG1, IgG2a subclass の誘導能を比較検討した。その結果、HA 単独投与群と比較して、全身面において、HA 特異的 IgG 産生を増強させるサイトカイン群を見出した。また、HA 特異的 IgG2a の効率の良い誘導が認められるサイトカイン群も見出し、これらサイトカインによる免疫誘導には、Th1 細胞が関与する

ことが示唆された。続いて、粘膜面における免疫誘導を、腸管、膈および口腔粘膜組織における、HA 特異的 IgA の産生を指標に検討した。その結果、ある種のサイトカイン投与群では、いずれの粘膜面においても、抗原特異的 IgA を効率良く誘導しており、ポジティブコントロールとして用いた CTB を上回る程、強力であった。以上の結果より、全身面における IgG 産生のみならず、粘膜面における IgA 誘導能を有するインターロイキンが存在し、粘膜アジュバントとしても有用性が示唆された。

2. TNF-K90R の粘膜アジュバント効果、およびアデノウイルスベクターの有用性評価

次に、我々がこれまでに独自の技術で創製してきた、高活性型 TNF 構造変異体 TNF である mTNF-K90R を用い、インフルエンザウイルス抗原に対する免疫誘導能を評価した。まず、mTNF-K90R を HA と共に経鼻免疫し、血清中の HA 特異的 IgG 誘導能を評価した。その結果、mTNF-K90R は HA 単独投与群と比較して、有意な HA 特異的 IgG 産生の増加がみられ、ポジティブコントロールとしての CT-B に匹敵する抗体産生能を有していた(図4)。次に、粘膜面における免疫誘導を、鼻粘膜組織および唾液中における、HA 特異的 IgA 産生を指標に検討した。その結果、mTNF-K90R は HA 単独投与群と比較して、HA 特異的 IgA 産生が有意に向上しており、CT-B と同等あるいはそれ以上の活性を有している可能性が示唆された(図5、6)。以上の結果から、mTNF-K90R はインフルエンザウイルスに対する有効な粘膜ワクチンアジュバントになり得る可能性が示唆された。

次に、将来的な粘膜ワクチンへの応用を念頭に、遺伝子導入効率に優れた Adv の創製を試みるとともに、その遺伝子導入メカニズムに関して検討した。まず、Adv 表面のペプチド結合部位(リジン残基)に対して 25 倍モル量の活性基付与型 Tat ペプチド、R8 ペプチドを混合することによって、ルシフェラーゼ遺伝子を発現する Tat-Adv、R8-Adv を作製した。これら Adv を用いて B16BL6 細胞、CT26 細胞、A549 細胞に遺伝子導入し、24 時間培養後のルシフェラーゼ発現レベルを指標に各ベクターの遺伝子導入活性を比較した(図7)。その結

果、CAR 低発現の B16BL6 細胞、CT26 細胞において、Tat-Adv、R8-Adv は未修飾 Adv と比較して 10-100 倍高い遺伝子導入を達成した。また、CAR 高発現の A549 細胞においては、Tat-Adv 及び R8-Adv は未修飾 Adv とほぼ同等の遺伝子発現活性を示した。

次に、Tat-Adv 及び R8-Adv の高い遺伝子導入効率に関して、そのメカニズムを検討した。一般に、Tat ペプチドや R8 ペプチドは、細胞表面のヘパラン硫酸などの負電荷を有する糖鎖に結合し、その後エンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスにより効率的に細胞内に取り込まれることが知られている。そこでまず、Tat-Adv 及び R8-Adv の遺伝子導入におけるマクロピノサイトーシスの関与を検討した。マクロピノサイトーシス阻害剤であるアミロライド存在下での遺伝子導入を検討した結果、未修飾 Adv では全く遺伝子導入の低下が観察されないのに対し、Tat-Adv 及び R8-Adv では有意な遺伝子導入効率の低下が認められた(図8)。以上の結果から、Tat-Adv 及び R8-Adv は、マクロピノサイトーシス依存的に細胞内に取り込まれることが示唆された。次に、ヘパラン硫酸と類似した構造を有するヘパリンと Adv を同時に作用されることで、遺伝子導入におけるヘパラン硫酸の関与について検討した。その結果、未修飾 Adv、R8-Adv では、ヘパリン共存下でも遺伝子導入効率が保持されたのに対して、Tat-Adv ではヘパリン濃度依存的に遺伝子導入効率の低下が観察された(図9)。すなわち、Tat-Adv と R8-Adv では、細胞表面への接着において異なるメカニズムを有することが示された。そこで、同様の方法を用いて、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 B、コンドロイチン硫酸 C の関与を検討した。その結果、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C では、未修飾 Adv、Tat-Adv、R8-Adv いずれも顕著な変化がみとめられないものの、コンドロイチン硫酸 B 共存下において、Tat-Adv、R8-Adv で遺伝子導入効率の低下が認められた(図10)。以上の結果より、R8-Adv の遺伝子導入メカニズムは未だ不明瞭なもの、Tat-Adv とは異なるメカニズムを有することが示された。

我々はこれまでに、TNF α 変異体である mTNF-K90R を粘膜ワクチンとして応用し、mTNF-K90R

が有効な粘膜ワクチンアジュバントとして利用できる可能性を示してきた。しかし一般に、用いる抗原の抗原性によりその免疫誘導特性は変化することが知られている。本研究で、mTNF-K90R がインフルエンザウイルス抗原に対しても、効率良く免疫誘導を示したことから、mTNF-K90R が感染症ワクチンとしても有望であることが示された。すでに、mTNF-K90R の経鼻投与において、鼻腔で顕著な副作用を誘発しないことは確認しており、今後霊長類などを用いた有効性評価を進める予定である。また、mTNF-K90R により誘導された抗体が、インフルエンザウイルスの感染に対して中和能を保有しているかについても詳細な検討が必要と考えられる。

近年、ワクチン素材として期待される Adv について、その感染域拡大を目指した結果、従来型 Adv では困難であった細胞にも効率的に遺伝子導入可能な Adv の創製に成功した。今後は、樹状細胞に対する遺伝子導入効率を検討するとともに、in vivo における粘膜免疫誘導能に関しても検討する必要がある。

E. 結論

本研究では、我々が開発してきた機能性蛋白質構造変異体創製技術を駆使することにより、レセプターサブタイプ指向性の TNF 変異体創製に成功した。また、TNF α 変異体 mTNF-K90R が、インフルエンザウイルスに対する粘膜ワクチンアジュバントになり得ることを示した。一方、TNF スーパーファミリーおよびインターロイキンファミリーサイトカインの中から、粘膜アジュバントとして有望なサイトカインを見出すことができた。更に、多様な細胞種に遺伝子導入可能なアデノウイルスベクターの創製に成功し、その遺伝子導入メカニズムを明らかとした。以上の成果は、粘膜ワクチンアジュバントシステムの開発に有用な情報を提供するものと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Abe Y., Nomura T., Mukai Y., Nakagawa S., Taniai M., Ohta T., Mayumi T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: The therapeutic effect of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF- α in murine hepatitis models. *Cytokine* 44: 229-233 (2008).
2. Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H., Nomura T., Minowa K., Kayamuro H., Katayama K., Miyoshi H., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity. *J. Immunol. Methods*. 335: 71-78 (2008).
3. Yoshioka Y., Asavatanabodee R., Eto Y., Watanabe H., Morishige T., Yao X., Kida S., Maeda M., Mukai Y., Mizuguchi H., Kawasaki K., Okada N., Nakagawa S. Tat conjugation of adenovirus vector broadens tropism and enhances transduction efficiency. *Life Sci*. 83: 747-755 (2008).
4. Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Taniai M., Ohta T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., *J. Mol. Biol.* 385: 1221-1229 (2009).
5. Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Taniai M., Ohta T., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y., Fast binding kinetics and conserved 3D structure underlie the antagonistic activity of mutant TNF: useful information for designing artificial proteo-antagonists. *J. Biochem.* (in press).

G-2 学会発表

1. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 形山和史, 鎌田春彦, 野村鉄也, 阿部康弘, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央: TNF スーパーファミリーに着目した粘膜ワクチンアジュバント能の体系的評価., 第 56 回 日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008 年 10 月.
2. 鎌田春彦, 萱室裕之, 吉岡靖雄, 形山和史, 廣井隆親, 阿部康弘, 角田慎一, 堤 康央: 活性増強

型 TNF・構造変異体の粘膜ワクチンアジュバントへの応用., 第 22 回 日本エイズ学会学術集会, 大阪, 2008 年 11 月.

3. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 形山和史, 鎌田春彦, 野村鉄也, 廣井隆親, 角田慎一, 堤康央: 活性増強型 TNF 変異体の粘膜ワクチンアジュバントへの応用., ファーマバイオフォーラム 2008, 東京, 2008 年 11 月.
4. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 形山和史, 鎌田春彦, 野村鉄也, 阿部康弘, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央: A bioactive mutant TNF (mTNF-K90R) elicited mucosal and systemic immunity against HIV-1 gp120 and influenza virus hemagglutinin., 第 38 回 日本免疫学会・学術集会, 京都, 2008 年 12 月.
5. 吉岡靖雄, 萱室裕之, 形山和史, 鎌田春彦, 野村鉄也, 阿部康弘, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央: Identification of new candidates as mucosal vaccine adjuvant in TNF superfamily cytokines., 第 38 回 日本免疫学会・学術集会, 京都, 2008 年 12 月.
6. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 形山和史, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央: 活性増強型 TNF 変異体の粘膜ワクチンアジュバントへの応用., 日本薬学会 第 129 年回, 京都, 2009 年 3 月.
7. Yoshioka Y, Asavatanabodee R, Eto Y, Watanabe H, Morishige T, Yao X, Kida S, Maeda M, Mukai Y, Mizuguchi H, Kawasaki K, Okada N, Nakagawa S. Tat conjugation of adenovirus vector broadens tropism and enhances transduction efficiency. *ASGT 11th Annual Meeting*. May, 2008. Boston.
8. Yoshioka Y, Shinsaku Nakagawa. Tat conjugation of adenovirus vector broadens tropism and enhances transduction efficiency. *6th Symposium on Membrane Stress Biotechnology*. September, 2008. Osaka.
9. Kayamuro H, Yoshioka Y, Katayama K, Kamada H, Nomura T, Abe Y, Hiroi T, Tsunoda S, Tsutsumi Y. MUTANT TNF ELICITS TH2-TYPE RESPONSES FOR ENHANCED MUCOSAL IMMUNITY. *7th Joint*

Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society., October, 2008. Montréal.

10. Yoshioka Y, Kayamuro H, Katayama K, Kamada H, Abe Y, Hiroi T, Tsunoda S, Tsutsumi Y. IDENTIFICATION OF NEW CANDIDATES AS MUCOSAL VACCINE ADJUVANT IN TNF SUPERFAMILY CYTOKINES. FIMSA 2008, October, 2008. Taipei.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許

角田慎一、堤 康央、吉岡靖雄、粘膜ワクチン用アジュバント、特願 2009-055953.

H-2 実用新案

該当なし

I. 研究協力者

阿部 康弘 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロジェクト

萱室 裕之 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロジェクト

野村 鉄也 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロジェクト

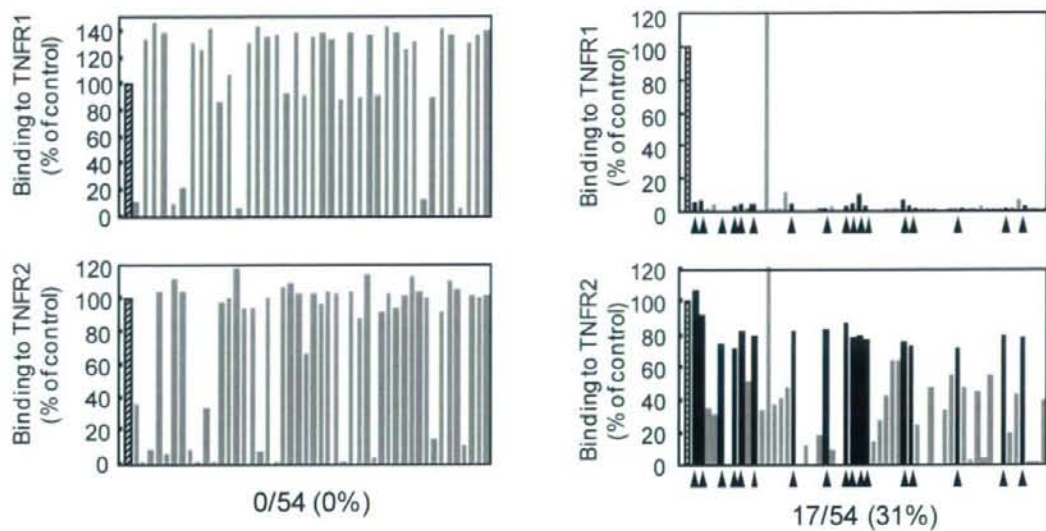


図1 ELISAによるTNFR2指向性TNF変異体のスクリーニング.

表1 TNFR2指向性変異体候補のアミノ酸配列と各TNFレセプターに対する結合特性の評価。

(A) TNFR1に対する結合特性

	Residue Position						$k_{on}^{1)}$ ($\times 10^6 M^{-1} s^{-1}$)	$k_{off}^{2)}$ ($\times 10^{-4} s^{-1}$)	$K_D^{3)}$ ($\times 10^{-10} M$)	Relative ⁴⁾ affinity (%)
	29	31	32	145	146	147				
wtTNF	L	R	R	A	E	S	0.45	1.3	2.9	100.0
R2-6	L	R	R	H	E	D	0.79	54.5	68.8	4.2
R2-7	L	R	R	T	S	D	1.19	50.1	42.3	6.9
R2-8	L	R	R	N	D	D	1.22	50.3	41.1	7.1
R2-9	V	R	R	D	D	D	0.44	116.0	262.0	1.1
R2-10	L	R	R	Q	D	D	0.67	43.9	63.7	4.6
R2-11	L	R	R	T	D	D	0.81	87.5	108.0	2.7
R2-12	L	R	R	D	G	D	1.36	98.8	72.6	4.0
R2-13	L	R	R	D	E	D	0.97	104.0	107.0	2.7

(B) TNFR2に対する結合特性

	Residue Position						$k_{on}^{1)}$ ($\times 10^6 M^{-1} s^{-1}$)	$k_{off}^{2)}$ ($\times 10^{-4} s^{-1}$)	$K_D^{3)}$ ($\times 10^{-10} M$)	Relative ⁴⁾ affinity (%)
	29	31	32	145	146	147				
wtTNF	L	R	R	A	E	S	1.98	12.1	6.11	100.0
R2-6	L	R	R	H	E	D	3.24	7.9	2.43	251.4
R2-7	L	R	R	T	S	D	3.83	12.6	3.30	185.2
R2-8	L	R	R	N	D	D	3.13	6.6	2.10	291.0
R2-9	V	R	R	D	D	D	2.06	7.4	3.60	169.7
R2-10	L	R	R	Q	D	D	2.22	5.3	2.41	253.5
R2-11	L	R	R	T	D	D	2.33	5.4	2.31	264.5
R2-12	L	R	R	D	G	D	4.06	10.6	2.60	235.0
R2-13	L	R	R	D	E	D	2.85	8.2	2.88	212.2

¹⁾ k_{on} : 結合速度定数 ²⁾ k_{off} : 解離速度定数 ³⁾ K_D : 解離平衡速度定数 ($K_D = k_{off} / k_{on}$)

⁴⁾ Relative affinity = K_D (wtTNF) / K_D (TNF variants) $\times 100$

表2 TNFR1およびTNFR2を介した生物活性の評価。

	HEp-2 Assay		TNFR2/Fas Assay		
	EC50 ¹⁾ (ng/ml)	Relative activity ²⁾	EC50 ¹⁾ (ng/ml)	Relative activity ²⁾	TNFR2/TNFR1 ³⁾
wtTNF	0.6	1.0	0.56	1.00	1.0
R2-6	8.1×10^3	7.3×10^{-5}	0.39	1.44	2.0×10^4
R2-7	2.1×10^3	2.8×10^{-4}	0.21	2.67	9.5×10^3
R2-8	4.6×10^3	1.2×10^{-4}	0.67	0.84	7.0×10^3
R2-9	$>1.0 \times 10^5$	$<6.0 \times 10^{-6}$	0.51	1.10	1.8×10^5
R2-10	1.1×10^4	5.4×10^{-5}	0.72	0.78	1.4×10^4
R2-11	6.7×10^4	8.9×10^{-6}	0.95	0.59	6.6×10^4
R2-12	2.6×10^4	2.2×10^{-5}	0.23	2.43	1.1×10^5
R2-13	$>1.0 \times 10^5$	$<6.0 \times 10^{-6}$	0.63	0.89	1.5×10^5

¹⁾ 50%効果濃度 (EC50) をロジスティック回帰法により算出した。

²⁾ Relative activities = EC50 (wtTNF) / EC50 (TNF variants).

³⁾ TNFR2-selectivities = Relative activity (via TNFR1) / Relative activity (via TNFR2).

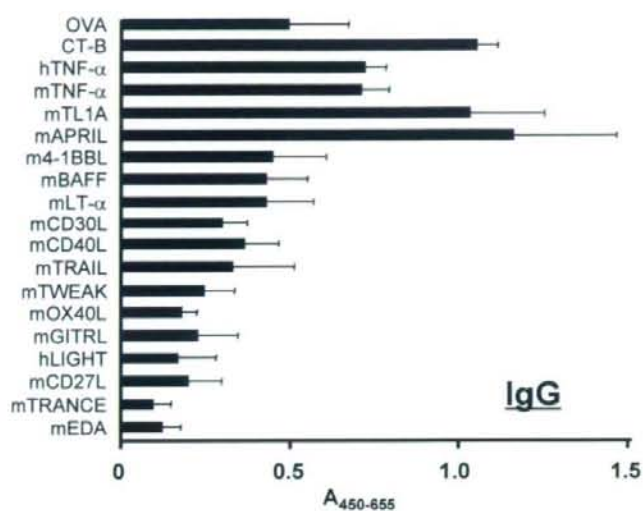


图2. Comparison of OVA-specific serum IgG Abs responses in mice immunized with TNFsf. BALB/c mice were immunized intranasally with 100 μ g OVA alone or in combination with 1 μ g TNFsf once per week for three consecutive weeks. Serum was collected on day 21 and analyzed by ELISA for OVA specific IgG Abs responses. Values represent the mean $OD_{450-655} \pm$ S.E. at a 1:50 dilution of seven mice for each groups.

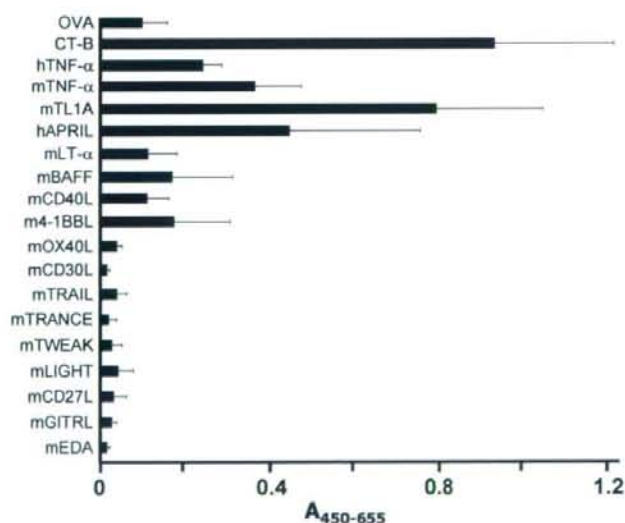


图3. Comparison of OVA-specific IgA Abs responses in nasal washes of mice immunized with TNFsf.

BALB/c mice were immunized intranasally with 100 μ g OVA alone or in combination with 1 μ g TNFsf once per week for three consecutive weeks. Nasal washes were collected on day 21 and analyzed by ELISA for OVA specific IgA Abs responses. The data represent the mean reciprocal titers and each points represents the mean \pm SE of seven mice for each groups.

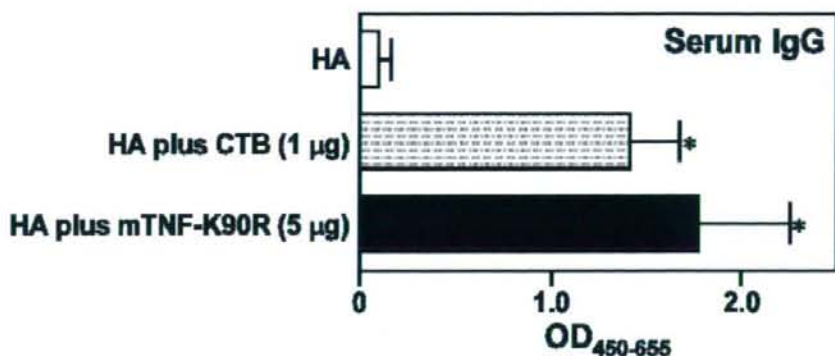


Figure 4. mTNF-K90R induced serum IgG responses against influenza virus HA in mice.

BALB/c mice were immunized intranasally with HA together with 1 µg CTB or 5 µg mTNF-K90R. One week after the last immunization, the levels of HA-specific IgG in serum at a 1:500 dilution was assessed by ELISA at a 1:8 dilution. Data represents the mean of absorbance 450 nm (reference wavelength, 655 nm). Data are presented as means ± SEM (n = 4-6; * P < 0.05 versus value for HA alone treated group by ANOVA).

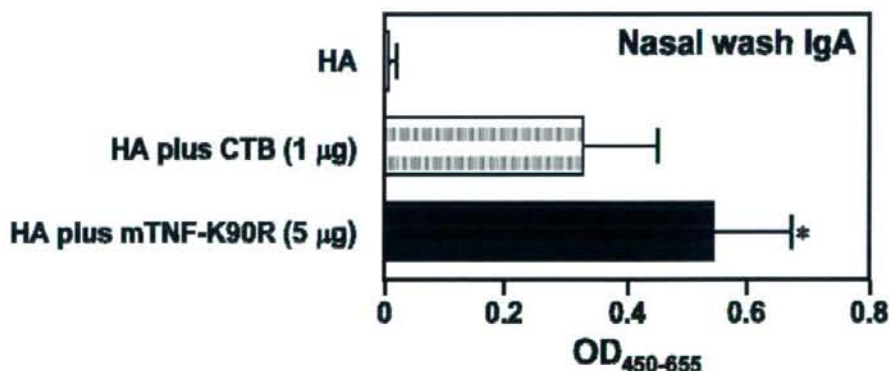


Figure 5. mTNF-K90R induced nasal IgA against influenza virus HA in mice.

BALB/c mice were immunized intranasally with HA together with 1 µg CTB or 5 µg mTNF-K90R. One week after the last immunization, the levels of HA-specific IgA in nasal at a 1:8 dilution were assessed by ELISA at a 1:8 dilution. Data represents the mean of absorbance 450 nm (reference wavelength, 655 nm). N.D.; not detected. Data are presented as means ± SEM (n = 4-6; * P < 0.05 versus value for HA alone treated group by ANOVA).

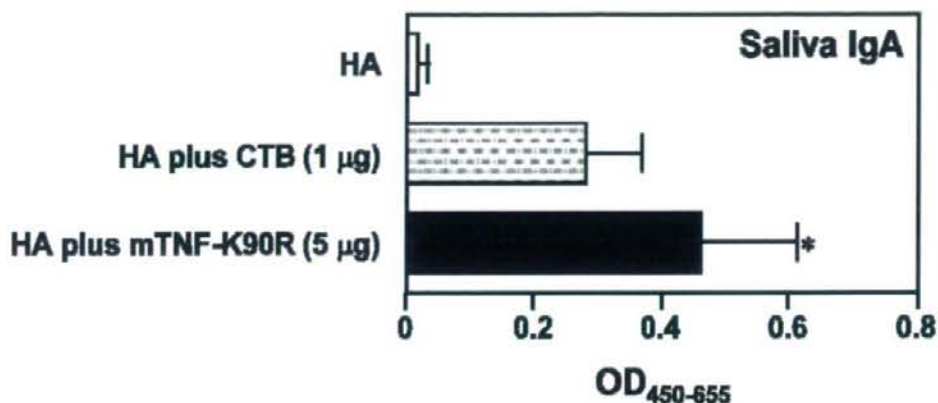


Fig. 6. mTNF-K90R induced saliva IgA against influenza virus HA in mice.

BALB/c mice were immunized intranasally with HA together with 1 µg CTB or 5 µg mTNF-K90R. One week after the last immunization, the levels of HA-specific IgA in saliva at a 1:8 dilution were assessed by ELISA at a 1:8 dilution. Data represents the mean of absorbance 450 nm (reference wavelength, 655 nm). N.D; not detected. Data are presented as means ± SEM (n = 4-6; * *P* < 0.05 versus value for HA alone treated group by ANOVA).

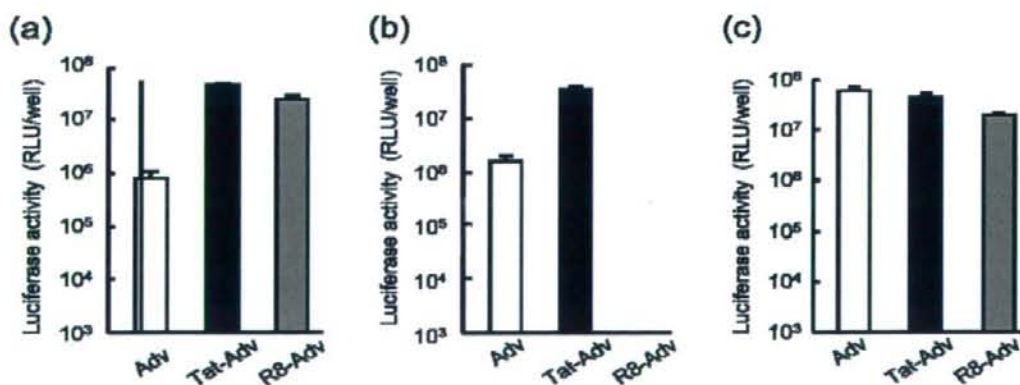


Fig. 7. Transduction efficiency of CPP-Advs with various modification ratios into (a) B16BL6, (b) CT26, and (c) A549 cells.

Cells (1×10^4) were transduced with 1×10^4 vp/cell of Tat-Adv, Pro-Adv, or R8-Adv encoding the luciferase gene. After 24 h of cultivation, luciferase expression was measured. Each bar represents the mean ± S.D. (n = 4). Each CPP-Adv was used at molar ratios of 1:25 (Adv lysine residue: CPP-NHS).

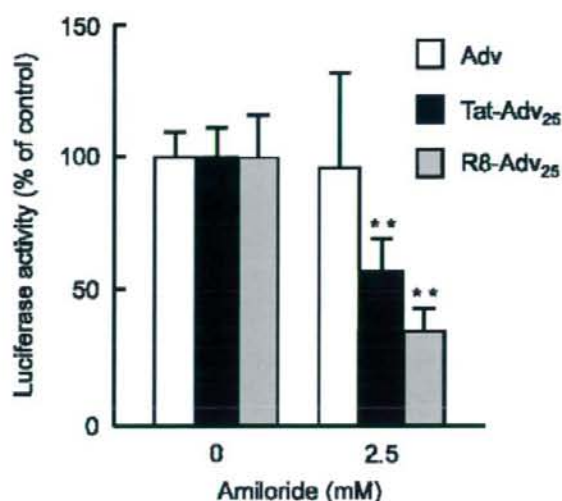


Figure 8. The cellular uptake of Tat-Adv and R8-Adv depends on macropinocytosis.

A549 cells (1×10^4 cells) were transduced with 1×10^4 vp/cell for each vector in the absence or presence of 2.5 mM amiloride. After 24 h of cultivation, luciferase expression was measured. Each bar represents the mean \pm S.D. ($n = 5$; ** $P < 0.01$ versus value for the absence of amiloride by Student's *t*-test)

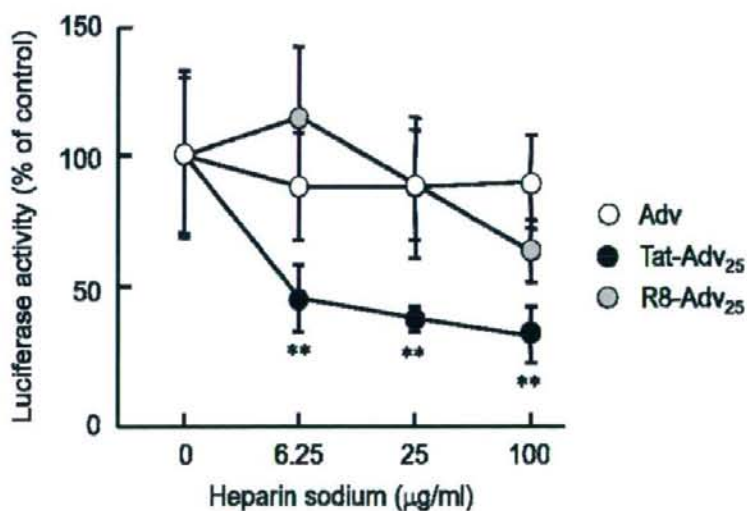


Figure 9. The cellular uptake of Tat-Adv and R8-Adv depends on heparan sulfate proteoglycans.

A549 cells (1×10^4 cells) were transduced with 1×10^4 vp/cell of each vector in the absence or presence of 6.25, 25, or 100 µg/ml of heparin sodium. After 24 h of cultivation, luciferase expression was measured. Each bar represents the mean \pm S.D. ($n = 5$; ** $P < 0.01$ versus value for absence of heparin sodium by ANOVA)

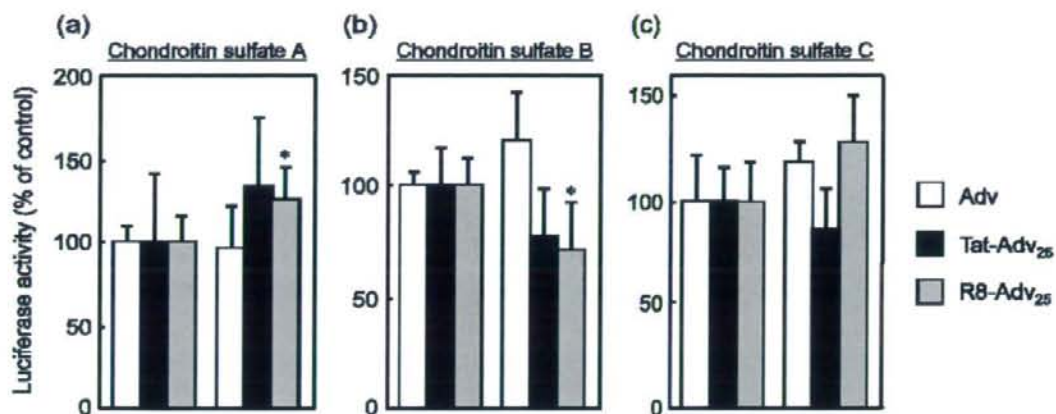


Figure 10. Cellular uptake of Tat-Adv and R8-Adv depends on chondroitin sulfate.

A549 cells (1×10^4) were transduced with 1×10^4 vp/cell of each vector in the absence or presence of 90 $\mu\text{g/ml}$ of (a) chondroitin sulfate-A, (b) chondroitin sulfate-B, or (c) chondroitin sulfate-C. After 2 h incubation, the cells were washed twice by PBS, and the virus solution was replaced with fresh medium. After 24 h cultivation, luciferase expression was measured. Each point represents the mean \pm S.D. (n = 5; * $P < 0.05$ versus value for the absence of chondroitin sulfate by Student's *t*-test)

新規サイトカインアジュバントの開発

分担研究者 吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任講師 (常勤)

研究要旨

インフルエンザウイルスは呼吸器粘膜面を介して感染することから、粘膜面での免疫応答を活性化することでウイルスの侵入を防御する方法論の開発が待望されている。本観点から経口・経鼻・経膈投与など経粘膜接種によるワクチン(粘膜ワクチン)は、抗原投与部位の粘膜面のみならず、遠隔の粘膜面、更には脾臓などの全身系免疫組織にも抗原特異的免疫応答が誘導可能なため、インフルエンザウイルス感染制御の点で理想的方法論として期待されている。現在、インフルエンザウイルスに対する粘膜ワクチンの最適化に向け、種々検討が行われているが、未だ良好な成果は得られていない。その最大の原因は、粘膜面における免疫反応(粘膜免疫)を効率良く誘導可能な安全性・有効性に優れた免疫活性化因子(粘膜ワクチンアジュバント)の開発の遅れにある。本研究では、安全性・有効性に優れた経粘膜投与型サイトカインを創製した上で、粘膜ワクチンアジュバントへ適用することで、インフルエンザウイルスに対する効果的な粘膜ワクチンシステム構築を試みる。更に、粘膜ワクチンへ適用可能な改変型アデノウイルスベクターの開発を試みる。本研究は、インフルエンザウイルスに対する効果的な粘膜ワクチン開発の最大の問題点を克服可能であると共に、他の多くの感染症に対しても有効なワクチン戦略を提供可能と考えられる。

A. 研究目的

呼吸器粘膜面を介して感染するインフルエンザウイルスの感染経路を考慮した場合、経口・経鼻・経膈投与など経粘膜接種によるワクチン(粘膜ワクチン)は、抗原投与部位の粘膜面のみならず、遠隔の粘膜面、更には脾臓などの全身系免疫組織にも抗原特異的免疫応答が誘導可能なため、インフルエンザウイルス感染制御の点で理想的方法として期待されている。しかし、抗原単独で経粘膜投与しただけでは、抗原性の低さなどから効率的に分泌型IgA抗体産生・細胞傷害性T細胞誘導をはじめとした粘膜免疫応答を誘導することが困難であり、粘膜免疫を強力に誘導することが可能な粘膜ワクチンアジュバントの開発が待望されている。これまで、コレラトキシンなどの細菌由来毒素が粘膜ワクチンアジュバントとして適用されてきたが、強い抗原性・毒性から、臨床応用は断念されている。

本観点から、強い免疫活性化能を持つサイトカインの、粘膜ワクチンアジュバントへの応用が期待されている。これまで、サイトカインのワクチンアジュバントとしての適用は、注射による方法で試みられ、そのアジュバント効果が認められてきた。しかし、サイトカインの粘膜ワクチンアジュバントへの適用は皆無であり、どのサイトカインが、ワクチンアジュバント効果を示すのかなど全く不明である。また一般にサイトカインは、経粘膜投与に伴う消化酵素・pH変化により瞬時に失活・分解するため、未だ有望な粘膜ワクチンアジュバントに成り得ていないのが現状である。我々はこれまで、約20種類程度のサイトカインから構成されるTNFスーパーファミリーサイトカインの、粘膜ワクチンアジュバントとしての有効性を包括的に評価し、腫瘍壊死因子(TNF α)が優れた粘膜ワクチンアジュバントになり得る可能性を示してきた。更に、独自のファージ表面提示法