

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

HIV に対する粘膜ワクチンの最適化に適う安全性・有効性
に優れた粘膜ワクチンアジュバントの開発
に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉岡 靖雄

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
HIV に対する粘膜ワクチンの最適化に適う安全性・有効性に優れた粘膜ワクチンアジュバントの開発に関する研究	1
吉岡 靖雄	
II. 分担研究報告	
1. 生体内安定性・比活性に優れたリジン欠損 TNF α 変異体の粘膜ワクチンアジュバントとしての機能評価に関する研究	13
形山 和史	
2. 粘膜ワクチンアジュバントの開発にむけた TNF スーパーファミリー分子のスクリーニング	18
鎌田 晴彦	
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

HIV に対する粘膜ワクチンの最適化に適う安全性・有効性に優れた粘膜 ワクチンアジュバントの開発に関する研究

研究代表者 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

多剤併用療法の確立は、HIV 感染者の劇的な死亡率低下をもたらし、エイズは“不治の病”から“制御可能な慢性感染症”へと変化した。しかし、HIV 感染者は日本を含め全世界的に増加の一途をたどっており、病態発症後の対処・治療戦略の最適化のみならず、HIV 根絶へのアプローチすなわち根本的予防法としてのワクチン開発が必要不可欠である。HIV 感染の大半は性行為によるものであり、生殖器などの粘膜面を介して感染する。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、HIV 感染制御の点で理想的方法として期待されている。現在、HIV 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、HIV に対する効果的な粘膜ワクチンシステム構築を図るものである。平成 20 年度には、①独自の “フェージ表面提示法による機能性人工蛋白質創製技術” を駆使することで創製した、生体内安定性・比活性に優れたリジン欠損腫瘍壊死因子 (TNF α) 変異体が、顕著な副作用無く、HIV 抗原特異的な粘膜免疫アジュバント能を発揮することを明らかとした。また、②TNF スーパーファミリーサイトカインをスクリーニングすることで、TL1A などが Th2 型サイトカインを強く誘導し、強い粘膜免疫誘導能を有することを見出した。更に、③IL-1 から IL-33 までのインターロイキンサイトカインをスクリーニングし、優れた粘膜ワクチンアジュバント能を有する 4 種類のサイトカインを新たに見出した。本研究は、HIV 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。

分担研究者

1. 鎌田 春彦・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・主任研究員
2. 形山 和史・財団法人東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所花粉症プロジェクト・研究員

A. 研究目的

エイズの治療に用いられている多剤併用療法は、エイズ発症の原因である HIV の感染そのものを防御するのではなく、また薬剤耐性・副作用・費用などの解決すべき問題が多数残されている。従って、エイズの克服に向けた最重要課題は、先進国・開発途上国を問わず HIV に対するワクチン開発に他ならない。泌尿生殖器など経粘膜的に感染する HIV 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、HIV 感染制御の点で理想的な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だけでは、抗原性の低さなどから、効率よく分泌型IgA抗体産生・細胞傷害性T細胞(CTL)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る。さらに、期待しない免疫応答であるアレルギー等を誘導する可能性も考えられることから、粘膜免疫を強力かつ適切に誘導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。本観点から、強い免疫活性化能を持ち、さらに生体の免疫反応を緻密に制御しているサイトカインを利用した、粘膜ワクチンアジュバントへの応用が試みられている。しかし、サイトカインは、経粘膜投与では瞬時に失活・分解してしまい、その結果として粘膜免疫誘導能が低下することから、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。我々は昨年度、これまでに創製してきた機能性腫瘍壊死因子（TNF α ）変異体 mTNF-K90R（プロテアーゼ抵抗性を有し、*in vitro* における比活性が野生型の 6 倍向上した TNF α 変異体）が、野生型と比較して優れた粘膜免疫誘導能を有することを明らかとした。本年度は、HIV 由来 gp120 を抗原として用い、mTNF-K90R の粘膜免疫誘導能を検討した。また、16 種類の TNF スーパーファミリーサイトカイン（TNFsf）をスクリーニングし、優れた粘膜免疫誘導能を有するサイトカインを探索した。更に、TNFsf 以外のサイトカインに関しても、粘膜免疫誘導能を評価することで、最適な粘膜ワクチンアジュバントの候補サイトカインの探索を試みた。

B. 研究方法

免疫方法①

BALB/c マウス（6～8 週齢、雌性）への経鼻免疫は、個々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(CT-B；List Biological Laboratories)を HIV 由来抗原 gp120 あるいはインフルエンザウイルス

由来抗原 HA と混合投与し行なった。尚、投与スケジュールは、gp120 では 1 週間間隔で 3 回行った。HA では 4 週間間隔で 2 回行った。

免疫方法②

BALB/c マウス（6～8 週齢、雌性）への経鼻免疫は、個々の TNFsf あるいは CT-B をニワトリ卵白アルブミン（OVA；SIGMA）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 1 週間間隔で 3 回行った。

サンプル回収

- 1) 血清サンプルの回収；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血清を回収した。
- 2) 鼻腔洗浄液の回収；マウス鼻腔内を 200 μ L PBS で洗浄後、14000 rpm、20 分、4 $^{\circ}$ C 遠心操作を行うことにより鼻腔洗浄液を調製した。
- 3) 膈洗浄液の回収；マウス膈腔内を 100 μ L PBS で洗浄後、14000 rpm、20 分、4 $^{\circ}$ C 遠心操作を行うことにより膈洗浄液を調製した。
- 4) 糞便抽出液の調製；100 mg/mL となるように PBS を加え、4 $^{\circ}$ C、2 時間激しく攪拌した。得られた懸濁液を 14000 rpm、4 $^{\circ}$ C、20 分遠心し、上清を回収して糞便抽出液を調製した。

抗原特異的抗体産生能の評価

抗原（in 50 mM Bicarbonate Buffer）を ELISA プレートに加え、4 $^{\circ}$ C で一晩放置し固相した。PBS で 2 倍希釈したブロックエースを室温で 1 時間反応させることでブロッキング後、各濃度に調製したサンプルを加えて反応させた（IgG；室温、2 時間、IgA；37 $^{\circ}$ C、2 時間）。これらのプレートを 0.05% Tween 含有 PBS あるいは、0.05% Tween 含有 TBS 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 抗体を加えて反応させた（IgG；室温、2 時間、IgA；37 $^{\circ}$ C、2 時間）。IgA の測定では、プレート洗浄後、1/2500 に希釈した HRP 標識ストレプトアビジンを加え、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、測定波長 450 nm、参考波長 690 nm における吸光度を測定した。

脾細胞の調製方法

最終免疫 7 日後のマウスから脾臓を無菌的に摘出した後、70 μm セルストレーナー上で細胞を分散させ、1500 rpm、5 min、4 °C の条件で遠心することで、細胞のペレットを回収した。回収したペレットを RPMI 1640 (10% FBS、50 μM 2-ME、抗生物質を含む) で洗浄操作を 1 回行った後、NH₄Cl 溶液で懸濁することにより赤血球を除去した。さらに遠心操作を行った後、RPMI 1640 (10% FCS、50 μM 2-ME、10 mL/L of a 100x non-essential amino acids solution、1 mM sodium pyruvate、10 mM HEPES) で懸濁し、脾細胞を調製した。

Bio-Plex Multiplex Cytokine assay

マウスから回収した脾細胞を 5 × 10⁶ cells/well で 24 well plate フィルタープレートに播種し、OVA 溶液を終濃度 1 mg/mL となるように添加し、37 °C で 72 時間培養した。Cytokine assay buffer を添加してフィルターを馴染ませた後、1 次抗体付きビーズ溶液および Cytokine assay buffer を添加した。その後、培養上清を添加し、300 rpm で攪拌しながら室温で 30 分インキュベートした。洗浄操作を 3 回行った後、detection antibody を添加し、300 rpm で攪拌しながら室温で 30 分インキュベートした。3 回洗浄操作を行った後、PE 標識 streptavidin を添加し、300 rpm で攪拌しながら室温で 10 分インキュベートした。3 回の洗浄操作を行った後、Cytokine assay buffer で beads を懸濁し、Bio-Plex system により、サイトカイン産生 (IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、GM-CSF、IFN-γ、TNF-α) を測定した。

IFN-γ ELISPOT assay

マウスから回収した脾細胞を 5 × 10⁶ cells/well で 96 well ELISPOT plate に播種し、OVA 溶液を終濃度 1 mg/mL となるように添加し、37 °C で 24 時間培養した。96 well ELISPOT plate に capture antibody

を添加して PVDF 膜に 4 °C で一晩固相化した。Capture antibody の除去後、blocking solution を添加して室温で 2 時間インキュベートした。さらに、OVA を最終濃度が 1 mg/mL となるように添加した後、脾細胞を 5 × 10⁶ cells/well となるように ELISPOT plate に添加した。37 °C で培養した後、脾細胞を除去し、蒸留水および PBST で洗浄操作を 2 回繰り返した。その後、Detection antibody および streptavidin-HRP を添加した後、substrate solution を添加して室温で 30 分インキュベートし、発色の程度をモニタリングした。蒸留水を加えることにより、発色反応を停止させ、室温で 2 時間から一晩かけて乾燥させた。スポット数の計測は、KS ELISPOT イメージングシステムを用いて行なった。

mTNF-K90R 投与部位の病理学的評価

BALB/c マウス (6~8 週齢、雌性) へ抗原と mTNF-K90R を投与した場合の安全性について投与後の病理学的な評価により検討した。短期的な影響については抗原と mTNF-K90R を単回投与した 2 週間後に組織切片を作成した。また、長期的な影響については、1 週間おきに 3 回投与し、最終免疫のさらに 1 週間後に組織切片を作成した。作成した組織切片は H&E 染色を行い、組織障害や局所炎症について評価した。

C. 研究結果

昨年度、これまでに創製してきた機能性 TNFα 変異体 mTNF-K90R (プロテアーゼ抵抗性を有し、in vitro における比活性が野生型の 6 倍向上した TNFα 変異体) が、野生型と比較して優れた粘膜免疫誘導能を有することを、モデル抗原 OVA を用いて明らかとした。そこで本年度は、HIV に対するワクチン開発を念頭に、HIV 由来抗原 gp120 を用い、mTNF-K90R の粘膜免疫誘導能を評価した (Fig. 1)。その結果、抗原単独投与群と比較して 5 μg mTNF-K90R を共存させた場合には全身面、粘膜面のいずれにおいても有意に高い gp120 抗原特異的 IgG、IgA 産生が誘導された。また、インフルエンザウイルス由来抗原 HA を用いた場合においても、HIV

抗原 gp120 の場合と同様に、mTNF-K90R の免疫賦活活性が確認された。これらの結果は、mTNF-K90R が抗原の種類を問わず粘膜免疫アジュバントとしての能力を発揮できること示している。

次に、mTNF-K90R の安全性について評価したところ、強い粘膜免疫賦活活性が確認された 5 μ g 投与のみならず、その 5 倍量の 25 μ g を投与した場合においても、投与部位である鼻腔粘膜面において目立った炎症像は確認されなかった (Fig. 2)。以上のことから、mTNF-K90R は優れた粘膜免疫賦活活性と安全性を有した優れた粘膜ワクチンアジュバントとなり得ること、そのアジュバント効果は種々のワクチン抗原に対しても有効である可能性が示された。

次に、生体防御に関わるサイトカインの中から、免疫活性化能に優れたサイトカインスーパーファミリーの一つである TNFsf に焦点を絞り、TNFsf の中から、粘膜ワクチンアジュバント活性に優れた分子をスクリーニングした。まず、現在市販されている 16 種類の TNFsf を、OVA と共に経鼻免疫し、全身面における免疫が誘導されるかどうかを、血清中の OVA 特異的 total IgG、IgG1、および IgG2a の誘導を指標に検討した (Fig. 3)。抗原特異的 total IgG の産生を測定した結果、TL1A は OVA 単独投与群と比較して、全身面において、有意な OVA 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。また IgG のサブクラスである、IgG1 の産生を検討した結果からも、TNF- α ならびに TL1A は有意に抗原特異的 IgG1 の産生を惹起していた。また、IgG2a の産生は、上昇傾向にはあるものの、有意な上昇は認められなかった。次に、粘膜面における免疫誘導を、腸管、膈および鼻粘膜組織における、OVA 特異的 IgA の産生を指標に検討した (Fig. 4)。その結果、いずれの粘膜面においても TL1A は抗原単独投与群と比較して、抗体産生能が有意に向上しており、特に鼻粘膜組織においては、タンパク量あたりに換算した CT-B (1 μ g 投与群) と同等の活性を有している可能性が示唆された。更に、免疫マウスから回収した脾細胞を用いて各種 TNFsf の免疫誘導特性を、サイトカインアレイ (Fig. 5, 6) および ELISPOT アッセイ

(Fig. 7) を用いて解析した。その結果、サイトカインアレイを用いた結果から、TL1A 投与群は、CT-B をアジュバントとして用いた群と比較し IL-2、IL-4、IL-5、および GM-CSF 産生を有意に促進し、特に IL-4、IL-5 などの Th2 型サイトカイン産生誘導を有意に増強する傾向にあることが明らかとなった。一方で、ELISPOT アッセイの結果から、IFN γ 産生脾細胞数は、TL1A をアジュバントとして用いた群では、上昇しておらず、むしろ TRAIL、TRANCE、TWEAK 等の TNFsf の方が産生細胞数の上昇を惹起する可能性が示唆された。これら ELISPOT アッセイの結果は、より詳細な検討を今後進める必要があると考えられる。

これまでの結果から、TNFsf サイトカインは、優れた抗原特異的抗体産生能を有するものの、抗原特異的抗体産生と抗原特異的 CTL を同時に誘導し得るサイトカインは無い可能性が強く示唆された。そこで、IL-1 から IL-33 までのインターロイキンサイトカインの中から、抗原特異的抗体産生能ならびに CTL 誘導能が共に優れたサイトカインをスクリーニングした。その結果、4 種類のサイトカイン (特許申請の都合上、ここでは X1、X2、Y、Z と記載する) が、これまでの mTNF-K90R や TNFsf と比較しても、格段に強い粘膜免疫誘導を有することを見出した。X1、X2、Y、Z をそれぞれ抗原と共に、経鼻投与した後、抗原特異的抗体産生を評価したところ、抗原単独投与群と比較して、X1、X2、Y、Z 併用投与群では、血清中の抗原特異的 IgG 産生の有意な増加が認められた (Fig. 8)。また、X1、X2、Y、Z 併用投与群では、投与部位である鼻腔洗浄液中の抗原特異的 IgA 産生も増加しており、遠隔の粘膜面である膈洗浄液、糞便抽出液中でも同様に、抗原特異的 IgA の産生が有意に増加していた (Fig. 9)。さらに、血清中の抗体サブクラスの解析から、X1、X2、Y、Z 併用投与群では IgG1、IgG2a 共に誘導されたことから、CTL も誘導されている可能性が示唆された (Fig. 8)。以上の結果から、X1、X2、Y、Z が、抗体産生のみならず CTL をも誘導する優れた粘膜ワクチンアジュバントに成り得る可能性が示された。

D. 考察

海外のワクチンメーカーが行った大腸菌易熱性毒素をアジュバントとする経鼻インフルエンザワクチンの臨床試験において、ワクチン接種後に顔面神経麻痺の発生が報告された。この報告等により、細菌毒素系のアジュバントの臨床応用は困難であるとの見解が強い。しかしながら多くの場合、抗原のみを経粘膜投与しても免疫応答は誘導されないことから、粘膜投与型ワクチンの開発には、より安全で効果的な粘膜ワクチンアジュバントの開発が不可欠となっている。野生型 TNF α を全身投与した場合には強い副作用が引き起こされるという事実から、mTNF-K90R を鼻粘膜に投与した場合にも、期待する粘膜ワクチンアジュバントとしての作用以外の副作用が出現することが懸念された。しかしながら本年度の研究結果から、mTNF-K90R が粘膜ワクチンアジュバントとしての活性を示す投与量の 5 倍量を投与した場合においても、投与部位における炎症等は全く観察されなかったことから、その有効性と安全性がマウスレベルで証明された。今後はさらに大型の実験動物（霊長類等）を使用することや、mTNF-K90R が粘膜ワクチンアジュバントとして作用するためのメカニズムを解明することで、臨床応用への可能性について検証していきたい。

これまで TNFsf は強い免疫誘導能を有することが知られており、CD40L、LIGHT、OX40L などは、注射によるワクチンにおいて強いアジュバント能を有することが知られている。しかし、種々 TNFsf を粘膜ワクチンアジュバントとして用い、その中から有効な TNFsf をスクリーニングした報告はこれまでにない。本研究では、現在市販されている TNFsf を粘膜ワクチンとして応用するため、16 種類の TNFsf の中から、有効な粘膜ワクチンアジュバントとして利用できる分子をスクリーニングした。その結果、TL1A が、粘膜ワクチンアジュバントとして、最も期待される分子の一つであることが示唆された。TL1A は、1997 年に同定され、T 細胞および B 細胞を除く、多くの細胞で発現していることが Northern Blot の結果から明らかになっている。TL1A は一方で、血管内皮細胞増殖抑制分子 (VEGI) と呼ばれ、

血管の増殖を阻害する分子としても知られている。TL1A の受容体は、Death Receptor-3 (DR3) および、Decoy receptor-3 (DCR3) が知られており、これらの受容体は、血漿中にも可溶性で存在する以外にも、DR3 は、脾臓、胸腺、および末梢血リンパ球、DCR3 は、胎児の肺、脳、肝臓、および成人脾臓、腸管、肺にもそれぞれ発現することが知られている。現在、この TL1A が誘導する強い粘膜ワクチンアジュバント効果に関して、受容体の発現パターンとそのシグナル伝達の面から解析しているところである。今後は、前年度の TNF リジン欠損体の持つワクチンアジュバントとしての有用性が明らかになっていることから、この TL1A に関して、リジン欠損体を作製し、その有用性を検討していくことで、より有効性に優れた TNF スーパーファミリーを利用した粘膜ワクチンアジュバント開発に有効活用できるものと期待される。

HIV に対する粘膜ワクチンアジュバント開発を考えた場合、粘膜面で IgA により HIV の侵入を抑え、万が一侵入した場合に粘膜面・全身面での CTL により感染細胞を排除するという戦略が理想である。しかし、我々のこれまでの検討から、mTNF-K90R や TNFsf では CTL を誘導し得るものは乏しいと考えられた。一方で、本検討から X1、X2、Y、Z は、mTNF-K90R や TNFsf よりも強い粘膜免疫誘導能を示すとともに、CTL をも誘導し得る可能性が示された。X1、X2、Y、Z は炎症性サイトカインとして知られていることから、安全性に関してより詳細な検討を来年度進める予定である。更に、これらサイトカインの粘膜免疫誘導能についても、詳細な検討を進める予定である。

E. 結論

・ mTNF-K90R が優れた粘膜ワクチンアジュバントとして働き得ることを明らかとした。また、mTNF-K90R を経鼻投与した場合の安全性について、マウスを使用した実験レベルで証明することが出来た。

・ 現在市販されている 16 種類の TNFsf の中から、粘膜ワクチンアジュバントとして最も有効であるこ

とが示唆される TL1A を見出し、その優れた粘膜ワクチンアジュバント効果を確認した。

・IL-1 から IL-33 をスクリーニングし、強い粘膜ワクチンアジュバント能を有する 4 種類のサイトカインを見出した。これらは、CTL をも誘導し得る可能性が見出された。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

①論文発表

1. Imai S., Mukai Y., Takeda T., Abe Y., Nagano K., **Kamada H.**, Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. The effect of protein properties on display efficiency using the M13 phage display system. *Pharmazie*. 63(10):760-764, 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(1-2):71-8, 2008.

②学会発表

国外

1. 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. 12-16 October, 2008, Montréal/Québec, CANADA.
2. **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. 17-20 October,

2008, Taipei, Taiwan.

国内

1. 渡辺 光, **吉岡靖雄**, 森重智弘, **鎌田春彦**, 向洋平, 角田慎一, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作. フェージ表面提示法を用いた活性増強型リンフォトキシンの創製とその特性評価. 第 8 回 日本蛋白質科学会年会, 2008 年 6 月, 東京.
2. 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, 2008 年 10 月, 岡山.
3. **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, 2008 年 11 月, 大阪.
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, 2008 年 12 月, 京都.
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, 2008 年 12 月, 京都.
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, 2009 年 3 月, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

該当事項無し

②実用新案登録

該当事項無し

③その他

該当事項無し

床医学総合研究所花粉症プロジェクト プロジェクト
トリーダー

1. 研究協力者

廣井 隆親；財団法人東京都医学研究機構東京都臨

萱室裕之 大阪大学大学院薬学研究科 医薬基盤化
学分野 博士後期課程 2年

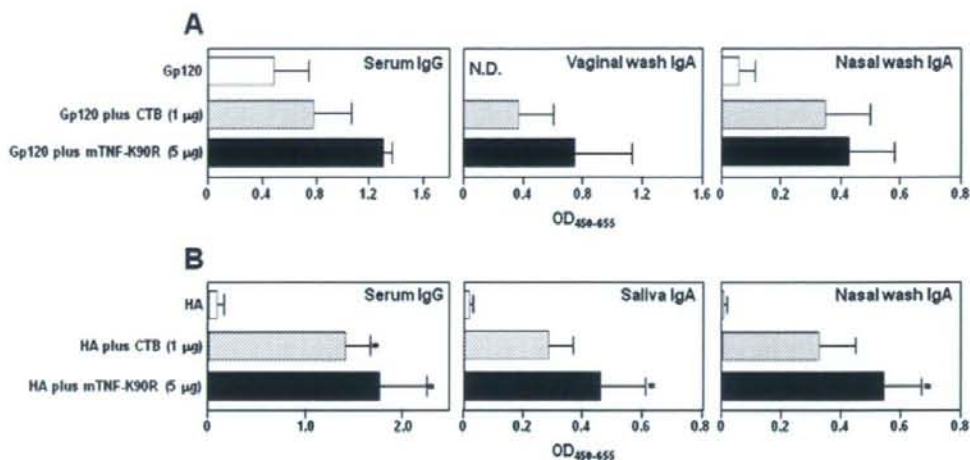


Figure 1. mTNF-K90R induced mucosal IgA and IgG responses against HIV-1 gp120 or influenza virus HA in mice. BALB/c mice were immunized intranasally with gp120 or HA together with 1 µg CTB or 5 µg mTNF-K90R. One week after the last immunization, (A) the levels of gp120-specific IgG in serum at a 1:100 dilution and IgA in nasal or vaginal wash at a 1:8 dilution, (B) HA-specific IgG in serum at a 1:500 dilution and IgA in nasal or 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).

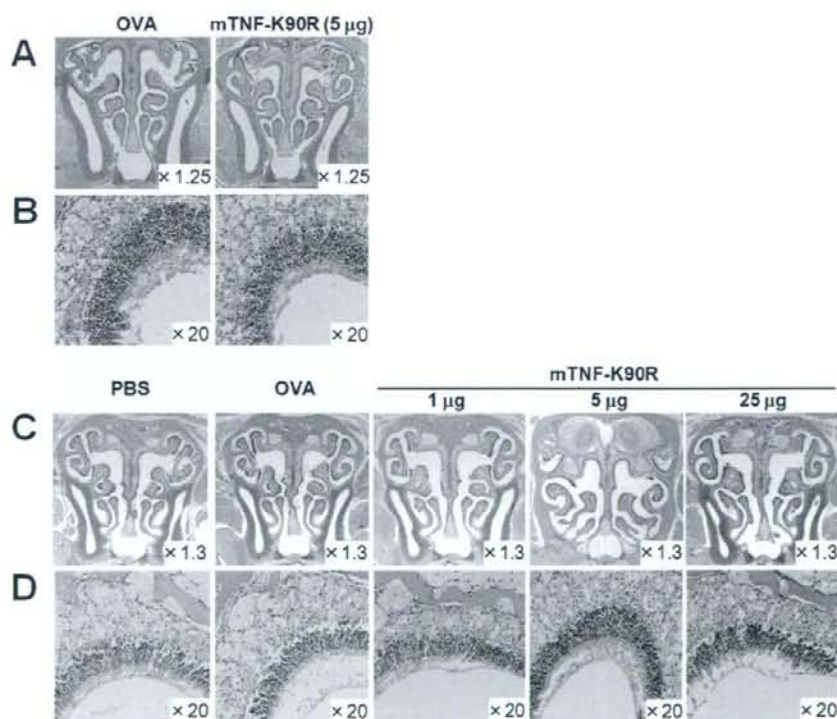


Figure 2. Histopathological analysis of nasal cavity treated with mTNF-K90R. Frontal cross-sections of the nasal cavity from mice, taken 2 h after administration (A, B) or one week after three times administration of PBS, OVA alone, and OVA together with 1 µg, 5 µg or 25 µg mTNF-K90R (C, D). An overall view of the nasal passage is shown in (A) and (C). The region of nasal olfactory epithelia is shown in (B) and (D). Sections were prepared and the tissues were stained with H&E to assess the degree of tissue injury and local inflammation.

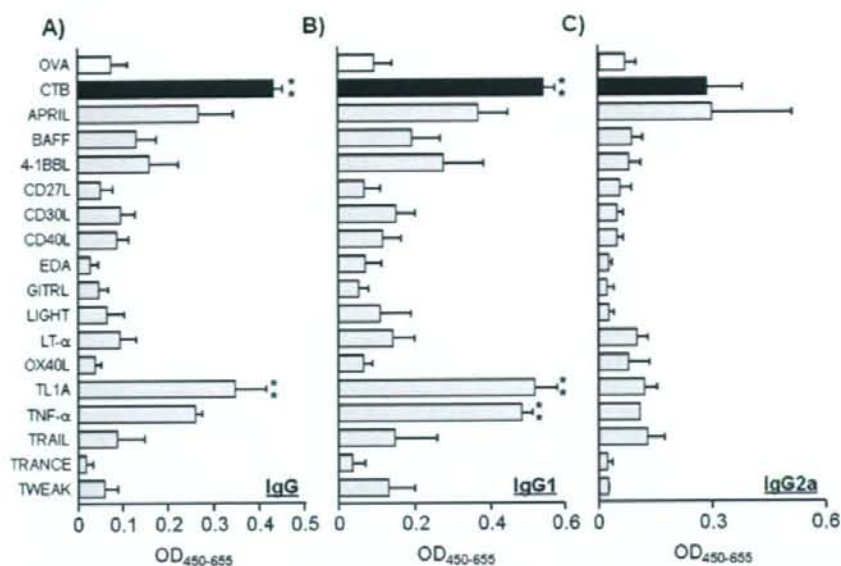


Figure 3. Serum OVA-specific IgG responses by nasal immunization with OVA plus TNF superfamily cytokines. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus CTB, or OVA plus each TNF superfamily cytokine three times at weekly intervals. Serum was collected 7 days after last immunization and analyzed by ELISA for OVA-specific (A) total IgG, (B) IgG1 and (C) IgG2a responses at a 500 fold dilution of serum. Data are presented as means \pm SEM (n = 5; ** P < 0.01 versus value for OVA alone treated group by ANOVA).

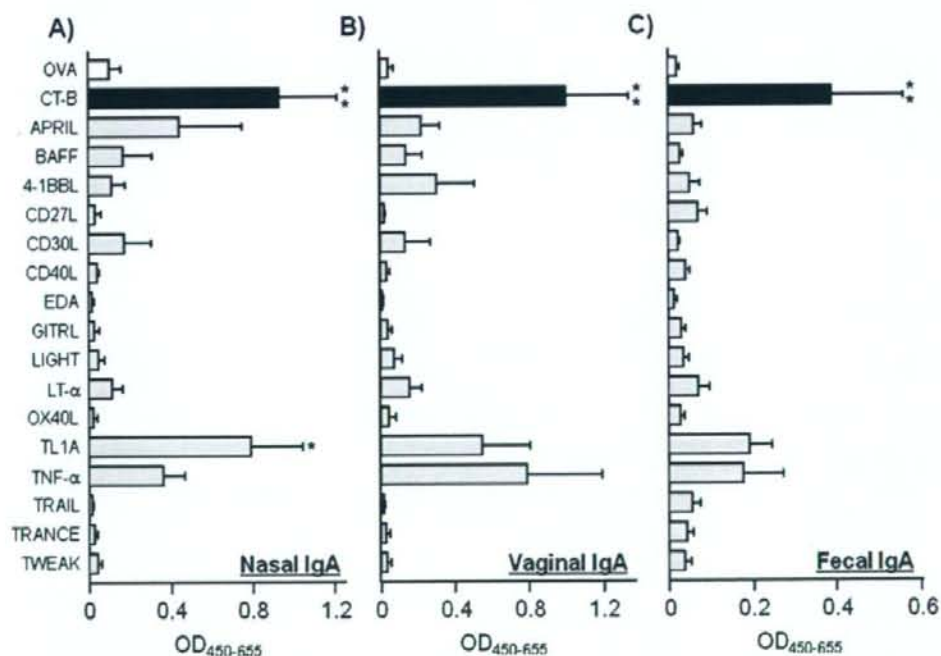


Figure 4. OVA-specific mucosal IgA responses by nasal immunization with OVA plus TNF superfamily cytokines. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus CTB, or OVA plus each TNF superfamily cytokines once a week three times at weekly intervals. Mucosal secretions was collected seven days after last immunization and OVA-specific IgA responses in (A) nasal wash, (B) vaginal wash and (C) fecal extract were determined by ELISA, respectively. Data are presented as means \pm SEM (n = 5; * P < 0.05, ** P < 0.01 versus value for OVA alone treated group by ANOVA).

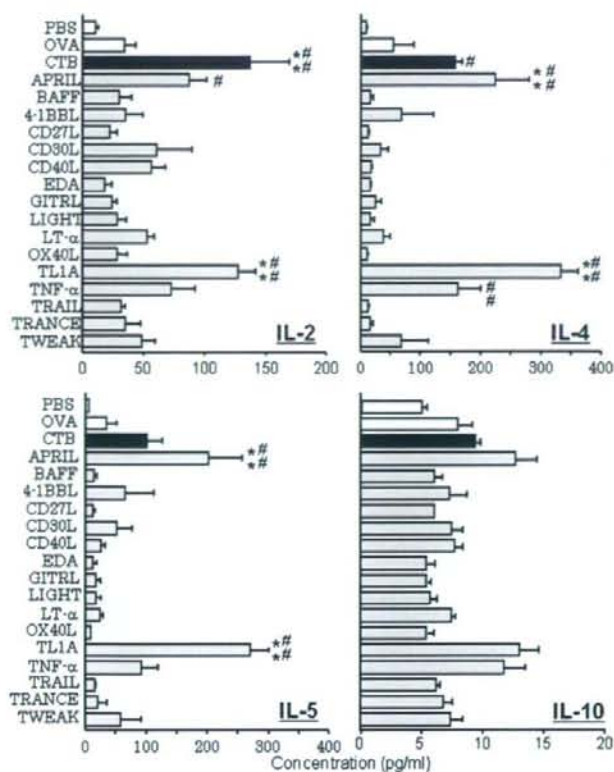


Figure 5. Cytokine responses induced by nasal immunization with OVA plus adjuvants. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus CTB, OVA plus each TNF superfamily cytokine three times at weekly intervals. Seven days after last immunization, splenocytes from each group were cultured with 1 mg/ml OVA. Culture supernatants were harvested following 3 days of incubation, and OVA-specific IL-2, IL-4, IL-5 and IL-10 productions in culture supernatant were analyzed by using the Bio-Plex Multiplex Cytokine Assay. Data are presented as means \pm SEM ($n = 4$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ versus value for PBS treated group by ANOVA; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus value for OVA alone treated group by ANOVA).

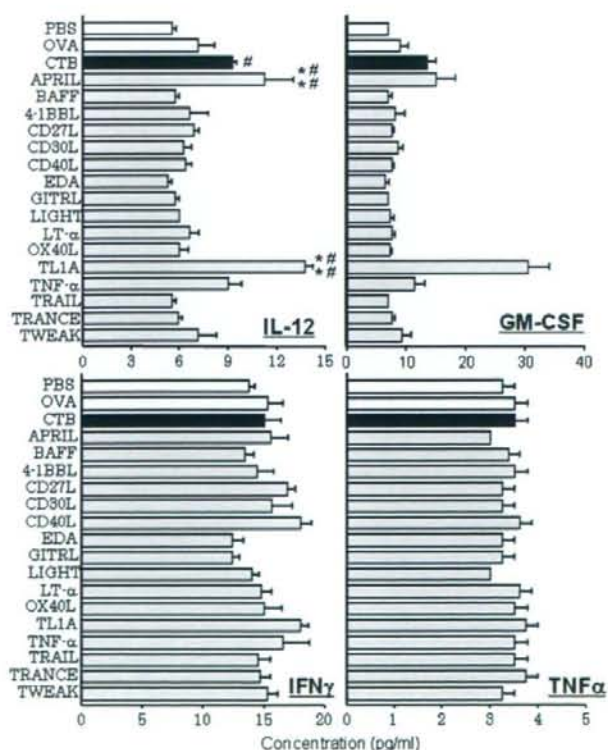


Figure 6. Cytokine responses induced by nasal immunization with OVA plus adjuvants. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus CTB, OVA plus each TNF superfamily cytokine three times at weekly intervals. Seven days after last immunization, splenocytes from each group were cultured with 1 mg/ml OVA. Culture supernatants were harvested following 3 days of incubation, and OVA-specific (A) IL-4, (B) IL-5, (C) IFN γ and (D) TNF- α productions in culture supernatant were analyzed by using the Bio-Plex Multiplex Cytokine Assay. Data are presented as means \pm SEM ($n = 4$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ versus value for PBS treated group by ANOVA; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus value for OVA alone treated group by ANOVA).

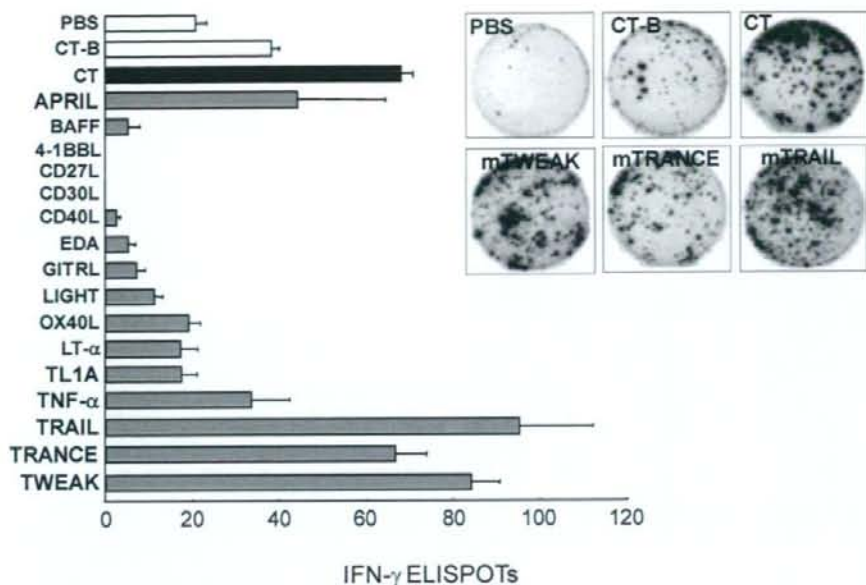


Figure 7. Analysis of OVA-specific cytokine-secreting cells in mice nasally immunized with OVA plus adjuvant. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus 1 μ g CTB, OVA plus 1 μ g TNF super family members once a week for three consecutive weeks. One week after the last immunization, splenocytes from each group were cultured with 1 mg/ml OVA. The numbers of IFN- γ -producing cells were examined by individual cytokine-specific ELISPOT assay. Data are presented as means \pm SEM.

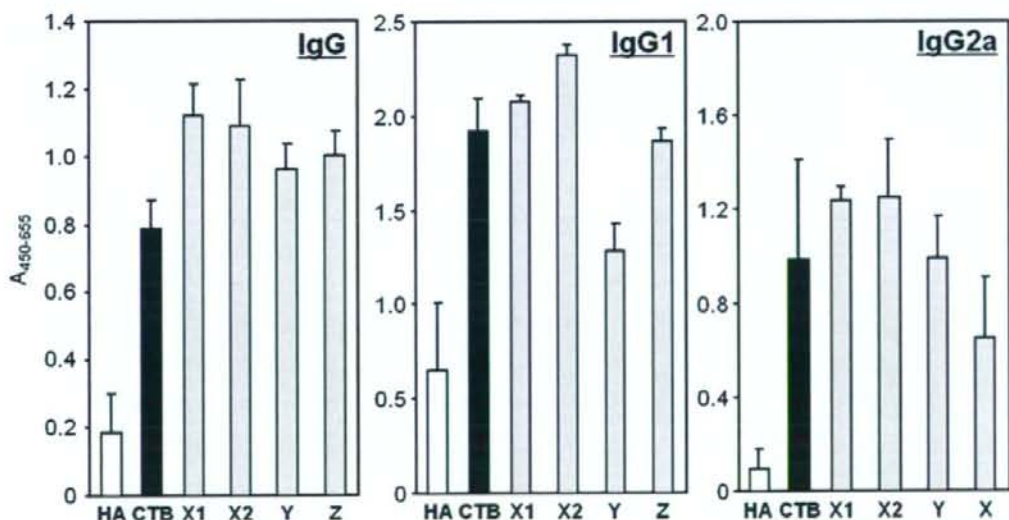


Figure 8. Serum OVA-specific IgG responses by nasal immunization with HA plus cytokines. BALB/c mice were intranasally immunized with HA alone, HA plus CTB, or OVA plus each cytokine two times at 4 week intervals. Serum was collected 7 days after last immunization and analyzed by ELISA for HA-specific (A) total IgG, (B) IgG1 and (C) IgG2a responses at a 500 fold dilution of serum. Data are presented as means \pm SEM (n = 5).

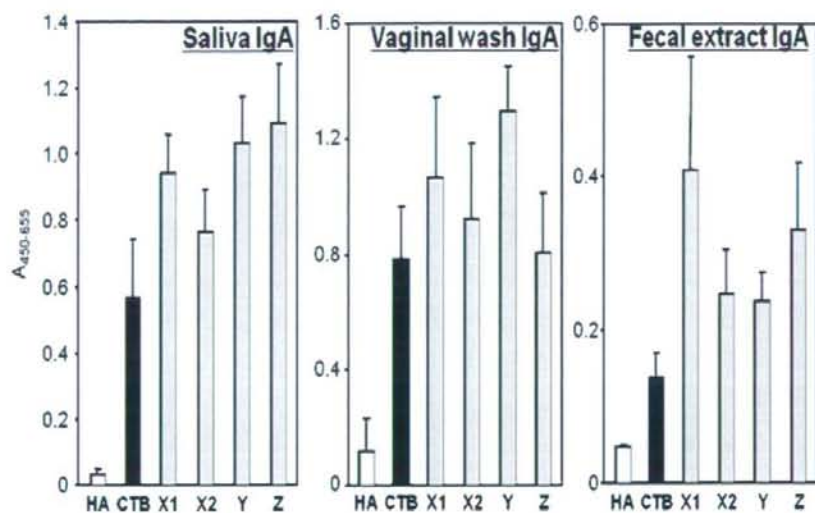


Figure 9. HA-specific mucosal IgA responses by nasal immunization with OVA plus cytokines. BALB/c mice were intranasally immunized with HA alone, HA plus CTB, or OVA plus each cytokine two times at 4 week intervals. Mucosal secretions was collected seven days after last immunization and OVA-specific IgA responses in (A) saliva, (B) vaginal wash and (C) fecal extract were determined by ELISA, respectively. Data are presented as means \pm SEM (n = 5).

生体内安定性・比活性に優れたリジン欠損 TNF α 変異体の粘膜ワクチン アジュバントとしての機能評価に関する研究

研究分担者 形山 和史 財団法人東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所花粉症プロジェクト 研究員

研究要旨

本研究では、HIV に対する効果的な粘膜ワクチン開発を最終目標に、安全性・有効性に優れた粘膜ワクチンアジュバントの開発を試みている。昨年度は共同研究者らによって創製された生体内安定性・比活性に優れたリジン欠損 TNF α 変異体が、野生型よりも優れた粘膜免疫アジュバント能を発揮することをモデル抗原 OVA を使用した実験により明らかとした。それらの結果を踏まえ本年度は、HIV 抗原 gp120 を用いた場合の mTNF-K90R の粘膜ワクチンアジュバント能を評価した。その結果、抗原単独投与と比較して mTNF-K90R を共存させた場合には、全身面、粘膜面のいずれにおいても有意に高い gp120 抗原特異的 IgG、IgA 産生が誘導された。また、インフルエンザウイルス由来抗原 HA を用いた場合においても、HIV 抗原 gp120 の場合と同様に mTNF-K90R の免疫賦活活性が確認された。これらの結果は、mTNF-K90R が抗原の種類を問わず粘膜免疫アジュバントとしての能力を発揮できることを示している。更に、mTNF-K90R の安全性について評価したところ、強い粘膜免疫賦活活性が確認された 5 μ g 投与のみならず、その 5 倍量の 25 μ g を投与した場合においても、全身ならびに投与部位である鼻腔粘膜面において目立った炎症像は確認されなかった。以上のことから、mTNF-K90R は優れた粘膜免疫賦活活性と安全性を有した優れた粘膜免疫アジュバントとなり得ること、そのアジュバント効果は種々のワクチン抗原に対して広く有効である可能性が示された。

A. 研究目的

独自のフェージ表面提示法を駆使することで作製してきた、*in vitro* における比活性・体内安定性が野生型と比較して数倍向上している TNF α 変異体 (mTNF-K90R) を利用し、サイトカインの粘膜ワクチンへの応用と、その有用性評価に関する基礎検討を行った。昨年度実施した研究において mTNF-K90R をモデル抗原 OVA と共に経鼻免疫した場合の粘膜免疫誘導能を評価したところ、mTNF-K90R 共存下では野生型 TNF α 共存下と比較して、全身面・粘膜面のいずれにおいても、有意に高い OVA 特異的抗体産生の増加が認められた。本年度は HIV に対するワクチン開発を念頭に、HIV 由来抗原 gp120 経鼻投与時に mTNF-K90R を共存させ

た場合の gp120 特異的粘膜免疫誘導能を評価した。また、インフルエンザウイルス由来抗原 HA と mTNF-K90R を共存させた場合の粘膜免疫誘導能についても評価することで、種々の抗原に対して適用することが出来る粘膜ワクチンアジュバントとしての可能性について評価した。更に、ヒトへの応用を念頭に、mTNF-K90R を過剰に経鼻投与した場合の局所および全身性の炎症反応を評価することで、その安全性について評価した。

B. 研究方法

免疫方法

BALB/c マウス (6~8 週齢、雌性) への経鼻免疫は、個々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(CT-B ; List Biological Laboratories)を HIV 由来抗原 gp120 あるいはインフルエンザウイルス由来抗原 HA と混合投与し行なった。尚、投与スケジュールは、gp120 では 1 週間間隔で 3 回行った。HA では 4 週間間隔で 2 回行った。

サンプル回収

- 1) 血清サンプルの回収 ; 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血清を回収した。
- 2) 鼻腔洗浄液の回収 ; マウス鼻腔内を 200 μ L PBS で洗浄後、14000 rpm、20 分、4 $^{\circ}$ C 遠心操作を行うことにより鼻腔洗浄液を調製した。
- 3) 膣洗浄液の回収 ; マウス膣腔内を 100 μ L PBS で洗浄後、14000 rpm、20 分、4 $^{\circ}$ C 遠心操作を行うことにより膣洗浄液を調製した。
- 4) 糞便抽出液の調製 ; 100 mg/mL となるように PBS を加え、4 $^{\circ}$ C、2 時間激しく攪拌した。得られた懸濁液を 14000 rpm、4 $^{\circ}$ C、20 分遠心し、上清を回収して糞便抽出液を調製した。

抗原特異的抗体産生能の評価

抗原 (in 50 mM Bicarbonate Buffer) を ELISA プレートに加え、4 $^{\circ}$ C で一晩放置し固相した。PBS で 2 倍希釈したブロックエースを室温で 1 時間反応させることでブロッキング後、各濃度に調製したサンプルを加えて反応させた (IgG; 室温、2 時間、IgA; 37 $^{\circ}$ C、2 時間)。これらのプレートを 0.05% Tween 含有 PBS あるいは、0.05% Tween 含有 TBS 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 抗体を加えて反応させた (IgG; 室温、2 時間、IgA; 37 $^{\circ}$ C、2 時間)。IgA の測定では、プレート洗浄後、1/2500 に希釈した HRP 標識ストレプトアビジンを加え、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 H_2SO_4 を添加することにより発色反応を停止させ、測定波長 450 nm、参考波長 690 nm における吸光度を測定した。

mTNF-K90R投与部位の病理学的評価

BALB/c マウス (6~8 週齢、雌性) へ抗原と mTNF-K90R を投与した場合の安全性について投与後の病理学的な評価により検討した。短期的な影響については抗原と mTNF-K90R を単回投与した 2 週間後に組織切片を作成した。また、長期的な影響については、1 週間おきに 3 回投与し、最終免疫のさらに 1 週間後に組織切片を作成した。作成した組織切片は H&E 染色を行い、組織障害や局所炎症について評価した。

C. 研究結果

HIV に対するワクチン開発を念頭に、HIV 由来抗原 gp120 を用い、mTNF-K90R の粘膜免疫誘導能を評価した (Fig. 1)。その結果、抗原単独投与群と比較して mTNF-K90R を共存させた場合には、全身面、粘膜面のいずれにおいても有意に高い gp120 抗原特異的 IgG、IgA 産生が誘導された。また、インフルエンザウイルス由来抗原 HA を用いた場合においても、HIV 抗原 gp120 の場合と同様に mTNF-K90R の免疫賦活活性が確認された (Fig. 1)。これらの結果は、mTNF-K90R が抗原の種類を問わず粘膜免疫アジュバントとしての能力を発揮できることを示している。

次に mTNF-K90R の安全性について評価したところ、強い粘膜免疫賦活活性が確認された 5 μ g 投与のみならず、その 5 倍量の 25 μ g を投与した場合においても、全身ならびに投与部位である鼻腔粘膜面において目立った炎症像は確認されなかった (Fig. 2)。以上のことから、mTNF-K90R は優れた粘膜免疫賦活活性と安全性を有した優れた粘膜ワクチンアジュバントとなり得ること、そのアジュバント効果は種々のワクチン抗原に対しても有効である可能性が示された。

D. 考察

海外のワクチンメーカーが行った大腸菌易熱性毒素をアジュバントとする経鼻インフルエンザワクチンの臨床治験において、ワクチン接種後に顔面神経麻痺の発生が報告された。この報告等により、細菌毒素系のアジュバントの臨床応用は困難であるとの

見解が強い。しかしながら多くの場合、抗原のみを経粘膜投与しても免疫応答は誘導されないことから、粘膜投与型ワクチンの開発にはより安全で効果的なアジュバントの開発が不可欠となっている。野生型 TNF α を全身に投与した場合には、強い副作用が引き起こされるという事実から、mTNF-K90Rを鼻粘膜に投与した場合にも期待する粘膜ワクチンアジュバントとしての作用以外の副作用が出現することが懸念された。しかしながら本年度の研究結果から、mTNF-K90Rが粘膜ワクチンアジュバントとしての活性を示す投与量の5倍量を投与した場合においても、投与部位における炎症像等は全く観察されなかったことから、その有効性と安全性がマウスレベルで証明された。今後はさらに大型の実験動物（霊長類等）を使用することや、mTNF-K90Rが粘膜ワクチンアジュバントとして作用するためのメカニズムを解明することで、臨床応用への可能性について検証していきたい。

E. 結論

本研究では、共同研究者らが独自のファージ表面提示法を駆使して作製した TNF α 変異体 (mTNF-K90R) が優れた粘膜ワクチンアジュバントとして働き得ることを明らかとした。また、mTNF-K90Rを経鼻投与した場合の安全性について、マウスを使用した実験レベルで証明することが出来た。

G. 研究発表

①論文発表

無し

②学会発表

国外

1. 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. 12-16 October, 2008, Montréal/Québec, CANADA.

2. 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. 17-20 October, 2008, Taipei, Taiwan.

国内

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, 2008年10月, 岡山.
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, 2008年11月, 大阪.
3. 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, 2008年12月, 京都.
4. 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, 2008年12月, 京都.
5. 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, 2009年3月, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

該当事項無し

②実用新案登録

該当事項無し

③その他

該当事項無し

1. 研究協力者

廣井 隆視；財団法人東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所花粉症プロジェクト プロジェクトリーダー

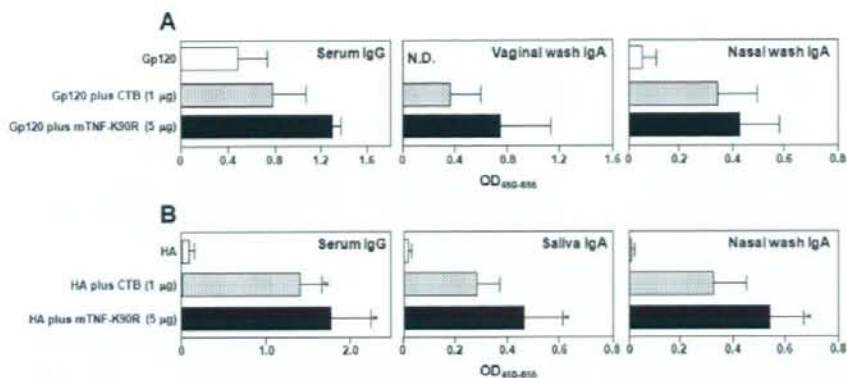


Fig 1. mTNF-K90R induced mucosal IgA and IgG responses against HIV-1 gp120 or influenza virus HA in mice. BALB/c mice were immunized intranasally with gp120 or HA together with 1 µg CTB or 5 µg mTNF-K90R. One week after the last immunization, (A) the levels of gp120-specific IgG in serum at a 1:100 dilution and IgA in nasal or vaginal wash at a 1:8 dilution, (B) HA-specific IgG in serum at a 1:500 dilution and IgA in nasal or 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).

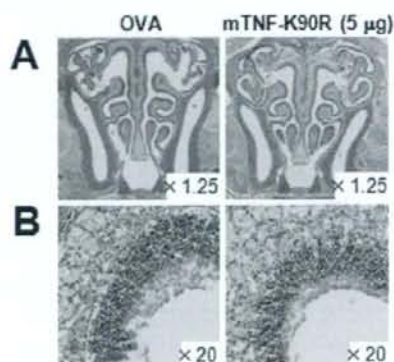
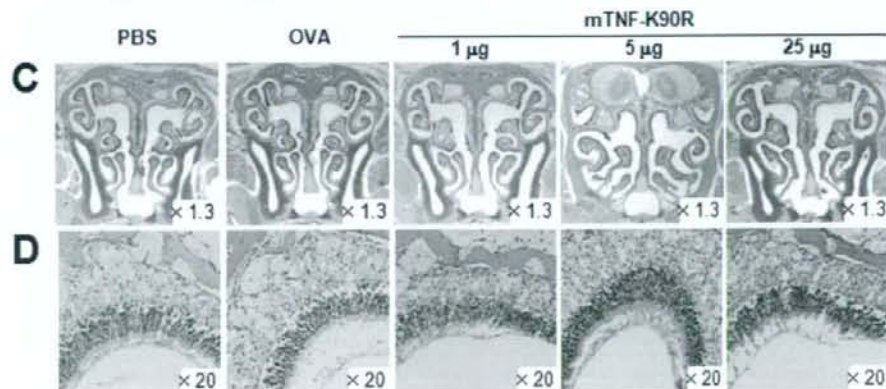


Fig 2. Histopathological analysis of nasal cavity treated with mTNF-K90R. Frontal cross-sections of the nasal cavity from mice, taken 2 h after administration (A, B) or one week after three times administration of PBS, OVA alone, and OVA together with 1 µg, 5 µg or 25 µg mTNF-K90R (C, D). An overall view of the nasal passage is shown in (A) and (C). The region of nasal olfactory epithelium is shown in (B) and (D). Sections were prepared and the tissues were stained with H&E to assess the degree of tissue injury and local inflammation.



粘膜ワクチンアジュバントの開発にむけた TNF スーパーファミリー分子のスクリーニング

研究分担者 鎌田 春彦 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 主任研究員

研究要旨

本研究は、HIV に対する効果的な粘膜ワクチン開発を目標に、生体防御に深く関与するサイトカインの中から粘膜ワクチンアジュバントとして有用な分子を見だし、それらを臨床応用可能な粘膜ワクチンアジュバントとして使用することを目的とする。本年度は、強い免疫活性化能を有することが知られている TNF スーパーファミリーに着目し、その中から粘膜ワクチンアジュバントとして有用な TNF スーパーファミリーをスクリーニングした。現在市販されている 16 種類の TNF スーパーファミリー分子を、OVA と共に経鼻免疫し、粘膜免疫誘導能を評価した結果、TL1A 等が抗原として用いた OVA 単独投与群と比較して、全身面、粘膜面のいずれにおいても、有意な OVA 特異的 IgG、IgA 産生を増加させた。更に、陽性コントロールとして用いたコレラトキシン B サブユニットと比較しても、ほぼ同等の免疫活性が認められた。次に、免疫マウスから回収した脾細胞を用いて上記 TNF スーパーファミリーの免疫誘導特性を解析した結果、IL-2、IL-4、IL-5、IL-12、GM-CSF 等のサイトカイン産生を有意に促進し、特に IL-4、IL-5 などの Th2 型サイトカイン産生は、コレラトキシン B サブユニットよりも有意に向上していることが明らかとなった。以上の結果から TNF スーパーファミリーは、これまでの粘膜ワクチンアジュバントと比較しても、高い免疫活性化能を有していることが明らかとなったことから、次年度、これらの病原性抗原に対する抗体産生能を比較することで、より有効性の高い粘膜ワクチンアジュバントとしての利用が期待される。

A. 研究目的

HIV は近年、多剤併用療法がその治療法として確立されつつあるものの、本治療法は、感染そのものを阻害するものではなく、また、長期投与に伴う薬剤耐性や費用、さらに副作用など解決すべき問題が山積している。従って、AIDS 治療における最も有効な手段は先進国・開発途上国を問わず HIV に対するワクチン開発に他ならない。従来までの注射によるワクチンは、血中抗体の産生などを誘導するものの、HIV 感染部位である粘膜面での免疫応答を誘導しない。従って、泌尿生殖器など経粘膜的に感染する HIV の感染経路を考慮した場合、粘膜面・全身面での 2 段階の防御が可能な粘膜ワクチンは効果的

な方法といえる。しかし、抗原単独で経粘膜投与しただけでは、タンパク質の分解性や粘膜固有層への免疫活性化能の弱さなどの問題から効率的に分泌型 IgA 抗体産生や細胞傷害性 T 細胞の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、粘膜免疫を強力に活性化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。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精力的に試みられており、その臨床応用への可能性が示唆されつつあるものの、未だ有望な粘膜ワクチンアジュバントは殆ど見出されていないのが現状である。

TNF スーパーファミリー (TNFsf) は、TNF 受容