

200931049A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・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21年度 総括研究報告書

研究代表者 角田 慎一

平成22年4月

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・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21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	15
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 段階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などから、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る。そして、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ことを目指す。

これらの目標に向けて、前年度までに、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 スーパーファミリーサイトカインを用いてアジュバント効果に基づいたスクリーニングを行い、TNF- α 、TL-A、APRIL 等が粘膜アジュバントとして有望であることを見出した。本年度は、IL-1 ファミリーサイトカインの粘膜アジュバント効果とその特性解析を実施し、IL-1 ファミリーサイトカインが顕著な粘膜アジュバント効果を有することを見出した。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でき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(TNFsf)、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。

前年度までに、TNFsf の粘膜アジュバント特性の評価を行った結果、TNFsf を経鼻ワクチンアジュバントとして用いた場合、Th2 応答を主体とする抗原特異的抗体の誘導を増強可能であることを明らかとしている。一方、ウイルス感染症を標的としたワクチン開発を考慮した際、上述の抗体は粘膜面で侵入してくるウイルスや細胞外に存在する遊離のウイルスには対応できるが、細胞内に感染しているウイルスに対して効果は期待出来ない。そのため抗体に加え、ウイルス感染細胞を排除する細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導が出来れば、ウイルス感染に対する防御網を何重にも構築することが可能となる。このような観点から、インターロイキンの粘膜アジュバントとしての可能性を考えた。しかし、インターロイキンの粘膜アジュバント活性化能を網羅的に比較解析した報告はなく、どのインターロイキンが抗原特異的抗体とCTLの両者を最も効率良く誘導するかに関しては不明である。そこで本研究では、26種類にも及ぶインターロイキンに関して、経鼻ワクチンアジュバントとして適用した場合における抗原特異的な免疫誘導特性を評価した。

B. 研究方法

B-1 インターロイキンの粘膜アジュバント活性評価 試薬

Recombinant mouse IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-27、IL-28A、IL-28B、IL-31、IL-33 は R&D Systems より、コレラトキシン CT は List Biological Laboratories より、インフルエンザ抗原 HA240-248 (IYSTVASSL)、HA462-470 (LYEKVKSQL)、Phycoerythrin (PE) 標識 H-2Kd HA tetramer-IYSTVASSL tetramer、FITC 標識 anti-mouse CD8 α (KT-15)mAb は医学生物学研究所(MBL)より、それぞれ購入した。

動物

BALB/c マウス(H-2d; 雌性 6 週齢)は日本 SLC より購入した。本研究における動物の飼育および実験は医薬基盤研究所の動物実験規定および厚生労働省動物実験指針に準じて行った。

マウスへの HA の免疫

BALB/c マウスへの経鼻免疫は、個々のサイトカインあるいは CT-B を 1 μ g/mouse でニワトリ卵白アルブミン(OVA)量として 100 μ g/mouse と共に混合投与し、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。

血清の回収

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。

鼻腔洗浄液の回収方法

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。

腔洗浄液の回収方法

マウス腹腔内を 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腔洗浄液を調製した。

糞便抽出液の調製方法

マウスから回収した糞便を 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

10 μ g/mL の抗原 (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。

B-2 インターロイキン粘膜アジュバントによる免疫誘導特性の評価

免疫方法

WBB6F1 マウス (6~8 週齢、雌性) あるいはマスト細胞欠損マウス WBB6F1 W/W^v 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 (CT) をインフルエンザウイルス抗原 HA (1 μ g/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。

HA 特異的抗体産生能の評価

HA (2 μ g/mL, in 50 mM Bicarbonate Buffer) を ELISA プレートに加え、4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C、2 時間; IgA)。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 抗体を加えてインキュベートした (室温、2 時間; IgG、37 $^{\circ}$ C、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。

サンプル回収

血清サンプルの回収: 最終免疫から 7 日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。

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。

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 μ m セルストレーナー上で細胞を分散させ、1500 rpm、5 分、4 $^{\circ}$ 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 μ M 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 μ M 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 5×10^6 cells/well で 24 well plate フィルタープレートに播種し、HA 溶液を終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 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、サイトカイン産生を測定した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

D-1 インターロイキンの粘膜アジュバント活性評価

まず、インターロイキンによる粘膜アジュバント効果を比較する目的で、26 種類のインターロイキンをインフルエンザ HA 抗原と共に、4 週間間隔で 2 回経鼻免疫し、血清中の HA 特異的 IgG 誘導能を指標に評価した。その結果、抗原単独で投与したマウスと比較して、IL-1 α/β 、IL-18、IL-33 といった、所謂 IL-1 ファミリーを併用投与したマウスにおいて、HA 特異的 IgG 産生が著しく亢進されていた(図 1A, 図 2A)。このことから、インターロイキンの中でも特に IL-1 ファミリーが、全身性の免疫応答を強力に誘導可能であることが判明した。また、IgG1 および IgG2a の両者の効率よい誘導が認められたことから、IL-1 ファミリーは、I 型、II 型ヘルパー T 細胞を共に活性化していた可能性が考えられた。続いて、粘膜面におけるインターロイキンの HA 特異的 IgA 誘導能を比較する目的で、先程と同様に免疫したマウスから回収した粘膜洗浄液中の HA 特異的 IgA 産生を

指標に評価した。その結果、インターロイキンの中でも IL-1 ファミリーが特に優れた HA 特異的 IgA 誘導能を有しており、唾液や腸管、膣といった全身の粘膜組織において抗原特異的 IgA が強力に誘導されていた(図 1B, 図 2B)。以上の結果より、IL-1 ファミリーが全身のみならず、粘膜面においても、ウイルスの感染防御に必須となる HA 特異的抗体を極めて効率良く誘導していたことから、これらサイトカインは粘膜ワクチン効果を強力に誘導可能な優れたアジュバント候補になり得るものと考えられた。

次に、IL-1 ファミリーをインフルエンザ粘膜アジュバントとして経鼻ワクチンした場合における HA 特異的な免疫誘導能を評価した。免疫マウス由来の脾細胞を用いて、in vitro で抗原再刺激後のサイトカイン産生を指標に評価したところ、抗原単独投与群と比較して、IL-1 ファミリーを併用投与した群においては HA 特異的 IL-4 産生ならびに IFN- γ 産生が共に増強されていることが判明した(図 3)。したがって、IL-1 ファミリーによるワクチン効果の増強には、Th2 と Th1、両者の免疫応答が深く関与することが明らかとなり、抗体産生を主体とする液性免疫に加えて細胞性免疫までも誘導する可能性が示唆された。そこで次に、IL-1 ファミリーによる HA 特異的 CTL 誘導能を評価したところ、抗原を単独で投与したマウスと比較して、IL-1 α 、IL-18、IL-33 を併用投与したマウスにおいては、classI 拘束性の IFN- γ 産生細胞数ならびに classI テトラマー陽性細胞数が著しく増加していた(図 4)。特に IL-33 を併用投与したマウスにおいては、最も強い粘膜アジュバント活性を有するコレラトキシンの投与と比較しても同程度、あるいは更に増加している傾向が認められた。以上のことから、IL-33 を経鼻ワクチンアジュバントとして用いた場合には HA 特異的抗体の誘導に加えて、全身性の CTL までも誘導出来ることから、ウイルス感染に対する防御網を何重にも構築できるものと考えられた。

D-2 インターロイキン粘膜アジュバントによる免疫誘導特性の評価

IL-1 ファミリーによる粘膜アジュバント活性の発現指標となるマスト細胞の可能性について検証する目的で、

マスト細胞が欠損したマウスおよびコントロールである野生型マウスを用いて IL-1 ファミリーによる抗原特異的な抗体産生の差異を比較した。これらマウスに、IL-1 ファミリーサイトカインを各々HA とともに経鼻免疫し、血清および糞便中の HA 特異的 IgG(図 5A)および IgA(図 5B)をELISAにより評価した。その結果、IL-1 ファミリーの中でも、IL-1 α/β あるいは IL-33 を併用投与した野生型マウスおよびマスト細胞欠損マウスにおいては、HA 特異的 IgG 産生および IgA 産生に差異は認められなかった。以上のことから、IL-1 α/β と IL-33 による抗原特異的な抗体産生にはマスト細胞以外の細胞が深く関与する可能性が示唆された。一方で、IL-18 を併用投与した場合、野生型マウスで観察された HA 特異的抗体の産生がマスト細胞欠損マウスにおいては完全に消失することが判明した。このことから、IL-18 による粘膜アジュバント活性の発現には、マスト細胞が必須であることが示唆された。次に、より詳細にマスト細胞依存的な抗原特異的免疫応答を解析する目的で、先程と同様に免疫したマウス由来の脾細胞を用いて、IL-1 ファミリーによるマスト細胞依存的な抗原特異的サイトカイン産生能を比較検討した(図 6)。その結果、IL-18 を併用投与した野生型マウスで認められた HA 特異的 Th2 型サイトカイン(IL-4、IL-5)ならびに HA 特異的 Th1 型サイトカイン(IFN- γ 、TNF- α)の何れのサイトカイン産生も、マスト細胞欠損マウスでは完全に消失しており、IL-18 によって誘導される抗原特異的な免疫応答にはマスト細胞が極めて重要な役割を担っているものと考えられた。さらに興味深いことに、IL-33 を経鼻アジュバントとして併用投与したマスト細胞欠損マウスにおいては、抗原特異的 Th2 型のサイトカイン産生には影響を与えず、Th1 型サイトカインである IFN- γ 産生のみが完全に消失していた。

従来まで、アレルギーを誘発する悪玉細胞と考えられてきたマスト細胞が、最近になって獲得免疫系を調節する免疫制御機能を有する細胞として注目されるようになってきている。TLR リガンドを全身投与のアジュバントとして用いた検討から、その効果発現にはマスト細胞が深く関与することが報告され、さらに 2008 年 McLachlan らの報告によると、樹状細胞の NALT への

遊走活性の調節に関与し、抗原特異的な免疫誘導を制御する可能性が示唆され始めている。一方で、IL-1 ファミリーは気管支喘息やアトピーといったアレルギー性の免疫応答を増強する危険分子であることが示唆されており、その原因の 1 つとしてマスト細胞の活性化が考えられている。これらを考え合わせると、IL-1 ファミリーを経粘膜投与した場合に誘導された抗原特異的な免疫誘導の増強メカニズムには、マスト細胞が重要な役割を担う可能性が考えられた。そこで、この仮説を検証する目的で、IL-1 ファミリーによるマスト細胞依存的な抗原特異的な抗体誘導能を検討したところ、IL-18 による効果の発現に極めて重要な役割を担う可能性が示唆された。これらの事実は、マスト細胞が IL-18 による粘膜アジュバント活性発現の標的細胞であり、マスト細胞があたかも抗原提示細胞として機能し、T 細胞を中心とした獲得免疫応答を発動していた可能性が考えられたが、詳細に関して現在検討中である。また、プレリミナリーなデータであるが、IL-18 受容体がマスト細胞表面上に高発現していること、NALT 中の樹状細胞の表面上には全くその発現が観察されなかったことを考え合わせると、IL-18 の経鼻投与によって誘導される免疫応答の発動にはマスト細胞が中心的な役割を担うと推察された。さらに、これらの事実を裏付けるように、IL-1 ファミリーによる抗原特異的な Th1、Th2 応答におけるマスト細胞の関与を検討したところ、IL-18 を免疫したマスト細胞欠損マウスにおいては、野生型マウスで観察された Th1 と Th2 応答が完全に消失していた。興味深いことに、IL-33 を投与したマスト細胞欠損マウスでは Th2 応答には影響を与えず、Th1 応答のみが著しい減弱効果が認められたことから、今後詳細に検討する必要はあるものの、マスト細胞が IL-18 による液性免疫応答を主体とする抗体産生の調節に関与する一方で、IL-33 による細胞性免疫の誘導調節にも深く関与する可能性が考えられた。

E. 結論

本研究では、解析に用いた26種類のインターロイキンの中で、IL-1 ファミリーサイトカインが特に顕著な粘膜アジュバント効果を有することを見出した。さらに、

IL-18、IL-33 の粘膜ワクチンアジュバント活性にマスト細胞が極めて重要であることを明らかとした。本研究結果は、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に向けて極めて重要な基盤情報を提供するとともに、他の多くの感染症に対しても有効なワクチン戦略を提示可能と考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Katayama K, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Hiroi T, Itoh N, Kawai Y, Kamada H, Tsunoda SI, Tsutsumi Y. TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jul 3;384(3):296-300.
2. Kayamuro H, Abe Y, Yoshioka Y, Katayama K, Nomura T, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Kawai Y, Mayumi T, Hiroi T, Itoh N, Nagano K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y. The use of a mutant TNF- α as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses. *Biomaterials.* 2009 Oct;30(29):5869-76.
3. Kayamuro H, Abe Y, Yoshioka Y, Katayama K, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Kawai Y, Mayumi T, Hiroi T, Ito N, Nagano K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y : Mutant TNF-alpha, mTNF, K90R, is a novel mucosal vaccine adjuvant candidate against HIV., *Pharmazie,* 2010 Apr;65(4):254-6

G-2 学会発表

1. 阿部康弘, 萱室裕之, 吉岡靖雄, 形山和史, 野村鉄也, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央:生物学的DDS による活性増強型 TNF 変異体の創出とその粘膜ワクチンアジュバントとしての有用性評価., 第

25 回 DDS 学会, 文京区(東京), 2009 年 7 月.

2. 有田修平, 萱室裕之, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 鎌田春彦, 吉川友章, 伊藤徳夫, 長野一也, 角田慎一, 堤 康央 : インフルエンザ経鼻ワクチンのためのサイトカインアジュバントの開発., ファーマバイオフフォーラム 2009, 名古屋(愛知), 2009 年 11 月.
3. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Arita S., Katayama K., Kamada H., Nomura T., Itoh N., Nagano K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Characterization of mucosal and systemic immune responses elicited by interleukin cytokines as mucosal vaccine adjuvant against influenza virus., 第 39 回 日本免疫学会学術集会, 大阪(大阪), 2009 年 12 月.
4. Arita S., Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Kamada H., Nomura T., Itoh N., Nagano K., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Mast cells are essential for inducing mucosal immune responses by interleukin-18., 第 39 回 日本免疫学会学術集会, 大阪(大阪), 2009 年 12 月.
5. Abe Y., Kayamuro H., Yoshioka Y., Katayama K., Nomura T., Hiroi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of efficacy of mutant TNF as a mucosal vaccine adjuvant against HIV-1 and influenza virus., 12th International TNF Conference, Madrid (Spain), 26-29 April, 2009.
6. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Nomura T., Hiroi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Identification of new candidates as mucosal vaccine adjuvant in TNF superfamily cytokines., 12th International TNF Conference, Madrid (Spain), 26-29 April, 2009.
7. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Arita S., Katayama K., Kamada H., Nomura T., Itoh N., Yoshikawa T., Nagano K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Characterization of mucosal and systemic immune responses elicited by interleukin cytokines as mucosal adjuvant against influenza virus., 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte

Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon (Portugal), 18-21 October, 2009.

8. Abe Y., Kayamuro H., Yoshioka Y., Arita S., Katayama K., Kamada H., Nomura T., Itoh N., Yoshikawa T., Nagano K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Mast cells are required for interleukin-18 dependent mucosal immune responses., 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon (Portugal), 18-21 October, 2009.
9. Abe Y., Kayamuro H., Yoshioka Y., Arita S., Katayama K., Yoshikawa T., Nagano K., Hiroi T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Intranasal immunization with mutant TNF modulates mucosal and systemic immune responses., 9th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy (IMMUNO2010), Geneva (Switzerland), 4-6 February.
10. Yoshioka Y., Kayamuro H., Abe Y., Arita S., Katayama K., Yoshikawa T., Nagano K., Hiroi T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : TNF

superfamily member, TL1A, is a potential immunoregulator for development of mucosal vaccin., 9th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy (IMMUNO2010), Geneva (Switzerland), 4-6 February.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許

該当なし

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
テオミクスプロジェクト
萱室 裕之 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロ
テオミクスプロジェクト
野村 鉄也 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロ
テオミクスプロジェクト

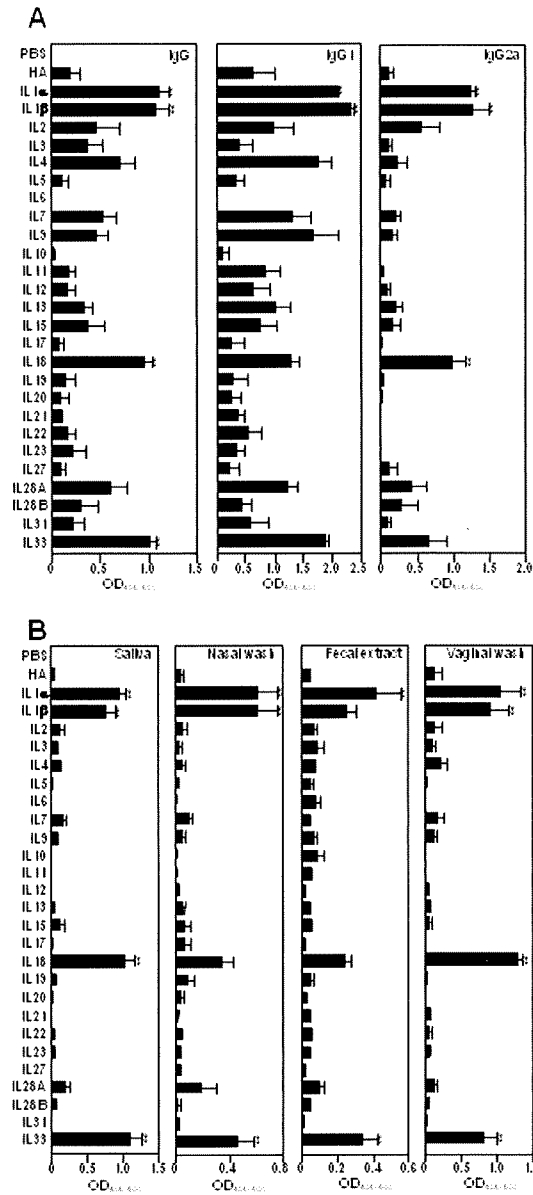


图 1 Serum rHA-specific IgG responses by nasal immunization with rHA plus interleukins.

BALB/c mice were intranasally immunized with rHA alone or rHA plus each interleukins two times at 4 weekly intervals. Serum was collected 14 days after the final immunization and analyzed by ELISA for rHA-specific (A) IgG, IgG1, and IgG2a responses. rHA-specific IgA responses in (B) saliva, nasal wash, fecal extract and vaginal wash were determined by ELISA. Data are presented as means \pm SEM (n = 5;)

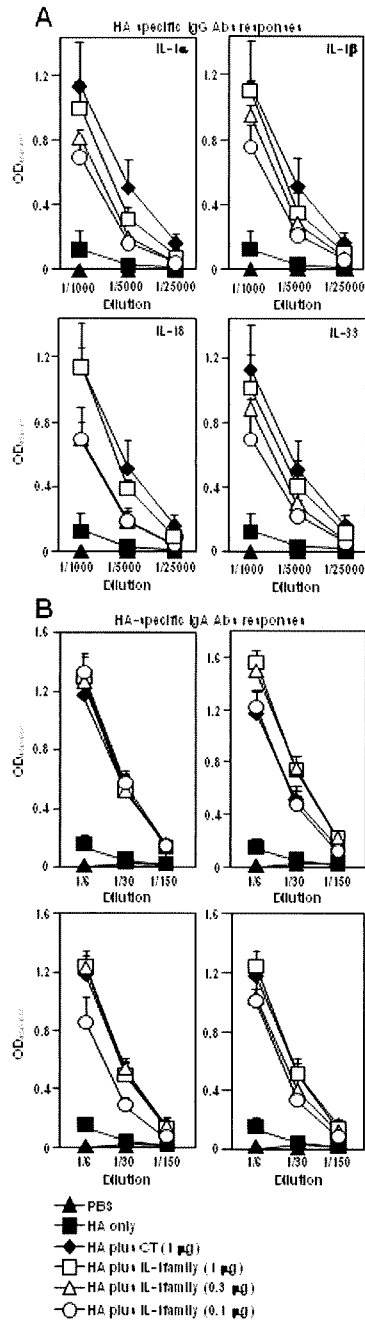


图 2 The dose response for the induction of rHA-specific Ab responses by nasal immunization with rHA plus IL-1 family cytokines.

BALB/c mice were intranasally immunized with rHA alone, rHA plus CT (1 μ g/mouse), or rHA plus IL-1 family cytokines (0.1, 0.3, or 1 μ g/mouse) two times at 4 weekly intervals. Serum was collected 14 days after the final immunization and analyzed by ELISA for rHA-specific (A) IgG responses at a dilution of 1/1000, 1/5000, and 1/25000. (B) The nasal wash was examined for the presence of rHA-specific IgA responses at dilutions of 1/6, 1/30, and 1/150. Data are presented as means \pm SEM (n = 5;)

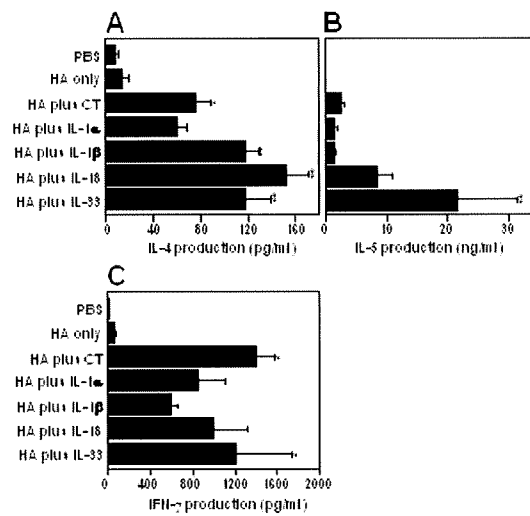


Figure 3 Cytokine responses induced by nasal immunization with rHA plus IL-1 family cytokines.

BALB/c mice were intranasally immunized with rHA alone, rHA plus CT, or rHA plus IL-1 family cytokines two times at 4 weekly intervals. 14 days after the final immunization, splenocytes from each group were cultured with 10 μ g/mL rHA. Culture supernatants were harvested after 3 days of incubation, and then rHA-specific (A) IL-4, (B) IL-5, and (C) IFN- γ productions in culture supernatant were analyzed using the Bio-Plex Multiplex Cytokine Assay. Data are presented as means \pm SEM (n = 5;)

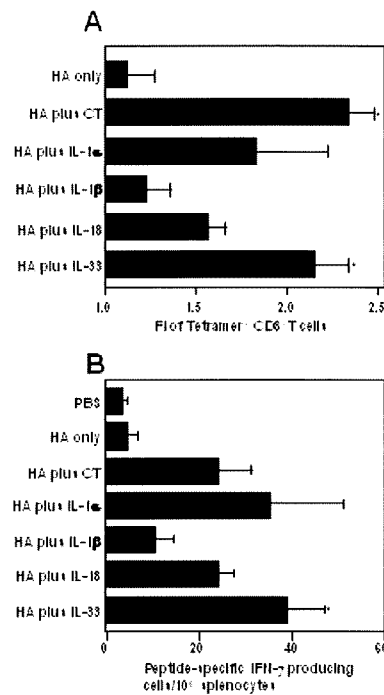


Fig. 4 The frequency of H-2Kd/HA240-248 tetramer⁺ CD8⁺ T cells and H-2Kd/HA240-248 specific IFN- γ secreting cells in spleen after nasally immunization with rHA plus IL-1 family cytokines.

BALB/c mice were intranasally immunized with rHA alone, rHA plus CT, or rHA plus IL-1 family cytokines two times at 4 weekly intervals. 14 days after the final immunization, splenocytes from immunized mice were harvested and stimulated in the presence of H-2Kd-restricted class I HA peptide at a final concentration of 10 μ g/ml total peptide. (A) For detection of H-2Kd/HA240-248 tetramer⁺ CD8⁺ T cells, splenocytes from immunized mice were cultured in media containing CTL epitope peptide (HA240-248; IYSTVASSL) plus 10 U/ml human IL-2 for 7 days, and then stained for the presence of CD8 and tetramer-binding cells using flow cytometry. (B) After 24 h incubation, the IFN- γ -producing cells were measured by an ELISPOT assay. Data are presented as means \pm SEM (n = 5;)

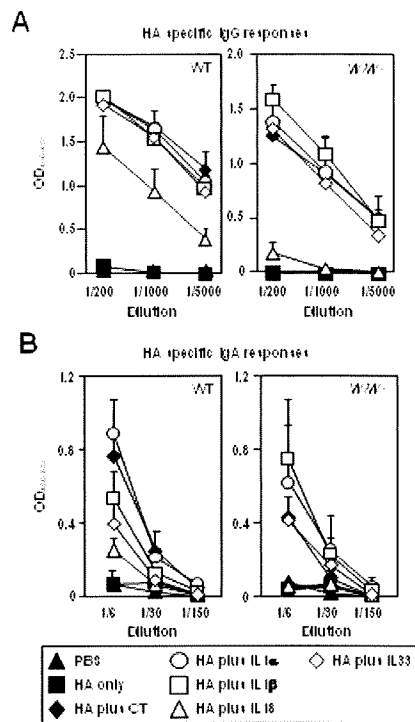


Fig 5 The dependency of MCs for the induction of rHA-specific immune responses by nasal immunization with rHA plus IL-1 family cytokines.

WBB6F1 W/Wv and WT mice were intranasally immunized with rHA alone, rHA plus CT ($1 \mu\text{g}/\text{mouse}$), or rHA plus IL-1 family cytokines ($1 \mu\text{g}/\text{mouse}$) two times at 4 weekly intervals. Plasma and fecal extracts were collected 14 days after the final immunization and analyzed by ELISA for rHA-specific IgG responses in (A) plasma and rHA-specific IgA responses in (B) fecal extract. Data are presented as means \pm SEM ($n = 5$;))

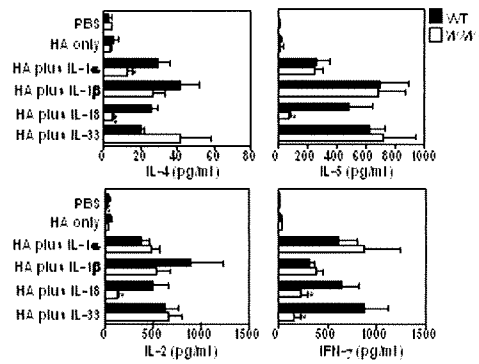


Fig. 6 The dependency of MHCs for the induction of rHA-specific immune responses by nasal immunization with rHA plus IL-1 family cytokines.

WBB6F1 W/Wv and WT mice were intranasally immunized with rHA alone, rHA plus CT (1 μ g/mouse), or rHA plus IL-1 family cytokines (1 μ g/mouse) two times at 4 weekly intervals. Splenocytes from each group of WBB6F1 W/Wv and WT mice were cultured with 10 μ g/mL rHA. Culture supernatants were harvested after 3 days of incubation, and then rHA-specific cytokine productions in culture supernatant (IL-4, IL-5, IL-2, and IFN- γ) were analyzed using the Bio-Plex Multiplex Cytokine Assay. Data are presented as means \pm SEM (n = 5;)

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・経膺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。しかし現在、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。本研究課題では、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ている。本年度の代表研究者の研究により、代表的なサイトカインであるインターロイキンファミリーの中でも、インターロイキン1（IL-1）ファミリーサイトカインが経粘膜投与により効率良く粘膜免疫を誘導し得ることが明らかとなった。そこで本研究では、IL-1ファミリーサイトカインの粘膜免疫誘導メカニズムを、特にマスト細胞に焦点を絞り解析した。その結果、IL-18やIL-33がマスト細胞依存的に粘膜免疫応答を誘導することが明らかとなった。本研究成果は、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に向けて極めて重要な基盤情報を提供するとともに、他の多くの感染症に対しても有効なワクチン戦略を提示可能と考えられる。

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・経膺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。本観点から我々は今年度、約 30 種類程度のサイトカインから構成されるインターロイキン (IL) 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、IL-1 α ・IL-1 β ・IL-18・IL-33 など IL-1 ファミリー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。しかし、その粘膜免疫誘導メカニズムについては全く不明であるのが現状である。

近年、Toll-like receptor の機能解析を中心とした自然免疫研究分野の発展により、自然免疫応答がワクチン効果発現に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。さらに鼻腔や腸管といった粘膜免疫系は、他の組織と比較して特有の免疫システムを有していることが従来より知られており、実際、鼻粘膜組織や腸管粘膜組織には特徴的な樹状細胞やマクロファージなどの自然免疫担当細胞が存在している。これまで数十年のアジュバント研究の成果は、これら樹状細胞やマクロファージといった、いわゆる、抗原提示細胞群こそが、アジュバント活性発現の標的細胞となり得ることを示すのみであった。しかし近年、粘膜免疫を調節するユニークな細胞群として、マスト細胞や好塩基球、好中球といった、これまであまり重要ではないとさえ考えられていた細胞群が、実は、獲得免疫系を直接的あるいは間接的に制御し得ることが次第に明らかとなってきた。このような背景のもと、我々は、IL-1 ファミリーの粘膜アジュバント活性発現機序解明の一環として、IL-1 ファミリーの活性発現標的細胞としてのマスト細胞の可能性に着目した。マスト細胞は、鼻粘膜上皮層に加えて、鼻粘膜免疫誘導層、固有層等に広く存在することが知られている。また、マスト細胞から産生される腫瘍壊死因子 (TNF- α) や、ケモカインの作用により、樹状細胞

やT細胞がリンパ組織へ集積するとの報告もあることから、マスト細胞には、T、B 細胞を中心とした獲得免疫応答を調節し得る可能性が考えられた。そこで本研究では、マスト細胞が IL-1 ファミリーの作用標的となり得る可能性について検討する目的で、マスト細胞欠損マウスを用いて、IL-1 ファミリーによるマスト細胞依存的な抗原特異的な免疫応答を検討した。

B. 研究方法

・免疫方法

WBB6F1 マウス (6~8 週齢、雌性) あるいはマスト細胞欠損マウス WBB6F1 W/W^v 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 (CT) をインフルエンザウイルス抗原 HA (1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) 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。

・HA 特異的抗体産生能の評価

HA (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, in 50 mM Bicarbonate Buffer) を ELISA プレートに加え、4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間; IgA)。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 抗体を加えてインキュベートした (室温、2 時間; IgG、37 $^{\circ}\text{C}$ 、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 H_2SO_4 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。

・サンプル回収

血清サンプルの回収; 最終免疫から 7 日後に眼底

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。

糞便抽出液の調製;100 mg/mLとなるようにPBSを加え、4°C、2時間激しく攪拌した。得られた懸濁液を14000 rpm、4°C、20分遠心し、上清を回収して糞便抽出液を調製した。

・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分、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 5×10^6 cells/wellで24 well plate フィルタープレートに播種し、HA溶液を終濃度10 µg/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、サイトカイン産生を測定した。

C. 研究結果

まず、IL-1ファミリーによる粘膜アジュバント活性の発現標的となるマスト細胞の可能性について検証する目的で、マスト細胞が欠損したマウスおよびコントロールである野生型マウスを用いてIL-1ファミリーによる抗原特異的な抗体産生の差異を比較した。これらマウスに、IL-1ファミリーサイトカインを各々HAとともに経鼻免疫し、血清および糞便中のHA特異的IgG (Fig. 1A) およびIgA (Fig. 1B)をELISAにより評価した。その結果、IL-1ファミリーの中でも、IL-1 α/β あるいはIL-33を併用投与した野生型マウスおよびマスト細胞欠損マウスにおいては、HA特異的IgG産生およびIgA産生に差異は認められなかった。以上のことから、IL-1 α/β とIL-33による抗原特異的な抗体産生にはマスト細胞以外の細胞が深く関与する可能性が示唆された。一方で、IL-18を併用投与した場合、野生型マウスで観察されたHA特異的抗体の産生がマスト細胞欠損マウスにおいては完全に消失することが判明した。このことから、IL-18による粘膜アジュバント活性の発現には、マスト細胞が必須であることが示唆された。次に、より詳細にマスト細胞依存的な抗原特異的免疫応答を解析する目的で、先程と同様に免疫したマウス由来の脾細胞を用いて、IL-1ファミリーによるマスト細胞依存的な抗原特異的サイトカイン産生能を比較検討した (Fig. 2)。その結果、IL-18を併用投与した野生型マウスで認められたHA特異的Th2型サイトカイン (IL-4、IL-5)ならびにHA特異的Th1型サイトカイン (IFN- γ 、TNF- α)の何れのサイトカイン産生も、マスト細胞欠損マウスでは完全に消失しており、IL-18によって誘導される抗原特異的な免疫応答にはマスト細胞が極めて重要な役割を担っているものと考えられた。さらに興味深いことに、IL-33を経鼻アジュバントとして併用投与したマスト細胞欠損マウスにおいては、抗原特異的Th2型のサイトカイン産生には影響を与えず、Th1型サイトカインであるIFN- γ 産生のみが完全に消失していた。

D. 考 察

従来まで、アレルギーを誘発する悪玉細胞と考えられてきたマスト細胞が、最近になって獲得免疫系を調節する免疫制御機能を有する細胞として注目されるようになってきている。TLR リガンドを全身投与のアジュバントとして用いた検討から、その効果発現にはマスト細胞が深く関与することが報告され、さらに 2008 年 McLachlan らの報告によると、樹状細胞の NALT への遊走活性の調節に関与し、抗原特異的な免疫誘導を制御する可能性が示唆され始めている。一方で、IL-1 ファミリーは気管支喘息やアトピーといったアレルギー性の免疫応答を増強する危険分子であることが示唆されており、その原因の 1 つとしてマスト細胞の活性化が考えられている。これらを考え合わせると、IL-1 ファミリーを経粘膜投与した場合に誘導された抗原特異的な免疫誘導の増強メカニズムには、マスト細胞が重要な役割を担う可能性が考えられた。そこで、この仮説を検証する目的で、IL-1 ファミリーによるマスト細胞依存的な抗原特異的な抗体誘導能を検討したところ、IL-18 による効果の発現に極めて重要な役割を担う可能性が示唆された。これらの事実は、マスト細胞が IL-18 による粘膜アジュバント活性発現の標的細胞であり、マスト細胞があたかも抗原提示細胞として機能し、T 細胞を中心とした獲得免疫応答を発動していた可能性が考えられたが、詳細に関して現在検討中である。また、プレリミナリーなデータであるが、IL-18 受容体がマスト細胞表面上に高発現していること、NALT 中の樹状細胞の表面上には全くその発現が観察されなかったことを考え合わせると、IL-18 の経鼻投与によって誘導される免疫応答の発動にはマスト細胞が中心的な役割を担うと推察された。さらに、これらの事実を裏付けるように、IL-1 ファミリーによる抗原特異的な Th1、Th2 応答におけるマスト細胞の関与を検討したところ、IL-18 を免疫したマスト細胞欠損マウスにおいては、野生型マウスで観察された Th1 と Th2 応答が完全に消失していた。興味深いことに、IL-33 を投与したマスト

細胞欠損マウスでは Th2 応答には影響を与えず、Th1 応答のみが著しい減弱効果が認められたことから、今後詳細に検討する必要はあるものの、マスト細胞が IL-18 による液性免疫応答を主体とする抗体産生の調節に関与する一方で、IL-33 による細胞性免疫の誘導調節にも深く関与する可能性が考えられた。

E. 結 論

本研究では、IL-18・IL-33 の粘膜ワクチンアジュバント活性にマスト細胞が極めて重要であることを明らかとした。本研究成果は、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に向けて極めて重要な基盤情報を提供するとともに、他の多くの感染症に対しても有効なワクチン戦略を提示可能と考えられる。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

①論文発表

1. Kayamuro H, **Yoshioka Y**, Abe Y, Katayama K, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Hiroi T, Itoh N, Kawai Y, Kamada H, Tsunoda SI, Tsutsumi Y. TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jul 3;384(3):296-300.
2. Kayamuro H, Abe Y, **Yoshioka Y**, Katayama K, Nomura T, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Kawai Y, Mayumi T, Hiroi T, Itoh N, Nagano K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y. The use of a mutant TNF- α as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(29):5869-76.
3. Kayamuro H, Abe Y, **Yoshioka Y**, Katayama K, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Kawai Y, Mayumi T, Hiroi T, Ito N, Nagano K,