

200932037A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉岡 靖雄

平成 22 (2010) 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. サイトカインを用いた粘膜ワクチンアジュバントの IgE 産生誘導に関する検討---	8
形山 和史	
2. サイトカインを用いた粘膜ワクチンアジュバントの安全性評価-----	12
鎌田 晴彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	16
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	17

## 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・経膣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のである。これまでに、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 $\alpha$ ) 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、TNF $\alpha$ ・TL1A・APRIL 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 X1、X2、Y、Z (特許申請のため、仮名で示す) を新たに見出した。本年度は、X1、X2、Y、Z の安全性を評価した。更に、これらサイトカインの送達方法として、アデノウイルスを用いた方法の最適化に向け検討を進めた。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

- 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
- 形山 和史・大阪大学大学院薬学研究科分子生

物学分野・助教

### 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ものではなく、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しただけでは、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。我々はこれまでに、①独自の“ファ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 $\alpha$ ）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、TNF $\alpha$ ・TL1A・APRIL 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 X1、X2、Y、Z（特許申請のため、仮名で示す）を新たに見出した。そこで本年度は、X1、X2、Y、Z の安全性を評価した。更に、これらサイトカインの送達方法として、アデノウイルスを用いた方法の最適化に向け検討を進めた。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。

## B. 研究方法

### アジュバント

インターロイキンサイトカインである X1、X2、Y、Z は、R&D 社（Minneapolis, MN）より購入した。

### 病理学的評価

BALB/c マウスへ抗原とサイトカイン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。4 週間おきに 2 回、抗原とともに候補となる 4 種のインターロイキンサイトカインを混合投与し、最終免疫のさらに 2 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、組織傷害や局所炎症について評価した。

### 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（CT；List Biological Laboratories）をモデル抗原であるニワトリ卵白アルブミン（OVA）と混合投与し行なった。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

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。

### 抗原特異的 IgE 抗体産生能の評価

血清中の OVA 特異的 IgE は、市販のキット（DS バイオファーマ）を用い、取り扱い説明書に従い

評価した。

### C. 研究結果

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、粘膜面での 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、独自に検討してきた TNF 変異体 mTNF-K90R や TNF スーパーファミリーサイトカインでは細胞傷害性 T 細胞を誘導するのは困難と考えられた。一方で、昨年度の検討から、インターロイキンサイトカインである X1、X2、Y、Z の 4 種類のサイトカインは、mTNF-K90R や TNF スーパーファミリーサイトカインよりも強い粘膜免疫誘導能を示すとともに、細胞傷害性 T 細胞をも誘導し得る可能性が示された。しかし、経鼻投与による粘膜ワクチン開発を考えた場合、鼻腔のみならず肺での炎症惹起など安全性を十分考慮する必要がある。事実、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、その安全性を十二分に評価する必要性が考えられる。そこで本年度は、X1、X2、Y、Z の粘膜ワクチンアジュバントとしての安全性を評価する目的で、投与局所部位における組織傷害性および炎症性細胞浸潤の程度（局所炎症）を病理組織学的に解析した。昨年度の検討から、十分な粘膜免疫を誘導可能な投与量・スケジュールで、抗原とともに X1、X2、Y、Z を経鼻投与した。その結果、投与期間中、発熱、立毛、体重減少など顕著な副作用は観察されなかった。また、X1、X2、Y、Z の経鼻投与による鼻粘膜組織に及ぼす傷害性は殆んど観察されず、鼻粘膜上皮細胞の壊死や脱落、菲薄化といった病理学的な異常所見は全く認められなかった（Figure 1）。さらに、ルナ染色の結果からも、好酸球などアレルギー反応に関与する細胞群の集積についても、鼻組織、肺組織で認められなかった。以上の結果から、X1、X2、Y、Z は、投与局所の粘膜面における安全性を保持したまま、粘膜ワクチン効果を増強し得る安全且つ効果的な粘膜アジュ

バントであると考えられた。

次に、これらサイトカインを経鼻投与した後の、アナフィラキシーの原因となる抗原特異的 IgE 産生について評価した（Figure 2）。ポジティブコントロールとして使用したコレラトキシン（CT）、あるいはコレラトキシン B サブユニット（CTB）と OVA を共投与した場合には、予想されたとおり OVA 抗原を認識する血清中 IgE が誘導されていた。また、X1、X2、あるいは Z を共投与した場合には CT 以上の OVA 特異的 IgE が観察された。一方、非常に興味深いことに、Y を共投与した場合の OVA 特異的 IgE 誘導能は他のサイトカイン（X1、X2、Z）に比べて低い事を明らかとした。以上の結果から、Y は安全性に優れた粘膜ワクチンアジュバントになり得る可能性が示された。

今後、臨床開発を視野に入れた場合、これらサイトカインを蛋白質製剤として使用するの、薬価の点などから困難と予想される。そこで、遺伝子製剤として適用し、粘膜面で上記サイトカインを抗原と共に発現させる方法が最もリーズナブルと考えられる。そこで、遺伝子送達キャリアーとして汎用されるアデノウイルスベクターを用い、細胞標的能を有するアデノウイルスベクターの開発を試みた。その結果、アデノウイルスを水溶性高分子ポリエチレングリコール（PEG）で修飾した後、PEG 先端に細胞指向性ペプチドを付与することで、目的の細胞にのみ遺伝子を発現可能なシステム開発に成功した（Figure 3）。今後、これらを用い、経鼻的に投与することで、鼻粘膜でのみサイトカインアジュバントや抗原を発現可能になると期待される。

### 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。

これまでに、X1、X2、Y、Zの過剰発現は、喘息などアレルギー疾患の原因となることが知られている。従って、X1、X2、Y、Zを経鼻投与した際の、鼻および肺での安全性評価は非常に重要と考えられる。本検討では、重篤な病変は観察されなかったが、最終投与2週間後の検討であるため、今後は投与直後の病理学的解析を実施するなど詳細な検討が必要と考えられる。さらに、大量投与、頻回投与などでの検討も進める必要があると考えられる。また、アナフィラキシーを引き起こす原因のひとつであるIgE誘導について解析した結果、同等のOVA特異的血清IgGや粘膜IgA誘導能を示すX1、X2、Y、Zのなかで、Y投与群のIgEは低い値を示すことを明らかとした。本結果から、Yは他のX1、X2、Zと異なるメカニズムで粘膜免疫を活性化する可能性が考えられた。

我々は、プレリミナリーなデータではあるが、マスト細胞欠損マウス(W/W<sup>u</sup>)を用いた解析において、Yが他のサイトカインと異なる免疫誘導パターンを示すと共に、Yの共投与により感染防御能の高い粘膜免疫が誘導される可能性を示している。それらの結果と本研究結果を総合的に判断すると、粘膜面におけるYの作用機序や標的細胞等を明らかにすることは、安全かつ有効な新規粘膜ワクチンアジュバント開発に繋がるものと考えられた。また、共同研究者らが有するフェージ表面提示法を駆使した機能性人工蛋白創製技術により、Yを基本とした新規アジュバント分子創出の可能性が見出された。

## E. 結論

本研究では、粘膜ワクチンアジュバントとして有望であるX1、X2、Y、Zの安全性評価を実施し、投与局所に炎症や顕著なIgE産生など重篤な副作用を誘発しないことを明らかとした。今後、より詳細な安全性評価を実施することで、HIVに対する粘膜ワクチンの開発に貢献可能な粘膜ワクチ

ンアジュバントの開発が可能と考えられる。また、これらサイトカインを部位特異的に発現可能な送達システムの構築も図った。

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。

## 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, 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-alpha as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses. *Biomaterials*. 30(29): 5869-76, 2009.
2. Kayamuro H, **Yoshioka Y**, Abe Y, **Katayama K**, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Hiroi T, Itoh N, Kawai Y, Mayumi T, **Kamada H**, Tsunoda S, Tsutsumi Y. TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant. *Biochem Biophys Res Commun*. 384(3): 296-300, 2009.
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*, in press.

### ②学会発表

国外

1. 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.
  2. 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.
  3. 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.
- 2009年3月.
  2. 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.
  3. 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.

#### 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

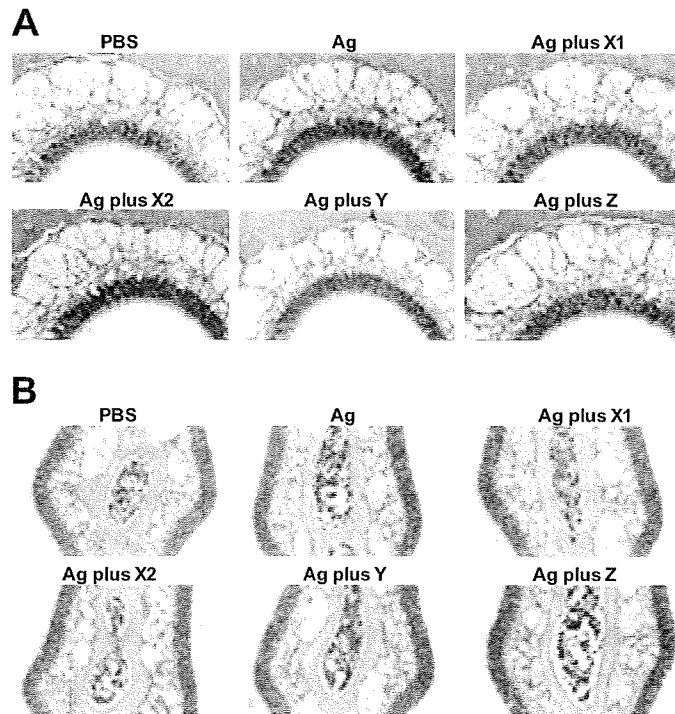
#### I. 研究協力者

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

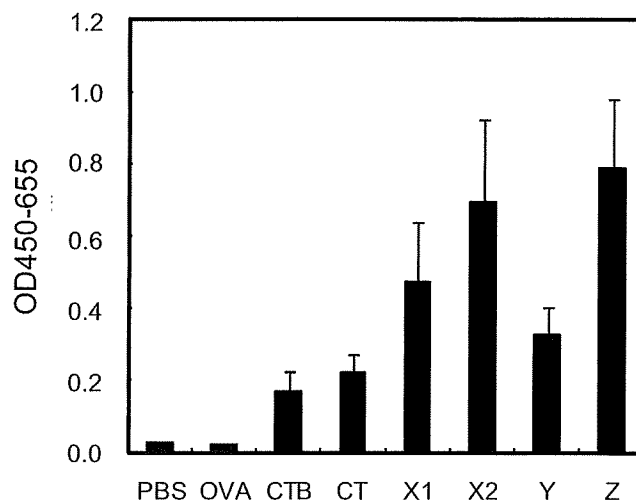
萱室裕之 大阪大学大学院薬学研究科 医薬基盤化学分野 博士後期課程 3年

#### 国内

1. 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(京都),

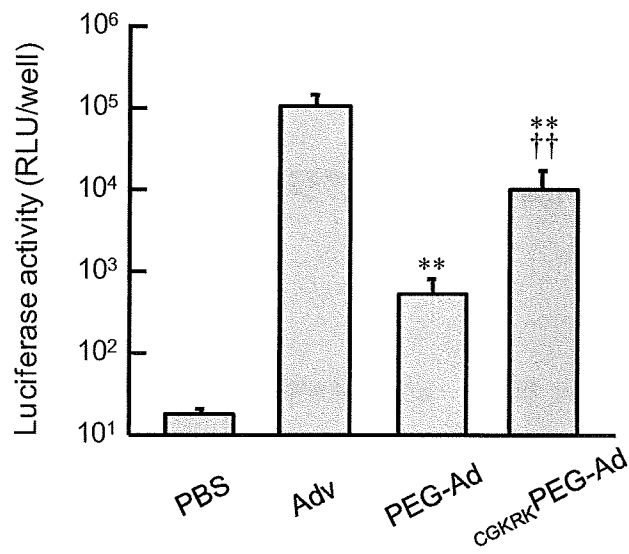


**Figure 1.** Histopathological analysis of the nasal cavity treated with cytokine. Frontal cross-sections of the nasal cavity from mice taken after two administrations of PBS, Ag alone or Ag together with cytokine. Sections were prepared and the tissues were stained with H&E (A) or Luna staining (B) to assess the degree of pathological changes. An overall view of the nasal epithelium (A) and Luna-stained eosinophils in the nasal septum (B) are shown, respectively.



**Figure 2.** Serum OVA-specific IgE responses following nasal immunization with OVA plus each indicated cytokine. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus CTB, OVA plus CT, or OVA plus each cytokine three times at weekly intervals. Serum was collected 7 days after last immunization and analyzed by ELISA for OVA-specific IgE.





**Figure 3.** Transgene expression of PEG-Ad *in vitro*. B16BL6 cells were transduced with 10<sup>4</sup> vp/cell of indicated Ad. After culturing for 24 hours, luciferase activity was determined using a luciferase assay system. The data are represented as the means ±SD (n = 6; \*\* *P* < 0.01 versus value for Adv-treated group by ANOVA; †† *P* < 0.01 versus value for PEG-Ad group by ANOVA).

## サイトカインを用いた粘膜ワクチンアジュバントの IgE 産生誘導に関する検討

研究分担者 形山 和史 大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野 助教

### 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、様々なインターロイキンファミリーサイトカインの粘膜免疫誘導能を体系的に評価することで、X1、X2、Y、Z の 4 種類（特許申請のため、仮名で示す）のサイトカインが、経鼻投与で強い粘膜免疫を誘導することを明らかとした。本年度は、それらサイトカインの粘膜ワクチンアジュバントとしての安全性について評価することを目的に、アナフィラキシーの原因となる抗原特異的 IgE 産生について評価した。その結果、Y を共投与した場合の OVA 特異的 IgE 誘導能は、他のサイトカイン (X1、X2、Z) に比べて低い事を明らかとした。従って、Y は安全性・有効性に優れた粘膜ワクチンアジュバントの新規候補分子となり得ることが示された。

### A. 研究目的

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、様々なサイトカインの粘膜免疫誘導能を体系的に評価することで、インターロイキンサイトカインである X1、X2、Y、Z の 4 種類（特許申請のため、仮名で示す）のサイトカインが、経鼻投与で強い粘膜免疫を誘導することを明らかとした。経鼻投与による粘膜ワクチン開発を考えた場合、鼻腔のみならず肺での炎症惹起など安全性を十分考慮する必要がある。事実、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、その安全性を十二分に評価する必要性が考えられる。そこで本年度は、これらサイトカインを経鼻投与した後の、アナフィラキシーの原因となる抗原特異的 IgE 産生について評価した。

### 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 (CT ; List Biological Laboratories) をモデル抗原であるニワトリ卵白アルブミン (OVA) と混合投与し行なった。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

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。

#### 抗原特異的 IgE 抗体産生能の評価

血清中の OVA 特異的 IgE は、市販のキット (DS バイオファーマ) を用い、取り扱い説明書に従い評価した。

### C. 研究結果

ポジティブコントロールとして使用したコレラトキシン (CT)、あるいはコレラトキシン B サブユニット (CTB) と OVA を共投与した場合には、予想されたとおり OVA 抗原を認識する血清中 IgE が誘導されていた。また、X1、X2、あるいは Z を共投与した場合には、CT 以上の OVA 特異的 IgE が観察された。一方、非常に興味深いことに、Y を共投与した場合の OVA 特異的 IgE 誘導能は他のサイトカイン (X1、X2、Z) に比べて低い事を明らかとした。

#### D. 考察

HIV をはじめとする感染症ワクチン開発、特に感染防御の為に予防ワクチン開発においては、安全性を担保することは非常に重要である。いくつかの細菌毒素系分子は強力な粘膜免疫活性化能を示すことが報告されているが、安全性の観点からそれらの臨床応用は困難であるとの見解が強い。従って、安全性と有効性を備えた新規粘膜ワクチンアジュバント分子を見出すことが切望されている。

前年度までの研究結果を踏まえ、粘膜ワクチンアジュバントとしての高い能力を示した X1、X2、Y、Z の安全性について評価するために、アナフィラキシーを引き起こす原因のひとつである IgE 誘導について解析した。その結果、同等の OVA 特異的血清 IgG や粘膜 IgA 誘導能を示す X1、X2、Y、Z のなかで、Y 投与群の IgE は低い値を示すことを明らかとした。本結果から、Y は他の X1、X2、Z と異なるメカニズムで粘膜免疫を活性化する可能性が考えられた。

我々は、プレリミナリーなデータではあるが、マスト細胞欠損マウス (*W/W<sup>o</sup>*) を用いた解析において Y が他のサイトカインと異なる免疫誘導パターンを示すと共に、Y の共投与により感染防御能の高い粘膜免疫が誘導される可能性を示している。それらの結果と本研究結果を総合的に判断すると、粘膜面における Y の作用機序や標的細胞等を明らかにすることは、安全かつ有効な新規粘膜ワクチンアジュバント開発に繋がるものと考

えられた。また、共同研究者らが有するフェージ表面提示法を駆使した機能性人工蛋白創製技術により、Y を基本とした新規アジュバント分子創出の可能性が見出された。

#### E. 結論

本研究により、Y が安全性・有効性に優れた粘膜ワクチンアジュバントの新規候補分子となり得ることが明らかとなった。

#### G. 研究発表

##### ①論文発表

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

##### ②学会発表

###### 国外

1. 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.

2. 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.
3. 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.

#### 国内

1. 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.
2. 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、東京、2009 年.
3. 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、2009 年.

#### 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

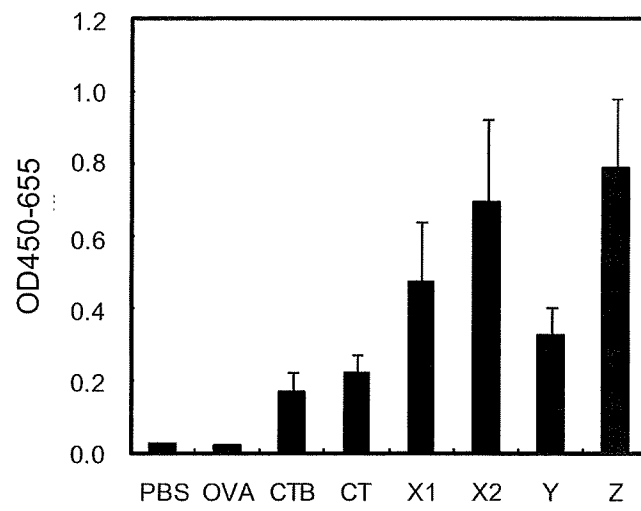
該当事項無し

##### ③その他

該当事項無し

#### I. 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



**Figure 1.** Serum OVA-specific IgE responses following nasal immunization with OVA plus each indicated cytokine. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus CTB, OVA plus CT, or OVA plus each cytokine three times at weekly intervals. Serum was collected 7 days after last immunization and analyzed by ELISA for OVA-specific IgE.

## サイトカインを用いた粘膜ワクチンアジュバントの安全性評価

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ための基礎検討を目的とする。我々は昨年度までに、多数のサイトカインを粘膜ワクチンアジュバント候補として用い、これらの粘膜免疫誘導能を比較検討する中で、インターロイキンサイトカインである X1、X2、Y、Z の 4 種類（特許申請のため、仮名で示す）のサイトカインが優れた粘膜免疫誘導能を有することを明らかとしてきた。そこで本年度は、これらサイトカインの粘膜ワクチンアジュバントとしての安全性に焦点を絞り検討した。その結果、X1、X2、Y、Z はいずれも経鼻投与において、安全性を確保しつつ免疫誘導可能なサイトカインであることが示された。

### A. 研究目的

HIV 感染に伴う AIDS 治療は近年、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、抗原単独を経粘膜投与しただけでは、抗原タンパク質の分解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、優れた粘膜免疫誘導能を有する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。

我々は昨年度までに、多数のサイトカインの粘膜免疫誘導能を評価し、インターロイキンサイトカインである X1、X2、Y、Z の 4 種類（特許申請のため、仮名で示す）のサイトカインが優れた粘膜免疫誘導能を有することを明らかとしてきた。そこで本年度は、これらサイトカインの粘膜ワクチンアジュバントとしての安全性に焦点を絞り検討した。

## B. 研究方法

### アジュバント

インターロイキンサイトカインである X1、X2、Y、Z は、R&D 社 (Minneapolis, MN) より購入した。

### 病理学的評価

BALB/c マウスへ抗原とサイトカイン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。4 週間おきに 2 回、抗原とともに候補となる 4 種のインターロイキンサイトカインを混合投与し、最終免疫のさらに 2 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、組織傷害や局所炎症について評価した。

## C. 研究結果

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、粘膜面での IgA により HIV の侵入を抑え、万が一侵入した場合に粘膜面・全身面での細胞傷害性 T 細胞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、独自に検討してきた TNF 変異体 mTNF-K90R や TNF スーパーファミリーサイトカインでは細胞傷害性 T 細胞を誘導するのは困難と考えられた。一方で、昨年度の検討から、インターロイキンサイトカインである X1、X2、Y、Z の 4 種類のサイトカインは、mTNF-K90R や TNF スーパーファミリーサイトカインよりも強い粘膜免疫誘導能を示すとともに、細胞傷害性 T 細胞をも誘導し得る可能性が示された。そこで本年度は、X1、X2、Y、Z の粘膜ワクチンアジュバントとしての安全性を評価する目的で、投与局所部位における組織傷害性および炎症性細胞浸潤の程度（局所炎症）を病理組織学的に解析した。昨年度の検討から、十分な粘膜免疫を誘導可能な投与量・スケジュールで、抗原とともに X1、X2、Y、Z を経鼻投与した。その結果、投与期間中、発熱、立毛、体重減少など顕著な副作用は観察されなかった。また、X1、X2、Y、Z の経鼻投与による鼻粘膜組織に及ぼす傷害性は殆んど観察されず、鼻粘膜上皮細胞の壊死や脱落、菲薄化といった病理学的な

異常所見は全く認められなかった (Figure 1)。さらに、ルナ染色の結果からも、好酸球などアレルギー反応に関与する細胞群の集積についても、鼻組織、肺組織で認められなかった。以上の結果から、X1、X2、Y、Z は、投与局所の粘膜面における安全性を保持したまま、粘膜ワクチン効果を増強し得る安全且つ効果的な粘膜アジュバントであると考えられた。

## D. 考察

これまでに、X1、X2、Y、Z の過剰発現は、喘息などアレルギー疾患の原因となることが知られている。従って、X1、X2、Y、Z を経鼻投与した際の、鼻および肺での安全性評価は非常に重要と考えられる。本検討では、重篤な病変は観察されなかったが、最終投与 2 週間後の検討であるため、今後は投与直後の病理学的解析を実施するなど詳細な検討が必要と考える。さらに、大量投与、頻回投与などでの検討も進める必要があると考えられる。それと同時に、鼻粘膜組織にのみ、これらサイトカインを送達可能な方法論の確立も必須と考えられる。

## E. 結論

本研究では、粘膜ワクチンアジュバントとして有望である X1、X2、Y、Z の安全性評価を実施し、投与局所に炎症など重篤な副作用を誘発しないことを明らかとした。今後、より詳細な安全性評価を実施することで、HIV に対する粘膜ワクチンの開発に貢献可能な粘膜ワクチンアジュバントの開発が可能と考えられる。

## G. 研究発表

### ①論文発表

1. 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- $\alpha$  as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal

- immune responses. *Biomaterials*. 30(29): 5869-76, 2009.
2. Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Katayama K, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Hiroi T, Itoh N, Kawai Y, Mayumi T, **Kamada H**, Tsunoda S, Tsutsumi Y. TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant. *Biochem Biophys Res Commun*. 384(3): 296-300, 2009.
  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*, in press.

②学会発表

海外

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.

国内

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、2009年、大阪。

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

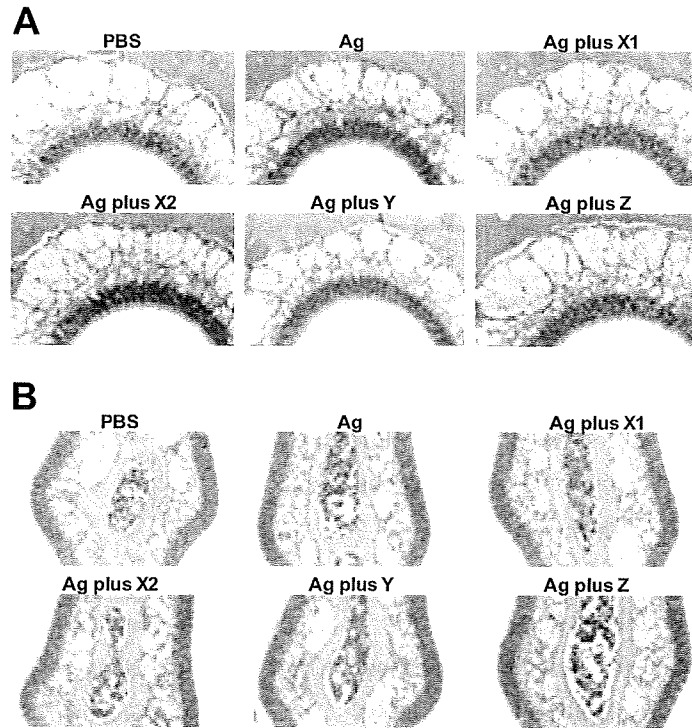
③その他

該当事項無し

I. 研究協力者

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3年





**Figure 1.** Histopathological analysis of the nasal cavity treated with cytokine. Frontal cross-sections of the nasal cavity from mice taken after two administrations of PBS, Ag alone or Ag together with cytokine. Sections were prepared and the tissues were stained with H&E (A) or Luna staining (B) to assess the degree of pathological changes. An overall view of the nasal epithelium (A) and Luna-stained eosinophils in the nasal septum (B) are shown, respectively.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

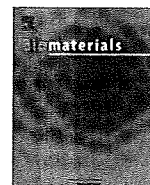
発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kayamuro H, Abe Y, Yoshioka Y, Katayama K, Nomura T, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Kawai Y, Mayumi T, Hiroi T, Itoh N, Nagano K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y.	The use of a mutant TNF- $\alpha$ as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses.	Biomaterials	30(29)	5869-76	2009
Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Katayama K, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Hiroi T, Itoh N, Kawai Y, Mayumi T, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y.	TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant.	Biochem Biophys Res Commun	384(3)	296-300	2009
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			In press



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biomaterials](http://www.elsevier.com/locate/biomaterials)

## The use of a mutant TNF- $\alpha$ as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses

Hiroyuki Kayamuro<sup>a,b,1</sup>, Yasuhiro Abe<sup>a,1</sup>, Yasuo Yoshioka<sup>a,c,1</sup>, Kazufumi Katayama<sup>b,d</sup>, Tetsuya Nomura<sup>a,b</sup>, Tokuyuki Yoshida<sup>a,b</sup>, Kohei Yamashita<sup>a,b</sup>, Tomoaki Yoshikawa<sup>a,b</sup>, Yuichi Kawai<sup>e</sup>, Tadanori Mayumi<sup>e</sup>, Takachika Hiroi<sup>d</sup>, Norio Itoh<sup>b</sup>, Kazuya Nagano<sup>a</sup>, Haruhiko Kamada<sup>a,c</sup>, Shin-ichi Tsunoda<sup>a,c,\*</sup>, Yasuo Tsutsumi<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation (NiBio), 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

<sup>b</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>c</sup>The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 1-6, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>d</sup>Department of Allergy and Immunology, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8613, Japan

<sup>e</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe-Gakuin University, 1-1-3, Minatogima, Chuo-ku, Kobe 650-8586, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 May 2009

Accepted 6 July 2009

Available online 30 July 2009

#### Keywords:

Bioactivity

Cytokine

Mucosa

Immunomodulation

### ABSTRACT

Safe and potent adjuvants are required in order to establish effective mucosal vaccines. Cytokines are promising adjuvants because they are human-derived safe biomaterial and display immune-modulating functions. We have created a mutant tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), mTNF-K90R, that exhibits high bioactivity and resistance to proteases. Here, we examined the potential of mTNF-K90R as a mucosal adjuvant. Initially, we showed that intranasal co-administration of mTNF-K90R with ovalbumin (OVA) potentially produced OVA-specific Immunoglobulin (Ig) G antibodies (Abs) in serum and IgA Abs both at local and distal mucosal sites compared to co-administration with wild-type TNF- $\alpha$ . The OVA-specific immune response was characterized by high levels of serum IgG1 and increased production of interleukin-4 (IL-4), IL-5 and IL-10 from splenocytes of immunized mice, suggesting a Th2 response. Furthermore, intranasal immunization with an antigen from influenza virus plus mTNF-K90R exhibited mucosal adjuvant activity for induction of both systemic and mucosal immune responses. Importantly, histopathological examination of the nasal tissue of mTNF-K90R treated mice detected no signs of toxicity. These findings suggest that mTNF-K90R is safe and effective mucosal adjuvant and this system may have potential application as a universal mucosal adjuvant system for mucosal vaccines improving the immune response to a variety of viral antigens.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Mucosal immunity forms the first line of defense against various infectious diseases. The majority of emerging and re-emerging pathogens, including *Vibrio cholerae*, pathogenic *Escherichia coli*, HIV or influenza virus, invade and infect *via* the mucosal surfaces of the host gastrointestinal, respiratory and/or genitourinary tracts [1,2]. An important aspect of the immune response at mucosal surfaces is the production of polymeric immunoglobulin (Ig) A antibodies (Abs), as well as their transport across the epithelium and release as

secretory IgA [3]. Because this IgA response represents the major mechanism for defense against viral and bacterial infections, recent efforts have been focused on the development of vaccines that are capable of inducing IgA production as well as cytotoxic T cell activation efficiently in mucosal tissues.

Mucosal vaccines administered either orally or nasally have been shown to be effective in inducing antigen-specific immune responses at both systemic and mucosal compartments [4,5]. Because of this two-layered protective immunity, mucosal vaccines are thought to be an ideal strategy for combating both emerging and re-emerging infectious diseases. However the mucosal antigen-specific immune response is weak because most protein antigens, such as non-living macromolecules or protein-subunit antigens, can evoke only a weak or undetectable adaptive immune response when they are applied mucosally [6]. Therefore, one strategy to overcome the weakness of the immune response is a co-administration of mucosal adjuvant

\* Corresponding author. Laboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation (NiBio), 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan. Tel.: +81 72 641 9811; fax: +81 72 641 9817.

E-mail address: [tsunoda@nibio.go.jp](mailto:tsunoda@nibio.go.jp) (S.-i. Tsunoda).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the work.

with the vaccine antigen [4]. Unfortunately, the development of safe and effective mucosal adjuvant has proved to be challenging. As a potent mucosal vaccine adjuvant, cholera toxin (CT) or heat labile toxin have been used in experimental studies. However, the watery diarrhea induced by the administration of these toxins precludes their use as oral adjuvants in humans [7]. In addition, recent reports show that a human vaccine containing inactivated influenza and heat labile toxin as a mucosal adjuvant results in a very high incidence of Bell's palsy [8]. Therefore, development of novel mucosal vaccine adjuvants with high efficacy and safety is urgently required for clinical applications.

Cytokines are promising candidate adjuvants because they are human-derived and able to enhance the primary and memory immune responses sufficiently for protection against various infections [9–11]. One of the most important cytokines of adaptive and innate immune response is tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a proinflammatory cytokine primarily produced by T cells and macrophages [12]. TNF- $\alpha$  has been reported to affect certain phases of the immune process, including innate immune activation, dendritic cells (DC) maturation/recruitment, T cell activation, or pathogen clearance [13]. Indeed many reports have shown that TNF- $\alpha$  exerts adjuvant activities against viral infection in various model systems [14–16]. Therefore the application of TNF- $\alpha$  in the development of a vaccine adjuvant has been anticipated for some time. However the application of TNF- $\alpha$  as a mucosal vaccine adjuvant has not been reported because TNF- $\alpha$  administered by mucosal routes is rapidly degraded at the mucosal surface. Therefore, the maximum adjuvant effects of TNF- $\alpha$  are quite limited in the mucosal environment.

Previously, we have produced a bioactive lysine-deficient mutant TNF- $\alpha$ s from a phage library expressing mutant TNF- $\alpha$ s in which all of the lysine residues that act as a site of trypsin-type protease recognition were replaced with other amino acids [17–19]. Lysine-deficient mutant TNF- $\alpha$ s were more resistant to proteolytic cleavage than wild-type TNF- $\alpha$  (wTNF- $\alpha$ ) due to the lack of lysine residues. Furthermore we demonstrated that the mTNF-K90R, one of the lysine-deficient mutant TNF- $\alpha$ s, showed 6-fold stronger *in vitro* bioactivity and 13-fold stronger *in vivo* bioactivity compared with wTNF- $\alpha$  [18].

In this study, to develop effective and safe cytokine-based mucosal vaccine adjuvants, we examined the potential of mTNF-K90R as a nasal vaccine adjuvant. We demonstrate that intranasal administration of vaccine antigen with mTNF-K90R as an adjuvant induces a strong antigen-specific systemic IgG and mucosal IgA response. In addition, the safety of mTNF-K90R was confirmed by pathological examination. These results suggest that mTNF-K90R is an attractive mucosal vaccine adjuvant for clinical application.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Recombinant TNF- $\alpha$ s

wTNF- $\alpha$  and mTNF-K90R were prepared in house as described previously [18]. Endotoxin level was quantified using a Limulus amoebocyte lysate assay kit (QCL-1000, BioWhittaker, Walkersville, MD). The endotoxin content of purified TNF- $\alpha$  and its mutant was  $<0.02$  EU  $\mu\text{g}^{-1}$  protein.

### 2.2. Mice and immunization protocols

Female BALB/c mice were purchased from Nippon SLC (Kyoto, Japan) and used at 6–8 weeks of age. All of the animal experimental procedures were performed in accordance with the institutional ethical guidelines for animal experiments. Mice were intranasally immunized with a 20  $\mu\text{l}$  aliquot (10  $\mu\text{l}$  per nostril) containing 100  $\mu\text{g}$  of ovalbumin (OVA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) as antigen and 1 or 5  $\mu\text{g}$  of wTNF- $\alpha$  or mTNF-K90R on days 0, 7 and 14. As positive control, mice were intranasally immunized with the same volume containing 100  $\mu\text{g}$  of OVA and 1  $\mu\text{g}$  cholera toxin B subunit (CTB; List Biological Laboratories, Campbell, CA) on days 0, 7 and 14. In the influenza virus studies, 1  $\mu\text{g}$  baculovirus-expressed recombinant hemagglutinin (HA) derived from New Cal/99 virus (Protein Sciences, Meriden, CT), was immunized with 1  $\mu\text{g}$  CTB or 5  $\mu\text{g}$  mTNF-K90R on days 0, 7 and 14.

### 2.3. Sample collection

One week after the final immunization, plasma and mucosal secretions (nasal washes, saliva, vaginal washes and fecal extracts) were collected to assess antigen-specific Ab responses. Nasal and vaginal washes were collected by gentle flushing of the nasal passage or vaginal canal with 200  $\mu\text{l}$  or 100  $\mu\text{l}$  of sterile phosphate buffered saline (PBS), respectively. Fecal pellets (100 mg) were suspended in 1 ml of PBS and then vortexed for 30 min. The samples were centrifuged at 15000g for 20 min and the supernatants were then collected as fecal extracts. Secreted saliva was collected from mice intraperitoneally injected with 0.2 mg of pilocarpine-HCl (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan).

### 2.4. Detection of antigen-specific Ab responses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Antigen-specific Ab levels in plasma, nasal washes, saliva, vaginal washes and fecal extracts were determined by ELISA. ELISA plates (Maxisorp, type 96F; Nalge Nunc International, Tokyo, Japan) were coated with 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  OVA or 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  HA in 0.1 M carbonate buffer and incubated overnight at 4 °C. The plates were incubated with blocking solution (Block Ace; Dainippon Sumitomo Pharmaceuticals, Osaka, Japan) at 37 °C for 2 h, and serum or mucosal secretion dilutions were added to the antigen-coated plates. After incubation at 37 °C for 2 h, the coated plates were washed with PBS-Tween 20 and incubated with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG solution or a biotin-conjugated goat anti-mouse IgA detection Ab (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) solution at 37 °C for 2 h, respectively. For detection of IgA, the plates were washed with PBS-Tween 20 and then incubated with the horseradish peroxidase-coupled streptavidin (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) for 1 h at RT. After incubation, the color reaction was developed with tetramethylbenzidine (MOSS, Inc. Pasadena, MD), stopped with 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and measured by OD<sub>450–655</sub> on a microplate reader.

### 2.5. Isolation of splenocytes

Spleens were aseptically removed and placed in RPMI 1640 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) supplemented with 10% fetal bovine serum, 50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol and 1% antibiotic cocktail (Nacal tesque, Kyoto, Japan). Single-cell suspension of splenocytes was treated with ammonium chloride to lyse the red blood cells, washed, counted, and suspended in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum, 50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol, 1% antibiotic cocktail, 10  $\text{ml L}^{-1}$  of a 100 $\times$  nonessential amino acids solution (NEAA; Gibco-BRL), 1 mM sodium pyruvate, and 10 mM HEPES to a final concentration of  $1 \times 10^7$  cells  $\text{ml}^{-1}$ .

### 2.6. Antigen-specific cytokine responses

Antigen-specific cytokine responses were evaluated by culturing the splenocytes ( $5 \times 10^6$  cells  $\text{well}^{-1}$ ) stimulated with OVA (1  $\text{mg ml}^{-1}$ ) *in vitro*. Cells were incubated at 37 °C for 24 h (interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay), 48 h (IL-4 ELISPOT assay) or 72 h (multiplex cytokine assay).

### 2.7. Multiplex cytokine assay

Culture supernatants from *in vitro* unstimulated and OVA-stimulated cells were analyzed by the Bio-Plex Multiplex Cytokine Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions. The assay was read on a Luminex 100 (Austin, TX), and analyzed using Bio-Plex Manager software. The mean concentration of cytokines in supernatants from OVA-stimulated cells over the unstimulated background was then calculated.

### 2.8. Cytokine ELISPOT assay

An ELISPOT assay was performed to detect IFN- $\gamma$  and IL-4 producing cells. After 24 h (IFN- $\gamma$ ) or 48 h (IL-4) incubation at 37 °C, the plate was washed, and the IFN- $\gamma$  and IL-4 producing cells were measured by an ELISPOT assay kit (BD Biosciences), according to the manufacturer's instructions.

### 2.9. Fluorescence microscopy

BALB/c mice were administered intranasally with fluorescent isothiocyanate (FITC) labeled OVA (FITC-OVA; Molecular Probes-Invitrogen, Eugene, OR) at 50  $\mu\text{g mouse}^{-1}$  with or without mTNF-K90R (5  $\mu\text{g mouse}^{-1}$ ). After 15 min, the heads of the anesthetized mice were severed from the body. The heads were placed in fixative solution, and embedded in OCT compound (Sakura FineTek Japan Co. Ltd., Tokyo, Japan) and frozen tissue sections were prepared. FITC-OVA was observed under fluorescence microscopy ( $\times 20$ ).

### 2.10. Histopathological analysis

For three times immunization protocol, BALB/c mice were immunized with OVA with or without mTNF-K90R at a dose of 1  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$  or 25  $\mu\text{g}$  on days 0, 7 and 14.