

2009J2037B

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 19 年度～21 年度 総合研究報告書

研究代表者 吉岡 靖雄

平成 22 (2010) 年 3 月

## 目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	25
III. 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ものである。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明らかとした。更に、②強力な免疫活性化能を有する腫瘍壊死因子スーパーファミリーの中で、TNF $\alpha$ ・TL1A・APRIL が優れた粘膜ワクチンアジュバントであることを明らかとした。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、有効性・安全性に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・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

HIV に対する多剤併用療法は、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、HIV 治療・予防における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。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、さらにどのような生物学的特性を有するかなど全く不明である。

そこで本研究では、HIV に対する粘膜ワクチンの開発を最終目的として、サイトカインを粘膜ワクチンアジュバントに適用し、その有効性・安全性を評価した。

## 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、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(CT-B)をニワトリ卵白アルブミン (OVA、100 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 1 週間間隔で 3 回行った。

### サンプルの回収

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 µL PBS で洗浄後、14000 rpm、20 分、4 °C 遠心操作を行うことにより鼻腔洗浄液を調製した。
- 3) 膺洗浄液の回収 ; マウス膺腔内を 100 µL PBS で洗浄後、14000 rpm、20 分、4 °C 遠心操作を行うことにより膺洗浄液を調製した。
- 4) 糞便抽出液の調製 ; 100 mg/mL となるように PBS を加え、4 °C で 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。

### 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 °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 °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 °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ربت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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 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  $\mu$ M 2-ME、抗生物質を含む) で洗浄操作を 1 回行った後、NH<sub>4</sub>Cl 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  $\mu$ 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。

#### OVA 再刺激試験

最終免疫 7 日後のマウスから回収した脾細胞を 5 x 10<sup>6</sup> cells/well で 24 穴プレート、96 穴 ELISPOT 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、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で培養した (24 時間; IFN- $\gamma$  エリスポットアッセイ、48 時間; IL-4 エリスポットアッセイ、72 時間 Bio-Plex Multiplex Cytokine assay) 。

#### IFN- $\gamma$ , IL-4 ELISPOT assay

96 穴 ELISPOT プレートに capture antibody を添加して PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane 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 x 10<sup>6</sup> cells/well となるように ELISPOT plate に添加した。37 °C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で培養した後、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〜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。

#### Bio-Plex Multiplex Cytokine assay

フィルタープレートに 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-4, IL-5, GM-CSF, IL-10, IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) を定量した。

#### NALT (nasal associated lymphoid tissue) への抗原移行性評価

Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 OVA50  $\mu$ g を単独、あるいは、リジン欠損 TNF $\alpha$ 変異体 (5  $\mu$ g) をマウス経鼻より併用投与した。投与 15 分後、回収した頭部を 10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、EDTA/PBS にて脱灰後 (8 日間)、鼻腔凍結組織切片を作製した。NALT 組織における FITC 由来の蛍光を蛍光顕微鏡観察することにより、抗原の局在を解析した。

#### 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 時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。

#### 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。

### 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って評価した。

## C. 研究結果

まず、強い免疫活性化能を有する TNF スーパーファミリーサイトカインに焦点を絞り、最も強い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 (APRIL、BAFF、CD27L、CD30L、CD40L、EDA、GITRL、LIGHT、LT $\alpha$ 、OX40L、TL1A、TNF $\alpha$ 、TRAIL、TRANCE、TWEAK、4-1BBL) 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。まず、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 (Figure. 1A)。一方、TNF スーパーファミリーサイトカインでは、TNF $\alpha$ 、TL1A、APRIL 投与群で、OVA 単独投与群と比較して高い OVA 特異的 IgG 産生が認められた (Figure. 1A)。特に、APRIL、TL1A 投与群では、CTB と同等以上の高い抗体産生が認められた。他のサイトカインでは、OVA 単独投与群と同等もしくはそれ以下の抗体産生しか観察されなかった。次に、血清中 OVA 特異的 IgG1 産生量を検討した結果、OVA 特異的総 IgG 産生と同様に、TNF $\alpha$ 、TL1A、APRIL 投与群で、OVA 単独投与群よりも強い産生が認められ、特に TL1A 投与群では CTB と同等の強い抗体産生が

認められた (Figure. 1B)。また、4-1BBL や CD30L 投与群でも、OVA 単独投与群より強い抗体産生が認められた。血清中 OVA 特異的 IgG2a に関しては、どの群も低い産生しか認められなかったが、CTB、APRIL 投与群が高い産生を示した (Figure. 1B)。

次に、粘膜面における IgA 産生誘導能を評価した。投与部位である鼻腔の洗浄液中における OVA 特異的 IgA 量と共に、HIV 感染における主要経路である膣、肛門中の IgA 産生の指標として、膣洗浄液中、糞便中の OVA 特異的 IgA 量をそれぞれ測定した (Figure. 2)。その結果、血清中 IgG 産生と同様に、OVA 単独投与群では全く IgA 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 IgA 産生が認められた。TNF $\alpha$  では、鼻腔洗浄液、膣洗浄液、糞便中の全てで、OVA 単独投与群と比較して高い IgA 産生を示した。更に、TL1A も、鼻腔洗浄液、膣洗浄液、糞便中の全てで、OVA 単独投与群と比較して高い IgA 産生を示し、鼻腔洗浄液中 IgA 量は CTB に匹敵するほどであった。以上の結果から、TNF スーパーファミリーサイトカインの中でも、TNF $\alpha$ 、TL1A が、全身面での IgG 産生のみならず、粘膜面においても IgA 産生誘導能を有し、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。

更に、免疫マウスから回収した脾細胞を用いて各種 TNF スーパーファミリーサイトカインの免疫誘導特性を、サイトカインアレイ (Figure 3) を用いて解析した。その結果、TNF $\alpha$ 、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。以上の結果から、TNF スーパーファミリーサイトカインの中でも、特に TNF $\alpha$ 、TL1A が優れた粘膜ワクチンアジュバントになり得ることが示唆された。

そこで、我々がこれまでに独自の技術で創製したリジン欠損 TNF $\alpha$  変異体 (mTNF-K90R) を

用い、粘膜面および遠隔粘膜組織における、免疫誘導能と、モデル抗原の粘膜面における動態に及ぼす影響に関して、基礎的検討を行った。mTNF-K90R は、TNF $\alpha$ 中の 6 個のリジン残基が全て他のアミノ酸に置換され、かつ活性を完全に保持したリジン欠損 TNF $\alpha$ 変異体であり、in vitro における比活性が野生型より数倍向上しているために、通常の野生型 TNF $\alpha$  (wTNF) と比較して、より強いワクチン効果が得られるものと予想される。まず、この mTNF-K90R 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 特異的総 IgG、IgG1、および IgG2a の誘導を指標に検討した (Figure 4)。その結果、mTNF-K90R は wTNF 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。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 (Figure 5)。その結果、いずれの粘膜面においても mTNF-K90R は wTNF 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  $\mu$ g 投与群) 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。更に、免疫マウスから回収した脾細胞を用いて mTNF-K90R の免疫誘導特性を、サイトカインアレイ (Figure 6) および ELISPOT アッセイ (Figure 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、IL-2、IL-12、IFN- $\gamma$ 産生は wTNF と同程度であったのに対し、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していることが明らかとなった。また、ELISPOT アッセイの結果からも、IFN- $\gamma$ 産生脾細胞数は上昇していないにもかかわらず、IL-4 産生脾細胞数が上昇していることから、Th2 型の免疫を強く誘導することが明らかになった。さらに、mTNF-K90R を粘膜面に投与後の、粘膜面における動態を検討した結果 (Figure 8)、抗原モデ

ルとして用いた FITC ラベル化 OVA の粘膜組織下への移行が有意に促進されていることが明らかになった。

そこで、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 (Figure 9、10)。その結果、抗原単独投与群と比較して 5 $\mu$ g 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。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 $\mu$ g 投与のみならず、その 5 倍量の 25 $\mu$ 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 (Figure 11)。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。

これまでの結果から、TNF スーパーファミリーサイトカインは、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細胞傷害性 T 細胞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細胞傷害性 T 細胞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 TNF スーパーファミリーサイトカインと比較しても、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 (Figure 12)。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 (Figure 13)。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 (Figure 12)。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。

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、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。これまでの検討から、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 14)。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 15)。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。

#### 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、TNF スーパーファミリーサイトカイン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 TNF スーパーファミリーサイトカイン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 TNF スーパーファミリーサイトカイン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 TNF スーパーファミリーサイトカインを粘膜ワクチンとして応用するため、16 種類の TNF スーパーファミリーサイトカインの中から、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、TNF $\alpha$ 、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、2002年に発見されたサイトカインであり、主にマクロファージ、樹状細胞から産生され、T 細胞刺激における共刺激分子として働くことが知られている。クローン病患者の疾患部位で高発現していることから、粘膜面での免疫活性化にも重要な働きを持つと考えられている。しかし、TL1A の粘膜ワクチンアジュバントへの適用は皆無であり、IgA 産生誘導メカニズムも全く明らかになっていない。今後、TL1A の IgA 産生メカニズムを詳細に検討する必要があると考えられる。

また、リジン欠損 TNF $\alpha$  変異体 (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が示唆された。この原因として、1) 本来的に粘膜面における TNF $\alpha$  の生理活性と、直接 *in vivo* に投与した場合の TNF $\alpha$  の役割が異なる、2) 野生型 TNF $\alpha$  (wTNF) よりも、*in vitro* の活性が数倍向上している、3) リジンが欠損していることで、本来有していた TNF $\alpha$  の性状とは異なるため、動態特性が変化し、粘膜面での TNF $\alpha$  の役割が変化した、などいくつかの可能性が考えられるが、本研究結果からは推測の域をでない。また、今回使用した mTNF-K90R は、粘膜面における抗原の粘膜下組織への移行を促進したことから、注射による投与とは異なるメカニズムで、優れたワクチンアジュバント効果を示した可能性もある。今後は、リジン欠損 TNF $\alpha$  変異体が、なぜ強い粘膜ワクチンアジュバントとして有効であったのか、そのメカニズムを解析することで、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、mTNF-K90R や TNF スーパーファミリーサイトカインでは 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 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、CTL をも誘導し得る可能性が示された。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。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

・現在市販されている 16 種類の TNF スーパーファミリー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最も有効であることが示唆される TNF $\alpha$ 、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。

・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-K90 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。

・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。

・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。

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. 研究発表

### ①論文発表

1. Shibata H, Kamada H, Kobayashi-Nishibata K, Yoshioka Y, Nishibata T, Abe Y, Nomura T, Nabeshi H, Minowa K, Mukai Y, Nakagawa S, Mayumi T, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Role of amino acid residue 90 in bioactivity and receptor binding capacity of tumor necrosis factor mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1774(8): 1029-35, 2007.

2. Shibata H, Yoshioka Y, Ohkawa A, Minowa K, Mukai Y, Abe Y, Taniai M, Nomura T, Kayamuro H, Nabeshi H, Sugita T, Imai S, Nagano K, Yoshikawa T, Fujita T, Nakagawa S, Yamamoto A, Ohta T, Hayakawa T, Mayumi T, Vandenabeele P, Aggarwal BB, Nakamura T, Yamagata Y, Tsunoda S, Kamada H, Tsutsumi Y. Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist. *J Biol Chem.* 283(2): 998-1007, 2008.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. 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

### 国内

1. Kayamuro H, **Kamada H**, **Yoshioka Y**, Yoshikawa T, **Katayama K**, Hiroi T, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Intranasal immunization with mutant TNF induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice. 日本免疫学会、2007年、東京。
2. 野村鉄也、柴田寛子、阿部康弘、蓑輪恭子、鍋師裕美、中川晋作、**吉岡靖雄**、角田慎一、**鎌田春彦**、堤 康央. 抗腫瘍活性に優れた TNF レセプター指向性変異体の創製. DDS 学会、2007年、熊本。
3. **鎌田春彦**、**吉岡靖雄**、柴田寛子、阿部康弘、野村鉄也、蓑輪恭子、鍋師裕美、中川晋作、角田慎一、堤 康央. 腫瘍壊死因子- $\alpha$  の活性に及ぼす 90 番目のアミノ酸の影響に関する検討. 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会、2007年、東京。
4. 萱室裕之、**吉岡靖雄**、**鎌田春彦**、**形山和史**、阿部康弘、野村鉄也、廣井隆親、吉川友章、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としての応用. 日本薬学会、2008年、横浜。
5. 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、東京。
6. 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、岡山。
7. **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、大阪。
8. 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、京都。
9. **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、京都。
10. 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、京都。
11. 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、京都。
12. 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、2009年、東京.

13. 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.

#### 海外

1. Minowa K, **Yoshioka Y**, Abe Y, Nomura T, Nabeshi H, Kayamuro H, Shibata H, Fujita T, Yamamoto A, Tsunoda S, **Kamada H**, Tsutsumi Y. Creation of TNF receptor1-selective mutant TNF using phage display system. The 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society. October 2007, San Francisco (USA).
2. **Yoshioka Y**, Morishige T, Watanabe H, Tanabe A, Abe Y, Mukai Y, **Kamada H**, Okada N, Nakagawa, Tsutsumi Y. Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF superfamily with full bioactivity. The 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society. October 2007, San Francisco (USA).
3. Nomura T, Shibata H, Abe Y, Minowa K, Mukai Y, **Yoshioka Y**, Nakagawa S, Tsunoda S, **Kamada H**, Tsutsumi Y. Creation of bioactive Lysine-deficient tumor necrosis factor for antitumor therapy. HUPO 6th Annual World Congress. October 2007, Seoul (South Korea).
4. 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/Québec (CANADA).

5. **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 (Taiwan).
6. 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, April 2009, Madrid (Spain).
7. 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, April 2009, Madrid (Spain).
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), October 2009, Lisbon (Portugal).

#### G. 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

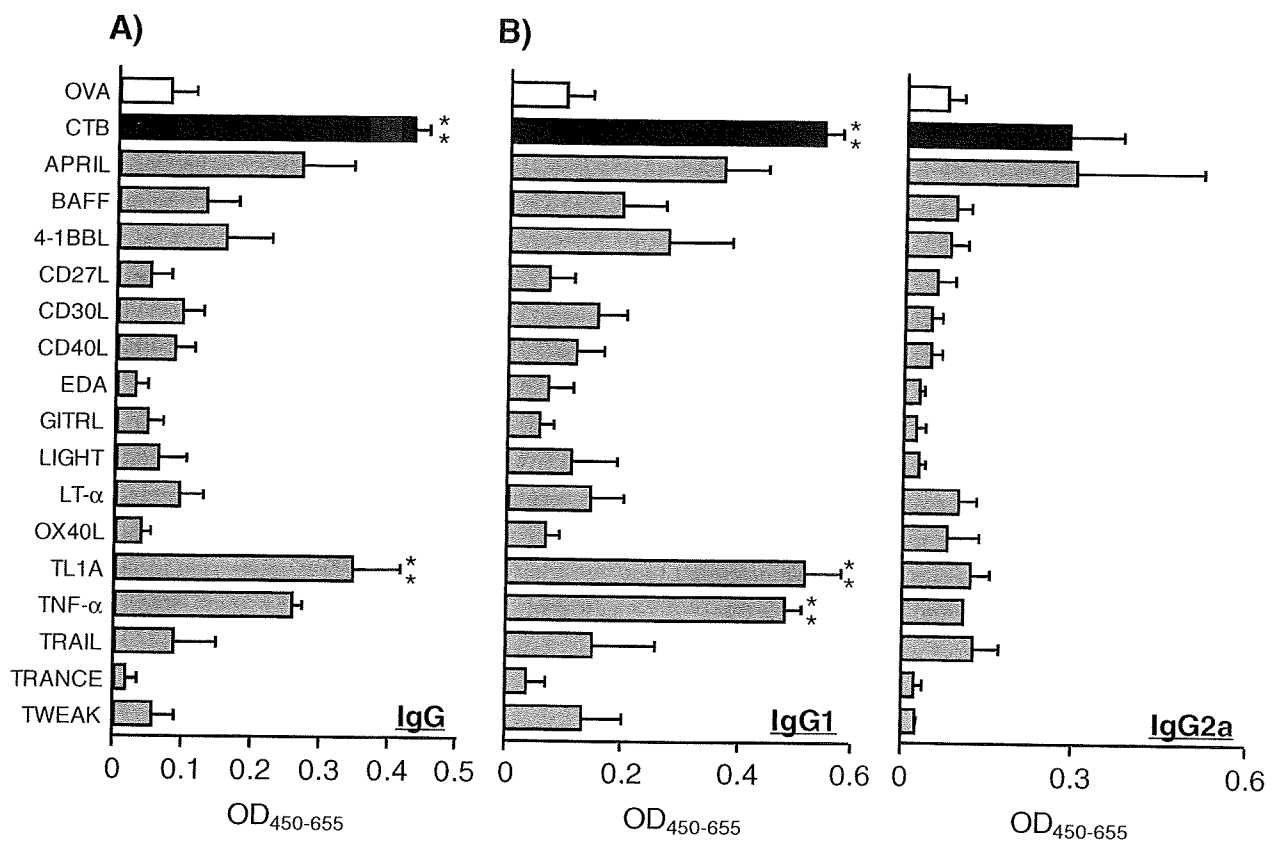


Figure 1. Serum OVA-specific IgG responses by nasal immunization with OVA plus TNF superfamily cytokines. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus CTB, or OVA plus each TNF superfamily cytokine three times at weekly intervals. Serum was collected 7 days after the last immunization and analyzed by ELISA for OVA-specific (A) total IgG, (B) IgG1 and (C) IgG2a responses at a 500 fold serum dilution. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 5; \*\* P < 0.01 versus value for OVA alone treated group by ANOVA).

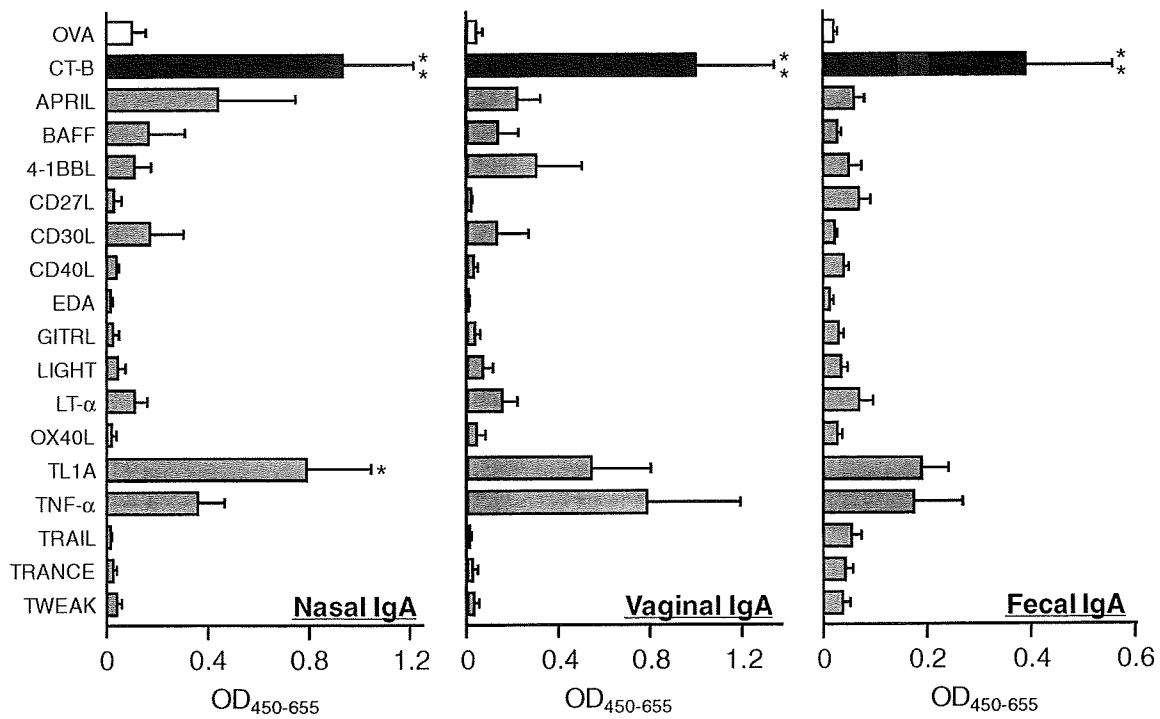


Figure 2. OVA-specific mucosal IgA responses by nasal immunization with OVA plus TNF superfamily cytokines. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus CTB, or OVA plus each TNF superfamily cytokines once a week for 3 weeks. Mucosal secretions were collected seven days following the last immunization and then OVA-specific IgA responses in nasal wash, vaginal wash and fecal extract were determined by ELISA. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 5; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  versus value for OVA alone treated group by ANOVA).

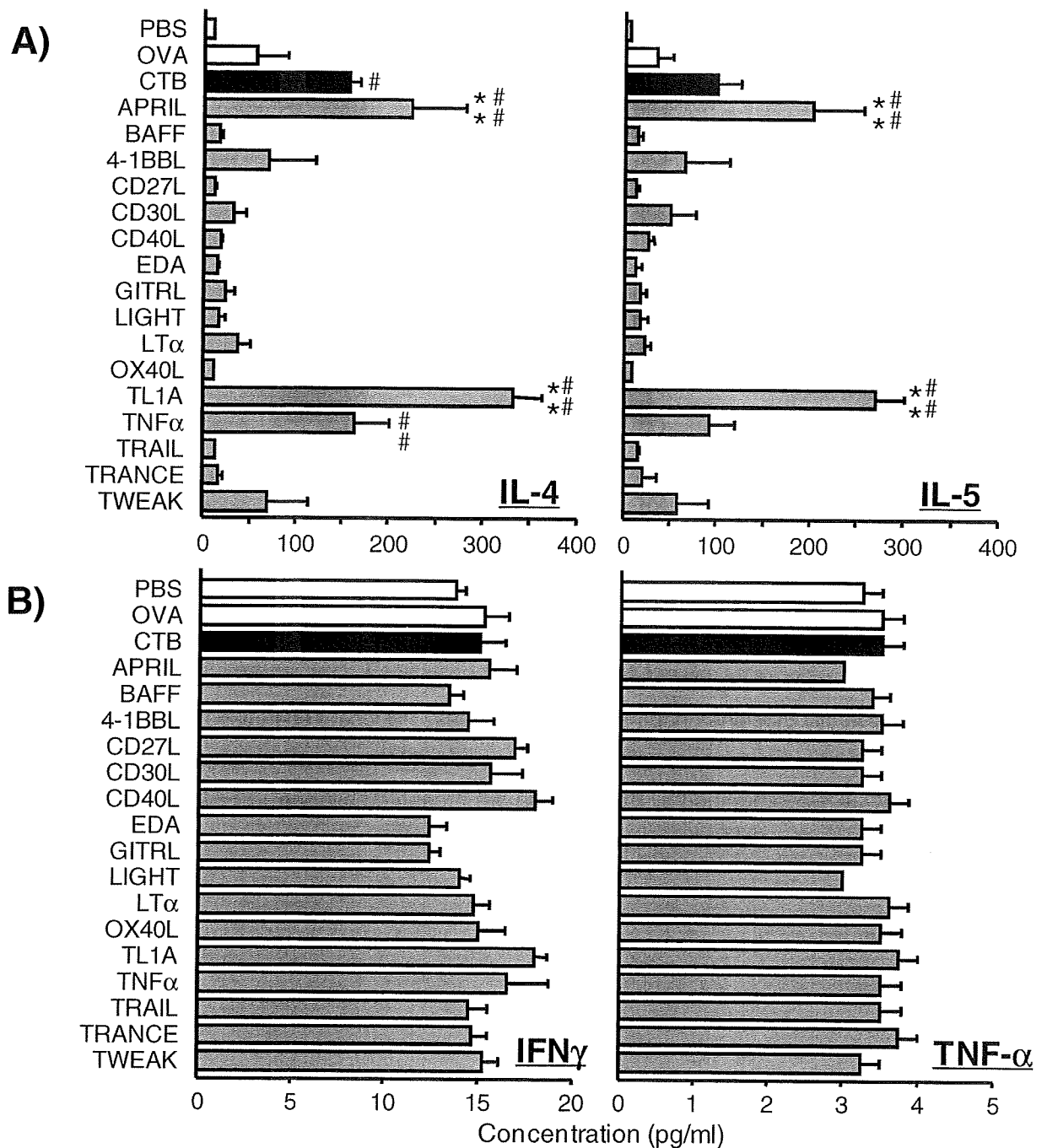


Figure 3. Cytokine responses induced by nasal immunization with OVA plus adjuvants. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus CTB, OVA plus each TNF superfamily cytokine three times at weekly intervals. Seven days after the last immunization, splenocytes from each group were cultured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



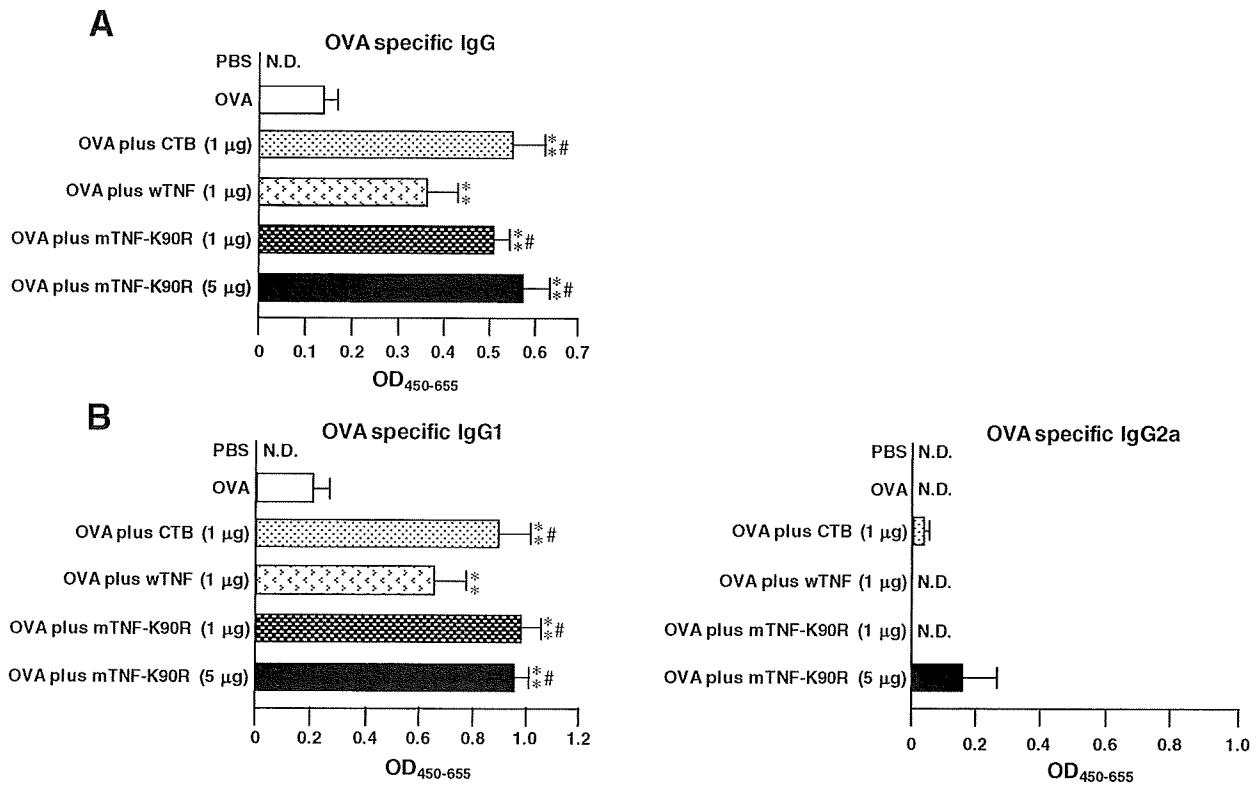


Figure 4. Serum OVA-specific IgG Abs response after nasal immunization with OVA plus adjuvant. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus CTB, OVA plus wTNF- $\alpha$  or OVA plus mTNF-K90R once a week for three consecutive weeks. Serum was collected 1 wk after the last immunization and analyzed by ELISA for OVA-specific IgG (A) and IgG subclass (B) at a 1:100 dilution of serum. Data represents the mean of absorbance 450 nm (reference wave, 655 nm). N.D; not detected. Data are presented as means  $\pm$  SEM (n = 7; \*\*  $P < 0.01$  versus value for OVA alone treated group by ANOVA; #  $P < 0.05$  versus value for OVA plus wTNF- $\alpha$  treated group by ANOVA).

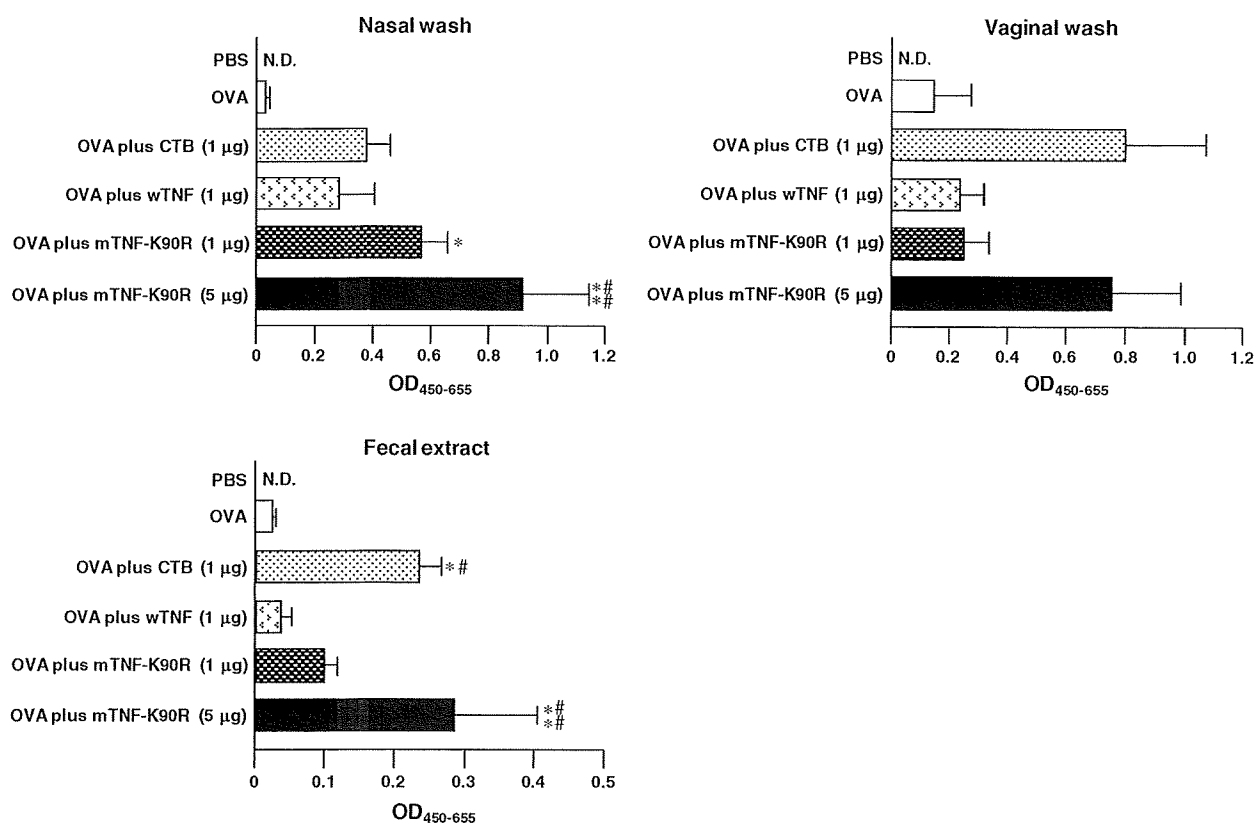


Figure 5. OVA-specific mucosal IgA Abs response after nasal immunization with OVA plus adjuvant. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus CTB, OVA plus wTNF- $\alpha$  or OVA plus mTNF-K90R once a week for three consecutive weeks. Mucosal secretions was collected 1 wk after the last immunization and OVA-specific IgA Abs responses in nasal wash, vaginal wash and fecal extract were determined by ELISA at a 1:8 dilution. Data represents the mean of absorbance 450 nm (reference wavelength, 655 nm). Data are presented as means  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  versus value for OVA alone treated group by ANOVA; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  versus value for OVA plus wTNF- $\alpha$  treated group by ANOVA).

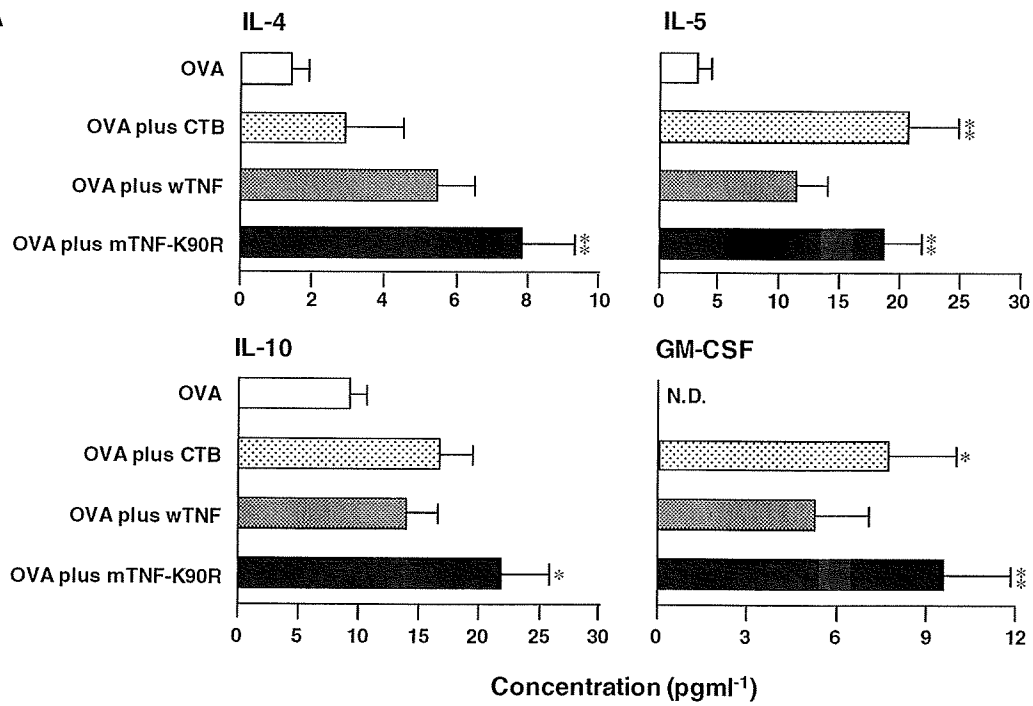
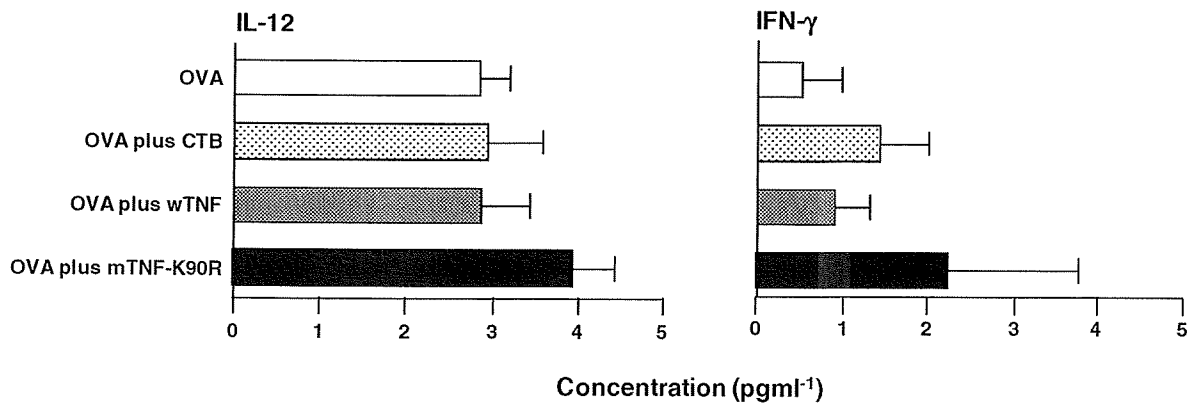
**A****B**

Figure 6. Cytokine response induced after nasal immunization with OVA plus adjuvant. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus 1  $\mu\text{g}$  CTB, OVA plus 1  $\mu\text{g}$  wTNF- $\alpha$  or OVA plus 1  $\mu\text{g}$  mTNF-K90R once a week for three consecutive weeks. One wk after the last immunization, splenocytes from each group were cultured with 1  $\text{mgml}^{-1}$  OVA. Culture supernatants were harvested following 3 days of incubation, and OVA-specific Th2-type (A) and Th1-type (B) cytokine productions in culture supernatant were analyzed by using the Bio-Plex Multiplex Cytokine Assay. Data are presented as means  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  versus value for OVA alone treated group by ANOVA).

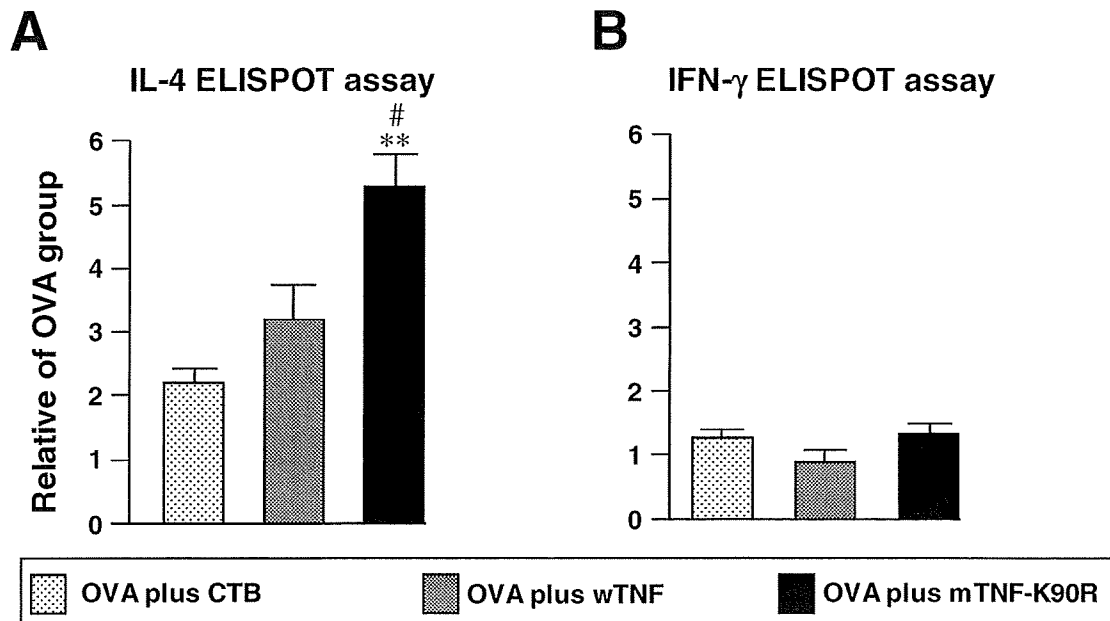


Figure 7. Analysis of OVA-specific cytokine-secreting cells in mice nasally immunized with OVA plus adjuvant. BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus 1  $\mu\text{g}$  CTB, OVA plus 1  $\mu\text{g}$  wTNF- $\alpha$  or OVA plus 1  $\mu\text{g}$  mTNF-K90R once a week for three consecutive weeks. One week after the last immunization, splenocytes from each group were cultured with 1  $\text{mgml}^{-1}$  OVA. The levels of OVA-specific IL-4 (A) and IFN- $\gamma$ -producing cells (B) were examined by individual cytokine-specific ELISPOT assay. Data are presented as means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ; \*\*  $P < 0.01$  versus value for OVA plus CTB treated group by ANOVA; #  $P < 0.05$  versus value for OVA plus wTNF- $\alpha$  treated group by ANOVA).