

virion production in a cell-independent and codon triplet-dependent manner. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 9, 2010, Awaji, Japan.

- 14) 三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫、野間口雅子 HIV-1 インテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) における 1 塩基置換によるウイルス増殖促進機構の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7 日、徳島.
- 15) 土肥直哉、齊藤 暁、明里宏文、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫、野間口雅子 サル指向性 HIV-1 CA の 1 アミノ酸変異はサル細胞での増殖を促進する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 8 日、徳島.
- 16) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 アカゲザルに存在する抗 HIV-1 因子 TRIM5 α と tetherin を回避するサル細胞指向性 HIV-1 の構築. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 8 日、徳島.
- 17) 三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫、野間口雅子 HIV-1 増殖過程におけるインテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) の影響. (ワークショップ) 第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 24 日、東京.
- 18) 齊藤 暁、河野 健、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、安富康宏、俣野哲朗、明里宏文 カニクイザル TRIM5 allele がサル指向性 HIV-1 の増殖に与えるインパクト. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 24 日、東京.
- 19) 野間口雅子、齊藤 暁、明里宏文、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 サル細胞で効率よく増殖する HIV-1 の構築—アカゲザル TRIM5 α と tetherin による抑制の回避—. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 24 日、東京.
- 20) 足立昭夫、野間口雅子 HIV-1 宿主域を規定する細胞因子とウイルス蛋白質.

(シンポジウム 4) 第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 25 日、東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし.
2. 実用新案登録
なし.
3. その他
なし.

エイズ発症サルモデル確立のためのHIV-1病原性 クローンの構築：遺伝子工学的改変と細胞馴化による ウイルスの変異・進化の戦略的利用

所 属 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
研究者 野間口 雅子

研究要旨

サル病原性 HIV-1 の構築は、動物モデルの確立に必須である。本研究では、サル TRIM5 α に抵抗性を示す HIV-1 CA の構築に取り組み、サル細胞での増殖効率が著しく向上したウイルスクローンを得た。HIV-1 病原性クローンの構築が大きく進展した。

A. 研究目的

HIV-1/エイズ霊長類モデルは、(1) 個体レベルでの HIV-1 複製および病原性発現機構の解析や、(2) HIV-1 感染制御のためのワクチン・新薬の評価に必須である。しかし、HIV-1 は宿主域が狭く実用的な動物モデルが存在しない。本研究室では、プロトタイプサル指向性 HIV-1 (NL-DT5R; *vif* の全遺伝子と CA の helix 4/5 loop をサル病原性標準株 SIVmac239 の対応領域に置換) を世界に先駆けて作製した。NL-DT5R はブタオザルおよびカニクイザル細胞・個体で増殖可能となったが、SIVmac239 よりもサル細胞での増殖効率が悪く、サル個体でのウイルス血症は一過性で病原性を示さなかった。HIV-1 病原性分子クローン構築のためには、まず、SIVmac239 のサル細胞での複製レベルを指標として、これに匹敵する増殖能を有するクローンを取得する必要がある。前年度に、サル細胞での馴化、遺伝子工学的改変や構造解析を行い、サル細胞での増殖効率が向上した MN4Rh-3 を得た。しかし、MN4Rh-3 はサル TRIM5 α の抑制を完全に回避していないことが分かった。そこで、本年度は、サル TRIM5 α に抵抗性を示す HIV-1 CA を構築し、サル細胞での増殖効率向上を図ることを目的とした。

B. 研究方法

1. サル TRIM5 α に抵抗性を示す HIV-1 CA の構築：HIV と SIVmac239 の CA のアミノ酸配列および構造を比較し、MN4Rh-3 の CA を遺伝子工学的に改変した。遺伝子工学的改変は定法に従った。
2. ウイルス調製とウイルス量の測定：ウイル

スストックは、ヒト 293T 細胞へのリン酸カルシウム法によるトランスフェクションで調製した。ウイルス量は逆転写酵素活性により測定した。

3. ウイルス感染実験：カニクイザル由来 HSC-F 細胞およびアカゲザル由来の HSR5.4 細胞と M1.3S 細胞を使用した。HSC-F 細胞は 10%FCS 加 RPMI 培地、HSR5.4 細胞と M1.3S 細胞とは 10%FCS/IL-2 加 RPMI 培地で培養した。サル細胞での感染実験は IL-2 存在下で行った。
4. TRIM5 α 感受性試験：TRIM5 α (*Mamu-3* と *Mamu-4*) はアカゲザル由来 HSR1.4 細胞から PCR 法で増幅した。TRIM5 α 恒常発現細胞株は、ネコ由来 CRFK 細胞に遺伝子導入後 G418 による選択とクローニングを行い樹立した。カニクイザル TRIM5 α 恒常発現 CRFK 細胞は本研究室で既に樹立されていたものを用いた。これらの細胞に対するウイルス感染価は VSV-G シュードタイプウイルスを用いたルシフェラーゼアッセイで定量した。リコンビナントセンダイウイルスを用いた TRIM5 α 発現系による感受性試験は、大阪大学微生物病研究所/塩田教授、中山博士らとの共同研究により行った。
5. CA の構造解析は、MOE ver. 2008.10 を用いてホモロジーモデリングにより行った(国立感染症研究所/佐藤博士、横山博士との共同研究)。

(倫理面への配慮)

ヒトおよび動物対象の実験は含まれていない。組換えウイルスを用いる実験については、徳島大学遺伝子組換え実験安全管理規則を遵守してその安全管理に充分配慮するとともに、

遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づいた手続きを行なった。

C. 研究結果

1. HSR5.4 細胞でのウイルス馴化実験において、馴化型ウイルス (③-25) が出現した (図 1)。このウイルスの CA に増殖適応変異を見出した。CA 構造解析により、増殖適応変異 (細矢印) とは別に、サル細胞での増殖効率向上に寄与する CA の 1 アミノ酸 (太矢印) を新たに同定した (図 2)。この変異を導入した HIV-1 クローン (MN4Rh-3) は、HSC-F 細胞および HSR5.4 細胞での増殖効率が著しく向上していた (図 3)。
2. MN4Rh-3 の TRIM5 α および TRIMCyp (サル細胞に存在する抗 HIV-1 CA 因子群) に対する感受性を二種類の方法で調べた。その結果、MN4Rh-3 はカニクイザル TRIM5 α に抵抗性を示すが (図 4)、その抑制を完全には回避していないこと、カニクイザル TRIMCyp の抑制は完全に回避していることが分かった。また、これまでに構築したサル指向性 HIV-1 は、アカゲザル TRIM5 α に対しては全く抵抗性を示さないことがわかった (図 4)。一方、MN4Rh-3 の TRIM5 α に対する抵抗性は、MN4S (MN4Rh-3 において CA の 1 アミノ酸変異を導入する前のクローン) と同程度であった。これは、MN4Rh-3 に導入された CA の 1 アミノ酸変異が TRIM5 α 抑制の回避に寄与していないことを示している。
3. MN4Rh-3 を用いてカニクイザル個体感染実験を行った。TRIM5 α ホモ個体群では MN4Rh-3 の増殖はほとんど認められなかった。しかし、MN4Rh-3 を接種した TRIMCyp ホモ個体群では、急性感染ピーク時のウイルス量が MN4S と比較すると 10 倍程度上昇していた。(京都大学/明里教授らとの共同研究)。個体感染実験の結果は、上述の *in vitro* での結果とよく一致しており、MN4Rh-3 は TRIM5 α の抑制は回避していないが、TRIMCyp ホモ個体での増殖効率が向上していることが確かめられた。
4. 以上の結果は、TRIM5 α が *in vivo* でのウイルス増殖を規定する因子の 1 つである

ことを示している。そこで、サル TRIM5 α に抵抗性を示す HIV-1 CA の構築を試みた。HIV と SIVmac239 の CA のアミノ酸配列を比較し、MN4Rh-3 の CA を遺伝子工学的に改変した。CA 改変体の増殖効率を M1.3S 細胞を用いて調べた。M1.3S 細胞は、アカゲザル TRIM5 α 多型のうち *mamu-1* と *mamu-3* を持っており HIV-1 複製抑制能が非常に強い細胞株である。まず、M1.3S 細胞での増殖効率を増加させる 1 アミノ酸変異を同定した。続いて、HSR5.4 細胞での馴化で同定した CA の増殖適応変異を導入した。さらに、HIV と SIVmac239 の CA の構造比較からサル細胞での増殖効率向上に寄与するアミノ酸を予測した。その結果、これまでに構築したサル指向性 HIV-1 よりも、M1.3S 細胞で著しく増殖効率が向上した HIV-1 クローン (CA+3/4Rh および CA+4/4Rh) を得た (図 5)。CA+4/4Rh のアカゲザル TRIM5 α (*mamu-3*) に対する抵抗性を調べた結果、このウイルスクローンが SCA (SIVmac239 の CA を持つポジティブコントロール) と同程度の抵抗性を示すことが分かった (図 6)。CA+3/4Rh および CA+4/4Rh は、HSC-F 細胞における増殖効率も顕著に増強されており、カニクイザル個体感染実験の結果が期待される。

D. 考察

本研究では、サル病原性 HIV-1 クローンの構築に向け、サル細胞での HIV-1 クローンの増殖効率の向上を目指し、サル指向性 HIV-1 CA の改変を試みた。サル細胞での馴化、遺伝子工学的改変や構造解析を適宜組み合わせ、サル TRIM5 α 抑制に抵抗性を示す HIV-1 CA の構築に成功した。

MN4Rh-3 における CA の 1 アミノ酸変異の導入は、サル TRIM5 α 抑制の回避には寄与していなかったが、サル細胞および個体での増殖を促進した。このことは、TRIM5 α /TRIMCyp 以外にも HIV-1 CA をターゲットとする何らかの因子が存在する可能性を示唆している。MN4Rh-3 のサル個体感染実験の結果から、サル指向性 HIV-1 のウイルス複製を規定する因子の 1 つが TRIM5 α であることが明らかになった。サル TRIM5 α の抑制を回避できれば、サル指向性 HIV-1 のサル個体での増殖効率は著しく改善

されることが予測される。本研究で得られた CA+3/4Rh および CA+4/4Rh は、サル病原性 HIV-1 クロンの構築および HIV-1 感染サルモデルの確立のための基盤材料となると期待される。また、サル TRIM5 α に強い抵抗性を示す HIV-1 CA の構築により、不明な点の多い TRIM5 α による抑制機構の解析と、作用機序に基づく HIV-1 複製制御に向けた臨床応用への展開も可能になると考えられる。

E. 結論

本研究では、サル TRIM5 α の抑制を回避し、サル細胞での増殖効率が格段に向上した CA+3/4Rh および CA+4/4Rh の構築に成功した。今後は、これらのウイルスのサル個体感染実験を進めていきたいと考えている。一方、種間バリアとなる他の抗 HIV-1 因子（テザリンなど）が近年報告されており、CA+3/4Rh および CA+4/4Rh の更なる改変が必要になるかもしれない。このような課題を含めて、サル病原性 HIV-1 構築をクリアし、感染個体での HIV-1 複製・病原性発現機構および HIV-1 の個体内進化・多様性に関する実験的解析に取り組んでいきたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jere, A., Fujita, M., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2010. Role of HIV-1 Nef protein for virus replication *in vitro*. *Microbes and Infection* 12: 65-70.
- 2) Yamashita, T., Nomaguchi, M., Miyake, A., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2010. Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity. *Microbes and Infection* 12: 166-171.
- 3) Nagao, T., Yamashita, T., Miyake, A., Uchiyama, T., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Different interaction between HIV-1 Vif and its cellular target proteins APOBEC3G/APOBEC3F. *Journal of Medical Investigation*

57:89-94.

- 4) Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. *Reviews in Medical Virology* 20: 68-76.
 - 5) Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Virology as biosystematics: towards understanding the viral infection biology. *Frontiers in Microbiology* 1: 2. doi: 10.3389/fmicb.2010.00002.
 - 6) Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2010. Growth ability in various macaque cell lines of HIV-1 with simian cell-tropism. *Journal of Medical Investigation* 57: 284-292.
 - 7) Nomaguchi, M., Doi, N., Fujiwara, S., Fujita, M., and Adachi, A. 2010. Site-directed mutagenesis of HIV-1 *vpu* gene demonstrates two clusters of replication-defective mutants with distinct ability to down-modulate cell surface CD4 and tetherin. *Frontiers in Microbiology* 1: 116. doi: 10.3389/fmicb.2010.00116.
 - 8) Saito, A., Nomaguchi, M., Iijima, S., Kuroishi, A., Yoshida, T., Lee, Y.-J., Hayakawa, T., Kono, K., Nakayama, E. E., Shioda, T., Yasutomi, Y., Adachi, A., Matano, T., and Akari, H. 2011. Improved capacity of a monkey-tropic HIV-1 derivative to replicate in cynomolgus monkeys with minimal modifications. *Microbes and Infection* 13: 58-64.
- ### 2. 学会発表
- 1) Miyake, A., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. Analysis of growth adaptive mutations in HIV-1 genome identifies a pol-integrase region that enhances virion production in a cell-independent and codon triplet-dependent manner. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 9, 2010, Awaji,

Japan.

- 2) 三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫、野間口雅子 HIV-1 インテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) における 1 塩基置換によるウイルス増殖促進機構の解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 7 日、徳島.
- 3) 土肥直哉、齊藤 暁、明里宏文、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫、野間口雅子 サル指向性 HIV-1 CA の 1 アミノ酸変異はサル細胞での増殖を促進する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 8 日、徳島.
- 4) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 アカゲザルに存在する抗 HIV-1 因子 TRIM5 α と tetherin を回避するサル細胞指向性 HIV-1 の構築. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 8 日、徳島.
- 5) 三宅在子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫、野間口雅子 HIV-1 増殖過程におけるインテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) の影響. (ワークショップ) 第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 24 日、東京.
- 6) 齊藤 暁、河野 健、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、安富康宏、俣野哲朗、明里宏文 カニクイザル TRIM5 allele がサル指向性 HIV-1 の増殖に与えるインパクト. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 24 日、東京.
- 7) 野間口雅子、齊藤 暁、明里宏文、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 サル細胞で効率よく増殖する HIV-1 の構築—アカゲザル TRIM5 α と tetherin による抑制の回避—. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 24 日、東京.
- 8) 足立昭夫、野間口雅子 HIV-1 宿主域を規定する細胞因子とウイルス蛋白質. (シンポジウム 4) 第 24 回日本エイズ学会学術集会、2010 年 11 月 25 日、東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

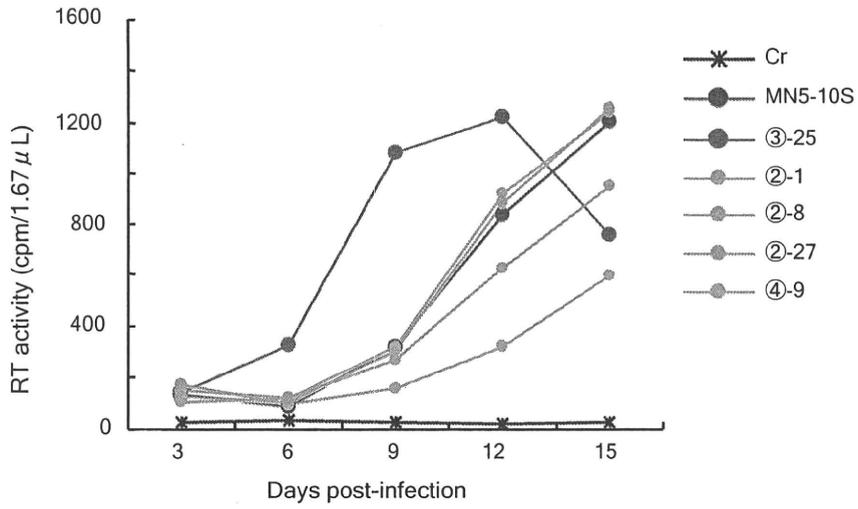


図1. HSR5.4馴化型ウイルス由来分子クローンの増殖特性

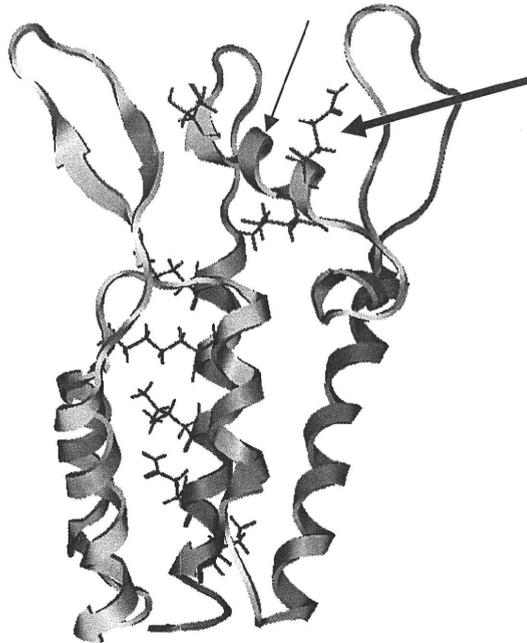


図2. MN4-5SのCA-NTD構造

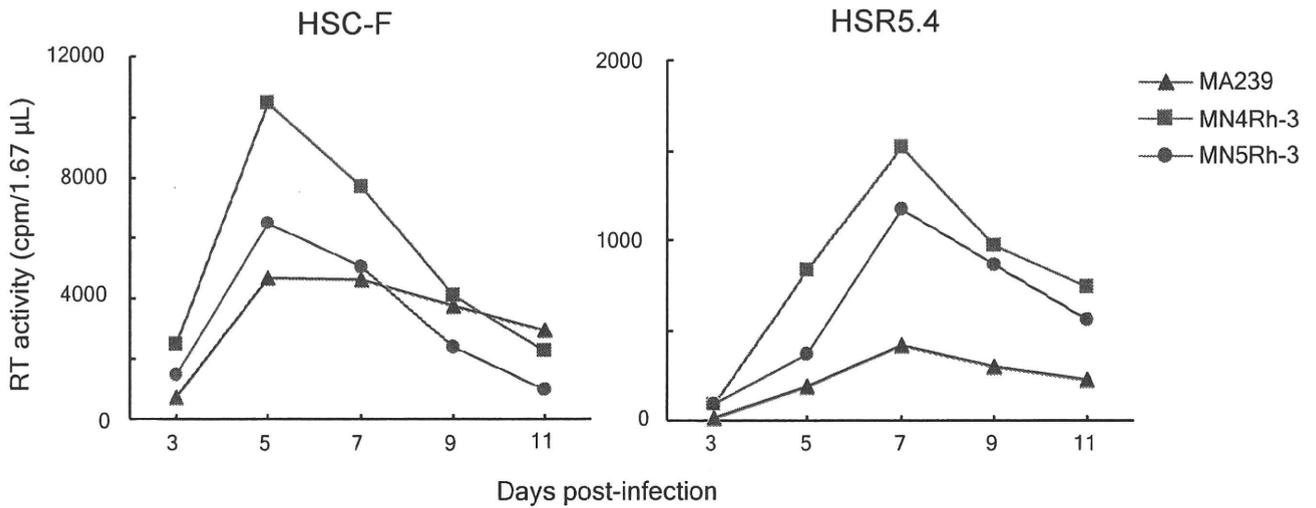


図3. サル細胞でのMN4Rh-3/MN5Rh-3とMA239との増殖特性比較

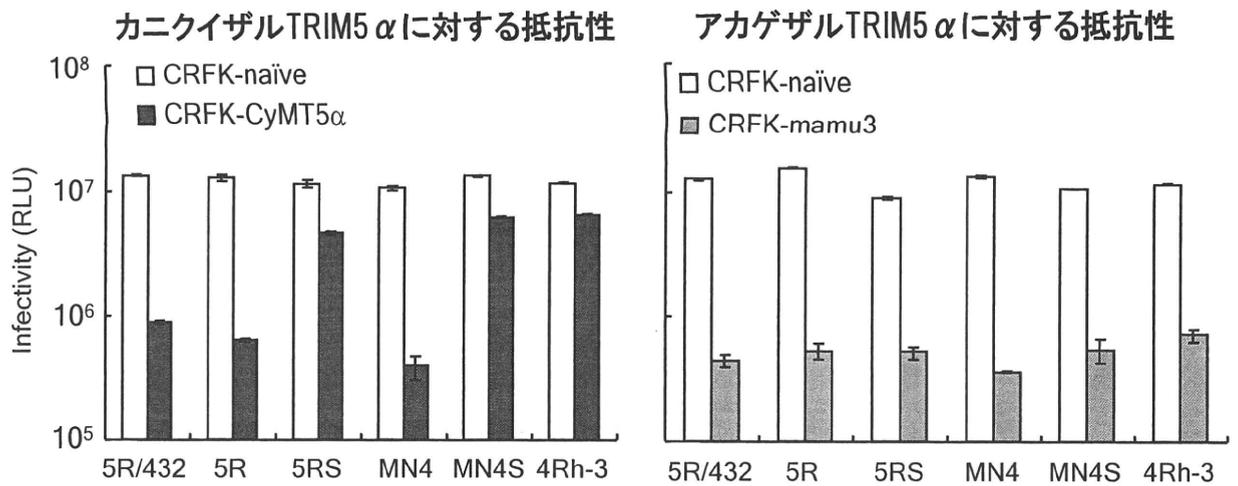


図4. サル指向性HIV-1のサルTRIM5 α に対する抵抗性

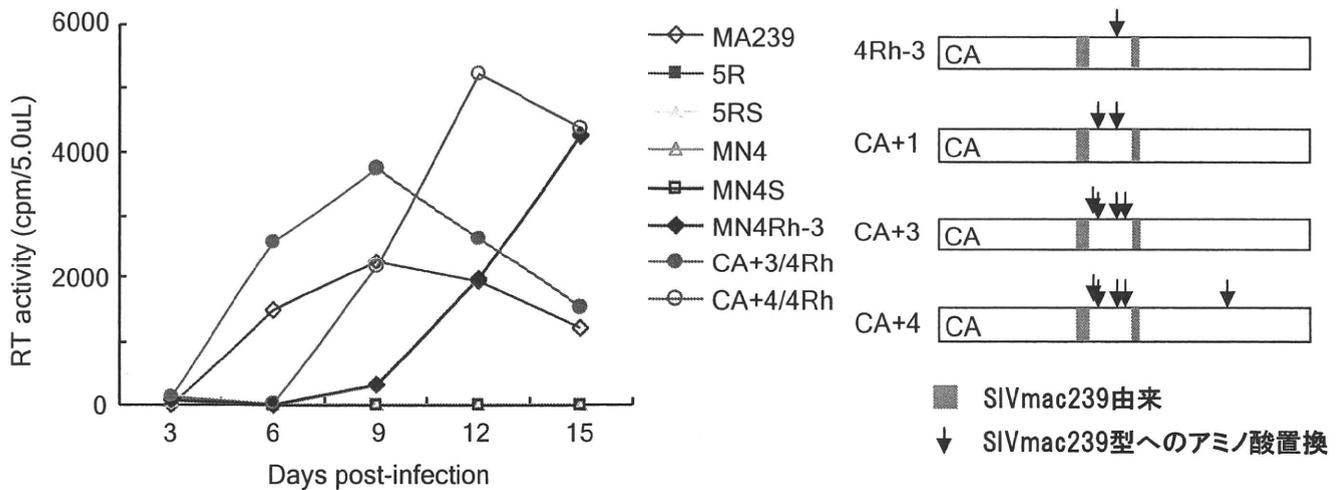


図5. MN4Rh-3 Gag-CA改変体のM1.3S細胞での増殖特性

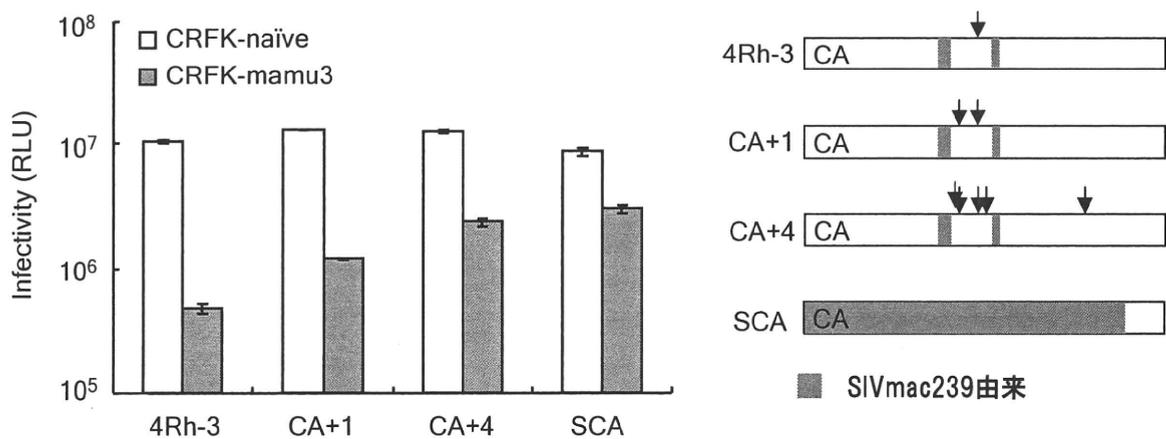


図6. MN4Rh-3 Gag-CA改変体のアカゲザルTRIM5 α に対する抵抗性

密着結合蛋白質を利用した経鼻エイズワクチン基盤技術の開発

所属 大阪大学大学院 薬学研究科

代表研究者 近藤 昌夫

研究期間 平成 21 年 4 月～平成 23 年 3 月

研究要旨

周知のように、単回投与で病原体特異的かつ長期にわたる免疫反応を惹起可能であること、副作用がほとんどないことから、有効かつ安心・安全な次世代エイズ治療法としてワクチンが注目されている。とりわけ粘膜ワクチンは、①HIV の初発感染部位（粘膜面）における感染予防作用、②体内に侵入した HIV に対する体液性免疫誘導作用、③細胞障害性 T 細胞活性化による HIV 感染細胞排除活性を併せ持つことから、夢のエイズ治療薬として注目されているものの、粘膜免疫組織に効率的に抗原を送達する技術開発の遅延から、エイズ粘膜ワクチンの開発は遅々として進展していない。

本研究では、粘膜免疫組織に高発現している claudin-4 (CL4) に着目し、独自の CL4 binder を有効活用することでエイズワクチン開発に資する経鼻ワクチン基盤技術の確立を試み、CL4 を標的とした粘膜ワクチンの proof of concept を確立し、さらに、粘膜ワクチン特性に優れた新規 CL4 binder の創製に成功した。本成果を基に、今後は疾病抗原を用いた粘膜ワクチン活性解析を進める予定である。

A. 研究目的

本研究は、独自かつ世界唯一の claudin-4 (CL4) binder 技術を有効活用することにより初めての経鼻エイズワクチン基盤技術を創出し、大阪大学が中核となる先端医療開発特区（スーパー特区）と密接に連携し、本課題終了後可及的速やかに実用化研究へ展開することを目的とする。

周知のように、粘膜ワクチンはヒト免疫不全ウイルス (HIV) の侵入門戸である粘膜面での HIV 侵入防御網構築、体内に侵入した HIV の排除機構の活性化能を併せ持つことから、夢の HIV 感染予防・治療薬として期待されているものの、粘膜免疫組織に効率良く抗原をデリバリするシステムの開発遅延と相俟って、有効かつ安全な粘膜ワクチンの創出は立ち遅れている。最近粘膜免疫組織を覆う上皮細胞に密着結合構成蛋白質 CL4 が高発現していることが示され、CL4 を利用した粘膜免疫組織への抗原デリバリ法が提唱された。しかしながら、CL は抗原性が低く CL4 の細胞外領域に対する抗体

作製は遅々として進展しておらず、特許および論文を見ても分かるように CL4 を利用した粘膜ワクチン開発は皆無である。

これまでに当研究グループでは、CL4 binder (C-CPE、ウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体結合ドメイン) とトキシンの融合蛋白質が CL4 発現細胞特異的に細胞障害性を発揮することを見出し、C-CPE が CL4 ターゲティング分子として利用できること明らかにしていた (J Pharmacol Exp Ther, 2006 他)。さらに、C-CPE を経鼻投与することでペプチド性医薬品の粘膜吸収が促進することを見出し、CL4 binder を利用した経鼻デリバリの可能性を見出している (Biochem Pharmacol, 2010)。

これら独自の研究成果を踏まえ、本研究では、3 年計画で CL4 binder を利用した経鼻ワクチンを開発することを目的とし、これまでに①鼻粘膜免疫組織 (NALT) における CL4 発現を解析し、②卵白アルブミン (OVA) をモデル抗原として用いて CL4 を利用した経鼻粘膜ワク

チンの免疫賦活化特性を解析し、③C-CPE に比して優れた物性を有する新規 CL4 binder の創製、④本 binder の粘膜ワクチン活性を解析した。さらに、⑤C-CPE 投与の安全性情報の集積を図った。

B. 研究方法

① NALT における CL4 発現解析

1) RT-PCR 法による鼻腔組織における CL4 の発現

マウスより鼻腔組織を摘出し、ISOGEN (WAKO) を用いて RNA を回収した。回収した RNA 量は、分光光度計 (DU640: BECKMAN) を用いて波長 260 nm で吸光度を測定し、40 µg/ml RNA 溶液の吸光度を 1.0 として算出した。約 1 µg の RNA に対して TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TAKARA) を用いて逆転写反応を行った。得られた転写産物を用い、PCR により CL4 (Forward primer: 5'-tggatgaactgcgtggtg-3'、Reverse primer: 5'-ggtgtagaagtcgcggtg-3'、94 °C、45 sec、52 °C、60 sec、72 °C、30 sec、35 cycles) を、またポジティブコントロールとして β-actin (Forward primer: 5'-tagatgggcacagtgtggg-3'、Reverse primer: 5'-ggcgtgatggtgggcatgg-3'、94 °C、30 sec、58 °C、60 sec、72 °C、30 sec、30 cycles) を増幅し、得られた PCR 産物を 2% TBE ゲルにて、泳動・検出した。

2) Western blot 法による鼻腔組織における CL4 の発現

マウス鼻腔組織は、組織溶解 buffer (50 mM Tris buffer [pH 7.5]、150 mM NaCl、0.1% Triton X、0.1% SDS、1 mM オルトバナジン酸、1 mM EDTA、10 mM NaF、1 mM PMSF) 200 µl に溶解し、4 °C、20,000 ×g で 20 分間遠心し、上清を Western blot に使用した。

3) 免疫組織染色法による鼻腔組織における CL4 の発現

安楽死させたマウスの頭部を切断し、4%パラホルムアルデヒドを用い 4 °C にて一晚固定した。翌日、PBS に置換し、EDTA 法にて脱灰後、パ

ラフィン包埋し、マイクロトームにて 4 µm 厚の切片を作製した (アプライドメディカルリサーチにパラフィン切片の作製を依頼)。得られた切片を 60 °C で加温し、パラフィンを溶かした。その後、すぐにキシレンに浸し、脱パラフィン操作を行なった。脱パラフィン操作をした切片を徐々にエタノール濃度を下げることで親水性にした。その後、Target Retrieval Solution (pH 9.0、Dako) に浸し、Pascal (Dako) を用いて抗原の賦活化を行なった。

賦活化した切片の CL4 の染色には AutoStainer (Dako) を用い、End. Enz. には POD Blocking Solution、Protein Blocking には 10% BSA、primary Ab には Rabbit anti-CL4 mAb、Secondary Ab には Envision + anti-rabbit、Substrate には DAKO DAB+を使用した。

染色後の切片をヘマトキシリン (Dako) に 1 分間浸し、水道水ですすぎ、10 分間流水に浸した。その後、徐々にエタノール濃度を上げ、さらにキシレンに浸すことで脱水操作を行なった。脱水した切片を MOUNT-QUICK (DAIDO SANGYO) を用いて封入し、顕微鏡下で観察した。

② CL4 を利用した粘膜ワクチンの免疫賦活化特性解析

1) OVA-C-CPE をコードしたプラスミドの作製

pCMV-Script/OVA プラスミドを鋳型とし、5' -gcggtaccatgggctccatcggcgcagc-3' (Forward primer、the underline indicates *KpnI* site)、5' -ccttaattaagggaacacatctgcca-3' (Reverse primer、the underline indicates *PacI* site) を用いて OVA を含む領域 KOD-plus にて増幅させた。得られた PCR 産物を PCR Purification Kit を用いて精製し、*KpnI*、*PacI* を用いて 37 °C にて一晚制限酵素処理した。T4 DNA ligase を用いて 16 °C にてあらかじめ *KpnI*、*PacI* にて制限酵素処理した pET-MCS-C-CPE と一晚ライゲーション反応を行い、インサートの確認およびシーケンス解析を行い、OVA-C-CPE をコードしたプラスミド (pET-OVA-C-CPE) を得た。

2) OVA-C-CPE303 をコードしたプラスミドの作製

C-CPE303 をコードする発現ベクターを用い、pET-MCS-C-CPE303 を作製した。なお、MCS の挿入には、両端に *NdeI* binding サイトを持つ 5'-tataggtaccgggactagttaattaaggaggaggaggatctggaggaggatctggaggagc-3'、5'-tagctcctccagatccctcctccagatctcctcctcccttaactagctccgggtaccta-3' を用いた。pET-OVA-C-CPE を *KpnI*、*PacI* を用いて 37 °C にて 2 時間制限酵素処理し、1% TAE ゲルを用いて、OVA 遺伝子を分離した。OVA 遺伝子を含むゲルを切り出し、QIAEX II Agarose Gel Extraction kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製した OVA 遺伝子とあらかじめ、*KpnI*、*PacI* 処理した pET-MCS-C-CPE303 とを混合し、T4 DNA ligase を用いて 16 °C で一晩ライゲーション反応を行った。ライゲーション産物からプラスミドを精製し、インサートの確認およびシーケンス解析を行い、OVA-C-CPE303 をコードしたプラスミド (pET-OVA-C-CPE303) を得た。

3) OVA-C-CPE の発現誘導条件の検討

OVA-C-CPE、OVA-C-CPE303 発現プラスミドをヒートショック法にて大腸菌 BL21 (DE3) (Novagen) にトランスフォーメーションし、LA プレートに播種し一晩培養した。翌日コロニーをピックアップし、LA 培地 3 ml にて 37 °C で一晩振盪培養した。LA 培地を 2 ml ずつ分注した Sterile Culture Tubes (IWAKI) に大腸菌培養液を 50 μ l ずつ加え、37 °C で 3 時間振盪培養した。その後、isopropyl- β -D (-) thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 0、0.25、0.5、または 1.0 mM となるように添加し、さらに 37 °C で 3 時間振盪培養した。遠心分離により大腸菌を回収後、200 μ l の Laemmli's sample buffer (12.5% glycerol、31.25 mM Tris-HCl (pH 6.8)、1% SDS、0.02% bromophenol、1.25% 2-mercaptoethanol) に懸濁し、氷冷しながら 20 秒間超音波処理を行い、大腸菌を破碎した。4 °C、14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収して 99 °C で 5 分間加熱し、これを泳動用サン

プルとした。泳動用サンプルを SDS-PAGE に供し、coomassie brilliant blue (CBB、Bio-Rad) 染色液で 1 時間染色後 MilliQ 水を用いて脱色洗浄し、OVA-C-CPE、OVA-C-CPE303 が多く産生されている IPTG 濃度を示適濃度に設定した。

4) OVA-C-CPE の可溶化条件の検討

OVA-C-CPE、OVA-C-CPE303 の発現誘導条件の検討に準じ、大腸菌を回収した。大腸菌を buffer A (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、400 mM NaCl、5 mM MgCl₂、0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride、1 mM 2-mercaptoethanol、10% glycerol) 1 ml に懸濁し、氷冷しながら 40 秒間 3 回超音波処理を行い、大腸菌を破碎した。4 °C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収した後、沈殿に 2% TritonX-100 含有 buffer A を 1 ml 加え、超音波処理を行った。遠心分離後、沈殿に 8 M urea 含有 buffer A を 1 ml 加え、超音波処理をした。遠心分離後上清を回収し、適宜 4 × Laemmli's sample buffer を添加し、99 °C で加熱することで泳動用サンプルとした。泳動用サンプルを SDS-PAGE に供し、CBB 染色した後、DTA または DTA-C-CPE が多く可溶化していた画分の可溶化条件を基に精製条件を設定した。

5) OVA-C-CPE の精製

OVA-C-CPE を発現させた大腸菌 (500 ml culture 分) を 5 ml の可溶化 buffer に懸濁し、氷冷しながら 40 秒間超音波処理を 3 回行い、4 °C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA、MilliQ 水、0.1 M NiSO₄、buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Kit (GE Healthcare) を用いて AKTAprime plus (GE Healthcare) により精製した。すなわち、buffer A および 100 mM imidazole 10 ml ずつで洗浄後、10 ml で 100-500 mM imidazole のグラジエントとなる条件にて精製し、UV の値を元にフラクションを回収した。

OVA-C-CPE が溶解している buffer を PBS (137 mM NaCl、2.68 mM KCl、8.14 mM Na₂HPO₄、1.15 mM KH₂PO₄) に置換するため PD-10 column (GE Healthcare) を用いた。あらか

じめ PD-10 column に PBS を 30 ml 流して平衡化しておき、HiTrap™ Kit で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500 μ l ずつ流し PD-10 column から溶出液を分取した。BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE) を用い、560 nm における吸光度を測定することでタンパク質濃度を算出した。なお、検量線には標準タンパク質として BSA を用いた。

6) pFastBac-CL4 の作製

マウス CL4 の遺伝子を T-Easy vector に挿入した pGTCL-4 (神戸大学大学院医学研究科 古瀬幹夫博士より供与) を鋳型とし、KOD-plus-を用いて PCR を行った。なお、Forward primer として 5'-gctctagaatggattacaaggatgacgacgataagatggcgtctatggactacaggtcctgggaatctcttagca-3', the underline indicates *Xba*I site)、Reverse primer として 5'-ggggtaccttacacatagttgctggcggggacagagcgggc-3', the underline indicates *Kpn*I site) を使用した。得られた PCR 産物を PCR Purification Kit を用い精製後、*Xba*I および *Kpn*I により、37 °C にて一晚制限酵素処理した。あらかじめ *Xba*I および *Kpn*I 処理した pFastBac1 と T4 DNA ligase を用いて 16 °C にて一晚ライゲーション反応を行い、インサートの確認およびシーケンス解析を行い、マウス CL4 をコードしたプラスミド (pFastBac-CL4) を得た。

7) Bacmid の作製

pFastBac-CL4 をヒートショック法にて大腸菌 DH10Bac (Invitrogen) にトランスフォーメーションし、50 μ g/ml kanamycin、7 μ g/ml gentamicin、10 μ g/ml tetracycline を含み、2% 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside (X-gal) 100 μ l および 50 mM IPTG 100 μ l を塗布した LB 培地プレートに播種し、37 °C で 24 時間培養した。任意の白コロニーをピックアップし、アルカリプレップにて大腸菌から bacmid を精製した。精製した bacmid に目的とする遺伝子が挿入されていることを PCR 法にて確認した。なお、Forward primer として 5'-gtttcccagtcacgac-3' を、Reverse primer として 5'-ggaacagctatgaccatg-3'、5'-ggggtaccttacacatagttgctggcggggacagagcgggc-3' を用いた。目的とする遺伝子断片の挿入が確認

された bacmid をヒートショック法にて大腸菌 DH5 α にトランスフォーメーションし、50 μ g/ml kanamycin を含む LB 培地 (LK) プレートに播種し、37 °C で一晚培養し、コロニーをピックアップ後、LK 培地 100 ml でさらに一晚培養した。大腸菌を回収し、QIAfilter™ plasmid Midi kit (QIAGEN) を用いて bacmid-CL4 を精製した。

8) Budded baculovirus (BV)-CL4 の作製

培養用 6 穴プレートに 2×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞 (Invitrogen) を播種し、室温で 1 時間静置した。静置中に tube A (cellfectin (Invitrogen) 6 μ l、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 (Invitrogen) 100 μ l) と tube B (bacmid-CL4 1 μ g、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100 μ l) を用意し、tube A と tube B とをよく混和し、泡立てないようにゆっくりピペティングした後、室温で 30 分間放置した。1 時間静置することで接着させた Sf9 細胞を血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地で洗浄後、培地を除去し、tube A と tube B との混合溶液に血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 800 μ l を加え、ウェルに全量 (1 ml) 添加し、プレートをビニールテープで密封して 5 時間、27 °C で培養した。その後、培地を除去し、血清と抗生物質を含む 2 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen) に交換し、27 °C で 3 日間培養した。3 日後、培養上清を 800 \times g で 10 分間遠心することで回収した (P1 ストックと称する)。続いて、 2×10^6 cells/ml の Sf9 細胞 200 ml に対して、P1 ストック 2 ml を加え、27 °C で 2 日間培養した。2 日後、培養上清を 800 \times g で 10 分間遠心することで回収した (P2 ストックと称する)。

培養用 6 穴プレートに 2×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞を播種し、P2 ストックを 10、100、1000 μ l ずつ加え、27 °C で 3 日間培養した (全量 2 ml)。3 日後、800 \times g で 10 分間遠心し、上清を回収した。Protease inhibitor (SIGMA) および 1% Triton-X を含む PBS で細胞ペレットを懸濁後、超音波処理で破碎し細胞可溶化液とした。培養上清および細胞可溶化液を用いて、Western blot 法にて目的とするタンパク質の発

現を確認した。

2×10^6 cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに用意し、発現確認のできた P2 ストックを適量加え、 27°C で 3 日間培養した。3 日後、培養上清を $800 \times g$ で 10 分間遠心することで回収した。回収した培養上清を $10,000 \times g$ で 25 分間さらに遠心した。得られた沈殿を PBS で懸濁後、 $800 \times g$ で 10 分間遠心し、上清をさらに $10,000 \times g$ で 25 分間遠心した。得られた沈殿を protease inhibitor を含む TBS $250 \mu\text{l}$ で懸濁し、BCA™ Protein Assay Kit を用いてタンパク質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用いた。

9) BV ELISA

96 穴 ELISA plate (Greiner) に BV-CL4 (ネガティブコントロールとして BV-WT および BV-CL1) を $0.5 \mu\text{g}/\text{well}$ 、 4°C 、over night で固相化した。1.6% ブロックエース (DS PHARMA BIOMEDICAL) を用いて、室温で 2 時間ブロッキングした。サンプルを $0.02 \mu\text{g}/\text{well}$ で添加し、室温で 2 時間反応させた。1.6% ブロックエースで 3000 倍に希釈した mouse anti His-tag mAb (Zymed) を加え、室温にて 2 時間反応させ、さらに 0.4% ブロックエースで 2000 倍に希釈した HRP 標識 goat anti-mouse IgG を添加し、室温にて 1 時間反応させた。TMB solution (Thermo Scientific) を加え、20 分間反応させ、2 M 硫酸を加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm 、副波長 595 nm で吸光度を測定した。なお、プレートから各溶液を除去する際には、0.05% Tween 20-PBS (T-PBS) による洗浄操作を 5 回行なった。

10) マウスへの免疫とサンプル回収

BALB/c マウスに週 1 回、計 3 回、ovalbumin (OVA、SIGMA) 単独、OVA + C-CPE 混合液、OVA-C-CPE、OVA-C-CPE303 を経鼻より投与した。なお、すべての群において 1 匹、1 回当たりの投与量は OVA として $5 \mu\text{g}$ とし (OVA + C-CPE 混合液投与群では OVA $5 \mu\text{g}$ と C-CPE $1.89 \mu\text{g}$ 、OVA-C-CPEs 投与群では融合蛋白 6.89

μg)、投与量が $10\text{-}15 \mu\text{l}$ となるように PBS に溶解した。最終投与より 1 週間後に、血清、鼻腔洗浄液、膣洗浄液、および糞便抽出液を回収した。

・血清

麻酔したマウスから眼底採血により血液を回収し、 $3000 \times g$ で 10 分間遠心し、上清を PBS にて 10 倍に希釈し、 -20°C で保存した。

・鼻腔洗浄液

安楽死させたマウスの気道から鼻腔にむけて $200 \mu\text{l}$ の PBS を流し込み、その洗浄液を回収し、 -20°C で保存した。

・膣洗浄液

マウスの膣口に $50 \mu\text{l} \times 2$ の PBS を流し込み、10 回ピペッティングを行い回収し、 -20°C で保存した。

・糞便抽出液

マウスの糞便を回収し、糞便 10 mg につき $100 \mu\text{l}$ の割合で PBS を加え、 4°C 、で 10 分間ボルテックスを行った。その後、 $3000 \times g$ 、10 分間遠心し、上清を回収し、 -20°C で保存した。

1.1) ELISA 法による OVA 特異的抗体価の測定

OVA を炭酸緩衝液 ($0.19 \text{ M Na}_2\text{CO}_3$ 、 1.67 M NaHCO_3 (pH 9.6)) に溶解し、96 穴 NUNC Immuno plate に $100 \mu\text{g}/\text{well}$ となるように分注し、 4°C 、over night で固相化した。4% ブロックエースを用いて、室温にて 2 時間ブロッキングした。TBS-T にて 10 倍希釈したブロックエース (sample diluent) を用いて各種サンプルを適宜希釈し、 $50 \mu\text{l}/\text{well}$ でプレートに添加し、室温にて 2 時間反応させた。その後、sample diluent にて HRP detection antibody (IgG、IgA、IgG1、IgG2a (BETHYL)) を $1/10,000$ に希釈し、 $100 \mu\text{l}/\text{well}$ となるように加え、室温にて 1 時間反応させた。TMB solution を加え、室温で 20 分間反応させ、2 M 硫酸を加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm 、副波長 595 nm で吸光度を測定し、吸光度を log 10 の力価として表記した。なお、プレートから各溶液を除去する際には、T-TBS による洗浄操作

を5回行なった。

1 2) 脾臓細胞の回収

最終投与より1週間後に、BALB/c マウスを安楽死させ、消毒用アルコールで消毒し、無菌的に脾臓を回収した。5 ml の注射筒を用いて、70 μ m のセルストレイナー (FALCON) 上で脾臓をホモジナイズし、50 ml チューブに回収した。2000 rpm で5分間遠心し、ペレットに氷冷した ACT 溶液 (15 M NH_4Cl , 1 mM KHCO_3 , 1 mM EDTA) を加えよく懸濁し、氷中で5分間インキュベートした。その後、さらに10% FBS を含む RPMI1640 (NISSUI) 5 ml を添加し、セルストレイナーを通して別の50 ml チューブに移した。2000 rpm で5分間遠心し、上清を除去後、10% FBS を含む RPMI1640 で再懸濁した。懸濁した脾臓細胞を96-well plate (FALCON) に 1×10^6 cells/well で播種し、1 mg/ml OVA 溶液存在下、37 °C で24時間培養し、培養上清を回収し、-80 °C で保存した。

1 3) サイトカイン ELISA

回収した培養上清をサイトカインアッセイキット (R&D SYSTEMS) を用いて測定した。測定方法はキットのプロトコールに従った。

③ 新規 CL-4 binder の作製および活性解析

1) C-CPE 変異体の作製

各種 C-CPE 変異体は天然型 C-CPE を鋳型として用いた PCR 法による変異導入後にクローニングし、His タグ融合蛋白質発現ベクター pET16b に挿入した。当該プラスミドを *E. Coli* BL21 にトランスフォーメーションし、過去の精製法に準じ Ni カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィ法により精製した (Biochem Pharmacol, 75, 1639, 2008)。蛋白質の精製は SDS-PAGE 後 Coomassie Brilliant Blue 染色により確認した。尚、精製蛋白質は溶媒を PBS に置換後 -80 °C に凍結保存した。

2) 溶解度試験

0.4 M Imidazole 含有 PBS (pH 7.4) に溶解した各変異体を限外濾過フィルター (Amicon Ultra-4:

MW 10K cut) を使用して 15 °C、4000 \times g で濃縮、10分おきに濃縮状況を確認し、濾液量が一定になったところを濃縮限界とした。濃縮限界に到達した濃度を飽和濃度 (最大到達濃度) として各種 C-CPE 変異体の溶解度とした。

3) CL4 結合性の解析

Biacore を用いて、各種 C-CPE の CL4 結合性を解析した。センサーチップ CM5 に CL4 を固定化後、各種 C-CPE 変異体を 1.25、2.5、5、10、20 nM になるように添加し、センサーグラムを解析することで結合速度定数 K_a 、解離速度定数 K_d 、解離定数 $KD (=K_d/K_a)$ を算出した。

④ 新規 CL-4 binder の粘膜ワクチン活性解析

1) OVA-C-CPE をコードしたプラスミドの作製

pCMV-Script/OVA プラスミドを鋳型とし、5' -gcggtaccatgggctccatcggcgcagc-3' (Forward primer、 the underline indicates *KpnI* site)、5' -ccttaattaagggaacacatctgcca-3' (Reverse primer、 the underline indicates *PacI* site) を用いて OVA を含む領域 KOD-plus-にて増幅させた。得られた PCR 産物を PCR Purification Kit を用いて精製し、*KpnI*、*PacI* を用いて 37 °C にて一晚制限酵素処理した。T4 DNA ligase を用いて 16 °C にてあらかじめ *KpnI*、*PacI* にて制限酵素処理した pET-MCS-C-CPE 変異体と一晚ライゲーション反応を行い、インサートの確認およびシーケンス解析を行い、OVA-C-CPE 変異体をコードしたプラスミド (pET-OVA-C-CPE 変異体) を得た。

2) OVA-C-CPE 変異体の発現誘導条件の検討

OVA-C-CPE 変異体発現プラスミドをヒートショック法にて大腸菌 BL21 (DE3) (Novagen) にトランスフォーメーションし、LA プレートに播種し一晚培養した。翌日コロニーをピックアップし、LA 培地 3 ml にて 37 °C で一晚振盪培養した。LA 培地を 2 ml ずつ分注した Sterile Culture Tubes (IWAKI) に大腸菌培養液を 50 μ l ずつ加え、37 °C で3時間振盪培養した。その後、isopropyl- β -D (-) thiogalactopyranoside (IPTG)

を終濃度 0、0.25、0.5、または 1.0 mM となるように添加し、さらに 37 °C で 3 時間振盪培養した。遠心分離により大腸菌を回収後、200 μ l の Laemmli's sample buffer (12.5% glycerol、31.25 mM Tris-HCl (pH 6.8)、1% SDS、0.02% bromophenol、1.25% 2-mercaptoethanol) に懸濁し、氷冷しながら 20 秒間超音波処理を行い、大腸菌を破碎した。4 °C、14000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収して 99 °C で 5 分間加熱し、これを泳動用サンプルとした。泳動用サンプルを SDS-PAGE に供し、coomassie brilliant blue (CBB、Bio-Rad) 染色液で 1 時間染色後 MilliQ 水を用いて脱色洗浄し、OVA-C-CPE 変異体が多く産生されている IPTG 濃度を最適濃度に設定した。

4) OVA-C-CPE 変異体の可溶化条件の検討

OVA-C-CPE 変異体の発現誘導条件の検討に準じ、大腸菌を回収した。大腸菌を buffer A (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、400 mM NaCl、5 mM MgCl₂、0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride、1 mM 2-mercaptoethanol、10% glycerol) 1 ml に懸濁し、氷冷しながら 40 秒間 3 回超音波処理を行い、大腸菌を破碎した。4 °C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収した後、沈殿に 2% TritonX-100 含有 buffer A を 1 ml 加え、超音波処理を行った。遠心分離後、沈殿に 8 M urea 含有 buffer A を 1 ml 加え、超音波処理をした。遠心分離後上清を回収し、適宜 4 × Laemmli's sample buffer を添加し、99 °C で加熱することで泳動用サンプルとした。泳動用サンプルを SDS-PAGE に供し、CBB 染色した後、OVA-C-CPE 変異体が多く可溶化していた画分の可溶化条件を基に精製条件を設定した。

5) OVA-C-CPE 変異体の精製

OVA-C-CPE 変異体蛋白質を発現誘導させた大腸菌 (500 ml culture 分) を 5 ml の可溶化 buffer に懸濁し、氷冷しながら 40 秒間超音波処理を 3 回行い、4 °C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA、MilliQ 水、0.1 M NiSO₄、buffer A を順に流して

平衡化しておいた HiTrap™ Kit (GE Healthcare) を用いて AKTAprime plus (GE Healthcare) により精製した。すなわち、buffer A および 100 mM imidazole 10 ml ずつで洗浄後、10 ml で 100-500 mM imidazole のグラジエントとなる条件にて精製し、UV の値を元にフラクションを回収した。

OVA-C-CPE が溶解している buffer を PBS (137 mM NaCl、2.68 mM KCl、8.14 mM Na₂HPO₄、1.15 mM KH₂PO₄) に置換するため PD-10 column (GE Healthcare) を用いた。あらかじめ PD-10 column に PBS を 30 ml 流して平衡化しておき、HiTrap™ Kit で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500 μ l ずつ流し PD-10 column から溶出液を分取した。BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE) を用い、560 nm における吸光度を測定することでタンパク質濃度を算出した。なお、検量線には標準タンパク質として BSA を用いた。

6) BV ELISA

96 穴 ELISA plate (Greiner) に BV-CL4 (ネガティブコントロールとして BV-WT および BV-CL1) を 0.5 μ g/well、4 °C、over night で固相化した。1.6% ブロックエース (DS PHARMA BIOMEDICAL) を用いて、室温で 2 時間ブロッキングした。サンプルを 0.02 μ g/well で添加し、室温で 2 時間反応させた。1.6% ブロックエースで 3000 倍に希釈した mouse anti His-tag mAb (Zymed) を加え、室温にて 2 時間反応させ、さらに 0.4% ブロックエースで 2000 倍に希釈した HRP 標識 goat anti-mouse IgG を添加し、室温にて 1 時間反応させた。TMB solution (Thermo Scientific) を加え、20 分間反応させ、2 M 硫酸を加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。なお、プレートから各溶液を除去する際には、0.05% Tween 20-PBS (T-PBS) による洗浄操作を 5 回行った。

7) マウスへの免疫とサンプル回収

BALB/c マウスに週 1 回、計 3 回、OVA-C-CPE

変異体、OVA-C-CPE303 を経鼻より投与した。なお、すべての群において1匹、1回当たりの投与量はOVAとして5 µgとし(OVA-C-CPEs投与群では融合蛋白6.89 µg)、投与量が10-15 µlとなるようにPBSに溶解した。最終投与より1週間後に、血清、鼻腔洗浄液、膣洗浄液、および糞便抽出液を回収した。

・血清

麻酔したマウスから眼底採血により血液を回収し、3000 × gで10分間遠心し、上清をPBSにて10倍に希釈し、-20 °Cで保存した。

・鼻腔洗浄液

安楽死させたマウスの気道から鼻腔にむけて200 µlのPBSを流し込み、その洗浄液を回収し、-20 °Cで保存した。

・膣洗浄液

マウスの膣口に50 µl × 2のPBSを流し込み、10回ピペティングを行い回収し、-20 °Cで保存した。

・糞便抽出液

マウスの糞便を回収し、糞便10 mgにつき100 µlの割合でPBSを加え、4 °C、で10分間ボルテックスを行った。その後、3000 × g、10分間遠心し、上清を回収し、-20 °Cで保存した。

8) ELISA 法による OVA 特異的抗体価の測定
OVA を炭酸緩衝液 (0.19 M Na₂CO₃, 1.67 M NaHCO₃ (pH 9.6)) に溶解し、96 穴 NUNC Immuno plate に 100 µg/well となるように分注し、4 °C、over night で固相化した。4%ブロックエースを用いて、室温にて2時間ブロッキングした。TBS-T にて 10 倍希釈したブロックエース (sample diluent) を用いて各種サンプルを適宜希釈し、50 µl/well でプレートに添加し、室温にて2時間反応させた。その後、sample diluent にて HRP detection antibody (IgG, IgA, IgG1, IgG2a (BETHYL)) を 1/10,000 に希釈し、100 µl/well となるように加え、室温にて1時間反応させた。TMB solution を加え、室温で20分間反応させ、2 M 硫酸を加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定し、吸光度を log 10

の力価として表記した。なお、プレートから各溶液を除去する際には、T-TBS による洗浄操作を5回行った。

9) 脾臓細胞の回収

最終投与より1週間後に、BALB/c マウスを安楽死させ、消毒用アルコールで消毒し、無菌的に脾臓を回収した。5 ml の注射筒を用いて、70 µm のセルストレイナー (FALCON) 上で脾臓をホモジナイズし、50 ml チューブに回収した。2000 rpm で5分間遠心し、ペレットに氷冷したACT溶液 (15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 1 mM EDTA) を加えよく懸濁し、氷中で5分間インキュベートした。その後、さらに10% FBS を含むRPMI1640 (NISSUI) 5 ml を添加し、セルストレイナーを通して別の50 ml チューブに移した。2000 rpm で5分間遠心し、上清を除去後、10% FBS を含むRPMI1640 で再懸濁した。懸濁した脾臓細胞を96-well plate (FALCON) に1 × 10⁶ cells/well で播種し、1 mg/ml OVA 溶液存在下、37 °C で24時間培養し、培養上清を回収し、-80 °C で保存した。

10) サイトカイン ELISA

回収した培養上清をサイトカインアッセイキット (R&D SYSTEMS) を用いて測定した。測定方法はキットのプロトコールに従った。

11) OVA-C-CPE 変異体の粘膜ワクチン活性解析

6週齢の雌性C57BL/6マウスに週1回、計3回、OVA、OVA-C-CPE 194、もしくはOVA-C-CPE 303 を経鼻投与した。なお、マウス1匹、1回当たりの投与量はOVAとして5 µgとし、投与量が10-15 µlとなるようにPBSに溶解した。最終投与より1週間後に、背中にEG7-OVA細胞 (1 × 10⁶ cells/mouse) を皮下移植した。その後、3日毎に腫瘍径を測定し、腫瘍の大きさを算出した。なお、腫瘍の大きさは長径 × 短径 × 短径 / 2 により算出した。

⑤ C-CPE の安全性解析

1) 粘膜障害性の解析

BALB/c マウスに週 1 回、計 3 回、PBS もしくは OVA-C-CPE 変異体 (OVA 量として 5 μ g) を経鼻投与し、最終免疫の 1 週間後に鼻腔組織を回収した。回収した鼻腔組織を 4% パラホルムアルデヒドにて 4°C で一晩固定した。翌日、PBS に置換し、アプライドメディカルリサーチにパラフィン切片の作製、H&E 染色、および組織所見を依頼した。組織所見は主に炎症生細胞の浸潤について、0; なし、1; 極軽度、2; 軽度、3; 中等度、4; 高度のグレードで表した。

2) 鼻粘膜面における IgE 産生の解析

週 1 回、計 3 回、各種サンプルを BALB/c マウスに経鼻投与し、最終投与一週間後に鼻粘膜洗浄液を回収し、-20°C で保存した。

OVA を炭酸緩衝液 (pH 9.6, Na₂CO₃ 0.19 M, NaHCO₃ 1.67 M) に溶解し、96 穴 NUNC Immuno plate に固層化後、段階希釈した洗浄液を添加、室温にて 2 時間インキュベートした後、HRP detection antibody (IgE) (BETHYL Laboratories, Inc.) を添加し、TMB solution を基質として用いて、吸光度を測定した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

① NALT における CL4 発現

腸管粘膜組織パイエル板には CL4 が高発現していることが知られている。そこで、まず NALT における CL4 の発現を確認した。まず、NALT 組織を用いて RT-PCR およびウエスタンブロッティングにより、CL-4 発現の有無を解析したところ、mRNA レベルおよび蛋白質レベルいずれにおいても NALT における CL4 発現が観察された (Fig. 1A and 1B)。そこで次に、NALT における CL4 発現を免疫染色により解析したところ、NALT を覆う上皮細胞層において CL4 の強い染色像が認められた (Fig. 1C)。以上の結果から、

CL4 を利用した NALT への抗原送達の可能性が示唆された。そこで次に、卵白アルブミン (OVA) をモデル抗原として用いて CL4 を利用した粘膜ワクチンの活性を解析した。

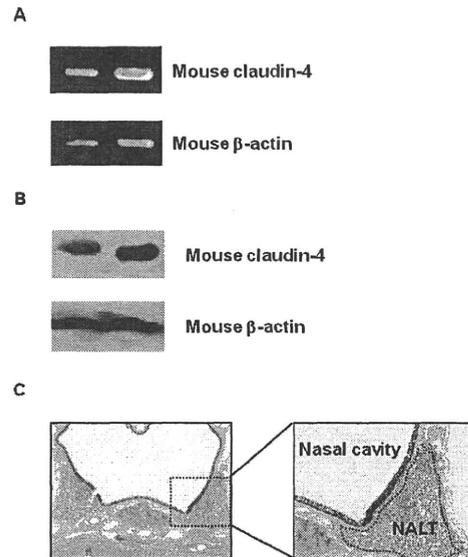


Figure 1. Expression of claudin-4 in NALT

A) RT-PCR analysis. mRNA was isolated from NALT of mice, and expression of claudin-4 was assayed by RT-PCR. B) Immunoblot analysis. The lysate of NALT was subjected to SDS-PAGE, followed by western blotting with anti-claudin-4 Ab. β -actin was used as an internal control. C) Immunohistochemical analysis. Specimens were cryosectioned (4 μ m) and stained with anti-claudin-4 Ab, followed by horseradish peroxidase-labeled secondary Ab. The immunoreactive regions were stained with a commercially available staining kit.

② CL4 を利用した粘膜ワクチンの免疫賦活化特性の解析

1) OVA-C-CPE の作製

まず、OVA と天然型 C-CPE の融合蛋白質を作製した (Fig. 2A and 2B)。次に、OVA-C-CPE の CL 発現 BV に対する結合性を C-CPE をポジティブコントロールとして用いて解析したところ、OVA-C-CPE は CL 非発現 BV (BV-WT) および CL1 発現 BV (BV-CL1) には結合性を示さず、BV-CL4 に対してのみ結合性を示したことから (Fig. 2C)、OVA-C-CPE は CL4 指向性を有するものと推察される。

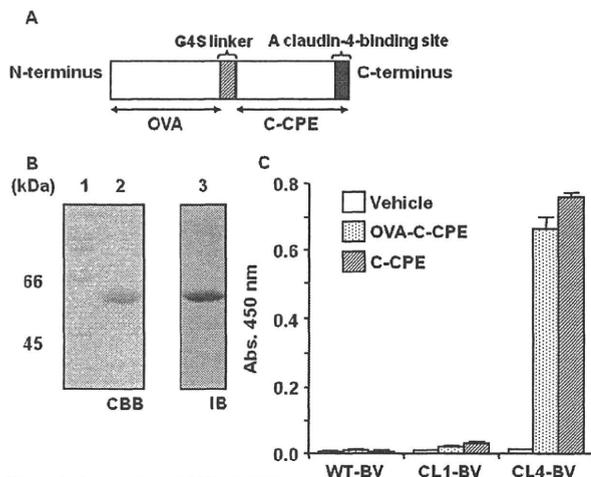


Figure 2. Preparation of OVA-C-CPE. A) Schematic illustration of OVA-C-CPE. The claudin-4-binding site of C-CPE is located in the C-terminal 16 amino acids. OVA was fused with C-CPE at the N-terminal of C-CPE, resulting in OVA-C-CPE. B) Purification of OVA-C-CPE. OVA-C-CPE was expressed in *E. coli* as a his-tagged protein and isolated by Ni-affinity chromatography. The purification of OVA-C-CPE was confirmed by SDS-PAGE followed by staining with Coomassie Brilliant Blue (CBB, left panel) and by immunoblotting with an anti his-tag antibody (IB, right panel). Lane 1: molecular weight marker; lane 2, 3: OVA-C-CPE. The putative molecular mass of OVA-C-CPE is 62 kDa. C) Binding of OVA-C-CPE to claudin-4. Wild-type BV (WT-BV), BV displaying claudin-1 (CL1-BV) or -4 (CL4-BV) was adsorbed onto a 96-well immunoplate, and then vehicle or OVA-C-CPE was added to the well. OVA-C-CPE bound to BV was detected by an anti-his-tag Ab followed by horseradish peroxidase-labeled secondary Ab. C-CPE was used as a positive control for a claudin-4 binding. Data are means \pm SD (n=4).

2) OVA-C-CPE の免疫賦活化作用

次に、作製した OVA-C-CPE の経鼻投与による免疫賦活化作用について評価した。6 週齢の雌性 BALB/c マウスに 1 匹当たり OVA 量として 5 μ g となるように調製し、週 1 回、計 3 回経鼻投与し、最終投与より 1 週間後に血清、鼻腔洗浄液、膣洗浄液、および糞便抽出液を回収し、各種サンプル中の OVA 特異的な抗体価を ELISA 法により解析した。その結果、OVA 単独投与群および OVA と C-CPE との混合液投与群では血清中の IgG 抗体価の上昇が認められないのに対して、OVA-C-CPE 投与群では有意な上昇が観察された (Fig. 3A)。さらに、投与量依存的な抗体産生も認められた (data not shown)。投与粘膜面である鼻粘膜中の IgA 抗体価も血清中 IgG 抗体価と同様に OVA-C-CPE 投与群でのみ有意に上昇していた (Fig. 3B)。また、遠隔粘膜面である膣粘膜および糞便中の IgA 抗体価も OVA-C-CPE 投与群でのみ有意な抗体価の上昇が認められた (Fig. 3C and 3D)。

C-CPE は TJ の CL4 に作用することでバリア機能を破綻させ、細胞間隙を介した物質吸収促進作用を示すものの、分子量が 20 kDa 以下の

物質に限られる。OVA の分子量は 45 kDa であることから、OVA が細胞間隙を通過することができず、OVA と C-CPE との混合液投与群では免疫応答が惹起されなかったものと推察される。以上の結果より、OVA-C-CPE を経鼻投与することで、全身面のみならず粘膜面において抗原特異的な免疫応答を惹起することを見出した。

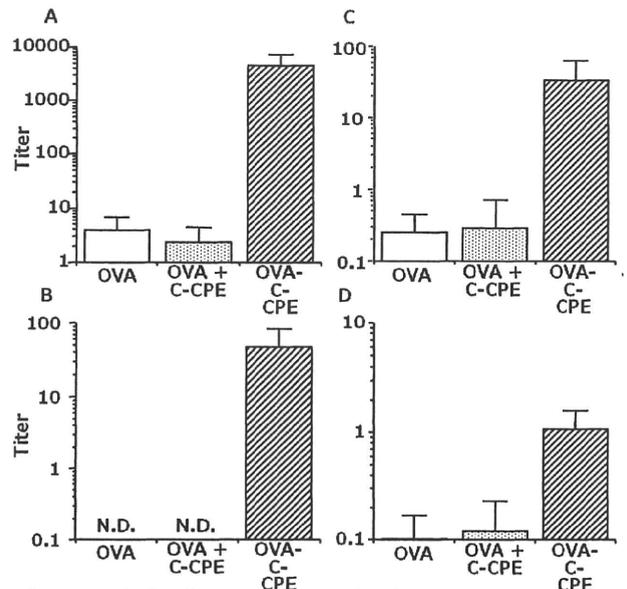


Figure 3. Production of OVA-specific IgG and IgA by OVA-C-CPE. Mice were nasally immunized with vehicle, OVA, a mixture of OVA and C-CPE, or OVA-C-CPE (5 μ g OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the levels of serum IgG (A), nasal IgA (B), vaginal IgA (C) and fecal IgA (D) were determined by ELISA. Data are means \pm SD (n=4). N.D., not detected.

3) OVA-C-CPE の免疫活性化における CL4 の関与

OVA-C-CPE 投与に伴う抗原特異的な免疫応答における CL4 の関与を検証するために、CL4 結合性を消失させた OVA-C-CPE303 を作製した (Fig. 4A)。まず、作製した OVA-C-CPE303 の CL4 結合性を BV ELISA 法により確認したところ OVA-C-CPE303 は CL4 結合性を消失していた (Fig. 4B)。

そこで次に、OVA-C-CPE303 を経鼻投与し免疫賦活化作用を検討した。その結果、OVA-C-CPE 投与群で認められた血清、鼻粘膜、膣粘膜および糞便中における OVA 特異的な抗体価の上昇が、OVA-C-CPE303 投与群では認められなかった (Fig. 4C-F)。

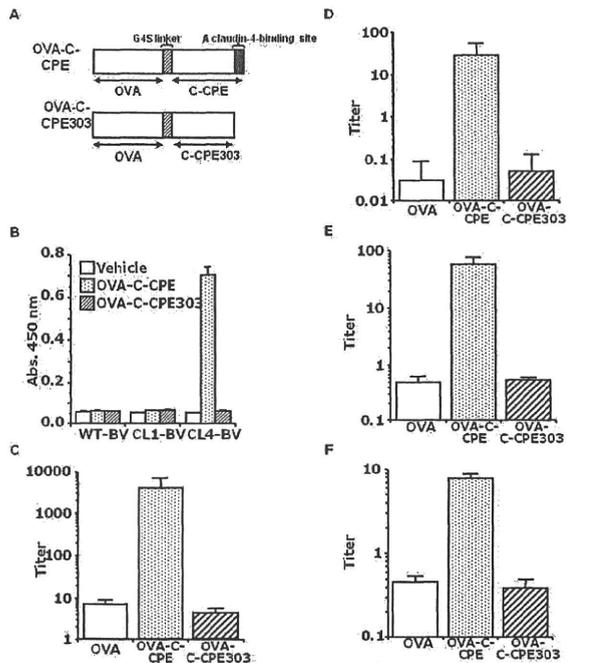


Figure 4. Involvement of claudin-4 in the immune responses to OVA-C-CPE. A) Schematic illustration of OVA-C-CPE mutant. The C-terminal 16 amino acid-deleted C-CPE mutant (C-CPE303) did not bind to claudin-4. To clarify the involvement of claudin-4 in the immune response initiated by OVA-C-CPE, OVA was fused with C-CPE303, resulting in OVA-C-CPE303. B) Interaction of OVA-C-CPE303 with claudin-4. Binding of OVA-C-CPE303 to claudin-4 was investigated by ELISA with wild-type BV (WT-BV), claudin-1 or -4 displaying BV (CL1-BV, CL4-BV). C) Immune responses by OVA-C-CPE303. Mice were nasally immunized with OVA, OVA-C-CPE or OVA-C-CPE303 (5 mg OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the levels of serum IgG (C), nasal IgA (D), vaginal IgA (E) and fecal IgA (F) were measured by ELISA. Data are means \pm SD (n=4).

これらの結果は OVA-C-CPE による抗原特異的な免疫応答の活性化には、C-CPE と CL4 との相互作用が関与していることを示唆するものであり、CL4 を標的とした粘膜ワクチン技術開発の可能性が示された。

4) CL4 指向性ワクチンの免疫活性化能の解析

細胞性免疫を主とする Th1 系はインターフェロン (IFN) γ やインターロイキン (IL) -2 を産生して IgG2a 産生を誘導し、液性免疫を主とする Th2 系は IL-4 や IL-13 を産生し IgG1 産生を誘導する。そこで、これらを測定することで OVA-C-CPE による免疫賦活化特性を解析した。その結果、BALB/c マウスを OVA-C-CPE で免疫すると 2 型ヘルパー T 細胞誘導型の IgG1 に加え、1 型ヘルパー T 細胞誘導型の IgG2a 抗体価の上昇が観察された。一方、OVA-C-CPE303 投与群ではこれらサブクラスの産生は認められなかった (Fig. 5A)。

続いて、OVA-C-CPE で免疫したマウスより脾臓細胞を摘出し、*in vitro* で OVA により再刺激することで産生したサイトカイン量を測定した。その結果、OVA-C-CPE で免疫したマウスより摘出した脾臓細胞に OVA で再刺激した

群でのみ Th1 系サイトカイン (IFN- γ) および Th2 系サイトカイン (IL-13) の産生が認められた。一方、OVA-C-CPE303 投与群ではこれらサイトカイン産生は認められなかった。

これらの結果より、CL4 指向性ワクチンは Th1 系および Th2 系の免疫応答も惹起するものと推察される。

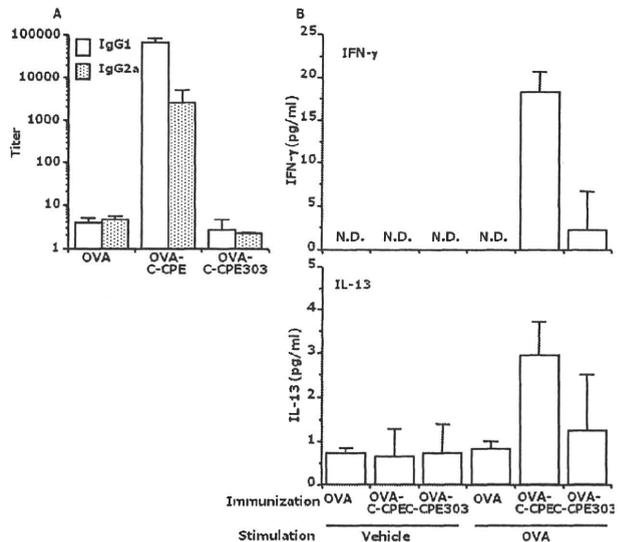


Figure 5. Th1 and Th2 responses induced by OVA-C-CPE. Mice were nasally immunized with vehicle, OVA, a mixture of C-CPE with OVA, or OVA-C-CPE (5 μ g OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, serum and splenocytes were collected. Serum IgG subclass (IgG1 and IgG2a) was determined by ELISA (A). The splenocytes isolated from the immunized mice were stimulated with vehicle or OVA (1 mg/ml) for 24 h, and the cytokines (IFN- γ and IL-13) in the conditioned medium were measured by ELISA (B). Data are means \pm SD (n=4). N.D., not detected.

③ 新規 CL-4 binder の創製

天然型 C-CPE を prototype として用いて、各種変異体を作製したところ、天然型 C-CPE (約 0.3 mg/ml) に比して溶解性に優れた C-CPE 変異体 A、B、C を見出した (Fig. 6)。さらに、各種 C-CPE 変異体の CL4 結合性を解析したところ、天然型 C-CPE に比して 4~20 倍高い CL4 親和性を有する各種 C-CPE 変異体の取得に成功した (Table 1)。

④ 新規 CL4 binder の粘膜ワクチン活性解析

CL4 に対する結合性、大腸菌での生産性を考慮し、変異体 C、D、F について OVA との融合蛋白質を作製したところ、変異体 C および D の融合蛋白質では CL4 結合性が保持されていたものの、変異体 F 融合蛋白質では結合性が消失して

いた (Fig. 7)。

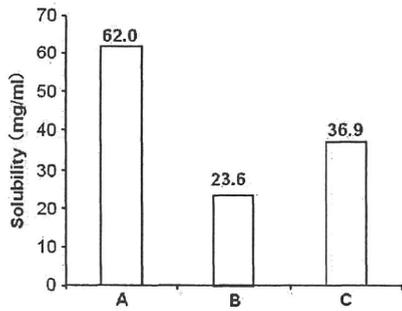


Figure 6. Solubility of the C-CPE mutants. C-CPE mutants was investigated in PBS (pH 7.4) containing 0.4 M imidazole at 15 °C. The number over the column indicated the solubility (mg/ml).

Table 1. Binding kinetics of C-CPEs to claudin-4

Derivatives	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D
C-CPE184	5.96 × 10 ⁵	2.55 × 10 ⁻⁴	429 pM
A	6.50 × 10 ⁵	2.93 × 10 ⁻⁴	451 pM
B	5.59 × 10 ⁵	6.53 × 10 ⁻⁵	117 pM
C	6.67 × 10 ⁵	3.05 × 10 ⁻⁵	46 pM
D	7.13 × 10 ⁵	3.24 × 10 ⁻⁴	455 pM
E	7.67 × 10 ⁵	2.87 × 10 ⁻⁴	374 pM
F	7.55 × 10 ⁵	1.45 × 10 ⁻⁵	19 pM

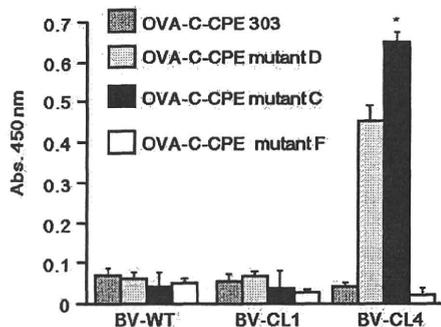


Figure 7. Interaction of OVA-C-CPE mutant with claudin-4. Binding of OVA-C-CPE mutant C and D to claudin-4 was investigated by ELISA with BV-WT, BV-CL1, or BV-CL4. Data are means ± SD (n=4). The results are representative of three independent experiments. Statistical significance was analyzed using Student t-test (*, p<0.05, when compared with OVA-C-CPE mutant D).

そこで変異体CおよびD誘導蛋白質を経鼻投与し、血中、鼻粘膜、膣粘膜、腸管粘膜面におけるOVA特異的IgG産生を解析したところ、変異体DではC-CPE184と同程度、変異体Cで

は約10倍以上の免疫賦活化活性が観察された (Fig. 8A-8D, data not shown)。

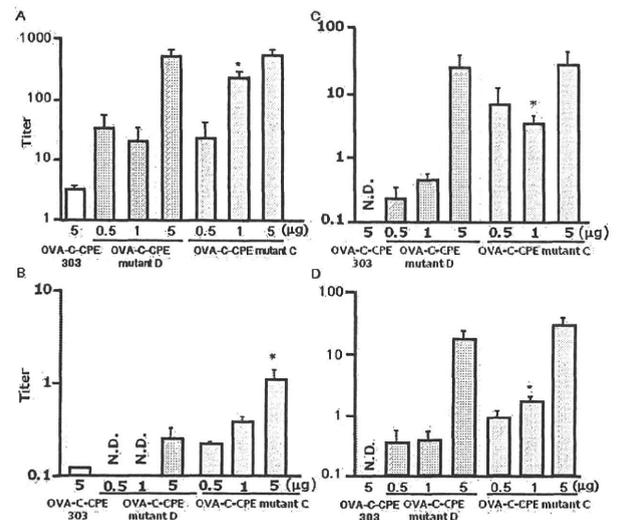


Figure 8. Production of OVA specific IgG and IgA by OVA-C-CPE mutant C. BALB/c mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE mutant D, or OVA-C-CPE mutant C (0.5, 1 or 5 µg of OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the levels of serum IgG (A), nasal IgA (B), vaginal IgA (C), and fecal IgA (D) were determined by ELISA. Data are means ± SEM (n=3-5). The results are representative of three independent experiments. Statistical significance was analyzed using Student t-test (*, p<0.05, when compared with the same concentration of OVA-C-CPE mutant D). N.D., not detected.

両変異体融合蛋白質ともにIgG1, IgG2aの誘導が観察されており、Th1系、Th2系の免疫反応を惹起する可能性が示唆される (Fig. 9)。実

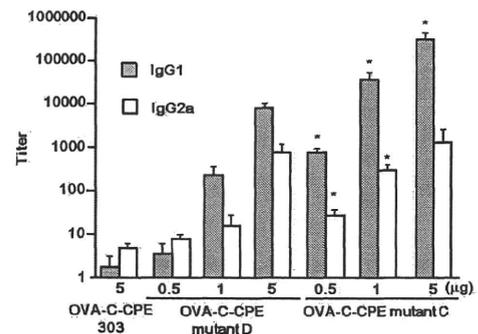


Figure 9. OVA specific IgG1 and IgG2a responses induced by OVA-C-CPE mutant C. BALB/c mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE mutant C or D (0.5, 1 or 5 µg of OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the levels of serum IgG1, and IgG2a were determined by ELISA. Data are means ± SEM (n=3-5). The results are representative of three independent experiments. Statistical significance was analyzed using Student t-test (*, p<0.05, when compared with the same concentration of OVA-C-CPE mutant D).

際、脾臓細胞からIFN-gammaやIL-13が産生されていた (Fig. 10A and 10B)。尚、いずれの免疫応答も変異体C融合蛋白質では約10倍以上

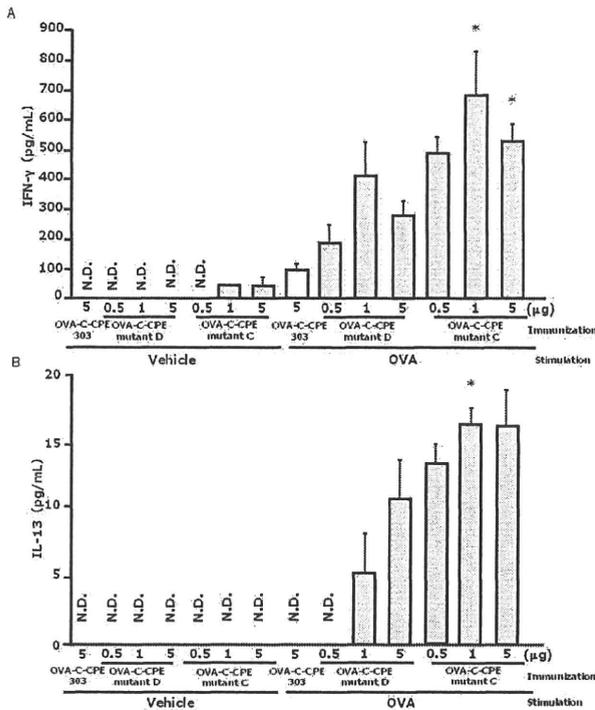


Figure 10. Th1 and Th2 responses induced by OVA-C-CPE mutant C. Balb/c mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE mutant C, or D (0.5, 1 or 5 μg of OVA) once a week for 3 weeks. The splenocytes isolated from the immunized Balb/c mice were stimulated with vehicle or OVA (1 mg/ml) for 24 h, and the cytokines (IFN-γ (A) and IL-13 (B)) in the conditioned medium were measured by ELISA. Data are means ± SEM (n=5). The results are representative of three independent experiments. Statistical significance was analyzed using Student's t-test (*, p < 0.05, when compared with the same concentration of OVA-C-CPE mutant D). N.D., not detected.

の免疫賦活化活性が観察され、変異体 F 融合蛋白質投与では抗原特異的免疫応答の活性化は観察されなかった (data not shown)。次に OVA 発現腫瘍細胞を用いた担癌マウスを用いて、当該融合蛋白質のワクチン活性の解析を試みたところ、変異体 C 融合蛋白質、変異体 D 融合蛋白質の経鼻免疫により、腫瘍増殖の抑制効果が観察され、CL4 結合性に優れた変異体 C 誘導蛋白質は高い抗腫瘍活性を有していた (Fig. 11)。

⑤ C-CPE の安全性解析

変異体 D と OVA の融合蛋白質を経鼻投与し、鼻粘膜面における組織障害性を解析したところ、組織学的な異常は観察されなかった (Fig. 12A and 12B)。さらに、変異体 C 融合蛋白質、変異体 D 融合蛋白質投与群では IgE 産生は観察されなかった (Fig. 13)。

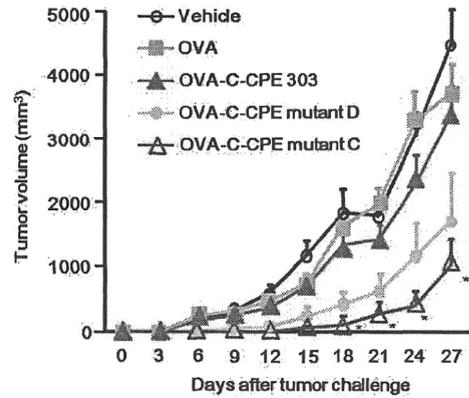


Figure 11. Anti-tumor activity of nasal immunization with OVA-C-CPE mutant C. C57BL/6 mice were nasally immunized with vehicle, OVA, OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE mutant C or D (5 μg of OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the mice were injected s.c. on the right back with 1×10^6 E.G7-OVA cells. The tumor growth was monitored by measuring two diameters, and the tumor volumes was calculated as $a \times b \times b/2$, where a is the maximum diameter of the tumor and b is the minimum diameter of the tumor. Data are means ± SEM (n=5). The results are representative of three independent experiments. Statistical significance was analyzed using Student's t-test (*, p < 0.05, when compared with OVA-C-CPE mutant D).

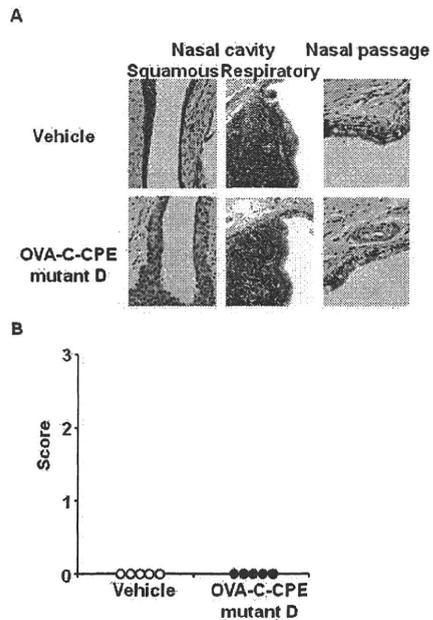


Figure 12. Histological injury caused by OVA-C-CPE mutant D. Balb/c mice were nasally immunized with vehicle or OVA-C-CPE mutant D (5 μg of OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, nasal tissue was collected and fixed by formalin. Thin tissue-sections were stained with H&E (A) and histological injury was scored with the following scale: 0, no damage; 1, slight damage; 2, moderate damage (B).