

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

有効かつ安全なインフルエンザ粘膜ワクチンの確立を目指した
新規アジュバントシステムの開発

平成 22 年度 総括研究報告書

平成 20～22 年度 総合研究報告書

研究代表者 角田 慎一

平成 23 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

有効かつ安全なインフルエンザ粘膜ワクチンの確立を目指した
新規アジュバントシステムの開発

平成 22 年度 総括研究報告書

平成 20～22 年度 総合研究報告書

研究代表者 角田 慎一

平成 23 年 5 月

目次

平成 22 年度総括研究報告書

I.	平成 22 年度総括研究報告書 有効かつ安全なインフルエンザ粘膜ワクチンの確立を 目指した新規アジュバントシステムの開発 角田慎一	1
II.	分担研究報告 新規サイトカインアジュバントの開発 吉岡靖雄	9
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	14
IV.	研究成果の刊行物・別刷	15

平成 20～22 年度総合研究報告書

I.	平成 20～22 年度総合研究報告書 有効かつ安全なインフルエンザ粘膜ワクチンの確立を 目指した新規アジュバントシステムの開発 角田慎一	51
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	83
III.	研究成果の刊行物・別刷	87

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

**有効かつ安全なインフルエンザ粘膜ワクチンの確立を目指した
新規アジュバントシステムの開発**

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 角田 慎一

平成23年5月

有効かつ安全なインフルエンザ粘膜ワクチンの確立を目指した 新規アジュバントシステムの開発

研究代表者 角田 慎一

独立行政法人医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト
プロジェクトリーダー

研究要旨

本研究は、新型インフルエンザ等の新興・再興感染症に対する有効かつ安全な粘膜ワクチンの確立を目的に、独自の機能性サイトカイン創製技術を駆使することにより“宿主の粘膜面及び全身に抗原特異的な体液性・細胞性免疫を惹起できる機能性サイトカインアジュバントの創出”を図るものである。

粘膜ワクチンは、(1) 全身で体液性・細胞性免疫が誘導できるのみならず、病原体侵入の場である粘膜面でも抗原特異的な体液性免疫 (IgA 抗体産生) が誘導可能であり、二段構えの防御網を構築できること、(2) 従来のワクチンと異なり、吸う・飲むといった非侵襲的投与によるものであって、注射による二次感染の危険性がないことなどから、理想的な感染症の予防/治療法になり得る。しかし一方で粘膜ワクチンにおいては、抗原単独の投与では十分な IgA 産生等の免疫を誘導できないことが知られている。そこで本研究では、有効な粘膜ワクチンを開発するための基盤技術開発を目的に下記検討を実施した

(i) 各種サイトカインの粘膜ワクチンアジュバントとしての有用性評価およびメカニズム解析

(ii) サイトカインアジュバントを用いた粘膜ワクチンのインフルエンザ感染・増殖の阻害効果の評価

まず、経鼻粘膜ワクチンアジュバントとして有効なサイトカインの選択を目的に、インフルエンザ HA を抗原とし、TNF ファミリー、およびインターロイキンファミリーサイトカインを用いて粘膜アジュバント効果に基づいたスクリーニングを行った。その結果、TNF- α 、APRIL、TL1A、あるいは IL-1 α 、IL-18、IL-33 等の IL-1 ファミリーサイトカインの投与により、全身および粘膜面に顕著な免疫応答が誘導された。またその粘膜免疫誘導特性の解析を行ったところ、TNF は Th2 型応答を、IL-1 ファミリーは Th2 および Th1 型応答を示すこと、さらに、IL-18、IL-33 によるアジュバント効果には、肥満細胞が関与することを世界に先駆けて見出した。これら知見をもとに、上記サイトカインをアジュバントとした HA 粘膜ワクチンのインフルエンザウイルス感染阻害効果を検討した。その結果、IL-1 ファミリーサイトカインをアジュバントとすることでインフルエンザウイルス感染を抑制できたことから、IL-1 ファミリーサイトカインを用いたアジュバントシステムが粘膜ワクチンに有用であることが明らかとなった。これらの研究は、新型インフルエンザ等新興再興感染症に対する有効な予防法の開発に寄与することで厚生労働行政に貢献するとともに、未だ不明な点が多い粘膜免疫システムに関する有用な知見を提供できるものと期待される。

研究代表者

角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所 バイオ
創薬プロジェクト

研究分担者

吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センタ

A. 研究目的

近年、感染症に対する粘膜面での一次的防御 (IgA 産生)、さらに全身での二次的防御 (IgG 産生、CTL 誘

導)の両者を誘導可能な粘膜ワクチンに大きな期待が寄せられている。しかし、粘膜ワクチンは一般に抗原単独の投与では十分な免疫を誘導することができない。従って、抗原特異的な粘膜免疫を効率よく誘導できる方法論の開発がキーポイントとなる。本観点から研究代表者らは、独自の機能性サイトカイン変異体創製技術を駆使することで、安全かつ効率的に免疫系を活性化しうる新規アジュバントの創製を目指している。これまで粘膜ワクチンアジュバントとしてコレラトキシン(CT)が世界的に有望視されてきたが、重篤な副作用を伴うことが明らかとなり、臨床応用も断念された。この点、我々は全身面・粘膜面での病原体特異的免疫誘導の根幹を担うサイトカイン TNF- α をアジュバントとして用いると、重篤な副作用なく、粘膜免疫を効率よく誘導可能であることを見出した。そこで本研究では、種々の TNF スーパーファミリー(TNFsf)、およびインターロイキンファミリー分子の中から、粘膜ワクチンアジュバントとしての有用な分子を探索するとともに、粘膜免疫制御における機能を解析することを試みることにした。

前年度までに、TNFsf の粘膜アジュバント特性の評価を行った結果、TNFsf を経鼻ワクチンアジュバントとして用いた場合、Th2 応答を主体とする抗原特異的抗体の誘導を増強可能であることを明らかとしている。一方、ウイルス感染症を標的としたワクチン開発を考慮した際、上述の抗体は粘膜面で侵入してくるウイルスや細胞外に存在する遊離のウイルスには対応できるが、細胞内に感染しているウイルスに対して効果は期待出来ない。そのため抗体に加え、ウイルス感染細胞を排除する細胞傷害性 T 細胞(CTL)の誘導が出来れば、ウイルス感染に対する防御網を多重に構築することが可能となる。このような観点から、インターロイキンの粘膜アジュバントとしての可能性を考えた。そこで 26 種類にも及ぶインターロイキンに関して、経鼻ワクチンアジュバントとして適用した場合の抗原特異的な免疫誘導特性を評価した。その結果、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18、IL-33 という IL-1 ファミリーに属するサイトカインで抗原特異的な血清 IgG、粘膜 IgA の顕著な誘導が認められた。これらサイトカインの免疫誘導特性を解析した結果、Th2 タイプの免疫応答のみならず、Th1 タイプの免疫応答が

誘導され、抗原特異的な CTL の誘導が認められた。また一方で、IL-18、IL-33 の粘膜ワクチンアジュバント活性にマスト細胞が極めて重要であることを明らかとした。

以上のようにサイトカインの中で、とりわけ IL-1 ファミリーサイトカインが粘膜アジュバント効果に優れていることが判明したことから、本年度は、これらサイトカイン用いた粘膜ワクチンの in vivo インフルエンザウイルス感染予防効果について検討を行い、サイトカインアジュバントの有用性を検証した。

一方で我々は、非晶質シリカなどナノマテリアルの有効利用と安全性確保に関する研究を推進しており、これら研究過程において、①ナノマテリアルの体内吸収性や免疫制御作用がナノマテリアル自身の物性により規定されること、②ある物性のナノマテリアルが、経鼻投与後に免疫誘導組織へ効率良く移行し、さらに免疫担当細胞内へも移行すること、を明らかとしている。従って、ナノマテリアルを抗原と共に経鼻接種することで抗原特異的粘膜免疫応答を効率良く誘導し得るのではないかと考えた。そこで、本研究では、非晶質シリカを抗原送達キャリアーとして用い、粘膜免疫誘導能を評価する研究も実施した。

B. 研究方法

B-1 IL-1 ファミリーのインフルエンザウイルス感染阻害効果

試薬

リコンビナントマウス IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18、IL-33 は R&D Systems より、コレラトキシン CT は List Biological Laboratories より購入した。インフルエンザ PR8 HA protein (inactivated-product vaccine with influenza virus A/Puerto Rico/8/34)は Charles River より購入、influenza virus A/PR/8/34(H1N1)は大阪大学微生物病研究所 生田和良博士より分与して頂いた。

動物

BALB/c マウス(H-2d; 雌性 6 週齢)は日本 SLC より

購入した。本研究における動物の飼育および実験は厚生労働省動物実験指針に準じ、所属機関での倫理審査を経て行った。

インフルエンザウイルス感染実験

BALB/c マウスへの経鼻免疫は、IL-1 ファミリー (IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18、IL-33) と PR8 HA protein をそれぞれ 1 μ g/mouse になるように調製し、混合溶液を片鼻孔 10 μ L ずつ両鼻孔に非麻酔条件下で経鼻投与した。尚、投与スケジュールは 4 週間隔で 2 回行った。最終免疫 2 週間後、25 μ L PBS/256 hemagglutinating units (HAU) に調製した PR8 ウイルス (influenza virus A/PR/8/34) 25 μ L を、マウスの片鼻孔へ麻酔下 (生理食塩水で 1mg/mouse になるように調製したペントバルビタールを 100 μ L 腹腔内投与) で投与した。インフルエンザウイルス投与後 14 日間、経日的にマウスの生存数と体重を測定し、生存率と体重変動によりウイルスの感染阻害効果を評価した。

鼻腔粘膜組織の病理学的解析

BALB/c マウスへの経鼻免疫は、IL-1 ファミリー (IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18、IL-33) と rHA をそれぞれ 1 μ g/mouse になるように調製し、混合溶液を片鼻孔 10 μ L ずつ両鼻孔に非麻酔条件下で経鼻投与した。なお、投与スケジュールは 4 週間隔で 2 回行った。最終免疫 2 週間後のマウスから回収した鼻腔粘膜の組織切片を用いて、投与局所部位における組織傷害ならびに炎症性細胞の浸潤を H&E (hematoxylin and eosin) 染色法とルナ染色法により評価した。なお、病理組織学的解析は Applied Medical Research Laboratory 社に解析委託した。

B-2 抗原送達キャリアとしてのナノシリカの有用性評価

ナノマテリアル

Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany) より購入した表面未修飾非晶質シリカ (直径 30、70、300、1000 nm; それぞれ nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000) を使

用した。

免疫方法

BALB/c マウス (6~8 週齢、雌性) への経鼻免疫は、個々の非晶質シリカ (250 mg/mouse) をニワトリ卵白アルブミン (OVA; SIGMA Grade V、10 μ g/mouse) と混合して投与した。尚、3 日間連続で計 3 回、非麻酔条件下で行なった。その後、初回免疫から 21 日後に、血清中の OVA 特異的抗体産生を評価するとともに、解剖し脾細胞の活性化を評価した。

OVA 特異的抗体産生能の評価

OVA (10 μ g/mL, in 50 mM Bicarbonate Buffer) を ELISA プレートに加え、4°C で一晚放置することで固相した。PBS で 2 倍希釈した Block Ace でブロッキング (室温、1 時間) した後、各濃度に調製したサンプルを加えてインキュベートした (室温、2 時間)。プレートを 0.05% Tween 含有 PBS (PBST) あるいは、0.05% Tween 含有 TBS (TTBS) で洗浄後、各濃度に調製した HRP 標識 IgG 抗体 (Southern Biotech) を加えてインキュベートした (室温、2 時間)。プレートを洗浄した後、1/2500 に希釈した HRP 標識ストレプトアビジン (ZyMed) を加え、さらに室温で 1 時間反応させた。再度、洗浄操作を行い最後に蒸留水で洗浄した後、TMB 基質液を添加した。2N H₂SO₄ を添加することにより発色反応を停止させ、吸光波長 450 nm、副波長 690 nm における吸光度を測定した。

脾細胞の調製方法

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

Bio-Plex Multiplex Cytokine assay

マウスから回収した脾細胞を 5×10^6 cells/well で 24 well plate フィルタープレートに播種し、OVA 溶液を終濃度 1 mg/mL となるように添加し、37 °C で 72 時間培養した。Cytokine assay buffer を添加してフィルターを馴染ませた後、1 次抗体付きビーズ溶液および Cytokine assay buffer を添加した。その後、培養上清を添加し、300 rpm で攪拌しながら室温で 30 分インキュベートした。洗浄操作を 3 回行った後、detection antibody を添加し、300 rpm で攪拌しながら室温で 30 分インキュベートした。3 回洗浄操作を行った後、PE 標識 streptavidin を添加し、300 rpm で攪拌しながら室温で 10 分インキュベートした。3 回の洗浄操作を行った後、Cytokine assay buffer で beads を懸濁し、Bio-Plex system により、サイトカイン産生を測定した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

D-1 IL-1 ファミリーのインフルエンザウイルス感染阻害効果

IL-1 ファミリーを粘膜アジュバントとしてそれぞれ PR8 HA protein と共に 4 週間隔で 2 回経鼻免疫し、最終免疫 2 週間後に致死量の PR8 ウイルスを投与した。ウイルス投与後のマウスの生存率と体重変化を比較することで、IL-1 ファミリー粘膜アジュバントのウイルス感染阻害効果を検討した。非免疫マウスの致死量のインフルエンザウイルスを感染させた条件において、抗原単独投与群では生存率が 20% にまで低下していたのに対して、IL-1 ファミリーをそれぞれ併用投与した群においては 80% 以上のマウスが生存し続けた。特に IL-18 投与群においては、致死量のウイルスを投与したのにも関わらず、体重減少することなく効果的にウイルス感染を阻害した(図. 1)。このことから IL-1 ファミリーは、インフルエンザウイルスの感染予防に適う有用な粘膜アジュバントになることが示唆された。

さらに、IL-1 ファミリーの粘膜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を病理組織学的に解析した。その結果、投与 2 週間後では、IL-1 ファミリーの経鼻投与による鼻粘膜上皮細胞の壊死や脱落といった傷害性および炎症性細胞の浸潤は殆ど観察されず、抗原単独投与群と同程度であった(図. 2)。今後、より詳細に安全性評価を行う必要があるが、粘膜アジュバントとして十分に有効性を示す 1 μ g という投与量において、少なくとも投与後 2 週間後の鼻腔粘膜局所では傷害性や炎症反応を生じることなく粘膜アジュバント効果を示すことが明らかとなった。

D-2 抗原送達キャリアとしてのナノシリカの有用性評価

次に、抗原送達キャリアーとしてナノマテリアルを用いた粘膜ワクチンの開発を最終目的に、非晶質シリカと抗原を混合し経鼻投与することで、免疫応答を増強可能であるかを検討した。モデル抗原としては OVA を用いた。また、非晶質シリカの粒子径と免疫誘導能の連関を評価する目的で、直径 30、70、300、1000 nm の非晶質シリカ(nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000)を用いた。なお、各粒子径の非晶質シリカを用い、ゼータサイザーによる 2 次粒子径を測定したところ、各々カタログ値と同様の粒子径を有し、かつ分散性に優れていることを確認している。

各粒子径の非晶質シリカと OVA を混合し、マウスに 3 日間連続で経鼻投与した後、初回投与から 21 日後に、血清中 OVA 特異的 IgG を評価した。その結果、OVA 単独投与群では、全く抗体価の上昇が認められなかった(図. 3A)。一方で、非晶質シリカ投与群では、粒子径の小さな非晶質シリカほど強い OVA 特異的 IgG 産生を示した。特に、nSP30 投与群では、OVA 単独投与群と比較して、有意に高い OVA 特異的 IgG 産生を示した(図. 3A)。

一般に IFN- γ を産生する Th1 細胞は細胞性免疫の誘導に関与し、IL-4 や IL-5 といったサイトカインを産生する Th2 細胞は液性免疫を誘導することが知ら

れている。さらに活性化した各々のT細胞は、B細胞に対して異なる種類の抗体を誘導する。そこで、抗体サブセットを解析した結果、nSP30 投与群では、OVA 単独投与群と比較して、Th2 型の OVA 特異的 IgG1 産生を有意に産生誘導することが判明した(図. 3B)。なお、データには示さないが、Th1 型のフェノタイプを示す OVA 特異的 IgG2a 産生は、いずれの群においても観察されないことを確認している。

そこで、nSP30による抗原特異的 Th2 細胞の誘導能を評価する目的で、同様に免疫したマウスから回収した脾細胞を用いて、*in vitro*で抗原再刺激した場合のサイトカイン産生プロファイルを解析した。その結果、OVA 単独投与群では、全く産生が認められない一方で、非晶質シリカ投与群では、OVA 特異的 IgG 産生と同様に、粒子径の小さな非晶質シリカほど強い産生が認められた(図. 4)。特に、nSP30 投与群では、IL-4 や IL-5 といった Th2 型サイトカインの産生が有意に増強していることが明らかとなった(図. 4)。以上の結果より、nSP30 による強い免疫誘導活性には、Th2 応答を主体とする抗原特異的な免疫システムの活性化が深く関与することが明らかとなり、nSP30 による抗原特異的な抗体産生の増強に結びついたものと考えられた。

E. 結論

本研究では、マウス経鼻ワクチン実験において、インフルエンザ HA 蛋白質をワクチン抗原とし、26 種類のインターロイキンファミリーサイトカインのアジュバント効果をスクリーニングした。その結果、インターロイキンファミリーサイトカインの中で、IL-1 ファミリーに属する IL-1 α 、IL-1 β 、IL-18、IL-33 が、とりわけ効率よく全身 (IgG) および粘膜面 (IgA) の防御免疫を誘導するという知見を得た。そして、IL-1 ファミリーサイトカインを HA ワクチンのアジュバントとして用いることで、インフルエンザウイルス(A/PR8 株)の感染を顕著に抑制できることが判明した。

一方、ワクチン送達キャリアの適用を目的として、ナノシリカの特性を評価した。その結果、ナノサイズの非晶質ナノシリカが、粘膜免疫誘導能に優れた抗原送達

キャリアーになり得る可能性が示された。今後は、優れた粘膜免疫アジュバントとして我々が見出した IL-1 ファミリーサイトカインとの併用により、より有効な粘膜ワクチンを創製可能になると考えている。

本研究成果は、インフルエンザウイルスに対する効果的な粘膜ワクチン開発に向けて極めて重要な基盤情報を提供するとともに、他の多くの感染症に対しても有効なワクチン戦略を提示可能と考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Arita S., Katayama K., Nomura T., Yoshikawa T., Kubota-Koketsu R., Ikuta K., Okamoto S., Mori Y., Kunisawa J., Kiyono H., Itoh N., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y. and Tsunoda S. Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus. *J Virol.* 84(24): 12703–12712, 2010.
2. Mukai Y., Nakamura T., Yoshikawa M., Yoshioka Y., Tsunoda S., Nakagawa S., Yamagata Y. and Tsutsumi Y. Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 Complex. *Sci Signal.* 3: ra83, 2010.
3. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Arita S., Nomura T., Yoshikawa T., Itoh N., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Identification of new candidates as mucosal vaccine adjuvant in TNF family cytokines. *Advances in Experimental Medicine and Biology* volume 691, pp299–304, Wallach D. eds, Springer Science, 2010.
4. Yoshida T, Yoshioka Y, Fujimura M, Yamashita K, Higashisaka K, Morishita Y, Kayamuro H, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa T, Tsutsumi Y.

Promotion of allergic immune responses by intranasally-administrated nanosilica particles in mice. *Nanoscale Res Lett.* 6: 195 (2011)

G-2 学会発表

1. 有田修平, 萱室裕之, 阿部康弘, 鎌田春彦, 古屋剛, 井上雅己, 長野一也, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 國澤 純, 清野 宏, 瀧瀬律子, 生田和良, 堤 康央, 角田慎一: インフルエンザ経鼻ワクチンアジュバントとしての IL-1 ファミリーの有用性評価。第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪, 2010 年 10 月。
2. 角田慎一: サイトカインとタンパク質工学による粘膜アジュバント開発, 次世代アジュバント研究会, 大阪, 2011 年 1 月。
3. Arita S., Kayamuro H., Abe Y., yoshioka Y., Kamada H., Nomura T., Kawara T., Furuya T., Itoh N., Yoshikawa T., Nagano K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Characterization of Interleukin-1 family cytokines as an adjuvant for mucosal vaccine against influenza virus., 14th International Congress of Immunology., Kobe, Aug, 2010
4. Arita S., Kayamuro H., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Furuya T., Itoh N., Yoshikawa T., Nagano K., Tsutsumi Y., Tsunoda S., THE POTENTIAL OF IL-1 FAMILY CYTOKINES AS MUCOSAL

ADJUVANTS FOR NASAL INFLUENZA VACCINE, Joint Meeting of the International Cytokine Society (ICS) and the International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR), Chicago, October, 2010.

5. 吉岡靖雄, 森重智弘, 角田慎一, 向 洋平, 岡田直貴, 堤 康央, 中川晋作: 非晶質ナノシリカの粒子特性と自然免疫応答の連関評価とそのメカニズム解析。第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇, 2010 年 6 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許

該当なし

H-2 実用新案

該当なし

I. 研究協力者

阿部 康弘 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロ
テオミクスプロジェクト

有田 修平 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

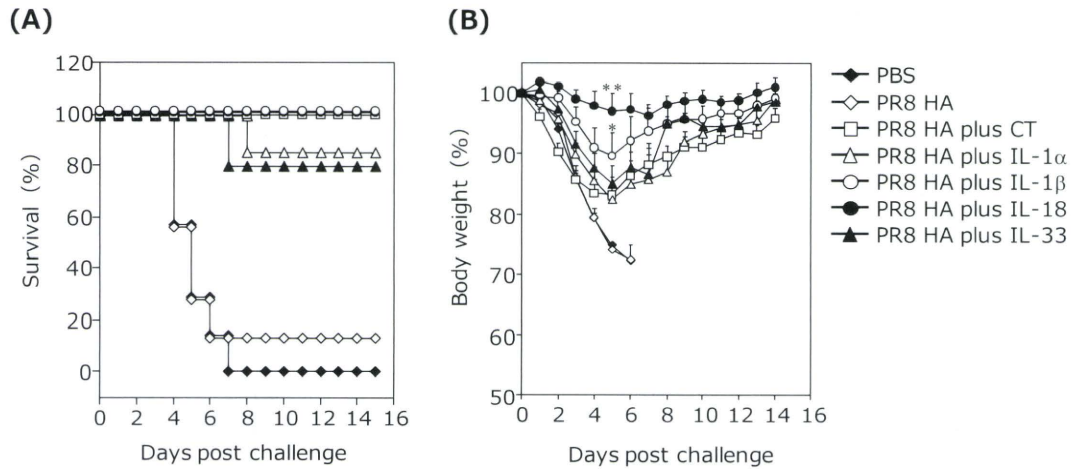


Fig 1. Protection of BALB/c mice against lethal influenza virus infection by IL-1 family cytokine adjuvants. BALB/c mice were immunized intranasally at 0 and 28 days with PR8 HA alone, PR8 HA plus CT, or PR8 HA plus an IL-1 family cytokine. 14 days after the final immunization, mice were intranasally infected with 256 HAU of influenza virus A/PR/8/34. Mice were monitored for survival (A) and weight loss (B) for 14 days after infection. The results are expressed as percent survival (A) and percent initial body weight (B). Data are presented as means \pm SEM (n=4 to 7). Differences were compared using Dunnett analysis of variance (ANOVA). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ compared to the value for the PR8 HA treated group.

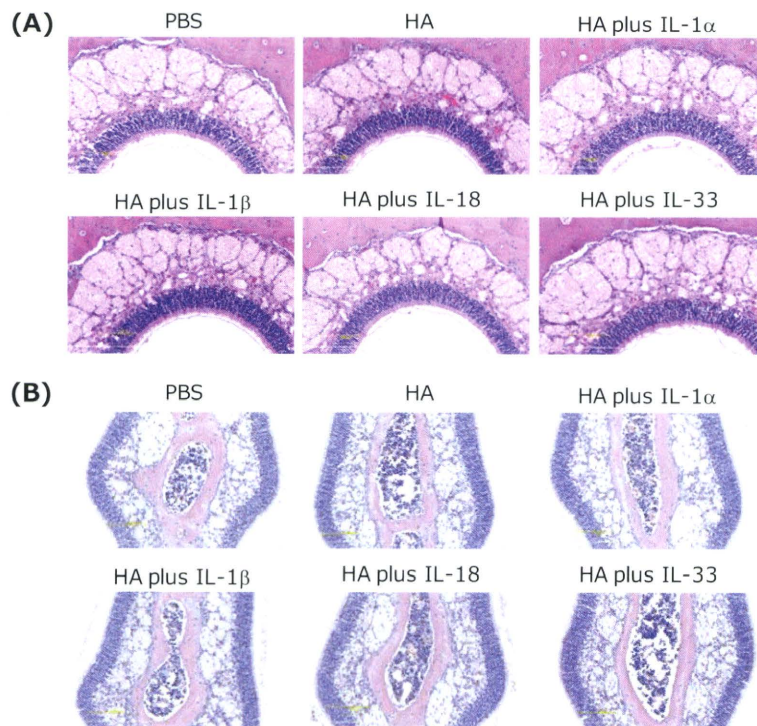


Fig 2. Histopathological analysis of the nasal cavities of mice immunized intranasally with rHA plus an IL-1 family cytokine. Frontal cross sections of nasal cavities of mice were taken after two administrations of PBS, rHA alone, or rHA plus an IL-1 family cytokine. Sections were prepared and stained with H&E (A) or Luna's stain (B) to assess pathological changes. Overall views of the nasal epithelium (A) and of Luna's-stained eosinophils in the nasal septum (B) are shown.

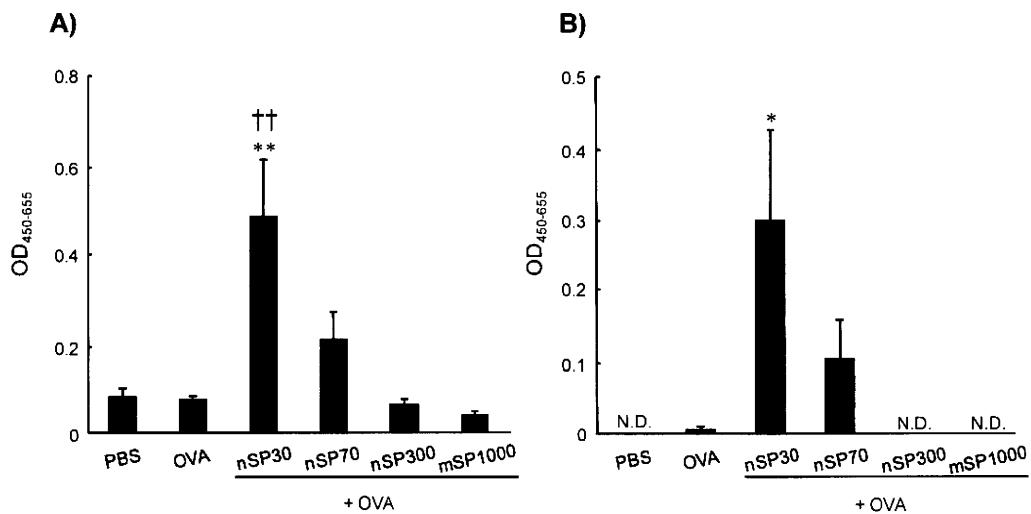


Figure 3. Plasma OVA-specific IgG and subclass IgG1 Ab response after intranasal exposure to OVA plus silica particles.

BALB/c mice were intranasally exposed to PBS (vehicle control), OVA alone or OVA plus silica particles (250 μ g/mouse) on days 0, 1, and 2. Plasma was collected on day 21 and analyzed by ELISA to detect the level of (A) OVA-specific IgG and (B) OVA-specific IgG1 Ab responses. Data represent mean absorbance at a wavelength of 450 nm (reference wavelength, 655 nm). N.D., not detected. Data are presented as mean \pm SEM (n = 5 to 8); **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs OVA alone; ††*P* < 0.01 vs PBS).

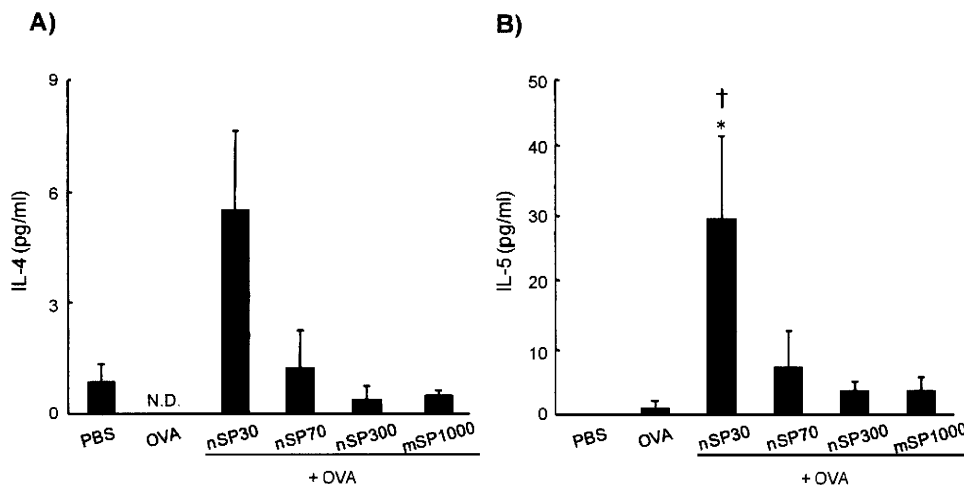


Figure 4. Cytokine responses induced after intranasal exposure to OVA plus silica particles.

BALB/c mice were intranasally exposed to PBS (vehicle control), OVA alone or OVA plus silica particles (250 μ g/mouse) on days 0, 1, and 2. On day 21, splenocytes from each group were prepared and cultured with 1 mg/mL OVA. Culture supernatants were harvested after 3 days of incubation, and the level of OVA-induced IL-4 (A) and IL-5 (B) produced and released into the culture supernatant was analyzed using the Bio-Plex Multiplex Cytokine Assay. Data are presented as mean \pm SEM (n = 3; **P* < 0.05 vs OVA alone; †*P* < 0.05 vs PBS).

新規サイトカインアジュバントの開発

分担研究者 吉岡 靖雄

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任講師

研究要旨

インフルエンザウイルスは呼吸器粘膜面を介して感染することから、粘膜面での免疫応答を活性化することでウイルスの侵入を防御する方法論の開発が待望されている。本観点から、経口・経鼻・経腔投与など経粘膜接種によるワクチン(粘膜ワクチン)は、抗原投与部位の粘膜面のみならず、遠隔の粘膜面、更には脾臓などの全身系免疫組織にも抗原特異的免疫応答が誘導可能なため、インフルエンザウイルス感染制御の点で理想的方法論として期待されている。しかし現在、インフルエンザウイルスに対する粘膜ワクチンの最適化に向け、種々検討が行われているが、未だ良好な成果は得られていない。その最大の原因は、粘膜面における免疫反応(粘膜免疫)を効率良く誘導可能な安全性・有効性に優れた免疫活性化因子(粘膜ワクチンアジュバント)、抗原送達キャリアーの開発の遅れにある。本研究課題では、安全性・有効性に優れた経粘膜投与型サイトカインを創製した上で、粘膜ワクチンアジュバントへ適用することで、インフルエンザウイルスに対する効果的な粘膜ワクチンシステム構築を試みてきた。特にサイトカインに注目し、IL-1 ファミリーサイトカインが優れた粘膜ワクチンアジュバントになり得ることを明らかとしてきた。そこで本年度は、粘膜免疫を効率良く誘導可能な抗原送達キャリアーの開発を最終目的に、ナノマテリアルを抗原送達キャリアーとして適用し、粘膜免疫誘導能を評価した。本研究成果は、インフルエンザウイルスに対する効果的な粘膜ワクチン開発に向けて極めて重要な基盤情報を提供するとともに、他の多くの感染症に対しても有効なワクチン戦略を提示可能と考えられる。

A. 研究目的

呼吸器粘膜面を介して感染するインフルエンザウイルスの感染経路を考慮した場合、経口・経鼻・経腔投与など経粘膜接種によるワクチン(粘膜ワクチン)は、抗原投与部位の粘膜面のみならず、遠隔の粘膜面、更には脾臓などの全身系免疫組織にも抗原特異的免疫応答が誘導可能なため、インフルエンザウイルス感染制御の点で理想的方法として期待されている。しかし、抗原単独で経粘膜投与しただけでは、抗原性の低さなどから効率的に分泌型 IgA 抗体産生・細胞傷害性 T 細胞誘導をはじめとした粘膜免疫応答を誘導することが困難であり、粘膜免疫を強力に誘導することが可能な粘膜ワクチンアジュバントや、抗原を効率良く免疫細胞へ送達可能な抗原送達キャリアー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。本観点から我々はこれまでに、約 30 種類程度のサイトカインから構成されるインターロイキン(IL)ファミリーサイトカインの、粘膜ワクチンアジュバントとしての有効性を包括的に評価し、IL-1 α ・IL-1 β ・IL-18・IL-33 など IL-1 ファミリーが優れた粘膜ワクチンアジュバントになり得る可能性を示してきた。

一方で申請者は、非晶質シリカなどナノマテリアルの安全性確保研究を推進しており、これら研究過程において、①ナノマテリアルの体内吸収性や免疫制御作用がナノマテリアル自身の物性により規定され

ること、②ある物性のナノマテリアルが、経鼻投与後に免疫誘導組織へ効率良く移行し、さらに免疫担当細胞内へも移行すること、を明らかとしている。従って、ナノマテリアルを抗原と共に経鼻接種することで抗原特異的粘膜免疫応答を効率良く誘導し得るのではないかと考えた。そこで、本研究では、非晶質シリカを抗原送達キャリアーとして用い、粘膜免疫誘導能を評価した。

B. 研究方法

ナノマテリアル

Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany) より購入した表面未修飾非晶質シリカ (直径 30、70、300、1000 nm ; それぞれ nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000) を使用した。

免疫方法

BALB/c マウス (6~8 週齢、雌性) への経鼻免疫は、個々の非晶質シリカ (250 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) をニワトリ卵白アルブミン (OVA ; SIGMA Grade V、10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) と混合して投与した。尚、3 日間連続で計 3 回、非麻酔下で行なった。その後、初回免疫から 21 日後に、血清中の OVA 特異的抗体産生を評価するとともに、解剖し脾細胞の活性化を評価した。

OVA 特異的抗体産生能の評価

OVA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, in 50 mM Bicarbonate Buffer) を ELISA プレートに加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩放置することで固相した。PBS で 2 倍希釈した Block Ace でブロッキング (室温、1 時間) した後、各濃度に調製したサンプルを加えてインキュベートした (室温、2 時間)。プレートを 0.05 % Tween 含有 PBS (PBST) あるいは、0.05 % Tween 含有 TBS (TTBS) で洗浄後、各濃度に調製した HRP 標識 IgG 抗体 (Southern Biotech) を加えてインキュベートした (室温、2 時間)。プレートを洗浄した後、1/2500 に希釈した HRP 標識ストレプトアビジン (ZyMed) を加え、さらに室温で 1 時間反応させた。再度、洗浄操作を行い最後に蒸留水で洗浄した後、TMB 基質液を添加した。2N H_2SO_4 を添加することにより発色反応を停止させ、吸光波長 450 nm、

副波長 690 nm における吸光度を測定した。

脾細胞の調製方法

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 $^{\circ}\text{C}$ の条件で遠心することで、細胞のペレットを回収した。回収したペレットを RPMI 1640 (10% FBS、50 μM 2-ME、抗生物質を含む) で洗浄操作を 1 回行った後、 NH_4Cl 溶液で懸濁することにより赤血球を除去した。さらに遠心操作を行った後、RPMI 1640 (10% FCS、50 μM 2-ME、10 mL/L of a 100x non-essential amino acids solution、1 mM sodium pyruvate、10 mM HEPES) で懸濁し、脾細胞を調製した。

Bio-Plex Multiplex Cytokine assay

マウスから回収した脾細胞を 5×10^6 cells/well で 24 well plate フィルタープレートに播種し、OVA 溶液を終濃度 1 mg/mL となるように添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 72 時間培養した。Cytokine assay buffer を添加してフィルターを馴染ませた後、1 次抗体付きビーズ溶液および Cytokine assay buffer を添加した。その後、培養上清を添加し、300 rpm で攪拌しながら室温で 30 分インキュベートした。洗浄操作を 3 回行った後、detection antibody を添加し、300 rpm で攪拌しながら室温で 30 分インキュベートした。3 回洗浄操作を行った後、PE 標識 streptavidin を添加し、300 rpm で攪拌しながら室温で 10 分インキュベートした。3 回の洗浄後、Cytokine assay buffer で beads を懸濁し、Bio-Plex system により、サイトカインを測定した。

C. 研究結果

結果は D. 結果・考察欄にまとめて記載した。

D. 結果・考察

本研究では、抗原送達キャリアーとしてナノマテリアルを用いた粘膜ワクチンの開発を最終目的に、非晶質シリカと抗原を混合し経鼻投与することで、免疫応答を増強可能であるかを検討した。モデル抗原としては OVA を用いた。また、非晶質シリカの粒子径

と免疫誘導能の連関を評価する目的で、直径 30、70、300、1000 nm の非晶質シリカ(nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000)を用いた。なお、各粒子径の非晶質シリカを用い、ゼータサイザーによる2次粒子径を測定したところ、各々カタログ値と同様の粒子径を有し、かつ分散性に優れていることを確認している。

各粒子径の非晶質シリカと OVA を混合し、マウスに3日間連続で経鼻投与した後、初回投与から21日後に、血清中 OVA 特異的 IgG を評価した。その結果、OVA 単独投与群では、全く抗体価の上昇が認められなかった (Fig. 1A)。一方で、非晶質シリカ投与群では、粒子径の小さな非晶質シリカほど強い OVA 特異的 IgG 産生を示した (Fig. 1A)。特に、nSP30 投与群では、OVA 単独投与群と比較して、有意に高い OVA 特異的 IgG 産生を示した (Fig. 1A)。

一般に IFN- γ を産生する Th1 細胞は細胞性免疫の誘導に関与し、IL-4 や IL-5 といったサイトカインを産生する Th2 細胞は液性免疫を誘導することが知られている。さらに活性化した各々の T 細胞は、B 細胞に対して異なる種類の抗体を誘導する。そこで、抗体サブセットを解析した結果、nSP30 投与群では、OVA 単独投与群と比較して、Th2 型の OVA 特異的 IgG1 産生を有意に産生誘導することが判明した (Fig. 1B)。なお、データには示さないが、Th1 型のフェノタイプを示す OVA 特異的 IgG2a 産生は、いずれの群においても観察されないことを確認している。

そこで、nSP30 による抗原特異的 Th2 細胞の誘導能を評価する目的で、同様に免疫したマウスから回収した脾細胞を用いて、*in vitro* で抗原再刺激した場合のサイトカイン産生プロファイルを解析した。その結果、OVA 単独投与群では、全く産生が認められない一方で、非晶質シリカ投与群では、OVA 特異的 IgG 産生と同様に、粒子径の小さな非晶質シリカほど強い産生が認められた (Fig. 2)。特に、nSP30 投与群では、IL-4 や IL-5 といった Th2 型サイトカインの産生が有意に増強していることが明らかとなった (Fig. 2)。以上の結果より、nSP30 による強い免疫誘導活性には、Th2 応答を主体とする抗原特異的な免疫システムの活性化が深く関与することが明らかとなり、nSP30 による抗原特異的な抗体産生の増強に結び

ついたものと考えられた。

E. 結論

本研究では、ナノサイズの非晶質ナノシリカが、粘膜免疫誘導能に優れた抗原送達キャリアーになり得る可能性が示された。今後は、優れた粘膜免疫アジュバントとして我々が見出した IL-1 サイトカインとの併用により、より有効な粘膜ワクチンを創製可能になると考えている。本研究成果は、インフルエンザウイルスに対する効果的な粘膜ワクチン開発に向けて極めて重要な基盤情報を提供するとともに、他の多くの感染症に対しても有効なワクチン戦略を提示可能と考えられる。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

①論文発表

1. Yoshida T, Yoshioka Y, Fujimura M, Yamashita K, Higashisaka K, Morishita Y, Kayamuro H, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa T, Tsutsumi Y. Promotion of allergic immune responses by intranasally-administrated nanosilica particles in mice. *Nanoscale Res Lett.* 6:195 (2011)

②学会発表

1. 吉岡靖雄, 森重智弘, 角田慎一, 向洋平, 岡田直貴, 堤康央, 中川晋作:非晶質ナノシリカの粒子特性と自然免疫応答の連関評価とそのメカニズム解析., 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇, 2010年6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

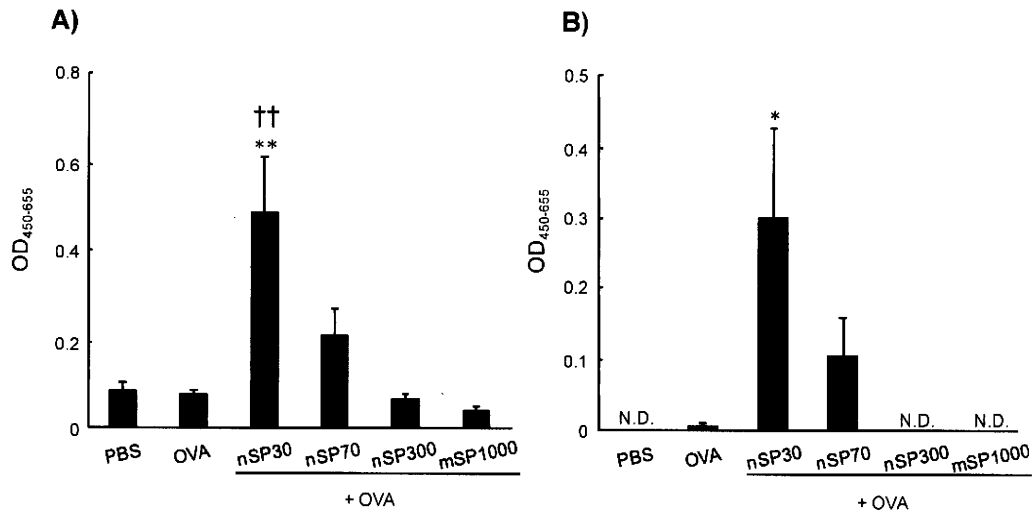


Figure 1. Plasma OVA-specific IgG and subclass IgG1 Ab response after intranasal exposure to OVA plus silica particles. BALB/c mice were intranasally exposed to PBS (vehicle control), OVA alone or OVA plus silica particles (250 μ g/mouse) on days 0, 1, and 2. Plasma was collected on day 21 and analyzed by ELISA to detect the level of (A) OVA-specific IgG and (B) OVA-specific IgG1 Ab responses. Data represent mean absorbance at a wavelength of 450 nm (reference wavelength, 655 nm). N.D., not detected. Data are presented as mean \pm SEM (n = 5 to 8); * P < 0.05, ** P < 0.01 vs OVA alone; †† P < 0.01 vs PBS).

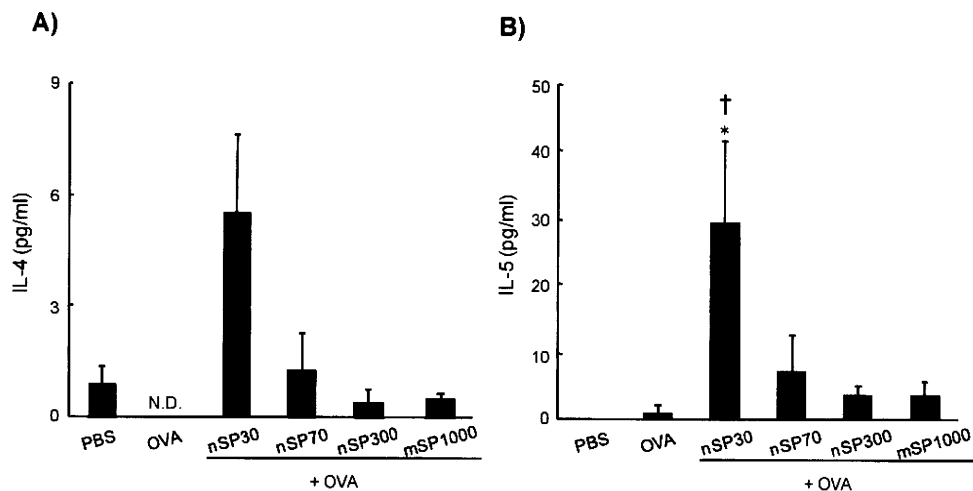


Figure 2. Cytokine responses induced after intranasal exposure to OVA plus silica particles. BALB/c mice were intranasally exposed to PBS (vehicle control), OVA alone or OVA plus silica particles (250 μ g/mouse) on days 0, 1, and 2. On day 21, splenocytes from each group were prepared and cultured with 1 mg/mL OVA. Culture supernatants were harvested after 3 days of incubation, and the level of OVA-induced IL-4 (A) and IL-5 (B) produced and released into the culture supernatant was analyzed using the Bio-Plex Multiplex Cytokine Assay. Data are presented as mean \pm SEM (n = 3; * P < 0.05 vs OVA alone; † P < 0.05 vs PBS).

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Arita S., Nomura T., Yoshikawa T., Itoh N., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Identification of new candidates as mucosal vaccine adjuvant in TNF family cytokines.	Wallach D.	Advances in Experimental Medicine and Biology volume691	Springer Science	U.S.A.	2010	299-304

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., Yoshioka Y., Abe Y., Arita S., Katayama K., Nomura T., Yoshikawa T., Kubota-Koketsu R., Ikuta K., Okamoto S., Mori Y., Kunisawa J., Kiyono H., Itoh N., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y. and Tsunoda S.	Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus.	J Virol.	84 (2)	12703-12712	2010
Mukai Y., Nakamura T., Yoshikawa M., Yoshioka Y., Tsunoda S., Nakagawa S., Yamagata Y. and Tsutsumi Y.	Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 Complex.	Sci Signal.	3	ra83	2010
Yoshida T, Yoshioka Y, Fujimura M, Yamashita K, Higashisaka K, Morishita Y, Kayamuro H, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Itoh N, Yoshikawa T, Tsutsumi Y.	Promotion of allergic immune responses by intranasally-administrated nanosilica particles in mice.	Nanoscale Res Lett.	6	195	2011

Chapter 31

Identification of New Candidates as Mucosal Vaccine Adjuvant in TNF Family Cytokines

Hiroyuki Kayamuro, Yasuo Yoshioka, Yasuhiro Abe, Kazufumi Katayama, Shuhei Arita, Tetsuya Nomura, Tomoaki Yoshikawa, Norio Itoh, Haruhiko Kamada, Shin-ichi Tsunoda, and Yasuo Tsutsumi

Mucosal Immunity and Vaccine

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 (human immunodeficiency virus), and influenza virus, invade and infect via the mucosal surfaces of the host gastrointestinal, respiratory, and/or genitourinary tracts [3]. 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 [2]. Because this IgA response represents the major mechanism of defense against viral and bacterial infections, recent efforts have been focused on the development of vaccines that are capable of efficiently inducing IgA production, as well as cytotoxic T-cell activation, in mucosal tissues.

Mucosal vaccines administered either orally or nasally are effective in inducing antigen-specific immune responses in both the systemic and the mucosal compartment [10]. Because of this two-layered protective immunity, the use of mucosal vaccines is likely to be an ideal strategy for combating both emerging and re-emerging infectious diseases (Fig. 31.1). 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 [1]. Therefore, one strategy to overcome the weakness of the immune response is the co-administration of a mucosal adjuvant with the vaccine antigen [6]. Unfortunately, the development of a safe and effective mucosal adjuvant has proved to be challenging. As a potent mucosal vaccine adjuvant, cholera toxin (CT) or heat-labile toxin has been used

S. Tsunoda (✉)

Laboratory of Biopharmaceutical Research, National Institute of Biomedical Innovation (NiBio), 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan; Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan; The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

e-mail: tsunoda@nibio.go.jp

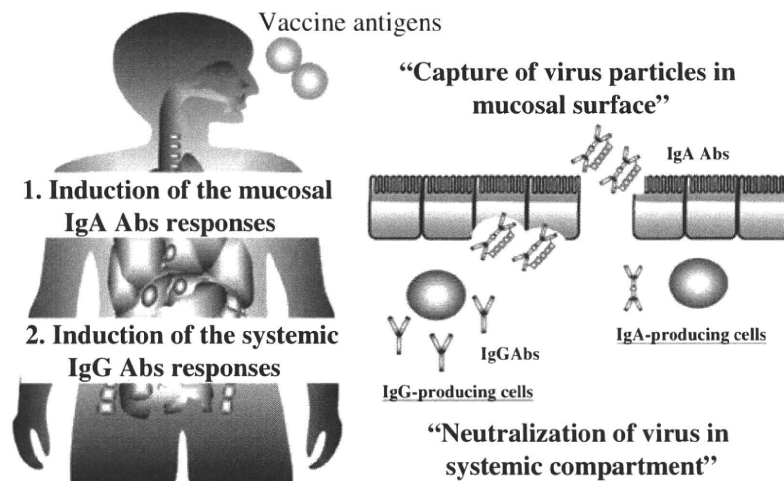


Fig. 31.1 Mucosal vaccine strategy

in experimental studies. However, the watery diarrhea induced by the administration of these toxins precludes their use as oral adjuvants in humans [4]. In addition, a recent report showed that administration of a human vaccine containing inactivated influenza virus, with heat-labile toxin as a mucosal adjuvant, resulted in a very high incidence of Bell's palsy [9]. Therefore, development of novel mucosal vaccine adjuvants with high efficacy and safety is urgently required for clinical applications.

Previously, we tested the potential for tumor necrosis factor (TNF)- α to function as a mucosal vaccine adjuvant. We showed that TNF- α could substantially enhance antigen-specific Ab responses at both the systemic and the mucosal level in mice [7, 8]. Furthermore, we have utilized a phage display system to create a functionalized TNF- α , and we have developed a mutant form of TNF- α , namely mTNF-K90R, which possesses six times the *in vitro* bioactivity and 13 times the *in vivo* bioactivity as wild-type TNF- α [11]. In addition, we previously demonstrated that intranasal administration of a model antigenic protein (ovalbumin; OVA) together with mTNF-K90R effectively induced the production of both antigen-specific IgG in the serum and IgA at mucosal sites (Fig. 31.2). Importantly, although mTNF-K90R had a potent adjuvant effect on mucosal immunity, it did not elicit signs of excessive inflammation, such as edema or fibrosis [7, 8]. These findings indicate that our technique of creating bioactive mutant cytokines might be attractive for designing novel mucosal adjuvants that are effective and safe.

Identification of New Candidate Mucosal Vaccine Adjuvants Among TNF Superfamily Cytokines

Previously, we reported that use of TNF- α as a mucosal vaccine adjuvant augmented both the antigen-specific systemic IgG Ab response and the mucosal IgA Ab response in mice [7, 8]. However, it is not yet known which of the TNF superfamily cytokines is the most potent mucosal adjuvant for augmenting antigen-specific