

201028053A・B

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」
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

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、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、サイトカインの機能改変体の創製、さらに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・増殖の阻害効果の検証を行った。

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。一方で、サイトカイン機能改変体を創製し、よりアジュバント効果に優れるサイトカイン変異体を創製することにも成功した。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 創薬プロジェクト

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

A. 研究目的

近年、感染症に対する粘膜面での一次的防御(IgA 産生)、さらに全身での二次的防御(IgG 産生、CTL 誘導)の両者を誘導可能な粘膜ワクチンに大きな期待が寄せられている。しかし、粘膜ワクチンは一般的に抗原提示の効率が低く、抗原単独の投与では十分な免疫を誘導することができない。従って、抗原特異的な粘膜免疫を効率よく誘導できる方法論の開発がキーポイントとなる。本観点から申請者は、独自の機能性サイトカイン変異体創製技術および抗体プロテオミクス技術を駆使することで、1.安全かつ効率的に免疫系を活性化しうる新規アジュバントの創製、2.抗原を粘膜リンパ組織へ効率よく抗原を送達し得る方法の開発を目指している。これまで粘膜ワクチンアジュバントとしてコレラトキシン(CT)が世界的に有望視されてきたが、重篤な副作用を伴うことが明らかとなり、臨床応用も断念された。この点申請者は、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、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。そして、インフルエンザ粘膜ワクチンのアジュバントとしての有用性を検証する。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。

B. 研究方法

B1. ファージ表面提示法を用いたレセプターサブタイプ指向性 TNF 変異体の創製

TNF 変異体発現ファージライブラリの作製

PCRによって、TNF 中に6つのアミノ酸を NNS 配列に置換したライブラリを作製した。PCR 産物を PCR

purification kit で精製することで、6 個のアミノ酸をコードする配列が NNS 配列に置換された TNF 構造変異体ライブラリ遺伝子を得た。この TNF 構造変異体ライブラリ遺伝子を HindIII および Not I で処理し、予め HindIII および Not I で処理したファージミドベクター-pY03'-FLAG と T4 ligase を用いて 16°C、18 時間ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物を PCR purification kit で精製した後、大腸菌の形質転換に用いた。

ファージライブラリの作製

大腸菌ライブラリを 50 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地で OD600=0.4 まで培養し、M13K07 ヘルパーファージ (Invitrogen™ Life Technologies) を添加した。110rpm 30 分間、250rpm 30 分間培養後、3,000rpm 10 分間遠心し、得られたペレットに 100 μ g/mL アンピシリン、50 μ g/mL カナマイシン (Sigma-Aldrich, Inc.) 含有 2YT 培地を添加し、6 時間培養することで、ファージを産出した。この TG1 培養液を氷冷し、12,000rpm 10 分間遠心した後、回収した上清に氷冷した PEG8,000 (和光純薬株式会社)、2.5M NaCl を 1/5 volume 加え、1 時間静置後、12,000rpm 15 分間遠心した。得られたファージペレットを NTE buffer (100mM NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA) に懸濁し、0.45 μ m のフィルターを通し、精製ファージライブラリ溶液とした。

タイターの測定

2%グルコース含有 2YT 培地で OD600 = 0.3 まで培養した TG1 に対して、10 倍希釈で段階希釈したファージ溶液を添加し、37°C 1 時間培養した。培養液の一部に 50 μ g/mL アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、クローンディスクに播種し一晩培養した。各希釈段階でのコロニー数を計測することで、ファージタイターを算出した。

コンペティティブパンニングによる TNFR2 指向性 TNF 変異体の濃縮

TNF 変異体発現ファージライブラリ溶液をランニン

グ緩衝液 HBS-EP (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20; GE Healthcare) で 1.0×10^{11} CFU/mL になるように希釈し、インプットライブラリとした。ファージ溶液 100 μ L に対して、種々濃度に調整したヒト TNFR1 Fc キメラ (hTNFR1:Fc; R&D systems) を 100 μ L 添加し、4°C で 2 時間反応させた。その後、各混合溶液を TNFR2:Fc を固相化したセンサーチップ CM3 (GE Healthcare) に流速 3 μ L/min で 100 μ L インジェクションした。リンスコマンドにより洗浄後、流速 20 μ L/min で 2 回再生液 20 μ L をインジェクションし、回収したファージ溶出液に 1mM Tris-HCl pH 8.0 を 40 μ L、2% グルコース含有 2YT 培地を 420 μ L 添加し、その 50 μ L を用いてタイターチェックを行った。残りのファージを再度 TG1 に感染させ、増幅させてプラスミドを回収した。精製したプラスミドを TG1 ヘレクトロポレーションにより導入した後、ファージを産出し、再度同様のパンニング操作を行ったものを 2nd パンニングとした。

TNF 変異体を含む培養上清の作製

パンニングで溶出したファージを TG1 に感染させ、得られたコロニーを 96well plate に回収し、一晚培養した。2% グルコース、50 μ g/mL アンピシリン含有 2YT 培地 100 μ L を新たに添加した plate に、一晚培養した培養液 10 μ L を添加し OD600 = 0.4~0.5 まで培養した。3,000 rpm 20 分間遠心した後、上清を捨て 1mM IPTG、50 μ g/mL アンピシリン含有 2YT 培地 100 μ L を添加し、37°C 8 時間培養した。再び 3,000 rpm 20 分間遠心し、上清を回収して ヒト TNFR1 およびヒト TNFR2 に対する結合力を ELISA にて検討した。

BIAcore を用いた各 TNF 変異体の各 TNF レセプターに対する結合力の測定

BIAcore biosensor (BIAcore 2000, GE Healthcare) を用いて各変異体の hTNFR1 および hTNFR2 に対する親和性を測定した。各 TNF サンプルは、タンパク質濃度として 4 μ g/mL から、4.9 ng/mL にランニン

グ緩衝液 HBS-EP で適宜希釈し、60 μ L (3min) インジェクション後、180 秒ランニング緩衝液を流すことで結合反応と解離反応における相互作用を計測した。各速度パラメーターの算出は BIA evaluation 3.0 program を用いて行った。

TNFR1 を介した生物活性の評価 (HEp-2 細胞に対する細胞傷害性試験)

HEp-2 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FCS) および抗生物質 (1% Antibiotic - Antimycotic (100 \times), liquid (GIBCO BRL)) を含む RPMI-1640 にて継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96well plate に 4×10^4 cells の HEp-2 細胞を播種し、37°C、飽蒸気圧、5% 炭酸ガス気相下で 2 時間培養を行った後、予め、100 μ g/mL シクロヘキシミド含有 10% FCS-RPMI にて段階希釈したサンプル 100 μ L を加えた。18 時間培養を行った後、25% グルタルアルデヒドにて細胞を固定した。洗浄後 0.05% メチレンブルー溶液で細胞を染色し、plate を洗浄・風乾した後、0.3 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度 (測定波長 655 nm、対照波長 415 nm) を測定し、比活性を評価した。標準品には、recombinant human TNF (peprotech, Inc.) を用いた。

TNFR2 を介した生物活性の評価 (TNFR2/Fas preadipocyte に対する細胞傷害性試験)

TNFR2/Fas preadipocyte は、10% FCS、抗生物質 および、Blasticidin HCl (Invitrogen, Inc.) を 5 μ g/mL を含む D-MEM (Sigma-Aldrich, Inc.) にて継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96well plate に 1.5×10^4 cells/50 μ L の TNFR2/Fas preadipocyte を播種し、1 μ g/mL シクロヘキシミド含有培養液にて段階希釈したサンプルを 50 μ L 添加した。37°C、飽和蒸気圧、5% 炭酸ガス気相下で 48 時間培養を行った後、生細胞数測定試薬 SF (Nacalai Tesque) 10 μ L/well を加え、37°C で 1 時間培養し、吸光度 (測定波長 450 nm、対照波長 650nm) を測定することで、細胞傷害活性を評価した。

B2. アジュバント効果を有するサイトカインのスクリーニング

免疫方法

BALB/c マウス(6~8 週齢、雌性)に、TNF スーパーファミリーおよびインターロイキンファミリーのサイトカインあるいはコレラトキシン B サブユニット(CTB; List Biological Laboratories)をニワトリ卵白アルブミン(OVA)、あるいはリコンビナント HA 蛋白質(H1N1 ニューカレドニア株; Protein Sciences, Meriden, CT)と混合して、非麻酔条件下で経鼻的に投与した。投与スケジュールは OVA については1週間間隔で3回、4週間間隔で2回行った。

サンプルの回収

血清サンプルは、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回収した。唾液は、ピロカルピン塩酸塩(和光特級)を PBS に溶解して終濃度 0.2 mg/ml となるように調製し、BALB/c マウスに 1ml/mouse で腹腔内投与を行うことで回収した。糞便を 100 mg/mL となるように PBS を加え、4 °C、2 時間激しく攪拌し、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とした。腔洗浄液は、マウス腔内を 100 μ L PBS で洗浄後、14000 rpm、20 分、4 °C 遠心操作を行うことにより調製した。

HA 特異的抗体産生能の評価(HA specific Ig ELISA)

リコンビナント HA (2 μ g/mL, in 50 mM Bicarbonate Buffer) を ELISA プレートに加え、4 °C で一晩放置することで固相した。PBS で2倍希釈した Block Ace でブロッキング(室温、1時間)した後、各濃度に調製したサンプルを加えてインキュベートした(室温、2時間; IgG、37 °C、2時間; IgA)。これらのプレートを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 抗体およびビオチン標識 IgA 抗体(Southern Biotech)を加えてインキュベート

した(室温、2時間; IgG、37 °C、2時間; IgA)。プレートを洗浄した後、1/2500 に希釈した HRP 標識ストレプトアビジン(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、TMBZ 基質液を添加した。2N H₂SO₄ を添加することにより発色反応を停止させ、吸光波長 450 nm、副波長 690 nm における吸光度を測定した。

2. TNF-K90R およびアデノウイルスベクターの有用性評価

免疫方法

BALB/c マウス(6~8 週齢、雌性)への経鼻免疫は、サイトカインあるいはコレラトキシン B サブユニット(CT-B; List Biological Laboratories)をインフルエンザウイルス抗原 HA (Protein science, 1 μ g/mouse) と混合投与し、非麻酔条件下で行なった。尚、投与スケジュールは4週間間隔で2回行った。

各サンプルの回収

最終免疫から2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。

OVA 特異的抗体産生能の評価(OVA specific Ig ELISA); OVA (10 μ g/mL, in 50 mM Bicarbonate Buffer) を ELISA プレートに加え、4 °C で一晩放置することで固相した。PBS で2倍希釈した Block Ace でブロッキング(室温、1時間)した後、各濃度に調製したサンプルを加えてインキュベートした(室温、2時間; IgG、37 °C、2時間; IgA)。これらのプレートを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 抗体およびビオチン標識 IgA 抗体(Southern Biotech)を加えてインキュベートした(室温、2時間; IgG、37 °C、2時間; IgA)。プレートを洗浄した後、1/2500 に希釈した HRP 標識ストレプトアビジン(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、TMBZ 基質液を添加した。2N H₂SO₄ を添加すること

により発色反応を停止させ、吸光波長 450 nm、副波長 690 nm における吸光度を測定した。尚、抗体価は非免疫マウスよりも吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率を Reciprocal Log2 Titer で表した。

HA 特異的抗体産生能の評価 (HA specific Ig ELISA)

HA (2 μ g/mL, in 50 mM Bicarbonate Buffer) を ELISA プレートに加え、4 °C で一晩放置することで固相した。PBS で 2 倍希釈した Block Ace でブロッキング (室温、1 時間) した後、各濃度に調製したサンプルを加えてインキュベートした (室温、2 時間; IgG、37 °C、2 時間; IgA)。これらのプレートを 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 抗体およびビオチン標識 IgA 抗体 (Southern Biotech) を加えてインキュベートした (室温、2 時間; IgG、37 °C、2 時間; IgA)。プレートを洗浄した後、1/2500 に希釈した HRP 標識ストレプトアビジン (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、TMBZ 基質液を添加した。2N H₂SO₄ を添加することにより発色反応を停止させ、吸光波長 450 nm、副波長 690 nm における吸光度を測定した。尚、抗体価は非免疫マウスよりも吸光度が 0.1 以上高い最大希釈倍率を Reciprocal Log2 Titer で表した。

ベクターの作製、精製、および力価測定

アデノウイルスベクター (Adv) は、水口らが開発した改良 *in vitro* ligation 法に準拠して作製した。本研究では、Cytomegalovirus プロモーター制御下にホタルルシフェラーゼを発現する Adv を構築した。作製した各種 Adv は、293 細胞を用いて増幅し、塩化セシウム密度勾配遠心法にて精製した。また、Adv 粒子数 (vector particle; VP) の測定は Maizel らの方法に準拠した。

活性基を有する Tat ペプチド、R8 ペプチドの合成と Tat-Adv、R8-Adv の作製

Tat ペプチド (GRKKRRQRRPPQ)、R8 ペプチド

(RRRRRRRR) に活性基を付与した Tat-NHS、R8-NHS を作製した。Adv の Tat、R8 ペプチド修飾は、Adv1 粒子あたりのカプシドタンパクに存在するリジン残基に対して 25 倍モル量に相当する Tat-NHS、R8-NHS を Adv 懸濁液 (final 2×10^{11} VP/ml) と混合し、300 rpm で攪拌しながら 37 °C で 45 分間反応させることにより行った。

Tat-Adv、R8-Adv の *in vitro* 遺伝子導入効率の評価

未修飾 Adv、Tat-Adv あるいは R8-Adv を 300 ~ 10000 VP/cell で用いて B16BL6 細胞、CT26 細胞、A549 細胞に遺伝子導入した。24 時間培養した後、これらの細胞における導入遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) の発現を指標に遺伝子導入効率を評価した。

B3. インターロイキンの粘膜アジュバント活性評価

試薬

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

動物

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

マウスへの HA の免疫

BALB/c マウスへの経鼻免疫は、個々のサイトカインあるいは CT-B を 1 μ g/mouse でニワトリ卵白アル

ブミン(OVA)量として 100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ と共に混合投与し、非麻酔条件下で行なった。尚、投与スケジュールは 1 週間間隔で 3 回行った。

血清の回収

最終免疫から 1 週間後に眼底採血を行い、11000 rpm、10 分遠心操作を行うことにより血清を回収した。

鼻腔洗浄液の回収方法

マウス鼻腔内を 200 μL PBS で洗浄後、14000 rpm、20 分、4 $^{\circ}\text{C}$ 遠心操作を行うことにより鼻腔洗浄液を調製した。

膈洗浄液の回収方法

マウス膈腔内を 100 μL PBS で洗浄後、14000 rpm、20 分、4 $^{\circ}\text{C}$ 遠心操作を行うことにより膈洗浄液を調製した。

糞便抽出液の調製方法

マウスから回収した糞便を 100 mg/mL となるように PBS を加え、4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間激しく攪拌した。得られた懸濁液を 14000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 、20 分遠心し、上清を回収して糞便抽出液を調製した。

抗原特異的抗体産生能の評価

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗原 (in 50 mM Bicarbonate Buffer) を ELISA プレートに加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩放置し固相した。PBS で 2 倍希釈したブロックエースを室温で 1 時間反応させることでブロッキング後、各濃度に調製したサンプルを加えて反応させた (IgG: 室温、2 時間、IgA: 37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間)。これらのプレートを 0.05% Tween 含有 PBS あるいは、0.05% Tween 含有 TBS で洗浄後、各濃度に調製した HRP 標識 IgG 抗体およびビオチン標識 IgA 抗体を加えて反応させた (IgG: 室温、2 時間、IgA: 37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間)。IgA の測定では、プレート洗浄後、1/2500 に希釈した HRP 標識ストレプトアビジンを加え、室温で 1 時間反応させた。再度、洗浄操作を行い最後に蒸留水で洗浄した後、TMBZ

基質液を添加した。2N H₂SO₄ を添加することにより発色反応を停止させ、測定波長 450 nm、参考波長 690 nm における吸光度を測定した。

B4. インターロイキン粘膜アジュバントによる免疫誘導特性の評価

免疫方法

WBB6F1 マウス (6~8 週齢、雌性) あるいはマスト細胞欠損マウス WBB6F1 W/W^v マウス (6~8 週齢、雌性) への経鼻免疫は、サイトカインあるいはコレラトキシン (CT) をインフルエンザウイルス抗原 HA (1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) と混合投与し、非麻酔条件下で行なった。尚、投与スケジュールは 4 週間間隔で 2 回行った。

HA 特異的抗体産生能の評価

HA (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, in 50 mM Bicarbonate Buffer) を ELISA プレートに加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩放置することで固相した。PBS で 2 倍希釈した Block Ace でブロッキング (室温、1 時間) した後、各濃度に調製したサンプルを加えてインキュベートした (室温、2 時間; IgG、37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間; IgA)。これらのプレートを 0.05% Tween 含有 PBS あるいは、0.05% Tween 含有 TBS で洗浄後、各濃度に調製した HRP 標識 IgG 抗体およびビオチン標識 IgA 抗体を加えてインキュベートした (室温、2 時間; IgG、37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間; IgA)。プレートを洗浄した後、1/2500 に希釈した HRP 標識ストレプトアビジンを加え、さらに室温で 1 時間反応させた。再度、洗浄操作を行い最後に蒸留水で洗浄した後、TMBZ 基質液を添加した。2N H₂SO₄ を添加することにより発色反応を停止させ、吸光波長 450 nm、副波長 690 nm における吸光度を測定した。

サンプル回収

血清サンプルの回収: 最終免疫から 7 日後に眼底採血を行い、11000 rpm、10 分遠心操作を行うことにより血清を回収した。

糞便抽出液の調製

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

脾細胞の調製方法

最終免疫 7 日後のマウスから脾臓を無菌的に摘出した後、70 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 x 10⁶ cells/well で 24 well plate フィルタープレートに播種し、HA 溶液を終濃度 10 μ g/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。

B5. 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。

B6. 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streptavidin (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 5x 10⁶ 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

D1. ファージ表面提示法を用いたレセプターサブタイプ指向性 TNF 変異体の創製

最初に、有効なワクチンアジュバントとなりうるサイトカインを創製する目的で、レセプターサブタイプ指向性を有する構造変異サイトカインの簡便な創製技術の確立を試みた。構造変異 TNF 発現ファージライブラリの中から TNFR2 指向性 TNF 変異体をスクリーニングするため、コンペティティブパンニングを試みた。パンニング後に得られた個々のファージクローンから、可溶性 TNF をそれぞれ作製し、ヒト TNFR1 及びヒト TNFR2 に対する結合力を ELISA により評価した(図 1)。その結果、通常のパンニングでは TNFR2 だけでなく、TNFR1 にも強い親和性を示すクローンが数多く回収されていたのに対して、コンペティティブパンニングを行うことで、TNFR2 選択的に結合するクローンが効率良く濃縮されていることを確認した。特に黒色で示したクローンは、TNFR2 への結合親和性が wtTNF と比較して同程度であり、かつ TNFR1 への結合性が著しく低下しており、TNFR2 指向性が飛躍的に向上していた。以上の結果より、構造変異 TNF 発現ファージライブラリを最適条件で TNFR1:Fc と複合体形成させ、TNFR2 に対してコンペティティブパンニングを行うことで、ライブラリの中から効率良く TNFR1 へ強く結合するクローンを除くことができることが判明した。

スクリーニングにより最終的に得られた 8 種類の候補クローンのアミノ酸配列と各レセプターに対する結合力を表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance : SPR)にて評価した結果を表 1 に示した。TNFR1 に対する結合特性を比較すると、全ての変異体において解離定数 KD 値の大幅な増大が確認され、TNFR2 に対しては、wtTNF と同等以上の結合力を保持していることが判明した。また、いずれの変異体も R31、R32 が wtTNF と同じ配列であり、L29 も保存される傾向にあった。また非常に興味深いことに、A145、E146、S147 は、アスパラギン酸に富む配列を含む傾向にあった。以上の事実は、これらアミノ酸残基が TNFR1 への結合親和性低下のみならず、逆に TNFR2 への結合力維持・増強に重要であることを具体的に示したものである。

続いて、TNFR2 指向性変異体の候補タンパク質

のヒト TNFR1 およびヒト TNFR2 を介した生物活性を HEP-2 細胞、TNFR2/Fas preadipocyte に対する細胞傷害性を指標に評価した(表 2)。その結果、これら変異体はヒト TNFR1 を介した生物活性をほとんど示さなかったのに対して、ヒト TNFR2 を介した生物活性は wtTNF とほぼ同程度の活性を保持していることが判明した。中でもクローン R2-9 は、TNFR2 への作用選択性が wtTNF と比較して 18 万倍も増強しており、優れた TNFR2 指向性アゴニストであることが判明した。以上のように、ファージ表面提示法を有効活用することにより、レセプターサブタイプ指向性を有するサイトカイン構造変異体を創製しうる事が明らかとなった。今後はワクチンアジュバントとして有効な種々の機能性サイトカイン創製を試みる予定である。

次に、粘膜アジュバントとして有効なサイトカインを見出すことを目的に、TNF スーパーファミリーサイトカインに焦点を絞り、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(図 2)。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。一方、TNF スーパーファミリーサイトカインでは、OVA 単独投与群と比較して高い OVA 特異的 IgG 産生を示すサイトカインが見出された。また、鼻洗浄液を用いて鼻粘膜での IgA 産生を測定した結果においても、IgA 産生誘導を効率よく誘導しうるサイトカインが見出された(図 3)。

一方、TNF 以外のサイトカインから粘膜アジュバントとして有効なサイトカインを見出すため、インターロイキンファミリーの、粘膜 IgA 抗体および細胞性免疫誘導特性を体系的に評価した。全部で 26 種類のリコンビナントインターロイキンを、HA と共に経鼻免疫し、血清中の HA 特異的 total IgG、IgG1、IgG2a subclass の誘導能を比較検討した。その結果、HA 単独投与群と比較して、全身面において、HA 特異的 IgG 産生

を増強させるサイトカイン群を見出した。また、HA 特異的 IgG2a の効率の良い誘導が認められるサイトカイン群も見出し、これらサイトカインによる免疫誘導には、Th1 細胞が関与することが示唆された。続いて、粘膜面における免疫誘導を、腸管、膈および口腔粘膜組織における、HA 特異的 IgA の産生を指標に検討した。その結果、ある種のサイトカイン投与群では、いずれの粘膜面においても、抗原特異的 IgA を効率良く誘導しており、ポジティブコントロールとして用いた CTB を上回る程、強力であった。以上の結果より、全身面における IgG 産生のみならず、粘膜面における IgA 誘導能を有するインターロイキンが存在し、粘膜アジュバントとしても有用性が示唆された。

D2. TNF-K90R の粘膜アジュバント効果、およびアデノウイルスベクターの有用性評価

次に、我々がこれまでに独自の技術で創製してきた、高活性型 TNF 構造変異体 TNF である mTNF-K90R を用い、インフルエンザウイルス抗原に対する免疫誘導能を評価した。まず、mTNF-K90R を HA と共に経鼻免疫し、血清中の HA 特異的 IgG 誘導能を評価した。その結果、mTNF-K90R は HA 単独投与群と比較して、有意な HA 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(図 4)。次に、粘膜面における免疫誘導を、鼻粘膜組織および唾液中における、HA 特異的 IgA 産生を指標に検討した。その結果、mTNF-K90R は HA 単独投与群と比較して、HA 特異的 IgA 産生が有意に向上しており、CT-B 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(図 5, 6)。以上の結果から、mTNF-K90R はインフルエンザウイルスに対する有効な粘膜ワクチンアジュバントになり得る可能性が示唆された。

次に、将来的な粘膜ワクチンへの応用を念頭に、遺伝子導入効率に優れた Adv の創製を試みるとともに、その遺伝子導入メカニズムに関して検討した。まず、Adv 表面のペプチド結合部位(リジン残基)に対して 25 倍モル量の活性基付与型 Tat ペプチド、R8

ペプチドを混合することによって、ルシフェラーゼ遺伝子を発現する Tat-Adv、R8-Adv を作製した。これら Adv を用いて B16BL6 細胞、CT26 細胞、A549 細胞に遺伝子導入し、24 時間培養後のルシフェラーゼ発現レベルを指標に各ベクターの遺伝子導入活性を比較した(図 7)。その結果、CAR 低発現の B16BL6 細胞、CT26 細胞において、Tat-Adv、R8-Adv は未修飾 Adv と比較して 10-100 倍高い遺伝子導入を達成した。また、CAR 高発現の A549 細胞においては、Tat-Adv 及び R8-Adv は未修飾 Adv とほぼ同等の遺伝子発現活性を示した。

次に、Tat-Adv 及び R8-Adv の高い遺伝子導入効率に関して、そのメカニズムを検討した。一般に、Tat ペプチドや R8 ペプチドは、細胞表面のヘパラン硫酸などの負電荷を有する糖鎖に結合し、その後エンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスにより効率的に細胞内に取り込まれることが知られている。そこでまず、Tat-Adv 及び R8-Adv の遺伝子導入におけるマクロピノサイトーシスの関与を検討した。マクロピノサイトーシス阻害剤であるアミロライド存在下での遺伝子導入を検討した結果、未修飾 Adv では全く遺伝子導入の低下が観察されないのに対し、Tat-Adv 及び R8-Adv では有意な遺伝子導入効率の低下が認められた(図 8)。以上の結果から、Tat-Adv 及び R8-Adv は、マクロピノサイトーシス依存的に細胞内に取り込まれることが示唆された。次に、ヘパラン硫酸と類似した構造を有するヘパリンと Adv を同時に作用されることで、遺伝子導入におけるヘパラン硫酸の関与について検討した。その結果、未修飾 Adv、R8-Adv では、ヘパリン共存下でも遺伝子導入効率が保持されたのに対して、Tat-Adv ではヘパリン濃度依存的に遺伝子導入効率の低下が観察された(図 9)。すなわち、Tat-Adv と R8-Adv では、細胞表面への接着において異なるメカニズムを有することが示された。そこで、同様の方法を用いて、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 B、コンドロイチン硫酸 C の関与を検討した。その結果、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C では、未修飾 Adv、Tat-Adv、R8-Adv いずれも顕著な変化がみとめられ

ないものの、コンドロイチン硫酸 B 共存下において、Tat-Adv、R8-Adv で遺伝子導入効率の低下が認められた(図 10)。以上の結果より、R8-Adv の遺伝子導入メカニズムは未だ不明瞭なものの、Tat-Adv とは異なるメカニズムを有することが示された。

我々はこれまでに、TNF α 変異体である 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を示してきた。しかし一般に、用いる抗原の抗原性によりその免疫誘導特性は変化することが知られている。本研究で、mTNF-K90R がインフルエンザウイルス抗原に対しても、効率良く免疫誘導を示したことから、mTNF-K90R が感染症ワクチンとしても有望であることが示された。すでに、mTNF-K90R の経鼻投与において、鼻腔で顕著な副作用を誘発しないことは確認しており、今後霊長類などを用いた有効性評価を進める予定である。また、mTNF-K90R により誘導された抗体が、インフルエンザウイルスの感染に対して中和能を保有しているかに関しても詳細な検討が必要と考えられる。

近年、ワクチン素材として期待される Adv について、その感染域拡大を目指した結果、従来型 Adv では困難であった細胞にも効率的に遺伝子導入可能な Adv の創製に成功した。今後は、樹状細胞に対する遺伝子導入効率を検討するとともに、in vivo における粘膜免疫誘導能に関しても検討する必要がある。

D3. インターロイキンの粘膜アジュバント活性評価

まず、インターロイキンによる粘膜アジュバント効果を比較する目的で、26 種類のインターロイキンをインフルエンザ HA 抗原と共に、4 週間間隔で 2 回経鼻免疫し、血清中の HA 特異的 IgG 誘導能を指標に評価した。その結果、抗原単独で投与したマウスと比較して、IL-1 α/β 、IL-18、IL-33 といった、所謂 IL-1 ファミリーを併用投与したマウスにおいて、HA 特異的 IgG 産生が著しく亢進されていた(図 11A、図 12A)。このことから、インターロイキンの中でも特に IL-1 ファミリーが、全身性の免疫応答を強力に誘導

可能であることが判明した。また、IgG1 および IgG2a の両者の効率よい誘導が認められたことから、IL-1 ファミリーは、I 型、II 型ヘルパー T 細胞を共に活性化していた可能性が考えられた。続いて、粘膜面におけるインターロイキンの HA 特異的 IgA 誘導能を比較する目的で、先程と同様に免疫したマウスから回収した粘膜洗浄液中の HA 特異的 IgA 産生を指標に評価した。その結果、インターロイキンの中でも IL-1 ファミリーが特に優れた HA 特異的 IgA 誘導能を有しており、唾液や腸管、膣といった全身の粘膜組織において抗原特異的 IgA が強力に誘導されていた(図 11B、図 12B)。以上の結果より、IL-1 ファミリーが全身のみならず、粘膜面においても、ウイルスの感染防御に必須となる HA 特異的抗体を極めて効率良く誘導していたことから、これらサイトカインは粘膜ワクチン効果を強力に誘導可能な優れたアジュバント候補になり得るものと考えられた。

次に、IL-1 ファミリーをインフルエンザ粘膜アジュバントとして経鼻ワクチンした場合における HA 特異的な免疫誘導能を評価した。免疫マウス由来の脾細胞を用いて、in vitro で抗原再刺激後のサイトカイン産生を指標に評価したところ、抗原単独投与群と比較して、IL-1 ファミリーを併用投与した群においては HA 特異的 IL-4 産生ならびに IFN- γ 産生が共に増強されていることが判明した(図 13)。したがって、IL-1 ファミリーによるワクチン効果の増強には、Th2 と Th1、両者の免疫応答が深く関与することが明らかとなり、抗体産生を主体とする液性免疫に加えて細胞性免疫までも誘導する可能性が示唆された。そこで次に、IL-1 ファミリーによる HA 特異的 CTL 誘導能を評価したところ、抗原を単独で投与したマウスと比較して、IL-1 α 、IL-18、IL-33 を併用投与したマウスにおいては、class I 拘束性の IFN- γ 産生細胞数ならびに class I テトラマー陽性細胞数が著しく増加していた(図 14)。特に IL-33 を併用投与したマウスにおいては、最も強い粘膜アジュバント活性を有するコレラトキシンの投与と比較しても同程度、あるいは更に増加している傾向が認められた。以上のことから、IL-33 を経鼻ワクチンアジュバントとして用いた場合

には HA 特異的抗体の誘導に加えて、全身性の CTL までも誘導出来ることから、ウイルス感染に対する防御網を何重にも構築できるものと考えられた。

D4. インターロイキン粘膜アジュバントによる免疫誘導特性の評価

IL-1 ファミリーによる粘膜アジュバント活性の発現標的となるマスト細胞の可能性について検証する目的で、マスト細胞が欠損したマウスおよびコントロールである野生型マウスを用いて IL-1 ファミリーによる抗原特異的な抗体産生の差異を比較した。これらマウスに、IL-1 ファミリーサイトカインを各々 HA とともに経鼻免疫し、血清および糞便中の HA 特異的 IgG (図 15A) および IgA (図 15B) を ELISA により評価した。その結果、IL-1 ファミリーの中でも、IL-1 α/β あるいは IL-33 を併用投与した野生型マウスおよびマスト細胞欠損マウスにおいては、HA 特異的 IgG 産生および IgA 産生に差異は認められなかった。以上のことから、IL-1 α/β と IL-33 による抗原特異的な抗体産生にはマスト細胞以外の細胞が深く関与する可能性が示唆された。一方で、IL-18 を併用投与した場合、野生型マウスで観察された HA 特異的抗体の産生がマスト細胞欠損マウスにおいては完全に消失することが判明した。このことから、IL-18 による粘膜アジュバント活性の発現には、マスト細胞が必須であることが示唆された。次に、より詳細にマスト細胞依存的な抗原特異的免疫応答を解析する目的で、先程と同様に免疫したマウス由来の脾細胞を用いて、IL-1 ファミリーによるマスト細胞依存的な抗原特異的サイトカイン産生能を比較検討した (図 16)。その結果、IL-18 を併用投与した野生型マウスで認められた HA 特異的 Th2 型サイトカイン (IL-4, IL-5) ならびに HA 特異的 Th1 型サイトカイン (IFN- γ , TNF- α) の何れのサイトカイン産生も、マスト細胞欠損マウスでは完全に消失しており、IL-18 によって誘導される抗原特異的な免疫応答にはマスト細胞が極めて重要な役割を担っているものと考えられた。さらに興味深いことに、IL-33 を経鼻アジュバントとして併用投与したマ

スト細胞欠損マウスにおいては、抗原特異的 Th2 型のサイトカイン産生には影響を与えず、Th1 型サイトカインである IFN- γ 産生のみが完全に消失していた。

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

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

D5. 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 17)。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 18)。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 μg 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。

D6. 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 19A)。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 19A)。

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 19B)。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 20)。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 20)。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、我々が開発してきた機能性蛋白質構造変異体創製技術を駆使することにより、レセプターサブタイプ指向性の TNF 変異体創製に成功した。また、TNF α 変異体 mTNF-K90R が、インフルエンザウイルスに対する粘膜ワクチンアジュバントになり得ることを示した。一方、TNF スーパー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の中から、粘膜アジュバントとして有望なサイトカインを見出すことができた。更に、多様な細胞種に遺伝子導入可能なアデノウイルスベクターの創製に成功し、その遺伝子導入メカニズムを明らかとした。以上の成果は、粘膜ワクチンアジュバントシステムの開発に有用な情報を提供するものと考えられる。

また、インターロイキンの粘膜アジュバント活性の評価を行ったところ、解析に用いた26種類のインターロイキンの中で、IL-1 ファミリーサイトカインが特に顕著な粘膜アジュバント効果を有することを見出した。さらに、IL-18、IL-33 の粘膜ワクチンアジュバント活性にマスト細胞が極めて重要であることを明らかとした。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念頭に、ナノシリカの可能性を評価した。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、今後 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が創製可能になると考えられる。

以上本研究成果は、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の開発戦略に資するものと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Abe Y., Nomura T., Mukai Y., Nakagawa S., Taniai M., Ohta T., Mayumi T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: The therapeutic effect of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF-alpha in murine hepatitis models. *Cytokine* 44: 229-233 (2008).
2. 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: 71-78 (2008).
3. Yoshioka Y., Asavatanabodee R., Eto Y., Watanabe H., Morishige T., Yao X., Kida S., Maeda M., Mukai Y., Mizuguchi H., Kawasaki K., Okada N., Nakagawa S. Tat conjugation of adenovirus vector broadens tropism and enhances transduction efficiency. *Life Sci*. 83: 747-755 (2008).
4. Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Taniai M., Ohta T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a

- fully active TNFR1-selective TNF mutant., *J. Mol. Biol.* 385: 1221-1229 (2009).
5. Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Taniai M., Ohta T., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y., Fast binding kinetics and conserved 3D structure underlie the antagonistic activity of mutant TNF: useful information for designing artificial proteo-antagonists. *J. Biochem.* 146: 167-172 (2009).
 6. Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Katayama K, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Hiroi T, Itoh N, Kawai Y, Kamada H, Tsunoda SI, Tsutsumi Y. TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jul 3;384(3):296-300.
 7. Kayamuro H, Abe Y, Yoshioka Y, Katayama K, Nomura T, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Kawai Y, Mayumi T, Hiroi T, Itoh N, Nagano K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y. The use of a mutant TNF- α as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses. *Biomaterials.* 2009 Oct;30(29):5869-76.
 8. Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Application of bioactive mutant TNF alpha to a mucosal vaccine adjuvant. *Yakugaku Zasshi.* 2010, 130: 55-6.
 9. 萱室裕之、角田慎一、堤 康央、新規粘膜ワクチンアジュバントとしての機能性サイトカインの開発、*Drug Delivery System*, 25: 22-28, 2010.
 10. 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* volume691, pp299-304, Wallach D. eds, Springer Science, 2010.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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. 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, 岡山, 2008 年 10 月.
2. 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, 大阪, 2008 年 11 月.
3. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 形山和史, 鎌田春彦, 野村鉄也, 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., ファーマバイオフォーラム 2008, 東京, 2008 年 11 月.
4. 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, 京都, 2008 年 12 月.
5. 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, 京都, 2008 年 12 月.
6. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 形山和史, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央: 活性増強型 TNF 変異体の粘膜ワクチンアジュバントへの応用., 日本薬学会 第 129 年回, 京都, 2009 年 3 月.
7. Yoshioka Y, Asavatanabodee R, Eto Y, Watanabe

- H. Morishige T. Yao X, Kida S, Maeda M, Mukai Y, Mizuguchi H, Kawasaki K, Okada N, Nakagawa. Tat conjugation of adenovirus vector broadens tropism and enhances transduction efficiency. ASGT 11th Annual Meeting, May, 2008. Bosotn.
8. Yoshioka Y, Shinsaku Nakagawa. Tat conjugation of adenovirus vector broadens tropism and enhances transduction efficiency. 6th Symposium on Membrane Stress Biotechnology. September, 2008. Osaka.
 9. 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 Intenational Society for Interderon and Cytokine Research and International Cytokine Society., October, 2008. Montréal.
 10. 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.
 11. 阿部康弘, 萱室裕之, 吉岡靖雄, 形山和史, 野村鉄也, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央: 生物学的 DDS による活性増強型 TNF 変異体の創出とその粘膜ワクチンアジュバントとしての有用性評価. 第 25 回 DDS 学会, 東京, 2009 年 7 月.
 12. 有田修平, 萱室裕之, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 鎌田春彦, 吉川友章, 伊藤徳夫, 長野一也, 角田慎一, 堤 康央: インフルエンザ経鼻ワクチンのためのサイトカインアジュバントの開発. ファーマバイオフォーラム 2009, 名古屋, 2009 年 11 月.
 13. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Arita S., Katayama K., Kamada H., Nomura T., Itoh N., Nagano K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Characterization of mucosal and systemic immune responses elicited by interleukin cytokines as mucosal vaccine adjuvant against influenza virus., 第 39 回 日本免疫学会学術集会, 大阪, 2009 年 12 月.
 14. Arita S., Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Kamada H., Nomura T., Itoh N., Nagano K., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Mast cells are essential for inducing mucosal immune responses by interleukin-18., 第 39 回 日本免疫学会学術集会, 大阪, 2009 年 12 月.
 15. Abe Y., Kayamuro H., Yoshioka Y., Katayama K., Nomura T., Hiroi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of efficacy of mutant TNF as a mucosal vaccine adjuvant against HIV-1 and influenza virus., 12th International TNF Conference, Madrid, 26-29 April, 2009.
 16. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Nomura T., Hiroi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Identification of new candidates as mucosal vaccine adjuvant in TNF superfamily cytokines., 12th International TNF Conference, Madrid, 26-29 April, 2009.
 17. Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Arita S., Katayama K., Kamada H., Nomura T., Itoh N., Yoshikawa T., Nagano K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Characterization of mucosal and systemic immune responses elicited by interleukin cytokines as mucosal adjuvant against influenza virus., 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon, 18-21 October, 2009.
 18. 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 intereukin-18 dependent mucosal immune responses., 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon, 18-21 October, 2009.
 19. Abe Y., Kayamuro H., Yoshioka Y., Arita S., Katayama K., Yoshikawa T., Nagano K., Hiroi T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Intranasal immunization with mutant TNF modulates mucosal and systemic immune responses., 9th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy (IMMUNO2010), Geneva, 4-6 February.
 20. Yoshioka Y., Kayamuro H., Abe Y., Arita S., Katayama K., Yoshikawa T., Nagano K., Hiroi T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : TNF superfamily member, TL1A, is a potential immunoregulator for development of mucosal vaccin., 9th International Conference on New