

Fig. 5. mTNF-K90R induced mucosal IgA and IgG responses against influenza virus HA in mice. BALB/c mice were immunized intranasally with HA together with 1 µg CTB or 5 µg mTNF-K90R. One week after the last immunization, HA-specific IgG in serum at a 1:500 dilution and IgA in nasal or saliva at a 1:8 dilution were assessed by ELISA at a 1:8 dilution. Data represents the mean of absorbance 450 nm (reference wavelength, 655 nm). N.D.; not detected. Data are presented as means ± SEM (n = 4–6; *P < 0.05, **P < 0.01 versus value for HA alone treated group by ANOVA).

due to the presence of a specific receptor, GM1 ganglioside, which is highly expressed in neuronal tissue [20]. This neurotoxicity has severely restricted the use enterotoxins as adjuvants for mucosal vaccines in clinical practice. To evaluate the *in vivo* toxicity of mTNF-K90R, inflammatory response and tissue injury were assessed in the nasal tissue (Fig. 7). Tissue sections of the nasal cavity were prepared at various time points after immunization of OVA plus mTNF-K90R. However, no tissue injury could be detected in any of the sections. These observations indicate no membrane barrier disruption and/or inflammatory changes, not even after 2 h single immunization with 5 µg mTNF-K90R (Fig. 7A and B). Furthermore, increasing the dose of mTNF-K90R given intranasally from 1 µg to 25 µg did not seem to have an adverse effect on the mice after three immunizations (Fig. 7C and D). Thus, although further evaluation is required, the results of this initial study demonstrated that the toxicity of mTNF-K90R is likely to be relatively low.

4. Discussion

In this study, we examined the mucosal adjuvant activity of mTNF-K90R and showed that intranasal co-administration of mTNF-K90R with antigen strongly induced both antigen-specific IgG in serum and IgA at mucosal site (nasal cavity, oral cavity, vagina and intestine). The enhanced adjuvant effect of mTNF-K90R might be caused by improved bioactivity and protease resistance compared to wTNF-α. Although mTNF-K90R showed a potent adjuvant effect on mucosal immunity, it does not elicit excessive inflammatory symptoms, such as formation of edema or fibrosis. Therefore, we believe that mTNF-K90R is a potent mucosal adjuvant for vaccines against various infectious diseases.

The development of a safe and effective vaccine is critical in preventing the spread of influenza virus. It is generally thought that or anti-influenza virus-neutralizing antibody must be induced at mucosal surfaces in order to prevent influenza virus infection. Previous studies also reported that antigen-specific systemic IgG and mucosal IgA Abs have potentially important roles for protection against the influenza virus [21,22]. Therefore, our results suggest that mTNF-K90R might be a superior mucosal vaccine adjuvant against infectious diseases caused by influenza virus.

TNF-α is anticipated to be used as a therapeutic drug to treat cancer. TNF-α has been used clinically for the treatment of non-resectable high-grade sarcoma and melanoma by locoregional applications in combination with melphalan under the approval of the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products because systemic administration of TNF-α at therapeutically effective doses is limited by its unacceptable toxic side effects [23,24]. Further, in a recent report, it has been suggested that TNF-α had the potentials of the genetic toxicity, because TNF-α caused DNA damage through its ability to induce reactive oxygen species [25]. Thus, it is important to examine the safety of mTNF-K90R in a protocol using a mucosal vaccine adjuvant. Previously, we reported that mTNF-K90R had 1.3-fold lower *in vivo* toxicity after systemic administration compared with that of wTNF-α because of a change in the pharmacokinetics. Similarly, no adverse effect on the nasal mucosa was observed in this study after intranasal administration of mTNF-K90R. Although detailed examinations are required, mTNF-K90R is expected to be a useful mucosal vaccine adjuvant. Furthermore, we have shown that conjugating cytokines with polyethylene glycol (PEG) improves their safety *in vivo* [17,18,26–28]. We have also developed a novel site-specific PEGylation process to overcome the

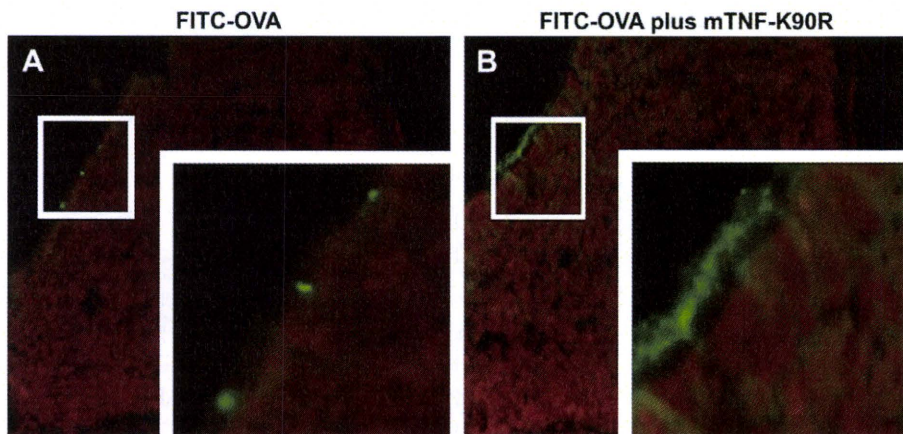


Fig. 6. Localization analysis of OVA in NALT. BALB/c mice were administered 50 µg FITC-OVA and a combination of 5 µg mTNF-K90R as a nasal vaccine adjuvant. Frozen sections of NALT resected from mice treated with FITC-OVA alone (A) and a combination of mTNF-K90R (B). The FITC-OVA (green) signals were detected by fluorescence microscopy. The nucleus was counterstained using PI (red). The original magnification of these photographs was 20×.

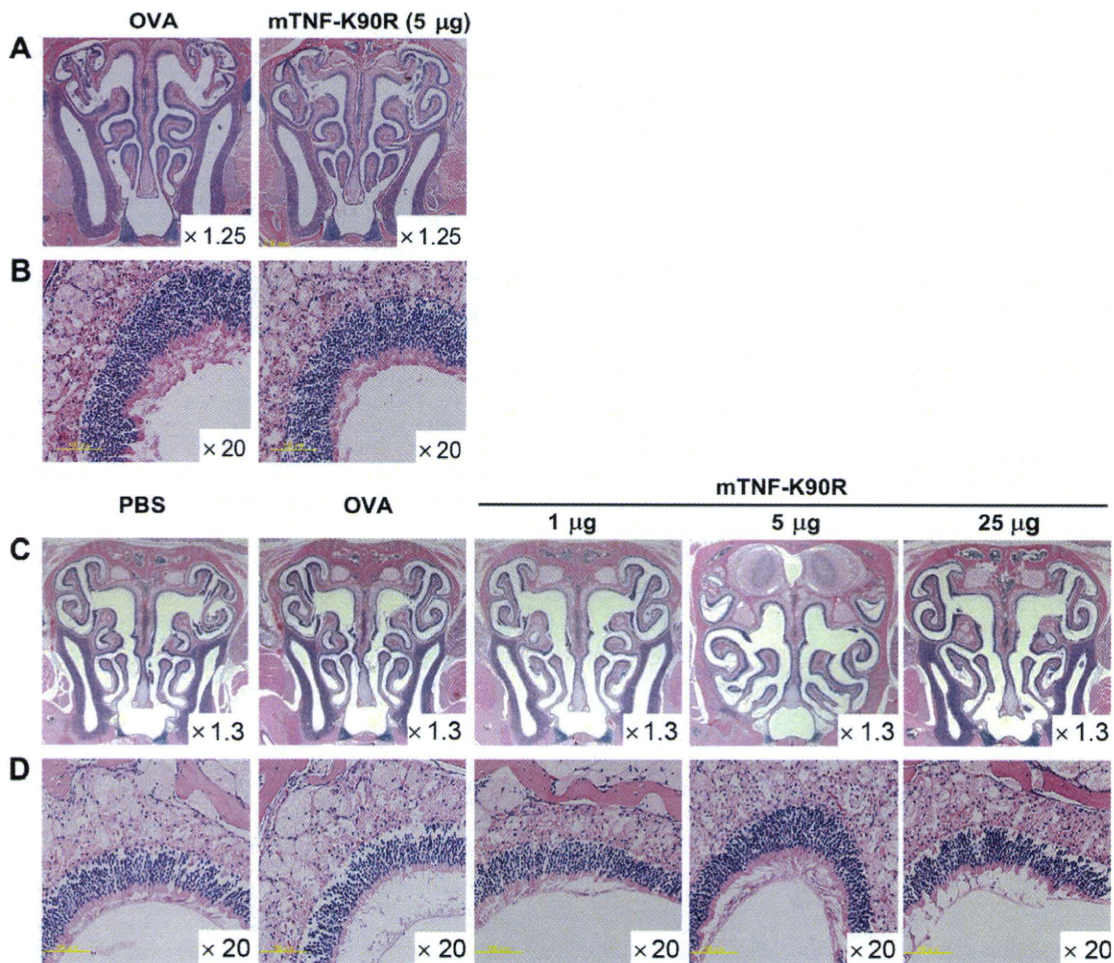


Fig. 7. Histopathological analysis of nasal cavity treated with mTNF-K90R. Frontal cross-sections of the nasal cavity from mice, taken 2 h after administration (A, B) or one week after three times administration of PBS, OVA alone, and OVA together with 1 µg, 5 µg or 25 µg mTNF-K90R (C, D). An overall view of the nasal passage is shown in (A) and (C). The region of nasal olfactory epithelia is shown in (B) and (D). Sections were prepared and the tissues were stained with H&E to assess the degree of tissue injury and local inflammation.

problems of PEGylation [17,18,26,28]. Previously we showed that the application of this technology to mTNF-K90R improved the safety and the anti-tumor effects of mTNF-K90R [18]. We are currently examining the safety and efficacy of site-specific PEGylated mTNF-K90R as a mucosal vaccine adjuvant.

The effects of mTNF-K90R at mucosal tissue was also analyzed. We reasoned that the adjuvant effect of mTNF-K90R may be related to its stimulation of antigen-presenting cells, such as DC. Indeed, DC plays a crucial role in eliciting T cell-dependent immunity. TNF- α is known to have profound effects on DC function and contributing to their activation, maturation and migration to, and accumulation within, draining lymph nodes [29,30]. Moreover, DC stimulated by TNF- α prior to anti-tumor vaccination or transfection with the TNF- α gene are reported to induce anti-tumor immunity [14,15]. However, we found that mTNF-K90R significantly enhanced the permeability of the nasal epithelial layer and diffusion of antigen into NALT. Consistent with our results, some reports have shown that TNF- α causes an increase in intestinal permeability [25,31]. Taken together, these results suggest that the strong mucosal adjuvant activity of mTNF-K90R is caused, at least in part, by increased epithelial permeability. In addition, TNF- α causes up-regulation of human polymeric Ig receptor on mucosal epithelial cells [32]. Polymeric Ig receptor transports polymeric IgA into external secretions as secretory IgA, which is critical for the defense

of mucosal tissues [33]. We believe that multiple actions of mTNF-K90R contribute to its potent adjuvant activity. Currently, we are attempting to elucidate these various mechanisms.

Induction of both Th1- and Th2-type responses is the major goal for the development of mucosal vaccines because these responses would provide protective immunity against viral and bacterial infections by maximizing antigen-specific Ab and cytolytic T lymphocytes (CTL) responses. Although mTNF-K90R is not likely to induce CTLs, it could efficiently induce Abs responses. To induce both antigen-specific Ab and CTL responses, combinatorial administration of mTNF-K90R with another mucosal adjuvant, which can induce Th1-type immune responses, is applicable. We have already screened the TNF superfamily and other cytokines and succeeded in finding candidates that can effectively induce CTL at the mucosal site. The combinatorial effect of the cytokines and mTNF-K90R as a mucosal vaccine adjuvant is now under examination.

Recently, vaccine therapy has been attempted not only to combat cancer or viral infections but also for other diseases such as Alzheimer-type dementia. Schenk et al. demonstrated that intraperitoneal vaccination of β -amyloid peptide plus Freund's adjuvant to a murine Alzheimer's disease model resulted in a dramatic reduction of cerebral amyloidosis [34]. This therapeutic approach is clearly efficacious; however, the safety of this strategy is of paramount importance. In a clinical trial, approximately 6% of patients

administered a synthetic β -amyloid peptide plus adjuvant developed aseptic meningoencephalitis, most likely mediated by brain-infiltrating activated T cells [35,36]. This adverse effect seemed to be associated with the activation of Th1-type immunity by vaccination with β -amyloid peptide [37,38]. Nikolic et al. demonstrated that immunization capable of inducing Th2-type immunity predominantly constitutes an effective and potentially safe treatment strategy for Alzheimer's disease [39]. Therefore, our mTNF-K90R is a promising development in the establishment of an easy-to-use, efficacious, safe immunotherapy for Alzheimer's disease. However, further analyses are necessary in order to elucidate the Th2-dominant mechanism of mTNF-K90R.

5. Conclusions

In summary, our study showed that mTNF-K90R, engineered by using a phage display technique, induced two layers of protective immunity when administered intranasally with a vaccine antigen. Our results indicate that mTNF-K90R is a safe and effective mucosal adjuvant. Additionally, our technique of creating bioactive mutant cytokines might be an attractive generic approach for designing novel mucosal adjuvants.

Acknowledgements

This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (MEXT) and Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), some Health Labour Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare in Japan by the Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation from the Japan Health Sciences Foundation and by the Takeda Science Foundation.

Appendix

Figures with essential color discrimination. Figs. 6 and 7 in this article may be difficult to interpret in black and white. The full color images can be found in the on-line version, at doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.009.

References

- Eriksson K, Holmgren J. Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr Opin Immunol* 2002;14:666–72.
- Haynes BF, Shattock RJ. Critical issues in mucosal immunity for HIV-1 vaccine development. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:3–9.
- Brandtzaeg P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 2007;25:5467–84.
- Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 2005;11:S45–53.
- Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 2006;6:148–58.
- Ada G. Vaccines and vaccination. *N Engl J Med* 2001;345:1042–53.
- Gorbach SL, Khurana CM. Toxigenic *Escherichia coli* in infantile diarrhea in Chicago. *J Lab Clin Med* 1971;78:981–2.
- Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, et al. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 2004;350:896–903.
- Boyaka PN, Marinaro M, Jackson RJ, Menon S, Kiyono H, Jirillo E, et al. IL-12 is an effective adjuvant for induction of mucosal immunity. *J Immunol* 1999;162:122–8.
- Staats HF, Bradney CP, Gwinn WM, Jackson SS, Sempowski GD, Liao HX, et al. Cytokine requirements for induction of systemic and mucosal CTL after nasal immunization. *J Immunol* 2001;167:5386–94.
- Toka FN, Pack CD, Rouse BT. Molecular adjuvants for mucosal immunity. *Immunol Rev* 2004;199:100–12.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10:45–65.
- Calzascia T, Pellegrini M, Hall H, Sabbagh L, Ono N, Elford AR, et al. TNF-alpha is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. *J Clin Invest* 2007;117:3833–45.
- Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, Bidlingmaier M, Eigler A, Haimerl W, et al. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation *in vitro* and therapeutic anti-tumor responses *in vivo*. *J Immunol* 2000;165:6278–86.
- Chen Z, Huang H, Chang T, Carlsen S, Saxena A, Marr R, et al. Enhanced HER-2/neu-specific antitumor immunity by cotransduction of mouse dendritic cells with two genes encoding HER-2/neu and alpha tumor necrosis factor. *Cancer Gene Ther* 2002;9:778–86.
- Nimal S, Heath AW, Thomas MS. Enhancement of immune responses to an HIV gp120 DNA vaccine by fusion to TNF alpha cDNA. *Vaccine* 2006;24:3298–308.
- Yamamoto Y, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Nishibata T, Kobayashi K, Okamoto T, et al. Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity. *Nat Biotechnol* 2003;21:546–52.
- Shibata H, Yoshioka Y, Ikemizu S, Kobayashi K, Yamamoto Y, Mukai Y, et al. Functionalization of tumor necrosis factor-alpha using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window. *Clin Cancer Res* 2004;10:8293–300.
- Shibata H, Yoshioka Y, Ohkawa A, Minowa K, Mukai Y, Abe Y, et al. Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist. *J Biol Chem* 2008;283:998–1007.
- van Ginkel FW, Jackson RJ, Yuki Y, McGhee JR. Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J Immunol* 2000;165:4778–82.
- Veazey RS, Shattock RJ, Pope M, Kirjan JC, Jones J, Hu Q, et al. Prevention of virus transmission to macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120. *Nat Med* 2003;9:343–6.
- Hasegawa H, Ichinohe T, Tamura S, Kurata T. Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. *Expert Rev Vaccines* 2007;6:193–201.
- Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D. Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol* 1998;10:573–80.
- Eggermont AM. TNF registered in Europe: does TNF get a second chance? *J Immunother* 2000;23:505–6.
- Yan B, Wang H, Rabbani ZN, Zhao Y, Li W, Yuan Y. Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Res* 2006;66:11565–70.
- Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Ikemizu S, Yamamoto Y, Shibata H, Nishibata T, et al. Optimal site-specific PEGylation of mutant TNF-alpha improves its antitumor potency. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:808–14.
- Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Mayumi T. Recent progress on tumor missile therapy and tumor vascular targeting therapy as a new approach. *Curr Vasc Pharmacol* 2004;2:259–70.
- Mukai Y, Yoshioka Y, Tsutsumi Y. Phage display and PEGylation of therapeutic proteins. *Comb Chem High Throughput Screen* 2005;8:145–52.
- Trejejo JM, Marino MW, Philpott N, Josien R, Richards EC, Elkon KB, et al. TNF-alpha-dependent maturation of local dendritic cells is critical for activating the adaptive immune response to virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12162–7.
- Lee LF, Xu B, Michie SA, Beilhack GF, Warganich T, Turley S, et al. The role of TNF-alpha in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:15995–6000.
- Gitter AH, Bendfeldt K, Schmitz H, Schulzke JD, Bentzel CJ, Fromm M. Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 2000;915:193–203.
- Takenouchi-Ohkubo N, Moro I, Mukae S, Kaneko Y, Komiya K. Tumour necrosis factor-alpha-mediated human polymeric immunoglobulin receptor expression is regulated by both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol-3-kinase in HT-29 cell line. *Immunology* 2008;123:500–7.
- Mestecky J, McGhee JR. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol* 1987;40:153–245.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999;400:173–7.
- Hock C, Konietzko U, Streffer JR, Tracy J, Signorell A, Muller-Tillmanns B, et al. Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* 2003;38:547–54.
- Bayer AJ, Bullock R, Jones RW, Wilkinson D, Paterson KR, Jenkins L, et al. Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic Abeta42 (AN1792) in patients with AD. *Neurology* 2005;64:94–101.
- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 2003;9:448–52.
- Monsonego A, Imitola J, Petrovic S, Zota V, Nemirovsky A, Baron R, et al. Abeta-induced meningoencephalitis is IFN-gamma-dependent and is associated with T cell-dependent clearance of Abeta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5048–53.
- Nikolic WV, Bai Y, Obregon D, Hou H, Mori T, Zeng J, et al. Transcutaneous beta-amyloid immunization reduces cerebral beta-amyloid deposits without T cell infiltration and microhemorrhage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:2507–12.

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

萱室裕之,^{a,b} 吉岡靖雄,^{a,b,c} 阿部康弘,^a 鎌田春彦,^{a,c} 角田慎一,^{a,b,c} 堤 康央^{*,a,b,c}

Application of Bioactive Mutant TNF Alpha to a Mucosal Vaccine Adjuvant

Hiroyuki KAYAMURO,^{a,b} Yasuo YOSHIOKA,^{a,b,c} Yasuhiro ABE,^a Haruhiko KAMADA,^{a,c}
Shin-ichi TSUNODA,^{a,b,c} and Yasuo TSUTSUMI^{*,a,b,c}

^aNational Institute of Biomedical Innovation (NiBio), Laboratory of Pharmaceutical Proteomics (LPP),
7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan, ^bGraduate School of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, and ^cThe Center
for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University,
2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received August 29, 2009)

A large number of emerging pathogens, such as severe acute respiratory syndrome (SARS), human immunodeficiency virus (HIV), and influenza virus are mucosally transmitted and must cross mucosal barriers to infect the host. Thus, to induce a maximal protective effect, it is desirable to apply vaccines by the mucosal route where virus infections start. Mucosal vaccines administered either orally or nasally have been shown to be effective in inducing antigen-specific immune responses at both systemic and mucosal compartments. However the mucosal antigen-specific immune response is weak because most protein antigens can evoke only a weak immune response when they are applied mucosally. Therefore, one strategy to overcome the weakness of the immune response is a co-administration of mucosal adjuvant with the vaccine antigen. Unfortunately, the development of safe and effective mucosal adjuvant has proved to be challenging. Cytokines are promising adjuvants because they are human-derived safe material and display potent immune-modulating functions. In this regards, we have created a mutant tumor necrosis factor- α (TNF- α), mTNF-K90R, that exhibits high bioactivity and resistance to proteases. In this report, we examined the potential of mTNF-K90R as a mucosal adjuvant and evaluated its effectiveness and safety.

Key words—adjuvant; cytokine; mucosal vaccine; mutant protein; phage display

1. はじめに

ワクチンが発明されたことにより、人類は天然痘を始めとする多くの感染症の恐怖から解放された。しかし、1980年頃から、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）やエボラウイルス、SARS（重症急性呼吸器症候群）ウイルスといった致死率が極めて高い脅威のウイルスが突如として出現した時には、世界中を震撼させた。また昨今では、米国・メキシコで新型インフルエンザが流行し、発生源とみられる米国で

は、21州で爆発的に感染が拡大し、発生後まもなく160人もの死傷者をもたらした。その後、ヒトからヒトへの感染は世界的に拡大し続け、WHO（世界保健機関）が発表した2009年8月6日現在の感染確認事例数は、世界76カ国で合計177457人（うち死亡者数1462人）にも及び、わが国においても、その感染者は5000人を超えた。インフルエンザウイルスのパンデミック（世界的大流行）は以前にも人類は経験しており、1918年のスペイン風邪パンデミックでは、インフルエンザウイルスが爆発的な感染力と高い病原性を獲得したことにより、4000万人もの犠牲者をもたらしたことは周知の通りである。¹⁾このような過去の教訓から、強毒性インフルエンザウイルス等のパンデミックを抑止するため、有効で安全なワクチンの開発はまさに緊急の課題である。

さて、現在用いられているワクチンは一般に注射

^a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(〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8),

^b大阪大学大学院薬学研究科(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6), ^c大阪大学臨床医工学融合研究教育センター(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2)

*e-mail: ytsutsumi@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムGS3で発表したものを中心に記述したものである。

により接種されているが、これは全身性免疫に効率よく抗原特異的抗体を誘導可能である。しかし、注射によるワクチン接種では、インフルエンザや HIV など多くのウイルスの感染場所である粘膜面における免疫を十分誘導できないことが知られている。そのため、経粘膜感染するウイルスに対して、第一線のバリアとなる粘膜面に効率よくウイルス抗原特異的な免疫応答を惹起可能な新たなワクチンの開発が期待されている。²⁾ 本観点において、近年、ウイルスの自然感染経路を模倣した新たなワクチン投与方法として、抗原を経粘膜的に投与するワクチン(粘膜ワクチン)が注目を集めている。粘膜ワクチンは、全身性の免疫のみならず、従来の注射によるワクチンでは誘導することが困難とされてきた、粘膜面での感染防御免疫を誘導可能である上、ワクチン接種時に医療従事者を必要しない非侵襲的な投与方法を達成できるなど、まさに理想的ワクチンとして早期の実用化が期待されている(Fig. 1)。³⁾ しかし、粘膜ワクチンでは、抗原を単独で投与しても十分な免疫を誘導することができず、免疫増強剤(アジュバント)との併用投与が必要不可欠であることが明らかとなっている。^{4,5)} これまでに、粘膜アジュバントとして、コレラ毒素(Cholera toxin: CT)や大腸菌易熱性毒素(heat labile toxin: LT)の応用が試みられてきた。しかし、これら細菌毒素由来のアジュバントは、粘膜面及び全身面において優れた粘膜アジュバント効果を発揮するものの、視神経麻痺(Bell's palsy)などの重篤な副作用を呈することが明らかとなった。事実、LTをアジュバントとして用いた、経鼻インフルエンザ不活化ワクチンの臨床試験においては、ワクチン接種と視神経麻痺との関

連が明らかとなり、臨床研究は断念されている。⁶⁾ そこで筆者らは、既にタンパク性医薬品として上市され、安全性の点で優れた実績を持つサイトカインに着目し、その粘膜ワクチンアジュバントとしての実用化、医薬品化を目指した研究開発に取り組むことにした。サイトカインは、免疫応答の制御に係わる主要な生体分子であり、樹状細胞等の抗原提示細胞に対する強力な活性化作用、さらに、T細胞やB細胞といった獲得免疫担当細胞の分化/増殖刺激作用など、有効性と安全性の両者が求められる粘膜ワクチンアジュバントとして魅力的な性質を兼ね備えているものと考えられる。そのため、サイトカインの粘膜アジュバントとしての応用は期待されるものの、サイトカインの粘膜面における免疫誘導メカニズムが十分解析されていないこと、また、生理活性タンパク質であるサイトカインを経粘膜投与した場合、タンパク分解酵素やpH変化により速やかに失活・分解されてしまうこと等が原因となり、いまだ有効なサイトカイン粘膜アジュバントは開発されていない。そこで上記サイトカインアジュバントの問題点を克服すべく、われわれは、サイトカインの中でも特に免疫活性化能に優れた“腫瘍壊死因子(TNF- α)”に着目し、独自のフェージ表面提示法を駆使した機能性人工タンパク質創製技術により、活性が野生型TNF- α (wTNF)よりも飛躍的に向上し、かつ体内安定性にも優れた活性増強型TNF変異体(mTNF-K90R)を創製し、粘膜ワクチンアジュバントとしての応用を試みてきた。⁷⁾

そこで本稿では、新型インフルエンザ等のウイルス感染症予防に叶う有効かつ安全な粘膜ワクチンアジュバント開発を目指し、独自に創出した機能性TNF変異体mTNF-K90Rの粘膜アジュバントとしての応用に関する研究を中心に紹介する。

2. 活性増強型TNF変異体の創出とその生物学的特性評価

これまでの検討から、およそ20種類にも及ぶTNFスーパーファミリーサイトカインの中でも、TNF- α が特に優れた粘膜アジュバント効果を発揮すること、また重篤な副作用を伴うことなく、粘膜免疫を効率よく誘導可能であることを世界に先駆けて見い出してきた。⁸⁾ しかし、一般にTNF- α を始めとするサイトカインは免疫活性化能に優れる反面、体内安定性に乏しく、特に経粘膜投与した場合

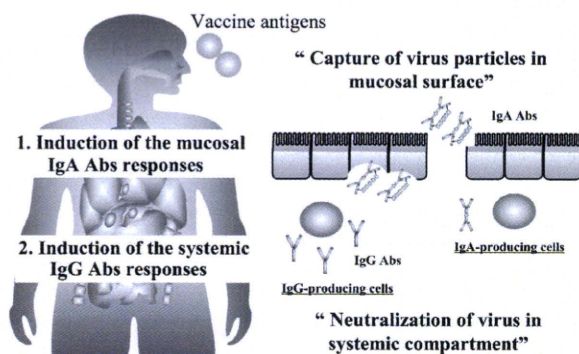


Fig. 1. Mucosal Vaccine Strategy

には、粘膜面に分泌されるタンパク分解酵素等により速やかに分解されることにより、十分なポテンシャルを発揮することができない。したがって、TNF- α を有効性に優れた粘膜アジュバントとして開発するためには、体内安定性の問題点を克服することが重要な鍵となってくる。この点、われわれは、ファージ表面提示法を駆使した、独自の“機能性人工タンパク質創製技術”を開発し、タンパク質中の任意のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した機能性人工タンパク質を迅速に創出可能な方法論を確立してきた。そこで本技術を TNF- α に適用した結果、TNF- α 中の全 6 個のリジン残基が他のアミノ酸に置換され、さらに野生型 (wTNF) に比べて生物活性が 5.6 倍にも向上した変異体 (mTNF-K90R) の創出に世界に先駆けて成功した (Fig. 2).^{9,10} mTNF-K90R は、リジン残基の欠損によって、pI 値が大幅に低下していること (lowering pI)、また、トリプシン系タンパク分解酵素の認識配列の欠損により、wTNF と比較して生体内安定性が著しく向上していた。また驚くべきことに、mTNF-K90R は、wTNF よりも強力な生物活性を示すものの、全身毒性の指標である LD₅₀ 値は、wTNF よりも低下していることが明らかとなり、mTNF-K90R は治療濃度域を飛躍的に拡大し得る優れた特徴を有していた (Table 1).¹⁰ 以上の結果

より mTNF-K90R は、安全性を確保しつつも粘膜面における生物活性を持続的に増強し、粘膜ワクチン効果を強力に誘導できる優れたアジュバントになり得るものと考えられた。

3. 活性増強型 TNF 変異体の粘膜アジュバント特性評価

感染症に対する予防ワクチンの開発は、これまで主流であった全細胞ワクチンや弱毒化生ワクチンから、免疫原性が弱いながらも安全性の高い、成分ワクチンやサブユニットワクチンへとシフトしつつある。そのため、有効かつ安全なワクチンアジュバント開発は、次世代のワクチン開発の成功の鍵を握る最重要課題として認識されている。上述のように、粘膜ワクチン開発には、適切な粘膜アジュバントが必須となるものの、¹¹ これまで数十年にも及ぶアジュバント研究の成果も虚しく、いまだ、粘膜免疫誘導活性と安全性の問題点を克服したアジュバントは存在しない。

そこでまず、mTNF-K90R の粘膜ワクチンアジュバントとしての可能性を探るため、モデル抗原 (ニワトリ卵白アルブミン; OVA) をワクチンとして用い、mTNF-K90R とともにマウスに経鼻免疫した場合の OVA 特異的抗体産生能を評価した。その結果、OVA を単独で投与した場合には、血清中の OVA 特異的 IgG 抗体の誘導がほとんど認めら

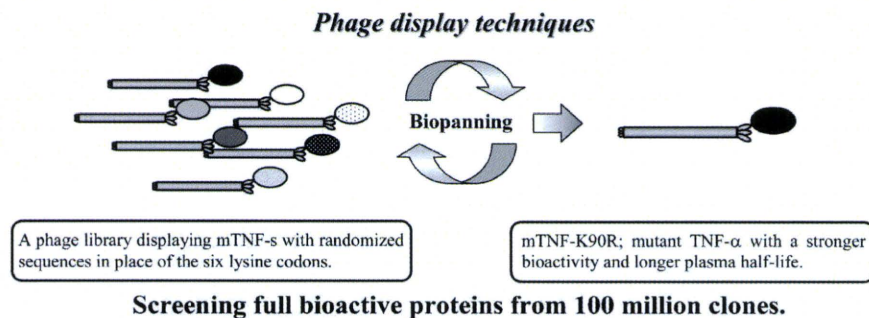


Fig. 2. Creation of a Lysine-deficient Mutant TNF- α (mTNF-K90R) by Using the Phage Library Technique

Table 1. Amino Acid Sequence and the Biological Properties of mTNF-K90R

	Residue positions						pI	AUC ($\times 10^3$ ng·min/ml)	LC ₅₀ (ng/ml)	LD ₅₀ (μ g/ml)
	11	65	90	98	112	128				
wTNF	K	K	K	K	K	K	7.44	28 \pm 2	0.17	390
mTNF-K90R	A	S	R	A	L	T	4.96	62 \pm 7	0.03	510

pI: isoelectric point, AUC: area under the blood concentration time curve, LC₅₀: lethal concentration 50.

れなかったのに対して, wTNF を併用投与したマウスにおいては, OVA 特異的抗体産生が増強されていた. さらに, mTNF-K90R 共投与による抗原特異的 IgG の誘導は, wTNF の投与と比べて有意に増強されており, 粘膜免疫誘導活性に優れたコレラ毒素構成成分 (CTB) と同程度のアジュバント活性を有してしていた [Fig. 3(A)]. また, mTNF-K90R により誘導された OVA 特異的 IgG 抗体サブクラスを解析したところ, IgG2a の誘導はほとんど認められず, IgG1 優位な抗体産生が認められたことから, 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) 依存的に抗体産生を増強したものと考えられた. 次に, OVA と mTNF-K90R を併用投与したマウスから回収した鼻腔洗浄液, 膣洗浄液, 糞便抽出液中における OVA 特異的 IgA 産生を評価した. その結果, OVA 単独投与群と比較して wTNF 併用投与群において, OVA 特異的 IgA の誘導が増強していた. また, mTNF-K90R 併用投与群では, その効果が更に向上しており, 投与局所である鼻粘膜面のみならず, 腸管及び膣といった遠隔の粘膜面においても, mTNF-K90R による粘膜ワクチン効果の増強が認められた [Fig. 3(B)]. 以上の結果より, mTNF-K90R は, ワクチン抗原特異的な抗体を粘膜面 (IgA) と全身面 (IgG) に効率よく誘導可能であり, 優れた粘膜アジュバントになり得ることが示唆された. そこで続いて, mTNF-K90R による抗原特異的免疫誘導機序を解析する目的で, 先と同様に免疫したマウスから脾細胞を回収し, OVA 特異的サイトカイン産生能を ELISPOT アッセイにて評価し

た. その結果, mTNF-K90R 投与マウス脾細胞の IFN- γ の産生は, OVA 単独投与群と同程度であったのに対し, IL-4 の産生は OVA 単独投与群の 6 倍, また, wTNF と比較した場合においても, およそ 3 倍強力で誘導されていた. 以上の結果より, mTNF-K90R による粘膜アジュバント活性の増強には, 抗原特異的 IL-4 の産生を主体とした Th2 依存的免疫応答の増強に基づくものであることが明らかとなった. さらに, mTNF-K90R の粘膜ワクチンアジュバントとしての安全性を評価する目的で, 投与局所部位における組織傷害性及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, 粘膜アジュバント効果を発揮するのに必要な投与量の 25 倍もの過剰量を複数回投与した場合においても, mTNF-K90R の鼻粘膜組織に及ぼす傷害性等は全く認められなかった. 以上の結果を総合すると, mTNF-K90R は, 投与局所の粘膜面に毒性を示すことなく, 抗原特異的な免疫応答を強力に誘導可能であり, 安全かつ効果的な粘膜アジュバントになり得るものと期待される.

4. ウイルスを標的とした活性増強型 TNF 変異体の有効性評価

現行のポリオ生ワクチンは, 自然感染経路同様に経口で接種され, 血清中における IgG 抗体に加えて, 腸管粘膜面において IgA 抗体産生を誘導することにより, 抜群の感染防止効果を発揮する.¹²⁾ このポリオ生ワクチンの成功事例にならい, 近年では, 上気道粘膜を介して感染するインフルエンザウイルスや腸管・膣粘膜を介して感染する HIV とい

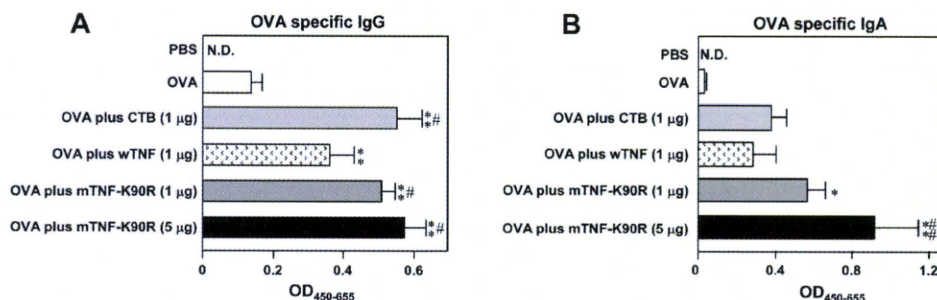


Fig. 3. Serum OVA-specific IgG Abs and Mucosal OVA-specific IgA Abs Response after Nasal Immunization with OVA Plus Adjuvant

BALB/c mice were intranasally immunized with OVA alone, OVA plus CTB, OVA plus wTNF- α or OVA plus mTNF-K90R once a week for three consecutive weeks. Serum and nasal washes were collected 1 wk after the last immunization and analyzed by ELISA for OVA-specific IgG (A) at a 1 : 100 dilution of serum and OVA-specific IgA (B) at a 1 : 8 dilution of nasal washes. Data represents the mean of absorbance 450 nm (reference wave, 655 nm). N.D.; not detected. Data are presented as means \pm S.E.M. ($n=7$; $*p<0.05$, $**p<0.01$ versus value for OVA alone treated group by ANOVA; $\#p<0.05$, $\#\#p<0.01$ versus value for OVA plus wTNF- α treated group by ANOVA).

った経粘膜感染型ウイルスを標的として、粘膜ワクチンが盛んに研究されている。^{13,14)}しかし、有効性と安全性に優れたアジュバントが存在しないことが、粘膜ワクチン開発を推進する上での律速段階となっており、その点、われわれが独自に創出した mTNF-K90R は、このような問題点を克服し、粘膜アジュバント開発のブレイクスルーになるものと期待される。そこで、mTNF-K90R のウイルスワクチンアジュバントとしての有効性を検証する目的で、インフルエンザウイルス (H1N1:A ソ連型) の HA タンパク質、及び、HIV-1 エンベロープタンパク質である gp120 をワクチン抗原として、mTNF-K90R によるウイルス抗原特異的抗体誘導能を評価した。その結果、HA タンパク質とともに mTNF-K90R を経鼻投与したマウスにおいては、HA タンパク質を単独で投与したマウス及び、CTB を併用投与したマウスと比較して、血清中における HA 特異的 IgG 産生、並びに鼻腔洗浄液中、唾液中における IgA 産生ともに増強していた [Fig. 4 (A)]。また、gp120 をワクチン抗原として用いた場合においても、mTNF-K90R による粘膜アジュバント効果が認められ、全身面と粘膜面ともに抗原特異的抗体を誘導増強可能であった [Fig. 4 (B)]。

以上の結果より、mTNF-K90R は、インフルエンザや HIV を始めとするウイルス感染症予防に叶う、優れた粘膜ワクチンアジュバントになり得るものと考えられる。

5. おわりに

2009 H1N1 ウイルスによるパンデミックに伴い、欧米の製薬企業が中心となって、ワクチン開発が急ピッチで進められている。しかし、現在、FDA (米国医薬品食品局) が承認しているワクチン製造法では、ワクチンの製造に 4-6 ヶ月もの長期間を必要とし、かつ、その供給量が限定されることから、パンデミック発生時に必要な莫大な需要を賄うことは到底不可能である。したがって、少ない抗原量でワクチン効果を発揮させなければならず、免疫応答惹起を補完するためにも、アジュバントとの併用投与が必須となってくる。¹⁵⁾ これまで数十年のアジュバント研究にもかかわらず、全身投与型のアジュバントである Alum (水酸化アルミニウムゲル) が唯一米国で承認されたにすぎず、粘膜アジュバントは皆無である。このような背景から、今後の粘膜ワクチンの実用化と一層の進展に向けての最大の鍵は、安全性と有効性の両者のバランスに優れたアジュバントの開発にあると言える。本稿では、TNF-

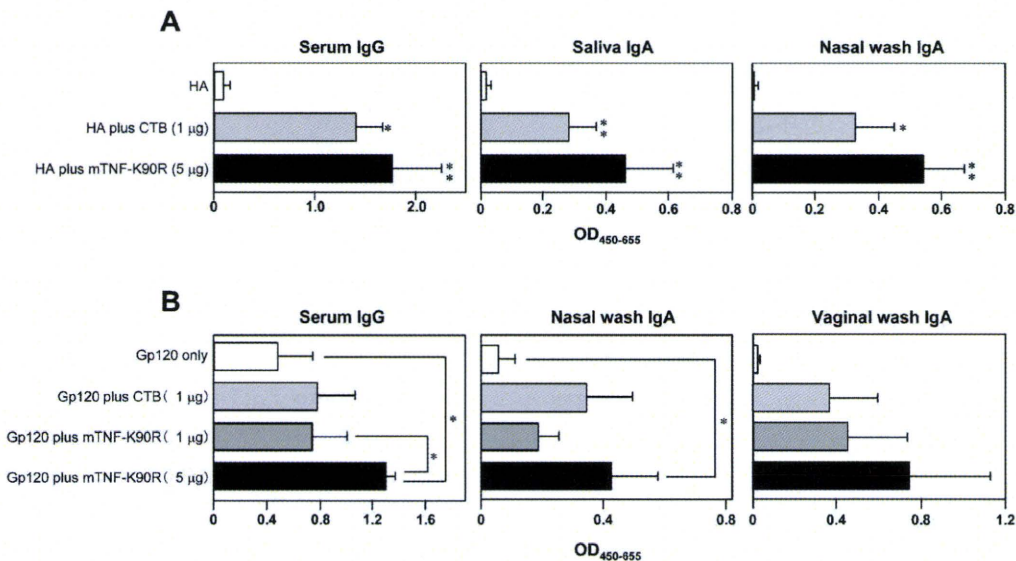


Fig. 4. mTNF-K90R Induced Mucosal IgA and IgG Responses against Influenza Virus HA or HIV-1 gp120 in Mice

In influenza studies, BALB/c mice were immunized intranasally with HA together with 1 µg CTB or 5 µg mTNF-K90R. One week after the last immunization, HA-specific IgG in serum at a 1 : 500 dilution and IgA in nasal or saliva at a 1 : 8 dilution were assessed by ELISA at a 1 : 8 dilution. Data represents the mean of absorbance 450 nm (reference wavelength, 655 nm). N.D.; not detected. Data are presented as means ± S.E.M. ($n=4-6$; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ versus value for HA alone treated group by ANOVA). In HIV studies, BALB/c mice were intranasally immunized with gp120 alone, gp120 plus CTB, or gp120 plus mTNF-K90R once a week for four weeks. Serum and mucosal secretions were collected 7 days after the last immunization and analyzed by ELISA for gp120-specific IgA in 8-fold diluted nasal wash or vaginal wash. Data are presented as mean ± S.E.M. ($n=6$; * $p<0.05$).

α を素材として創出した mTNF-K90R の粘膜アジュバントとしての適用可能性に関する検討により、1) mTNF-K90R が、ワクチン抗原特異的抗体の誘導を粘膜面・全身面ともに増強可能であること、2) mTNF-K90R の投与局所部位である鼻粘膜面において、高い安全性を保持すること、3) mTNF-K90R は、インフルエンザウイルスや HIV といったウイルス抗原に対しても、抗原特異的抗体を粘膜面と全身面の両者に効率よく誘導することが明らかとなり、mTNF-K90R は粘膜免疫誘導活性と安全性の両者のバランスに非常に優れた粘膜アジュバント特性を有すると言える。また、mTNF-K90R を経鼻粘膜アジュバントとして適用した場合、抗体産生を主体とする体液性免疫を誘導することが判明している。しかし、HIV によるウイルス感染を効果的に抑制するためには、体液性免疫のみならず、細胞性免疫をも効率よく誘導することが重要となってくる。¹⁶⁾ このような観点から、現在、細胞性免疫誘導能に優れたサイトカインの探索にも着手しており、抗原特異的 IgA 抗体と MHC class I 拘束性の CD8⁺CTL 誘導をともに増強するサイトカインの同定にも成功している。したがって、今後、感染標的となるウイルス種に応じて適切なサイトカインを選択すれば、体液性免疫あるいは細胞性免疫の誘導を任意に制御することが可能となり、更なる有効かつ安全な粘膜ワクチン開発戦略につながるものと期待される。また一方で、本粘膜ワクチンシステムを病原体のみならず、生体内分子に対する抗体誘導に応用することができれば、新たな疾患治療法が確立可能と考えられる。例えば、サイトカインに対する自己抗体を自在に誘導できれば、サイトカインの過剰産生が病態に係わる種々の難治性免疫疾患の新規治療法になり得ると期待される。更なる検討は必要であるが、本研究を、広義のワクチン療法、あるいは抗体誘導療法ともいべき新しい疾患予防・治療法として展開していきたいと考えている。

謝辞 本研究の遂行に際し、多くのアドバイスを頂きました、勸東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所花粉症プロジェクト 廣井隆親先生、大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野 形山和史先生に感謝申し上げます。また本研究は、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及びエイズ対策研究事業の支援を受けて実施したものです。

REFERENCES

- 1) Tumpey T. M., Basler C. F., Aguilar P. V., Zeng H., Solórzano A., Swayne D. E., Cox N. J., Katz J. M., Taubenberger J. K., Palese P., García-Sastre A., *Science*, **310**, 77-80 (2005).
- 2) Holmgren J., Czerkinsky C., *Nat. Med.*, **11**, S45-S53 (2005).
- 3) Kunisawa J., Gohda M., Kiyono H., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 319-326 (2007).
- 4) Ada G., *N. Engl. J. Med.*, **345**, 1042-1053 (2001).
- 5) Petrovsky N., Aguilar J. C., *Immunol. Cell Biol.*, **82**, 488-496 (2004).
- 6) Mutsch M., Zhou W., Rhodes P., Bopp M., Chen R. T., Linder T., Spyr C., Steffen R., *N. Engl. J. Med.*, **350**, 896-903 (2004).
- 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., *Biomaterials*, **30**, 5869-5876 (2009).
- 8) Kayamuro H., Yoshioka Y., Abe Y., Katayama K., Yoshida T., Yamashita K., Yoshikawa T., Hiroi T., Itoh N., Kawai Y., Mayumi T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **384**, 296-300 (2009).
- 9) Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Nishibata T., Kobayashi K., Okamoto T., Mukai Y., Shimizu T., Nakagawa S., Nagata S., Mayumi T., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 546-552 (2003).
- 10) Shibata H., Yoshioka Y., Ikemizu S., Kobayashi K., Yamamoto Y., Mukai Y., Okamoto T., Taniai M., Kawamura M., Abe Y., Nakagawa S., Hayakawa T., Nagata S., Yamagata Y., Mayumi T., Kamada H., Tsutsumi Y., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 8293-8300 (2004).
- 11) Reed S. G., Bertholet S., Coler R. N., Friede M., *Trends Immunol.*, **30**, 23-32 (2008).
- 12) Kiyono H., Fukuyama S., *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 699-710 (2004).
- 13) Ichinohe T., Watanabe I., Ito S., Fujii H.,

- Moriyama M., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Chiba J., Kurata T., Sata T., Hasegawa H., *J. Virol.*, **79**, 2910–2919 (2005).
- 14) Belyakov I. M., Isakov D., Zhu Q., Dzutsev A., Berzofsky J.A., *J. Immunol.*, **178**, 7211–7221 (2007).
- 15) Leroux-Roels I., Borkowski A., Van-wolleggem T., Dramé M., Clement F., Hons E., Devaster J. M., Leroux-Roels G., *Lancet*, **370**, 580–589 (2007).
- 16) Berzofsky J. A., Ahlers J. D., Janik J., Morris J., Oh S., Terabe M., Belyakov I. M., *J. Clin. Invest.*, **114**, 450–462 (2004).

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

特集 感染症対策に資する新規ワクチンシステムの開発

萱室裕之^{*1,2)}, 角田慎一・堤 康央^{*1~3)}

Development of functional cytokines as novel mucosal vaccine adjuvants

Mucosal vaccines administered either orally or nasally have been shown to be effective in inducing antigen-specific immune responses at both systemic and mucosal compartments. Because of this two-layered protective immunity, mucosal vaccines are thought to be an ideal strategy for combating both emerging and re-emerging infectious diseases. There is, however, no mucosal vaccine to use in human due to the lack of mucosal adjuvant with high efficacy and safety. In this regard, we succeeded in augmentation of protective immunity to viral infection by applying a mutant tumor necrosis factor- α (TNF- α), mTNF-K90R, that exhibits high bioactivity and resistance to proteases as a mucosal vaccine adjuvant.

In this review, we describe about the feasibility of functional cytokines as mucosal vaccine adjuvants in vaccine therapy for infectious diseases.

粘膜ワクチンは、全身面と粘膜面の二重の防御免疫を誘導可能な唯一の方法であることから、新興・再興感染症に対する予防法として期待されている。しかし、生ワクチンを除いて、いまだ実用的な粘膜ワクチンは皆無であり、その実現に向けては、有効かつ安全なアジュバント開発が必要とされている。筆者らが開発を進めている機能性サイトカインは、防御免疫を効率よく誘導しうることから、粘膜アジュバントとしての可能性が大きく期待されるものである。

本稿では、粘膜ワクチンおよびアジュバント開発の現状と、筆者らの成果について概説する。

Hiroyuki Kayamuro^{*1,2)}, Shin-ichi Tsunoda・Yasuo Tsutsumi^{*1~3)}

key words : adjuvant, cytokines, mucosal vaccine, functional protein mutants, phage display library

腸管や呼吸器といった粘膜組織には、パイエル板や鼻咽頭関連リンパ組織(nasopharynx-associated lymphoid tissue : NALT)という粘膜固有の免疫誘導組織が存在し、粘膜免疫システムを発動させるための中枢として機能することが明らかとなってきた¹⁾。そして近年、この粘膜免疫システムを有効利用した経粘膜投与型ワクチン(粘膜ワクチン)が、インフルエンザやエイズといった新興再興感染症に対する次世代型ワクチンに適うものとして、大きく期待されている。

粘膜ワクチンは、全身レベルでの免疫のみならず、種々の病原体の侵入部位である粘膜面における抗原特異的免疫応答をも誘導することで、二段構え

の予防免疫を誘導できるという、従来の注射型ワクチンでは達成できない効果を期待できる²⁾。したがって昨今、世界的感染拡大を起している新型インフルエンザウイルスをはじめとするさまざまな病原体に対する感染予防策として、感染初発部位である粘膜局所での予防免疫を構築可能な粘膜ワクチンへの期待はますます高まっている(図1)。

粘膜ワクチンの有効性は、ポリオ生ワクチンによって実証されてきた。ポリオ生ワクチンを自然感染経路同様に経口接種すると、血清中におけるIgG抗体に加えて、腸管粘膜面においてIgA抗体産生が誘導され、すぐれた感染防止効果を発揮する³⁾。このポリオ生ワクチンに倣い、経粘膜感染型ウイルスを標的とした粘膜ワクチンが、現在、盛んに研究されている⁴⁾。

しかし、生ワクチンではなく、スプリットワクチンや成分ワクチンの場合には、ワクチン抗原を単独で経粘膜投与しても、抗体産生能に乏しく、感染防

^{*1)} Laboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation 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

^{*2)} Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University 大阪大学大学院薬学研究所

^{*3)} The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター

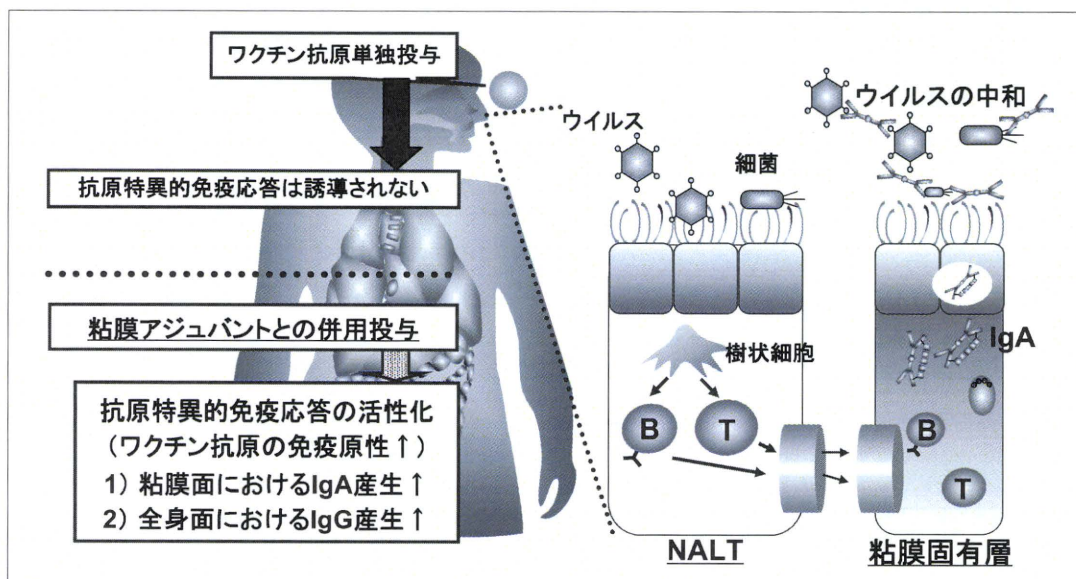


図1 粘膜ワクチン開発におけるアジュバントの必要性

御に十分な免疫を誘導できないことが明らかとなっている。したがって、粘膜ワクチン効果を最大限に発揮するためには、ワクチン抗原に対する抗原特異的な免疫応答を強化、活性化できる免疫増強剤(アジュバント)の併用が必須である⁵⁾。

これまでに、粘膜アジュバントとして、コレラ毒素(cholera toxin: CT)や大腸菌易熱性毒素(heat labile enterotoxin: LT)が見いだされ、臨床応用も試みられてきた。しかし、これら細菌毒素由来のアジュバントは、粘膜面および全身面に効率よく免疫を誘導しうるものの、顔面神経麻痺(Bell's palsy)をはじめとする重篤な副作用を呈することが明らかとなり、臨床応用は断念されている⁶⁾。

本観点から筆者らは、臨床応用可能な粘膜アジュバントを開発することを目的に、免疫調節因子であるサイトカインに着目し、新規粘膜アジュバントとしての有用性を検討してきた。サイトカインは、免疫応答の制御に必要不可欠な生体由来分子であり、おのおののサイトカインが抗原提示細胞の活性化作用や、T細胞・B細胞といった獲得免疫担当細胞の分化/増殖刺激作用などを担っている。したがって、サイトカインは、粘膜ワクチンアジュバントとして具備すべき、有効性と安全性の両者を兼ね備えているものと考えられた。

しかし、これまで粘膜免疫システムにおけるサイ

トカインの役割はほとんど解明されていないうえ、サイトカインを経粘膜投与した場合には、蛋白分解酵素やpH変化により速やかに失活・分解されることが予想された。

そこで筆者らは、これら問題点を克服し、サイトカインを粘膜アジュバントとして有効活用しうる方法論の確立を試みた。すなわち、サイトカインのなかでも特に強力な免疫活性化能を有することが知られる腫瘍壊死因子(TNF- α)に着目し、フェージ表面提示法を駆使した独自の機能性人工蛋白質創製技術により、活性が野生型TNF- α (wTNF)よりも飛躍的に向上し、かつ体内安定性にもすぐれた活性増強型TNF変異体(mTNF-K90R)を創製し、粘膜ワクチンアジュバントとしての応用を試みた⁷⁾。

活性増強型TNF変異体の創出

上記観点から筆者らは、およそ20種類にも及ぶTNFスーパーファミリーサイトカインについて、粘膜アジュバント活性の比較解析を実施した。その結果、TNF- α が特にすぐれた粘膜アジュバント効果を発揮すること、また重篤な副作用を伴うことなく粘膜免疫を誘導可能であることを世界に先駆けて見いだした⁸⁾。

しかし、サイトカインは一般に、強力な免疫活性

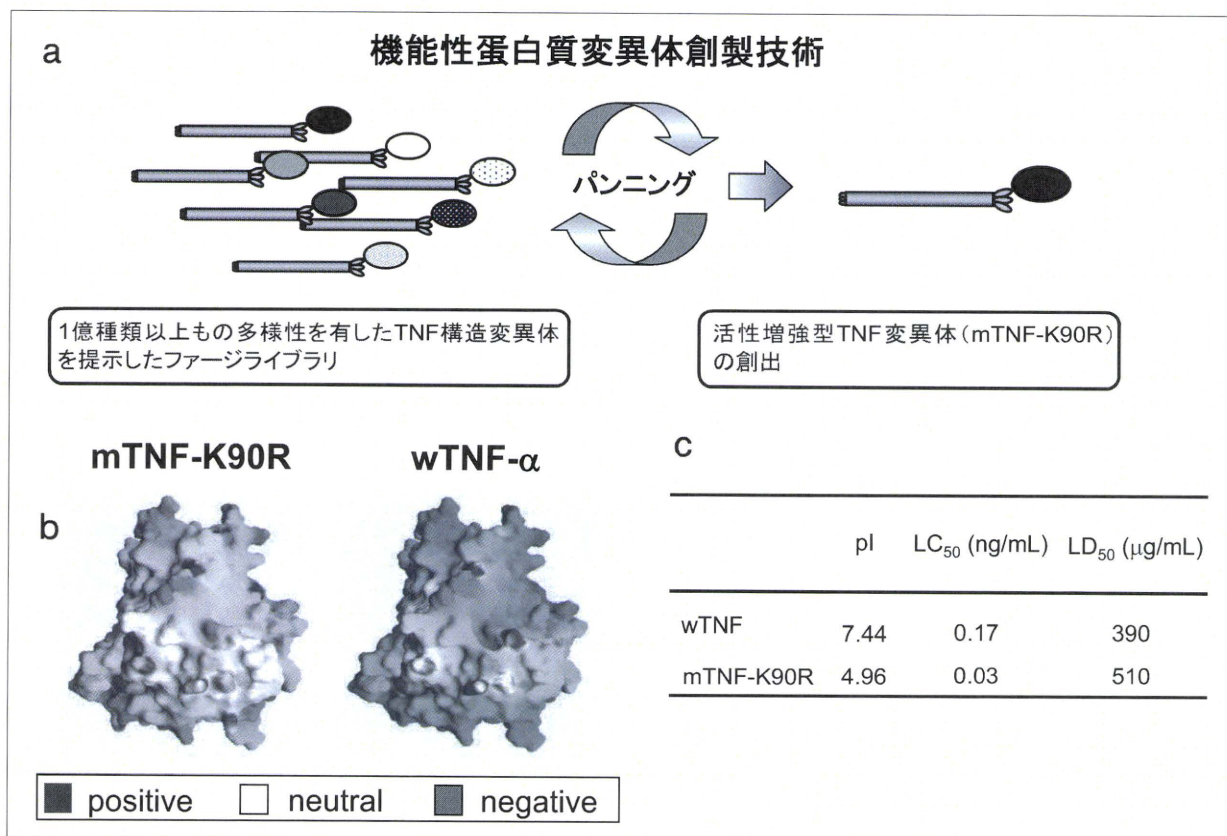


図2 ファージ表面提示法を駆使した機能性蛋白質変異体創製技術と mTNF-K90R の生物学的特性
 a: 機能性蛋白質変異体創製技術の概略. b: mTNF-K90R の表面電荷. c: mTNF-K90R の等電点(pI 値)と生物活性/安全性(LC₅₀ 値/LD₅₀ 値)

化能を有する反面、体内安定性に乏しく、経粘膜投与した場合には粘膜面に分泌される蛋白分解酵素などにより速やかに分解されることになる。したがって、TNF- α のポテンシャルを十分に引き出し、有効な粘膜アジュバントとして開発するためには、体内不安定性の克服が重要な鍵となってくる。

この点筆者らは、さまざまな機能改変蛋白質を迅速に、自在に創出可能な独自の“機能性蛋白質変異体創製技術”を確立してきた。本技術は、ファージ表面提示法を有効活用し、アミノ酸改変蛋白質の網羅的ライブラリのなかから、目的機能を有する変異体を迅速に単離可能とするものである。本技術を TNF- α に適用し、TNF- α 分子中の全6個のリジン残基を他のアミノ酸で完全置換した変異体の創製を試みた結果、野生型(wTNF)にくらべて比活性が約10倍向上した変異体(mTNF-K90R)の創出に成功した(図2)⁹⁾。

この mTNF-K90R は、塩基性のリジン残基が欠損することによって pI 値が低下(lowering pI)するとともに、トリプシン系蛋白分解酵素抵抗性となり、wTNF と比較して生体内安定性が著しく向上していた。また興味深いことに、mTNF-K90R は、wTNF よりも高い比活性を示すものの、全身毒性は、wTNF よりも低減していた¹⁰⁾。

以上の結果より mTNF-K90R は、安全性を確保しつつも粘膜面における生物活性を増強することで、粘膜免疫を強力に誘導しうるすぐれたアジュバントになるものと考えられた。

活性増強型 TNF 変異体の粘膜アジュバントとしての特性評価

近年、感染症に対する予防ワクチンの開発は、これまで主流であった全細胞ワクチンや弱毒化生ワク

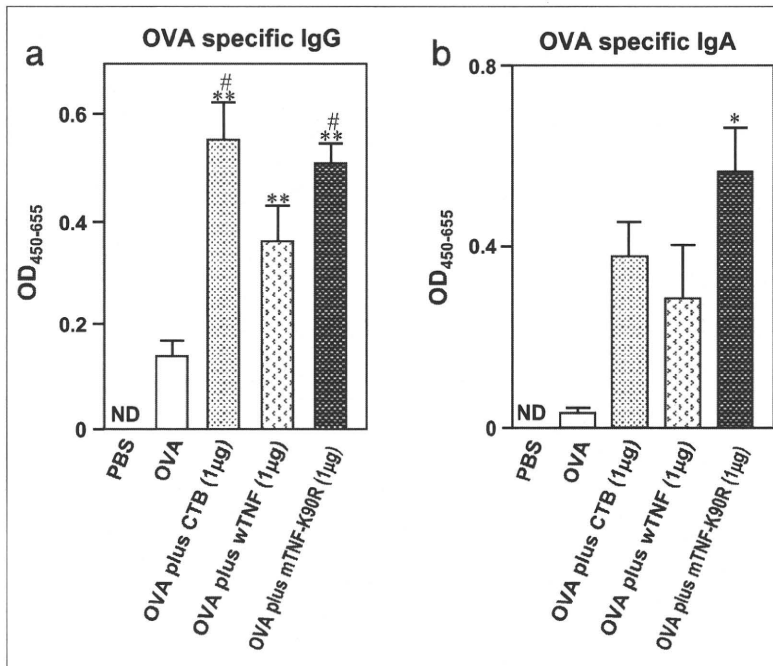


図3
mTNF-K90Rを粘膜アジュバントとした際のOVA特異的抗体誘導
BALB/cマウスにOVA(100 µg)とともにCTB, wTNF-α, mTNF-K90RまたはOVA溶液を1週間間隔で3回経鼻免疫し, 最終免疫から1週間後の血清および鼻腔洗浄液中のOVA特異的IgG産生(a), IgA産生(b)をELISAにより評価した. mean ± SD (n=7: フィッシャーのANOVA法, *P<0.05, **P<0.01: OVA単独投与群との比較, #P<0.05: wTNF-α併用投与群との比較)

チンから, 免疫原性が弱いながらも安全性の高いスプリットワクチン, 成分ワクチンへとシフトしつつある。

当然ながら, 高病原性の病原体では, 生ワクチンよりも, スプリットワクチンや成分ワクチンが望ましく, その実用化のためには, 有効かつ安全なワクチンアジュバントの開発が不可欠である。しかし, これまで多くのアジュバント研究がなされてきたにもかかわらず, 粘膜免疫誘導活性と安全性を兼ね備えた粘膜アジュバントの開発・実用化には至っていない。

そこで筆者らは, mTNF-K90Rの粘膜ワクチンアジュバントとしての可能性を探るため, モデル抗原(ニワトリ卵白アルブミン: OVA)とともに, mTNF-K90Rをアジュバントとしてマウスに経鼻免疫した場合のOVA特異的抗体産生を評価した。その結果, OVAを単独で投与した場合には, 血清中でのOVA特異的IgG抗体の誘導がほとんど認められなかったのに対して, wTNFをアジュバントとして併用投与したマウスにおいては, OVA特異的抗体産生が増強されていた。さらに, mTNF-K90R共投与による抗原特異的IgGの誘導は, wTNFの投与の場合とくらべて有意に増強され,

粘膜免疫誘導活性にすぐれていることで知られるコレラ毒素Bサブユニット(CTB)と同程度のアジュバント活性を有してしていた(図3a)。

つぎに, OVAとmTNF-K90Rを併用投与したマウスから回収した鼻腔洗浄液, 膈洗浄液, 糞便抽出液中におけるOVA特異的IgAを測定した。その結果, OVA単独投与群と比較してwTNF併用投与群では, OVA特異的IgAが強く誘導されていた。また, mTNF-K90R併用投与群では, その効果がさらに向上しており(図3b), 投与局所である鼻粘膜面のみならず, 腸管および膈といった遠隔の粘膜面においても顕著な抗体産生が認められた。

以上の結果より, mTNF-K90Rは, ワクチン抗原特異的な抗体を粘膜面(IgA)と全身面(IgG)に効率よく誘導可能な, すぐれた粘膜アジュバントになりうることを示唆された。

つづいて, mTNF-K90Rによる抗原特異的免疫誘導機序を解析する目的で, 先と同様に免疫したマウスから脾細胞を回収し, OVA特異的サイトカイン産生能をELISPOTアッセイにて評価した。その結果, mTNF-K90R投与マウスの脾細胞中におけるIFN-γ産生細胞数は, OVA単独投与群と同程度であったのに対し, IL-4の産生細胞はOVA単独

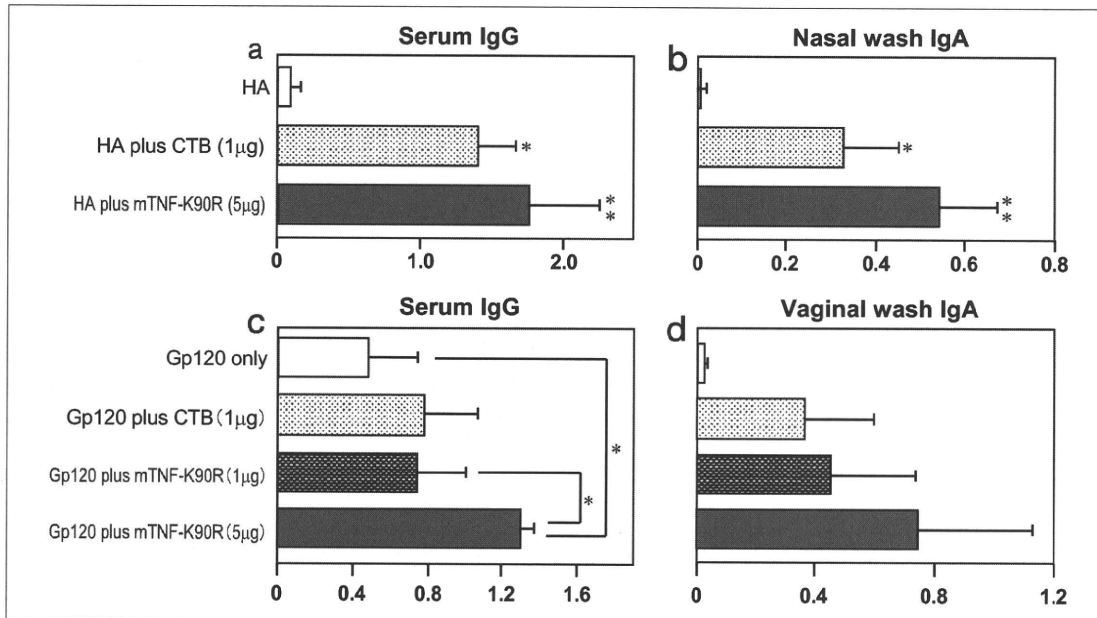


図4 mTNF-K90Rのウイルス抗原特異的抗体誘導能

a, b: BALB/cマウスにHA (1μg)とともにCTB, mTNF-K90R (1μg), mTNF-K90R (5μg), またはHA溶液を4週間間隔で2回経鼻免疫し, 最終免疫から2週間後の血清および鼻腔洗浄液中のHA特異的IgG産生(a), IgA産生(b)をELISAにより評価した. mean ± SD (n=4~6: フィッシャーのANOVA法, *P < 0.05, **P < 0.01: HA単独投与群との比較)

c, d: BALB/cマウスにgp120 (5μg)とともにCTB, mTNF-K90R (1μg), mTNF-K90R (5μg), またはgp120溶液を1週間間隔で3回経鼻免疫し, 最終免疫から1週間後の血清および陰洗浄液中のgp120特異的IgG産生(c), IgA産生(d)をELISAにより評価した. mean ± SD (n=6: *P < 0.05: gp120単独投与群との比較)

投与群の6倍, またwTNFと比較した場合においても, およそ3倍に増加していた。

以上の結果より, mTNF-K90Rによる粘膜アジュバント活性の増強は, 抗原特異的IL-4の産生を主体としたTh2依存的な免疫応答によることが示唆された。

さらに, mTNF-K90Rの粘膜ワクチンアジュバントとしての安全性を評価する目的で, 投与局所における組織傷害の有無を組織病理学的に解析した。その結果, mTNF-K90Rを粘膜アジュバント効果を得るのに必要となる投与量の5倍もの過剰量を複数回投与した場合においても, 鼻粘膜組織に傷害性などの異常所見は認められなかった。

以上の結果を総合すると, mTNF-K90Rは投与局所の粘膜面に毒性を示すことなく, 抗原特異的な免疫応答を強力に誘導可能であり, 安全かつ効果的な粘膜アジュバントになりうるものと期待される。

抗ウイルスワクチン用粘膜アジュバントとしてのTNF変異体

つぎに, 上記mTNF-K90Rのウイルスワクチンアジュバントとしての有効性を検証する目的で, インフルエンザウイルス(H1N1:Aソ連型)のHA蛋白質, およびHIV-1エンベロープ蛋白質であるgp120をワクチン抗原として, ウイルス特異的抗体の誘導能を評価した。その結果, HA蛋白質とともにmTNF-K90Rを経鼻投与したマウスにおいては, HA蛋白質を単独で投与したマウス, およびCTBを併用投与したマウスと比較して, 血清中におけるHA特異的IgG産生, ならびに鼻腔洗浄液中, 唾液中におけるIgA産生ともに増強されていた(図4a,b)。

また, gp120をワクチン抗原として用いた場合においても, mTNF-K90Rによる粘膜アジュバント効果が認められ, 全身面と粘膜面ともに抗原特異的

抗体を誘導可能であった(図 4c,d).

以上の結果より, mTNF-K90R は, インフルエンザや HIV をはじめとするウイルス感染症予防に適うすぐれた粘膜ワクチンアジュバントになりうるものと考えられ, 現在, ウイルス感染阻害実験などより詳細な検討を進めている.

おわりに

2009 年の春からはじまったインフルエンザ H1N1 2009 ウイルスによるパンデミックでは, ワクチンメーカーはもとより, 欧米のメガファーマが中心となってワクチン開発が急ピッチで進められ, 冬になって, ようやく一部の対象者に限定して供給されはじめたところである.

このように, 現在のインフルエンザワクチンの製造には 4~6 カ月もの期間を必要とし, その供給量も限定されることから, パンデミック発生時の莫大な需要を賄うことが到底できていない現状は周知の通りである. したがって, 可能な限り少ない抗原量でワクチン効果を発揮させるためには, 免疫誘導を補完するアジュバントがきわめて重要な意味を持つ¹¹⁾.

しかし, これまでに米国 FDA では, 全身投与型のアジュバントとして Alum(水酸化アルミニウムゲル)が唯一承認されているだけであり, 欧州でも数種類に限られている. また, パンデミックの際には, ワクチン接種を行う医師の数さえ不足することが予想されるが, 注射を必要とせず, 簡便に投与が可能な粘膜ワクチンは, 医師が常時不足している地域, とりわけ発展途上国などでのワクチン適用にも大きな意味を持つ.

このような背景からも, 今後の粘膜ワクチンの実用化と, そのための安全性と有効性にすぐれたアジュバントの開発が急がれる.

本稿では, 独自の技術を駆使して創出した機能的 TNF 変異体 mTNF-K90R の粘膜アジュバントとしての可能性について紹介した. 最近では, ワクチン抗原やアジュバントの開発とともに, ナノテクノロジーを取り入れたさまざまなワクチンキャリアーの開発も試みられている. これら技術を駆使したワク

チンシステムを開発するうえで, 体内動態の緻密な制御と最適化を目指す DDS の概念は非常に有用となる¹²⁾.

今後, DDS の概念を取り入れた, 次世代のワクチン開発戦略を提示できればと願っている.

本研究の遂行に際して多くのご助言をいただきました, 東京大学医科学研究所・清野 宏先生, 國澤純先生, 東京都臨床医学総合研究所・廣井隆親先生, 形山和史先生, 独立行政法人医薬基盤研究所・岡本成史先生に感謝申し上げます. また, 共同研究者である大阪大学臨床医工学融合研究教育センター・吉岡靖雄先生, 独立行政法人医薬基盤研究所・山西弘一先生, 鎌田春彦先生, 吉川友章先生, 阿部康弘先生, 長野一也先生をはじめとする諸先生方, 学生の皆様に心より御礼申し上げます.

なお, 本研究は日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 B 一般(No.21390046)および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の支援を受けて実施したものです.

文 献

- 1) Fujihashi K, Kiyono H : Mucosal immunosenescence : new developments and vaccines to control infectious diseases. *Trends Immunol* 30 : 334-343, 2009.
- 2) Kunisawa J, Gohda M, Kiyono H : Uniqueness of the mucosal immune system for the development of prospective mucosal vaccine. *Yakugaku Zasshi* 127 : 319-326, 2007.
- 3) Kiyono H, Fukuyama S : NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 4 : 699-710, 2004.
- 4) Belyakov IM, Isakov D, Zhu Q, Dzutsev A, Berzofsky JA : A novel functional CTL avidity/activity compartmentalization to the site of mucosal immunization contributes to protection of macaques against simian/human immunodeficiency viral depletion of mucosal CD4+ T cells. *J Immunol* 178 : 7211-7221, 2007.
- 5) Ada G : Vaccines and vaccination. *N Engl J Med* 345 : 1042-1053, 2001.
- 6) Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT et al. : Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 350 : 896-903, 2004.
- 7) Kayamuro H, Abe Y, Yoshioka Y, Katayama K, Nomura T et al. : The use of a mutant TNF-alpha as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses. *Biomaterials* 30 : 5869-5876, 2009.
- 8) Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Katayama K, Yoshida T et al. : TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant. *Biochem Biophys Res Commun* 384 : 296-300, 2009.
- 9) Yamamoto Y, Tsutsumi Y, Yoshioka Y, Nishibata T, Ko-

- bayashi K et al. : Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity. *Nat Biotechnol* 21 : 546-552, 2003.
- 10) Shibata H, Yoshioka Y, Ikemizu S, Kobayashi K, Yamamoto Y et al. : Functionalization of tumor necrosis factor-alpha using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window. *Clin Cancer Res* 10 : 8293-8300, 2004.
- 11) Leroux-Roels I, Borkowski A, Vanwolleghem T, Dramé M, Clement F et al. : Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine : a randomised controlled trial. *Lancet* 370 : 580-589, 2007.
- 12) Yoshikawa T, Okada N, Oda A, Matsuo K, Matsuo K et al. : Nanoparticles built by self-assembly of amphiphilic gamma-PGA can deliver antigens to antigen-presenting cells with high efficiency : a new tumor-vaccine carrier for eliciting effector T cells. *Vaccine* 26 : 1303-1313, 2008.

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

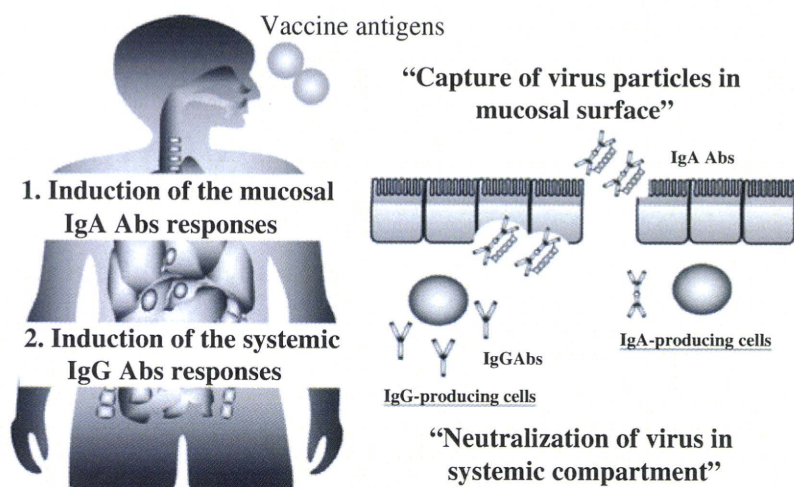


Fig. 31.1 Mucosal vaccine strategy

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

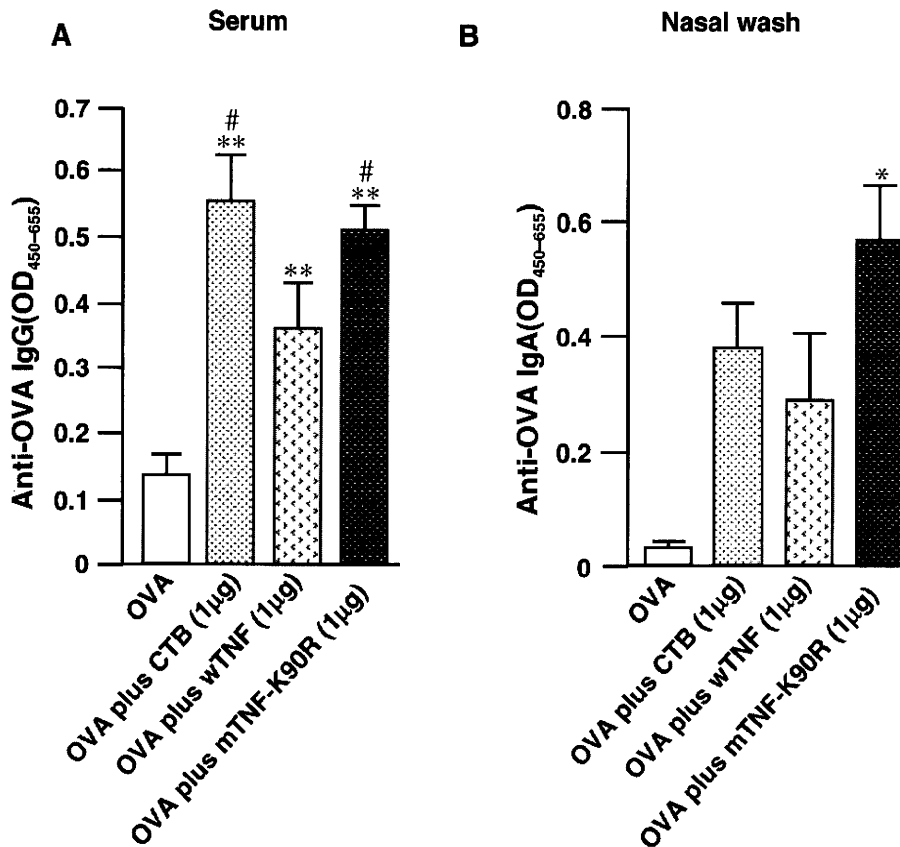


Fig. 31.2 Ovalbumin (OVA)-specific Ig antibody response after nasal immunization with OVA plus adjuvant. BALB/c mice were intranasally immunized once a week for three consecutive weeks with OVA alone, OVA plus 1 µg cholera toxin B subunit (CTB), OVA plus 1 µg wild-type tumor necrosis factor (wTNF)- α , or OVA plus 1 µg mutant (m)TNF-K90R. Serum and nasal wash was prepared 1 week after the last immunization and analyzed by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) for OVA-specific IgG (a) at a 1:100 dilution of serum and OVA-specific IgA (b) at a 1:8 dilution of nasal wash. Data represent the means of absorbance a wavelength of 450 nm (reference wavelength, 655 nm). ND, not detected. Data are presented as means \pm SEM ($n = 7$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus value for group treated with OVA alone, by ANOVA; # $P < 0.05$ versus value for group treated with OVA plus wTNF- α , by ANOVA)

Ig Ab responses in both the mucosal and the systemic immune compartment. We attempted to identify the powerful mucosal adjuvants among 16 different TNF superfamily cytokines.

Currently, more than 40 members of the TNF/TNF receptor (TNFR) superfamily have been identified, and the majority are expressed by immune cells. The biological functions of this system encompass beneficial and protective effects in inflammation and host defense, as well as a crucial role in immune organogenesis [5]. Some TNF superfamily cytokines already being used as vaccine adjuvants[0] to enhance primary and memory immune responses against cancer and infectious diseases are among the candidates for selection of a powerful but safe adjuvant. For example, 4-1BBL, CD27L, CD30L, GITRL, LIGHT, OX40L, and TNF- α ,