

201123063A

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

パイエル板指向性分子を利用した経口ワクチンの開発
に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成24（2012）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

パイエル板指向性分子を利用した経口ワクチンの開発
に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
パイエル板指向性分子を利用した経口ワクチンの開発 に関する研究	----- 1
渡利 彰浩	
II. 分担研究報告	
パイエル板指向性分子の作製・機能解析 に関する研究	----- 21
鈴木 亮	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 30
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 32

総括研究報告書

「パイエル板指向性分子を利用した経口ワクチンの開発」

研究代表者 渡利 彰浩 大阪大学大学院薬学研究科 助教

研究要旨

昨今の新型インフルエンザの世界的流行でも明らかのように、依然として感染症は人類に立ちはだかる大きな脅威であり、感染症によって毎年 2000 万人の命が失われている。患者の生活の質・有効性・安全性を考慮すると、非侵襲性投与が可能であること、多くの感染性病原体の侵入門戸（粘膜面）における防御網を構築できること、生体内に侵入した病原体の排除活性をも有することから、『経口ワクチン』は理想的な感染予防法である。しかしながら、経口ワクチンが有効に機能するには、消化酵素による分解を回避しつつ、腸管粘膜免疫組織に抗原を効率良く送達する必要がある。以上の背景を踏まえ、本研究では腸管粘膜免疫組織パイエル板（PP）に claudin-4（CL-4）が高発現していることに着目し、独自の CL-4 指向性分子を有効活用することで、初めてのパイエル板指向性経口ワクチンを開発することを目的とする。

経口ワクチン開発における最重要課題は、PP への高効率抗原送達法の創出にある。最近粘膜免疫組織を覆う上皮細胞層に CL-4 が高発現していることが示され、CL-4 を標的とした粘膜ワクチン開発の可能性が示唆された。しかしながら、CL は抗原性が低い上に立体構造が解析されておらず、抗体を含めて CL binder の創製は立ち遅れており、CL-4 を標的とした粘膜ワクチン開発は皆無に等しい。当研究グループでは、独自の CL-4 binder（C-CPE）を用いて、CL-4 を標的とした粘膜ワクチンの可否を検証し、CL-4 ターゲティングによる粘膜ワクチン技術を世界に先駆けて確立してきた。本研究は、これらの CL-4 を標的とした粘膜ワクチン技術とリポソーム技術を融合・システムアップすることで、PP 指向性経口ワクチンの開発を試みるものである。

そこで本年度は、Claudin-4 への結合能に重要な C-CPE の C 末端側アミノ酸をランダムなアミノ酸に置換して構築した C-CPE 変異体提ファージライブラリから、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体を取得し、予備検討としてモデル抗原を用いた経鼻投与によるワクチン活性を解析した。その結果、新たに作製した CL-4 高結合性 C-CPE 変異体を用いた抗原送達法により、既存の C-CPE と比較して有意な免疫誘導能および腫瘍増殖効果が観察された。平成 24 年度は、ワクチン活性能を上昇させた C-CPE 変異体を利用し、C-CPE 変異修飾リポソームの作製および機能評価を行う予定である。

研究分担者

鈴木 亮 帝京大学薬学部 准教授

は粘膜面に免疫防御網を構築し生体内への侵入を阻止すること、第二は粘膜面の防御網をすり抜け体内に侵入した病原体および感染細胞を排除するために全身系の体液性・細胞性免疫機構を構築することにある。ワクチンは感染症対策の切り札として期待されているものの、現在汎用されている注射型ワクチンでは全身系体液性免疫の誘導に局限され、粘

A. 研究目的

インフルエンザウイルス、エイズウイルスなど感染性病原体の多くは粘膜面を介して生体内に侵入することから、感染症対策の最重要基本戦略の第一

膜面における侵入防御網の構築活性を持たず感染予防効果を期待できない。一方、粘膜ワクチンは、粘膜系免疫と全身系体液性・細胞性免疫の活性化能を併せ持つことから、効果的な感染予防・治療法であると言える。なかでも経口ワクチンは、粘膜系免疫と全身系体液性・細胞性免疫の活性化能をもち、抗原分子の脳内移行の危険性が拭いきれない経鼻ワクチンと異なり、安全性も高いことを考慮すると理想的なワクチンと考えられる。しかしながら、消化酵素による分解を回避しつつ腸管粘膜免疫誘導組織パイエル板に抗原を効率的に送達するシステムが開発されていないことから、経口ワクチンの開発は立ち遅れている。

近年、粘膜免疫組織に tight junction 構成タンパク質である claudin-4 (CL4) が高発現しており、CL4 を標的とした粘膜ワクチン開発の可能性が示唆されている。そこでこれまでに当研究グループは CL4 binder として知られるウエルシュ菌毒素 C 末断片である C-CPE を利用し、CL4 を標的とした経鼻粘膜ワクチン開発を試みた。モデル抗原として卵白アルブミン OVA と C-CPE 融合タンパクを用いて検証した結果、CL4 を標的とした粘膜ワクチンの proof of concept の実証に成功した。

次に、腸管粘膜免疫誘導組織パイエル板にも CL4 が高発現していたことから、腸管粘膜免疫組織を標的とした経口粘膜ワクチンの開発を試みたが、抗体価の上昇は観察されなかった。この原因として、(1) 経口ワクチンは経鼻ワクチンに比して 10 倍以上の抗原を粘膜免疫組織に送達する必要があるため抗原送達量が低かったこと、(2) 抗原が消化酵素分解により分解されることが考えられた。この解決法として、(1) 腸管粘膜免疫組織への抗原送達率を高めるため、既存の C-CPE よりも高い CL4 結合性を示す C-CPE 変異体の創出する、(2) 消化酵素耐性であるリポソームに抗原を封入することにより抗原分解回避するという方法を考案した。

そこで、本研究は CL4 へ高い結合性を示す C-CPE 変異体を創出するため、C-CPE の CL4 結合性に関与している C 末端 30 アミノ酸をランダムなアミノ酸に置換した C-CPE 変異体ファージライブラリを

作製し、CL4 結合性を指標に CL4 高結合性 C-CPE 変異体をスクリーニングした結果、C-CPE に比して 10 倍近く結合性に優れる新規 CL4 binder: C-CPE 194N309A/S313A の獲得に成功した。本報告では、作製した C-CPE 変異体を用いることにより、粘膜ワクチン活性が向上したことを報告する。

本研究で開発を試みるパイエル板への抗原送達システムは、従来まで注射による投与を余儀なくされていたワクチンを経口投与化する技術であり、医師や看護師などの医療従事者が居なくても簡便に投与可能であり、利便性および汎用性を兼ね備えていること、多くの病原体の侵入門戸である粘膜面に感染防御網を構築できることから、少子高齢社会を迎えた我が国の健康寿命の延伸、特徴あるワクチン開発技術を用いた本邦ワクチン産業の育成など、厚生労働行政に多方面から貢献できると考えられる。

B. 研究方法

B-1. CL-BV の作製

pFastBac-CL4 の作製

Claudin-4 の遺伝子を T-Easy Vector に挿入した pGTCL4 (神戸大学大学院医学研究科 古瀬幹夫博士より供与) を鋳型とし、KOD-plus-を用いて PCR を行った。なお、Forward primer として 5'-gctctagaatggattacaaggatgacgaacgataagatggcgtctatggga ctacaggtcctgggaatctccttagca-3' (the underline indicates *Xba*I site) を、Reverse primer として 5'-ggggtaccttacacatagttgctggcggggacagagcgggc-3' (the underline indicates *Kpn*I site) を用いた。得られた PCR 産物を PCR Purification Kit を用い精製後、*Xba*I および *Kpn*I を用い、37 °C にて一晚制限酵素処理した。あらかじめ *Xba*I および *Kpn*I 処理した pFastBac1 (東京大学先端科学技術研究センター 浜窪隆雄博士より供与) と T4 DNA ligase を用いて 16 °C にて一晚ライゲーション反応を行い、続いて *Xho*I を用いて制限酵素処理を行った。ライゲーション産物から第一章第一節に準じプラスミドを精製し、インサートの確認およびシーケンス解析を行い、claudin-4 をコードしたプラスミド (pFastBac-CL4) を得た。

Bacmid の作製

pFastBac-mCL4 をヒートショック法にて大腸菌 DH10Bac (Invitrogen) にトランスフォーメーションし、50 µg/ml kanamycin, 7 µg/ml gentamicin, 10 µg/ml tetracycline を含み、2% X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside) 100 µl および 50 mM IPTG 100 µl を塗布した LB 培地プレートに播種し、37 °C で 24 時間培養した。任意の白コロニーをピックアップし、アルカリプレップにて大腸菌から bacmid を精製した。精製した bacmid に目的とする遺伝子が挿入されていることを PCR 法にて確認した。なお、Forward primer として 5′-gttttcccagtcacgac-3′を、Reverse primer として 5′-ggaaacagctatgacatg-3′ または 5′-ggggtaccttacacatagttgctggcggggacagagcgggc-3′ を用いた。目的とする遺伝子の確認がとれた bacmid をヒートショック法にて大腸菌 DH5α にトランスフォーメーションし、50 µg/ml kanamycin を含む LB 培地 (LK) プレートに播種し、37 °C で一晩培養し、コロニーをピックアップ後、LK 培地 100 ml でさらに一晩培養した。大腸菌を回収し、QIAfilter™ plasmid Midi kit (QIAGEN) を用いて bacmid-mCL4 を精製した。

Budded baculovirus (CL4-BV) の作製

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

養した。3 日後、培養上清を $800 \times g$ で 10 分間遠心することで回収した (P1 ストック)。続いて、 2×10^6 cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに 200 ml 用意し、そこに P1 ストック 2 ml を加え、27 °C で 2 日間培養した。2 日後、培養上清を $800 \times g$ で 10 分間遠心することで回収した (P2 ストック)。

培養用 6 穴プレートに 2×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞を播種し、P2 ストックを 10, 100, 1,000 µl ずつ加え、27 °C で 3 日間培養した (全量 2 ml)。3 日後、 $800 \times g$ で 10 分間遠心し、上清を回収した。沈殿物 (細胞) には protease inhibitor (SIGMA) および 1% Triton-X を含む PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) で懸濁後、超音波処理で破碎し細胞可溶化液とした。培養上清および細胞可溶化液を用いて、Western blot 法にて目的とする蛋白質の発現を確認した。

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

CL4-BV の発現確認

蛋白質量として 5 µg を供し 15 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間蛋白質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.,) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッキング操作を行った。T-TBS で 5 回洗浄し、T-TBS により 1/2000 に希釈した一次抗体: Mouse anti claudin-4

(ZYMED) と 2 時間反応させた。T-TBS で 5 回 洗 浄 し、T-TBS により 1/3000 に希釈した二次抗体: Goat anti-Mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland) と 1 時間反応させ た。次に T-TBS で 5 回 洗 浄 した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて発光させ、Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA)により claudin-1 蛋白質の検出を行った。

B-2.OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A による免疫誘導

OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A の免疫と各種サンプルの回収

週 1 回、計 3 回、BALB/c マウスに経鼻投与を行った。Ovalbumin (OVA, Sigma Aldrich Co.) 単独投与群、OVA-C-CPE 303 または OVA-C-CPE 194 投与群の 3 群とした(n=5)。すべての群において一匹、一回あたりの投与量は OVA として 5 µg とし投与量が 10~15 µl となるように PBS に溶解した。最終投与より一週間後、マウスより血清サンプルを回収した。

OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A タンパク質による抗体価の測定

抗体価の測定に用いる各種サンプルは以下の方法で回収した。

・血清サンプル (serum sample)

マウスから眼底採血により血液を回収し、3000 × g , 10 分にて遠心分離を行った。上清を PBS にて 10 倍に希釈し、-20°C で保存した。

・鼻腔洗浄液 (nasal wash)

頸椎脱臼して安楽死処分したマウスに対し、気道より鼻腔にむけて 200 µl の PBS を流し込み、その洗浄液を回収し、-20°C で保存した。

・膣洗浄液 (virginal wash)

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

・糞便抽出液 (fecal extract)

マウスの糞便を回収し、糞便 10 mg につき 100 µl の割合で PBS を加え、4°C、10 分にてボルテックスを行った。次に 3000 × g , 10 分にて遠心分離を行い、上清を回収し、-20°C で保存した。

前日に OVA が 10 µg/ml となるように炭酸緩衝液 (pH 9.6, Na₂CO₃ 0.19 M, NaHCO₃ 1.67 M) に溶解し、96 穴 NUNC Immuno plate に 100 µl/well で分注し、4°C で保存した。翌日、T-TBS にてプレートを 3 回 wash し、4%ブロッカーを 200 µl/well で添加した。室温にて 2 時間インキュベートした後、T-TBS で 5 回 wash した。T-TBS (Tween 20-TBS) にて 10 倍希釈したブロッカー (sample diluent) を用いて検体を 1/10~1/1000000 希釈 (血清)し、50 µl/well にて添加した。室温にて 2 時間インキュベートした後、T-TBS で 5 回 wash した。sample diluent にて HRP detection antibody (IgG, IgG1 , IgG2a, IgA) (BETHYL Laboratories, Inc.) を 1/10000 に希釈し、100 µl/well にてプレートに添加した。室温で 1 時間インキュベートした後、T-TBS にて 5 回 wash した。TMB solution を 100 µl/well 添加し、20 分インキュベート後、2 M の硫酸を 100 µl/well 加え、吸光度を測定した (450 nm , ref 595 nm)。

B-3.OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A による免疫特性

OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A の免疫と各種サンプルの回収

抗体価の測定に用いる各種サンプルは以下の方法で回収した。

・血清サンプル (serum sample)

マウスから眼底採血により血液を回収し、3000 × g , 10 分にて遠心分離を行った。上清を PBS にて 10 倍に希釈し、-20°C で保存した。

OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A タンパク質による抗体価の測定

前日に OVA が 10 µg/ml となるように炭酸緩衝液 (pH 9.6, Na₂CO₃ 0.19 M, NaHCO₃ 1.67 M) に溶

解し、96 穴 NUNC Immuno plate に 100 μ l/well で分注し、4°Cで保存した。翌日、T-TBS にてプレートを 3 回 wash し、4%ブロッカーを 200 μ l/well で添加した。室温にて 2 時間インキュベートした後、T-TBS で 5 回 wash した。T-TBS(Tween 20-TBS) にて 10 倍希釈したブロッカー (sample diluent) を用いて検体を 1/10¹~1/1000000 希釈(血清)し、50 μ l/well にて添加した。室温にて 2 時間インキュベートした後、T-TBS で 5 回 wash した。sample diluent にて HRP detection antibody (IgG, IgG1, IgG2a, IgA) (BETHYL Laboratories, Inc.) を 1/10000 に希釈し、100 μ l/well にてプレートに添加した。室温で 1 時間インキュベートした後、T-TBS にて 5 回 wash した。TMB solution を 100 μ l/well 添加し、20 分インキュベート後、2 M の硫酸を 100 μ l/well 加え、吸光度を測定した (450 nm, ref 595 nm)。

OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A タンパク質による各種サイトカインの測定

週 1 回、計 3 回、BALB/c マウスに経鼻投与を行った。最終投与より 1 週間後に、BALB/c マウスを安楽死させ、消毒用アルコールで消毒し、無菌的に脾臓を回収した。5 ml の注射筒を用いて、70 μ m のセルストレイナー (FALCON) 上で脾臓をホモジナイズし、50 ml チューブに回収した。2,000 rpm で 5 分間遠心し、ペレットに氷冷した ACT 溶液 (15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 1 mM EDTA) を加えよく懸濁し、氷中で 5 分間インキュベートした。その後、さらに 10% FBS を含む RPMI1640 (NISSUI) 5 ml を添加し、セルストレイナーを通して別の 50 ml チューブに移した。2,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去後、10% FBS を含む RPMI1640 で再懸濁した。懸濁した脾臓細胞を 96-well plate (FALCON) に 1 \times 10⁶ cells/well で播種し、1 mg/ml OVA 溶液存在下もしくは非存在下、37 °C で 24 時間培養し、培養上清を回収し、-80 °C で保存した。

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

B-3.OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A によるワクチン活性

OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A の免疫

6 週齢の雌性 C57BL/6 マウスに週 1 回、計 3 回、OVA、OVA-C-CPE 194、もしくは OVA-C-CPE 303 を経鼻投与した。なお、マウス 1 匹、1 回当たりの投与量は OVA として 5 μ g とし、投与量が 10-15 μ l となるように PBS に溶解した。最終投与より 1 週間後に、背中に E.G7-OVA 細胞 (1 \times 10⁶ cells/mouse) を皮下移植した。その後、3 日毎に腫瘍径を測定し、腫瘍の大きさを算出した。なお、腫瘍の大きさは長径 \times 短径 \times 短径 / 2 により算出した。

B-4. V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A の作製

V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A 発現 plasmid の作製

2 つの相補的なオリゴ (Fuka-11:5'-togaaggtagccgggactagtagtaattaagt-3', Fuka-12:5'-togaacttaattaactagtagccgggtacct-3') をハイブリダイズさせて作製した、マルチクローニングサイトと両端に Xho I binding サイトを持つ pET16b-MCS を作製した。

C-CPE 194 N309A/S313A の遺伝子を特異的なプライマー(suzu-52: 5'-ttaattaagtgaggcggttcaggcggagtggtctctggcggtatagaaaaagaaatc-3', suzu-53: 5'-agatctttaaaattttgaaataatattgcataagggtatgctcc-3')を用いて増幅させ、PCR 産物を Bgl II および Pac I (New England Biolabs., Inc)にて 37°C、20 時間処理し、同様に Bgl II および Pac I にて 37°C、120 分間処理した、pET16b-MCS に T4 DNA ligase (New England Biolabs., Inc) を用いて 16°Cにて一晩ライゲーション反応を行った。

また、相補的なオリゴをハイブリダイズさせて作製した、V3 を Bgl II および Pac I (New England Biolabs., Inc)にて 37°C、20 時間処理し、同様に Bgl II および Pac I にて 37°C、120 分間処理した、pET16b-MCS- C-CPE 194 N309A/S313A に T4 DNA ligase (New England Biolabs., Inc) を用いて 16°Cにて一晩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フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿した後、ライゲーション産物と大腸菌 DH5 α (TOYOBO, Co., Ltd, Japan) を氷上で 15 分なじませた後、42°C で 40 秒 heat shock を行い、氷上で 3 分間静置した。その後 SOC 培地を添加し 37°C にて 50 分培養した後、100 μ g/ml ampicilin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した LB 培地 (LA 培地) プレートに播種し一晩培養した。LA 培地 を 3 ml 分注した Sterile Culture Tubes (IWAKIGLASS, Co., Ltd) に 1 コロニーずつピックアップし、一晩振盪培養した後、遠心分離し大腸菌を回収した。QIA prep Spin Miniprep kit (50) (QIAGEN Science, USA) にて大腸菌より plasmid を精製した。得られた plasmid をシークエンス解析し、目的の遺伝子配列と一致したものを得た。

V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A タンパク質の作製確認

V3-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 μ l を BL21(DE3)(Novagen, Co., Ltd) 10 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い 3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え 37°C で 1 時間培養し、LA プレートに播種し一晩培養した。LA 培地 3 ml を分注した Sterile Culture Tubes に 1 コロニーをピックアップし、37°C で一晩振盪培養し翌日 LA 培地を 2 ml ずつ分注した Sterile Culture Tubes を 4 本用意し、大腸菌培養液を 200 μ l ずつ加え、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、isopropyl- β -D (-) thiogalactopyranoside (IPTG, WaKo Pure Chemicals Ind., Japan) を終濃度 0、0.25、0.5、1.0 mM となるように添加し、37°C で 3 時間振とう培養した。遠心分離により大腸菌を回収後、200 μ l の 1 \times SDS (62.5 mM Tris-HCl, 5% 2-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) に懸濁し、氷冷しながら超音波処理 20 秒 \times 3 回行い大腸菌を破碎した。4°C, 14000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収して 99°C で 5 分間加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて 30 mA で電

気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB (Bio-Rad laboratories, Inc., USA) で 1 時間染色し MilliQ で脱色した後、19.2 kDa 付近の V3-C-CPE 194 N309A/S313A が多く産生されている IPTG 濃度を最適なものとした。

V3-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 μ l を BL21(DE3)(Novagen, Co., Ltd) 10 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い 3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え 37°C で 1 時間培養し、LA プレートに播種し一晩培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 50 ml に移し、37°C で一晩培養した (少量培養)。翌日 TA (TERRIFIC BROTH/amp, Invitrogen, Co., Ltd) 培地 500 ml に大腸菌培養液全てを移し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、決定した発現誘導条件に従い IPTG を添加し 37°C で 3 時間振とう培養した (大量培養) 後、10,000 rpm で 1 分間遠心分離し大腸菌を回収した。

500 ml の大腸菌培養液のうち 100 ml を可溶化条件の検討に用い、400 ml は精製条件の検討に用いた。100 ml culture の大腸菌を buffer A (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 400 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride, 1 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol) 1 ml に懸濁し、氷冷しながら超音波処理 40 秒を 3 回行い大腸菌を破碎した。4°C, 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し上清を回収後、沈殿に 2% TrironX-100 含有 buffer A を 1 ml 加え超音波処理を行った。遠心分離後沈殿に 8 M Urea 含有 buffer A を 1 ml 加え超音波処理をした。遠心分離後上清を回収し、沈殿に buffer A を 1 ml 加え超音波処理を行い懸濁させた。それぞれの溶液画分 20 μ l に 4 \times SDS を 6.7 μ l 加え、99°C で加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行い CBB 染色した後、V3-C-CPE 194 N309A/S313A が可溶化した画分の buffer を可溶 buffer とした。

V3-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 μ l を BL21 10 μ l に加え、氷上で 15 分間なじませ、45 秒間 heat shock を行い 15 分間氷上で静置したのち、SOC 培地 100 μ l を加え 37°C で 45 分間培

養し、LA プレートに播種し一晩培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 100 ml に移し、37°C で一晩培養した。翌日 TA 培地 1 リットルに大腸菌培養液すべてを移し、37°C で 2 時間振とう培養した後、最適濃度の IPTG を添加し 37°C で 3 時間振とう培養した。その後 10,000 rpm で 1 分間遠心分離して大腸菌を回収し、-20°C で凍結保存した。

大腸菌を氷上で溶解した後、可溶化条件の検討結果に従い、buffer A を用いて V3-C-CPE 194 N309A/S313A の可溶化を行った。buffer A を 1 ml/100 ml culture の割合で添加し、40 秒間の超音波処理を 3 回行った後、14000 rpm , 15 分にて遠心分離を行い、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA , MilliQ , NiSO₄ , buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Chelating HP (GE Healthcare) にサンプルを流し、V3-C-CPE 194 N309A/S313A を吸着させた。100 μm の imidazol 溶液 10 ml で洗浄した後、400 μM の imidazol 溶液 10 ml で V3-C-CPE 194 N309A/S313A を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。

V3-C-CPE 194 N309A/S313A が溶解している buffer を PBS (-) (137 mM NaCl , 2.68 mM KCl , 8.14 mM Na₂HPO₄ , 1.15 mM KH₂PO₄) に置換するため PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いた。あらかじめ PD-10 column に PBS を 30 ml 流して平衡化しておき、HiTrap™ Chelating HP で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500 μl ずつ流して PD-10 column から溶出液を分取した。次にウシ血清アルブミン (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を標準液として BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用い、560 nm における吸光度を測定し、V3-C-CPE 194 N309A/S313A タンパク質の濃度を算出した。

V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A タンパク質の発現確認

上記の操作により得た、PBS に溶解した V3-C-CPE 194 N309A/S313A 蛋白質を 100 μg/ml にて調整した。その溶液 20 μl に 4×SDS を 6.7 μl を加え、99 °C で 5 分間加熱しサンプルとした。サン

プルは 20 μl (タンパク質量として 1 μg) アプライした。一方分子量マーカーとして Broad Range (BIO-RAD Laboratories, Inc., USA) を用いた。12 % polyacrylamide gel を用いて 20 mA で電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB で 1 時間染色し MilliQ で脱色した後、19.2 kDa 付近に存在する V3-C-CPE 194 N309A/S313A 蛋白質を確認した。

V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A の CL4 結合性

96 穴 ELISA plate (Greiner Bio-One GmbH, Germany) に BV-mClaudin-4 (ネガティブコントロールとして wild BV および BV-mClaudin-1) を 0.5 μg/well の条件で、4°C で一晩インキュベーションすることで固相化した。翌日、PBS(-) で 3 回洗浄後、1.6 % ブロックエース (DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で室温、2 時間ブロッキングし、PBS(-) で 3 回洗浄した。続いて、C-CPE タンパク質量として 0.02 μg/well の条件で各種タンパク質を添加し、室温で 2 時間インキュベーションした。インキュベーション後、0.05% tween-PBS(-) (T-PBS) で 3 回洗浄後、1.6% ブロックエースで 3,000 倍に希釈した Mouse anti His-tag Ab (Zymed Laboratories Inc., Co, USA) を加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、T-PBS で 3 回洗浄後、0.4% ブロックエースで 2,000 倍に希釈した Goat anti-Mouse IgG HRP conjugated を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応後、T-PBS で 5 回洗浄後、TMB solution (Thermo Scientific, Rockford, IL) を加えた。20 分インキュベート後、2 M の硫酸を 100 μl/well 加え、吸光度を測定した。(450 nm , ref 595 nm)

C. 研究結果

C-1. CL-BV の作製

CL4 の遺伝子を T-Easy vector に挿入した pGTCL-4 を鋳型とし、制限酵素サイト (*Xba* I/*Kpn* I) を付加したプライマーを用いて DNA 鎖を増幅した。増幅した配列を pFastBac に組み込んだ後、DH5α にトランスフォーメーションした。シーケンス確認後、CL4 の遺伝子配列と一致したものを pFastBac-CL4 とし、これを DH10Bac と相同組換えさせ bacmid をえ

た。

培養用 6 ウェルプレートに Sf9 細胞を播種し、cellfectin を用いて CL4-Bacmid をトランスフェクションした。培養後の上清を Sf9 細胞に感染させて高力価の BV を生成する過程を繰り返し、TBS 溶液に懸濁させた CL4-BV を得た。

WT-BV と CL4-BV を供した Western Blot による CL4 の発現解析を行った結果、目的の位置 (23 kDa) にバンドが確認された。なお、コントロールとして CL4 発現 L (CL4/L) 細胞を用いた。

C-2. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A の免疫誘導

OVA-C-CPE194 N309A/S313A をマウスに経鼻投与し、各種サンプルを回収し、OVA 特異的抗体価を ELISA 法により検証した。その結果、OVA-C-CPE194 投与群に比して OVA-C-CPE194 N309A/S313A 投与群では抗 OVA 特異的 serum IgG および抗 OVA 特異的 nasal IgA の有意な上昇が認められた。さらに遠隔粘膜面である膈および腸管粘膜においても抗 OVA 特異的 IgA の産生が確認された(Fig. 1, 2, 3 and 4)。

C-3. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A の免疫特性

OVA-C-CPE194 N309A/S313A をマウスに経鼻投与し、血清サンプルを回収し、OVA 特異的 IgG サブクラスの抗体価を ELISA 法により検証した。その結果、OVA-C-CPE194 投与群に比して OVA-C-CPE194 N309A/S313A 投与群では IgG1 および IgG2a の有意な上昇が観察されたことから、細胞性および液性免疫双方の活性誘導が可能であることが示唆された(Fig. 5)。

また、脾臓細胞より分泌される Th1 系サイトカイン:IFN- γ および Th2 系サイトカイン:IL-13 の産生を確認した結果、OVA-C-CPE194 N309A/S313A による IFN- γ および IL-13 の誘導が認められた(Fig. 6)。これらのことから、OVA-C-CPE194 N309A/S313A は細胞性免疫および液性免疫の双方を活性可能であることが示された。

C-4. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A のワクチン活性

OVA 発現がん細胞 E.G.7-OVA をマウスに移植した担癌モデルマウスを用いて、OVA-C-CPE194 N309A/S313A による腫瘍増殖抑制効果を検証した結果、OVA-C-CPE194 N309A/S313A 投与群は OVA-C-CPE194 投与群に比して有意な抗腫瘍効果を発揮したことから、OVA-C-CPE194 N309A/S313A はワクチン活性に優れていることが示唆される(Fig. 7)。

C-5. V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A

HIV に対するワクチン効果を検証するに当たり、HIV 関連抗原である V3 と C-CPE194 N309A/S313A との融合タンパク質を作製した。まず、pET16b-MCS-C-CPE194 N309A/S313A plasmid に V3 遺伝子を導入し、pET16b-V3-C-CPE194 N309A/S313A plasmid を作製した(Fig. 8A)。作製した plasmid を BL21 にトランスフォーメーションし、IPTG および可溶バッファの検討を行った。決定した IPTG および可溶バッファを用い、AKTA によりタンパク質の精製を行った。作製したタンパク質を CBB 染色より発現を確認した(Fig. 8B)。予想される V3-C-CPE194 N309A/S313A タンパク質の分子量付近にバンドが認められたことから、V3-C-CPE194 N309A/S313A のタンパクが精製できていることを確認できた。

続いて作製した V3-C-CPE194 N309A/S313A タンパク質の CL 結合性を mCL 発現 BV を用いた ELISA 法により確認した。WT、mCL1 および mCL4-BV をイムノチューブに固相化して、V3-C-CPE194 N309A/S313A を添加し、HRP 標識抗体を用いて結合性を検証した。結果、V3-C-CPE194 N309A/S313A は V3 を付加した場合でも mCL4 に対して特異性を示し、結合性に変化は認められなかった(Fig. 9)。

D. 考察

本研究では CL4 を標的とした経口ワクチン開発

の課題である粘膜免疫組織への抗原送達に関して C-CPE に比して CL4 結合性に優れる C-CPE 194N309A/S313A を用いて検証を行った。まず、モデル抗原として OVA と C-CPE 194N309A/S313A の融合タンパクを作製し、CL4 結合性を検証した結果、従来の OVA-C-CPE と比べて OVA-C-CPE 194N309A/S313A では CL4 結合性に優れたものであった。本タンパクをマウスに経鼻投与した結果、OVA-C-CPE 194N309A/S313A は OVA-C-CPE に比して有意な全身免疫および粘膜免疫の誘導活性が認められた。また、細胞性免疫および液性免疫に関しても各種サイトカイン、IgG サブクラスの上昇が観察された。さらに、OVA-C-CPE 194N309A/S313A によるワクチン効果を担癌モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の観点から評価したところ、OVA-C-CPE 194 投与群に比して OVA-C-CPE 194N309A/S313A 投与群では有意な腫瘍増殖抑制効果が観察された。これらの成果からも C-CPE 194N309A/S313A は C-CPE に比して粘膜免疫組織への抗原送達を効率よく行えるものと考えられる。しかしながら、これらの結果は OVA 量 0.5 μ g または 0.1 μ g 投与のみで OVA-C-CPE 194N309A/S313A による有意な免疫誘導が観察され、OVA 量 5 μ g では観察されなかった。これは、鼻腔粘膜に発現している CL4 に対して CL4 binder が飽和状態になっていることにより抗体価の上昇などが観察されなかったものと推察される。しかしながら、鼻腔粘膜に比して腸管粘膜はその表面積が広く CL4 も多く発現しているものと考えられる。

また、OVA はインフルエンザや HIV 関連抗原に比して抗原性が高いことから、HIV 関連抗原である V3 を用いたワクチン効果を検証することにした。OVA を用いた検証と同様に V3 と C-CPE 194N309A/S313A との融合タンパク質を作製した。本タンパク質の mCL 結合性を検証した結果、V3-C-CPE 194N309A/S313A は mCL4 に対する結合性を有していた。今後は本タンパク質などを用いて感染症に対するワクチン効果を検証する。

E. 結論

本研究では CL4 を標的とした経口ワクチン開発を目的として行い、開発問題点としては、①粘膜免疫組織への効率の良い抗原送達法、②抗原の消化酵素回避が挙げられる。

このうち本年度では粘膜免疫組織への効率の良い抗原送達に焦点を絞り検証を行い、以下のような成果を挙げた。

①C-CPE 194N309A/S313A を用いた免疫誘導活性
C-CPE 194N309A/S313A による免疫誘導活性を検証するに当たり、モデル抗原 OVA との融合タンパク質を作製し、マウスに経鼻投与することにより検証を行った。その結果、OVA-C-CPE 194N309A/S313A 投与群は C-CPE 194 投与群に比して有意な免疫誘導能を発揮した。

②C-CPE 194N309A/S313A によるワクチン効果
C-CPE 194N309A/S313A によるワクチン効果を検証するに当たり、OVA 発現がん細胞を移植した担癌モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の観点から評価した。その結果、OVA-C-CPE 194N309A/S313A 投与群では OVA-C-CPE 194 投与群に比して有意な腫瘍増殖効果が観察された。

③C-CPE 194N309A/S313A を用いた感染症関連抗原に対するワクチン

CL4 を標的とした感染症に対するワクチン効果を検証するに当たり HIV 関連抗原である V3 と C-CPE 194N309A/S313A との融合タンパク質を作製した。本融合タンパク質の mCL 結合性を検証した結果、mCL4 に対する指向性を有していた。

上記の結果を踏まえ、今年度は C-CPE 194N309A/S313A を抗原封入した消化酵素耐性であるリポソームへ修飾し、粘膜免疫組織への抗原送達および感染症関連抗原に対するワクチン効果に焦点を当てて検証を行う予定である。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi A, Kondoh M, Suzuki H, Watari A, Yagi K. Pathological changes in tight junctions and potential applications into therapies. *Drug Discov Today*. 2012.
2. Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, Yamamura S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y.: Bubble Liposomes and Ultrasound Promoted Endosomal Escape of TAT-PEG Liposomes as Gene Delivery Carriers. *Mol Pharm.*, 8: 2416-2423 (2011)
3. Un K, Kawakami S, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M.: Involvement of activated transcriptional process in efficient gene transfection using unmodified and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure. *J Control Release* 156: 355-363 (2011)
4. Shiraishi K, Endoh R, Furuhashi H, Nishihara M, Suzuki R, Maruyama K, Oda Y, Jo J, Tabata Y, Yamamoto J, Yokoyama M.: A facile preparation method of a PFC-containing nano-sized emulsion for theranostics of solid tumors. *Int J Pharm*, 421: 379-387 (2011)
5. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Suppression of Melanoma Growth and Metastasis by DNA Vaccination Using an Ultrasound-Responsive and Mannose-Modified Gene Carrier. *Mol Pharm.* 8: 543-554 (2011)
6. Negishi Y, Matsuo K, Endo-Takahashi Y, Suzuki K, Matsuki Y, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y. Delivery of an Angiogenic Gene into Ischemic Muscle by Novel Bubble Liposomes Followed by Ultrasound Exposure. *Pharm Res.* 28: 712-719 (2011)
7. Hagsawa K, Nishioka T, Suzuki R, Takizawa T, Maruyama K, Takase B, Ishihara M, Kurita A,

Yoshimoto N, Ohsuzu F, Kikuchi M. Enhancement of ultrasonic thrombus imaging using novel liposomal bubbles targeting activated platelet glycoprotein IIb/IIIa complex—in vitro and in vivo study. *Int J Cardiol.*, 152: 202-206 (2011)

2. 学会発表

1. Yohei Kakamu, Kyohei Matsushita, Yumiko Saito, Azusa Takahashi, Koji Matsuhisa, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Biochemical analysis of a novel dual claudin binder. *Experimental Biology* 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA
2. Kiyohito Yagi, Seiji Yamane, Hidehiko Suzuki, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Development of novel claudin-4 binder and its application in mucosal vaccine. *Experimental Biology* 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA
3. Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Fukasaka, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Targeting to claudin-4 is a novel strategy for the development of mucosal vaccine. *The 7th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientist* 6, Jun 2-4, 2011, Seoul National University, Korea
4. Azusa Takahashi, Yumiko Saito, Koji Matsuhisa, Yohei Kakamu, Miki Kodaka, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Preparation of a dual claudin binder using a fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Experimental Biology* 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA
5. Koji Matsuhisa, Azusa Takahashi, Yohei Kakamu, Miki Kodaka, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a novel claudin binder using baculoviral display for its application in mucosal absorption of drugs. *38th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society*, July 30-Aug 3, 2011, National Harbor, MA, USA.

6. Seiji Yamane, Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A novel strategy for mucosal vaccination using a claudin binder. 38th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 30–Aug 3, 2011, National Harbor, MA, USA.
 7. Hidehiko Suzuki, Seiji Yamane, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Kiyohito Yagi, Preparation of claudin-4 binder using C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin and its application to mucosal vaccination. 51st annual meeting of the American society for cell biology, Dec 3–7, 2011, Denver, CO, USA.
 8. 松久幸司、高橋梓、角谷秀樹、佐伯理恵、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、*Clostridium perfringens* enterotoxin を利用したドラッグデリバリーシステムの開発、第 58 回トキシシンポジウム、平成 23 年 7 月 6–7 日、東京
 9. 高橋梓、松下恭平、斉藤郁美子、嵩原綱吉、各務洋平、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、*Clostridium perfringens* enterotoxin 変異体 m19 の claudin 結合性解析、第 58 回トキシシンポジウム、平成 23 年 7 月 6–7 日、東京
 10. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Risa Koshima, Keiichi Hirata, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, The Combination Therapy of Therapeutic Ultrasound and Dendritic Cell-Based Immunotherapy, WFUMB2011、オーストリア、2011 年 8 月 26–30 日
 11. 鈴木 亮、丸山一雄、超音波造影・治療技術の新展開、日本バイオイメージング学会、北海道、2011 年 9 月 1–2 日
 12. 佐藤紗也佳、真柴拓哉、本田亜紀、Citterio Daniel、小田雄介、鈴木 亮、丸山一雄、鈴木孝治、静岡 DDS カンファランス、静岡、2011 年 9 月 16 日
 13. Ryo Suzuki, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Induction of anti-tumor immunity in the combination of therapeutic ultrasound and dendritic cell-based immunotherapy、日本癌学会、名古屋、2011 年 10 月 3–5 日
 14. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Keiichi Hirata, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Development of an effective gene delivery system with sonoporation in cancer gene therapy、AAPS2011、米国、2011 年 10 月 22–27 日
 15. 鈴木 亮、小田雄介、平田圭一、野村鉄也、宇都口直樹、丸山一雄、リポソーム型微小気泡を利用した超音波がん温熱療法と樹状細胞免疫療法の併用によるがん治療効果の増強に関する研究、東京、2011 年 11 月 26 日
 16. 鈴木 亮、小田雄介、丸山一雄、バブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入特性の評価、マイクバブルと超音波の相互作用に関するシンポジウム、名古屋、2012 年 1 月 20 日
 17. 鈴木 亮、根岸洋一、必ずうまくいくソノポレーション法：実験の実際とコツ、第 4 回超音波分子診断治療研究会、福岡、2012 年 3 月 3 日、招待
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得
該当事項なし
 - 2 実用新案登録
該当事項なし
 3. その他
該当事項なし
- I. 研究協力者**
大阪大学大学院薬学研究科：
- ・吉田猛史(大学院生)
 - ・松久幸司(大学院生)
 - ・鈴木英彦(大学院生)

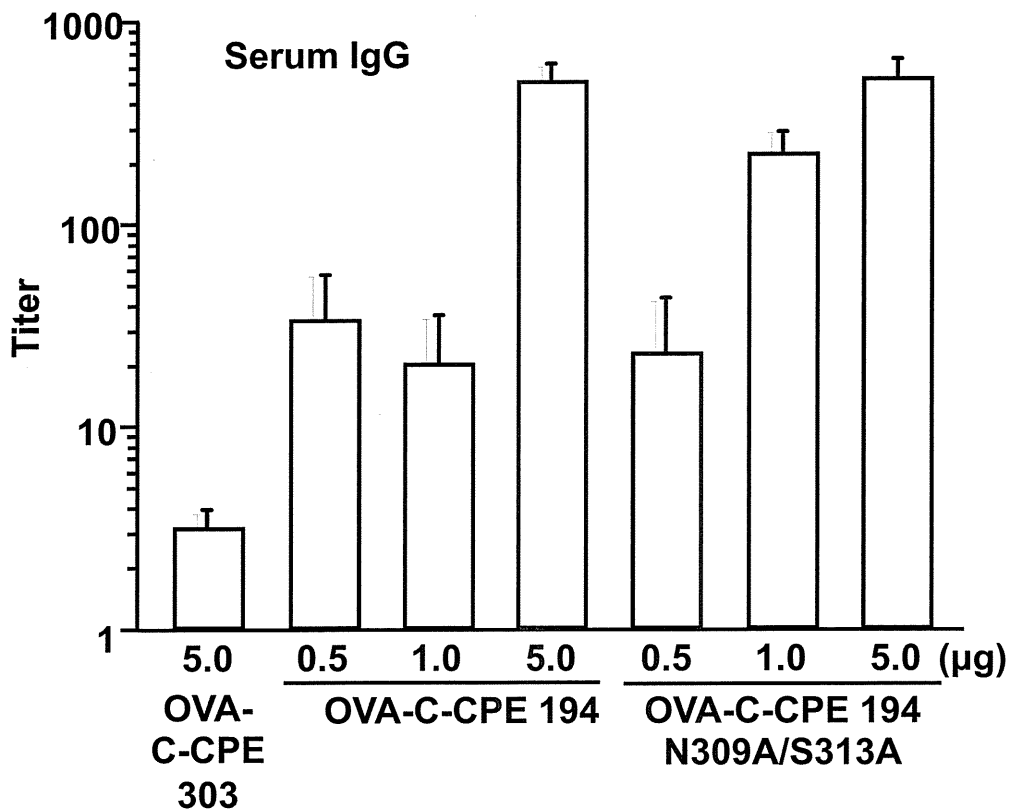


Fig.1 Production of OVA specific IgG in serum by OVA-C-CPE 194 N309A/S313A.

Mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE 194, or OVA-C-CPE 194 N309A/S313A (5, 1 or 0.5 mg of OVA) once a week for three weeks. Seven days after the last immunization, the levels of serum IgG were determined by ELISA. Data are means \pm SEM (n=3~5). The results are representative of three independent experiments.

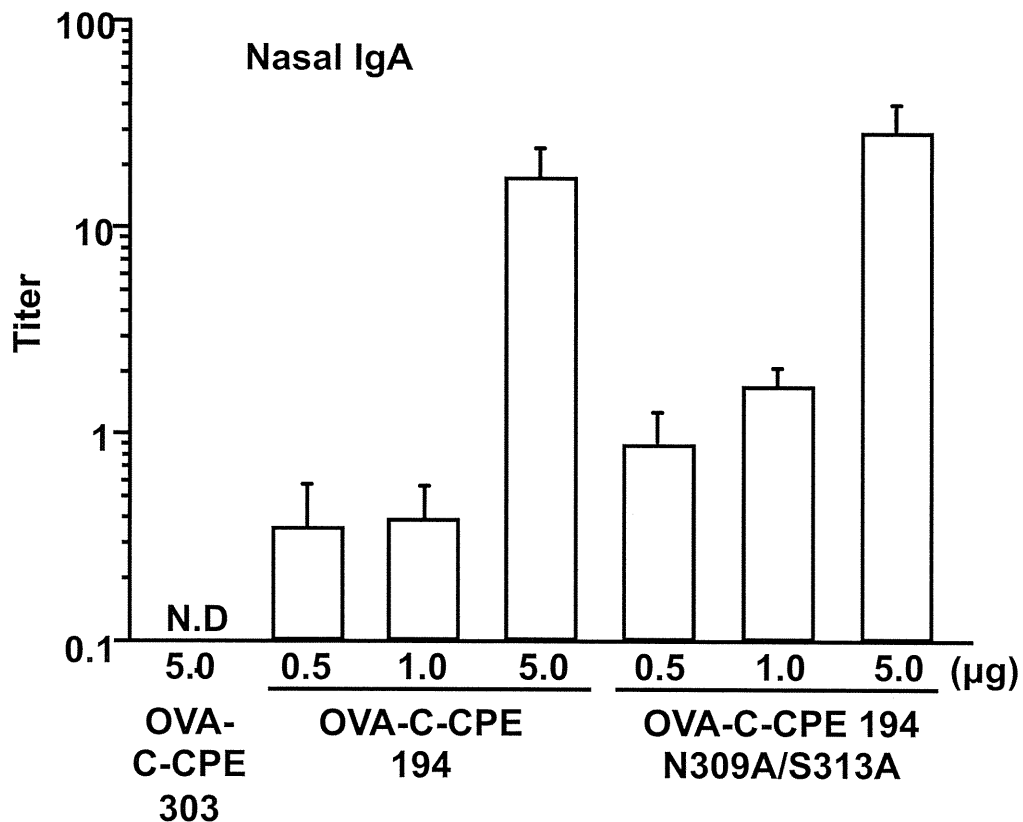


Fig.2 Production of OVA specific IgA in nasal by OVA-C-CPE 194 N309A/S313A.

Mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE 194, or OVA-C-CPE 194 N309A/S313A (5, 1 or 0.5 mg of OVA) once a week for three weeks. Seven days after the last immunization, the levels of nasal IgA were determined by ELISA. Data are means \pm SEM (n=3~5). The results are representative of three independent experiments. N.D., not detected.

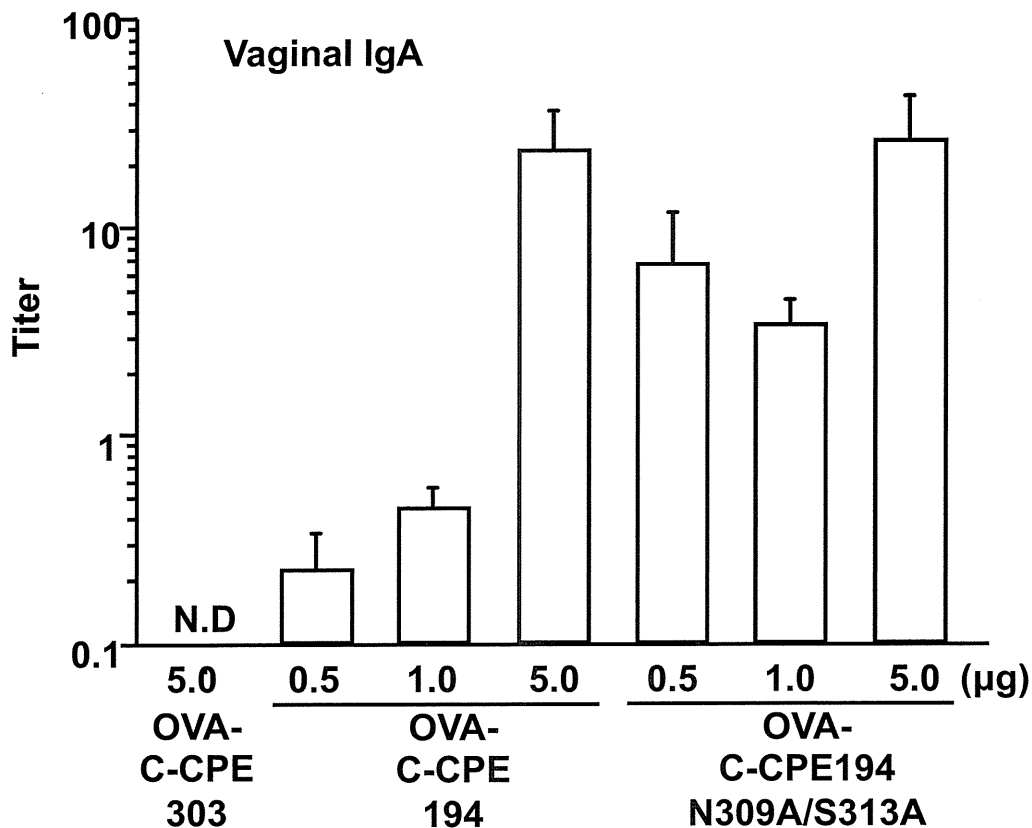


Fig.3 Production of OVA specific IgA in vagina by OVA-C-CPE 194 N309A/S313A.

Mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE 194, or OVA-C-CPE 194 N309A/S313A (5, 1 or 0.5 mg of OVA) once a week for three weeks. Seven days after the last immunization, the levels of vaginal IgA were determined by ELISA. Data are means \pm SEM (n=3~5). The results are representative of three independent experiments. N.D., not detected.

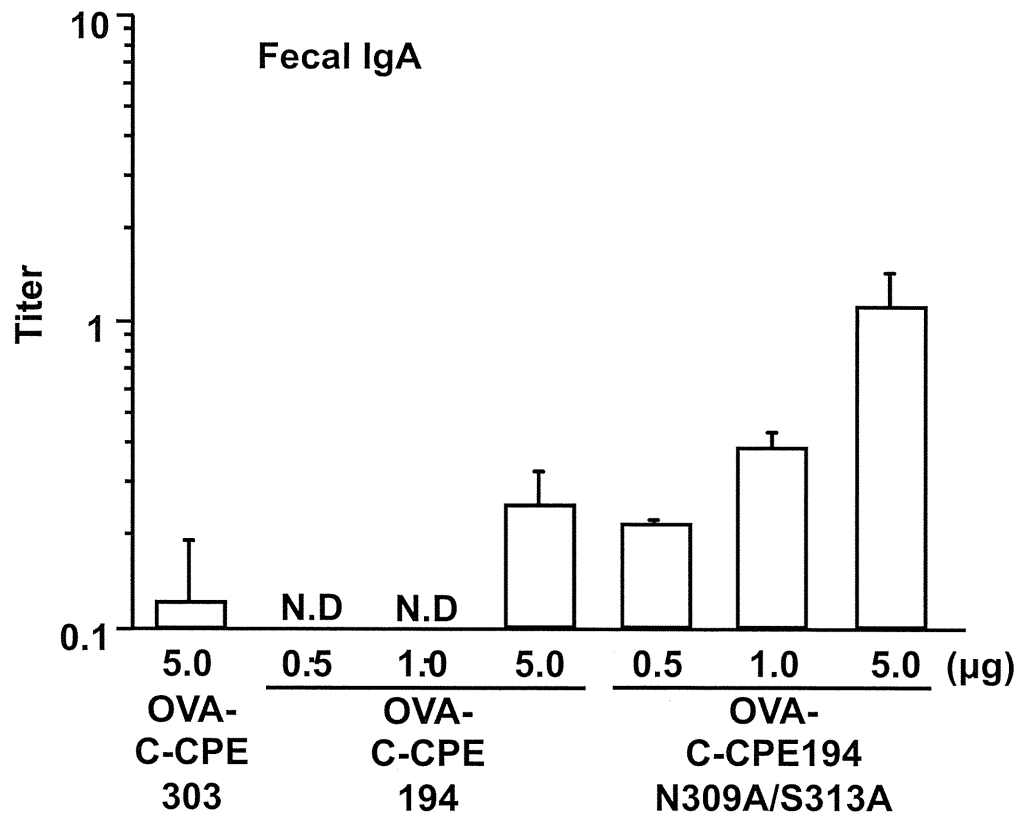


Fig.4 Production of OVA specific IgA in feces by OVA-C-CPE 194 N309A/S313A.

Mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE 194, or OVA-C-CPE 194 N309A/S313A (5, 1 or 0.5 mg of OVA) once a week for three weeks. Seven days after the last immunization, the levels of fecal IgA were determined by ELISA. Data are means \pm SEM (n=3~5). The results are representative of three independent experiments. N.D., not detected.

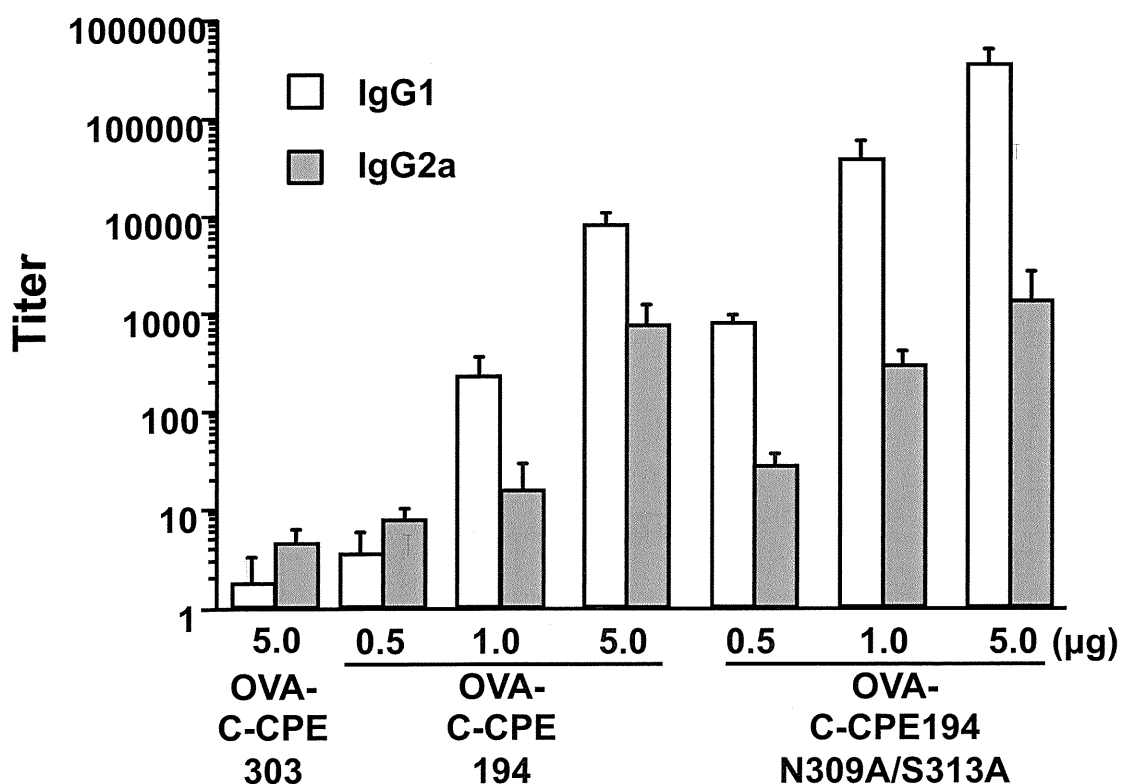


Fig.5 Serum IgG subclass induced by OVA-C-CPE 194 N309A/S313A.

Mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE 194 or OVA-C-CPE 194 N309A/S313A (5, 1 or 0.5 mg of OVA) once a week for three weeks. Seven days after the last immunization, serum were collected. Serum IgG subclass (IgG1 and 2a) was determined by ELISA. Data are means \pm SEM (n=3~5). The results are representative of three independent experiments.

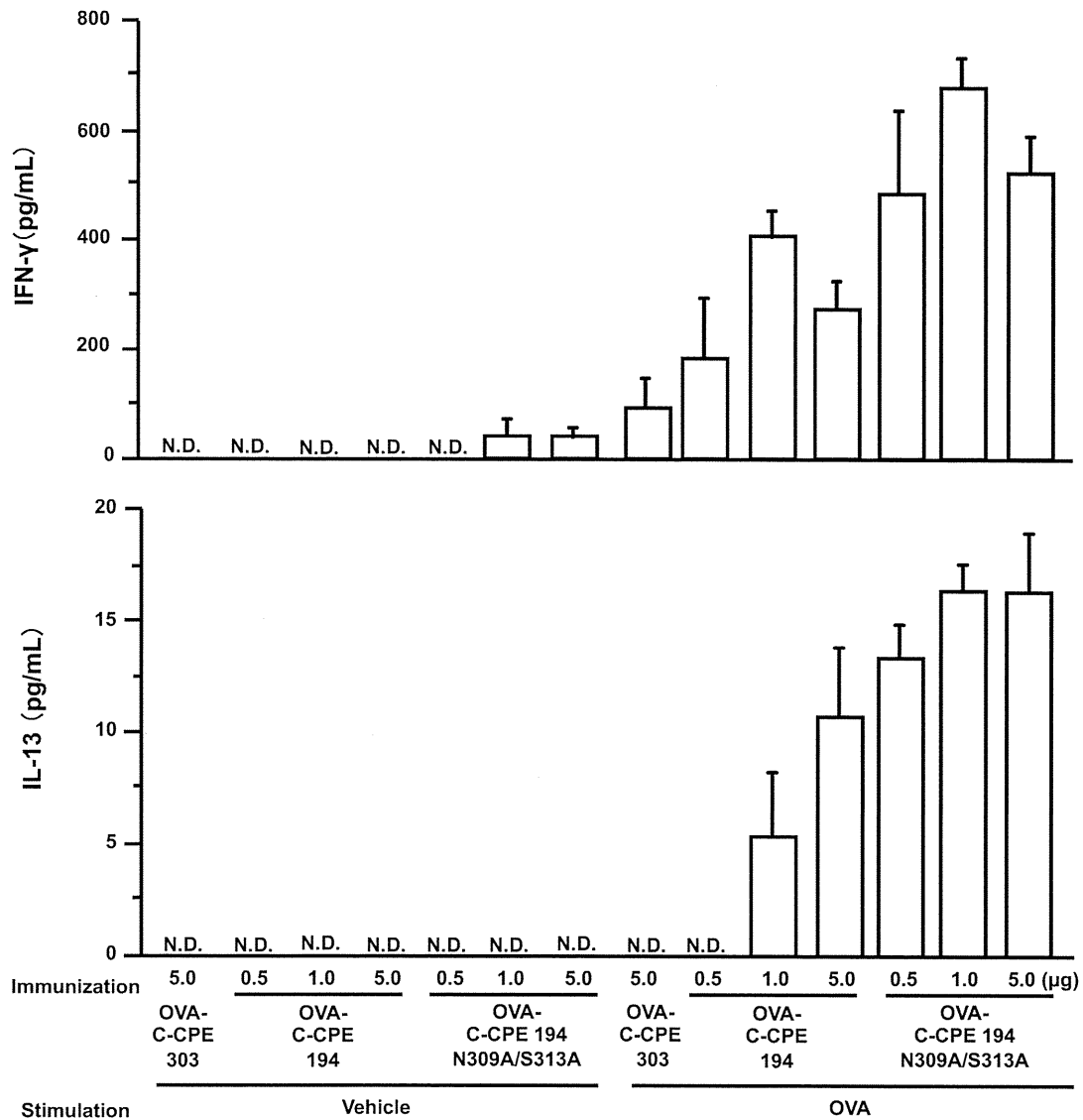


Fig.6 Th1 and Th2 responses induced by OVA-C-CPE 194 N309A/S313A.

Mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE 194 or OVA-C-CPE 194 N309A/S313A (5, 1 or 0.5 mg of OVA) once a week for three weeks. Seven days after the last immunization splenocytes were collected. The splenocytes isolated from the immunized BALB/c mice were stimulated with vehicle or OVA (1 mg/ml) for 24 hr, and the cytokine (IFN-γ and IL-13) in the conditioned medium were measured by ELISA. Data are means ± SEM (n=3~5). The results are representative of three independent experiments. N.D., not detected.