

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

「アジュバント安全性評価データベースの構築研究」

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石井 健

(独) 医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクトリーダー

平成25(2013)年 5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

#### アジュバント安全性評価データベースの構築研究

石井 健 ----- 1 - 1 1

### II. 分担研究報告

青枝 大貴 ----- 1 2 - 1 4

小檜山 康司 ----- 1 5 - 1 8

山田 弘 ----- 1 9 - 3 0

水口 賢司 ----- 3 1 - 3 9

清野 宏 ----- 4 0 - 4 6

中西 憲司 ----- 4 7 - 5 1

瀬谷 司 ----- 5 2 - 5 5

植松 智 ----- 5 6 - 5 7

浜口 功 ----- 5 8 - 6 0

保富 康宏 ----- 6 1 - 6 8

Daron M. Standley ----- 6 9 - 7 4

Cevayir Coban ----- 7 5 - 8 1

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 8 2 - 9 5

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 別紙

アジュバント安全性評価データベースの構築研究

研究代表者 石井健 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

**研究要旨**

本研究は、次世代の免疫医薬として期待されるアジュバントの開発研究（有効性）および審査行政（安全性）に寄与するバイオマーカー探索可能なデータベースを構築することを目的とする。

アジュバントの開発研究の歴史は古いものの実際のメカニズムは長らく不明であったが、2011年度のノーベル医学生理学賞が授与された自然免疫、樹状細胞の研究が起爆剤となり次世代アジュバント開発が世界中で激しい競争になっている。

しかし一方で、アジュバントはその起源や作用機序などが多岐にわたり、他の創薬に比べその有効性そして安全性の指標が未開拓という点が挙げられる。日本の産学官連携や支援、そして審査行政の立ち遅れもあり新たなアジュバントの評価方法、指標（バイオマーカー）の構築が切望されている。

上記を踏まえ、本研究では各種アジュバントによるヒト細胞やげっ歯類、霊長類個体の生物反応を総合的に解析したデータベースを構築する。

**A. 研究目的**

本研究は、次世代の免疫医薬として期待されるアジュバントの開発研究（有効性）および審査行政（安全性）に寄与するバイオマーカー探索可能なデータベースを構築することを目的とする（図1）。

アジュバントとは、ラテン語の“助ける”という意味をもつ“adjuvare”という言葉が語源に持ち、ワクチン抗原に対する免疫原性を増強する目的で使用される因子の総称である。アジュバントの開発研究の歴史は古いものの、抗原の徐放を担う程度と考えられ、‘Immunologist’s little dirty secret’ と揶揄されるほど実際のメカニズムは長らく不

明であった。しかし、近年の自然免疫研究や樹状細胞の発見により、ワクチンの効果には「アジュバント」が樹状細胞等の抗原提示細胞のTLRなどの自然免疫受容体を活性化することが必須であることが判明した。この成果に対し2011年度のノーベル医学生理学賞が授与されたことからその重要性和高いインパクトは明らかである。現在感染症、ガン、アレルギーワクチンへのTLRリガンドを中心とした次世代アジュバント開発が世界中で激しい競争になっており、世界のトップレベルをほこる日本の免疫学の成果が日本発のアジュバント開発研究に寄与することが期待されている。

しかし一方で、アジュバントの種類はその起源（天然、合成、内因性）、作用機序など多岐にわたり、他の創薬（低分子医薬、抗体医薬）に比べその開発は困難を極めている。その大きな理由のひとつとして、アジュバントの有効性そして安全性の指標が未開拓という点が挙げられる。グローバル化する研究開発に比べ、いくつかのアジュバントが認可されているものの、FDA や EMA、PMDA ではいまだガイドラインの有無からして温度差があり、国際的な協調、連携が望まれている。日本においても産学官連携や支援、そしてアジュバントに特化したレギュラトリーサイエンス、審査行政の立ち遅れもあり新たなアジュバントの評価方法、指標（バイオマーカー）の構築が切望されている。

上記を踏まえ、本研究では認可済みから開発中まで、多岐にわたるアジュバントによるヒト細胞、マウス個体の生物反応を総合的に解析したデータベースを構築する。このデータベースは1) 医薬基盤研究所で作成された世界最高レベルのトキシコゲノミクスデータベースを基盤とする点、2) 世界でも有数の遺伝子欠損マウスリソースや霊長類センターを基盤とし、世界トップレベルの研究者を擁したアジュバント研究チームを擁している点、3) 血清などに安定して含まれる核酸情報であるマイクロ RNA に特化したデータベース作製を予定しており、世界の他のワクチン関連のデータベースと一線を画し、独創的な点といえよう。

このような状況の中で、本研究はワクチン開発研究になくはならなくなってきた、アジュバントに関する基礎研究、開発、審査行政に寄与する網羅的なデータベースを提供する意欲的なものである。国内はもとより、グ

ローバルな視点でユニークかつトップレベルの仕事がされている分担研究者に参加をお願いしアジュバントの開発研究（有効性）および審査行政（安全性）に寄与するバイオマーカー探索可能なデータベースの構築を目指した。

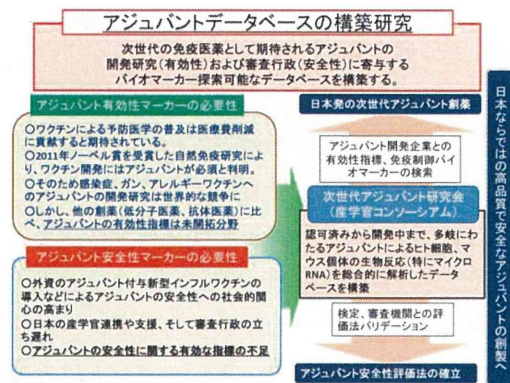


図1；アジュバントデータベース構築研究

## B. 研究方法

本提案はアジュバントやワクチンの安全性と有効性の判断における有用な指標（バイオマーカー、サロゲートマーカー）を同定、検証するために、人に対する臨床試験を行う前の研究段階で2つの実験系を用いて行い、臨床試験のデータからのサンプルでバリデーションをとる。各種アジュバントやアジュバントを含んだワクチンを用いてデータを蓄積し、公開することを目的とし、下記の研究方法を採った。

- 1) 認可もしくは開発中のアジュバントを20種類選択し、ヒトのリンパ球等各種免疫系細胞、マウス等のモデル動物を用いてアジュバント及びワクチンに対する初期反応（自然免疫反応を含む）の遺伝子解析をDNA マイクロアレイ、マイクロ RNA アレイを用いて行う。（石井、山田、水口、清野、中西、瀬谷、植

松、浜口、Coban)

これまでに研究開発された又は開発中のアジュバント、ワクチンのなかからワクチンメーカー等と調整を行って対象となるサンプルを選定して使用し、DNA マイクロアレイ法によりそれらの生物学的活性を、細胞や生体レベルでの宿主細胞反応としての遺伝子発現情報として解析し、蓄積する。

また、実際のヒトにおけるアジュバントワクチンの臨床試験（平成21年度に行われたアラムアジュバントを含有する全粒子H5N1プレパデミックワクチンの小児での臨床試験（BK-PIFA/KIB-PIAの健康小児を対象とした臨床試験：代表研究者 神谷齊）のサンプル（血清など）を用いてマイクロRNAの解析を行う。（石井、山田、水口、浜口、Standley）

次にこれらの網羅的解析で見つかった分子群、因子群に関して、アジュバント（ワクチン）の安全性もしくは有効性の指標になりうるかを、細胞レベル、動物実験レベル、そして臨床試験のレベルで検証実験を行う。特に評価法の開発につながるアジュバントのターゲット器官である粘膜におけるターゲット細胞の解析や、アジュバントのイメージングなどを行う（石井、清野、中西、瀬谷、植松、Coban）

2) また、動物モデルの実験系を用いてアジュバント（ワクチン）接種後の時空間的变化を病理学的、および分子生物学的な手法を用いて解析する。（石井、清野、保富）

アジュバントを接種し、アジュバントの組織への取り込み効率の検討、他の組織へのアジュバントの侵入経路、炎症性細胞の浸潤、多臓器への影響の検討を病理学的手法を用いて解析を行う。（石井、山田、水口、清野、保

富、Coban)

これら1)2)で得られた情報をデータベース化して順次公開するとともに、得られたデータを活用して、安全性・有効性のバイオマーカーの探索を行い、アジュバントの安全性予測システムを開発し、アジュバントの安全性評価試験法の開発・改良を行う。（石井、山田、水口、浜口、Standley）

加えて、これらの研究は研究機関だけで実施するのではなく、母体となるコンソーシアムである、次世代アジュバント研究会を開催し、日本ワクチン産業協会や日本製薬工業協会との連携のもと、ワクチンメーカーや製薬企業等ユーザーのニーズを汲み上げて、実際のワクチン開発の研究段階において使用できるようなデータを蓄積する。「次世代アジュバント研究会」を母体に産学官の共同研究を積極的に奨励し、上記データベースを用いた解析を行う。この研究会を母体に、データベースの国際化、各国のデータベースとの連携、WHO、ICHなどの機関との連携、他学会や一般向けのアウトリーチ活動を積極的に行う。（石井、山田、水口、清野、中西、植松、瀬谷、浜口、保富）

本計画の全体フロー図は以下（図2）のとおりである。

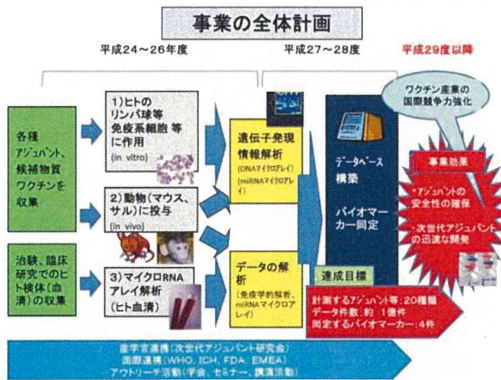


図 2 ; 事業の全体および年次計画

実際の解析と実施体制の模式図を示す。(図 3, 4)

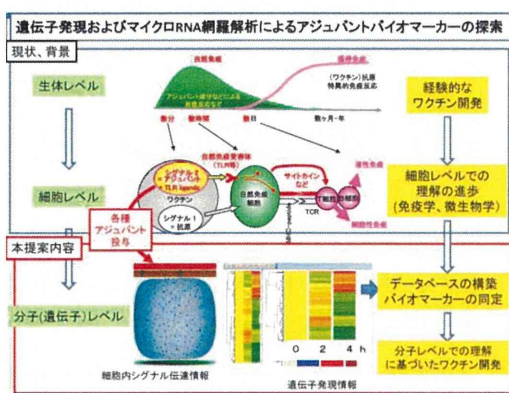


図 3 : アジュバントの有効性、安全性バイオマーカーの網羅的解析

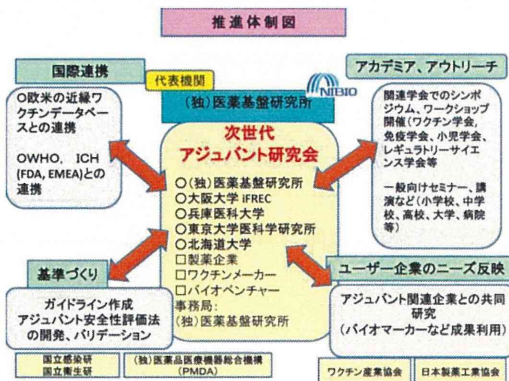


図 4 ; 実施体制図

(倫理面への配慮)

ヒト末梢血細胞は医薬基盤研究所の倫理審査委員会で承認を受けた。また実験動物は、医薬基盤研究所および国立感染症研究所動物実験委員会規定に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。

### C. 研究結果

1) 認可もしくは開発中のアジュバントを約 20 種類ほど選択し (Alum, AS1, AS02, AS03, AS04, AS15, MF59, IFA, CFA, CpG (2 種類), Imiquimod, PolyIC, inulin, hemozoin, その他数種類)、販売、製造する企業との秘密保持契約、MTA締結、共同研究契約等の調整を行った。ヒトのリンパ球等各種免疫系細胞、ラット、マウス等のモデル動物を用いてアジュバントに対する初期反応 (自然免疫反応を含む) の遺伝子解析を DNA マイクロアレイ、マイクロ RNA アレイを用いて網羅的に行う研究体制を確立した。(平成 24 年度 ; 石井、山田、清野、中西、瀬谷、植松、浜口、Coban)

2) 実際のヒトにおけるアジュバントワクチンの臨床試験 (最初の実施予定研究 ; 平成 21 年度に行われたアラムアジュバントを含有する全粒子 H5N1 プレパンドミックワクチンの小児での臨床試験 (BK-PIFA/KIB-PIA の健康小児を対象とした臨床試験 : 代表研究者 神谷 齊)) のサンプル (血清など) を用いてマイクロ RNA の解析を行った。(平成 24 年度 ; 石井、山田、水口、Standley)

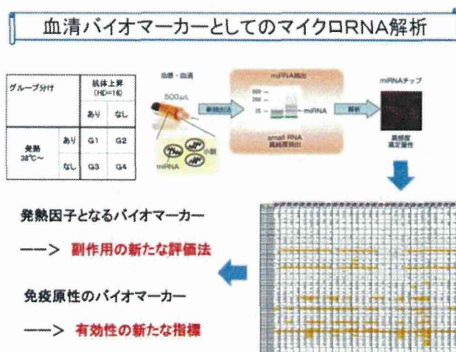


図5；血清バイオマーカーとしてのマイクロRNA解析

3) 上記の網羅的解析や機能解析で見つかった分子群、因子群に関して、アジュバント（ワクチン）の安全性もしくは有効性の指標になりうるかを、細胞レベル、動物実験レベル、そして臨床試験のレベルで検証実験を行った。特に評価法の開発につながるアジュバントのターゲット器官である粘膜におけるターゲット細胞の解析や、アジュバントのイメージングなどを行った。（平成24年度；石井、清野、中西、瀬谷、保富、植松、浜口、Coban）

4) また、サルなどの高等動物モデルの実験系を用いてアジュバント（ワクチン）接種後の有効性、安全性の解析を行い、ヒトやげっ歯類での実験結果のブリッジングを開始した。（平成24年度；石井、清野、保富）

特記事項として、研究代表者 石井健は、WHO、ICH主導でFDA、EMA、PMDA等世界各国の規制当局やGSK、サノフィ、ファイザーをはじめとした世界のワクチン企業が参加して作成を試みているアジュバントおよびアジュバント入りワクチンのガイ

ドライン作成のアドバイザーを務めた。（WHO Informal Consultation on Guidelines for Nonclinical Evaluation of Adjuvanted Vaccines, WHO head quarter office, Geneva, Switzerland 27-28 November 2012）

また、アウトリーチの一環として、一般公開、次世代アジュバント研究会、学会、シンポジウム等で本研究内容を含めたアジュバントの研究、開発、臨床試験、審査、臨床にわたる広い範囲の啓発活動を行った。

**「次世代アジュバント研究会」について**

■ 設立：平成22年10月  
 ■ 趣旨：アジュバント研究促進のための産学官共同研究のプラットフォーム組織

■ 研究会メンバー  
 ○ 山西 弘一（独）医薬基礎研究所 理事長兼研究所長：会長  
 ○ 藤井 幹男（大阪大学免疫学フロンティア研究センター 拠点長）  
 ○ 中西 重司（兵庫医科大学 学長）  
 ○ 清野 宏（東京大学医科学研究所 教授）  
 ○ 瀬谷 司（北海道大学大学院医学研究科 教授）  
 ○ 石井 健（独）医薬基礎研究所 アジュバント開発プロジェクトリーダー）

以上が研究会幹事...  
 (その他の研究会メンバー)  
 以下の企業の研究者  
 (製薬企業)  
 ○アステラス製薬㈱ ○大塚製薬㈱ ○塩野義製薬㈱  
 ○ゼリア新薬工業㈱ ○第一三共㈱ ○大日本住友製薬㈱  
 ○武田薬品工業㈱ ○田辺三菱製薬㈱ ○中外製薬㈱  
 ○MSD㈱ ○タカカネ・スズキケイ㈱ ○チノバイオ㈱  
 ○ハルシヤファーマ㈱ ○ファイザー㈱

(ワクチンメーカー)  
 ○(財)化学及血清療法研究所 ○(学)北里研究所 ○(財)阪大微生物病研究会  
 (バイオベンチャー)  
 ○MIMBR ○ジーンデザイン㈱ ○セルメディン㈱

**2013年3月までにすでに6回の研究会を開催**

図6；次世代アジュバント研究会の運営

#### D. 考察

上記の通り、予定されていた研究内容を予定通りかそれ以上の成果を上げることが出来たと考えている。

特に、上市されているアジュバントや臨床試験にてドロップしたアジュバントなどを網羅的解析できるかが、このアジュバントデータベースプロジェクトの成否を握るといっても過言ではないが、5年かけてじっくり交渉する予定であった外資の企業などから積極的な参画の申し込みがあったのは想定外であった。そのため予定より早くMTA、共同研究契約の交渉が始まり、計画の前倒しが可能になった。

また、平成 24 年度はアラムアジュバントを含有する全粒子 H5N1 プレパンデミックワクチンの小児での臨床試験の被験者血清でのマイクロ RNA 解析を計画していたが、トキシコゲノミクス、バイオインフォーマティクスのチームの積極的な関与もプラスに働き、計画より早く解析が終了した。そのため、25 年度以降に予定していたアジュバントの安全性（発熱）や有効性（抗体価）を予見できるバイオマーカー候補の同定作業やその次に予定していたアジュバント入りインフルエンザワクチンの臨床試験の検体を用いたバリデーションの解析まで 24 年度中に可能になった。

#### E. 結論

今後のワクチン開発におけるアジュバントの役割は非常に大きく、アジュバントの安全性及び有効性を科学的に評価するためには、アジュバント投与によって生じる生体反応を細胞および遺伝子レベルで解析したデータからなるデータベース構築が必須である。本研究では、ラット、マウス、ヒト PBMC を用いてアジュバント投与後の遺伝子発現変化を遺伝子アレイによって網羅的解析してデータベース構築を進めていく。アジュバントの有効性と安全性を適正に評価するためには高品質のデータベースが必要であり、さらに知見を集積して SOP を確立していく。また、結果として得られる膨大なデータから様々な指標を抽出する方法論の確立も進めていく。

#### F. 研究発表

【学術論文(英文・すべて査読付)】

1. Kobiyama K, Kawashima A, Jounai N, Takeshita F, Ishii KJ, Ito T, Suzuki K  
Role of extrachromosomal histone H2B on recognition of DNA viruses and cell

damage. *Front in Epigenomics and Epigenetics*

2. Halder SK, Matsunaga H, Ishii KJ, Akira S, Miyake K, Ueda H. Retinal cell type-specific prevention of ischemia-induced damages by LPS-TLR4 signaling through microglia. *J. Neurochem.* 2013 *in press*
3. Palacpac N, Ntege E, Yeka A, Balikagala B, Suzuki N, Shirai H, Yagi M, Ito M, Fukushima W, Hirota Y, Nsereko C, Okada T, Tetsutani K, Arisue N, Itagaki S, Tougan T, Ishii KJ, Ueda S, Egwang TG, Horii T Phase 1b randomized trial and follow-up study in Uganda of the blood-stage malaria vaccine candidate BK-SE36 *PLoS one* 2013 *in press*
4. Tang CK, Aoshi T, Jounai N, Ito J, Ohata K, Kobiyama, K, Dessailly BH, Kuroda E, Akira S, Mizuguchi K, Coban C and Ishii KJ\* The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant *PLoS one* 2013 2013;8(3):e60038
5. Kuroda E, Coban C, Ishii KJ\* Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings and future prospects. *Int. Rev. Immunol.* 2013 2013;32(2):209-20
6. Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, Komatsu K, Akira S, Kawai T. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 110(8):2969-74.
7. Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ\*. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 2 (168) 1-13.
8. Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ, Horii T.



- TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum Vaccin Immunother*. 2013 4;9 (2) 1-8.
9. Shiraishi K, Hamano M, Ma H, Kawano K, Maitani Y, Aoshi T, Ishii KJ, Yokoyama M. Hydrophobic blocks of PEG-conjugates play a significant role in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon. *J Control Release*. 2013 Feb 10;165(3):183-90.
  10. Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii KJ, Coban C. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. *Cell Host Microbe*. 2012 12(5):705-16.
  11. Nakayama T, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody responses in young children. *Vaccine*. 2012 30(52):7662-6.
  12. Tetsutani K, Ishii KJ\*. Adjuvants in influenza vaccines. *Vaccine*. 2012 30(52):7658-61.
  13. Shoji M, Tachibana M, Katayama K, Tomita K, Tsuzuki S, Sakurai F, Kawabata K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. Type-I IFN signaling is required for the induction of antigen-specific CD8(+) T cell responses by adenovirus vector vaccine in the gut-mucosa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 425(1):89-93.
  14. Desmet CJ, Ishii KJ\*. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat Rev Immunol*. 2012 12(7):479-91.
  15. Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions. *Vaccine*. 2012 30(26):3885-90.
  16. Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 30(1):184-94.e11.
- 【書籍および日本語総説】
- 英文書籍
- 1 Elsevier Book “Biological DNA Sensor: The Impact of Nucleic Acids on Diseases and Vaccinology” edited by Tang CK and Ishii KJ Elsevier Inc. In press 2013
- 日本語総説
1. 城内 直、石井 健. 「感染と免疫」 *Medicina* 2013,50(3):406-411
  2. 大西 元康、石井 健. 「ワクチン (アジュバント) デザインの新展開」 *医薬ジャーナル* 2013,49(2):699-705
  3. 石井 健. 「トップランナーに聞く 核酸による自然免疫および獲得免疫の制御機構の研究と核酸アジュバントのワクチンへの応用研究」 *最新医学* 2013,68(2):107-111.
  4. 鉄谷耕平、石井 健. 「ワクチンアジュバントの現状と展望」 *レギュラト*

- リーサイエンス学会誌 2012, 2(2): 149-158. “Extracellular nucleic acids in Immunity”
5. 鉄谷耕平、石井 健. 「アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政.」 *ファームテクジャパン* 2012,28(4): 45-52. 5月4日 GIGA DAY (The GIGA-Research Center ブリュッセル) “Nucleic acid sensing in immunity”
6. 小檜山康司、石井 健. 「自然免疫メカニズムを利用するワクチンアジュバント開発.」 *THE LUNG* 2012 20(4):54-61. 6月6日～8日 Asia-Pacific Congress of Medical Virology (オーストラリア アデレード) “Making immune sense of nucleic acids in inflammation and vaccination”
7. 城内 直、石井 健. 「細胞外核酸の生物学的意義と臨床応用.」 *実験医学増刊* 2012 vol.30 No.20 p209(3367)-216(3374). 6月12日～14日 6th Annual World Vaccine Congress Asia 2012 (シンガポール) “Innovative vaccine design: Important chemistry, manufacturing and controls (CMC) issues in adjuvant development”
8. 黒田悦史. 「粒子アジュバントのメカニズム.」 *実験医学増刊* 2012 vol.30 No.20 p203(3361)-208(3366). 6月28日～29日 7th RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2012 (パシフィコ横浜) 「Making immune sense of nucleic acids in infkammation and vaccination」
9. 石井 健. 「感染・共生・生体防御研究から生まれる新たな疾患予防、治療法ターゲット.」 *実験医学増刊* 2012 vol.30 No.20 p172(3330)-175(3333).
10. 石井 健. 「宿主の生体バリア -腸管、肺、皮膚における新たな免疫細胞とその機能.」 *実験医学増刊* 2012 vol.30 No.20 p134(3292)-137(3295). 7月9日～10日 GTC meeting for Influenza Research & Development (アメリカ サンフランシスコ) “Innate Immune Regulation of Influenza Vaccination by Endo and Exo-genous Adjuvants”

【国際学会：招待講演】

4月27日～29日

IMMUNOLOGY&IMMUNOGENETICS  
CONGRESS 2012 (トルコ アンタリア)

10月14日～16日 6th Vaccine & ISV  
Annual Global Congress (中国 上海)  
“Making immune sense of nucleic acids in  
inflammation and vaccination”

10月16日～19日 The 34<sup>th</sup> Naito Conference on ‘Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine’ (札幌) ”Immunobiology of nucleic acids and their metabolites”

10月23～26日 12<sup>th</sup> International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012 (IEIIS2012) (東京) Session chair for ‘Enigmas of innate immunerecognition of Th2/Th17adjuvants’ and presentation on “Intra- and extra-cellular nucleic acids as an adjuvant”

12月4日～7日 20<sup>th</sup> anniversary meeting “DNA vaccine 2012” for the international society of DNA vaccines. (アメリカ サンデイエゴ) “Intra- and Inter-Cellular Signaling Pathways for DNA Vaccination”

2013年1月29日 第1回免疫記憶—ワクチン国際研究会  
「Biomarkers and mechanism of vaccine adjuvants」

2013年3月25日～28日 Foundation Mérieux Conference (メリュー財団国際シンポジウム) ‘Therapeutic Vaccines: Reprogramming Immunity in Infectious Diseases, Allergy and Cancer’ (フランス アネシー) “Biomarkers and molecular mechanisms of vaccine adjuvant”

#### 【国内学会：招待講演】

7月4日～5日 第28回日本DDS学会学術集会 (札幌コンベンションセンター) ワークショップ「ワクチンとDDS」

7月26日～27日 第16回日本がん免疫学会総会 (北海道大学 学術交流会館) ワークショップ「アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政まで」

7月30日～31日 第12回遺伝子・デリバリー研究会・夏季セミナー (かんぼの宿 北九州市) 「免疫制御を目的とした核酸医薬の開発研究」

11月17日～18日 第16回日本ワクチン学会学術集会 (パシフィコ横浜) 「DDS 機能をもったアジュバントの開発研究」

2013年3月18日～20日 第86回日本細菌学会総会  
「アジュバント開発研究の最前線」

#### 【学会以外の講演会、セミナー等】

5月23日 ワクチンの市場・技術動向と開発・事業戦略 (東京・ゆうぽうと) 「ワクチンの非臨床～臨床試験の進め方と審査対応」

6月2日 第162回東三河小児科医会学術講演会 (ホテルアソシア豊橋) 「ワクチンアジュバント開発研究の新展開」

7月23日～26日 第14回免疫サマースク

ール 2012 (ラフォーレ那須)

座長「免疫病：研究から臨床へ、そして又研究へ」

8月29日 技術情報機構セミナー「アジュバント開発研究の新展開」オーガナイザーおよび講演「アジュバント総論とその開発研究の新展開」(東京駒込 滝の川会館)

8月31日 BD 学術セミナー (マンダリン オリエンタル東京)

「細胞外核酸の免疫認識機構とその臨床応用」

11月19日 Wako ワークショップ 一次世代感染症ワクチンの開発をめざしてー

(ポスト日本ワクチン学会シンポジウム・サテライトシンポジウム)

「細胞外核酸の認識構造とそのワクチン、アジュバントへの応用」

2013年2月9日 第10回日本免疫治療学研究会学術集会 (東京ガーデンパレス)

「自然免疫シグナルを利用した新規アジュバント開発」(小檜山 康司)

2013年2月12日 メディバイオ事業研究会 発会記念講演会

「ワクチン開発研究の新展開 自然免疫の次は？」

2013年2月27日 富山化学研究会

「ワクチン開発研究の新展開 自然免疫の次は？」

【学会発表 (国際)】

ポスター

1. Kobiyama K, Ishii KJ. A

Dectin-1-assisted APC-targeting

TLR9-agonist as an adjuvant. THE 34th NAITO

CONFERENCE on Infection, Immunity and

their Control for Health: Mucosal Barrier,

Pathogen and Vaccine. Sapporo. Oct 16 - 19,

2012

2. Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii

KJ. Characterization of STING

phosphorylation mediated by cytosolic

double stranded DNA. THE 34th NAITO

CONFERENCE on Infection, Immunity and

their Control for Health: Mucosal Barrier,

Pathogen and Vaccine. Sapporo. Oct 16 - 19,

2012

3. Aoshi T, Ishii KJ. Requirements of the

innate immune responses for CD8 T cell

induction with infection and vaccination.

THE 34th NAITO CONFERENCE on Infection,

Immunity and their Control for Health:

Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine.

Sapporo. Oct 16 - 19, 2012

4. Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. A

Dectin-1-assisted APC-targeting

TLR9-agonist as an adjuvant. IEIIS2012

Homeostatic Inflammation Symposium. Tokyo.

Oct 23-26, 2012

5. Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. A

Dectin-1-assisted APC-targeting

TLR9-agonist as an adjuvant. Keystone

symposia on Molecular and Cellular Biology.

Ottawa, Ontario, Canada. Dec 13-18, 2012

6. Onishi M, Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-b-CD), a common additive acts as a vaccine adjuvant via a unique mode of innate immune activation. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. Ottawa, Ontario, Canada. Dec 13-18, 2012

7. Tang C, Ito J, Jounai N, Aoshi T, Ohata K, Kobiyama K, Dessalloy B, Akira S, Mizuguchi K, Coban C, Ishii KJ. The vascular disruptive agent DMXAA is an effective vaccine adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. Ottawa, Ontario, Canada. Dec 13-18, 2012

8. Tozuka M, Jounai N, Kobiyama K, Koyama S, Coban C, Ishii KJ. Differential Roles of Antigen Presentation and DNA Adjuvanticity in Immunogenicity of DNA vaccine. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. Ottawa, Ontario, Canada. Dec 13-18, 2012

#### 口頭

1. Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. A Dectin-1-assisted APC-targeting TLR9-agonist as an adjuvant. IEIIS2012 Homeostatic Inflammation Symposium. Tokyo. Oct 23-26, 2012

#### 【学会発表（国内）】

##### ポスター、口頭

1. Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. A Dectin-1-assisted APC-targeting

TLR9-agonist as an adjuvant. 日本ワクチン学会学術集会. 横浜. 2012. 11. 17-18.

Kobiyama K, Ishii KJ. A Dectin-1-assisted APC-targeting TLR9-agonist as an adjuvant. 日本免疫学会総会・学術集会. 神戸. 2012. 12. 5-7.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

アジュバントの有効性及び安全性指標の探索

石井健 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー  
研究協力者 青枝大貴 同上 主任研究員

**研究要旨**

感染症のみならず、がん、アレルギー、生活習慣病にいたるまでワクチンによる予防や治療の適応が広がりつつある。近年の自然免疫研究や樹状細胞の発見により、ワクチンの作用機序について分子レベルでの研究が可能になり、なかでもアジュバントによる自然免疫の活性化がワクチン効果に必須であることが明らかとなった。一方で、アジュバントの種類や作用機序は多岐にわたり、アジュバントの添加によってワクチン効果が増強するだけ未だこのような多様なアジュバント群の有効性及び安全性を評価する指標は明らかでない。安全性と有効性を兼ね備えた次世代型ワクチンの開発研究には、多岐にわたるアジュバントによるヒト細胞、マウス個体、ラット個体における生物反応を総合的に解析したデータベースの構築が必須である。本研究ではヒト細胞、ラット、マウスを認可済みから開発中の代表的なアジュバントで刺激・投与することで生じる生物反応を網羅的に解析することで、アジュバントの安全性および有効性を評価可能なデータベースを構築することを目的とし、ラット、マウス、ヒト PBMC での実験をスタートした。

**A. 研究目的**

アジュバントの安全性および有効性評価の基礎としてアジュバント投与後の細胞・臓器における遺伝子発現データを、ヒト細胞、マウス及びラットを用いて収集しデータベースを構築する。その基盤として、アジュバント投与、臓器の回収、遺伝子チップによる網羅的発現遺伝子解析、のそれぞれについて標準化を行う。

**B. 研究方法**

高品質のデータベースを構築するためには、一連の実験手技の標準化が必須である。それ

らの検討を含めて、代表的なアジュバントとして水酸化アルミニウムおよび完全フロイントアジュバントをラット腹腔内に投与し主要な臓器（肝臓、脾臓、肺、脾臓、腎臓、筋肉）を6時間および24時間後に回収し、遺伝子チップを用いてアジュバント投与後の遺伝子発現変化を網羅的に解析した。各群は2～3匹のラットを使用した。

同様にマウスにおいても主要なアジュバントを投与し各臓器におけるアジュバント投与後の遺伝子発現変化を網羅的に解析した。各群は3匹で、最大5時点(0, 1, 3, 6, 24時間)の

サンプリングを行った。

ヒト PBMC を *in vitro* において各種アジュバントで刺激し、24 時間後の遺伝子発現変化を網羅的に解析した。

ラットへの投与実験は国立感染症研究所と、ラット・マウス・ヒトの遺伝子発現解析は医薬基盤研究所トキシコゲノミクスプロジェクトと共同して行った。

(倫理面への配慮)

ヒト末梢血細胞は医薬基盤研究所の倫理審査委員会で承認を受けた。また実験動物は、医薬基盤研究所および国立感染症研究所動物実験委員会規定に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。

### C. 研究結果

- 1) ラット約 40 匹から総サンプル数約 400 (アジュバントは 2 種類)、マウス約 200 匹から総サンプル数 2000 (アジュバントは 6 種類) のサンプリングを終了した。その中から 6 時間時点を中心に網羅的な遺伝子発現解析を進めた。
- 2) ラット及びマウスで、アジュバント投与後、少なくとも 6 時間で各臓器において遺伝子発現の変化が認められ、アジュバント投与による遺伝子変化を検出することができた。
- 3) 臓器の回収手技が、それぞれの臓器の遺伝子発現のパターンに大きく影響する事例が数匹に一匹程度の頻度で散見された。一連の手技の再検討を行っているが、具体的な原因の特定には至っていない。
- 4) ヒト PBMC からの遺伝子発現解析から PBMC においてもアジュバントの種類に依存したヒト遺伝子プロファイルを見出すことが出来た。

### D. 考察

これまでに得られたデータから、本研究で構築を進めているアジュバント投与後のラット及びマウスから臓器を回収し、その遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析する方法によって、アジュバントの安全性および有効性評価に活用できる指標を見出すことは十分可能であると推測された。

### E. 結論

今後のワクチン開発におけるアジュバントの役割は非常に大きく、アジュバントの安全性及び有効性を科学的に評価するためには、アジュバント投与によって生じる生体反応を細胞および遺伝子レベルで解析したデータからなるデータベース構築が必須である。本研究では、ラット、マウス、ヒト PBMC を用いてアジュバント投与後の遺伝子発現変化を遺伝子アレイによって網羅的に解析してデータベース構築を進めていく。アジュバントの有効性と安全性を適正に評価するためには高品質のデータベースが必要であり、さらに知見を集積して SOP を確立していく。また、結果として得られる膨大なデータから様々な指標を抽出する方法論の確立も進めていく。

### F. 研究発表

論文発表

1. Hydrophobic blocks of PEG-conjugates play a significant role in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon. Shiraishi K, Hamano M, Ma H, Kawano K, Maitani Y, Aoshi T, Ishii KJ, Yokoyama M. *J Control Release*. 2012Dec3.  
Doi:pil:S0168-3659(12)00813-9.

- 10.1016/j.jconrel.2012.11.016.
2. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii KJ, Coban C. Cell Host Microbe. 2012;12(5):705-16. doi: 10.1016/j.chom.2012.10.010.

学会発表

1. PS[II]-42 Requirements of innate immune responses for CD8 T cell induction with infection and vaccination. Taiki AOSHI, Ken J ISHII. 第 34 回内藤コンファレンス(感染・炎症・免疫). 2012 年 10 月 16 日(火)~10 月 19 日(金) (札幌)

日本語総説

1. 自然免疫と次世代ワクチン開発. 青枝大貴, 石井 健. Drug Delivery System (0913-5006)27 巻 1 号 Page19-27 (2012.01)
2. 自然免疫の関わる病態と治療への応用 自然免疫研究と次世代ワクチン. 青枝大貴, 石井 健. 医学のあゆみ 243 巻 1 号 Page122-128 (2012.10)

書籍

3. 免疫学コア講義(第 3 版)(熊ノ郷淳, 阪口薫雄, 竹田潔, 吉田裕樹/編). ワクチン. 青枝大貴, 石井 健. 南山堂 2012 年 11 月.
4. 免疫学 Update 分子病態の解明と治療への展開(審良静男, 熊ノ郷淳, 竹田潔/

編). 第 23 章ワクチン開発研究の展開. 青枝大貴, 石井 健. 南山堂 2012 年 12 月

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

新規アジュバントの同定、作用機序を含めた開発研究

石井 健 医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクトリーダー

小檜山 康司 医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト研究員

### 研究要旨

現在までに、国内で認可されているアジュバントの数は少なく、またその作用機序にも不明な点が多く残されている。新たなアジュバントの探索は、今後のワクチン開発においても重要であると考えられ、実際に、安全性及び有効性の高い新規ワクチン開発にはアジュバントの開発、そして作用機序の解明が必須であると考えられる。本研究では、新たに2つの化合物がワクチンのアジュバントとして働く事を示すとともに、マウスにおける作用機序とアジュバントとしての特性を明らかにした。

#### A. 研究目的

新規ワクチンアジュバントの、作用機序の解明及びアジュバントとしての特性の評価。

エンザウイルスを感染させる事で、ウイルスに対する感染防御能を評価した。

（倫理面への配慮）

#### B. 研究方法

本研究では抗腫瘍薬として臨床試験が行われている低分子化合物である、DMXAA (5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid) または、医薬品の添加剤としても用いられているシクロデキストリンを抗原と共にマウスに投与し、免疫後のマウスの血清を用いて抗原特異的抗体価、脾臓細胞を用いてサイトカインを測定することにより、アジュバント効果を評価した。また、作用機序解明のため、自然免疫関連遺伝子欠損マウスを用いて同様の実験を行い、自然免疫シグナルの関与を検討した。マウスにインフルエンザワクチンと共にアジュバントを投与し、致死量のインフル

使用された実験動物は、医薬基盤研究所および大阪大学微生物病研究所動物実験委員会規定に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。

#### C. 研究結果

1) DMXAA およびシクロデキストリンをモデル抗原である卵白アルブミン (OVA) と共に 2 週間隔で 2 回投与し、その後の抗原特異的抗体価を測定した。DMXAA およびシクロデキストリンを投与する事により、抗原のみに比べ強い抗原特異的 IgG1、IgG2c 抗体の産生が確認された(図 1)。

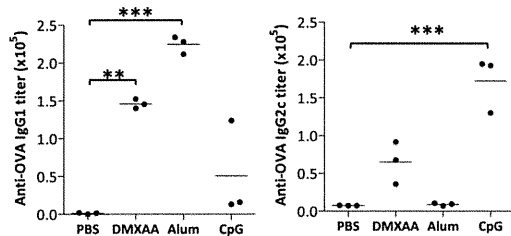


図 1: DMXAA のワクチンアジュバントとしての効果。

2) 自然免疫関連遺伝子欠損マウスに、抗原と DMXAA またはシクロデキストリンを投与する事で、アジュバント効果における自然免疫系の関与の評価を行った。DMXAA はインターフェロン (IFN) 産生を誘導する事がすでに知られている事から、IFN 受容体 (IFNAR) と IFN 産生に重要な転写因子である IFN regulatory factor 3 (IRF3) の欠損マウスを用いて評価した。その結果、DMXAA のアジュバント効果は、IRF3、IFNAR に依存している事が示された (図 2)。

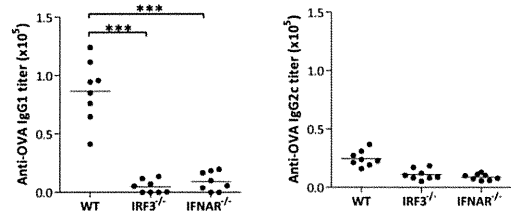


図 2: DMXAA によるアジュバント効果の作用機序。

3) マウスインフルエンザワクチンモデルを用いて、DMXAA およびシクロデキストリンのアジュバント効果を評価した。インフルエンザワクチンとして実際に投与されている、スプリットワクチン (SV) を用いた。SV にアジュバントを添加する事で、ワクチン抗原特異的抗体の産生が認められた。免疫後、致死量のインフルエンザウイルスを

経鼻にて感染させ、その後の体重変動を測定、生存を観察した (図 3)。

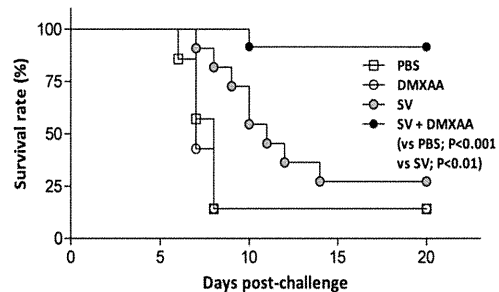


図 3: DMXAA によるインフルエンザワクチンアジュバントとしての効果。

#### D. 考察

本研究で用いたアジュバント候補物質である DMXAA とシクロデキストリンはアジュバントとして働く事が示された。実際に、臨床で用いられているインフルエンザワクチンのアジュバントとしても効果が高かった事から、新規ワクチンのアジュバントとしても有用であると考えられる。自然免疫系の関与も明らかとなり、安全性確立のためにも重要な作用機序においても一部解明する事が出来た。しかしながら、本研究はマウスを用いて行われたため、ヒトへの応用に向けて高等動物であるサルでの評価が必須であると考えられる。また、副反応に関しても、遺伝子レベルでの解析が重要であり、今後の課題である。

#### E. 結論

今回の研究により、新たに 2 つの低分子化合物がアジュバントとして働く事が示された。実際に、DMXAA はヒトで臨床試験も行われており、シクロデキストリンは添加剤としてすでに使用されている事から、アジュバントとしての応用の可能性は高いと考えられる。一方で、アジュバントの評価法が確立していない事もあり、効果のみならず、安全の評価を

行う必要があると考えられる。

Symposium. Tokyo. Oct 23-26, 2012

## F. 研究発表

### 論文発表

#### 【学術論文(英文・すべて査読付)】

1. Kobiyama K, Kawashima A, Jounai N, Takeshita F, Ishii KJ, Ito T, Suzuki K Role of extrachromosomal histone H2B on recognition of DNA viruses and cell damage. *Front in Epigenomics and Epigenetics*
2. Tang CK, Aoshi T, Jounai N, Ito J, Ohata K, Kobiyama, K, Dessailly BH, Kuroda E, Akira S, Mizuguchi K, Coban C and Ishii KJ\* The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant *PLoS one* 2013 2013;8(3):e60038
3. Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ\*. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 2 (168) 1-13.
4. Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ. Characterization of STING phosphorylation mediated by cytosolic double stranded DNA. THE 34th NAITO CONFERENCE on Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine. Sapporo. Oct 16 - 19, 2012
5. Kobiyama K, Ishii KJ. A Dectin-1-assisted APC-targeting TLR9-agonist as an adjuvant. THE 34th NAITO CONFERENCE on Infection, Immunity and their Control for Health: Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine. Sapporo. Oct 16 - 19, 2012
6. Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. A Dectin-1-assisted APC-targeting TLR9-agonist as an adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. Ottawa, Ontario, Canada. Dec 13-18, 2012
7. Onishi M, Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-b-CD), a common additive acts as a vaccine adjuvant via a unique mode of innate immune activation. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. Ottawa, Ontario, Canada. Dec 13-18, 2012

### 学会発表

1. Kobiyama K, Ishii KJ. A Dectin-1-assisted APC-targeting TLR9-agonist as an adjuvant. 日本免疫学会総会・学術集会. 神戸. 2012. 12. 5-7.
2. Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. A Dectin-1-assisted APC-targeting TLR9-agonist as an adjuvant. 日本ワクチン学会学術集会. 横浜. 2012. 11. 17-18.
3. Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. A Dectin-1-assisted APC-targeting TLR9-agonist as an adjuvant. IEIIS2012 Homeostatic Inflammation
4. Tang C, Ito J, Jounai N, Aoshi T, Ohata K, Kobiyama K, Dessaolly B, Akira S, Mizuguchi K, Coban C, Ishii KJ. The vascular disruptive agent DMXAA is an effective vaccine adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. Ottawa, Ontario, Canada. Dec 13-18, 2012
5. Tozuka M, Jounai N, Kobiyama K, Koyama S, Coban C, Ishii KJ.

Differential Roles of Antigen Presentation and DNA Adjuvanticity in Immunogenicity of DNA vaccine. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. Ottawa, Ontario, Canada. Dec 13-18, 2012

日本語総説

1. 小檜山康司、石井 健. 「自然免疫メカニズムを利用するワクチンアジュバント開発.」 THE LUNG 2012 20(4):54-61.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特になし