

PARTICLE SIZE AND IMMUNE RESPONSES

Particle size is thought to affect particulate-induced immune responses. Sharp et al. investigated the relationship between particle size and DC activation. They showed that the polystyrene particles measuring between 430 nm and 1 μm activated DCs efficiently to produce IL-1 β [15]. Hornung et al. demonstrated that the optimal size of silica crystals engulfed by macrophages was approximately 1 μm [29]. Coban et al. investigated the adjuvanticity of hemozoin of different sizes. They reported that hemozoin particles measuring between 50 nm and 200 nm exhibited a stronger adjuvant effect compared with larger (2–20 μm) and smaller (<50 nm) particles [27, 30]. These results suggest that particles measuring between 200 nm and 1 μm are the optimal size for phagocytosis and the stimulation of immune responses.

DEPOT EFFECT

Antigen persistence and prolonged release, an effect referred to as the “depot effect” (first proposed by Glenny et al. in 1926), is believed to be responsible for the adjuvanticity of alum [31]. Harrison verified this hypothesis in 1935 by transferring the alum nodules from one guinea pig into a second guinea pig [32]. However, the depot effect has been questioned in several reports. Holt demonstrated that the antibody responses were normal if alum nodules were excised 2 weeks after immunization [33]. In particular, a recent report by Hutchison et al. demonstrated that the removal of the injection site 2 hours after the administration of antigen/alum had no effect on antigen-specific antibody and T-cell responses [34]. These studies suggest that the antigen depot does not play an important part in alum adjuvanticity, and that alum exhibits additional effects that account for its adjuvant properties.

TH2 CYTOKINES AND IL-4-PRODUCING CELLS

Alum preferentially induces Th2 responses (which are characterized by the production of IgG1 and IgE) and IL-4 is a crucial factor for the induction of such Th2 responses. Alum and several other particulates induce the recruitment of IL-4-producing myeloid cells. Jordan et al. reported that alum induces IL-4-producing Gr-1⁺ cells, and that these cells and IL-4 are required for the expansion of antigen-specific B cells *in vivo* [35]. Furthermore, Wang et al. demonstrated that alum-elicited Gr-1⁺ cells are IL-4-producing eosinophils [36]. As stated above, chitin-induced IL-4-producing cells were eosinophils and basophils. Moreover, eosinophil recruitment is dependent on the leukotriene B₄ produced by macrophages [28]. However, it has been reported that the antigen-specific antibody responses are normal in several eosinophil-deficient mice (IL-5-deficient, GATA1 Δ , and Phil mice) compared with wild-type (WT) control mice after immunization with ovalbumin (OVA)-alum [37]. In addition, Ohnmacht et al. demonstrated that antigen-specific IgG1 and IgE responses were comparable in WT and basophil-deficient mice immunized with OVA and alum [38]. These studies suggest that IL-4-producing myeloid cells such as eosinophils and basophils do not participate in alum adjuvanticity or Th2 responses. Recently, it has been reported that CD1d-deficient [both type-I and -II natural killer T (NKT) cell-deficient]-mice, but not J α 18-deficient (only type-I NKT cell-deficient)-mice exhibited reduced levels of antigen-specific IgG1 [39]. Type-II NKT cells appear to be required for alum-induced antigen-specific IgG1 responses in the regulation of IL-4-producing T cells.

There are several reports on IL-4 signaling and alum adjuvanticity [40, 41]. Brewer et al. reported on the involvement of IL-4 in the immunization of alum using IL-4-, IL-4R α -, and STAT6-deficient mice. These strains of mice did not induce the production of IgE and exhibited reduced levels of IgG1. However, T cells from IL-4R α - and STAT6-deficient mice produced normal or higher amounts of IL-4 and IL-5 in response to

a specific antigen. These results indicate that IL-4- and IL-13-mediated signaling is required for Th2-associated antibody production but is dispensable for alum-induced Th2 responses.

Recently, several reports focused on the importance of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) on Th2 activation, and Al-Shami et al. demonstrated that TSLP receptor-deficient mice displayed reduced Th2 responses after immunization with OVA and alum [42]. However, allergen (without adjuvant)-induced Th2 responses were also reduced in TSLP receptor-deficient or anti-TSLP antibody-treated mice [43, 44]. These results indicate that TSLP receptor-deficient mice are Th1 prone, and that reduced Th2 responses are not specific to immunization with alum.

PARTICULATES AND MYD88 SIGNALING

All TLR ligands are thought to be potent immune adjuvants through the activation of the adaptor molecules MyD88 and TRIF. Schnare et al. demonstrated that MyD88-deficient mice produced normal levels of OVA-specific IgG and IgE, but that elevated levels of total IgE were produced after immunization with OVA in alum [45]. The excessive amounts of total IgE appeared to be caused by the increased production of IL-13 in MyD88-deficient T cells. Gavin et al. also reported alum adjuvanticity in mice deficient in MyD88 and TRIF, which lack TLR signaling. The antibody responses in these double-knockout (KO) mice were comparable with those in WT mice immunized with trinitrophenol (TNP)-hemocyanin in alum [46]. These results suggest that TLR signaling does not account for the action of alum and indicate that TLRs may act as negative regulators of IgE production. However, Da Silva et al. demonstrated that MyD88 pathway was required for alum-induced Th2 responses in asthma models [47]. The reason for these discrepant results is unclear. There might be differences in the alum (Imject alum, aluminum hydroxide, aluminum phosphate, or aluminum potassium sulfate) and OVA (endotoxin-free or not) used.

Conversely, hemozoin crystals seem to act as MyD88-dependent adjuvants in natural and synthetic forms [27, 30]. The mechanism(s) underlying this dissimilarity between alum and hemozoin particulates remains to be investigated.

NLRP3 INFLAMMASOME

In 2008, several reports focused on the discovery that particulate adjuvants activate the NLRP3 inflammasome [29, 48]. The inflammasome is a PRR, and there are four classes of inflammasome: NLRP1, NLRP3, NLRC4, and AIM2 [5]. The NLRP3 inflammasome is one of the best characterized inflammasomes and is activated by particulates and crystals [15, 29, 48–53]. NLRP3 forms a multiprotein complex with apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) and caspase-1. The NLRP3 inflammasome promotes the secretion of inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-18 as active mature forms cleaved by activated caspase-1. In addition to activation by PAMPs, several reports have demonstrated that particulates such as silica and alum stimulate macrophages and DCs to produce IL-1 β and IL-18 through activation of the inflammasome, and that alum-induced antigen-specific IgG1 responses are significantly reduced in NLRP3-, ASC-, and caspase-1-deficient mice [48, 54]. Similar to alum, most particulate adjuvants are considered to have an adjuvant effect via inflammasome activation because silica, asbestos, PLGA, and MSU act as activators of the NLRP3 inflammasome. However, other reports have shown that the NLRP3 inflammasome is not required for antibody production in response to vaccination using a particulate adjuvant, including alum [27, 37, 55, 56]. These contradictory reports on the role of the NLRP3 inflammasome may be because of different experimental conditions. Several studies used Imject alum [48, 54, 55], whereas other studies used aluminum hydroxide [56]. Differences in genetic background of the animal used, such

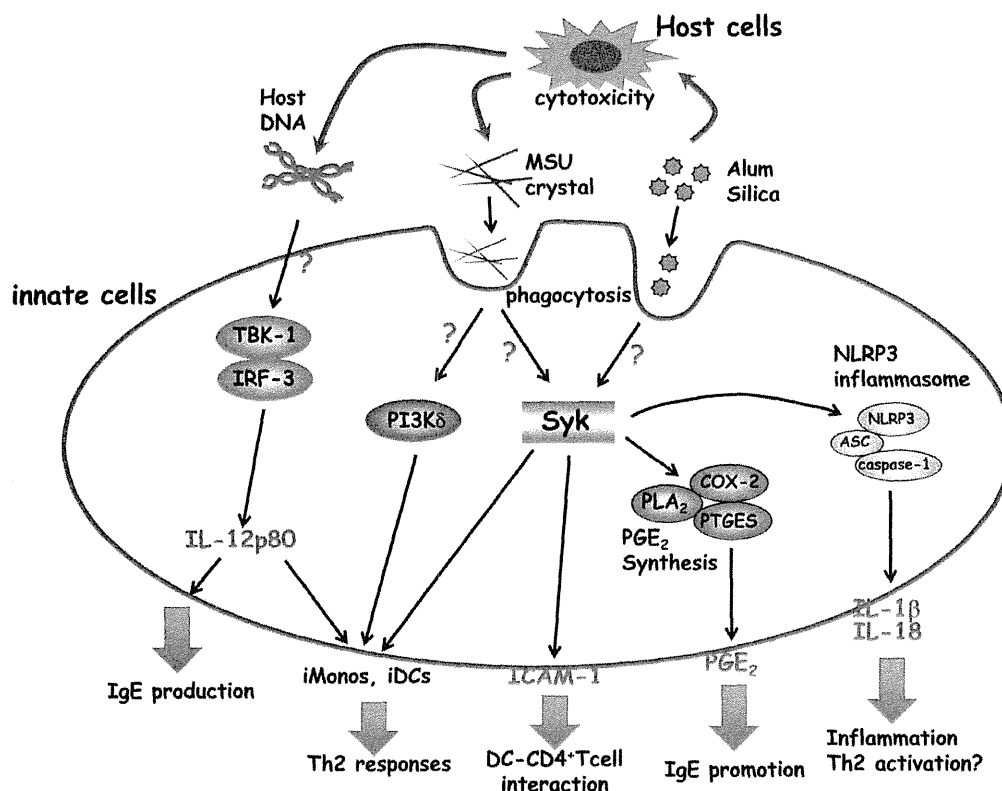


FIGURE 1. Proposed mechanisms of particulate adjuvants (alum, MSU, silica) in innate immunity. Alum induces cell death, and the damaged host cells, such as macrophages and neutrophils, release genomic DNA and uric acid as DAMPs. The recognition mechanisms of genomic DNA are still unclear, but the TBK-1-IRF3 axis plays an important part in IgE production and iMono/iDC migration via the IL-12p80 production. The released uric acid forms MSU crystals, which are recognized by lipid sorting on DCs. The engulfed MSU crystals trigger the activation of Syk and PI3K δ , and induce inflammatory cells or a strong interaction between DCs and CD4⁺ T cells. However, the released uric acid has not been shown to form crystals at the site of alum injection. Alum and silica stimulate macrophages and DCs to produce NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β and IL-18. These cytokines contribute (at least in part) to acute inflammation and Th2 activation. Macrophages and DCs also induce PGE₂ in response to alum and silica via Syk activation. PGE₂ is involved in IgE production. iMonos: inflammatory monocytes; iDCs: inflammatory DCs.

as C57BL/6 [48, 54, 55] and mixed C57BL/6-129 [56], might contribute to the contrasting results. The involvement of inflammasome-dependent cytokines in alum adjuvanticity is an important issue. It has been demonstrated that IL-18 plays an important part in alum-mediated Th2 responses [57]. However, IL-1 and IL-18 signaling triggers MyD88-dependent signaling, and MyD88 signaling is dispensable for alum adjuvanticity (as described above). The NLRP3 inflammasome may participate in adjuvant activity through IL-1 β - and IL-18-independent mechanisms, but the role of the NLRP3 inflammasome in the induction of adjuvant activity remains unclear (Figure 1).

MSU AS A DAMP

Uric acid is a purine catabolite that is released from dying or stressed cells. Uric acid forms MSU crystals if the concentration of uric acid is saturated. Shi et al. demonstrated that uric acid and MSU crystals act as DAMPs and stimulate DCs to induce the maturation and activation of cells [58]. Interestingly, similar to alum, MSU crystals are known to activate Th2 responses preferentially [22-26]. Kool et al. demonstrated that uric acid is released in the peritoneal cavity after the injection of alum, and that antigen-specific T-cell responses were prevented after uricase treatment [22]. Alum is

known to induce cell death, and uric acid and MSU crystals induced by alum cytotoxicity appear to contribute to alum adjuvanticity (whether uric acid forms crystal *in vivo* in alum-injected sites is of considerable interest). In addition, this study demonstrated that uric acid-primed inflammatory monocytes and DCs have an important role in the activation of antigen-specific T cells [22]. However, this study reported that MyD88 signaling was required for this mechanism, which is a controversial proposal. Similar to alum and silica, MSU crystals have been reported to activate the NLRP3 inflammasome [50], and this finding is suspected to be linked to the adjuvant activity through the activation of the NLRP3 inflammasome. However, it has been reported that IL-1 β , MyD88, and the NLRP3 inflammasome are dispensable for uric acid-dependent adjuvant activity, and that spleen tyrosine kinase (Syk) and PI3-kinase δ in inflammatory monocytes and DCs are required for Th2 activation by uric acid (Figure 1) [25]. Syk is a nonreceptor tyrosine kinase and a key mediator of immunoreceptor signaling in immune cells. It has been demonstrated that Syk is involved in particulate-mediated innate cell activation [17, 51, 59]. The relationship between uric acid-induced Th2 activation and Syk is interesting. Although Syk is known to be activated by immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-bearing receptors [60], the underlying mechanisms of Syk activation by particulates is unclear.

Recently, several studies demonstrated the unique recognition mechanisms of particulates. Ng et al. analyzed the recognition of MSU crystals by DCs using atomic force microscopy. MSU crystals were shown to interact with DCs via receptor-independent mechanisms by directly engaging cell surface lipids (mainly cholesterol) [61]. The aggregation of lipid rafts triggers the recruitment and activation of Syk, and ultimately, Syk activates PI3-kinase, phagocytosis, and cytokine secretion (Figure 1) [61]. Flach et al. reported that alum also binds to the surface of DCs, leading to lipid sorting that is similar to MSU crystal-mediated activation of Syk and PI3-kinase. However, the uptake of alum is not required, and activated DCs interact with DC4⁺ T cells via binding with intracellular adhesion molecule (ICAM)-1 and leukocyte function-associated antigen (LFA)-1 (Figure 1) [62]. Syk appears to be a key molecule for the activation of DCs via lipid sorting, but the mechanisms of Syk activation by MSU or alum are unclear. In general, Syk is known to be activated by Src family kinases such as Hck, Fgr, and Lyn, and ITAM-containing FcR γ and DNAX-activating protein of 12 kDa (DAP12). However, DCs double-deficient in ITAM-containing FcR γ and DAP12 or triple-deficient in Src family kinases (Hck^{-/-}, Fgr^{-/-}, and Lyn^{-/-}) retain their function after activation by MSU crystals [61].

LIPID MEDIATOR

Recently, we found that Th2-inducing particulate adjuvants have another unique mechanism for the activation of innate immune cells: alum and silica particulates stimulate macrophages to produce prostaglandins (PGs) in a similar way to the secretion of IL-1 β and IL-18 via NLRP3 activation [17]. In addition to proinflammatory cytokines, lipid mediators such as PGs are involved in the induction of inflammatory responses. The well-characterized proinflammatory lipid mediator PGE₂ is a metabolite of arachidonic acid that is produced by various types of cells, including antigen-presenting cells [63]. Studies have shown that PGE₂ suppresses Th1 responses by elevating intracellular concentrations of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in DCs and macrophages, thereby inhibiting the production of IL-12 and interferon [64–66]. In addition, PGE₂ enhances IL-23 production by DCs and favors Th17 polarization [67, 68]. More recently, PGE₂ has been shown to facilitate the differentiation of Th1 cells in the presence of IL-12 and high doses of the co-stimulatory CD28 antibody via the activation of the PI3-kinase pathway [68]. Thus, PGE₂ exhibits various functions in the regulation of immune responses.

Silica and alum stimulate macrophages and DCs to produce IL-1 β , IL-18, and PGE₂. The PGE₂ production induced by silica and alum has been shown to be independent of the NLRP3 inflammasome because inflammasome-deficient (NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-}, caspase-1^{-/-}) macrophages produced normal levels of PGE₂ in response to silica and alum compared with WT counterparts. Treatment with a Syk inhibitor or the knock-down of Syk using small interfering RNA (siRNA) molecules markedly suppressed the production of PGE₂ after stimulation with silica and alum, demonstrating that Syk regulates particulate-induced PGE₂ production. In this case, the mechanisms of Syk activation by alum and silica are unclear. However, several reports (including those involving studies on MSU crystals) have demonstrated that particulates stimulate innate immune cells via Syk activation. Therefore, Syk may be a key molecule for particulate-induced immune responses (Figure 1). PGE₂ synthesis is regulated by cyclooxygenase (COX) and PGE synthase (PTGES), and COX-2 and PTGES (also known as mPGES-1) in particular have been reported to regulate stimulation-dependent PGE₂ production in macrophages [69]. PTGES-deficient macrophages do not produce detectable amounts of PGE₂ after stimulation with silica or alum. In addition, PTGES-deficient mice display reduced amounts of antigen-specific IgE after immunization with alum and silica. In contrast, the levels of antigen-specific IgG are normal in PTGES-deficient mice compared with WT mice. These results indicate that particulate-induced PGE₂ is involved in IgE production *in vivo* (Figure 1) [17]. Several reports have demonstrated that PGE₂ facilitates IgE production by the accumulation of increased levels of intracellular cAMP [70, 71]. Interestingly, neuropeptides such as vasoreactive intestinal polypeptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) preferentially activate Th2 responses and increase intracellular cAMP levels in a receptor-dependent manner [72, 73]. In addition, the soluble extract of birch pollen consists of a lipid that is thought to be the causative agent of allergic asthma and to resemble the structure and function of PGE₂. This lipid induces Th2 responses and intracellular cAMP accumulation in DCs [74, 75]. Agents for cAMP elevation may act as Th2 adjuvants.

Many particulates that exhibit adjuvant activity, such as MSU crystals, PLGA, chitin particles, nickel oxide, amorphous silica, and carbon nanotubes, stimulate macrophages to produce inflammasome-dependent IL-1 β and inflammasome-independent PGE₂. In addition, we have found that, similar to the release of uric acid, increased amounts of PGE₂ are released from damaged cells, suggesting that PGE₂ also works as a DAMP (Kuroda et al., unpublished data). These findings suggest that PGE₂ is a useful marker for the screening of particulate (Th2) adjuvants.

RELEASE OF NUCLEIC ACIDS FROM HOST CELLS

Activation of innate immunity by DAMPs appears to be a critical mechanism for adjuvant activity. Recently, it was reported that the DNA released from host cells mediates the adjuvant activity of alum [76]. In this study, alum induced the local accumulation of host DNA at the injection site during alum-induced cell death, and interestingly, treatment with DNase I decreased the antigen-specific antibody responses in mice immunized with OVA in alum. Purified genomic DNA mixed with OVA induced OVA-specific IgG1 and IgE responses as efficiently as the alum adjuvant. These results indicate that the alum-induced release of host DNA triggers initial innate immune responses. These responses are not dependent on TLRs, RLRs, or inflammasomes, and the mechanisms by which the host DNA triggers the immune response are unclear. However, interferon regulatory factor 3 (IRF3) and TANK-binding kinase 1 (TBK1) are required for the adjuvant activity of alum (Figure 1). It has been reported that antigen-specific IgE responses, but not IgG1 responses, are significantly reduced in IRF3-deficient and TBK1/tumor necrosis factor (TNF)-double-deficient mice.

TABLE 1. Summary of the effect of particulate (alum) adjuvant on immune system

	Proposed mechanisms	Adjuvant activity	References
Depot effect	Antigen persistence and prolonged release	• Depot effect is not required.	33), 34)
IL-4-producing cells and IL-4 signals	Th2 and IgE induction	• Eosinophils and basophils are not required. • IL-4 is required for IgE production, but not for Th2 cell differentiation.	37), 38) 40), 41)
MyD88 pathway and TLRs	Innate cell activation	• MyD88 and TLRs are not required.	42), 43)
NLRP3 Inflammasome	Activation of NLRP3 inflammasome and IL-1 β , IL-18 release	• The involvement of inflammasome in adjuvant activity remain unclear.	27), 37), 44)~52)
Uric acid (MSU crystal)	Released from damaged cells by alum Work as DAMPs	• Th2 induction by inflammatory monocytes and DCs via Syk and PI3 kinase activation.	25), 57)
Lipid mediator	Induced from macrophage and DCs by alum or silica	• PGE ₂ is induced by Syk activation and promote IgE production.	17)
Nucleic acid (DNA)	Released from damaged cells by alum Work as DAMPs	• Th2 and IgE induction by inflammatory monocytes and DCs through the secretion of IL-12p80 and activation of TBK1-IRF3.	75)

Inflammatory DCs (derived from inflammatory monocytes) were identified as the cells responsible for the induction of Th2 responses. In addition, a reduced number of inflammatory DCs in the draining lymph nodes were observed in IRF3-deficient mice immunized with OVA in alum, and the transfer of WT inflammatory monocytes to IRF3-deficient mice increased Th2 cytokine and IgE production. This study also demonstrated that IL-12p80 (a p40 homodimer) is required for alum-induced migration of inflammatory monocytes, and that treatment with anti-IL-12p80 antibody partially attenuated the IgE responses in alum-treated WT mice (Figure 1). IL-12p80 is known to induce DC migration and to activate nuclear factor kappa-B (NF- κ B) and p38 MAP kinase but not signal transducers and activator of transcription (STAT) proteins [77, 78]. Identifying the IL-12p80-producing cells involved in responses to alum or host DNA would be interesting.

IgG1 and IgE responses are uncoupled, i.e. the TBK1-IRF3 axis is required only for the IgE responses. It is believed that the Th2-related antibodies IgE and IgG1 are regulated by identical mechanisms. As described above, PGE₂ is only involved in IgE production, not IgG1 production. Although the mechanisms of the regulation of IgE and IgG1 production and the relationship between IRF3 and PGE₂ remain unclear, the investigation of these mechanisms may help to improve the adjuvants currently in use.

FUTURE PROSPECTS AND CONCLUSION

A summary of the effects of particulate adjuvants is shown in Table 1. Particulate adjuvants (including alum) induce adaptive immunity. The development and modulation of adaptive immunity is regulated by innate immunity. However, the basis for the adjuvant activity of particulates and the mechanisms by which particulates activate

innate immunity are not fully understood. Alum has been used as a safe vaccine adjuvant in humans, but the limitations of alum include local reactions and the augmentation of IgE antibody responses [11, 79]. These limitations reflect the need for continuing research, and these limitations may be overcome by elucidation of the mechanisms of the effect of particulate adjuvants on immune responses.

Alum in combination with another adjuvant, an AS04, a combination of alum with monophosphoryl lipid A (MPL), has been licensed. In addition, a combination with potent Th1 stimulator such as IL-12 and CpG oligodeoxynucleotides shows a great promise, with improvement in alum-induced Th2 responses [11, 12, 80]. Other adjuvant combinations might be explored further. Thus, advances in adjuvant research could open new possibilities for the treatment of not only infectious diseases but also allergic inflammation and cancer.

Declaration of Interest

C.C. and K.J.I are supported by a Health and Labour Sciences Research Grant “Adjuvant Database Project” of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. E.K. was supported in part by the Regional Innovation Strategy Support Program and the Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (grant number 24591145).

ABBREVIATIONS

DC	dendritic cell
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PRR	pattern-recognition receptor
TLR	Toll-like receptor
NLR	Nod-like receptor
RLR	RIG-I-like receptor
CLR	C-type lectin receptor
DAMP	damage-associated molecular pattern
Th2	type-2 helper
IL	interleukin
Ig	immunoglobulin
PGLA	poly(lactic-co-glycolic acid)
MSU	monosodium urate
LPS	lipopolysaccharide
WT	wild-type
OVA	ovalbumin
NKT	natural killer T
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
KO	knockout
TNP	trinitrophenol
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain
Syk	spleen tyrosine kinase
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ICAM	intracellular adhesion molecule
LFA	leukocyte function-associated antigen
DAP	DNAX-activating protein of 12 kDa
PG	prostaglandin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
siRNA	small interfering RNA

VIP	vasoreactive intestinal polypeptide
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
COX	cyclooxygenase
PTGES	PGE synthase
IRF3	interferon regulatory factor 3
TBK1	TANK-binding kinase 1
TNF	tumor necrosis factor
NF- κ B	nuclear factor kappa-B
STAT	signal transducers and activator of transcription
MPL	monophosphoryl lipid A

REFERENCES

- [1] Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Phil Trans R Soc B* 2011;366:2748–2755.
- [2] Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010;327:291–295.
- [3] Coquerelle C, Moser M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev* 2010;234:317–334.
- [4] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011;34:637–650.
- [5] Elinav E, Strowig T, Henao-Mejia J, Flavell Richard A. Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity* 2011;34:665–679.
- [6] Loo Y-M, Gale M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011;34:680–692.
- [7] Osorio F, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense. *Immunity* 2011;34:651–664.
- [8] Desmet CJ, Ishii KJ. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat Rev Immunol* 2012;12:479–491.
- [9] Lambrecht BN, Kool M, Willart MAM, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol* 2009;21:23–29.
- [10] O'Hagan DT, Ott GS, De Gregorio E, Seubert A. The mechanism of action of MF59—an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine* 2012;30:4341–4348.
- [11] Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;32:155–172.
- [12] Aimanianda V, Haensler J, Lacroix-Desmazes S, et al. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends Pharmacol Sci* 2009;30:287–295.
- [13] Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol* 2009;9:287–293.
- [14] Mancino D, Buono G, Cusano M, Minucci M. Adjuvant effects of a crystalline silica on IgE and IgG1 antibody production in mice and their prevention by the macrophage stabilizer poly-2-vinylpyridine N-oxide. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1983;71:279–281.
- [15] Sharp FA, Ruane D, Claass B, et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:870–875.
- [16] Nygaard UC, Aase A, Lovik M. The allergy adjuvant effect of particles—genetic factors influence antibody and cytokine responses. *BMC Immunol* 2005;6:11.
- [17] Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, et al. Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. *Immunity* 2011;34:514–526.
- [18] Inoue K, Koike E, Yanagisawa R, et al. Effects of multi-walled carbon nanotubes on a murine allergic airway inflammation model. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;237:306–316.
- [19] Nygaard UC, Hansen JS, Samuelsen M, et al. Single-walled and multi-walled carbon nanotubes promote allergic immune responses in mice. *Toxicol Sci* 2009;109:113–123.
- [20] Ichinose T, Takano H, Miyabara Y, et al. Murine strain differences in allergic airway inflammation and immunoglobulin production by a combination of antigen and diesel exhaust particles. *Toxicology* 1997;122:183–192.
- [21] Lovik M, Hogseth AK, Gaarder PI, et al. Diesel exhaust particles and carbon black have adjuvant activity on the local lymph node response and systemic IgE production to ovalbumin. *Toxicology* 1997;121:165–178.
- [22] Kool M, Soullie T, van Nimwegen M, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008;205:869–882.
- [23] Behrens MD, Wagner WM, Krco CJ, et al. The endogenous danger signal, crystalline uric acid, signals for enhanced antibody immunity. *Blood* 2008;111:1472–1479.

- [24] Willart MAM, Lambrecht BN. The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma. *Clin Exp Allergy* 2009;39:12–19.
- [25] Kool M, Willart Monique AM, van Nimwegen M, et al. An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma. *Immunity* 2011;34:527–540.
- [26] Kool M, Hammad H, Lambrecht B. Cellular networks controlling Th2 polarization in allergy and immunity. *F1000 Biol Rep* 2012;4:6.
- [27] Coban C, Igari Y, Yagi M, et al. Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host Microbe* 2010;7:50–61.
- [28] Reese TA, Liang H-E, Tager AM, et al. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* 2007;447:92–96.
- [29] Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008;9:847–856.
- [30] Coban C, Yagi M, Ohata K, et al. The malarial metabolite hemozoin and its potential use as a vaccine adjuvant. *Allergol Int* 2010;59:115–124.
- [31] Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U. Immunological notes XVLL-XXIV. *J Pathol Bacteriol* 1926;29(1):31–40.
- [32] Harrison WT. Some observations on the use of alum precipitated diphtheria toxoid. *Am J Public Health Nations Health* 1935;25:298–300.
- [33] Holt LB. Developments in diphtheria prophylaxis. London: Heinemann; 1950.p. xvi; 181.
- [34] Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, et al. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB J* 2011;26:1272–1279.
- [35] Jordan MB. Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. *Science* 2004;304(5678):1808–1810.
- [36] Wang HB, Weller PF. Pivotal advance: eosinophils mediate early alum adjuvant-elicited B cell priming and IgM production. *J Leukoc Biol* 2008;83:817–821.
- [37] McKee AS, Munks MW, MacLeod MKL, et al. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act As an adjuvant for specific immunity. *J Immunol* 2009;183:4403–4414.
- [38] Ohnmacht C, Schwartz C, Panzer M, et al. Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths. *Immunity* 2010;33:364–374.
- [39] Shah HB, Devera TS, Rampuria P, et al. Type II NKT cells facilitate alum-sensing and humoral immunity. *J Leukoc Biol* 2012;92:883–893.
- [40] Brewer JM, Conacher M, Satoskar A, et al. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *Eur J Immunol* 1996;26:2062–2066.
- [41] Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, et al. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol* 1999;163:6448–6454.
- [42] Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, et al. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med* 2005;202:829–839.
- [43] Chen ZG, Zhang TT, Li HT, et al. Neutralization of TSLP inhibits airway remodeling in a murine model of allergic asthma induced by chronic exposure to house dust mite. *PLoS ONE* 2013;8:e51268.
- [44] Nakajima S, Igyarto BZ, Honda T, et al. Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1048–1055e6.
- [45] Schnare M, Barton GM, Holt AC, et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001;2:947–950.
- [46] Gavin AL, Hoebe K, Duong B, et al. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* 2006;314:1936–1938.
- [47] Da Silva CA, Pochard P, Lee CG, Elias JA. Chitin particles are multifaceted immune adjuvants. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:1482–1491.
- [48] Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008;453:1122–1126.
- [49] Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008;320:674–677.
- [50] Martinon F, Petrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440:237–241.
- [51] Tiemi Shio M, Eisenbarth SC, Savaria M, et al. Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathol* 2009;5:e1000559.
- [52] Dostert C, Guarda G, Romero JF, et al. Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS ONE* 2009;4:e6510.

- [53] Griffith JW, Sun T, McIntosh MT, Bucala R. Pure hemozoin is inflammatory in vivo and activates the NALP3 inflammasome via release of uric acid. *J Immunol* 2009;183:5208–5220.
- [54] Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol* 2008;181:17–21.
- [55] Kool M, Petrilli V, De Smedt T, et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 2008;181:3755–3759.
- [56] Franchi L, Núñez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* 2008;38:2085–2089.
- [57] Pollock KG, Conacher M, Wei XQ, et al. Interleukin-18 plays a role in both the alum-induced T helper 2 response and the T helper 1 response induced by alum-adsorbed interleukin-12. *Immunology* 2003;108:137–143.
- [58] Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;425:516–521.
- [59] Shi Y, Mucsi AD, Ng G. Monosodium urate crystals in inflammation and immunity. *Immunol Rev* 2010;233:203–217.
- [60] Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VLJ. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 2010;10:387–402.
- [61] Ng G, Sharma K, Ward SM, et al. Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells. *Immunity* 2008;29:807–818.
- [62] Flach TL, Ng G, Hari A, et al. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat Med* 2011;17:479–487.
- [63] Narumiya S. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice. *J Mol Med (Berlin)* 2009;87:1015–1022.
- [64] Fabricius D, Neubauer M, Mandel B, et al. Prostaglandin E2 inhibits IFN- α secretion and Th1 costimulation by human plasmacytoid dendritic cells via E-prostanoid 2 and E-prostanoid 4 receptor engagement. *J Immunol* 2010;184:677–684.
- [65] Kuroda E, Yamashita U. Mechanisms of enhanced macrophage-mediated prostaglandin E2 production and its suppressive role in Th1 activation in Th2-dominant BALB/c mice. *J Immunol* 2003;170:757–764.
- [66] Koga K, Takaesu G, Yoshida R, et al. Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein. *Immunity* 2009;30:372–383.
- [67] Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, et al. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J Exp Med* 2009;206:535–548.
- [68] Yao C, Sakata D, Esaki Y, et al. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med* 2009;15:633–640.
- [69] Uematsu S, Matsumoto M, Takeda K, Akira S. Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol* 2002;168:5811–5816.
- [70] Fedyk ER, Phipps RP. Prostaglandin E2 receptors of the EP2 and EP4 subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10978–10983.
- [71] Roper RL, Brown DM, Phipps RP. Prostaglandin E2 promotes B lymphocyte Ig isotype switching to IgE. *J Immunol* 1995;154:162–170.
- [72] Delgado M, Leceta J, Gomariz RP, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulate the induction of Th2 responses by up-regulating B7.2 expression. *J Immunol* 1999;163:3629–3635.
- [73] Delgado M, Gomariz RP, Ganea D. VIP/PACAP preferentially attract Th2 effectors through differential regulation of chemokine production by dendritic cells. *FASEB J* 2004;18:1453–1455.
- [74] Traidl-Hoffmann C, Mariani V, Hochrein H, et al. Pollen-associated phytoprostanins inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *J Exp Med* 2005;201:627–636.
- [75] Mariani V, Gilles S, Jakob T, et al. Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction. *J Immunol* 2007;178:7623–7631.
- [76] Marichal T, Ohata K, Bedoret D, et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med* 2011;17:996–1002.
- [77] Cooper AM, Khader SA. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol* 2007;28:33–38.
- [78] Robinson RT, Khader SA, Locksley RM, et al. *Yersinia pestis* evades TLR4-dependent induction of IL-12(p40) $_2$ by dendritic cells and subsequent cell migration. *J Immunol* 2008;181:5560–5567.
- [79] Nagel J, Svec D, Waters T, Fireman P. IgE synthesis in man. I. Development of specific IgE antibodies after immunization with tetanus-diphtheria (Td) toxoids. *J Immunol* 1977;118:334–341.
- [80] Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol* 2004;82:497–505.

自然免疫研究と次世代ワクチン

Vaccine development based on innate immune research



青枝大貴(写真) 石井 健

Taiki Aoshi and Ken J Ishii

医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト, 大阪大学免疫学フロンティア研究センターワクチン学

◎感染症に対するワクチンは非常に有効な医療手段のひとつであり、天然痘の撲滅に代表されるように大きな効果を上げてきた。現在では最大でおよそ15種類の、病原体に対する乳幼児期からはじまる秩序だったワクチンプログラムが日本を含む各国で実施されており、乳幼児死亡率の低下や公衆衛生の改善に寄与している。しかし、ワクチンによる乳幼児・小児における感染症対策が効果を発揮すればするほど、ワクチンによる恩恵を感じることは難しく、ワクチンの効果よりもむしろワクチン接種に伴う発熱や、きわめてまれで発生予測が難しくまたワクチン接種との因果関係を明確にできない重篤な副作用が重大な社会的問題となっており、ワクチンに対する不信や拒絶の一因ともなっている。また、従来の乳幼児・小児に対する感染症ワクチンだけでなく、いまだに有効なワクチンが存在しないHIV、結核、マラリアの三大感染症や、エボラやSARSなどの新興感染症、さらに高血圧、癌、認知症といった現代型の疾患や病態に対しても、有用な新しいワクチンの開発への期待が高まっている。このような課題に対応するためには、これまでの経験に基づいた(empirical)方法を踏まえたうえで、近年めざましく進展した免疫学、とくに自然免疫研究の知見を取り入れた科学的かつ革新的なワクチン開発研究が必要である。



アジュバント, ワクチン, 自然免疫, 獲得免疫, Th細胞分化

自然免疫と獲得免疫

近年の免疫学による成果でワクチン研究にもっとも重要なもののひとつとして自然免疫応答の分子メカニズムの解明があげられる。“免疫”と総称される現象についても、炎症反応を含む“自然免疫”と、“二度なし”の主体となる“獲得免疫”の2つの枠組みで理解されるようになってきている。

自然免疫(innate immunity)とは、病原体やワクチンを含む外来異物に対して早期に働く免疫反応で、おもに好中球やマクロファージなどの貪食細胞や、補体の活性化などからなる。貪食細胞などに発現する自然免疫受容体が細菌やウイルス由来の構成物を認識することに伴ってさまざまなサイトカインやケモカインが誘導され、炎症や発熱、免疫系細胞の遊走などが惹起され、抗原非特異的な生体防御機構として機能する。

それに対して獲得免疫(adaptive immunity)は、

T細胞やB細胞によって担われ、抗原を特異的に認識しその排除に働く。また、一度抗原特異的に活性化したT細胞やB細胞の一部はメモリー細胞として生体内に残り、2回目の感染などに対しては迅速かつ強力に感染や異物を排除する。このような獲得免疫を誘導することが、“二度なし”といわれる免疫の主体をなしている(図1)。また、後に詳述するように、獲得免疫を誘導するためには自然免疫反応が必須であることが明らかとなりつつある^{1,2)}。

ワクチンにおけるアジュバント・自然免疫応答の重要性

前述したように、感染やワクチンによって獲得免疫応答が誘導されるためには自然免疫の活性化が重要である。実際にマウスに高度に精製された蛋白抗原のみを用いて免疫しても、抗原特異的な

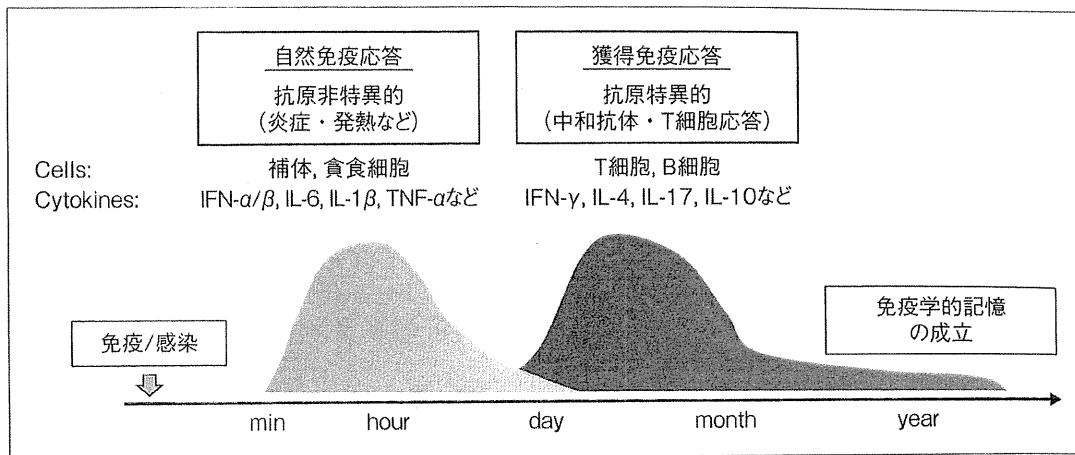


図 1 ワクチン・感染後の免疫応答

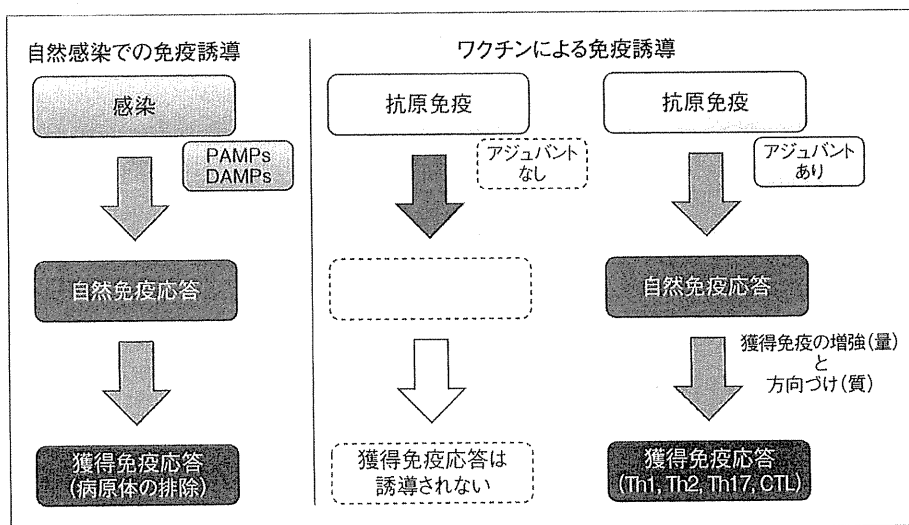


図 2 ワクチンによる免疫誘導

免疫応答はほとんど認められない¹⁾(図2)。それに対して抗原蛋白質にアジュバントを添加したワクチンで免疫した場合や何らかの病原体に感染した場合は、添加されたアジュバントや感染に伴うPAMPsやDAMPs(表1、解説は次節)の存在によって宿主の自然免疫レセプターが刺激されることで、抗原提示細胞の活性化やI型インターフェロン・炎症性サイトカインの産生といった自然免疫応答が惹起されることにより、強力に獲得免疫応答が誘導される。また、活性化された自然免疫受容体の種類およびそれらを発現する抗原提示細胞の違いや産生されたサイトカインの種類などによって自然免疫応答にも複数のタイプが存在すると考えられ、それぞれに対応してTh1, Th2, Th17などの獲得免疫応答の方向づけがなされて

いると考えられている(図2, 3)。このように自然免疫応答は獲得免疫応答を誘導するために必須なだけでなく、誘導される獲得免疫応答の質にも大きく影響を与えるため、ワクチンにアジュバントを添加する場合には、単にそのアジュバントによって誘導される獲得免疫の強さだけでなく、それらのタイプについても十分な考慮をする必要がある。

● 自然免疫受容体

自然免疫系の活性化は、生体を構成するさまざまな細胞に発現している自然免疫受容体がおもに病原体に由来するリガンドを認識することからはじまる。近年、つぎつぎと自然免疫受容体およびそのリガンドが同定されたことで、自然免疫系が

表 1 自然免疫受容体とリガンド(PAMPs) および合成・精製リガンド(アジュバント)

自然免疫受容体 (PRRs)		リガンド(PAMPs)	合成・精製リガンド(アジュバント)	内在性リガンド (DAMPs)
TLRs	TLR1/2	Triacyl lipopeptide	Pam3CSK4	UIRNA ⁹⁾ HMGB1, OxPL ⁴⁾ siRNA ⁸⁾ Host DNAs
	TLR2/6	Diacyl lipopeptide	Macrophage-activating lipopeptide 2 (MALP-2)	
	TLR3	dsRNA	Poly I : C	
	TLR4	LPS	Monophosphoryl lipid A (MPL)	
	TLR5	Bacterial flagellin	Flagellin-protein fusions	
	TLR7/8	ssRNA (RNA viruses)	Imiquimod (R-837), Resiquimod (R-848)	
	TLR9	非メチル化 CpG DNA	CpG-ODNs	
	TLR11	Profilin-like protein (<i>T. gondii</i>)	unknown	
RLRs	RIG- I	5'-PPP ssRNA or 短い(~1 kb)dsRNA	unknown	
	MDA5	長い(>2 kb)dsRNA	Poly I : C	
NLRs	NOD1	Peptideglycans, Diaminopimelic acid (iE-DAP)	FK156, FK565	Uric acid, ATP
	NOD2	Peptideglycans, Muramyl dipeptides (MDP)	Muramyl dipeptides (MDP)	
	NLRP3	oxidized mtDNA ? ¹¹⁾	Aluminum salts, MSU, Silica	
	NAIP5	Bacterial flagellin	Flagellin-protein fusions	
CLRs	Dectin-1	β 1,3-glucan	Curdlan, lentinan, schizophyllan	SAP130 ⁷⁾ Actin ^{5,6)}
	Dectin-2	High mannose structures	Man9GlcNAc2	
	Mincle	Trehalose-6,6-dimycolate (TDM)	Trehalose-6,6-dibehenate (TDB)	
	Clec9A	?	?	
ALRs	AIM-2	dsDNA	unknown	
	IFI16	dsDNA	unknown	

非自己である外来異物や病原体を認識する仕組みが分子レベルで明らかになった³⁾.

これまでに同定されている代表的な自然免疫受容体としてはその分子構造に基づいて、①Toll-like receptor (TLR), ②RIG- I -like receptor (RLR), ③Nod-like receptor (NLR), ④C-type lectin receptor (CLR), ⑤AIM2-like receptor (ALR), の大きく 5 つに分類されている(表 1). これらの受容体は病原体(ウイルス, 細菌, 真菌, 寄生虫)のさまざまな構成成分(膜成分, 鞭毛, 核酸)を認識する. これらの病原体成分は宿主には存在しないため, pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) あるいは microbe-associated molecular patterns (MAMPs) とよばれ, 生体の自然免疫系が自己と非自己を識別する指標になっている. TLR4 や dectin-1 などは宿主細胞の形質膜に存在して病原体膜由来のリポ蛋白質や糖鎖成分を認識し, また Nod1 や Nod2 などは細胞内で細菌膜由来のペプチドグリカン(ペプチド)を認識する. 病原体

由来の DNA や RNA などの核酸を認識する TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 はエンドゾームに局在し, RIG- I, MDA5, AIM-2, IFI16 などは細胞質内の非自己外来核酸を認識する.

また興味深いことに, TLR5 リガンドの flagellin と TLR11 リガンドの Profilin-like protein を除いて, ほとんどの自然免疫受容体リガンドは脂質, 糖鎖, 核酸などの非蛋白性の化学構造を認識している. このことは獲得免疫系を構成する T 細胞や B 細胞がそれぞれ外来蛋白質抗原由来のペプチド(8~15 アミノ酸)や抗原蛋白そのものの立体構造を認識していることと対照をなしている. また, 自然免疫受容体は外来性のリガンド認識だけでなく, 炎症や組織障害によって修飾されたり放出されたりする宿主由来成分(damage associated molecular patterns : DAMPs)も認識することが知られ⁴⁻⁹⁾(表 1), 自己由来のこれらの DAMPs が生体の自然免疫系を刺激することによるアレルギーや自己免疫疾患などの病態への関与も示唆されている.

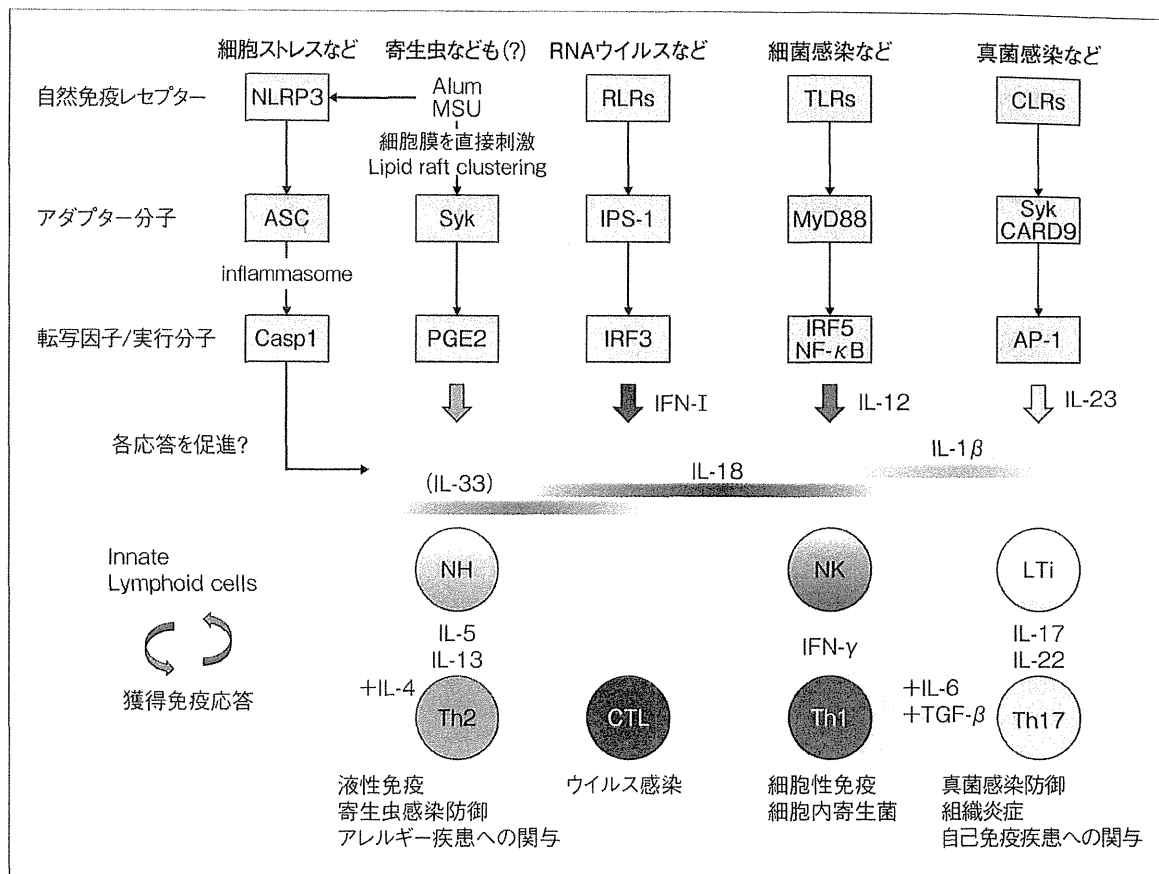


図 3 自然免疫応答とTh細胞応答

アジュバントの役割

アジュバントとは免疫応答を増強させる物質の総称で、その機能的役割は、①ワクチン抗原を抗原提示細胞に送達すること、②直接・間接に細胞膜あるいは細胞質内に存在するさまざまな自然免疫レセプターを刺激して自然免疫応答を惹起させること、の2つに分けられる(図4)。またいくつかのアジュバントはその両方の機能を合わせもっていると考えられる。現行のワクチンで広く使用されている水酸化アルミニウムをはじめとしたアルミニウム塩によるアジュバント効果は、ワクチン抗原の取込み促進と自然免疫レセプターに対する刺激の両方によるものと考えられている。

近年そのアジュバントメカニズムが徐々に明らかとなりつつあるアルミニウム塩を例にとると、以下のような機序が想定されている。

- ① アルミニウム塩と抗原蛋白質の静電的な相互作用によって、可溶性抗原とアルミニウム塩が数 μm 程度の複合体を形成することで抗原提示細胞に取り込まれやすくなり、結果と

して抗原蛋白質の取込みが促進される¹⁰⁾。

- ② アルミニウム塩がミトコンドリア障害をひきおこし、それに伴う oxidized mtDNA の細胞質への放出を介して、NLRP3 依存的なインフラマゾームを活性化する¹¹⁾。
- ③ アルミニウム塩が直接あるいは間接的に尿酸を介して抗原提示細胞、とくに樹状細胞の細胞膜上の lipid raft clustering を引き起こし、膜近傍に存在する Syk が活性化され、PGE2 などの産生が促進されることで Th2 応答を誘導する¹²⁻¹⁴⁾。
- ④ アルミニウム塩による組織障害が宿主 DNA の放出を引き起こし、宿主 DNA が TBK1/IRF3 を介した IgE 応答を引き起こす¹⁵⁾。

アルミニウム塩は上記のような複数の経路を介して、これらの複数の経路が協調してアジュバント効果を発揮していると考えられている。アルミニウム塩以外の粒子状アジュバントや MF59 や AS03 に代表される Oil-in-water アジュバントもおそらく同様に、直接細胞膜を刺激する経路と、

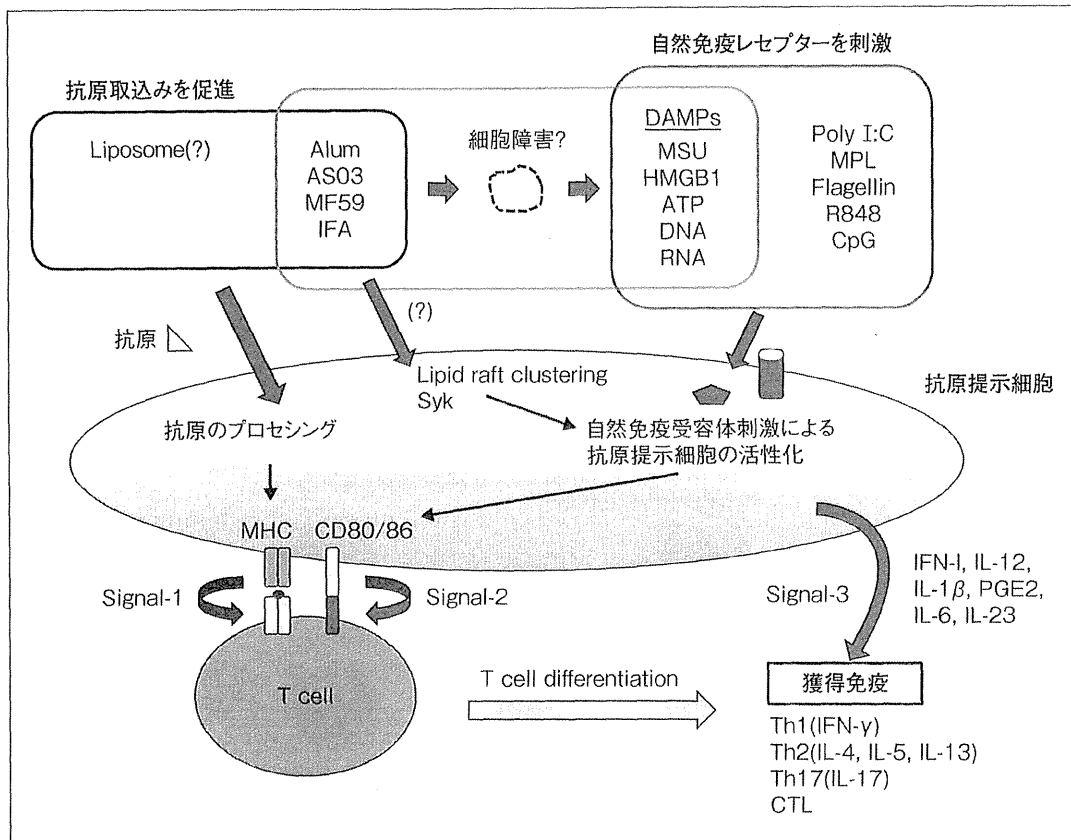


図 4 アジュバントの抗原提示における役割

これらのアジュバントの投与部位で起こる組織障害に伴って放出される尿酸, HMGB1, ATP, DNA, RNA などの DAMPs を介して抗原提示細胞上の自然免疫レセプターを刺激して効果を発揮することが想像されているが(図 4), 個々の粒子状アジュバントやオイルアジュバントの詳細な作用メカニズムの解明にはさらなる研究が待たれる。

抗原提示という観点からは, このようなアジュバント由来の直接あるいは間接的な自然免疫刺激によって抗原提示細胞が活性化し, かつ抗原のプロセッシングも増大して T 細胞への抗原提示が促進される。また刺激される自然免疫レセプターの種類や組合せなどによって抗原提示細胞周囲のサイトカイン環境が変化することで獲得免疫応答が方向づけられる(図 4)。

自然免疫シグナルと Th 細胞分化

自然免疫受容体からのシグナルカスケードは非常に複雑で, それぞれの受容体シグナル間でのクロストークや細胞集団による違いも存在し, たがい

に相違するような報告も多い。多くの例外や異なる事例も存在することを前提に, リガンドからの自然免疫受容体シグナルカスケードとそれに伴って産生される特徴的なサイトカイン, またそれらに相関する Th 細胞分化の概念図を簡潔化して図示すると図 3 のようになる。

TLR や RLR からのシグナルはそれぞれ MyD88/TRIF や IPS-1 を介して伝達され, IRF3 や IRF7 などの転写因子を活性化して I 型インターフェロン産生を誘導する。また, NF- κ B を介して IL-6, TNF- α , IL-12 などの炎症性サイトカイン産生も誘導する。とくに TLR シグナルによる IL-12 産生は強力に Th1 反応を誘導する。これらのサイトカインが共同的に働くことで TLR や RLR による自然免疫応答は Th1 や CTL を誘導することが知られている。Th1 は, IFN- γ 産生によってマクロファージを活性化して結核に代表される細胞内寄生菌の感染防御に働き, CTL は直接感染細胞を傷害することでウイルスの排除などにかかわっている。また最近 RLR シグナルが

IRF3を介してIRF5によるIL-12産生を阻害することが、ウイルス感染後の二次性細菌感染増悪に関与することも報告された¹⁶⁾。

CLRは、TLRとは異なるシグナル伝達経路をもつ宿主細胞形質膜に存在する自然免疫受容体であり、dectin-1やmincleなどが含まれ、それぞれITAMモチーフおよびFcR γ を介してSykを活性化し、CARD9/MAPK経路でTh17を誘導することが報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。Th17はTh1、Th2とは異なる機能的役割を果たすCD4T細胞サブセットであり、カンジダ症などの真菌感染やリウマチのような自己免疫疾患に関与することが報告されている。

NLRはLRRドメインをもつ細胞内自然免疫レセプターで、インフラマゾーム活性化には関与しないNod1やNod2²⁰⁾とインフラマゾーム形成を介してcaspase-1依存性なIL-1 β やIL-18の産生を誘導するNLRP3などがある^{21,22)}。NLRP3はalumやsilicaなどの粒子状異物や細胞ストレスなど各種のdanger signal認識に関与する細胞内自然免疫受容体として報告されたが、NLRP3が認識するリガンドの実体はいまだ明らかでない。近年、NLRP3リガンド刺激による細胞ストレスに起因するミトコンドリア障害がNLRP3シグナルに重要であることが報告され、障害を受けたミトコンドリアから酸化ミトコンドリアDNAが細胞質に放出され、直接NLRP3と相互作用することも報告された^{11,23-25)}。

インフラマゾームの活性化によるcaspase-1依存性なIL-1 β はTh1やTh17応答を促進し、IL-18はTh1やCTL応答を促進することが報告されている²⁶⁾(図3)。さらに、IL-1ファミリーサイトカインであるIL-33産生はcaspase-1に依存しないが²⁷⁾、組織障害に伴って宿主細胞から放出されるAlarminとして機能し、Th2細胞応答の促進のみならず²⁸⁾CTL応答の増強効果も報告されている²⁹⁾(図3)。このようなIL-1ファミリーのサイトカインはTLR、RLR、CLRによるサイトカイン応答と協調して各ThやCTL応答を促進していると考えられる。近年このプロセスに関与する獲得免疫細胞以外の各Th細胞が産生するのと同様の特徴的なサイトカインを産生する自然免疫系細胞

群として、innate lymphoid cellと総称される細胞群が同定され、Th細胞分化に重要な役割を果たしていることが報告されている³⁰⁻³²⁾。

また、上記のASCを介したNLRシグナル経路とは独立に、alum, silica, monosodium urate (MSU)などの粒子状異物は、自然免疫受容体を介さずに形質膜内側に存在するSykの活性化を誘導し、MAPK(p38)経路でPGE2産生を起こすことが報告され、その経路がAlumのTh2アジュバント効果により重要な役割を果たしていることが報告されている^{13,14,33)}。Th2タイプの免疫応答はIL-4, IL-5, IL-13などのサイトカインを特徴的に産生するCD4T細胞からなり、おもに抗体産生による液性免疫反応を促すことで、腸管寄生虫感染防御にかかわると同時に、IgE高値や好酸球浸潤を伴うアレルギー反応に関与している。

次世代のワクチン

これまでみてきたように自然免疫応答は獲得免疫応答を誘導するために必須だけでなく、誘導される獲得免疫応答の質にも大きく影響を与える。次世代のワクチンには予測可能な(predictable)活性をもつアジュバントを添加することが重要である。近年の自然免疫研究の進展によってある程度の予測は可能となりつつあるが、多様な自然免疫レセプターが複数の免疫系細胞にそれぞれ特徴的な発現パターンを示して分布し、同じ自然免疫レセプターを刺激しても細胞の種類によって産生されるサイトカインが異なる場合があること、二次的な組織由来のDAMPsによる影響、複数の自然免疫刺激による各シグナル間のクロストークの存在などを考慮すると、分子レベル、細胞レベル、組織レベルでこのような複雑な免疫ネットワークを理解するためのさらなる努力が必要である。

基礎的な理解に基づいた理想的な次世代ワクチンに求められる要件としては、①接種に伴って被接種者の健康を損なわないこと、②対象疾患の発症を予防する効果が高いこと、③接種回数や方法が簡便であること、があげられる(図5)。このような要件を満たす次世代ワクチンの開発には、病態の深い理解に基づいた優れたワクチン抗原の探

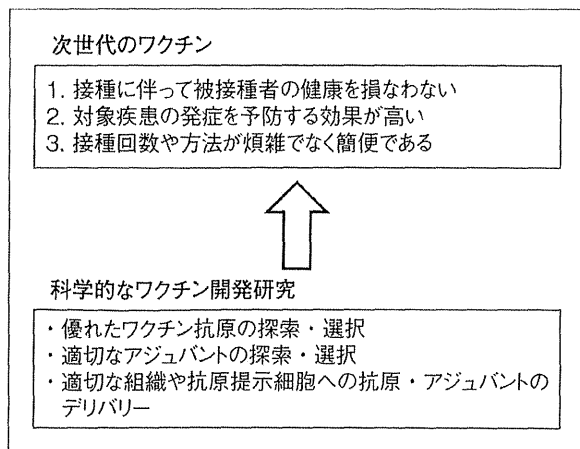


図 5 次世代ワクチンに求められる要件

索・選択はもとより、そのワクチン抗原に対して適切な獲得免疫応答を誘導できるアジュバントの探索・選択、さらにそれらのワクチン抗原やアジュバントを適切な組織や抗原提示細胞にデリバリーする DDS 技術の開発研究が重要であり、今後の課題である。

文献

- 1) Koyama, S. et al.: *Sci. Trans. Med.*, **2**: 25ra24, 2010.
- 2) Aoshi, T. et al.: *Curr. Opin. Virol.*, **1**: 226-232, 2011.
- 3) Takeuchi, O. et al.: *Cell*, **140**: 805-820, 2010.
- 4) Imai, Y. et al.: *Cell*, **133**: 235-249, 2008.
- 5) Ahrens, S. et al.: *Immunity*, **36**: 635-645, 2012.
- 6) Zhang, J. G. et al.: *Immunity*, **36**: 646-657, 2012.
- 7) Yamasaki, S. et al.: *Nat. Immunol.*, **9**: 1179-1188,

- 2008.
- 8) Hornung, V. et al.: *Nat. Med.*, **11**: 263-270, 2005.
- 9) Bernard, J. J. et al.: Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat. Med.*, 2012, Jul. 8. (Epub ahead of print)
- 10) Lindblad, E. B.: *Cell Biol.*, **82**: 497-505, 2004.
- 11) Shimada, K. et al.: *Immunity*, **36**: 401-414, 2012.
- 12) Flach, T. L. et al.: *Nat. Med.*, **17**: 479-487, 2011.
- 13) Kool, M. et al.: *Immunity*, **34**: 527-540, 2011.
- 14) Kuroda, E. et al.: *Immunity*, **34**: 514-526, 2011.
- 15) Marichal, T. et al.: *Nat. Med.*, **17**: 996-1002, 2011.
- 16) Negishi, H. et al.: *Nat. Immunol.*, **13**: 659-666, 2012.
- 17) LeibundGut-Landmann, S. et al.: *Nat. Immunol.*, **8**: 630-638, 2007.
- 18) Schoenen, H. et al.: *J. Immunol.*, **184**: 2756-2760, 2010.
- 19) Agrawal, S. et al.: *PLoS One*, **5**: e13418, 2010.
- 20) Franchi, L. et al.: *Immunol. Rev.*, **227**: 106-128, 2009.
- 21) Lamkanfi, M.: *Nat. Rev. Immunol.*, **11**: 213-220, 2011.
- 22) Schroder, K. et al.: *Cell*, **140**: 821-832, 2010.
- 23) Zhou, R. et al.: *Nature*, **469**: 221-225, 2011.
- 24) Nakahira, K. et al.: *Nat. Immunol.*, **12**: 222-230, 2011.
- 25) Murakami, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**: 11282-11287, 2012.
- 26) Nakanishi, K. et al.: *Cytokine Growth Factor Rev.*, **12**: 53-72, 2001.
- 27) Lefrancais, E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**: 1673-1678, 2012.
- 28) Schmitz, J. et al.: *Immunity*, **23**: 479-490, 2005.
- 29) Bonilla, W. V. et al.: *Science*, **335**: 984-989, 2012.
- 30) Spits, H. et al.: *Ann. Rev. Immunol.*, **30**: 647-675, 2012.
- 31) Koyasu, S. et al.: *Immunity*, **36**: 317-319, 2012.
- 32) Koyasu, S. et al.: *Front Immunol.*, **3**: 101, 2012.
- 33) Pelka, K. et al.: *Immunity*, **34**: 455-458, 2011.

* * *

ワクチン開発研究の展開

青枝大貴 石井 健

Summary

ワクチンは非常に効果の高い有用な医療として、その発見以来、人々の健康に大きな役割を果たしてきたが、そのワクチンがなぜ効くのかという疑問に答える分子メカニズムはあまり明らかになっていなかった。近年の自然免疫研究の進展によってアジュバントの作用機序が徐々に明らかになり、これまでのような経験に基づいたワクチン開発から、自然免疫研究の成果を科学的に取り入れた新しいワクチン開発への期待が高まっている。本章では、自然免疫やアジュバントという視点から、さまざまなアジュバントとそれらに対応する自然免疫受容体、さらにはこれらの自然免疫受容体を特徴的に発現する樹状細胞のサブセットについて概説する。現在のワクチンよりもより有効で、かつ安全性の高い次世代ワクチンの開発には、適切なワクチン抗原とアジュバントを適切な樹状細胞サブセットに標的することが重要と考えられる。

Key Words

● ワクチン ● アジュバント ● 自然免疫 ● 獲得免疫 ● 樹状細胞

はじめに

E. Jenner や L. Pasteur にはじまるワクチン研究は、とくに天然痘やポリオなどの重篤な伝染性感染症に対して非常に高い効果を上げてきた。天然痘は1977年のソマリア青年を最後に自然感染が報告されず、1980年に世界保健機関(WHO)によって天然痘の根絶が宣言され、また2000年には日本を含む西太平洋地域からのポリオ根絶が宣言された。ワクチン接種は費用対効果の高い有用な医療の1つであり、現在ではおよそ15種類の病原体に対するワクチンが世界で用いられ、疾病の流行防止や疾病の発症阻止および軽症化を目的として接種されている。しかしながら、感染症に対するワクチン接種の対象者が乳幼児や高齢者をも含むほぼすべての健常人であること、集団免疫(herd immunity)の観点からは多くの場合約80%以上の接種率が必要で大多数の人々に接種を推奨しなければならないことなどから、公衆衛生環境の整っ

た日本を含む先進国では、ワクチンの効果そのものよりも、むしろワクチン接種に伴って起こる発熱などの比較的軽微な副反応や、きわめてまれで発生予測の難しい重篤な副作用が重大な社会的問題となっている。さらに、未だ有効なワクチンが存在しないAIDS、結核、マラリアの3大感染症に加えて、エボラ出血熱などの新興感染症や、平均余命が延びたことによるがんや認知症の増加といった現代型の疾患や病態に対しても、従来の枠組みを超えた新たなワクチンの開発が望まれている¹⁾。これらの課題を克服するためには、これまでの経験に基づいた方法(empirical)をふまえた上で、最新の免疫学研究の知見を取り入れた科学的アプローチによるワクチンの開発研究が重要である。

23-1 自然免疫と獲得免疫

免疫学はワクチンのメカニズムを明らかにする

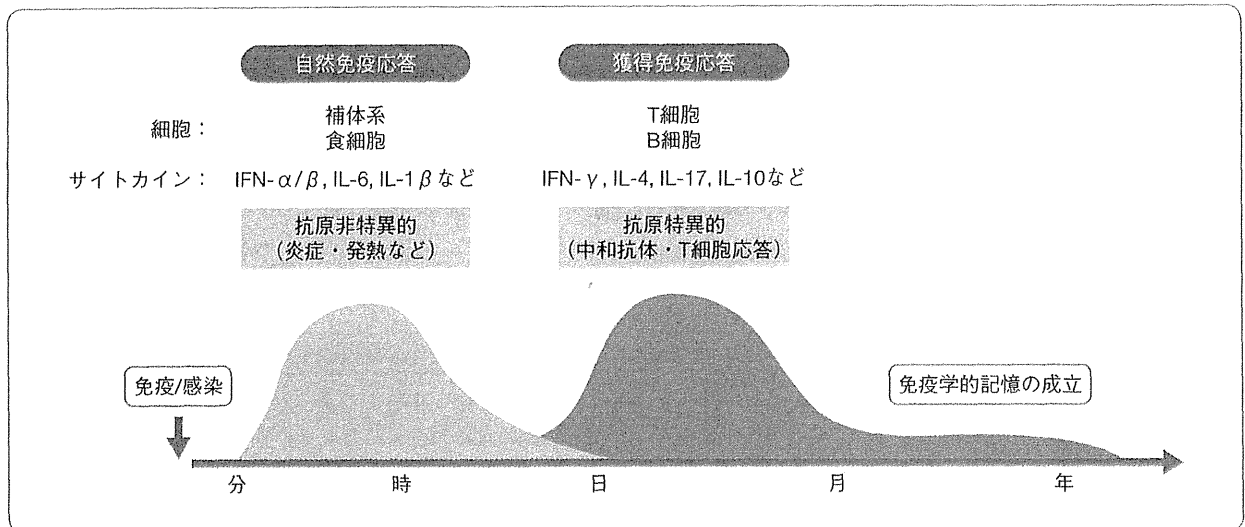


図23-1 ワクチン/感染後の生体免疫応答

ことに端を発して派生した学問分野であり、その研究は近年めざましい進展をとげ、複雑な免疫システムの詳細が少しずつ明らかになってきている。近年の免疫学による成果でワクチン研究に最も重要なものの1つとして自然免疫の分子メカニズムの解明があげられ、いわゆる「免疫」とよばれる現象も従来の炎症反応を含む「自然免疫」と“二度なし”の主体となる「獲得免疫」の2つの枠組みで理解されている(図23-1)。自然免疫 innate immunityとは病原体やワクチンを含む外来異物に対して早期に働く免疫反応で、おもに好中球やマクロファージなどの貪食細胞や、補体の活性化などからなる。貪食細胞などに発現する自然免疫受容体による細菌やウイルス由来の構成物の認識に伴ってさまざま

まなサイトカインやケモカインが誘導され、炎症や発熱、免疫系細胞の遊走などが惹起され、抗原非特異的な生体防御機構として機能する。それに対して、獲得免疫 adaptive immunity は、T細胞やB細胞によって担われ、抗原を特異的に認識しその排除に働く。また一度抗原特異的に活性化したT細胞やB細胞の一部はメモリー細胞として生体内に残り、2回目の感染などに対しては迅速かつ強力で感染や異物を排除する。このような獲得免疫を誘導することが“二度なし”といわれる免疫の主体をなしている。獲得免疫応答は強力でかつ抗原特異的であるため、感染に際しては非常に効果的に感染防御に働くが、一度自己の抗原に対してこのような獲得免疫系が活性化してしまう

Key Words 解説

- **ワクチン(予防接種)**：わが国で接種可能なワクチンは、定期接種(DTP, BCG, ポリオ, 麻疹/風疹, 日本脳炎)と任意接種(定期接種以外の Hib, 肺炎球菌, B 型肝炎, ロタウイルス, 水痘, おたふくかぜ, インフルエンザ, ヒトパピローマウイルス, A 型肝炎など)に分けられている。定期接種は公費負担で実施され無料で受けることができるが、任意接種のワクチンについては自治体などによる補助もあるが基本的には全額自己負担である。予防の観点からは生後2カ月前後のなるべく早期からワクチン接種を開始することが望ましいが、多くのワクチンを接種(1種類のワクチンについても期間をおいて複数回の接種が必要)するには、何回も小児科を訪れる必要があり、その負担を軽減するために2種類以上のワクチンを別々の接種部位に同日に接種する同時接種(欧米では一般的に行われている)を取り入れたワクチンスケジュールでの接種も行われているが、国内においては同時接種の安全性に対する懸念もゼロではない。

表 23-1 自然免疫受容体とリガンド (PAMP) および合成・精製リガンド (アジュバント)

自然免疫受容体 (PRR)	リガンド (PAMP)	合成・精製リガンド (アジュバント)	内在性リガンド (DAMP)	
TLR	TLR1/2	トリアシルリポペプチド	Pam3CSK4	
	TLR2/6	ジアシルリポペプチド	マクロファージ活性化リポペプチド (MALP-2)	
	TLR3	dsRNA	ポリI:C	mRNA ⁹⁾
	TLR4	リポ多糖 (LPS)	モノホスホリルリピド A (MPL)	HMGB1, HSP, OxPL ⁵⁾
	TLR5	細菌性フラジェリン	フラジェリン融合タンパク質	
	TLR7/8	ssRNA (RNA ウイルス)	イミキモド (R-837), レシキモド (R-848)	siRNA ¹⁰⁾
	TLR9	非メチル化 CpG DNA	CpG-ODNs (Type-A, Type-B, Type-C, Type-P)	宿主 DNA
	TLR11	プロフィリン様タンパク質 (トキソプラズマ)	不明	
RLR	RIG-I	5'-PPP ssRNA または 短い (~1 kb) dsRNA	不明	
	MDA5	長い (>2 kb) dsRNA	ポリI:C	
NLR	NOD1	ペプチドグリカン, ジアミノピメリン酸 (iE-DAP)	FK156, FK565	
	NOD2	ペプチドグリカン, ムラミルジペプチド (MDP)	ムラミルジペプチド (MDP)	
	NLRP3	細胞ストレス, リソソームの損傷	アルミニウム塩, MSU, シリカ	尿酸, ATP
	NAIP5	細菌性フラジェリン	フラジェリン融合タンパク質	
CLR	Dectin-1	β (1,3)-グルカン	カードラン, レンチナン, シゾフィラン	
	Dectin-2	高マンノース構造	Man9GlcNAc2	
	Mincle	トレハロース-6, 6-ジミコール酸 (TDM)	トレハロース-6,6-ジベヘナート (TDB)	SAP130 ⁸⁾
	Clec9A	?	?	アクチン ^{6), 7)}
ALR	AIM-2	dsDNA	不明	
	IFI16	dsDNA	不明	

dsDNA : 二本鎖 DNA, ssDNA : 一本鎖 DNA.

と重篤な自己免疫疾患を引き起こすことにもなるため、生体における獲得免疫の活性化は厳密に制御されなければならない。しかしまた同時に病原体に曝露された際には迅速に獲得免疫系を活性化させる必要がある。獲得免疫誘導の制御メカニズムはまだ完全に理解されているわけではないが、自然免疫系の活性化が獲得免疫誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある^{2), 3)}。

23-2 自然免疫受容体

自然免疫系の活性化は、生体を構成するさまざまな細胞に発現している自然免疫受容体がおもに

病原体に由来するリガンドを認識することから始まる。近年、次々と自然免疫受容体およびそのリガンドが同定されたことで、自然免疫系が非自己である外来異物や病原体を認識する仕組みが分子レベルで明らかになっている⁴⁾。これまでに同定されている代表的な自然免疫受容体としては、その分子構造に基づいて Toll 様受容体 (TLR)、RIG-I 様受容体 (RLR)、NOD 様受容体 (NLR)、C 型レクチン受容体 (CLR)、AIM2 様受容体 (ALR) の大きく 5 つに分類されている (表 23-1)。これらの受容体は病原体 (ウイルス、細菌、真菌、寄生虫) のさまざまな構成成分 (膜成分、鞭毛、核酸) を認識する。これらの病原体成分は宿主には存在しないため