

## 6. 細胞外核酸の生物学的意義と臨床応用

城内 直, 石井 健

核酸は、細胞内において遺伝子発現を担うだけでなく、細胞外にも存在し、自己免疫疾患、炎症性疾患、がんの病態に関与している。これを利用して、疾患のバイオマーカーへの応用がすでに研究されている。また、細菌感染の防御に関与する好中球由来の細胞外DNAも報告されている。さらに、感染防御に留まらず、細胞外DNAを介したワクチンアジュバントの作用機序も報告されている。これらの事象から、細胞外核酸は多様な機能を担うと推察される。本稿では、細胞外核酸の生理的意義と作用機序、そしてその臨床応用について概説したい。

### はじめに

細胞内外、そして自己・非自己にかかわらず、生体内には非常に多くの核酸が存在している。特に、生体内の細胞外核酸のレベルは、日常に起こる細胞死、病原微生物感染、慢性炎症疾患、創傷など、さまざまな要因により変動する。生体内では、これら細胞外の核酸を処理し、一定レベルに保つことで恒常性を維持している。この細胞外核酸の調節機構が破綻すると、慢性炎症性疾患、自己免疫疾患の発症リスクが増加する

可能性も示唆されている。一方で、細胞外核酸は微生物感染防御にも深く関与している。具体的に、病原微生物感染において、好中球はNETs (neutrophil extracellular traps) とよばれるDNAとさまざまなタンパク質の複合体を細胞外に放出し、網目状に張り巡らせて病原微生物を捕捉し、殺菌する。さらに、最近の研究から、ワクチンによく用いられるアラムアジュバント (第4章-5) の作用機序の1つとして、細胞外核酸の存在が明らかとなった。このように、細胞外核酸はさまざまな生理作用に結びついているため、疾

#### [キーワード&略語]

NETs, ワクチンアジュバント, TLRs, TBK1, LL37

**DAMPs** : damage-associated molecular patterns

**GAS** : group A streptococcus (A群レンサ球菌)

**IKK  $\epsilon$**  : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase epsilon

**NETs** : neutrophil extracellular traps

**PAMPs** : pathogen-associated molecular patterns

**pDCs** : plasmacytoid dendritic cells (形質細胞様樹状細胞)

**SLE** : systemic lupus erythematosus (全身性紅斑性狼瘡)

**TBK1** : TANK-binding Kinase 1

**TLRs** : Toll-like receptors (Toll様受容体)

#### The Biological features of extracellular DNA and RNA

Nao Jounai<sup>1)2)</sup>/Ken J. Ishii<sup>1)2)</sup> : Laboratory of Vaccine Science, Immunology Frontier Research Center, Osaka University<sup>1)</sup>/Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation<sup>2)</sup> (大阪大学免疫学フロンティア研究センターワクチン学<sup>1)</sup>/医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト<sup>2)</sup>)

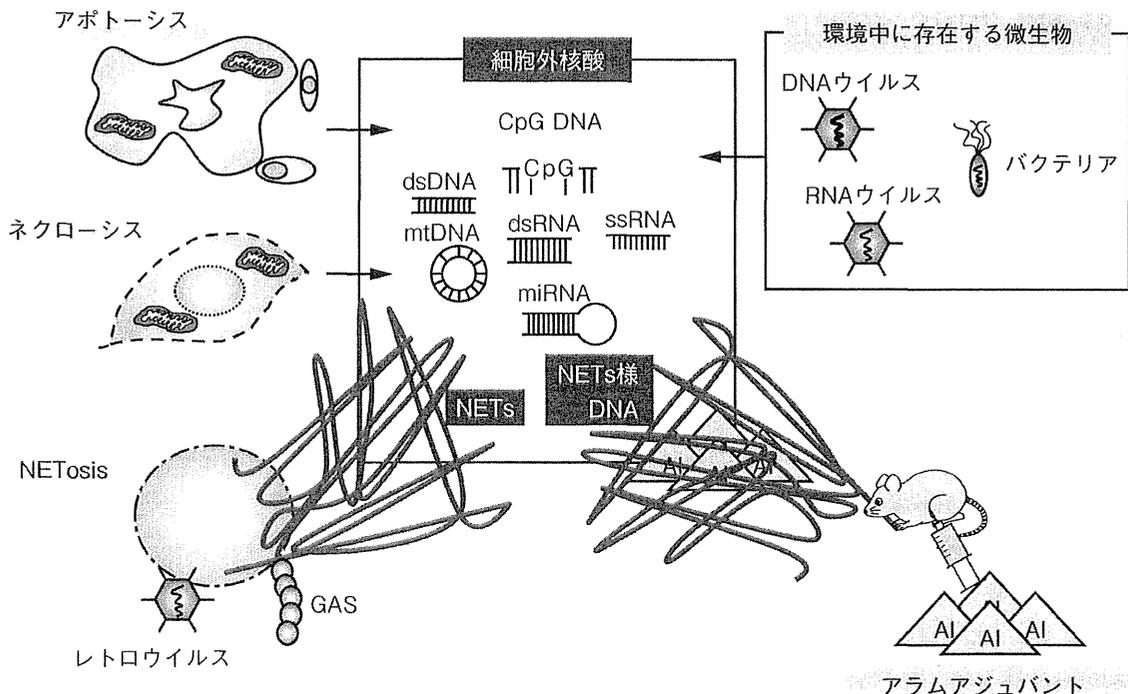


図1 細胞外核酸の供給源  
詳細は本文参照

病の診断マーカーとしての有用性が高い。また、非メチル化CpGモチーフや二本鎖RNAは、近年ワクチンアジュバントとして注目されているが、これも代表的な細胞外核酸の臨床応用とみなすことができる。本稿では、細胞外DNAまたはRNAの由来、生物学的意義と作用機序から、細胞外核酸の臨床応用まで、これまでの知見とさらなる可能性について述べる。

## ■ 細胞外核酸の種類とその由来

われわれの体は、アポトーシスまたはネクローシスといった細胞死を日常的に経験している。細胞の代表的な構成要素として、脂質、糖、タンパク質、そして核酸があげられるが、これらは死細胞から細胞外に放出される。よって細胞死は、1つの細胞外核酸産生メカニズムとして研究されている。もう1つに、細胞の核酸代謝により、恒常的に細胞外へDNAを分泌するメカニズムも報告されている。細胞外に存在する核酸の種類として、ゲノムDNA、ミトコンドリアDNA (mtDNA)、RNA、マイクロRNA (miRNA) が報告されている (図1, mtDNAについては第4章-2を参照)<sup>1)</sup>。これらの細胞外核酸は血中に認められるが、なかには

タンパク質や脂質と複合体を形成することにより、血中の核酸分解酵素から免れているものもある。RNAに関しては、がん患者の血中において、がん関連RNA断片が多量に認められている。miRNAに関しては、細胞内では遺伝子発現制御に関する機能が報告されているが、近年、血中での存在も報告されており、セラミド依存的な分泌機構により細胞外へ産生される。血中miRNAは、細胞死を起こした細胞からアポトーシス小体とよばれる直径1 μmの膜小胞やエキソソームとよばれる分泌小胞 (直径50~100 nm) に内包され、存在する<sup>2)</sup>。また、Ago2とよばれるタンパク質との複合体も報告されている<sup>3)</sup>。

前述した細胞外核酸の多くは定常状態においても認められるが、細菌感染によって誘導される細胞外DNAも存在する。よく研究されているのは、NETsとよばれる網目状のタンパク質とDNAの複合体である (図1)。NETsは細菌感染によって強く誘導されるが、TLRs (Toll-like receptors) リガンドを用いた刺激やPMA (phorbol myristate acetate) 刺激によっても誘導される。NETsの構成要素は、DNAのみではなく、ヒストンやエラスターゼ、HNP (human neutrophil

peptide), BPI (bactericidal/permeability increasing) タンパク質と複合体を形成している。NETs誘導の起因として、PKC (protein kinase C) を介したROS (reactive oxygen species) 産生が報告されている<sup>4)</sup>。ROS産生は細胞死を引き起こし、好中球由来のNETs形成が誘導される。興味深いことに、NETs形成時に誘導される細胞死は、アポトーシスやネクローシスと異なる特徴を有しており、これら細胞死と区別するため、NETosis (ネトーシス) とよばれる単語も存在する<sup>5)</sup>。NETs形成に関連して、ワクチンに用いられるアラムアジュバントも細胞外DNA産生を誘導することが示唆されている<sup>6)</sup>。しかしながら、アラムアジュバントによって誘導される細胞外DNAが好中球由来であるのか、現在解析中である。

これまであげた細胞外核酸は自己由来のDNAまたはRNAであるが、非自己の細胞外核酸も報告されている。例えば、抗生物質であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌は、細胞壁分解酵素による自己消化によって産生される細菌ゲノムDNAが報告されており、薬剤耐性菌のバイオフィーム形成に重要な働きを示すことが報告されている<sup>7)</sup>。また、環境中にも細胞外核酸が多量に存在し、海底の堆積物においては、乾燥重量1グラムあたり1 ng~31 μgであるとの報告もある(図1)。これらの細胞外DNAは、その環境に存在する真核・原核生物、ウイルス由来であることが明らかとなっており、その環境に生息する微生物の新たな形質獲得に関与していると考えられている。

## 2 細胞外核酸の生物学的機能

### 1) 炎症性疾患との関連

死細胞から産生される自己由来の細胞外核酸は、炎症応答の誘導と密接にリンクしている。例えば、病原微生物感染によって引き起こされた細胞死は、細胞外核酸の供給源となり、さまざまな細胞がこれら細胞外核酸を認識し、局所から全身に炎症応答を誘導する。それゆえ、古くから細胞外DNAは、DAMPs (damage-associated molecular patterns) の1つとして考えられていた。これと対を成して、PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) とよばれる、病原微生物由来の自然免疫活性化リガンドを指す単語も存在する。代表的な核酸系PAMPsとして、病原微生物由

来のゲノム核酸があげられる。興味深いことに、DAMPs, PAMPsはその認識機構を共有し、炎症応答を誘導しているように見受けられる。例えば、DNA核酸の認識に重要なTLR9は、自己・非自己にかかわらず、DNAによる炎症応答誘導に重要な役割を担っている(図2, 図3)。

PAMPs, DAMPsともに、外来微生物の侵入を防ぐためのマーカーとして認識され、宿主はその排除を行う。しかしながら、慢性炎症性疾患、自己免疫疾患、がんの患者においては、細胞外DNAやRNAのレベルが有意に高いことが示されている。つまり、細胞外核酸のレベルは炎症性疾患に密接にかかわることが明らかとなった(図2)。この機序は、マウスを用いた細胞外DNA代謝・分解の研究から明らかとなった。

血清中や尿など分泌液には、数々のエンドヌクレアーゼが含まれている。その1つであるDNase Iは、死細胞由来の細胞外ssDNA (single stranded DNA) やdsDNA (double stranded DNA) またクロマチンの代謝・分解を担っている。DNase IのDNA分解活性は、*in vitro*の系においてネクローシス後のクロマチンを分解し、低分子のDNA断片にすることが確認されている<sup>8)</sup>。この細胞外DNA代謝にかかわるDNase Iを欠損したマウスでは、炎症疾患である全身性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus : SLE)<sup>\*1</sup>の症状を示すことが認められた。また、多くの炎症性疾患の指標である抗dsDNA抗体や抗ssDNA抗体、ヌクレオソームに対する抗体も検出された。これらのことから、DNase I欠損による細胞外DNA代謝異常が、慢性炎症応答を誘発し、SLEのような炎症性疾患の引き金となっていることが示唆される。これを支持する報告として、SLE様の症状を呈する他のマウス種NZB/NZWマウスにおいても、DNase Iの血中内濃度が著しく低下しており、高い抗DNA抗体レベルも確認されている。ヒトでの報告例として、SLEの患者におい

#### ※1 全身性紅斑性狼瘡 (SLE)

自己免疫疾患の1つ。全身のさまざまな場所に多様な炎症症状を引き起こす病気の総称。皮膚にできる発疹が、狼に噛まれた痕のような赤い紅斑であることから、病名が名付けられた。原因は、遺伝的要因から環境要因までさまざまである。SLE患者の95%以上で、血液中の抗核酸抗体が高いレベルで認められる。

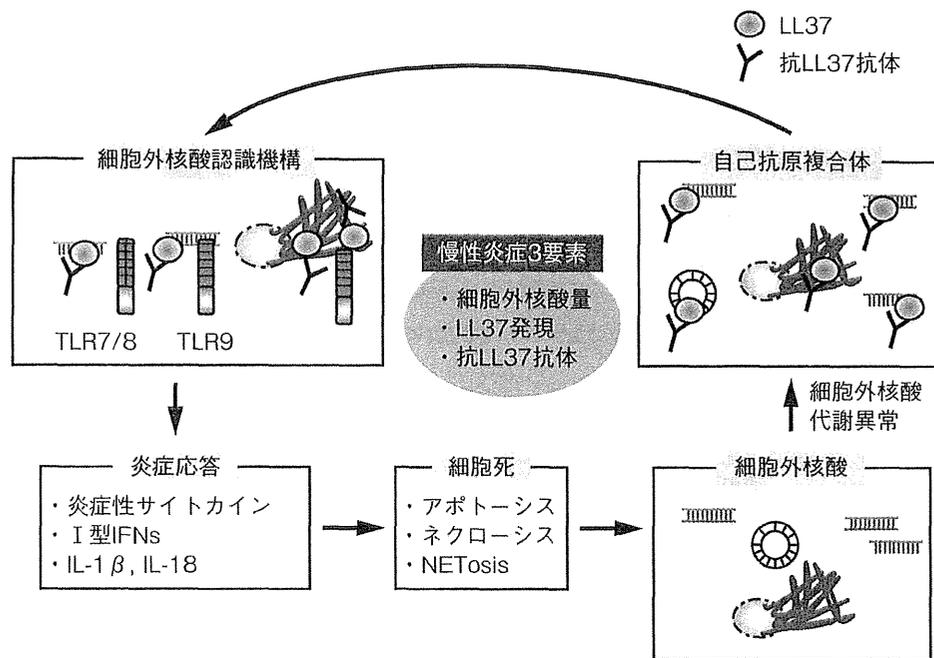


図2 細胞外核酸代謝異常による炎症性疾患  
詳細は本文参照

てDNase Iの変異が確認されており、exon2のA172Gが2人の女性で確認されている<sup>9)</sup>。他にも、DNA代謝異常によって過剰な炎症応答が誘発され、慢性炎症疾患の症状を呈することが、DNase II欠損マウス、TREX1 (DNase III) 欠損マウスを用いた研究においても報告されている<sup>10) 11)</sup>。これらのことから、細胞外核酸の代謝異常は、炎症性疾患を誘発し、数多くの慢性炎症性疾患の起因となっている可能性が示唆される。

## 2) NETsによる細菌感染の排除

NETsは好中球によって産生され、細菌感染の排除を担う。抗細菌活性は、NETsを形成しているDNA結合タンパク質が担っていると考えられる。逆をいえば、血中に存在するゲノム由来のDNAやミトコンドリアDNAは、それ自体は殺菌活性を示さない。これらのことから、NETsを形成するDNAは抗菌機序に重要でないように見受けられるが、実際は重要な機能を有している。事実、細胞内感染細菌であるA群レンサ球菌 (group A streptococcus : GAS) 感染は、好中球のNETs産生を誘導し排除されるが (図1)、ある種のGAS株は分泌型DNaseを発現しており、NETsを破壊、体内深部へ浸潤し症状を悪化させる<sup>12)</sup>。つまり、NETs構成成分であるDNAは、細菌排除に重要な役割

を担っていることが示唆されている。NETsを構成するDNAの役割についてさまざまな意見があるが、主に、正に帯電する抗菌タンパク質を感染部位に停める滞留効果や、菌の捕捉に重要であると考えられている。また、NETsが細菌感染のみならず、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus type 1 : HIV-1) の感染において、ウイルスの捕捉と失活を担うという研究報告もなされた<sup>13)</sup>。

NETsは病原微生物感染の排除に重要であるが、最近の報告によるとSLEの患者において、過剰なNETs形成が認められている<sup>14)</sup>。過剰なNETsの産生によって、NETs構成要素である自己DNAとそのキャリアータンパク質LL37の複合体が、宿主認識機構を介したI型インターフェロン (Type I IFNs) を誘導し、慢性的な炎症応答を誘発する (図2)。興味深いことに、SLE患者に認められるNETs形成は、抗LL37抗体で患者から分離した好中球を刺激することによって誘導される。この結果は、SLEや乾癬の患者において、LL37発現が増強していること、そして抗LL37抗体が認められることと相関しており、慢性炎症応答の誘導を説明する鍵となると考えられる (LL37については3で詳述)。

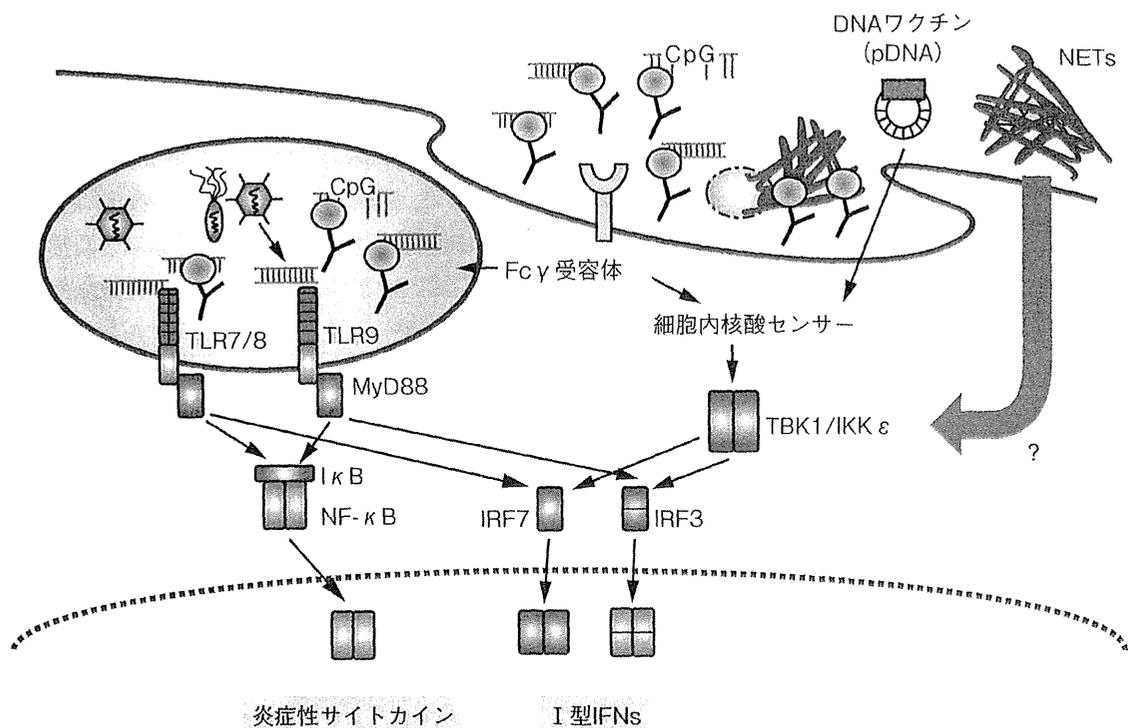


図3 細胞外DNAの認識機構  
詳細は本文参照

### 3) アラムアジュバントとの関連

アラムアジュバントは、子宮頸がんワクチン、B型肝炎ワクチンなど、多くのワクチンに含まれる代表的なワクチンアジュバントである。アラムアジュバントを用いたワクチンでは、抗原特異的抗体が強く誘導されることが古くから認められていた。また、アレルギー反応の起因抗体サブクラスであるIgE誘導も増強されるが、その詳細な作用機序は不明であった。しかしながら近年、アラムアジュバントをマウス腹腔内に投与すると、投与カ所において大量の細胞外DNAが認められることが明らかとなった<sup>6)</sup>。アラムアジュバントの代わりに、裸のDNAと抗原を投与してもアラムアジュバントと同様な効果が得られたこと、さらに、アラムアジュバント投与カ所の腹腔浸潤液をDNase処理するとアラムのアジュバント効果が消失することから、アラムアジュバントにより誘導される細胞外DNAは、アラムのアジュバント効果を説明する作用機序の1つと考えられる。興味深いことに、アラムアジュバントによる細胞外DNAの出現は、IgE産生に強く関与して

いることも示唆されている。つまり、アラムアジュバントによる細胞外DNA産生は、アラムアジュバントの副作用の1つであるアレルギー応答増強の作用機序とみなされ、今後の詳細な解析によって、アレルギー反応を誘発しない安全なワクチン開発が可能となる。

### 4) 環境中の核酸の意義

細胞外DNAは生体内のみならず、われわれヒトを含めた生物個体外、つまり環境中にも数多く存在する。古くは1959年に、ヒト培養細胞において細胞外DNAが細胞に取り込まれ、分解から免れたわずかなDNA populationが、ゲノムへ取り込まれることが示されていた<sup>15)</sup>。分子生物学では、細菌の形質転換や薬剤耐性菌の出現メカニズムとしてよく研究されているが、真核細胞においても、細胞外DNAの取り込み、そしてゲノムへの組み込みが認められている。事実、われわれヒトゲノム内にもレトロウイルス由来の配列が同定されている。つまり、細胞外核酸は環境中にありふれており、免疫学における炎症応答誘発の起因としてだけでなく、生物の進化に重要な核酸種であることが

示されている。一方で、細胞の形質転換を引き起こす際の炎症応答の有無、または核酸の種類、配列、構造による核酸代謝の多様性など、いまだ不明な点は数多く存在する。

### ③ 細胞外核酸の認識機構

#### 1) TLRの関与する経路

細胞外核酸の認識機構と作用機序は、近年精力的に行われている。そのなかでもよく研究されている分子は、核酸受容体であるTLR7またはTLR9である。TLR7はssRNAを認識するとされ、TLR9はssDNAや非メチル化CpGの受容体である。しかしながら、TLR7そしてTLR9ともに、細胞内のエンドソームに局在していると報告され、いかにして細胞外核酸がこれら受容体に認識されるかは、不明であった。SLEをはじめとした炎症性疾患の患者に認められる細胞外核酸は、抗DNA抗体や抗RNA抗体と複合体を形成していることから、Fc $\gamma$ 受容体を介して細胞内に取り込まれ、TLR7やTLR9にコンタクトする可能性が示唆されていた<sup>16)</sup>。しかしながら近年、LL37とよばれるタンパク質がDNAキャリアータンパク質として機能し、TLR9へ細胞外DNAを送達する可能性が示唆されている<sup>14)</sup>。

LL37は抗菌ペプチド<sup>※2</sup>としてよく研究されており、NETs同様、好中球から産生される。LL37の抗菌活性は、主に細菌の細胞膜破壊と考えられる。これは、LL37が正に荷電しており、静電的に菌体膜表面に結合、挿入され、菌体膜に小孔を生じ、膜破壊を誘導するためであると考えられる。つまり、負に帯電している核酸と結合することは、容易に想像できる。SLE患者において、抗核酸抗体と同様に、LL37に対する自己抗体も多く認められる。このことは、細胞外DNAまたはNETs-LL37-抗LL37抗体の免疫複合体が、Fc $\gamma$ 受容体を介してTLR9を発現する形質細胞様樹状細胞

(plasmacytoid dendritic cells: pDCs)に取り込まれ、炎症性サイトカイン産生を引き起こすと考えられる(図3)。細胞外DNAとLL37の免疫複合体が、SLE患者における起因物質であることは示されているが、同様に、細胞外RNAとLL37の複合体に関しても、ヒトの樹状細胞を活性化することが示されており、細胞外RNA-LL37-抗LL37抗体がTLR7またはTLR8を介して、慢性炎症性疾患の起因となる可能性が示唆されている<sup>17)</sup>。

#### 2) I型IFNsの関与する経路

細胞外核酸が細胞内へ取り込まれた後の下流シグナル分子として、前述したようなTLR7/8/9以外にも、数多くの受容体候補分子が同定されている。どの分子もすべての核酸認識機構を説明するには至っていない。しかしながら、核酸の刺激によって誘導される炎症性サイトカイン、特にI型IFNs産生にかかわる必須因子が同定されている。これはDNAワクチンの作用機序解析から見出された。

DNAワクチンとは、抗原遺伝子を発現するプラスミドDNA(pDNA)を生体内に投与し、pDNAを取り込んだ細胞内で抗原が発現し、その抗原に対して免疫を誘導するワクチン手法である。つまり、細胞外DNAの作用機序を利用したワクチンの手法であるとも捉えられる。当初、pDNAは細菌由来であり、非メチル化CpGモチーフを含むことから、TLR9が受容体として考えられていた。しかしながら、TLR9欠損マウスにおいても、DNAワクチンの免疫原性が減弱しないことから、他の作用機序が存在することが示唆されていた。そこで、自然免疫にかかわるさまざまな分子の欠損マウスを用いて免疫実験を行った結果、I型IFNs受容体の欠損マウスにおいて、DNAワクチンの免疫原性が顕著に低下したことが認められた。I型IFNs発現は、転写因子であるIRF3またはIRF7がリン酸化され活性化することにより、誘導される。これら転写因子を活性化するリン酸化酵素はTBK1(TANK-binding kinase 1)またはIKK $\epsilon$ (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon)であることが示されている。そこで、TBK1/IKK $\epsilon$ の欠損マウスにDNAワクチンを投与したところ、DNAワクチンの免疫原性の消失が認められた<sup>18)</sup>。このことから、DNAワクチンの作用機序にはTBK1を介した自然免疫の活性化が重要である

#### ※2 抗菌ペプチド

微生物感染に対する防御機構の1つとして、生体が産生する30個ほどのアミノ酸からなるペプチド。ヒトの産生するペプチドとして、ディフェンシンやカテリシジンがよく知られている。産生細胞として好中球、上皮細胞が主にあげられる。LL37はカテリシジンのカルボキシ末端の37アミノ酸からなり、カテリシジンがプロテアーゼで切断されることにより産生される。

ことが明らかとなった (図3)。

TBK1 欠損マウスの特徴として、TNFシグナルの欠損があげられる。これにより、IKK  $\beta$  欠損マウス、NF- $\kappa$  Bのサブユニットの1つであるRelA欠損マウスと同様、TBK1 単独欠損マウスは、肝臓細胞の過剰なアポトーシス誘発によって胎生致死となる。つまり、TBK1 は、自然免疫制御において、負の制御も担う恒常性維持に必要不可欠なリン酸化酵素であると考えられる。現在のところ、TLR9を介した炎症応答の誘導において、TBK1 は関与しないとされているが、細胞外核酸の認識機構におけるLL37複合体とTBK1 の関係を明らかにすることは、炎症性疾患の作用機序解明だけでなく、DNAワクチン開発をはじめとした臨床応用に向けても、重要な課題である。

## ■ 細胞外核酸の臨床応用

遺伝子解析技術が急速に発展している昨今、細胞外核酸は炎症性疾患、がんのバイオマーカーとして非常に有用である。実際に、Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Array 6.0を用いて、乳がんの特異的な細胞外DNA量を評価している<sup>19)</sup>。すでに12年分のフォローアップがなされ、診断・治療のマーカーとして研究が進められている。

細胞外DNAは、ワクチンへの応用、アジュバントへの応用も盛んである。そのなかでもDNAワクチンは、まさに細胞外DNAの臨床応用例と考えられる。細胞外DNAの認識機構、自然免疫活性化能、過剰な炎症応答誘導のメカニズム解明は、すべてDNAワクチン開発推進に直結する。DNAワクチンの上市品はいまだないが、いくつかの海外企業は第1/2相臨床試験を進めている。DNAワクチン開発に歯止めをかけている問題点として、自己免疫疾患や炎症性疾患の発症リスクの他に、ゲノムへのpDNA断片の挿入が懸念されている。今後のさらなる解析によって、ゲノムへ挿入されないDNA配列や、一過性の自然免疫活性化を可能とするpDNAベクター開発につながることを期待する。

アジュバント開発においては、CpGモチーフを含むオリゴDNA、二本鎖RNAなどがあげられる。両者とも、TLRを介した自然免疫活性化を介して、抗原特異的な免疫誘導を増強する目的で使用されている。臨床試験において、すでに好成績を収めているものもあり、

近い将来、これら上市品が出ることも期待される。

細胞外核酸のほとんどが、宿主の炎症応答誘発に関与している。このことから、細胞外核酸は宿主細胞にとって有害な一面も有するが、NETs形成やDAMPsとしてのアラート機能は、病原微生物の排除に必要不可欠である。言い換えると、細胞外核酸のレベルを一定に保つ制御機構、代謝機構が非常に重要であると考えられる。本稿では詳細に取り上げなかったが、プリン骨格を含む化合物と尿酸値の関係、そして痛風や関節炎などの免疫疾患発症に至るまで、核酸の代謝異常が起因となっているのはいうまでもない。それゆえ、細胞外核酸の認識機構と炎症応答誘発メカニズムの解析は、炎症性疾患、慢性炎症による肥満や糖尿病の新規治療薬開発の標的である。今後のさらなる解析により、細胞外核酸代謝異常にかかわる疾患の新規治療薬開発に期待したい。

## おわりに

細胞外核酸は、古くからわれわれを含む生物の身の回りに存在し、進化や新たな形質獲得に寄与していたと考えられる。しかしながら、昨今の分子生物学、免疫学の発展により、細胞外核酸と炎症性疾患の関係が明らかとなり、これまでに原因不明とされていたいくつかの難治療性疾患の治療法開発の糸口となっている。また、疾病バイオマーカーとしての細胞外核酸の利用、ワクチンアジュバント開発への応用など、臨床応用も進められている。細胞外核酸の認識機構や核酸種による詳細な特性の違いなど、いまだ明らかとなっていない部分もあり、今後も細胞外核酸研究は加速度的に発展していくことはいうまでもない。細胞外核酸研究に基づく創薬研究の発展により、難治療性疾患の治療薬開発、副作用低減のワクチン開発につながることを大いに期待して止まない。

## 文献

- 1) Mitra, I. et al. : J. Biosci., 37 : 301-312, 2012
- 2) Kosaka, N. et al. : J. Biol. Chem., 285 : 17442-17452, 2010
- 3) Schöler, N. et al. : Genome Med., 3 : 72, 2011
- 4) Remijnsen, Q. et al. : Cell Death Differ., 18 : 581-588, 2011
- 5) Steinberg, B. E. & Grinstein, S. : Sci. STKE, 2007 : pe11, 2007

- 6) Marichal, T. et al. : Nat. Med., 17 : 996-1002, 2011
- 7) Pozzi, C. et al. : PLoS Pathog., 8 : e1002626, 2012
- 8) Napirei, M. et al. : Nat. Genet., 25 : 177-181, 2000
- 9) Yasutomo, K. et al. : Nat. Genet., 28 : 313-314, 2001
- 10) Kawane, K. et al. : Nature, 443 : 998-1002, 2006
- 11) Morita, M. et al. : Mol. Cell. Biol., 24 : 6719-6727, 2004
- 12) Walker, M. J. et al. : Nat. Med., 13 : 981-985, 2007
- 13) Saitoh, T. et al. : Cell Host Microbe, 12 : 109-116, 2012
- 14) Lande, R. et al. : Sci. Transl. Med., 3 : 73ra19, 2011
- 15) Gartler, S. M. : Nature, 184 (Suppl 19) : 1505-1506, 1959
- 16) Lövgren, T. et al. : Arthritis Rheum., 50 : 1861-1872, 2004
- 17) Ganguly, D. et al. : J. Exp. Med., 206 : 1983-1994, 2009

- 18) Ishii, K. J. et al. : Nature, 451 : 725-729, 2008
- 19) Shaw, J. A. et al. : Genome Res., 22 : 220-231, 2012

<筆頭著者プロフィール>

城内 直：横浜市立大学大学院医学研究科で学位を取得後、カリフォルニア大学ロサンゼルス校に留学。大学院では、DNAワクチン研究や、オートファジーと細胞内核酸認識機構の相互作用の研究を行っていた。留学中は、mTOR機能に関与する化合物の標的分子同定手法の研究に従事していた。現在、石井 健教授のもと、アジュバントの作用機序研究と細胞内核酸認識機構の研究に従事している。抱負は、自ら進んで投与されたいと思えるような、安全なワクチンアジュバントの開発である。

## 特集

### ワクチン製造をめぐる 規制・製造技術の最新動向

## 5

# アジュバント開発研究の新展開： 自然免疫から審査行政

Vaccine adjuvant : from innate immunity to regulations

独立行政法人医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト

鉄谷耕平, 石井 健

KOHHEI TETSUTANI, KEN J. ISHII

Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation

## はじめに

本稿では自然免疫アジュバントについて現在の知見を概説する。体内での免疫応答およびワクチンの機能を振り返り、ワクチンの機能を増強する因子であるアジュバントについて、安全性および有効性の評価法を概観する。

## 1. 自然免疫と獲得免疫

### (1) 自然免疫

自然免疫は、体内に侵入する病原体・ワクチンなどの外来物に対し第一に働く排除機能であり、多くの場合外来物の排除が自然免疫機構のみによって可能である。自然免疫機構は、①生体バリア(皮膚や粘膜上皮など上皮細胞による外来物侵入の物理的な阻止)、②好中球・マクロファージなどの貪食細胞やNK細胞などの宿主免疫細胞、③補体、凝固因子、サイトカインなどの液性因子によって構成される。自然免疫細胞が外来物を認識する分子機構には、さまざまな自然免疫受容体が知られており、核酸・細胞膜成分や鞭毛成分などの病原体由来の構成物を、特有の分子構造“病原体関連分子パターン(Pathogen-Associated Molecular Patterns ; PAMPs)”として認識する(Pattern Recognition Receptor ; PRR)。獲得免疫の受容体が、遺伝子再構成・体細胞突然変異などを起こすことにより、自己由来など病原体以外の物質

を含めより幅広い物質を抗原として認識すること、および極めて厳格に個々の抗原を区別して認識するのと異なり、PRRは遺伝子変異を起こさず、そのリガンド認識は微生物由来の比較的限られた物質に限定されること、およびリガンド特異性は高いものの、獲得免疫の抗原認識に比較するとやや“大雑把”な認識であると考えられている。自然免疫受容体を介して活性化された細胞はさまざまなサイトカインやケモカインを分泌して、抗原非特異的な生体防御機能を誘導するだけでなく、獲得免疫をより強く誘導する。

### (2) 自然免疫系による獲得免疫系の誘導

病原体ないしワクチン抗原は体内に入ったのち、貪食細胞および樹状細胞の抗原提示細胞によって処理され8~15アミノ酸長ほどの小さいペプチドとして、主要組織適合抗原とともにT細胞ないしB細胞に抗原として提示される(signal-1)。しかし抗原ペプチドだけでは不十分で、抗原提示細胞の自然免疫受容体への刺激(signal-0)およびリンパ球への補助刺激(signal-2)があわさって初めて十分な獲得免疫誘導がなされる(図1)。

またToll-Like Receptor (TLR), RIG-I-Like Receptor (RLR), Nod-Like Receptor (NLR), C-type Lectin-like Receptor (CLR), AIM2-Like Receptor (ALR)などの自然免疫受容体によって、誘導される獲得免疫の型が異なることが知られる。例えば、抗原提示細胞である樹状細胞がTLRを介して活性化されると、樹状細胞が産生す

アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政

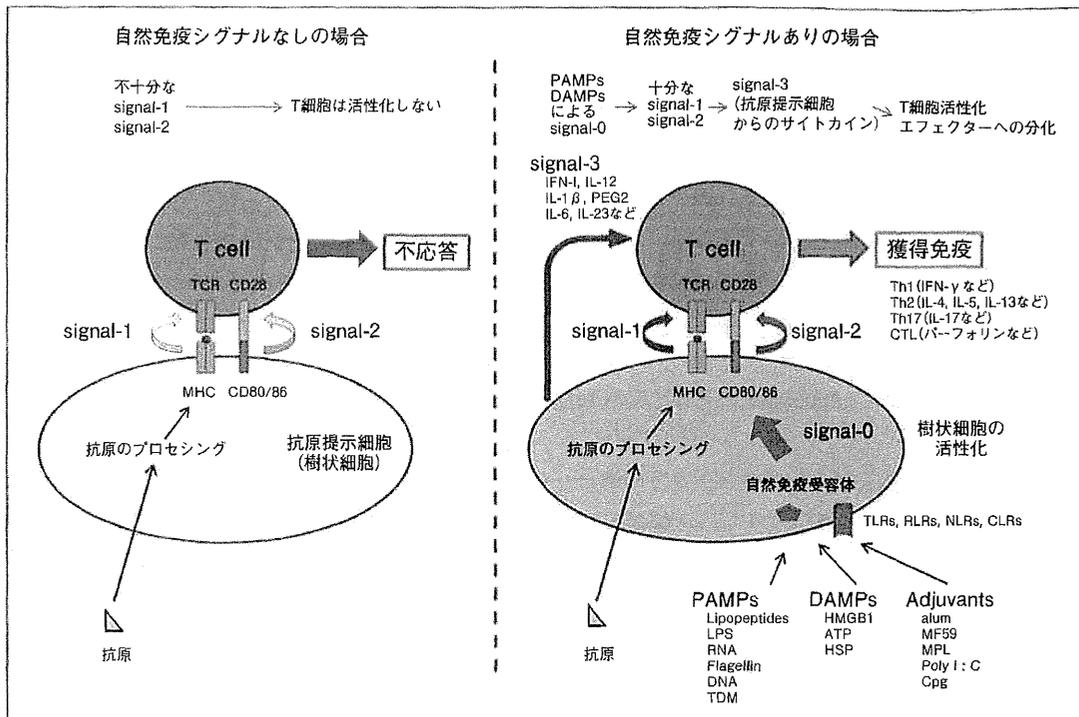


図1 自然免疫シグナルによる獲得免疫誘導<sup>1)</sup>

るサイトカインの種類が大きく影響され、獲得免疫を調整してTh1型免疫応答を誘導し、細胞性免疫を調整する。ほとんどのTLR刺激は樹状細胞を刺激してTh1細胞の分化を誘導する<sup>2,3)</sup>。また外来性抗原のMHCクラス1による“クロスプレゼンテーション”能力が増強され、抗原特異的に細胞傷害性T細胞が誘導される<sup>4)</sup>。ただ記憶免疫細胞に対してTLRがどのような作用を示すのかについてはまだわかっていない。

(3) 獲得免疫系

獲得免疫は、体内に侵入する病原体・ワクチンなどの外来物をTリンパ球やBリンパ球が特異的に排除する機構である。抗原提示細胞によって外来物はリンパ球に提示され、リンパ球はT細胞受容体あるいは免疫グロブリンおよびT細胞受容体でこれらを抗原と認識する。そこでは、糖・脂質・炭水化物・リン脂質・核酸・タンパク質など多様な分子が、極めて厳格に区別され認識される(抗原特異性)。抗原特異的にこれらの細胞が活性化されるとクローン的に増殖し、外来物の排除に働く。また、活性化された抗原特異的なリンパ球の一部は記憶免疫細胞として長時間生存し、次回以降同一抗原が体内に侵入した際には初回曝露時と同様、抗原特異的かつクローン

的に、初回曝露時よりも迅速に活性化されて(secondary expansion)、病原体を速やかに排除する。

B細胞は形質細胞に分化して抗原特異的な抗体を産生する。形質細胞は病原体排除ののち脾臓ないしリンパ節において死滅するが、一部の形質細胞は骨髄に移動しそこで数年以上生存し抗体を産生し続けるほか、活性化したB細胞の一部は記憶免疫細胞となってやはり長期間生存する。抗体は標的を排除し、標的の侵入を予防ないし標的による症状を軽減するが、そのメカニズムは、①毒素の活性部位に結合し、毒素活性を阻害する、②ウイルスの細胞侵入部位に結合し、細胞への侵入および増殖を阻害する、③オプソファゴサイトーシスを活性化する、④補体系を活性化する、などである。抗体そのものの体内での寿命は数カ月程度であり、タンパク質として分解され処理される。

CD8陽性T細胞はエフェクター細胞となり、直接的(パーフォリンやグランザイムの分泌など)ないし間接的(サイトカイン分泌)に、抗原特異的に標的を排除する。CD8陽性T細胞は標的排除ののち大部分が死滅し、ごくわずかが記憶免疫細胞として体内で長期間生存する。また、CD4陽性T細胞は活性化してCD8陽性T細胞ないしB細胞をTh1あるいはTh2型などの免疫型に活性化する

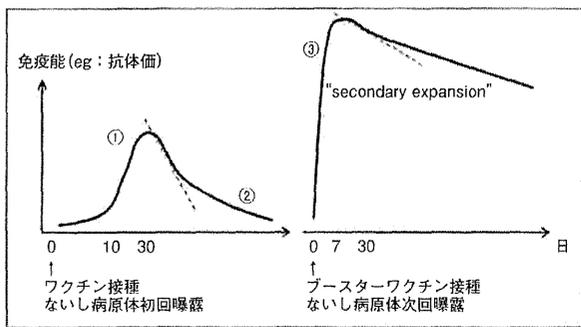


図2 ワクチン接種ないし病原体曝露時に惹起される免疫応答<sup>9)</sup>

が、標的排除後は同じく記憶免疫細胞となって長期間生存する。

記憶免疫細胞は、抗原提示後エフェクター細胞として活性化したT細胞ないしB細胞のうち、一部が長寿化したものである。セントラルメモリー、エフェクターメモリーと呼ばれる表現型が知られるほか、初回抗原提示時にすでに記憶免疫細胞となるよう運命づけられる一群があるなど、記憶免疫細胞は多種かつ多様な細胞群であるらしい。

期間をあけて同一の抗原をもつ病原体が再度体内に入った際には、血中にまだ残っている抗体が即時的に反応し排除する。また、当該抗原に反応しうる記憶免疫細胞(B細胞・T細胞)が直ちに活性化してクローン的に増殖し、病原体を排除する。その際、抗原提示細胞によるsignal-0およびsignal-2は不要であり、抗原が提示されるだけで記憶免疫細胞は活性化されるため、このときの排除のスピードは初回曝露時よりも数倍以上速い(Secondary Expansion)。またその後の免疫応答の減弱速度も、初回曝露時ないしワクチン接種時に比べると緩やかである(図2)。

#### (4) Toll-Like Receptor

1996年、リンパ球をもたず獲得免疫能のないショウジョウバエにおいてTollと呼ばれる受容体が真菌を特異的に認識し、引き続く応答によって抗真菌ペプチドが誘導され、真菌を排除することがわかった<sup>6)</sup>。哺乳類においてもTollと相同する受容体の存在が示され<sup>7)</sup>、Toll-Like Receptorと名づけられた。

TLRファミリーは1回膜貫通部分をもつ受容体で、ヒトではTLR1~13まで13種類あり、細胞外領域にロイシンリッチリピート(LRR)をもちPAMPsを認識する。細胞内領域にIL-1受容体の細胞内領域と相同性をもつToll/IL1R相同領域(TIR)をもち細胞内シグナル伝達経

路を活性化する。TLR1~9はいずれの種でも保存されている<sup>8)</sup>。

TLRは樹状細胞・マクロファージや好中球などの食細胞に強く発現している。これらの自然免疫担当細胞の活性化はTLRを介しており、各TLRにはそれぞれ特異的なリガンドが同定され、特異的な細胞内シグナル伝達が起こる。外来性リガンドには主に微生物由来の分子があり、内在性リガンドには危険シグナルdanger signalと呼ばれる宿主由来の死細胞や傷害組織由来の分子がある。

TLRは細胞における局在リガンドにより2つのグループに大別される。1つは細胞表面に存在するTLR1, 2, 4, 5, 6で、これらは微生物の外膜、細胞壁や鞭毛などの成分をそれぞれ特異的に認識する。もう1つは細胞内のエンドソームに存在するTLR3, 7, 9で、これらは核酸を認識する。TLR3は二本鎖RNAを、TLR7は一本鎖RNAを、TLR9はウイルスや細菌の核酸に高頻度にみられるCpGモチーフを含む非メチル化DNA(後述)を認識する(表1)。

細胞表面型TLRの内因性リガンドとしては、死細胞・傷害組織などに由来する細胞外マトリックスタンパク質・熱ショックタンパク質・High-Mobility Group Box-1(HMGB1)などがある<sup>9)</sup>。また核酸認識型TLRの内因性リガンドには、死細胞から遊離した自己核酸とタンパク質の複合体がある。余談ながら、炎症などで体内組織が破壊され自己細胞由来の核酸が放出されると、正常状態では血清中の核酸分解酵素によって分解されるため、TLR3, 7, 9の細胞内エンドソームに存在する核酸認識型TLRには認識されず、自然免疫応答を惹起しない<sup>10)</sup>。しかし重度の炎症や自己免疫疾患においては、自己核酸が抗DNA抗体、LL37やHMGB1との複合体を形成するなどして、酵素分解を免れ細胞内に取り込まれてTLRに認識されうるため、自己免疫疾患の増悪に寄与する<sup>11,12)</sup>と考えられる。

アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政

表1 TLRリガンドとアジュバント

| TLR<br>(発現部位)       | 自然界で知られる<br>リガンド           | ワクチンに適用さ<br>れるアジュバント<br>(由来)          | 臨床試験例                               |
|---------------------|----------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| TLR1/2<br>(細胞表面)    | 細菌の細胞膜<br>トリアシル化<br>リポペプチド | Pam3Cys<br>(MALP2由来合成<br>化合物)など       | ライム病ワクチン                            |
| TLR3<br>(エンドソーム)    | 二本鎖RNA                     | poly(I:C) (合成<br>核酸poly(I:C)由<br>来)など | 腫瘍免疫療法                              |
| TLR4<br>(細胞表面)      | グラム陰性菌の<br>細胞壁リポ多糖<br>体    | MPL(LPS由来合<br>成化合物)など                 | HBVワクチン,<br>HPVワクチン, マ<br>ラリアワクチンなど |
| TLR5<br>(細胞表面)      | 細菌の鞭毛成分<br>フラジェリン          | フラジェリン                                | 前臨床試験：腸チ<br>フス・ペスト・緑<br>膿菌ワクチン      |
| TLR2/TLR6<br>(細胞表面) | 細菌の細胞膜<br>ジアシルリポ<br>タンパク質  |                                       |                                     |
| TLR7/8<br>(エンドソーム)  | 一本鎖RNA                     | 抗ウイルス薬<br>イミキモドなど                     | HPVワクチン                             |
| TLR9<br>(エンドソーム)    | 非メチル化<br>CpG DNA           | K型CpG-ODN<br>(合成核酸)                   | HBVワクチン, マ<br>ラリアワクチンなど             |

2. ワクチンアジュバント

(1) ワクチンアジュバントの役割

牛痘罹患者が天然痘に罹患しないように、対象となる病気に類似するが軽症な別の疾患にあらかじめ感染しておけば、当該疾患の感染あるいは重症化を予防できる。また麻疹のように、いったん感染し治癒したのちには終生にわたる当該疾患に対する免疫が付与される。ワクチンはこういった免疫現象を技術化したものである。病原性をもたないワクチン抗原をあらかじめ接種して抗原特異的な免疫担当細胞・抗体を誘導しておけば、病原性のある病原体が侵入した際に、病原体特異的に速やかに応答、病原体を排除し、感染症を発症しない。

ワクチンは抗原の種類によって弱毒化生ワクチンと不活化ワクチンとに分かれ、後者は抗原の精製度によって不活化全粒子・全死菌体ワクチン、不活化スプリットワクチン、不活化サブユニットワクチン、遺伝子組換えタンパクワクチン、DNAワクチンと分類される(表2)。生ワクチンよりも不活化ワクチンのほうが免疫原性は弱く、不活化ワクチンでも抗原が全粒子・全死菌体からエピトープ単独へと精製・単純化が進むほど免疫原性が弱まるため、それを補うためのアジュバントがトキシイドやサブユニットワクチンの多くに添加される。

ワクチンの歴史において、抗原の精製・単純化は主に安全性への志向から追求されており、それにともなってアジュバントの重要性は強まっている。トキシイドが20世紀初頭に相次いで開発されたときに、期待されたほどのワクチン効果はみられなかったため、ワクチン効果を補助する(*adjuvare*[L])のものとしてさまざまな添加物が試みられたことがアジュバントの創始である。近年では例えば新型インフルエンザのワクチンの開発において、2011年9月の世界保健機構(World Health Organization; WHO)集計による約200のプロジェクトの約2/3はアジュバントを含んでいる<sup>19)</sup>。生ワクチンにはアジュバントは添加されないが、不活化全粒子ワクチンにはアルミニウム塩が添加され、その他のスプリットないしサブユニットワクチンや、遺伝子組換えワクチンには、GSK社のAS03、Montanide社のMF59など新規アジュバントや、イヌリン、フラジェリンなど研究開発中のアジュバントを添加したものがみられる。

(2) アジュバントの種類と機能

アジュバントにはアルミニウム塩、乳化剤、サイトカイン、微粒子などが含まれ、物質としての性質は多様である(表3)。これまで臨床使用されてきたアジュバントはアルミニウム塩(水酸化アルミニウムあるいは硫酸アルミニウム)であったが、近年のアジュバント開発の成

表2 ワクチンの種類

| ワクチンの種類  |   | ワクチン抗原の特徴  | アジュバントの必要性 |
|----------|---|--|------------|
| 弱毒化生ワクチン |   | 弱毒化されたワクチン抗原ウイルスないし細菌。毒性はないが、接種後体内で増殖するものもある。  | -          |
| 不活化ワクチン  | 全粒子・全死菌体  | ホルマリンなどで殺ウイルスないし殺菌処理を行った、ワクチン抗原ウイルスないし細菌。殺処理後のウイルス粒子ないし菌体の破壊はない。                                   | -          |
|          | スプリット   | ホルマリンなどで殺ウイルスないし殺菌処理を行い、さらに、ウイルス粒子ないし菌体を破壊したもの。ウイルス粒子内部のタンパクや、細胞質あるいは構成成分もワクチン抗原として接種後宿主免疫系に提示される。 | ++±        |
|          | サブユニット  | ホルマリンなどで殺ウイルスないし殺菌処理を行い、さらに、ウイルス粒子ないし菌体を破壊したものから、抗原タンパクを精製したもの。                                    | +          |
|          | 遺伝子組換えタンパク  | 抗原タンパクを各種培養系(大腸菌など)で産生させ、抽出・精製してワクチン製剤としたもの。   | ++         |
|          | DNA   | 抗原タンパクをコードする塩基配列をベクタープラスミドに組み込み、接種する。接種後体内で抗原タンパクが宿主由来のアミノ酸を用いて産生され、宿主免疫系に提示される。                   | +++*       |
| トキシノイド   | 病原細菌の培養上清中に分泌される外毒素を、ホルマリンなどで処理したもの。菌体由来成分は含まれない。 | ++   |            |

\*ワクチン輸送にプラスミドベクターを必要とする

表3 アジュバントの分類

| 機能   | 分類      | 例                                       |
|------|---------|---|
| 抗原輸送 | 鉱物塩     | 水酸化アルミニウムゲルなど                           |
|      | 乳化液     | CFA, IFA, スクワレン, MF59など                 |
|      | 微粒子     | リポソーム, PLGAなどのバイオポリマー, ウイルス様粒子, ISCOMなど |
| 免疫増強 | 微生物由来物質 | フラジェリシ, コレラトキシン・大腸菌易熱性毒素などの毒素, 細胞壁成分など  |
|      | サイトカイン  | IL-2, IL-15, GM-CSFなど                   |
|      | 共刺激分子   | CD134など                                 |
|      | 核酸      | dsDNA, CpG-ODNなど                        |
|      | 結晶      | 尿酸, 合成ヘモソインなど                           |
|      | 他       | Pam2Cys2, MPL, イミキモドなど                  |

注)下線のアジュバントは、臨床使用されている。

果を受けて、さまざまなアジュバントが臨床試験されている。

アジュバントの機能には抗原輸送と、免疫増強とがある。ワクチン抗原が体内に投与されてから記憶免疫として定着するまでの過程は、

- ①抗原を生体内代謝から保護して長くそのままの形でとどめ、長時間の抗原提示を可能にするdepot効果。
  - ②抗原提示細胞による、抗原タンパクの取り込みを効率化。
  - ③抗原提示細胞による、抗原提示を効率化。
  - ④記憶免疫細胞を長期間保持。
- となる。抗原タンパクとともに生体内で振る舞い、①、②を特にワクチン輸送という。免疫賦活剤は抗原タンパクとは必ずしも同一に振る舞わず、共刺激分子のように抗原提示細胞を独自に活性化して、②～④の機能を果たす分子などを指す。またアルミニウム塩のように主に①を担うと考えられていたが、近年③の機能ももつことがわかる<sup>19)</sup>など、複数の機能をもつアジュバントもある。

### (3) 自然免疫受容体を活性化するアジュバント

自然免疫受容体がさまざま微生物由来物質によって活性化され、そのことがより強い獲得免疫の誘導に貢献することが解明された。その成果をワクチン開発に反映するために、自然免疫受容体を活性化する物質がアジュバ

### アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政

ント候補として探索された(表1)。そのなかで最も開発が進んでいるのが、TLR4のリガンドでもある合成リン脂質のMPLと、TLR9のリガンドでもある合成核酸のCpG-Oligodeoxynucleotide(CpG-ODN)である。

Monophosphoryl Lipid A (MPL)は、Lipopolysaccharide (LPS)をもとに人工的に合成されたTLR4のリガンドであり、B型肝炎ウイルス(HBV)ワクチン(FENDrix<sup>®</sup>)、ヒトパピローマウイルス(HPV)ワクチン(Cervarix<sup>®</sup>)として臨床使用されるほか、マラリアワクチンなどにアルミニウム塩とともにアジュバントとして用いられた製品が臨床試験されている。感染症の存在がワクチン効果を増強することは古くから知られていたが、LPSそのものはグラム陰性桿菌由来のエンドトキシンであり、ワクチンアジュバントとして使用するにはあまりに毒性が強い。そのため、LPSを一部加水分解することで毒性を弱めたものがMPLである。MPLをワクチンに添加して用いることにより、誘導される抗体価が10ないし20倍に上昇するほか、Th1型の免疫応答を誘導する。Pollinex<sup>®</sup>Quattro Ragweedという花粉症ワクチンはこういった特性を活かし、MPLを花粉抗原とともに投与し、アレルギーを引き起こす病的なTh2型ではなく、Th1型免疫応答を生体内で誘導することによって花粉症を予防ないし治療する。安全性に関しては、例えばHPVワクチンにおいて、MPLを含まないワクチンに比べ、疼痛や腫脹など接種局所の副反応、頭痛・筋関節痛などの全身における副作用がより頻繁に、かつより重度でみられるが、いずれも重症でなく忍容性は良好であるとされる<sup>15)</sup>。

CpG-ODNは人工的に合成された20塩基長前後の短いDNAで、シトシンの次にグアニンが現れる5'-CG-3' (またはCp-G)のモチーフを含む、TLR9のリガンドである。B型肝炎ワクチン・マラリアワクチン・さまざまな腫瘍免疫療法にアジュバントとして添加され、臨床研究が行われている。細菌では真核生物と異なりメチル化されていないDNAが高頻度に認められ、TLR9はこういったDNAをPAMPとして認識する。C-Gモチーフをさまざまに組み込ませた多数の人工核酸配列がTLR9を刺激するとして知られる。CpG-ODNは配列および骨格によってD型(A型ともいう)、K型(B型ともいう)、C型の3種が知られ、それぞれの免疫系への働きが異なる。現在臨床試験で主に用いられているものはK型である。CpG-ODNをワクチンに添加して用いることにより、誘導される抗体価が上昇するほか、Th1型の免疫応答を誘

導する。安全性に関しては、CpG-ODNを含まないワクチンに比べ、疼痛や腫脹接種局所の副反応がより頻繁に、かつより重度でみられるほか、感冒様症状の全身における副作用が高頻度で見られるが、いずれも重症ではなく、忍容性は良好であるとされる<sup>16)</sup>。1.(4)で既述のとおり、自己免疫を惹起する危惧は理論的に指摘されている。また*in vitro*知見としては、全身性エリテマトーデス(SLE)の患者においてはTLR9を発現するB細胞は増加すること<sup>17)</sup>、抗好中球細胞質抗体(ANCA)陽性血管炎患者由来の末梢血単核球にK型CpGを添加して培養すると、ANCA産生が増強されること<sup>18)</sup>が知られる。しかし、さまざまなCpGを用いたワクチンの臨床試験においては自己免疫状態を呈した被験者は極めてまれであり、ワクチンとの因果関係は否定されている<sup>19,20)</sup>。

#### (4)アジュバントの評価法

アジュバントの有用性effectivenessについては、これまでアルミニウム塩がほぼ唯一使用されてきた歴史と、ワクチンに添加されワクチン製剤として臨床使用される製剤の特性から、単独で評価されることはほとんどなかった。また有効性efficacyについても、あるアジュバントが添加されるワクチン・予防対象病原体・被験動物の生物種等によって異なる振る舞いを示すなど、画一的な評価は困難であって、現実にはワクチン製剤ごとに有効性・安全性が検証されて選択されるようである。例えば、現在第Ⅲ相臨床試験が行われているRTSSマラリアワクチンにはGSK社のAS01という、MPL, QS21およびリポソームを組み合わせた混合アジュバントが添加されているが、RTSSを抗原としたワクチンにおいては、4種類の混合アジュバントを比較する十数件の臨床試験が行われ、第Ⅲ相に進むワクチンのアジュバントが選択された<sup>21)</sup>。

しかし、アジュバントが感染症ワクチンだけでなく、腫瘍やアレルギー疾患など非感染症を対象とした免疫応答調整を目的とする薬剤に使用が拡大しつつある現在、アジュバントはもはや免疫賦活剤としての機能だけでなく、被接種者個人個人の医学的特性や疾患背景に適合した免疫応答を惹起するための、“個の医療”のツールとして機能することが求められつつある。そのためには、ワクチン製剤としての安全性・有効性の知見とともに、それと組み合わせるアジュバント単独についての安全性・有効性の知見も有用である。

アジュバントに特化した指針は欧州医薬品庁

(European Medicines Agency ; EMA) のもの<sup>23)</sup> だけであるが、ワクチンとしての安全性・有効性の各種指針にも、ワクチンとしての試験に加えアジュバント単独についての非臨床試験を推奨するという立場が多いようである。わが国の感染症ワクチンのためのガイドライン<sup>24)</sup> では、「新規アジュバントと抗原の組み合わせにより毒性反応に差を生じる可能性があるため、抗原の新規性の有無にかかわらず、新規アジュバントと抗原の両方を含んだ製剤での毒性評価も必要」とする。米国食品医薬品局 (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration ; FDA) は「アジュバントと抗原の組み合わせで1つの医薬品として承認されるわけであるから、アジュバント単独は認可対象とは認められないだろう」とするが、アジュバント単独の毒性試験は「推奨される」とする<sup>25)</sup>。WHO<sup>26)</sup> も必要であるとする。

各指針の詳細をみると(表4)、アジュバント単独で実施すべき非臨床試験としては、接種局所における肉芽腫形成を危惧した組織観察と、全身毒性が共通して言及されている。また、アジュバント単独による発熱性およびアレルギー応答を含めた免疫毒性も多くで言及されるが、

発がん性および生殖毒性については、必要であるとするもの、言及されないもの、および概して不要であるとするものに分かれる。

なお、ワクチン製剤の有効性の評価にはワクチン対象疾患に対する免疫を反映する“防御能と相関を示すマーカー” (Correlates of Protection ; CoP) が用いられるが、アジュバントの効果はともに用いられるワクチンのCoPが、アジュバントを含まないワクチンのCoPに比べてどれほど高められているかで評価され、アジュバントそのものの有効性の評価指標は存在しない。過去には、鶏卵白アルブミンやインフルエンザワクチンなどを“モデルワクチン”としてアジュバント効果を評価する方法が議論されたが<sup>26)</sup>、ワクチンおよびアジュバントの多様性を考えるとモデルワクチンを用いる評価法には限界があるように思われる。

試験動物種の選択については、共刺激分子やサイトカインなど生物種に極めて依存的な活性を示すアジュバントについては特に注意が必要であるが(WHO, EMA)、通常2種以上の動物種での試験が推奨される(EMA)。扱いやすいげっ歯類とヒトに近い霊長類が選択される場合が多いかもしれない。ただし、BALBcマウスにおけ

表4 アジュバントに関するガイドライン

|               | 日本   | 米国  | EU   | WHO   |
|---------------|--|---|--|---|
| 出典            | 厚生労働省医薬食品局審査管理課長、感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン5 特別な留意事項5.1 アジュバント、2010 | FDA, guidance for industry for the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: production, testing and clinical studies, III preclinical studies A Adjuvants, 1997 | Committee for medicinal products for human use, guideline on adjuvants in vaccines for human use, 2005 | WHO, WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines, 5, special considerations, 5.1 adjuvants |
| アジュバント単独の毒性試験 | 新規アジュバントについて必要   | 推奨  | 必要。げっ歯類および被げっ歯類の2種以上の動物種で実施  | 必要  |
| 反復投与試験        | 必要   |   | 必要   |   |
| 局所反応          | 必要   |   | 必要   |   |
| 過敏反応          | 必要   |   | 必要   |   |
| 発熱性試験         |  |   | 必要   |   |
| 生殖発生毒性試験      |  |   | 必要   |   |
| 遺伝毒性試験        |  |   | 合成アジュバントには必要かもしれない   |   |
| がん原性試験        |  |   | 必要とは考えない   |   |
| 備考            |  | 新規アジュバントの安全性に係る事柄として、接種局所反応・発熱他全身性の副反応・免疫関連事象・全身性の化学的毒性、催奇形性・がん原性があげられる   |  |   |

### アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政

る油脂性アジュバント接種後の形質細胞腫のように、生物種特異的な副反応があるため、選択には注意を要する。

非臨床試験における投与量については、総接種量および1回あたり接種量の双方で被験個体体重にかかわらず臨床使用量を投与する群を設けるべきだとする議論<sup>27)</sup>、最大許容量よりも低めとするもの(EMA)、などがある。動物に対して臨床使用量よりも高用量で複数回試験的に接種することは、臨床使用上大変低い頻度でしか認められない副作用でも、投与量を極端に多くすることで、個体数の小さい非臨床試験で検討できるようになるかもしれないとして、正当化される場合が多い<sup>28)</sup>。しかし、たとえ臨床使用の際には許容される程度の軽度な副反応であっても、高用量投与の非臨床試験ではそれが毒性と解釈されることもあるため、投与量設定については慎重な検討が個々で必要である。

### まとめ

自然免疫系を刺激するアジュバントのうち現在臨床応用に最も近づいているのはTLRリガンド、なかでもすでにHBV、HPVワクチンに用いられるMPLとCpG-ODNであるが、他の自然免疫受容体のリガンドについても精力的に研究が行われている。ワクチンが“個の医療”のツールになりつつある現在、アジュバントの特性についての知見を集積し、ワクチンとの多様な組み合わせを模索することが大きな潮流であり続けるだろう。

本稿では、自然免疫系受容体を活性化するアジュバントを中心に、免疫機構とワクチンならびにアジュバントの評価の考え方について基本的な知見を概観した。本稿がワクチン開発の一助となれば幸いである。

### 参考文献

- 1) 青枝, 石井: *Drug Delivery System*, 27(1), 19-27, 2012
- 2) Akira S, Takeda K, Kaisho T: *Nat. Immunol.*, 5, 987-995, 2004
- 3) Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, et al.: *J. Immunol.*, 171, 4984-4989, 2003
- 4) Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, et al.: *Nat. Immunol.*, 4, 1009-1015, 2003
- 5) 鉄谷, 石井: ワクチンの市場動向と開発・製造実務集, 技術情報協会, 東京, pp.179-202, 2012
- 6) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al.: *Cell*, 86, 973-983, 1996
- 7) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr.: *Nature*, 388, 394-7, 1997
- 8) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.: *Cell*, 124, 783-801, 2006
- 9) Kawai T, Akira S: *Nat. Immunol.*, 11, 373-384, 2010

- 10) Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R: *Nat. Immunol.*, 7, 49-56, 2006
- 11) Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al.: *Nature*, 449, 564-569, 2007
- 12) Urbanaviciute V, Furnrohr BG, Meister S, et al.: *J. Exp. Med.*, 205, 3007-3018, 2008
- 13) WHO, Initiative for Vaccine Research (IVR) [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/influenza/flu\\_trials\\_tables/en/](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/flu_trials_tables/en/)
- 14) Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, et al.: *Nature*, 453, 1122-6, 2008
- 15) Descamps D, Hardt K, Spiessens B, et al.: *Hum. Vaccin.*, 5, 332-40, 2009
- 16) Bode C, Zhao G, Steinhagen F, et al.: *Expert. Rev. Vaccin.*, 10, 499-511, 2011
- 17) Papadimitraki ED, Chouaki C, Koutala E, et al.: *Arthritis. Rheum.*, 54, 3601-3611, 2006
- 18) Hurrado PR, Jeffs L, Nitschke J, et al.: *BMC Immunol.*, 9: 34, 2008
- 19) DeFrancesco L.: *Nat. Biotech.*, 26: 484, 2008
- 20) Dynavax Technologies Co. Press release, 20th July 2011, <http://investors.dynavax.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=592848>
- 21) Casares S, Brumeanu TD, Richie TL: *Vaccine*, 28, 4880-94, 2010
- 22) European Medicines Agency, committee for medical products for human use, guideline on adjuvants in vaccines for human use, EMEA/CHMP/VEG/134716/2004, 2005
- 23) 厚生労働省薬食品局審査管理課長, 「感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドラインについて」, 薬食審査発0527第1号, 2010
- 24) Guidance for Industry on the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: production, testing and clinical studies, 1997
- 25) World Health Organization: WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines, 2003
- 26) Stewart-Tull DES., Gregoriades G. ed.: *Immunological Adjuvants and Vaccines*, Plenum Press, New York, USA, pp.213-26, 1989
- 27) Goldenthal KL, Cavagnaro JA, Alving CR, et al.: *ADIS. Res. Hum. Retrov.*, 9, S47-S51, 1993
- 28) Lindblad E.B.: *Vaccine Adjuvants and Delivery Systems*, Singh M. ed., Vaccine adjuvant and delivery system, Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons Inc., pp.421-444, 2007

基礎医学とのダイアローグ

# 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

*Innate immune receptors and vaccine adjuvant*

独立行政法人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

独立行政法人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／

大阪大学免疫学フロンティア研究センターワクチン学教授

小檜山康司 Kouji Kobiyama

石井 健 Ken Ishii

## Key words

アジュバント, 自然免疫, ワクチン, 獲得免疫

## Summary

われわれはこれまでに、経験的にワクチンにアジュバントと呼ばれる免疫賦活剤を用いてきた。アジュバントは自然免疫応答を活性化することでワクチンの効果を高める働きを有しており、アジュバントなしには効果的な獲得免疫応答を誘導することは困難である。自然免疫研究の発展とともに新たなアジュバントの開発が試みられており、いくつかのアジュバントは実際にワクチン製剤として臨床で使用されている。一方で、HIVや結核、マラリアなどに対する効果的なワクチンはいまだなく、現在新規ワクチン開発においてアジュバントの添加は重

要な点であり、さまざまなワクチンとアジュバントの組み合わせで開発研究が行われている。今後は病原体や誘導したい獲得免疫応答によってアジュバントとの組み合わせを変更するなどさまざまな可能性が考えられ、これまでに効果的でないワクチンに関してても有用となることも考えられる。しかしながら、いまだアジュバントには不明な点が多く残されており、今後の基礎研究が非常に重要になってくるだろう。この総説では、自然免疫応答とアジュバント活性について解説する。

## はじめに

宿主は、ウイルスやバクテリアなどの病原体に対する免疫応答を有しており、大きく自然免疫と獲得免疫に分け

ることができる。自然免疫応答は病原体感染後、迅速に誘導される生体防御反応であり、昆虫から哺乳類まで広く保存されている。一方で、獲得免疫応答は哺乳類などの高等動物のみが有し

ている機能であり、ワクチン投与によって最適に誘導されることが期待される免疫応答である。1990年代後半のToll様受容体(Toll-like receptor: TLR)の発見を機に急速に自然免疫学研究が

新型(鳥)インフルエンザ—高病原性インフルエンザへの備え

進み、シグナル伝達経路が明らかとなり、さまざまな生体反応も明らかとなりつつある。そのなかでも、獲得免疫の誘導には自然免疫の誘導が先んじて行われ、かつ必須であることが示され、今後のワクチン開発における重要な発見の1つである。また、精製された抗原のみでは免疫応答は誘導されないことも重要な発見の1つであった。ナイーブマウスに精製された抗原のみを投与した際には、抗原は抗原提示細胞に取り込まれ、抗原提示(シグナル1)は行われるものの、抗原特異的抗体や細胞性免疫は誘導されずに免疫寛

容となる。一方で、自然免疫シグナル(シグナル2)が入ることで自然免疫応答が誘導され、抗原特異的免疫応答の誘導、さらには免疫記憶の形成へとつながっていく。このシグナル1とシグナル2が協調して作用することが病原体の排除には重要である(図1)。これらのことは、これまでに感染歴のない病原体に対しては、ワクチン抗原のみでは効果がなく、アジュバントの添加が必須であることを示唆している。この自然免疫応答の誘導に必須なのが自然免疫受容体である。これまでに多くの自然免疫受容体が報告されており、

いくつかのグループに分けられている。TLRs, RIG-I様受容体[retinoic acid inducible gene-I(RIG-I)-like receptors; RLRs], NOD様受容体[nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors; NLRs], C型レクチン受容体(C-type lectin receptors; CLR)などである<sup>1)</sup>。これら受容体のリガンドの多くがアジュバント活性を有していると考えられており、現在臨床に向けた開発研究が盛んに行われている。アジュバント製剤としては、2009年に子宮頸癌の原因ウイルスであるヒトパピローマウイルスに対するワクチンであ

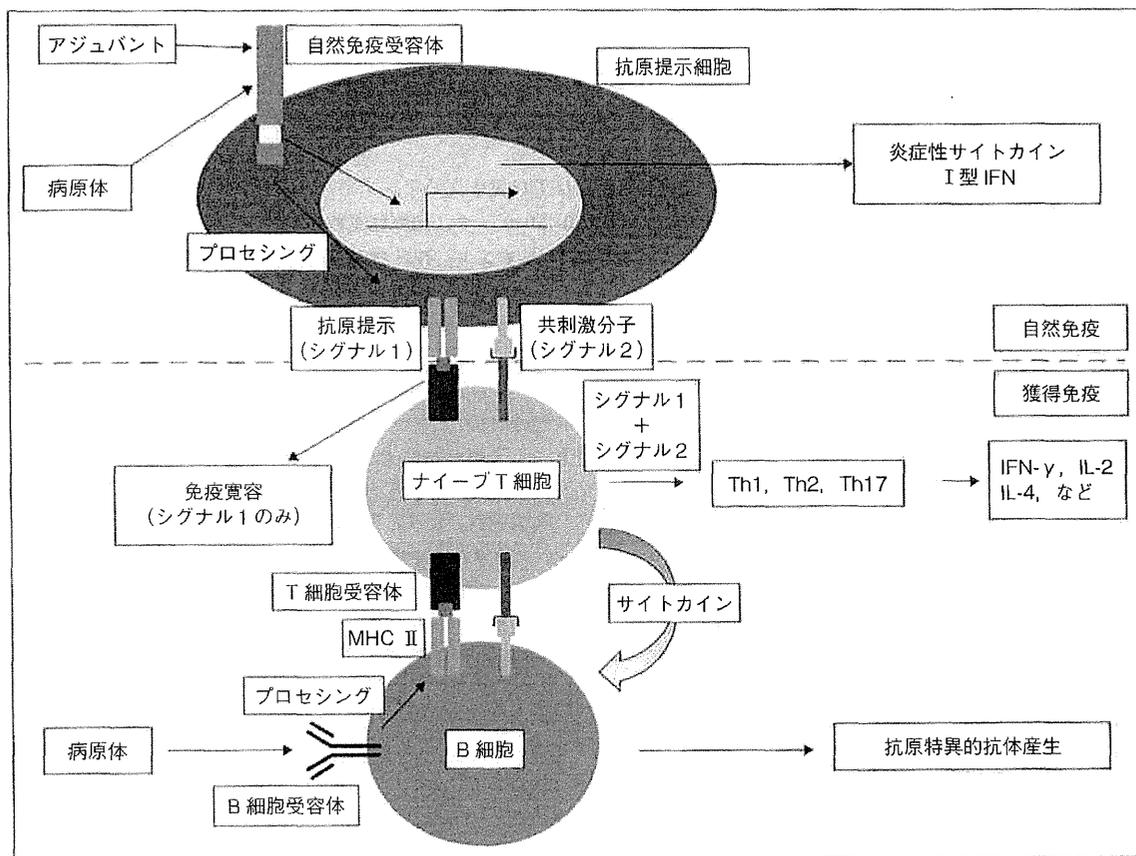


図1. 免疫応答のシグナル伝達経路

MHC: 主要組織適合遺伝子複合体

表1. アジュバントの種類と開発状況

| 分類             | アジュバント                                  | 特徴  |
|----------------|---|---|
| 鉍酸塩            | 水酸化アルミニウム,<br>リン酸アルミニウムなど               | IgE産生誘導が強い。タンパク抗原と沈降物を形成し、徐放性に抗原を放出する。1920年代に見出された。   |
| 毒素             | CTB, 大腸菌易熱性毒素                           | ワクチンと経鼻投与することによりIgA産生を誘導。臨床試験で顔面神経麻痺が起き、臨床応用はされていない。  |
| O/W<br>エマルジョン  | MF59<br>AS03<br>Provax                  | 粒子が小さく細胞に取り込まれやすく、体液性免疫を誘導。インフルエンザワクチンのアジュバントとして使用されている。<br>2008年に欧州で認可されたH5N1ウイルスワクチンのアジュバント。<br>CTL誘導活性が強い。現在開発中。 |
| W/O<br>エマルジョン  | Montanide ISA 51/ ミネラルオイルと<br>植物由来界面活性剤 | 大阪大学, 久留米大学が開発中の癌ペプチドワクチンのアジュバント。樹状細胞を活性化。  |
| Bio polymer    | Advax/biopolymer                        | HBVワクチン, インフルエンザワクチンのアジュバントとして開発中。  |
| 植物成分<br>(サポニン) | QS2                                     | 成分はQuiA由来サポニン。CTLを誘導することができる。現在開発中。   |
| Lipid A        | ISCOM/脂質+サポニンのミセル                       | 直径40nmほどの粒子。CTLを誘導することができる。現在開発中。   |
|                | AS04/MPL+アルミニウム塩                        | 細胞性免疫を誘導。MPLとアルミニウム塩の混合剤。HBV, インフルエンザワクチンのアジュバントとして欧州で認可。   |
|                | RC-529/ MPLアナログ                         | 細胞性免疫を誘導。HBVワクチンのアジュバントとしてアルゼンチンで認可。  |
|                | AS02/スクアレン+QS21+MPL(W/O)                | MPLとQS21との混合剤。マラリアワクチンのアジュバントとして開発中。  |
| 鞭毛成分           | AS01/リボソーム+QS2+MPL                      | マラリアワクチンのアジュバントとして開発中。  |
| 核酸             | フラジェリン                                  | TLR5のリガンド。細胞性免疫を誘導。現在開発中。   |
|                | dsRNA                                   | TLR3のリガンド。IFN誘導薬としては認可されている。アジュバントとして細胞性免疫を誘導。現在開発中。  |
|                | CpG ODN                                 | 細菌に特有な非メチル化CpG ODN。細胞性免疫を誘導。CpG 2006はヒト用として認可。抗癌薬としても特許がとられている。CpG 7909はHBV, インフルエンザワクチンのアジュバントとして開発中。              |
| 結晶             | ヘモゾイン                                   | ヘムの2量体のポリマー。炎症性サイトカイン産生を誘導し、アジュバントとして用いることで体液性免疫を誘導。50~200nmの結晶が高いアジュバント活性を有している。                                   |
|                | 尿酸結晶                                    | 痛風の原因物質。IL-1 $\beta$ やIL-18産生を誘導。アジュバントとして用いることで体液性免疫を誘導。   |
| $\beta$ -グルカン  | SPG                                     | シゾフィランとして抗悪性腫瘍薬として応用されている多糖類。樹状細胞から炎症性サイトカイン産生を誘導。CpGと複合体形成することにより、新規CpGアジュバントとして応用可能。また、DDSとしても注目されている。            |
| サイトカイン<br>カチオン | IL-12, GM-CSF<br>DOTAP, DDA             | IL-12は細胞性免疫を誘導し、IgG2やIgG3産生を誘導する。<br>DNAワクチンの安定性や抗原の発現量を増大させる。細胞性免疫を誘導。現在開発中。                                       |
| ポリペプチド         | N'-CARD-PTD                             | PTDが付加していることにより、細胞内に取り込まれやすく、細胞性免疫を誘導。  |

CTB: コレラ毒素Bサブユニット, DDS: ドラッグデリバリーシステム, GM-CSF: 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子

る組換え沈降2価ヒトパピローマウイルス様粒子ワクチンにAS04(モノホスホリリピッドA (monophosphoryl lipid A; MPL)と水酸化アルミニウム)がアジュバントとして添加されており、日本でも認可され使用されている。AS04の成分であるMPLはTLR4のリガンドとして知られており、強く自然免疫応答を活性化することでアジュバント効果を発揮する<sup>2)</sup>。2007年には特例承認であるが、AS03(スクアレニン+Tween80+ビタミンE)<sup>3)</sup>やMF59(スクアレニン+Tween80+Span85)<sup>4)</sup>といったアジュバントがインフルエンザワクチンのアジュバントとして認可された。

このように、いくつかの新規アジュバントが臨床で使用されてきている。現在も多くのアジュバント候補物質の臨床開発が行われている(表1)。次に、実際に研究開発が行われているアジュバント候補物質について、自然免疫受容体とともに解説する。

## I 自然免疫受容体とアジュバント(表2)

### 1. TLR

TLRはこれまでに13種類、ヒトでは10種類が同定され報告されており、病原体のさまざまな成分(核酸、タン

パク質、多糖、鞭毛など)を認識する。TLRは主に免疫細胞である樹状細胞、マクロファージ、B細胞などに発現しており、病原体が感染後、その構成成分を認識することで自然免疫シグナルを活性化し、サイトカイン産生や共刺激分子などの発現を増強させ、取り込んだ抗原を提示することが可能となる。これにより強く獲得免疫を誘導することができる<sup>5)</sup>。

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6は細胞膜に発現しており、TLR3, TLR7/8, TLR9はエンドソーム膜に局在している。それぞれ認識できるリガンドが異なっており、それがさまざまな病原体

表2. 自然免疫受容体とアジュバント活性

| 自然免疫受容体  | アジュバント              | リガンド                | 誘導される獲得免疫応答             |
|----------|---------------------|---------------------|-------------------------|
| TLR      |                     |                     |                         |
| TLR2/1   | Pam3CSK4            | リポプロテイン             | 抗体, Th1                 |
| TLR2/6   | MALP-2              | リポプロテイン             | 抗体, Th1                 |
| TLR3     | Poly(I:C)           | dsRNA               | 抗体, Th1, CD8 T細胞, I型IFN |
| TLR4     | MPL                 | LPS                 | 抗体, Th1                 |
| TLR5     | フラジェリン              | フラジェリン              | 抗体, Th1, Th2            |
| TLR7/8   | イミダゾキノリン            | ssRNA, 合成RNAアナログ    | 抗体, Th1, CD8 T細胞, I型IFN |
| TLR9     | CpG ODN             | 非メチル化 CpG モチーフ      | 抗体, Th1, CD8 T細胞, I型IFN |
| RLR      |                     |                     |                         |
| RIG-I    | 短鎖 dsRNA, 5'-pppRNA | 短鎖 dsRNA, 5'-pppRNA | I型IFN                   |
| MDA5     | Poly(I:C)           | 長鎖 dsRNA            | 抗体, Th1, CD8 T細胞, I型IFN |
| NLR      |                     |                     |                         |
| NOD1     | FK156, FK565        | ペプチドグリカン            | 抗体, Th2                 |
| NOD2     | 完全フロイントアジュバント       | ムラミルジペプチド           | 抗体, Th2                 |
| NLRP3?   | アラム                 | アルミニウム塩             | 抗体, Th2, IgE            |
| CLR      |                     |                     |                         |
| Dectin-1 | シゾフィラン              | $\beta$ -グルカン       | 抗体, Th1, Th17, CD8 T細胞  |
| Dectin-2 | $\alpha$ -マンナン      | $\alpha$ -マンナン      | Th17                    |
| Mincle   | TDM                 | $\alpha$ -マンノース     | 抗体, Th1, Th17           |
| DNA センサー | dsDNA               | dsDNA               | 抗体, Th1, CD8 T細胞, I型IFN |