

への早期免疫応答の誘導に役立っている。

TLR2はTLR1やTLR6とヘテロダイマーを形成し、グラム陽性細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやリポプロテイン、リポタイコ酸などを認識する。実際に、macrophage-activating lipopeptide-2(MALP-2)はTLR2とTLR6のヘテロダイマーによって認識され、また合成リポペプチドであるPam3CSK4はTLR2とTLR1のヘテロダイマーによって認識され自然免疫応答を活性化させる。これらはアジュバントとして働くことも報告されており、Th1型の免疫応答を誘導することが明らかとされている⁶⁷⁾。

TLR3は、ウイルス感染細胞内で複製されたウイルス由来の二本鎖RNAを認識することで自然免疫応答を活性化させる。その結果として、Th1型免疫応答を強く誘導することができるために、ウイルス感染症のワクチンなどに有用であると考えられている。一方で、Poly(I:C)はRLRであるmelanoma differentiation-associated gene 5(MDA5)のリガンドであることが報告され、アジュバント効果への寄与は不明であった。2008年に、MDA5のアダプター分子であるIPS-1、またはTLR3のアダプター分子であるTRIF欠損マウスを用いてアジュバント効果の検討が行われた。結果として、Poly(I:C)によるアジュバント効果はIPS-1欠損マウスでは減弱しており、一方でTRIF欠損マウスでは効果に変化がみられなかった。このことから、Poly(I:C)のアジュバント効果はTLR3ではなくMDA5への寄与が大きいことが示唆された⁶⁸⁾。

TLR4はリポポリサッカライド(lipo-

polysaccharide:LPS)を認識することで自然免疫応答を活性化させる。LPSはアジュバントとしても有用ではあるが、強力な毒性によりヒトに投与することはきわめて困難である。LPSから毒性を除いたMPLはアジュバント活性を有しながらヒトでの安全性も確認され、現在ワクチンのアジュバントとしても認可されている²⁾。今後、他の感染症ワクチンでも応用されていくことが考えられる。

TLR5は細菌の鞭毛(フラジェリン)を認識することで自然免疫応答を活性化させる。フラジェリンは強力にTh1型免疫応答のみを誘導するのではなく、Th2型免疫応答をも誘導することができるため、アジュバントとしても有用であると考えられている^{69) 11)}。

TLR7/8はウイルス由来の一本鎖RNAや、合成低分子であるイミダゾキノリンなどを認識する。TLR7/8はリガンド認識後、強力にI型インターフェロン(interferon:IFN)産生を誘導する。ヒトにおいてTLR7とTLR8は発現している細胞が異なっており、両方に対するアゴニストを用いることで樹状細胞やB細胞を活性化することができ、効率よくTh1型免疫応答、細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte:CTL)反応、抗原特異的抗体産生を誘導することができる¹²⁾。インフルエンザワクチンには内因性のTLR7リガンドが含まれているが、詳細はインフルエンザワクチンの稿で解説する。

TLR9のリガンドであるCpGオリゴデオキシヌクレオチド(oligodeoxynucleotide:ODN)は自身の有する自然免疫活性化能により、単独で癌やアレルギーなどを含めたさまざまな疾患への

治療が期待されており、現在も臨床応用へ向けて開発が進められている¹³⁾。一方で、ワクチンのアジュバントとしてもCpG ODNは開発が進んでおり、ワクチン抗原とともに免疫することによって、強力にTh1型免疫応答を誘導することが既にマウスやサルを用いた実験で明らかとなっている。また、B型肝炎ウイルスワクチン¹⁴⁾、C型肝炎ウイルスワクチン¹⁵⁾、インフルエンザウイルスワクチン¹⁶⁾、マラリアワクチン¹⁷⁾のアジュバントとしても現在臨床試験が進んでいる。

2. NLR

NLRは細胞質に存在する自然免疫受容体として知られており、2008年にアラムがNLRP3によって認識され、自然免疫応答[特にインターロイキン(interleukin:IL)-1 β 産生]を誘導することが明らかとなった。同時に、アラムによるアジュバント効果はNLRP3からの自然免疫応答に依存していると報告された¹⁸⁾¹⁹⁾。しかしながら、その後の研究によって、NLRP3のアラムアジュバント効果への関与を否定する報告が相次いで出された²⁰⁾²¹⁾。これらの結果から、いまだアラムのアジュバント効果には不明な点が多く残されていた。最近、アラムのアジュバント効果に関して興味深いことが明らかとなった。1つは、アラムのアジュバント効果には脂質メディエーターであるプロスタグランジン(prostaglandin:PG)E2が関与していることである²²⁾。この報告では、アラムによってマクロファージからインフラマソーム非依存的にPGE2が誘導されること、PGE2合成酵素欠損マウスではアラムによる抗原特

異的免疫グロブリン (immunoglobulin ; Ig)E 産生の誘導が低下していることが示された。これらの結果により、アラムのアジュバント効果 (IgE 産生) には PGE2 の産生が重要であり、これまでに報告されたシグナル伝達とは異なる経路を介していることが示唆された。もう1つの報告では、アラムを投与することにより細胞死が誘導され、死細胞から放出された自己の DNA がアラムのアジュバント効果に重要であることが明らかとされた²³⁾。実際に、アラムを腹腔内に投与することで腹腔に好中球が集積し、集積した好中球がアラムによって細胞死を起し、細胞内から核酸である DNA や尿酸を大量に放出する。この放出された尿酸ではなく DNA が、アラムのアジュバント効果 (IgE 産生) に重要であることが示された。これまでも DNA がアジュバント効果を誘導することは報告されていたが、アラムアジュバントの効果の指標である IgE 産生をも誘導することが明らかとされた。DNA による自然免疫応答活性化には、リン酸化酵素である TBK1 と転写因子の IFN 調節因子 (IFN regulatory factor ; IRF) 3 が必須である。これらの遺伝子の欠損マウスではアラムによる IgE 産生が誘導されなかったことから、アラムのアジュバント効果には自己の DNA が深く関与していることが示唆された。しかしながら、アラムのアジュバント効果にはいまだ不明な点が多く残されている。現在使用されているアジュバントの作用機序解明は、副作用の軽減、新たなアジュバントの開発にもつながり重要な課題である。

3. CLR

これまでに多くの CLR が報告されており、その機能は細胞接着や組織の再構築、補体の活性化、病原体の認識など多岐にわたっている²⁴⁾。いくつかの CLR は病原体の構成成分を認識することで自然免疫応答を活性化し、獲得免疫の誘導にも関与していることが報告されている。そのなかではじめに同定されたのが Dectin-1 (CLEC7a) である。Dectin-1 はマクロファージなどの細胞膜上に発現しており、真菌の細胞壁成分である β グルカンを認識することで自然免疫応答を誘導する。また、Dectin-1 による自然免疫応答は獲得免疫を誘導することができ、Th1, Th17 型免疫応答や CTL 反応をも誘導する²⁵⁾。Th17 型免疫応答は真菌感染防御に重要であることも報告されており、Dectin-1 による自然免疫応答が重要な役割を担っていると考えられる²⁶⁾。macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) も真菌の認識に関与しており、 α マンノースを認識することが報告された²⁷⁾。一方で、結核菌感染にも関与していることが報告され、結核菌細胞壁の病原体成分であるトレハロースジマイコレート (trehalose dimycolate ; TDM) を認識することが明らかとされた²⁸⁾。TDM は完全フロイントアジュバント (complete Freund's adjuvant ; CFA) のアジュバント活性成分としても知られており、実際に、結核菌のコンポーネントワクチンとともに投与することで強いアジュバント活性 (Th17 型免疫応答の誘導) を示した²⁹⁾。これらの結果から、Mincle をターゲットとしたアジュバントは結核菌ワクチン開発にとって重要であることが示唆された。

II インフルエンザワクチン

現在、インフルエンザワクチンには弱毒生ワクチン、不活化全粒子ワクチン、コンポーネントワクチンの3種類が存在する。現在国内で使用されているインフルエンザワクチンはコンポーネントワクチンであり、内因性のアジュバントや製剤としてのアジュバントも含んでいない。このアジュバントも含んでいないワクチンを接種した際に、感染歴のある成人においては一定の効果は得られるものの、感染歴のない乳幼児や免疫力が低下している老人などでは効果が得られないか、その効果が十分ではないことが示されてきている。一方で、生ワクチンと不活化全粒子ワクチンには内因性のアジュバントとしてウイルス由来の一本鎖 RNA が含まれている。最近のわれわれの研究により、これらインフルエンザワクチンに含まれているアジュバント効果の作用機序が異なっていることを示した³⁰⁾。不活化全粒子ワクチンによって誘導される免疫応答 (体液性免疫、細胞性免疫) は、形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell ; pDC) または TLR7 を欠損させることで完全に消失していた。一方で、生きたウイルス感染によって誘導される免疫応答には TLR7 は関与していないことが明らかとなった。これらの結果から、これまで明らかとされていなかったインフルエンザワクチンの作用機序が明らかとなりつつある。しかしながら、全粒子ワクチンとウイルス感染ではその機序が異なるなど、不明な点もいまだ残されている。また、現在使用されているコンポーネントワクチンにはアジュバ

ントが含まれていないことから、不活化全粒子ワクチンの臨床応用への動きもある。安全性の面からもワクチンの詳細な作用機序の解明、または安全なアジュバントの開発が、安全にかつ効果的にワクチンを接種するためには必要となってくる。

おわりに

これまでに多くの自然免疫受容体が同定され、それらの機能解析が行われてきた。実際に、自然免疫研究の発展に伴いワクチンやアジュバントの作用機序が明らかとなりつつある。それと同時に、アジュバントの重要性も示されてきた。これまではアラムアジュバントが主流であったが、今後は各ワクチンに適したアジュバントの開発が行われるであろう。その際に、ワクチン、アジュバントともに作用機序が明らかとなっていることは安全性の面から非常に重要である。現在、不活化全粒子ワクチンからコンポーネントワクチンへと需要がシフトしている。こういった背景からも、新規ワクチン開発におけるアジュバントの重要性はいうまでもない。さらなる免疫学の発展とともに、効果的でより安全なワクチン、アジュバントが開発されることを期待する。

文献

- 1) Takeuchi O, Akira S : Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010 ; **140** : 805-20.
- 2) Esposito S, Birlutiu V, Jarcuska P, et al : Immunogenicity and safety of human papillomavirus-16/18 AS04-adjuvanted vaccine administered according to an alternative dosing schedule compared with the standard dosing schedule in healthy women aged 15 to 25 years ; results from a randomized study. *Pediatr Infect Dis J* 2011 ; **30** : e49-55.
- 3) Garçon N, Chomez P, Van Mechelen M : GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines ; concepts, achievements and perspectives. *Expert Rev Vaccines* 2007 ; **6** : 723-39.
- 4) Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MC, et al : Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology. 1996. *Int J Hyperthermia* 2009 ; **25** : 323-34.
- 5) Kawai T, Akira S : The role of pattern-recognition receptors in innate immunity ; update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010 ; **11** : 373-84.
- 6) Patel M, Xu D, Kewin P, et al : TLR2 agonist ameliorates established allergic airway inflammation by promoting Th1 response and not via regulatory T cells. *J Immunol* 2005 ; **174** : 7558-63.
- 7) Borsutzky S, Kretschmer K, Becker PD, et al : The mucosal adjuvant macrophage-activating lipopeptide-2 directly stimulates B lymphocytes via the TLR2 without the need of accessory cells. *J Immunol* 2005 ; **174** : 6308-13.
- 8) Kumar H, Koyama S, Ishii KJ, et al : Cutting edge : cooperation of IPS-1- and TRIF-dependent pathways in poly IC-enhanced antibody production and cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 2008 ; **180** : 683-7.
- 9) Applequist SE, Rollman E, Wareing MD, et al : Activation of innate immunity, inflammation, and potentiation of DNA vaccination through mammalian expression of the TLR5 agonist flagellin. *J Immunol* 2005 ; **175** : 3882-91.
- 10) Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ, et al : Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 2006 ; **74** : 1113-20.
- 11) Mizel SB, Bates JT : Flagellin as an adjuvant ; cellular mechanisms and potential. *J Immunol* 2010 ; **185** : 5677-82.
- 12) Wille-Reece U, Flynn BJ, Loré K, et al : HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ; **102** : 15190-4.
- 13) Klinman DM, Currie D, Gursel I, et al : Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* 2004 ; **199** : 201-16.
- 14) Cooper CL, Davis HL, Morris ML, et al : CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults ; a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol* 2004 ; **24** : 693-701.
- 15) Qiu Q, Wang RY, Jiao X, et al : Induction of multispecific Th-1 type immune response against HCV in mice by protein immunization using CpG and Montanide ISA 720 as adjuvants. *Vaccine* 2008 ; **26** : 5527-34.
- 16) Cooper CL, Davis HL, Morris ML, et al : Safety and immunogenicity of CPG 7909 injection as an adjuvant to Fluorix influenza vaccine. *Vaccine* 2004 ; **22** : 3136-43.
- 17) Ellis RD, Martin LB, Shaffer D, et al : Phase 1 trial of the Plasmodium falciparum blood stage vaccine MSP1 (42)-C1/Alhydrogel with and without CPG 7909 in malaria naïve adults. *PLoS One* 2010 ; **5** : e8787.

- 18) 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** : 1122-6.
- 19) Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al : Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008 ; **9** : 847-56.
- 20) Franchi L, Núñez G : The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* 2008 ; **38** : 2085-9.
- 21) Kool M, Pétrilli V, De Smedt T, et al : Cutting edge : alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 2008 ; **181** : 3755-9.
- 22) 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** : 514-26.
- 23) Marichal T, Ohata K, Bedoret D, et al : DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med* 2011 ; **17** : 996-1002.
- 24) Kerrigan AM, Brown GD : Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends Immunol* 2011 ; **32** : 151-6.
- 25) Kerrigan AM, Brown GD : Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol Rev* 2010 ; **234** : 335-52.
- 26) Conti HR, Gaffen SL : Host responses to *Candida albicans* : Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect* 2010 ; **12** : 518-27.
- 27) Yamasaki S, Matsumoto M, Takeuchi O, et al : C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 ; **106** : 1897-902.
- 28) Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, et al : Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med* 2009 ; **206** : 2879-88.
- 29) Schoenen II, Bodendorfer B, Hitchens K, et al : Cutting edge : Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J Immunol* 2010 ; **184** : 2756-60.
- 30) Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, et al : Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med* 2010 ; **2** : 25ra4.

小檜山康司

平成21年 横浜市立大学大学院医学研究科博士課程修了(医学博士)

現在, 医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト プロジェクト研究員

専門分野 : 感染免疫学

