

Box 2 | Type I interferons in adaptive immunity

Type I interferons (IFNs) are a family of cytokines that comprises 12 IFN α subtypes, IFN β 1, IFN ϵ , IFN κ and IFN ω and has essential roles in the immune responses against viruses and other intracellular pathogens¹²⁵. Type I IFNs are mostly known for their capacity to generate an innate antiviral state by inducing the expression of IFN-stimulated genes¹²⁶. In addition to this essential function, type I IFNs may also profoundly affect adaptive immune responses, most often by contributing to the induction of T helper 1 (T_H1)-type responses¹²⁵. Indeed, type I IFNs may directly favour the differentiation and modulate the effector function of T_H1 cells. Furthermore, type I IFNs promote the cross-presentation of antigens to CD8⁺ T cells by conventional dendritic cells and may directly stimulate the proliferation of CD8⁺ T cells. Finally, they have been shown to stimulate antibody production and isotype switching in B cells.

to decreased expression of tumour necrosis factor (TNF) and IFN β 1, respectively. It has been suggested that DHX9 and DHX36 may bind directly to MYD88. In keeping with this, silencing of DHX9 expression reduces the nuclear translocation of NF- κ B in response to CpG-B-mediated stimulation, whereas silencing of DHX36 expression reduces the nuclear localization of IRF7 following CpG-A-mediated stimulation. Together, these observations suggest that DHX9 and DHX36 might trigger distinct MYD88-dependent signalling pathways in pDCs. Intriguingly, DHX9 and DHX36 do not appear to intervene in the response of cDCs to dsDNA³¹, and this might point towards a pDC-specific role of these proteins. By contrast, DHX9 has been proposed to sense dsRNA in cDCs³².

Finally, DDX41 was shown to bind dsDNA and to directly interact with STING and TBK1, but not IPS1 (REF. 31). Indeed, silencing of DDX41 expression led to a marked inhibition of type I IFN production by DCs following transfection with DNA or during infection with DNA viruses or *Listeria monocytogenes*.

NLRs and ALRs. NOD-like receptors (NLRs) are a family of cytosolic proteins with diverse functions in the immune system³³. Despite their denomination, most NLRs actually seem to act as adaptor molecules rather than as receptors *per se*, and only some NLRs have been shown to directly bind PAMPs or DAMPs so far. Nevertheless, a recent report suggests that nucleotide-binding oligomerization domain protein 2 (NOD2) — which is already known as a receptor for the bacterial envelope component muramyl dipeptide — could also be implicated in the production of type I IFNs in response to viral infection through the sensing of ssRNA³⁴. The proposed pathway involves signalling via IPS1 and subsequent activation of IRF3. NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing 3), which is another NLR, is indirectly activated by viral and synthetic ssRNA and dsRNA, resulting in ASC-dependent inflammasome formation and the secretion of biologically active IL-1 β ^{35,36}. Very recently, NLRP3 was also shown to directly sense oxidized mitochondrial DNA that is released into the cytosol during macrophage apoptosis, leading to inflammasome-dependent IL-1 β production³⁷.

AIM2-like receptors (ALRs) are a newly proposed group of nucleic acid-sensing PRRs that comprises two members of the pyrin and HIN domain-containing protein family (PYHIN family): absent in melanoma 2 (AIM2) and IFN γ -inducible protein 16 (IFI16)³⁸. AIM2 has been shown to detect cytoplasmic dsDNA and to induce the ASC-dependent formation of inflammasomes, resulting in the activation of caspase 1 and the production of biologically active IL-1 β ^{39–42}. IFI16 was recently identified as a cytoplasmic protein able to bind to an IFN β 1-inducing fragment of the vaccinia virus dsDNA genome in human monocytes⁴³. Gene-silencing experiments indicate that IFI16 promotes type I IFN production in response to transfected DNA and DNA virus infection. IFI16 signalling to induce type I IFNs involves STING, TBK1 and IRF3. IFI16 was also proposed to mediate the recognition of viral infection in the nucleus, resulting in the activation of inflammasomes⁴⁴. Whether direct sensing of the viral nucleic acids is involved in this particular situation currently remains unknown.

Other nucleic acid-sensing PRRs. ZBP1 (Z-DNA-binding protein 1; also known as DAI and DLM1) is a type I IFN-inducible DNA-binding protein of poorly understood function. Silencing of ZBP1 expression *in vitro* decreases type I IFN production in response to transfected DNA or infection with a dsDNA virus⁴⁵. ZBP1 may associate with TBK1 and IRF3 (REF. 45), and it has also been implicated in the activation of NF- κ B through receptor-interacting protein 1 (RIP1) and RIP3 (REF. 46). However, ZBP1-deficient mice still respond to DNA vaccination and DNA virus infection in a similar manner to their wild-type counterparts⁴⁷. This apparent discrepancy between *in vitro* and *in vivo* data has been attributed to a possible redundancy of DNA-sensing receptors and to cell type-specific effects. The contribution of ZBP1 to DNA sensing *in vivo* thus remains to be established.

LRRFIP1 (leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1) is a leucine-rich motif-containing protein that was identified in a gene-silencing screen in macrophages as a cytosolic receptor involved in the production of type I IFNs in response to transfected DNA or bacterial infection⁴⁸. LRRFIP1 is thought to be able to directly bind dsDNA and dsRNA, and to potentiate IRF3 transcriptional activity at the *IFNB1* promoter through β -catenin-dependent signalling.

STING is mostly known as an important adaptor protein downstream of many TBK1-activating PRRs. However, STING was also recently shown to directly bind to the bacterial nucleic acid signalling molecules cyclic di-GMP and cyclic di-AMP⁴⁹. This finding indicates that STING could also be considered as a nucleic acid-sensing PRR.

Deconstructing current vaccines

As is apparent from their respective downstream effectors, nucleic acid-sensing PRRs can activate the key pathways of the innate immune system and, as such, may potentiate antigen-specific adaptive immune responses. Recent studies are starting to highlight the role of nucleic acids as 'built-in' adjuvants in important

classes of vaccines, such as live attenuated vaccines and DNA vaccines. Emerging evidence also supports the concept that nucleic acids and their metabolites are important endogenous mediators of the adjuvant effects of aluminium salt-based adjuvants (commonly referred to as alum), an important class of vaccine adjuvants. This knowledge could provide useful hints for the design and optimization of future vaccines.

Deconstructing live vaccines. Some live attenuated vaccines are among the most efficient vaccines ever developed. Although live attenuated vaccines cannot be generated against all types of pathogen, deconstructing the responses they induce may offer valuable clues for the design of new vaccines that mimic their mechanisms of action. Few studies have addressed this so far, but the data are starting to point towards a central role of nucleic acid-sensing PRRs in the response to live attenuated vaccines.

The yellow fever vaccine YF-17D is one of the most efficient antiviral vaccines ever developed, and it is able to induce protective immunity that lasts for decades. Evidence in mice indicates that YF-17D activates DCs through the concomitant stimulation of several TLRs (namely, TLR2, TLR7, TLR8 and TLR9), which results in the induction of CD8⁺ T cell responses and a mixed T_H1- and T_H2-type immune response⁵⁰. Although TLR2 signalling, which depends on MYD88, appears to downregulate the T_H1 and CD8⁺ T cell responses elicited by the vaccine, MYD88-dependent signalling is required for these responses. Without ruling out a potential contribution of IL-1 and related cytokines or other MYD88-dependent PRRs, these results suggest an important role for nucleic acid-sensing TLRs in the induction of adaptive T_H1-type responses to YF-17D. In support of this assumption, DCs from mice deficient for either TLR7 or TLR9 secrete less IL-12 than wild-type DCs following infection with YF-17D⁵⁰. In vaccinated humans, gene expression profiling indicates that YF-17D activates a prominent type I IFN response (which is probably controlled by IRF7) at the time the primary adaptive immune response is established^{51,52}. Furthermore, YF-17D upregulates the expression of TLR7 (REF. 51) and activates RIG-I and MDA5 (REF. 52), although the contribution of these receptors to adaptive immune responses in this context is currently unknown. Finally, a recent study in humans indicates that YF-17D induces innate immune gene expression profiles that functionally overlap with those elicited by an experimental adjuvant that is based on a modified polyI:C agonist of TLR3 and MDA5 (REF. 53).

Vaccinia virus is the attenuated virus that formed the basis of the vaccine that allowed the eradication of smallpox. It is now used as a vector in other vaccines. Vaccinia virus may activate several APC-expressed PRRs, including RIG-I, MDA5, TLR2, TLR6, TLR9 and NLRP3- and AIM2-dependent inflammasomes^{41,54,55}. Studies in knock-out mice have revealed that the activation of innate immune responses and the induction of CD8⁺ T cell population expansion and memory formation in response to vaccinia virus crucially depend on TLR2 (REF. 56), but also require type I IFN

production^{56,57}. Moreover, a recent report suggests that, in mice, type I IFN production following vaccinia virus infection may result from TLR8-dependent activation of pDCs, possibly through the recognition of AT-rich DNA⁵⁸. Whether this mechanism also occurs in humans, whose pDCs do not express TLR8, is not yet certain. In addition, cDCs may produce type I IFNs following vaccinia virus infection in a TLR-independent manner, probably through RLR-dependent signalling^{55,56}.

In the case of influenza A virus, a variety of vaccine compositions have been developed, including live attenuated, killed whole-virion and subunit vaccines. The influenza virus ssRNA genome has been shown to activate pDCs through TLR7 (REFS 59,60) and cDCs and stromal cells through RIG-I-dependent sensing^{61,62}. Influenza virus RNA also indirectly triggers inflammasome activation^{35,36,63}. Subunit vaccines, which are devoid of viral RNA, were shown to be ineffective at immunizing naive mice owing to their inability to stimulate pDCs, although they could still boost memory T cell responses⁶⁴. This evidence underscores the importance of viral nucleic acid sensing in influenza vaccination. By contrast, live attenuated and killed vaccines induce robust primary adaptive immune responses through TLR7, a process that requires the production of type I IFNs by pDCs in the case of killed vaccines^{64,65}.

Very few studies so far have investigated the role of nucleic acid-sensing PRRs in live attenuated bacterial vaccines. The immunogenicity of such vaccines — which include the *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine — is usually attributed to the innate recognition of bacterial cell wall components, mostly by TLR2 and TLR4. However, live bacteria may also activate APCs through nucleic acid-sensing PRRs^{17,22,66,67}. Recent research indicates that nucleic acid sensing could actually be key to the success of live bacterial vaccines.

One possible explanation for the higher efficiency of live attenuated bacterial vaccines over killed vaccines could be that the immune system is able somehow to sense general bacterial viability. This possibility has recently received support from an elegant study that compared the innate and adaptive immune responses induced by live and killed non-replicating non-virulent bacteria⁶⁸. Live bacteria, but not killed bacteria, were shown to induce pronounced expression of type I IFNs and the release of mature IL-1 β from infected macrophages and DCs. The augmented response to live bacteria was shown to depend on the sensing of bacterial mRNA, which is lost following the killing of the bacteria and was therefore termed a viability-associated PAMP ('vita-PAMP'). The cytosolic PRR responsible for vita-PAMP sensing in this context has not been identified, but the induction of type I IFNs by IRF3 and the generation of IL-1 β by the NLRP3 inflammasome were impaired in TRIF-deficient cells. The recognition of this vita-PAMP was proposed to depend on the absence of 3'-polyadenylation in bacterial mRNA. Consistent with the idea that vita-PAMP sensing may boost adaptive immune responses, killed bacteria mixed with bacterial mRNA were shown to induce humoral responses similar to those induced by live bacteria in mice.

Molecular mechanisms of DNA vaccination. DNA vaccines are one example of vector-based vaccines that are currently in development⁶⁹. What is considered a major advantage of DNA vaccines is their ability to induce the local expression of target antigens and to subsequently elicit T_H1 and CD8⁺ T cell responses along with T_H1-biased antibody production. DNA vaccines are currently used in veterinary medicine, and attempts in humans indicate a good tolerability and safety profile^{69,70}. However, DNA vaccines tend to display low immunogenicity in humans and this has hindered their development, although different approaches have been proposed to address this issue. The reasons for this lower responsiveness of humans compared with other mammals are currently unclear. Possible explanations could involve lower expression levels of certain components of the DNA-sensing machinery, differing expression patterns of nucleic acid-sensing PRRs or issues related to DNA delivery and processing in different cell types^{69,70}. It is likely that a more accurate characterization of the cellular and molecular mechanisms involved in nucleic acid sensing during DNA vaccination would help us to understand these issues and improve the design of such vaccines.

The plasmids used in DNA vaccination may contain CpG motifs, which would provide a built-in adjuvant because these PAMPs activate TLR9. However, TLR9 deficiency does not appear to affect the cellular or humoral immune responses to repeated DNA vaccination in mice^{47,71,72}, although TLR9 could participate in CD8⁺ T cell induction following the initial immunization⁷³. Instead, T_H1 and CD8⁺ T cell responses, as well as antibody production, in response to DNA vaccination in mice have been shown to crucially depend on the induction of type I IFNs through the STING-TBK1 axis^{47,74}. Although the PRR implicated in DNA detection in this context remains to be identified, this suggests that cytoplasmic receptors for DNA have a more prominent role than intracellular TLRs in mediating the effect of DNA vaccines. Given that STING engagement may also lead to NF- κ B activation⁷⁴, it could be worthwhile investigating the potential contribution of this pathway in DNA vaccination.

DNA vaccine administration may lead to the direct transfection of APCs or to the transfection of other tissue-resident cells, such as muscle cells. In the latter case, antigens may be indirectly acquired by DCs for presentation⁶⁹. Bone marrow transfer experiments in mice support the idea that antibody responses to DNA vaccination require TBK1 activation in haematopoietic cells (presumably DCs)⁴⁷. By contrast, TBK1 activity in non-haematopoietic cells (presumably stromal cells) is essential for CD8⁺ T cell activation. Finally, the activation of antigen-specific CD4⁺ T cells requires TBK1 activity in both the haematopoietic and non-haematopoietic compartments. Altogether, direct presentation, cross-presentation and bystander cytokine production are all likely to be essential for the adaptive immune response to DNA vaccines (FIG. 3).

Cross-presentation

A process by which certain antigen-presenting cells may take up and process extracellular antigens and present them on MHC class I molecules to CD8⁺ T cells.

Nucleic tricks of an old adjuvant. Alum is the oldest but most widely used of the few vaccine adjuvants that are licensed for human use^{1,75}. Alum mostly potentiates IgG1 and IgE production through the promotion of T_H2 cell responses, although the induction of CD8⁺ T cells by alum has also been reported⁷⁶. For decades, little attention has been given to the immunological mechanisms that drive the adjuvant activity of alum⁷⁷. Renewed interest was sparked by the discovery that alum activates the NLRP3 inflammasome^{78,79}. However, studies on the contribution of NLRP3 to the effects of alum on adaptive immune responses have generated conflicting results^{76,80}, suggesting that the NLRP3 inflammasome is not, in general, essential for the adjuvant activity of alum and that additional mechanisms are involved.

Dead lysed cells have been repeatedly observed at sites of alum injection^{81,82}, implying that alum may induce the release of DAMPs. Research in mouse models recently reported a role for two DAMPs, which were both connected to nucleic acid biology, in the adjuvant activity of alum^{83–85}. Uric acid is the end product of the degradation of purines, and may be rapidly released by injured cells following DNA and RNA degradation. Alum induces the accumulation of uric acid at sites of injection, and reducing uric acid levels *in vivo* through treatment with uricase was shown to inhibit T cell responses and the production of IgG1 and IgE^{83,84}. Uric acid has not been shown to form crystals (its usual form for recognition as a DAMP⁸⁶) at sites of alum injection, and the signalling pathways activated in this context remain to be identified. Alum also induces the rapid release of host cell DNA at sites of injection^{82,85}, and the elimination of extracellular DNA using DNase I treatment decreases alum-induced T cell responses and the production of IgG1 and IgE⁸⁵. Although the PRRs (or PRR) triggered by host DNA in alum immunization were not identified, IRF3 was shown to control the IgE response. However, any contribution of TLRs, RLRs or inflammasomes to this response was ruled out.

Harnessing nucleic acid sensors

With the increased recognition of the impact of nucleic acid-sensing PRRs on APC function, research is well underway to directly harness these PRRs using novel adjuvants. Several candidates, mostly TLR agonists so far, are now in the preclinical or early clinical stages of development⁷⁵.

TLR3 and RLR agonists. The activation of TLR3 in cDCs induces the production of IL-12, type I IFNs and pro-inflammatory cytokines by these cells and upregulates their expression of MHC class II and co-stimulatory molecules, as well as their cross-presentation activity^{86–89}. Of note, cDCs with strong cross-presentation activity — such as CD8 α ⁺ and CD103⁺ cDCs in mice and DNCR1⁺CD114⁺BDCA3⁺ cDCs in humans — express the highest levels of TLR3 (REFS 88–90).

In preclinical models, co-administration of TLR3 agonists with soluble or DC-targeted antigens was shown to induce durable T_H1 cell^{91–93} and CD8⁺ T cell⁸⁹ responses, as well as augmented antibody responses^{93–95}, which could confer protection against subsequent intracellular pathogen infection^{89,95}.

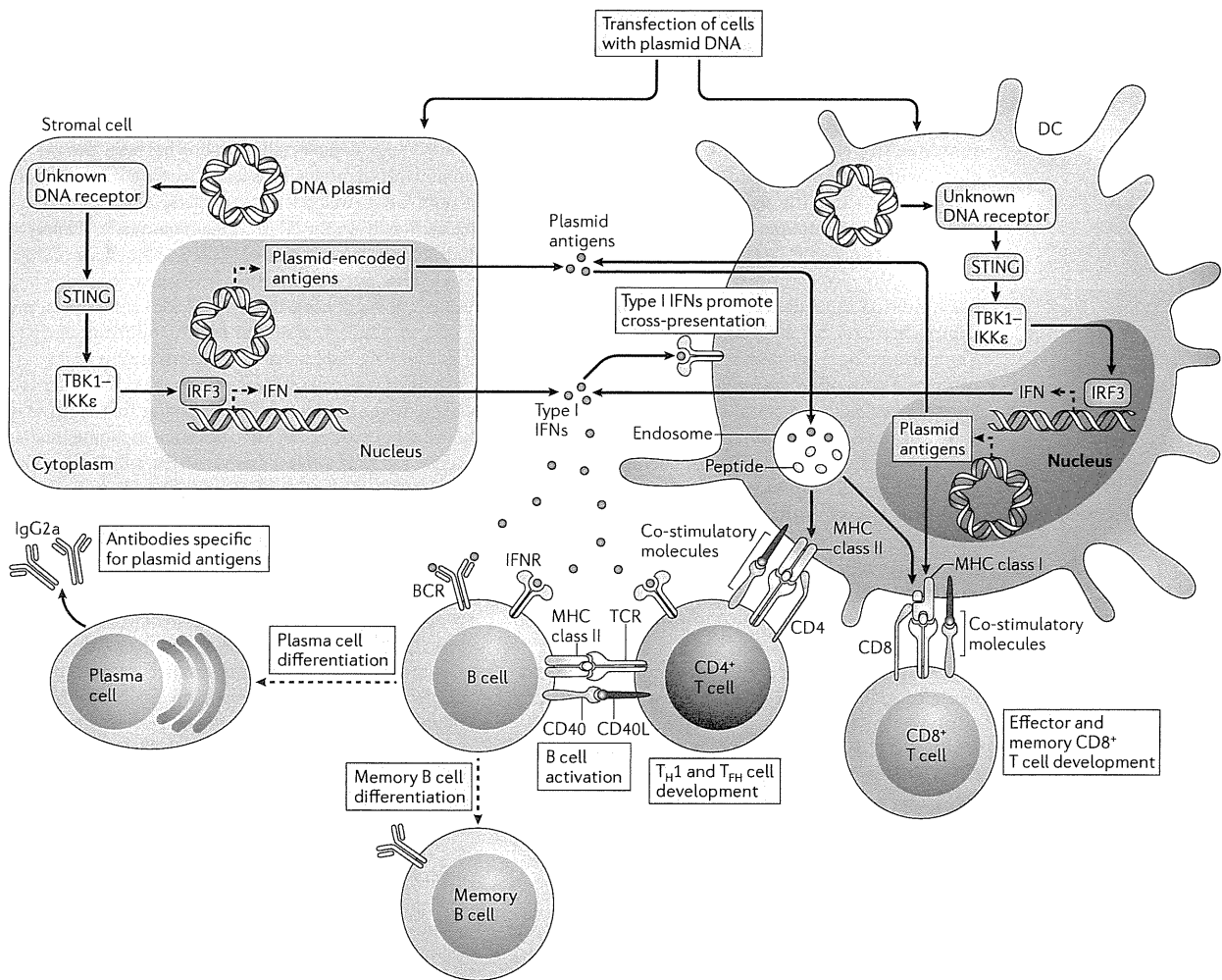


Figure 3 | Mechanisms of DNA vaccination. The plasmid DNA used in DNA vaccination may directly transfect stromal cells (such as muscle cells) or dendritic cells (DCs). In these cells, a cytosolic DNA receptor that has not yet been identified induces the activation of TANK-binding kinase 1 (TBK1) and I κ B kinase- ϵ (IKK ϵ) through stimulator of IFN genes (STING), leading to the activation of interferon- γ (IRF3) and resulting in the production of type I interferons (IFNs). The antigens encoded by the transfected plasmid DNA can also be expressed in stromal cells and DCs. In DCs, these antigens may be directly processed and presented on MHC class I molecules to naive CD8⁺ T cells. Alternatively, antigens may be indirectly acquired by DCs from stromal cells and then cross-presented to CD8⁺ T cells or presented to naive CD4⁺ T cells on MHC class II molecules. Type I IFN expression by stromal cells and DCs seems to be important for promoting the cross-presentation activity of DCs, as well as for the differentiation of T helper 1 (T_H1) cells and the promotion of T_H1-type isotype switching in B cells. BCR, B cell receptor; CD40L, CD40 ligand; TCR, T cell receptor; T_{FH}, T follicular helper.

Most TLR3 agonists, such as polyI:C, also activate MDA5 in DCs and stromal cells. Both TLR3 and MDA5 were proposed to participate in the induction of type I IFN production^{92,94,96}, which is essential for the development of polyI:C-induced T_H1 and CD8⁺ T cell responses^{92,96}. MDA5-dependent production of type I IFNs by stromal cells seems to be especially important for the generation of memory CD8⁺ T cells in such models⁹⁶. PolyI:C-induced activation of MDA5, but not TLR3, was also shown to be essential for the production of antibodies specific for a co-administered antigen in alum⁹⁴.

Even though the aforementioned immunization studies were performed in mice and nonhuman primates, data are emerging as to the potential adjuvant effects of ligands for TLR3 and MDA5 in humans. As mentioned above, a pilot systems biology study in human subjects compared the innate immune response induced by the YF-17D vaccine to that of an RNase-resistant analogue of polyI:C (polyI:C stabilized with poly-L-lysine and carboxymethylcellulose (polyICLC))⁵³. The gene expression profile of blood cells from polyICLC-treated subjects showed the induction of a type I IFN response as well as signatures associated with

NF- κ B signalling, inflammasomes and DC activation. However, the response was faster than that observed with YF-17D. TLR3 and MDA5 agonists are thus emerging as promising adjuvants in the development of vaccines that promote a T_H1 -type response against viruses and other intracellular pathogens.

TLR7 and TLR8 agonists. A preferred option to target TLR7 and TLR8 are the small synthetic compounds imidazoquinolines. Given that the expression patterns of TLR7 and TLR8 differ between mice and humans, caution should be exerted when extrapolating results obtained with TLR7 and TLR8 agonists from mice to humans.

In human pDCs, which express TLR7, the activation of this receptor leads to the expression of type I IFNs, IL-12 and pro-inflammatory cytokines, as well as to the upregulation of co-stimulatory molecules^{86,97}. Human cDCs express TLR8, and agonists of this TLR induce the expression of IL-12 and pro-inflammatory cytokines and the upregulation of co-stimulatory molecules^{90,98}.

In mice, the administration of an antigen together with a TLR7 or TLR8 agonist promotes T_H1 and CD8⁺ T cell responses^{99–101} and antibody production⁹⁹. Data from mice and nonhuman primates indicate that conjugation of the TLR7 or TLR8 agonist with the antigen and protein aggregation may result in a more efficient induction of T_H1 and CD8⁺ T cell responses^{102,103}. In mice immunized subcutaneously with an antigen–TLR7/8 agonist conjugate, the improvement in these responses has been attributed to more efficient antigen uptake by multiple DC subsets¹⁰³. TLR7-dependent production of type I IFNs has been implicated in this increased antigen uptake, as well as in the promotion of DC migration to the lymph nodes. Together with IL-12, type I IFNs appear to be required for optimal T_H1 and CD8⁺ T cell responses following the administration of TLR7 and TLR8 agonists^{101,103}. Thus, TLR7 and TLR8 agonists are emerging as promising candidate adjuvants for promoting T_H1 -type immune responses, although the development of improved formulation and delivery strategies is likely to be key for their efficiency in humans.

TLR9 agonists. TLR9 agonists (mostly different types of CpG oligodeoxynucleotides) are the most studied and probably the most advanced nucleic acid-sensing PRR agonists in development as potential immune response-biasing vaccine adjuvants^{75,104}. Again, it should be kept in mind when interpreting rodent studies that TLR9 expression is restricted in humans, being highest in pDCs and B cells, whereas mice have a broader expression pattern¹⁰⁵.

In human pDCs, stimulation of TLR9 leads to strong expression of type I IFNs, IL-12 and pro-inflammatory cytokines, as well as to the upregulation of co-stimulatory molecules⁸⁶. In B cells, TLR9 activation leads to the expression of pro-inflammatory cytokines and, in conjunction with CD40 engagement, synergistically promotes the production of antibodies and IL-12, which allows B cells to promote the differentiation of T_H1 cells¹⁰⁶. Concomitant stimulation of TLR9 in pDCs may further promote B cell antibody production and

memory B cell differentiation in the absence of T cell help through type I IFN production¹⁰⁷. In addition, TLR9 triggering synergizes with B cell receptor activation in the induction of antigen-specific B cell responses and promotes T_H1 -biased isotype switching¹⁰⁸. In mice, TLR9 agonists very potently induce T_H1 and CD8⁺ T cell responses as well as T_H1 -type B cell responses¹⁰⁴.

TLR9 agonists have entered clinical trials as adjuvants in hepatitis B, influenza and anthrax vaccines and have been shown to boost and accelerate protective antibody responses^{75,104}.

STING agonists. The discovery that STING may directly respond to cyclic di-GMP supports the idea that it could be targeted directly by novel adjuvant molecules. So far, this potential can only be inferred from data on cyclic di-GMP, which has immunostimulatory and adjuvant activities that are being increasingly documented¹⁰⁹. For instance, treatment with cyclic di-GMP may upregulate the expression of MHC class II molecules, co-stimulatory molecules, pro-inflammatory cytokines and type I IFNs by human and mouse cDCs^{110,111}. Furthermore, cyclic di-GMP has adjuvant effects on adaptive responses to soluble antigens in mice^{110,111}. It remains to be determined whether the adjuvant activity of cyclic di-GMP *in vivo* is entirely due to STING activation or also a result of other activities of this molecule. Either way, it is likely that STING has an important role, given that mice with an inactivating point mutation in the gene encoding STING display impaired type I IFN responses to cyclic di-GMP¹¹².

Combined adjuvants. In line with the observation that efficient live attenuated vaccines target multiple PRRs^{50,55}, combining multiple PRR agonists appears to be a promising rationale for the design of effective new adjuvants. This approach is already being applied, for instance in the clinically approved adjuvant AS04 (a combination of alum and a TLR4 ligand). Similar strategies aim to couple the potential of nucleic acid-sensing PRRs with that of other PRRs. To date, most studies have combined TLR ligands.

MYD88-dependent and TRIF-dependent TLR ligands synergistically activate cDCs. Thus, a combination of these ligands strongly increases the secretion of IL-12, type I IFNs and pro-inflammatory cytokines by cDCs, resulting in efficient activation of T_H1 cells and CD8⁺ T cells^{113,114}. A recent *in vivo* study in mice using such a combined adjuvant strategy indicated that combining aggregated TLR2–TLR6, TLR3 and TLR9 ligands could boost not only the number of antigen-specific CD8⁺ T cells, but also their avidity and functionality, providing a qualitative advantage over combinations of two agonists¹¹⁵. This difference has been linked to activation of the expression of IL-15 and IL-15 receptor subunit- α (IL-15Ra) by cDCs in a type I IFN-dependent manner¹¹⁵. In another study, a TLR4 agonist and a TLR7 agonist, which were combined in nanoparticles, were shown to have synergistic effects in increasing the levels of neutralizing antibodies and promoting the generation of memory B cells and long-lived plasma cells¹¹⁶. These effects were dependent on TLR triggering in

both DCs and B cells, and also on T cell help. Experimental immunizations using this combined adjuvant were shown to protect mice from lethal influenza virus infection and to boost neutralizing antibody responses in nonhuman primates¹¹⁶. Again, such studies highlight the benefit of optimizing formulation and delivery strategies in vaccines containing this type of adjuvant.

Conclusions and perspectives

Nucleic acid-sensing PRRs are taking centre stage in the induction of adaptive immune responses to many existing vaccines. Preclinical and clinical evidence indicates that the triggering of these receptors by selective agonists may suffice in mediating efficient immunization against co-administered antigens. Even though considerable progress has been made in the past decade since the discovery of the first nucleic acid-sensing PRR, much remains to be elucidated concerning the role of these receptors in adaptive immunity in general and in vaccination in particular.

A robust and comprehensive characterization of the nucleic acid-sensing machinery is likely to be key not only to a more complete understanding of antimicrobial immunity, but also for elucidating the mechanisms of action of many current vaccines. For instance, the monopoly of TLR9 on DNA sensing has recently been challenged by the discovery of cytosolic DNA-sensing mechanisms. However, the PRRs that mediate the response to nucleic acids in several important vaccination strategies — including DNA vaccination and alum-adjuvanted immunization — remain to be identified. A few novel DNA- and RNA-sensing PRRs have been proposed using *in vitro* approaches, and we expect that mice (conditionally) deficient for individual nucleic acid sensors should soon help to establish the respective contributions of these PRRs to antimicrobial immunity and vaccination. Moreover, a more advanced characterization of the expression patterns of these receptors and of their ligand-binding specificities could provide new molecular targets for experimental adjuvants or help to optimize delivery strategies. Notably, this could help us to understand the origin of human hyporesponsiveness to DNA vaccines, which deserves more scrutiny.

Another potentially important question is the extent to which host nucleic acids contribute to vaccination, in line with recent data suggesting a role for host DNA and uric acid in mediating the adjuvant effects of alum. In the context of alum-adjuvanted immunization, these

two DAMPs induce T_H2-type responses independently of type I IFNs^{83–85}. This is in contrast to most nucleic acid PAMPs, which induce T_H1-type responses that most often require type I IFN signalling. As it increasingly appears that PRR engagement may result in the active release of host nucleic acids¹¹⁷, we propose that it may be worthwhile studying the potential adjuvant or immunomodulatory effects of host nucleic acids and their metabolites in vaccination. This investigation would probably benefit from the identification of the receptors for uric acid and host DNA that are involved in alum-adjuvanted immunization.

Finally, achieving a more precise understanding of the APCs and the PRRs that are targeted by nucleic acids in different vaccination strategies is likely to be of utmost importance. Indeed, APCs, especially cDCs, are highly heterogeneous, and multiple distinct subsets are present at the various sites potentially used for vaccination and in the lymphoid organs that drain such sites¹¹⁸. The improving characterization of the functional specialization and plasticity of each DC subset provides opportunities for tailoring vaccines to preferentially target specific DC subsets¹¹⁹. Notably in this regard, the expression patterns of intracellular TLRs indicate a distinct distribution among DC subsets that correlates with the functional specialization of each subset^{13,88–90}. It is likely that further characterization of the contribution of pDCs to nucleic acid sensing will be of particular importance. Being ‘professional’ type I IFN producers, pDCs may at least be important bystander contributors to the triggering of T_H1-type immune responses by nucleic acid sensing in vaccination^{65,120}. Furthermore, recent data suggest that pDCs could directly participate in the activation of CD8⁺ T cells *in vivo*¹²¹, although this notion remains controversial¹²². Determining the main PRRs through which pDCs react to nucleic acids in different settings could also provide valuable information. Although most research to date has focused on TLRs, there is evidence, for instance, that pDCs may respond to immunostimulatory dsDNA via STING⁷⁴. Emerging mouse models that allow for the deletion of specific DC subsets or of genes encoding nucleic acid-sensing PRRs within these subsets are likely to help in deconstructing the relative contributions of pDCs and other DC subsets in the immune responses to different vaccines. This knowledge could be key to refining the formulation and delivery strategies for new vaccine adjuvants tailored to elicit specific types of adaptive immune response.

- Coffman, R. L., Sher, A. & Seder, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **33**, 492–503 (2010).
- Pulendran, B. & Ahmed, R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nature Immunol.* **131**, 509–517 (2011).
- Plotkin, S. A. Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. *Clin. Infect. Dis.* **47**, 401–409 (2008).
- Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* **327**, 291–295 (2010).
- Pichlmair, A. & Reis e Sousa, C. Innate recognition of viruses. *Immunity* **27**, 370–383 (2007).
- Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
- Barbalat, R., Ewald, S. E., Mouchess, M. L. & Barton, G. M. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 185–214 (2011).
- Chen, G. Y. & Nunez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Rev. Immunol.* **10**, 826–837 (2010).
- Blasius, A. L. & Beutler, B. Intracellular Toll-like receptors. *Immunity* **32**, 305–315 (2010).
- Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637–650 (2011).
- Loo, Y. M. & Gale, M. Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* **34**, 680–692 (2011).
- Kadowaki, N. *et al.* Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* **194**, 863–869 (2001).
- Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunol.* **5**, 987–995 (2004).
- Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
- Schlee, M. & Hartmann, G. The chase for the RIG-I ligand — recent advances. *Mol. Ther.* **18**, 1254–1262 (2010).
- Ablasser, A. *et al.* RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nature Immunol.* **10**, 1065–1072 (2009).

REVIEWS

17. Chiu, Y.-H., MacMillan, J. B. & Chen, Z. J. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* **138**, 576–591 (2009).
18. Kato, H. *et al.* Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* **205**, 1601–1610 (2008).
19. Malathi, K., Dong, B., Gale, M. & Silverman, R. H. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* **448**, 816–819 (2007).
20. Venkataraman, T. *et al.* Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J. Immunol.* **178**, 6444–6455 (2007).
21. Satoh, T. *et al.* LGP2 is a positive regulator of RIG-I and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 1512–1517 (2010).
22. Monroe, K. M., McWhirter, S. M. & Vance, R. E. Identification of host cytosolic sensors and bacterial factors regulating the type I interferon response to *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog.* **5**, e1000665 (2009).
23. Li, X. D. *et al.* Mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) monitors commensal bacteria and induces an immune response that prevents experimental colitis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 17390–17395 (2011).
24. Poeck, H. *et al.* Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 β production. *Nature Immunol.* **11**, 63–69 (2010).
25. Ishikawa, H. & Barber, G. N. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* **455**, 674–678 (2008).
26. Zhong, B. *et al.* The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* **29**, 538–550 (2008).
27. Oshiumi, H., Sakai, K., Matsumoto, M. & Seya, T. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN- β -inducing potential. *Eur. J. Immunol.* **40**, 940–948 (2010).
28. Zhang, Z. *et al.* DDX1, DDX21, and DHX36 helicases form a complex with the adaptor molecule TRIF to sense dsRNA in dendritic cells. *Immunity* **34**, 866–878 (2011).
29. Miyashita, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M. & Seya, T. DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3802–3819 (2011).
30. Kim, T. *et al.* Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 15181–15186 (2010).
31. Zhang, Z. *et al.* The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nature Immunol.* **12**, 959–965 (2011).
32. Zhang, Z., Yuan, B., Lu, N., Facchinetti, V. & Liu, Y. J. DHX9 pairs with IPS-1 to sense double-stranded RNA in myeloid dendritic cells. *J. Immunol.* **187**, 4501–4508 (2011).
33. Elinav, E., Strouj, T., Henao-Mejia, J. & Flavell, R. A. Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity* **34**, 665–679 (2011).
34. Sabbah, A. *et al.* Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nature Immunol.* **10**, 1073–1080 (2009).
35. Kanneganti, T. D. *et al.* Critical role for Cypripyn/ Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J. Biol. Chem.* **281**, 36560–36568 (2006).
36. Allen, I. C. *et al.* The NLRP3 inflammasome mediates *in vivo* innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* **30**, 556–565 (2009).
37. Shimada, K. *et al.* Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* **36**, 401–414 (2012).
38. Keating, S. E., Baran, M. & Bowie, A. G. Cytosolic DNA sensors regulating type I interferon induction. *Trends Immunol.* **32**, 574–581 (2011).
39. Burckstummer, T. *et al.* An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nature Immunol.* **10**, 266–272 (2009).
40. Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Datta, P., Wu, J. & Alnemri, E. S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* **458**, 509–513 (2009).
41. Hornung, V. *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**, 514–518 (2009).
42. Roberts, T. L. *et al.* HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* **323**, 1057–1060 (2009).
43. Unterholzner, L. *et al.* IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature Immunol.* **11**, 997–1004 (2010).
44. Kerur, N. *et al.* IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe* **9**, 363–375 (2011).
45. Takaoka, A. *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**, 501–505 (2007).
46. Kaiser, W. J., Upton, J. W. & Mocarski, E. S. Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF- κ B activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors. *J. Immunol.* **181**, 6427–6434 (2008).
47. Ishii, K. J. *et al.* TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* **451**, 725–729 (2008).
48. Yang, P. *et al.* The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a β -catenin-dependent pathway. *Nature Immunol.* **11**, 487–494 (2010).
49. Burdette, D. L. *et al.* STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* **478**, 515–518 (2011).
50. Querec, T. *et al.* Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med.* **203**, 413–424 (2006).
51. Gaucher, D. *et al.* Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J. Exp. Med.* **205**, 3119–3131 (2008).
52. Querec, T. D. *et al.* Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nature Immunol.* **10**, 116–125 (2009).
53. Caskey, M. *et al.* Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans. *J. Exp. Med.* **208**, 2357–2366 (2011). **References 51–53 illustrate how systems biology may help to deconstruct the mechanisms of action of current vaccines in humans.**
54. Samuelsson, C. *et al.* Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *J. Clin. Invest.* **118**, 1776–1784 (2008).
55. Delaloye, J. *et al.* Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. *PLoS Pathog.* **5**, e1000480 (2009).
56. Zhu, J., Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production of IFN- β . *Blood* **109**, 619–625 (2007).
57. Quigley, M., Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. A critical role for direct TLR2–MyD88 signaling in CD8 T-cell clonal expansion and memory formation following vaccinia viral infection. *Blood* **113**, 2256–2264 (2009).
58. Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. Toll-like receptor 8-mediated activation of murine plasmacytoid dendritic cells by vaccinia viral DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 6442–6447 (2010).
59. Diebold, S. S., Kisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529–1531 (2004).
60. Lund, J. M. *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 5598–5603 (2004).
61. Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunol.* **5**, 730–737 (2004).
62. Kato, H. *et al.* Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**, 19–28 (2005).
63. Thomas, P. G. *et al.* The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity* **30**, 566–575 (2009).
64. Koyama, S. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci. Transl. Med.* **2**, 25ra24 (2010).
65. Aoshi, T., Koyama, S., Kobayama, K., Akira, S. & Ishii, K. J. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 226–232 (2011).
66. Mancuso, G. *et al.* Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nature Immunol.* **10**, 587–594 (2009).
67. von Meyenn, F. *et al.* Toll-like receptor 9 contributes to recognition of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin by Flt3-ligand generated dendritic cells. *Immunobiology* **211**, 557–565 (2006).
68. Sander, L. E. *et al.* Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature* **474**, 385–389 (2011). **This study supports the idea that bacterial nucleic acids may be recognized as a signal of microbial viability and may contribute to an enhanced adaptive immune response against the pathogen.**
69. Liu, M. A. Immunologic basis of vaccine vectors. *Immunity* **33**, 504–515 (2010).
70. Coban, C. *et al.* Novel strategies to improve DNA vaccine immunogenicity. *Curr. Gene Ther.* **11**, 479–484 (2011).
71. Spies, B. *et al.* Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice. *J. Immunol.* **171**, 5908–5912 (2003).
72. Babiuk, S. *et al.* TLR9^{-/-} and TLR9^{+/-} mice display similar immune responses to a DNA vaccine. *Immunology* **113**, 114–120 (2004).
73. Rottembourg, D. *et al.* Essential role for TLR9 in prime but not prime–boost plasmid DNA vaccination to activate dendritic cells and protect from lethal viral infection. *J. Immunol.* **184**, 7100–7107 (2010).
74. Ishikawa, H., Ma, Z. & Barber, G. N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* **461**, 788–792 (2009). **This study identifies STING as an essential adapter protein in the signalling pathways of TBK1-activating cytosolic DNA sensors.**
75. Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. M. & Rappuoli, R. New adjuvants for human vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 411–416 (2010).
76. McKee, A. S. *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.* **183**, 4403–4414 (2009).
77. Marrack, P., McKee, A. S. & Munks, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Rev. Immunol.* **9**, 287–293 (2009).
78. Hornung, V. *et al.* Silica crystals and aluminium salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunol.* **9**, 847–856 (2008).
79. Eisenbarth, S. C., Colegio, O. R., O'Connor, W., Sutterwala, F. S. & Flavell, R. A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* **453**, 1122–1126 (2008).
80. Spreafico, R., Ricciardi-Castagnoli, P. & Mortellaro, A. The controversial relationship between NLRP3, alum, danger signals and the next-generation adjuvants. *Eur. J. Immunol.* **40**, 638–642 (2010).
81. Goto, N. *et al.* Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine* **15**, 1364–1371 (1997).
82. Munks, M. W. *et al.* Aluminium adjuvants elicit fibrin-dependent extracellular traps *in vivo*. *Blood* **116**, 5191–5199 (2010).
83. Kool, M. *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **205**, 869–882 (2008).
84. Kool, 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* **34**, 527–540 (2011).
85. Marichal, T. *et al.* DNA released from dying host cells mediates aluminium adjuvant activity. *Nature Med.* **17**, 996–1002 (2011).
86. Lore, K. *et al.* Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J. Immunol.* **171**, 4320–4328 (2003).
87. Schulz, O. *et al.* Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* **433**, 887–892 (2005).
88. Jongbloed, S. L. *et al.* Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* **207**, 1247–1260 (2010).

89. Jelinek, I. *et al.* TLR3-specific double-stranded RNA oligonucleotide adjuvants induce dendritic cell cross-presentation, CTL responses, and antiviral protection. *J. Immunol.* **186**, 2422–2429 (2011).
90. Poulin, L. F. *et al.* Characterization of human DNGR-1⁺ BDCA3⁺ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8a⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* **207**, 1261–1271 (2010).
91. Trumppfeller, C. *et al.* The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4⁺ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 2574–2579 (2008).
92. Longhi, M. P. *et al.* Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J. Exp. Med.* **206**, 1589–1602 (2009).
93. Stahl-Hennig, C. *et al.* Synthetic double-stranded RNAs are adjuvants for the induction of T helper 1 and humoral immune responses to human papillomavirus in rhesus macaques. *PLoS Pathog.* **5**, e1000373 (2009).
94. Kumar, H., Koyama, S., Ishii, K. J., Kawai, T. & Akira, S. Cutting edge: cooperation of IPS-1 and TRIF-dependent pathways in poly IC-enhanced antibody production and cytotoxic T cell responses. *J. Immunol.* **180**, 683–687 (2008).
95. Tewari, K. *et al.* Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4⁺ T cell responses to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) and aDEC-CSP in non human primates. *Vaccine* **28**, 7256–7266 (2010).
96. Wang, Y., Cella, M., Gillfillan, S. & Colonna, M. Cutting edge: polyinosinic:polycytidylic acid boosts the generation of memory CD8 T cells through melanoma differentiation-associated protein 5 expressed in stromal cells. *J. Immunol.* **184**, 2751–2755 (2010).
97. Russo, C. *et al.* Small molecule Toll-like receptor 7 agonists localize to the MHC class II loading compartment of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **117**, 5683–5691 (2011).
98. Levy, O., Suter, E. E., Miller, R. L. & Wessels, M. R. Unique efficacy of Toll-like receptor 8 agonists in activating human neonatal antigen-presenting cells. *Blood* **108**, 1284–1290 (2006).
99. Hamm, S. *et al.* Immunostimulatory RNA is a potent inducer of antigen-specific cytotoxic and humoral immune response *in vivo*. *Int. Immunol.* **19**, 297–304 (2007).
100. Zhang, W. W. & Matlashewski, G. Immunization with a Toll-like receptor 7 and/or 8 agonist vaccine adjuvant increases protective immunity against *Leishmania major* in BALB/c mice. *Infect. Immun.* **76**, 3777–3783 (2008).
101. Rajagopal, D. *et al.* Plasmacytoid dendritic cell-derived type I interferon is crucial for the adjuvant activity of Toll-like receptor 7 agonists. *Blood* **115**, 1949–1957 (2010).
102. Wille-Reece, U. *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. USA* **102**, 15190–15194 (2005).
103. Kastenmuller, K. *et al.* Protective T cell immunity in mice following protein-TLR7/8 agonist-conjugate immunization requires aggregation, type I IFN, and multiple DC subsets. *J. Clin. Invest.* **121**, 1782–1796 (2011).
- References 102 and 103 show how optimizing the formulation of agonists for nucleic acid sensors may affect quantitative and qualitative aspects of the response to subunit vaccines adjuvanted with such molecules.
104. Huang, X. & Yang, Y. Targeting the TLR9–MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses. *Expert Opin. Ther. Targets* **14**, 787–796 (2010).
105. Campbell, J. D. *et al.* CpG-containing immunostimulatory DNA sequences elicit TNF- α -dependent toxicity in rodents but not in humans. *J. Clin. Invest.* **119**, 2564–2576 (2009).
106. Wagner, M. *et al.* IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA. *J. Immunol.* **172**, 954–963 (2004).
107. Poeck, H. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T cell help. *Blood* **103**, 3058–3064 (2004).
108. Krieg, A. M. *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546–549 (1995).
109. Chen, W., Kuolee, R. & Yan, H. The potential of 3',5'-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) as an effective vaccine adjuvant. *Vaccine* **28**, 3080–3085 (2010).
110. Karaolis, D. K. *et al.* Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule. *J. Immunol.* **178**, 2171–2181 (2007).
111. McWhirter, S. M. *et al.* A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. *J. Exp. Med.* **206**, 1899–1911 (2009).
112. Sauer, J. D. *et al.* The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the *in vivo* interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infect. Immun.* **79**, 688–694 (2011).
113. Trinchieri, G. & Sher, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Rev. Immunol.* **7**, 179–190 (2007).
114. Zhu, Q. *et al.* Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: implications for vaccines. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 16260–16265 (2008).
115. Zhu, Q. *et al.* Using 3 TLR ligands as a combination adjuvant induces qualitative changes in T cell responses needed for antiviral protection in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 607–616 (2010).
116. Kasturi, S. P. *et al.* Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* **470**, 543–547 (2011).
- References 115 and 116 illustrate how combining nucleic acid sensor agonists and optimizing their delivery strategies could allow fine-tuning of the responses to subunit vaccines.
117. Remijsen, Q. *et al.* Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ.* **18**, 581–588 (2011).
118. Hashimoto, D., Miller, J. & Merad, M. Dendritic cell and macrophage heterogeneity *in vivo*. *Immunity* **35**, 323–335 (2011).
119. Palucka, K., Banchereau, J. & Mellman, I. Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity* **33**, 464–478 (2010).
120. Gilliet, M., Cao, W. & Liu, Y.-J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature Rev. Immunol.* **8**, 594–606 (2008).
121. Takagi, H. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells are crucial for the initiation of inflammation and T cell immunity *in vivo*. *Immunity* **35**, 958–971 (2011). This study suggests a direct role of pDCs in the priming of CD8⁺ T cell responses *in vivo*.
122. Reizis, B., Colonna, M., Trinchieri, G., Barrat, F. & Gilliet, M. Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system? *Nature Rev. Immunol.* **11**, 558–565 (2011).
123. Janeway, C. A. Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54** (Pt 1), 1–13 (1989).
124. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045 (1994).
125. González-Navajas, J. M., Lee, J., David, M. & Raz, E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nature Rev. Immunol.* **12**, 125–135 (2012).
126. Sadler, A. J. & Williams, B. R. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Rev. Immunol.* **8**, 559–568 (2008).

Acknowledgements

The authors thank F. Bureau, C. Coban and T. Marichal for critical reading of the manuscript. C.J.D. is supported by the Fonds National de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS, Belgium; Fonds pour la Recherche Scientifique Médicale grant). K.J.I. is supported by a Health and Labour Sciences Research Grant of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare and by the Core Research Evolutionary Science and Technology (CREST) programme at the Japan Science and Technology Agency.

Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

FURTHER INFORMATION

Christophe J. Desmet's homepage: <http://www.giga.ucl.ac.be/pcm>
 Ken J. Ishii's homepage: <http://www.ifrec.osaka-u.ac.jp/en/laboratory/vaccinescience/index.php>

ALL LINKS ARE ACTIVE IN THE ONLINE PDF

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)方法を踏まえたくうえで、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

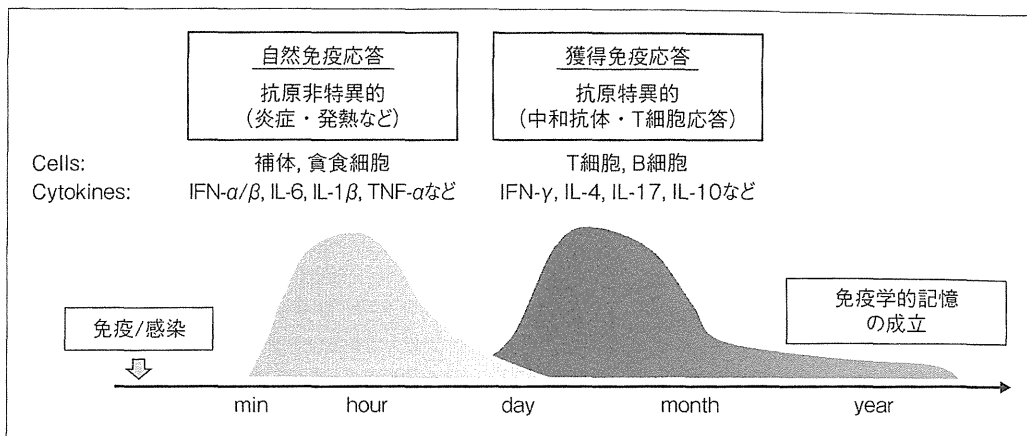


図1 ワクチン・感染後の免疫応答

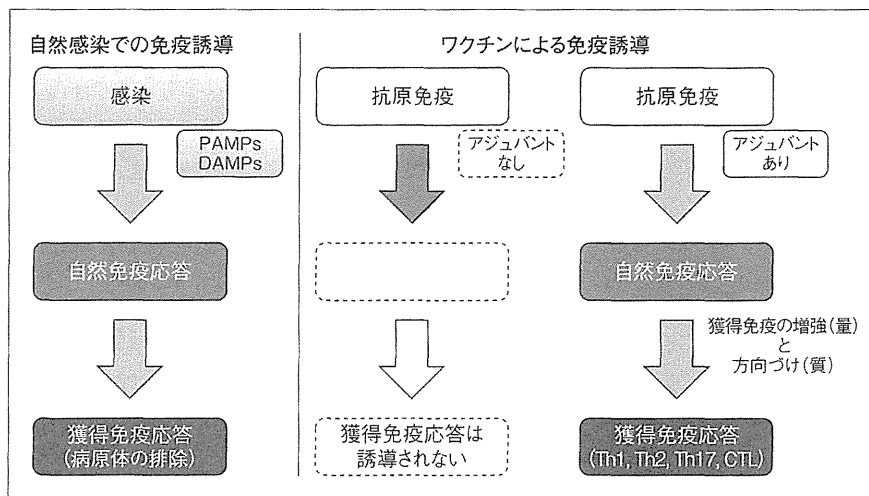


図2 ワクチンによる免疫誘導

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 TLR2/6	Triacyl lipopeptide Diacyl lipopeptide	Pam3CSK4 Macrophage-activating lipopeptide 2 (MALP-2)	U1RNA ⁹⁾ HMGB1, OxPL ⁴⁾ siRNA ⁸⁾ Host DNAs
	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 MDA5	5'-PPP ssRNA or 短い (~1 kb) dsRNA 長い (>2 kb) dsRNA	unknown Poly I : C	
NLRs	NOD1	Peptideglycans, Diaminopimelic acid (iE-DAP)	FK156, FK565	Uric acid, ATP
	NOD2	Peptideglycans, Muramyl dipeptides (MDP)	Muramyl dipeptides (MDP)	
	NLRP3 NAIP5	oxidized mtDNA ? ¹¹⁾ Bacterial flagellin	Aluminum salts, MSU, Silica Flagellin-protein fusions	
	CLRs	Dectin-1 Dectin-2 Mincle Clec9A	β 1,3-glucan High mannose structures Trehalose-6,6-dimycolate (TDM) ? ?	
ALRs	AIM-2 IFI16	dsDNA dsDNA	unknown 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, 核酸などの非蛋白質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。

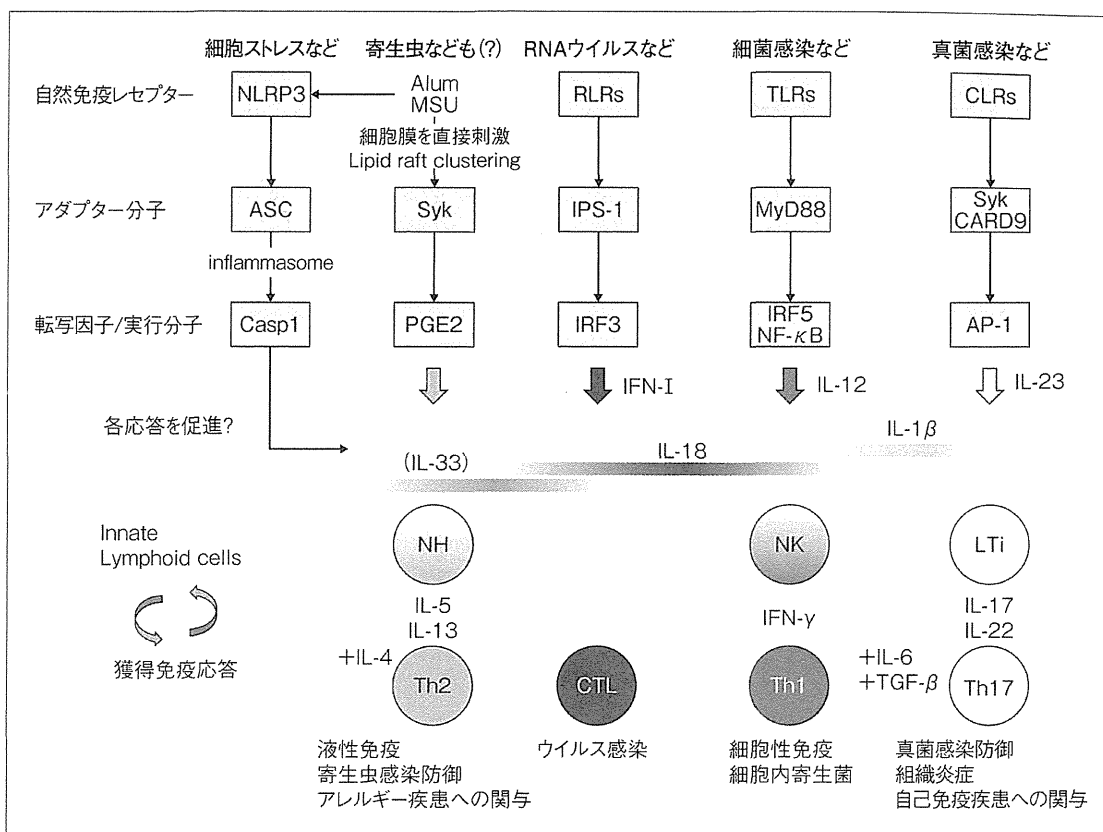


図 3 自然免疫応答とTh細胞応答

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、

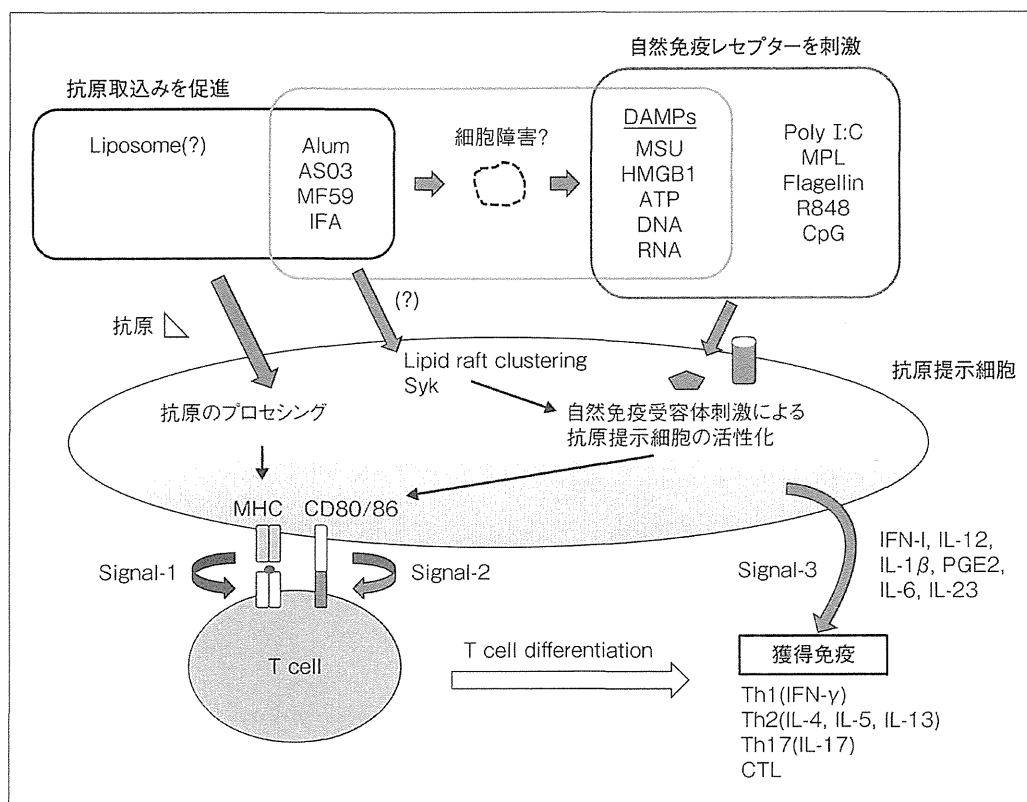


図 4 アジュバントの抗原提示における役割

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依存的な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依存的な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。次世代のワクチンには予測可能な(predicable)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

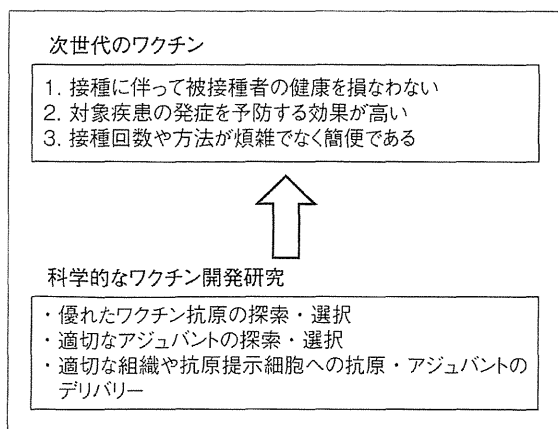


図 5 次世代ワクチンに求められる要件

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

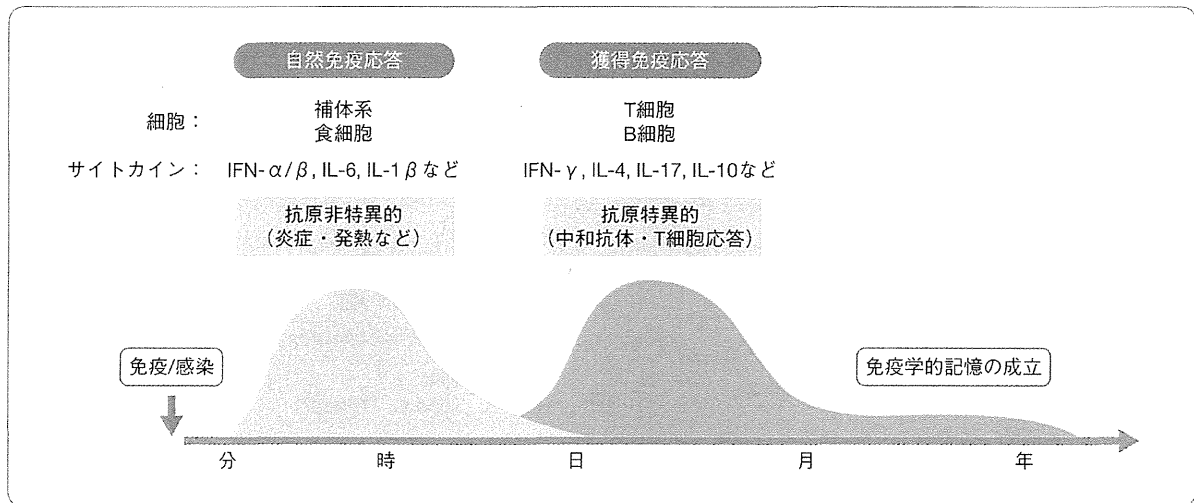


図 23-1 ワクチン/感染後の生体免疫応答

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 ウィルス)	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 (トキンプラズマ)	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する必要がある。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

PAMP (pathogen-associated molecular pattern) あるいは MAMP (microbe-associated molecular pattern) とよばれ、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タンパク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 はエンドソームに局在し、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リガンドのフラジェリンと TLR11リガンドのプロフィリン様タンパク質を除いて、ほとんどの自然免疫受容体リガンドは脂質、糖鎖、核酸などの非タンパク質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タンパク質抗原由来のペプチド(8~15アミノ酸)や抗原タンパク質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 pattern (DAMP) も認識することが知られ^{5)~10)}(表23-1)、自己由来のこれらの DAMP 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。

23-3 現行のワクチン(生ワクチン、不活化ワクチン)

現在わが国で用いられているワクチンには、表23-2に示したものがあげられ、それらのワクチンは大きく「生ワクチン」と「不活化ワクチン」に分けられる。生ワクチンは、毒性や病原性を弱めた微生物をそのままワクチンとして用いるもので、弱毒化した生きた病原体をそのまま接種するため実際の感染で誘導されるのとほぼ同様の免疫反応が引き起こされ、獲得免疫を誘導するために外来性のアジュバントを必要としない。不活化ワクチ

ンは、病原体をホルマリンなどの化学物質で処理して感染性を不活化したもので、さらに3つに分類することができる。全粒子ワクチンは、ウイルス粒子をまるごとホルマリンなどで固定・不活化したもので、病原体のもつほぼすべての成分が不活化された病原体粒子に含まれるため、外来性のアジュバントはほとんどの場合必要ない。スプリット / コンポーネントワクチンは、病原体を不活化したのち、さらに防御免疫効果の高い病原体由来成分だけ(たとえばインフルエンザの HA 抗原など)を高度に濃縮・精製したもので、防御抗原だけに精製されているため、本来病原体がもっていた自然免疫受容体を刺激する PAMP は精製過程で失われていることが多く、免疫反応を効率よく誘導するためにアルミニウム塩(Alum)などの外来性アジュバントが添加されることが多い。また、病原体の産生する外毒素がその病原性に大きくかかわっている場合には、病原体の産生する毒素のみを精製してホルマリンで不活化したものであるトキソイド(不活化外毒素)をワクチンとして投与し、それら毒素に対して抗体をつくらせることで効果的に病気の発症を抑えることができるが、この場合も外来性アジュバントとして水酸化アルミニウムが添加されている。

23-4 現行ワクチンの課題

これらの現行ワクチンは、歴史的な背景や試行錯誤による経験に基づいて開発されたものが多く、公衆衛生を含めた社会的な要請によって使用され、かつ効果が実証されてきたため、分子レベルでの個々のワクチンの作用メカニズムの多くはまだまだに不明である。現時点ではワクチン接種に伴って発生した有害事象(真のワクチンによる副反応・副作用と偶然ワクチン接種と時期を同じく発生したワクチンとは関係のない疾病発生の両方を含む)とワクチン接種そのものに起因する副反応・副作用を科学的に解析することは非常に困難であり、ワクチンに対する不信や拒絶の一因となっている。また最近報道を通じて取り上げられることの多い

表 23-2 現行ワクチンの種類とその特徴

	生ワクチン	不活化ワクチン		
		全粒子ワクチン	スプリットワクチン コンポーネントワクチン	トキソイド (不活化外毒素)
特徴	毒性や病原性を弱めた微生物(細菌やウイルス)をそのままワクチンとして用いる	ホルマリンなどの化学処理で病原微生物をそのまま殺した(不活化した)もの	病原体を不活化した後、破砕し、免疫に有用な成分(抗原)のみを高度に濃縮・精製したもの	病原体の産生する外毒素のみを精製し、ホルマリンなどで不活化したもの
接種時の自然免疫反応	+++++	+++	±	-~++
安全性	+	++	+++	+++
免疫効果	+++++	+++++	+~++	+++++
誘導される免疫反応	B 細胞(抗体) CD4 ⁺ T 細胞(Th1) CD8 ⁺ T 細胞(CTL)	B 細胞(抗体) CD4 ⁺ T 細胞 (Th1>Th2)	B 細胞(抗体) CD4 ⁺ T 細胞 (Th1/Th2)	B 細胞(抗体) CD4 ⁺ T 細胞 (Th1<Th2)
ワクチンの例 (外来性アジュバントが添加されていないもの)	BCG, ポリオ, 麻疹風疹混合(MR) 麻疹, 風疹 流行性耳下腺炎, 水痘 黄熱, ロタウイルス	A 型肝炎 日本脳炎 狂犬病	インフルエンザ 肺炎球菌(23価多糖体) b 型インフルエンザ菌 (Hib)(破傷風トキソイドとのコンジュゲート)	—
ワクチンの例 (外来性アジュバントが添加されているもの)	—	プレバンデミックインフルエンザワクチン(A/H5N1):(水酸化アルミニウム)[緊急時のための備蓄ワクチン]	B 型肝炎:(水酸化アルミニウム) 肺炎球菌7価結合型(ジフテリア毒素 CRM197 とのコンジュゲート):(リン酸アルミニウム) ヒトパピローマウイルス(HPV)2 価:(水酸化アルミニウム + MPL) ヒトパピローマウイルス(HPV)4 価:(リン酸アルミニウム)	DTP/DT:(水酸化アルミニウム) 破傷風トキソイド:(水酸化アルミニウム) 成人用ジフテリアトキソイド:(水酸化アルミニウム)

ポリオの経口生ワクチンと不活化ワクチンの問題に代表されるように、弱毒化されているとはいえ感染性を保持した生きた病原微生物を接種する生ワクチンは、原理的に、潜在的な病原性復帰や免疫不全状態による発病などのリスクを抱えている。そのため、現行の生ワクチンの中で最も有効で安全なポリオ経口生ワクチン oral attenuated polio vaccine (OPV) であっても約100万人に1人のワクチン株に由来するポリオ麻痺 vaccine associated polio paralysis (VAPP)は避けられず、不活化ポリオワクチン inactivated polio vaccine (IPV) への移行が進められている。このような弱毒生ワクチンから不活化ワクチンへの移行という社会的な要請は今後も続くと考えられるが、安全性を高めるためにワクチン抗原の精製度を高めれば高めるほど、獲得免疫を誘導するために重要な病原体

に由来する内在性自然免疫リガンドが失われるため、外来性アジュバントの添加を必要とするケースが増加することが予想される。しかしながら現在認可され広く使用されている外来性アジュバントはアルミニウム塩だけであり、過去80年間全世界でヒトに用いられ安全性に問題はないとされてはいるが、その作用メカニズムもいまだ十分に明らかにされているとはいえない^{11), 12)}。またアルミニウム塩はマウスモデルにおいては力価の高い中和抗体産生を促すが、同時に強く Th2 タイプの免疫応答を惹起する。そのため、現行のアルミニウム塩が添加された不活化ワクチンによる免疫が、ヒトにおいても、一般的に細菌やウイルス感染に対する防御により有効とされる Th1 タイプの免疫応答よりもアレルギーなどへの関与が示唆される Th2 タイプの免疫応答を誘導している可能性も否