

第4章 研究開発事例

表1

	PRRs (受容体)	PAMPs (リガンド)	認識されるウイルス
TLRs	TLR2/1	Peptidoglycan, Glycolipids, diacyl or triacyl	麻疹ウイルス
	TLR2/6	lipopeptides, Phospholipomannan	
	TLR3	dsRNA, siRNA	ウエストナイルウイルス, MCMV, EMCV
	TLR4	LPS, RS ウイルス融合蛋白, phosphorylcholine, glycan, Mannan	RS ウイルス
	TLR5	Flagellin	
	TLR7	ssRNA	RNA ウイルス全般
	TLR9	非メチル化 CpG, Hemozoine	DNA ウイルス
RLRs	TLR11	Profilin-like molecule	
	RIG-I	ssRNA 5' 末端 3 リン酸, 短い (~1 kb) dsRNA	センダイウイルス, VSV, インフルエンザウイルス
	MDA5	長い (> 2 kb) dsRNA	EMCV, メンゴウイルス
NLRs	NOD1	NOD1 : diaminoiphilic acid (iE-DAP)	
	NOD2	NOD2 : muramyl dipeptides	
	NLRP3 (NALP3)	細菌 RNA, LPS, pore-forming toxins, muramyl dipeptides, アスベスト, シリカ	インフルエンザウイルス
	NLRC4	Flagellin + ?	
CLRs	NAIP5	Flagellin	
	Dectin-1	$\beta$ -glucan, Zymosan	

LPS : lipopolysaccharide, MCMV : Mouse Cytomegalovirus, EMCV : Encephalomyocarditis virus

する段階（後述するが、この時もウイルス由来の核酸が PRRs によって認識されることが、ワクチンの効果にきわめて重要であることが分かった）

以上の自然免疫応答のメカニズムの詳細について説明する。

①；これまで、ウイルスの表面蛋白を細胞膜上に存在する TLR が認識するケースがいくつか報告されている。Respiratory syncytial virus (RSV), Mouse mammary tumor virus (MMTV), Murine leukemia virus (MMLV) のエンベロープ蛋白や, Coxsackievirus B4 のウイルス構成蛋白は TLR4 によって認識される。また麻疹ウイルスや Cytomegalovirus (CMV) のエンベロープ蛋白は TLR2 によって認識されることが知られている<sup>5)</sup>。

②-⑤；①の受容体が細胞表面に存在するのに対して、これらに関わる受容体はいずれも細胞内に存在する。受容体としては、TLRs の一部 (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9), RLRs の一部 (RIG-I, MDA5) や NLRs の一部 (NALP3) の関与が報告されている<sup>6, 7)</sup>。そしていずれにも共通するのは、ウイルス由来の核酸構造を認識することである。これらの TLR は全てエンドソームの膜上に存在するのに対して、RIG-I, MDA5, NALP3 はいずれも細胞質内に存在する。②④⑤のように、ウイルスもしくはウイルス感染細胞がエンドソームに取り込まれた場合、これらの TLRs が自然免疫応答を担当し、Rotavirus などのレオウイルス科のウイルスや CMV などの 2 本鎖 RNA (dsRNA) は TLR3, Influenza virus, Vesicular stomatitis virus (VSV),

HIVなどの1本鎖RNA(ssRNA)はTLR7もしくはTLR8, Herpes simplex virus(HSV)-1やHSV-2などのDNA非メチル化CpGモチーフはTLR9によってそれぞれ認識される。一方細胞内に存在する受容体による認識に関しては, Sendai virus, Influenza virus, VSVなどはRIG-I, Mengo virusはMDA5(RLRsはいずれもRNAウイルスを認識), Influenza virus, AdenovirusなどはNALP3(NALP3はRNA・DNAいずれのウイルスにも関係する)によってそれぞれ認識される<sup>8-10)</sup>。ワクチンについては, 例えば全粒子不活化インフルエンザワクチンはTLR7によって, また以前よりアジュバントとして使用されてきた合成dsRNAのpoly I:CはTLR3およびMDA5によって認識されることが知られている<sup>11, 12)</sup>。生ワクチンや全粒子不活化ワクチンなどが, 標的抗原だけを濃縮精製したサブユニットワクチンと比較して免疫原性が高い理由は, これらのワクチンに残存するウイルスのゲノムそのものが内因性のアジュバントとして自然免疫を刺激することに由来する。③の代表例はEncephalomyocarditis virus(EMCV)で, ゲノムはssRNAであるが, 細胞内に侵入し増殖の際に産生されるdsRNAがエンドソームのTLR3と細胞質内のMDA5によって認識される。

以上のように, ウイルスもしくはワクチンが特異的な自然免疫受容体に認識され, 図1に示すようなシグナル伝達経路を通じてI型インターフェロン(interferon: IFN)やinterleukin(IL)-1 $\beta$ , IL-6などを含む様々な炎症性サイトカインが産生され, 抗原特異的なB細胞, T細胞の活性化が誘導される。抗原特異的な獲得免疫の誘導には自然免疫の活性化が必須であることは間違いないが, 例えばインフルエンザウイルス感染時のように, 自然免疫応答にTLR, RLR, NLRのいずれの経路も関わるような場合でも, IgG2a, IgG2cなどのTh1型の抗体産生, CD4T細胞の活性化にはTLRの経路のみが必須であることが分かった<sup>13)</sup>。このように, 全ての自然免疫応答が同じように獲得免疫を誘導するのではなく, それぞれの自然免疫応答が役割分担をしている可能性が示唆される。

#### 4.3 ウイルスワクチン用のアジュバントの分類とその獲得免疫誘導のメカニズム

先述のとおり, 自然免疫受容体とその特異的リガンドの解明により, これまで不明であったワクチンやアジュバントの作用機序の多くが明らかとなり, ワクチン開発において最も基本的な概念が築かれた。理論的には, 自然免疫受容体を刺激するリガンドは全てアジュバントの候補になるが(表1), 実際に合成されて動物実験レベルを含めて利用されているアジュバントの数は表2のように未だ少なく, 詳細な作用機序が分かっていないものが多い。さらに現在ヒトで承認されているのは, わずか3種類である(表2)。これまでのワクチンアジュバントの主な問題点は, 有効性はあるが安全性に問題があったこと(例; 細菌由来の毒素による顔面神経麻痺<sup>14)</sup>)と動物実験で有効だがヒトで有効性が認められないこと(例; CpG-oligonucleotide

## 第4章 研究開発事例

表2

	合成のアジュバント	作用する自然免疫受容体とアダプター因子	自然免疫受容体のグループ
*	Monophosphoryl lipid A	TLR2/MyD88, TLR4/MP88-TRIF	TLRs
	Aluminium based salts	NALP3/ASC	NLRs
	Emulsion (e.g. MF59)	?	?
	Pam3Cys-SK4	TLR1/2/MyD88	TLRs
	MALP2	TLR2/6/MyD88	TLRs
	Chitosan	NALP3/ASC	NLRs
	Saponins (e.g. QS-21)	NALP3/ASC	NLRs
**	Bacterial toxoids (e.g. CT, LT)	?	?
	Imiquimod, Resiquimod (ssRNA)	TLR7, TLR8/MyD88	TLRs
	CpG-ODN (ssDNA)	TLR9/MyD88	TLRs
	Poly I:C (dsRNA)	TLR3/TRIF, MDA5/IPS-1	TLRs, RLRs
	DNA ワクチン (plasmid dsDNA)	?/TBK1	?

MALP 2 : macrophage-activating lipopeptide 2, Poly I:C : Polyinosinic-polycytidylic acid

\* : ヒトで認可されているアジュバント, \*\* : 核酸のアジュバント

(ODN)<sup>15)</sup>, DNA ワクチン (プラスミド由来の DNA が内在性のアジュバント)) である。これらの問題点を解消するため、前者の観点から、生化学的アプローチやバイオテクノロジーを利用して副作用を減らしたアジュバント、後者の観点から、実験動物とヒトでの自然免疫受容体発現パターンの違いを考慮し、ドラッグデリバリーシステムや複数の組み合わせを利用したアジュバントの開発が進んでいる。ここでは、ウイルスワクチン用のアジュバントとして実際に使用されているものを例示しながら、そのメカニズムとして知られているものを概説する。

### 4.3.1 自然免疫受容体に作用することが明らかになっているアジュバント

自然免疫受容体リガンドのうち実際にアジュバントとして動物実験を含めて使用されているものは表2に示したとおりである。ここでは、最近アジュバント効果の発現機序が一部明らかになった核酸およびアルミニウム化合物のアジュバントとしての作用機序に着目して概説する。

#### (1) 核酸

われわれは最近アジュバントとして ssRNA (ウイルスゲノム ssRNA を含むインフルエンザの全粒子不活化ワクチン), dsRNA (poly I:C), dsDNA (DNA ワクチン) を使用した場合のアジュバント効果発現機序についてマウスを用いた実験で報告をした<sup>11, 12, 16)</sup>。インフルエンザ全粒子ワクチンを経鼻投与した実験では、インフルエンザウイルスのゲノム ssRNA は TLR7, RIG-I, NLRP3 いずれの受容体にも認識されるが、Th1 型の獲得免疫の誘導には TLR7-Myd88 のシグナル伝達が必須であることを示した<sup>11, 13)</sup>。一方 ovalbumin に合成 dsRNA の poly I:C をアジュバントとして加えた際の獲得免疫の誘導には、poly I:C が認識される TLR3, MDA5 のいずれの経路も関与していることを示した<sup>12)</sup>。また dsDNA を内在性のアジュバントとして含む DNA ワクチンを用いた実験により、今度は獲得免疫が Myd88 にも IPS-1 にも非依存的で、下流の TBK1 や I 型 IFN を介して誘導されることを明らかにした<sup>16)</sup>。以上の結果か

ら、ssRNAのアジュバント効果はTLRを介する経路で、dsRNAはTLRとRLRを介する経路で、dsDNAは依然受容体・アダプター因子は不明であるがTBK1・I型IFNを介する経路でそれぞれ発揮されることが示されると共に、核酸の種類によって獲得免疫誘導に必須となる自然免疫シグナルが異なることを明らかにした。

## (2) アルミニウム化合物

1920年代にGlennyらが使用して以来<sup>2)</sup>、最もヒトに使用されているのはAluminium hydroxygelやAluminium phosphateなどのアルミニウム化合物（以降Alum）である。Alumはヒトへの使用が多く、多くの国で認可されている唯一のアジュバントである。これまでもHSV、Hepatitis virusをはじめ様々なウイルスワクチンのアジュバントとして使用されてきただけでなく、最近ではH5N1新型鳥インフルエンザのプレパネミックワクチンにも利用されている<sup>17, 18)</sup>。しかしながら、その安全性の反面、免疫原性は決して満足とは言えない。Alumのアジュバント効果は主にTh2型の液性免疫を誘導するが、Th1型CD4T細胞やCTLのような細胞性免疫の誘導には適さない。その作用機序はこれまで不明であったが、そのアジュバント効果の発現には、最も基本的な作用として、抗原を継続して投与した部分に留めておくdepot effect以外に、NALP3を介したinflammasomeの活性化の関与が示唆されているが<sup>19)</sup>、異論も多い<sup>20)</sup>。最近ではその免疫原性の弱さを代償するために他のアジュバントとの併用が行われているが、詳細は後述する。

### 4.3.2 自然免疫受容体リガンド以外のアジュバント

#### (1) サイトカイン

サイトカインは抗原の侵入に際し宿主側から内因性に分泌され、先述のように自然免疫から獲得免疫を誘導するために重要な役割を果たすのみならず、免疫応答を増強したり修飾したりする作用があることから、アジュバントとしても使用される。現在では毒性や非特異的な免疫活性などを考慮し、標的抗原に対してより選択的に作用できるようにDNAワクチン<sup>21)</sup>や粘膜ワクチン<sup>22)</sup>に応用されている。例えば、IL-2やIL-12をHBV、HSVの抗原とともにプラスミドに組み込んだDNAワクチンの有効性が確認されているほか<sup>21, 23)</sup>、粘膜免疫ではI型インターフェロンを様々なウイルス抗原とともに投与した場合抗体誘導の増強が報告されている<sup>22)</sup>。

#### (2) 界面活性剤

界面活性剤が免疫原性を持つという事実は古くから知られており、植物由来の成分サポニンがアジュバントとして現在でも利用されている。1984年Moreinらが、Quillaja saponariaの樹皮から抽出したQuilAというサポニンをウイルス抗原とミセル化して初めてアジュバントとして使用した<sup>24)</sup>。このようなサポニンとウイルス抗原をミセル化したものをimmuno-stimulating complex (ISCOM<sup>®</sup>)として使用し、動物実験ではInfluenza virus, Rotavirus, RSVなどに

対してアジュバント効果が報告されている<sup>25)</sup>。実際ヒトに対してはより安全な QS-21 が使用され、CTL および Th1 型 B 細胞・CD4T 細胞の活性を誘導することが示されている<sup>26)</sup>。臨床試験では HIV, Influenza, HSV, Hepatitis B virus (HBV) など有効性が認められている。サポニンはコレステロールと相互作用し、細胞膜に穴を開けることによって効果を発揮すると考えられている。最近の報告によると QuilA が NALP3 依存的に inflammasome を活性化することが示されたが<sup>27)</sup>、その詳細なアジュバント効果のメカニズムは依然として不明である。

### (3) エマルジョン

この種のアジュバントには Freund's incomplete adjuvant (FIA) や Montanide に代表される water-in-oil 型と、MF59 などが属する oil-in-water 型の 2 つに大きく分類される。FIA の臨床試験は今から 50 年前にもさかのぼり、ポリオやインフルエンザワクチンとの併用が試されたものの副作用の問題からこれまで動物実験レベルに限られていた。しかしながら、製造工程の改善や癌・HIV などより重篤な疾患への適応拡大などから再び注目されている<sup>28)</sup>。Montanide ISA 720 は新世代の water-in-oil 型のエマルジョンで、Epstein-Barr virus (EBV), HCV, 麻疹ウイルスなどのウイルス感染症に対してすでに臨床試験が始まっている<sup>29)</sup>。MF59 はヨーロッパですでに認可されており、Th1 型の抗体反応を誘導することから、主に H5N1 のプレパンデミックワクチンを含めたインフルエンザワクチンのアジュバントとして期待されている<sup>30)</sup>。エマルジョンのアジュバント効果の 1 つは、多くのアジュバントに共通している depot effect であるが、それ以外の機序については明らかではない。

### (4) 多糖類

植物の根から抽出されるイヌリンはこの種類に属する。通常微粒子の状態で使用され Micro-particulate inulin (MPI) とも呼ばれる。動物実験のウイルス感染における MPI のアジュバント効果はかなり多種の標的抗原との併用 (Human papilloma virus (HPV) E7 蛋白, Herpes virus glycoproteinD, HBs 抗原や Influenza virus haemagglutinin など) で報告されている。MPI は補体の alternative pathway を活性化し、さらに Th1, Th2 いずれの細胞性免疫をも活性化しうる<sup>31)</sup>。

## 4.3.3 ドラッグデリバリーに着目したアジュバント

### (1) リポソーム

リポソームは標的抗原を脂質二重膜で覆い、抗原を目的の細胞まで運ぶ機能だけでなくそれ自体がアジュバントとしても効果を発揮することが知られている<sup>32, 33)</sup>。リポソームにウイルスの抗原を取り込んだものは virosome と呼ばれる。リポソームは、その構造から抗原提示細胞に取り込まれると、低い pH の状況下でも容易にエンドソーム膜と融合するため、抗原提示細胞の細胞質内に抗原を大量に放出することになる。この作用がプロセッシングの過程を促進し、MHC

class I による抗原提示を誘導し cross-presentation を促進する (CTL が活性化)。近年リポソームによってプラスミド DNA と標的蛋白を一緒に取り込んだ (この場合 DNA 自身もアジュバントとして作用する) 手法が開発され、ウイルスワクチンの新たなワクチン形態として注目されている<sup>34)</sup>。

#### (2) ポリマー微粒子

生体に適合性があり、生体内で代謝可能なポリマー微粒子として polylactide co-glycolide (PLG) 微粒子がよく知られている。PLG 微粒子は形状や濃度の調整によって抗原を放出するタイミングをコントロールできるほか、表面に電荷を持たせることでプラスミド DNA や標的蛋白を表面に吸着させた状態でデリバリーすることが可能である<sup>35)</sup>。

#### (3) ナノビーズ

もともと径が 0.5~1.0 $\mu\text{m}$  前後のビーズは CTL 活性を誘導することが知られていたが、近年の生産技術の進歩に伴い、40-50nm のサイズのビーズが最も抗原提示細胞 (特に所属リンパ節の DEC205 $\cdot$ CD40 $\cdot$ CD86 陽性樹状細胞) に効率的に抗原を運搬し、液性免疫および CTL の活性の両方を誘導することが分かったほか<sup>36)</sup>、またサイズによって Th1 型と Th2 型の誘導のバランスも変化することが報告された<sup>37)</sup>。

#### (4) Virus-like particles (VLPs)

VLPs には、ウイルスからゲノム DNA や RNA を取り去った外郭 (キャプシド) だけのものや、遺伝子工学の技術によって抗原を含めウイルスに似せて人工的に再現したものが含まれる。後者は、当初ワクシニアウイルスを用いた発現系によって作成されていたが、現在ではバキュロウイルスや酵母を用いた発現系が主流となっている<sup>38)</sup>。VLPs は樹状細胞に特異的に取り込まれたり、B 細胞と相互作用したりすることで液性免疫・細胞性免疫いずれの反応も惹起することができる。2006 年 6 月に HPV 6, 11, 16, 18 の VLPs と Alum を混合した HPV ワクチンがアメリカで承認された<sup>39)</sup>。また HBV の経鼻ワクチンも現在検討されている<sup>40)</sup>。

#### 4.3.4 粘膜免疫用の細菌毒素成分

粘膜免疫用に古くから使用されてきたアジュバントとして細菌由来の毒素成分が挙げられる (もちろん自然免疫のリガンドを粘膜免疫用のアジュバントとしても利用できる<sup>41)</sup>)。細菌由来の毒素成分としては cholera toxin (CT) や heat-labile enterotoxin (LT) がある。CT および LT は A サブユニットと B サブユニットからなる。A サブユニットは毒素の活性を持ち、B サブユニットが粘膜上皮の GM1 ガングリオシドに接着する。アジュバントとしての効果を維持しながら、元来有する腸管毒性を軽減するため A サブユニットの mutant を作成するなどの方法が施行されている。CT $\cdot$ LT いずれも A サブユニットが ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性を有し、CT $\cdot$ LT が作用するとアデニル酸シクラーゼが常に活性化された状態になり、細胞

## 第4章 研究開発事例

内サイクリック AMP 濃度が高まる。これを契機に粘膜上皮細胞や抗原提示細胞が活性化され、細胞透過性の亢進、炎症性サイトカインの産生、樹状細胞の成熟促進などが誘導される。類似の作用機序を有するが、アジュバントとしては CT が Th2 型の免疫反応 (IL-4, IL-5 分泌型の CD4T 細胞の活性化や IgA, IgG1, IgE の産生) および Th17 を誘導するのに対して、LT は Th1, Th2 型の両方の免疫反応 (IFN $\gamma$  分泌型の CD4T 細胞活性化および IgG2 の産生) を誘導する<sup>42, 43)</sup>。

### 4.3.5 コンビネーションアジュバント

アジュバントの組み合わせを考える上で重要なことは、2種類のを組み合わせれば必ずしもシナジー効果を得られるわけではなく、場合によって競合阻害を起こしてしまうことも知られている。簡単に言えば、同じ自然免疫のシグナル伝達経路を同時に、もしくは短期間のうちに刺激すると効果がなくなってしまう<sup>44)</sup>。シナジーを得るには、例えば図1に示したように、TRIF を介するリガンドと MyD88 を介するリガンドの組み合わせ<sup>45)</sup>、TLR と NLR をそれぞれ刺激するリガンドの組み合わせ<sup>46)</sup>、自然免疫受容体リガンドとそれ以外のアジュバントの組み合わせが考えられる。最後の例として、グラクソスミスクラインは、MPLA を用いたコンビネーションアジュバントの開発に着手し、AS01 (MPLA と QS21 をリポソームで包んだもの)、AS02 (MPLA と QS21 をエマルジョンで包んだもの)、AS04 (MPLA+Alum) を作成している。ヨーロッパでは AS04 を用いた HBV ワクチンとして FENDrix<sup>47)</sup> やオーストラリアでは同じく AS04 を用いた HPV ワクチン Cervarix<sup>48)</sup> が認可されている。

## 4.4 おわりに

19・20 世紀ワクチン療法の飛躍的な進歩に伴い、天然痘、黄熱病、麻疹、HPV など一部の感染症に対しては強力な予防効果を発揮した一方で、Hepatitis C virus (HCV) や influenza virus のように、依然ワクチン開発が困難なものや効果が不十分なものも依然として残されている。もちろん病原体側の特性がワクチン開発を妨げているのは自明であるが、HCV の培養法が確立したこと、インフルエンザウイルスを認識する3種類の自然免疫受容体の解明されたこと、さらには精製技術やバイオテクノロジーの急速な進歩に伴い、ナノ粒子や人工的なウイルスの類似物質 (単純に自然免疫受容体を刺激するだけでなく、ドラッグデリバリーも考慮したアジュバント) の作成が可能になったことなどワクチン開発にとって好条件がそろってきたのも事実である。

近年の目覚ましい自然免疫学分野の進歩に伴い、ウイルス学・ワクチン学・免疫学が一致団結してヒトの治療・予防へ向かう非常に良いチャンスに恵まれたと思う。今後のワクチン・アジュバント開発において重要なことは、最新のテクノロジーを駆使して安全で効果的なアジュバント

を作成・改良することはもちろんのこと、最適なアジュバントを選択し、安全で強力な自然免疫の誘導及び病原体に合わせた防御免疫の選択的誘導（抗体産生か細胞性免疫か、Th1 か Th2 か）を可能にする必要がある。さらに侵入門戸への免疫やドラックデリバリー、複数のアジュバントの併用などの工夫を加え、より安全で効果的なワクチンを生み出すことが要求される。

## 文 献

- 1) Ramon G. Procèdes pour accroître la production des antitoxines. *Ann Inst Pasteur*, **40**, 1-10 (1926)
- 2) Glenn AT *et al.*, The antigenic value of toxoid precipitated by potassium-alum., *J Path Bact*, **29**, 38-45 (1926)
- 3) Pulendran B and Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell*, **124**, 849-863 (2006)
- 4) Steinman RM. Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity*, **29**, 319-324 (2008)
- 5) Finberg RW *et al.*, Toll like receptors and viruses. *Rev Med Virol*, **17**, 35-43 (2007)
- 6) Ishii kJ *et al.*, Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microb*, **3**, 352-363 (2008)
- 7) Koyama S *et al.*, Innate immune control of nucleic acid-based vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines*, **8**, 1099-1107 (2009)
- 8) Kato H *et al.*, Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, **441**, 101-105 (2006)
- 9) Owen DM *et al.*, Fighting the flu with inflammasome signaling. *Immunity*, **30**, 476-478 (2009)
- 10) Muruve DA *et al.*, The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*, **452**, 103-107 (2008)
- 11) Koyama S *et al.*, Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination. *J Immunol*, **179**, 4711-4720 (2007)
- 12) Kumar H *et al.*, 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)
- 13) Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, Kumagai Y, Kobiyama K, Tougan T, Sakurai K, Coban C, Horii T, Akira S, Ishii KJ., Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med*. 2010 Mar **31**, 2 (25), 25ra24.
- 14) Couch RB *et al.*, Nasal vaccination, Escherichia coli enterotoxin, and Bell's palsy. *N*



- Engl J Med*, 350, 860-861 (2004)
- 15) Mutwiri G *et al.*, Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Adv Drug Deliv Rev.*, 61, 226-232 (2009)
  - 16) Ishii KJ *et al.*, TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*, 451, 725-729 (2008)
  - 17) Lin J *et al.*, Safety and immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1) vaccine: a phase I randomized controlled trial. *Lancet*, 368, 991-997 (2006)
  - 18) Treanor JJ *et al.*, Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A (H5N1) vaccine. *J Infect Dis*, 198, 1309-1316 (2008)
  - 19) Eisenbarth SC *et al.*, Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*, 453, 1122-1126 (2008)
  - 20) Franchi L and Núñez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 $\beta$  secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol*, 38, 2085-2089 (2008)
  - 21) Egan MA and Israel ZR. The use of cytokines and chemokines as genetic adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Clin Appl Immunol Rev*, 2, 255-287 (2002)
  - 22) Bracci L *et al.*, Type I interferons as vaccine adjuvants against infectious diseases and cancer. *Expert Rev Vaccines.*, 7, 373-381 (2008)
  - 23) Hirao LA *et al.*, Combined effects of IL-12 and electroporation enhances the potency of DNA vaccination in macaques. *Vaccine*, 26, 3112-3120 (2008)
  - 24) Morein B *et al.*, Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*, 08, 457-460 (1984)
  - 25) Pearse MJ and Drane D. ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev.*, 57, 465-474 (2005)
  - 26) Kensil CR and Kammer R. QS-21: a water-soluble triterpene glycoside adjuvant. *Exp Opin Invest Drugs*, 7, 1475-1482 (1998)
  - 27) Li H *et al.*, Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol.*, 181, 17-21 (2008)
  - 28) Aucouturier J *et al.*, The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. *Vaccine*, 24, S2-44-5 (2006)
  - 29) Elliott SL *et al.*, Phase I trial of a CD8+ T-cell peptide epitope-based vaccine for infectious mononucleosis. *J Virol*, 82, 1448-1457 (2008)
  - 30) O'Hagan DT *et al.*, MF59 Is a Safe and Potent Vaccine Adjuvant for Flu Vaccines in Humans: What Did We Learn During Its Development? *Clin Pharmacol Ther*, 82, 740-744 (2007)
  - 31) Petrovsky N. Novel human polysaccharide adjuvants with dual Th1 and Th2 potentiating activity. *Vaccine.*, 24, Suppl 2: S2-26-9 (2006)
  - 32) Bovier PA *et al.*, Epaxal: a virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection. *Expert Rev Vaccines.*, 7, 1141-1150 (2008)

- 33) Moser C *et al.*, Influenza virosomes as a combined vaccine carrier and adjuvant system for prophylactic and therapeutic immunizations. *Expert Rev Vaccines.*, **6**, 711-721 (2007)
- 34) Laing P *et al.*, The 'co-delivery' approach to liposomal vaccines: application to the development of influenza-A and hepatitis-B vaccine candidates. *J Liposome Res*, **16**, 229-235 (2006)
- 35) Singh M *et al.*, Polylactide-co-glycolide microparticles with surface adsorbed antigens as vaccine delivery systems *Curr Drug Deliv*, **3**, 115-120 (2006)
- 36) Fifis T *et al.*, Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol*, **173**, 3148-3154 (2004)
- 37) Peek LJ *et al.*, Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev.*, **60**, 915-928 (2008)
- 38) Kirnbauer R *et al.*, Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 12180-12184 (1992)
- 39) Chan JK and Berek JS. Impact of the human papilloma vaccine on cervical cancer. *J Clin Oncol.*, **25**, 2975-2982 (2007)
- 40) Aguilar A *et al.*, Phase I clinical trial in healthy adults of a nasal vaccine candidate containing recombinant Hepatitis B surface and core antigens. *Int J Infect Dis*, **11**, 394-401 (2007)
- 41) Oma K *et al.*, Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-like receptor agonist induces specific antibodies and enhances bacterial clearance in the airways of mice. *Vaccine.*, **27**, 3181-3188 (2009)
- 42) Freytag LC and Clements JD. Mucosal adjuvants. *Vaccine.*, **23**, 1804-1813 (2005)
- 43) Lee JB *et al.*, Intranasal delivery of cholera toxin induces th17-dominated T-cell response to bystander antigens. *PLoS ONE.*, **e5190** (2009)
- 44) S Trinchieri G and Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Rev. Immunol.*, **7**, 179-190 (2007)
- 45) Roelofs MF *et al.*, The expression of Toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of Toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum.*, **52**, 2313-2322 (2005)
- 46) Van Heel DA *et al.*, Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease. *Gut* **54**, 1553-1557 (2005)
- 47) Kundi M. New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system. *Expert Rev Vaccines*, **6**, 133-140 (2007)
- 48) Schwarz TF. AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 vaccination: recent advances in cervical cancer prevention. *Expert Rev Vaccines.*, **7**, 1465-1473 (2008)

# DNA センサーとその生理的意義

DNA Sensors and their Physiological Relevance

小檜山康司, 石井 健

Kouji Kobiyama, Ken J. Ishii

核酸であるDNAが免疫システムを直接活性化することが示唆されてから50年近く経過した。その間いくつかの重要な発見はあったものの、自然免疫システムによる病原体や宿主由来のDNA認識の詳細なメカニズムが盛んに研究されるようになったのはここ数年のことである。TLR9によるDNAリガンド(一本鎖非メチル化CpGモチーフ)認識機構、細胞内シグナル伝達経路などがノックアウトマウスを用いた研究により次々と明らかになり、感染症や自己免疫疾患における生理的意義が示唆されている。一方で、TLR9に依存しないDNA認識機構の存在も明らかになり、リガンドも右巻きの二本鎖DNA(B-form DNA)であることが示された。その後、レセプターやシグナル伝達分子の候補が次々と報告されているが、詳細な分子メカニズムや生理的意義ははまだ全容が明らかになっておらず、真のB-DNAセンサーと考えられる分子の同定が待たれている。本稿では、DNAによる自然免疫活性化機構とその生理的意義について最新の報告とともに解説したい。



自然免疫, ワクチン, 自己免疫

## はじめに

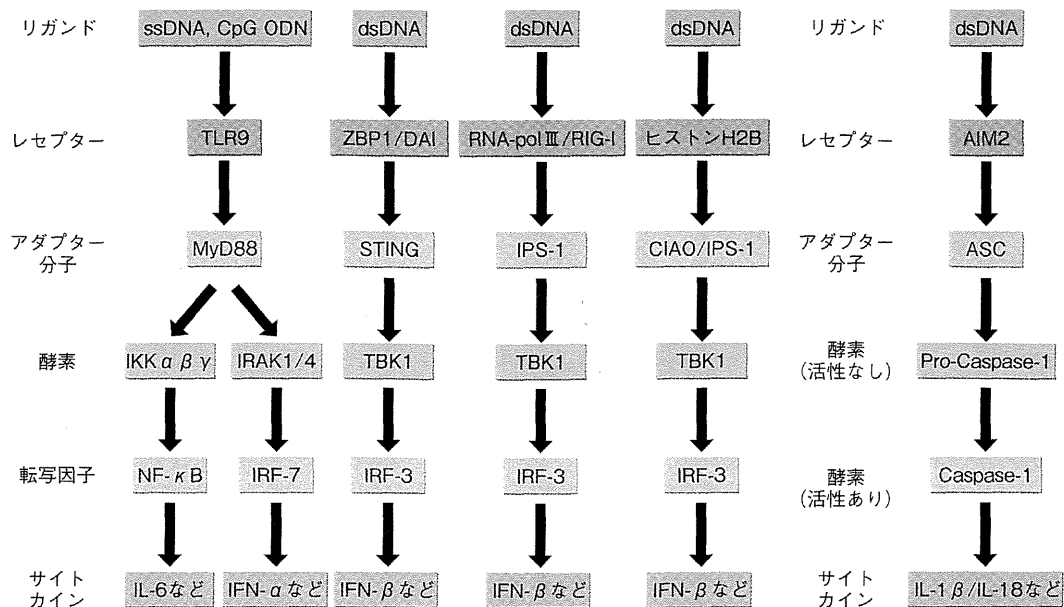
### 1. 免疫によるDNA認識：概要

核酸であるDNAは、我々哺乳類を含む真核動物において核内で染色体として(一部はミトコンドリアにも)存在しており、遺伝子情報を保持、維持そして伝達する機能を持ち合わせている。当然ながら、宿主に感染する細菌やウイルス、寄生虫などの微生物も自身の増殖のための遺伝情報としてDNA(一部のウイルスはRNA)を、その形状や大きさに異なりはあるが保持している。通常、このような病原体や宿主細胞自身のDNAは細胞内外の宿主免疫システムからは“見えない”ように様々な方法で保護されているが、感染などによる病原体由来のゲノムDNAだけでなく、感染、DNA損傷などの細胞に対するストレス、物理的組織傷害、そして細胞分裂によって核膜を失ったゲノムなど、いろいろな状況で自己のDNAも細胞内外で剥き出しになり、宿主自然免疫システムによって認識されることが近年明らかになってきた。それではDNAはどのように自己・非自己として宿主の免疫システムに認識されているのだろうか? これまでに、DNAの塩基配列、高次構造、修飾などを特異的に認識するレセプター、DNA結合タンパク質、DNAの細胞への取り込まれ方、取り込む細胞による特異的な多種多様な認識機構が示唆されている。

免疫システムによるDNA認識の研究は古いものの、最近までその重要性が広く認知されることはなかった。しかしながら、Toll様レセプター(Toll-like receptor; TLR)9の発見は、核酸による自然免疫活性化機構が存在することを分子レベルで、かつ生体レベルでも証明し、いわゆる自然免疫学の分野を大きく発展させるきっかけとなった<sup>1)</sup>。

現在ヒトでは10種類のTLRが存在し、主に微生物由来の糖脂質成分や核酸、タンパク質などをそれぞれ異なるTLRが認識する。TLRがそれらを認識すると、MyD88(myeloid differentiation primary response gene(88))やTRIF(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ )などのアダプター分子を介して自然免疫応答を惹起し、I型インターフェロン(IFN)や炎症性サイトカイン産生を誘導する。TLRによる認識には、TLRの局在が重要であり、例えば核酸を認識するTLR3、7、8、9はエンドソーム内でそれぞれのリガンドを認識し、自然免疫応答を活性化する。TLR3はウイルス由来の二本鎖RNA(dsRNA)を、TLR7、8はウイルス由来の一本鎖RNA(ssRNA)を認識し、またTLR9は細菌由来の非メチル化CpG配列を有した一本鎖DNA(ssDNA)を認識し、自然免疫応答を活性化することが報告されている<sup>2)</sup>。

哺乳類でもCpG配列は存在するが、CpGがメチル化修飾を受けていることが自己と非自己の区別に関与しており、実際にCpG DNAのメチル化はTLR9を介した自然免疫活性



■図1 DNAセンサーによるシグナル伝達

化能が失われていることが示されている。同様に、CpG配列を有するRNAもメチル化により自然免疫活性化能は失われる<sup>3)</sup>。これらのことは、ヒトと病原体での核酸への修飾が異なっていることが自己と非自己の核酸認識には重要であることを示している。

一方で、宿主細胞はTLR非依存的にウイルス由来のdsRNAやdsDNAを細胞質中で認識することは以前から知られていたが、そのレセプターは明らかとなっていなかった。近年、RIG-I (retinoic acid inducible gene-I) やMDA5 (melanoma differentiation associated gene 5) と呼ばれるRLR (RIG-I-like receptor) がdsRNAや5'末端三リン酸RNAなどの免疫賦活化RNA [immunostimulatory RNA (isRNA)] を認識することが示された<sup>4)</sup>。これらのレセプターの同定により、核酸によるTLR非依存性自然免疫応答の分子メカニズムの研究は急速に発展を遂げていった。

## 2. 免疫によるDNA認識：歴史

TLR9のリガンドであるCpG DNAの発見の源流は、1984年の徳永氏や山本氏らによる、結核菌由来DNA分画の抗腫瘍作用の解析から、GCリッチなDNAによるIFN誘導およびナチュラルキラー(NK)細胞の活性化機構の解明に至る一連の研究成果であるのは明白であろう<sup>5)</sup>。TLR9非

依存性のDNA自然免疫認識機構の研究は、IFNの命名者であるA. Isaacs氏が1963年に発表した「核酸はIFNの誘導物質である」という論文が最初であったと考えられるが<sup>6)</sup>、その後の研究は続いておらず、いろいろな経緯を経て忘れ去られた時期が長く続いた。しかし、1999年に鈴木氏および筆者らにより、ラット甲状腺の細胞にdsDNAで刺激(トランスフェクション法を用いたためIsaacsらで使用した1000分の1~数万分の1のDNA濃度を用いた)を行うことにより、MHCやTAP (transporter associated with antigen processing) などの抗原提示機能分子を含む様々な免疫関連遺伝子の発現上昇が確認された。これらの現象にはCpGモチーフなどの配列は関係なく、ある程度の長さのDNAの一本鎖ではなく二本鎖の構造が必須であることが示された。また、壊死を起こした自己の細胞のdsDNAは樹状細胞にトランスフェクションにより取り込まれると、樹状細胞の成熟化を促進し、内因性のアジュバントとして作用することも判明した<sup>7)</sup>。

これらの発見はそのころ盛んであった微生物由来の非メチル化CpG配列によるマクロファージや樹状細胞、B細胞の自然免疫の活性化機構の研究の流れとは一線を画しており、特に自己・非自己のDNAの区別が微生物に特異的なパターン(非メチル化CpG配列を含むCpGモチーフ)認識によって行われているという概念とは真っ向から対抗していたため

自然免疫の研究者の間でもしばらくは懐疑的に見られていた。しかしその後、長田氏らのグループによってDNase II欠損マクロファージが強力にIFN- $\beta$ を産生し、結果としてDNase II欠損マウスが胎仔期に貧血症を呈し致死に陥ることが示された。これは、DNase II欠損マクロファージが赤血球から放出された核を貪食するが、DNAを分解することができずに蓄積し、その結果としてIFN- $\beta$ を産生することが原因であることが示された<sup>8),9)</sup>。これらの結果は自己のDNAが自然免疫応答を活性化することを強力に示唆している。

さらに筆者らは、ワトソン、クリック氏らが最初に発表したとされる、右巻きの二本鎖B-form DNA (B-DNA)の構造が、TLR9非依存的に自然免疫応答を活性化するDNAとして最も活性の高いリガンドであることを見いだした。実際に合成のB-DNAを非免疫細胞であるマウス線維芽細胞やヒト胎児腎由来細胞 (HEK293) にトランスフェクション法で導入することにより、I型IFNや炎症性サイトカイン産生を強く誘導し、抗ウイルス作用などに重要な役割を担っていることが明らかになった<sup>10)</sup>。

このB-DNAによる自然免疫活性化能はアダプター分子であるIPS-1 (interferon  $\beta$  promoter stimulator-1, 別名MAVS/VISA/Cardif) が関与していること、そしてその下流であるTBK1 (TANK binding kinase 1) と呼ばれるキナーゼ、そして転写因子であるIRF-3 (interferon regulatory factor-3) 依存的であることが見いだされた<sup>11),12)</sup>。その後、IPS-1のノックアウトマウスではB-DNAによるI型IFN産生には影響がないとの報告がなされ、ヒトとマウスにおける種差の存在が示唆された<sup>13)</sup>。さらに近年、いくつかの候補分子がDNAセンサーとして報告されたが、その多くが細胞やシグナルによって特異性などが異なっていることからいまだ定説化していない。そこで、それらDNAセンサーの機能や特徴について項目に分けて次章より解説する (図1)。

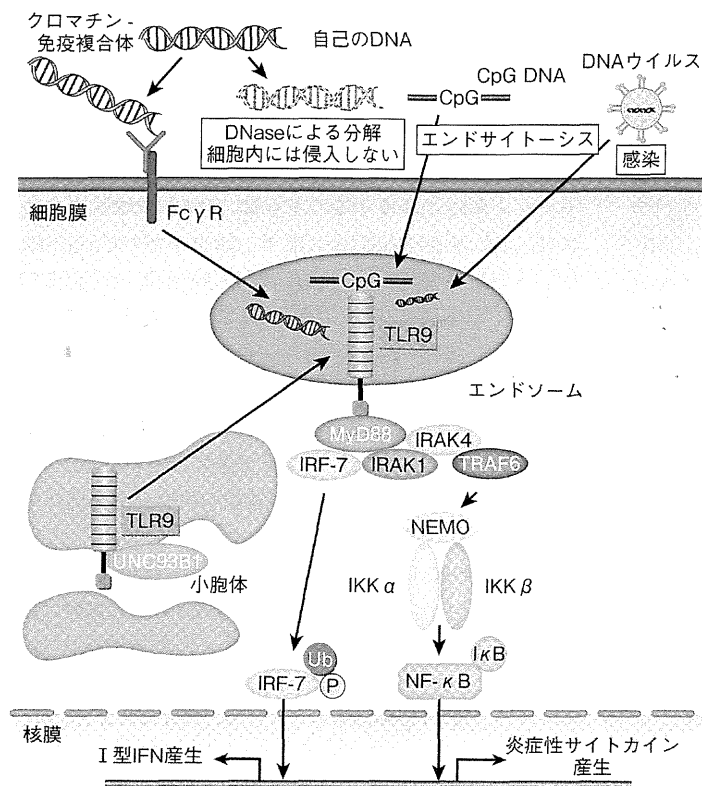
## I TLR9によるDNAの認識

TLR9は最も研究されているDNAセンサーであり、また核酸のレセプターとして最初に同定されたTLRでもある。TLR9はI型膜タンパク質で小胞体からエンドソームへと移行することが知られている。TLR9は非メチル化CpG配列を含むCpGモチーフを有しているDNAを認識し(その他ヘモジンも認識することも知られている)<sup>14)</sup>、ヒトではB細胞、一部の樹状細胞を活性化する<sup>15)</sup>。TLR9リガ

ンドとしてヒトに使用される(もしくは活性のある)CpG ODN (oligodeoxynucleotides)には大きく分けて2種類存在し、K(またはB)タイプとD(またはA)タイプがある。KタイプCpG ODNはB細胞や樹状細胞に作用しTLR9-MyD88認識経路を介して、NF- $\kappa$ Bを介した炎症性サイトカイン産生を誘導するとともに、B細胞の増殖能を向上させ、抗体産生をも促進する<sup>16)</sup>。DタイプのCpG ODNは形質細胞様樹状細胞(pDC)のTLR9によって認識された後IRF-7を活性化し、I型IFNであるIFN- $\alpha$ 産生を誘導する<sup>17)</sup>。また、TLR9はウイルス由来のDNAも認識して抗ウイルス活性を誘導することも報告されている。実際、マウスサイトメガロウイルス(MCMV)や単純ヘルペスウイルス(HSV) -1やHSV-2、アデノウイルス(AdV)はpDCに発現しているTLR9によって認識され、IFN- $\alpha$ や他のサイトカイン産生を誘導する<sup>18)~21)</sup>(図2)。

TLR9はCpGモチーフを有していないDNAやDNAの糖骨格のみも認識できることが報告されている。実際にカチオン性のトランスフェクション試薬であるDOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate) を使用することによって非メチル化CpG配列を有していないDNAがTLR9を活性化することが報告されている<sup>22)</sup>。DOTAPはDNAの取り込みと細胞内でのエンドソームのトラフィッキングを変化させることが知られているが、実際の生理的意義は不明である。ただし、TLR9の局在はDNAの認識に重要で、TLR9は通常小胞体に存在するが何らかの機序によりDNAを取り込んだエンドソームに移動するのは間違いないだろう。そこでCpG DNAはエンドソームの低pH環境下にて認識されると考えられている。細胞膜上に発現させた実験では自己のDNAによってTLR9による自然免疫の活性化が誘導されるといった報告もされている<sup>23)</sup>。しかしながら、この報告ではTLR9の膜および細胞質部位をTLR4のものと置換しているため、TLR9の生理的意義を反映しているとは言いがたい。

またエンドリソソーム内でカテプシンによるTLR9の切断が起こることが知られている。ある報告では、切断されたTLR9はリガンドであるCpGと結合することができること、MyD88を介した自然免疫活性化を誘導することが示された。そして、TLR9の欠損細胞に切断後のTLR9を強制発現させることによってCpGによる自然免疫活性化能が(一部ではあるが)補完されることが示された<sup>24),25)</sup>。同時期に、主にリソソームやエンドソームに存在するカテプシンKが、TLR9による自然免疫活性化にも関与していることが報告さ



■図2 TLR9を介した自然免疫活性化の分子メカニズム

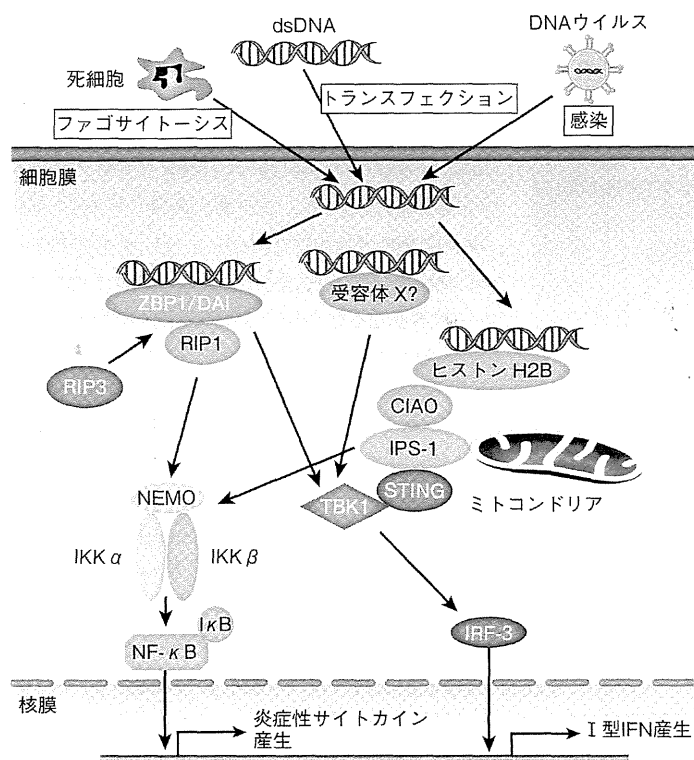
れた。カテプシンKは骨を分解する酵素と考えられており、マウス関節リウマチモデルにカテプシンKの抑制剤を投与することによって、骨の破壊を抑制する結果が得られるとともに、TLR9による炎症性反応をも抑制することが示された<sup>26)</sup>。しかしながら、報告されているカテプシンの種類は1つではなく、特異的な抑制剤を用いても完全にはTLR9による自然免疫反応が失われないことから、生体内においては様々なプロテアーゼがTLR9の切断に関与していることが示唆されている<sup>27)</sup>。カテプシンによるTLR9の切断がその機能に必須であるか今後のさらなる検討が必要であろう。

自己の核酸は通常DNaseやRNaseによって分解されるためレセプターに認識されないが、自己抗体やLL37, HMGB1 (high mobility group box protein1)などのDNA結合タンパク質と結合することによって安定化し、TLR7, 9に認識されることで免疫応答を活性化することが示唆されている。全身の臓器に炎症が起こる自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) 患者では樹状細胞や、自己反応性のB細胞が活性化されており、それらの大部分がTLR9に依存している

ことが報告されている。実際にSLE患者の血清中にはクロマチンとIgGの免疫複合体(自己のDNA, スクレオソームタンパク質, 抗スクレオソーム抗体)が検出され、この複合体はFc $\gamma$ Rを介してTLR9の存在するエンドソームへ取り込まれることが報告されている<sup>28)</sup>。

LL37と呼ばれる抗菌ペプチドは乾癬患者の皮膚から検出され、自己のDNAと結合することでDNAを安定させること、そしてエンドソーム内に自己のDNAを移行させ、TLR9を介した自然免疫応答を活性化することが報告された<sup>29)</sup>。HMGB1はネクロシスや細胞がCpGなどで刺激を受けることで細胞外に放出される。HMGB1はDタイプのCpGと直接結合することができ、pDC上のRAGEと呼ばれる細胞表面レセプターを介してIFN- $\alpha$ 産生を強力に誘導する。一方で、HMGB1はRAGEではなくTLR2やTLR4を介してサイトカイン産生を誘導するという異なった報告や<sup>30)~32)</sup>、あらゆる核酸に結合しその後の自然免疫活性に必須であるとの最近の報告もあり、これらの生理的意義は今後のさらなる検証が必要であろう<sup>33)</sup>。

他にもいくつかの因子がTLR9によるシグナル伝達に関与していることが報告されている。TLRによる自己免疫の誘導はTLR7とTLR9の双方が関与していることが示唆されているが、自己免疫疾患マウスモデルでは、TLR7を欠損させることにより症状が緩和されるが、TLR9を欠損させると症状が悪化するという逆の機能を示す。この現象に対し、膜タンパク質であるUNC93B1はTLR7, 9の膜貫通ドメインに特異的に結合し、TLR7, 9を小胞体からエンドソームへと輸送することが示された。一方で、UNC93B1の機能欠損マウス(3Dマウス)では、病原体の核酸に反応できなくなっていた。UNC93B1のN末端のドメインを介してTLR7の反応を抑制していることも明らかとなっており、UNC93B1のN末端の変異体(34番目のアスパラギン酸とアラニンに置換)ではTLR7による自然免疫活性化が増強されていたが、TLR9による自然免疫活性化は減少していた。実際に、UNC93B1の変異体を発現している細胞ではTLR7のエンドソームへの移行が認められるのに対して、TLR9の移行はほとんど認められないことが示された。すなわちUNC93B1はTLR7とTLR9のエンドソームへの輸送を制御することによってその反応性を調節していることが示された<sup>34), 35)</sup>。



■図3 細胞内DNAセンサーを介した自然免疫活性化の分子メカニズム

## II ZBP1/DAIによるB-form DNAの認識

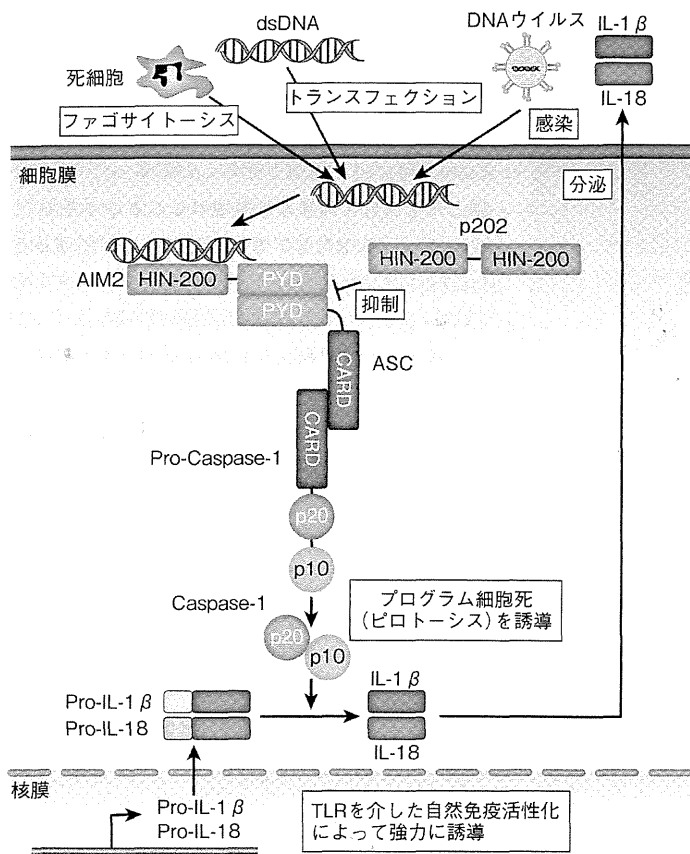
細胞内DNAによる自然免疫活性化の研究は古くから行われてきたが、TLR9非依存的なDNAの認識、そして分子メカニズムに関しては近年ようやく明らかとなってきた。B-DNAによるシグナル伝達はisRNAによるシグナル伝達と共通している部分が多く、ヒトでは細胞内RNAセンサーであるRIG-Iやアダプター分子であるIPS-1がDNAによるI型IFN産生に関与していることが報告された。しかしながら、RIG-IやIPS-1欠損細胞ではB-DNAによる自然免疫応答に変化は見られなかった。一方でTBK1の欠損細胞においては完全にDNAによる自然免疫応答が抑制されていた。そして、ヒトとマウスなどの種は関係なくTBK1の関与が示されている。このようにシグナル伝達の解析は進んでいったが、肝心のレセプターの同定は報告がされてこなかった。

このような状況の中、ZBP1 (Z-DNA binding protein-1) /DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory

factor) がDNAセンサーの1つの候補として同定された<sup>36)</sup>。ZBP1/DAIは自然免疫活性が強いB-DNAでなく左巻きのZ-DNAに強く結合することがすでに報告されている。実際に、ZBP1/DAIをL929細胞に過剰発現させることによってB-DNAによるI型IFN産生が増強されることが示された。また、特異的siRNAを用いた実験によって、ZBP1/DAIがB-DNAによるI型IFNやIL-6産生に関与していること、またHSV-1の複製に関与していることが示された。ZBP1/DAIはB-DNAと結合し、その下流であるTBK1-IRF-3の経路を活性化することも明らかとなっている<sup>36), 37)</sup> (図3)。しかしながらL929細胞以外の、マウス線維芽細胞や樹状細胞およびヒトの細胞ではZBP1/DAIの関与は示されておらず、ノックアウトマウスを用いた実験においてもDNAワクチンの免疫原性には関与していないことから、真のDNAセンサーは他にあると考えられている。

## III AIM2によるB-DNA認識とインフラマソーム

自然免疫レセプターの中で、NODドメインを有する分子群をNLR (NOD-like receptors) ファミリー分子と称し、細胞質における病原体認識を担っていると考えられている。NLRはNODドメインのほかにロイシンリッチリピート (LRR)、シグナル伝達に重要なドメインとしてCARD (caspase recruitment domain) やPYD (pyrin domain)、BIR (Baculovirus IAP repeat) などのドメインを持つものが知られ、NF-κBやCaspase-1活性化を誘導する。このファミリーにおいて最も研究されているNOD1とNOD2を除く大部分のNLRは活性化によりインフラマソームと呼ばれる複合体を形成する。最もよく研究されているNLRP3はRNAをはじめシリカや尿酸結晶、ペプチドグリカンやATPなど多様なリガンドにより活性化されることが知られており、活性化後に形成されたインフラマソームは、アダプター分子としてASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) を介し、互いのPYDとCARDで相互作用してCaspase-1を活性化することによりIL-1βやIL-18の前駆体を切断、細胞外へと分泌を促進する。一方で、DNAによってインフラマソームが活性化され、IL-1βが誘導されることも報告されたが、その認識に



■図4 AIM2を介したインフラマソーム活性化の分子メカニズム

はNLRP3 (NLR family, pyrin domain-containing 3) は関与しておらず、B-DNAによるIL-1 $\beta$ 産生には異なる認識経路またはレセプターを介していることが示唆された<sup>38)</sup>。

その後、HIN-200 (hematopoietic interferon-inducible nuclear proteins with a 200-amino acid repeat) というDNA結合ドメインを持つ遺伝子ファミリーメンバーであるAIM2 (absent in melanoma 2) が細胞質B-DNAによるインフラマソーム形成、その後のCaspase-1の活性化、細胞死の誘導に必須であることが相次いで報告された。AIM2は細胞質に存在し、HIN-200、PYDドメインを有しており、HIN-200ドメインを介して直接B-DNAと結合し、アダプター分子であるASCを介してCaspase-1を活性化することが*in vitro*で示された<sup>39)~42)</sup> (図4)、AIM2欠損マウスではDNAウイルスであるワクシニアウイルス (VV) やMCMV感染後のインフラマソーム活性化によるCaspase-1の活性化は誘導されず、またMCMV感染においてはIL-18の産生誘導やNK細胞依存的

IFN- $\gamma$ 産生、そして初期のウイルスの複製をコントロールしていることが示された。また、AIM2欠損細胞では細胞内寄生菌のリステリア感染後のIL-1 $\beta$ 産生や、フランシセラ菌感染によるCaspase-1活性化も誘導されなかった。実際、AIM2欠損マウスに致死量のフランシセラ菌を感染させると、野生型に比べ低い生存率を示した。このことはAIM2が細菌感染においてレセプターとして働きインフラマソームを活性化することで、病原体の排除を誘導すると考えられる。特記すべき点として、AIM2欠損マウスではB-DNAによるI型IFN産生においては変化が見られなかった<sup>43), 44)</sup>。これらの結果よりAIM2は細胞内でDNAのレセプターとして働き、インフラマソームの活性化を介して細菌やウイルス感染防御に働いていることが強く示唆される。

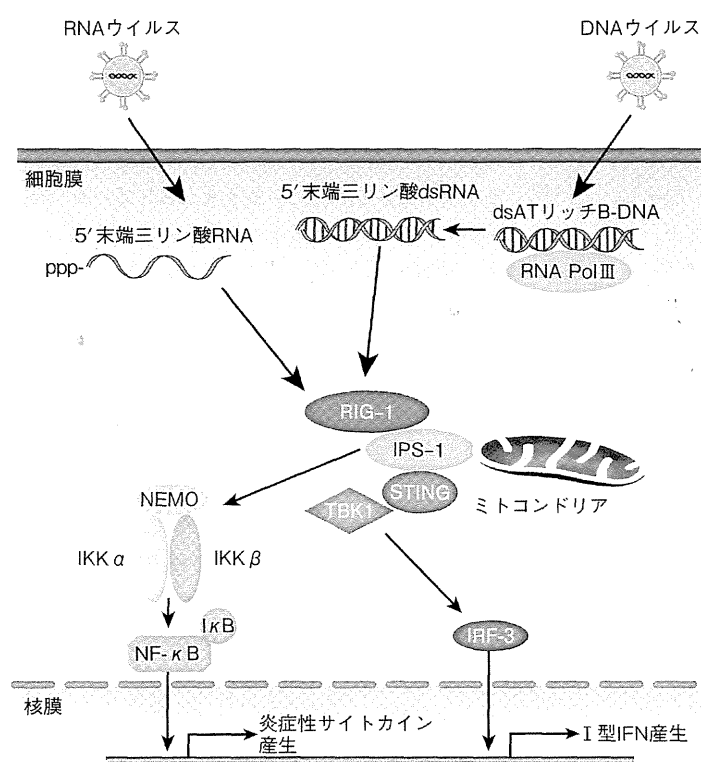
また、マウスHIN-200ファミリーメンバーであるp20は特異的にB-DNAに結合するが、PYDドメインを有しておらず、AIM2とは異なりASCと相互作用できないため、AIM2を介したCaspase-1活性化を抑制する報告がなされた<sup>39)</sup>。しかしながら、p20に関しては現在ヒトにおけるホモログは見つかっておらず、他のHIN-200ファミリー分子とともに詳細な解析が必要である。AIM2の自己DNAの認識、そして自己免疫疾患との関連、またDNAワクチンの免疫原性と明らかにされていない点は多い。

#### IV DNAセンサーとしてのRNAセンサーRIG-I

RNAヘリカーゼであるRIG-I、MDA5は細胞内RNAセンサーとして働くことが報告されている。B-DNAによるTLR9非依存的な自然免疫応答が報告された後に、RIG-IがDNAセンサーであると報告された。最初に、ヒトへパトマ細胞であるHuh7細胞にRIG-I特異的なsiRNAで処理することにより、B-DNAによるI型IFN産生が抑制されることが示された<sup>45)</sup>。

その後、RNAポリメラーゼIII (Pol III) がDNAセンサーとして働くことが報告された。RNAポリメラーゼはATに富んだB-DNAをRNAに変換させ、そのRNAがRIG-Iによって認識され、I型IFN産生を誘導することが示された (図5)。実際にPol IIIの機能を抑制することが知られている薬剤は、B-DNA刺激やAdV, HSV-1, EBV (Epstein-Barr





■図5 RIG-I-RNA Pol IIIを介した自然免疫活性化の分子メカニズム

virus) 感染による IFN- $\beta$  産生を抑制した。同様の実験においてレジオネラ感染による IFN- $\beta$  産生も抑制され、結果としてレジオネラの増殖を促進させた。これらの結果は Pol III が DNA センサーとして自然免疫活性化に関与していることを示唆している<sup>46), 47)</sup>。しかしながら、ATに富んでいない DNA の認識、他の DNA センサーとの関連、自己 DNA の認識など不明な点は多い。

## V ヒストンH2BによるB-DNA認識

生体内において、ヒストンはクロマチンの構成成分として核内に存在することが重要であるが、筆者らの研究によって核外のヒストンH2BがB-DNAによる自然免疫反応に重要であることが示された<sup>48)</sup>。これまでにヒストンが核外にも存在していることは様々な分野で報告されている。ヒストンH1.2はDNA損傷によって核内からミトコンドリアへと輸送され、アポトーシスを誘導すること<sup>49)</sup>、そして複数の生物種におい

て、リンカーヒストンであるヒストンH1やヒストンH2A、H2Bが抗菌物質として存在していることが報告されている<sup>50), 51)</sup>。

ヒストンH2Bを強制発現させることで、B-DNAによる自然免疫活性化を著しく誘導し、特異的な siRNA を用いた実験により他のヒストンではなく、ヒストンH2B特異的に I 型 IFN 産生を抑制することを示した。また、ヒストンH2Bはアダプター分子 IPS-1 と新規分子である CIAO (COOH-terminal Importin 9-related adaptor organizing histone H2B and IPS-1) を介して相互作用し、下流の TBK1 を活性化し I 型 IFN 産生を誘導することを明らかとした(図3)。またDNAウイルスの複製にも関与しており、ヒストンH2Bをノックダウンさせることで、AdVやヒトパピローマウイルス(HPV)の複製が増大された。しかしながらRNAウイルスではそのような変化は見られなかった。これらの結果はマウスの細胞を用いた実験では同様の結果が得られず、DNAセンサーはヒトとマウスではその機能や役割が異なっている可能性が示唆された。このことはヒストンH2Bが核外で自然免疫活性化分子として働く可能性があることを示しているだろう。

## VI DNA認識関連分子

近年、多くの分子がDNAやRNAによる自然免疫誘導に関与していることが報告された。4回膜貫通型タンパク質である STING (stimulator of interferon genes, MPYS/TMEM173) は、MHCクラスII分子に結合することでアポトーシスシグナル伝達に必須であることが最初に報告されたが、B-DNAによるI型IFN産生にも関与している。実際に、STING欠損細胞ではB-DNA刺激やHSV、リステリア感染時におけるI型IFN産生が誘導されなかった。STINGはB-DNAの直接のレセプターではないものの、B-DNA刺激後に小胞体からゴルジ体に輸送され、TBK1と相互作用することが報告された。STING欠損マウスではHSVへの感受性が高くなっており、野生型に比べ生存率が低く、DNAワクチンの免疫原性もT細胞、B細胞ともにSTING欠損マウスでは減少が見られた<sup>52), 53)</sup>。

細胞内核酸結合タンパク質であるLRRFIP1 (leucine rich repeat (in FL II) interacting protein 1) はRNAウイルスであ

るVSVやリステリア感染によるマクロファージからのI型IFN産生に関与していることが報告された。実際に、LRRFIP1を強制発現させることによりdsRNAやB-DNA刺激によるIFN- $\beta$ 産生を増大させた。また、 $\beta$ -カテニンと相互作用することによって $\beta$ -カテニンを活性化し、IRF-3を介してIFN- $\beta$ 産生を増大することが示された<sup>54)</sup>。さらに、元々共転写因子として同定されたスレオニンホスファターゼの一種であるEYA4 (Eyes absent 4) はB-DNAによるI型IFN産生をSTINGとIPS-1と相互作用することにより増強することが報告された<sup>55)</sup>。

## VII DNA ワクチンとDNA センサー

DNA ワクチンは発現プラスミドに抗原遺伝子を組み込み、投与することによって抗原遺伝子を生体内に発現させることで、抗原に対する特異的免疫を誘導させるための免疫法である。DNA ワクチンは骨格にCpG配列を有しているためTLR9を介した自然免疫応答を活性化することができる。そしてそれがワクチンによる免疫原性に関与していると考えられてきた。しかしながら、筆者らの研究によって、IRF-3キナーゼであるTBK1がDNA ワクチンのアジュバント効果に必須であることが示された。そして、TLR9欠損マウスではDNA ワクチンによって誘導される免疫応答は正常であった。このことは細胞内DNAセンサーがワクチンの免疫原性に重要であることを強く示唆している。そしてIFNレセプター欠損マウスではDNA ワクチンによる免疫応答が誘導されなかったことから、I型IFNが重要であることも明らかとなった<sup>41)</sup>。それではどのDNAセンサーがDNA ワクチンの免疫原性に重要なのであろうか。ZBP1/DAIの欠損マウスではDNA ワクチンによって誘導される免疫応答は正常であったが、STINGの欠損マウスでは免疫応答の減少が示された<sup>53)</sup>。他のDNAセンサーの欠損マウスではいまだ報告はない。AIM2, RIG-I, そしてヒストンH2B, はたまた他のDNAセンサー、DNA ワクチンの免疫原性に関与しているDNAセンサーを同定することが、いまだヒトに応用されていないDNA ワクチンを臨床で用いるためには必須である。

## VIII 自己免疫疾患とDNA

自己のDNAと自己免疫疾患との関連はDNAを分解する

酵素であるDNaseのノックアウトマウスを用いた研究によって報告されている。DNase Iはエンドヌクレアーゼであり、プラスミンとともにネクローシスによって死んだ細胞から放出されたクロマチンを低分子に分解するために必要である。DNase Iが欠損していると高分子の状態が保たれることで、自然免疫応答を活性化すると考えられている。実際にSLEの患者においてDNase Iの変異も確認することができる。また、DNase Iの欠損マウスではSLE様の症状を示しており、DNase I欠損がB-DNAとヌクレオソームに対する自己抗体産生、SLE患者の糸球体腎炎にも密接に関与していると考えられている<sup>56), 57)</sup>。同様にDNase IIはアポトーシスによって死んだ細胞からのDNAを排除するために必須なエンドヌクレアーゼである。DNase IIを欠損させるとファゴサイトーシスによってマクロファージ内に取り込まれたDNAが分解できず蓄積する。この分解できず蓄積したDNAはTLR非依存的にIFN- $\beta$ 産生を強力に誘導するため、マウスは死んでしまう。このマウスにIFNR1欠損マウスを掛け合わせることで、マウスの致死性がなくなることが報告されている。しかしながら、このマウスは出生後2カ月経過すると自己免疫である多発性関節炎を発症してしまい、それにはTNF- $\alpha$ が関与していることが報告された<sup>8), 9)</sup>。

Trex1/DNase IIIはDNAのホメオスタシスの調節に関与していること、DNAによる自然免疫活性化や自己免疫、炎症性疾患に関連していることが報告された。Trex1はエクソヌクレアーゼであり、すでに変異がSLE患者から見つかっている。また、RNaseH2との変異が遺伝性の炎症性疾患であるAicardi-Goutiere症候群の発病に関与しているとの報告もなされており、実際にTrex1欠損マウスでは炎症性心筋炎が確認され、その症状はIRF-3やIFNR1欠損マウスでは見られないか、軽減が確認された。Trex1欠損細胞ではssDNAの蓄積が見られ、自己抗体の産生も確認された。それゆえTrex1はDNAの消化にも関与しており、自己のDNAの反応を抑制するために働いていることが考えられる<sup>58)-61)</sup>。

これらの結果は、細胞内に異常なDNAが蓄積することが自然免疫応答を活性化させ、過度な炎症を引き起こすことによって自己免疫疾患を誘発していることを示唆している。

## おわりに

これまでTLR9がDNAを認識する自然免疫レセプターとして知られてきたが、近年いくつかの細胞内DNAセンサー

■表1 DNAセンサーと病原体

レセプター	病原体	表現型
TLR9	結核菌	感染後のIL-12 p40産生減少(欠損樹状細胞) <sup>62)</sup>
		感染後のIL-12 p40, IFN- $\gamma$ 産生減少, 感染後の致死性増大(欠損マウス) <sup>62)</sup>
	MCMV	感染後のIFN- $\alpha$ , IL-12産生減少(欠損樹状細胞) <sup>18)</sup> 感染後の血清中IFN- $\alpha$ , IL-12産生減少(欠損マウス) <sup>18)</sup>
	HSV-1	感染後のIFN- $\alpha$ , IL-12産生減少(欠損樹状細胞) <sup>19)</sup>
	HSV-2	HSV-2(UV処理) 刺激後のIFN- $\alpha$ 産生減少(欠損樹状細胞) <sup>20)</sup>
ZBP1/DAI	HSV-1	Ad-LacZ刺激後のIFN- $\alpha$ 産生減少(欠損樹状細胞) <sup>21)</sup> Ad-LacZ投与後(静脈内)のIFN- $\alpha$ 産生減少(欠損マウス) <sup>21)</sup>
		感染後のIFN- $\beta$ mRNAレベルの減少(L929細胞(siRNA)) <sup>36)</sup> 感受性増大(L929細胞(siRNA)) <sup>36)</sup>
AIM2	VV	感染後のIL-1 $\beta$ 産生減少(欠損樹状細胞) <sup>44)</sup>
	MCMV	感染後のIL-1 $\beta$ 産生減少(欠損マクロファージ) <sup>44)</sup> 感染後の血清中IL-18産生減少(欠損マウス) <sup>44)</sup> 感受性増大(欠損マウス) <sup>44)</sup>
RNA Pol III/RIG-I	リステリア	感染後のIL-1 $\beta$ 産生減少(欠損マクロファージ) <sup>44)</sup>
	フランシセラ属	感染後のIL-1 $\beta$ 産生減少(欠損マクロファージ) <sup>44)</sup> 感染後の血清中IL-18産生減少(欠損マウス) <sup>43)</sup> 感染後の致死性増大(欠損マウス) <sup>43)</sup>
	レジオネラ	感染後のIFN- $\beta$ mRNAレベルの減少(阻害剤使用) <sup>46)</sup> 感受性増大(阻害剤使用) <sup>46)</sup>
ヒストンH2B	HSV-1	感染後のIFN- $\beta$ mRNAレベルの減少(阻害剤使用) <sup>46)</sup>
	EBV	感染後のIFN- $\beta$ mRNAレベルの減少(阻害剤使用) <sup>46)</sup>
	AdV	感染後のIFN- $\beta$ mRNAレベルの減少(阻害剤使用) <sup>46)</sup>
ヒストンH2B	HPV	感受性増大[HEK293細胞(siRNA)] <sup>48)</sup>
	AdV	感受性増大[SSC-4細胞(siRNA)] <sup>48)</sup>

が相次いで報告されたことで、TLR9非依存的な自然免疫DNA認識機構の研究に脚光が集まっている。病原体由来のDNAだけではなく自己のDNAに対するDNAセンサーの役割を解明することは、感染症のみならず、DNAが病原性に関わる疾患、例えば自己免疫疾患の原因や治療に向けて重要になると思われる。

DNAワクチンに関してはワクチンそのものにアジュバントとしてのDNAが含まれており、免疫原性にSTING-TBK1-IRF-3を介した自然免疫シグナル経路が関与している。どのDNAセンサーがDNAワクチンの免疫原性に関与しているのでしょうか？新たなDNAセンサーの検索を含め今後の研究の進展が望まれる。

さらには、TLR9やその他のDNAセンサーによるDNA認識という現象が、自然免疫における生体防御だけでなく、例えばDNA損傷に対するゲノムのホメオスタシスに関与し

ていたり、細胞死の誘導から創傷治癒に向けたシグナルを制御していても何の不思議はなく、今後多方面にわたりDNAおよびDNAセンサーの生物学的作用が明らかになることを期待したい。

#### PROFILE 小檜山康司

- 医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト  
大阪大学免疫学フロンティア研究センターワクチン学
- E-mail: kobji@nibio.go.jp
- 趣味: バスケットボール

2003年東京薬科大学薬学部卒業。2009年横浜市立大学大学院博士課程修了(医学博士)。2010年より現職。

#### PROFILE 石井 健

- 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
- E-mail: kenishii@biken.osaka-u.ac.jp

## 文献

- 1) Hemmi H, et al: Nature (2000) 408: 740-745
- 2) Akira S, et al: Cell (2006) 124: 783-801
- 3) Ishii KJ, et al: Immunity (2005) 23: 111-113
- 4) Yoneyama M, et al: Adv Drug Deliv Rev (2008) 60: 841-846
- 5) Tokunaga T, et al: J Natl Cancer Inst (1984) 72: 955-962
- 6) Isaacs A, et al: Lancet (1963) 2: 113-116
- 7) Suzuki K, et al: Proc Natl Acad Sci USA (1999) 96: 2285-2290
- 8) Kawane K, et al: Nature (2006) 443: 998-1002
- 9) Yoshida H, et al: Nat Immunol (2005) 6: 49-56
- 10) Ishii KJ, et al: Nat Immunol (2006) 7: 40-48
- 11) Ishii KJ, et al: Nature (2008) 451: 725-729
- 12) Kumar H, et al: J Exp Med (2006) 203: 1795-1803
- 13) Sun Q, et al: Immunity (2006) 24: 633-642
- 14) Coban C, et al: Cell Host Microbe (2010) 7: 50-61
- 15) Latz E, et al: Nat Immunol (2007) 8: 772-779
- 16) Verthelyi D, et al: Clin Immunol (2003) 109: 64-71
- 17) Kumagai Y, et al: Adv Drug Deliv Rev (2008) 60: 795-804
- 18) Krug A, et al: Immunity (2004) 21: 107-119
- 19) Krug A, et al: Blood (2004) 103: 1433-1437
- 20) Lund J, et al: J Exp Med (2003) 198: 513-520
- 21) Zhu J, et al: J Virol (2007) 81: 3170-3180
- 22) Honda K, et al: Nature (2005) 434: 1035-1040
- 23) Barton GM, et al: Nat Immunol (2006) 7: 49-56
- 24) Park B, et al: Nat Immunol (2008) 9: 1407-1414
- 25) Ewald SE, et al: Nature (2008) 456: 658-662
- 26) Asagiri M, et al: Science (2008) 319: 624-627
- 27) Matsumoto F, et al: Biochem Biophys Res Commun (2008) 367: 693-699
- 28) Krug A: Handb Exp Pharmacol (2008): 129-151
- 29) Lande R, et al: Nature (2007) 449: 564-569
- 30) Apetoh L, et al: Immunol Rev (2007) 220: 47-59
- 31) Tian J, et al: Nat Immunol (2007) 8: 487-496
- 32) Abdulahad DA, et al: Autoimmun Rev (2010) 9: 661-665
- 33) Yanai H, et al: Nature (2009) 462: 99-103
- 34) Brinkmann MM, et al: J Cell Biol (2007) 177: 265-275
- 35) Kim YM, et al: Nature (2008) 452: 234-238
- 36) Takaoka A, et al: Nature (2007) 448: 501-505
- 37) Wang Z, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2008) 105: 5477-5482
- 38) Schroder K, et al: Cell (2010) 140: 821-832
- 39) Roberts TL, et al: Science (2009) 323: 1057-1060
- 40) Hornung V, et al: Nature (2009) 458: 514-518
- 41) Fernandes-Alnemri T, et al: Nature (2009) 458: 509-513
- 42) Bürckstümmer T, et al: Nat Immunol (2009) 10: 266-272
- 43) Fernandes-Alnemri T, et al: Nat Immunol (2010) 11: 385-393
- 44) Rathinam VA, et al: Nat Immunol (2010) 11: 395-402
- 45) Cheng G, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2007) 104: 9035-9040
- 46) Chiu YH, et al: Cell (2009) 138: 576-591
- 47) Ablasser A, et al: Nat Immunol (2009) 10: 1065-1072
- 48) Kobiyama K, et al: J Virol (2010) 84: 822-832
- 49) Konishi A, et al: Cell (2003) 114: 673-688
- 50) Park CB, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2000) 97: 8245-8250
- 51) Kawasaki H, et al: Biochem Biophys Res Commun (2003) 312: 1082-1086
- 52) Ishikawa H, et al: Nature (2008) 455: 674-678
- 53) Ishikawa H, et al: Nature (2009) 461: 788-792
- 54) Yang P, et al: Nat Immunol (2010) 11: 487-494
- 55) Okabe Y, et al: Nature (2009) 460: 520-524
- 56) Napirei M, et al: Nat Genet (2000) 25: 177-181
- 57) Yasutomo K, et al: Nat Genet (2001) 28: 313-314
- 58) Morita M, et al: Mol Cell Biol (2004) 24: 6719-6727
- 59) Lee-Kirsch MA, et al: Nat Genet (2007) 39: 1065-1067
- 60) Yang YG, et al: Cell (2007) 131: 873-886
- 61) Stetson DB, et al: Cell (2008) 134: 587-598
- 62) Bafica A, et al: J Exp Med (2005) 202: 1715-1724