

ことが明らかとなった (図3)。

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

4 細胞外核酸の臨床応用

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

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

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

近い将来、これら上市品が出ることも期待される。

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

おわりに

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

文献

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

- 6) Marichal, T. et al. : Nat. Med., 17 : 996-1002, 2011
- 7) Pozzi, C. et al. : PLoS Pathog., 8 : e1002626, 2012
- 8) Napirei, M. et al. : Nat. Genet., 25 : 177-181, 2000
- 9) Yasutomo, K. et al. : Nat. Genet., 28 : 313-314, 2001
- 10) Kawane, K. et al. : Nature, 443 : 998-1002, 2006
- 11) Morita, M. et al. : Mol. Cell. Biol., 24 : 6719-6727, 2004
- 12) Walker, M. J. et al. : Nat. Med., 13 : 981-985, 2007
- 13) Saitoh, T. et al. : Cell Host Microbe, 12 : 109-116, 2012
- 14) Lande, R. et al. : Sci. Transl. Med., 3 : 73ra19, 2011
- 15) Gartler, S. M. : Nature, 184 (Suppl 19) : 1505-1506, 1959
- 16) Lövgren, T. et al. : Arthritis Rheum., 50 : 1861-1872, 2004
- 17) Ganguly, D. et al. : J. Exp. Med., 206 : 1983-1994, 2009
- 18) Ishii, K. J. et al. : Nature, 451 : 725-729, 2008
- 19) Shaw, J. A. et al. : Genome Res., 22 : 220-231, 2012

<筆頭著者プロフィール>

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

特集

ワクチン製造をめぐる 規制・製造技術の最新動向

5

アジュバント開発研究の新展開： 自然免疫から審査行政

Vaccine adjuvant ; from innate immunity to regulations

独立行政法人医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト

鉄谷耕平, 石井 健

KOHHEI TETSUTANI, KEN J. ISHII

Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation

はじめに

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

1. 自然免疫と獲得免疫

(1) 自然免疫

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

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

(2) 自然免疫系による獲得免疫系の誘導

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

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

アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政

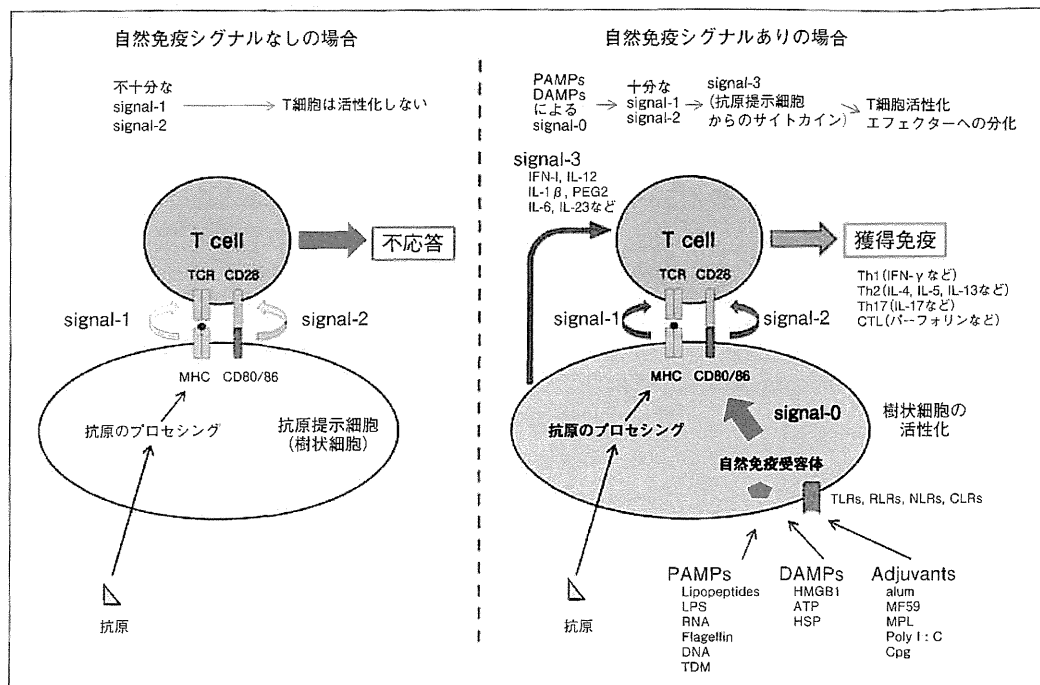


図1 自然免疫シグナルによる獲得免疫誘導¹⁾

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

(3) 獲得免疫系

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

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

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

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

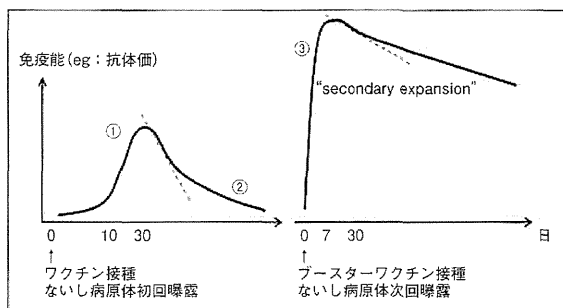


図2 ワクチン接種ないし病原体曝露時に惹起される免疫応答⁵⁾

が、標的排除後は同じく記憶免疫細胞となって長期間生存する。

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

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

(4) Toll-Like Receptor

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

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

路を活性化する。TLR1~9はいずれの種でも保存されている⁸⁾。

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

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

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

アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政

表1 TLRリガンドとアジュバント

TLR (発現部位)	自然界で知られる リガンド	ワクチンに応用さ れるアジュバント (由来)	臨床試験例
TLR1/2 (細胞表面)	細菌の細胞膜 トリアシル化 リポペプチド	Pam3Cys (MALP2由来合成 化合物)など	ライム病ワクチン
TLR3 (エンドソーム)	二本鎖RNA	poly(I:C ₁₂ U) ^{(合成 核酸poly(I:C)由 来)} など	肺瘍免疫療法
TLR4 (細胞表面)	グラム陰性菌の 細胞壁リポ多糖 体	MPL(LPS由来合 成化合物)など	HBVワクチン、 HPVワクチン、マ ラリアワクチンなど
TLR5 (細胞表面)	細菌の鞭毛成分 フラジェリン	フラジェリン	前臨床試験：腸チ フス・ペスト・緑 膿菌ワクチン
TLR2/TLR6 (細胞表面)	細菌の細胞膜 ジアシルリポ タンパク質		
TLR7/8 (エンドソーム)	一本鎖RNA	抗ウイルス薬 イミキモドなど	HPVワクチン
TLR9 (エンドソーム)	非メチル化 CpG DNA	K型CpG-ODN (合成核酸)	HBVワクチン、マ ラリアワクチンなど

2. ワクチンアジュバント

(1) ワクチンアジュバントの役割

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

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

ワクチンの歴史において、抗原の精製・単純化は主に安全性への志向から追求されており、それにもなつてアジュバントの重要性は強まっている。トキシイドが20世紀初頭に相次いで開発されたときに、期待されたほどのワクチン効果はみられなかったため、ワクチン効果を補助する(*adjuvare*[L])ものとしてさまざまな添加物が試みられたことがアジュバントの創始である。近年では例えば新型インフルエンザのワクチンの開発において、2011年9月の世界保健機構(World Health Organization; WHO)集計による約200のプロジェクトの約2/3はアジュバントを含んでいる⁽¹⁵⁾。生ワクチンにはアジュバントは添加されないが、不活化全粒子ワクチンにはアルミニウム塩が添加され、その他のスプリットないしサブユニットワクチンや、遺伝子組換えワクチンには、GSK社のAS03、Montanide社のMF59など新規アジュバントや、イヌリン、フラジェリンなど研究開発中のアジュバントを添加したものがみられる。

(2) アジュバントの種類と機能

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

表2 ワクチンの種類

ワクチンの種類	ワクチン抗原の特徴	アジュバントの必要性
弱毒化生ワクチン	弱毒化されたワクチン抗原ウイルスないし細菌。毒性はないが、接種後体内で増殖するものもある。	-
不活化ワクチン	全粒子・全死菌体	-
	スプリット	- ~ +
	サブユニット	+
	遺伝子組換えタンパク	++
	DNA	++*
トキシイド	病原細菌の培養上清中に分泌される外毒素を、ホルマリンなどで処理したもの。菌体由来成分は含まれない。	++

*ワクチン輸送にプラスミドベクターを必要とする

表3 アジュバントの分類

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

注) 下線のアジュバントは、臨床使用されている。

果を受けて、さまざまなアジュバントが臨床試験されている。

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

①抗原を生体内代謝から保護して長くそのままの形でとどめ、長時間の抗原提示を可能にするdepot効果。

②抗原提示細胞による、抗原タンパクの取り込みを効率化。

③抗原提示細胞による、抗原提示を効率化。

④記憶免疫細胞を長期間保持。

となる。抗原タンパクとともに生体内で振る舞い、①、②を特にワクチン輸送という。免疫賦活剤は抗原タンパクとは必ずしも同一に振る舞わず、共刺激分子のように抗原提示細胞を独自に活性化して、②～④の機能を果たす分子などを指す。またアルミニウム塩のように主に①を担うと考えられていたが、近年③の機能ももつことがわかる¹⁰⁾など、複数の機能をもつアジュバントもある。

(3) 自然免疫受容体を活性化するアジュバント

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

アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政

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

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

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

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

(4) アジュバントの評価法

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

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

アジュバントに特化した指針は欧州医薬品庁

(European Medicines Agency ; EMA) のもの²³⁾ だけであるが、ワクチンとしての安全性・有効性の各種指針にも、ワクチンとしての試験に加えアジュバント単独についての非臨床試験を推奨するという立場が多いようである。わが国の感染症ワクチンのためのガイドライン²⁴⁾ では、「新規アジュバントと抗原の組み合わせにより毒性反応に差を生じる可能性があるため、抗原の新規性の有無にかかわらず、新規アジュバントと抗原の両方を含んだ製剤での毒性評価も必要」とする。米国食品医薬品局 (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration ; FDA) は「アジュバントと抗原の組み合わせで1つの医薬品として承認されるわけであるから、アジュバント単独は認可対象とは認められないだろう」とするが、アジュバント単独の毒性試験は「推奨される」とする²⁴⁾。WHO²⁵⁾ も必要であるとする。

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

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

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

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

表4 アジュバントに関するガイドライン

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

アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政

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

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

まとめ

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

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

参考文献

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

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

基礎医学とのダイアローグ

自然免疫メカニズムを利用する ワクチンアジュバント開発

Innate immune receptors and vaccine adjuvant

独立行政法人医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト／

大阪大学免疫学フロンティア研究センターワクチン学

独立行政法人医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクトリーダー／

大阪大学免疫学フロンティア研究センターワクチン学教授

小檜山康司 *Kouji Kobiyama*

石井 健 *Ken Ishii*

Key words

アジュバント, 自然免疫, ワクチン, 獲得免疫

Summary

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

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

はじめに

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

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

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

▼新型(鳥)インフルエンザ—高病原性インフルエンザへの備え▲

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

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

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

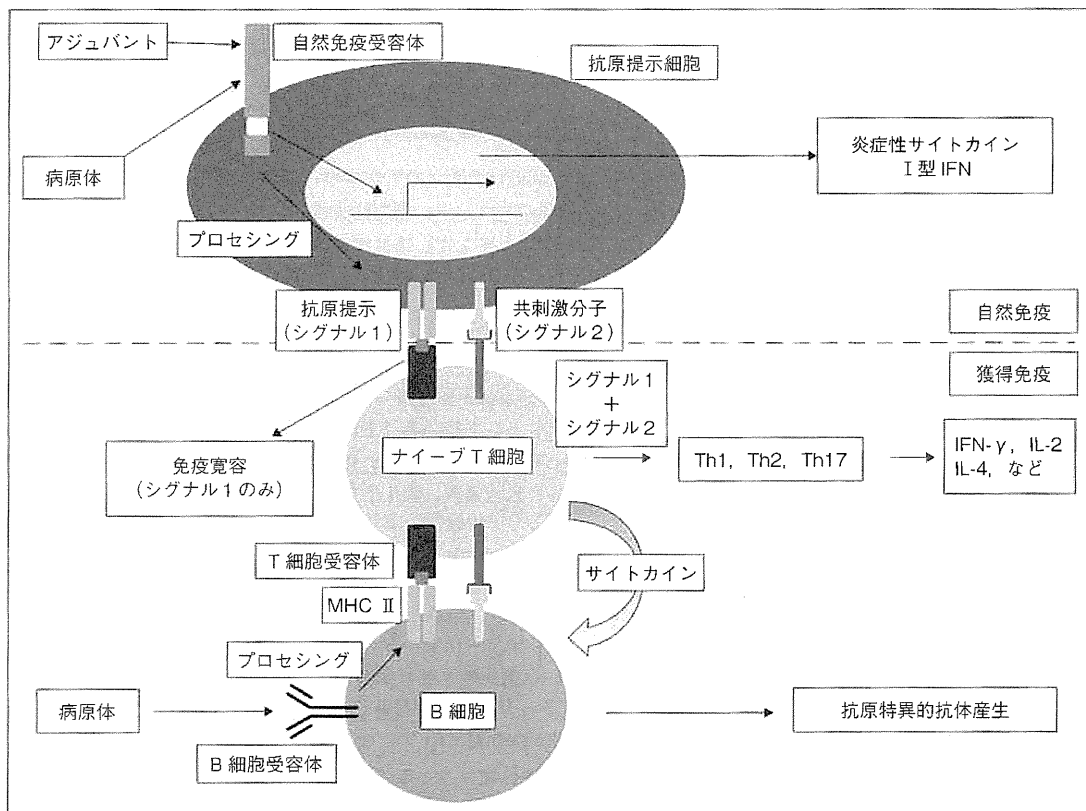


図1. 免疫応答のシグナル伝達経路

MHC : 主要組織適合遺伝子複合体

表1. アジュバントの種類と開発状況

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

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

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

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

I 自然免疫受容体とアジュバント(表2)

1. TLR

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

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

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

表2. 自然免疫受容体とアジュバント活性

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

への早期免疫応答の誘導に役立っている。

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

TLR3は、ウイルス感染細胞内で複製されたウイルス由来の二本鎖RNAを認識することで自然免疫応答を活性化させる。その結果として、Th1型免疫応答を強く誘導することができるために、ウイルス感染症のワクチンなどに有用であると考えられている。一方で、Poly(I:C)はRLRであるmelanoma differentiation-associated gene 5(MDA5)のリガンドであることが報告され、アジュバント効果への寄与は不明であった。2008年に、MDA5のアダプター分子であるIPS-1、またはTLR3のアダプター分子であるTRIF欠損マウスを用いてアジュバント効果の検討が行われた。結果として、Poly(I:C)によるアジュバント効果はIPS-1欠損マウスでは減弱しており、一方でTRIF欠損マウスでは効果に変化がみられなかった。このことから、Poly(I:C)のアジュバント効果はTLR3ではなくMDA5への寄与が大きいことが示唆された⁸⁾。

TLR4はリポポリサッカライド(lipo-

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

TLR5は細菌の鞭毛(フラジェリン)を認識することで自然免疫応答を活性化させる。フラジェリンは強力にTh1型免疫応答のみを誘導するのではなく、Th2型免疫応答をも誘導することができるため、アジュバントとしても有用であると考えられている⁹⁾⁻¹¹⁾。

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

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

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

2. NLR

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

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

3. CLR

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

II インフルエンザワクチン

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

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

おわりに

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

文 献

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

- 18) Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, et al : Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008 ; 453 : 1122-6.
- 19) Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al : Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008 ; 9 : 847-56.
- 20) Franchi L, Núñez G : The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* 2008 ; 38 : 2085-9.
- 21) Kool M, Pétrilli V, De Smedt T, et al : Cutting edge : alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 2008 ; 181 : 3755-9.
- 22) Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, et al : Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. *Immunity* 2011 ; 34 : 514-26.
- 23) Marichal T, Ohata K, Bedoret D, et al : DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med* 2011 ; 17 : 996-1002.
- 24) Kerrigan AM, Brown GD : Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends Immunol* 2011 ; 32 : 151-6.
- 25) Kerrigan AM, Brown GD : Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol Rev* 2010 ; 234 : 335-52.
- 26) Conti HR, Gaffen SL : Host responses to *Candida albicans* ; Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect* 2010 ; 12 : 518-27.
- 27) Yamasaki S, Matsumoto M, Takeuchi O, et al : C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 ; 106 : 1897-902.
- 28) Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, et al : Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med* 2009 ; 206 : 2879-88.
- 29) Schoenen H, Bodendorfer B, Hitchens K, et al : Cutting edge : Mincle is essential for recognition and adjuvant activity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J Immunol* 2010 ; 184 : 2756-60.
- 30) Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, et al : Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci Transl Med* 2010 ; 2 : 25ra4.

小檜山康司

平成21年 横浜市立大学大学院医学研究科博士課程修了(医学博士)

現在, 医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト プロジェクト研究員

専門分野 : 感染免疫学



Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination

Nao Jounai^{1,2}, Kouji Kobiyama^{1,2}, Fumihiko Takeshita^{1,2} and Ken J. Ishii^{1,2*}

¹ Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan

² Laboratory of Vaccine Science, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka, Japan

Edited by:

Nelson Gekara, Umea University, Sweden

Reviewed by:

Dario S. Zamboni, Universidade de São Paulo, Brazil

Willem Van Eden, Utrecht University, Netherlands

Yan Shi, University of Calgary, Canada

***Correspondence:**

Ken J. Ishii, Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan.
e-mail: kenishii@biken.osaka-u.ac.jp

All mammalian cells are equipped with large numbers of sensors for protection from various sorts of invaders, who, in turn, are equipped with molecules containing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Once these sensors recognize non-self antigens containing PAMPs, various physiological responses including inflammation are induced to eliminate the pathogens. However, the host sometimes suffers from chronic infection or continuous injuries, resulting in production of self-molecules containing damage-associated molecular patterns (DAMPs). DAMPs are also responsible for the elimination of pathogens, but promiscuous recognition of DAMPs through sensors against PAMPs has been reported. Accumulation of DAMPs leads to massive inflammation and continuous production of DAMPs; that is, a vicious circle leading to the development of autoimmune disease. From a vaccinological point of view, the accurate recognition of both PAMPs and DAMPs is important for vaccine immunogenicity, because vaccine adjuvants are composed of several PAMPs and/or DAMPs, which are also associated with severe adverse events after vaccination. Here, we review as the roles of PAMPs and DAMPs upon infection with pathogens or inflammation, and the sensors responsible for recognizing them, as well as their relationship with the development of autoimmune disease or the immunogenicity of vaccines.

Keywords: PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), DAMPs (damage-associated molecular patterns), nucleic acids, metabolites, innate immunity, DNA sensors, uric acid, vaccine adjuvant

INTRODUCTION

Host cells are equipped with numerous types of receptors to discriminate self from non-self. When cells are attacked by infectious pathogens, host cellular receptors such as Toll-like receptors (TLRs), nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs), retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLRs), C-type lectin receptors, and other non-classified receptors recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), small molecular motifs conserved amongst microbes. Through the recognition of PAMP molecules, innate immune responses are induced, and inflammatory cytokines are produced that aid in the elimination of the pathogens. However, in some circumstances host inflammatory responses can cause host cell death leading to tissue injury, and the release of host cellular components to the extracellular environment. These cellular components could be considered “messengers” for danger; they are also known as “damage-associated molecular patterns” (DAMPs). DAMPs include lipids, sugars, metabolites, and nucleic acids such as RNA and DNA species. DAMPs are important for the elimination of pathogens, but are also implicated in the development of autoimmune disease and chronic inflammatory disease, and are used as adjuvants for vaccines. Interestingly, high numbers of PAMP receptors also recognize endogenous DAMPs and can augment inflammatory responses against pathogens,

whereas continuous inflammatory responses owing to impaired regulation of inflammatory signaling results in chronic inflammatory disease or autoimmune disease. Therefore, “bipolar sensors” for both PAMPs and DAMPs appear to be the mostly responsible for dysregulated inflammation. Here, we describe the various types of DAMPs and their receptors, with a special focus on nucleic acids as DAMPs.

LIPID-RELATED DAMPs LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS)

A representative lipid for the induction of inflammatory responses is LPS, a PAMP present in gram-negative bacteria. Upon recognition by TLR4, LPS promotes the production of various inflammatory cytokines following bacterial infection (Table 1). However, Shi et al. reported that, TLR4 also recognizes endogenous fatty acids and can activate inflammatory responses in adipocytes and macrophages (Shi et al., 2006). In addition, TLR4-deficient mice developed reduced inflammatory cytokine production in response to a high fat diet (Shi et al., 2006). Previous studies have revealed that saturated fatty acids are released from hypertrophied adipocytes in the presence of macrophages, and that released fatty acids are sensed by macrophages in a TLR4-dependent manner, following excessive production of inflammatory cytokines such as tumor necrosis

Table 1 | Association of PAMP or DAMP sensors with autoimmune diseases.

Receptor	PAMP	DAMP	Autoimmune disease
TLR1/TLR2	Lipopeptide	Serum amyloid A protein	Atherosclerosis, rheumatoid arthritis, Crohn's disease
TLR4	LPS	Fatty acid	Obesity
		Hyaluronic acid	Rheumatoid arthritis, sarcoidosis, systemic sclerosis, pancreatic cancer
NLRP3	Uric acid	Uric acid	Hyperuricemia, gout
		ATP	Unknown
RIG-I, MDA5, TLR7/8	Virus RNA	Immunocomplex of snRNPs	SLE
TLR9	Bacterial DNA	Self-DNA-containing immune complexes, histone	SLE
RAGE	–/?	HMGB1	SLE
DAI, IFI16, AIM2, H2B, RNA pol III	Bacterial DNA, Virus DNA	Self-DNA?	SLE?

factor (TNF)- α (Suganami et al., 2007). Because the production of pro-inflammatory or inflammatory cytokines is dysregulated in obese adipose tissues, obesity can be thought of as a chronic inflammatory disease caused by fatty acids acting as DAMP molecules (Berg and Scherer, 2005).

SERUM AMYLOID A PROTEIN (SAA)

Some lipoproteins can also act as DAMP molecules. In 1982, Hoffman and Benditt revealed that the treatment of mice with LPS of *Salmonella typhosa* increased SAA levels (Hoffman and Benditt, 1982). According to several studies, SAA functions in cholesterol transport as well as in the production of proinflammatory cytokines, suggesting that SAA is a DAMP molecule that responds to bacterial endotoxins (Banka et al., 1995; He et al., 2003). In support of this, increased levels of SAA may be closely related to various diseases such as atherosclerosis, rheumatoid arthritis, and Crohn's disease (Chambers et al., 1983, 1987; Malle and De Beer, 1996). SAA binds to two receptors, TLR4 and TLR2, which also recognize bacterial PAMP molecules such as triacyl lipopeptides (in cooperation with TLR1), diacyl lipopeptides or lipoteichoic acids (together with TLR6) (Schwandner et al., 1999; Takeuchi et al., 2001, 2002; Cheng et al., 2008; Hiratsuka et al., 2008) (Table 1). Recently, Loser et al. showed direct evidence for the local production of the SAA molecules myeloid-related protein-8 (Mrp8) and Mrp14, which induced autoreactive CD8⁺ T cells and systemic autoimmunity through TLR4 signaling in mice (Loser et al., 2010). Taken together, these findings suggest that TLR4 may be a key receptor in the discrimination of lipid PAMPs from lipid DAMPs molecules, because promiscuous recognition of lipids via TLR4 unfortunately causes inflammatory disease. Although a consensus recognition structure for TLR4 has not yet been identified, antagonists of TLR4 signaling by lipid-DAMPs might be candidate drugs for the treatment of chronic inflammatory disease.

SUGAR-RELATED DAMPS

Hyaluronic acid (HA) is a non-sulfated linear polysaccharide, and a major component of the extracellular matrix. Weigel et al. revealed that HA is induced and degraded during inflammatory responses and that it functions in immune cell activation or new blood vessel formation (Weigel et al., 1986). Interestingly, small molecular weight HA (sHA), produced by the degradation of HA during inflammation, can induce the maturation of dendritic cells (DCs) for pathogen elimination (Termeer et al., 2002). Bone marrow-derived DCs from mice expressing non-functional TLR4 could not be activated by sHA, while DCs from TLR2-deficient mice retained the ability for sHA-mediated activation. This suggests that sHA can act as a DAMP molecule signaling through TLR4 to induce DC maturation upon pathogen infection (Termeer et al., 2002). Consistent with this, excessive sHA levels appeared to be closely associated with inflammatory autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, sarcoidosis, systemic sclerosis, and pancreatic cancer (Hallgren et al., 1985; Witter et al., 1987; Sugahara et al., 2006; Yoshizaki et al., 2008) (Table 1).

METABOLITE-RELATED DAMPS

URIC ACID

Uric acid is a metabolite of purine nucleotides and free bases in humans and other primates, and it functions as an antioxidant to protect erythrocyte membranes from lipid oxidation (Kellogg and Fridovich, 1977). However, it was previously shown that soluble uric acid-induced inflammatory cytokines such as monocyte chemoattractant protein-1 in rat vascular smooth muscle cells (Kanellis et al., 2003). Shi et al. also reported that uric acid is produced in ultraviolet-irradiated BALB/c 3T3 cells, and activates DCs (Shi et al., 2003). In addition, high levels of uric acid in the blood are associated with the development of hyperuricemia and gout (Johnson et al., 2005), suggesting that it acts as a DAMP during cell injury and can induce inflammatory responses that are related to autoinflammatory diseases such as gout (Table 1).