

201407034A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

「アジュバント安全性評価データベースの構築研究」

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 石井 健

(独) 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

平成27(2015)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

アジュバント安全性評価データベースの構築研究

石井 健	-----	1 - 11
------	-------	--------

II. 分担研究報告

青枝 大貴	-----	12 - 17
黒田 悦史	-----	18 - 24
岸下 奈津子	-----	25 - 27
(別紙) 石井研究室業績	-----	28 - 33
山田 弘	-----	34 - 47
水口 賢司	-----	48 - 58
清野 宏	-----	59 - 66
中西 憲司	-----	67 - 70
松本 美佐子	-----	71 - 74
植松 智	-----	75 - 77
浜口 功	-----	78 - 83
保富 康宏	-----	84 - 93
Standley Daron	-----	94 - 99
Cevayir COBAN	-----	100 - 104
國澤 純	-----	105 - 113
山崎 晶	-----	114 - 119

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	121 - 141
---------------------	-------	-----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	別紙
-----------------	-------	----

アジュバント安全性評価データベースの構築研究

研究代表者 石井健 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨

本研究は、次世代の免疫医薬として期待されるアジュバントの開発研究（有効性）および審査行政（安全性）に寄与するバイオマーカー探索可能なデータベースを構築することを目的とする。

アジュバントの開発研究の歴史は古いものの実際のメカニズムは長らく不明であったが、2011 年度のノーベル医学生理学賞が授与された自然免疫、樹状細胞の研究が起爆剤となり次世代アジュバント開発が世界中で激しい競争になっている。しかし一方で、アジュバントはその起源や作用機序などが多岐にわたり、他の創薬に比べその有効性そして安全性の指標が未開拓という点が挙げられる。日本の産学官連携や支援、そして審査行政の立ち遅れもあり新たなアジュバントの評価方法、指標（バイオマーカー）の構築が切望されている。

上記を踏まえ、本研究では各種アジュバントによるヒト細胞やげっ歯類、霊長類個体の生物反応を総合的に解析したデータベースを構築する。

A. 研究目的

本研究は、次世代の免疫医薬として期待されるアジュバントの開発研究（有効性）および審査行政（安全性）に寄与するバイオマーカー探索可能なデータベースを構築することを目的とする（図 1）。

アジュバントとは、ラテン語の“助ける”という意味をもつ“adjuvare”という言葉が語源に持ち、ワクチン抗原に対する免疫原性を増強する目的で使用される因子の総称である。アジュバントの開発研究の歴史は古いものの、抗原の徐放を担う程度と考えられ、‘Immunologist’s little dirty secret’ と揶揄されるほど実際のメカニズムは長らく不

明であった。しかし、近年の自然免疫研究や樹状細胞の発見により、ワクチンの効果には「アジュバント」が樹状細胞等の抗原提示細胞の TLR などの自然免疫受容体を活性化することが必須であることが判明した。この成果に対し 2011 年度のノーベル医学生理学賞が授与されたことからその重要性と高いインパクトは明らかである。現在感染症、ガン、アレルギーワクチンへの TLR リガンドを中心とした次世代アジュバント開発が世界中で激しい競争になっており、世界のトップレベルをほこる日本の免疫学の成果が日本発のアジュバント開発研究に寄与することが期待されている。

しかし一方で、アジュバントの種類はその

起源（天然、合成、内因性）、作用機序など多岐にわたり、他の創薬（低分子医薬、抗体医薬）に比べその開発は困難を極めている。その大きな理由のひとつとして、アジュバントの有効性そして安全性の指標が未開拓という点が挙げられる。グローバル化する研究開発に比べ、いくつかのアジュバントが認可されているものの、FDA や EMA、PMDA ではいまだガイドラインの有無からして温度差があり、国際的な協調、連携が望まれている。日本においても産学官連携や支援、そしてアジュバントに特化したレギュラトリーサイエンス、審査行政の立ち遅れもあり新たなアジュバントの評価方法、指標（バイオマーカー）の構築が切望されている。

上記を踏まえ、本研究では認可済みから開発中まで、多岐にわたるアジュバントによるヒト細胞、マウス個体の生物反応を総合的に解析したデータベースを構築する。このデータベースは1) 医薬基盤研究所で作成された世界最高レベルのトキシコゲノミクスデータベースを基盤とする点、2) 世界でも有数の遺伝子欠損マウスリソースや霊長類センターを基盤とし、世界トップレベルの研究者を擁したアジュバント研究チームを擁している点、3) 血清などに安定して含まれる核酸情報であるマイクロ RNA に特化したデータベース製作を予定しており、世界の他のワクチン関連のデータベースと一線を画し、独創的な点といえよう。

このような状況の中で、本研究はワクチン開発研究になくはならなくなってきた、アジュバントに関する基礎研究、開発、審査行政に寄与する網羅的なデータベースを提供する意欲的なものである。国内はもとより、グローバルな視点でユニークかつトップレベル

の仕事がされている分担研究者に参加をお願いしアジュバントの開発研究（有効性）および審査行政（安全性）に寄与するバイオマーカー探索可能なデータベースの構築を目指した。

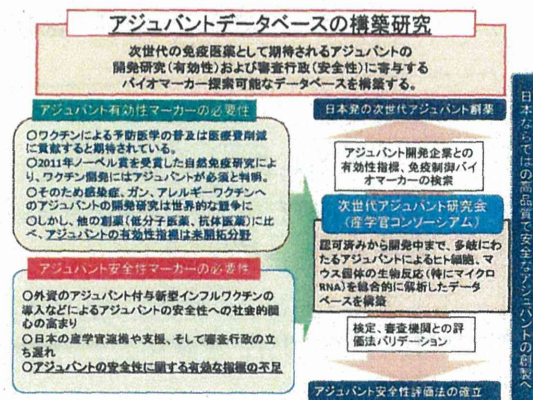


図1；アジュバントデータベース構築研究

本計画の全体フロー図は以下（図2）のとおりである。



図2；事業の全体および年次計画

B. 研究方法

本提案はアジュバントやワクチンの安全性と有効性の判断における有用な指標（バイオマーカー、サロゲートマーカー）を同定、検証するために、人に対する臨床試験を行う前の研究段階で2つの実験系を用いて行い、臨床試験のデータからのサンプルでバリデー

ションをとる。各種アジュバントやアジュバントを含んだワクチンを用いてデータを蓄積し、公開することを目的とし、下記の研究方法を採った。

1) 認可もしくは開発中のアジュバントを約 20 種類ほど選択し

(Alum, AS1, AS02, AS03, AS04, AS15, MF59, IFA, CFA, CpG (2 種類), Imiquimod, PolyIC, inulin, hemozoin, その他数種類)、販売、製造する企業との秘密保持契約、MTA締結、共同研究契約等の調整を続ける。ヒトのリンパ球等各種免疫系細胞、ラット、マウス等のモデル動物を用いてアジュバントに対する初期反応(自然免疫反応を含む)の遺伝子解析を DNA マイクロアレイ、マイクロ RNA アレイを用いて網羅的に行う。(平成 25 年度-終了予定 28 年度;石井、山田、清野、中西、瀬谷、植松、浜口、Coban)

2) ヒトにおけるアジュバントワクチンの臨床試験(アジュバント入りのインフルエンザワクチン治験、マラリアワクチン、がんワクチン、コメワクチン)のサンプル(血清など)を用いてマイクロ RNA の解析、加えてアジュバント副作用に関連する自己免疫疾患などの患者血清を用いた臨床研究も開始する(臨床研究 I R B 申請済)。(平成 25 年度-終了予定 28 年度:石井、山田、水口、Standley)

以下、I R B 申請した miRNA 臨床研究および予定は下記の通り;

1. 術後膀胱癌に対するペプチドワクチン臨床試験被験者血清を用いた miRNA 解析研究(和歌山医大との共同研究)

2. 小児炎症性疾患患者における血清マイ

クロ RNA 解析研究(横浜市大との共同研究)

3. AdvaxTM を添加したインフルエンザワクチン治験被験者の保存血清を用いたマイクロ RNA 研究(オーストラリア Vaxine 社との共同研究)

4. IgG4 関連疾患の病態解明に関するヒト血液および末梢血単核球を用いた臨床研究(兵庫医大との共同研究)

5. ヒト血液および末梢血単核球を用いたマイクロ RNA 研究(基盤研内)

3) 上記の網羅的解析や機能解析で見つかった分子群、因子群に関して、アジュバント(ワクチン)の安全性もしくは有効性の指標になりうるかを、細胞レベル、動物実験レベル、そして臨床試験のレベルで検証実験を行う。特に評価法の開発につながるアジュバントのターゲット器官である粘膜におけるターゲット細胞の解析や、アジュバントのイメージングなどを行う。(平成 24 年度-終了予定 28 年度;石井、清野、中西、瀬谷、保富、植松、浜口、Coban)

4) また、サルなどの高等動物モデルの実験系を用いてアジュバント(ワクチン)接種後の有効性、安全性の解析を行い、ヒトやげっ歯類での実験結果のブリッジングを続行する。(平成 24 年度-終了予定 28 年度;石井、清野、保富)

5) WHO、ICH 主導で FDA、EMA、PMDA 等世界各国の規制当局や GSK、サノフィ、ファイザーをはじめとした世界のワクチン企業が参加して作成を試みているアジュバントおよびアジュバント入りワクチンのガイドライン作成の最終段階に入る

(First Draft, Public comment など)。日本でのガイドライン作成の可能性を検討する。

6) アウトリーチの一環として、一般公開、次世代アジュバント研究会、学会、シンポジウム等で本研究内容を含めたアジュバントの研究、開発、臨床試験、審査、臨床にわたる広い範囲の啓発活動を行う。

実際の解析と実施体制の模式図を示す。

(図3, 4)

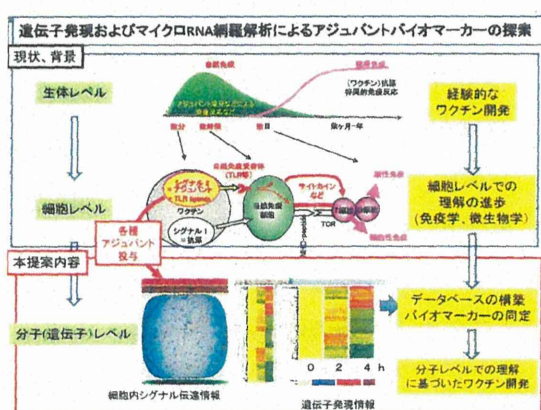


図3：アジュバントの有効性、安全性バイオマーカーの網羅的解析

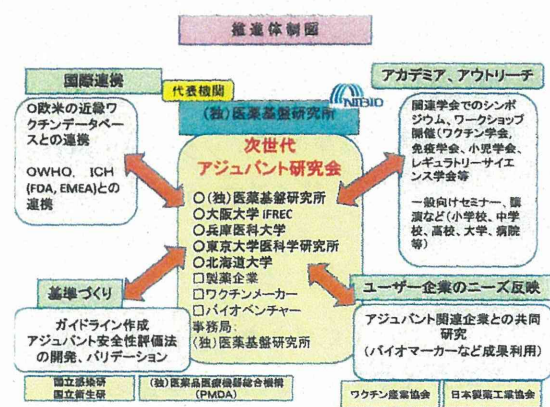


図4：実施体制図

(倫理面への配慮)

ヒト末梢血細胞は医薬基盤研究所の倫理審査委員会で承認を受けた。また実験動物は、医薬基盤研究所および国立感染症研究所動物実験委員会規定に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。

C. 研究結果

アジュバントデータベースプロジェクトは国内外の産学連携が増え、また、医薬基盤研のバイオインフォマティクスプロジェクトチームやワクチンマテリアルプロジェクト、霊長類医科学研究センターと連携し、ほぼ毎週の定例ランチ班会議やほぼ毎月の基盤研セミナーを開催し、連携、アウトリーチの幅が格段に向上した。

具体的な研究の成果として、

1-アジュバントによる生体反応を、マウス、ラットを用いて投与後の各種遺伝子発現解析にて国内外で臨床開発が進む各種アジュバントの作用機序解明に成功し、さらに

2-実際の臨床試験、臨床研究における被験者血清中に存在するマイクロRNAの塩基配列の同定、発現解析を行い、平成26年度までにワクチンによる発熱(安全性)、抗体価(有効性)の予測できる可能性があるバイオマーカーの同定に成功している。

3-新規のアジュバント開発を同時に行い、産学官をあげての開発体制を確立する。平成26年度までにマラリアワクチンにおける新規核酸アジュバントの医師主導治験(スクリーニング)を開始し、平成26年度中に終了し非常に良好な結果を得た。第2世代のD

DS機能付加アジュバントの同定 (PNAS 2014) に成功し、特許申請、大手製薬企業、JSTとの共同開発が開始された。さらに新たな非粒子、水溶性を含めたの新規アジュバントなどを20種以上同定した。石井は大阪科学賞を受賞した。

D. 考察

上記の通り、予定されていた研究内容を予定通りかそれ以上の成果を上げることが出来たと考えている。

特に、アジュバントデータベースのプロトタイプが前倒しで完成し、バリデーションに入った点、動物実験やヒトの治験サンプルの成果も順調に上がってきている点、実際のアジュバント開発も予想以上の成果(20種以上の同定)、そしてWHOにおけるアジュバント入りワクチンの非臨床ガイドライン発布や次世代アジュバント研究会の開催、専門書の発行、PMDA科学委員会など、アウトリーチ活動にも成果が増えている点などが挙げられる。

E. 結論

今後のワクチン開発におけるアジュバントの役割は非常に大きく、アジュバントの安全性及び有効性を科学的に評価するためには、アジュバント投与によって生じる生体反応を細胞および遺伝子レベルで解析したデータからなるデータベース構築が必須である。本研究では、ラット、マウス、ヒトPBMCを用いてアジュバント投与後の遺伝子発現変化を遺伝子アレイによって網羅的解析してデータベース構築を進めていく。アジュバントの有効性と安全性を適正に評価するためには高品質のデータベースが必要であり、さらに知見を

積してSOPを確立していく。また、結果として得られる膨大なデータから様々な指標を抽出する方法論の確立も進めていく。

F. 研究発表

【学術論文(英文・すべて査読付)】

- 1) Shen YJ, Le Bert N, Chitre AA, Koo CX, Nga XHI, Ho SW, Khatoo M, Tan NY, Ishii KJ and Gasser S. Genome-Derived Cytosolic DNA Mediates Type I Interferon-Dependent Rejection of B Cell Lymphoma Cells. *Cell Reports* 2015 11, 1-14
- 2) Temizoz B, Kuroda E, Ohata K, Jonai N, Ozasa K, Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type II IFN. *Eur J Immunol*. 2015. 45(4) 1159-1169,
- 3) Onishi M, Ozasa K, Kobiyama K, Ohata K, Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Katakai Y, Yasutomi Y, Wijaya E, Igarashi Y, Nakatsu N, Ise W, Inoue T, Yamada H, Vandenbon A, Standley DM, Kurosaki T, Coban C, Aoshi T, Kuroda E, Ishii KJ. Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Spikes Local Inflammation That Induces Th2 Cell and T Follicular Helper Cell Responses to the Coadministered Antigen. *J Immunol*. 2015 194(6):2673-82.
- 4) Koo CX, Kobiyama K, Shen YJ, LeBert N, Ahmad S, Khatoo M, Aoshi T, Gasser S, Ishii KJ. RNA Polymerase III Regulates Cytosolic RNA:DNA Hybrids and Intracellular MicroRNA Expression. *J Biol Chem*. 2015. 290(12):7463-73
- 5) Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, Kusuba N, Otsuka A,

- Kitoh A, Honda T, Nakajima S, Tsuchiya S, Sugimoto Y, [Ishii KJ](#), Tsutsui H, Yagita H, Iwakura Y, Kubo M, Ng Lg, Hashimoto T, Fuentes J, Guttman-Yassky E, Miyachi Y, Kabashima K. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol*. 2014 (11):1064-9.
- 6) Piao Z, Akeda Y, Takeuchi D, [Ishii KJ](#), Ubukata K, Briles DE, Tomono K, Oishi K. Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice. *Vaccine*. 2014 32(43):5607-13.
- 7) Uraki R, Das SC, Hatta M, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Ozawa M, Coban C, [Ishii KJ](#), Kawaoka Y. Hemozoin as a novel adjuvant for inactivated whole virion influenza vaccine. *Vaccine*. 2014 32(41):5295-300.
- 8) Mizukami T, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Araki K, Furuhata K, [Ishii KJ](#), Hamaguchi I, Yamaguchi K. System vaccinology for the evaluation of influenza vaccine safety by multiplex gene detection of novel biomarkers in a preclinical study and batch release test. *PLoS One*. 2014 9(7):e101835.
- 9) Hemmi M, Tachibana M, Tsuzuki S, Shoji M, Sakurai F, Kawabata K, [Kobiyama K](#), [Ishii KJ](#), Akira S, Mizuguchi H. The early activation of CD8⁺ T cells is dependent on type I IFN signaling following intramuscular vaccination of adenovirus vector. *Biomed Res Int*. 2014;158128.
- 10) Yagi M, Bang G, Tougan T, Palacpac NM, Arisue N, [Aoshi T](#), Matsumoto Y, [Ishii KJ](#), Egwang TG, Druilhe P, Horii T. Protective epitopes of the Plasmodium falciparum SERA5 malaria vaccine reside in intrinsically unstructured N-terminal repetitive sequences. *PLoS One*. 2014 9(6):e98460.
- 11) Zhao H, [Aoshi T](#), Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, [Haseda Y](#), Shimizu M, Kohyama M, [Kobiyama K](#), Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshioka Y, [Ishii KJ](#), Coban C. Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe*. 2014 15(5):551-63.
- 12) [Onishi M](#), Kitano M, Taniguchi K, Homma T, Kobayashi M, Sato A, Coban C, [Ishii KJ](#). Hemozoin is a potent adjuvant for hemagglutinin split vaccine without pyrogenicity in ferrets. *Vaccine*. 2014 32(25):3004-9.
- 13) Imanishi T, Ishihara C, Badr Mel S, Hashimoto-Tane A, Kimura Y, Kawai T, Takeuchi O, [Ishii KJ](#), Taniguchi S, Noda T, Hirano H, Brombacher F, Barber GN, Akira S, Saito T. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. *Nature Communications*. 2014 5:3566.
- 14) Takemura N, Kawasaki T, Kunisawa J, Sato S, Lamichhane A, [Kobiyama K](#), [Aoshi T](#), Ito J, Mizuguchi K, Karuppachamy T, Matsunaga K, Miyatake S, Mori N, Tsujimura T, Satoh T, Kumagai Y, Kawai T, Standley DM, [Ishii KJ](#), Kiyono H, Akira S, Uematsu S. Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Nature Communications*. 2014 5:3492.

- 15) Lam AR, Le Bert N, Ho SS, Shen YJ, Tang ML, Xiong GM, Croxford JL, Koo CX, Ishii KJ, Akira S, Raulet DH, Gasser S. RAE1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by STING-dependent DNA sensor pathways in lymphoma. *Cancer Res.* 2014 74(8):2193-203.
- 16) Kobiyama K, Aoshi T, Narita H, Kuroda E, Hayashi M, Tetsutani K, Koyama S, Mochizuki S, Sakurai K, Katakai Y, Yasutomi Y, Saijo S, Iwakura Y, Akira S, Coban C, Ishii KJ. Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 111(8):3086-91. (Direct submission)
6. 米田悦啓 堤康央 石井健 (編集) 生命科学から創薬へのイノベーション 2014年1版 南山堂
7. 小檜山康司、石井健、「自然免疫研究からのアジュバント開発へ」生命科学から創薬へのイノベーション、南山堂、2014年
8. Temizoz B, Kuroda E, Kobiyama K, Aoshi T and Ishii KJ “Immunotherapy of Cancer: An Innovative Treatment Comes of Age” Editor: Yoshiyuki Yamaguchi 2014 *Springer*
9. Etsushi Kuroda, Cevayir Coban, Ken J. Ishii Chapter 10 “Particulate and Immunity” Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application Nanomedicine and Nanotoxicology 2014, pp 193-204 2014 *Springer*

書籍

1. 庵原俊昭, 清野宏、石井健他 ワクチン開発の現状と将来 ヒューマンサイエンス 25(1), 4-14, 2014-04
2. 鉄谷耕平 石井健 産業と行政 アジュバントの研究開発 バイオサイエンスとインダストリー 72(1), 53-59, 2014
3. Vaccine Development : Present and Future 北畑裕司 石井健アジュバントの可能性 : がんワクチン, がん免疫療法への展開 (特集 次世代ワクチン開発 : 実用化に向けた課題と挑戦) *Bio Industry* 31(6), 27-33, 2014-06
4. 青枝大貴, 石井健. 次世代ワクチンの方向性(解説) : 感染・炎症・免疫 44 巻3号 Page194-207 (2014. 10)
5. 小檜山康司、石井健、「ワクチン開発の新しい方向性-アジュバント開発を軸に」*医学のあゆみ*、医歯薬出版株式会社、2015年1月

【招待講演】

国際学会

- 1) 2014年4月27~30日 2nd International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress” (MIMIC-II) 「Good and Bad Inflammation During Vaccination」 Antalya, Turkey
- 2) 2014年8月25日~26日 2nd International Immunological Memory and Vaccine Forum (IIMVF) 「Innovation and renovation of vaccine adjuvant」 San Diego, USA
- 3) 2014年10月8日~13日 Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. 「Nucleic Acids as “Built-in” or “Inducible” Adjuvant during Vaccination」 Seattle, Washington, USA.
- 4) 2014年10月20日~21日 The 1st

- International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014 「Nucleic acids as ‘built-in’ or ‘inducible’ adjuvant during vaccination」 University of Tokyo
- 5) 2014年10月26-28日 8th Vaccine & ISV Congress “New mechanism of action and potential biomarkers for vaccine adjuvant” Philadelphia, USA
 - 6) 2014年11月6-7日 The 2014 Fall Conference of The Korean Association of Immunologists 「New mechanism of action and potential biomarkers for vaccine adjuvant」 Seoul, Korea
 - 7) 2015年1月28日 NIAID 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID), ARI Panel “Adjuvants” Academia Sinica, Taipei, Taiwan
 - 8) 2015年3月2日 Lecture "Nucleic acids released from cell death, or induced by DNA damage, and their clinical implications" Dept. of Mol. Biol. and Genetics, Life Sciences and Technologies Research Center, Bogazici University, Istanbul, Turkey
 - 9) 2015年3月9日 ABRC Lecture “Innovation and safety of adjuvant research and development” Academia Sinica, Taipei, Taiwan
- 国内学会
- 1) 2014年5月14日 Cutting Edge Seminar Higo Program 「Adjuvant Innovation for influenza and cancer vaccination」 Kumamoto University, Kumamoto
 - 2) 2014年5月16日 BIO tech 2014 特別講演 「ワクチンアジュバントの開発研究の新展開」 東京
 - 3) 2014年6月1日 第40回神戸薬科大学卒業研修講座「ワクチン開発研究の最前線 安全安心なワクチンを目指して」 神戸
 - 4) 2014年7月2日-4日 第41回日本毒性学会学術年会 教育講座 「ワクチンの副作用は予測できるか？安全なアジュバントとバイオマーカー開発の新展開」 神戸
 - 5) 2014年7月11日 京都府立医科大学 大学院 特別講義「ワクチン、アジュバントの基礎と臨床：細胞死とマクロファージの役割」 京都
 - 6) 2014年9月11日-12日 第21回日本免疫毒性学会学術年会 「ワクチンの副作用は予測できるか？安全なアジュバントとバイオマーカー開発の新展開」 徳島文理大学
 - 7) 2014年9月18日 日本生物科学研究所 第二研究会「アジュバント開発研究の最前線“免疫の種差と動物ワクチン”」 東京
 - 8) 2014年9月25-26日 第73回日本癌学会学術総会「次世代アジュバントの開発研究」 パシフィコ横浜
 - 9) 2014年10月16日 JST 研究開発戦略センター(CRDS) 医薬品等 俯瞰ワークショップ「次世代ワクチン<アジュバント>」 東京
 - 10) 2014年10月18日-19日 第46回日本小児感染症学会総会・学術集会「過去の歴史から学ぶこれからのワクチン開発と戦略」 東京
 - 11) 2014年11月10日-12日 第62回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム「次

- 世代のワクチン開発～Next generation vaccine development」 ”New mechanism of action and potential biomarkers for vaccine adjuvant” 横浜
- 12) 2014年12月4日～5日 第12回日本糖鎖科学コンソーシアム (JCGG) シンポジウム「新規アジュバント開発に向けて」東京医科歯科大学
- 13) 2014年12月4日～5日 第27回日本バイオセラピー学会学術集会「がん免疫療法に資する核酸医薬を基盤としたアジュバントの開発」大阪
- 14) 2015年2月3日 琉球医学会特別講演会「アジュバント開発研究の新展開：安全でよく効くワクチンを目指して」琉球大学 那覇
- 15) 2015年3月25日～28日 日本薬学会 第135年会「アジュバント開発研究の最前線：データベースを駆使した安全性、有効性のバイオマーカー」神戸
- immunogenicity of DNA vaccine. 2014 DNA Vaccine Conference. San Diego, California, USA. Jul 21-23, 2014.
- 4) Aoshi T, Nakatsu N, Igarashi Y, Ito J, Kishishita N, Yamada H, Mizuguchi K, Ishii KJ. Adjuvant Database Project: comprehensive transcriptome analysis in animal models. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 5) Coban C, Onishi M, Ozkan M, Ishii KJ. Potential and mechanism of Hemozoin as vaccine adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 6) Hayashi M, Aoshi T, Petrovsky N, Ishii KJ. Advax™, a formulation of delta inulin microparticles, is a non-canonical adjuvant that induces distinct immune response depending on the property of vaccine antigen. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 7) Kobiyama K, Kitahata Y, Ishii KJ. K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonistic ligand works as a potent IFN inducer and CTL adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.
- 8) Kobiyama K, Kitahata Y, Ishii KJ. Antigen free systemic monotherapy by nano-particulate TLR9 agonist induces CTL responses for the

【学会発表】

- 1) Kuroda E, Ishii KJ. Particulate-induced systemic IgE production is mediated by DAMPs released from alveolar macrophages. 22nd International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe. June 2-3, 2014.
- 2) Kobiyama K, Ishii KJ. K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonist targets macrophages and dendritic cells in the draining lymph node to exert its adjuvanticity. 22nd International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe. June 2-3, 2014.
- 3) Kobiyama K, Ishii KJ. Differential roles of antigen presentation and DNA adjuvanticity in

- tumor regression. 第43回 日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 9) 2014年10月18日 石井健他「RNA Polymerase-III は細胞質の RNA:DNA ハイブリッドと細胞内 miRNA 発現を制御する」第87回日本生化学会大会 京都
- 10) Kuroda E, Ozasa K, Kobiyama K, Ishii KJ. Particulate-induced systemic IgE production is mediated by DAMPs released from alveolar macrophages. 第43回 日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 11) Ozkan M, Onishi M, Ishii KJ, Coban C. Investigation of Potential and Mechanism of Hemozoin as Vaccine adjuvant. 第43回 日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.
- 12) Temizoz B, Kuroda E, Kobiyama K, Ishii KJ. Synergistic activity of TLR9- and STING-agonists in innate and adaptive Type-II IFN production. 第43回 日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.

【その他特記事項】

1. 薬事戦略相談 2件 (がん免疫療法9月4日、インフルエンザワクチン2月26日)
2. 特許出願
- 1) 発明人: 石井健・小檜山康司・青枝大貴・武下文彦・粕谷祐司・丹羽貴子・小泉誠
出願人 : 医薬基盤研究所・第一三共株式会社
発明の名称: 免疫賦活活性を有するオリゴヌクレオチド含有複合体及びその用途
出願番号 : PCT/JP2014/074835 (2014年9月19日)

- 2) 発明人: 石井健・黒田悦史・Temizoz Burcu
出願人 : 医薬基盤研究所・大阪大学
発明の名称: 異なる核酸アジュバントの組み合わせによる新規 Th1 誘導性アジュバントおよびその用途
出願番号 : 特願 2014-235934 (2014年11月20日) PCT/JP2015/001564 (2015年3月20日)
- 3) 発明人: 石井健・青枝大貴・小檜山康司
出願人 : 医薬基盤研究所
発明の名称: 免疫賦活活性を有する核酸多糖複合体の抗腫瘍薬としての応用
出願番号 : PCT/JP2014/084772 2014年12月26日
- 4) 発明人: 石井健・青枝大貴・佐藤秀昭
出願人 : 医薬基盤研究所・(株) ジーンデザイン
発明の名称: 非凝集性免疫賦活化オリゴヌクレオチド
出願番号 : 特願 2014-263017
- 5) 発明人: 小泉誠・丹羽貴子・城内直・石井健・小檜山康司
出願人 : 医薬基盤研究所・第一三共株式会社
発明の名称: 免疫賦活活性を有する CpG スペーサーオリゴヌクレオチド含有複合体及びその用途
出願番号 : 特願 2015-157861
- 6) 発明人: 石井健 青枝大貴 Coban, Cevayir, 吉岡芳親
出願人 : 医薬基盤研究所・大阪大学
発明の名称: 脳マラリアの診断及び治療

出願番号 : 特願 2014- 66193 (PCT出願
—2015年3月25日)

3. ガイドライン作成 :

平成26年度は、前年度にWHOが主体となりアジュバント添加ワクチンのガイドラインの発布がなされ、日本でのアジュバントのガイドラインもワクチン開発・審査上必要性が高まっており、このような状況の中で、国際的に適用可能なアジュバント添加ワクチンガイドラインの草案を作成した。このガイドラインを作成することは、海外との連携・競争においても重要な役割を担うことが期待される。

4. アウトリーチ :

- 1) 国際ワクチン学会 (ISV) 理事
- 2) 日本免疫学会サマースクール 2014 オーガナイザー
- 3) 国際ワクチン学会総会、オーガナイザー
- 4) 日本ワクチン学会理事、日本免疫学会評議委員、教育推進委員
- 5) WHO アジュバントガイドラインアドバイザー
- 6) JST・CRDS戦略プロポーザル会議委員

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

アジュバントの有効性及び安全性指標の探索

研究分担者 石井健 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー
研究協力者 青枝大貴 同上 主任研究員

研究要旨

ワクチンによる予防や治療の適応は近年拡大傾向にあり、感染症のみならず、がん、アレルギー、生活習慣病などにおいても積極的なワクチン開発が行われている。近年の自然免疫や樹状細胞の研究によって、ワクチンの作用機序について分子レベルでの理解が進み、アジュバントが誘導する自然免疫反応がワクチンによって誘導される獲得免疫反応の強さや性質を決定する重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。世界的には近年上市されたワクチンには MF59 や MPL などのアジュバントが添加されており、今後もさらに多様なアジュバントが臨床使用されるワクチンに添加されていくことが予想されているが、一方でアジュバント添加ワクチンによる副作用（副反応）に対する懸念も存在している。アジュバントの種類や作用機序は多岐にわたり、未だにこのような多様なアジュバント群の有効性や安全性を評価する指標は明らかではない。安全性と有効性を兼ね備えた次世代型ワクチンの開発研究には、様々なアジュバントおよびアジュバント候補物質に対する生物反応を総合的に評価・研究することが必須であると考えられる。本研究ではラット、マウスに認可済みから開発中の代表的なアジュバントを投与し、各臓器における生物反応を遺伝子発現の変化を指標に網羅的に解析することで、アジュバントの安全性および有効性を評価可能なデータベースを構築することを目的とする。

A. 研究目的

アジュバントの安全性および有効性評価の基礎データの収集を目的として、アジュバント投与後の末梢血中の各血液細胞数および主

要な臓器における mRNA 発現データをマウスおよびラットを用いて網羅的に取得・収集しデータベースを構築する。構築されたデータベースを用いたアジュバントの評価法についても検討する。

B. 研究方法

高品質のデータベースを構築するために、一連の実験手技の標準化を行い、ラットおよびマウスに対して約 20 種類のアジュバントを皮内、腹腔内、筋肉に投与する。ラットでは肝臓、脾臓、肺、脾臓、腎臓、筋肉を、マウスでは肝臓、脾臓、肺、脾臓、腎臓、筋肉、リンパ節を回収し、マイクロアレイチップを用いてアジュバント投与後の各臓器における遺伝子発現変化を網羅的に解析する。各群はマウスおよびラットともに 3~4 匹の動物を使用する。

マウスへの投与・採材はすべて医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクトで行い、ラットへの投与と採材は外部委託した。マウス、ラットともに採材臓器からの RNA 抽出、マイクロアレイデータの取得は医薬基盤研究所トキシコゲノミクスプロジェクトと共同して行った。遺伝子発現データの解析は、医薬基盤研究所のアジュバント開発プロジェクト、トキシコゲノミクスプロジェクト、バイオインフォマティクスプロジェクト、大阪大学免疫学フロンティア研究センターのシステム免疫学と共同して行った。

(倫理面への配慮)

ヒト末梢血細胞は医薬基盤研究所の倫理審査委員会で承認を受けた。また実験動物は、医薬基盤研究所および国立感染症研究所動物実験委員会規定に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。

C. 研究結果

1) マウスでは Advax, Alum, bCD, D35, Endocine, FCA, K3, K3-SPG を含む 29 種類のアジュバントについて腹腔内、皮下、筋肉内投与後の各臓器(肺、肝臓、脾臓、腎臓、筋肉、リンパ節)を 6 時間および 24 時間後に n=3 で回収し、6 時間後のサンプルを中心に約 400 サンプルの mRNA GeneChip 解析を完了した。

2) ラットでも同様に Addavax, Alum, bCD, D35, DMXAA, FCA, FK565, ISA51VG, K3, MALP2s, MPLA, Poly I:C, R848, sHZ を含む 20 種類のアジュバントについて筋肉内および腹腔内投与後の各臓器(肺、肝臓、脾臓、腎臓、筋肉)を n=4 で回収し、Alum と FCA について約 400 サンプルの mRNA GeneChip 解析を完了した。その他の 18 種類のアジュバントについては、サンプル取得が完了しており、現在 mRNA GeneChip 解析(約 600 サンプル)が進行中である。

3) 脂溶性薬剤の溶解性を高める目的で添加剤として使用されていた β シクロデキストリン(bCD)にワクチンアジュバント作用があることを見出した。その作用機序は不明であったが、一連の研究および現時点でのアジュバント投与後マウスのデータベース(図 1)を用いて、bCD 投与後の各臓器 mRNA 発現解析結果を検討したところ、bCD の作用機序として高濃度の bCD を局所的に作用させた際に見られる DAMPs、特に DNA が bCD のアジュバント効果に重要であることを見出し論文発表した(Onishi et al. J Immunol. 2015)。

4) 上記と同様に作用機序不明の 2 種類のアジュバントについても、アジュバント投与後のマウスのアジュバントデータベースを用い

て解析した。1 種類のアジュバントはその化学構造や物理的性質からそのアジュバント作用には DAMPs の寄与が推測されていたが、データベースの解析では PAMPs 様の作用が主であることが強く示唆された。このデータベース解析の結果を確認するマウス実験を進めており、これまでの結果からはデータベース解析から導かれた仮説をサポートする実験データが得られた。

5) 同様にもう 1 種類のアジュバントについては、物理化学的性質からは PAMPs 様の作用機序が予想されたが、データベース解析では DAMPs 様作用が主であることが示唆され、このアジュバントについても、現在実際にマウスでの詳細な実験を行って、検証を進めているところである。これらの結果は、現在作成中のデータベースが新規アジュバントの作用機序解明に有用であることを具体的に示す事例になると考えている。

6) 品質の高いデータベース構築のためのサンプル取得には、他臓器のコンタミネーションに細心の注意をはらう必要があることが再度認識された。特に脾臓では脾臓組織のコンタミネーション、リンパ節では脂肪組織のコンタミネーションが比較的多く認められる傾向が判明し、実体顕微鏡下で複数人による取得されたサンプルのクリーニング作業を行ったが、ある一定の頻度で生じるマイクロコンタミネーションを完全に除去することは不能であることが判明した。そこで、取得した遺伝子発現データから公共データベースに登録された脂肪組織や脾臓組織のデータを用いて詳細な解析を行い、バイオインフォマティク

的な手法を開発し、実用的なレベルでこれらの異組織マイクロコンタミネーションを取り除くことが可能になった(図 2)。これらのコンタミネーションをバイオインフォマティクスのクリーニングすることでより精度や感度の高い遺伝子チップ解析が可能となった。

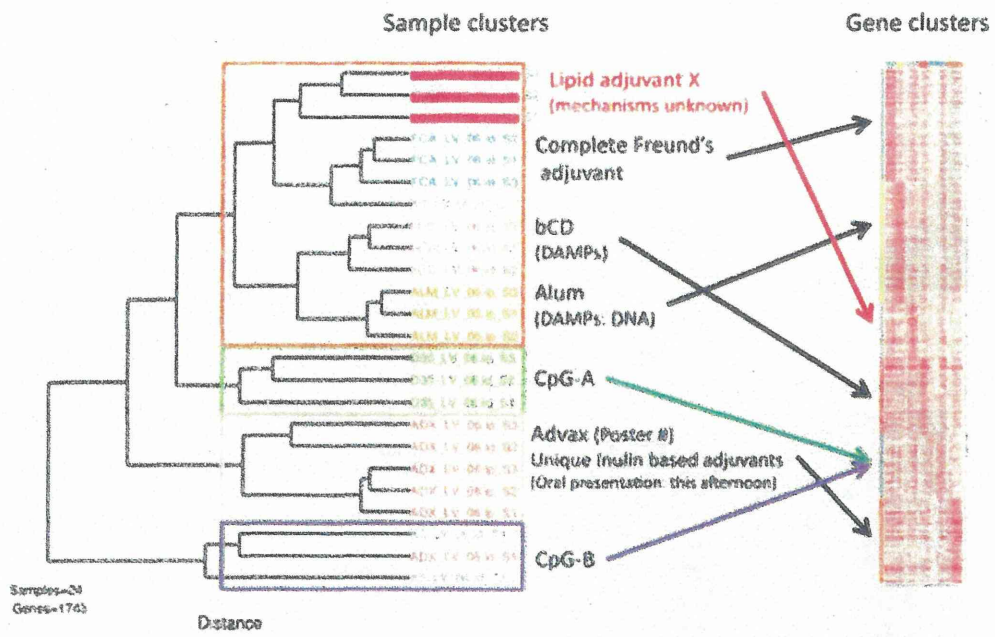


図1. 各種アジュバント投与後の遺伝子変化のクラスター解析。

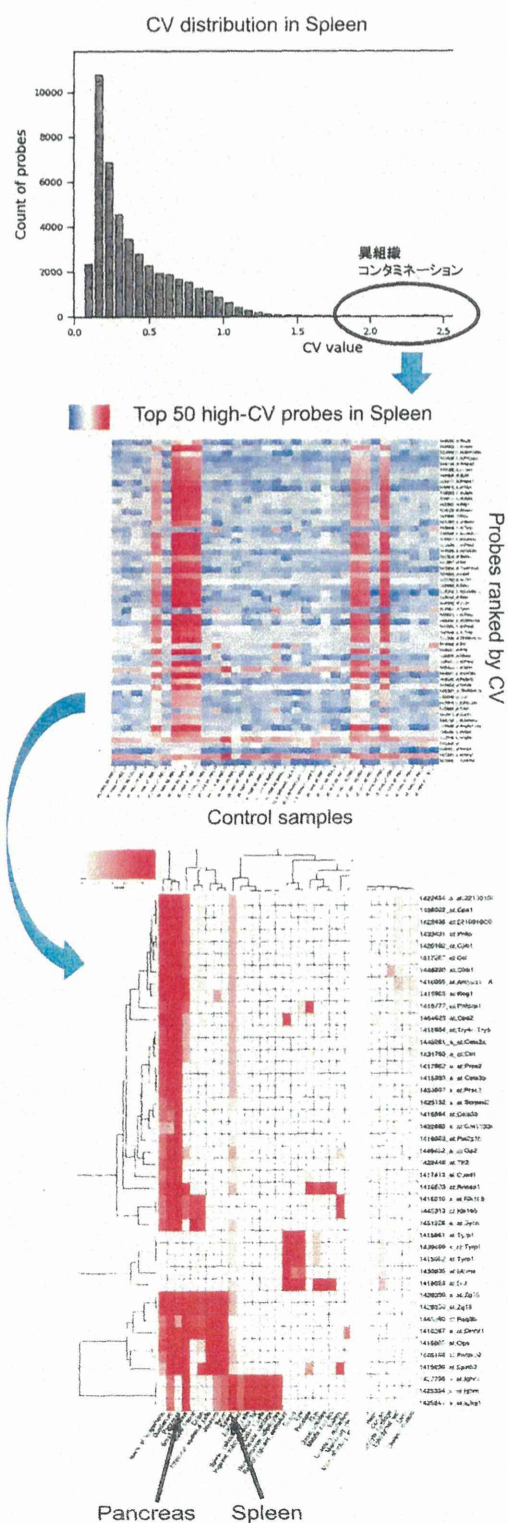


図2. マイクロコンタミネーションの情報工学によるフィルタリングと由来組織の同定。

D. 考察

これまでに得られたデータから、本研究で構築を進めているアジュバント投与後のラット及びマウスから臓器を回収し、その遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析する方法によって、アジュバントの安全性および有効性評価に活用できる指標を見出すことは十分可能であると推測された。今後はアジュバントの用量を変えてマウスに投与した後の網羅的な解析の可能性についても検討し、さらに TG-gate のデータを活用した安全性評価法の開発を進めたいと考えている。

E. 結論

今後のワクチン開発におけるアジュバントの役割は非常に大きく、アジュバントの安全性及び有効性を科学的に評価するためには、アジュバント投与によって生じる生体反応を細胞および遺伝子レベルで解析したデータからなるデータベース構築が必須である。本研究では、ラット、マウスを用いてアジュバント投与後の遺伝子発現変化を遺伝子アレイによって網羅的に解析してデータベース構築を進めていく。目標としてあげた 20 アジュバントのデータ取得を既に完了しており、アジュバントデータベースを利用することで、論文発表した bCD の作用機序解明に加え、さらに 2 種類の新規アジュバントについてもその作用機序の解析を進めているが、データベース解析から示唆される作用機序は実際の実験によってもサポートされており、本データベースの有効性と有用性を示唆すると考えている。今後は TG-Gate に蓄積さ

れた薬剤の毒性評価との橋渡しによってアジュバントの有効性や作用機序のみならず、アジュバントの臨床応用に極めて重要な安全性を適正に評価出来る高品質のデータベース構築を進めたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

17) 別紙参照

2. 学会発表

13) 別紙参照

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

別紙参照

2. 実用新案登録

別紙参照

3. その他

10. 別紙参照

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書（平成 26 年度）

アジュバントの有効性と安全性の理論基盤構築

医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト

研究代表者 プロジェクトリーダー 石井健

研究協力者 大阪大学免疫学フロンティア研究センター ワクチン学研究室 黒田悦史

研究要旨：我々は新規アジュバント候補物質として 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP-b-CD)を見いだした。そのアジュバント活性のメカニズム解析を行い、HP-b-CD がダメージ関連分子パターン (DAMPs) として投与局所から宿主の DNA を遊離すること、さらに遊離した DNA がアジュバント活性に重要であることを認めた。さらに、既存のアラムアジュバントや HP-b-CD とは異なる特性を有する新規核酸アジュバントとして、CpG と cyclic GMP-AMP (cGAMP)の2種類の核酸由来分子のコンビネーションが有効であることを認めた。この2種類のアジュバントのコンビネーションにより、それぞれを単独で用いるよりも強力に Th1 アジュバント活性が誘導されることを見出し、特にガン免疫のアジュバントとしての可能性を認めた。

A. 研究目的

現在日本において臨床の場で使用されているアジュバントは主にアルミニウム塩(アラム)である。アラムアジュバントは副作用が少ない安全なアジュバントとして長年臨床の場で用いられているが、アジュバント効果に関する分子メカニズムは不明な点が多く残されている。さらに、アラムアジュバントのみでは様々な限界も報告されているため、アラムアジュバントに代わる安全かつ有効な次世代アジュバントの開発が急務であると考えられる。本研究では安全性と有効性を兼ね備えた新規アジュバントの探索およびその機能解析を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1) HP-b-CD のアジュバント活性のメカニズム解析

1-1 HP-b-CD 投与による遺伝子発現変化についての解析

C57BL/6 マウスに 30% HP-b-CD を皮内投与した。6 時間後に所属リンパ節を回収し、GeneChip array により遺伝子発現の変化を解析した。

1-2 HP-b-CD 投与によるダメージ関連分子パターン (DAMPs) についての解析

C57BL/6 マウスに HP-b-CD を皮下に 200 μ l 投与した。投与後 3、6、24 時間後に投与部位に 200 μ l の PBS を注射し、PBS を回収した。PBS 中の宿主由来 DNA を Qubit にて測定した。

1-3 アジュバント活性に対する DNase 投与の影響についての解析

野生型 C57BL/6 (n=4~5) に卵白アルブミン