

(OVA) を抗原に、30% HP-b-CD をアジュバントとして皮下に投与した。免疫時に同時に 2 mg の DNase も投与した。10 日後に再度同様の手法で免疫し、さらに 7 日後に採血を行い、OVA 特異的な IgG 抗体の量を ELISA 法にて解析した。

1-4 遺伝子欠損マウスを用いた HP-b-CD の作用機序の解析

野生型 C57BL/6 および種々の遺伝子欠損マウス (n=4~5) に卵白アルブミン (OVA) を抗原に、30% HP-b-CD をアジュバントとして皮下に投与した。10 日後に再度同様の手法で免疫し、さらに 7 日後に採血を行い、OVA 特異的な IgG 抗体の量を ELISA 法にて解析した。

2) サルを用いた HP-b-CD のアジュバント活性の実証研究

カニクイザルを 3 頭ずつ 4 群にわけ、麻酔下にて生理食塩水のみ、H1N1 スプリットワクチン単独、H1N1 スプリットワクチンに 3% または 30% HP-b-CD をアジュバントとして加えたものを 1 日目および 14 日目の 2 回皮下注射にて免疫した。血清中のインフルエンザ抗体価は ELISA 法にて評価した。動物実験は霊長類医科学研究センター共同利用施設にて行った。

3) CpG と cyclic GMP-AMP (cGAMP) のコンビネーションによるアジュバント活性の解析

C57BL/6 マウス (n=4) に OVA 10 μ g を抗原に、K3 CpG (10 μ g)、cGAMP (1 μ g) (インビトロジェンより購入) または K3 CpG + cGAMP をアジュバントとしてマウスの大腿四頭筋に筋肉内注射 (i.m.) にて day 0 および day 10 に投与した。投与する CpG と cGAMP の量に関して検討を行ったところ、

K3 CpG を 10 μ g、cGAMP を 1 μ g 投与することで、十分な免疫反応が認められたため (データ示さず)、すべての実験は K3 CpG を 10 μ g、cGAMP を 1 μ g で行った。また、マウス (n=2) に OVA 10 μ g と生理食塩水を投与したものをコントロール群 (アジュバント非投与群) として用いた。Day 17 に血清を回収し、血清中の抗体価を測定した。また脾細胞を回収し、抗原特異的なサイトカイン産生 (IFN- γ /IL-13) についても評価した。

4) CpG と cyclic GMP-AMP (cGAMP) のコンビネーションアジュバントのガン治療への応用

ガン細胞としてとして、C57BL/6 マウス由来の胸腺種である EG.7 および黒色腫 (メラノーマ) である B16F10 を用いた。これらのガン細胞 1x10⁶ をマウス (n=5) の背中に皮下接種した。一週間後に腫瘍が同程度定着したのを確認したのちに K3 CpG (10 μ g)、cGAMP (1 μ g)、または K3 CpG + cGAMP を腫瘍に直接投与した。腫瘍のサイズを経時的に測定することで、各アジュバントの抗腫瘍効果を検討した。腫瘍サイズ V (cm³) は

$$V (\text{cm}^3) = \text{ガン細胞長径 (cm)} \times \text{ガン細胞短径 (cm)} \times \text{ガン細胞短径 (cm)} \times 0.5$$

にて算出した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は医薬基盤研究所の動物実験ガイドラインに基づいて行った。

C. 研究結果

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

表1にGeneChip arrayの結果を示す。(A)は急性期反応遺伝子群、(B)は自然免疫関連遺伝子群、(C)はインターロイキンおよびケモカイン遺伝子群、(D)はインターフェロン関連遺伝子群を示す。これらの結果より、HP-b-CD投与により多くの免疫関連遺伝子が誘導されていることがわかる。特に興味深いのはインターフェロン関連遺伝子群であり、I型インターフェロン関連遺伝子はアラムアジュバントでも誘導されることが報告されている。最近、種々の報告により、アジュバントによってダメージを受けた宿主細胞から遊離する様々な免疫刺激因子、いわゆるダメージ関連分子パターン(DAMPs)がアジュバントの作用機序として重要であることが示されている。また我々の以前の研究成果により、アラムアジュバントが宿主細胞からDNAを遊離させ、そのDNAがDAMPsとして免疫担当細胞を活性化すること、さらにI型インターフェロン関連分子は遊離したDNAによって誘導されることを認めている。以上の結果より、HP-b-CDによるアジュバント活性にI型インターフェロンや宿主DNAをはじめとするDAMPsが関与している可能性が示唆された。

HP-b-CDのアジュバント活性にDAMPsが関与するか否かを明らかにする目的で、HP-b-CDを皮下投与した際の投与局所における宿主由来DNAの遊離について評価した。図1に示すようにHP-b-CD投与によって6時間後をピークに皮下に宿主由来のDNAが遊離されることが明らかになった。アラムアジュバントに関しても宿主由来DNAがそのアジュバント活性に重要な因子の一つであることが明らかにされており、HP-b-CDのアジュバント活性にも宿主由来のDNAが関与している可能性が高いと考えられた。

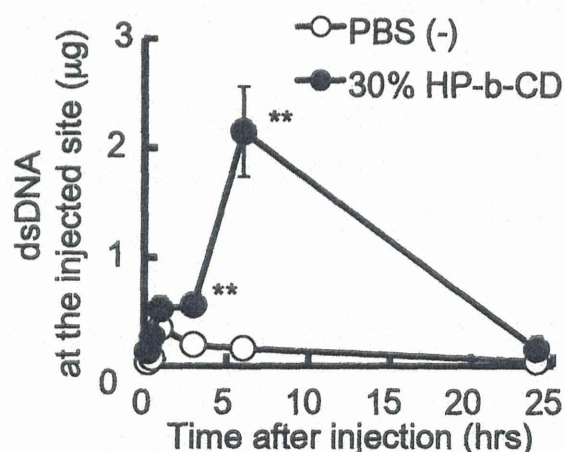


図1 b-CD投与後の投与部位の宿主由来DNAの遊離

(A)	(B)	(C)	(D)
Saa3 5.121	Clec4d 4.848	Ccl12 5.743	Ifi204 3.079
Socs3 5.793	Clec4e 4.280	Ccr1 4.675	Ifi1 2.713
Ptgs2 4.989	Adnp2 2.947	Cxcl3 4.391	Ifi3 2.696
Ptscr1 3.637	Bcl3 2.591	Ccl7 4.116	Oas2 2.589
Lbp 2.721	Rsad2 2.532	Il1b 3.767	Ifitm6 2.474
Selp 2.697	Cfd 2.469	Il1f9 3.273	Ifi44 2.056
Cd14 2.430	Fosl2 2.356	Ccl9 3.190	Igip1 1.877
Cebpb 2.260	Vnn1 2.298	Ccr1 3.151	Ifi205 1.827
Ednrb 2.165	Nfil3 2.167	Ccl2 2.327	Star 1.791
Serpina3 2.043	Cebpd 2.155	Cxcl2 2.311	Isg15 1.788
Saa1 1.984	Pim1 2.105	Ccl6 2.250	Oas12 1.639
Il1rn 1.920	Nfatc1 2.085	Il33 2.152	Ifi2 1.618
Fcgr4 1.919	Glis3 2.025	Il10 2.049	Ifitm2 1.511
Orm1 1.787	Zbp1 1.843	Ccr5 1.881	Oas1a 1.495
Nos3 1.758	Myd88 1.833	Il6 1.823	Igtp 1.424
Stat3 1.751	Spic 1.808	Cxcl10 1.821	Ifih1 1.412
Ednra 1.721	Fgr 1.750	Il1r2 1.718	Tlr2 1.408
Arg2 1.703	Hoxd8 1.728	Cxcr7 1.630	Isg20 1.408
Tirap 1.610	Jun 1.723	Il1rap 1.568	Tgip1 1.396
Cd163 1.598	Runx2 1.722	Cxcl1 1.420	Ddx58 1.369

表1 HP-b-CD投与により所属リンパ節で誘導される遺伝子群のマイクロアレイ解析

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

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

我々は、HP-b-CDのアジュバント活性には投与局所における宿主のDNA遊離が重要であることを認めている。実際にDNAそのものがアジュバント活性に関するか否かをDNaseの投与実験にて確認した。図2に示すように、HP-b-CDと抗原(OVA)の投与時にDNaseを投与することによって、抗原特異的なIgGの産生が有意に低下した(p<0.05)。この結果は宿主のDNAそのものがアジュバント活性に関与していることを示す直接的なデータであ

ると言える。

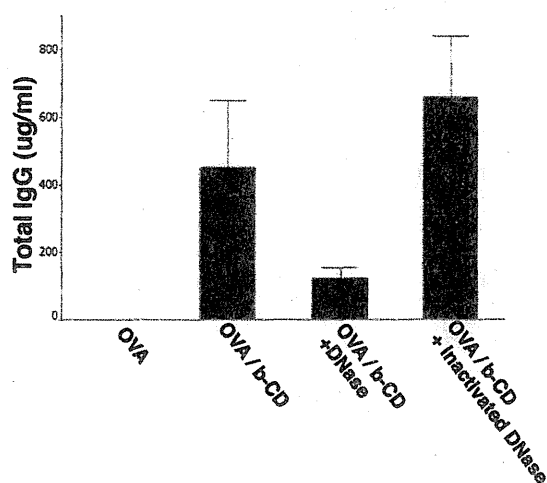


図2 DNase投与によりHP-b-CDのアジュバント効果が低下する

1-4 遺伝子欠損マウスを用いた HP-b-CD の作用機序の解析

これまでの結果より、HP-b-CD の作用機序として、①I 型インターフェロン関連分子の関与 (表1より)、②宿主由来の DNA の関与 (図1、2より) の2つの要因が考えられた。そこでまず、I 型インターフェロンの関与について解析を行った。I 型インターフェロン受容体欠損マウス、およびI型インターフェロン誘導に必須とされている IRF3 および IRF7 の二重欠損マウスを用い、HP-b-CD のアジュバント活性の評価を行った。どちらの遺伝子欠損マウスにおいても野生型マウスと同等の抗原特異的な IgG 抗体産生が認められたことから (データ示さず)、I 型インターフェロンはアジュバント活性には関与しないことが明らかとなった。

宿主由来の DNA の認識機構は不明な点が多く残されているが、細胞内 DNA センサーの関連分子の

一つである TBK1 が重要な役割を演じていることが報告されている。そこで、TBK1 欠損マウスを用いて HP-b-CD によるアジュバント活性の評価を行ったところ、抗原特異的な IgG 抗体の産生が約 100 倍低下した (図3)。

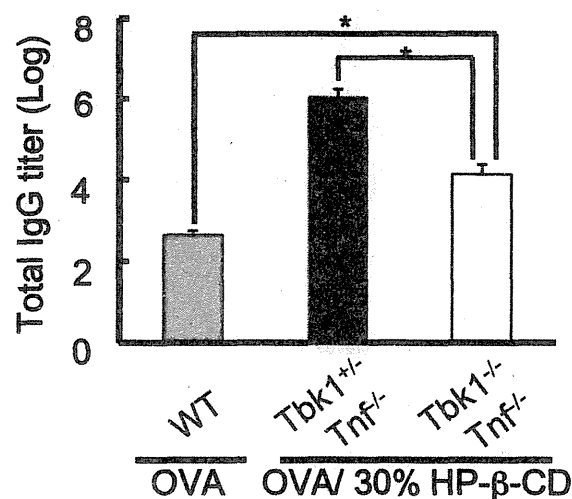


図3 TBK1 欠損マウスではb-CDのアジュバント活性が低下する。

最近、DNA センサー分子群が続々と明らかにされており、そのなかでも STING が TBK1 の上流に位置する重要な細胞内 DNA センサー分子であることが報告された。そこで、STING 欠損マウスを用いて HP-b-CD によるアジュバント活性の評価を行ったところ、抗原特異的な IgG の産生は野生型マウスとほぼ同等であった (図4)。

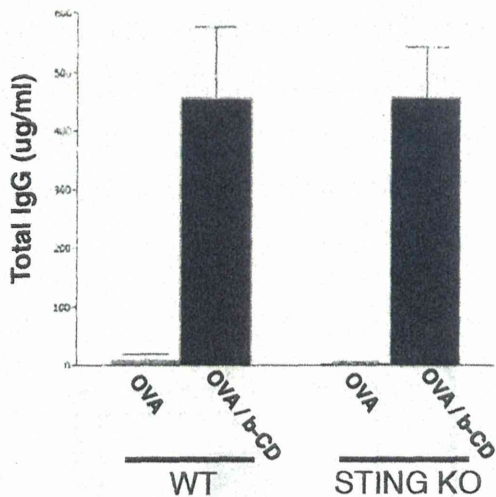


図4 STING は HP-b-CD のアジュバント効果に関与しない

2) サルを用いた HP-b-CD のアジュバント活性の実証研究

本実験では 3%と 30%の HP-b-CD をアジュバントとし H1N1 スプリットワクチンにて免疫した。図 5 に抗体価の結果を示す。実験結果にバラツキが生じたため、結果は幾何平均抗体価 (geometric mean titer: GMT) にて示した。30% HP-b-CD をアジュバントとして用いることによりインフルエンザに対する抗体価の有意な上昇が認められた ($p>0.05$)。

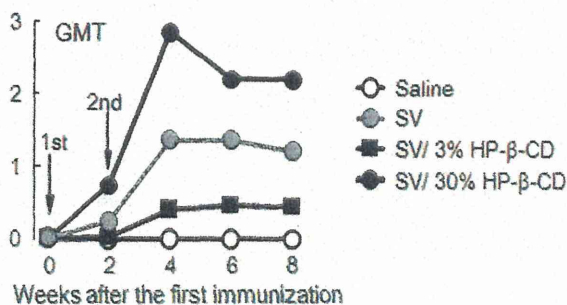


図5 HP-b-CD はカニクイザルの抗インフルエンザ抗体価を増強する

3) CpG と cyclic GMP-AMP (cGAMP) のコンビネーションによるアジュバント活性の解析

抗体価の結果を図 6 に、脾細胞からのサイトカイン産生の結果を図 7 に示す。CpG での免疫では抗原特異的な抗体価も脾細胞からのサイトカイン産生も低かった。一方、cGAMP での免疫では主に Th2 型の免疫反応が活性化され、抗原特異的な IgG1 および IgE の誘導が認められ、脾細胞からは主に Th2 サイトカインである IL-13 が誘導された。この結果は、cGAMP 単独投与ではアレルギー性炎症を引き起こす可能性があることを示している。しかしながら興味深いことに cGAMP と CpG を組み合わせることで、CpG 単独では低かった Th1 型免疫反応が強力に誘導され、高い IFN- γ 産生誘導と Th1 型抗体である IgG2c の増強が認められた。一方、cGAMP 単独投与で認められた Th2 型免疫反応、すなわち IgE の誘導と IL-13 産生に関しては、cGAMP と CpG の組み合わせにより全て有意に低下した。これらの結果から、cGAMP と CpG を組み合わせることにより、アジュバント活性の長所である Th1 誘導活性が強力に引き起こされるとともに、副反応の可能性のある Th2 活性が抑制されることが明らかになった。

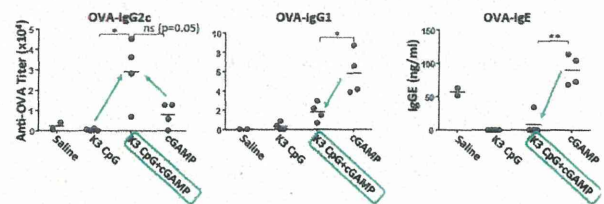


図6 K3 CpG、cGAMP または K3 CpG + cGAMP による抗原特異的な抗体価の変化

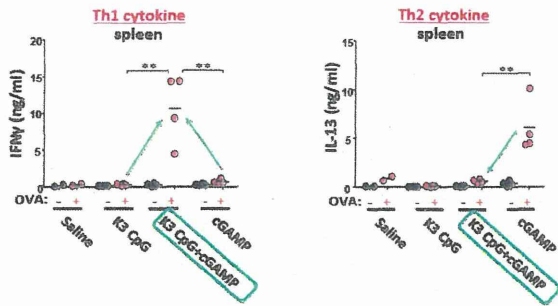


図7 K3 CpG、cGAMPまたはK3 CpG+cGAMPによる脾細胞からの抗原特異的サイトカイン産生の変化

4) CpGとcyclic GMP-AMP (cGAMP)のコンビネーションアジュバントのガン治療への応用

K3 CpG または cGAMP の単独投与は B16F10 に対しては部分的に効果的であったが、EG.7 に対してはほとんど効果が認められなかった。興味深いことに、両腫瘍細胞に対して K3 CpG + cGAMP の投与は非常に効果的であり、単独投与に比して強力に腫瘍細胞の増殖を抑制した。(図8)

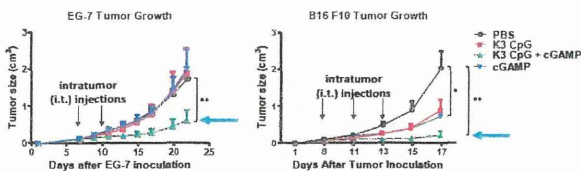


図8 K3 CpG + cGAMP の組み合わせは腫瘍細胞の増殖を抑制する

D. 考察

1) 新規アジュバント、HP-b-CD についての考察

今回の結果から、HP-b-CD が投与局所において宿主の DNA を遊離させること、さらに DNase 処理で局所に遊離された DNA を分解することによりアジュバント活性が低下することは明らかとなったが、DNA センサータンパク質として中心的な役割を演じているとされる STING 欠損マウスではアジュバント活性の低下は認められなかった。これらの結果は HP-b-CD によって遊離された宿主の DNA には

未知なる DNA 認識機構が働き、アジュバント活性を誘導している可能性を示唆している。

また、サルを用いた実証研究において、HP-b-CD が霊長類において効果的なアジュバントとして働くことを証明できた。

2) CpGとcyclic GMP-AMP (cGAMP)のコンビネーションアジュバントについて

本試験では、cGAMP と CpG を組み合わせが、非常に強力な Th1 型のアジュバント活性を有することが明らかになった。この特性を利用することで Th1 型免疫反応が必要とされる種々の疾患に対するアジュバント療法への応用が期待できると考えられた。K3 CpG は、現在臨床試験が進められている CpG であるが、インターフェロン誘導能が低く、Th1 活性化能もそれほど高くない。一方、cGAMP は典型的な Th2 型アジュバントでありアレルギー性炎症誘導の可能性が示唆されている。この両者を組み合わせる意義は、長所である Th1 アジュバント活性をさらに強く引き出し、短所であった Th2 アジュバント活性を抑える点であると言える。

また我々は、CpG+cGAMP の投与により抗腫瘍免疫が効果的に誘導されることを認めた。CpG + cGAMP の投与が NK 細胞の活性化や CTL の誘導を促進することも認めており(データ示さず)、これらの細胞の活性化により抗腫瘍効果が発揮されたと考えられる。より効果的な抗腫瘍効果を誘導するためにも作用機序の解明が重要であると考えられる。

E. 結論

HP-b-CD に関しては HP-b-CD が霊長類において効果的なアジュバントとして働くことを証明できた。さらに、実用化に向け、PMDA の薬事戦略相談を行った。本プロジェクトは第一三共株式会社と提携し、

今後は毒性評価および前臨床試験に関しては第一三共株式会社と共に進める。

CpG + cGAMP のコンビネーションアジュバントに関しては、その強力な Th1 アジュバント活性をがん治療や感染症ワクチンのアジュバントへとつなげる予定であり、その前段階として Th1 型免疫応答の誘導メカニズムの解明や、サルを用いた全臨床試験を進めていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

18) 別紙参照

2. 学会発表

14) 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

別紙参照

アジュバントの有効性及び安全性評価に資するマイクロRNAバイオマーカーの探索研究

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 プロジェクト研究員 岸下奈津子

研究要旨：近年様々な種類のワクチンが開発されているが有効性及び安全性の高いワクチンの実現には評価法の確立が不可欠である。今日TLRリガンドに代表される様々な自然免疫系のリガンド分子等が免疫賦活作用を示しアジュバントとして作用する事が報告されている。それらのアジュバントを実際にワクチンに利用するにはアジュバント単体の評価が重要である。近年発見されたマイクロRNAは免疫系を含む幅広い生体システムの遺伝子発現制御に重要な役割を果たしている。更に、血中のマイクロRNAは癌診断や組織障害のバイオマーカーとして活用できる可能性が示唆されている。そこで本研究ではアジュバント作用（有効性及び安全性）の評価における、血中のマイクロRNAのバイオマーカーとしての有用性を検討する。

A. 研究目的

マイクロアレイ法により網羅的に解析した血中のマイクロRNAプロファイル、同個体から採取した血液学的検査結果や主要臓器の網羅的遺伝子発現解析データ等と併せてバイオインフォマティクス的手法により解析することで、アジュバントの安全性及び有効性の指標となるようなマイクロRNAバイオマーカーを探索する。

B. 研究方法

上市済みや開発中の約 20 種類のアジュバントをマウス及びラットに単回投与し、6 時間後及び 24 時間後に血中マイクロRNAプロファイルと血液学的検査、及び主要臓器の遺伝子発現プロファイルの網羅的解析を行った。前年度までにここまで終了している。ラットは比較的多量のアジュバントを腹腔内投与することで安全性評価を目

的とする。一方、マウスは中程度と思われる量のアジュバントを皮下投与することで作用機序の解析を目指す。

平成 26 年度は主にラットの血中マイクロRNAプロファイルデータを解析した。まず、ラットの血中マイクロRNAプロファイルの網羅的解析データの正規化法を検討した。マイクロRNAの網羅的解析は比較的新しい実験手法であり、その正規化法が定まっていない為検討が必要であった。更に正規化後のデータを解析し有意に変化しているマイクロRNAを抽出して定量PCR（qPCR）法により検証を行った。更に血液学的検査結果や主要臓器の遺伝子発現プロファイルデータとの比較解析を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は医薬基盤・健康・栄養研究所の動物実験規定に基づき実施された。動物の苦痛の軽減、

安楽死等に配慮した。

C. 研究結果

血中マイクロRNAプロファイルの網羅的解析データの正規化法を二種類比較検討した結果、図1のような結果が得られた。二つの正規化法それぞれで統計解析を行うと異なるマイクロRNAリストが得られた為、正規化法の検討は重要であると示唆された。図1左のデータでは2個と14個のマイクロRNAがそれぞれ有意に増加または減少していた。図1右のデータでは8個と16個のマイクロRNAがそれぞれ有意に増加または減少していた。

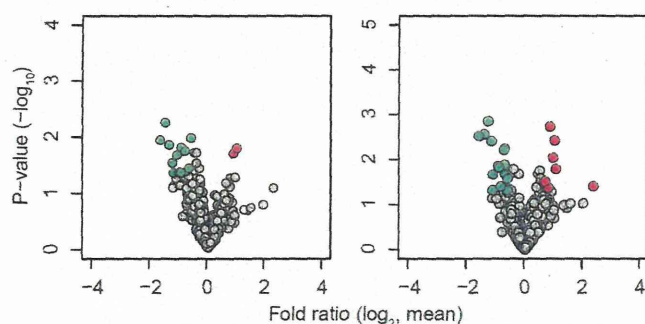


図1 マイクロRNA網羅的解析データの正規化法比較。

アジュバントY投与6時間後のラットの血清中のマイクロRNAを測定し、二種類の正規化法を試してボルケーノ図を作成した。○は個々のマイクロRNAのデータを示し、赤色と緑色はそれぞれ、Salineコントロール群に対する比が1.5倍以上或は1.5分の1以下、且つp-value (T検定)が0.05未満を基準にした時、有意に発現量が高い、低いことを示す。

図1右のデータにおいて有意に上昇していたマイクロRNAに関してqPCR法により検証をおこなったところ、マイクロRNA-Xに関してマイクロアレイ法と同様な結果が得られた(図2)。

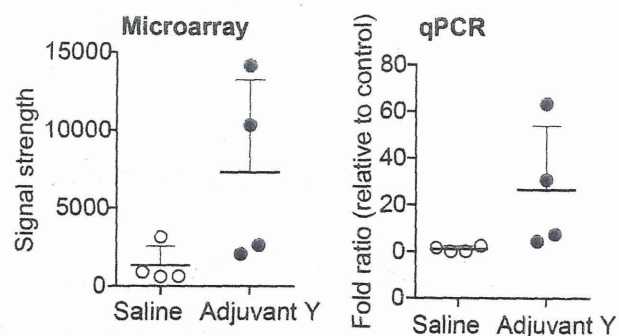


図2 マイクロアレイ法とqPCR法の比較。アジュバントY投与6時間後のラットの血清中のマイクロRNA-Xを二種類の手法で測定した。

更に血中マイクロRNAプロファイルの網羅的解析データと血液学的検査結果や主要臓器の遺伝子発現プロファイルデータとの比較解析を行った。その結果、アジュバントY投与後に血中の白血球数が大きく変動していて、主要臓器の発現変化も比較的大きかった。今後はこれらのデータとマイクロRNAプロファイルとの比較解析を詳細に行いたい。更に、マウス及びラットの解析結果を併せて検討し、有効性及び安全性のマイクロRNAバイオマーカーを探索する。

D. 考察

ラットで取得したマイクロRNA解析データは正規化法の検討が重要であることが分かった。更にマイクロアレイ法による解析結果は、qPCR法でも同様な結果が得られたことから有用であると示唆された。更に、マイクロRNAプロファイルにおける変化のみならず血中の細胞数や遺伝子発現プロファイルが大きく変動していたことから、これらのデータセット間での比較解析が重要であると示唆された。

E. 結論

種々のアジュバント投与後にマイクロRNA

プロファイルの変化が検出され、その変化はqPCR法で確認できた。一方血液学的検査結果や主要臓器の遺伝子発現プロファイルでも、概して強い免疫賦活作用を示すアジュバントで大きな反応が見られていた。従って、マイクロRNA解析データとの比較解析は有用であると予想され、マイクロRNA解析データはアジュバントデータベースにおいて重要なデータになり得ると示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
19) 別紙参照
2. 学会発表
15) 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
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（別紙）

業績まとめ

F. 研究発表

論文発表

1. Shen YJ, Le Bert N, Chitre AA, Koo CX, Nga XHL, Ho SW, Khatoor 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, Vandenberg 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, Khatoor 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, Karuppuchamy 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)

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 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 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. 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.
 10. 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.
 11. Temizoz B, Kuroda E, Kobiyama K, Ishii KJ. Synergic activity of TLR9- and STING-agonists in innate and adaptive Type-II IFN induction. 日本免疫学会総会・学術集会、京都、12/10-12, 2014
 12. 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、2014年10月18日
- 日本語総説
11. 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
 12. 鉄谷耕平 石井健 産業と行政 アジユバントの研究開発 バイオサイエンスとインダストリー 72(1), 53-59, 2014
 13. 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
 14. 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)
 15. 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

書籍

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

- 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)

- 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)

- 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

- 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

- 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

- 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 (P C

T出願—2015年3月25日

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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

トキシコゲノミクスによる毒性バイオマーカーの開発

(独)医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト

研究分担者	山田 弘	プロジェクトリーダー
研究協力者	中津 則之	プロジェクト研究員
研究協力者	五十嵐芳暢	プロジェクト研究員

研究要旨

医薬品開発の一環として次世代アジュバントの開発が精力的に行われている中、その安全性を評価するための新たな手法の構築に係る課題の克服が必要となっている。

本分担研究では、平成 23 年度までに構築したトキシコゲノミクスデータベースと本研究事業で構築されるアジュバントデータベースの情報を融合させ、インフォマティクス手法を用いて解析することにより、アジュバントの安全性評価に用いるバイオマーカー、加えて有効性の評価に用いるバイオマーカーの特定を目指している。

本年度は、(1) 本年度取得したデータを含めたラットの遺伝子発現データの解析、(2) 本年度取得したデータを含めたマウスの遺伝子発現データの解析、(3) マウスにおける遺伝子発現値と血液学的検査値の相関解析、(4) アジュバントデータベースのメタデータの整備を行った。

その結果、年度で計画した動物実験は全て完了した。ラットでは 14 種のアジュバント、マウスでは 23 種のアジュバント投与による遺伝子発現データを比較解析したところ、幾つかのアジュバントで共通して発現変動する遺伝子群、特定のアジュバントで特異的に発現変動する遺伝子群など、様々な形でアジュバントを特徴付ける遺伝子群が抽出された。加えて、血液学的検査値の変動と相関して動く遺伝子群の存在が確認できた。計画したアジュバントデータベースのメタデータの整備作業を完了した。

今後、アジュバントデータベースの情報量を充実させることにより、単に予想性だけではなくロバストネスが保証された安全性及び有効性に係るバイオマーカーの抽出、ラットとマウスにおける反応性の種差の検討などが可能になると考えられる。

A. 研究の目的

現在、パンデミックワクチンをはじめとする様々なワクチンの開発が世界中で進められているが、関連して次世代アジュバントの開発も精力的に行われている。アジュバントは、ワクチンの効力を増強させるための有効なツールとなりうるが、その安全性を評価するための新たな手法の構築が課題となっている。本研究事業は、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しているが、その中で本分担研究は、トキシコゲノミクス手法を用いてアジュバントの安全性評価に資する新規バイオマーカーの開発を第一目標としている。

バイオマーカー探索研究には、2種のデータベースを活用する。1つは、平成23年度までに構築したトキシコゲノミクスデータベースである。当データベースには、医薬品を中心とした約180化合物に係る毒性情報及び遺伝子発現情報が蓄積されている。当データベース構築においては、*in vivo*系では製薬企業における毒性情報が最も豊富な動物種であるラット（肝臓および腎臓が評価対象臓器）、*in vitro*系ではラット初代培養肝細胞およびヒト初代培養肝細胞を用い、選定した化学物質を曝露した際の遺伝子発現情報を Affymetrix社の GeneChip® マイクロアレイにより取得している。また、ラットを用いた実験では、単回投与および28日間反復投与を実施し、遺伝子発現の用量相

関的变化および経時的変化を確実に捉えるため、単回・反復それぞれ4用量・4時点という十分な用量段階およびサンプリング時間を設定し、全ての用量・時点で、臓器重量、血液学、血液生化学、病理変化等の毒性学データを取得し、データベースに格納している。

2つ目は、当研究事業で構築されるアジュバントデータベースである。当データベースには、臨床研究等で採取されたヒトの血液サンプル、ラットやマウス等の実験動物から採取した血液サンプル及び臓器サンプルから得た、マイクロRNAデータ、トランスクリプトームデータ等が蓄積されることになっている。

これらのデータベース情報を融合させ、インフォマティクス手法を用いて解析することにより、アジュバントの安全性評価に用いるバイオマーカー、加えて有効性の評価に用いるバイオマーカーの特定を目指す。

B. 研究の方法

(1)アジュバント投与ラットのサンプルより取得した遺伝子発現データを用いたバイオマーカー探索

本研究は、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）及び国立感染症研究所血液・安全性研究部（研究分担者）との連携の下で遂行している。本年度は表1に示す12種のアジュバントを用いた動物実験が実施された。各実験方法の概略は以下の通りである。

① 動物実験

ラットへのアジュバント投与(単回投与)及び臓器の採取は LSI メディエンスに委託して実施した。採取した肝臓、腎臓、脾臓、肺及び筋肉は、RNA later (Ambion)に 4°C で一晩浸漬後、-80°Cにて凍結保存した。

② total RNA の抽出・精製

RNA later 中で凍結保存されていたサンプルから RNA later を除去後、RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。破碎液に TRIZOL LS、クロロホルムを添加して水層を分取し、RNeasy キット (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。一部をアガロースゲル電気泳動することにより RNA の純度及び分解の有無を確認した。

③ 網羅的遺伝子発現測定

測定はアフィメトリクス社のプロトコールに従い GeneChip 3' IVT Plus Kit および Rat Genome 230 2.0 array を用いて行った。total RNA 100 ng より、T7-oligo dT プライマーを用いて逆転写し一本鎖 cDNA を合成した。さらに T4 DNA polymerase により、二本鎖 DNA を合成・精製した。次に IVT 反応により標識化された cRNA を合成・精製後、300-500bp となるように断片化し、ターゲット液とした。断片化の前後で吸光度測定及びアガロースゲル電気泳動を行い、純度及び分解の有無を確認した。ターゲット液

を Rat Genome 230 2.0 array に 45°Cにて 18 時間ハイブリダイゼーションし、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE)ラベルストレプトアビジンで染色し、専用スキャナーにて発現データを得た。測定されたデータは mas5.0 アルゴリズムによって数値化し、メディアンノーマライゼーションによって正規化した。遺伝子発現データの群内・群間再現性及び変動は、スクATTERプロットにより確認した。

本年度実施した動物実験における遺伝子発現データ取得進捗状況を図1に示す。

④ 遺伝子発現データの解析

対照群に対して、「Welch's t-test $p < 0.01$ 」、「発現値が 2 倍以上変動」、「対照群もしくは投与群いずれかの群の 2/3 以上の個体で Presence call を示す」の 3 条件を満たしたものを発現変動遺伝子と定義し、抽出した。

(2)アジュバント投与マウスのサンプルより取得した遺伝子発現データを用いたバイオマーカー探索

本研究は、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)との連携の下で遂行している。本年度は、アジュバント開発プロジェクトにおいて、表 2 に示す 16 種のアジュバントを用いた動物実験が実施された。各実験方法の概略は以下の通りである。

- ① 動物実験、total RNA の抽出・精製、網羅的遺伝子発現測定、遺伝子発現データの解析
ラットと同様にして実施した((1)①~④)
- ② 血液学的検査値と遺伝子発現値の相関解析
マウスの血液学的検査値(18種類)と3種の臓器(肝臓、脾臓、リンパ節)の遺伝子発現値(45037種類)について、約243万通りの組み合わせでの相関解析を行った。遺伝子発現値及び血液学的検査値は、対照群と投与群の比率をとり、底数を2とする対数に変換して解析に供した。さらにt検定によるP値によって統計的な有意差の有無を判定した。相関解析は、遺伝子発現値と血液学的検査値ともに有意に変動するサンプルデータのみを用いた場合、有意差のつかなかったサンプルのデータも含めた全てのサンプルデータを用いた場合の2通りで実施し、両者の一致性を確認した。加えて、全サンプルデータを用いた線形判別分析を実施し、有意差の有無を判定する判別式を求めた。

(3)アジュバントデータベースのメタデータの整備

アジュバントデータベースの構築の

ため、各種アジュバントを投与したラット及びマウスの臓器における遺伝子発現や血液学的検査データが取得されている。取得した遺伝子発現データには、投与したアジュバントの種類、ロット、溶媒、用量、投与経路、時点、臓器などの様々な情報が付随する。これらの情報を整理整頓かつ計算機処理が可能な形でデータベースに格納することは、データ解析を円滑に推進するために大変重要な作業となる。これまで我々が用いてきたメタデータファイルを元にしてアジュバントデータベースのメタデータを作成してきたが、作成方法の簡素化及び作成時間の短縮化のため、メタデータ構造の改良等が必要と考えられた。そこで本年度は、メタデータ構造の改良とヒューマンエラーの回避を目標とし、メタデータ作成の半自動化の実装を行った。

- ① メタデータ構造の改良
データベースに登録する際のサンプルID番号の付与ルールの見直しを行うとともに、データ登録項目の追加等によるメタデータ構造の改良を行った。
- ② メタデータ作成の半自動化
実験プロセスの中で、一つのGeneChipデータを得るのに通常3種のバーコード(以下コード)が必要になる。1つは動物臓器の採材時に付すコード、2つ目はmRNA抽出時に付すコード、3つ目は製造メーカーにより予め付されているGeneChip管理用のコード(32桁からなる数字)である。これら3種

のコードを自動的に紐付けして管理できるプログラムの実装を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の生体試料を用いる場合は試料提供者に一切不利益・危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的等を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で行われた。

動物実験については、施設(医薬基盤研究所、LSI メディエンス)の動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施され、倫理審査の承諾を得て行われた。

C. 研究結果

(1)アジュバント投与ラットのサンプルより取得した遺伝子発現データを用いたバイオマーカー探索

平成 24~26 年度に取得した 12 種のアジュバントの遺伝子発現データより、発現変動遺伝子を抽出した。アジュバント投与動物の肝臓、脾臓、リンパ節及び腎臓における発現変動遺伝子の抽出数を表 3 に示す。Poly I:C、FK565、MALP2s 及び R848 において 4 臓器共に著しい発現変動が見られ、これらの変動は 24 時間目と比して 6 時間目で顕著であった。上記 4 種のアジュバントで共通して抽出された遺伝子には S100a8、S100a9 及び heat shock protein といった Damage-associated

molecular pattern molecules (DAMPs) やサイトカイン・ケモカイン関連遺伝子といった自然免疫や炎症に関連するとされている遺伝子が多く含まれていた。なお、Poly I:C 及び MALP2s に比して FK565 では、インターフェロン下流遺伝子の発現上昇が極めて軽度であった。

(2)アジュバント投与マウスのサンプルより取得した遺伝子発現データを用いたバイオマーカー探索

平成 24~26 年度に取得した 23 種のアジュバントの遺伝子発現データより、発現変動遺伝子を抽出した。アジュバント投与動物の肝臓、脾臓及びリンパ節における発現変動遺伝子の抽出数を表 4 に示す。ラットで著しい発現変動が見られた Poly I:C、FK565、MALP2s 及び R848 に加えて、cdiGMP、2'3'cGAMP においても 3 臓器共に著しい発現変動が見られた。また、ラット同様、Poly I:C 及び MALP2s に比して FK565 では、インターフェロン下流遺伝子の発現上昇が極めて軽度であった。6 種類のアジュバントで強く発現変動する遺伝子の他にも様々なアジュバントで広く誘導される遺伝子、FK565 など特定のアジュバントに対し特異的に誘導される遺伝子など様々なパターンを示す遺伝子群が抽出され、この中には、ラットでは変動が認められなかった DMXAA の発現上昇などが含まれていた。

血液学的検査値の変動と遺伝子発現変動の相関解析を実施した。解析結果の一例を図 1 に示す。本解析に