

§ ワクチン関連トピックス

トピックス I

誘導性アジュバント；温故知新のサイエンスの新展開

石井 健、日下部峻斗、岸下奈津子、飯島則文、黒田悦史^{1)、2)}

1) 国立研究開発法人・医薬基盤健康栄養研究所・ワクチンアジュバント研究センター

2) 大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・ワクチン学

アジュバントとはラテン語の「adjuvare」（助けるの意味）を語源としており、不活化細菌毒素ワクチンなどに添加される製剤がいわゆるアジュバントと呼称され、長らく利用されてきた。その歴史は90年以上になるものの、20世紀後半までに上市されていたのはアルミニウム塩（通称アラム）のみであり、21世紀になってもでも Oil in Water のエマルジョンなどいくつかの製剤が上市されている程度である。すなわち、理論だった基礎研究のエビデンスに基づいた開発はなされていなかったといえる。その理由として、アジュバントがなぜ効くのかといった疑問に対し、経験的に抗原を保持する（Depot 効果）程度であろうといった理解がされていた程度で、詳細な作用機序、分子メカニズムの研究が立ち遅れていたからに他ならない。いまだに、免疫学の教科書にもアジュバントの分子レベルの作用機序は明確に記載されておらず、もっとも有名な免疫学の教科書でさえ、最近まで「immunologist's dirty little secret」と揶揄されていたほどである。当時は免疫研究の便利なツールではあった「アジュバント」の研究が基礎研究として成り立つと考えた研究者は皆無だったといっても過言ではないだろう。

21世紀にはいると、アジュバントの作用機序の解明の鍵となった知見が怒涛のように発表される。すなわち樹状細胞の発見や自然免疫と獲得免疫をつなぐ TLR の発見などが続き、2011年にはこれらの研究のバイオニアにノーベル医学生理学賞が授与された。ただ、そのころはまだ、自然免疫の研究は病原体由来の外因性アジュバント成分（PAMPs）を用いた研究が主であり、宿主自身のいわゆる内因性アジュバント成分（DAMPs、後述）はあまり注目されることはなかった。

一方、アポトーシスに代表される「細胞死」の研究は20世紀末に最盛期を迎えていた。ギリシャ語を語源とするネクローシスやアポトーシスの研究は、分子生物学の中心の研究領域として知られていたが、近年、その細胞死の研究分野とアジュバントを対象とした免疫学の研究領域の融合が見られるようになり、宿主細胞自体のストレス、ダメージ、細胞死が、病原体に対する免疫反応やワクチンのアジュバント作用機序、がんやアレルギーに対する免疫反応などの防御的免疫反応の作用機序の一端を担っていることが明らかになってきた。

今回はアジュバント研究の新たな展開であり、温故知新ともいえる、宿主細胞由来のアジュバント因子、「誘導性アジュバント」の研究の一端をお伝えしたい。

<誘導性アジュバント>

「誘導性アジュバント」（Inducible Adjuvant）とは、アジュバントそのものによって直接免疫細胞を活性化するわけではなく、体内に取り込まれた後、宿主の細胞傷害あるいは細胞死によって細胞外に放出される何らかの細胞内因子、DAMPs（Damage Associated Molecular Patterns）（図1）がパターン認識受容体（Pattern Recognition Receptors）に感知され、炎症反応や免疫の活性化を誘導するメカニズムとなっている。すなわち、DAMPs を誘導できる物質はアジュバントになりうるといえる。その代表格が、先に述べた、90年以上使われているアラムアジュバントである。

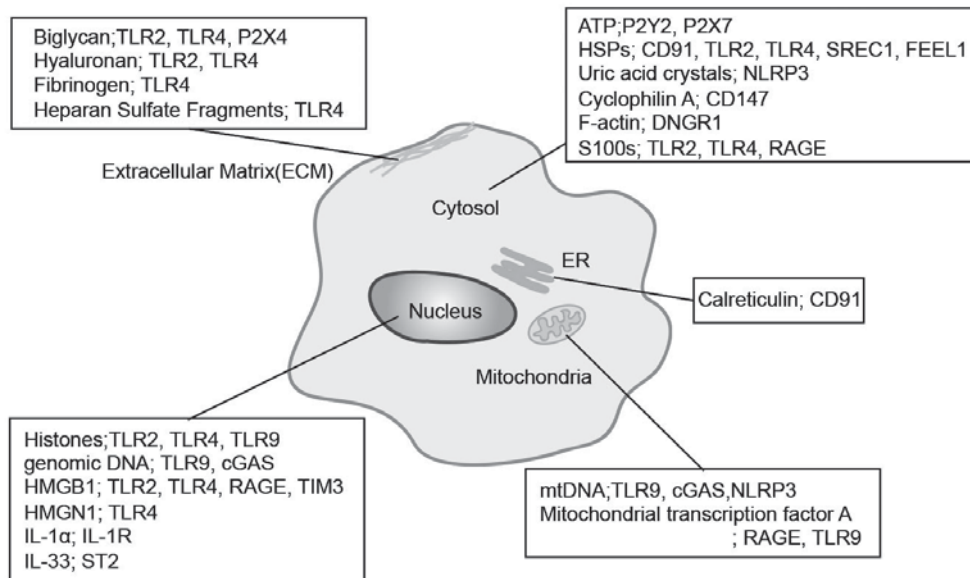


図1 主要なダメージ関連分子パターン (DAMPs) 一覧
DAMP: 認識する受容体 (目下部下、炎症と免疫、2017 より転載)

1) アルミニウム塩 (アラム) アジュバント

アラムアジュバントは、現在4種混合ワクチン (DPT-IPV)、B型肝炎ワクチンなど多くのワクチンに広く用いられている。これまでアラムアジュバントのメカニズムについて様々な研究が報告されている¹。現在最も理解が進んでいる作用機序はアラムによって投与部位で受けた細胞ダメージがDAMPsを放出し、そのDAMPsによって免疫細胞の活性化をしている、所謂誘導性アジュバントとしての機序である。DAMPsの成分であるDNAも関与していることが知られており、宿主DNAが抗原特異的なIgGやIgEの誘導に関与することが報告されている²。さらに、DNAによる自然免疫活性化に重要なシグナル伝達体であるTBK1 (TANK binding kinase 1) やIRF3 (interferon regulatory factor3) の遺伝子欠損マウスにおいて野生型マウスに比べいづれもアジュバント効果の低下が認められており、核酸がアラムアジュバント効果のメカニズムに大きく関与していることが示唆される。他にも多くの粒子アジュバントは細胞死を誘導することが知られていることから³、それらのアジュバント効果も自己のDNAが関与している可能性が高いといえる。

2) 新規誘導性アジュバント (シクロデキストリン、オレイン酸など)

近年、我々のグループで水溶性アジュバントとして、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン (HP-β-CD) を見出した^{4,5}。HP-β-CDはすでに医薬品の溶解剤や安定化剤として注射剤にも用いられており、安全性の高い物質である。このHP-β-CDは、高濃度条件下では生体膜からコレステロールやリン脂質を引き抜き細胞膜の安定を壊すことで細胞死を起し、免疫が活性化していると考えられる。実際に、マウスに抗原とともに投与して局所のDNA濃度を測定すると、一過的にDNA濃度が上昇し、さらにTBK1の遺伝子欠損マウスでは野生型に比べ抗原特異的抗体価の減少がみられた。また、我々はHP-β-CDと同様にEndocineも誘導性アジュバントとしての働きがあることを報告した⁶。Endocineはオレイン酸とモノオレイン酸で構成された脂質化合物であり、ワクチン抗原と同時に経鼻投与すると、全身性免疫応答だけでなく局所の粘膜応答も誘導するアジュバントである。このアジュバント

トもアラムや HP- β -CD と同様に細胞死を誘導し代表的な DAMPs 成分である DNA や RNA を放出している。しかし、Endocine の場合、放出された宿主の DNA でなく RNA を介してアジュバント効果を発揮していることが明らかとなった。以上、我々のグループの最近報告した知見を紹介したが、他にもカチオン性多糖類キトサンは細胞死によって放出された mtDNA や DNA が cGAS-STING シグナル伝達経路を活性させることでアジュバント効果を示しているということが報告されている⁷。このように、同じ誘導性アジュバントでもそれぞれ活性に関与している DAMPs が異なっている。これは、誘導する細胞死が形態的・生化学的特徴が異なっていることによる原因が大きいと考えられるが詳細なメカニズムについては更なる研究が必要である。

3) 核酸アジュバント (図2)

近年の研究で環状ジヌクレオチドの一つ cGAMP は細胞内に侵入した DNA ウイルスや細菌、あるいは宿主由来の DNA が細胞内 DNA センサーである cGAS によって認識された際に生成されることが明らかとなった^{8,9}。また環状ジヌクレオチドは STING リガンドであり、TBK1-IRF3 の活性化を介して I 型 IFN が産生することから、近年新たなサブセットの核酸アジュバントとして大きく注目を集めている。

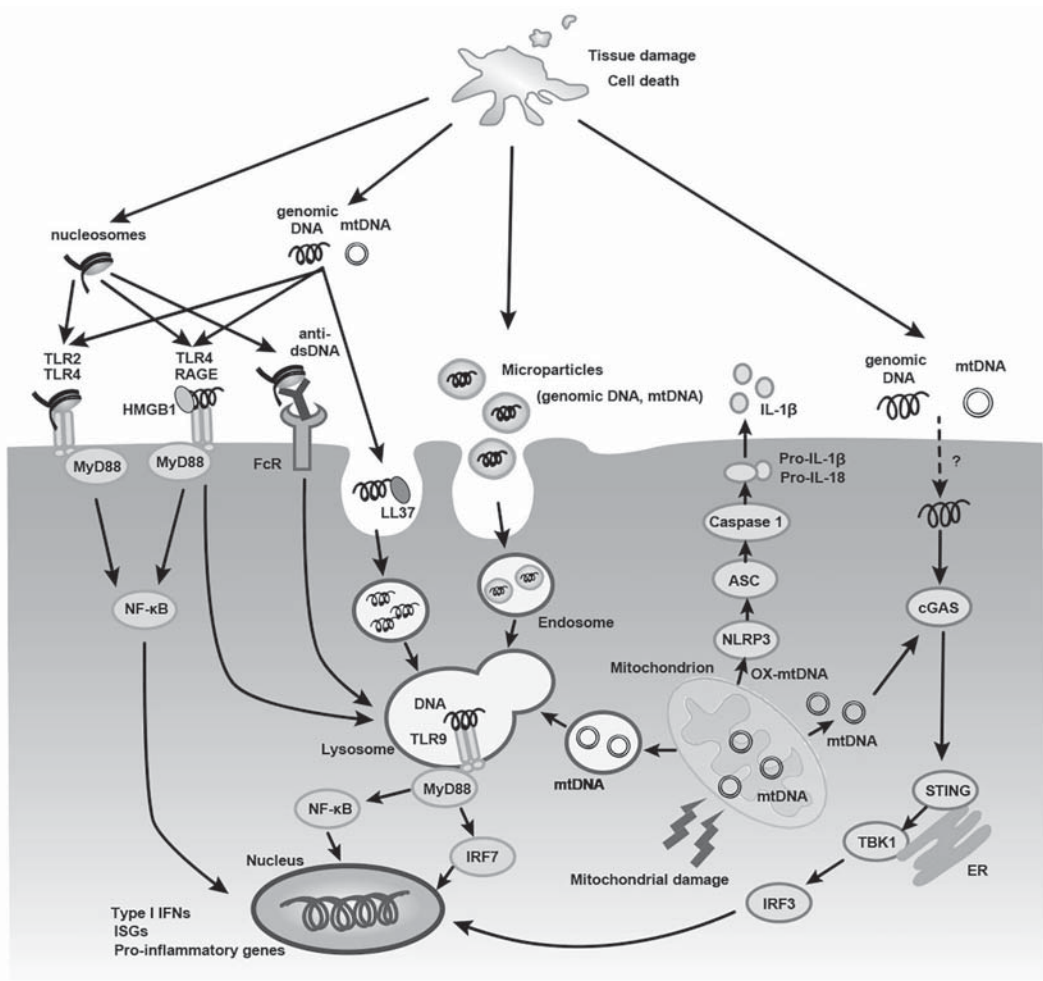


図2 細胞ダメージによる DNA の認識機構 (日下部ら、炎症と免疫、2017 より転載)

実際にマウスを用いた実験において抗原特異的な抗体産生や T 細胞応答を誘導することが知られている^{1, 10, 11}。しかし、これらのアジュバントは抗体産生を誘導する Th2 免疫応答にシフトしやすいため¹²、ガンやアレルギーのワクチン療法には不向きであった。最近我々は、cGAMP と K タイプの CpG-ODN の組み合わせが強力に Th1 免疫応答を誘導し、さらに IL-12 や IFN- γ を産生することを見出した¹³。また、リンパ腫由来の細胞株である EG7 を用いた癌モデルマウスにおいて、腫瘍内への cGAMP + CpG-ODN 投与群でそれぞれ単独で投与した群に比べ有意な腫瘍の退縮が見られ、癌の増殖抑制効果が認められた。このように STING リガンドは、そのまま使用すれば従来型の液性免疫誘導型 Th2 アジュバント、CpG-ODN と組み合わせれば強力な細胞性免疫誘導型 Th1 アジュバントとして使用できる、次世代型のアジュバントとして期待できると考えられる。

おわりに

最近のアジュバントに関する研究の一端を紹介させていただいたが、自然免疫の研究から始まり、細胞死の研究との融合、そして、アジュバントを利用した、新たな免疫療法に至るまで、今後アジュバントの研究は基礎から臨床まで、広がりのある展開が期待される。今後はワクチンに興味のある学生、医師、企業の研究者にいたる多くの方々にアジュバント研究の一翼を担っていただけることを期待したい。

- 1.Kuroda, E., Coban, C. & Ishii, K.J. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *International reviews of immunology* 32, 209-220 (2013).
- 2.Marichal, T., et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature medicine* 17, 996-1002 (2011).
- 3.Maughan, C.N., Preston, S.G. & Williams, G.R. Particulate inorganic adjuvants: recent developments and future outlook. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 67, 426-449 (2015).
- 4.Onishi, M., et al. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin spikes local inflammation that induces Th2 cell and T follicular helper cell responses to the coadministered antigen. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 194, 2673-2682 (2015).
- 5.Kusakabe, T., et al. Intranasal hydroxypropyl-beta-cyclodextrin-adjuvanted influenza vaccine protects against sub-heterologous virus infection. *Vaccine* 34, 3191-3198 (2016).
- 6.Hayashi, M., et al. RNA is an Adjuvanticity Mediator for the Lipid-Based Mucosal Adjuvant, Endocrine. *Scientific reports* 6, 29165 (2016).
- 7.Carroll, E.C., et al. The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons. *Immunity* 44, 597-608 (2016).
- 8.Ablasser, A., et al. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* 498, 380-384 (2013).
- 9.Diner, E.J., et al. The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell reports* 3, 1355-1361 (2013).
- 10.Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. & Chen, Z.J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* (New York, N.Y.) 339, 786-791 (2013).
- 11.Li, X.D., et al. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* (New York, N.Y.) 341, 1390-1394 (2013).
- 12.Tang, C.K., et al. The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant. *PloS one* 8, e60038 (2013).
- 13.Temizoz, B., et al. TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type-II IFN. *European journal of immunology* 45, 1159-1169 (2015).