

## “アラムアジュバント効果に宿主細胞の DNA による自然免疫が鍵を握る”

石井健(いしいけん)

(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

大阪大学免疫学フロンティア研究センター・ワクチン学・主任研究者(招へい教授)

アルミニウム塩を主とするアジュバント(総称:アラム)は世界で最も古く、かつもともと汎用されていますが、その生物活性は多岐にわたり、アジュバント効果の鍵となるメカニズムは不明のままです。この「鍵」となるメカニズムがわかれば、アジュバントの有効性や安全性の本質に迫ることが可能になると期待されています。

大阪大学 IFREC・ワクチン学(医薬基盤研究所・アジュバント開発プロジェクト)の石井健教授、チョバン准教授、審良教授らとリージュ大学(ベルギー)の Desmet 准教授らの研究グループは、このアラムのアジュバントは生体内で細胞の遊走、細胞死を誘導し、その宿主細胞からの DNA を網状に放出され自然免疫を活性化することが、その効果に必須であること発見しました。さらにアジュバントの副作用であるアレルギー反応(IgE 抗体)と主作用である抗体反応(IgG)を区別する免疫シグナルを発見し、新たなアジュバント開発に繋がるのみならず、その副作用軽減の技術開発にも光が当てられると期待されます。

### 研究の背景と経緯

生体には、外部から侵入する病原微生物などを自身の組織と見分けて認識し排除する自然免疫というシステムがあります。自然免疫システムには様々な免疫担当細胞があり、いろいろなタイプの病原体成分を見分けることのできるセンサー(受容体、たとえばトル様受容体)を備えています。そのなかでもとくに樹状細胞といわれる特殊な細胞はその機能にもっとも長けていて、感染に対する自然免疫反応を誘導するだけでなく、獲得免疫システムといわれる次の段階の免疫細胞、たとえば免疫の記憶を担当する T 細胞や抗体を作り出す B 細胞などに伝えることが知られています。この獲得免疫を誘導する医薬品が「ワクチン」ですが、このワクチンの効果には自然免疫を活性化する「アジュバント」が必須であることが最近の免疫学の進歩で明らかになってきました。

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”という言葉を語源とし、ワクチン抗原と共に投与して、ワクチンの効果を増強することのできる物質の呼称です。アジュバントの医薬品としての歴史は長く、1920 年代に アルミニウム塩 (ミョウバンのこと;総称してアラムとも)を用いてジフテリアや破傷風のトキソイドの効果が増強され、ワクチンとして製剤化されたのが始まりといわれています。それ以来、このアラムアジュバントはいろいろなワクチンのアジュバントとして幅広く利用されています。例えば日本では百日咳、ジフテリア、破傷風、B型肝炎のワクチンをはじめ、7 価肺炎球菌ワクチンや最近認可された子宮頸がんワクチンにも含まれています。ワクチン特異的な IgG という抗体を誘導する能力に長けていますが、IgE というアレルギーの原因になる抗体も誘導し、副作用をおこすことも知られています。

そのため、このアラムアジュバントがどのようにして IgG を誘導したり、IgE を誘導したりするメカニズムがわかれば、その有効性や安全性を向上させる新たなアジュバントが開発することができるのではと、世界中でアジュバントの研究がさかんになってきています。

しかしながら、これだけ長く、かつ広く汎用されているアジュバントであるにもかかわらず、アラムアジュバントの作用機序は最近まで推測の域を出ていませんでした。長らく信じられているアラムのアジュバント効果の理由とし

て、アラムは抗原を保持する能力が高く(デポ効果 Depot)、そのために抗原を徐々に放出する(徐放)からであると考えられてきましたが、最近になりアラムアジュバントもほかの病原体やアジュバントのように自然免疫を活性化することによってその効果を示しているのではないかと示唆するような論文が続々と発表されるようになりました。しかし、アラムのアジュバント効果に直結する決定的な因子は発見されていませんでした。

そこで我々は、アラムアジュバントの多様な生物活性のなかで何がアジュバント効果に重要なのか、アラムのアジュバント効果は本当に「アルミニウム塩」が自然免疫に認識されるからなのか、という素朴な疑問に答える実験から開始しました。

## 研究の内容

まず、マウスの実験系を用い、アラムアジュバントを OVA という抗原タンパクと一緒に腹腔に投与し、その後に起こる生体反応を観察しました。そこで判明したのは、アラムアジュバントを投与した場所(腹腔)にたくさんの好中球が集まってきて、細胞死を起こし、細胞内の主な核酸である DNA やその代謝産物である尿酸を外に大量に放出していることが判明しました(図1)。

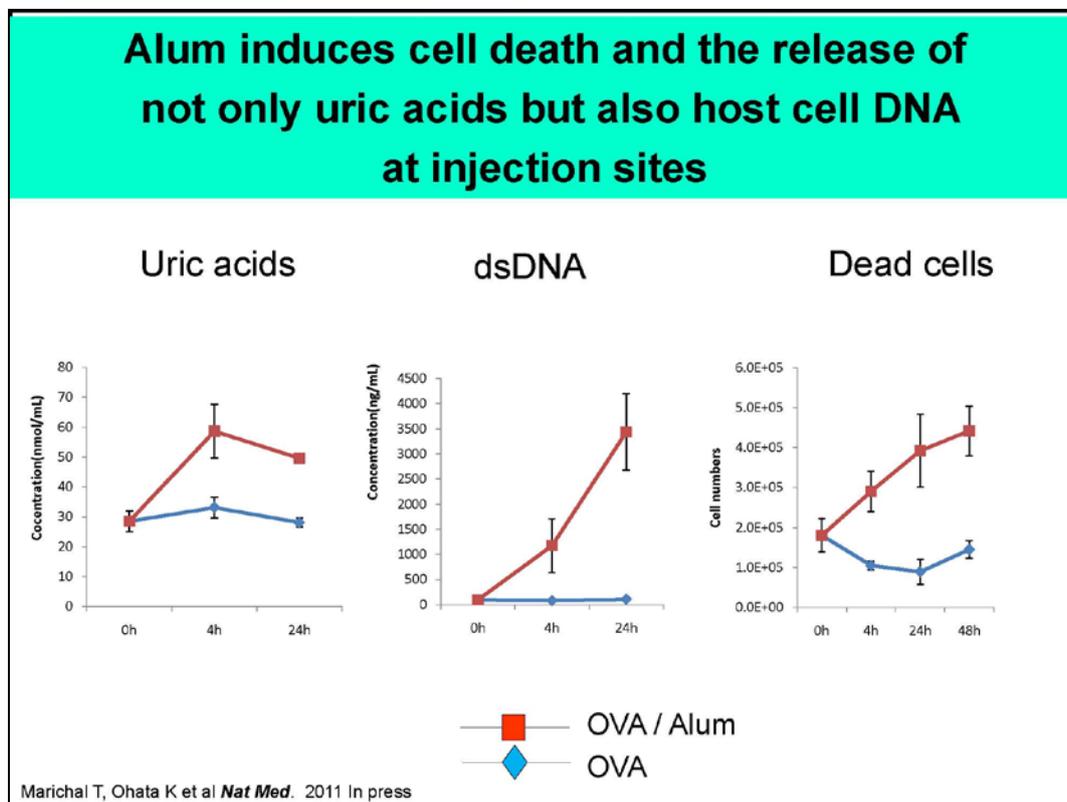


図1: アラムは生体内で細胞死を誘導し、DNA や尿酸を放出する。

そして驚いたことに、その好中球がまるで自分から率先して自身の DNA(核酸)を吐き出している像が観察できたのです。その形はまさに網(ネット)状に DNA が組織に出されており、微生物学でも最近知られるようになった「NETs」(Neutrophil Extracellular Traps の略で、造語)という現象と同様のことがおきていたのです(図2)。

## Alum induce neutrophil extracellular traps (NETs)

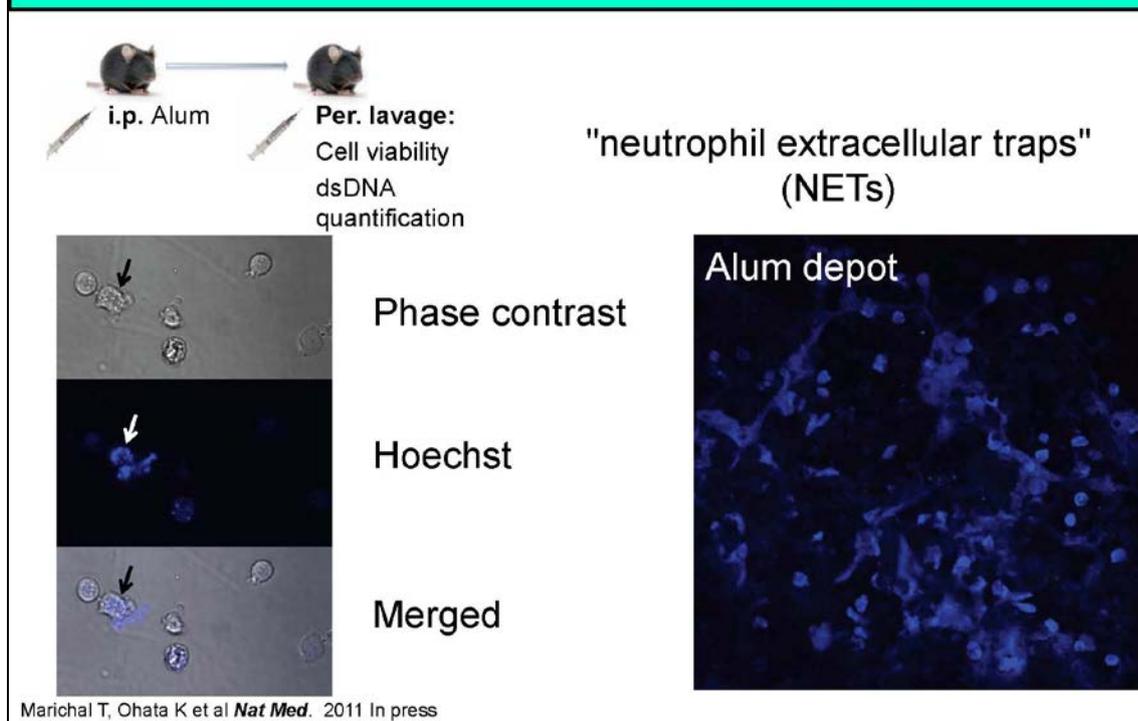


図2: アラムをマウス腹腔に投与した後の細胞(好中球)の顕微鏡像(左)と細胞組織で核酸である DNA が網状に放出された像(NETs: neutrophil extracellular traps)

次に、このように示されたアラムによる細胞死の誘導、そしてその後の DNA 放出という現象がどこまでアラムのアジュバント効果に関わっているか検討しました。まず、マウスの DNA だけでアジュバント効果が示されるか実験しました。マウスの細胞からゲノム DNA を抽出、精製し、この DNA を OVA タンパクと混ぜ、マウスの腹腔に投与しました。その後マウスの血清に存在する OVA 特異的な IgG 抗体と IgE 抗体を計ったところ、なんと DNA のみでアラムアジュバントと同等のアジュバント効果が得られることがわかりました(以前までは DNA は細胞性免疫のアジュバントとなりうるというデータはありましたが、免疫のプロトコール次第で IgE が誘導できるのを示したのは初めてでした)(図3)。つまり、DNA のみでアラムアジュバントの代わりになるほど十分なワクチン効果が得られた(Sufficient)ということを意味します。

## Host dsDNA boosts Ag-specific IgG1 and IgE as efficiently as Alum

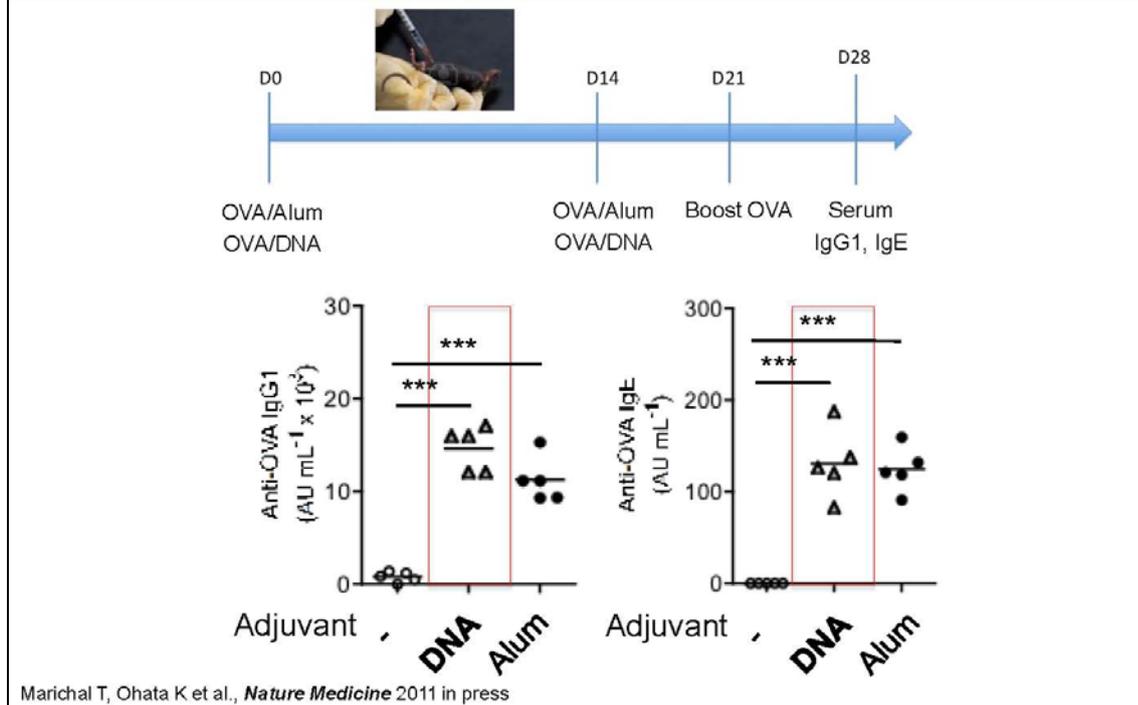


図3: DNA のみでアラムアジュバントと同等のアジュバント効果を得ることができる。

しかし、DNA がアラムアジュバントと同等の効果を示したからといってアラムアジュバントのメカニズムに DNA が必須、もしくは重要な役割をしているということにはなりません。この点を検証するために、次のような実験を行いました。すなわち、アラムアジュバントを OVA タンパクと腹腔に投与し、その後腹腔浸出液を回収します。回収した浸出液を遠心して細胞やアラムアジュバントなどを取り除きます。そしてその上清を今度はナイーブ (何も処置していない) マウスの腹腔に戻してやり、その 10 日後にマウスの血清中の OVA 特異的な IgG、IgE の量を計測すると、どちらの抗体価も上昇していました。つまり、腹腔の浸出液を移植するだけで「アラムアジュバント」のワクチン効果がナイーブのマウスに転送できたこととなります。そして今度は同様の実験の際に、ナイーブなマウスに投与する浸出液を DNase (ヌクレアーゼ) で処理し、DNA を除去しておく、なんと免疫の転送、すなわち、マウスの IgG、IgE が検出されなくなりました (図4)。この結果は、少なくともこの実験系において、アラムアジュバントの効果はその腹腔浸出液に存在する DNA によって誘導されている、つまり、DNA がアラムアジュバントの効果に必須であること (Essential) を証明したことになります。

## Alum-induced host dsDNA boosts humoral responses in alum vaccination

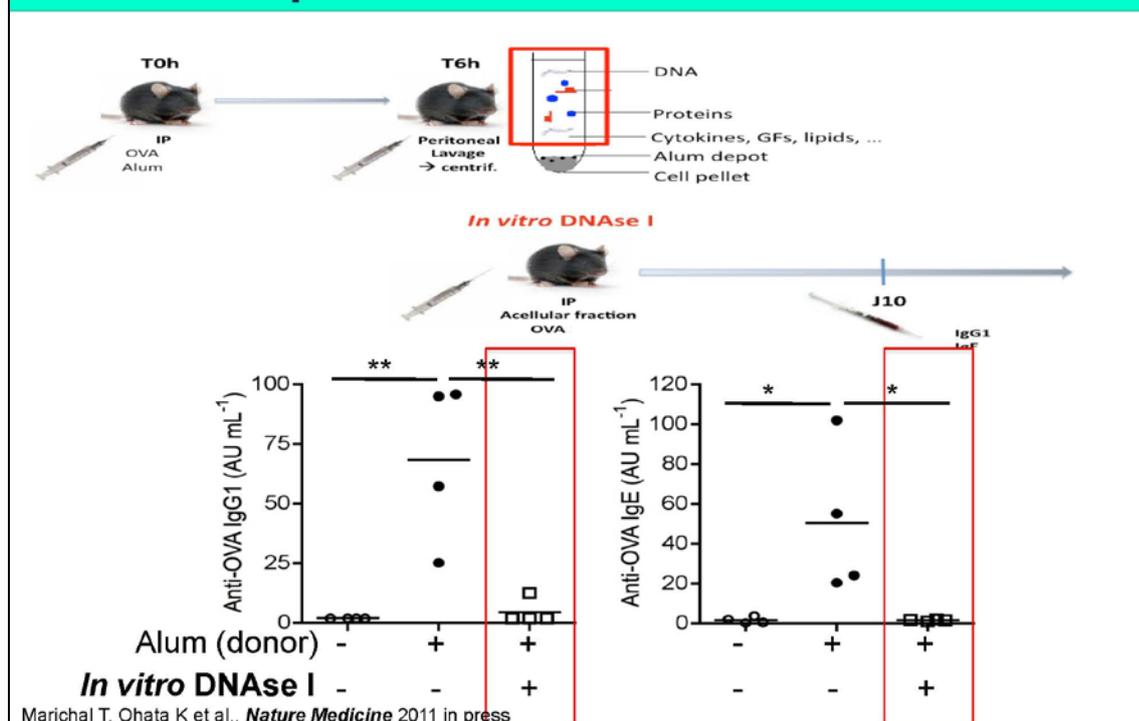
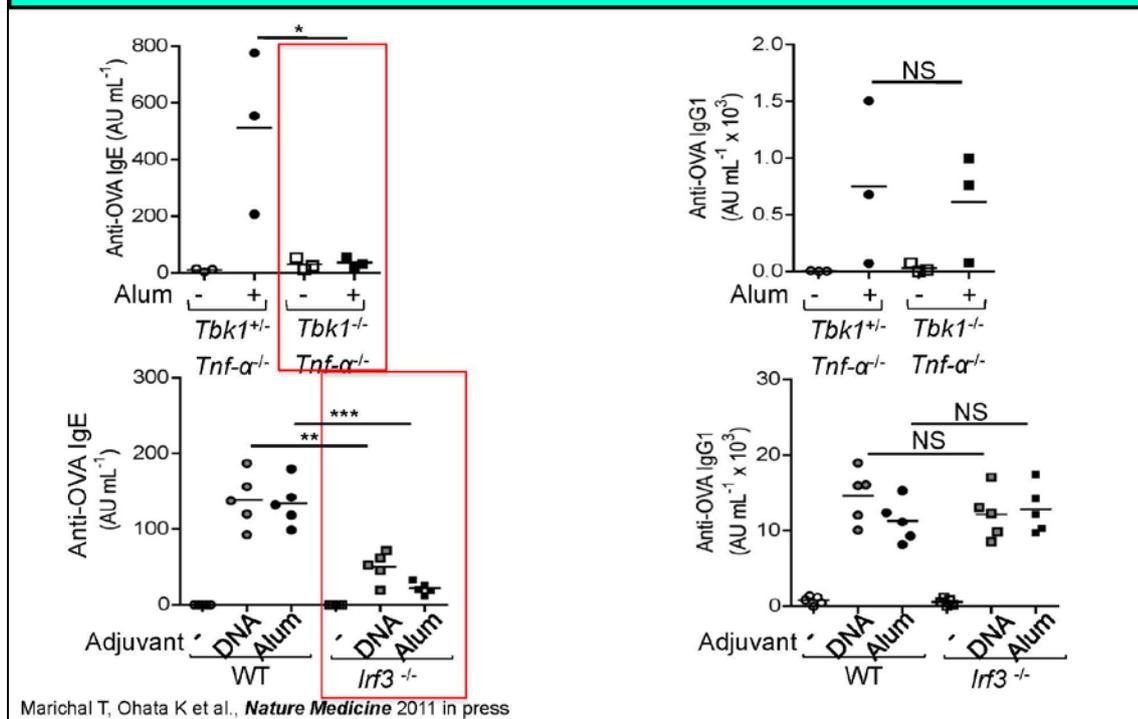


図4: アラムアジュバント投与によって腹腔浸出液に放出されたDNAがアラムのアジュバント効果に必須の役割を担っている。

DNAがアラムのアジュバント効果に必須である、という証明がされたということですが、そのDNAはどのようにして免疫を活性化しているのでしょうか？DNAを細胞内で認識し、I型インターフェロンなどを産生させる自然免疫の経路が知られていましたが<sup>1-4</sup>、我々はこの経路に注目し実験を進めました。DNAの細胞内受容体はいまだ不明な点が多いですが、その認識経路にて重要な役割をしていると生体のレベルで証明されているシグナル伝達物質のTBK1(TANK binding kinase 1)、IRF3(Interferon regulatory factor 3)の欠損マウスを用いてその詳細を検討しました。その結果、このDNAを細胞内で認識し自然免疫反応を起こす能力を欠いていることが知られている2系統のマウスはアラムアジュバントの効果である、IgG、IgEのなかでもとくにIgEの誘導が顕著に減弱していることが判明しました(図5)。しかし、IgGの誘導はこれらのマウスでも保たれていたことから、細胞内DNA認識による自然免疫シグナルがIgEの産生に必須であることが証明されました。しかし、IgGはいまだ不明のメカニズムが存在することも示され、アラムアジュバントの「副作用であるIgE」の誘導と、「主作用であるIgG」の誘導の免疫シグナルが異なることも明らかになりました。

## Signaling via TBK-1 and IRF3 is responsible for alum- and host DNA-boosted production of IgE, but not IgG1



Marichal T, Ohata K et al., *Nature Medicine* 2011 in press

図5: 細胞内DNA認識機構に必須なシグナル伝達物質TBK1とIRF3がアラムアジュバントのIgE誘導に必須であるが、IgG誘導には必要ない。

最後に、上記の結果を踏まえて、アラムによって誘導される細胞内DNA認識による自然免疫活性化がどのような細胞を介して誘導されているか検討しました。その結果、IgEが産生されるような反応は inflammatory monocytes (iMONOs: 炎症性単球) がアラムによって誘導されたDNAによるIRF3を介した自然免疫反応を惹起して inflammatory dendritic cells (iDCs: 炎症性樹状細胞) に成熟すること、そしてその細胞が接種部位から所属リンパ節への移動することが必須であることが判明しました。また、そのプロセスはI型インターフェロンではなく、IRF3で誘導される別のサイトカイン、IL-12p40であることも判明しました。IL-12p40はホモ2量体をつくり、IL-12p80となると、Th1を抑制し、Th2タイプの免疫反応を誘導することが知られており、実験的にもこのサイトカインが上記の反応に重要であることも今回の研究で示すことができました。

### 本研究成果の意義と今後の展開

本研究の意義としては

1) 「世界中で最も古く、最も汎用されているワクチンアジュバントであるアルミニウム塩(アラム)の鍵となるメカニズムを発見」したことであるとおもいます。

昨今自然免疫を中心としたアラムアジュバントの生物学的活性を示した論文が乱立し、とくにNLRP3インフラマソームの活性に関するNature(2008)<sup>5</sup>の論文発表後に免疫学をはじめとしたワクチン関連分野におけるアラムの作用機序のコンセンサスが混乱していました。この論文の内容のうち、アラムが直接マクロファージなどに作

用し NLRP3 を介して自然免疫を活性化することは正しかったのですが、産業医大の黒田氏<sup>6</sup>や今回の論文<sup>7</sup>ではアジュバント効果にはインフラマソームの関与は非常に低いと結論付けられると考えています。また、ほかにもアラム自身が樹状細胞の膜に作用して受容体非依存性に自然免疫を活性化するメカニズム<sup>8</sup>、尿酸を介したアジュバント効果<sup>9</sup>、マクロファージに直接作用し、プロスタグランジン E2 を産生させ Th2 タイプの免疫反応が誘導されるとの報告<sup>6</sup>もあり、今回の研究成果との関連が注目されます。DNA を主とした自然免疫がアラムの免疫原性を惹起し、その Th2 タイプへの免疫反応の方向性を PGE2 をはじめとしたさまざまな因子が決定するのではないかと現時点では推測されます。

## 2)「アラムが細胞自らの DNA を投げ網(NET)のように放出させ免疫を活性化する」

微生物学の世界では数年前から注目されていた NETs という DNA を主成分とした宿主細胞の積極的な Host Defense の現象が、人工的なアラムアジュバントでも再現されること、そして、「アラム自身」でなく、生体で投与後に誘導される「宿主細胞由来の DNA」がアジュバント効果に必須であることを世界で初めて示したことは非常に意義があると考えています。とくに、今までアラムと免疫細胞の相互作用を *in vitro* で観察していただけでは決して見出すことのできない発見であるため、今まで発見に時間がかかったともいえます。

## 3)「アジュバントの副作用であるアレルギー反応(IgE 抗体)と主作用である抗体反応(IgG)を区別する免疫シグナルを発見;ワクチンアジュバント副作用軽減に光」

アジュバントは今世界中でワクチン開発に必須なアイテムとして多くの製薬企業を含め激しい開発競争が行われています。しかし、アジュバントが強い免疫活性物質であり、薬にもなりますが、ややもすると「毒」になりうる危険性も秘めていることを明記しなくてはなりません。今回の研究対象のアラムアジュバントも長いあいだ、多くのワクチンに用いられてきましたが、IgE を誘導してしまうという「副作用」がありました。しかし、「主作用」である IgG と IgE は Th2 タイプの免疫反応では絶えずパラレルに動くと考えられていたため、IgE 誘導と IgG 誘導は分けることがむつかしいと考えられていた点も否めません。しかし、今回の研究成果から、IgE と IgG がアラムによって誘導されるシグナル経路がきれいに分かれることを見出したことから、今後は IgE のシグナルを抑え、IgG 誘導能のみを高めるようなアジュバントの開発が可能になることを意味すると考えています。今後のアジュバント開発において、「安全性」も最も重要視しつつも、「有効性の高い」アジュバントの開発を目指すことができることが期待されます。

## 謝辞

本研究結果はベルギーのリージュ大学の Desmet 准教授と医薬基盤研究所/大阪大学の石井がそれぞれ類似のデータを持っていたことが発端で始まり、リージュ大学院生の T.Marichal が大阪大学の招へい研究員として赴任し二つのラボをつなぐ実験を数ヶ月で行った共同研究の成果です。その際に大阪大学免疫学フロンティア研究センター、マラリア免疫学のチョン准教授、大畑研究員、審良拠点長をはじめ医薬基盤研究所/大阪大学のメンバー、とくに小檜山研究員の協力がなければこの研究成果はなかったことも明記します。また、大阪大学、微生物病研究所の堀井俊宏教授、教室員の皆様、審良研の皆様にもこの場をお借りして感謝の意と敬意を表します。

## 参考文献

1. Ishii, K.J. & Akira, S. Innate immune recognition of nucleic acids: Beyond toll-like receptors. *Int. J. Cancer* **117**, 517-523 (2005).
2. Ishii, K.J. & Akira, S. Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trends Immunol.* **27**, 525-532 (2006).
3. Takeshita, F. & Ishii, K.J. Intracellular DNA sensors in immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 383-388 (2008).
4. Koyama, S. *et al.* Innate immune control of nucleic acid-based vaccine immunogenicity. *Expert. Rev. Vaccines.* **8**, 1099-1107 (2009).
5. Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., Sutterwala, F.S., & Flavell, R.A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* **453**, 1122-1126 (2008).
6. Kuroda, E. *et al.* Silica Crystals and Aluminum Salts Regulate the Production of Prostaglandin in Macrophages via NALP3 Inflammasome-Independent Mechanisms. *Immunity* **34**, 514-526 (2011).
7. Marrichal, T. *et al.* DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat. Med.* (2011).
8. Flach, T.L. *et al.* Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvant activity. *Nat. Med.* **17**, 479-487 (2011).
9. Kool, M. *et al.* An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma. *Immunity* **34**, 527-540 (2011).

## その他

- 1- Koyama S, Akira S and Ishii KJ. "Immune recognition of nucleic acids and their metabolites" Extra Nucleic Acids, edited by Kikuchi Y, Ryokova ET, *Springer*, 2010 (BOOK CHAPTER)
- 2- 小山正平、石井 健 「ワクチンアジュバントの必要性和安全性」 *医学のあゆみ* (2010) 234(3):217-221.2010
- 3- 青枝大貴、石井 健 「ワクチンを考えるうえで必要な免疫の知識」 *臨床検査* Vol.54 No.11 2010.10.30 増刊号
- 4- 小檜山康司、石井 健 「DNA センサーとその生理的意義」 *細胞工学* Vol.29 No.10(2010.9.22) p1004-1013
- 5- 小檜山康司、石井 健 「自然免疫とワクチン開発」 *医学のあゆみ* Vol.234 No.5(2010.7.31) p608-614