

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：アジュバントの *in vitro* 安全性・有効性ハイスループットスクリーニング系の創出を目指した研究

The research for development of high-throughput screening system for safety and efficacy evaluation of adjuvants

研究開発実施期間：2017 年 5 月 1 日～2020 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：佐々木 永太

Eita Sasaki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

Senior Research Scientist, Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases

II 研究開発の概要

本研究開発課題 2017 年度から 2019 年度にかけて、ワクチンアジュバントのシーズ化合物のスクリーニング系構築を目指し、*in vitro* および *in vivo* 評価系の両評価系の構築を行い、さらに構築した評価系を用いてアジュバント候補化合物のスクリーニングを実施した。具体的には下記の成果が得られた。

(1) アジュバントスクリーニングのための *in vitro* 評価系の構築

In vitro 評価系の構築においては、ヒトへの外挿性を考慮し、ヒト由来の細胞株から選定を行った。ヒト単球等の細胞株と、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を用いてバイオマーカー遺伝子を解析したところ、ヒト PBMC が最も網羅的にアジュバント活性を捉えることが可能と判明した。さらに、PBMC に含まれる細胞のうち、鍵となる細胞の 1 つが形質細胞様樹状細胞 (pDC) であることを見出した。しかし、pDC は安定細胞株が存在せず、また機能的にも完全な pDC 機能を持つ細胞株は存在しないことから、評価系には PBMC を用いることとした。*In vivo* でワクチンの有効性指標および毒性指標マーカーとして機能する 17 個のバイオマーカー遺伝子のうち、PBMC で機能する 6 つの遺伝子を、PBMC 評価マーカー遺伝子として抽出し、評価系の基盤構築に成功した。

(2) アジュバントスクリーニングのための *in vivo* 評価系の構築と *in vitro* 評価系の機能評価

PBMC で評価した遺伝子が、*in vivo* におけるワクチンの有効性とどのような相関性があるのかを検証するため、作用機序の異なるアジュバント添加ワクチンをマウスに接種し、*in vivo* のバイオマーカー遺伝子発現変化と、それらと有効性と毒性発現との関連性を詳細に解析した。その結果、特徴的な発現パターンを示す *Timp1* 遺伝子は肺への細胞傷害性を反映するバイオマーカーであることが判明した。さらに、1 型 IFN シグナル活性化と白血球減少毒性の指標となるバイオマーカー遺伝子セット、Th1/Th2 免疫バランスの指標となるバイオマーカー遺伝子セット、抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導の指標となるバイオマーカー遺伝子セット、IgA 産生誘導の

指標となるバイオマーカー遺伝子セットの同定にそれぞれ成功した。このうち、PBMC で機能する 5 つのバイオマーカー遺伝子は、Th1 免疫 IgG2a 抗体産生指標となる遺伝子であることが判明し、PBMC を用いた評価系では主に、Th1 免疫誘導評価が可能であることを見出した。一方で、IgA 産生や細胞傷害性マーカーに関する遺伝子は、PBMC では機能しないことから、PBMC を用いた *in vitro* 評価系では、*in vivo* のように網羅的な評価ができないことが判明した。このことから、スクリーニングでは、*in vitro* と *in vivo* の両評価系を駆使することが必要であることが明らかにされた。

(3) 構築したスクリーニング系を用いたアジュバントスクリーニングの実施とヒット化合物の評価

上記(1)(2)の研究で構築した *in vitro* および *in vivo* 評価系を用いて、新たなアジュバントシーズの探索を実施した。米国 BROAD Institute の Web ページ上で提供されている遺伝子発現データベース Connectivity map を用いて、バイオマーカー遺伝子を発現上昇させる既承認薬や、日本で承認されている医薬品添加剤成分を用いて、アジュバントシーズのスクリーニングを行った。その結果、単回接種によって、既存のアジュバント添加インフルエンザワクチンの 10-50 倍以上の抗原特異的 IgA 誘導活性をもつ、8 つの新規アジュバント候補化合物同定に成功した。これらの化合物をスプリットインフルエンザワクチンに添加し、マウスに単回免疫し、インフルエンザウイルスの感染を行ったところ、アジュバント候補化合物を加えたワクチンのみ、インフルエンザウイルスによる死亡を 100%抑制し、ウイルス感染による体重減少をほぼ完全に抑制した。さらに、肺胞洗浄液、鼻腔洗浄液中のウイルス価を測定したところ、アジュバント候補化合物が添加されたワクチンを接種されたマウスにおいては、ウイルス価は検出限界値付近であり、ウイルス増殖が著しく抑制されていることが判明した。また、毒性については、肺胞洗浄液中では 1 型 IFN の誘導は認められず、白血球減少毒性も認められなかった。このことから、これらのアジュバント候補化合物は非常に高いアジュバント活性を持つにも関わらず、poly I:C や全粒子不活化インフルエンザワクチンのような血液毒性や発熱発症リスクが極めて低いと考えられる。以上の成果から、本スクリーニング系は、アジュバントスクリーニング系として機能することが実験的に示された。さらに、得られたアジュバント候補化合物は、単回接種で高い有効性を持つこと、医薬品添加物として本邦で使用されていることから安全性も高いと考えられ、迅速な実用化が期待される。

(4) ワクチンアジュバントの発熱反応を捉える新規バイオマーカー遺伝子の同定

ワクチンアジュバントの主要な副反応として、発熱反応がある。発熱活性を捉えることは、ワクチンアジュバントの安全性評価上極めて重要である。そこで、ウサギにエンドトキシン、全粒子不活化インフルエンザワクチン、R848、Poly I:C などの作用機序の異なる発熱活性物質を接種したところ、接種後およそ 3-4 時間以内に直腸で発熱反応が認められることを見出した。さらに、この時の血中のサイトカイン濃度を解析したところ、IL-1 β をはじめとする炎症性サイトカインの上昇が認められた。次に発熱反応を捉えるための *in vitro* 評価系を構築するため、ウサギに各種発熱物質投与 90 および 180 分後の血液を採取し、全血のマイクロアレイ解析を実施した。その結果、発熱時に特徴的な発現変動を示す遺伝子を得ることに成功した。

(5) DAMPs 放出に着目したワクチンアジュバントスクリーニング系の基盤構築

アジュバントの有効性評価の精度を高めるため、近年アジュバントの作用機序としてその重要性が認識されている damage associated molecular patterns (DAMPs) の放出を *in vitro* で評価するための試験系構築に取り組んだ。具体的には、ヒト初代肺胞上皮細胞およびマクロファージ細胞株に各種既存アジュバントを添加し、培養上清中の DAMPs (IL-33, IL-1 α , HMGB1, dsDNA) および細胞生存率評価 (LDH) を行った。その結果、DAMPs 放出を誘導することが知られている AddaVax や Alum 等において、DAMPs の放出が認められ、DAMPs 誘導能評価系として機能することを見出した。

今後の課題

本研究課題で作成したスクリーニング系によって、既存アジュバント (Poly I:C 等) よりも強いアジュバント活性を持つ化合物を 8 つ発見した。今後は、この化合物の毒性と有効性を *in vivo* で検証し、アジュバント活性を持

つ物質として、特許取得を目指して研究を進めていく。さらに化合物のアジュバントとしての作用機序を解明し、アジュバントとしての臨床応用へ進めることを目指す。いずれの化合物も、医薬品添加物として承認済みであることからヒトへの応用は比較的ハードルが低いと考えられる。さらに、マウスを用いた解析より、1型IFN誘導活性がないことが示唆されており、poly I:Cや全粒子不活化ワクチンのような副反応リスクが極めて低いことが予測されている。今後は、これらの化合物について、メカニズム解明と、安全性評価そして霊長類を用いた有効性評価を行い、今後は発見したこの化合物を、基礎研究から臨床試験へとつなげていくことを目標として取り組んでいく必要があると考えている。また、今後も評価系の更なる改善や、インフルエンザワクチンのみならず様々なワクチンアジュバントを創出の可能性を探ることも含め、引き続きスクリーニングを実施していく必要がある。

現時点で達成できていないウサギ発熱バイオマーカーの同定とそれを用いた発熱活性評価法の構築について、発熱指標となるバイオマーカー遺伝子について特許の取得を目指す。ウサギ発熱試験の*in vitro*代替試験法として耐えうる試験法は、世界で未だ開発されていない。しかし、発熱活性は無視できない副反応の1つであり、世界的に実施されているワクチンの安全試験としても、動物を用いずに簡便に発熱活性を評価する手法の開発が望まれている。さらに、アジュバントの主要な副反応としては、poly I:Cで認められたような発熱反応の懸念も払拭されておらず、アジュバントをヒトに使用するには、発熱活性の有無は明らかにしなければならない重要課題である。これらの成果は、アジュバントの安全性向上と開発のスピードアップに直接貢献することが期待される。

DAMPs誘導評価系については、評価系の基盤を整ったと考えられるが、評価アジュバントの数を増やすこと、DAMPs遺伝子の発現解析を行うこと、*in vivo*とのブリッジングを検証し、DAMPs誘導能評価系を完成させる必要がある。この成果はアジュバント候補化合物探索のスピードアップに貢献するものである。また、DAMPsに着目したアジュバントスクリーニングは報告されておらず、世界にさきがけた評価系となりうる。

Summary

This research and development task: From FY2017 to FY2019, aiming at constructing a screening system for seed compounds of vaccine adjuvants, we constructed both *in vitro* (PBMC) and *in vivo* (mouse model) evaluation systems, and then used the constructed evaluation system to search and develop adjuvant candidate compounds.

Using the evaluation system constructed in this research project, we searched for new adjuvant seeds. As a result, we succeeded in identifying eight novel adjuvant candidate compounds having an antigen-specific IgA-inducing activity that is 10 to 50 times higher than that of existing adjuvanted influenza vaccines. When added to influenza vaccine, these compounds also showed strong adjuvant activity by single immunization.

To obtain the biomarker genes for evaluating risk fever development, rabbits were inoculated with endotoxin, whole-particle inactivated influenza vaccine, R848, poly I:C and other pyrogenic compounds with different mechanism of action. The blood was collected 90 and 180 minutes later and then applied into a microarray analysis was performed, and several genes that could be biomarkers were successfully obtained.

In order to improve the accuracy of adjuvant evaluation, we have set up an *in vitro* test system to evaluate potential for releasing damage associated molecular patterns (DAMPs) from cells, which has recently been recognized as important for the mechanism of action of adjuvants. Specifically, various existing adjuvants were added to human alveolar epithelial cells and macrophage cell line. Then DAMPs (IL-33, IL-1 α , dsDNA) in the culture supernatant and cell viability were evaluated. As a result, it was found that the release of DAMPs from cells was observed in oil-based adjuvants, aluminum salts, which have been known to induce DAMPs. Taken this result, they function as a DAMPs inducing ability evaluation system.