

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：革新技術に裏打ちされた有効かつ安全な次世代アジュバント開発

Development of the next-generation adjuvants with innovative evaluation systems for safety and efficacy

研究開発実施期間：平成 29 年 5 月 1 日～令和 4 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：石井 健

Ken Ishii

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東京大学 医科学研究所 教授

The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Professor

II 研究開発の概要

近年、ワクチン開発においてアジュバントの重要性が注目されており、企業およびアカデミアにおいて新規アジュバントの研究開発が進められている。しかしながら、現在はアジュバントを適切に評価する評価法が存在しておらず、現行の薬機法(旧薬事法)ではアジュバントは生物活性を有さない添加剤として扱われている。そのため安全かつ有効な新規アジュバント開発のためにはアジュバントの評価法やガイドラインの作成が必要不可欠であると考えられる。

我々は前事業の「アジュバント安全性評価データベースの構築研究」において、アジュバントの安全性や有効性に関する膨大なデータを得ることに成功した。さらに最近では、1)アジュバントの生体内分布、2)食事や代謝の違いが生み出すアジュバントの感受性の違い、3)霊長類を用いた安全性と有効性の評価、などが求められており、それらの情報を利用した、4)トランスオミクス解析も注目されている。

本研究では革新技術に裏打ちされた有効かつ安全な次世代アジュバント開発を行うことを目的とし、アジュバントデータベースのデータに加え、上記した4つの評価法を確立し統合することにより、精度の高いアジュバントの評価を構築し、それを利用した有効かつ安全な次世代アジュバントの開発のため以下の4つの研究開発を行った。

(1) 新規アジュバント探索と作用機序解析

新規アジュバントの探索として、薬用植物由来エキス、カチオニックタンパク、自己集合型低分子化合物のアジュバント活性のスクリーニングを行なった。薬用植物由来エキスに関しては、夏目グループと共同で、アジュバント活性と薬用植物由来エキスに含まれる微粒子の関連性について解析を行い、新規アジュバントのスクリーニング法を構築し、*in vivo*における獲得免疫応答に関連するパラメーターを機械学習により同定した。さらに共同研究の中で、約 8000 個の自己集合性を有する化合物の中から、アジュバント活性を有する化合物(コリカマイド)を見出し、作用機序の一部を明らかとした。

これまで行ってきたハイドロキシプロピル-β-シクロデキストリン(HP-β-CD)の有効性に関する研究として経鼻ワクチンのアジュバントへの可能性を検討した。HP-β-CDは経鼻のアジュバントとして抗原特異的抗体価の増強を誘導し、気道および鼻腔中のIgAの誘導が認められた。経鼻アジュバントとしてのHP-β-CDの作用機序

を解析したところ、IL-33 依存的にアジュバント活性が誘導されることが明らかとなり、さらに IL-33 欠損マウスでは HP- β -CD を用いた経鼻ワクチンでは HA 抗原特異的な抗体は誘導されず、インフルエンザ感染に対するの防御免疫も著しく低下していた。さらに 2 型自然リンパ球の欠損によりアジュバント効果が低下することを認め、IgA の誘導には IL-33 による ILC2 の活性化が重要であると考えられた。また新たに IL-1 誘導型の低分子経鼻アジュバントを見出し、抗原と共に経鼻投与することで抗原特異的 IgG および粘膜面の IgA を誘導することを確認した。その作用機序として肺胞マクロファージのネクロトーシス誘導が重要であり、RIPK3 欠損により低分子経鼻アジュバントによる細胞死が抑えられ、さらにアジュバント活性の部分的な低下も認められた。

HP- β -CD を使用したインフルエンザワクチンの臨床試験検体および、核酸アジュバントを用いたがん治療の臨床試験検体を用いて、抗原特異的な免疫学的プロファイリング解析を行った。

(2) 食事、腸内細菌、代謝とアジュバント効果についての解析

腸内細菌由来物質などをシーズとしたアジュバント開発や、腸内細菌叢データや食事などの生活習慣とワクチン効果を含む免疫指標などがリンクしたヒトコホートやマウス実験のデータを活用し、ワクチン効果など免疫制御に影響を与える腸内環境因子の検索を行なった。菌体由来分子については、パイエル板などの腸管のリンパ組織内部に共生する細菌であるアルカリゲネスの菌体成分であるリポポリサッカライド (LPS) を精製し、皮下や経鼻ワクチンに対するアジュバントとしての有効性を見出した。さらに LPS の活性中心である Lipid A についても化学合成を確立すると共に、本 Lipid A が抗原特異的な免疫応答を増強し、経鼻ワクチンとして使用した際には肺炎球菌の呼吸器感染を防御出来ること、さらにインフルエンザ桿菌に対するワクチンのアジュバントとしても有用であることを明らかにした。アルカリゲネス Lipid A の構造に基づくユニークな LPS 活性により、アルカリゲネス菌は大腸菌に比べて樹状細胞における一酸化窒素の誘導活性を低く保つことで、アルカリゲネス菌がパイエル板の樹状細胞内で共生関係を築くことができることを見出した。本成果をもとに、企業と共同で非臨床試験を開始し、実用化に向けた研究を進めると共に、研究用試薬としても販売が開始されている。

食事・栄養に関して、必須脂肪酸として知られるオメガ 6 脂肪酸の一つであるリノール酸を起点に産生されるロイコトリエン B₄に着目した。ロイコトリエン B₄の受容体である BLT1 は、アレルギーや炎症反応に関わる好中球や好酸球などの細胞に発現し、炎症部位への遊走に重要な役割を果たすことが知られていたが、抗体産生における機能は不明であった。そこで腸管 IgA 産生における BLT1 の機能解明を行った結果、腸管免疫の誘導組織として働くパイエル板において、IgM 陽性ナイーブ B 細胞では BLT1 の発現は認められなかったものの、IgA にクラススイッチした IgA 陽性 B 細胞では BLT1 の発現が認められ、腸管粘膜固有層に存在する IgA 陽性形質細胞にも BLT1 が高発現することを見出した。さらに詳細な解析を行ったところ、BLT1 を介したシグナルが MyD88 の発現を増加させることで形質細胞の腸内細菌依存的な細胞増殖を亢進し、その結果、経口ワクチンにおける抗原特異的 IgA 産生を促進することを明らかにした。実際に、BLT1 欠損マウスでは経口ワクチン抗原に対する腸管 IgA 産生が野生型マウスに比べて減弱し、コレラ毒素を経口ワクチンした場合に得られる毒素中和効果が全く得られず、下痢の発症を抑制できないことが判明した。これらの結果から、食事として摂取するリノール酸やアラキドン酸に代表されるオメガ 6 脂肪酸を摂取し、ロイコトリエン B₄-BLT1-MyD88 シグナルが十分に作動する栄養状態を作っておくことが自然アジュバントとして機能すること、さらに同経路を活性化出来る化合物は腸管 IgA 抗体を増強出来るアジュバントになりうることを示唆された。その他、食餌性脂質由来代謝物による抗アレルギー、抗炎症型アジュバントとしての可能性を示した。これら成果について、食品メーカーと共同で実用化に向けた検討を進めている。

ヒトにおける食事や腸内環境による自然アジュバント効果を検討するため、コホート研究に参加された健常者を対象にした季節性インフルエンザに対する抗体価を分析した結果、抗体価と関連する環境因子を同定した。現在は、動物モデルでの検証やメカニズム解明を進めるとともに、実用化に向けて製薬メーカーと共同研究を開始している。

(3) 霊長類を用いたアジュバントの解析

サル/ヒトキメラエイズウイルス (SHIV) に抗酸菌由来のアジュバントである Ag85B を組み込んだ SHIV-Ag85B を作製した。このウイルスは感染直後に非常に強い SHIV 特異的細胞性免疫を誘導し、速やかに血漿中から消失することが確認され、さらに PBMC 中の proviral DNA も消失していることが確認された。また、この SHIV-Ag85B 非検出ザルにおいて強毒株である SIV89.6P を接種したところ、感染後 20 週目までは感染が確認されたが、その後ウイルスが排除されていることが判明した。さらに、強毒株 SHIV 接種初期において抗原特異的 IFN- γ 産生細胞の強い誘導を認め、マルチサイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL2) 産生をフローサイトメトリーで解析した結果、IFN- γ , TNF- α , IL2 産生 CD8+T 細胞や IFN- γ , TNF- α 産生 CD8+T 細胞の誘導を確認した。また強毒株制御の個体について、CD8 抗体投与試験 (CD8+細胞喪失実験) や感染細胞移植試験を実施したところ、半分以上のサルでウイルスの再活性化を認めなかった。

SHIV-Ag85B 感染サルを用いて、アジュバント抗原 Ag85B に対する細胞性免疫応答の検討を行なった結果、感染後、2 週および 4 週の PBMC において Ag85B 遺伝子の発現を確認した。この感染サルの PBMC を用いて Ag85B およびウイルス抗原 (SIVGag) 特異的な IFN- γ ELISPOT 法を行った結果、アジュバント Ag85B に対する応答は低値を示した一方で、SIVGag 抗原に対する応答は高値を確認し、アジュバントに対する免疫原性は低いことが示唆された。

(4) バイオインフォマティクス解析によるアジュバントの評価

アジュバント投与による mRNA、miRNA 発現変動を格納・解析するプラットフォームの開発において、収集したマイクロアレイデータ (miRNA、mRNA) の格納を完了した。MiRNA と mRNA の発現プロファイルを同時に閲覧することが可能となるデュアルテーブルを導入し、ユーザーが選択した miRNA とその標的となる mRNA の制御関係をネットワークとして描画する機能を実装した。この時、miRNA のデータベースである MiRTarBase と MirDB に格納された情報を参照するだけでなく、ヒト miRNA 配列全域から深層学習 (MiRAW) により標的遺伝子を予測した結果を追加した。更に、データベース上で選択した miRNA/mRNA の制御ネットワークを上記データベース/予測結果を基に可視化し、アジュバント投与群においてコントロール群と比較して発現量がどのように変動したかを色で示す interactive network analysis 機能を実装した。これにより、アジュバントによってどのように miRNA-mRNA 制御ネットワークが影響を受けるのかに加え、実験条件の違う 2 つのデータ間での差異を簡便にデータベース上で比較可能となった。また、これまでに収集したアジュバントデータベースのデータを機械学習 (人工知能開発の基盤となる技術) で解析し、血中 miRNA からアジュバントの安全性予測を試みた。各種アジュバント投与後に取得された mRNA 発現プロファイルより、特徴的な発現パターンを有するアジュバントグループを検出し、このグループにおいて変動する遺伝子についてエンリッチメント解析を実施した結果、これらの遺伝子がアジュバントによる副作用によるものである可能性が示唆された。更に、血中 miRNA のプロファイルからこれらのアジュバントグループを予測するモデルを作成し、血中 miRNA がアジュバントによる副作用を評価するバイオマーカーとして活用できる可能性を示した。アジュバントデータベース構築に利用している技術をパッケージ化し、Panomicon というデータベース構築支援ツールとしてリリースした。また、Panomicon に WGCNA (weighted gene correlation network analysis) による解析機能を追加し、より高度なデータ解析をデータベース上で実行することが可能となった。さらなるアジュバントデータベースの高度化を目的として、フロントエンド web アプリケーションフレームワークを最新技術に置き換える改良を進めた。これにより、データ解析時のセットアップやデータ格納がより簡便なシステムとなっている。更に、アジュバントデータベースの公開に向けた準備として、ユーザーロール別にアクセス制限をかける仕様に変更した。

Research background and objectives

Adjuvants, which are mainly used as enhancer for immunogenicity of vaccines against infectious diseases, are recently expected for wider therapeutic applications for cancer, allergy and so on. However, adjuvants are currently considered as excipients, defined as no biological activity. Furthermore, the most relevant guideline issued by WHO is basically for adjuvanted vaccines, not prepared for adjuvant as a singular immuno-regulatory drug. Under such circumstances, a new guideline and nonclinical evaluation method for adjuvant as an immunoregulatory drug, to develop the next-generation adjuvants with innovative evaluation systems for safety and efficacy, is an urgent task. Although one of important evaluations of adjuvant is to clarify the mode of action (MOA) in immune responses, the mechanisms of adjuvant effects of current adjuvants are still unclear. Novel guideline and evaluation method focusing on MOA is necessary for promotion of development of new adjuvant. Conventional methods for adjuvant evaluation have been focused on the mechanisms of recognition of adjuvant, signal transduction and cytokine/chemokine release evoked by adjuvant in immune cells. With the advances of immunology and experimental techniques, novel evaluation methods such as 1) in vivo bio-distribution of adjuvant, 2) Trans-omics analysis and biomarker hunting based on gene-array and microRNA array, 3) sensitivity difference to the effect of adjuvant caused by difference of food and metabolism as an individual difference, and 4) efficacy and safety evaluation by the model of non-human primate and extrapolation of animal research to humans are required. Therefore, research groups excelled in each research field gather and build-up a systematic evaluation method for adjuvant from each research achievements.

The purpose of this research group is the establishment of novel evaluation method that utilizes both new findings and data from adjuvant data-base project. In addition, we also aim that each research group investigates adjuvant innovation that is based on a novel evaluation method, makes practicable with pharmaceutical companies.

Results

(1) Screening of novel adjuvant and MOA analysis

As a novel adjuvant development, we screened the candidate of adjuvants using herbal medicine extracts, cationic proteins, and self-assembly low molecular-weight compounds. For herbal medicine extracts, we identified several parameters related to adjuvant effect by machine learning and established the screening method. In addition, we discovered a compound cholicamide as candidate of adjuvant among 8000 self-assembling compounds,

We also utilized HP- β -CD as intranasal vaccine adjuvant. HP- β -CD induced antigen-specific antibody responses and induced antigen-specific IgA in the trachea and nasal cavity. As a mode of action of HP- β -CD, we found IL-33-induced ILC2 activation is required for antigen-specific IgA response. We also identified the IL-1-inducing mucosal adjuvant that potently induced antigen-specific IgG and mucosal IgA.

We also performed antigen-specific human immune profiling using phase I clinical trial samples of Influenza vaccine using HP- β -CD as adjuvant and cancer therapy using nucleic acid adjuvant.

(2) Natural adjuvant effects of dietary and microbial components and metabolites

We researched immunomodulatory functions of dietary and microbial components and metabolites in order to develop a novel adjuvant. Regarding an intestinal bacterium-derived component, we focused on a lipopolysaccharide (LPS) and its active site, lipid A, of *Alcaligenes*, a bacterium that lives symbiotically in Peyer's patches, and found its effectiveness as an adjuvant for subcutaneous and nasal vaccines against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus Influenzae*. With regard to diet and nutrition, we focused

on Leukotriene B₄ (LTB₄), a metabolite produced from dietary linoleic acid. LTB₄ and its receptor BLT1-axis enhances the proliferation of commensal bacteria-dependent IgA⁺ plasma cells through the induction of MyD88 and thereby plays a key role in the production of antigen-specific intestinal IgA for oral vaccination. In addition, we identified several dietary and microbial immunomodulatory compounds in animal models and human cohort study and started non-clinical studies in collaboration with pharmaceutical manufacturers.

(3) Efficacy and safety evaluation of adjuvant by the non-human primate model

A live *nef*-deleted simian-human immunodeficiency virus to express the adjuvant molecule Ag85B (SHIV-Ag85B) was genetically constructed and assessed vaccine effects in cynomolgus macaques. The SHIV-Ag85B could not be detected 4 weeks after injection in cynomolgus macaques. Moreover, most of macaques inoculated with SHIV-Ag85B showed protective effects against the intravenous challenge of pathogenic SHIV89.6P, and viral RNAs remained undetectable for more than 200 weeks. Remarkably, eradication of SHIV89.6P was confirmed by an adoptive transfer experiment and CD8⁺ cell depletion study. In these macaques, SHIV antigen-specific CD8⁺ T cell responses with polyfunctionality were rapidly induced in the acute phase of SHIV89.6P challenge. The results suggest that SHIV-Ag85B elicited strong sterile immune responses against pathogenic SHIV and that it may lead to the development of a live vaccine and cure for AIDS virus infection.

(4) In silico evaluation of adjuvants

We have completed the storage of collected microarray data (miRNA and mRNA) to the adjuvant database. This platform enables users to view miRNA and their targeted mRNA expression profiles simultaneously, to draw these regulatory relationship as a network. We demonstrated that serum miRNAs can be used as biomarkers to evaluate adverse effects caused by adjuvants. The technology used to construct the adjuvant database was released as a database construction support tool called Panomicon.