

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：アジュバントを応用した免疫寛容誘導ワクチンに関する研究

Study of adjuvant for the tolerogenic vaccine development

研究開発実施期間：令和3年9月15日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：小檜山 康司

Koji Kobiyama

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 准教授

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

II 研究開発の概要

本研究開発課題では、AMED 創薬基盤推進研究事業 アジュバント安全性評価データベースの構築研究の成果であるアジュバントデータベースを利用し、アジュバントおよびアジュバント候補物質を用いた免疫寛容誘導アジュバントのスクリーニングを行うことで、非感染症疾患ワクチン開発の基盤構築を目指した。具体的には下記の成果が得られた。

(1) 抗原特異的免疫寛容誘導アジュバントの免疫学的スクリーニング

免疫寛容誘導アジュバント同定のため、自己由来ペプチドを抗原として、14種のアジュバントを用いて抗原特異的サイトカイン産生を評価した。また、本研究課題において動脈硬化症を標的疾患と設定したため、抗原として動脈硬化症関連タンパク質由来ペプチドを用いた。マウスにペプチドとともに各種アジュバントを野生型マウスに接種し、脾臓やリンパ節、腹腔洗浄液を回収し、抗炎症性サイトカインである IL-10 を一つの指標として抗原ペプチド特異的獲得免疫応答の解析を行なった。結果として、TLR9 のリガンドである CpG オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) と STING のリガンドにおいて抗原特異的 IL-10 の産生がペプチド単独免疫群と比べ強く誘導されていることが確認された。

(2) アジュバントデータベースを用いたアジュバントのスクリーニング

アジュバントデータベースのプラットフォームを用い、negative regulation of immune response (GO: 0050777) および tolerance induction (GO: 0002507) に含まれる遺伝子群に関して、各種アジュバントによる誘導能の解析を行なった。また、トキシコゲノミクスデータベースである Open TG-GATEs のデータを用いて、同遺伝子群の発現変動を惹起する低分子化合物を抗原特異的免疫寛容誘導アジュバントの候補物質としてスクリーニングする解析を行なった。解析結果として、マウスのリンパ節において、いくつかのアジュバントが投与後に negative regulation of immune response (GO: 0050777) および tolerance induction (GO: 0002507) に含まれる遺伝子を誘導していることを示し、その中には(1)で同定した STING のリガンドも含まれていることが示された。さらにラットを用いた解析

においても、比較的類似のアジュバントが同様の遺伝子群の発現を誘導していることが示され、これらアジュバントを POC の取得実験へと用いることとした。

(3)自己抗原、非自己抗原を用いた免疫寛容誘導機序の解明

自己および非自己抗原に対するアジュバントによる獲得免疫誘導能の違いを明らかとするために、卵白アルブミン (OVA)を恒常的に発現している OVA トランスジェニック (Tg)マウスを導入した。動脈硬化症ワクチンのアジュバントとして有用性を示したスクアレンアジュバントおよび(1),(2)により候補アジュバントとして同定した CpG ODN または STING のリガンドを使用し、OVA 特異的獲得免疫応答の誘導に関して解析を行なった。スクアレンアジュバントを用いた実験では、OVA Tg マウスにおいて野生型のマウスと比較し抗原特異的抗体の誘導は抑制された一方で、抗原特異的 IL-10 産生は強く誘導されていることが確認されたことから、抗原の自己・非自己の違いが抗原特異的な免疫寛容の誘導には重要であることが示唆された。さらに、CpG ODN および STING リガンドを用いた実験においても、OVA Tg マウスでは抗原特異的抗体誘導が減少するとともに、抗原特異的 IL-10 産生が強く誘導されることが確認された。これらの結果から抗原の違いが免疫寛容誘導には重要であると考えられるものの、CpG ODN を第一の候補アジュバントとして動脈硬化症モデルマウスを用いて有効性確認のための実験 (4)を行なった。

(4)モデルマウスを用いたワクチンとアジュバントの有用性解析

動脈硬化症モデルマウスである Apoe 欠損マウスに、コントロール群として動脈硬化症関連タンパク質由来ペプチド、そしてペプチドにスクアレンアジュバントを加えたもの、さらにはペプチドに(1), (2), (3)で候補アジュバントとして得られた CpG ODN を加えて、それぞれマウスに免疫を行なった。初回免疫から2週間後に高コレステロール・高脂肪食へと変更し、動脈硬化症の発症を亢進させた。高コレステロール・高脂肪食を与えてから10週間後にマウス大動脈、心臓、リンパ節、脾臓、腹腔洗浄液を回収した。動脈硬化症病変を評価するために、大動脈をパラホルムアルデヒドで固定した後に、動脈硬化症病変部位をズダン IV で染色した。動脈硬化症病変部位を解析および定量し、ワクチンによる有効性の評価を行なった結果、スクアレンアジュバントを用いた群においては動脈硬化症病変部位の減少が確認されたものの、CpG ODN を用いた群では著しい変化は確認できなかった。さらに、異なる動脈硬化症モデルマウスである Ldlr 欠損マウスを用いて STING リガンドにおける動脈硬化症病変部位の解析を同様に行なった。免疫および高コレステロール・高脂肪食の期間は Apoe 欠損マウスと同じプロトコルを用いた。その結果として、ペプチド+スクアレンアジュバント群に関しては、Apoe 欠損マウスを用いた実験と同様に病変部位の減少が確認されたものの、STING のリガンドを用いた群では著しい変化は確認されなかった。

(5)モデルマウスを用いたワクチンとアジュバントの作用機序解析

(4)で行なった実験で用いたマウスの臓器および腹腔洗浄液を回収し、抗原として用いたペプチドで最刺激を行い、抗原特異的な獲得免疫応答の評価を行なった。具体的には、ペプチドで再刺激し24時間後の培養上清を回収し炎症性サイトカインの指標である IFN-g と抗炎症性サイトカインの指標である IL-10 の産生に関して評価を行なった。

Apoe 欠損マウスにおいて、スクアレンアジュバント接種群および CpG ODN 接種群ともに抗原特異的 IL-10 産生の増強が確認されたものの、スクアレンアジュバント接種群では IFN-g 産生が誘導されなかったのに対して、CpG ODN 接種群では抗原特異的 IFN-g 産生が著しく増強されているのが確認された。

上記と同様の実験を(4)で使用した Ldlr 欠損マウスの実験に関しても行なった。結果として、スクアレンアジュバント接種群では抗原特異的 IL-10 産生が確認されたが、IFN-g 産生は確認されなかった。一方で、STING リガンド接種群においては抗原特異的 IL-10 産生が強く誘導されたものの、抗原特異的 IFN-g 産生も強く誘導されていることが確認された。

今後の課題

本研究課題を遂行することで、モデル抗原を用いた実験においては抗原特異的 IL-10 を誘導する候補アジュバ

ントが、アジュバントデータベースおよびマウスを用いた実験において同定することができたものの、疾患モデル動物を用いた実験においては有効性を示すことはできなかった。抗原特異的免疫応答の解析により、炎症性サイトカインである IFN-g の産生が強く誘導されたことが、有効性が得られなかった原因だと考えられる。そのため、抗炎症サイトカインや抗炎症遺伝子群のみならず、炎症性反応に関しても、データベースを駆使して探索を行う必要があると考えられる。さらに、今回新たに Ldlr 欠損マウスにおいてもスクアレンアジュバントが動脈硬化症ワクチンのアジュバントとして有用であることが示されたことから、スクアレンアジュバントの遺伝子発現に類似する化合物やアジュバントを探索することが、免疫寛容誘導ワクチンの基盤構築には重要だと考えられる。また、遺伝子発現プロファイルを用いてデータ駆動的に免疫寛容誘導型アジュバント候補を探索するため、トキシコゲノミクスデータベース Open TG-GATEs を用いた *in silico* スクリーニングを実施しており、得られた遺伝子発現プロファイルを用いて、免疫寛容誘導に関わる遺伝子の発現を誘導する化合物の同定を目指す。今後もこれらの研究を継続することで、免疫寛容ワクチンの詳細な作用機序を明らかとしている。

Summary

This research aims are (1) identify the optimal adjuvant for tolerogenic vaccine against non-communicable diseases and (2) understand the mechanisms of tolerogenic vaccines. To identify the candidate of adjuvants, we utilized Adjuvant Database for innate immune profile and performed animal experiments for adaptive immune profiles. Adjuvant Database contains candidates of biomarker for safety and efficacy of adjuvants and the marker for the induction of immunotolerance. Animal experiment using self and non-self antigen with many types of adjuvant candidates will provide character of T cell phenotype. These innate and adaptive immune profiles will reveal the biomarker of tolerogenic responses and identify the candidate of adjuvants.

Based on the Adjuvant Database analysis, we found that TLR9 and STING ligand induce the several gene sets in negative regulation of immune response (GO: 0050777) and tolerance induction (GO: 0002507). Animal experiments also showed that TLR9 and STING ligand induced antigen-specific IL-10 induction from immunized mice when we used OVA as an antigen. These results suggested that these ligands might be the candidate for tolerogenic vaccine adjuvant, and we selected these adjuvants for the proof-of-concept study. In this research, we decided atherosclerosis as target diseases because atherosclerosis cause of the cardiovascular diseases that number 1 killer in the world. We used atherosclerosis-related protein-derived peptide as vaccine antigen and used squalene-based adjuvant as positive control. Two weeks after first antigen peptide with TLR9 ligand immunization in atherosclerosis prone mice (*ApoE*-deficient mice), we changed the diet from chow diet to high cholesterol diet to accelerate atherosclerosis progression. After several time immunization, we collected aorta and atherosclerosis plaques were stained by Sudan IV. En face lesion area in aorta were quantified using ImagePro software. Although squalene-based adjuvant immunized mice reduced atherosclerosis lesion area, TLR9 ligand immunized mice could not reduce. We also performed similar experiment using different atherosclerosis prone mice (*Ldlr*-deficient mice) and STING ligand. Similar to the *ApoE*-deficient mice and TLR9 ligand, immunization with antigen peptide with STING ligand could not reduce atherosclerosis lesion area, although squalene-based adjuvant reduced. To understand the adaptive immune responses in *ApoE*- and *Ldlr*-deficient mice after immunization, we collected spleen and peritoneal lavage, and stimulated with antigen peptide. After antigen stimulation, we measured antigen-specific IFN- γ and IL-10 production using culture supernatants. Although squalene-based adjuvant immunization induced only antigen-specific IL-10, TLR9 and STING ligand significantly induced both IL-10 and IFN- γ after antigen-peptide restimulation. These results suggested that several adjuvants have a potential to induce antigen-specific anti-inflammatory cytokines but also induce antigen-specific inflammation to progress diseases.

We identified candidate adjuvants that induce antigen-specific IL-10 using model antigens in the adjuvant database and in experiments using mice. However, these adjuvant candidates could not demonstrate efficacy in experimental atherosclerosis model mice. Analysis of antigen-specific immune responses suggested that the strong induction of IFN- γ , an inflammatory cytokine, was the reason for the lack of efficacy. Therefore, it might be necessary to search not only for anti-inflammatory cytokines and anti-inflammatory gene clusters, but also for inflammatory responses using Adjuvant Database. Since squalene adjuvant was newly shown to be useful as an adjuvant for atherosclerosis vaccine in *Ldlr*-deficient mice, the search for compounds and adjuvants that have similar gene expression of squalene adjuvant is key for immune tolerance induction vaccine.