

日本医療研究開発機構 ワクチン・新規モダリティ研究開発事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) Th1 アジュバント・ARNAX を用いたインフルエンザ成分ワクチンの開発研究
(英 語) An influenza subcomponent vaccine with Th1 adjuvant ARNAX

研究開発実施期間: 令和 5 年 11 月 1 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 瀬谷 司
(英 語) Seya Tsukasa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 学校法人青森山田学園 青森大学・付属青森ねぶた健康研究所・所長／特任教授
(英 語) Aomori-Yamada Gakuen Aomori University, Nebuta Research Institute for Life Sciences
Director Tsukasa Seya

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

はじめに

健常人対象のワクチンは有効性に加えて頻回接種や接種後の副反応が問題となる。現行のヒトのインフルエンザsplit vaccine (SV)は副反応こそ少ないが、効果に劣り毎年の接種を必要とする。回数を減じて免疫を維持できればパンデミック時の集団免疫の獲得、ワクチン製造の費用も削減できる。炎症毒性ないアジュバントARNAXをヒトのインフルエンザSV単価ワクチン(*1) (Th2指向性)に添加すると1. 炎症毒性なしに 2. Th1指向性のワクチンとなり、3. 強い細胞性免疫が起動する。4. さらにHA特異抗体価はアラムに優りスクアレン (*2) に近似、5. Th1シフトに基づくTfh (*3) とGCB(*4)の上昇に伴う親和性の強い抗体産生が期待できる。SVワクチンにARNAXを加えるだけで安全性を保持しながら抗体価非劣性、細胞性免疫記憶に優れたインフルエンザワクチンを提供できる。

ARNAXはヒト抗原提示樹状細胞 (CD141+DC) のTLR3のみを標的とするDNA/RNAハイブリッドの核酸アジュバントである。サイトカイン血症など副反応を誘起せずに交差抗原提示とT/Bリンパ球の活性化を起動することが皮下投与の動物実験から判明した。即ち免疫は炎症と独立に成立するという知見がARNAXによって導かれた。このこととARNAXが生体で天然型核酸に分解され血中に検知量を超えて検出されないことから、従来の概念を超えた安全な免疫増強の方法を本樹状細胞標的性のアジュバントの発明によって提示しえた。

比較試験

これまでアラム、スクアレンが多くの感染症予防ワクチンに使われてきた。アラム、スクアレン (Addavax) をSVのアジュバントとしてSVとともにマウスに皮下投与した。アジュバントは添付書に記載の溶媒を用いたのでPBS溶解のARNAXとアラムに対しaddavaxの溶媒は相違がある。アラム、スクアレンは常用量でTh2 指向性で抗体価を上げたがCTL誘導は観察されなかった。ARNAXのみがCTLを誘導した。但し、CTL誘導には高いSV抗原量 (15 μ

g/head) を必要とした。なお、評価系はNPタンパク質のテトラマーアッセイを用いた (HAに相応しいHAテトラマーアッセイ系は未開発だった)。IFN- γ アッセイを併用してCTL誘導の評価を補完した。

TLRアジュバントはインフルエンザワクチンでは未認可だが TLR4, 7, 9が治験を繰り返してきた。これらはヒト抗原提示樹状細胞に発現せず、全てMyD88という炎症誘起性のアダプターと連動する。従って、全身性のサイトカイン血症を回避できず安全性に難がある。1 部のTLR4、TLR9アゴニストが限られた感染症ワクチンに適用されているが、多くは承認もされていない。ARNAXはアラム以上の有効性・MyD88アジュバント以上の安全性を担保するTLR3特異的アジュバントであることが示された。

安全性試験

炎症性サイトカインを遊離させないアジュバントを安全性の規範とした。polyI:Cが2重鎖RNAの典型として長くTLR3アゴニストとして使われてきたが、長さを設定できる作製法ではないため、ロットごとに規格が不均一で品質が定義できない。そのためアジュバントとして承認認可されていない。他に標準品がないのでpolyI:C+SV、アラム+SV、スクアレン+SVのサイトカイン誘導活性をARNAX+SVと比較した。Day0, day14にワクチンの反復投与を行い、各3時間、6時間後のサイトカイン上昇をLegendplex (BioLegend) でFACS査定した。結果はpolyI:C+SVが高い炎症性サイトカイン誘導を起こすのに対し、ARNAX+SVは微量のサイトカイン誘導に留まった。スクアレン+SVも中等量のIL-6を誘導したがアラム+SVは炎症性サイトカインを誘導しなかった。一方、IL-12, IP-10などTリンパ球活性化や遊走に関する因子はARNAX+SVで上昇したがアラム+SV、スクアレン+SVでは上昇しなかった。従って、ARNAXはサイトカイン血症を誘起しないことでpolyI:Cに優り、Tリンパ球活性化を起動することでアラム、スクアレンに優ることが判明した。このことはアラム、スクアレンが本質的に樹状細胞を標的にするアジュバントではないことと符合する。以上からARNAXは細胞性免疫の起動が必要な感染症ワクチンに普遍的に提供できることが推察される。

ウイルス感染防御試験

マウス (C57/BL6) をA/Victoria/1/2020 pdm09 (H1N1) で2回免疫し、同株 (Victoria) でチャレンジした。3000pfuのドーズでも各アジュバント+SV免疫群では感染後の体重減少が抑制され、感染死は回避された。どのアジュバントも2回免疫後中和抗体価を遜色なく上げた。一方、同様な2回免疫マウスを異株 (PR8) でチャレンジすると3~1200pfuのドーズ範囲で体重減少が確認され、感染の成立が認められた。アジュバントの種類に拘らず交差免疫による防御効果の増強は観察されなかった。PR8に対する中和抗体価もアジュバントの種類に拘らず上がらなかった。以上から交差免疫活性はVictoria-PR8間で液性免疫では成立していないことが示唆された。Victoriaと他の株間同士の交差免疫の成立は時間切れのため中断した。

インフルエンザ感染症でCTLの交差免疫活性を査定する系は確立されていない。ARNAXのCTL誘導活性の呼吸器感染における重要性を示唆するデータとして肺内CTLの浸潤を剖検後に査定した。高い肺内CTLの浸潤が見られる個体が散見されたが浸潤が見られない例もあり、CTL誘導の感染防御への機序は検討中である。期間内に感染回避とCTL誘導性アジュバントのワクチン投与における優位性を証明できるに至らなかった。

生体内分布試験

新規アジュバントの場合、投与後の動態試験、臓器分布を調べる必要がある (感染症ワクチン非臨床ガイドライン・厚生省2024)。現在進行中で5月末までに終了報告書に提示する予定である。

意義

TLR3を除く全てのヒトTLRはMyD88をアダプターにとる。TLR3のみは例外的にMyD88でなく、TICAM-1をアダプターに取る。更にTLR3は抗原提示樹状細胞に高発現し、交差抗原提示 (cross-antigen presentation) を起動する。そのためARNAXはTh1指向性のCTL誘導 (細胞性免疫) を惹起するアジュバントとして機能する。ARNAXは生体内分布試験で速やかに代謝されるため全身細胞に波及せず、細胞内RNAセンサー (RIG-I/MDA5) を活性化せず炎症性サイトカインを上げないことが非臨床、生体内分布試験から想定された。リンパ球活性化や誘引に必要なIL-12、IP-10などはARNAXもpolyI:Cと同等程度上げるので炎症なく記憶免疫を起動するという特異なワクチンアジュバントとして機能できると推定された。これらの知見はがん治療ワクチン領域の実験とも符合する。

我々は本趣旨を満たす核酸アジュバントARNAXの化学合成法を確立し、副反応ないがんワクチン、感染症予防

ワクチンが創造できることを非臨床試験で証明してきた。本企画ではSV抗原 + ARNAX ワクチンの非臨床 POC を取得したが、Ph1 試験を展望するに至らなかった。理由の 1 つはインフルエンザの場合記憶免疫が誘導され難く CTL の成立する前に発症するというウイルスの性質によるのかもしれない。交差免疫の成立する株の選別、抗体と CTL のカバーする変異の相違など未解析な課題を残す。SARS-CoV-2, RSV など明らかに細胞性免疫が感染防御に重要な感染症に ARNAX ワクチンを適用しておれば養成結果が得られたと推測される。SV ワクチンは安全だが一過性の抗体増加のみを誘導する一方、長期記憶と細胞性免疫を起動できない。SV に限らず他の感染症ワクチンで ARNAX は Th1 アジュバント・細胞性免疫誘導剤としてメリットを付与する可能性がある。

パンデミックの時期・抗原の予測はつかず不経済な対策になりがちである。mRNA ワクチンだけで安全性や継続投与に問題がないか問われる感染症もありうる。安全なアジュバントを常備すれば変異抗原・特異抗原を要事調整してどんな感染症にも安全・有効な蛋白ワクチンを短期で提供しうる。

*1. SV: A/Victoria/1/2020pdm09 (H1N1)

*2. スクアレンは Addavax を用い AddaS03 は省いた。AddaS03 は TLR4 アゴニストの MPLA を含有するため接種部位に炎症性の腫瘍が頻発した。AddaS03 の中和抗体価は最高値を示したが、安全性重視のインフルエンザワクチンのアジュバントとしては適性が低いと判断した。

*3. Tfh は CD4 T の subset, follicular helper T 細胞。邦訳では濾胞性ヘルパーT 細胞。リンパ節、脾臓、パイエル板などの二次リンパ器官の B 細胞濾胞の外縁部にみられる

*4 GCB は germinal center B cell の略。リンパ節や脾臓などの免疫組織の濾胞内で形成される B 細胞で、抗体の性能を高める役割を担っている。

成果の説明

本研究期間に達成した成果を具体的に列記する。

1. マウス非臨床 POC 取得

- 全身性サイトカイン誘導: ARNAX+SV 皮下投与でサイトカイン血症が起きないことを証明。
- CTL 誘導試験: ARNAX のアラム・スクアレンに対する SV への CTL 誘導活性の競争優位性を証明。
- 抗体産生試験: 対照の市販ワクチンと比較して抗体産生に対する非劣性を確認。
- ウイルス感染防御試験: SV ワクチンと同株の Victoria 株でワクチンによる感染防御を証明。SV と異株の PR8 交差免疫活性は非検証。

2. 原薬製造: ARNAX GMP 合成が必須なので A 社とプロセス検討を行い、製造ルートを確定した。

- 製造の一貫性: ARNAX の品質評価を完了し、nonGMP 製造企画を最終化。
- GMP 合成ルートの確定: A 社の製造機を使って予約を入れたが、中断した。
- 長期保管 (2 年以上) における安定性の評価: ARNAX は -80℃凍結保存で 2 年以上活性を保持した。
- 節目ごとに試料の生物活性を計測し、標準品 (S 社が作製) との比較を行った。標準品の 95%以上活性があることを裁定基準にした。現在エンジニアリングバッチの手前で止まっている (製造のロードマップ)。

3. ARNAX の知財戦略

- PCT 出願を完了、各国移行は 2025 年 6 月。

4. 薬理学的基礎検討

- ヒト細胞性免疫の評価系確立: シングルセル解析により、アラムはミエロイド系の細胞集団を大きく減じると判明した。ARNAX と polyI:C は単球の炎症性サイトカインや 1 型 IFN 誘導経路を活性化する。DC では、IL6 や TNF- α の他に ISGs も発現が低く抑えられている。DC では、好気呼吸や骨髓系細胞の

分化などに関連する遺伝子の発現が高くなる。

- b) ARNAX 刺激による自然リンパ球 (ILC) の反応: ILC2 は ARNAX の樹状細胞活性化作用に影響しないが、*Ex vivo* のマウス系で ARNAX は ILC に働いて Th1 シフトを助長する可能性がある。ARNAX は ILC の 2 型免疫誘導機能を抑制し、Th1 優位の CD4 T 細胞応答を誘導する可能性を検討している。

Abstract

The purpose of this study is to submit ARNAX, a non-inflammatory, non-toxic adjuvant, for approval and to provide it for human influenza split vaccine (SV). ARNAX is a DNA/RNA hybrid nucleic acid adjuvant that targets only TLR3 of human antigen-presenting dendritic cells (CD141+ DC). Subcutaneous administration in animals has been shown to activate cross-antigen presentation and T/B lymphocyte activation without inducing adverse reactions such as cytokinemia. In other words, ARNAX has led to the knowledge that immunity is independently established from inflammation. This and the fact that ARNAX is degraded *in vivo* to natural nucleic acids and is not detected in the bloodstream in detectable amounts, make the invention of this adjuvant a safe method of immunopotentialization that goes beyond conventional concepts.

Alum and squalene have been used as adjuvants in many vaccines to prevent infectious diseases; TLR adjuvants have not been approved, but TLR4, 7, and 9 have been repeatedly tested. They are not expressed on human antigen-presenting dendritic cells and are all linked to an inflammation-inducing adaptor called MyD88. Thus, systemic cytokinemia cannot be avoided and safety is compromised. There is a need to develop an adjuvant that is more effective and safer than Alum, squalene or MyD88 adjuvants, and that can be used universally for vaccines against infectious diseases.

In contrast, only TLR3 exceptionally employs TICAM-1 as the adaptor instead of MyD88. TLR3 is highly expressed on antigen-presenting dendritic cells (XCR1+). Thus, ARNAX creates a favorable environment for Th1-biased CTL induction. We have established a chemical synthesis method for nucleic acid adjuvants that fulfills this purpose, and have demonstrated in preclinical studies that vaccines against cancer and infectious diseases can be created without adverse events. SV vaccines are safe but induce only a transient increase in antibodies, and fail to trigger memory and durable immunity. We were going to obtain a preclinical POC for an SV antigen + ARNAX vaccine, and look forward to a Ph1 study.

During this study period, we demonstrated the preclinical POC and safety of ARNAX + SV antigen, considered GMP manufacturing of ARNAX, established a standard API, working with SV antigen providers as noted below. Unfortunately, this ARNAX project has been discontinued from April 2025 by the decision of the SCARDA, due to the fact that within the time frame we were not able to prove the superiority of the infection avoidance by CTL-inducing adjuvant in SV vaccination.

The timing and antigens of a pandemic are unpredictable, and the countermeasures tend to be uneconomical. If safe adjuvants are always available, it is possible to provide safe and effective vaccines against any infectious diseases in a short period of time by adjusting mutant antigens or specific antigens as necessary, confirming the quality of the antigen for vaccine.

List of deliverables

1. Acquisition of mouse preclinical POC

- a) Systemic cytokine induction: Proved that ARNAX+SV subcutaneous administration does not cause cytokinemia.
- b) CTL induction: Demonstrated competitive advantage of ARNAX over Alum and squalene in inducing CTLs to SV.
- c) Antibody production: confirmed non-inferiority of ARNAX in antibody production compared to control commercial Th2 adjuvants.
- d) PR8 cross-immunity activity between SV (A/Victoria/1/2020pdm09(H1N1)) and other strains was not verified.

2. Manufacturing of drug substance: ARNAX GMP synthesis is required, so the process was reviewed with company A and the manufacturing route was finalized.

- a) Consistency of manufacturing: Quality evaluation of ARNAX was completed and non-GMP manufacturing plan was finalized.
- b) Finalization of GMP synthesis route: A reservation was made using company A manufacturing machine, but was suspended.
- c) Evaluation of stability in long-term storage (>2 years): ARNAX retained >95% activity for >2 years in frozen storage at -80°C compared with the standard lot (prepared by Sumitomo Chemical).
- d) Biological activity of the samples was measured at each milestone and compared with the standard. The ruling criterion was that the activity should be more than 95% of the standard product. Currently stopped before engineering batch (roadmap for production).

3. ARNAX's IP Strategy

- a) Completed PCT filing; country transitions are June 2025.

4. basic pharmacological studies

- a) Establishment of an evaluation system for human cellular immunity: single cell analysis revealed that Alum significantly reduces myeloid cell populations. ARNAX and polyI:C activate monocyte inflammatory cytokines and type 1 IFN-induced pathways; in DCs, expression of ISGs as well as IL6 and TNF- α are suppressed at low levels. In DCs, expression of genes related to aerobic respiration and myeloid cell differentiation is elevated.
- b) ARNAX controls the function of innate lymphocytes. ARNAX suppresses the type 2 immune-inducing function of