

令和元年6月21日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13046

研究課題名(和文) ワクチン・アジュバントのin vitro安全性予測/評価システムの構築

研究課題名(英文) Establishment of in vitro evaluation system for vaccine and adjuvant safety

研究代表者

佐々木 永太 (Sasaki, Eita)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・研究員

研究者番号：40762216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト末梢血単核細胞(PBMC)とバイオマーカー遺伝子を用いることでアジュバントの毒性や自然免疫活性化能の一部が評価可能であることが示された。さらに、バイオマーカー遺伝子は特に1型インターフェロン(IFN)誘導型アジュバントによって顕著に発現上昇を示し、PBMCに含まれる形質細胞様樹状細胞がその鍵となっていることが明らかとなった。また、ドナーによるPBMCの反応性の差は、毒性参照ワクチン添加時の遺伝子発現レベルを基準とした相対発現値を用いることで、減少(補正)できることを明らかにし、PBMC安全性評価系構築に向けて、大きく前進させるデータを得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ワクチンの副反応は自己免疫疾患や麻痺などの極めて重篤な副反応を招く可能性があり、安全性評価系の構築が急がれている。本研究では、世界に先立ちヒト末梢血単核細胞を用いたワクチン・アジュバントの安全性評価系の構築に取り組み、評価系構築に向け大きく前進する成果が得られた。ワクチンの副反応発症には個人差があり、ヒトでの反応を強く反映し、個人差を評価できる安全性評価系が強く求められている。PBMCを用いた評価系は動物を用いた試験等と異なり、ヒトの反応を直接的に捉えられること、また血液からの採取が可能であることからテラーメイドワクチン療法等への応用性が高く、本研究から得られた成果の社会的意義は非常に高い。

研究成果の概要(英文)：This study shown that by using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), cytokine productions and biomarker genes expression levels, it is possible to evaluate some of the adjuvant toxicity and ability of innate immune activation. Furthermore, the biomarker genes showed marked increase by type 1 interferon (IFN)-induced adjuvant, and it was revealed that plasmacytoid dendritic cells contained in PBMC has a key role in this reaction. In addition, it was revealed that the difference in the reactivity of PBMC by donors can be reduced (corrected) by using the relative expression value based on the gene expression level upon toxicity reference vaccine treatment. This study obtained data that made accelerating to build PBMC-based vaccine safety assessment system.

研究分野：免疫学、免疫毒性学

キーワード：インフルエンザワクチン 安全性評価系 アジュバント PBMC バイオマーカー 形質細胞様樹状細胞 免疫毒性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ワクチン接種は感染症予防において重要な手段である。現在、様々な感染症に対するワクチンがヒトに接種されているが、ワクチンによる副反応も一定頻度発生している。また、ワクチンの効果を高めるために、アジュバントの添加し、免疫原性を高めたワクチンの開発が精力的に行われている。しかし、高い免疫原性は副反応の誘発を招く恐れもあり、安全性の観点からも注視する必要がある。

ワクチンの安全性は、動物を用いた試験によって担保されている。近年、化学合成医薬品においては、その安全性評価系の研究開発が進んでおり、毒性発現機序に基づいた安全性評価法や、動物を用いない *in vitro* の迅速評価法などが開発されている。また、化学合成医薬品の安全性評価においては、iPS 細胞やヒト試料を用いた評価系の開発研究が進んでおり、実験動物の削減や、ヒトへの外挿を考慮した安全性評価の開発が精力的に行われている。

その一方で、ワクチンやアジュバントの安全性評価は、従来の動物を用いた体重減少試験等の評価法が中心であり、*in vitro* の代替試験法や、毒性発現機序に基づいた評価法の開発に関する報告は、少数に留まっている。従来の安全性評価法は、マウスやモルモットにワクチンを投与し、体重減少、白血球数や一般病理変化を指標にする試験法のため、動物福祉の観点からも、より苦痛の少ない試験法の開発が望まれている。一方で、ワクチンのような抗原による免疫毒性は動物実験においてヒトにおける反応を予測できない場合も多い。このように、ワクチン・アジュバントの安全性評価においても、化学合成医薬品と同様に、従来の動物実験に替わり、ヒトへの外挿や免疫毒性学的機序を考慮した新規評価システムの構築が望まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、動物を用いずかつヒトへの外挿を考慮した新規の「安全性予測・評価」システムの確立を目指すものである。申請者らは既に、各種のインフルエンザワクチン投与後のラット肺のマイクロアレイ解析により、肺に発現する 18 個の遺伝子発現が、毒性を持つアジュバントや全粒子不活化ワクチンで認められる副反応を予測する安全性評価マーカーとなり得ることを明らかにし (Vaccine, 2008, 26(18):2270-83.)、新規ワクチン安全性評価法として特許を出願している (特願 2016-195374)。さらに、この安全性評価マーカー遺伝子の多くは、リンパ球において発現が認められることを見出しており、PBMC による動物を用いない評価も可能であると考えられている。ワクチンおよびアジュバントは、最終的にヒトに接種されることから、ヒトでの安全性を評価する点で、ヒト由来の試料を用いた評価系が望まれる。

そこで申請者は、以前に動物実験から同定された安全性評価マーカー遺伝子が、動物を用いず、かつヒトの生体反応を反映した *in vitro* 安全性予測・評価マーカーとなり得るかについて、インフルエンザワクチン、アジュバントおよびヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を用いて検討をすることとした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では第一に、ラット肺から同定したマーカー遺伝子がヒト PBMC において発現し、さらにそれがマーカー遺伝子として機能するのかを各種ワクチン・アジュバントを添加し確認する。PBMC で発現するマーカー遺伝子の有用性が確認できた後、様々なアジュバントを用いて評価を行い、本系が評価系として有用であるかを検討し、評価系を確立させる。

(2) 第二の課題として、PBMC はヒト由来の試料であることから、PBMC のドナーごとに含まれる細胞集団の割合や、ワクチンやアジュバントに対する応答性が異なることが予測される。そこで、ドナーの年齢等 (成人・小児) を考慮し、少なくとも 3 lot 以上の異なるドナー由来の PBMC を実験に供し、得られた実験結果が普遍的な現象であるのかを検討し、評価系としての頑強性を検討する。

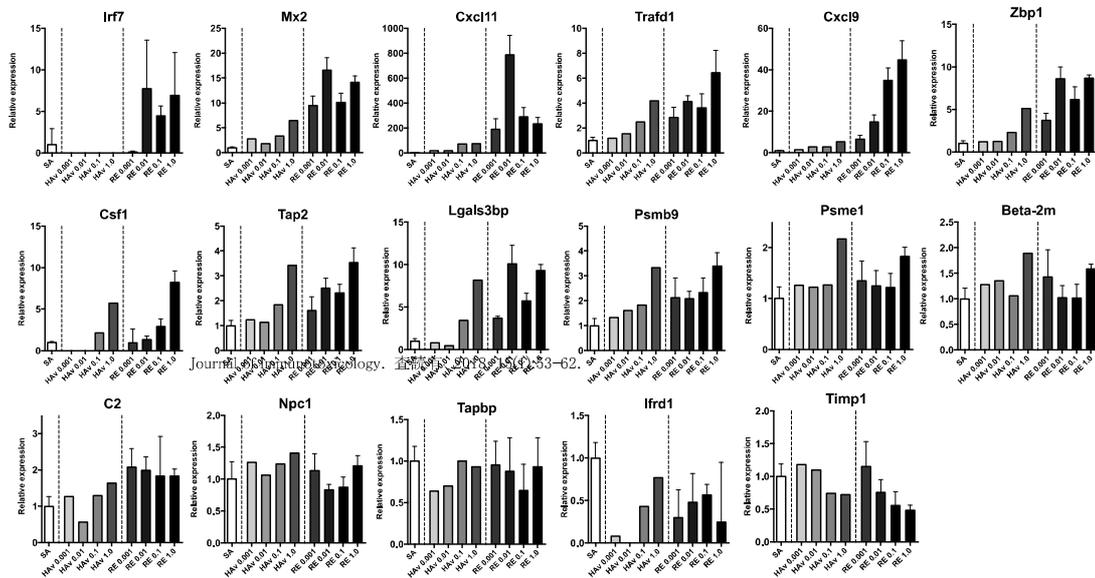
(3) 第三の課題として、ワクチン・アジュバントによる免疫毒性発現機序の解析を実施する。これまでに Poly I:C など、サイトカインストームを介した毒性を持つ事が知られているアジュバントによる炎症が複数報告されているが、その毒性発現機序に関してはほとんど明らかにされていないのが現状である。申請者はワクチン・アジュバント処置後の PBMC から放出される、炎症性サイトカイン IL-1、IL-6 や 1 型 IFN などのタンパク質濃度測定ならびに、PBMC 中の各種免疫細胞の応答に着目し、アジュバント

の免疫毒性発現機序の解明を実施する。

4. 研究成果

(1) ヒト PBMC に全粒子不活化インフルエンザワクチン (WV)、インフルエンザ HA ワクチン (HAV)、CpG K3またはPoly I:Cを添加し、安全性評価マーカー遺伝子 (マーカー遺伝子) の発現レベルを解析した。その結果、ヒトでの副反応が比較的高頻度で認められる Poly I:C および WV を添加した際には、一部のマーカー遺伝子の発現レベルが、無処置コントロールや副反応報告の比較的小さい HAV 添加時と比べて有意に上昇することを見出した (図)。これらの結果から、いくつかのマーカー遺伝子は PBMC を用いたワクチン・アジュバント評価に応用可能であることが示唆された。また、この時の培養液中のサイトカイン濃度を測定したところ、IL-6 や TNF-alpha などの炎症性サイトカインの分泌が認められた。これらのサイトカイン濃度は、マーカー遺伝子の発現レベルと相関傾向が認められた。このことから、バイオマーカー遺伝子は、ワクチン・アジュバントの炎症誘発性を反映している可能性があることを見出した。

(図) PBMCにおけるバイオマーカー遺伝子発現変動



SA:生理食塩水
 HAV:ヘマグルチニンスプリットインフルエンザワクチン
 RE:毒性参照ワクチン(全粒子不活化インフルエンザワクチン)

Journal of Immunotoxicology. 2018, 15(1):53-62. より引用

(2) バイオマーカー遺伝子を用いた最適試験条件について検討した。バイオマーカー遺伝子の発現レベルは、ワクチン・アジュバント添加 24 時間後に顕著に認められ、またアッセイに必要な細胞の播種密度等の条件を決定した。さらに、マーカー遺伝子の発現レベルを短時間で解析するための測定手法 (QuantiGene Plex (QGP) 法) についても構築した。

(3) ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) に各種アジュバント (R848, Pam3CSK4, DMXaa および Poly I:C) を添加した際の安全性評価マーカー遺伝子 (マーカー遺伝子) の発現レベルを解析した。また、複数ドナーの PBMC を用い、ドナー間のバイオマーカー遺伝子の発現変動応答の差を解析し、評価系としての安定性を評価した。その結果、バイオマーカー遺伝子発現応答は、1 型インターフェロン (IFN) 誘導型アジュバントである R848, DMXaa および poly I:C で顕著に認められた。このことから、PBMC とバイオマーカー遺伝子を用いた評価系では 1 型 IFN 関連のシグナルを主に検出していることが示唆された。

(4) ドナー間でのバイオマーカー遺伝子発現変動の差を解析したところ、ドナーにより、バイオマーカー遺伝子の発現変動幅がおよそ2-50倍程度あることが明らかになった。そこで、各ドナーのPBMCにおいて、バイオマーカー遺伝子を網羅的かつ顕著な発現上昇を誘導する毒性参照用ワクチン (RE) を添加した際の発現レベルに対する相対発現量を算出し、ドナー間の差が補正されるのかを検証した。その結果、3つの遺伝子を除き、ドナー間の反応性の差が減少することを見出し、評価系としての有用性が飛躍的に向上することが見込まれることを見出した。以上の成果より、試験系の基盤構築に成功した。

(5) バイオマーカー遺伝子発現の鍵となっている細胞を探索するため、1型IFN産生を担う形質細胞様樹状細胞 (pDC) をPBMCから単離し、pDCとそれ以外のPBMC含有細胞におけるバイオマーカー遺伝子発現量を解析した。その結果pDCでは、それ以外の細胞集団よりも、ワクチン添加によって誘導される遺伝子発現上昇レベルが顕著に高いことが明らかになった。さらに、pDCの割合を増加させたPBMCを作成したところ、このPBMCでは全粒子不活化インフルエンザワクチン (WV) や、アジュバント添加によるPBMC中の自然免疫関連遺伝子の発現上昇が、通常のPBMCよりも高値を示した。このことから、PBMCに含まれるpDCがWV, poly I:C や R848などの毒性発現を引き起こすワクチン・アジュバントの活性に重要であることが明らかにされた。以上の結果から、pDCの過剰な活性化による1型IFNの分泌と、それに続くサイトカイン分泌による自然免疫の活性化が、副反応発症に關与することが示唆された。以上の結果から、PBMCを用いた本試験系は特に1型IFNを活性化させるアジュバントの評価に有用であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

E. Sasaki, H. Momose, Y. Hiradate, T. Mizukami, I. Hamaguchi. Establishment of a novel safety assessment method for vaccine adjuvant development. *Vaccine*. 査読有、2018, 36(46): 7112-7118.
DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.10.009.

E. Sasaki, H. Momose, Y. Hiradate, K.J. Ishii, T. Mizukami, I. Hamaguchi. In vitro marker gene expression analyses in human peripheral blood mononuclear cells: A tool to assess safety of influenza vaccines in humans. *Journal of Immunotoxicology*. 査読有、2018, 15(1):53-62.
DOI: 10.1080/1547691X.2018.1447052.

〔学会発表〕(計4件)

佐々木 永太 ワクチンアジュバントのハイスループットスクリーニング系構築を目指した培養細胞による *in vitro* 評価系の構築 第11回 次世代アジュバント研究会、大阪、2018年1月

水上 拓郎、佐々木 永太、百瀬 暖佳、浅沼 秀樹、蒲地 一成、石井 健、浜口 功 ヒトPBMCsを用いたインフルエンザワクチンの *in vitro* 安全性評価法の開発とヒト化マウスによる *in vivo* モデルの構築 第21回日本ワクチン学会学術集会、福岡、2017年12月

佐々木 永太、百瀬 暖佳、平舘 裕希、古畑 啓子、水上 拓郎、浜口 功 ワクチン接種時の初期免疫反応を捉えるヒト化マウスモデルの作出ならびにワクチン安全性評価法への応用とその評価 第24回日本免疫毒性学会学術年会、青森、2017年9月

佐々木 永太、百瀬 暖佳、平舘 裕希、古畑 啓子、山田 宏、石井 健、水上 拓郎、浜口 功 マーカー遺伝子と統計学的手法を用いた新規アジュバント安全性評価系の構築 第44回日本毒性学会学術年会、神奈川、2017年7月

〔図書〕(計2件)

浜口 功、佐々木 永太、水上 拓郎「医学のあゆみ 近未来のワクチン-開発研究の潮流と課題」2018, 264巻, 5号, p477-p483 ワクチンの安全性試験の理論的構築、医歯薬出版株式会社

佐々木 永太、水上 拓郎、浜口 功「感染症ワクチンおよびアジュバントのレギュレーションと評価法」2017,p349-p354 次世代アジュバント開発のためのメカニズム解明と安全性評価、シーエムシー出版

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。