

1. 抗がん免疫アジュバント： 歴史から現状まで

瀬谷 司, 松本美佐子

微生物感染は通常炎症と組織傷害を伴う。この局所症状は微生物による直接の細胞傷害より宿主の免疫応答によるところが大きい。微生物は宿主免疫を強く増強する成分を含む。がん患者にこの微生物成分（アジュバント）を投与する試みは免疫系のしくみがわかる前の19世紀から試行され、副作用を伴いながらも有効例を見出してきた。微生物成分応答は自然免疫の機構解明にも役立った。アジュバントは微生物に似せて免疫系を増強させる物質の総称になる。本稿はアジュバントが合理的に抗がん免疫に導入されるまでの歴史と現状を総説する。

はじめに

免疫は宿主が非自己抗原に曝された際の応答をいう。抗原は自己以外の外来性の細胞でも内因性的の変異物質であってもよい。それは由来の問題ではなくその生物の免疫系に「自己ではない」とみえることに起因する。哺乳類の高次免疫系は遺伝子組換えにより非自己認識の多様性を獲得し、それは種ごとに異なる。いくら奇

妙な分子であっても免疫系がそれを異常と感知しなければ抗原たりえず、微妙な1アミノ酸変異であっても免疫系がそれに応答すれば抗原エピトープを形成する。ヒトにはヒト固有の免疫系がある。昔は倫理規制が甘かったので理論的裏付けや毒性試験が未熟なままにアジュバントを患者さんに使っていた。それらのデータはヒト自然免疫系の微生物応答を知る貴重な手掛かりになりうる。ヒト免疫系が抗原に応答する一般則か

【キーワード&略語】

PAMP, パターン認識分子, 樹状細胞, 腫瘍 DAMP, インターフェロン誘導経路, polyI:C

BCG : Bacillus Calmette-Guérin

BCG-CWS : BCG-cell wall skeleton
(BCG 細胞壁成分)

CTL : cytotoxic T lymphocyte
(細胞傷害性T細胞)

TLR : Toll-like receptor (Toll様受容体)

PAMP : pathogen-associated molecular
pattern (病原体関連分子パターン)

DAMP : damage-associated molecular pattern
(ダメージ関連分子パターン)

NK細胞 : natural killer cell
(ナチュラルキラー細胞)

Pam2 : 16 S-[2,3-bis (palmitoyl) propyl]
cysteine

Immune adjuvants revisited

Tsukasa Seya/Misako Matsumoto : Department of Microbiology and Immunology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University (北海道大学大学院医学研究科免疫学分野)

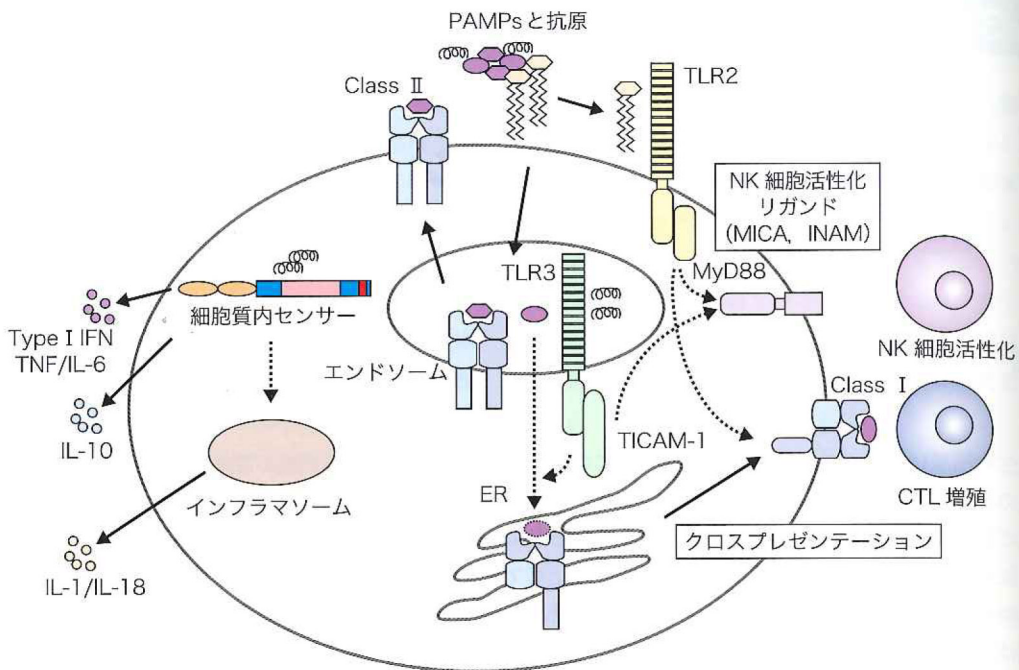


図1 アジュバントによる抗原提示樹状細胞の成熟化

自然免疫はミエロイド系の細胞の応答に顕著に現れる。微生物などの非自己成分は常在性のマクロファージ、上皮系細胞の他に特に樹状細胞を活性化する。樹状細胞の活性化はIFN/サイトカインの分泌、MHC class I 提示能の増強(共刺激因子を含む)、に加えて細胞性エフェクター (NK, CTL) の活性化を惹起する。本稿は特にTLR2-MyD88経路とTLR3-TICAM-1 (TRIF) 経路による細胞性免疫の活性化とがん免疫におけるアジュバントの意義を総説した

ら、がん抗原免疫応答の起動におけるアジュバントの役目、それを裏付ける研究史を総括する。

1 ヒストリーとしての免疫

免疫学は感染の「2度なし現象」の経験から免疫記憶の本体としてリンパ球研究が先行してきた経緯がある。脊椎動物の終末分化細胞であるリンパ球の免疫システムがまず解明され、続いてサイトカインなど液性因子の調節系が分子レベルで明らかにされてきた。それらが自然免疫の統制下に連動することが示されたのは最近15年のことである。その意味で免疫研究の歴史は本末転倒の発展を遂げた。免疫研究を生命科学の広い視野からとらえ直す融合研究がくり返し促されてきた所以である。

自然免疫の現象的理解は早期に遡るが、Janewayらは自然免疫のシグナル伝達が特定の分子受容体によって起動することを示し、それを獲得免疫系との連携という概念に位置付けた提唱者の1人である¹⁾、免疫系

を広義にとらえると自然免疫の非自己 (PAMP と DAMP^{※1)} 2) と獲得免疫の非自己 (抗原) がある。免疫系の成立を系統発生から解説すると、PAMP 応答 (ミエロイド)、自然リンパ球応答³⁾、胸腺依存型リンパ球応答と進んだことが推定される。哺乳類では基本的に先にできた系に影響されて後の系が活性化する (図1)。感染症は寄生体と免疫系の抗争の結果、寄生体が優位な場合に成立する。そのため免疫応答は熾烈を極める。しかし、がんは後成的に体細胞に発生するため通常免疫耐性を獲得して成立する。原則的にリンパ球の抗原ペプチド投与のみでは治らない⁴⁾。炎症とPAMPのアシストがあってはじめて非自己応答は完成するといつてよい。感染ががん進展を制御する例はまさにこ

※1 PAMP/DAMP

それぞれpathogen-associated molecular pattern, damage-associated molecular pattern の略語。それぞれ外来性、内因性の自然免疫活性化因子を指す。多くがTLRなどパターン認識受容体のリガンドである。

のこの表象である。しかし、感染は腫瘍形成を促進するという諸刃の剣でもあり、その際の自然免疫とがん微小環境の関係は未解明である。

この総説は抗がんアジュバントの各論なので2つのTLR, すなわちTLR2とTLR3, のアジュバントをがん医療現場の歴史からスクープする。CpG DNAはTLR9アジュバントであり日本の徳永博士の発見になる金字塔だがDNAセンサーの研究は未解明の課題を含むので成書を参照されたい⁵⁾。

2 細菌性アジュバントの歴史

感染ががんを退縮させるという現象は18世紀に経験的に知られていた。まだリンパ球抗原認識機構の理解もない1880年代に、William Coleyはヒト(がん患者)に治療目的で細菌を注射するという試行を行った。1891年、細菌(*Streptococcus pyogenes*と*Serratia marcescens*の混合生菌)のがん患者への投与成績を公表した⁶⁾。この試みは現代的に言えば「アジュバント免疫療法」であり、がん抗原が患者任せなどの問題はあがるが自然免疫の理にかなっている。細菌の異種抗原とPAMPを同時に投与して自然免疫から獲得免疫を活性化させており、抗がんCTL(細胞傷害性T細胞)はみえていないが有効例もあった。しかし、副作用が強く死亡例も出て、ドイツのFederal Institute for Drugs and Medical Devicesが有効性を再現できなかったため、1990年には棄却された。今日的に言えば細菌を弱毒化してがん抗原の遺伝子を組み込めば治療法として十分成立するものである。

この系列の研究として、日本では結核ワクチンのBCG^{※2}を使ったがん免疫療法がある。丸山ワクチンと山村、東らによるBCG-CWSである。両者の成分は異なるがBCG菌の抽出物で、最近でも大阪府立成人病センターの見玉らによる単独投与の有効例の報告がある⁷⁾。膀胱がん(移行上皮がん)ではBCG療法は標準

治療として70%以上の治癒率をあげている。BCG-CWSの作用機序は辻らが1999年にTLR2/4アゴニスト(peptidoglycan)活性を⁸⁾、最近山崎らがMincleのアゴニスト(TDM)活性を報告している⁹⁾。BCG-CWSの活性中心はMDP(muramyl dipeptide)とされてきたが、MDPはTLR2アゴニストでなく、抗がん活性はほとんど付帯しない¹⁰⁾。また、大日本住友製薬社が高度にBCG-CWSを精製してSMP105というGMP標品を作製したが、TLR2のみのアゴニストで、矛盾だがTLR2非依存性に抗がん活性を示した¹¹⁾。これらの成果は単一合成物よりBCG由来の混合物の相乗免疫応答が抗がん免疫効果に有利であったことを物語る。BCG-CWSの成分は細胞内のパターン認識センサーを刺激するかもしれない。TLRの自然免疫活性化の機序は成書を参照されたい¹²⁾。

3 ウイルスアジュバントの歴史

一方、ウイルス感染が発がん・抗がんなどがんの予後に影響を与えることが以前より知られていた。この流れは1957年のインターフェロン(type I IFN)の発見から拍車がかかり、インターフェロンの誘導因子としてのウイルス産物(二重鎖RNAアナログpolyI:C)を投与する抗がん免疫療法が1960年代からマウス移植がんで¹³⁾、1970年代からがん患者で^{14) 15)} Levyらによって開始された。1979年、IFN- β がcDNAクローニングされ¹⁶⁾、IFNの治療投与もがん患者に施行された。がん退縮は多くのがん腫で認められたが、副作用が強く出る(発熱、関節痛、精神症状、ショック)ことから、一部のがん(転移性腎臓がん、ヒアリーセル白血病)を除いて適用になっていない。高価であるのも難点であった。

当時インターフェロンはウイルスの二重鎖(ds)RNAによって起動することが判明していた。RNAの配列特異的な化学合成は難事だったのでウイルスdsRNAの

※2 BCG

ウシ型結核菌(*Mycobacterium bovis*)の実験室培養をくり返して作製された培養菌株、および、それを利用した結核に対するワクチンのこと。多数の亜株があり、ヒト結核菌とは抗原的にもかなり異なるものとされる。

※3 polyI:CLC (Hiltonol), polyI:C12U (Ampligen)

PolyI:CはpolyI, polyC鎖を別個に化学合成してアニーリングさせた二重鎖(ds)RNAアナログ。これにpoly L-lysineとmethylcelluloseを加えて安定化させたものをpolyI:CLCと名付けた。Hiltonolは商標。AmpligenはpolyC鎖約12個に1個ミスマッチを入れたもの。毒性が低いといわれるが基礎データはほとんど公表されていない。

A)

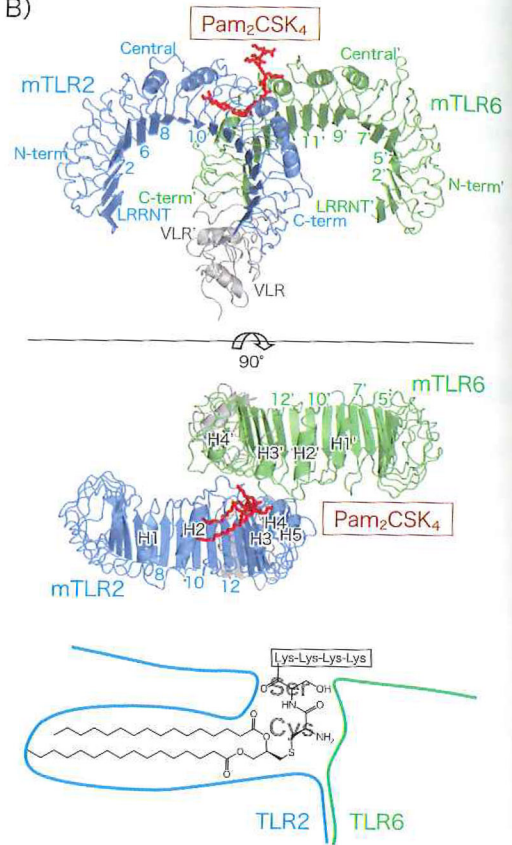
	TLR2	TLR6
樹状細胞	+	+
がん細胞	+	-

	Pam2ペプチド配列		
	CSXX	CGXX	CPXX
樹状細胞			
サイトカイン誘導	++	++	--
NK活性化	++	++	--
CTL誘導	++	++	--
NK細胞			
直接NK活性化	+	+/-	--
がん細胞			
腫瘍増殖	++	+/-	--

図2 TLR2の結晶構造とリガンド認識

TLR2/TLR6, TLR2/TLR1のリガンド結合時の結晶構造解析モデルはLeeらによって提出された¹⁹⁾。この資料と従来のPam2リポペプチドの機能解析結果²⁰⁾を比較すると表Aのようになり、ペプチド部分のアミノ酸配列ががん細胞 (TLR2陽性) と樹状細胞 (TLR2/TLR6陽性) の応答を規制する。これをもとに腫瘍増殖活性のないTLR2アジュバントの開発が可能かもしれない (Bの結晶構造は文献19より転載)

B)



アナログとしてはもっぱら polyI:C が用いられた。polyI:C の副作用を軽減するために Levy らは RNase 阻害剤 LC (poly L-lysine と methylcellulose) を polyI:C に混合して治験に用いた¹⁴⁾。1970年代当初、polyI:C はウイルス感染の治療薬、がん免疫の起動薬として多大な期待をもって迎えられた。だが、治験が進むにつれ、untolerable (耐容不能) という記載が多くなる。結局、極量がきわめて低く、有効量に至る前に死に至る。27 mg/m² の投与で腎不全死した例がある。現在も Steinman (2011年ノーベル賞) の提唱もあって polyI:CLC (Hiltonol), polyI:C12U (Ampigen)^{*3} として使用されている¹⁶⁾。ともに今日的に TLR3 アゴニスト というのが RIG-I/MDA5 経路を活性化する可能性がある。ヒトに 1.6 mg/head で IFN 誘導活性は証明されたが、この低用量での細胞性エフェクター誘導の証拠はない¹⁷⁾。2013年現在、まだ第II相臨床試験が続いている¹⁵⁾。

4 アジュバント revisited

特記すべきは Coley も Levy も全く独立に抗がん療法をスタートしたにもかかわらず、ともに PAMP の TLR アジュバント治療に行き着いたことである。また、ともに感染症からがん退縮を観察してそこに至る方法を人工的に指向した。アジュバントは手術、放射線、化学療法に比較してがん領域で決して王道ではなかったし、理解も及びにくかった。ペプチドワクチン単独で有効症例がきわめて限られる事実から⁴⁾、がん免疫の科学的理解と再考が求められた2000年代後半に入ってアジュバントの重要性は樹状細胞成熟化の知見と相まって (図1)、ようやくがん免疫のなかでも理解が浸透してきた¹⁸⁾。Coley, Levy らの初期の臨床研究の結果を素直に科学として再現する基礎研究が継続していれば抗がんアジュバントも早い展開があったかもしれない。以下はその努力の一環としての TLR2, TLR3

に関する実用化（ヒトに使える）アジュバント研究の紹介である。

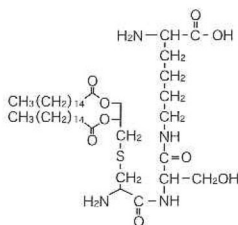
5 TLR2 アゴニスト Pam2 リポペプチド

結晶構造解析がTLRに適用されてTLRは一般に二量体を形成してPAMPを認識することが判明した¹⁹⁾。TLR2はPAMP構造の相違をヘテロ二量体によって分別認識する受容体である(図2)。TLR2/1でPam3リポペプチド、TLR2/6でPam2リポペプチド²⁰⁾を識別する。PGNは合成できないから最終証明は提出されていないが、TLR2二量体で認識されるらしい。Pam2、Pam3、PGNのTLR2シグナル系もそれに依りて異なるはずだがそれは末梢的な問題である。

Pam2リポペプチドは細菌種ごとにペプチド配列が多様で、しかも複数のPam2リポペプチドを細胞膜に表出している。これが細菌種によってTLR2の活性化が異なる理由の一つであろう。アミノ酸配列の異なるリポペプチドの多様性は自然の摂理だが、それに生理的意義があるのか？はアジュバントの問題である。樹状細胞TLR2とがん細胞TLR2のPam2リポペプチド認識応答を解析すると想定外のことがわかる。樹状細胞によるNK細胞活性化とIL-10分泌はペプチド配列特異的に決まる²⁰⁾。つまり、抗原提示樹状細胞のTLR2/TLR6ポケットはがん細胞や他の正常細胞のTLR2と異なり、Pam2-Cys-Ser-X-XもPam2-Cys-Gly-X-Xも認識しNK細胞活性化を誘導するが(図2)、Cys-Pro、Cys-Leu置換では活性を消失する。一方、がん細胞、NK細胞のTLR2に認識される配列はPam2-Cys-Ser-X-Xのみである。Pam2リポペプチドの場合、NK活性化はIFN- γ 、CD69発現の他に常に細胞傷害活性を起動する²⁰⁾。

※4 Pam2リポペプチド

細菌のリポタンパク質には diacylation (図) と triacylation の修飾を受けたものが存在し、これらの脂肪酸鎖で細菌の外膜にアンカーする。Pam2 は 16 S-[2,3-bis(palmitoyl)propyl]cysteine の略。脂肪酸鎖は 2 本鎖の場合 TLR2 と TLR6 で認識され、三本鎖の場合 TLR2 と TLR1 で認識される。これら TLR2 ファミリーはリポペプチドの機能的認識受容体である。



以上からペプチド配列を樹状細胞型 (Cys-Gly) にすれば腫瘍増殖 (TLR2は versican などのリガンドにみるような腫瘍増殖活性をもつ²¹⁾) せずに樹状細胞と細胞性免疫を選択活性化しうる。同時に樹状細胞型の Pam2-Cys-Gly-X-XはMyD88依存性に強力にCTLを誘導する。MyD88下流のいかなる分子機構が樹状細胞成熟化とNK, CTL誘導によるかは今後の研究課題である。

6 TLR3 アゴニスト ssDNA-dsRNA

結晶構造解析からTLR3も二量体を形成してdsRNAを認識することが判明した(図3)²²⁾。TLR3の細胞外ドメイン(LRRsからなる)は2カ所で二重鎖RNA構造を認識し、それ以外のスパーサーRNA部位は不完全な(ミスマッチのある)ステム構造であっても構わない²³⁾。RNAの5'/3'末端の構造も認識に関与しない。以上からTLR3はRIG-I/MDA5に捕捉認識されないdsRNA構造モチーフを認識することを示唆する²³⁾。TLR3特異リガンドはこのような基礎資料から、全身投与でサイトカイン毒性がほとんどないことが期待される²⁴⁾。TLR3特異アゴニストは*in vitro* 合成品からデザインが完了し、完全化学合成に向かっている。これを全身投与し、TLR3応答のみを抽出して再現すると、その細胞性免疫応答における重要性を証明できる。この理論はマウスで再現できたが、GMP標品が未開発のためヒトでは今後の確認となる。これまでのpolyI:C臨床試験がuntolerableであったのは高サイトカイン血症の毒性のためと推測される²⁴⁾。TLR3は上皮系とミエロイド系にしか発現しないので、RIG-I/MDA5のような全身性IFN誘導を起こさない¹⁸⁾。このようなTLR3アゴニストからヒトに大量投与して副作用の少ないNK, CTL誘導剤の開発が期待できる(図3)。すなわち*in vivo*でpolyI:Cの細胞性免疫起動はIFN血症とは独立して起きる。がん治療はこのTLR3アゴニストの大量投与によって可能になるであろう。

A)

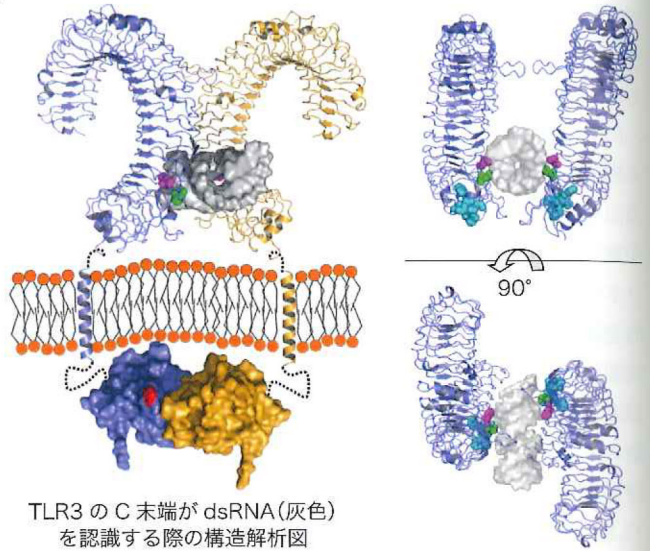
RNA センサー	RNA 分子種	Prominent response
TLR3	dsRNA (>140 bp), Bulged stem RNA	抗腫瘍作用, 核リプログラミング, 内在性 RTP 活性化
RIG-I/MDA5	3P-短鎖 dsRNA, 長鎖 dsRNA (> 1 kb)	抗ウイルス作用
Inflammasome	dsRNA	炎症性作用
Dicer/RISC 複合体	siRNA, miRNA	転写後および転写制御
不明	環状 RNA, 長鎖非コード RNA	si/miRNA による遺伝子発現制御

本文中で触れた RNA センサーを青字で示した。RNA 認識から反応に至る分子機構の解明は現在進行中である。自然免疫から獲得免疫の起動はその一端である。RTP: retrotransposon (レトロトランスポゾン)

B)

図3 TLR3の結晶構造とリガンド認識

TLR3・dsRNAの結晶構造解析モデルは Segal らによって提示された²²⁾。図はC末端側の dsRNA 結合を示す。これ以外にN末端側にも結合部位がある。樹状細胞 TLR3 はエンドソームで酵素による分解を受けるが、二量体形成は損なわれない。TICAM-1 へのシグナルも伝達され、限定分解の生理的意義は不明である。樹状細胞 TLR3 経路は強いエフェクター誘導を行うが、上皮系・線維芽細胞における核リプログラミングの促進や内因性レトロトランスポゾンの活性化など未解明の生理活性も報告されている(表A)。これらの RNA 応答を他の RNA センサーと比較し表に掲示した (Bは文献22より転載)



おわりに

免疫アジュバントの作用機序は自然免疫、特に TLR の発見を契機に解明が進んだ。がん免疫の領域にもその知識活用が望まれている。がん患者に使えるアジュバントは免疫療法の発展と相俟って QOL の高い非侵襲性の治療の確立に貢献するであろう。しかし、Alum やオイルを除けばまだヒトに使える抗がん免疫アジュバントは開発されていない。内毒素様の副作用の問題は依然として残り、評価系を含めた行政の対応が遅れている。創薬化にはアジュバントの免疫活性化機能を抽出し、内毒素活性を抑える分子デザインが必須であろう。今後の発展が望まれる。

文献

- 1) Medzhitov, R. & Janeway, C. A. Jr. : Cell, 91 : 295-298, 1997
- 2) Kono, H. & Rock, K. L. : Nat. Rev. Immunol., 8 : 279-289, 2008
- 3) Koyasu, S. et al. : Adv. Immunol., 108 : 21-44, 2010
- 4) Rosenberg, S. A. et al. : Nat. Med., 10 : 909-915, 2004
- 5) Desmet, C. J. & Ishii, K. J. : Nat. Rev. Immunol., 12 : 479-491, 2012
- 6) Coley, W. B. : Ann. Surg., 14 : 199-220, 1891
- 7) Kodama, K. et al. : Surg. Today, 39 : 194-200, 2009
- 8) Tsuji, S. et al. : Infect. Immun., 68 : 6883-6890, 2000
- 9) Schoenen, H. et al. : J. Immunol., 184 : 2756-2760, 2010
- 10) Uehori, J. et al. : J. Immunol., 174 : 7096-7103, 2005
- 11) Murata, M. : Cancer Sci., 99 : 1435-1440, 2008
- 12) Honda, K. & Taniguchi, T. : IUBMB Life, 58 : 290-295, 2006
- 13) Levy, H. B. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 62 : 357-361, 1969

- 14) Levine, A. S. et al. : Cancer Res., 39 : 1645-1650, 1979
- 15) Galluzzi, L. et al. : Oncoimmunology, 1 : 699-716, 2012
- 16) Taniguchi, T. et al. : Proc. Japan Acad. Ser. B, 55 : 464-469, 1979
- 17) Caskey, M. et al. : J. Exp. Med., 208 : 2357-2366, 2011
- 18) Matsumoto, M. & Seya, T. : Adv. Drug Deliv. Rev., 60 : 805-812, 2008
- 19) Kang, J. Y. et al. : Immunity, 31 : 873-884, 2009
- 20) Azuma, M. et al. : PLoS One, 5 : e12550, 2010
- 21) Kim, S. et al. : Nature, 457 : 102-106, 2009
- 22) Bell, J. K. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 : 8792-8797, 2006

- 23) Tatematsu, M. et al. : Nat. Commun., 4 : 1833, 2013
- 24) Seya, T. et al. : Expert Opin. Ther. Targets, 17 : 533-544, 2013

<筆頭著者プロフィール>

瀬谷 司：1994年より大阪府立成人病センター研究所でアジュバントの基礎研究を開始，20年が経過した。難関だった副作用問題は科学的な解決へ向かっているが，ヒトへの実用化は別なハードルがあり，難しい。今後の国の対応とTRがわかる若手の参加が望まれる。