

【アジュバントワークショップ 講演④】

「 $\alpha$ -Galcer アジュバントの免疫制御メカニズムと臨床応用」

独立行政法人理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター  
ワクチンデザイン研究チームリーダー 石井保之

石井先生、過分なご紹介、ありがとうございます。

本日は発表の機会を与えていただきまして、ありがとうございます。

私は理研免疫・アレルギー科学総合研究センターのワクチンデザイン研究チームで、 $\alpha$ -Galcer という化合物を使って免疫寛容を誘導するスギ花粉症ワクチンを研究しております。この $\alpha$ -Galcer には様々な免疫制御機能が報告されていることから、その全体像を皆さんにご紹介できるのかなと思ひまして、このような演題で本日発表させていただきます。

まず、 $\alpha$ -Galcer、 $\alpha$ -galactosylceramide という化合物の発見の経緯をご紹介したいと思います。これは旧キリンビール医薬探索研究所（現在は協和発酵キリン）の研究チームが胆がんマウスを用いたin vivoアッセイで抗腫瘍効果を示すという天然物化合物をスクリーニングする過程で、アゲラスフィン類を単離したところから始まっております。このソースは沖縄の海域に生息する海綿で、それを1993年と1994年に、名取（俊二）らが報告しています。その後、そのアゲラスフィン類の誘導体を同じくin vivoの胆がんマウスの評価系でスクリーニングをして、より抗腫瘍活性が強い $\alpha$ -Galcer、開発コードがKRN7000という化合物を取得するに至りました。それが1995年の森田らの発表並びにそれ以降のキリンビールの研究チームの発表にあるわけです。

実際のデータを少しご紹介いたしますけれども、まず天然物として取られた $\alpha$ -galactosylceramideのアゲラスフィン類というものの構造なんですけれども、やはりガラクトースと $\alpha$ 位で結合したセラミドといった構造になっていますけれども、その中にはさまざまなシル基のナーサのデリバティブが取られていきましたけれども、その中でアゲラスフィン類のAGL-9bといったこの化合物、この化合物の抗腫瘍活性を胆がんマウスの評価系で見ますと、AGL-9bでコントロールに対して抗腫瘍効果を強く示すだけではなくて、一緒に投与しましたアドリアマイシンという抗がん剤と、それからAGL-9bのコンビネーションによって、さらに強い抗腫瘍効果を示すことがわかったわけ

でございます。

そしてさらに1995年の森田らの報告を見ますと、有機化合物をさらに合成して、この抗腫瘍活性をさらに高めるような化合物、コードネームではAGL-582だと思えますけれども、これが最終的なKRN7000になったというふうに記載されています。ですので、もともと天然物で取られた化合物でありますけれども、最終的には有機化合物として、KRN7000という開発コードネームを持ったわけですが、広く免疫学の中では $\alpha$ -Galcerと総称して呼ばれることが多いというのが現状だと思います。

ところが、その後研究は進んで、実は $\alpha$ -GalcerはインバリアントのNK T細胞のリガンドであったということが、当時千葉大の谷口克先生たちのグループが明らかにしました。それまでは単に抗腫瘍活性を示す天然化合物由来の化合物という位置づけだったわけですが、実はNK細胞（ナチュラルキラー）とT細胞の両方のキャラクターを持つNK T細胞の中でもT-cell receptorがインバリアントであるiNK T、もしくはV $\alpha$ 14のNK T細胞にスペシフィックなリガンドであるということが1997年のサイエンスのペーパーで明らかになっています。

ここに示しますデータはノックアウトマウスの結果ですけれども、左側がノーマルのマウスのレスポンスを見ていますけれども、ノーマルのマウスではNK T細胞があって、そして $\alpha$ -Galcerを投与するとNK T細胞が増殖して、IL-4が出て、インターフェロン $\gamma$ が出る。さらにNK T細胞のもう一つの性質であります細胞傷害性の活性もあるわけですが、それがNK T細胞のT-cell receptorの $\alpha$ 鎖だけをノックアウトして、NK T細胞がないようなマウスをつくった場合には、それらのアクティビティーがすべて消失することから、 $\alpha$ -GalcerはNK T細胞にスペシフィックだということがわかりました。

さらに右側の論文では、特にIL-12の産生がその抗腫瘍効果に重要であるということが示されています。IL-12があると、いわゆる胆がんマウスで、がん転移モデルで肝臓にできるがんが抑制されますが、NK T細胞欠損マウスにおいては、その活性が完全に消失することが明らかになりました。肺の所見でも同じような傾向が見られることから、 $\alpha$ -Galcerの効果でありますIL-12の産生がNK Tを介して抗腫瘍効果を示すということがこの実験で明らかになりました。

実際にどのような結合様式をしているかということが、さらに立体構造の解析によって明らかにされています。

$\alpha$ -Galcerはnon-classicalなMHCクラスIであるCD1d分子によって提示されて、その $\alpha$ -GalcerはNK T細胞のT細胞レセプターのに認識されるわけですが、そのTCR $\alpha$ 鎖はマウスではV $\alpha$ 14、ヒトではV $\alpha$ 24という不変の可変領域を使って認識しているということが明らかになっています。

今日までに、さまざまな $\alpha$ -Galcerアナログが報告されてきております。ここにはその一部を示していますが、オリジナルのKRN7000に加えて、ガラクトースとセラミドの結合が炭素になった $\alpha$ -C-Galcerや、セラミドのアシル基が短いOCHといったものが報告されています。この $\alpha$ -C-Galcerはインターフェロン $\gamma$ の産生が非常に強く誘導され、OCHのほうはIL-4の産生が誘導されるといった特徴が論文で報告されていますが、ヒトにおいて非常に強い活性を示すは、このKRN7000だけであるということをお皆さんはご記憶にとどめておいていただきたいと思えます。

そして、 $\alpha$ -Galcerは抗原提示細胞に取り込まれた後にNK T細胞と会合して、さまざまなサイトカインを産生しますが、ここには典型的なサイトカインであるインターフェロン $\gamma$ 、これは抗腫瘍効果を示すことに重要なサイトカインですし、IL-4は液性免疫、特に抗体産生のほうに非常に重要なサイトカインです。それからIL-10、IL-10は免疫抑制のほうに関係するサイトカインで、これらのさまざまな活性を持つサイトカインを出すポテンシャルを持っているということが明らかになったわけです。しかしながら、これらをどう制御していいかというのはこの時点ではわかりませんでした。

さまざまなモデル動物で薬効が確認されています。

ここでは、まず感染症に対する有効性を調べた論文を紹介いたします。2005年と2008年には、 $\alpha$ -Galcerを経鼻投与することによって、鼻の中のIgA産生を誘導できるという現象が報告されている。その $\alpha$ -Galcerを筋注で投与しても、IgA産生は誘導されなかったことから、非常に鼻に特徴的で現象であるということが示唆されました。

実際にインフルエンザのさまざまな株を同時投与して、その感染防御についても評価していますが、そのアジュバント活性によって感染防御のアク

ティビティーも高まっているということも確認されています。

そして、その I g A 産生に関して言うと、 $\alpha$ -G a l c e r の働きはこの右側のパネルで示すとおり、I L-5 や T G F- $\beta$  1 といういわゆる I g A 産生のクラススイッチに関係するような分子に加えて、I L-4 がこの I g A の、特にプラズマ細胞への分化に非常に重要であるということが I L-4 ノックアウトマウスの実験から示唆されました。この感染症、特に  $\alpha$ -G a l c e r の経鼻投与による I g A 産生には I L-4 の産生が非常に重要だということがわかったわけでございます。

さらに、移植拒絶や G v H D についても報告があります。左側のパネルでは、心臓移植での N K T 細胞の重要性を示しています。マウスの心臓移植のモデルにおいて、抗 C D 4 0 L 抗体による生着延長効果が、C X C L 1 6 という、N K T に特異的なケモカインである C X C R 6 のリガンド、それに対する中和抗体の投与によって、解除されています。これは N K T の遊走が阻害されることに N K T 細胞の機能が阻害されたことによって、抗 C D 4 0 L 抗体の効果が消失したことを示しています。

そして右側のパネルでは、骨髄移植モデルにおける G v H D に対する抑制効果を示しています。右上に示していますけれども、I L-4 のノックアウトマウスにおいて G v H D によって起きる細胞死というものが増強されているということがわかります。さらに、N K T の関与を確認するために、C D 1 d のノックアウトマウスや J  $\alpha$  1 8 ノックアウトマウス、N K T のないというマウスを使うと早期に G v H D でマウスが死んでしまうことが示されています。さらにそこに関与する制御性 T 細胞である、C D 4、C D 1 5、F o x p 3 陽性細胞のこの四角で囲んだ細胞の分化に関しても、N K T 細胞が産生する I L-4 が非常に重要であることを示しています。I L-4 ノックアウトマウスでは、この細胞が減少していますが、その I L-4 ノックアウトマウスに野生型 N K T を養子移入してやると、制御性 T 細胞の増殖が回復します。つまり I L-4 依存的に制御性 T 細胞を誘導して、骨髄移植後の G v H D を抑制しているということが示唆されたわけです。

もう一つのモデルマウスとしては、I 型糖尿病があります。2001年の報告では、自然発症的に糖尿病症状を呈するマウスが  $\alpha$ -G a l c e r 投与によってその発症が抑制され、そしてその効果が C D 1 d の中和抗体の投与によって解除されるということから N K T 細胞依存的な抑制であるという

ことが示唆されました。そのマウスの脾臓と膵臓のサイトカイン産生を解析すると、IL-4とIL-10の産生が優位になっていることが明らかになりました。そして、IL-10のほうに注目して、その作用をIL-10レセプターの中和抗体で確認したところ、IL-10中和抗体は $\alpha$ -Galcer投与の糖尿病抑制作用を完全に解除してしまうということがわかりました。そして、脾臓中のIL-10レセプターの発現も $\alpha$ -Galcer投与によって上昇することも示されました。このようにI型糖尿病においてはIL-4、IL-10、特にIL-10の増強というものが $\alpha$ -Galcerの効果として重要だということが示唆されています。

このように、さまざまな疾患に薬効がありそうな $\alpha$ -Galcerという化合物ではありますが、どのような制御を受けているかはっきりしていませんでした。しかしながら近年の研究によって、一つのアイデアとして、抗原提示細胞を変えることによってNK T細胞の活性を制御できる可能性が示唆されました。図上段のほうは、いわゆるprotective immunityでありまして、がん免疫、それから感染症といったところに関するポテンシャルでありますけれども、図下側の免疫制御のほうの機構も動かせることを示しています。それは通常のプロフェッショナルな抗原提示細胞である樹状細胞を使えばインターフェロン $\gamma$ を産生する作用が期待できますし、逆に制御性の抗原提示細胞、例えばB細胞のあるサブセットを誘導してやることで、NK T細胞のIL-10を介した免疫抑制を誘導して、アレルギーや自己免疫疾患の治療に使うという発想が出てきました。

実際に、 $\alpha$ -Galcerをアジュバントして臨床応用する場合のポイントには、どの抗原提示細胞にデリバリーするかということになります。それをコントロールするためには、投与ルートや薬剤の処方非常に重要で、その疾患に合わせてそれらを選択する必要があるということになります。

例えば、がん治療においてインターフェロン $\gamma$ を誘導して、細胞傷害性のT細胞を誘導するといった、いわゆるがん免疫を高めることを狙った臨床試験では、 $\alpha$ -Galcer、KRN7000を静脈内投与したけれども、インターフェロン $\gamma$ の産生は、3人の患者さんのうち1人だけ一過性に上昇しただけで、その後の投与を継続しても、インターフェロン $\gamma$ の産生は認められなかったという現象がありました。

この現象を理解するためには、2002年の藤井（眞一郎）らの論文が参考

になります。藤井らは $\alpha$ -GalcerをパルスしたDCをマウスに戻すと強い抗がん作用を示すということを見出しましたが、同時にその活性は、先に $\alpha$ -Galcer単独を静脈内投与されたマウスに後から $\alpha$ -GalcerパルスDCを移入した場合には、その抗腫瘍効果が回復しないことも報告しています。その回復しない期間というのはここでは最大で45日間ですが、 $\alpha$ -Galcerを単独で静脈内投与すると、免疫賦活ではなく、逆に免疫抑制を誘導する可能性を示唆していることになります。すると、臨床試験で実施した $\alpha$ -Galcerを単独で静脈内投与を繰り返すプロトコールでも、期待する免疫賦活とは全く逆の作用を誘導した可能性が考えられるわけです。

よって、がんワクチンのアジュバントとして $\alpha$ -Galcerを使用する場合には、やはり樹状細胞にきちんとデリバリーして、NKT細胞からのインターフェロン $\gamma$ を誘導するような投与ルートや薬剤処方が必要であることになります。投与ルートとしては体外で細胞にパルスをして静脈に投与するという方法で、薬剤処方としては細胞をベクターに使う方法が考えられます。それからナノ粒子も一つのアイデアですけれども、この場合はきちんと全身に樹状細胞がデリバリーされることが条件になるかと思います。

今は細胞を使った治療や研究が進んでいます。実際、理研と千葉大学の臨床研究では患者の末梢血をex vivo培養して、そこに $\alpha$ -Galcerをパルスして戻す肺がんの治療を行っていますが、そこでは有効性が示されています。これはDCに $\alpha$ -Galcerがデリバリーされれば、抗腫瘍効果を示すことの一つの傍証だということになります。

さらに、それを進歩させた2つの方法があって、患者のがん細胞そのものをベクターにしてしまうという方法、それから人工アジュバントのベクターを人工的につくるという方法、これらは理研の藤井眞一郎先生らが考案された方法ですが、今後のがんワクチンの決め手になっていくと考えられます。

それらをご紹介しますけれども、一つは血液がんの細胞をそのままベクターにしてしまうという発想です。血液がんの細胞を患者から取り出して、その末梢血に直接 $\alpha$ -Galcerをパルスして、患者さんに戻します。戻された $\alpha$ -Galcerを含むがん細胞はNKTによって認識されて、がん細胞は破壊されます。破壊されたがん細胞は、次に樹状細胞に取り込まれて、 $\alpha$ -Galcerとがん抗原の両方が細胞表面に提示されることになります。そのDCはNKT細胞の働きで成熟化を起こして、CD8陽性T細胞やCD4陽性T細胞

を活性化して、細胞障害性T細胞の誘導や獲得免疫を誘導することになります。この現象は、2007年の「JEM」の論文の中でマウスモデルを用いて証明されています。

血液がんのような場合は、がん細胞が末梢血から回収できるのですが、固形がんの場合だと、それは非常に難しいということになります。しかし、固形がんががん抗原が同定されているような場合には、そのがん抗原のメッセンジャーRNAと $\alpha$ -Galcerを繊維芽系細胞株に導入して、その細胞をベクターとしてがん免疫を誘導する方法が有効になります。ここではメラノーマのB16細胞をターゲットとした方法を使っています。このがん抗原のメッセンジャーRNAを繊維芽系細胞株に発現させて、それを胆癌マウスモデルに養子移入すると、がんの退縮効果と治療効果が認められる結果が得られています。

一方、免疫抑制を誘導するワクチンという目的で $\alpha$ -Galcerを利用する場合には、IL-10産生を誘導する方法になります。この場合はDCに取り込ませない方法としてリポソームを使った方法が考えられます。

我々のアレルギー治療に関する研究ですけれども、リポソーム化した $\alpha$ -GalcerはDCよりもより制御性B細胞に取り込まれてから、IL-10を産生し、次にその環境下において制御性T細胞が誘導され、IgE抗体産生が抑制される現象を報告しています。現在、JSTのプロジェクトで、スギ花粉症のワクチンをこの方法で開発しています。

また、骨髄移植時のGvHD抑制に $\alpha$ -Galcerの効果が示されています。その薬効をさらに増強させるために、理研ベンチャーの認定を受けたレイミューン (REGIMMUNE) 社では、リポソームを脾臓の制御性B細胞に導入する方法で開発を進めています。薬効試験では、リポソーム化 $\alpha$ -Galcerを投与したマウスのレシピエントの血中にはFoxp3陽性の制御性T細胞が誘導されることが確認できています。そしてGvHDによる致死率も大幅に改善されるということで、現在INDに向けて準備をしているという状況です。

最後にご紹介するのは、やはり感染症への $\alpha$ -Galcerの応用で、経鼻投与によってIgAを産生できるポテンシャルであります。 $\alpha$ -GalcerをきちんとNALTの中の、もしくは経口でGALTの中のDCにきちんとデリバーできればいいわけですが、単純に $\alpha$ -Galcerの単体で導入するのではなくて、きちんとデリバーできるデバイスを使うことが重要だと思いま

す。

最後、まとめですけれども、NKT細胞のリガンドである $\alpha$ -Galcerは、目的の抗原提示細胞に選択的にデリバリーできれば、さまざまな疾患のアジュバントとして使える可能性があるのではないかと考えています。

以上、ご清聴ありがとうございました。（拍手）