(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2018-24594
(P2018-24594A)
(43)公開日　平成30年2月15日(2018.2.15)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 39/39	(2006.01)	A61K	39/39	ZNA	4C084
A61K 31/704	(2006.01)	A61K	31/704		4C085
A61K 31/235	(2006.01)	A61K	31/235		4C086
A61K 31/245	(2006.01)	A61K	31/245		4C206
A61K 31/222	(2006.01)	A61K	31/222		

審査請求 未請求　請求項の数 16　ＯＬ　（全 17 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-156299 (P2016-156299)
(22)出願日　平成28年8月9日 (2016.8.9)

特許法第３０条第２項適用申請有り　１　ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃ－ｌｉｎｋａｇｅ．ｃｏ．ｊｐ／ｊａｃｉ２０／ｉｎｄｅｘ．ｈｔｍｌ　ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃ－ｌｉｎｋａｇｅ．ｃｏ．ｊｐ／ｊａｃｉ２０／ｃｏｍｍｏｎ／ｆｉｌｅｓ／ａｄｏｐｔｉｏｎ．ｐｄｆ　掲載日：平成２８年５月１８日　２．第２０回日本がん免疫学会総会プログラム／抄録集　第１３１頁　発行者：第２０回日本がん免疫学会総会　事務局　発行日：平成２８年６月２７日　３．第２０回日本がん免疫学会総会　開催日：平成２８年７月２７日　４．第２０回日本がん免疫学会総会　開催日：平成２８年７月２８日

(71)出願人　599045903
学校法人　久留米大学
福岡県久留米市旭町６７番地
(74)代理人　100101454
弁理士　山田　卓二
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷　道子
(74)代理人　100138911
弁理士　櫻井　陽子
(72)発明者　山田　亮
福岡県久留米市旭町６７番地　学校法人　久留米大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】コアジュバント組成物およびこれを含むワクチン組成物

(57)【要約】
【課題】免疫応答の増強に寄与する組成物を提供する。
【解決手段】本開示は、ある態様において、HMGB1阻害剤を含むコアジュバント組成物を提供する。さらなる態様において、本開示は、抗原、アジュバントおよび前記コアジュバント組成物を含むワクチン組成物を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
HMGB1阻害剤を含む、コアジュバント組成物。
【請求項２】
HMGB1阻害剤が、グリチルリチン、ガベキサート、ナファモスタットおよびシベレスタットもしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物からなる群から選択される、請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
自然免疫レセプターアゴニストと併用される、請求項１または２に記載の組成物。
【請求項４】
自然免疫レセプターアゴニストがTLRアゴニストである、請求項３に記載の組成物。
【請求項５】
TLRアゴニストがイミキモド、レシキモド、モノホスホリルリピドAおよびCpG-ODNからなる群から選択される、請求項４に記載の組成物。
【請求項６】
アジュバントと別の製剤に含まれる、請求項１～５のいずれかに記載の組成物。
【請求項７】
アジュバントと別の投与経路で投与される、請求項１～６のいずれかに記載の組成物。
【請求項８】
アジュバントと別の投与部位に投与される、請求項１～７のいずれかに記載の組成物。
【請求項９】
ワクチンと併用される、請求項１～８のいずれかに記載の組成物。
【請求項１０】
ワクチンががん抗原ペプチドを含む、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
抗原、アジュバント、および請求項１に記載のコアジュバント組成物を含む、ワクチン組成物。
【請求項１２】
コアジュバント組成物が、グリチルリチン、ガベキサート、ナファモスタットおよびシベレスタットもしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物からなる群から選択されるHMGB1阻害剤を含む、請求項１１に記載のワクチン組成物。
【請求項１３】
アジュバントが自然免疫レセプターアゴニストである、請求項１１または１２に記載の組成物。
【請求項１４】
自然免疫レセプターアゴニストがTLRアゴニストである、請求項１３に記載の組成物。
【請求項１５】
TLRアゴニストがイミキモド、レシキモド、モノホスホリルリピドAおよびCpG-ODNからなる群から選択される、請求項１４に記載の組成物。
【請求項１６】
抗原ががん抗原ペプチドである、請求項１１～１５のいずれかにに記載のワクチン組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、コアジュバント組成物およびこれを含むワクチン組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
がんや感染症などに対する免疫療法において、疾患の予防または治療に十分な免疫応答を得るには、抗原とともにアジュバントを用いる必要がある。現在、がんワクチンの臨床

試験のほとんどで、不完全フロイントアジュバントであるMontanide ISA51VGが使用されている。しかしながら、多くのがん患者が免疫抑制状態にあり、その効果は十分でない。また、近年、Toll様受容体（TLR）など自然免疫レセプターのアゴニストがアジュバントとして開発されているが、免疫増強作用とともに強い炎症反応を伴うため、臨床応用は限定的である。それゆえ、新規なアジュバント、コアジュバント、免疫調節剤が望まれている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００３】

【特許文献１】国際公開第２０１５／０７９９５２号公報

【非特許文献】

【０００４】

【非特許文献１】Vasilakos JP, Tomai MA. The use of Toll-like receptor 7/8 agonists as vaccine adjuvants. Expert Rev Vaccines. 2013 Jul;12(7):809-19

【非特許文献２】Baxevanis CN, Voutsas IF, Tsitsilonis OE. Toll-like receptor agonists: current status and future perspective on their utility as adjuvants in improving anticancer vaccination strategies. Immunotherapy. 2013 May;5(5):497-511

【発明の概要】

【０００５】

ある態様において、本発明は、HMGB1阻害剤を含むコアジュバント組成物を提供する。さらなる態様において、本発明は、抗原、アジュバントおよび前記コアジュバント組成物を含むワクチン組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【０００６】

【図１】図１は、アジュバントとしてイミキモドを用いたOT-I CD8 T細胞の抗原誘発増殖に対するグリチルリチンの効果を示す。イミキモド塗布処理をしたB6マウスにおいて、グリチルリチンの併用により、$OVA_{257-264}$ペプチド刺激によるCFSE標識OT-I CD8 T細胞の増殖が増強された。左：増殖した全OT-I CD8 T細胞（上）および３回以上増殖した細胞（下）の割合を示す。右：各群の代表的なFACS解析のデータを示す。増殖した全OT-I CD8 T細胞をボックス内に示した。GR, グリチルリチン; IMQ, イミキモド; n.s., 有意差なし。

【図２】図２は、各種アジュバントを用いたOT-I CD8 T細胞の抗原誘発増殖に対するグリチルリチンの効果を示す。イミキモド以外のアジュバントを用いて免疫されたB6マウスにおいても、グリチルリチンの併用により、$OVA_{257-264}$ペプチド刺激によるCFSE標識OT-I CD8 T細胞の増殖増強効果が観察された。上：各アジュバント処置群において、グリチルリチンを併用した場合（GR+）および併用しなかった場合（GR-）に増殖した全OT-I CD8 T細胞の割合を示す。下：各群の代表的なFACS解析のデータをドットブロットで示す。増殖した全OT-I CD8 T細胞をボックス内に示した。GR, グリチルリチン; IMQ, イミキモド; ISA51, Montanide ISA51VG; CpG, CpG-ODN (ODN2395); MPL, モノホスホリルリピドA; n.s., 有意差なし。

【図３】図３は、アジュバントとしてイミキモドを用いたOT-I CD8 T細胞の抗原誘発増殖に対する各種HMGB1阻害剤の効果を示す。イミキモド塗布処理をしたB6マウスにおいて、グリチルリチン以外のHMGB1阻害剤の併用によっても、$OVA_{257-264}$ペプチド刺激によるCFSE標識OT-I CD8 T細胞の増殖増強効果が観察された。上：増殖した全OT-I CD8 T細胞（左）および３回以上増殖した細胞（右）の割合を示す。下：各群の代表的なFACS解析のデータを示す。増殖した全OT-I CD8 T細胞をボックス内に示した。マウス一匹あたり200μgのHMGB1阻害剤を投与した。IMQ, イミキモド; GM, ガベキサートメシル酸塩; NM, ナファモスタットメシル酸塩; SV, シベレスタットナトリウム水和物。統計解析はANOVAを用いて行った。＊は有意差レベルが0.05より小さいことを示し、n.s.は有意差なしを意味する。

【図４】図４は、インビボでの抗原特異的細胞傷害性T細胞（CTL）誘導に対するグリチルリチンの効果を示す。イミキモド塗布処理をし、$OVA_{257-264}$ペプチドにより1週間隔で2回

免疫したB6マウスにおいて、抗原特異的CTLの誘導がグリチルリチンにより増強された。抗原特異的CTLの誘導はIFN-γ ELISPOTアッセイにより解析した。抗原特異的なIFN-γスポット数は、18時間の時点でインビトロで抗原刺激をした細胞におけるスポット数（OVA+）から、抗原刺激していない細胞（OVA-）のスポット数を引き、補正を行った。$OVA_{257-264}$ペプチド単独群の平均値＋2標準偏差（SD）である8.58スポットより高い値を示した個体を、増強効果ありと定義した。$OVA_{257-264}$ペプチド単独群と比較して増強効果を有するかは、Fisherの正確検定を用いて解析した。＊は有意差レベルが0.05より小さいことを示す。IFN-γ ELISPOTアッセイにおける陽性（増強有）結果と陰性（増強無）結果の代表例を下段に示す。

【図５ａ】図５ａは、治療用ワクチンモデルにおけるイミキモドおよびグリチルリチン併用時の抗腫瘍効果を示す。B6マウスにEG.7腫瘍細胞（OVA陽性）を皮下移植し、7、14、21日後に$OVA_{257-264}$ペプチドを投与した。腫瘍のサイズ（長径 x 短径）を2-3日間隔で35日目まで測定し、60日目まで生存を観察した。腫瘍細胞移植後14日目から26日目までにおける腫瘍細胞の成長変化をANOVA(one-sided test)で解析した。GR, グリチルリチン; IMQ, イミキモド; MST, 全生存期間中央値; NR, 未到達。

【図５ｂ】図５ｂは、治療用ワクチンモデルにおけるイミキモドおよびグリチルリチン併用時の抗腫瘍効果の抗原特異性を示す。B6マウスにEG.7細胞または親株のEL4細胞 (OVA陰性)を皮下移植し、図５ａと同様に実験を行った。$OVA_{257-264}$ペプチド投与による腫瘍増殖阻害はEG.7移植マウスにおいてのみ観察され、EL4移植マウスでは観察されなかった。GR, グリチルリチン; IMQ, イミキモド; MST, 生存期間中央値; NR, 未到達。

【図６】図６は、ワクチン投与後早期の皮膚組織おける免疫関連遺伝子の発現に対するグリチルリチンの効果を示す。$OVA_{257-264}$ペプチド投与後6時間、12時間、24時間で投与部位の皮膚組織を回収し、各遺伝子の相対的mRNA発現レベルをリアルタイムPCRで解析した。無処置のマウスにおけるハウスキーピング遺伝子GAPDHの発現レベルを1としてRQ値を補正した。

【図７】図７は、OT-I CD8 T細胞の抗原誘発増殖に対するHMGB1阻害剤の投与経路の影響を示す。増殖した全OT-I CD8 T細胞（右）および３回以上増殖した細胞（左）の割合を示す。sc mix: $OVA_{257-264}$ペプチドとグリチルリチンとを混合して皮下投与、sc proximal: $OVA_{257-264}$ペプチドとグリチルリチンとを近接する位置で別々に皮下投与、ip: $OVA_{257-264}$ペプチドを皮下投与、グリチルリチンを腹腔内投与。GR, グリチルリチン; IMQ, イミキモド。

【発明を実施するための形態】

【０００７】

本明細書において「アジュバント」とは、抗原に対する免疫応答を増強する効果を有する物質を意味する。本明細書における「コアジュバント組成物」なる用語は、アジュバントの効果を増強する組成物を意味する。本明細書において、アジュバント効果または活性とは、抗原に対する免疫応答を増強する効果または活性を意味し、コアジュバント効果または活性とは、アジュバントの効果を増強する効果または活性を意味する。コアジュバント組成物は、アジュバントの効果を増強することにより、免疫応答の増強に寄与する。

【０００８】

HMGB1（High Mobility Group Box 1）は、樹状細胞やマクロファージなどの免疫細胞から分泌され、また損傷細胞から受動的に放出される、約30 kDaの核タンパク質である。HMGB1は、Toll様受容体（TLR）2/4やRAGEを介して炎症や自然免疫を誘導することが知られている。本明細書において、HMGB1阻害剤には、HMGB1とその受容体との結合を阻害する物質（例えば、HMGB1またはその受容体に結合して、HMGB1と受容体との結合を阻害する物質）およびHMGB1の発現および／または放出を抑制する物質（例えばLPS等の刺激により誘導されるサイトカイン産生の抑制を介して、あるいは直接的に、HMGB1の発現および／または放出を抑制する物質）が含まれる。HMGB1阻害剤としては、グリチルリチン（glycyrrhizin）（グリチルリチン酸（glycyrrhizic acid）とも称される）、カルベノキソロン（carbenoxolone）、タンシノンIIAスルホン酸エステル（tanshinone IIA sodium sulfonate

）、エピガロカテキン-3-ガラート（epigallocatechin-3-gallate）、ケルセチン（quercetin）、リコピン（lycopene）、ガベキサート（gabexate）、ナファモスタット（nafamostat）、シベレスタット（sivelestat）、シンバスタチン（simvastatin）、アトルバスタチン（atorvastatin）およびメトトレキサート（methotrexate）もしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物が例示される。

【０００９】

医薬上許容される塩としては、例えば、アルカリ金属（カリウム、ナトリウム、リチウム等）の塩、アルカリ土類金属（カルシウム、マグネシウム等）の塩、アンモニウム塩（テトラメチルアンモニウム塩、テトラブチルアンモニウム塩等を含む）、有機アミン（トリエチルアミン、メチルアミン、ジメチルアミン、シクロペンチルアミン、ベンジルアミン、フェネチルアミン、ピペリジン、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミン、リジン、アルギニン、N-メチル-D-グルカミン等）の塩、酸付加物塩（塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩等の無機酸塩；および、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、安息香酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸（メシル酸）塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、イセチオン酸塩、グルクロン酸塩、グルコン酸塩等の有機酸塩を含む）が挙げられる。本明細書における水和物には、かかる医薬上許容される塩の水和物も含まれる。

【００１０】

好ましくは、HMGB1阻害剤は、グリチルリチン、ガベキサート、ナファモスタットおよびシベレスタットもしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物からなる群から選択される。より好ましくは、HMGB1阻害剤は、グリチルリチン酸一アンモニウム（monoammonium glycyrrhizinate）、グリチルリチン酸二カリウム（dipotassium glycyrrhizinate）、ガベキサートメシル酸塩（gabexate mesilate）、ナファモスタットメシル酸塩（nafamostat mesilate）およびシベレスタットナトリウム水和物（sivelestat sodium hydrate）からなる群から選択される。ある態様において、HMGB1阻害剤は、グリチルリチン酸一アンモニウム、ガベキサートメシル酸塩、ナファモスタットメシル酸塩およびシベレスタットナトリウム水和物からなる群から選択される。

【００１１】

コアジュバント組成物は、アジュバントとともに用いられる。好ましい態様において、コアジュバント組成物は、抗原およびアジュバントとともに用いられる。

【００１２】

アジュバントは、限定はされないが、自然免疫を活性化する物質である。アジュバントは、好ましくは自然免疫レセプターのアゴニストである。自然免疫レセプターアゴニストとしては、TLRアゴニスト（例えば、TLR2アゴニスト、TLR3アゴニスト、TLR4アゴニスト、TLR7アゴニスト、TLR8アゴニスト、TLR9アゴニスト）、RLR（retinoic acid-inducible gene I (RIG-1)-like receptors）アゴニスト、STING（stimulator of Interferon genes）アゴニスト、NLR（nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors）アゴニスト、CLR（C-type lectin receptors）アゴニストなどが例示される。TLRアゴニストとしては、例えば、リポペプチド、Poly IC RNA、イミキモド、レシキモド、モノホスホリルリピドA (MPL)、CpG-ODNなどが挙げられる。RLRアゴニストとしては、pppRNA、Poly IC RNAなど、STINGアゴニストとしてはcGAMP、c-di-AMP、c-di-GMPなど、NLRアゴニストとしてはiE-DAP、FK565、MDP、ムラブチドなど、CLRアゴニストとしてはベータグルカン、トレハロース６、６’-ジミコレートなどが挙げられる。アジュバントは、好ましくはTLRアゴニストであり、より好ましくはTLR4アゴニスト、TLR7アゴニストまたはTLR9アゴニストであり、さらにより好ましくはイミキモド、レシキモド、MPLまたはCpG-ODNである。ある態様において、アジュバントは、イミキモド、MPLまたはCpG-ODNである。

【００１３】

コアジュバント組成物は、抗原および／またはアジュバントと、別の製剤に含まれていても、同じ製剤に含まれていてもよい。すなわち、コアジュバント組成物、抗原およびア

ジュバントがいずれも別の製剤に含まれていてもよく、コアジュバント組成物、抗原およびアジュバントから選択される２以上が一つの製剤に含まれていても良い。コアジュバント組成物、抗原およびアジュバントから選択される２以上が一つの製剤に含まれる場合としては、（１）抗原とアジュバントが同じ製剤に含まれ、コアジュバント組成物が別の製剤に含まれる場合、（２）抗原とコアジュバント組成物が同じ製剤に含まれ、アジュバントが別の製剤に含まれる場合、（３）アジュバントとコアジュバント組成物が同じ製剤に含まれ、抗原が別の製剤に含まれる場合、および（４）抗原、アジュバントおよびコアジュバント組成物が同じ製剤に含まれる場合、がある。本明細書における「コアジュバント組成物」なる用語は、抗原および／またはアジュバントと同じ製剤に含まれる組成物も、別の製剤に含まれる組成物も包含する。

【００１４】

コアジュバント組成物が抗原および／またはアジュバントと別の製剤に含まれる場合、それぞれの製剤を別々に投与してもよく、使用前に混合して投与してもよい。

【００１５】

コアジュバント組成物は、抗原および／またはアジュバントと、同じ投与部位に投与しても別の投与部位に投与してもよく、また、同じ投与経路で投与しても別の投与経路で投与してもよい。投与経路としては、経口投与、および静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、皮内投与、経皮投与、腹腔内投与、経鼻投与などの非経口投与が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、（１）抗原、アジュバントおよびコアジュバント組成物を経皮投与する、（２）抗原、アジュバントおよびコアジュバント組成物を皮下投与する、（３）抗原およびコアジュバント組成物を皮下投与し、アジュバントを経皮投与する、（４）抗原およびアジュバントを皮下投与し、コアジュバント組成物を静脈内投与する、（５）抗原およびアジュバントを皮下投与し、コアジュバント組成物を経口投与する、などが考えられる。例えば、経皮投与は軟膏剤、クリーム剤、ローション剤などの塗布により、皮下投与および静脈内投与は注射により、行うことができる。コアジュバント組成物は、抗原および／またはアジュバントと、同時に投与してもよく、別の時点で投与してもよい。

【００１６】

ある態様において、コアジュバント組成物は、抗原またはアジュバントとは別の投与部位に投与される。

【００１７】

ある態様において、コアジュバント組成物は、抗原またはアジュバントとは別の投与経路で投与される。

【００１８】

ある態様において、コアジュバント組成物は、抗原またはアジュバントとは別の時点で投与される。

【００１９】

コアジュバント組成物が抗原および／またはアジュバントと別の製剤に含まれる場合、各製剤は別々に提供してもよく、２以上の製剤をまとめてキットとして提供してもよい。一例として、抗原、アジュバントおよびコアジュバント組成物をそれぞれ含む製剤を含むキットが挙げられる。

【００２０】

コアジュバント組成物の投与量は、HMGB1阻害剤の種類、併用される抗原またはアジュバント、剤形、投与方法などにより適宜調節される。コアジュバント組成物に含まれるHMGB1阻害剤が臨床応用されている場合、その臨床用量を参考に決定することもできる。

【００２１】

コアジュバント組成物の剤形としては、液状、粉末状（凍結乾燥粉末、乾燥粉末）、カプセル状、錠剤などが例示されるが、これらに限定されない。

【００２２】

コアジュバント組成物は、HMGB1阻害剤に加えて、医薬上許容される担体を含んでもよい。医薬上許容される担体としては、水、緩衝液、デキストロース、グリセロールなどが

挙げられる。さらに、抗酸化剤、保存剤、安定剤、等張化剤、緩衝剤、溶解補助剤などの添加剤を含むことができる。

【００２３】

コアジュバント組成物として、市販されているHMGB1阻害剤を含む製剤を用いても良い。

【００２４】

コアジュバント組成物は、ヒトおよび他の哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、トリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシ）、例えば家畜、ペット、および野生動物に用いることができる。

【００２５】

コアジュバント組成物は、免疫応答の誘導を介する、疾患の治療または予防に用いることができる。疾患としては、感染症、がん、アレルギー疾患、自己免疫疾患、神経疾患、循環器疾患などが例示されるが、これらに限定されない。

【００２６】

感染症としては、ウイルス、真菌、細菌などの病原体による感染症が例示される。ウイルスとしては、インフルエンザウイルス、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ＲＳウイルス、風疹ウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス、水痘ウイルス、アデノウイルス、狂犬病ウイルス、黄熱病ウイルスなどが例示される。細菌としては、ジフテリア菌、破傷風菌、百日咳菌、インフルエンザ菌、結核菌、肺炎球菌、ヘリコバクター・ピロリ、炭疽菌、腸チフス菌、髄膜炎菌、赤痢菌、コレラ菌などが挙げられる。真菌としては、カンジダ真菌、ヒストプラズマ真菌、クリプトコッカス真菌、アスペルギルス真菌などが例示される。

【００２７】

がんとしては、白血病、リンパ腫、メラノーマ、肺癌、胃癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、膵臓癌、腎臓癌、乳癌、子宮頸癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、骨腫瘍、脳腫瘍、甲状腺癌などが例示される。

【００２８】

アレルギー疾患としては、花粉、イエダニ、動物由来抗原などに対するアレルギー、気管支喘息などが例示される。自己免疫疾患としては、糖尿病、関節リウマチ、重症筋無力症、全身性エリテマトーデスなどが例示される。神経疾患としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病などが例示される。循環器疾患としては、動脈硬化症、高血圧症などが例示される。コアジュバント組成物は、疾患関連抗原としては、インスリン、グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）、アセチルコリン受容体、アミロイドβ、αシヌクレイン、プリオン、アンジオテンシンIおよびII、ApoB100、コレステリルエステル転送タンパク質（CETP）などが挙げられる。

【００２９】

ある態様において、コアジュバント組成物は、ワクチンと併用される。ワクチンは、例えば、感染症、がん、アレルギー疾患、自己免疫疾患、神経疾患、循環器疾患などの疾患の治療または予防を目的とするワクチンである。ある態様において、ワクチンは、感染症またはがんに対するワクチンである。

【００３０】

ある態様において、感染症に対するワクチンは、インフルエンザウイルス、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ＲＳウイルス、風疹ウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス、水痘ウイルス、アデノウイルス、狂犬病ウイルス、黄熱病ウイルスなどのウイルス；ジフテリア菌、破傷風菌、百日咳菌、インフルエンザ菌、結核菌、肺炎球菌、ヘリコバクター・ピロリ、炭疽菌、腸チフス菌、髄膜炎菌、赤痢菌、コレラ菌などの細菌；またはカンジダ真菌、ヒストプラズマ真菌、クリプトコッカス真菌、アスペルギルス真菌などの真菌に由来する抗原を含む。

【００３１】
ある態様において、がんに対するワクチン（本明細書中、がんワクチンとも記載する）は、がん抗原タンパク質、前記タンパク質由来のペプチド（本明細書中、がん抗原ペプチドとも記載する）、またはこれらをコードする核酸を含む。がん抗原タンパク質としては、ＰＳＡ（Prostate-specific antigen）、ＰＳＭＡ（Prostate-specific membrane antigen）、ＰＴＨ－ｒＰ（Parathyroid hormone-related protein）、ＳＡＲＴ２（Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 2）、ＳＡＲＴ３（Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3）、ＣｙｐＢ（Cyclophilin B）、ＬＣＫ（LCK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase）、ＥＧＦＲ（Epidermal growth factor receptor）、ＥＺＨ２（Enhancer of zeste homolog 2）、ＵＢＥ２Ｖ（Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1）、ＷＨＳＣ２（Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 2）、ＨＮＲＰＬ（Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L）、ＷＴ－１（Wilms tumor suppressor gene 1）、ＨＥＲ２／ｎｅｕ（Human EGFR related 2）、ＭＡＧＥ（Melanoma-associated Antigen）などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、がんワクチンは、がん抗原ペプチドを含む。
【００３２】
別の態様において、ワクチンは、花粉、イエダニ、動物由来抗原などのアレルギー抗原、インスリン、グルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）、アセチルコリン受容体、アミロイドβ、αシヌクレイン、プリオン、アンジオテンシンIおよびII、ApoB100、コレステリルエステル転送タンパク質（CETP）などの疾患関連抗原を含む。
【００３３】
ある態様において、コアジュバント組成物は、細胞免疫療法において用いられる。細胞免疫療法としては、がん患者から採取した末梢血単核細胞からインビトロでがん反応性細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）を誘導して患者の体内に戻す養子免疫療法、がん患者から採取した末梢血単核細胞からインビトロでがん抗原ペプチドを提示する樹状細胞を誘導して患者の体内に戻す樹状細胞療法が例示される。コアジュバント組成物は、インビトロでのＣＴＬまたは樹状細胞の誘導を改善しうる。
【００３４】
コアジュバント組成物は、疾患の治療または予防のみならず、アジュバントの効果増強が望まれるあらゆる操作において使用することができる。例えば、ある態様において、コアジュバント組成物は、抗体または抗血清の製造に用いられる。抗原およびアジュバントとともにコアジュバント組成物を用いて動物を免疫することで、効果的に抗体を誘導することができる。免疫動物の血清は抗血清として使用することができ、また、免疫動物のリンパ球を用いてモノクローナル抗体を作成することもできる。
【００３５】
ある態様において、本発明は、抗原、アジュバント、およびコアジュバント組成物を含むワクチン組成物を提供する。
【００３６】
抗原は、免疫応答を誘導するものであればよく、タンパク質、ペプチド、核酸、脂質などが挙げられるが、これらに限定されない。抗原としては、上記のワクチンについて記載の抗原が例示される。アジュバントはコアジュバント組成物と併用されるアジュバントについて記載のとおりである。
【００３７】
ある態様において、本願のコアジュバント組成物およびワクチン組成物は、両親媒性物質、具体的には、炭素数１０～１２のホスファチジルコリン、炭素数１２～１８のポリオキシエチレンソルビタンモノ脂肪酸エステル、炭素数１６～１８のソルビタン脂肪酸エステル、モノオレイン酸グリセロール、ジラウリン酸グリセロール、ジステアリン酸グリセロール、ジオレイン酸グリセロール、ポリオキシエチレンヒマシ油およびα－トコフェロールからなる群から選択される両親媒性物質を含まず、および／または、前記両親媒性物質と併用されない。

【００３８】
ある態様において、コアジュバント組成物に含まれるHMGB1阻害剤は、グリチルリチンもしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物ではない。ある態様において、HMGB1阻害剤は、ガベキサート、ナファモスタットおよびシベレスタットもしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物からなる群から選択される。さらなる態様において、HMGB1阻害剤は、ガベキサートメシル酸塩、ナファモスタットメシル酸塩およびシベレスタットナトリウム水和物からなる群から選択される。
【００３９】
本開示は、例えば、以下を提供する。
１．HMGB1阻害剤を含む、コアジュバント組成物。
２．HMGB1阻害剤が、グリチルリチン、ガベキサート、ナファモスタットおよびシベレスタットもしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物からなる群から選択される、前記１に記載の組成物。
３．HMGB1阻害剤が、グリチルリチン酸一アンモニウム、グリチルリチン酸二カリウム、ガベキサートメシル酸塩、ナファモスタットメシル酸塩およびシベレスタットナトリウム水和物からなる群から選択される、前記１または２に記載の組成物。
４．自然免疫レセプターアゴニストと併用される、前記１～３のいずれかに記載の組成物。
５．自然免疫レセプターアゴニストが、TLRアゴニスト、RLRアゴニスト、STINGアゴニスト、NLRアゴニストまたはCLRアゴニストである、前記１～４のいずれかに記載の組成物。
６．自然免疫レセプターアゴニストがTLRアゴニストである、前記５に記載の組成物。
７．TLRアゴニストがイミキモド、レシキモド、モノホスホリルリピドAおよびCpG-ODNからなる群から選択される、前記６に記載の組成物。
８．TLRアゴニストがイミキモドまたはレシキモドである、前記７に記載の組成物。
９．アジュバントと別の製剤に含まれる、前記１～８のいずれかに記載の組成物。
１０．抗原と別の製剤に含まれる、前記１～９のいずれかに記載の組成物。
１１．アジュバントと別の投与経路で投与される、前記１～１０のいずれかに記載の組成物。
１２．抗原と別の投与経路で投与される、前記１～１１のいずれかに記載の組成物。
１３．アジュバントと別の投与部位に投与される、前記１～１２のいずれかに記載の組成物。
１４．抗原と別の投与部位に投与される、前記１～１３のいずれかに記載の組成物。
１５．ワクチンと併用される、前記１～１４のいずれかに記載の組成物。
１６．ワクチンががんワクチンである、前記１５に記載の組成物。
１７．ワクチンががん抗原ペプチドを含む、前記１６に記載の組成物。
１８．細胞免疫療法において用いられる、前記１～１０のいずれかに記載の組成物。
１９．HMGB1阻害剤が、グリチルリチンもしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物ではない、前記１～１８のいずれかに記載の組成物。
２０．HMGB1阻害剤が、ガベキサート、ナファモスタットおよびシベレスタットもしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物からなる群から選択される、前記１～１９のいずれかに記載の組成物。
２１．HMGB1阻害剤が、ガベキサートメシル酸塩、ナファモスタットメシル酸塩およびシベレスタットナトリウム水和物からなる群から選択される、前記１～２０のいずれかに記載の組成物。
２２．炭素数１０～１２のホスファチジルコリン、炭素数１２～１８のポリオキシエチレンソルビタンモノ脂肪酸エステル、炭素数１６～１８のソルビタン脂肪酸エステル、モノオレイン酸グリセロール、ジラウリン酸グリセロール、ジステアリン酸グリセロール、ジオレイン酸グリセロール、ポリオキシエチレンヒマシ油およびα－トコフェロールからなる群から選択される両親媒性物質を含まない、前記１～２１のいずれかに記載の組成物。
２３．炭素数１０～１２のホスファチジルコリン、炭素数１２～１８のポリオキシエチレ

ンソルビタンモノ脂肪酸エステル、炭素数１６～１８のソルビタン脂肪酸エステル、モノオレイン酸グリセロール、ジラウリン酸グリセロール、ジステアリン酸グリセロール、ジオレイン酸グリセロール、ポリオキシエチレンヒマシ油およびα－トコフェロールからなる群から選択される両親媒性物質と併用されない、前記１～２２のいずれかに記載の組成物。

【００４０】

本開示はさらに、例えば、以下を提供する。

１’．抗原、アジュバント、および前記１に記載のコアジュバント組成物を含む、ワクチン組成物。

２’．コアジュバント組成物が、グリチルリチン、ガベキサート、ナファモスタットおよびシベレスタットもしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物からなる群から選択されるHMGB1阻害剤を含む、前記１’に記載のワクチン組成物。

３’．コアジュバント組成物が、グリチルリチン酸一アンモニウム、グリチルリチン酸二カリウム、ガベキサートメシル酸塩、ナファモスタットメシル酸塩およびシベレスタットナトリウム水和物からなる群から選択されるHMGB1阻害剤を含む、前記１’または２’に記載のワクチン組成物。

４’．アジュバントが自然免疫レセプターアゴニストである、前記１’～３’のいずれかに記載の組成物。

５’．自然免疫レセプターアゴニストが、TLRアゴニスト、RLRアゴニスト、STINGアゴニスト、NLRアゴニストまたはCLRアゴニストである、前記１’～４’のいずれかに記載の組成物。

６’．自然免疫レセプターアゴニストがTLRアゴニストである、前記５’に記載の組成物。

７’．TLRアゴニストがイミキモド、レシキモド、モノホスホリルリピドAおよびCpG-ODNからなる群から選択される、前記６’に記載の組成物。

８’．TLRアゴニストがイミキモドまたはレシキモドである、前記７’に記載の組成物。

９’．抗原ががん抗原ペプチドである、前記１’～８’のいずれかに記載の組成物。

１０’．HMGB1阻害剤が、グリチルリチンもしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物ではない、前記１’～９’のいずれかに記載の組成物。

１１’．HMGB1阻害剤が、ガベキサート、ナファモスタットおよびシベレスタットもしくはその医薬上許容される塩、またはこれらの水和物からなる群から選択される、前記１’～１０’のいずれかに記載の組成物。

１２’．HMGB1阻害剤が、ガベキサートメシル酸塩、ナファモスタットメシル酸塩およびシベレスタットナトリウム水和物からなる群から選択される、前記１’～１１’のいずれかに記載の組成物。

１３’．炭素数１０～１２のホスファチジルコリン、炭素数１２～１８のポリオキシエチレンソルビタンモノ脂肪酸エステル、炭素数１６～１８のソルビタン脂肪酸エステル、モノオレイン酸グリセロール、ジラウリン酸グリセロール、ジステアリン酸グリセロール、ジオレイン酸グリセロール、ポリオキシエチレンヒマシ油およびα－トコフェロールからなる群から選択される両親媒性物質を含まない、前記１’～１２’のいずれかに記載の組成物。

１４’．炭素数１０～１２のホスファチジルコリン、炭素数１２～１８のポリオキシエチレンソルビタンモノ脂肪酸エステル、炭素数１６～１８のソルビタン脂肪酸エステル、モノオレイン酸グリセロール、ジラウリン酸グリセロール、ジステアリン酸グリセロール、ジオレイン酸グリセロール、ポリオキシエチレンヒマシ油およびα－トコフェロールからなる群から選択される両親媒性物質と併用されない、前記１’～１３’のいずれかに記載の組成物。

【００４１】

本開示はさらに、例えば、以下を提供する。

１’’．アジュバントの効果を増強する方法であって、HMGB1阻害剤を対象に投与するこ

とを含む方法。
２’’．免疫応答を増強する方法であって、HMGB1阻害剤をアジュバントともに対象に投与することを含む方法。
３’’．アジュバントの効果の増強に使用するための、HMGB1阻害剤。
４’’．免疫応答の増強に使用するための、アジュバントと併用される、HMGB1阻害剤。
５’’．コアジュバント組成物の製造のための、HMGB1阻害剤の使用。
【実施例】
【００４２】
１．方法
マウスおよび腫瘍細胞
8-12週齢の雌C57BL/6J (B6) マウス (CLEA Japan (Tokyo, Japan))を全ての実験で使用した。OT-I T細胞受容体トランスジェニックマウスは、Taconic (Hudson, NY) より入手した。E.G7-OVA (本明細書中、E.G7とも記載する) はATCC (Manassas, VA)より入手し、高グルコースRPMI1640 (50μM 2-メルカプトエタノール (2-ME)、0.4 mg/mL G418および10% ウシ胎児血清 (FBS; TRACE Scientific, Melbourne, Australia)含有) で維持した。EL-4はJCRB Cell Bank (Osaka, Japan)より入手し、10% FBS含有RPMI1640 (2-MEおよびG418不含、通常濃度のグルコース) で維持した。
【００４３】
試薬
オボアルブミン由来のH-2K^{b}拘束性CTLエピトープペプチドであるSIINFEKL ($OVA_{257-264}$) (配列番号１) は、American Peptide (Sunnyvale, CA)より購入した。グリチルリチン (Neo-Minophagen C, Eisai, Tokyo, Japan、成分：グリチルリチン酸一アンモニウム、グリシン、L-システイン塩酸塩水和物)、ガベキサートメシル酸塩 (Reminaron, Alfresa, Osaka, Japan)、ナファモスタットメシル酸塩 (Nafamostat, Shionogi, Osaka, Japan)、およびシベレスタットナトリウム水和物 (Elaspol, Ono Pharmaceutical, Osaka, Japan) をHMGB1阻害剤として使用した。5%イミキモド含有ベセルナクリーム(Mochida Pharmaceuticals, Tokyo, Japan)、CpG-ODN (ODN2395) (InvivoGen, San Diego, CA)、モノホスホリルリピドA (MPL) (InvivoGen) 、およびMontanide ISA51VG (Seppic, Paris, France)をアジュバントとして使用した。
【００４４】
免疫化プロトコール
免疫の1～3日前に、B6マウスの背側皮膚の毛を剃った。5%イミキモド (ベセルナクリーム; 約25 mg/匹) を、麻酔下でマウス背側皮膚に局所的に塗布した。30分後、$OVA_{257-264}$を含む抗原溶液 (CFSE増殖アッセイでは0.3μg、その他のアッセイでは5μg)を、グリチルリチン(20μg/匹)または他のHMGB1阻害剤(200μg/匹)とともに、全量0.1 mLで同じ領域に皮下注射した。
【００４５】
CFSE増殖アッセイ
抗原誘発T細胞増殖は、OT-I細胞のトランスフェクションにより評価した。OT-Iマウスの脾臓細胞を、5μMのCSFE (5- or 6-(N-Succinimidyloxycarbonyl) fluorescein 3',6'-diacetate) (Molecular Probes, Eugene, OR)と37℃で15分間インキュベートして標識した。細胞を2回洗浄した後、3 x 10^{6} 細胞 (0.2 mL) を各B6マウスの静脈内へ注入した(3-4マウス/群)。注入の1日後、OT-I細胞注入B6マウスを、$OVA_{257-264}$と各種アジュバントおよびHMGB1阻害剤とで免疫した。イミキモドは前記のとおり投与し、他のアジュバント (100μg/匹 CpG-ODN (ODN2395)、2μg/匹 MPL、50μL/匹 Montanide ISA51VG) は抗原ペプチドと共に、全量0.1 mLで皮下注射した。ワクチン投与の3日後、ワクチン投与したB6マウス由来の脾臓細胞を回収し、抗マウスCD8a-PerCP/Cy5.5 (BioLegend, San Diego, CA) で染色し、OT-I CD8 T細胞の増殖をFACS CantoII system (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)により解析した。
【００４６】

ELISPOTアッセイ

CTL応答は、IFN-γ ELISPOTアッセイにより評価した。各処理群につき5匹のマウスを、1週間隔で2回免疫した。ワクチン投与したB6マウスから、最終ワクチン投与の1週間後に脾臓細胞を回収し、RBC溶解バッファーに再懸濁し、次いで10^7 細胞/mLにてX-VIVO 15 (Lonza, Walkersville, MD) (10 mM HEPES、2 mM GlutaMax、および0.05 mM 2-ME含有) に再懸濁した。10^6 細胞の脾臓細胞 (0.1 mL)を、抗マウスIFN-γ抗体 (AN18) (Mabtech, Nacka Strand, Sweden)でコートした96ウェルプレート (Multi-Screen Filter Plate (MSHAS4510)) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)に播種した。等量のX-VIVO 15 (20μg/mL $OVA_{257-264}$含有または$OVA_{257-264}$不含) を各ウェルに添加した。37℃で18時間インキュベートした後、プレートをビオチン結合抗マウスIFN-γ (R4-6A2) (Mabtech)と室温で2時間インキュベートし、その後、ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)と室温で1時間インキュベートした。IFN-γスポットは、SIGMAFAST BCIP/NBT (Sigma-Aldrich)で可視化した。ELISPOTプレートは、ImmunoCapture version 6.4 (Cellular Technology, Ltd., Shaker Heights, OH)により解析した。

【００４７】

移植腫瘍に対する治療用ワクチンモデル

E.G7 細胞 (1 x 10^6 細胞、0.1 mL中) を剃毛したB6マウスの左背側皮膚に皮下注射した。腫瘍塊が直径7-8 mmに達した時にワクチン投与を開始した。イミキモド塗布処理をした後、$OVA_{257-264}$ (5μg)をグリチルリチンとともに全量0.1 mLでマウス背側皮膚に皮下投与した。ワクチン投与は1週間隔で3回行った。腫瘍の増殖は2日または3日毎に測定した。腫瘍サイズは以下のように表した：腫瘍サイズ (mm^2) = 長径 (mm) x 短径 (mm)。

【００４８】

リアルタイムPCR

各種免疫関連遺伝子のレベルをリアルタイムPCRにより測定した。ワクチン投与部位の皮膚 (10 mm x 15 mm) および脾臓標本を、ワクチン投与の6、12、および24時間後にマウスから得た。これら標本をRNAlater (Ambion, Austin, TX)に浸漬し、4℃で保存した。RNAの抽出および精製は、RNeasy Plus Universal Mini KitをTissueRuptorシステム (Qiagen, Hilden, Germany) とともに製造元の推奨にしたがい使用して行った。cDNAは、500 ngのトータルRNAからReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて合成した。リアルタイムPCRは、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いてStepOnePlus (Applied Biosciences, Foster City, CA)で行った。

【００４９】

統計学的解析

統計学的解析は、JMP version 11 software (SAS Institute, Cary, NC)を用いて行った。

【００５０】

２．結果

OT-I T細胞の抗原誘発増殖に対するグリチルリチンの効果

OT-Iマウス由来のCFSE標識脾臓細胞をB6マウスに移植し、1日後、アジュバントとしてTLR7アゴニストであるイミキモドを局所投与し、同じ領域に$OVA_{257-264}$ペプチドとグリチルリチンとを混合して皮下注射した。OT-I CD8 T細胞の増殖を免疫の2日または3日後にFACS解析により評価した（図１）。本実験において、$OVA_{257-264}$＋イミキモド投与群で大部分のOT-I CD8 T細胞の増殖が誘導され、$OVA_{257-264}$＋イミキモド＋グリチルリチン投与群と比較して全増殖細胞数に相違は見られなかった。一方、3回以上増殖した細胞の数を比較すると、グリチルリチンは$OVA_{257-264}$およびイミキモドの免疫による効果を有意に増強した。このグリチルリチンの増強効果は、イミキモドを用いずに$OVA_{257-264}$を免疫した群では観察されなかった。これらの結果は、グリチルリチンは、単独ではアジュバント効果を示さないが、コアジュバント効果を有することを示す。

【００５１】

グリチルリチンがイミキモドとは異なるアジュバント系であるMPL、CpG-ODN (ODN2395)

および不完全フロイントアジュバント(Montanide ISA51VG)において抗原誘発T細胞増殖を増強するかを調べた（図２）。MPLはTLR4アゴニスト、CpG-ODNはTLR9アゴニストである。不完全フロイントアジュバントは、抗原ペプチドとアジュバントとの混合物の油中水型エマルジョンから抗原ペプチドがゆっくりと放出される、抗原貯蔵システムの一種である。グリチルリチンの効果は、MPLおよびCpG-ODNでは観察されたが、不完全フロイントアジュバントでは観察されなかった。

【００５２】

HMGB1阻害剤のコアジュバント効果

グリチルリチンはHMGB1の選択的阻害剤である。それゆえ、次に、$OVA_{257-264}$誘発T細胞増殖に対するグリチルリチンの効果が他のHMGB1阻害剤（ガベキサートメシル酸塩、ナファモスタットメシル酸塩およびシベレスタットナトリウム水和物）で観察されるかを検討した。図３に示すように、ガベキサートメシル酸塩およびナファモスタットメシル酸塩は$OVA_{257-264}$誘発OT-I CD8 T細胞増殖を有意に増強し、シベレスタットナトリウム水和物も、統計学的に有意ではないものの増強する傾向を示した。ガベキサートメシル酸塩およびナファモスタットメシル酸塩はセリンプロテアーゼ阻害活性を有し、シベレスタットナトリウム水和物は好中球エラスターゼ阻害活性を有するが、グリチルリチンはかかる活性を有さない。これらの結果は、グリチルリチンで観察された増強効果が他のHMGB1阻害剤でも観察されることを示す。

【００５３】

インビボでの抗原特異的CTL誘導に対するグリチルリチンの効果

B6マウスにおける$OVA_{257-264}$誘発CTL誘導をELISPOTアッセイにより解析した。B6マウスに、イミキモドの局所投与後、グリチルリチンと混合した$OVA_{257-264}$または混合してない$OVA_{257-264}$を皮下注射により1週間隔で2回投与して免疫した。最終免疫の1週間後に脾臓細胞を得て、インビトロでの抗原特異的T細胞の増殖は行わず、IFN-γ ELISPOTアッセイに供した。各マウスにおける、$OVA_{257-264}$に応答するIFN-γ産生細胞の数を図４に示す。$OVA_{257-264}$単独で免疫したマウスのIFN-γ産生細胞数の平均＋2SDより値が高かった場合に、応答が増強されたと判定し、全マウスに対する増強率を示した。増強されたマウスの割合は、$OVA_{257-264}$＋イミキモド＋グリチルリチン投与群においてのみ、$OVA_{257-264}$単独投与群より有意に高かった（4/5と0/5、$p<0.05$)。かかるグリチルリチンの増強効果は、イミキモドを用いずに$OVA_{257-264}$のみで免疫した群では観察されなかった。

【００５４】

ペプチドワクチン投与により誘導されるインビボでの抗腫瘍効果のグリチルリチンによる増強

グリチルリチンのコアジュバント効果を、治療用ワクチンモデルを用いて更に検討した。E.G7腫瘍細胞を、B6マウスに皮下注射により移植した。移植したE.G7細胞が固形腫瘍塊を形成したことを確認した後、イミキモドおよび／またはグリチルリチンを用いて、あるいはこれらを用いずに、$OVA_{257-264}$によりマウスを免疫した。各群のマウスの腫瘍増殖および全生存期間を図５ａに示す。$OVA_{257-264}$＋イミキモド投与群または$OVA_{257-264}$単独投与群と比較して、$OVA_{257-264}$＋イミキモド＋グリチルリチン投与群では腫瘍増殖が抑制されているようであった。$OVA_{257-264}$＋イミキモド投与群および$OVA_{257-264}$＋イミキモド＋グリチルリチン投与群の14日目から26日目の各マウスの腫瘍増殖のプロットにより、この2つの群の腫瘍増殖が有意に異なることが明らかとなった。次いで、腫瘍特異性について検討した。E.G7細胞または親株のEL4細胞（OVA陰性)をB6マウスに移植し、腫瘍塊の形成後、$OVA_{257-264}$ワクチン投与とともに、または$OVA_{257-264}$を投与せずに、イミキモドおよびグリチルリチンの処理を開始した。図５ｂに示すように、$OVA_{257-264}$投与による腫瘍増殖阻害はEG.7移植マウスにおいてのみ観察され、EL4移植マウスでは観察されなかった。すなわち、本実験で観察された腫瘍増殖阻害は抗原特異的であった。

【００５５】

免疫関連遺伝子の発現に対するグリチルリチンの効果

ワクチン投与部位の皮膚組織における免疫6-24時間後の各種免疫関連遺伝子のmRNA発現

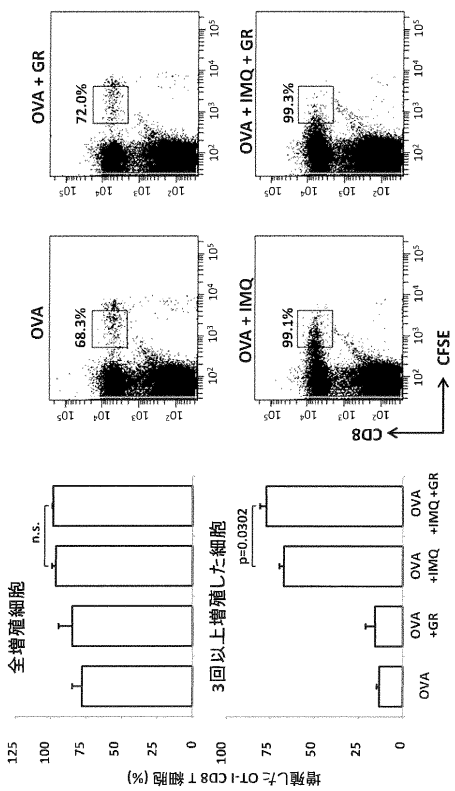
レベルをリアルタイムPCRにより解析した（図６）。グリチルリチン非処理の$OVA_{257-264}$＋イミキモド投与群と比較して、$OVA_{257-264}$＋イミキモド＋グリチルリチン投与群では、IL-1β、IL-6、IL-10、COX-2、INF-αおよびTNF-αの発現が皮膚免疫部位において低下していた。Arg1の発現はイミキモドにより抑制され、$OVA_{257-264}$＋イミキモド＋グリチルリチン投与群の発現レベルも、$OVA_{257-264}$単独投与群より低かった。グリチルリチン単独では、これら免疫関連サイトカインのレベルは変化しなかった（データ非提示）。これらの結果は、HMGB1阻害剤が自然免疫レセプターを介して誘導される炎症反応を抑制することを示す。

【００５６】

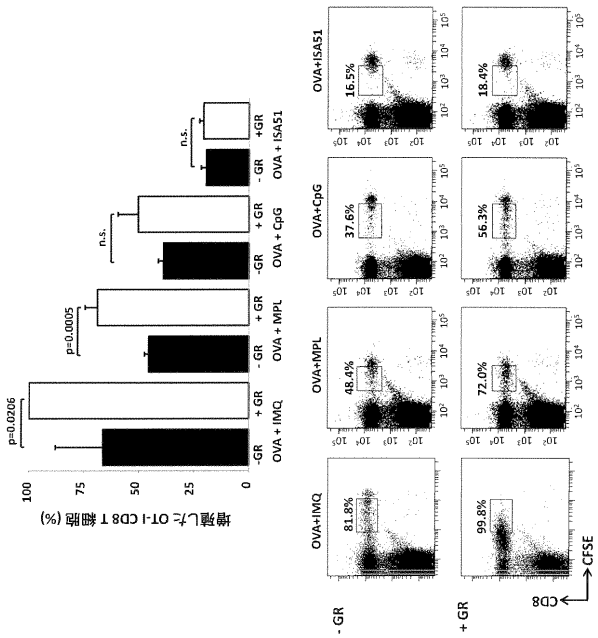
HMGB1阻害剤の投与経路の検討

OT-I T細胞の抗原誘発増殖に対するHMGB1阻害剤の投与経路を検討した。OT-Iマウス由来のCFSE標識脾臓細胞をB6マウスに移植し、1日後に、イミキモドを背側皮膚に局所投与した。30分後、イミキモドと同じ領域に$OVA_{257-264}$とグリチルリチンとを混合して皮下投与（sc mix群）、もしくは$OVA_{257-264}$とグリチルリチンとを近接する位置で別々に皮下投与（sc proximal群）するか、または、$OVA_{257-264}$をイミキモドと同じ領域に皮下投与し、グリチルリチンを腹腔内投与（ip群）した。OT-I CD8 T細胞の増殖を免疫の3日後にFACS解析により評価した（図７）。いずれの投与経路によっても、グリチルリチンの併用により、OT-I CD8T 細胞の増殖が増強された。これらの結果は、HMGB1阻害剤が、抗原またはアジュバントとの同時混合投与のみならず、別の投与部位または投与経路によっても投与可能であることを示す。

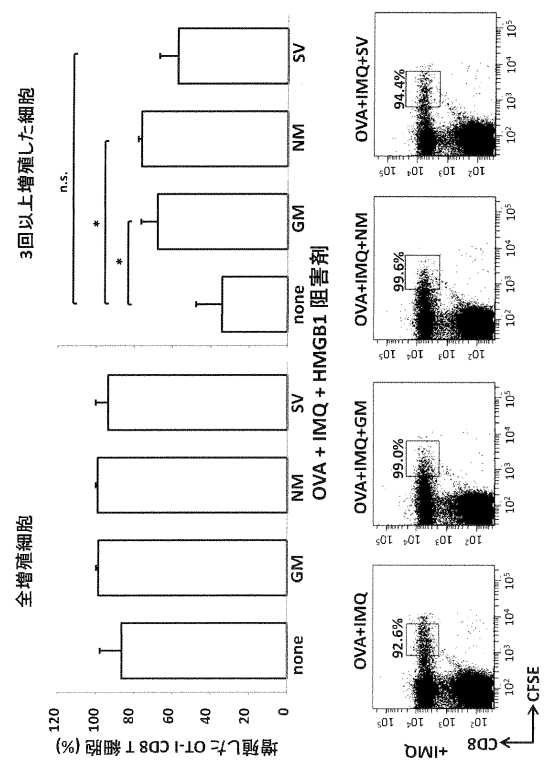
【図１】



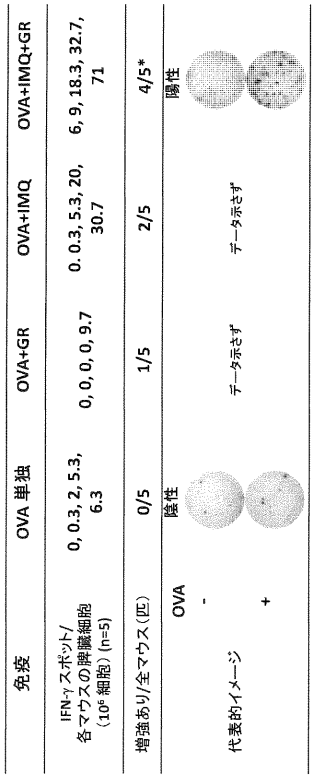
【図２】



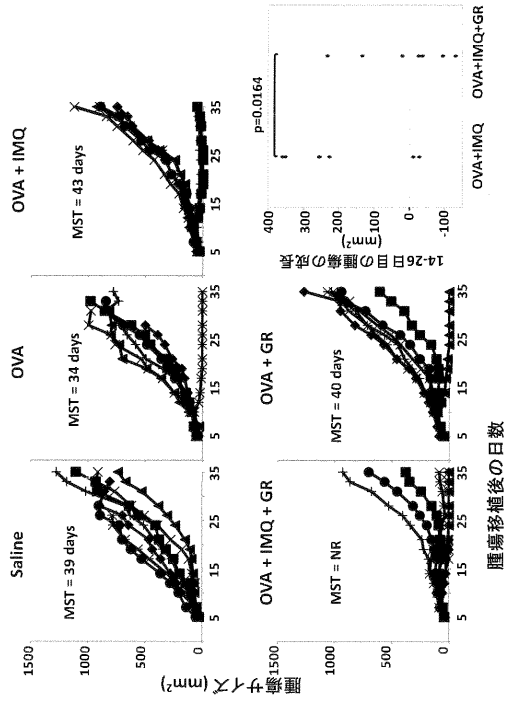
【図３】


全増殖細胞
3回以上増殖した細胞
増殖した OT-I CD8 T 細胞 (%)
none
GM
NM
SV
OVA + IMQ + HMGB1 阻害剤
n.s.
OVA+IMQ
OVA+IMQ+GM
OVA+IMQ+NM
OVA+IMQ+SV
92.6%
99.0%
99.6%
94.4%
+IMQ
CD8
CFSE

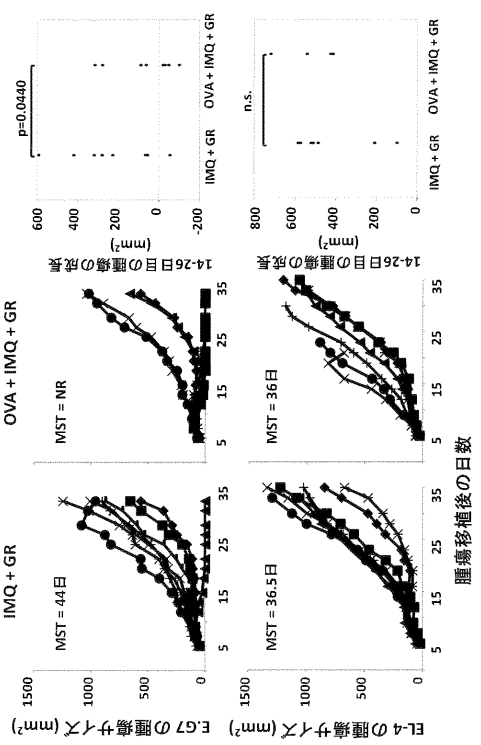
【図４】


免疫
OVA 単独
OVA+GR
OVA+IMQ
OVA+IMQ+GR
IFN-γスポット/各マウスの脾臓細胞 (10⁶ 細胞) (n=5)
0, 0.3, 2, 5.3, 6.3
0, 0, 0, 0, 9.7
0. 0.3, 5.3, 20, 30.7
6, 9, 18.3, 32.7, 71
増強あり/全マウス (匹)
0/5
1/5
2/5
4/5*
OVA
陰性
陽性
代表的イメージ
データ示さず
データ示さず

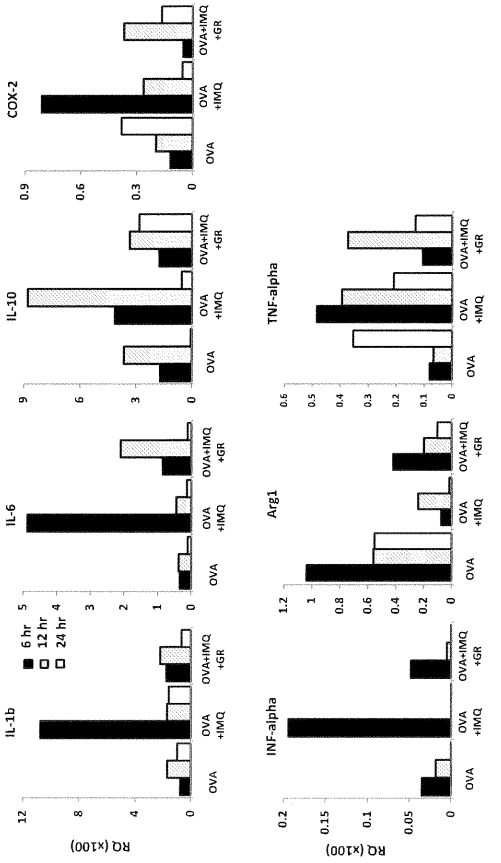
【図５ａ】


Saline
OVA
OVA + IMQ
OVA + IMQ + GR
OVA + GR
MST = 39 days
MST = 34 days
MST = 43 days
MST = NR
MST = 40 days
腫瘍サイズ (mm²)
腫瘍移植後の日数
14-26日目の腫瘍の成長
p=0.0164
OVA+IMQ
OVA+IMQ+GR

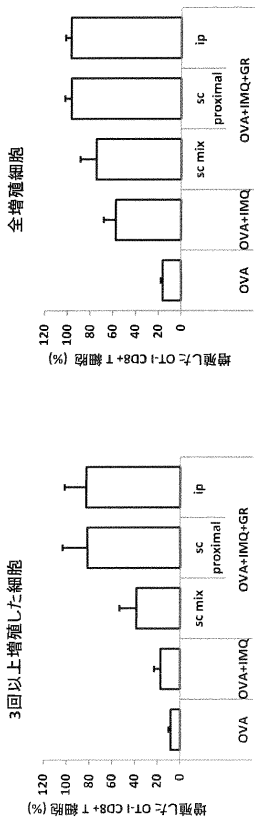
【図５ｂ】


IMQ + GR
OVA + IMQ + GR
MST = 44日
MST = NR
MST = 36.5日
MST = 36日
E.G7 の腫瘍サイズ (mm²)
EL-4 の腫瘍サイズ (mm²)
腫瘍移植後の日数
14-26日目の腫瘍の成長
p=0.0440
n.s.
IMQ + GR
OVA + IMQ + GR

【図６】



【図７】



【配列表】

2018024594000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　45/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		
Ａ６１Ｋ　31/4745	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/4745		
Ａ６１Ｋ　39/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｈ	
Ａ６１Ｐ　35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ　31/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00		
Ａ６１Ｐ　37/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		
Ａ６１Ｐ　37/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06		
Ａ６１Ｐ　37/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/08		
Ａ６１Ｐ　25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｐ　9/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00		
Ａ６１Ｐ　43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	

(72)発明者　和氣　加容子
福岡県久留米市旭町６７番地　学校法人　久留米大学内

Ｆターム(参考) 4C084 AA19 NA05 ZB071 ZB072 ZC422
4C085 AA03 AA38 BB01 FF12
4C086 AA01 AA02 CB05 EA19 MA01 MA04 MA06 NA14 ZB07 ZC41
4C206 AA01 AA02 FA44 HA31 JA13 MA01 MA04 MA06 MA28 NA14
ZB07 ZC41