

## 厚生労働科学研究費補助金

### 新興・再興感染症研究事業

結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究:

[ 抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン(サブユニット・DNA-・リコンビナントBCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法 ]  
に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 全司

平成17 (2005) 年3月

## 目 次

I. 総括研究報告			
結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究： [抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく 結核ワクチン（サブユニット・DNA・リコンビナントBCGワクチン） ・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法] に関する研究	岡田全司	——	1
II. 分担研究報告			
1. 新しい結核ワクチンによる臨床応用 （国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークを利用した）計画 に関する研究	坂谷光則	——	38
2. 結核サブユニットワクチンの開発：モルモットにおけるBCG- Tokyo細胞壁画分(CCW)の結核感染防御効果の検討に関する研究	矢野郁也	——	53
3. ツベルクリン反応に代わる結核菌感染特異的診断の開発に関する 研究	螺良英郎	——	57
4. 組み換えBCGワクチン改良・開発の研究に関する研究に関する 研究	大原直也	——	63
5. 新規結核DNAワクチンおよびバキュロウィルスビリオンワクチ ンの開発に関する研究	吉田栄人	——	68
6. ヒトマクロファージの結核菌殺菌機構における NRAMP1 及び MAP 系シグナル伝達機構の役割と GM 型マクロファージにおけ る結核菌殺菌能誘導機構の開発に関する研究	赤川清子	——	72
7. 国立病院機構の呼吸器ネットワークを用いた、多剤耐性結核患 者のリンパ球、血清における 新しい結核ワクチン抗原・結核 診断抗原に対するT細胞免疫応答の解析および多剤耐性結核 自己活性化T細胞輸注療法の検討に関する研究	倉島篤行	——	76
8. 活動性結核症患者の末梢血単球/マクロファージのIFN- $\gamma$ に対 する低応答性の原因に関する研究	土肥義胤	——	80
9. 結核に対する新しいワクチンの開発及び動物を用いた効果判定 に関する研究	菅原 勇	——	82
10. 結核菌症の病態解明とDCを用いた細胞遺伝子治療の開発に関す る研究	原 寿郎	——	84
11. 結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研 究	竹田 潔	——	92
12. 新しい結核ワクチン（①HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNAワ クチン、②リコンビナント72f BCGワクチン、③72f融合タンパ ク+BCG東京ワクチン）三種のワクチン接種マウス、モルモッ ト、カニクイザルの病理形態学的検討に関する研究	井上義一	——	99
13. 研究協力者研究報告書		——	109
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		——	135

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究：  
[抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン  
(サブユニット・DNA・リコンビナントBCG-ワクチン)・化学療法剤の開発  
による新しい治療・予防・診断法]に関する研究

主任研究者

岡田全司 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター 結核研究部長

研究要旨

〔1〕 新しい結核予防ワクチンの開発

(1) 新しいDNA ワクチンの開発 (Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチン：

Hsp65 = ヒト結核菌由来の Heat Shock Protein)

- ① BCG ワクチンより 1 万倍強力な結核予防ワクチン (HVJ/Hsp65+IL-12DNA ワクチン)開発に成功した。HVJは GMP レベル。
- ② プライムブースト法で、BCG ワクチンでプライムしこのワクチンでブーストすると極めて強力なワクチン効果を得ることに成功した。
- ③ カニクイザルの系で世界で初めて、結核予防ワクチンの有効性を示した。画期的な新しい結核予防ワクチンの開発に成功した。(Vaccine 2005)
- ④ このワクチンを第一候補として本邦・アジアでの臨床応用 (phase I、II study)計画。すでにタイ国との間で成立した。
- ⑤ キラーT細胞分化とヘルパーT(Th1)を活性化しワクチン効果を発揮することを明らかにした。
- ⑥ 研究が評価され WHO STOP TB Partnership 及び WHO TB Vaccine Meeting メンバーに選ばれた。WHO 推奨の最先端のワクチンの一つに選ばれた。

(2) 新しいリコンビナント BCG ワクチンの開発 (リコンビナント 72f BCG ワクチン)

マウス、モルモット、カニクイザルで BCG より強力なリコンビナント 72f BCG ワクチンの開発に成功した。又 r(Ag85B+ 85A+ MPB51)BCG も有効。

(3) 新しい結核サブユニットワクチンの開発

Mtb72f 融合蛋白ワクチンはマウス・モルモット・カニクイザルで有効。多剤耐性結核 T リンパ球活性化機能を示した。72f 蛋白は結核菌由来 Mtb39+ Mtb32 の融合蛋白である。

- (4) 経口弱毒化リステリア結核ワクチン (Ag85B) を開発。1 千倍発現効率が高い AAV ベクター/Hsp65DNA の開発に成功した。ユビキチン-、Sendai ウイルス-ベクターも開発した。

[2] 新しい結核治療ワクチンの開発 (Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチン)

- (1) 上記の Hsp65+IL-12DNA ワクチンは結核治療ワクチン効果も示し、世界で初めて結核治療ワクチンを創製することに初めて成功した。
- (2) マウスの系で、先に結核菌を投与した後、このワクチンを投与しても結核菌を減少させ、画期的な結核治療効果を明らかにした。
- (3) IL-6 関連遺伝子ワクチン (アデノウイルスベクター/IL-6+IL-6R+gp130-DNA) は結核治療ワクチンとして有効であることを明らかにした。

[3] 多剤耐性結核治療法 (化学療法剤) の開発

ヒト多剤耐性結核治療モデル IL-2R $\gamma$  鎖(-/-)SCID-PBL/hu を初めて作製した。これを用い多剤耐性結核にも有効な新しい結核化学療法剤(opc)開発に成功した。

[4] ツベルクリン反応に代わる新しい結核感染特異的診断法の開発に成功した。

- (1) DPPD 蛋白 [PPD に含まれる多くの蛋白の中より遺伝子クローニングし単離した蛋白で、唯一皮内反応で結核感染特異的 (モルモット及びヒトの系) ] によるツ反に代わる皮内反応法を確立した。
- (2) ESAT-6+CFP-10 による in vitro IFN- $\gamma$  産生。 の 2 種の新しい診断法開発に成功。

[5] 多剤耐性結核・難治性結核の予後診断法の開発

キラーT 細胞由来の結核菌殺傷蛋白 15K Granulysin は結核患者、特に多剤耐性結核や糖尿病合併難治性結核で著明に低下することを発見した。また、キラーT の Killer Secretory Protein (KSP37)の低下を発見した。

[6] キラーT 細胞由来結核菌殺傷蛋白(granulysin)の新しい結核菌殺傷メカニズムの発見と新しい治療剤としての発見 :

- (1) 結核菌症の病態解明に成功 :
- ① 15kd の granulysin(15K Gra)が直接マクロファージ(M $\phi$ )に入り、M $\phi$  内の結核菌を殺傷する事を見出した (特許)。

② 15K Gra DNA ワクチンは結核予防・治療効果を示した。

(2) Gra transgenic マウス (15K Gra transgenic マウス及び 9K Gra transgenic マウス) 作製に初めて成功し、15K Gra の生体内結核菌殺傷作用を初めて明らかにした。

[7] 結核症の病態解明：IFN- $\gamma$  レセプター欠損患者を多数発見し、結核菌に対する易感染性を明らかにし、IFN- $\gamma$  の結核免疫における重要性を明らかにした。また M-CSF は結核菌抵抗性 M $\phi$  分化に重要であることや、種々のサイトカイン・シグナル伝達分子 (IRF-1 等) の重要性をノックアウトマウスを用い病態を解明した。

[8] スーパー・スプレッダー多剤耐性結核の発見と TLR 認識エスケープの発見

(1) スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌を発見し、TLR4 の認識機構をエスケープする結果を世界に先駆けて明らかにした。

(2) TRIF(-/-)×MyD88(-/-)マウスを作製し、結核感染防御にこの二つのシグナル蛋白が重要であることを発見。結核免疫に自然免疫系の活性化シグナルの重要性を発見。

#### 分担研究者

坂谷光則  
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター  
病院長

吉田栄人  
自治医科大学 医動物学  
講師

矢野郁也  
日本BCG研究所  
中央研究所  
所長

赤川清子  
国立感染研究所  
免疫学部  
室長

螺良英郎  
財団法人大阪結核研究会  
理事長

倉島篤行  
国立病院機構東京病院  
臨床研究部長

大原直也  
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科  
口腔病原微生物学  
助教授

土肥義胤  
甲子園大学 栄養学部  
(大阪大学)  
教授(名誉教授)

菅原 勇  
財団法人結核予防会結核研究所  
抗酸菌レファレンスセンター  
センター長

原 寿郎  
九州大学大学院  
医学研究院成長発達医学  
教授

竹田 潔  
九州大学生体防御医学研究所  
ゲノム機能制御学研究分野  
発生工学分野  
教授

井上義一  
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター  
臨床研究センター呼吸不全研究部  
部長

#### A. 研究目的

結核罹患率の横這い、集団感染が頻発、AIDSや糖尿病患者等の免疫不全疾患に高頻度に合併、薬剤耐性結核が増え、いわゆる難治性結核の対策が早急に望まれていることより、我々の新しい治療・予防・診断の研究が必須である。

したがって、BCGよりもより強力な新しい結核治療ワクチン・結核予防ワクチン〔サブユニットワクチン、DNAワクチンおよびリコンビナントBCGワクチン(rBCG)〕の開発の臨床研究を行うことを目的とする ② さらに、最近キラーT細胞ならびにgranulysinの結核免疫に対する重要性が示唆されつつあるが、このキラーT細胞活性と結核発症を分子・遺伝子レベルで解明し、結核菌症の病態を解明するとともに ③ これらを用いた新しい治療法及び新しい結核予後診断・難治性診断法の開発を行う。

④ Toll like レセプター(TLR)とキラー細胞からの結核菌症(特に多剤耐性結核菌)の免疫監視エスケープ機構を解明し、新しい治療薬(新しい化学療法剤等)を開発する。多剤耐性結核の新しいワクチン・治療法を開発する。 ⑤ ツベルクリン反応に代わる新しい結核感染特異的診断法の開発 ⑥ 当院(結核・呼吸器準ナショナルセンター)を中心として、日本の43%の結核患者の治療を行っている、国立病院機構政策医療呼吸器ネットワーク(54施設)を利用して臨床応用を行う。

#### B. 研究方法

##### [ I ] DNAワクチンの作製とカニクイザルへのワクチン免疫方法

カニクイザルの免疫実験のため、ヒトIL-12p40, p35両遺伝子を健常人のPBMCよりクローニングした。DNAワクチン用ベクターとしてIL-12p40 p35融合タンパクを発現するプラスミドベクターを構築した。構築したIL-12p40 p35DNAワクチンとHSP65 DNAワクチンはHVJ-liposomeに包埋し、カニクイザルに接種した。(岡田、吉田、金田、Reed, Gillis)

米国NIH branchでWHOの支援研究機関であるLeonard Wood Memorial研究所(フィリピン、セブ)で行った。Leonard Wood Memorial研究所は世界で唯一多数のカニクイザルをP3レベルで結核研究できる施設である。この研究室からNatureに1996年、カニクイザルが最もヒト結核に近いモデルである有名な研究が発表された。

##### <実験 I >

Dr.Babie Tan, Dr.Cruz(Leonard Wood), Dr.Reed(Corixa)との共同研究でワクチンの投与群を5群に分け、各群4匹で行った。

- 1群 r72fBCG投与群
- 2群 HVJ-liposome/HSP65DNA+  
IL-12DNA投与群
- 3群 72f fusion蛋白+ BCG東京投与群
- 4群 BCG東京投与群
- 5群 生理食塩水投与群

各ワクチンを3週間隔で3回予防ワクチン $5 \times 10^6$ cfu皮内投与(0.1mlの生食に浮遊)した。HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNAはi.m.投与した。72f fusion蛋白はBCG東京浮遊液に同時に入れ、注射も同部位で行った。72f fusion蛋白+ BCG東京群の意味は、72f fusion蛋白予防ワクチンはカニクイザルでBCG接種後4ヶ月して投与した場合著明なワクチン効果を示したことにより、BCGをアジュバントとして72f fusion蛋白と同時に注射すると極めて強力なワクチン効果が得られる可能性があることより、このプロトコルを作製した。最終ワクチン投与4週後に強毒ヒト結核菌クロナ株を気道内投与した。

さらに、全62頭の多数のカニクイザルを用いて、以下の結核予防ワクチン効果を解析した。

#### <実験Ⅱ>

- HVJ-リボソーム/HSP65DNA+ IL-12 DNAワクチン効果の再現性実験
- G1. HVJ-リボソーム 3回投与  
/HSP65DNA+ IL-12DNA  
ワクチン群
  - G2. HVJ-リボソーム/GFP DNA 3回投与  
ワクチン群
  - G3 リコンビナント72f BCG 3回投与  
ワクチン群
  - G4 BCG東京+ Mtb72f protein 3回投与  
ワクチン群
  - G5 BCG東京ワクチン群 3回投与

- G6 BCG東京ワクチン群 1回投与
- G7 リコンビナント72f BCG 1回投与  
ワクチン群
- G8 BCG東京(priming)+  
72f蛋白/AS2(booster3回)
- G9 リコンビナント72f BCGワクチン  
(priming)+ 72f蛋白/AS2  
(booster 3回)
- G10 生食投与群

#### <実験Ⅲ> Priming-Booster法の解析

- G1 BCG東京(priming)+ HVJ-リボソーム  
/HSP65DNA+ IL-12DNA  
(booster 2回)
  - G2 HVJ-リボソーム/HSP65DNA+ IL-  
12DNA(priming)+ BCG東京  
(booster 2回)
  - G3 リコンビナント72f BCG (priming)  
+ HVJ-リボソーム/HSP65DNA+ IL-  
12DNA (booster 2回)
- コントロールは実験Ⅱの
- G6
  - G7
  - G10
  - G1

予防ワクチン効果は、生存率、胸部X線、血沈、体重、体温、PPD皮内反応ならびにワクチン投与ザルの末梢血Tリンパ球の増殖増強反応で解析した。末梢血T細胞をリコンビナントHSP65  $10 \mu\text{g/ml}$ 、リコンビナント72f  $10 \mu\text{g/ml}$ 、PPD  $10 \mu\text{g/ml}$ 、PHA-P 0.2%で刺激し、 $^3\text{H}$ -サイミジンuptakeの方法で三日後に増殖活性を測定した。

上記の検査は、①ワクチン投与前、②ワクチン1回目投与後3週後、③2回目投与3週後、④3回目投与後3週後、⑤TB菌投与4週後、⑥TB菌投与8週後行った。

#### [Ⅱ] Priming-Boosterワクチンの開発 (マウスの系で)

本邦では6ヶ月までにBCGワクチン接種が行われることより、成人(小学生、又は中学生も含む)ワクチンにおける有効なboosterワクチンの開発が切望されている。

したがって、HSP65DNA+IL-12DNAワクチンとBCG東京ワクチンのpriming-booster結核予防ワクチン効果を解析した。

PrimingとしてHSP65DNA+IL-12DNAワクチン、boosterワクチンとしてBCG東京を用いる系で解析した。

さらに、BCGワクチンをprimingワクチンとし、DNAワクチンをboosterワクチンとする方法を比較検討した。

Primingを1回行い、3週間隔でboosterワクチンを投与した。3回免疫後、4週後にH37Rvを感染させ、結核菌に対する予防ワクチン効果を解析した。

### [III] リコンビナントBCGワクチンの作製

Mtb72f DNA導入リコンビナントBCG  $1 \times 10^6$ あるいはBA51(Ag85B+Ag85A+MPB51)リコンビナントBCGをBALB/cマウスに皮下投与3回(2週間隔)し、結核感染(H37Rv  $5 \times 10^5$  i.v.)した後、4週後と10週後の肺・肝・脾臓の結核菌数を測定した。モルモットの実験系におけるr72f BCGワクチン効果はモルモット(ハートレイ系)にr72f BCGを  $1 \times 10^3$  CFU1回皮内投与し、8週後に  $1 \times 10^1$  CFUの結核菌を気道内投与し、結核菌感染後7週後に脾、肝、肺の結核菌数と脾細胞の免疫応答を解析した。

### [IV] モルモットを用いた結核菌吸入感染系における新しい結核ワクチンの予防効果のアッセイ

モルモットを用いた結核研究の世界の第一人者Texas A&M大学教授David N. McMurray博士と共同研究を行った。(McMurray博士は結核エアゾル感染さ

せたモルモットを用いて、米国FDAやNIHより委託された新しい結核ワクチンの効果判定を行っており、名実ともにモルモットを用いた結核研究の大御所である。)

結核DNAワクチン群を第1群BCG( $1 \times 10^3$ )ワクチン、第2群Emptyベクターワクチン、第3群HVJ-liposome / HSP65 DNAワクチン、第4群HVJ-liposome / モルモットIL-12 DNAワクチン、第5群HVJ-liposome / HSP65 DNA+モルモットIL-12DNAワクチンの5群、各群7匹のモルモットを用いた。

各々のワクチンをモルモットに3回免疫した後、最終免疫より6週後にヒト結核菌H37Rvを吸入感染させた。結核菌吸入感染後5週後にモルモットをsacrifyし血液を採取し、肺臓、肝臓、脾臓の病理組織の解析と肺臓、肝臓の結核菌数を7H11寒天培地で解析した。又、脾リンパ球の免疫機能(サイトカイン産生、IFN- $\gamma$ 等)を解析した。

一方、結核菌を吸入感染させる直前の結核ワクチン投与モルモットの免疫反応をIFN- $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-12p40等のRT-PCRを用いてサイトカイン活性を測定した。

### [V] サブユニットワクチン

結核菌に対する免疫応答において、多くのT細胞エピトープを持つ抗原蛋白の方がペプチドよりも有効なワクチンとなる。又、一つのリコンビナントの抗原蛋白よりもmultiple antigens (poly-protein)の方がより有効であることが考えられる。したがって、遺伝子工学的手法を用いて種々のfusion蛋白を作製し、これらの予防ワクチン効果を、マウス、モルモット、カニクイザルで検討した。Mtb39とMtb32をタンデム(Mtb72fと呼ぶ)に発現する遺伝子を構築した。最もヒトの結核感染に類似した



モデルのカニクイザルを用いて予防効果を解析した。3回Mtb72fで免疫し、最終免疫より4週間後に強毒株、ヒト型結核菌Erdman株を $1 \times 10^3$ 気道内チャレンジした。致死率、体重減少、血沈、肺のX-P所見で予防ワクチン効果を判定した。(岡田、井上、坂谷、Reed、Gillis)

[VI] AAV(アデノ随伴ウイルスベクター)及びアデノウイルスベクターを用いた発現効率の良い結核ワクチンの開発

今まで通常AAVベクターとして使用されていたAAV(2/1)ベクターに代わり、1000倍発現効率が良い AAV(2/5)ベクターにHSP65 DNA及びAg85B DNAを挿入して、AAV/HSP65 DNAワクチン及びAAV/Ag85B DNAワクチンを作製した。さらに、E1a、E1b、E3欠損アデノウイルスベクターにこれらの遺伝子を導入した。Adenovirus vector/ Ag85B DNAワクチン及びAdenovirus vector/HSP65 DNAワクチンを作製した。

[VII] Attenuatedリステリア菌を用いた新しい経口結核ワクチンの開発

リステリア(*Listeria monocytogenes*)は生体内でマクロファージ、樹状細胞などの抗原提示細胞の食胞に取り込まれ、その後listeriolysin O (LLO)を分泌することにより、食胞膜を破壊し細胞質に移行する。そこで、弱毒リステリア株にDNAワクチン(プラスミド)を導入し、感染させた。

結核菌抗原であるAg85A、Ag85BおよびMPB(MPT)51をコードする遺伝子を発現プラスミドp3L118Rに組み込み、弱毒リステリアDelta2株(ActA欠損株)にelectroporationで導入した。発現プラスミドp3L118RはActSプロモーターにドライブされるファージ由来のリステリア溶菌素lysin118遺伝子を持つため、この発現ベクターを持つリステリアは宿主細胞の食

胞から細胞質に移行すると溶菌し、DNAワクチン(発現ベクター)を放出する。これらの組み換えリステリアDNAワクチンをC57BL/6マウスまたはBALB/cマウスに2週間隔で2回腹腔免疫した。

[VIII] ツベルクリン反応に代わる結核感染特異的診断法の開発

PPD蛋白の中より、結核感染に極めて特異性の高い、ツ反に代わる蛋白DPPDのアミノ酸配列及び遺伝子クローニングに成功した。リコンビナントDPPD蛋白は結核感染に特異的で、BCG接種群には反応しないことがモルモットで示された。ヒトで結核感染特異性を示すか否かをskin testで施行した。(Gillis、Reed、岡田、坂谷、螺良)

ESAT-6抗原、CFP-10抗原(結核菌に存在し、BCG菌に存在しない)を用いた新しい結核特異的診断法を確立した。結核患者と健常人末梢血を分離せずに全血24wellプレートに1ml培養し、ESAT-6又はCFP-10で抗原刺激した。16~20時間後に培養上清を集めINF- $\gamma$ をELISAで測定した。

[IX] 結核菌症の病態解明

Toll like receptorと結核菌症の病態解明には、in vitroの種々のTLRノックアウトマウス由来のM $\phi$ を用い、UV処理して殺菌したこれらの多剤耐性結核菌に対するM $\phi$ 活性化機構の差異を通常の結核菌や非定型抗酸菌と比較検討した。さらにTLR2(-/-)マウス、TLR4(-/-)マウス、MyD88(-/-)マウス、TRIF(-/-)マウス及びMyD88(-/-)×TRIF(-/-)マウスにヒト型結核菌H37Rv及び種々の多剤耐性結核菌(スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌も含む)をi.v.投与又はi.p.投与してTLR2とTLR4の結核菌、多剤耐性結核菌に対するin vivo抗結核効果及びキラーT細胞分化誘導効果、サイトカイ

ン(IFN- $\gamma$ 、IL-2産生誘導効果)、T細胞増殖効果を解析した。

- [X] 難治性結核患者及び薬剤耐性結核患者末梢血キラーTリンパ球機能の解析  
多剤耐性結核患者PBL及び難治性結核患者PBLにおいて結核菌に対するキラーT分化誘導の低下、granulysin mRNA、TRAIL mRNA、低下を明らかにした。さらに15K granulysin に対する抗体を作製し、これらの患者のPBLのキラーT、NKでのgranulysin発現を検討した。(岡田、井上、坂谷)

- [XI] 世界に先駆けてのヒト生体内抗結核感染免疫モデルの作製

我々はIL-2R $\gamma$ 鎖ノックアウトNOD-SCIDを作製した。IL-2R $\gamma$ 鎖はIL-4、IL-7、IL-15、IL-21の $\gamma$ 鎖と共通である。したがって、IL-2R $\gamma$ 鎖をノックアウトすると、ほとんどのT細胞、NK細胞活性シグナルがブロックされる。したがって、このIL-2R $\gamma$  (-/-)NOD-SCIDを用いてSCID-PBL/huを作製した。

(倫理面への配慮)

1. 当病院の倫理委員会は歴史が古くかつ厳格なことで定評がある。すなわち院外者関西学院大学総長、大阪国際大学法学部教授等を含む各方面の医療従事者(事務系の人も含む)により構成されており毎月最低一回は長時間にわたり議論されている。
2. サブユニットワクチンや新しい結核診断蛋白のin vitro(試験管内)での結核患者末梢血リンパ球のT細胞免疫増強活性を検討する研究は、上記の倫理委員会に実験計画書を提出し、審査を得て実施する。すなわち、研究対象者の人権擁護を第一に考え、個人が特定されるような情報は公表しない等、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究対象者に対する不利益や危険性の排除を十分に配慮して実施する。また、サブユニットワクチンや新しい結核診断蛋白のphase I 試験においては、研究対象者の人権擁護を第一に考え、研究対象者に対する不利益や危険性の排除、および個人が特定されるような情報は公表しない等を十分に配慮した実験計画書を、倫理委員会のみならず、院内に設置されている治験審査委員会に治験計画書を提出し、審査を経て実施する。
3. 国立病院機構近畿中央胸部疾患センターで動物実験を行う場合、院内に設置されている動物実験委員会に事前に実験計画書を提出し審査を経て実施する。国立病院機構近畿中央胸部疾患センター動物実験取扱規程等に則って、動物実験用施設において安楽死等動物愛護上の配慮を十分に行い実施する。DNAワクチンやリコンビナントBCGワクチンを用いた結核予防および治療のための動物実験を行う場合は、事前に動物実験委員会のみならず、院内に設置されている組換えDNA実験安全管理委員会に実験計画書を提出して、審査を経て承認されてから実施する。安全性、倫理面、動物愛護上の配慮等の面から審査を受ける。また国立病院機構近畿中央胸部疾患センター組換えDNA実験安全管理規程に則って、感染あるいは環境汚染のおそれがないように十分に配慮して行うとともに、実験に使用した器具は全てオートクレーブ消毒してから洗浄する。
4. また、人のみならず動物を用いた研究を行う際には、事前に院内に設置されている倫理委員会等に研究計画書を提出して、倫理面からの審査・承認を受ける。当院は厚生省より結核疾患・呼吸器疾患の準ナショナルセンター(高度専門医療施設)に選ばれたことにより、倫理面への配慮を十

分おこない臨床応用を目指したい。

## C. 研究結果

### [ I ] 新しい結核ワクチンの開発

#### 1. 新しい結核予防ワクチンの開発

①HVJ-liposome/Hsp65 DNA+ IL-12 DNAワクチン、②リコンビナント72f BCG(r72f BCG)ワクチン、の世界で最先端のワクチン2種を開発した。

さらに、WHOより2004年2月からWHO STOP TB Partnershipに選出され、さらに、岡田は2004年WHO STOP TB Vaccine MeetingメンバーにWHOより選出され、発表し、世界の最先端かつ臨床応用すべき4つのワクチンの一つに選ばれる光栄を得た。

(1) 世界で最も切れ味のよい、BCG ワクチンより1万倍強力な結核予防ワクチンHVJ/Hsp65+ IL-12 DNA ワクチンを開発した。

結核菌由来のHeat Shock Protein (Hsp65) DNAを用いた。

① HVJ/Hsp65DNA+ IL-12DNA ワクチンを Balb/c マウスに3週毎に3回 i.m. 投与し、最終免疫から4週後にヒト型結核菌 H37Rv を  $5 \times 10^5$  i.v. チャレンジする系を用いた。BCG 東京ワクチンでプライミングした後、HVJ/Hsp65DNA+ IL-12DNA ワクチンをブースターした群では、BCG ワクチン単独投与群に比較して1万倍以上強力な画期的結核ワクチン効果(結核菌数  $1 \times 10^6$  cfu を  $1 \times 10^2$  cfu 以下に減少)を示した。

すなわち、肺や肝の結果菌数を非ワクチン群の10万分の一に減少させ、BCG ワクチン群の1万分の一に結核菌数を減少させ

た。脾臓の結核菌数でも同様の結果を得た。

② 逆に、HVJ/Hsp65DNA+ IL-12DNA ワクチン群でプライミングした後、BCG ワクチンでブースターを行っても BCG ワクチン単独に比較して、1万倍以上強力な結核ワクチン効果を示した。

日本人は乳幼児に BCG をほぼ全員投与することより、本邦では BCG を priming ワクチンとし、成人、中学生、小学生で HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンの booster ワクチンが有効である可能性が示された。

結核菌成分に対する IFN- $\gamma$  産生細胞数 (Elispot Assay で測定) や、IFN- $\gamma$  産生 (ELISA) 及び、IL-2 産生はワクチン効果と関連した。

③ ワクチン非投与群の10万倍強力な結核予防ワクチン効果を示した。

④ 他の研究室より報告されている結核ワクチンよりも1000倍強力な画期的な結核予防ワクチン効果を示した。

⑤ HVJ ワクチンは GMP レベルのワクチンであり迅速な臨床応用につながる。

⑥ これらのワクチン効果とキラーT細胞活性は関連した。キラーTの分化誘導を介して、ワクチン効果が発揮された。

(2) 世界に先駆けて、結核治療ワクチンHVJ/Hsp65DNA+ IL-12DNA ワクチンを開発した。このワクチンを結核菌 H37Rv を i.v. 投与したマウスに3回 i.m. 注射することにより BCG ワクチン投与群に比較して、有意差

( $p < 0.05$ )をもって治療効果を示した。ワクチン非投与群と比較しても、有意にこのワクチンは結核菌減少効果を示した。

結核治療ワクチン効果を示すワクチンの報告はいまだなく、この Hsp65DNA + IL-12DNA ワクチンが初めての結核治療ワクチンであることを明らかにした。この Hsp65DNA + IL-12DNA ワクチンの治療ワクチン効果は結核菌感受性 strain のマウス及び結核菌抵抗性 strain のマウス、両方で認められた。すなわち、このワクチンの将来的な臨床応用を考える一つの目標が得られた。

(3) 我々は世界の最先端の二種のワクチン①②を開発した。

① HVJ-liposome / Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン: カニクイザル(最もヒトの結核感染に類似したモデル Babie Tan et al. Nature Medicine 1996)を用い、(我々が唯一、世界に先駆けてこのサルを用いた極めて重要な研究を行っている)結核予防効果を示した。

② リコンビナント72f BCGワクチンはカニクイザルでBCGよりも強力な抗結核予防効果を示した。結核菌由来のタンパクで結核菌に対するT細胞免疫を強く誘導するMtb39とMtb32の融合タンパクMtb72fタンパクをコードするDNAをBCG菌に導入しリコンビナント72f BCGワクチンを作製した。

①②の結核予防ワクチン効果は、延命効果、胸部X線所見の改善、血沈の改善、体重減少の改善、サルPBLの増強反応、IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-6の産生増強

等のT細胞免疫増強作用が認められた。

2. カニクイザルを用いた結核予防ワクチン効果<実験II>

カニクイザルを用いた<実験II>では、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン投与群が最も強い増殖反応をHSP65 抗原や結核死菌抗原に対して示した。この結果はカニクイザルを用いた実験Iで2003年に報告した結果と同様の結果を示した。

このワクチン投与カニクイザル群は血沈の改善効果の再現性、体重減少抑制効果の再現性を示した。生食投与群は38℃前後の発熱を結核菌気道感染後示した。これに対しHSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン投与群では発熱の抑制効果も示された。

3. カニクイザルを用いた結核予防ワクチン効果<実験III>

priming-booster ワクチン効果カニクイザルを用いた<実験III>ではHVJ-liposome/ HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンの priming - booster ワクチン効果を検討した。

現在、結核菌投与後10カ月であるが、生存数はBCG priming + HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン投与群では4匹中4匹生存(死亡率は0%)している。一方生食投与群では6匹中3匹死亡した。

このことよりカニクイザルにおいてもHSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンの priming - booster 法が強力な結核予防ワクチン効果を示す可能性が示唆された。

4. モルモットのエアゾール結核菌吸入系においてもワクチン①のHVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン ②のリコンビナント72f BCGはBCGより強力な結核予防ワク

チン効果を示した(モルモットを用いた結核研究の世界の第一人者 McMurray との共同研究)。

5. 治療ワクチン(IL-6 関連遺伝子)の作製に成功した。すなわち、IL-6 DNA+ IL-6 レセプターDNA+ gp130 DNA/アデノウイルスベクターは結核菌治療効果を示した。
6. 1000 倍発現効率の高い AAV ベクターDNA ワクチンと弱毒化リステリア菌ベクターの新しい経口結核ワクチンを開発した。

[II] ヒト多剤耐性結核菌治療モデルを世界に先駆けて開発した。

ヒト多剤耐性結核菌治療モデル IL-2R(-/-)SCID-PBL/huを初めて作製した。IL-2レセプター $\gamma$ 鎖ノックアウトマウスNOD SCID[IL-2R(-/-)SCID]マウスを作製し、これにヒトPBLを投与して 極めてヒトT細胞の生着がよく、生体内ヒト抗結核菌免疫を解明できることを明らかにした。さらに、このIL-2R(-/-) SCID-PBL/huは、多剤耐性結核菌治療モデルとなることを初めて明らかにした。

[III] スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌はTLRの認識機構をエスケープする結果を世界に先駆けて明らかにした。種々のTLR(-/-)マウスを用い、スーパー・スプレッダー多剤耐性結核菌はTLR4レセプターとTLR2レセプターの認識機構をエスケープすることを明らかにした。

[IV] 新しい結核感染特異的診断法の開発

1. リコンビナントDPPD蛋白は結核感染に特異的で、BCG接種群には反応しないことを明らかにした(ヒト成人のskin testで)。すなわち、ツベルクリン反応に代わる新しい結核特異的診断法DPPD skin testを開発した。

(ツ反に用いられるPPDは多種の蛋白を含む。この中より、結核感染に極めて特異性の高い、ツ反に代わる蛋白DPPDのアミノ酸配列及び遺伝子クローニングに成功した。リコンビナントDPPD蛋白は結核感染に特異的で、BCG接種群には反応しないことをモルモットのみでなく、ヒト結核患者ですでに示した)

2. さらに我々は結核感染に特異的なESAT-6+ CFP10 test (in vitro)を開発した。Am. J. Respir. Crit. Care. Med. (2004) 発表。

[V] 新しい多剤耐性・難治性結核予後診断法の開発

1. 15K granulysin による新しい結核予後診断法を発見した。又 15K granulysin がキラーT から分泌されM $\phi$ にとり込まれM $\phi$ 内の結核菌を殺す新しい pathway を発見した。
2. 15K granulysin Tg マウスを初めて作製し、生体内抗結核菌作用を示唆する結果を得た。

- (1) 多剤耐性結核患者PBLの granulysin mRNA、TRAIL mRNA、及びgranulysin(Gra)発現の著明な低下を明らかにした。
- (2) 抗結核キラーT細胞から産出される granulysin[15kdの granulysin(15K Gra)]がM $\phi$ 内結核菌殺傷に極めて重要な役割を果たしている発見をした。
- (3) 15K Gra DNAワクチンは結核予防効果を示した。
- (4) 多剤耐性結核患者キラーT細胞の Gra蛋白発現の著明な低下を認めた。すなわち新しい結核予後診断法を確立した。
- (5) 15K Gra transgenicマウス、9K Gra transgenicマウスを初めて作製し、世界に先駆けて15K Gra の

生体内抗結核作用を明らかにした。すなわち15K Granulysin DNA, 9K Granulysin DNA及び分泌シグナルDNAを9K Granulysin DNAに付加して作製した。分泌型9K granulysin DNAをCAGプロテーターを用いて構築した。これらのプラスミドDNAを用い、①15K Granulysin Transgenicマウス2種及び ②9K Granulysin transgenicマウス3種及び ③分泌型9K granulysin transgenicマウス4種の作製に成功した。これらのマウスを用い、granulysinの生体内結核菌殺傷効果を世界に先駆けて明らかにした。15K Gra Tgマウスも9K Gra Tgマウスも結核菌に対しキラーT分化誘導作用を示した。

(6) キラーT細胞、NK細胞から産生され、血清中に流れているKiller Secretory Protein of 37kd (KSP37)が結核患者で著明に低下していることを初めて明らかにした。

(7) KSP37 transgenicマウスを初めて作製した。

[VI] スーパー・スプレッダー多剤耐性結核を世界に先駆けて発見した。

3つの結核病院が関与したMDR-TB院内感染事例発病者5人のうち2人は明らかな再感染発病であり、感染を受け発病した看護師2人はともに肺切除術を受けている。菌のRFLP、スポリゴタイピングも耐性パターンと一致。スポリゴタイピングでBeijing株とも異なる新しい多剤耐性株であることを明らかにした。

[VII] 種々のTLR(-/-)関連マウスと多剤耐性結核菌を用い、初めて多剤耐性結

核菌のTLRからのエスケープ機構が示唆された。

スーパー・スプレッダー MDR-TB菌(SS 0308-0783株)や他の通常のMDR-TB菌はToll likeレセプター4の認識機構をエスケープしスーパー・スプレッダーはTLR4とTLR2の認識機構をエスケープすることが示された。

[VIII] 新しい結核ワクチンのGMPに準拠した製造

ジェノメディア研究所、大塚製薬微生物研究所との共同研究で、新しいワクチンのGMPに準拠した製造設備での製造や、品質確保のための成分又は力価の定量法を含む規格及びその試験方法の設定、安全性の検討を行いつつある。

[IX] 臨床応用に向けたGMPレベルのHVJ/Hsp65 DNA+ IL-12 DNAワクチンの開発

極めて高度なGMPレベル(Good Manufacturing Practice: ヒトへの臨床応用に極めて重要な基準)を満たすHVJベクターをHEK293細胞感染して単離する方法を用いて開発した。HVJを用いた発現効率は極めて高くin vitroの系でHVJ-リポソームと同等かそれ以上であった。したがって、著明な効果を示したHVJをヒトに対する臨床応用に用いる。本研究では、純国産技術であるHVJ-Eベクターを利用して、結核に対する新規DNAワクチンの研究開発を行なった。HVJ-Eベクターの製造は、臨床応用を想定して医用材料レベルの材料とGMP基準に対応可能な製造技術、精製技術により行った。精製後のHVJ-Eベクターは、品質試験を行なった後

にDNAワクチン (IL-12遺伝子とHSP65遺伝子) を封入して、ワクチンとしての薬効確認のために使用した。その結果、HVJ-Eは結核に対するDNAワクチンのデリバリーシステム兼アジュバントとして有用である事が明らかとなった。

[X] 国立病院機構政策医療(54施設)呼吸器ネットワーク

当国立病院機構近畿中央胸部疾患センターは呼吸器疾患(結核を含む)準ナショナルセンターとなった。日本の結核患者数の43%の診断・治療を行っている、国立病院機構54施設を統括し、国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークを用いて結核の新しい予防・治療法の確立を全国規模で行う。

坂谷光則を中心に

- (1) 結核予防ワクチン:すでに、マウス、モルモットの結核感染モデル動物実験のみならずヒトの結核感染に最も近いと折り紙つきのカニクイザル(Nature Medicine 1996)のレベルで新しい結核ワクチン①HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン ②リコンビナント72f BCG等が結核予防ワクチンとして有効である事が示された。したがって、結核予防ワクチンの臨床応用としてPhase I study(健常人で行う PPD皮内反応 副作用 PBL免疫反応)Phase II study[日本(当国立病院機構近畿中央胸部疾患センターを中心として政策医療呼吸器ネットワーク) フィリピン ブラジル インド 南アフリカ等結核発生率の低下]、Phase III、Phase IVを行う計画をたてた。結核予防効果の判定には最低数年以上かかる。

- (2) 結核治療ワクチン:HSP65 DNA +

IL-12 DNAワクチンはマウスの系で治療効果を示した。さらにHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン+BCG ワクチンはこれより強い治療ワクチン効果を示した。またAdex (IL-6 + IL-6R + gp130) DNAワクチンは治療効果を示すことをすでに報告した。したがって①HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン ②HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA+BCG ワクチン ③Adex(IL-6 + IL-6R + gp130)DNAワクチン ④リコンビナント72fワクチンを単独又は組み合わせて、治療ワクチンの開発計画を立案した。

さらに、

- (3) 多剤耐性結核菌に対する治療ワクチン
- (4) PPD(ツ反)DPPD皮内反応、及び Quantiferon (ESAT-6 + CFP-10)テストによる結核特異的診断法の開発。これらの(1)~(4)の臨床応用を国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークを利用して行う予定である。

[XI] 新しい結核ワクチンの開発

新しい結核予防ワクチンの開発 ① HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン、②リコンビナント72f BCG(r72f BCG)ワクチン、③72f fusion蛋白ワクチンの世界の最先端のワクチンを開発した。

これらのワクチン開発研究が評価され、World Health Organization (WHO)のSTOP TB Partnership及びWHOのSTOP TB Vaccine Working Groupメンバーに選出され、極めて高い評価を得た。

[WHO Meeting 発表内容]

米国NIH branchでWHOの支援研究機関で

あるLeonard Wood Memorial研究所で行った。Leonard Wood Memorial研究所は世界で唯一多数のカニクイザルをP3レベルで結核研究できる施設である。この研究室からNature Med.に1996年、カニクイザルが最もヒト結核に近いモデルである有名な研究が発表された。

Dr.Babie Tan (Leonard Wood)、Dr.Reedとの共同研究でワクチンの投与群を5群に分け、各群、4匹で行った。(結核菌を投与後14ヶ月間経過観察と予防効果解析)

- 1群 r72f BCGワクチン
- 2群 HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン
- 3群 72f fusion蛋白+BCG東京ワクチン
- 4群 BCG東京ワクチン
- 5群 生理食塩液投与群

各ワクチンを3週間隔で3回予防ワクチン投与した。r72f BCGは $5 \times 10^6$ cfu皮内投与(0.1mlの生食にsuspend)した。

HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNAは、i.m.投与した。72f fusion蛋白はBCG東京suspend液に同時に入れ、注射も同部位に行った。最終ワクチン投与4週後に強毒ヒト結核菌クロノ株を気道内投与した。予防ワクチン効果は、生存率、胸部X線、血沈、体重、体温、PPD皮内反応ならびにワクチン投与ザルの末梢血Tリンパ球の増殖増強反応で解析した。

HSP65蛋白に特異的なTリンパ球増殖増強反応がHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン投与群で認められた。さらに、このHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン群では、BCG東京ワクチンや生食投与群に比し、PPD、72f融合タンパク、結核死菌に対しても著明な増殖増強効果を示した。また、サイトカイン産生(IL-6等)増強が認められた。一方72f蛋白に特異的な増殖反応増強がr72f BCGワクチン投与群で認められた。72f fusion蛋白+BCG東京ワクチン投与群では極めて強いT細胞増

殖反応が72f蛋白特異的に誘導された。

r72f BCG投与群、HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA投与群や72f蛋白投与群では血沈の改善、胸部X線所見の改善及び体重減少の改善が認められた。

14ヵ月後の生存率はHVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンでは4匹中2匹生存し、r72f BCGワクチンでは4匹中3匹生存し、(72f fusion蛋白+BCG東京)ワクチンでは4匹中4匹生存した。一方生食コントロール群は全例死亡した。すなわち三つのワクチンは結核感染カニクイザルにおいて生存率の改善効果を示すことを明らかにした。このように、この3つのワクチン投与群はサルレベルでも予防ワクチン効果を示した。

すなわち

- ① HVJ-liposome /HSP65 DNA+IL-12DNAワクチン
- ② r72f BCGワクチン
- ③ (72f fusion蛋白+BCG東京)ワクチンは有効であることがカニクイザルのレベルで示された。(岡田、吉田、大原、金田、Reed、Gillis)

さらに、モルモットを用い、HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンの結核予防ワクチン効果を初めて明らかにした。

1. HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンはBCG東京ワクチンよりも強力な結核予防効果を発揮することを我々は明らかにした。

すなわち、HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン、HVJ-liposome / HSP65 DNAワクチン、HVJ-liposome / IL-12 DNAワクチン、HVJ-liposome controlベクター群、BCG東京ワクチンを各々各群7匹のモルモットに3回免疫し、最終免疫から6週後にヒト結核菌を吸入感染させた。

肺臓、脾臓の結核菌数はHVJ-liposome



/ HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンで BCGワクチン群より著明な減少が認められた。さらにHVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンを投与したモルモットの肺臓及び脾臓の病理学的解析を行い結核granulomaに対し、このワクチンによる有効な改善効果が認められた。

granuloma indexでHVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンはモルモットの系でBCGよりも有意差をもって有効な結核予防ワクチンであることが示された。すなわちHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは結核菌吸入感染モルモットの系でも極めて強力な結核予防ワクチンであることが明らかとなった。

2. 免疫反応においてもHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン投与群ではIFN- $\gamma$ やIL-2の産生の増強が認められた。
3. 結核ワクチンの検定にモルモットが使われるが、効果判定に必要な免疫学的マーカーが存在しない。我々は、モルモットに発現するサイトカインmRNAを調べるために、RT-PCRを開発した。調べられるサイトカインは、TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-12, IL-10, GM-CSFである。このほかにTGF- $\beta$ , iNOSがある。このマーカーを使用することにより、結核菌感染とワクチン効果の判定が詳しく調べられるようになった。

今までの結果をまとめると

- (1) DNAワクチン: HSP65 DNA+ IL-12 DNA ワクチンは相乗効果を示し、BCGよりも強力(100倍強力)な結核予防ワクチンであることをマウスの系で明らかにした。

HVJ-liposome/ HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは、カニクイザル(最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med. 1996)で強力な抗結核予防効果

を示した。延命効果、胸部X線所見(結核病巣)、血沈、体重で強い改善傾向がみられた。さらに、HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチンはモルモットの系でもBCGより強力な画期的な結核予防ワクチンであることを明らかにした。病理形態学的解析も進展した。すなわち、新しい結核ワクチン(①HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチン、②リコンビナント72f BCGワクチン、③72f融合タンパク+BCG東京ワクチン)による結核病巣形成予防効果について、マウスモデル、モルモットモデル及びヒトの結核感染に最も近いカニクイザルのモデルを用い、病理形態学的に解析した。

BALB/cマウス、モルモット、カニクイザル(cynomolgus monkey)に上記の三種の新しい結核ワクチンを3回投与しヒト型結核菌強毒株を感染させた。マウスでは5~10週後、モルモットでは6週後、カニクイザルでは6ヶ月から12ヶ月後の結核病巣形成(肉芽腫(granuloma)形成および単核球浸潤)をコントロールと比較した。HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNAではマウス、モルモットで著明なgranuloma形成抑制効果、肺結核病理像の改善効果がBCG東京ワクチンよりも有意に強く認められた。リコンビナント72f BCGワクチン投与モルモットでも肺結核病理所見の改善がBCG東京ワクチンよりも強く認められた。

- (2) リコンビナントBCG72fワクチン

r72f BCGはマウス、モルモット、サルでBCGよりも強い結核予防ワクチン効果を発揮することを明らかにした。

これらの①HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNAワクチン、②リコンビナント72f BCGワクチン ③72f fusion蛋白ワクチンを免疫したカニクイザルの生存率と免疫増強効果、血沈、体重の改善効果は相関した。

- (3) 72f Fusion蛋白ワクチン(結核蛋白 Mtb39とMtb32のfusion蛋白ワクチン)のサブユニットワクチンがカニクイザル (cynomolgus monkey)のレベルでBCGよりも有効であることを明らかにした。新しい72f fusion蛋白ワクチンはヒト多剤耐性結核患者T細胞の結核免疫を増強した。BCGでprimingし、後に72f融合蛋白ワクチン(boosterワクチン)を行うと、カニクイザルで極めて強力な予防効果を示した。日本における成人での72f融合蛋白のboosterワクチンが有効である可能性を示唆。
- (4) Priming-Booster法で最も強力な新しい結核ワクチンを作製しつつある。本邦では乳幼児にBCG接種を行う。したがって成人におけるboosterワクチンとして上記のワクチン①HSP65DNA+ IL-12DNAワクチン、②r72f BCGワクチン、③72f fusion蛋白ワクチンを用いたモデルを62頭のサルの系で行いつつある。PrimingはBCG東京ワクチンを用い、すでに免疫をした。4ヶ月後からboosterワクチンを投与。Priming-Booster法は2003年第一回国際結核ワクチン学会で結核ワクチン効果を得る極めて良い方法であるとのコンセンサスが得られた。
- (5) 新しい治療ワクチンの開発: IL-6関連遺伝子ワクチン(Adenoウイルスベクター/IL-6 DNA+ IL-6レセプターDNA+ gp130 DNAワクチン)は初めて結核治療ワクチンとしても有効であることを示した。我々は72f fusion蛋白ワクチンがマウスのみならずカニクイザルでも治療ワクチン効果を示す予備実験結果を得た。したがって、①IL-6関連遺伝子ワクチン+ 72f蛋白ワクチン、又は、②IL-6関連遺伝子ワクチン+ リコンビナント72f BCGワクチンの組み合わせで強力な治療ワクチンを開発する。
- (6) ① 1000倍発現効率が高い画期的なAAVベクターワクチンを開発した。AAV(2/5)型ベクターに組み込んだHSP65 DNAワクチン すなわちAAV(2/5)/HSP65ワクチンは、今までのAAV(2/1)/HSP65 DNAワクチンに比しHSP65蛋白抗原に対するT細胞免疫反応を極めて強く増強した。さらに、AAV(2/5)/Ag85B DNAワクチンもAg85B蛋白に対するT細胞反応を増強した(ハーバード大学医学部R.C.Mulligan教授との共同研究)。すなわち、これらのワクチンをBALB/cマウス又はC57BL/6マウスに投与すると、極めて強力な結核菌特異的キラーT細胞の分化やヘルパーT細胞増殖増強効果が認められた。又IFN- $\gamma$ 産生の強い増強が認められた。特にAAV(2/5)/HSP65 DNAワクチンは $1 \times 10^{10}$ particleでと全く同等のこれらのT細胞活性化が認められた。このことより、有力な結核ワクチンとなることが示唆された。
- ② Adenovirusベクター/HSP65 DNA及びAdenovirusベクター/Ag85B DNAワクチンも作製した。これらのワクチンも強力なT細胞免疫誘導効果を示した(Mulligan教授との共同研究)。
- ③ 弱毒化したリステリア菌(act geneを欠損させた)にAg85A, Ag85B, MPB51 DNAを導入し免疫したマウスは結核感染予防効果を示した。我々が世界に先駆けての報告となった。
- ④ ユビキチンDNA-HSP65 DNAワクチン及びユビキチンDNA-Ag85B DNAワクチンもそれぞれ抗原特異的に結核免疫を増強した。プロテアソーム阻害剤であるMG-132,

エポキシマイシン等を用いることで、抗原提示におけるユビキチン-プロテアソーム経路の重要性について詳細に確認した。免疫プロテアソームのアクティベーターPA28及び免疫プロテアソームのメインコンポーネントであるLMP7のノックアウトマウスを用いて、ワクチンに対するユビキチンプロテアソーム経路の影響についてin vivoでの詳細な解析を行った。その結果、SAG1に対するCD8+ CTLの誘導には、PA28は関与してないが、LMP7が必須の関わりを持つことが明らかとなった

- ⑤ バキュロウイルスはヒトに感染しない安全性の高いウイルスベクターである。昨年度作製した(i) Hsp65タンパクをウイルスポリオン上に提示した組換えバキュロウイルス(ii) Hsp65遺伝子をCMVプロモーター下流に挿入した組換えバキュロウイルスの二種類の組換えバキュロウイルスは、マウスマクロファージRAW264.7細胞に作用し、NOの発現を強力に誘導することを検出した。結核菌は、マクロファージの細胞内殺菌をエスケープして増殖する。活性化マクロファージでは結核菌に対する殺菌活性が亢進するが、その重要な役割を果たしているのがNOであると考えられている。バキュロウイルスワクチンによりこの抗菌エフェクター分子であるNOが誘導されたことは、ワクチン開発に大きな期待がもたれる。

さらに、Sendaiウイルスベクターを用いてT bet DNAワクチンも開発した。強力なIFN- $\gamma$ 産生の誘導を有する転写因子であるT-bet遺伝子を組み込んだSendaiウイルスベク

ター(SeV-Tbet)を用いてマウス脾臓由来DCへの導入を試みたところ、SeV-Tbet導入樹状細胞において有意なIFN- $\gamma$ 産生能とT細胞増殖能を持つことがin vitroで示された。Tbet遺伝子導入DCによる細胞遺伝子療法は技術的に十分可能であり、今後も結核感染マウスモデルにおいてその有用性を検討する予定である。

これらの、①②③④を組み合わせ、さらにBCG東京ワクチンとpriming-booster法を用い、最も強力なワクチンを作製する。

一方、マウスに結核菌抗原感作(TB2ペプチド刺激)樹状細胞を投与することで脾臓の菌量が減少していた。結核に対する細胞免疫療法の有用性を検討するため、マウス由来の樹状細胞(dendritic cell: DC)を結核菌抗原で感作し、これをマウスに投与した。その結果、抗原特異的CD8陽性T細胞が誘導され、BCGを腹腔内感染(全身感染モデル)させるとコントロールマウスと比較してPEC・脾臓において有意な菌数の減少が認められた。以上より、結核菌抗原感作DCを用いた細胞免疫療法は抗酸菌易感染性患者あるいは多剤耐性結核菌患者など難治性結核患者に対するワクチン療法として利用できる可能性が示唆された。この実験系を用いて、今後、Sendaiウイルスベクターを用いてT-bet遺伝子を樹状細胞に導入し、結核菌感染に対する感染防御能の解析を行うことを検討している。

- ⑥ 感作と追加免疫を異なったベクターで行う所謂「ヘテロ免疫法」は強力な免疫能を誘導することが知られている。日本人はBCGで感作を受け

ている。そこで、我々は結核に対する追加免疫に有効なワクチンの研究を行った。1) 第三世代レンチウイルスベクター：MPT51またはHsp65を発現する安全なレンチウイルスベクターを作製した。このワクチンの経気管接種により、縦隔リンパ節に特異的T細胞を誘導できた。しかし、脾臓には特異的T細胞を検出できなかった。2) ケモカイン融合ワクチン：未熟樹状細胞に発現しているケモカイン受容体のリガンドとMPT51またはHsp65を融合させたDNAワクチンを作製した。これはマウスに特異的T細胞を効率よく誘導できた。3) アルファ-ガラクトシルセラミド( $\alpha$ -GalCer)を用いた樹状細胞ワクチン：CD1dのリガンドであり、NKT細胞を活性化する $\alpha$ -GalCerとMPT51のCD8+ T細胞エピトープを樹状細胞にパルスし、マウスに接種することで特異的T細胞の誘導が増強された。今後は、上記ワクチンをBCG免疫マウスの追加ワクチンとして用い、ヘテロ免疫の効果判定する予定である。

(7) リコンビナントBCGワクチン：

BA51(Ag85A+ Ag85B+ MPB51)リコンビナントBCGはBCGよりも強力なワクチンであることを明らかにした。種々のリコンビナントBCGワクチンを作製した。特に結核菌の感染防御免疫で主要な役割を演じているIL-12を産生するリコンビナントBCGワクチン(rBCG)を作成した。作成されたrBCGはIL-12を可溶性の蛋白質として産生していた。

また、チミン要求性を指標とした、薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しないBCG宿主-ベクター系構築のた

め、BCG thyA欠損株の作成をおこない、thyA欠損株の候補株を得た。

- (8) 我々が世界に先駆けて開発したSCID-PBL/huの系で結核患者リンパ球をSCIDマウスに生着させ、結核蛋白ESAT-6ペプチドで免疫し、画期的な結核菌に対する生体内ヒトT細胞免疫解析モデルを開発した。さらに、IL-2レセプター $\gamma$ 鎖ノックアウトSCID-PBL/huのモデルでヒト多剤耐性結核治療モデルを世界に先駆けて開発した。
- (9) 一方、我々は世界に先駆けて多くのヒトに感染するSuper Spreader多剤耐性結核菌SS 0308-0783株(一人のSuper Spreader患者から多数のヒトに感染)を発見した。IL-2R(-/-)SCID PBL/huモデルで治療ワクチン・治療薬を解析中。

[XII] 新しい診断法の開発

1. リコンビナントDPPD蛋白は結核感染に特異的で、BCG接種群には反応しないことを明らかにした。すなわち、ツベルクリン反応に代わる新しい結核特異的診断法DPPD skin testを開発した。(ツ反に用いられるPPDは多種の蛋白を含む。この中より、結核感染に極めて特異性の高い、ツ反に代わる蛋白DPPDのアミノ酸配列及び遺伝子クローニングに成功した。リコンビナントDPPD蛋白は結核感染に特異的で、BCG接種群には反応しないことをモルモットですでに示した)さらに、DPPDのヒト成人のskin testにおいて、結核感染特異性を証明した。すなわち、BCG接種者では、PPD(通常のツベルクリン反応)に対する反応は陽性であったのに対し、DPPDに対するskin testは陰性であった。結核患者ではPPD及びDPPDとも両者皮内反応陽性を示した。