

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究協力者研究報告書

IL-18の宿主抵抗性に及ぼす影響の解析に関する研究

研究協力者 柏村信一郎 兵庫医科大学 先端医学研究所 生体防御部門 講師

研究要旨

炎症性サイトカインのひとつであるインターロイキン18が誘導する生体防御作用のメカニズムを詳細に解析した。その結果、インターロイキン18にはその単独的作用として抗炎症性サイトカインを誘導する作用や、Cox-2遺伝子の誘導を介してTNF等の過剰な産生を制御する作用を持つ可能性が示唆された。

A. 研究目的

炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン18(IL-18)は炎症の開始から終息にいたる全てのステップで中心的な役割を持つ可能性が示唆されている。我々は、IL-18がIL-12と共同して γ 型インターフェロンの産生を介して一酸化窒素や活性酸素、さらにTNF α などの産生を誘導し感染に対する抵抗性を与える事(Singh R.P., et al., J. Immunol., 2003)、しかし同時に正常組織に対しては組織傷害をももたらす事を報告してきた(Shimmyo A.-K., et al., J. Immunothera., 2002)。しかし最近の研究で我々は、IL-18がIL-12の非存在下ではT細胞、NK細胞やマスト細胞に作用してIL-4, IL-10, IL-13などの抗炎症作用を持つサイトカインの産生を誘導するユニークな働きを持つサイトカインである事を示してきた(Kashiwamura S., et al., J. Immunothera., 2002)。この様な経緯からIL-18が感染時の宿主抵抗性という観点から重要な因子であると考え、その作用を詳細に解析した。

B. 研究方法

各種の炎症性疾患の患者からインフォームドコンセントを行った後、血清等の標品の提供をうけ、炎症とサイトカインの関連をIL-18を中心に測定した。また、マウスを用いた実験系で腫瘍細胞の拒絶に及ぼすIL-18の影響を解析した。

C. 研究結果・考察

マウスの系に於いてIL-18はOsteosarcoma細胞の増殖および転移を抑制する効果を示した。この結果はIL-18が生体防御にとって重要な因子である事を示唆するものと考えられた(Okamoto T., et al., Journal of Interferon & Cytokine Research, 2004, 24: 161 - 167)。またIL-18は子宮内膜症の患者腹水中で高値を示した。この結果はIL-18が一方で炎症性疾患の病態形成にも関与する事を示唆するものと考えられた(Oku H., et al., Human Reprod, 2004, 19: 709 - 714)。

D. 研究発表

(1) 論文発表

H. Oku, Y. Tsuji, S-I. Kashiwamura, S. Adachi, A. Kubota, H. Okamura, and K.

Koyama (2004) Role of IL-18 in
pathogenesis of endometriosis., Human
Reproduction, vol. 19 : 709 - 714

(2) 学会発表

Takuya Okamoto, Naoko Yamada,
Tohru Tsujimura, Ayako Sugihara,
Yasuko Nishizawa, Haruyasu Ueda,
Shin-ichiro Kashiwamura, Hiroko
Tsutsui, Hiroyuki Futani, Souji Maruo,
Haruki Okamura, and Nobuyuki Terada
(2004) Inhibition by Interleukin-18 of
the Growth of Dunn Osteosarcoma
Cells., Journal of Interferon & Cytokine
Research, vol. 24 : 161 - 167

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究協力者研究報告書

『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

研究協力者 松本 真 大塚製薬株式会社微生物研究所 所長

研究要旨

岡田班で見出された有望な予防ワクチンであるIL-6関連遺伝子およびHSP-65+IL-12遺伝子を主体にし、実際の臨床試験を見据え、臨床で汎用されている抗結核薬（リファンピシン：RFPおよびイソニアジド：INH）との併用における治療ワクチンとしての評価を行った。その結果、今回用いた評価系においては、下記の点において有意な効果を見出すことはできなかった。

- ・病態の指標であるLung Index値の改善効果
- ・抗結核剤（RFPまたはINH）との併用下におけるLung Index値の改善効果
- ・肺内生菌数を指標にした治療効果
- ・抗結核剤（RFPまたはINH）との併用下における肺内菌数を指標にした治療効果

一方、Lung Index値の増加などの免疫応答を示唆する反応が確認されたが、それが肺内生菌数の減少につながらなかったことにより、①感染により獲得された免疫力がほぼマックスに達していたことで、ワクチン効果とその効果に隠れてしまった可能性、及び②ワクチン接種により十分な効果が得られるまでの期間が短かった可能性も考えられた。感染初期にワクチン接種すると治療効果があることは、以前報告した通りであり、ワクチン接種タイミングや評価タイミングを考慮し、再度同様の抗結核剤との併用での治療ワクチンの検討を計画することで、臨床応用の可能性を考察したい。

A. 研究目的

岡田班において見出されてきた有望なワクチン候補について、将来の臨床試験を見据えた試験として、既存の抗結核薬との併用における治療効果の増強作用の確認を主な目的とした。

envelope、HSP65+IL-12/HVJ-envelope+BCG、およびIL-6関連遺伝子/AdexSWについて、既存の抗結核剤であるリファンピシン（RFP）およびイソニアジド（INH）と併用効果について治療効果の検討を行った。使用した実験モデルは強毒株である結核菌Kurono株を経気管的に感染させ、3週間放置後、治療およびワクチン接種を行った。治療については抗結核剤を1日1回28日間行

B. 研究方法

岡田班により見出されたワクチン候補物質であるHSP65+IL-12/HVJ-

い、ワクチン接種については、BCG摂取群は初日1回、他のワクチンについては、1、3、5、7、10、14日目の計6回行った。解剖は治療終了後翌日に行い、無菌的に肺を摘出し、肺重量の測定と肺内生菌数の測定を行った。治療効果の評価はLung Indexおよび肺内生菌数で有意差検定を行い、判断した。

C. 研究結果・考察

岡田班で見出された有望な予防ワクチンであるIL-6関連遺伝子およびHSP-65+IL-12遺伝子を主体にし、実際の臨床試験を見据え、抗結核薬との併用における治療ワクチンとしての評価を行った。その結果、今回用いた評価系においては、下記の点において有意な効果を見出すことはできなかった。

- ・病態の指標であるLung Index値の改善効果（評価ワクチン群：IL-6 related gene/Adex、HSP-65+ IL-12/HVJ-envelope、両者併用、BCG、BCGとHSP-65+ IL-12/HVJ-envelopeの併用）
- ・抗結核剤（RFPまたはINH）との併用下におけるLung Index値の改善効果（併用ワクチン群同上）
- ・肺内生菌数を指標にした治療効果（評価ワクチン群：同上）
- ・抗結核剤（RFPまたはINH）との併用下における肺内致菌数を指標にした治療効果（併用ワクチン群同上）

D. 結論

今回、治療ワクチンとしての効果を期待した点は、感染後細胞性免疫が成立してくる3週目からワクチン接種を行うことで、結核菌特異抗原に対する免疫応答にブーストがかかり、治療効果に反映されることであった。また、免

疫応答は化学療法剤の効果とは異なり、抗原特異的に作用を発揮することから、化学療法剤が及ばない結核菌に対しても効力が期待でき、併用することで相加・相乗効果が期待できると考えた。しかしながら、今回の結果からはそのような成果を見出すことはできなかった。

ワクチン接種により、病態の指標であるLung Index値が大きくなっており（IL-6関連遺伝子接種群）、これまでの岡田班の成果から判断すると、結核菌特異的免疫が増強された結果であると考えられる。その点においては再現性があり、反応が確認されたと考えられる。しかし、今回の評価系が気管内接種による感染であったことから、細胞性免疫の成立が全身感染のモデルより時間を要したことが考えられる。即ち、治療を開始した3週目のLung Index値とその時の肺内生菌数（Log値）は10.04および7.354であったが、治療終了時のVehicle投与群の同数値は、11.79および6.702であった。この結果より、治療開始時点のLung Index値に比較し、感染から7週目（4週間の治療終了時）の病態がより強くなっており、結核菌を抗原とした特異免疫が誘導された結果であることが推察された。また、その結果として、肺内生菌数が減少しており、3週目から7週目までに獲得された免疫活性が、抗結核活性を有していることが分かる。また、この獲得免疫は、結核菌が感染し増殖する課程で獲得されたものである。一方治療効果を期待してワクチン接種した結果、Lung Index値の増加などより強い反応が確認されたが、肺内致菌数に差が見出せなかったことより、以下の点が考察された。①感染により獲得

された免疫力がほぼマックスに達していたことで、ワクチン効果とその効果に隠れてしまった可能性、②ワクチン接種により十分な効果が得られるまでの期間が短かった可能性が考えられた。感染初期にワクチン接種すると治療効果があることは、以前報告した通りであり、ワクチン接種タイミングや評価タイミングを考慮し、再度同様の治療ワクチンの検討を計画したいと考える。

E. 研究発表

(1) 論文発表

1. Keiko Aoki, Sohkiichi Matsumoto, Yukio Hirayama, Takayuki Wada, Yuriko Ozeki, Makoto Niki, Pilar Domenech, Kiyoko Umemori, Saburo Yamamoto, Amao Mineda, Makoto Matsumoto, and Kazuo Kobayashi: Extracellular Mycobacterial DNA-binding Protein 1 Participates in Mycobacterium-Lung Epithelial Cell Interaction through Hyaluronic Acid J. Biol. Chem., Sep 2004; 279: 39798 - 39806

(2) 学会発表

1. Yoko Kita, Takao Tanaka, Shigeto Yoshida, Naoya Ohara, Yasufumi Kaneda, Sachiko Kuwayama, Yumiko Muraki, Noriko Kanamaru, Satomi Hashimoto, Hiroko Takai, Chika Okada, Yukari Fukunaga, Yayoi Sakaguchi, Izumi Furukawa, Kyoko Yamada, Yoshikazu Inoue, Yuji Takemoto, Mariko Naito, Takeshi Yamada, Makoto Matsumoto, David N. McMurray

E.C.Dela Cruz, E.V.Tan, R.M. Abalos, L.J. Young, J.A. Burgos, Robert Gelber, Yasir Skeiky, Steven Reed, Mitsunori Sakatani, Masaji Okada: Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model : The 4th world Congress on Vaccine and Immunization - WCVI 2004, Japan Sept 30- October 4, 2004

2. Okada M, Takemoto Y Okuno Y, Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Yoshida S, Matsumoto M, Daphne E. deMello, JSM Peiris, Pei-Jer Chen, Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M : The Development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. 12th ICI, 2004
3. Makoto Matsumoto : Screening novel anti-tuberculosis agents effective against MDR-TB, Symposist at The American Chemical Society, Paper#848940 in " Drug Resistant Tuberculosis" , submitted to Division of Medicinal Chemistry for the 229th ACS National Meeting, San Diego, CA, March 13-17, 2005 in San Diego
4. 平山幸雄、松本壮吉、青木圭子、和田崇之、尾関百合子、松本真、小林和夫 : 抗酸菌の肺胞上皮細胞接着における分子機構 ; 日本細菌学会, 2004

5. 平井真吾、本圭介、巖岩靖子、菊地晴久、播口徳充、松本 真、大島吉輝:
抗マラリアアルカロイドfebrifugineを基盤とした新規誘導体の開発, 日本薬学会3月29日~31日、2004
6. 菊地晴久, 平井真吾, 山本圭介, 巖岩靖子, 播口徳充、松本 真、大島吉輝:
新規抗マラリア剤の創製を目指したキナゾリンアルカロイド febrifugine関連化合物の合成、第23回メデイシナルケミストリーシンポジウム (つくば市)、2004年11月24~26日
7. Sohkiichi Matsumoto, Makoto Matsumoto, Kiyoko Umemori, Yuriko Ozeki, Makoto Furugen, Tatsuo Tomishige, Yukio Hirayama, Saburo Yamamoto, Takeshi Yamada, and Kazuo Kobayashi : DNA augments antigenicity of mycobacterial DAN-binding protein 1 and confers protection against Mycobacterium tuberculosis infection in mice (Submit中)

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究協力者研究報告書

非定型抗酸菌症合併後天性免疫不全症候群(AIDS)患者における血清学的結核診断の検討に
関する研究

研究協力者 服部 俊夫 東北大学大学院医学系研究科感染病態学分野 教授
芦野 有悟 東北大学大学院医学系研究科感染病態学分野 助手

研究要旨

- (目的) 今日、ヒト後天性免疫不全症候群(AIDS)ウイルス(HIV)感染者の増加と共に、AIDS発症時の全身播種型の非定型抗酸菌症が注目されており、新たな診断法が必要とされている。AIDS患者にて本疾患の血清学的診断の有用性を検討するために抗酸菌から抽出した抗原を用いてAIDS患者でのこれに対する抗体価を測定した。
- (対象および方法) AIDS発症で非定型抗酸菌症を合併した者41名。非HIV感染者で非定型抗酸菌症23名。これらを対象としてM.bovis BCG Tokyo 由来の抗原 3種、M.avium serotype4由来の抗原 2種を用い、ELISA法にて抗体を測定した。
- (結果) 5種類の抗原のいずれか一つ対し、抗体価がカットオフ値を越えれば陽性と判定した。陽性者は、非HIV感染者は 22名(95%)。AIDS発症者は 18名(44%)であった。
- (考察) 本研究は、非定型抗酸菌症において血清学診断法の可能性を示唆したが、AIDS発症患者の免疫応答については更なる検討が必要である。

A. 研究目的

今日、世界各国特に、アジア、アフリカでのHIV感染者の拡がりと共に、日和見感染症としての結核は、HIV感染者の生存に大きな影響をあたえている。先進諸国での結核対策の効果から現在開発中のワクチンは、アジア、アフリカでの使用の有益性を検討しなければならない。そして予防のみならず治療効果も期待できることからHIV感染者のAIDS発症時の結核症の治療の一環として結核ワクチン使用の適応が当然問題となってくる。ワクチンを投与するには、AIDS患者での結核の診断を迅速につけることが必要のため、我々は、これまで、アジアにおける結核合併AIDS患者の抗結核

抗体(TBGL抗体)を測定し、血清学的診断の可能性を模索してきた。ここで、もう一つの問題として結核の鑑別診断としての非定型抗酸菌である。これらは、普通、肺病変に限った場合、喀痰中ないし胃液の菌を得ることにより鑑別されるが、全身播種型にきた場合は、肺病変をとらないため血液や病変臓器の組織診やPCR検査が有用とされる。しかし必ずしも100%の陽性率を示さないこと、腹腔臓器の場合は手技的に難しいこと、またアジア各国の地方都市では、人的経済的問題から結核の診断、鑑別診を行う検査は簡素な方法で安価で確実性が要求されることなどから、これまでとは違う新たな方法を必要である。そこで今

回は、日本のAIDS発症非定型抗酸菌患者にてMycobacterium avium(M. Avium) 抗原等、抗酸菌由来の抗原を用いて非定型抗酸菌症の清学診断が可能性を模索するため、これらの抗原に対する抗体価の上昇を検討した。

B. 研究方法

AIDS発症者で、喀痰や組織中から菌が検出され播種性非定型抗酸菌症と認められた者20名、菌が検出されなかったが臨床症状より播種性非定型抗酸菌症と認められた者21名。非HIV感染者で呼吸器症状を認め、かつ非定型抗酸菌が検出された者23名。これらを対象としてM.bovis BCG Tokyo 由来の抗原3種(tetraacyl phosphatidyl inositol dimannosides; PL-1, trehalose6,6'-dimycolate; TDM-T, trehalose6-monomycolate; TMM-T)。M.avium serotype IV s 由来の抗原2種 (trehalose6-monomycolate; TMM-4, glycopeptidolipid; GPL-4) を使い抗酸菌血清抗体検出をEIA法にて試みた。

C. 研究結果

非HIV感染者にて各抗原に対する陽性率はPL-2 52.4%、TDM-T 76.1%、TMM-T 42.9%、TMM-4 71.4%、GPL-4 61.9%であった。5種類の抗原のいずれか一つ対し、抗体価がカットオフ値を越えれば陽性と判定した場合、陽性者は、22名95%であった。一方AIDS発症者でそれぞれの抗原に対する抗体陽性者は、PL-2 12.1%、TDM-T 24.4%、TMM-T 7.3%、TMM-4 4.9%、GPL-4 22.0%で、どれか一つに陽性であった者は18名(44%)であった。AIDS発症者を非定型抗酸菌の検出と非検出者にわけ検討した。菌の検出者では9名(45%)、非検出者では9名(43%)が陽性であり、差は

認められなかった。

また、全IgGの産生はADIS発症のうち菌の検出者は2056±730mg/dl、非検出者2209±525mg/dlで非HIV感染者の1414±408mg/dlより有意に高値であった(p<0.01)。各抗原への抗体価(OD)を見ても、非HIV感染者では、PL-2 0.29±0.46、TDM-T 0.35±0.61、TMM-T 0.29±0.58、TMM-4 0.42±0.69、GPL-4 0.51±0.69。菌検出者のAIDS患者ではPL-2 0.19±0.25、TDM-T 0.14±0.16、TMM-T 0.08±0.12、TMM-4 0.10±0.06、GPL-4 0.11±0.13。PL-2 0.12±0.26、TDM-T 0.09±0.13、TMM-T 0.06±0.06、TMM-4 0.07±0.27、GPL-4 0.23±0.34と、PL-2以外の抗原に対する抗体の産生量においても、非HIV感染非定型抗酸菌症患者は有意(p<0.01)に高く、AIDS発症患者では、産生は、低く抑えられていた。AIDS発症患者で非定型抗酸菌の検出の有無により抗体産生量に差は認められなかった。

D. 考察

抗酸菌抗原に対する抗体の陽性率から見ると非HIV感染者において、非定型抗酸菌症の血清学的診断法は有用である可能が示唆された。一種のみの抗原を用いた場合は、陽性率は40-70%であるが、数種類の抗原を組み合わせることで95%と感度を上げる事ができた。これは、同じ感染者でも糖脂質抗原に対する反応に多様性があることが示唆された。しかしこのことは特異性、特に結核患者での非陽性率を下げられるか否か、逆に問題となってくるが今後検討する必要がある。

AIDS発症患者では、各抗原への抗体陽性率は4-20%といずれも低下していた。非HIV感染者に比して有用性は劣ると言わ

ざるを得ない。しかしHIV感染者で菌の非検出者非定型抗酸菌症者においても抗原を組み合わせるとことにより40%に陽性者が出たことは、他の臨床所見と組み合わせれば補助的な診断価値をもたらす可能性があるものと思われる。

抗体価では、IgGはHIV感染者で高産生を示したが、糖脂質である抗酸菌抗原への抗体産生量は低下しており、陽性率の低下からも分かるように抗体産生が低下しているのではなく、糖脂質抗原へ液性免疫反応そのものが低下していることは示唆された。これは、CD4の低下のみによるものかAIDSウイルスの何らかの直接または間接的影響なのか今後検討すべきことと考えられた。

E. 結論

今回用いた5種類の抗酸菌抗原を用いることにより非定型抗酸菌症の診断に有用である可能性を示唆した。しかし、AIDS発症患者では有用性を更に検討することが必要である。

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. Sugiura H., Ichinose M., Tomaki M., Ogawa H., Koarai A., Kitamuro T., Komaki Y., Akita T., Nishino H., Okamoto S., Akaike T. and Hattori T.: Quantitative Assessment of Protein-bound Tyrosine Nitration in Airway Secretions from Patients with Inflammatory Airway Disease. *Free Radical Research* 38(1): 49-57, 2004
2. Ling H., Usami O., Xiao P., Gu H-G and Hattori T.: The N-terminal of the V3 loop in HIV-1 gp120 is

responsible for its conformation-dependent interaction with cell surface molecule(s) *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 20(2):213-218, 2004

3. Ling H., Xiao P., Usami O. and Hattori T.: Thrombin activates envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and enhances fusion. *Microbes and Infection* 6:414-420, 2004
4. Ling H., Hattori T., Gu H-X, Ashino J., Liu Y-C, and Liu C.: Surveillance of humoral immune responses to tuberculosis glycolipid antigen (TBGL) in TB and HIV infected individuals. XV International AIDS Conference E710L77812 53-56, 2004
5. 林克敏, 宍戸雄一郎, 賀来満夫, 服部俊夫, 大野勲: 肺炎球菌感染の成立機序 保菌から感染へ, 化学療法の領域 20:67, 2004

(2) 学会発表

1. Hattori T., Xiao P., Usami O., and Ling H.: Thrombin activates envelope glycoproteins of HIV-1 and enhances fusion. US-Japan meeting Nashville
2. Hattori T., Xiao P., Usami O., and Ling H.: Thrombin activates envelope glycoproteins of HIV-1 and enhances fusion. XV International AIDS Conference,

- Bangkok, Thailand, 11-16
July 2004, 1: 301[TuPeA4302]
3. Ling H., Hattori T., Gu H.X., Ashino Y., and Liu Y.C.: Humoral immune responses to Tuberculosis Glycolipid Antigen (TBGL) in TB patients and in HIV positive individuals in Heilongjiang province, China. XV International AIDS Conference, Bangkok, Thailand, 11-16 July 2004, [B12560]
 4. Usami O., Peng X., Ling H., and Hattori T.: The conformational property of an-HIV-1 envelope protein gp41 core structure monoclonal antibodies. 2004 International Meeting of the Institute of Human Virology Oct 31- Nov 4, 2004
 5. Ashino Y., Gui H., Matsumura T., Iwamoto A., Yano I., and Hattori T.: Low anti-mycobacterium antibody titer in atypical mycobacterium infection with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, December 7-10, 2004 Kyoto Japan AI-P08
 6. Usami O., Xiao P., Ling H., and Hattori T.: Properties of anti-gp41 core structure antibodies, which compete with sera of HIV-1 infected patients. Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, December 7-10, 2004 Kyoto Japan AI-P16
 7. 服部俊夫: HIV感染と呼吸器疾患。呼吸器感染免疫研究会 第13回 京都セミナー 平成16年7月31日 パルプラザ京都 教育講演
 8. 服部俊夫: 多様化したウイルス感染と阻止。第83回 感染防止研究会 平成16年9月11日 (仙台) 特別講演 宮城県婦人会館
 9. 宇佐見修、服部俊夫: 第 HIV エンベロープ蛋白 gp 4 1 に対する抗体の特性66回 日本血液学会総会 平成16年9月17-19日 (京都)
 10. 宇佐美修、服部俊夫第: HIV-1 IIIB 持続感染細胞 H9/IIIB 表面に発現するエンベロープ蛋白 gp1 の抗原解析。52 回 日本ウイルス学会 11月21-24 日 パシフィコ横浜
 11. 服部俊夫: ヒトとの共生をめざす HIV。家庭医学、放送11月14日 2004 年

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究協力者研究報告書

ユビキチンプロテアソーム系を応用したDNAワクチンの開発に関する研究

研究協力者 姫野國祐 九州大学・医学研究院・感染免疫・熱帯医学分野

研究要旨

近年、田中らによりペプチド抗原をユビキチン化することによりその抗原がプロテアソームでプロセッシングを受け、必然的にMHCクラスI分子に提示され、抗原特異的CD8⁺T細胞が誘導されることが証明された(Immunol. Rev. 163:161~76, 1998)。---この経路はユビキチンプロテアソーム経路と呼称されている。本申請計画では上記知見を基盤とし、結核菌由来のHSP65、トキソプラズマのSAG-1遺伝子、クルーズトリパノソーマのTSA-1遺伝子、ネズミマラリア(*P. yoelii*)のMSP-1遺伝子等とユビキチン遺伝子の融合遺伝子を構築し、各々の病原体抗原に特異的なCD8⁺T細胞を強力に誘導するフュージョンDNAワクチンを開発する。結核菌由来のHSP65を発現させたメラノーマ腫瘍を標的として、ユビキチン遺伝子とHSP65遺伝子の融合遺伝子を用いて、抗腫瘍免疫を指標としてHSP65特異的CD8⁺T細胞の誘導実験を行った。

A. 研究目的

近年、田中らによりペプチド抗原をユビキチン化することによりその抗原がプロテアソームでプロセッシングを受け、必然的にMHCクラスI分子に提示され、抗原特異的CD8⁺T細胞が誘導されることが証明された(Immunol. Rev. 163:161~76, 1998)。---この経路はユビキチンプロテアソーム経路と呼称されている。本申請計画では上記知見を基盤とし、結核菌由来のHSP65、トキソプラズマのSAG-1遺伝子、クルーズトリパノソーマのTSA-1遺伝子、ネズミマラリア(*P. yoelii*)のMSP-1遺伝子等とユビキチン遺伝子の融合遺伝子を構築し、各々の病原体抗原に特異的なCD8⁺T細胞を強力に誘導するフュージョンDNAワクチンを開発する。なお、結核感染系は進行中であるので、本報告書ではトキソプラズマの系のみ述べる。

B. 研究結果

- (1) ワクチンベクター及びサイトカイン発現ベクター構築
ワクチン抗原(トキソプラズマ原虫SAG1)をコードする遺伝子をユビキチン遺伝子とフュージョンした遺伝子(pcDNAUB-SAG1)でMHC class I依存性の免疫を誘導した。
- (2) ワクチンベクターのユビキチンプロテアソーム経路への関与の検討
作製したワクチンベクターは様々な細胞株に遺伝子導入を行い発現の確認を行い、抗原蛋白のプロセッシング及び抗原提示機構を解析した。作製したワクチンベクターを細胞株に遺伝子導入を行い、プロテアソーム阻害剤であるMG-132, エボキソマイシン等を用い、抗原蛋白質のプロセッシングとプロテ

アソーム阻害剤の影響についてウエスタンブロッティング法により解析を行った。

(3) マウスモデルにおけるワクチンベクター導入効果の検討

マウスに対して、「フュージョンベクター」DNAワクチンを行った。ワクチンには生体への遺伝子導入効率に優れた遺伝子銃を用いた。ワクチン後、同蛋白に対する特異抗体価、リンパ球の抗原特異的増殖反応・サイトカイン産生及び細胞傷害活性について解析を行い、「フュージョンベクターによるDNAワクチン」の免疫誘導能並びにその特徴を明らかにした。

(4) マウスモデルにおけるワクチンベクターのユビキチンプロテアソーム経路への関与の検討

マウスに対して、遺伝子銃を用いて「フュージョンベクター」DNAワクチンを行った。抗原提示細胞としてマクロファージ由来PMJ2-PC細胞等へワクチンベクターの遺伝子導入を行い、ワクチン後マウス脾細胞と共培養し、サイトカイン産生及び細胞傷害活性について解析を行った。その際、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。

(5) PA28a^{-/-}β^{-/-}及び免疫プロテアソームノックアウトマウスにおけるワクチンベクター導入効果の検討

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は関与していないが、LMP7が必須の関わりを持つことが明らかとなった。

C. 考察及び結論

ユビキチン遺伝子と結核菌由来のHSP65の融合遺伝子を用いてB6マウスを免疫後、HSP65発現したB6由来のメラノーマ(F10)移植したところ腫瘍増殖を顕著に抑制した。またその免疫マウスのCD8⁺T細胞は試験内でHSP65に特異的な強力なキラー活性を示した。以上の結果より、ユビキチンプロテアソーム系の応用により、結核感染に感染に対してもHSP65を標的とした強い防御免疫を誘導しうることが示唆された。

D. 研究発表

(1) 論文発表

1. Ishii K., Hisaeda H., Duan X., Sakai T., Fehling H.J., Murata S., Chiba T., Tanaka K., Imai T., Sano M., Yano A. and Himeno K.: Involvement of immunoproteasomes for induction of MHC class I-restricted immunity targeting Toxoplasma SAG1. (2004) submitted
2. Zhang M., Obata C., Hisaeda H., Ishii K., Murata S., Chiba T., Tanaka K., Li Y., Furue M., Duan X. and Himeno K.: A novel DNA vaccine based on the ubiquitin-proteasome pathway targeting 'self' antigens expressed in melanoma/melanocyte. (2004) Gene Therapy in press
3. Okamoto M., Oh-E G., Oshikawa T., Furuichi S., Tano T., Ahmed S.U.,

- Akashi S., Miyake K., Takeuchi O., Akira S., Himeno K., Sato M., Ohkubo S.: Toll-Like Receptor 4 Mediates the Antitumor Host Response Induced by a 55-Kilodalton Protein Isolated from *Aeginetia indica* L., a Parasitic Plant. (2004) Clin Diagn Lab Immunol. May; 11(3): 483-495.
4. Obata C., Zhang M., Moroi Y., Hisaeda H., Tanaka K., Murata S., Furue M. and Himeno K.: Formalin-fixed tumor cells effectively induce antitumor immunity both in prophylactic and therapeutic conditions. (2004) J Dermatol Sci. 2004 May; 34(3): 209-219.
5. Onishi K., Li Y., Ishii K., Hisaeda H., Tang L., Duan X., Dainichi T., Maekawa Y., Katunuma N. and Himeno K.: Cathepsin L is crucial for Th1-type immune response during *Leishmania major* infection. (2004) Microbes and Infection Apr; 6(5): 468-474.
6. Yamanaka A., Hamano S., Miyazaki Y., Ishii K., Takeda A., Mak TW., Himeno K., Yoshimura A., Yoshida H.: Hyperproduction of proinflammatory cytokines by WSX-1-deficient NKT cells in concanavalin A-induced hepatitis. (2004) J Immunol. Mar 15; 172(6): 3590-3596
7. Zhang M., Ishii K., Hisaeda H., Murata S., Chiba T., Tanaka K., Li Y., Obata C., Furue M. and Himeno K.: Ubiquitin-fusion degradation pathway plays an indispensable role in naked DNA vaccination with a chimeric gene encoding a syngeneic cytotoxic T lymphocyte epitope of melanocyte and green fluorescent protein. (2004) Immunology Aug; 112(4):567-574
8. Li Y., Ishii K., Hisaeda H., Hamano S., Zhang M., Nakanishi K., Yoshimoto T., Hemmi H., Takeda K., Akira S., Iwakura Y. and Himeno K.: IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in *Leishmania major*-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9?. (2004) Gene Therapy Jun; 11(11): 941-948
9. Hisaeda H., Maekawa Y., Iwakawa D., Okada H., Himeno K., Kishihara K., Tsukumo S., and Yasutomo K.: Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. (2004) Nature Medicine 10(1): 29-30

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

研究協力者研究報告書

H V J -Envelopeを用いた新しい結核ワクチンの開発に関する研究

研究協力者 中島俊洋 ジェノメディア株式会社 取締役・CTO

研究要旨

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。

A. 研究目的

ゲノム解析技術の向上により病原微生物のゲノム解析を短期間で完了する事が可能となったことから、遺伝子そのものをワクチンとする「DNAワクチン」が、感染症に対する次世代ワクチンとして期待されている。実際にSARSの例では、病原体同定から約1ヶ月でゲノム解析が完了し、そのゲノム情報をベースにDNAワクチンの開発が進められている。

このように遺伝子をワクチンとする

「DNAワクチン」の開発は、米国を中心に世界中で行われているが、現在のところワクチンとして実用化に至った品目は皆無である。その理由は、デリバリーシステムの性能が低く、抗原遺伝子の発現効率が充分ではない事や、DNAワクチンに適したアジュバントが見出されていない事が原因である。

そこで、本研究では次世代の結核ワクチン開発のために、DNAワクチンに適した医用材料レベルのデリバリーシステムとアジュバントを開発することを目的として研

究を行った。

B. 研究方法

(1) HVJ-Eベクターの製造

本研究では、ヒト臨床応用を想定して開発を進めているため、治験薬製造に使用可能な製造用材料を使用して、DNAワクチンのデリバリーシステム（HVJ-エンベロープベクター：HVJ-Eベクター）の製造を行った。従来試薬レベルのHVJ-エンベロープベクターは、発育鶏卵により産生していたが、ヒト培養細胞とバイオリクターシステムを使用して製造を行った。また、培地に関しても、BSEの混入やヒト病原ウイルスなどの混入を防止するために完全無血清培地を使用して製造用細胞の培養を行った。使用した培地は、FDAのドラッグマスターファイルに登録されている培地であり、治験薬の製造にも使用できる品質グレードの製品である。上記の完全無血清培地を使用して、製造用のヒト細胞株をバイオリ

アクターで培養して、細胞密度が 2×10^6 /mlの条件でHVJ (ATCC由来の株をクローニング) をシードとして産生を行なった。ベクターの導入活性に必要なベクター粒子上のF蛋白質開裂のために、トリプシンによる処理を行ない、一定時間インキュベートした後培養上清を回収してベクター製造用原料とした。

(2) ベクターの精製と品質の検討

DNAワクチンとしての臨床応用を想定して、医薬品製造の実績がある精製用樹脂を使用して、3種類のカラムクロマトグラフィー法を組み合わせた精製技術により、原料となる培養上清から不純物の除去を行った。

精製後のサンプルは、性状、生化学的濃度(蛋白濃度、ノイラミニダーゼ活性、HA活性)、遺伝子導入効率、不純物の混入量(エンドトキシン、産生細胞由来蛋白質量、産生細胞由来DNA量)、無菌性など、バイオ医薬として使用するために必要な項目について品質を試験した。

(3) 遺伝子の封入

品質試験完了後のHVJ-Eベクターを使用して、IL-12遺伝子及びHSP65遺伝子の発現プラスミド(DNAワクチン)の封入処理を行なった。封入は氷上で界面活性剤によりHVJ-Eベクターを処理する事で、プラスミドDNAを粒子内へ受動拡散させる方法で行なった。32HAU(赤血球凝集活性の単位で1HAUは約100万個のベクター粒子に相当)のベクター粒子に対して、1マイクログラムのプラスミドを使用して、DNAワクチン封入HVJ-Eを調製した。

(4) DNAワクチンとしての薬効検討

DNAワクチンを封入したHVJ-Eは、

薬効研究に使用するまで -80°C に凍結して保存した。薬効の検討試験に使用する直前に 34°C で融解し、ワクチンとしての結核菌増殖抑制効果、治療薬として抗生物質との併用効果に関する検討を行った。

(倫理面への配慮)

ジェノメディア株式会社は、所在地である独立行政法人 産業技術総合研究所の規定により、国で定められている、組換えDNA実験、動物取り扱いに関する指針に従い、施設で開催される各委員会での実験許可を受けてから実験を行うことになっている。また、ヒト生体由来細胞を材料として扱う場合は特に、ヒト試料解析研究倫理審査委員会を社内に設け、問題が無い事が確認されてから実験を行うことになっている。

C. 研究結果

(1) HVJ-Eベクターの製造

新規にクローニングしたHVJをシードとして、バイオリアクターシステムでHVJ-Eの調製を行った結果、10Lの培養スケールで、300万HAU(赤血球凝集活性の単位で1HAUは約100万個のベクター粒子に相当)のベクターが得られた。従来使用していたHVJ株を、ATCC由来の株に変更して、クローニングを行って高産生クローンを選択した事で、ベクター収量が3倍向上した。

(2) ベクターの精製と品質の検討

原料である培養細胞株の上清を、原理の異なる3種類のカラムクロマトグラフィー法を組み合わせた精製法により不純物の除去を行ない、品質試験により検定を行なった。その結果、精製後のサンプルは、性状、生化学的試験、遺伝子導入効率、不純物混入試験、無菌性のいずれの項目に関しても、想定

される基準値をクリアするレベルである事が明らかとなった。

(3) 遺伝子の封入

品質試験完了後のHVJ-Eに、DNAワクチンの候補となる2種類のプラスミド (IL-12遺伝子、HSP65遺伝子) を封入した。定法に従って、32HAUのベクター粒子 (約3200万個のベクター粒子に相当) に対して、1マイクログラムのプラスミドを使用して、DNAワクチンを封入したHVJ-Eベクターを調製した。封入効率は10%~20%程度であると推測される。

(4) DNAワクチンとしての薬効検討

調製したDNAワクチン封入HVJ-Eベクターを使用して、ワクチンとしての結核菌増殖抑制効果、治療薬としての抗生物質との併用効果に関する検討を行った結果、HVJ-Eは、従来型のHVJリポソームと比較して同レベル以上の性能を有することが明らかとなった。

D. 考察

本研究開発により、HVJ-EベクターやHVJリポソームが、感染症に対するDNAワクチンに適したデリバリーシステム兼アジュバントとなる事が示唆された。

また、研究に使用したHVJ-Eベクターは発育鶏卵で製造した試薬レベルの品質グレードではなく、バイオリクターシステムによりヒト培養細胞で製造した医用材料レベルの品質グレードである事から、今後必要な前臨床試験データを取得する事で、早期に臨床応用を開始する事が出来る。

薬効検討のデータでは、特にBCGとの併用によりワクチン活性の増強が認められた事から、既存ワクチンと新規DNAワクチンとの組み合わせにより、安全で有効性の高いワクチンの開発が出来る事が示唆された。

E. 結論

本研究開発により、純国産技術であるHVJ-Eベクターを利用した結核に対する新規DNAワクチン (IL-12遺伝子+HSP65遺伝子) が、ワクチンとして有用である事が明らかとなった。

今後は、安全性、薬効・薬理、体内動態などの前臨床試験データの取得を行うと共に、厚生労働省や医薬品機構などの規制当局のガイドラインに従って、適切な臨床試験のプロトコールとDNAワクチンの製造プロトコールを作成して、臨床応用の早期実現を目指す。

F. 健康危険情報

特になし。HVJをアルキル化剤やUV照射で不活性化して作成したHVJエンベロープベクターに感染性は認められず、安全性が高いことが明らかになっている。

G. 研究発表

1. 論文発表： なし
2. 学会発表： なし

H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得： 特許出願準備中1件
2. 実用新案登録： なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
岡田全司	肺炎(感染症:細菌・ウイルスなどによる感染症/呼吸器)	倉田毅, 総合監修 高久史麿, 猿田享男, 北村惣一郎, 福井次年.	家庭医学大全科	法研出版	東京	2004	2656-9.
岡田全司	肺膿瘍(感染症:細菌・ウイルスなどによる感染症/呼吸器)	倉田毅, 総合監修 高久史麿, 猿田享男, 北村惣一郎, 福井次年	家庭医学大全科	法研出版	東京	2004	2663-4
岡田全司	結核性髄膜炎(感染症:細菌・ウイルスなどによる感染症/脳)	倉田毅, 総合監修 高久史麿, 猿田享男, 北村惣一郎, 福井次年.	家庭医学大全科	法研出版	東京	2004	2635-6
岡田全司	肺結核(感染症:細菌・ウイルスなどによる感染症/呼吸器)	倉田毅, 総合監修高久史麿, 猿田享男, 北村惣一郎, 福井次年	家庭医学大全科	法研出版	東京	2004	2659-62.
岡田全司	膿胸(感染症:細菌・ウイルスなどによる感染症/呼吸器)	倉田毅, 総合監修高久史麿, 猿田享男, 北村惣一郎, 福井次年	家庭医学大全科	法研出版	東京	2004	2664-5.
岡田全司	結核ワクチン	泉孝英, 網谷良一	結核 第4版	医学書院		2005	in press
岡田全司	サイトカインの病態への関与 感染症 結核感染とサイトカイン 新しい結核ワクチン	宮坂信之, 宮島篤編	医学のあゆみ別冊 サイトカイン-state of arts	医学のあゆみ		2004	209-213

原寿郎	学校伝染病と対策		今日の治療指針 2005年版			2005	
原寿郎	小児の成長、小児の発達		標準小児科学第6版			2005	
原寿郎	新生児・小児科疾患. 小児の成長と発達		看護のための最近 医学講座 改訂第2版 第14巻			2005	
原寿郎	その他の炎症性疾患 (1)血球貪食症候群		サイトカイン- state of arts- サイトカインの病態 への関与	医学 のあ ゆみ		2004	
原寿郎	川崎病.		免疫症候 群(下)	日本 臨牀		2005	in press
小出幸夫	Ag85分子DNAワクチンによる抗結核細胞性免疫の誘導		Annual Review 免疫	中外 医学 社		2004	233- 243
鈴木克洋	肺抗酸菌感染症	和田洋巳、三 嶋理晃監修	呼吸器病 学総合講 座	メディ カルレ ビュー 社	大阪	2004	228- 229

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
岡田全司	The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice.	Vaccine	23(17-18)	2269-72	2005
岡田全司	Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model.	Vaccine	23(17-18)	2132-5.	2005

岡田全司	The Development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice.	Immunology 2004.MEDI MOND International Proceedings	Immunology 2004	449-452	2004
岡田全司	Novel (Recombinant BCG- and DNA) Vaccination against Tuberculosis using Cynomolgus Monkey.	Immunology 2004.MEDI MOND International Proceedings	Immunology 2004	403-406	2004
岡田全司	Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens.	Am J Respir Crit Care Med.	70(1)	59-64	2004
岡田全司	Induction of protective cellular immunity against Mycobacterium tuberculosis by recombinant attenuated self-destructing Listeria monocytogenes strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51.	Infect Immun.	72(4)	2014-21	2004
岡田全司	DNA vaccine combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12-encapsulated in hemagglutinating virus of Japan-liposome induces CD8+ CTL and confers protection against Mycobacterium tuberculosis both in mouse and guinea pig model.	Submitted			2005

岡田全司	Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to a dominant epitope on antigen 85A.	Vaccine	submitted		2005
岡田全司	Establishment and evaluation of novel vaccine against tuberculosis: cutting edge of basic study on tuberculosis.	Kekkaku	79(8)	27-41	2004
岡田全司	結核ワクチン	呼吸器科	7(1)	63-70.	2005
岡田全司	感染免疫における新知見. 新たな結核ワクチン開発	臨床免疫	42(1)	61-69	2004
岡田全司	新しい抗結核ワクチン開発の現状“結核病学会シンポジウム”.	結核	78(8)	487-501	2004
岡田全司	結核基礎研究の最前線 新たな抗結核ワクチンの作製と評価	結核	79(8)	497-499	2004
岡田全司	気管支動脈塞栓術におけるIDC (Interlocking Detachable Coil) 導入の有用性.	日本呼吸器学会雑誌	42(8)	730-736	2004
岡田全司	自然免疫と獲得免疫の基礎.	最新医学		in press	2005
坂谷光則	Effects of heat shock on in vitro development and intracellular oxidative state of bovine preimplantation embryos.	Mol Reprod Dev.	67(1)	77-82.	2004
坂谷光則	Four cases of Mycobacterium xenopi pulmonary disease.	Kekkaku.	79(4)	313-20	2004
坂谷光則	Serum neutralizing capacity of GM-CSF reflects disease severity in a patient with pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with inhaled GM-CSF.	Respir Med.	98(12)	1227-30.	2004