

23. Kawamura, I., H. Tsukada, H. Yoshikawa, M. Fujita, K. Nomoto, and M. Mitsuyama. 1992. IFN- γ -producing ability as a possible marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. *J. Immunol.* 148:2887-2893.
24. Launois, P., M. N. Niang, J. De Bruyn, J.-L. Sarthou, F. Rivier, A. Drowart, J.-P. Van Vooren, J. Millan, and K. Huygen. 1993. The major secreted antigen complex (Ag85) from *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin is associated with protective T cells in leprosy: a follow-up study of 45 household contacts. *J. Infect. Dis.* 167:1160-1167.
25. Launois, P., R. DeLeys, M. N. Niang, A. Drowart, M. Andrien, P. Dierckx, J.-L. Cartel, J.-L. Sarthou, J.-P. Van Vooren, and K. Huygen. 1994. T-cell-epitope mapping of the major secreted mycobacterial antigen Ag85A in tuberculosis and leprosy. *Infect. Immun.* 62:3679-3687.
26. Lecuit, M., S. Dramsi, C. Gottardi, M. Fedor-Chaiken, B. Gumbiner, and P. Cossart. 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* 18:3956-3963.
27. Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, C. Babinet, and P. Cassart. 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292:1722-1725.
28. Lowrie, D. B., C. L. Silva, and R. E. Tascon. 1998. Genetic vaccination against tuberculosis, p. 59-71. *In* E. Raz, (ed.), *Gene vaccination: theory and practice*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
29. Lozes, E., K. Huygen, J. Content, O. Denis, D. L. Montgomery, A. M. Yawman, P. Vandebussche, J.-P. Van Vooren, A. Drowart, J. B. Ulmer, and M. A. Liu. 1997. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. *Vaccine* 15:830-833.
30. Matsuo, K., R. Yamaguchi, A. Yamazaki, H. Tasaka, and T. Yamada. 1998. Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular α antigen. *J. Bacteriol.* 170:3847-3854.
31. Ohara, N., H. Kitaoura, H. Hotokezaka, T. Nishiyama, N. Wada, S. Matsumoto, T. Matsuo, M. Naito, and T. Yamada. 1995. Characterization of the gene encoding the MPB51, one of the major secreted protein antigens of *Mycobacterium bovis* BCG, and identification of the secreted protein closely related to the fibronectin binding 85 complex. *Scand. J. Immunol.* 41:433-442.
32. Orme, I. M., P. Andersen, and W. H. Boom. 1993. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 167:1481-1497.
33. Park, S. F., and G. S. Stewart. 1990. High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. *Gene* 94:129-132.
34. Paterson, Y., and G. Ikonomidis. 1996. Recombinant *Listeria monocytogenes* cancer vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 8:664-669.
35. Sizmore, D. R., A. A. Branstrom, and J. C. Sadoff. 1995. Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270:299-302.
36. Tanghe, A., O. Denis, B. Lambrecht, V. Motte, T. van den Berg, and K. Huygen. 2000. Tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85A is immunogenic and protective when administered by intramuscular needle injection but not by epidermal gene gun bombardment. *Infect. Immun.* 68:3854-3860.
37. Ulmer, J. B., M. A. Liu, D. L. Montgomery, A. M. Yawman, R. R. Deck, C. M. DeWitt, J. Content, and K. Huygen. 1997. Expression and immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 by DNA vaccination. *Vaccine* 15:792-794.
38. Weiskirch, L. M., and Y. Paterson. 1997. *Listeria monocytogenes*: a potent vaccine vector for neoplastic and infectious disease. *Immunol. Rev.* 158:159-169.
39. Wiker, H. G., and M. Harboe. 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* 56:648-661.
40. Yoshida, A., Y. Koide, M. Uchijima, and T. O. Yoshida. 1995. Dissection of strain difference in acquired protective immunity against *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG). *J. Immunol.* 155:2057-2066.
41. Yoshida, A., T. Nagata, M. Uchijima, T. Higashi, and Y. Koide. 2000. Advantage of gene gun-mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses. *Vaccine* 18:1725-1729.
42. Zhu, X., N. Venkataprasad, J. Ivanyi, and H. M. Vordermeier. 1997. Vaccination with recombinant vaccinia viruses protects mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology* 92:6-9.

Editor: S. H. E. Kaufmann



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Vaccine

Vaccine xxx (2005) xxx–xxx

www.elsevier.com/locate/vaccine

The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice

Masaji Okada^{a,*}, Yuji Takemoto^a, Yoshinobu Okuno^b, Satomi Hashimoto^a, Shigeto Yoshida^c, Yukari Fukunaga^c, Takao Tanaka^a, Yoko Kita^a, Sachiko Kuwayama^a, Yumiko Muraki^a, Noriko Kanamaru^a, Hiroko Takai^a, Chika Okada^a, Yayoi Sakaguchi^a, Izumi Furukawa^a, Kyoko Yamada^a, Makoto Matsumoto^d, Tetsuo Kase^b, Daphne E. deMello^e, J.S.M. Peiris^f, Pei-Jer Chen^g, Naoki Yamamoto^h, Yoshiyuki Yoshinaka^h, Tatsuji Nomuraⁱ, Isao Ishida^j, Shigeru Morikawa^k, Masato Tashiro^k, Mitsunori Sakatani^a

^a Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone, Sakai, Osaka 591-8555, Japan

^b Department of Infectious Diseases, Osaka Prefectural Institute of Public Health, 3-69 Nakamichi 1-chome Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

^c Department of Infection and Immunity, Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Tochigi 329-0498, Japan

^d Microbiological Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., 463-10, Kagasuno, Kawauchi-cho, Tokushima 771-0119, Japan

^e Department of Pathology Cardinal Glennon Children's Hospital, St. Louis University Health Science Center, 1465 South Grand Blvd. St. Louis, MO 63104, USA

^f Department of Microbiology, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong

^g Hepatitis Research Center, National Taiwan University College of Medicine, Room 328, 3F, No.1, Sec. 1, Ren-ai Rd., Zhongheng District 100, Taipei, Taiwan

^h Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8549, Japan

ⁱ Central Institute for Experimental Animals, 1430 Nogawa, Miyamae, Kawasaki, Kanagawa 216-0001, Japan

^j Pharmaceutical Division, Kirin Brewery Co., 6-26-1 Jingumae, Shibuya, Tokyo 150-8011, Japan

^k National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Abstract

We have investigated to develop novel vaccines against SARS CoV using cDNA constructs encoding the structural antigen; spike protein (S), membrane protein (M), envelope protein (E), or nucleocapsid (N) protein, derived from SARS CoV. Mice vaccinated with SARS-N or -M DNA using pcDNA 3.1(+) plasmid vector showed T cell immune responses (CTL induction and proliferation) against N or M protein, respectively. CTL responses were also detected to SARS DNA-transfected type II alveolar epithelial cells (T7 cell clone), which are thought to be initial target cells for SARS virus infection in human. To determine whether these DNA vaccines could induce T cell immune responses in humans as well as in mice, SCID-PBL/hu mice was immunized with these DNA vaccines. As expected, virus-specific CTL responses and T cell proliferation were induced from human T cells. SARS-N and SARS-M DNA vaccines and SCID-PBL/hu mouse model will be important in the development of protective vaccines.

© 2005 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: SARS DNA vaccine; SCID-PBL/hu; Human CTL

1. Introduction

The causative agent of severe acute respiratory syndrome (SARS) has been identified as a new type of corona virus,

SARS corona virus (SARS CoV) [1–3]. SARS has infected more than 8400 patients in about 7 months in over 30 countries and caused more than 800 deaths. The deadly epidemic has had significant impacts on many health, social, economic and political aspects. SARS is assumed to resurge in the near future. However, no SARS vaccine is currently available for clinical use. Therefore, we have developed novel vaccine can-

* Corresponding author. Tel.: +81 72 252 302; fax: +81 72 212 153.
E-mail address: okm@kch.hosp.go.jp (M. Okada).

47 didates against SARS CoV using cDNA constructs encoding
 48 the structural antigens; S, M, E, or N protein. In immunized
 49 mice, neutralizing antibodies against the virus and T cell im-
 50 munity against virus-infected-cells were studied, since these
 51 immunities play important roles in protection against many
 52 virus infections. In particular, CD8⁺ CTL plays an important
 53 role in T cell immunity dependent protection against virus
 54 infections and the eradication of murine and human cancers
 55 [4,5]. In the present study, a type II alveolar epithelial cell
 56 clone, T7, was used for analyzing precise mechanism of CTL
 57 against SARS CoV membrane antigens, as the SARS-CoV
 58 infects alveolar epithelial cell in the lungs [6]. Furthermore,
 59 the SCID-PBL/hu model, which is capable of analyzing in
 60 vivo human immune response, was also used because it is a
 61 more relevant translational model for human cases [4].

62 **2. Materials and methods**

63 Three kinds of SARS CoV strains: HKU39849(1), TW-
 64 1 and FFM-1(2) and their cDNAs were used. S, M, N or E
 65 cDNA was transferred into pcDNA 3.1(+) vector and pcDNA
 66 3.1(+)/vs-His Topo (QIAGEN K K, Tokyo, Japan). These
 67 genes were expressed in eukaryotic cells and *Escherichia*
 68 *coli*. pcDNA 3.1(+) vector, 50 µg each, containing SARS
 69 S, M, N, or E DNA was injected i.m. (M.tibia anterior) into
 70 C57BL/6 mice (female, 8 weeks CLEA Japan Inc, Japan) and
 71 BALB/c mice (female, 8 weeks) three times, at an interval of 7
 72 days. Neutralizing antibodies against SARS CoV in the serum
 73 from the mice immunized with SARS S, M, N or -E DNA
 74 vaccines were assayed by use of Vero-E6 cell. CTL activity
 75 against SARS CoV was studied using human type II alveolar
 76 epithelial cells, T7, expressing SARS antigens [6]. PBL from
 77 healthy human volunteers were administered i.p. into IL-2
 78 receptor γ-chain disrupted NOD SCID mice [IL-2R(-/-)
 79 NOD-SCID], and SCID-PBL/hu mice were constructed [4].
 80 SARS DNA vaccines at 50 µg were injected i.m. into the
 81 SCID-PBL/hu mice. CTL activity of human CD8-positive
 82 lymphocytes in the spleen from SCID-PBL/hu was assessed
 83 using IFN-γ production and 51Cr-release assay [4,5].

84 **3. Results**

85 **3.1. Induction of CTL against SARS CoV by SARS (N)
 86 DNA and SARS (M) DNA vaccine**

87 Spleen cells from C57BL/6 mice immunized with SARS-
 88 S, -M, -N or -E DNA vaccine were cultured with syngeneic
 89 T7 lung cells transfected with S, M, N or E cDNA. pcDNA
 90 3.1(+) SARS (N) DNA vaccine induced significantly CTL
 91 activity (IFN-γ production) against N cDNA transfected T7
 92 cells (Fig. 1A). Similarly, SARS M DNA vaccine induced
 93 SARS antigen M-specific CTL against T7 cells transfected
 94 with SARS M DNA (data not shown).

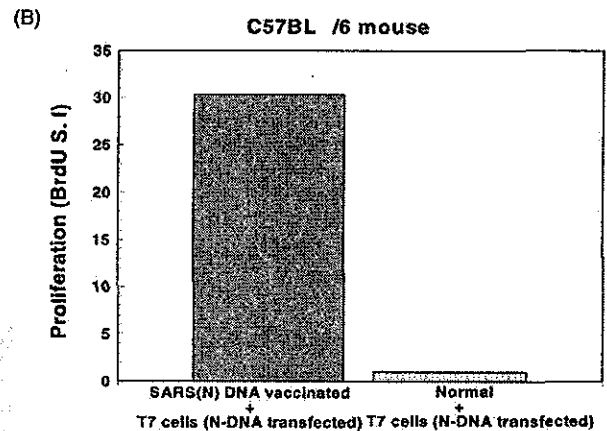
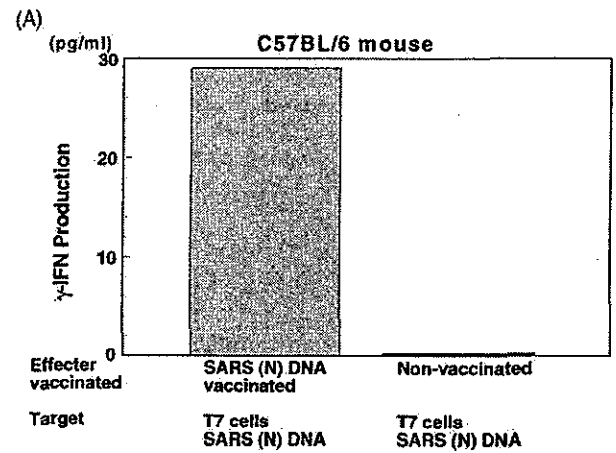


Fig. 1. Induction of CTL and T cell proliferation against SARS (N). (A) Induction of CTL against SARS (N) antigen in the spleen cells from C57BL/6 mice immunized with SARS (N) DNA vaccine. SARS (N) DNA using pcDNA3.1(+) vector was injected i.m. into C57BL/6 mice three times, at an interval of 7 days. CTL activity was assessed by IFN-γ production in the culture of 1 × 10⁶ spleen cells and 1 × 10⁴ T7 lung alveolar type II epithelial cells transfected with SARS (N) DNA at the E/T ratio of 100:1. IFN-γ production was assessed by ELISA assay. (B) Augmentation of lymphocyte proliferation specific for SARS (N) DNA vaccine. 1 × 10⁵ responder cells from vaccinated mice were cultured with Mitomycin C treated 1 × 10⁴ T7 cells transfected with SARS (N) DNA for 48 h and then Bromodeoxy Uridine (BrdU) was added. Proliferative responses were assessed by BrdU assay.

95 **3.2. Augmentation of lymphocyte proliferation specific
 96 for SARS CoV antigens by the immunization with SARS
 97 (M) DNA and SARS (N) DNA vaccine**

98 The proliferation of splenic T cells stimulated by co-
 99 culture either with T7 cells transfected with M DNA or SARS
 100 M peptide (TW1 M102-116) was strongly augmented by M
 101 DNA vaccine (data not shown). SARS N DNA vaccine also
 102 induced proliferation of splenic T cells in the presence of re-
 103 combinant N protein as well as N DNA-transfected T7 cells
 104 (Fig. 1B). Thus, both SARS N DNA vaccine and M DNA vac-

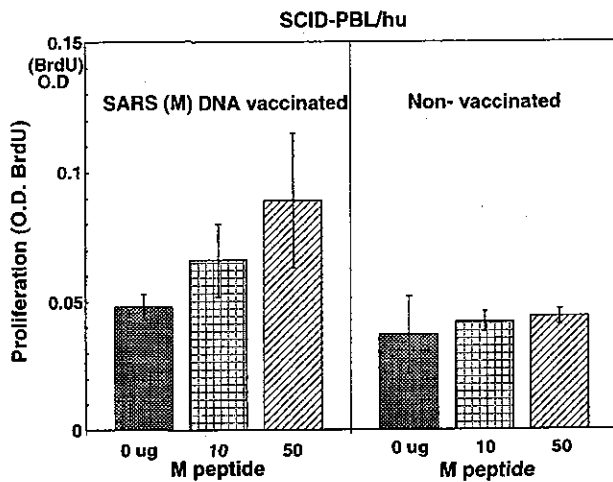


Fig. 2. SARS (M) DNA vaccine induces in vivo human T cell proliferation against SARS CoV in the SCID-PBL/hu human immune systems. 4×10^7 PBL from healthy human volunteers were administered i.p. into IL-2 receptor γ -chain disrupted NOD SCID mice [IL-2R (-/-) NOD-SCID], and SCID-PBL/hu mice were constructed. Fifty micrograms of SARS DNA vaccine was injected i.m. into these SCID-PBL/hu mice. 1×10^5 spleen cells from these vaccinated mice were cultured with 10~50 μ g of SARS M peptide for 3 days. Proliferation was assayed by BrdU.

105 cine were shown to induce T cell immune responses against
106 the relevant SARS CoV antigens.

107 **3.3. SARS M DNA and N DNA vaccines induced human**
108 **T cell immune responses (CTL and proliferation) in**
109 **SCID-PBL/hu model**

110 The M DNA vaccine enhanced the CTL activity and prolifer-
111 ation in the presence of M peptide in SCID-PBL/hu mice
112 (Fig. 2). Furthermore, the SARS N DNA vaccine induced
113 CTL activity (IFN- γ production by recombinant N protein
114 or N protein pulsed-autologous B blast cells) and prolifer-
115 ation of spleen cells in SCID-PBL/hu mice (Fig. 3). From
116 these results, it was demonstrated that SARS M DNA vac-
117 cine and N DNA vaccine induced human CTL and human T
118 cell proliferative responses.

119 **4. Discussion**

120 We have demonstrated that SARS (M) DNA and (N) DNA
121 vaccines induce virus-specific immune responses (CTL and
122 T cell proliferation) in the mouse systems using type II lung
123 alveolar T cell lines in clone target models [6]. These DNA
124 vaccines induced SARS-CoV-specific CTL and T cell prolifer-
125 ation in vivo human immune systems using SCID-PBL/hu.
126 Gao et al. developed adenovirus based a SARS DNA vaccine
127 encoding S1 polypeptide was capable of inducing neutraliz-
128 ing antibody, while another SARS DNA vaccine encoding N
129 protein generated IFN- γ producing T cells in rhesus monkeys
130 [7]. SARS S DNA vaccine which elicits effective neutral-
131 izing antibody responses that generate protective immunity

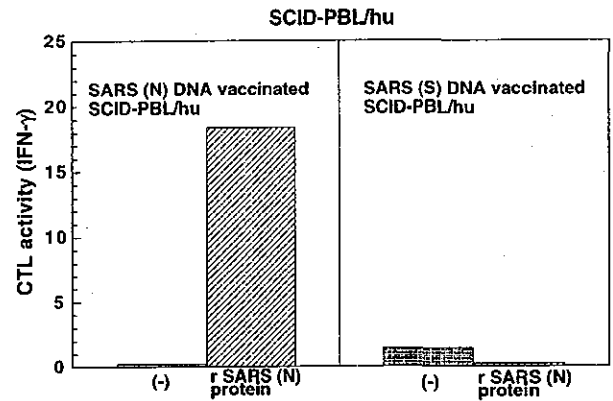


Fig. 3. SARS (N) DNA vaccine induces in vivo human CTL against SARS CoV in the SCID-PBL/hu human immune systems. 4×10^7 PBL from healthy human volunteers were administered i.p. into IL-2 receptor γ -chain disrupted NOD SCID mice [IL-2R (-/-) NOD-SCID], and SCID-PBL/hu mice were constructed. 50μ g of SARS (N) DNA vaccine or 50μ g of SARS (S) DNA vaccine. 1×10^5 spleen cells from SCID-PBL/hu mice were cultured with 10μ g of recombinant SARS (N) protein for 72 h. IFN- γ production in the culture supernatant was assayed using ELISA.

132 in a mouse model [8]. However its immunogenicity in humans
133 has yet to be established. Therefore, it is very important
134 to evaluate the efficacy of SARS DNA vaccine in a SCID-
135 PBL/hu mice, which is a highly relevant translational model
136 for demonstrating human immune responsiveness. Recently,
137 SARS DNA vaccines capable of inducing human neutraliz-
138 ing antibodies against SARS CoV have been established
139 by our SCID-PBL/hu model. It has been demonstrated that
140 Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is a functional re-
141 ceptor for the SARS CoV [9]. A transgenic mouse with hu-
142 man ACE-2 may be useful as an animal model of SARS. Fur-
143 thermore, ACE-2 transgenic SCID mice should be useful as a
144 human model for pre-clinical trial for SARS vaccines, since
145 ACE-transgenic SCID-PBL/hu model could analyze the hu-
146 man immune responses against SARS infection in vivo. The
147 effect of combination immunization with such SARS vac-
148 cines and neutralizing antibody dependent DNA vaccine is
149 now being studied. These DNA vaccines should provide a
150 useful tool for development of protective vaccines.

151 **Acknowledgements**

152 This study was supported by Grant-in-Aid for the science
153 and technology and Grant-in-Aid for Scientific Research on
154 Priority Areas from the Ministry of Education Culture Sports,
155 Science and Technology, Japan. This study also supported
156 by a Health and Labour Science Research Grant from the
157 Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan.

158 **References**

159 [1] Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al. SARS study group. Coronavirus
160 as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*
161 2003;361(9366):1319-25.

- 162 [2] Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel
163 coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N*
164 *Engl J Med* 2003;348(20):1967-76.
- 165 [3] Peiris JS, Yuen KY, Osterhaus AD, Stohr K. The severe acute respi-
166 ratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;349(25):2431-41.
- 167 [4] Tanaka F, Abe M, Akiyoshi T, et al. The anti-human tumor effect and
168 generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human pe-
169 ripheral blood lymphocytes by the in vivo transfer of the Interleukin-6
170 gene using adenovirus vector. *Cancer Res* 1997;57(7):1335-43.
- 171 [5] Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, Yamamura Y, Kishimoto T.
172 Establishment and characterization of human T hybrid cells se-
173 creting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*
174 1981;78(12):7717-21.
- [6] deMello DE, Mahmoud S, Padfield PJ, Hoffmann JW. Generation of 175
an immortal differentiated lung type-II epithelial cell line from the 176
adult H-2K(b)tsA58 transgenic mouse. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 177
2000;36(6):374-82. 178
- [7] Gao W, Tamin A, Soloff A, et al. Effects of a SARS-associated coro- 179
navirus vaccine in monkeys. *Lancet* 2003;362(9399):1895-6. 180
- [8] Yang ZY, Kong WP, Huang Y, et al. A DNA vaccine induces SARS 181
coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 182
2004;428(6982):561-4. 183
- [9] Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting en- 184
zyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 185
2003;426(6965):450-4. 186

UNCORRECTED PROOF

第79回総会シンポジウム

II. 結核基礎研究の最前線

座長 ¹光山 正雄 ²小林 和夫

キーワード：結核，結核菌，基礎研究

シンポジスト：

1. 抗酸菌菌体構成高分子の構造解析と生物活性
藤田由希子，¹矢野郁也（日本BCG製造株式会社中央研究所）
2. 結核菌潜伏感染の分子機構と新規治療戦略
松本杜吉（大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学）
3. 結核の病態と感染防御における各種サイトカインの意義
川上和義（琉球大学大学院医学研究科感染病態制御学講座分子病態感染症学分野）
4. 結核菌によるTh1サイトカイン誘導の意義と責任分子
河村伊久雄（京都大学大学院医学研究科微生物感染症学）
5. 新たな抗結核ワクチンの作製と評価
岡田全司（独立行政法人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）

ここ20年程の結核基礎研究を眺めてみると、免疫応答機構、結核菌の抗原や活性リガンドの同定、薬剤耐性の分子遺伝学的機構解明などに多くの進歩がみられ、さらにゲノムプロジェクトによって人型菌H37Rv株の全ゲノムが解明されてきている。結核菌全ゲノム配列解明は、これまで足踏み状態にあった病原因子の分子遺伝学的解析に新たなインパクトを与えたが、わが国ではその研究は少なく、より多くの研究者の参画が期待される。現有の抗結核薬が近い将来遭遇するかもしれない高度耐性菌の蔓延や compromised host のさらなる増加による集団としての感受性の低下などの可能性を想定すれば、結

核菌の病原性とそれによる病態のメカニズムの解明と、それを基盤とした新たなワクチン開発や新規免疫療法の開発が改めて要請されている。

本シンポジウムでは、わが国における数多くない結核基礎研究者から代表的な方々を選び、現時点で重要なテーマ別に cutting edge をお話しいただき、理解を深めることを目的とした。結核菌細胞壁には他の細菌にはみられない脂質や糖脂質が存在し、結核菌の特有な性格と強い免疫刺激活性を規定しており、病態の理解と感染の診断のいずれにも重要である。その構造と活性の解析における新たな進展、その診断への応用について、矢野郁也氏（日本BCG研）にまとめていただいた。結核菌の遺伝子には、マクロファージ内での殺菌回避と細胞内持続感染、きわめて遅い発育などを規定するものが多数存在すると思われ、それらが特有の感染のみならず、臨床的な休眠状態にも関与する可能性がある。松本杜吉氏（大阪市立大）には氏が単離したMDP1の知見を中心に新規病原因子候補遺伝子に関する研究の進展をお話しいただいた。臨床家である川上和義氏（琉球大）には、各種サイトカインのうちとくにTh1サイトカインの病態や防御における役割について、マウスでの詳細な実験成績に基づいて臨床での知見への関連を議論いただいた。結核菌に対して誘導される強いTh1依存型免疫応答には、結核菌リガンドに対する宿主TLRを介したTh1サイトカイン応答が必須と考えられるが、そのメカニズムと結核菌側の責任分子について河村伊久雄氏（京都大）に解析の現状をまとめていただいた。結核の防御免疫誘導には、現在のBCGよりもはるかに安全性と有効性に優れた候補ワクチンの開発が求められている。わが国でも多くのリコンビナントBCGワクチンやDNAワクチンが開発さ

¹京都大学大学院医学研究科微生物感染症学，²大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学

連絡先：光山正雄，京都大学大学院医学研究科微生物感染症学，〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町
(E-mail: mituyama@mb.med.kyoto-u.ac.jp)
(Received 15 Jul. 2004)

れ、一部はサルでの投与感染実験が実施されている。岡田全司氏（近畿中央病院）にはわが国における多数の候

補ワクチンの開発とその評価の現状をまとめていただいた。

1. 抗酸菌菌体構成高分子の構造解析と生物活性

日本 BCG 製造株式会社中央研究所 藤田由希子, 矢野 郁也

結核菌をはじめとする抗酸菌の大きな特徴は、細胞壁に多量のワックス様高分子脂質を含み、これらが菌表層の疎水性や抗酸性に寄与し、宿主体内外における長期間の菌自身の生存を可能にしている点である。宿主に対しては、細胞壁脂質やタンパク抗原の多くが、感染初期に自然免疫を介して生体防御機能を果たす一方で、過剰な免疫反応で肉芽腫形成や空洞化にも関わり、“双刃の剣”的な性質を示す。これらの表層成分は、一般に疎水性の強い脂質分子であるために親水性の生体反応とはなじみ難いものであり、従って長年の研究にもかかわらず、構造活性相関は十分解明されていなかった。最近、新しい質量分析法や NMR 等を駆使して網羅的にプロテオームやリポドーム解析が可能となり、また一方で新しい免疫学的視点から、これらの菌体成分の宿主への作用機作を明らかにし、診断薬抗原やワクチン開発を目指すことにより、結核研究の発展に“breakthrough”を与える可能性も現れてきた。結核菌細胞壁成分を中心に、最近の知見を紹介する。

〈Cord factor (trehalose dimycolate, TDM)〉

結核菌病原因子として最も早くから知られた糖脂質であるが、非病原性抗酸菌にも広く分布し、単独で肉芽腫形成能があり、抗腫瘍性、Th-1 アジュバント活性がある。NK 細胞活性化による IFN- γ や TNF- α 産生を示す。TDM 以外に trehalose monomycolate (TMM), -trimycolate (TTM) 等が存在し、TOF MASS 分析では 1600 前後 (TMM) から 2800 前後 (TDM) の分子量の多数の分子種が検出される。構成ミコール酸は菌種により異なり、宿主の樹状細胞の CD1 抗原提示分子により抗原として提示される。結核患者中には、ミコール酸を認識する抗 TDM 抗体が高頻度で検出される。

従来、ミコール酸を含む TDM や TMM の免疫薬理学的生物活性は、これらを構成するミコール酸の鎖長が長いほど活性が高く毒性も強いとされてきたが、最近の研究では、ミコール酸の構造のわずかの違いが菌の表層の性質にも影響し、例えばシクロプロパン環の含量が低いほど抗酸性が低下したり、コード形成が弱くなり、一方ワックスエステルミコール酸を含む極性の高い TDM は、結核菌 TDM より強力な播種性肉芽腫を形成することが判ってきた。TDM や TMM はその含量が高いこと

からも、表層構成分子として菌種特異性が高いことから、感染防御免疫や抗腫瘍性生体防御分子としてはきわめて興味のある物質で、これらの構造・免疫活性相関の網羅的解析がのぞまれる^{1)~3)}。

〈LAM (lipoarabinomannan), LM (lipomannan) および PIMx (phosphatidylinositol mannosides)〉

LAM と LM は抗酸菌表層の両親媒性物質で、PIM は core に相当する。近年病原因子としての性質と構造が次第に明らかにされ、Tリンパ球の抑制、O₂スカベンジャー活性、PL-fusion 阻害が報告される一方、TLR-2 依存的に NKT cell を活性化し、IL-8、TNF- α 産生、肉芽腫形成を示す。LAM (MW 15000 ~ 45000)、LM (MW 6000 ~ 8500) と菌種により構造が異なり、従って活性にも差がある。グラム陰性細菌内毒素と似て、LAM や LM のアンカー部分 (PIM) に主要活性があり、特に Man 20 mer 近辺の LM の活性が注目されている。BCG 菌では、parietal LAM と cellular LAM で PIM の脂質部分の構造が異なり、免疫学的活性 (IL-8 と TNF- α 産生能) に差がある。抗 LAM 抗体や抗 PIM 抗体の検出も、結核の診断に用いられる。

LM や LAM も抗酸菌に広く分布する表層構成分子であり、抗酸菌共通の構造を有するものと菌種特異的な構造をもつものがあるが、最近 IL-12 産生やヒト由来食細胞に対する apoptosis 活性は LM に最も活性が強く、マンノースキャップを有する LAM には必ずしも強い活性があるとは言えないとされる。これらの成分は両親媒性物質のため、抽出・単離が容易でないことから活性構造相関の解明は遅れているが、生体防御調節物質としてはきわめて興味がある^{4)~6)}。

〈Sulfolipids (2, 3, 6, 6' -tetraacyltrehalose 2' -sulfate, SL)〉

結核菌病原因子として TDM と協同して毒性を高める。貪食を促進する一方、PL-fusion を阻害し、細胞内寄生性を高める。SL-欠損株は、弱毒菌とする報告もある。

興味あることに、SL は TDM と同様 trehalose を構成糖とする糖脂質であるにもかかわらずミコール酸を含まず、硫酸基を有する酸性糖脂質であるが、マウスに対する致死毒性はない。TDM と同時に i.v. 投与すると肉芽腫形成を抑制し、体重減少も抑制する (毒性の中和; Yano

ら未発表)。SL自身には肉芽腫形成能はなく、しかもマクロファージの大部分の機能を阻害する点で、TDMとは異なる機構で病原性に寄与していると予想される⁹⁾。

〈GPL (glycopeptidolipids) と PGL (phenolglycolipid)〉

GPLは *M. avium* complex に特徴的な血清型特異抗原で、lipopeptide core と糖鎖からなる。糖鎖は血清型特異的、core は共通抗原として MAC 症患者 IgG 抗体に認識され、診断抗原となる。PGL は *M. leprae*, *M. tuberculosis* の表層抗原で血清診断に有用であるが、いずれも構成糖は天然ではきわめてユニークな O-メチル化、N-アシル化、酸性糖を含み、構造は MS 分析により解明されつつある。ヒト末梢血では、PPD や抗 CD3⁺ 抗体刺激によるリンパ球増殖抑制および IFN- γ 産生阻害がみられ、血清型により食食促進、PL-fusion 阻害を示す。

近年、MAC 菌感染による非結核性抗酸菌症が増加しているのみならず、AIDS 末期の CD4 リンパ球減少による免疫抑制患者にしばしば重篤な感染を引き起こすことや、結核との合併症が注目されており、MAC 症感染による免疫抑制が、MAC 菌菌体のどのような成分により引き起こされるのかは興味のある点である¹⁰⁾。

〈CWS (cell wall skeleton)〉

抗酸菌細胞壁は、arabinogalactan mycolate を主体とする巨大分子で、PG と共有結合して安定な疎水性細胞壁を形成する。TDM や LAM と協同して、TLR-2 および -4 を介して自然免疫に基づく抗腫瘍性や免疫強化活性を示す。天然では特殊な ara-furanoside, gal-furanoside が存在し、末端 ara にミコール酸がエステル結合している。

CWS はこのように、PG と AG-mycolate を含む巨大分子で、糖・脂質・ペプチドを構成成分とする複合体であるために、その構造はなお完全に解明されたとは言いがたい。特に CWS 刺激により複数の TLR を誘導することと、ミコール酸や PG 部分を除去すると、いずれも完全に免疫強化活性が失われることから、自然免疫強化活性の中心は親水性および疎水性部分の両方に存在することが予想され、ミコール酸の D-arabinose へのエステル化率は抗酸菌表層の疎水性の強さに反映しているものと考えられている¹⁰⁾。CWS 投与によるヒト単球細胞のサイトカイン mRNA 発現は、LPS 等と比べて著しく多様性にとみ、抗酸菌感染とヒトの免疫反応における多様なシグナルの交換は、長年にわたる宿主・寄生体関係の進化を想像させる。抗酸菌の細胞壁骨格は、このように抗酸菌細胞の形態維持に役立っているだけでなく、宿主免疫反応や病原性の発現にも深く関わっていると考えられることから、分子進化論的に限りなく興味をそそる構築分子である^{11) 12)}。

抗酸菌の病原性や免疫調節活性は、これら多彩な菌体

表層構築分子 (脂質とタンパク抗原) の総合的な働きによるものと考えられ、遺伝子解析後の課題として、新しい細胞壁分子構造の解析法と最新の免疫学的知見に基づく“対結核新戦略”の確立が期待される。

文 献

- 1) Noll H, Bloch H, Asselineau J, et al.: The chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biophys Biochim Acta*. 1956; 20: 299-309.
- 2) Ozeki Y, Kaneda K, Fujiwara N, et al.: *In vivo* induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6, 6'-dimycolate). *Inf Immun*. 1997; 65: 1793-1799.
- 3) Ryll R, Kumazawa Y, Yano I: Immunological Properties of Trehalose Dimycolate (Cord Factor) and Other Mycolic Acid-containing Glycolipids—A Review. *Microbiol Immunol*. 2001; 45 (12): 801-811.
- 4) Daffe M, Draper P: The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol*. 1998; 39: 131-203.
- 5) Chatterjee D, Khoo KH: Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology*. 1998; 8: 113-120.
- 6) Dao ON, Kremer L, Guerardel Y, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* Lipomannan Induces Apoptosis and Interleukin-12 Production in Macrophages. *Inf Immun*. 2004; 72: 2064-2074.
- 7) Goren MB, Brokl O, Schaefer WB: Lipid of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: correlation of virulence with elaboration of sulfatides and strongly acidic lipid. *Inf Immun*. 1974; 9: 142-149.
- 8) Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, et al.: Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Inf Dis*. 1992; 165: 1082-1085.
- 9) Fukui J: Suppressing effect of glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium-intracellulare* complex serovar 4 and 16 on blastogenesis of human peripheral blood mononuclear cells. *Kekkaku*. 1998; 73: 5-12.
- 10) McNeil M, Daffe M, Brennan P: Location of the Mycolyl Ester Substituents in the cell walls of Mycobacteria. *J Biol Chem*. 1991; 266 (20): 13217-13223.
- 11) Hayashi A, Doi O, Azuma I, et al.: Immunofriendly use of BCG cell wall skeleton remarkably improves the survival rate of various cancer patients. *Proc Jpn Acad*. 1998; 74: 50-55.
- 12) Begum NA, Ishii K, Kurita-Taniguchi M, et al.: *Mycobacterium bovis* BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and c-DNA subtraction in human macrophages. *Inf Immun*. 2004; 72: 937-948.

2. 結核菌潜伏感染の分子機構と新規治療戦略

大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学 松本 壮吉

結核と潜伏感染

結核は結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) による慢性感染症であるが、菌の感染が成立し直ちに発症する一次結核は5%程度と稀で、多くは不顕性の経過をたどる。一般に、感染した菌は終生、生体から完全に排除されることはなく、一部は休眠菌となり、代謝の著しく低下した状態で生存し続けると考えられている。宿主の抵抗性が低下すると菌は再び増殖を始め、内因性再燃を引き起こす。これを二次結核と呼び、大部分の成人型肺結核はこの機序で発症する。現在、人類の32%に結核菌が潜伏感染しており、既感染の健康人で一生の間に約10%が発病に至る。

増殖の停止と抗酸菌の病原性

結核菌は、14時間あまりをかけて分裂するきわめて増殖の緩慢な菌である。抗酸菌属菌種中でも、ハンセン病の原因菌 *Mycobacterium leprae*、非結核性抗酸菌症の主要原因菌である *Mycobacterium avium-intracellulare* complex など、病原性抗酸菌は、ほとんどが遅発育性である。遅発育性と病原性の直接の関わりは明らかでないが、一つには、病原性抗酸菌が細胞内寄生性であり、増殖緩慢であるがゆえに長期の寄生が可能になると考えられる。急速に増殖すれば菌は宿主を殺し、結果として住処を失う。休眠はそのさいたる例で、代謝を著しく抑制することで、自身と感染宿主双方の生存を可能にする。

化学療法と休眠結核菌

抗微生物化学療法薬は病原微生物の代謝を阻害する。そのため代謝がきわめて低下した休眠菌に対しては効果が低い。世界保健機関 (WHO) は、標準抗結核化学療法として直接監視下短期化学療法 (DOTS) により、薬剤を6カ月間投与することを推奨している。DOTS戦略は一定の成果をあげているが、制圧に程遠いのが現状である。その原因は、ヒト免疫不全ウイルスとの重感染、薬剤耐性菌の出現、そして現在人類の32%に既感染している潜伏感染菌の存在である。WHOは、今後20年間に、2億人が結核を発病、7000万人が死亡すると予測し対策を喚起している。このように潜伏休眠菌対策はきわめて危急度が高い課題であるが、菌の休眠機構は不明で、効果的な化学療法は開発されていない。

結核菌の増殖を停止し得る分子

すべての細胞は、刺激に対して的確に反応し生存を維持している。そのため、例えば、ある転写因子を活性化して特定の遺伝子群を発現させる等、特異的な応答によ

り恒常性を維持している。私達は、結核菌の休眠機構を解明するため、“特異的”な遺伝子発現調節に関与するものではなく、あえて“非特異的”な核酸結合能を有する分子の存在に注目した。非特異的にすべての遺伝子に結合し転写を抑制する分子であれば、生理的環境下において凍結するように細胞全体の代謝を停止せしめ、しかも遺伝子であるDNAを損傷から守り得るのではないかとの考えによる。仮説に基づき私達は、非特異的核酸結合性蛋白質 mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) を同定した。そしてMDP1に関して以下の事実を明らかにしてきた。

MDP1の性状と菌の遅発育性および休眠

MDP1は、遅発育型抗酸菌の対数増殖期において7~10%を占め、定常期から衰退期にかけて細菌が増殖を停止した状態においては、さらにその含有量が増大する。速育型抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* では、対数増殖期には少量の発現しか見られないが、定常期から発現が顕著になる。つまり、抗酸菌のMDP1の含有量は、増殖速度と逆相関する。

MDP1のアミノ末端部位は大腸菌のヒストン様蛋白質HUと、カルボキシル末端部はヒトのヒストンH1とそれぞれ部分的同一性を有する。このことからMDP1は、一種のヒストン様蛋白質と考えられる。同様の構造を持つ分子は他菌種には見られないが、検討したすべての抗酸菌にはMDP1の発現が認められることから、抗酸菌特異的分子である。

局在：免疫電顕法により、細胞壁、核酸領域、リボソーム領域に反応が見られ、生化学的分析法により少なくとも50Sリボソームサブユニットに局在している。

試験管内で、DNA合成、RNA合成、蛋白質合成をいづれも強く阻害する。複製と転写阻害活性は核酸結合性に依存し、翻訳阻害は核酸結合性に依存しない。

MDP1を発現させることで、*M. smegmatis* や大腸菌は遅発育型菌に形質転換され、遅発育型菌 (BCG) に大量に発現させると菌は増殖を停止する。この活性に、2番目のアミノ酸アスパラギン酸は重要で、その変異により増殖抑制性は減衰する。

これらの知見から、MDP1が抗酸菌の細胞増殖を負に調節し、遅発育性や休眠状態の導入および維持に関与することが推測される。

抗酸菌表面のMDP1

MDP1はシグナルペプチドや膜貫通領域を有しない

が、細胞壁にも存在する。私達は、菌体表面のMDP1が菌の細胞侵入を促す接着分子として作用する可能性を検討した。その理由は、核酸結合性蛋白質であるMDP1が、構造類似性から宿主細胞表面の糖とも結合するのではないかと考えたからだ。細胞は細胞外マトリックスに表面を覆われている。グリコサミノグリカン(GAG)はムコ多糖ともよばれ、細胞外マトリックスの主成分である。それは、二糖の繰り返し構造からなり、構成糖の種類により、ヒアルロン酸(HA)、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸などがある。結核菌は、GAGを介して、特に非貪食性の上皮細胞に接着すると報告されている。結核菌系に最も多く存在するのは、非貪食性の肺胞上皮細胞である。肺胞上皮細胞は、結核菌に対する増殖抑制能および殺菌能に乏しく、これに菌が侵入することで、感染の成立が容易となる。また、肺胞上皮細胞への侵入は肺から他臓器への菌の伝播を促し、病気の重篤化を促進する。肺胞上皮細胞は、潜伏感染休眠菌の主要な潜伏細胞でもある。

MDP1は宿主細胞表面のGAGに結合する

われわれはまず、MDP1のヘパリン結合性をカラムにて解析した。MDP1は、リン酸緩衝液中でヘパリンを吸着したカラムに結合し、NaCl濃度1Mで溶出された。これは、MDP1がヘパリンに結合することを示唆した。次にMDP1と各種GAGの結合を、ピアコアバイオセンサーを用いて解析した。その結果、MDP1のヘパリン結合性が確認され、またさらに、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸AおよびC、HAに結合することが分かった。一方、結核菌の上皮細胞への侵入を阻害しない、アラビノース、トレハロースに対しては結合性を示さなかった。各種GAGとの結合定数は、 $10^{-8} \sim 10^{-12} \text{M}$ で、強い結合性を有することが判明した。

MDP1は、A549ヒト肺胞上皮細胞株に接着する

MDP1を蛍光色素で標識し、それを用いてMDP1が肺胞上皮細胞に接着するかを狭焦点レーザー顕微鏡とFACScanを用いて観察した。A549ヒトII型肺胞上皮細胞株の培養液に、 $0.5 \mu\text{M}$ となるようにMDP1を加え反応させた。添加後、30分後には、90%以上の細胞がMDP1陽性となり、60分後にはほとんどの細胞に結合し、反応は平衡に達した。この結果から、MDP1が、速やかに肺胞上皮細胞に結合することが判明した。

実際に、MDP1が上皮細胞表面のGAGを介して細胞に結合しているかを検討した。MDP1が細胞に結合する条件下において、ヘパリンやHAを加えると、濃度依存的に結合を阻害した。MDP1がGAGを介して細胞に結合することが示唆された。

MDP1が結合する細胞表面のGAGを特定するため、細胞を特異的GAG分解酵素で処理した後に、MDP1を

反応させ、MDP1-細胞間結合が減衰するか否かを検討した。HA特異的分解処理が、MDP1の結合をほぼ完全に阻害した。MDP1は細胞表面のHAを介して肺胞上皮細胞に接着することが明らかとなった。

MDP1はDNA結合領域でGAGと結合する

酵素抗体法を用いて、MDP1とGAGとの結合を検討した。その結果は、ピアコアバイオセンサーを用いた解析と一致し、MDP1はプレートに固相化したHA、コンドロイチン硫酸に結合した。そしてその結合は、外部からDNAを加えることでほぼ完全に阻害された。以上のことから、MDP1はDNA結合領域でGAGと結合することが示された。

上皮細胞への接着において、実際にMDP1がDNA結合サイトを介して結合するかを検討した。蛍光色素でラベルしたMDP1をA549細胞に加えると、2時間後には、95%以上の細胞がMDP1陽性となった。この系にプラスミドDNAを加えるとMDP1-A549細胞間結合が顕著に阻害された。このことから、MDP1はDNA結合領域で細胞表面のHAと結合することが示された。

MDP1-HA間結合は、抗酸菌の細胞への接着を促す

GFPを発現する組み換えBCG(GFP-BCG)を作成し、菌の細胞接着および侵入を共焦点レーザー顕微鏡にて可視化、また感染細胞の比率をFACScanを用いて算定する試験管内系を確立した。これを用いて、MDP1が実際に、菌の接着/侵入に関わるかを検討した。同定したMDP1-A549細胞間結合の阻害物質であるDNAや抗MDP1抗体、またMDP1のA549細胞上の標的であるHAの作用を検討した。その結果、DNA、抗MDP1抗体、HAを加えることで、いずれもBCG-A549細胞間の結合を阻害することが分かった。HAの阻害活性が、DNAや抗MDP1抗体よりも強いことから、BCGは、HAに対するMDP1以外の接着物質を有すると考えられる。また、*M. tuberculosis* H37Rv株について、同様の試験管内感染実験を行った結果、GFP-BCGを用いた場合と同様の結果を得た。上記の結果から、MDP1-HA間結合は、抗酸菌の細胞への接着を促すことが明らかとなった。

菌-HA間結合と感染防御効果

肺において、菌-HA間結合阻害の抗酸菌感染に及ぼす影響を、動物モデルを用いて検討した。BCGをマウス気道内に注入し感染を成立させた。その際、HAの有無で肺への定着菌数に変化があるか検討した。感染2週後の感染菌数を算出した結果、陰性対照群では $40,875 \pm 16,585$ の集落形成単位の菌が検出されたのに対し、HA投与群では、 $5,960 \pm 4,530$ であった。HA-抗酸菌間結合阻害が、感染予防に有効であることが示された。

結語および今後

結核菌は、人類の3分の1に一部休眠状態で既感染し

ている。既感染健康人の10%が再燃を引き起こし、今後20年間で7000万人が死亡すると推測されている。休眠菌に対する化学療法は限られており、休眠菌対策は、きわめて危急度が高い。しかし、休眠機構は不明である。結核発病予備群に対する対策を構築するため、メカニズムを知る必要がある。

われわれは、生理的環境において、凍結するように細胞全体の代謝を停止できるのは、すべての遺伝子に結合しうる分子ではないかとの発想から、結核菌の非特異的核酸結合性蛋白質 (MDP1) を同定し解析してきた。この分子は、抗酸菌特異的ヒストン様蛋白質で、菌体内ではリボソームや核酸に結合し、菌の増殖を停止させる活性を有していた。またわれわれは、MDP1は菌体表面にも存在し、菌の細胞接着/侵入に関わることを明らかにした。休眠結核菌はマクロファージのみならず、非貪食性の肺胞上皮細胞や繊維芽細胞にも潜伏すると報告されてお

り、MDP1が初期感染のみならず、休眠菌の細胞接着/侵入に関わっていると推測される。このことは、HA-菌体間の結合を阻害する新たな治療法の創成が可能であることを示唆する。

MDP1は結核菌を、殺傷能力に劣る上皮細胞への侵入にうながす。それと同時に、菌体内では代謝を阻害し菌の増殖を抑制して菌/宿主両方の生存を確保するように思われる。そのようにして成立した潜伏感染巣が二次結核における主要な菌のリザーバーとなる可能性がある。今後さらにMDP1の活性を中心に休眠機構を探り、潜伏感染戦略の構築に繋げたい。

文 献

Aoki K, Matsumoto S, Kobayashi K, et al.: Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in Mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. J Biol Chem. in press, 2004.

3. 結核の病態と感染防御における各種サイトカインの意義

琉球大学大学院医学研究科感染病態制御学講座分子病態感染症学分野 川上 和義

結核菌に対する防御免疫の主体が細胞性免疫であることは周知の事実である。また、MosmannらによるTh1-Th2パラダイムの発見以来、細胞性免疫の分子基盤がTh1サイトカインであることも広くコンセンサスの得られているところである。しかしながら十数年前には、マウスと異なりヒトの結核防御免疫におけるIFN- γ の役割が混沌としていた時期があった。一連の研究では、ヒト末梢血単球、あるいは*in vitro*で分化させたマクロファージを用いて結核菌に対する殺菌活性に対するIFN- γ の影響が検討され、影響ないか、むしろこれを低下させるとの報告が相次いだ^{1)~3)}。しかし近年になって、IFN- γ 受容体遺伝子に変異を起こし、そのためにIFN- γ がうまく作用しない症例が見出され、このような患者では抗酸菌感染に対する感受性がきわめて亢進していることが明らかにされてきた^{4)~6)}。このことからIFN- γ は、マウスのみならずヒトにおいても結核感染防御の中心的な役割を担うサイトカインであることが認識された。同様な現象は、IL-12受容体異常症の症例でも報告されている⁶⁾。

最近十数年の間に、4つのIFN- γ 誘導性サイトカイン、すなわちIL-12, IL-18, IL-23, そしてIL-27が発見された。もともとNK細胞活性化因子として見出されたIL-12は、Th1細胞の分化誘導において必須なサイトカインであることが知られている⁷⁾。一方、IL-18はそれ自

体Th1細胞の分化を誘導し得ないが、IL-12と協調的に作用することでこの反応を飛躍的に亢進させることが報告された⁸⁾。しかし、条件によってはIL-18がTh2サイトカインの産生にも関与すると報告もみられるようになり、その作用は当初考えられていたよりも複雑であることが予想されている。最近になって発見されたIL-23とIL-27は、IL-12と同様なヘテロダイマー構造をしている。IL-23はIL-12p40を共有し、IL-12p35とホモロジーを有するp19とヘテロダイマーを構成する⁹⁾。一方IL-27は、各々IL-12p40, p35とホモロジーを有するEBI3, p28によって構成されている。IL-23, IL-27は、各々メモリーT細胞およびナイーブT細胞に作用しIFN- γ 産生を誘導する¹⁰⁾¹¹⁾。その生物活性にはまだ不明な点も多く、結核防御免疫における意義については今後の解析を待ちたい。また、骨や腎臓の分野で研究されてきたオステオポンチン(OPN)がIL-12の産生誘導能を有すると報告がなされ注目されている。OPN遺伝子欠損(KO)マウスを用いた検討ではBCGやリステリア感染の悪化が観察されている。

われわれは、遺伝子欠損マウスを用いて結核防御免疫における各種Th1関連サイトカインの役割を解析している。IFN- γ KO (GKO) マウス、IFN- γ 誘導サイトカインの中でIL-12p40, IL-18遺伝子を単独(IL-12p40KO, IL-18KO)または同時に欠損(double KO:DKO)したマ

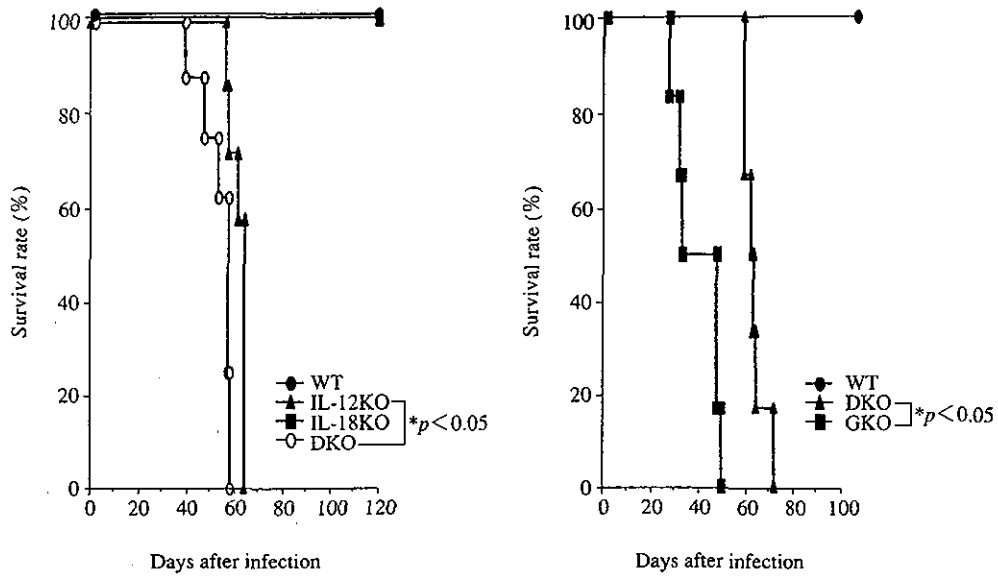


Fig. 1 Effect of Th1-related cytokine deficiency on *M. tuberculosis* infection

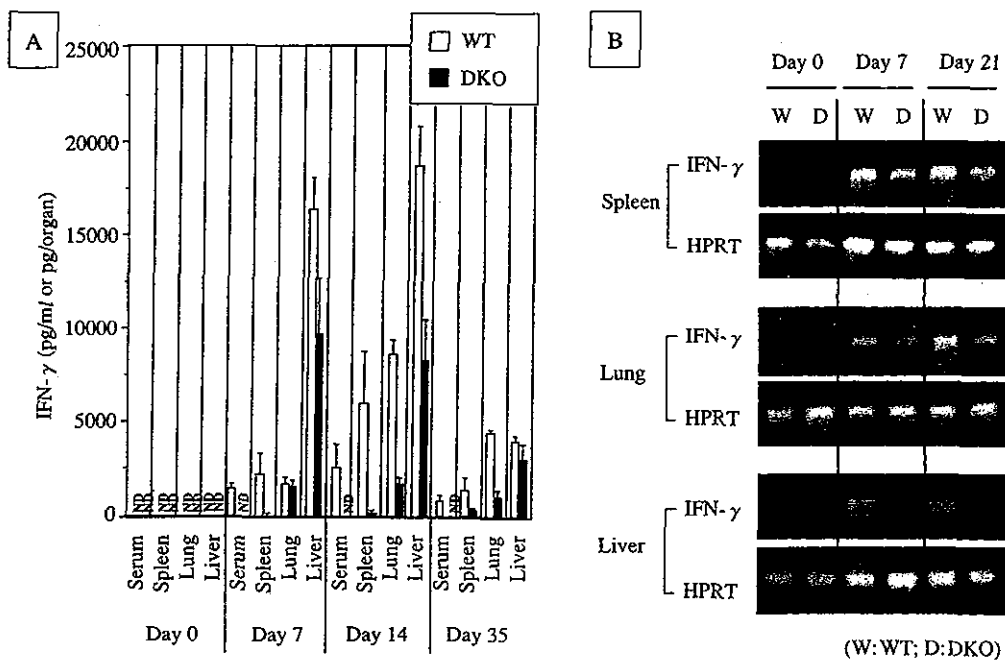


Fig. 2 IL-12, IL-18 and IL-23-independent IFN- γ synthesis after infection with *M. tuberculosis*

ウスを用いて結核感染に対する感受性を比較したところ、IL-18KO \ll IL-12p40KO $<$ DKO $<$ GKOの順に野生型(WT)マウスに比べ感受性の亢進が観察された(Fig. 1)¹²⁾¹³⁾。このことから、IFN- γ 誘導サイトカインの中ではIL-12が最も重要であり、IL-18の役割はIL-12に比べると限定して考えざるを得ない。また、DKOマウスがGKOマウスよりも結核感染に対してより抵抗性であったことから、IL-12、IL-18、IL-23に依存しない感染防御機構の存在が推察された。さらに、結核感染後の肺、肝、脾臓、血清中のIFN- γ 産生をELISAにて測定したとこ

ろ、肝臓、肺ではDKOマウスでも明らかな産生が認められた(Fig. 2A)。また、結核感染後の各臓器からRNAを抽出し、RT-PCR法にてIFN- γ mRNAの発現を調べたところ、肺、肝、脾臓にて明らかな発現が観察された(Fig. 2B)¹³⁾。これらの結果は、結核感染にともないIL-12、IL-18、IL-23に依存しないIFN- γ の産生および感染防御機構が存在することを示している。このことに一致して、DKOマウスでみられる結核感染後の各臓器でのiNOS mRNAの発現および感染抵抗性はIFN- γ に対する中和抗体の投与によって有意に抑制された。IFN- γ 産生細胞

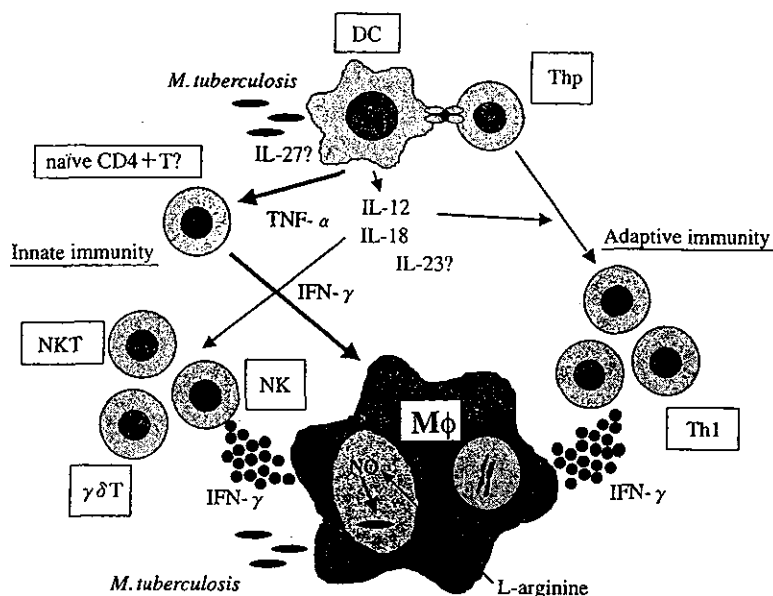


Fig. 3 Role of Th1-related cytokines in host defense to *M. tuberculosis*

については未だ明らかではないが、DKOマウスではIL-12p40KOマウスと同様にPPD特異的なT1細胞が全く検出できなかったことから、獲得免疫細胞よりもむしろ自然免疫細胞が関与している可能性を考えている¹³⁾。われわれはCD4陽性細胞が部分的に関与することを示すデータを得ており、自然免疫の時相においてこの細胞がIFN- γ 産生に関わっているものと推察している。さらには、このDKOマウスでのIFN- γ 産生および感染抵抗性は抗TNF- α 抗体投与によって有意に抑制されたことから、TNF- α がIL-12, IL-18, IL-23に依存しないIFN- γ 産生、そして結核感染防御に関与していることが示唆された¹³⁾。

これまでの報告と今回のわれわれの実験結果をもとに、現在考えられる結核に対するTh1依存性感染防御免疫機構についてシエマにまとめて示す(Fig. 3)。結核感染後に樹状細胞からIL-12, IL-18のようなIFN- γ 誘導サイトカインが産生されT1型の獲得免疫が誘導されるが、感染初期にはこれらのサイトカインによってNK, NKT, $\gamma\delta$ T細胞のような自然免疫リンパ球からのIFN- γ 産生がマクロファージによるNOを介した殺菌活性を増強すると考えられる。IL-23の役割については現時点では不明である。これらの経路に加えて、おそらく樹状細胞から産生されるTNF- α がnaïve CD4陽性細胞に作用してIFN- γ 産生を誘導する経路の存在も予想される。IL-27はnaïve T細胞に作用してIFN- γ 産生を誘導するとの報告があり、この経路に関与している可能性もある。このように幾重にも準備されたメカニズムによって、宿主はより効率的に結核感染に対抗しているものと考えられる。今後はこれらの機序をさらに詳細に明らか

にすることで、より有効性の高いワクチンやBRMの開発へつなげていくことが期待される。

文 献

- 1) Rook GAW, Sittler J, Fraher L, et al.: Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Immunology*. 1986; 57: 159-163.
- 2) Rook GAW, Taverne J, Leveton C, et al.: The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumor necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology*. 1987; 62: 229-234.
- 3) Denis M: Killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. *Clin Exp Immunol*. 1991; 84: 200-206.
- 4) Newport MJ, Huxley CM, Huston S, et al.: A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*. 1996; 335: 1941-1949.
- 5) Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, et al.: Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N Engl J Med*. 1996; 335: 1956-1961.
- 6) Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL: Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today*. 1998; 19: 491-494.
- 7) Trinchieri G: Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 133-146.
- 8) Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, et al.: Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*.

- 2001; 19: 423-474.
- 9) Brombacher F, Kastelein RA, Alber G: Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol.* 2003; 24: 207-212.
- 10) Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al.: Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000; 13: 715-725.
- 11) Pflanz S, Timans JC, Cheung J, et al.: IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4 (+) T cells. *Immunity.* 2002; 16: 779-790.
- 12) Kinjo Y, Kawakami K, Uezu K, et al.: Contribution of IL-18 to Th1 response and host defense against infection by *Mycobacterium tuberculosis*: a comparative study with IL-12p40. *J Immunol.* 2002; 169: 323-329.
- 13) Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, et al.: Interferon-gamma production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. *Microbes Infect.* 2004; 6: 339-349.

4. 結核菌による Th1 サイトカイン誘導の意義と責任分子

京都大学大学院医学研究科微生物感染症学 河村伊久雄

はじめに

細胞内寄生菌である結核菌は、その細胞壁主成分である mannose-capped lipoarabinomannan や、菌体表層に付着した補体成分を利用してマクロファージを活性化することなくその細胞内に侵入することができる¹⁾。細胞内に侵入した結核菌は、ファゴソームとリソソームの融合を阻害することでマクロファージの細胞内殺菌をエスケープし、細胞内で増殖する。また最近、結核菌が樹状細胞 (DC) 上の DC-SIGN を介してシグナルを細胞内に伝達し、積極的に感染初期の防御反応を抑制するメカニズムがあることが明らかにされており、これらはいずれも菌の persistent infection に関与する重要なステップであると考えられる²⁾。

一方、結核菌細胞壁には強いアジュバント活性があり、結核菌の感染では Th1 細胞を中心とした強い細胞性免疫が誘導される。この感染防御を担う T 細胞の分化は、DC あるいはマクロファージによる結核菌の識別およびそれらの抗原提示能に依存することから、防御免疫の誘導を阻害し、宿主体内で生存しようとする結核菌に対して、DC やマクロファージがどのような機序で活性化するのかを分子レベルで明らかにすることは、結核に対する感染防御機構を理解するうえで重要な意味がある。

そこで本稿では、これまでに得られた知見を基に、防御免疫の誘導における感染初期の Th1 サイトカイン産生の重要性と、その誘導にかかわる結核菌因子についてまとめる。

感染防御誘導における感染初期の IFN- γ 産生応答の重要性

M. bovis BCG をマウスに感染させると、抗原特異的 IFN- γ 産生性 CD4 陽性 T 細胞が誘導され、この T 細胞

が中心となる強い防御免疫が発現する。一方、BCG 死菌でマウスを免疫した場合には、生菌免疫でみられる抗原特異的 IFN- γ 産生性 T 細胞の誘導は認められず、防御免疫も発現しない³⁾。しかし、BCG 死菌免疫マウスの脾細胞は、生菌免疫マウス脾細胞と同程度に抗原刺激に対して強い IL-2 産生応答を示し、遅延型過敏反応を惹起することができる。これらの結果は、BCG 死菌免疫でも抗原特異的 Th1 細胞が誘導されるが、感染抵抗性を担う T 細胞の分化誘導には生菌による刺激が不可欠であり、生菌刺激に対してのみ誘導される感染初期の宿主免疫応答が存在することを示すものである。

この T 細胞の分化誘導のメカニズムをサイトカイン産生のレベルで解析したところ、Th1 細胞の分化に関与する IFN- γ の産生が生菌刺激では認められたが、死菌刺激では認められないことがわかった。この IFN- γ を抗体で中和すると感染抵抗性 T 細胞の誘導が阻害されることから、感染初期に産生される IFN- γ が T 細胞の分化を方向付け、防御免疫の誘導に重要な役割を果たすことが示された。

感染初期の IFN- γ 産生誘導機序

チオグリコレート培地で誘導した腹腔渗出細胞 (PEC) を BCG 生菌で刺激すると、IFN- γ 産生が誘導される。この実験系に各種サイトカインに対する抗体を加えて IFN- γ 産生応答を調べた。その結果、抗 IL-12 抗体および抗 IL-18 抗体の添加により IFN- γ 産生が抑制されることがわかった。また、腹腔渗出マクロファージを BCG 生菌で刺激した場合、IL-12 p40 および IL-18 の産生が認められた。しかし、IFN- γ 産生の誘導は認められなかった。これらの結果およびこれまでの実験成績を踏まえて BCG 生菌による IFN- γ 産生誘導機序をまとめると、BCG 生菌はマクロファージを刺激して IL-12 および

IL-18産生を誘導し、それらサイトカインの刺激を受けて主にNK細胞がIFN- γ を産生することがわかった。

近年、マクロファージやDC上のToll-like receptor (TLR)が異物識別や、その後の細胞の活性化に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。結核菌では、その主要な細胞壁成分であるリポアラビノマンナンや、フォスファチジルイノシトールマンノシド、19 kDaリポタンパク、あるいは易熱性結核菌体抗原がTLR2やTLR4分子により認識されることが明らかにされている¹⁷⁾。そこで、BCG生菌が示すTh1型サイトカイン産生誘導にこれらTLR分子が関与するか否かを調べる目的で、TLRノックアウトマウスPECのBCG生菌刺激に対するサイトカイン産生応答を解析した。その結果、正常マウスPECに比較して、TLR2ノックアウトマウスPECではIFN- γ およびIL-12 p40産生がほとんど認められず、BCG生菌で誘導されるIFN- γ 産生誘導にTLR2が深く関与することが示された。さらに、このTLR2の関与を確認するため、TLR2を発現するHEK 293細胞をBCGで刺激し、NF- κ Bの活性化を調べた。HEK 293細胞をBCG生菌で刺激してもNF- κ Bの活性化は誘導されなかったが、TLR2を発現したHEK 293細胞ではBCG生菌刺激後、強いNF- κ Bの活性化が誘導された。このことから、BCG生菌刺激後のIL-12およびIL-18産生にはマクロファージ上のTLR2分子が重要な役割を果たし、TLR2により認識されるBCG由来因子が、防御免疫を担うT細胞の分化誘導に不可欠であると考えられた。

BCGおよび結核菌由来IL-12産生誘導因子

これまでの解析から、BCG生菌にはIFN- γ 産生誘導に関与するTLR2リガンドが存在し、このBCG因子が防御免疫を担うT細胞の分化誘導に不可欠であると考えられた。また、BCG死菌のIFN- γ 産生誘導能が生菌に比較して著しく弱いことから、この因子は菌体構成成分ではなく、菌の代謝に伴い産生される成分である可能性が考えられた。そこでわれわれは、BCG由来の分泌成分に注目し、そのサイトカイン産生誘導活性を解析した。BCGでマクロファージを刺激した場合、培養24時間後に強いサイトカイン産生が認められることから、対数増殖期のBCGをsorton培地で24時間培養し、得られた上清を限外ろ過で濃縮してculture filtrateを調製した。このサイトカイン産生誘導活性を調べたところ、IL-12 p40産生誘導活性が認められた。一方、同様の方法で調製した死菌由来のculture filtrateにはその活性は認められなかった。さらに、このサイトカイン産生誘導活性はBCGだけでなく結核菌由来のculture filtrateにも認められ、結核菌culture filtrateでTLR2を発現したHEK 293

細胞を刺激したところ、NF- κ Bの活性化が誘導された。これらの結果から、BCGあるいは結核菌の早期培養上清中に含まれる分泌因子が生菌刺激で誘導されるIFN- γ 産生に関与するものと考えられた。また、この培養上清中のIL-12 p40産生誘導活性は、proteinase K処理あるいは加熱処理により著しく低下したことから、BCGや結核菌が産生するタンパク性因子がこの活性を担うことが示された。ハイドロキシアパタイトカラムを用いてこの因子の精製を試みたところ、いくつかの陽性画分が得られた。そのうち、最も強い活性は、ハイドロキシアパタイトカラムに吸着し、分子量100 kDa以上の比較的大きな分子を含む画分に存在することが示された。さらに、この画分のIL-12 p40産生誘導活性はproteinase K処理により失活したことから、この画分に含まれる分泌性タンパク成分がBCGや結核菌感染後のIFN- γ 産生誘導に関与する重要な因子であると考えられた。

まとめ

BCGや結核菌に対する防御免疫の誘導には感染初期に産生されるIFN- γ が重要な役割を果たしている。このサイトカイン産生にはマクロファージ上のTLR2分子が関与し、菌側のリガンドを認識してサイトカイン産生応答を惹起する。われわれは菌側のどのような因子がこのサイトカイン産生誘導に関与するのかについて解析を行い、BCGおよび結核菌培養早期の上清中に存在する分泌性タンパク因子がその役割を果たすことを示した。現在この因子の精製を試みているが、IFN- γ 産生の誘導にはこのIL-12 p40産生誘導因子以外に別な因子が関与することが示唆されており、今後さらに解析を進め、これらの因子を同定して感染初期のサイトカイン産生誘導のメカニズムの全体像を明らかにしていく予定である。

文 献

- 1) Aderem A, Underhill DM: Mechanism of phagocytosis in macrophages. *Ann Rev Immunol.* 1999; 17: 593-623.
- 2) Geijtenbeek TBH, Van Vliet SJ, Koppel EA, et al.: Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med.* 2003; 197: 7-17.
- 3) Kawamura I, Tsukada H, Yoshikawa H, et al.: IFN- γ -producing ability as a possible marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. *J Immunol.* 1992; 148: 2887-2893.
- 4) Means TK, Lien E, Yoshimura A, et al.: The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol.* 1999; 163: 6748-6755.
- 5) Jones BW, Means TK, Heldwein KA, et al.: Different Toll-

like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol.* 2001; 69: 1036-1044.

- 6) Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al.: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through

Toll-like receptors. *Science.* 1999; 285: 732-736.

- 7) Means TK, Wang S, Lien E, et al.: Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1999; 163: 3920-3927.

5. 新たな抗結核ワクチンの作製と評価

独立行政法人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 岡田 全司

要旨: BCGよりも強力な結核予防ワクチンである新しいDNAワクチンやリコンビナントBCGワクチンを開発した。(1) IL-12 DNA+HSP65 DNA (HVJ-liposomeベクター)のワクチンはBCGよりも100倍強力な結核予防ワクチンであることを世界に先駆けて明らかにした。このワクチンはキラーTの分化を増強した。結核吸入感染系を用い、モルモットの系でも結核菌数と病理組織より有効な結核感染予防効果を示した。(2) IL-6関連遺伝子ワクチンは強力な治療ワクチンであることを初めて示した。(3) ヒト生体内抗結核免疫解析モデルSCID-PBL/huを初めて開発した。(4) ヒトの結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用い、①HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン、②リコンビナントr72f BCGワクチン、③72f融合タンパクワクチンの強力な結核予防ワクチン効果を得た。さらに生存率改善、延命効果を認められた。(5) WHO STOP TB VACCINE MEETING: 2004年にWHO会議のメンバーに選ばれ、HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンはきわめて高い評価を受けた。

はじめに

いまだに世界の人口の3分の1が結核菌の感染を受け、その中から毎年800万人の結核患者が発生し、200万人が毎年結核で死亡している、最大の感染症の1つである。1998年、米国CDCおよびACETは新世代の結核ワクチン開発の必要性を発表した。しかしながら、BCGに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。われわれはBCGよりもはるかに強力な新しいDNAワクチン【Hsp65 DNA+IL-12 DNA】やリコンビナントBCGワクチン【リコンビナント72f BCG】、サブユニットワクチンの開発に成功した(Table 1)^{1)~3)}。これらの研究成果を中心に、新しい結核ワクチン作製と、評価について述べる。

方法と結果

(1) 結核ワクチンの種類

①DNAワクチン、②サブユニットワクチン、③リコンビナントBCGワクチン(弱毒化結核菌を含む)に大別

される^{1)~3)}。マウスではBCGワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンはきわめて少ない(Table 1)。

(2) DNAワクチン

われわれはIL-12 DNA+HSP65 DNAのワクチンが相乗効果を示し、HVJ-リポソームまたは、gene gunを用いた遺伝子投与でBCGよりもきわめて強力な(約100倍)結核予防ワクチンであることをBALB/cマウスの系で明らかにした(Fig. A)。ワクチン効果は、キラーT細胞やTh1細胞の分化誘導やIFN- γ 、IL-2、IL-6の産生を増強することによって発揮された^{1)~4)}。結核死菌を貪食させたJ774.1 M ϕ を標的細胞とし、IFN- γ の産生でキラー活性を測定した。その結果、ワクチン効果とキラー活性は見事な相関が認められた(Fig. B)。さらに、結核吸入感染系を用い、モルモットの系でも肺、肝、脾の結核菌数と病理組織より有効な結核感染予防効果を示した⁴⁾。

さらに、今までのAAVベクターより1000倍発現効率が高いAAV(2/5)/HSP65 DNAワクチンを世界に先駆けて作製した。

(3) 治療ワクチン

アデノウイルスベクターに導入したIL-6関連遺伝子(IL-6 gene+IL-6レセプター gene+gp130 gene)はBCGよりも強力な治療ワクチン効果を示した(Table 1)。IL-6関連遺伝子ワクチンは、結核菌に対するキラーT細胞の分化およびIL-2およびIFN- γ の産生誘導を増強した(Table 1)¹⁾²⁾。

(4) サブユニットワクチン

72f fusion蛋白(Mrb 39とMtb 32のfusion蛋白)ワクチン+BCG Tokyoワクチン同時接種がカニクイザルでBCGよりも強力な予防ワクチン効果を示すことを明らかにした(Table 1, Table 2)。ヒトの多剤耐性結核患者*in vitro*系でも72f等を用いてT細胞免疫応答(IFN- γ 、IL-2、IL-6産生を増強)が増強した¹⁾²⁾。

(5) リコンビナントBCGワクチン

PNN₂シャトルベクターを用い、BA51 (Ag85A + Ag85B + MPB51) リコンビナント(r)BCGや72f融合タンパクのDNAを導入した72f rBCGの作製に成功し、結核菌

Table 1 The development of novel vaccines against tuberculosis

(1) DNA vaccine HVJ liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA	More effective than BCG (mouse, guinea pig, cynomolgus monkey)
(2) Recombinant BCG vaccine ① recombinant 72f BCG ② recombinant (Ag85A + 85B + MPB51) BCG	More effective than BCG (mouse, guinea pig, cynomolgus monkey) More effective than BCG (mouse)
(3) Subunit vaccine Mtb72f fusion protein	More effective than BCG (monkey) Augmentation of T cell immunity of the patients with MDR-TB Phase I Study
(4) Therapeutic vaccine IL-6 related DNA vaccine (IL-6 DNA + IL-6 receptor DNA + gp130 DNA)	(mouse)
(5) Priming-Booster Method BCG Priming–Novel vaccines (Booster)	(mouse, monkey)
(6) Attenuated (gene knock out) Listeria–TB vaccine (per os)	
(7) Novel vectors AAV vector (1000 fold effective) Adenovirus vector	

→ Selected as WHO STOP TB Partnership and WHO STOP TB Vaccines Working Group

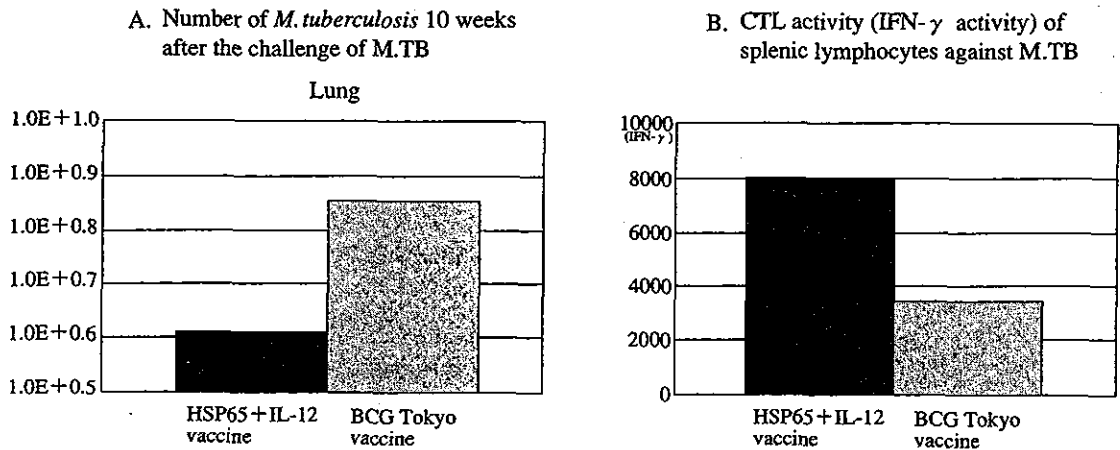


Fig. One hundred fold stronger anti-tuberculosis effect of HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine than that of BCG Tokyo (mouse) and enhancement of cytotoxic T lymphocyte (IFN- γ producing) induction.

に特異的な IFN- γ 産生 T 細胞数の増強を Elispot Assay で明らかにした¹²⁾。さらに、これらの BCG はマウスおよびモルモットの結核感染の系で BCG よりも強力な予防ワクチンであることを示した (Table 1)。また、融合タンパク 31f, 88f, 59f, 71f, 72f-85B の DNA を導入した rBCG を作製した¹²⁾。

(6) attenuated 結核ワクチン

われわれは (浜松医大 小出教授と) akt 遺伝子を欠失させた無毒化リステリア菌に Ag85A-, 85B-, MPB51-DNA を導入し新しい結核ワクチンを開発した (Table 1)²⁾。

(7) 新しいヒト生体内結核免疫解析モデル

SCID-PBL/hu (ヒト結核菌ワクチン解析モデル) を用いた評価：世界に先駆け、結核蛋白に特異的なヒトキラー T 誘導を示す画期的な、ヒト結核ワクチン効果評価モデルを開発した²⁾。ESAT-6 ペプチドを投与し、これに特異的で HLA-A 2 拘束性を示すヒトキラー T を生体内で誘導することに初めて成功した (Table 1)。

(8) 新しい結核ワクチンの臨床応用

さらに、ヒトの結核感染モデルに最も近い折り紙つきのカニクイザル (Nature Med 1996) の結核感染モデルを用い、HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン、r72f BCG ワクチン、r72 融合タンパク + BCG 東京ワクチン

Table 2 The development of novel vaccines using cynomolgus monkey anti-tuberculosis effect of HSP65DNA+IL-12 DNA vaccine, recombinant 72f BCG vaccine and 72f fusion protein + BCG

Three distinct kind of TB vaccines	Prophylactic effect against M. TB	Survival	Improvement of BSR	Increase in body weight	Improvement of chest X-ray finding	Immune responses Proliferative responses of lymphocyte
① HVJ-liposome /HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine	++	++	++	+	+	+++
② Recombinant 72f BCG vaccine	++	++	+	+	+	+
③ 72f fusion protein +BCG	++	++	+	±	++	++
④ Control (saline)	--	-	-	-	-	

ンの有効性を得たり²⁾。カニクイザルに3回免疫し、最終免疫4週後にヒト結核菌 Erdman株を経気道投与した。体重、体温、血沈、胸部X線、ツ反および生存率を解析し1年以上経過観察した。これらの群ではワクチン抗原に対する末梢血リンパ球増殖反応およびサイトカイン産生の増強が認められた (Table 2)。また、胸部X線所見、血沈の改善効果、体重減少の阻止効果が認められた。さらに延命効果も認められた。すなわち、HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン投与群および r72f BCG ワクチンは著明な延命効果を認めた。Ag85B-ESAT-6 融合タンパク質 (Anderson 博士ら) ワクチニアウイルスに 85A DNA を導入したワクチンや r85B BCG (Horowitz ら) も clinical trial が近い将来考えられている³⁾。しかしながら、最も切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭として HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンがあげられる。最も有力なものとして、① HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン、② r72f BCG ワクチン、③ 72f fusion 蛋白ワクチン (すでに phase I clinical trial) + BCG 東京があげられる。

考 察

これらの新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB VACCINE GROUP MEETING に選出された。われわれの HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンが高く評価された (Table 1)。当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であり、日本の結核患者数の約50%の診療を行っている政策医療呼吸器ネットワークを用い、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンおよび r72f BCG ワクチンの臨床応用を計画している。

サルにおいては HSP65 DNA + IL-12 DNA, r72f BCG および 72f 融合タンパクが明らかにすぐれていることより、これらのワクチンが結核の発症予防や治療に役立つ

日が来るであろう。

謝 辞

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；田中高生、喜多洋子、桑山さち子、村木裕美子、金丸典子、橋元里実、高井寛子、岡田知佳、福永有可里、坂口弥生、古川いづみ、山田恭子、和泉谷美和、井上義一、武本優次、坂谷光則、自治医大；吉田博士、ハーバード大；Mulligan 教授、Lee 博士、長崎大；山田、大原、内藤各博士、阪大；金田教授、東大；斉藤博士、Corixa 研究所；Reed, Skeiky, Gillis 各博士、Leonard Wood 研究所；Gelber, Tan, Cruz 各博士、Texas A&M 大学；McMurray 博士らとの共同研究。厚生労働科学研究費新興・再興感染症研究事業の支援を受けた。

文 献

- 岡田全司：結核感染とサイトカイン。医学のあゆみ。2004 (出版中)。
- 岡田全司：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]。厚生科学研究費補助金実績報告書・研究報告書。2004；1-128。
- Okada M, Tanaka T, Inoue Y, et al.: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 2002；171-175。
- Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, et al.: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. Pro Nat Acad Sci USA. 1981；78：7718-7721。

CUTTING EDGE OF BASIC STUDY ON TUBERCULOSIS

Chairpersons: ¹Masao MITSUYAMA and ²Kazuo KOBAYASHI

Abstract During the past two decades, we have observed outstanding advance in tuberculosis research including immune response, identification of antigens/ligands of *M. tuberculosis* and molecular mechanism of drug resistance. Worldwide genome project enabled the whole genome sequence of *M. tuberculosis* H37Rv and has provided a great impact on the molecular genetics on virulence mechanism. Extensive study by new members is greatly encouraged in our country. Though the number of tuberculosis patients has decreased comparing to some 50 years ago, there are new concerns about the emergence of multi-drug resistant strains and a possible increase due to the increase of immunocompromised population. Now the basic study on the pathophysiology, virulence mechanism and vaccine development are urgently required.

In this symposium, we have invited leading researchers in the field of basic study of tuberculosis/*M. tuberculosis* in order to provide general overview of the cutting edge of basic study. Mycobacterium is rich in lipids or glycolipids that are quite unique in both structure and biological activity, and they contribute a lot to the pathophysiology of tuberculosis. Dr. Ikuya Yano (Japan BCG) reviewed the major classes of glycolipids and presented some applications to clinical and bacteriological diagnosis. *M. tuberculosis* appear to have various genes contributing to the slow growth, escape from macrophage killing and persistence, however, almost nothing has been clarified yet. Dr. Sokichi Matsumoto (Osaka City University) discovered MDP1 as a possible mycobacterial factor responsible for slow growth. He mentioned that MDP1 might be involved in the dormancy during the long course of disease development after primary infection. Dr. Kazuyoshi Kawakami (University of the Ryukyus) presented many interesting data on the importance of various cytokines, especially Th1 cytokines, to resistance against experimental *M. tuberculosis* infection in mice obtained by using cytokine-knock out mice. The relevance of animal data to clinical observation was discussed. Th1-dependent cell-mediated immunity is regarded as the most effective immune response in the protection. Dr. Ikuo Kawamura (Kyoto University) employed animal model in which only viable BCG induces protective Th1 cells while killed BCG does not, and showed that the difference is due to some proteinaceous factor release by viable BCG. He showed preliminary data on the purification of such IFN- γ -inducing factor from the culture filtrate of *M. tuberculosis*. BCG is the most widely employed live vaccine for tuberculosis in the world, however, more effective and safe vaccine is requested urgently because of the serious concern about the efficacy of BCG vaccination. In Japan, Dr. Masaji Okada (Kinki-Chuo

Chest Medical Center) has been engaged actively in the development of new tuberculosis vaccines. He showed basic strategy for construction of new candidate vaccines and also presented some preliminary data on the trial using monkeys.

1. Molecular characterization and immunological properties of mycobacterial high molecular weight components: Yukiko FUJITA and Ikuya YANO (Japan BCG Laboratory)

Mycobacterial envelope contains a great variety of wax-like high molecular weight lipids which contribute to its strong hydrophobicity or acid-fastness and also play crucial role against host phagocytic cells at the early step of infection. Cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) and the related mycoloyl glycolipids are one of the most characteristic components in mycobacteria and are recognized to be a key molecule for pathogenicity and immunity. Recent progress of analytical techniques such as MS or NMR reveal the molecular structure-activity relationship. Lipoarabinomannan (LAM), lipomannan (LM) and core phospholipids (PIMx) are recently demonstrated to be one of the virulence factor, however some of which are shown to be IL-12 producer and apoptosis inducer. Mycobacterial sulfolipids play important role as a virulence factor together cord factor, but the mechanism seems to differ from TDM. *M. avium* complex produce serotype specific glycolipid (GPL) which suppresses the humans T cell response. The core structure is unique and carbohydrate shows high antigenicity to determine serotypes. Mycobacterial cell wall skeleton (CWS) plays the central role for maintaining the rigid structure and shows antitumor or infection prevention activities via the stimulation of innate immunity. Although at the present, their molecular structure-activity relationship is not fully understood, above components may play pivotal roles with the protein antigens for host immune responses.

2. Molecular mechanism of *M. tuberculosis* dormancy: Sokichi MATSUMOTO (Department of Host Defense, School of Medicine, Osaka City University)

Mycobacterium tuberculosis has remarkable ability to persist in the human host and infects both macrophages and nonprofessional phagocytes, such as alveolar epithelial cells. Glycosaminoglycans are considered as the component of mycobacterial adherence to epithelial cells. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) is suggested one of key molecules in latent infection. Here we show that extracellular MDP1 promotes mycobacterial adherence to A549 human lung epithelial cells through hyaluronan. Simultaneous treatment of intratracheal mycobacteria-infected mice with

HA reduced the growth of bacteria *in vivo*. Taken together, anti-MDP1 antibody or hyaluronan has potential as therapeutic and prophylactic interventions in mycobacterial infection.

3. A host defense mechanism against *Mycobacterium tuberculosis* mediated by Th1-related cytokines : Kazuyoshi KAWAKAMI (Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Graduate School and Faculty of Medicine, University of the Ryukyus)

Th1-related cytokines play a central role in the host defense to *Mycobacterium tuberculosis* infection. IL-12 is a key cytokine for development of Th1 cells and IL-18 potentiates this response. Recently, two novel IFN- γ -inducing cytokines, IL-23 and IL-27, have been discovered. In a series of studies, we demonstrated the important roles of IL-12p40 and IL-18 in the host defense to this infection and proposed a possible host protective mechanism mediated by IFN- γ which synthesis is independent of IL-12, IL-18 and IL-23. Thus, host is likely protected from *M. tuberculosis* infection by various Th1-related cytokines in a more complicated manner.

4. Possible involvement of TLR2 ligand derived from *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* to generate protective immunity by inducing endogenous IFN- γ production: Ikuo KAWAMURA (Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine)

IFN- γ plays a pivotal role for development of protective T cells, and both IL-12 and IL-18 which are produced from macrophages are necessary to induce IFN- γ production. To identify the mycobacterial factor contributing to the Th1 cytokine productions, we prepared a culture filtrate from 1d-culture of *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*, and measured the cytokine-inducing activity. These culture filtrates elicited IL-12p40 production from peritoneal macrophages. They could induce NF- κ B activation in HEK293 cells expressing TLR2 and the activity was sensitive to treatment with

proteinase K and heating. These results suggest that an early secreted protein from BCG and *M. tuberculosis* activates macrophages to produce IL-12 via TLR2 dependent pathway. It is likely that this is a critical interaction between mycobacteria and macrophages for the generation of protective immunity.

5. Establishment and evaluation of novel vaccine against tuberculosis: Masaji OKADA (National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, Clinical Research Center)

HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA vaccination was 100 fold more efficient than BCG on the elimination of *Mycobacterium tuberculosis* (M.TB) in the BALB/c mice. Cytotoxic T cells activity against M. TB was augmented. The recombinant (r) 72f BCG vaccine as well as HSP65+IL-12 DNA vaccine showed stronger anti-TB immunity than BCG in the mice, and guinea pigs. By using these new vaccines (HSP65+IL-12 DNA, r72f BCG and 72f fusion protein+BCG) and the cynomolgus monkey models which are very similar to human tuberculosis, the prophylactic effect of vaccines was observed. Thus, these novel vaccines should provide a useful tool for the prevention of human TB infection.

Key words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Basic research

¹Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine, ²Department of Host Defense, Graduate School of Medicine, Osaka City University

Correspondence to: Masao Mitsuyama, Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Yoshidakonoecho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8501 Japan. (E-mail: mituyama@mb.med.kyoto-u.ac.jp)