

(1) 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の確立。結核患者(表2)と健常人末梢血(表3)を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IFN- γ をELISAで測定した。その結果、結核感染に特異度の高い、しかもBCG接種した健常人リンパ球には反応しない、新しい結核感染特異的診断法を開発した。(図2)(岡田、坂谷、鈴木、井上) さらに、ESAT-6抗原とCFP-10抗原を同時に加えた診断法の方がESAT-6単独刺激又はCFP-10単独刺激よりも感度が良く、カットオフ値が0.35で鋭敏な結核感染特異的診断法となることを明らかにした。(表4)

また、ESAT-6のペプチド及びCFP-10のペプチドを用いより簡便で特異度の高い結核感染特異診断法を解析中である。

(2) 新しい結核特異診断法(DPPD)

① 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。一方、従来PPD陰性で結核感染が完全に否定されていた医療従事者が最近結核感染が強く疑われ、1年以内にPPD陽性となった人においてはDPPD陽性であった。(S.Gillis, S.Reed, 岡田、坂谷、螺良)

② さらに、数百名の成人健常者に行ったskin test研究においては、DPPD皮内反応は陰性群と陽性群にきれいに

に分かれた。一方、PPD skin testでは大多数が陽性であった。すなわちDPPD陰性群はBCGを接種した人でも結核非感染者を選別する画期的な方法となることが示された。

D. 考察

ツ反に代わる画期的な新しい診断法(結核感染特異的)DPPD skin testの本邦での普及を目指したい。DPPDは、大腸菌にDPPD DNAを発現させた場合、大腸菌での発現が低い。したがってこの蛋白の大腸菌での大量発現、大量産生法を検討中である。さらに、DPPDのskin testの際により少量の蛋白を小微粒にコートしskin testを行う方法を開発しつつある。

E. 結論

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に成功した。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。結核感染に特異度の高い、しかもBCG接種した健常人リンパ球には反応しない、新しい結核感染特異的診断法を開発した(岡田、坂谷、鈴木、井上)。

ツ反に用いられるPPDは多種の蛋白を含む。Dr.Gillisはこれらのアミノ酸配列を解読し、結核感染患者のみにskin test陽性でBCG接種者には反応しない蛋白のアミノ酸配列とDNAをクローニングした。さらに、我々の研究により、ヒトのin vitroにおけるDPPDに対する末梢血Tリンパ球のIL-2産生能や増殖反応において特異性が示唆された(DPPDはヒトのskin testでPPD以外の蛋白では唯一反応をおこす蛋白であり、他に報告はない)。上記のDPPD大量産生法の開発及びskin testの極めて鋭敏なアッセイ法の開発によりDPPD skin testのヒトでの第I相臨床試験が可能となる。

表1

目的

BCG接種歴のある被験者での結核感染の有無を検査するNC001(QF-2G)の臨床(体外診断薬)の有用性を評価する

- 結核菌暴露のリスク要因が確認されないBCG接種歴のある被験者群におけるQuantiFERON-2Gの特異度の評価。
- 培養法で確認された結核患者群におけるQuantiFERON-2Gの感度の評価。
- ツ反応強陽性小児群におけるQuantiFERON-2Gの陽性率の評価。
- QuantiFERON-2G、QuantiFERON-TB及びツ反応検査の性能比較。

表2

2群被験者

n=44

	女性 n=17		男性 n=27	
	ESAT-6	CFP-10	ESAT-6	CFP-10
平均	6.416	2.329	3.042	2.714
標準偏差	8.093	4.896	4.882	4.483

Age (years)	No. IFN-γ tested	No. IFN-γ positive	% IFN-γ positive	No. Mantoux tested	No. Mantoux positive >5	% Mantoux positive	>10	%
21-30	2			1	1	100.0	1	100.0
31-40	8			8	8	100.0	8	100.0
41-50	7			6	6	100.0	6	100.0
51-60	7			7	7	100.0	7	100.0
61-70	10			10	10	100.0	8	80.0
71-80	7			6	6	100.0	5	83.3
>80	3			3	3	100.0	2	66.7

表3

1群被験者
n=63

	女性 n=59		男性 n=4	
	ESAT-6	CFP-10	ESAT-6	CFP-10
平均	0.0013	0.0003	-0.0337	-0.036
標準偏差	0.061	0.105	0.019	0.015

Age (years)	No. IFN- γ tested	No. IFN- γ positive	% IFN- γ positive	No. Mantoux tested	No. Mantoux positive	% Mantoux positive
18 - 20	48			48	47	97.9
21 - 31	14			14	13	92.9

G1 No. Mantoux+: >5 =

表4

Cutoff

Cut off (IFN- γ IU/mL)	ESAT-6		CFP-10		ESAT-6 and/or CFP-10	
	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Sensitivity (%)
0.05	90.5	79.6	90.5	72.7	84.1	90.9
0.10	95.2	75.0	92.1	63.6	88.9	84.1
0.15	96.8	72.7	95.2	56.8	93.7	81.8
0.20	98.4	68.2	95.2	56.8	95.2	79.6
0.25	98.4	68.2	95.2	52.3	95.2	79.6
0.30	98.4	68.2	96.8	52.3	96.8	79.6
0.35	100.0	68.2	98.4	52.3	98.4	79.6
0.40	100.0	68.2	98.4	50.0	98.4	79.6
0.45	100.0	68.2	98.4	47.7	98.4	77.3
0.50	100.0	65.9	100.0	47.7	100.0	77.3

図1

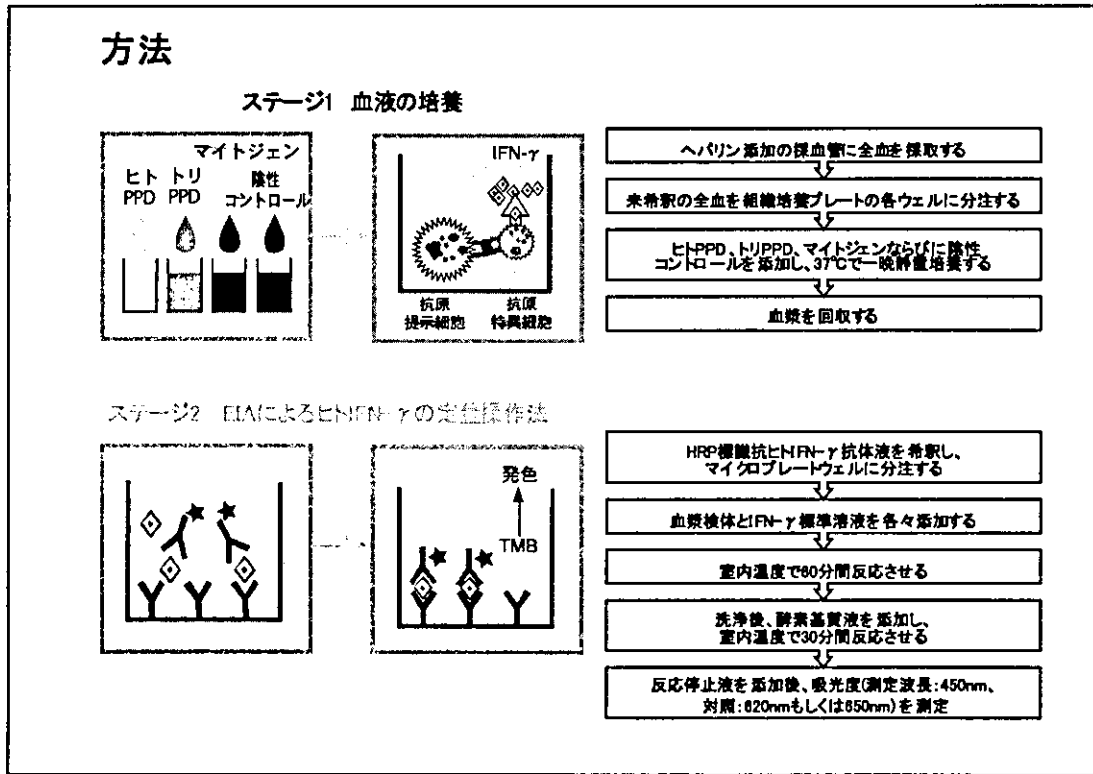
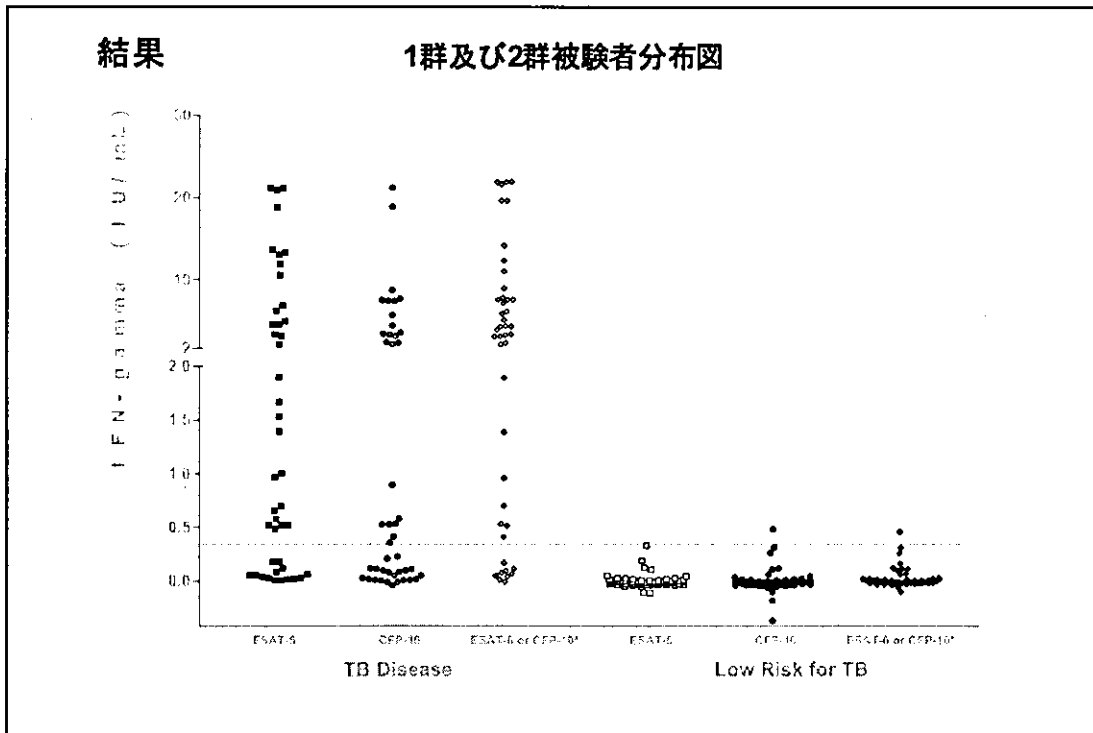


図2



〔Ⅳ〕新規結核DNAワクチンおよびバキュロウイルスビリオンワクチンの開発に関する研究

分担研究者 吉田 栄人 自治医科大学 感染免疫 講師

研究要旨

HVJエンベロープ結核DNAワクチン (Hsp65+ IL-12/HVJ) で免疫したカンクイザルは、致死量の結核菌を接種されてもレントゲン検査で結核病巣の陰影を見ることもなく、長期生存を続けており、Hsp65+ IL-12/HVJワクチンの有効性を明確に示している。GMPレベルでの生産方法が確立しているHVJエンベロープを用いた結核DNAワクチン

(Hsp65+ IL-12/Env) の評価試験を開始した。特筆すべき結果として、マウス動物実験においてBCGで初回免疫をした後、Hsp65+ IL-12/Envで追加免疫を行うとBCG単独と比較して1万倍もの強力なワクチン効果を示すことが明らかとなった。このように結核DNAワクチンは臨床試験に向けて確実に前進している。新規ワクチンベクターとしてバキュロウイルス粒子を用いた結核ワクチン (TB-AcNPV) の開発にも着手した。TB-AcNPV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見出しており、結核ワクチンとして新しい感染防御メカニズムを賦与する可能性を示した。

A. 研究目的

結核感染率を激減させ、また多剤耐性結核等の難治性結核を治療しうる画期的な次世代ワクチンを開発することを最終ゴールとする。特に新規結核DNAワクチンの開発を目指す。合わせて、バキュロウイルス粒子を用いた新しいアイデアのワクチン開発にも取り組む。

B. 研究計画

IL-12遺伝子を”DNAアジュバンド”としたHsp65結核DNAワクチンをHVJリポソームに包埋し(Hsp65+ IL-12/HVJ)、これを実験モデル動物 (マウス、モルモット、カンクイザル) に接種する。結核菌のエアゾル感染を行い、ワクチン効果を解析する。これらの動物実験結果をもとに、プロトタイプ改良および臨床試験申請のためのデータをまとめる。一方、GMPレベルでの

生産方法が確立しているHVJエンベロープと従来のHVJリポソームとのワクチン効果の比較・検討を行い、臨床試験のための基礎データを得る。結核菌由来の抗原あるいは遺伝子を導入した組換えバキュロウイルスビリオンを作製し、マウスで感染防御効果を検討する。さらに結核菌感染後のワクチン接種を想定し、Hsp65+ IL-12/HVJの結核予防ワクチンとしての効果を検討する。

C. 研究結果・考察

現在までにマウス、モルモット、ヒトよりIL-12遺伝子をクローニングし、独自に開発したDNAワクチン用高発現ベクターを作製した。これにより、実験動物として、マウス、モルモット、カンクイザルを用いてHVJリポソームDNAワクチンを評価することが可能となった。現在、DNAワクチンを接種したカンクイザルでは、致死量の結核

菌を接種されてもレントゲン検査で結核病巣の陰影を見ることもなく、長期生存を続けている。

GMPレベルで生産したHVJエンベロープは、本年度より本格的にマウスモデルの実験を開始した。BCGで初回ワクチンをした後、Hsp65+IL-12/Envで追加ワクチンを行うと、BCG単独と比較して1万倍もの強力なワクチン効果を示すことが明らかとなった。並行して、治療用ワクチンとしての効果も検討中である。

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スピ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見出した。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。今後、上記の確立した動物実験系を用いて解析を行っていく予定である。

D. 結論

平成14年度より開始しているカニクイザル実験は順調に成果を上げており、世界に先駆けた結核DNAワクチンの臨床応用に着実に前進している。さらにジェノメディア株式会社との共同開発によりGMPレベルで製造したHsp65+IL-12/EnvワクチンがマウスモデルでBCGをはるかに凌ぐ効果を得た。今後のカニクイザル実験に向けて着実

に前進している。また結核DNAワクチンの成果と合わせて、新しいタイプの結核ワクチンとしてバキュロウイルスベクターの可能性を見出したことは、研究の独創性を有し、今後の展開に大きな期待が寄せられる。

〔V〕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

分担研究者 原 寿郎 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 教授

研究要旨

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。一方、強力なIFN- γ 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センダイウイルスベクター（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- γ 産生能とT細胞増殖能を持つことがin vitroで示された。T-bet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。

A. 研究目的

我々はこれまで抗酸菌易感染性患者の病態について解析を行い、本邦で初めて4症例の常染色体優性遺伝形式をとるIFN- γ レセプター1欠損症を同定し報告した。このような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新たな治療戦略の開発が求められている。その一つとして強力かつ抗原特異的なTh1の誘導を目的とした樹状細胞（dendritic cell：DC）を用いた細胞遺伝子治療の開発が重要かつ有用な治療と考えている。特に転写因子であるT-betはIFN- γ 産生を誘導しTh1への分化を規定する最も重要な分子であることから、T-betを導入した樹状細胞は新たな細胞療法として有用な可能性が示唆される。

我々はマウスにおける細胞免疫療法モデルを作製し、新規ウイルスベクターであるセンダイウイルスを用いたマウス樹状細胞

へのT-bet遺伝子導入方法の確立とT-bet導入マウス樹状細胞の細胞内寄生性細菌に対する免疫学的効果の検討を目標に研究を行った。

B. 研究方法

- (1) マウスにおける細胞免疫療法モデルの作製
- ① 抗原感作DCの作製：C57BL/6マウスの大腿骨および脛骨から骨髓細胞を取り出し、IL-4およびGM-CSF添加RPMI培地で培養を行った。培養7日目にLPSを添加して一晚培養し、翌8日目に結核菌由来ペプチドであるTB2ペプチド（MHCクラスIb拘束性）、MPT64ペプチド（MHCクラスIa拘束性）添加し培養した。培養3時間後、遠心洗浄し結核菌抗原感作DCを作製した。
- ② 細胞性免疫能の解析：上記作製した結

核菌抗原感作DC をC57BL/6マウスに静脈内投与し、経時的に解析を行った。結核菌抗原感作DC投与マウスより肺、脾臓、PECを摘出し、これら浮遊細胞に結核菌抗原ペプチド (TB2ペプチド、MPT64ペプチド) を各々加え培養した。抗原特異的CD8陽性T細胞におけるIFN- γ 産生細胞数についてフローサイトメトリで解析を行った。

③ 抗酸菌に対する免疫能の解析：TB2ペプチドおよびMPT64ペプチド単独で感作したDC を作製しC57BL/6マウスに静脈内投与した。投与後6日目および60日目にBCG (Tokyo株) を 1.0×10^6 CFU腹腔内感染あるいは 1.0×10^5 CFU気道内感染させ、感染6日後に抗原特異的CD8陽性T細胞におけるIFN- γ 産生能の解析および臓器内菌数の測定を行った。

(2) センダイウイルスを用いたマウス樹状細胞への遺伝子導入法の検討

C57BL/6マウスから脾臓を採取し、コラゲナーゼ処理して細胞浮遊液を作成した。MACSにてCD11c陽性細胞を採取し、Sendai virus (SeV)-Tbetを導入、24時間培養をおこなった。培養後、このSeV-Tbet導入脾臓由来樹状細胞(以下DC-Tbet)を 1×10^6 cells/mlに調整し、96wellsのプレートに 200μ lずつ入れた。これにIL-12を10ng/mlとなるように添加して刺激を行い、72時間培養した。培養上清を回収し、ELISAにて上清中のIFN- γ について定量した。またこのDC-TbetとBALB/cマウス脾臓からT細胞を共培養し、MLR(mixed lymphocyte reaction)を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子解析研究「BCG副反応

例および抗酸菌感染症発症に関連する宿主遺伝子要因の解明」として九州大学大学院医学研究院 遺伝子解析倫理審査委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

(1) マウスにおける細胞免疫療法モデルの作製

マウス骨髄細胞から樹状細胞を作成し、結核菌抗原であるMPT64ペプチド (MHC class Ia拘束性) およびTB2ペプチド (MHC class Ib拘束性) で感作した。ペプチド感作樹状細胞投与後、脾臓・肺・PECにおける抗原特異的CD8陽性T細胞の経時変化を調べた。樹状細胞投与6日目に各臓器でMHC class IaおよびIb拘束性抗原特異的CD8陽性T細胞数がともにピークとなった。肺では投与9日目には抗原特異的CD8陽性T細胞が著明に減少したが、PECでは投与40日目でも持続してみられた。またペプチド感作樹状細胞投与から6日後にBCGを気道内および腹腔内感染させ脾臓・肺・腹腔内の生菌数測定し比較したところ、気道内感染では腹腔内感染と比べて菌の排除が悪かった。ペプチド感作樹状細胞投与60日後にもBCGを気道内および腹腔内感染させても同様な結果が得られた。またペプチド間で比較を行ったところ、MPT64ペプチド感作DC投与群の方が、TB2ペプチド感作DC投与群よりも菌の排除が優れている傾向があった。以上よりペプチド感作樹状細胞静脈内投与による免疫において、全身感染モデルでは有効であること、肺ではマイコバクテリアに対する免疫誘導能が悪い可能性が示唆された。

(2) センダイウイルスを用いたマウス樹状細胞への遺伝子導入法の検討

マウス脾臓由来樹状細胞にSeVを導入し、表面マーカー解析およびIL-12刺激下で培養を行い上清中のIFN- γ 定量を行った。DC-LacZおよびコントロールと比較してDC-TbetではCD86、CD40、MHCクラスIIの発現の増強と有意なIFN- γ 産生の増加がみられた。またBALB/c由来T細胞と共培養してMLRを行ったところ、DC-Tbetにおいて他と比べて有意なT細胞増殖能、IFN- γ 産生の増加がみられた。

D. 考察

DCを用いた結核菌に対する細胞免疫療法について、結核菌抗原感作DCをマウスに投与することにより経時的に抗原特異的CD8陽性T細胞の誘導を解析したところ、肺では脾臓・PECと比べて抗原特異的T細胞の維持は悪かった。さらにBCG感染マウスモデルにおいて菌の排除能についても調べたところ、全身感染モデルである腹腔内感染では結核菌抗原感作DC投与マウスにおいて有意な菌の排除は認められたが、局所感染モデルである気道内感染では菌の排除は弱かった。結核菌抗原感作樹状細胞投与によるワクチン療法は効果が期待できるものの、特に気道内感染では菌の排除が弱いいため、抗酸菌感染時における免疫反応の解析やさらに強力に抗原特異的CD8T細胞を誘導することができるスーパー樹状細胞

の作製が不可欠であると考えられた。

以前行った報告でT-bet遺伝子はIFN- γ 遺伝子に対する強いプロモーター活性を有していることを示した。我々はT-bet遺伝子を導入したセンダイウイルスベクターを開発し、マウス樹状細胞への導入を今回検討してみた。マウス脾臓由来樹状細胞にSeV-Tbetを導入したところ、CD86、CD40、MHCクラスIIの発現の増強およびIFN- γ の産生が高まり、強いT細胞増殖能をもつことが示され、T-bet遺伝子導入樹状細胞はスーパー樹状細胞として有用である可能性が考えられた。今後、in vivoでの系において有用性の確認を行うとともに、マウス骨髄由来樹状細胞へ導入における免疫反応の解析を行う予定である。

E. 結論

結核菌抗原感作DC投与により細胞性免疫が誘導され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。またT-bet遺伝子を導入したDCによる細胞性遺伝子療法の試みは技術的に十分可能であり、今後さらに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。

〔VI〕 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

分担研究者 竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所教授

研究要旨

TLRを介したシグナル伝達の分子機構を解析した。TBK1, IKKi/εのノックアウトマウスの解析から、TBK1, IKKi/εがTLR3, 4を介したIRF-3活性化に必須であることが明らかになった。さらに、TLR刺激で発現が誘導されるIκBζの生理機能を、ノックアウトマウスを用いて解析した結果、IκBζがTLRを介した遺伝子発現の中でIL-6などのあるサブセットの誘導に必須であることが明らかになった。そして、TLRを介した自然免疫系の活性化が消失するTRIF/MyD88二重欠損マウスを用いて、結核感染防御における自然免疫系の役割を解析した。TRIF/MyD88二重欠損マウスでは、他のマウスに比してBCG感染に対する感受性が高まっていた。このことから、TLRを介した自然免疫系の活性化が、結核感染防御に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

自然免疫系は、病原体の宿主内への侵入を最初に察知し、種々の炎症・免疫応答を誘導する重要な免疫系である。しかしながら、B, T細胞が主役を演じる獲得免疫系の分子機構が詳細に解析されてきているのに対し、自然免疫系の作動メカニズムはほとんど理解されていない。最近、Toll-like receptor (TLR)ファミリーが、病原体の構成成分の認識に関与していることが明らかになってきた。結核菌に対する生体防御においても、TLRファミリーによる結核菌の認識が重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、自然免疫系による結核などの病原体の生体内への侵入を察知するメカニズムをToll-like receptor (TLR)を中心とした受容体の解析から明らかにし、結核感染における免疫系作動の分子機構を解明することを目的とする。

B. 研究方法

まず、TLRを介した自然免疫系の活性化機構を、引き続きTLRを介したシグナル伝達

機構の解析を行い明らかにする。TLRを介した細胞内シグナルでは、MyD88がすべてのTLRを介した炎症反応の誘導に必須であるが、MyD88非依存性のシグナルの存在も明らかになっている。昨年度までに、MyD88非依存性のシグナルではTRIFが必須の役割を果たすことを明らかにしてきた。MyD88非依存性(TRIF依存性)のシグナルでは、転写因子IRF-3が活性化され、I型IFNの産生が誘導される。IRF-3を活性化するキナーゼとしてIKK関連分子であるTBK1, IKKi/εが同定された。TBK1, IKKi/εのTLRを介したシグナル伝達経路における役割を、ノックアウトマウスを作製し解析した。

また、TLRシグナルによりマクロファージにおいて発現が誘導されるIκBζの生理機能を、ノックアウトマウスを作製し解析した。これまでの解析から、TRIF/MyD88二重欠損マウスでは、TLRシグナルが完全に消失することが明らかになっている。TLRを介した自然免疫系の活性化の結核感染防御における役割を、TRIF/MyD88二重欠損マウ

スを作製し解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整ったSPF環境化で週に1回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

TBK1, IKKi/ ϵ のTLRを介したシグナル伝達経路における役割を、ノックアウトマウスを作製し解析した。TBK1ノックアウトマウスは胎生致死であるが、IKKi/ ϵ ノックアウトマウスは正常に出生した。TBK1欠損線維芽細胞では、TLR4, TLR3刺激によるIL-6の産生は正常であるものの、IRF-3の活性化、I型IFN遺伝子の誘導が障害されていた。一方、IKKi/ ϵ 欠損線維芽細胞では、単独で異常は認められなかったが、TBK1, IKKi/ ϵ の二重欠損マウス由来の胎児線維芽細胞では、TLR4, TLR3刺激によるIRF-3の活性化、I型IFN遺伝子の誘導が完全に消失していた。これらの結果は、TBK1, IKKi/ ϵ がTLR3, TLR4を介するMyD88非依存的経路に必須の役割を果たすことを示している。

次に、TLR刺激で発現が誘導されるI κ B ζ の生理機能を、ノックアウトマウスを作製し解析した。I κ B ζ ノックアウトマウスのマクロファージでは、TLR刺激による、IL-6, IL-12 p40などの遺伝子の発現がほとんど観察されなかった。しかし、I κ B ζ ノックアウト細胞でも、NF- κ BやAP-1などの転写因子の活性化は認められた。I κ B ζ が核内タンパク質であることから、核内においてI κ B ζ の発現誘導がこれらの遺伝子発現に関

与することが示唆された。実際、I κ B ζ がNF- κ Bのサブユニットp50と会合することが明らかになり、TLRシグナル伝達経路においてp50がI κ B ζ と協調することにより遺伝子が発現することを明らかにした。

このように、TLRシグナル伝達機構の概要が明らかになってきた。そこで、TLRシグナルの結核感染における役割を検討した。マウスにワクチン株であるBCGを感染させたところ、正常マウス、TRIF欠損マウス、MyD88欠損マウスでは肺組織に著明な変化は認められないが、TRIF/MyD88二重欠損マウスでは感染2週間以内に壊死を伴った病理変化が観察された。抗酸菌染色を行ったところTRIF/MyD88二重欠損マウスの肺では、多数の抗酸菌が観察された。これらのことから、TRIF/MyD88二重欠損マウスはBCG感染に高感受性を示すことが明らかになった。

D. 考察

TBK1, IKKi/ ϵ のノックアウトマウスの解析から、TLRを介したIRF3活性化の分子機構が明らかになった。この結果、TLRを介したシグナル伝達機構の概要が明らかになってきた。さらに、TLR刺激による遺伝子発現誘導の分子機構の一端もI κ B ζ の生理機能解析から明らかになった。さらに、TLRを介したシグナルがすべて消失するTRIF/MyD88二重欠損マウスでは、結核感染防御機構に障害が認められた。この結果は、自然免疫系の活性化シグナルが、結核菌感染防御に重要な役割を担っていることを示している。今後、TRIF/MyD88二重欠損マウスがBCG感染に高感受性になる分子機構を解析する。

E. 結論

自然免疫系のTLRを介した活性化機構の概要が、シグナル伝達経路の解析から明らか

になった。また自然免疫系の活性化が結核感染防御に重要な役割を担っていることが示唆された。

〔Ⅶ〕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

分担研究者 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

研究要旨

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ヵ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。

A. 研究目的

現行のBCGワクチンは成人に対して結核予防効果に問題点があるとされている。われわれはBCGワクチンより強力な新しい結核ワクチンの開発を行った。本年度は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。

B. 研究方法

BALB/cマウスにHVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNAを3回 i.m 投与しその後

M.tuberculosis H37Rv株 5×10^5 CFUを尾静脈投与した。前処置なし(Control)、emptyベクター群、BCG Tokyo 群を対照とし検討した。マウスはH37Rv株投与後、5週、12週で検討した。一群5匹。肺、肝臓、脾臓を湿重量測定後10%PBSホルマリンで固定。組織中の肉芽腫の量、単核球浸潤を以下の方法で顕微鏡下に半定量した。各臓器中結核菌のコロニー数とも比較検討した。

(1) 肉芽腫半定量法: granuloma index:
H&E染色標本を用い、 4×10 倍で1視野中の肉芽腫の長径×短径の合計(単位は $\times 10^{-2} \text{ mm}^2$)を計算した。無作為に3視野計算しその平均をgranuloma indexとした。

(2) 単核球浸潤半定量: mononuclear cell (MNC) infiltration index: H&E染色標本を用い、4×10倍で1視野中の単核球浸潤の程度を以下の基準でスコア化した。無作為に3視野計算し浸潤している部分の面積の%からスコアを求め、その平均をMNC infiltration indexとした。

- 0; 病的浸潤なし、
- 1; 0% < 浸潤面積 ≤ 10%
- 2; 10% < 浸潤面積 ≤ 30%
- 3; 30% < 浸潤面積 ≤ 70%
- 4; 70% < 浸潤面積 ≤ 100%

(3) 評価項目として組織の湿重量、組織のH&E stainを用いたgranuloma index及びmononuclear cell infiltration index。また組織の結核菌コロニー数(CFU/total)を用いた。

(4) モルモットではHVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA 投与群、empty ベクター投与群、BCG投与群等を比較検討した。マウスと同様のgranuloma indexを用いた。

(5) カニクイザルではgranuloma 形成及び乾酪壊死の病理像を解析した。

C. 研究結果

(1) マウスモデル

HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン投与群はBCG東京投与群やemptyベクター投与群に比しgranuloma indexの著明な改善が認められた。この効果は結核菌数(CFU)で解析したHSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンの抗結核効果と強く相関した。(図1)

(2) モルモットモデル

さらに、モルモットでも同様にHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン投与群は結核病巣の著明な改善が認められた。(図2)

また、HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン投与群は

BCGワクチン投与群に比しモルモットの肺におけるgranuloma indexの著明な改善をみた。(図3)

一方リコンビナント72f BCGワクチンもBCG東京ワクチン接種モルモットに比し肺の結核病巣の改善を示した。(図4)

(3) カニクイザルモデル

人の結核感染に最も近いモデルとして有名なカニクイザル(Nature Med. 1996)では、肺で、人の結核病理像と同じgranuloma形成と乾酪壊死像が認められた。(図5)

D. 考察

マウス、モルモットでHSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン投与によるgranuloma indexと抗結核菌効果が相関したことにより我々のgranuloma indexのアッセイ法は極めて有用である。

サルにおけるgranuloma形成と乾酪壊死像についてワクチン投与カニクイザルの肺で解析中である。

E. 結論

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。

本研究は、国立病院機構近畿中央胸部疾患センター岡田全司博士らとの共同研究による。

図1

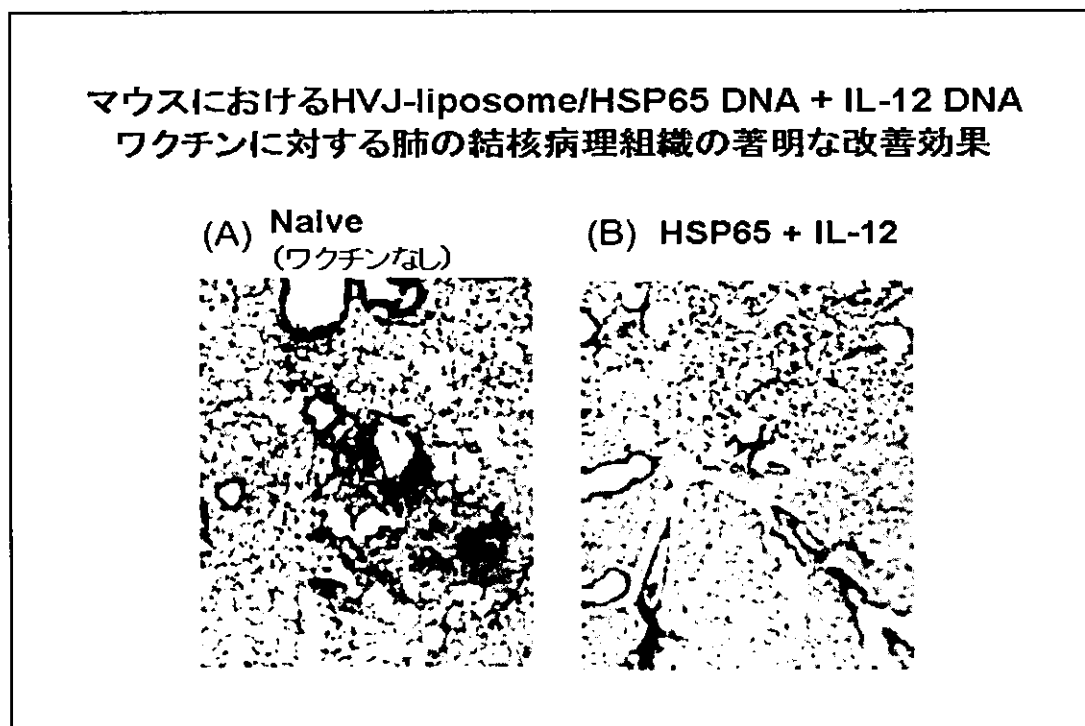


図2

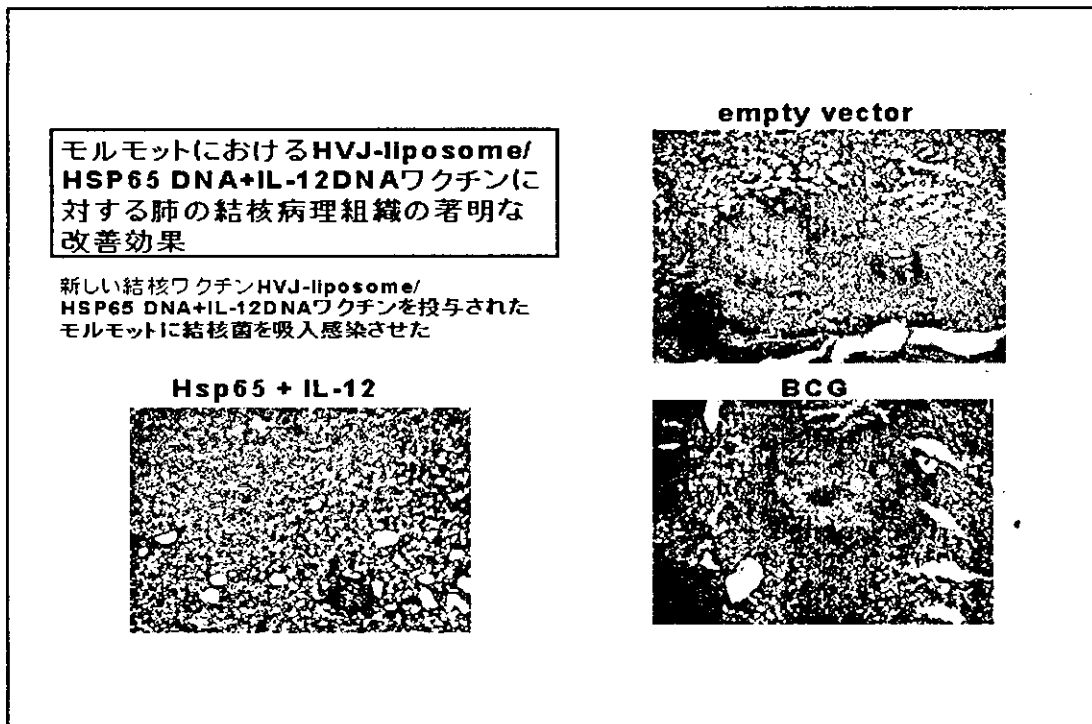


図3

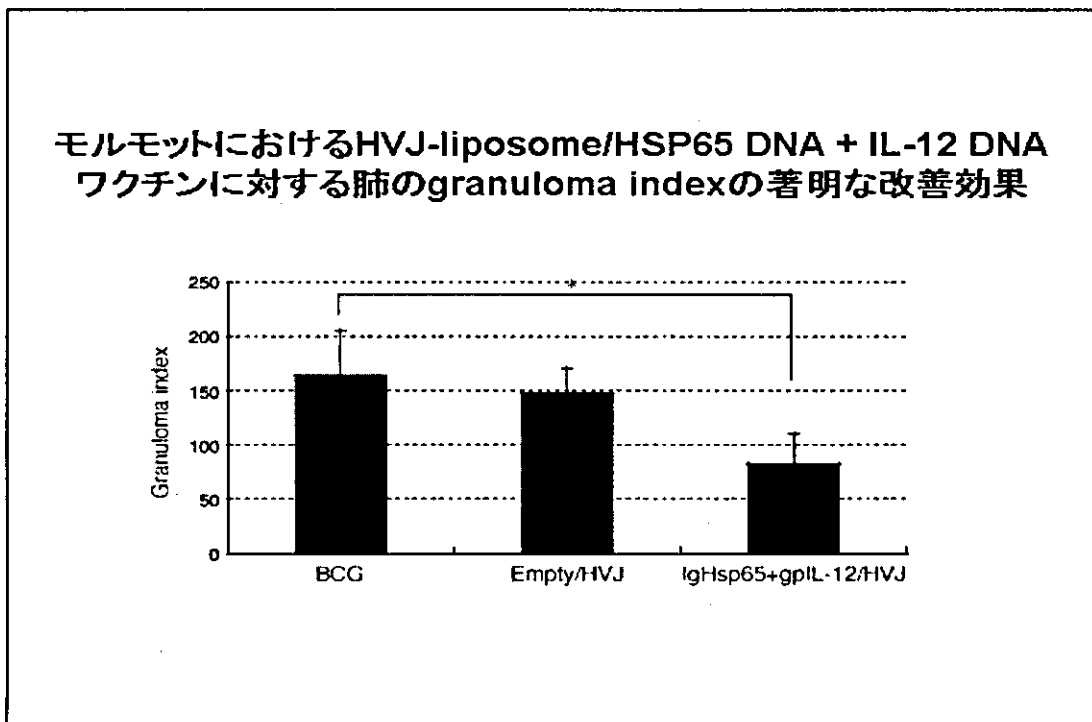


図4

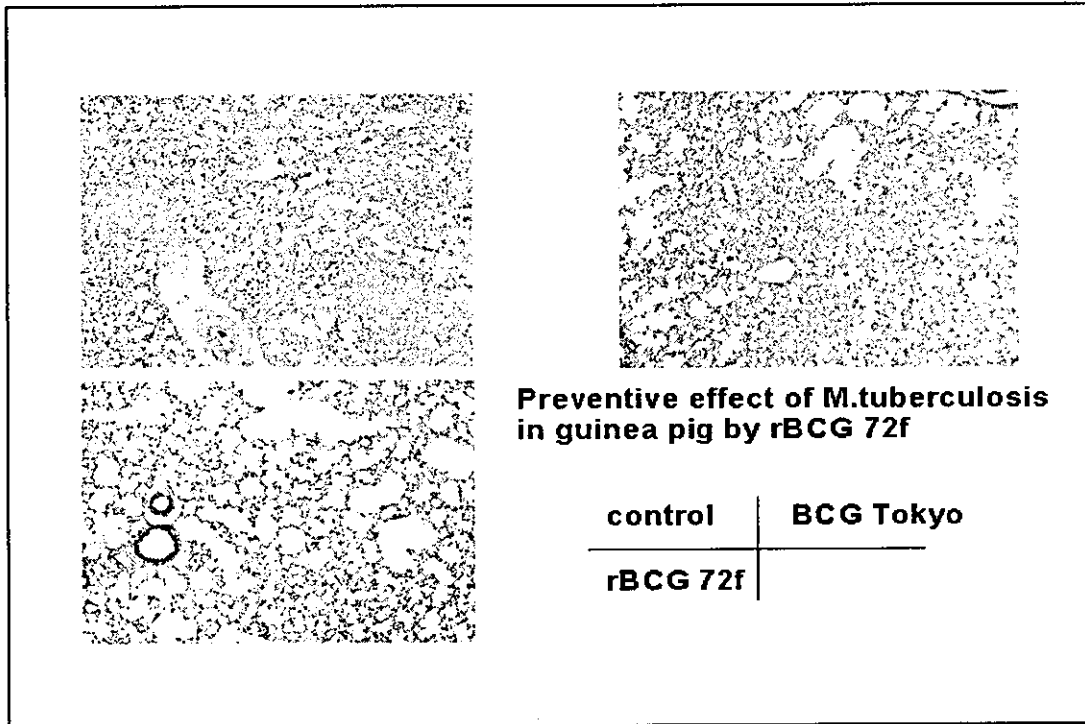
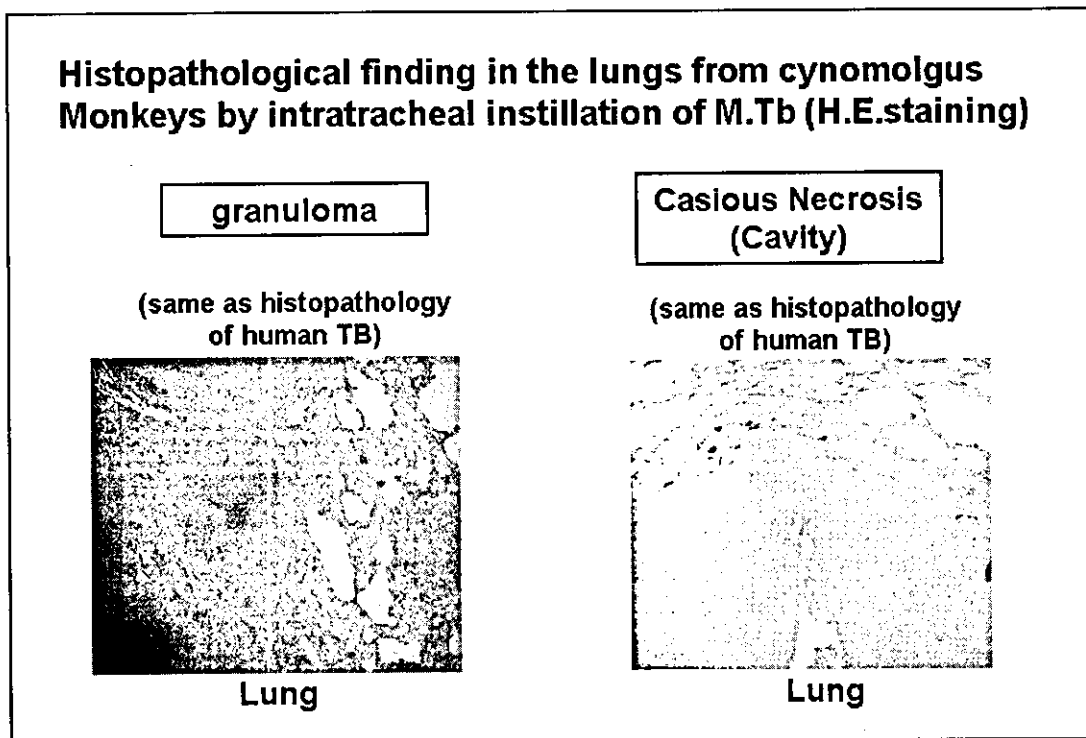


図5



〔Ⅷ〕結核に対して有効なヘテロ追加免疫法に関する研究に関する研究

研究協力者 小出 幸夫 浜松医科大学微生物学・教授

研究要旨

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(α -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 α -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、ヘテロ免疫の効果を判定する予定である。

A. 研究目的

HIVに対するワクチンの研究において、感作と追加免疫を異なるベクターで行う所謂「ヘテロ免疫法」の有効性が確かめられている。即ち、初回免疫をDNAワクチンで、追加免疫をワクシニアウイルス(MVA: recombinant modified vaccinia virus Ankara)ベクターで行うと強い防御免疫が得られるというものである。結核に対しても、このヘテロ免疫法が有効であると考えられる。実際に、ヒトに対してBCG初回免疫を行った後、Ag85Aを発現するMVAで追加免疫を行うことで強い抗結核免疫が誘導されることが報告されている(Nat Med 10:1240, 2004)。

本研究の目的は追加免疫用の上記MVAより更に強力なワクチンを開発することにより、結核に対して最適なヘテロ免疫システムを構築することにある。本年度は、

1) 第三世代レンチウイルスベクター、2) ケモカイン融合ワクチン、3) アルファ-ガラクトシルセラミド(α -GalCer)を用いた樹状細胞ワクチンの検討を行った。

B. 研究方法

(1) 第三世代レンチウイルスベクター：SIN(self-inactivating)ベクターとレンチウイルスのtatなど修飾遺伝子を除いて完全に安全にし、更に、エンベロープにVSV-Gを用いて組織特異性を無くした第三世代レンチウイルスベクターにMPT51またはHsp65遺伝子を挿入した(図1)。これら3種のプラスミドを293T細胞に遺伝子導入し、ウイルスを作製した。400mlの培養上清を超速心で400 μ lに濃縮し、 1.2×10^8 IU/mlのウイルスを得た。

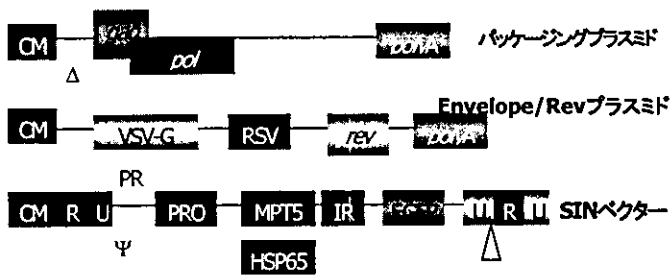


図1. 第三世代レンチウイルスベクター

50~100 μlのウイルス液を麻酔したBALB/cマウスの気管内に投与した。

- (2) ケモカイン融合ワクチン：未熟樹状細胞(DC)に発現しているケモカイン受容体CCR5のリガンドであるCCL3 (MIP-1α)をMPT51またはHsp65の上流に14アミノ酸をリンカーとして融合させたDNAワクチンを作製した(図2)。また、大腸菌により、この融合蛋白も作製した(Dr. Arya; NIH)。

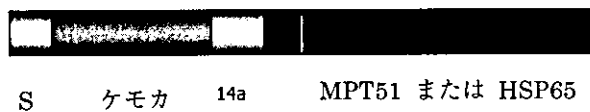


図2. ケモカイン融合蛋白

このDNAワクチンはBALB/cマウスの剃毛した腹部に遺伝子銃で2μgを1週間隔で3回接種した。

- (3) α-GalCerを用いた樹状細胞ワクチン：マウス骨髄由来DCにCD1dのリガンドであり、NKT細胞を刺激するα-GalCerとMPT51のH2-D^d拘束性T細胞エピトープであるMPT51 24-32ペプチドをパルスし、1 × 10⁵個をマウスに静注免疫した。

(倫理面への配慮)

動物実験は計画書を作成し、浜松医科大学動物実験委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

- (1) 第三世代レンチウイルスベクター

A



B

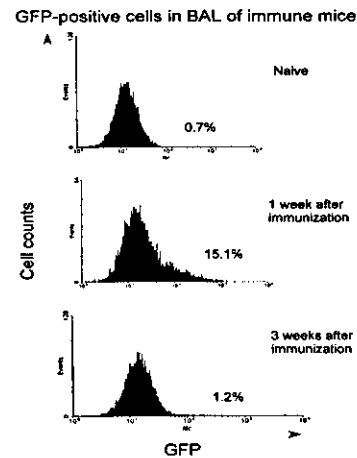


図3.Hsp65-GFP発現レンチウイルスの経気管投与

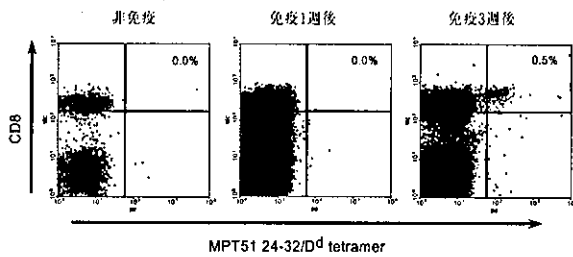
A：肺胞洗浄液中マクロファージのウイルス感染(GFP)

B：GFP陽性細胞の経時的変化

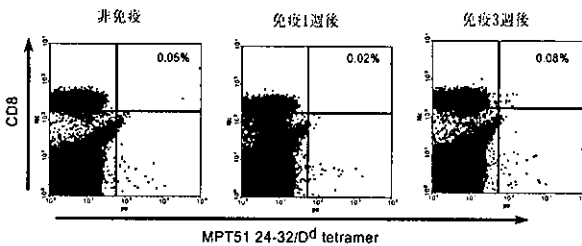
図3に見られるように、経気道的に接種したウイルスは肺胞マクロファージに感染し、接種1週後に15.1%と最も多く認めましたが、3週間には1.2%とほとんど認めなくなった。

次にMPT51を発現するウイルスを経気道的に接種し、縦隔リンパ節と脾臓におけるMPT51特異的CD8+ T細胞をテトラマー法で測定したところ、縦隔リンパ節で接種3週後に0.5%検出された(図4)。しかし、脾臓では特異的T細胞は検出されなかった。

A



B



(1) ケモカイン融合ワクチン

まず、未熟DCに発現しているCCR5のリガンドであるCCL3 (MIP-1 α)を用い、これと防御抗原との融合蛋白を発現するDNAワクチンを作製し、防御抗原をDCに取込ませることを計画した。即ち、CCL3/MPT51およびCCL3/Hsp65 DNAワクチンを1週おきに3回遺伝子銃で免疫したところ以下の結果を得た。i)テトラマー・アッ

セイでMPT51特異的CD8+ T細胞の誘導を検出した結果、MPT51 DNAワクチンではCD8+ T細胞の約0.13%がMPT51に特異的であったのに対し、CCL3/MPT51 DNAワクチンでは約3.0%と高頻度に特異的CD8+ T細胞を認めた。

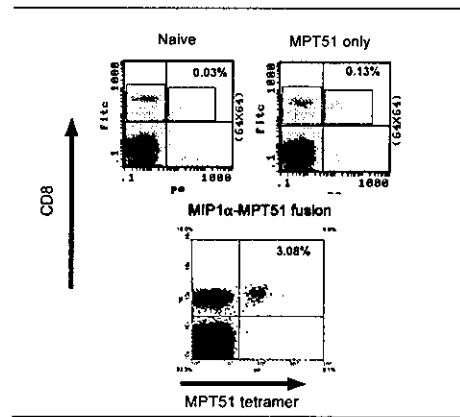


図5.MPT51およびCCL3(MIP1 α)/MPT51

DNAワクチンによる特異的CD8+ T細胞のテトラマーによる検出

- (2) サイトカイン産生能：DNAワクチン接種後のTNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-4, IL-2の産生をサイトカインビーズ・アレイで測定した(図6)。その結果、MPT51単独に比し、CCL3(MIP1 α)/MPT51 DNAワクチンは強くIFN- γ 産生を誘導した。興味あることに、CCL3とMPT51 DNAワクチンを混合接種した場合(mix)も融合ワクチンと同等のIFN- γ 産生を誘導した。
- (3) 特異的CTL活性：ペプチドをパルスしたP815細胞を標的細胞として、51Cr遊離法でCTL活性を測定したところ、MPT51単独に比し、CCL3/MPT51 DNAワクチンは強いCTL活性を誘導した。また、サイトカイン産生