

TABLE 1. Candidate T-cell epitopes on the p21 peptide of the MPT51 molecule

Peptide	Amino acid sequence ^a	Estimated scores for restriction molecules ^b		
		K ^d	D ^d	L ^d
p21	FLAGGPHAVYLLDAFNAGPD			
p22-32	LAGGPHAVYLL			
p25-32	GPHAVYLL	57.6	—	—
p23-32	<u>AGGPHAVYLL</u>	<u>11</u>	—	—
p22-31	<u>LAGGPHAVYL</u>	<u>40, 11</u>	—	—
p23-31	<u>AGGPHAVYL</u>	<u>57, 16</u>	20	<u>15</u>
p24-32	<u>GGPHAVYLL</u>	<u>48, 12</u>	400	<u>4.5, 12</u>
p29-37	VYLLDAFNA	120	—	—
p25-35	GPHAVYLLDAF	—	—	—
p27-35	HAVYLLDAE	—	—	10
p25-34	GPHAVYLLDA	—	—	30

^a Boldface type indicates peptide sequences that were synthesized and used for experiments. Underlining indicates anchor residues.

^b Scores (binding affinity) were estimated by BIMAS or SYFPEITHI (underlined) epitope prediction (algorithm). —, no binding score.

haps because p22-32 and p25-35 share 8 of 11 aa. Thus, we prepared two typical nine-mer candidate peptides, p23-31 and p24-32, which had higher theoretical binding stability (Table 1). As shown in Fig. 3B, p24-32, but not p23-31, could induce vigorous intracellular IFN- γ synthesis in the immune CD8⁺ T cells, indicating that the p24-32 nine-mer peptide is a bona fide CD8⁺ T-cell epitope on the MPT51 molecule for BALB/c mice. By using intracellular IFN- γ staining we detected the p24-32-specific CD8⁺ T cells in the immune spleen cells (Fig. 3C).

Identification of an MHC class Ia restriction molecule for p24-32. Since p24-32 was found to be a CD8⁺ T-cell epitope for BALB/c mice, we tried to determine which MHC class Ia molecule binds and presents the peptide to CD8⁺ T cells. First, the binding and stabilization of BALB/c MHC class Ia molecules (K^d, D^d, and L^d) by the peptide were investigated by using the TAP2-deficient RMA-S-K^d, RMA-S-D^d, and RMA-S-L^d cell lines. Remarkably, the p24-32 peptide appeared to up-regulate and stabilize D^d molecules on RMA-S-D^d cells, and the other molecules were not stabilized by this peptide (Fig. 4A). As a control, we utilized the p25-35 peptide, which contained two L^d-binding motifs. As expected, this peptide stabilized only L^d molecules on RMA-S-L^d cells (data not shown). Listeriolysin O 91-99 (LLO91-99) is a well-known CTL epitope which binds to K^d molecules. The LLO91-99 peptide stabilized K^d molecules but not D^d or L^d molecules on RMA-S transformants (data not shown).

To gain insight into the functional activity of the p24-32-D^d complex on RMA-S-D^d cells, we examined T-cell responses to the peptide-MHC complex. As shown in Fig. 4B, the peptide-pulsed RMA-S-D^d cells, but not RMA-S-K^d and RMA-S-L^d cells, were capable of stimulating MPT51-immunized splenocytes to secrete IFN- γ . We also examined whether the peptide-MHC complex was recognized by CTL. As shown in Fig. 4C, in vitro-stimulated splenic T cells from BALB/c mice immunized with MPT51 DNA vaccine appeared to lyse the peptide-pulsed RMA-S-D^d and P815 target cells substantially. However, neither peptide-pulsed RMA-S-K^d cells nor peptide-pulsed RMA-S-L^d cells were lysed by the same effector cells. Collec-

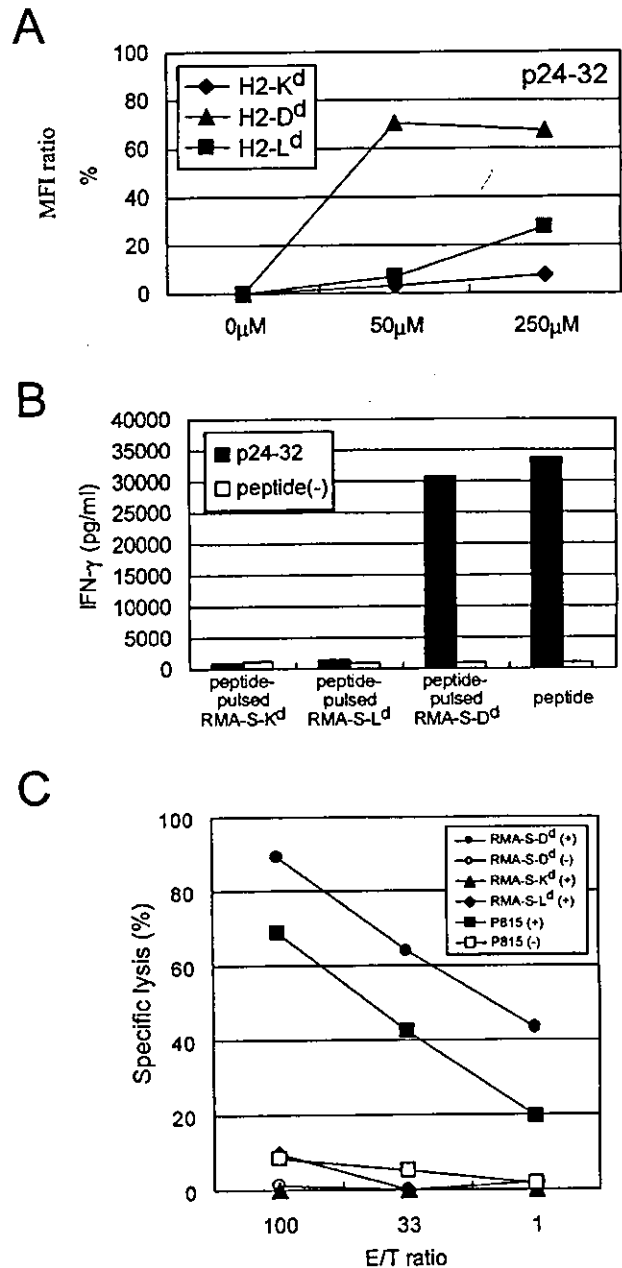


FIG. 4. p24-32 peptide binds to H2-D^d and can be recognized by immune T cells in the context of H2-D^d. (A) MHC class I stabilization assay indicated that the p24-32 peptide binds to H2-D^d. The p24-32 peptide was able to stabilize expression of D^d molecules. The MFI ratio was calculated as described in Materials and Methods. (B) p24-32 peptide-pulsed RMA-S-D^d cells, but not RMA-S-K^d and RMA-S-L^d cells, were able to stimulate immune spleen cells to produce IFN- γ . peptide(-), medium alone. (C) p24-32 peptide-pulsed RMA-S-D^d and P815 cells were lysed by spleen cells from MPT51 DNA-vaccinated BALB/c mice. Immune spleen cells (effectors) were incubated with target cells by using the effector/target cell ratios (E/T ratio) indicated on the x axis.

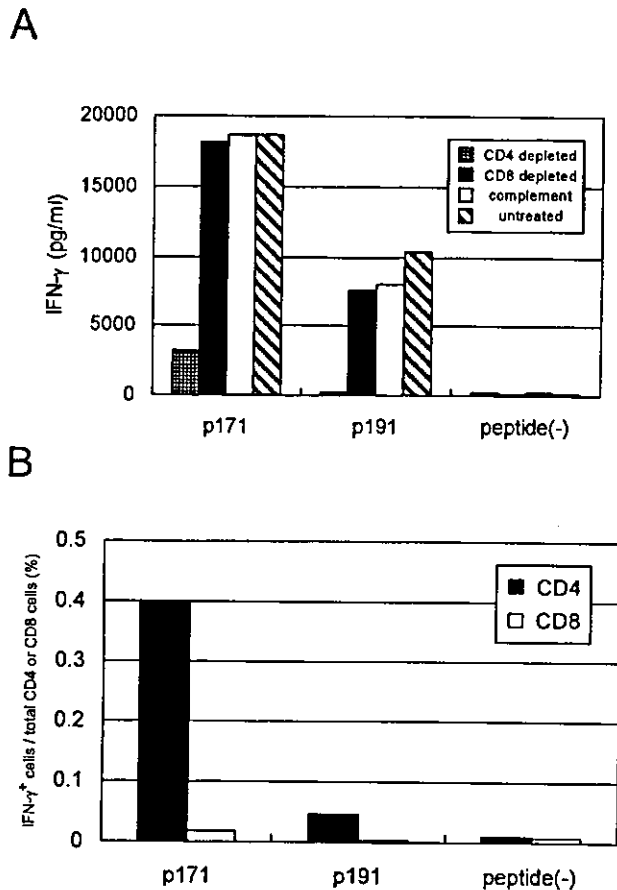


FIG. 5. p171 and p191 are CD4⁺ Th1 epitopes in C57BL/6 mice. (A) Depletion of CD4⁺ T cells with MAb plus complement, but not CD8⁺ T cells, eliminated IFN- γ production in response to the p171 and p191 peptides. (B) Three-color flow cytometric analyses for staining of intracellular IFN- γ and T-cell subsets indicated that CD4⁺ T cells, but not CD8⁺ T cells, synthesized intracellular IFN- γ in response to the p171 and p191 peptides. peptide(-), medium alone.

tively, these data clearly indicate that the p24-32 peptide is an H2-D^d-restricted CD8⁺ T-cell epitope.

Dominant and subdominant Th1 epitopes on MPT51 in C57BL/6 mice. As shown in Fig. 2B, p171 (aa 171 to 190) and p191 (aa 191 to 210) seem to contain T-cell epitopes for C57BL/6 (H-2^b) mice. To determine the T-cell subset responsible for IFN- γ production, T-cell subset depletion and flow cytometry analyses were performed. As shown in Fig. 5A, depletion of CD4⁺ T cells with an MAb and complement almost completely eliminated IFN- γ production in response to both p171 and p191. However, CD8⁺ T-cell depletion had no effect on IFN- γ production, suggesting that both p171 and p191 contain Th1 epitopes. This was confirmed by three-color flow cytometric analysis, which demonstrated that only CD4⁺ T cells were capable of synthesizing intracellular IFN- γ in response to not only p171 but also p191 (Fig. 5B). Since CD4⁺ T-cell epitopes (MHC class II ligands) consist of 12 to 25 aa (35) and their lengths are more heterogeneous than the lengths of CD8⁺ T-cell epitopes (18), the minimal epitopes were not determined.

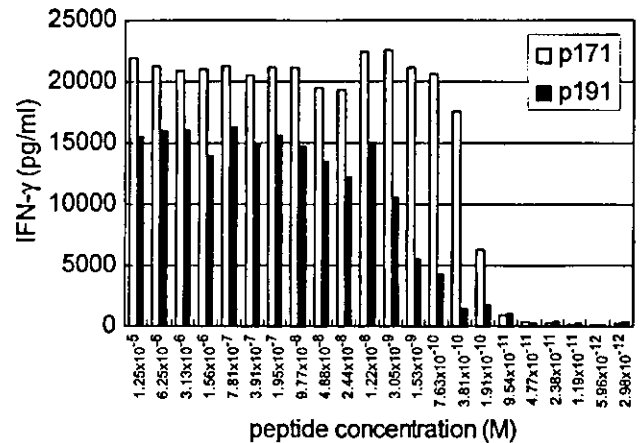


FIG. 6. p171 and p191 are dominant and subdominant Th1 epitopes in C57BL/6 mice. The immune spleen cells were stimulated with serially twofold diluted p171 and p191 peptides, and the IFN- γ concentrations in the supernatants were determined.

We observed that p171 always induced greater IFN- γ production than p191 induced (Fig. 2 and 5). In attempt to confirm this, the immune splenocytes were stimulated with serially dilutions of both peptides, and the IFN- γ concentrations were measured. As shown in Fig. 6, clearly different levels of IFN- γ production were observed after stimulation with the p171 and p191 peptides at peptide concentrations ranging from 1.53×10^{-9} to 3.81×10^{-10} M. Therefore, we concluded that p171 and p191 are dominant and subdominant Th1 epitopes, respectively.

DISCUSSION

From the data described above, we were able to draw the following conclusions about T-cell epitopes on the mature MPT51 molecule: (i) the p24-32 peptide is an H2-D^d-restricted CD8⁺ T-cell epitope; and (ii) p171-190 and p191-210 contain dominant and subdominant H2-A^b-restricted Th epitopes, respectively.

A greater understanding of the nature of protective immunity to TB would facilitate the development of a future vaccine. The cellular arm of the immune response mediated by Th1 cells has been determined to be a pivotal component of the protective immunity against TB (22). However, there is now mounting evidence from murine models and human studies that CD8⁺ T cells also play a pivotal role in the protection (21, 41). The precise mechanism of MHC class Ia-restricted CD8⁺ T-cell-mediated protection is not known. Mice deficient in perforin, granzyme, or Fas show no more susceptibility to *M. tuberculosis* infection than wild-type mice show (6). IFN- γ secreted by CD8⁺ T cells is probably involved in the protection (43).

The Ag85 complex is known to comprise immunodominant antigens in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses to *M. tuberculosis* infections in mice and humans. Vaccination with plasmid DNA encoding Ag85A or Ag85B reveals Th1 CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells in mice (25), and these cells confer protection against *M. tuberculosis* challenge (3, 17). Evidence that the Ag85 complex has T-cell epitopes has accumulated. Ag85A

was found to contain several CD4⁺ T-cell epitopes and at least one CD8⁺ T-cell epitope in BALB/c mice (10). In C57BL/6 mice, a cross-reactive T-cell response against two peptides spanning aa 241 to 260 and aa 261 to 280 of Ag85A and Ag85B has been detected (12). Furthermore, aa 240 to 254 of Ag85B has been reported to be an H2-A^b-restricted CD4⁺ T-cell epitope which is recognized by V β 11⁺ T cells (47). T-cell epitope mapping of Ag85A was also performed in humans (24). For example, HLA-A*0201-restricted CD8⁺ T-cell epitopes were identified in Ag85B (14). Another major secreted protein, MPT51, has been reported. The MPT51 molecule exhibits 37 to 43% homology to the mycolyl transferase component of the Ag85 complex (29) and is secreted as much as Ag85A (30). However, it seems unlikely that the MPT51 molecule possesses mycolyl transferase activity since two of three amino acid residues essential for enzymatic mycolyl transferase function (37) were replaced (S126A and H262N). Very recently, we observed that vaccination with plasmid DNA encoding MPT51 is capable of inducing specific protective cellular immunity against TB (27). This observation prompted us to identify T-cell epitopes on the MPT51 molecule.

In BALB/c mice, we identified an H2-D^d-restricted CD8⁺ T-cell epitope, p24-32 (GGPHAVYLL), by using gene gun DNA vaccination and an overlapping peptide library with biometric analysis. DNA vaccination is a powerful tool for identifying T-cell epitopes, as previously reported (10). IFN- γ responses were clearly seen in the spleen cells from mice immunized with plasmid DNA compared to the spleen cells from mice immunized with BCG. In addition, a computer-assisted algorithm is useful for identifying minimal epitopes after epitope mapping. In fact, p24-32, which we identified as a CD8⁺ T-cell epitope, had a high binding score (half-time dissociation score), 400, for D^d in BIMAS. However, various factors other than MHC-binding affinity are used to determine T-cell epitopes; these factors include (i) antigen processing (cleavage preference of the proteasome), (ii) TAP-dependent peptide transport, and (iii) the response to the T-cell repertoire. For example, p29-37 in p21-40, which was thought to contain a T-cell epitope(s), exhibits a high binding score for K^d, 120, in BIMAS. However, the p29-37 peptide failed to induce IFN- γ synthesis in spleen cells from immunized BALB/c mice. In addition, p25-35 contains two L^d-binding peptide motifs and can bind to L^d molecules on RMA-S-L^d cells (data not shown). However, this peptide could not elicit significant intracellular IFN- γ synthesis in immune spleen cells. Three-color flow cytometric analysis demonstrated that the p24-32 peptide can induce intracellular IFN- γ synthesis in immune CD8⁺ T cells, indicating that the p24-32 peptide is a CD8⁺ T-cell epitope in BALB/c mice. We further examined the restriction molecule of the epitope by using TAP2-deficient RMA-S cells transfected with the K^d, D^d, or L^d gene. We observed that p24-32 stabilized only H2-D^d molecules on RMA-S-D^d cells, indicating that the peptide binds to H2-D^d molecules. One could envision that only RMA-S-D^d cells can express D^d molecules on the cell surface and that neither RMA-S-K^d nor RMA-S-L^d cells can express K^d or L^d molecules. The uncertainty can be eliminated by our observations that LLO91-99 stabilized the expression of K^d molecules on RMA-S-K^d cells and that the p25-35 peptide stabilized L^d expression on RMA-S-L^d cells. We also demonstrated that the

p24-32 peptide-H2-D^d complex can be recognized by CD8⁺ T cells producing IFN- γ and exhibiting CTL activity. Corr et al. (8) demonstrated that the dominant peptide binding motif of H2-D^d consists of glycine at position 2 (P2), proline at P3, a positively charged residue (lysine or arginine) at P5, and a hydrophobic C-terminal residue (leucine, isoleucine, or phenylalanine) at P9 or P10. p24-32 (GGPHAVYLL) is consistent with this motif except at P5. However, P5 contributes ancillary support for high-affinity binding, so that the positively charged residue seems to be not always necessary. Ag85A and Ag85B sequences corresponding to MPT51 p24-32 do not possess proline at P3 but possess glycine at P2 and leucine at P9, implying that substitution of P3 residues may make the homologous region of Ag85A and Ag85B unable to bind D^d molecules. It is especially noteworthy that a hydrophobic C-terminal residue is critical for the CD8⁺ T-cell epitope since the immune CD8⁺ T cells were able to recognize p22-32 and p24-32 but not p23-31. The importance of the C-terminal residue in the CD8⁺ T-cell epitope was also observed in an HLA-A*0201-restricted MPT51 epitope (unpublished data), in H2-K^b-restricted Moloney murine leukemia virus (4), and in HLA-A*0201-restricted MAGE-A epitopes (15).

In BALB/c mice, the level of epitope-specific IFN- γ production by CD8⁺ T cells was below the detection level in BCG-vaccinated mice. This is consistent with the observation that in BALB/c mice, the level of Ag85-specific IFN- γ -producing T cells, which can be easily elicited by DNA vaccines, is below the detection level in BCG-vaccinated or TB-infected mice (10). Since a DNA vaccine encoding MPT51 is capable of inducing protective immunity against infection with *M. tuberculosis* in BALB/c mice (27) and the DNA vaccine induces CD8⁺ T cells recognizing the p24-32 in the context of H2-D^d, it is possible that low-level expression of the CD8⁺ T-cell epitope on *M. tuberculosis*-infected cells might be recognized by the DNA vaccine-induced CD8⁺ T cells in BALB/c mice.

In C57BL/6 mice immunized with a DNA vaccine encoding MPT51, we found one dominant Th1 epitope and one subdominant Th1 epitope, which are located in p171-190 and p191-210, respectively. Since C57BL/6 mice have a deletion in the E α gene and do not express H2-E molecules on the cell surface (26), these epitopes are considered to be exclusively presented in the context of H2-A^b. Spleen cells from BCG-vaccinated C57BL/6 mice produced a significant level of IFN- γ only in response to p171-190. DNA vaccination is suitable for mapping of T-cell epitopes since this type of vaccination is more potent than vaccination with BCG or infection with *M. tuberculosis*, as previously reported (10, 11). p171-190 shows no sequence homology to corresponding sequences of Ag85A and Ag85B except for the last 2 aa. However, 5 aa at the N terminus of p191-210 in MPT51 are identical to the corresponding residues in Ag85A and Ag85B, indicating that the 5 aa of MPT51 are not required for H2-A^b binding and do not play a role in the binding to H2-A^b molecules in the context of the rest of the sequence. In contrast to the prediction for MHC class I ligand motifs, the highly degenerate anchor positions in most class II motifs make it rather difficult to predict MHC ligands (35). Again, it is noteworthy that binding to MHC molecules is a necessary but not sufficient element for a T-cell epitope. We demonstrated that the MPT51 molecule does not possess MHC class Ia-restricted epitopes in C57BL/6 mice like an

Ag85A molecule (11). It has been demonstrated that vaccination with plasmid DNA encoding Ag85A does not protect H2^b CD4 knockout mice but significantly decreases bacterial replication in the lung and prolongs survival of H2^b β 2-microglobulin knockout mice (11). MPT51 may also induce CD4⁺ T-cell-mediated protective immunity in C57BL/6 mice. Thus, identification of T-cell epitopes may contribute to elucidation of the role of the molecules in the protective immunity induced in different strains of mice.

In conclusion, we identified one H2-D^d-restricted CD8⁺ CTL epitope in BALB/c mice and two H2-A^b-restricted Th1 epitopes in C57BL/6 mice, which are thought to play pivotal roles in protection against *M. tuberculosis* infection. Identification of these T-cell epitopes will be very useful for further elucidation of the role of MPT51-specific T cells in the protective immunity by tetramer staining or ICS.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank N. Ohara for providing plasmid pMB49, M. Bevan for providing RMA-S-K^d cells, D. H. Raulet for providing RMA-S-D^d cells, K. Uda for providing RMA-S-L^d (RL^d-E2) cells, and T. Takahashi for providing CD8 α MAb 35-17-2. We are also grateful to M. Uchijima for comments during this work. The technical assistance of K. Shibata is gratefully acknowledged.

This work was supported by grants-in-aid for scientific research and centers of excellence from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, by Health and Labour Science Research grants for research on emerging and reemerging infectious diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, and by the United States-Japan Cooperative Medical Science Committee.

REFERENCES

- Abou-Zeid, C., T. L. Ratliff, H. G. Wiker, M. Harboe, J. Bennedsen, and G. A. Rook. 1988. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 56:3046-3051.
- Andersen, P. 1994. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect. Immun.* 62:2536-2544.
- Baldwin, S. L., C. D. D'Souza, I. M. Orme, M. A. Liu, K. Huygen, O. Denis, A. Tang, L. Zhu, D. Montgomery, and J. B. Ulmer. 1999. Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines encoding secreted and non-secreted forms of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A. *Tuber. Lung Dis.* 79:251-259.
- Beekman, N. J., P. A. van Veelen, T. van Hall, A. Neisig, A. Sijts, M. Camps, P. M. Kloetzel, J. J. Neeffes, C. J. Melief, and F. Ossendorp. 2000. Abrogation of CTL epitope processing by single amino acid substitution flanking the C-terminal proteasome cleavage site. *J. Immunol.* 164:1898-1905.
- Befisle, J. T., V. D. Vissa, T. Sievert, K. Takayama, P. J. Brennan, and G. S. Besra. 1997. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 276:1420-1422.
- Cooper, A. M., C. D'Souza, A. A. Frank, and I. M. Orme. 1997. The course of *Mycobacterium tuberculosis* infection in the lungs of mice lacking expression of either perforin- or granzyme-mediated cytolytic mechanisms. *Infect. Immun.* 65:1317-1320.
- Cornell, K. A., H. G. Bouwer, D. J. Hinrichs, and R. A. Barry. 1999. Genetic immunization of mice against *Listeria monocytogenes* using plasmid DNA encoding listeriolysin O. *J. Immunol.* 163:322-329.
- Corr, M., L. F. Boyd, E. A. Padlan, and D. H. Margulies. 1993. H2-D^d exploits a four residue peptide binding motif. *J. Exp. Med.* 178:1877-1892.
- Correa, I., and D. H. Raulet. 1995. Binding of diverse peptides to MHC class I molecules inhibits target cell lysis by activated natural killer cells. *Immunity* 2:61-71.
- Denis, O., A. Tanghe, K. Palfiet, F. Jurion, T. P. van den Berg, A. Vanonckelen, J. Ooms, E. Saman, J. B. Ulmer, J. Content, and K. Huygen. 1998. Vaccination with plasmid DNA encoding mycobacterial antigen 85A stimulates a CD4⁺ and CD8⁺ T-cell epitope repertoire broader than that stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection. *Infect. Immun.* 66:1527-1533.
- D'Souza, S., O. Denis, T. Scorza, F. Nzabintwali, H. Verschueren, and K. Huygen. 2000. CD4⁺ T cells contain *Mycobacterium tuberculosis* infection in the absence of CD8⁺ T cells in mice vaccinated with DNA encoding Ag85A. *Eur. J. Immunol.* 30:2455-2459.
- D'Souza, S., V. Rosseels, M. Romano, A. Tanghe, O. Denis, F. Jurion, N. Castiglione, A. Vanonckelen, K. Palfiet, and K. Huygen. 2003. Mapping of murine Th1 helper T-cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 71:483-493.
- Flynn, J. L., M. M. Goldstein, K. J. Tricbold, B. Koller, and B. R. Bloom. 1992. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:12013-12017.
- Geluk, A., K. E. van Meijgaarden, K. L. Franken, J. W. Drijfhout, S. D'Souza, A. Necker, K. Huygen, and T. H. Ottenhoff. 2000. Identification of major epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* AG85B that are recognized by HLA-A*0201-restricted CD8⁺ T cells in HLA-transgenic mice and humans. *J. Immunol.* 165:6463-6471.
- Graff-Dubois, S., O. Faure, D. A. Gross, P. Alves, A. Scardino, S. Chouaib, F. A. Lemonnier, and K. Kosmatopoulos. 2002. Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted epitope shared by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy. *J. Immunol.* 169:575-580.
- Huygen, K., E. Lozes, B. Gilles, A. Drowart, K. Palfiet, F. Jurion, I. Roland, M. Art, M. Dufaux, J. Nyabenda, J. D. Bruyn, J.-P. Van Vooren, and R. DeLeys. 1994. Mapping of TH1 helper T-cell epitopes on major secreted mycobacterial antigen 85A in mice infected with live *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 62:363-370.
- Huygen, K., J. Content, O. Denis, D. L. Montgomery, A. M. Yawman, R. R. Deck, C. M. DeWitt, I. M. Orme, S. Baldwin, C. D'Souza, A. Drowart, E. Lozes, P. Vandenbussche, J. P. Van Vooren, M. A. Liu, and J. B. Ulmer. 1996. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat. Med.* 2:893-898.
- Jung, G., B. Fleckenstein, F. von der Mulbe, J. Wessels, D. Niethammer, and K. H. Wiesmuller. 2001. From combinatorial libraries to MHC ligand motifs, T-cell superagonists and antagonists. *Biologicals* 29:179-181.
- Kamath, A. T., C. G. Feng, M. Macdonald, H. Briscoe, and W. J. Britton. 1999. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 67:1702-1707.
- Karre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek, and R. Kiessling. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319:675-678.
- Kaufmann, S. H. 1988. CD8⁺ T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol. Today* 9:168-174.
- Kaufmann, S. H. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* 11:129-163.
- Kaufmann, S. H. 2000. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat. Med.* 6:955-960.
- 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.
- Lozes, E., K. Huygen, J. Content, O. Denis, D. L. Montgomery, A. M. Yawman, P. Vandenbussche, 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.
- Mathis, D. J., C. Benoist II, V. E. Williams, M. Kanter, and H. O. McDevitt. 1983. Several mechanisms can account for defective E α gene expression in different mouse haplotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:273-277.
- Miki, K., T. Nagata, T. Tanaka, Y.-H. Kim, M. Uchijima, N. Ohara, S. Nakamura, M. Okada, and Y. Koide. 2004. 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.* 72:2014-2021.
- Munk, M. E., J. De Bruyn, H. Gras, and S. H. Kaufmann. 1994. The *Mycobacterium bovis* 32-kilodalton protein antigen induces human cytotoxic T-cell responses. *Infect. Immun.* 62:726-728.
- Ohara, N., H. Kitaura, 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.
- Ohara, N., N. Ohara-Wada, H. Kitaura, T. Nishiyama, S. Matsumoto, and T. Yamada. 1997. Analysis of the genes encoding the antigen 85 complex and MPT51 from *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.* 65:3680-3685.
- Orme, I. M. 1988. Induction of nonspecific acquired resistance and delayed-type hypersensitivity, but not specific acquired resistance in mice inoculated with killed mycobacterial vaccines. *Infect. Immun.* 56:3310-3312.
- Pablos-Méndez, A., M. C. Raviglione, A. Laszlo, N. Binkin, H. L. Rieder, F. Bustreo, D. L. Cohn, C. S. Lambregts-van Weezenbeek, S. J. Kim, P. Chaullet, and P. Nunn. 1998. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N. Engl. J. Med.* 338:1641-1649.

33. Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan. 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* 152:163-175.
34. Porcelli, S. A., and R. L. Modlin. 1999. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol.* 17:297-329.
35. Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor, and S. Stevanovic. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213-219.
36. Rolph, M. S., B. Raupach, H. H. Kobernick, H. L. Collins, B. Perarnau, F. A. Lemonnier, and S. H. Kaufmann. 2001. MHC class Ia-restricted T cells partially account for β 2-microglobulin-dependent resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.* 31:1944-1949.
37. Ronning, D. R., T. Klabunde, G. S. Besra, V. D. Vissa, J. T. Belisle, and J. C. Sacchettini. 2000. Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drugs and vaccines. *Nat. Struct. Biol.* 7:141-146.
38. Schaible, U. E., H. L. Collins, F. Priem, and S. H. Kaufmann. 2002. Correction of the iron overload defect in β -2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *J. Exp. Med.* 196:1507-1513.
39. Silver, R. F., R. S. Wallis, and J. J. Ellner. 1995. Mapping of T cell epitopes of the 30-kDa α antigen of *Mycobacterium bovis* strain bacillus Calmette-Guerin in purified protein derivative (PPD)-positive individuals. *J. Immunol.* 154:4665-4674.
40. Sousa, A. O., R. J. Mazzaccaro, R. G. Russell, F. K. Lee, O. C. Turner, S. Hong, L. Van, Kaer, and B. R. Bloom. 2000. Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4204-4208.
41. Stenger, S., and R. L. Modlin. 1999. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:89-93.
42. Sterne, J. A., L. C. Rodrigues, and I. N. Guedes. 1998. Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2:200-207.
43. Tascon, R. E., E. Stavropoulos, K. V. Lukacs, and M. J. Colston. 1998. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8⁺ T cells requires the production of gamma interferon. *Infect. Immun.* 66:830-834.
44. Uchijima, M., A. Yoshida, T. Nagata, and Y. Koide. 1998. Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *J. Immunol.* 161:5594-5599.
45. Udaka, K., T. J. Tsomides, P. Walden, N. Fukusen, and H. N. Eisen. 1993. A ubiquitous protein is the source of naturally occurring peptides that are recognized by a CD8⁺ T-cell clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11272-11276.
46. Wiker, H. G., and M. Harboe. 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* 56:648-661.
47. Yanagisawa, S., M. Koike, A. Kariyone, S. Nagai, and K. Takatsu. 1997. Mapping of V β 11⁺ helper T cell epitopes on mycobacterial antigen in mouse primed with *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. Immunol.* 9:227-237.

Editor: S. H. E. Kaufmann

免疫と疾患

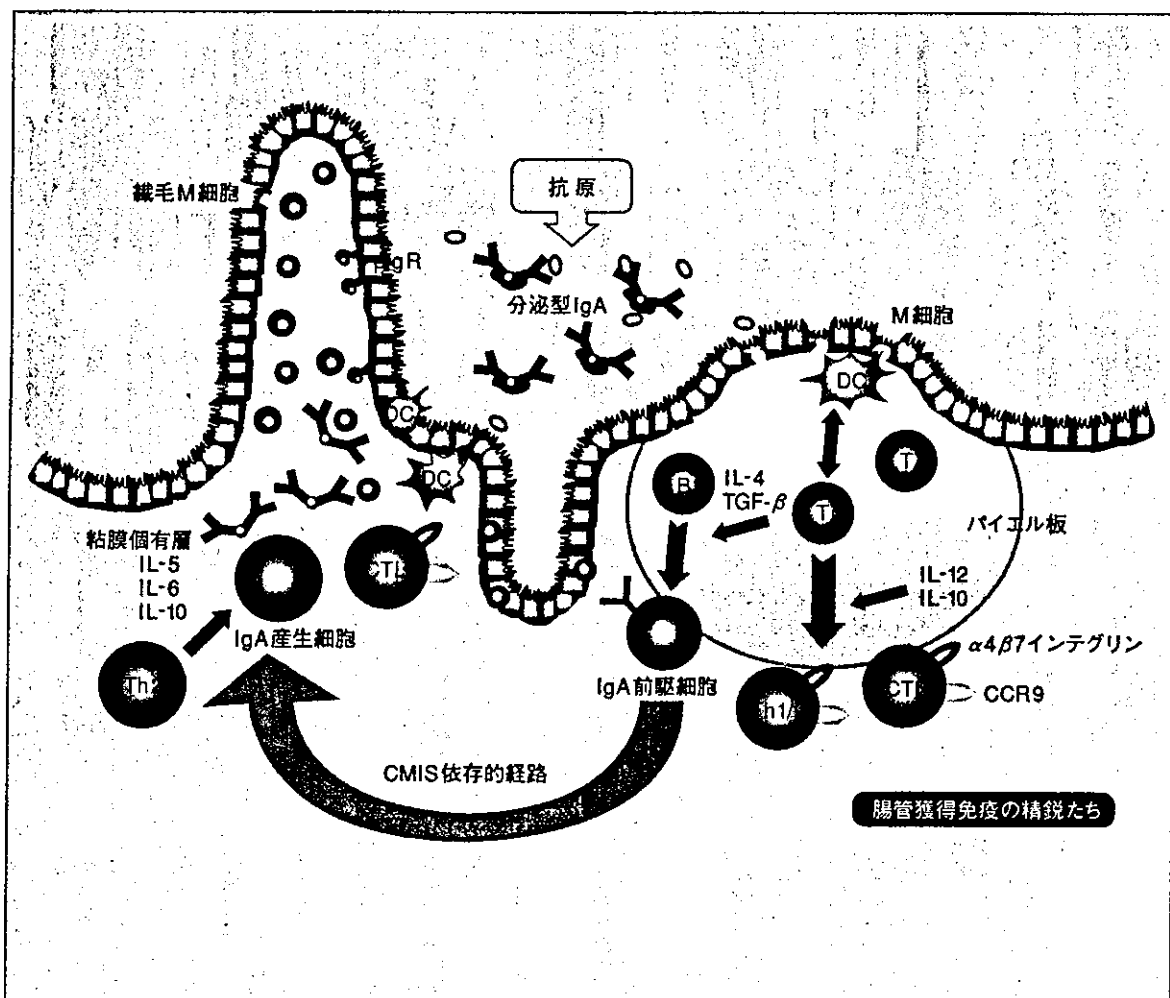
(前篇)

—自然・獲得免疫と疾患—

宮坂 信之 監修

最新医学  The Medical Frontline

2005 3月増刊号



最新医学社

● 自然・獲得免疫と疾患

結 核

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

|| 要 旨 ||

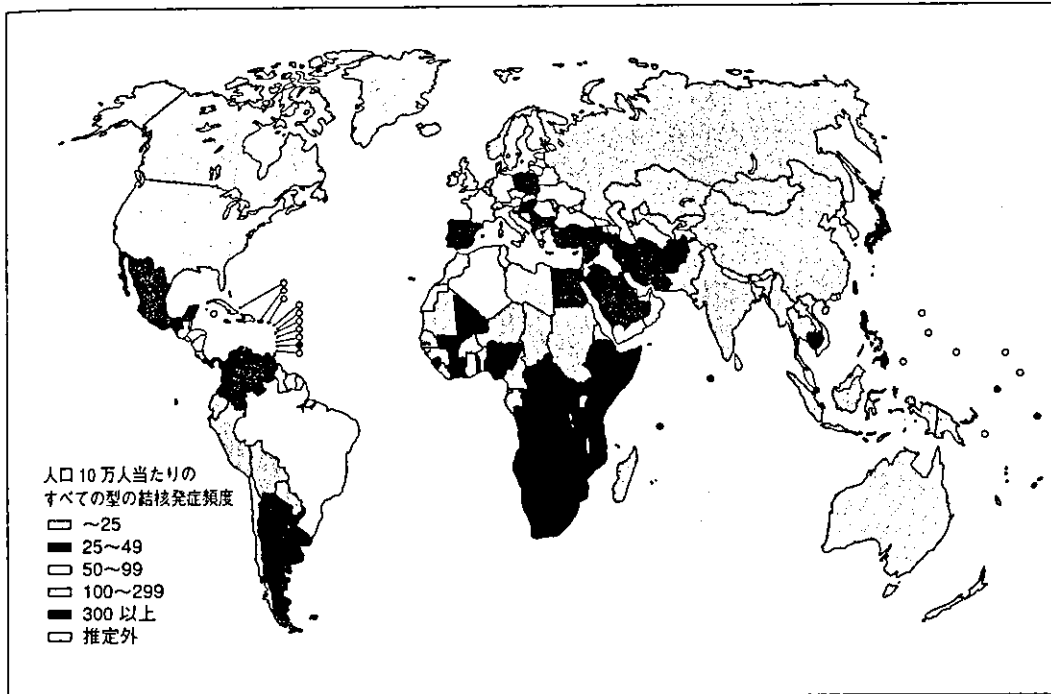
結核症は毎年 800 万人発症, 200 万人が死亡の世界最大の感染症である。結核に対する宿主抵抗性は獲得免疫の T 細胞免疫, 特にキラー T, Th1 細胞, 我々が示した結核菌殺傷タンパク質 granulysin が重要である。一方, TLR などを経る結核自然免疫も明らかとなりつつある。我々は世界に先駆けて BCG より 100 倍強力な Hsp65 + IL-12 DNA ワクチンを開発した。T 細胞免疫を経る結核予防ワクチン効果を示した。

はじめに

結核は, いまだに世界の 1/3 の 20 億人が結核菌に感染しており, その中から毎年 800 万人の結核患者が発症し, 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 (図 1 WHO レポート 2002 年)¹⁻⁴⁾。本邦でも 1998 年から結核罹患率の増加・横ばいが認められ, 1999 年“結核緊急事態宣言”が厚生省より出された。結核症に対する宿主の抵抗性イコール細胞性免疫とって過言ではない。特に獲得免疫 (キラー T 細胞と Th1 ヘルパー T 細胞) が重要であり, 最近では自然免疫の結核への関与が再び重要視されている。1998 年, 米国 CDC は結核に対し, 政府・学術機関・企業が一体となって新世代の

キーワード: キラー T 細胞, granulysin, 結核ワクチン, 結核症,
Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン

図1 2002年度推定結核罹患率頻度



結核ワクチン開発の必要性を強く主張する発表をした。また、ACET は国民の健康に対する大敵である結核撲滅のためには、BCG に代わる有効なワクチンが必要であることを示した。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。我々は BCG よりもはるかに強力な DNA ワクチンやリコンビナント BCG ワクチンの開発に成功した (図2)⁵⁻⁸⁾。新しい抗結核ワクチン開発と結核感染免疫におけるキラーT細胞の機能解明および自然免疫の Toll-like 受容体、マクロファージ (Mφ) と結核についても述べる⁹⁾¹⁰⁾。

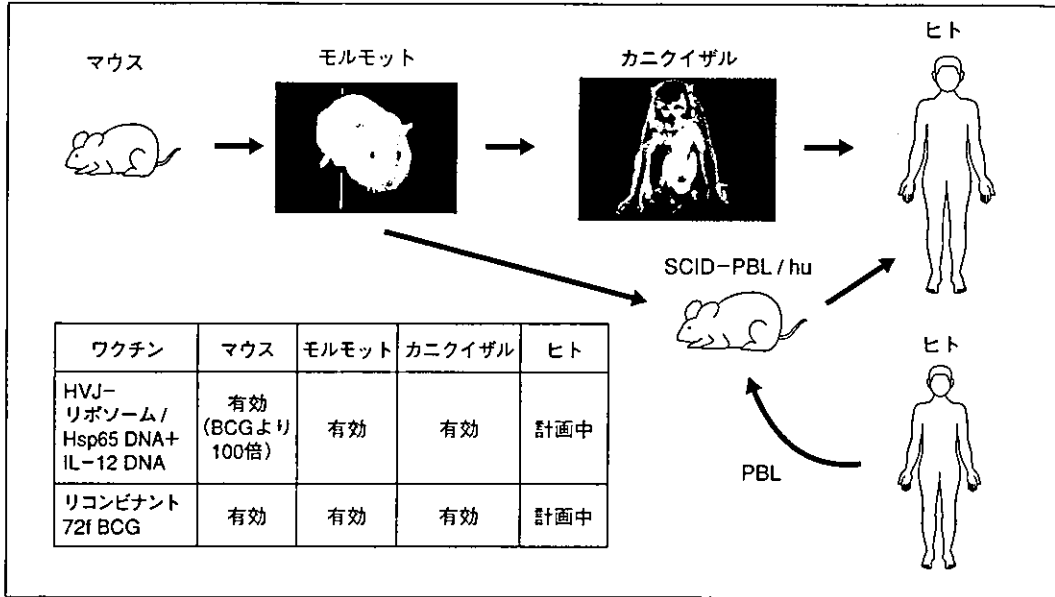
結 核 症

1. 結核症の現状

結核症は最大の再興感染症で、HIV 感染に伴う結核合併症や多剤耐性結核が大きな問題である。

2000 年の本邦結核死亡率は 10 万人に 2.1、罹患率は 31.0 である。日本の結核罹患率は、欧米の約 5 倍も高く、アジア (中国、インドな

図2 新しい結核ワクチンの開発



略語：巻末の「今号の略語」参照

ど) やアフリカ地域に多い。

感染した人の5～10%の人が発病し、発病は免れた人でも1/3以上の人には結核菌を身体の中に抱えたまま高齢に達している。結核菌は身体の抵抗力（免疫力）によって抑え込まれ冬眠状態（dormacy）になっている。高齢、糖尿病、エイズ、副腎皮質ホルモンによる治療、慢性腎不全（人工透析）、抗関節リウマチ薬 抗 TNF α 抗体などで免疫力が低下すると、冬眠していた結核菌が暴れ出す。

2. BCG ワクチン

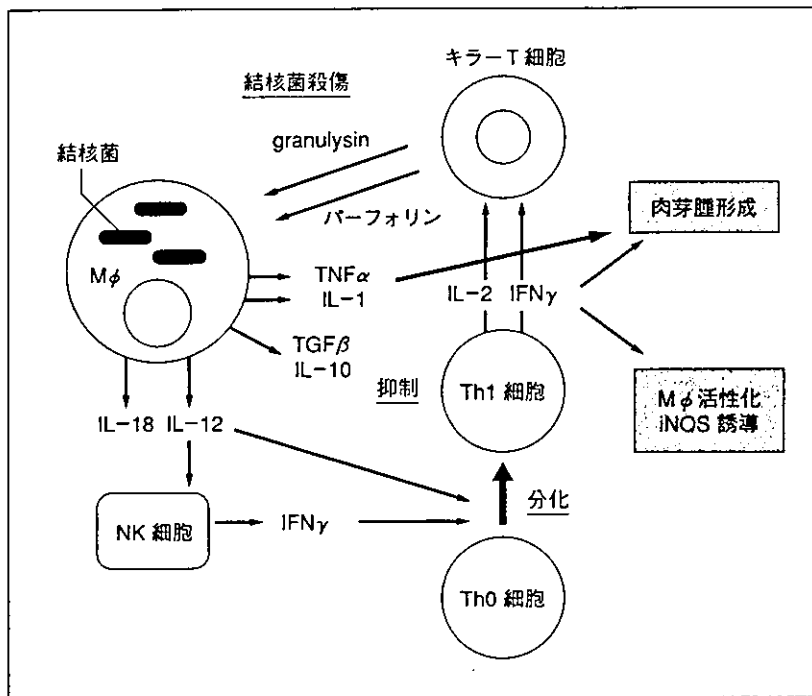
BCG は結核予防ワクチンとして、本邦では 2003 年 3 月まで小児、小、中学生の予防ワクチンとして使用されてきた。しかし、小児結核（特に結核性髄膜炎）には有効であるが成人に対してのワクチン効果は、ばらつきが大きく賛否両論であり、本邦でも BCG 接種は乳幼児のみと法改正がなされた¹⁰⁾。

したがって成人にも有効な新しい結核ワクチンの開発が切望されている。

3. WHO STOP TB Partnership

新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され WHO STOP TB

図3 抗結核免疫とマクロファージ、ヘルパーT細胞、キラーT細胞活性化



Mφ：マクロファージ
略語：巻末の「今号の略語」参照

Partnership および WHO STOP TB VACCIENE GROUP MEETING メンバーに選出された。

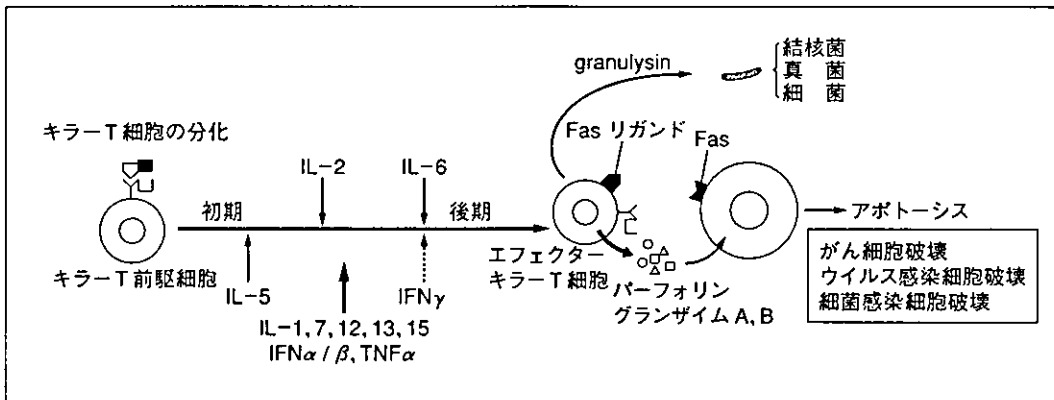
参考文献と略語

結核感染に対する免疫力は Mφ, CD4⁺T細胞, NK 細胞, γδT細胞, キラーT細胞 (CD8⁺Tと CD8⁻T) および肉芽腫形成の総合的な抵抗力である (図3)。また, 1998年 Nature に結核菌 H37Rv ゲノム全塩基が掲載され, 遺伝子レベルで結核免疫を解析しうることになった¹³⁾。

1. キラーT細胞 (CD8⁺T細胞)

CD8 あるいは β₂ ミクログロブリン遺伝子や TAP 遺伝子ノックアウトマウスでは抗結核免疫が十分でなく, 動物は死亡する。すなわち, 結核における CD8⁺T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である (図4)。

図4 キラーT細胞活性化と細胞傷害機構

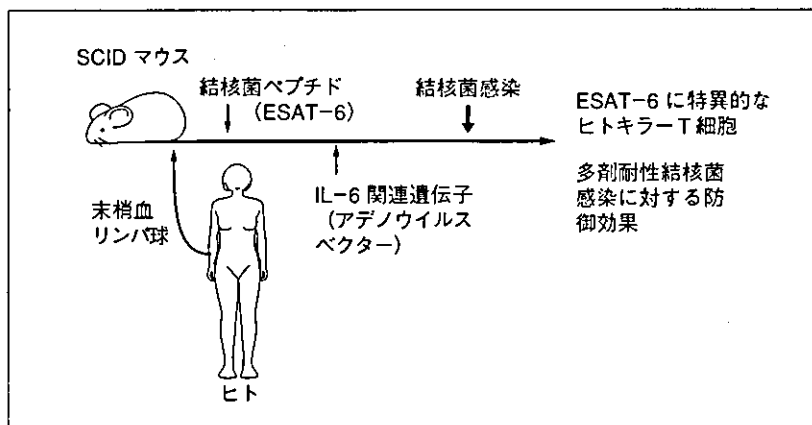


略語：巻末の「今号の略語」参照

キラーT細胞の1つの役割として IFN γ を分泌して抗結核免疫に寄与するが、次に述べる結核感染 M ϕ を殺して、結核菌の増殖の場をなくし結核菌を殺す役割の方が重要である。CD8⁺T細胞が結核菌で感染した M ϕ を Fas 依存性、顆粒依存性の機構で溶かし、最終的には結核菌を殺すことが報告されている¹²⁾¹³⁾。このT細胞は CD1 拘束性でミコール酸, LAM, ホスファチジルイノシトール, グルコースモノミコール酸, イソプレノイド糖脂質 (Cdlc と結合) などの結核菌脂質とリポグリカンを認識する。このキラーT細胞の顆粒内のタンパク質である granulysin は直接細胞外の結核菌を殺す。この機序は結核菌細胞膜を不完全な状態にすることによる。granulysin は病原細菌, 真菌, 寄生虫の生存を減少させる。さらにパーフォリンとの共存下で M ϕ 内の結核菌も殺すと考えられている。これはパーフォリンにより M ϕ に穴が開き, M ϕ 内の結核菌に直接 granulysin が作用するためと思われる。我々は結核患者, 特に多剤耐性結核患者ではキラーT細胞の mRNA の発現およびタンパク質の発現が低下していることを明らかにした⁵⁾⁷⁾。すなわち, 我々はキラーT細胞の granulysin (分子量 9,000) 産生低下が多剤耐性結核発症と大きな関連があるのではないかと考えている。一方, キラーT細胞の TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) とパーフォリンが抗結核免疫に重要である興味深い結果を得た。

一方, MHC クラス I 拘束性の結核菌の 38 kD タンパク質, Hsp65

図5 SCID-PBL/hu マウスを用いた結核菌ペプチドに特異的なヒトキラーT細胞の *in vivo* における誘導



略語：巻末の「今号の略語」参照

タンパク質を認識するマウス $CD8^+$ キラーT細胞や 19 kD タンパク質, Ag85, CFP10 (Mtb11) を認識するヒト $CD8^+$ キラーT細胞が報告されている³⁾. ESAT-6 抗原に対するキラーT細胞で HLA-A2 とは 82~90 位の 9 個のアミノ酸 AMASTEGNV, が結合してキラーT細胞がこれらを認識する. 我々は世界に先駆けて確立した, ヒト生体内結核免疫応答解析モデル SCID-PBL/hu に, この ESAT-6 ペプチドを投与し, これに特異的で HLA-A2 拘束性を示すヒトキラーT細胞を生体内で誘導することに初めて成功した²⁾⁷⁾¹³⁾ (図5).

Reed S, Alderson MR らは結核菌に対するヒト $CD8$ 陽性キラーT細胞クローンを確立したが, HLA-A, B, C, DR, DQ, CD1 に拘束性を示さない非古典的拘束性キラーT細胞と古典的な HLA に拘束性を示すキラーT細胞クローンの2種を確立した. また I-E 領域に拘束性の結核特異的キラーT細胞も報告された.

2. キラーT細胞分化とサイトカイン (キラーT細胞分化因子)

我々は $CD8^+$ キラーT細胞 (Tc) の誘導にはヘルパーT細胞 (Th細胞) から産生されるサイトカインが必要であることを初めて明らかにした. MHC クラス II 抗原を認識しキラーT細胞分化因子を産生する Th 細胞は $CD4^+CD8^-$ であり, MHC クラス I 抗原を認識しキラーT細胞分化因子を産生する Th 細胞は $CD8^+$ である. また, モノクローナル抗 IL-2 抗体を用いて, IL-2 はキラーT細胞誘導に必須な

因子の1つであることを示した¹⁴⁾(図4)。

さらに、IL-2とは異なるサイトカインもT細胞分化誘導に必要であることをキラーT細胞分化因子を産生するヒトT細胞ハイブリドーマ、およびIL-2依存性ヒトThクローンを世界に先駆けて確立し明らかにした。その解析の結果、IL-6、IFN γ がキラーT細胞分化因子として強力なキラーT細胞分化を誘導することを明らかにした¹⁵⁾¹⁶⁾。我々はIL-6がTc誘導の後期の分化段階に作用することを解明した¹⁶⁾(図4)。多剤耐性結核患者PBLにおいて、これらのキラーT細胞分化因子すなわちIL-2、IFN γ 、IL-6の著明な低下を認めた⁵⁾⁶⁾⁸⁻¹⁰⁾。また、糖尿病合併難治性結核患者ではPPD特異的キラーT細胞の分化誘導の著しい低下を明らかにした⁵⁾⁶⁾⁸⁻¹⁰⁾。

3. サイトカインと結核免疫

抗結核免疫にIFN γ 、TNF α 、IL-6、IL-12が重要であることは解析されている。(文献⁹⁾参照)

4. Th1リンパ球、Th2リンパ球

CD4⁺T細胞が結核免疫に重要であることはMHCクラスII^{-/-}マウスやCD4^{-/-}マウス抗CD4抗体投与マウスで明らかとなっている(Th1細胞と結核免疫については総説¹⁰⁾参照)。

自然免疫と結核

1. マクロファージ (M ϕ)

結核菌の増殖場所はM ϕ 内である。一方、M ϕ は異物貪食能と細胞内殺菌能および抗原提示能を持つ。したがって結核菌が優位に立つか、ヒト(生体)が優位に立つかの戦争でもある。(詳細は文献²⁾³⁾参照)

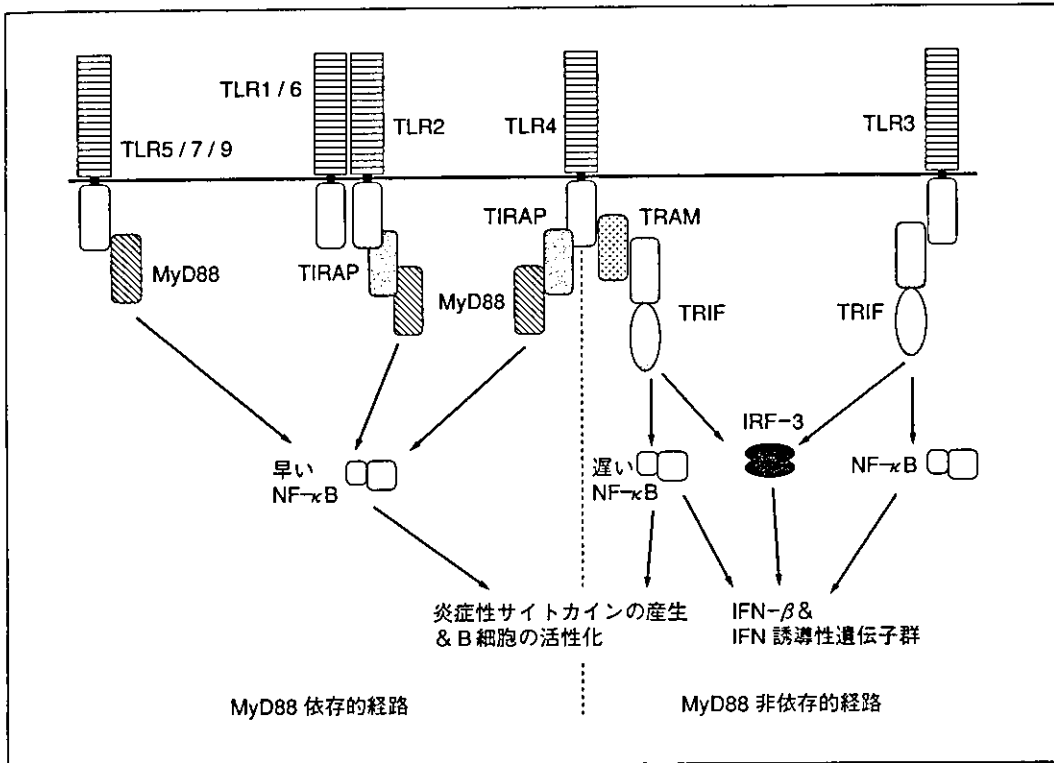
2. Toll-like受容体およびPathogen Recognition Receptorとマクロファージ・樹状細胞活性化

最近発見されたToll-like受容体(TLR)ファミリーが自然免疫の重要な役割を果たしている¹⁷⁾。

TLR(TLR1~TLR10)はそのリガンドによって大きく3つに分類される(図6)。

このうち菌体膜由来の糖脂質を認識するTLRとしては、TLR1、

図6 TIR ドメインを含むアダプター分子群による TLR シグナル伝達経路の制御 (文献²¹⁾ より引用改変)



略語：巻末の「今号の略語」参照

TLR2, TLR4, TLR6, TLR9 である。

結核菌の細胞壁 (LAM, mAGP, total lipid) による応答は TLR2 を介する (表 1)。一方, 結核生菌に対する反応には TLR2 と TLR4 が必要である。病原株の *M. tuberculosis* 由来の Man LAM は Mφ を活性化しないが, 非病原性の抗酸菌は異なる glycolipid Ara LAM よりなり, これは TLR2 を介して Mφ を活性化する。この差が発病の差となる可能性もある。結核菌体成分 19 kD のリポタンパク質が TLR2 を介して Mφ を活性化する。また, 抗酸菌 DNA から見いだされた CpG モチーフ (パリンドローム配列) は感染防御免疫能を増強することが示されていたが, CpG 受容体に対する TLR9 が審良らによりクローニングされた。

TLR2 の場合, 細胞内領域の 2 つの変異 (Arg753Gln と Arg677Trp) が認められ, Arg753Gln は敗血症にかかりやすく, Arg677Trp はア

表1 TLRと結核菌体成分

結核菌体成分	受容体
LAM	TLR2
CWS	TLR2 / 4
ペプチドグリカン	TLR2 / 4
19-kDa リポタンパク質	TLR2
CpG リPEAT	TLR9

略語：巻末の「今号の略語」参照

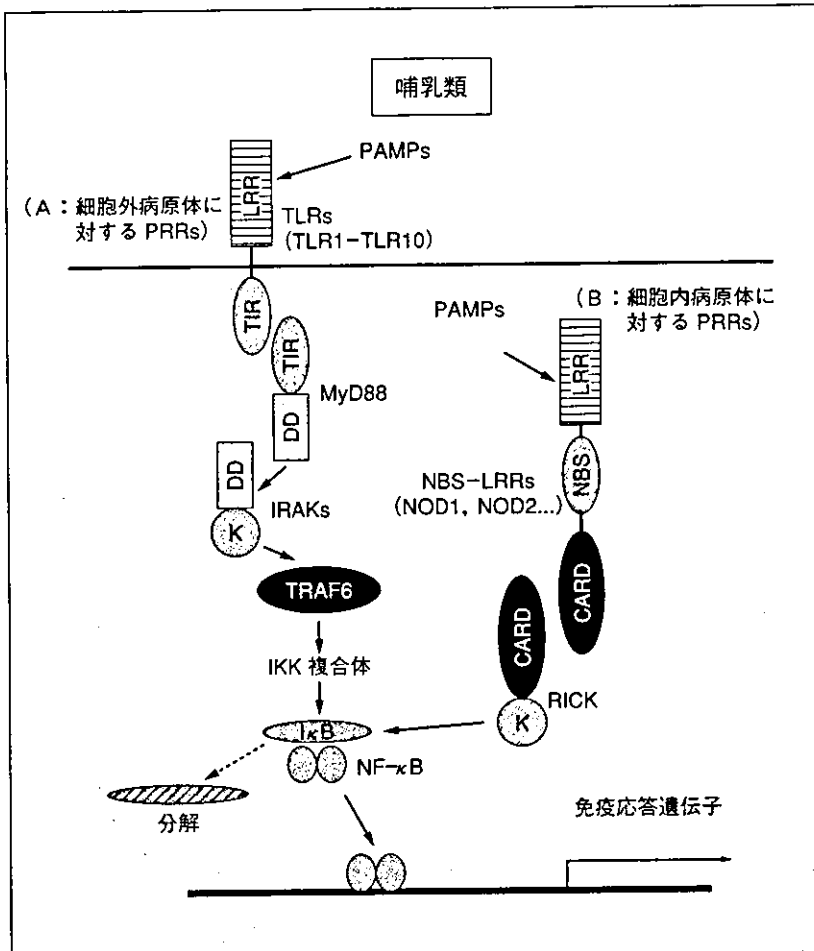
ジア人において *M. leprae* による結節性ハンセン症と関連している。

TLR はそれぞれ病原微生物由来の構成成分を認識する。TLR シグナルを介するシグナル伝達経路には MyD88 を介する MyD88 依存的経路と MyD88 を介さない MyD88 非依存的経路の2つが存在する。主に前者はすべての TLR を介した炎症性サイトカインの産生を、後者は主に TLR3・TLR4 を介したインターフェロン (IFN) および IFN 誘導性遺伝子群の産生を担う。

この MyD88 非依存的経路を担うアダプター分子が TRIF である。TRIF が TLR3 と TLR4 の MyD88 非依存的経路に共有されているのに対し、TRAM は MyD88 非依存的 (TRIF 依存的) 経路を TLR4 シグナルに特異的に与えるアダプター分子である。また、TIRAP はすべての TLR に共有された MyD88 依存的経路を、TLR1, 2, 6 と TLR4 にシグナル特異的に与える役割をもつ。我々は竹田との共同研究で TRIF^{-/-} × MyD88^{-/-} ダブルノックアウトマウスを用い、結核菌に対する易感染性を解析しつつある。

TLR 以外にも PRR (pathogen recognition receptor) として DC-SIGN, NOD ファミリー, マンノース受容体, スカベンジャー受容体, dectin-1 が挙げられる。HIV や *M. tuberculosis* は DC-SIGN に結合して樹状細胞に入り込むが、その際、その TLR による自然免疫機構の活性化を抑制し、これらの病原体の生存を有利にする機構が働いていることが示された。NOD1, NOD2 を中心とする CARD ファミリーの分子は、膜貫通領域を持たず、細胞質タンパク質として存在する (図7)。NOD2 は、古くより菌体由来の免疫調整物質として知られていた PGN の構成成分であるムラミルジペプチド

図7 Pattern recognition receptors による病原体認識



A : Toll ファミリーによる細胞外病原体認識機構

B : NBS-LRRs ファミリーによる細胞内病原体認識機構

PRRs (pattern-recognition receptor)

PAMPs (pathogen associated molecular patterns)

CARD : カスパーゼ再生ドメイン, DD : 致死ドメイン, K : キナーゼドメイン,

LRR : ロイシンリッチリピート, LZ : ロイシンジッパー, NBS : 核酸結合部位,

TIR : Toll / IL-1 受容体ドメイン

略語 : 巻末の「今号の略語」参照

(MDP) を認識することが、示された。

結核免疫における自然免疫と獲得免疫の関連機構

1. Hsp タンパク質

Hsp は細胞外では自然免疫と獲得免疫をつなぐという immunity

表2 Hsp 受容体

受容体	リガンド (Hsp タンパク質抗原)
[食食受容体]	
CD91	gp96, Hsp70, Hsp90
LOX-1	Hsp70, Hsp90, gp96
CD40	Hsp70
SR-A	gp96, calreticulin
[TLR]	
TLR2	Hsp70, gp96
TLR4	Hsp70, gp96

略語：巻末の「今号の略語」参照

のシャペロン (シャペロン免疫) として機能することが明らかとなりつつある。

我々は結核菌由来の Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチンが獲得免疫 (結核菌に対する獲得免疫：結核抗原特異的キラー T 細胞の活性化およびヘルパー T 細胞の活性化) を介して結核予防ワクチン効果を発揮することを明らかにした (下記)。

一方、結核菌の Hsp65 はヒトのそれと 40～50% のアミノ酸配列の相同性を示す。

したがって、現在この Hsp と免疫活性化に結核菌由来の Hsp が関与するか解析中である。

抗原提示細胞である DC・Mφ 上には機能的には異なる 2 種類の Hsp65 に対する受容体が最近同定された。1 つは CD91, LOX-1, CD40, SR-A によるクロスプレゼンテーション受容体である。他の 1 つは TLR2, 4 などの DC の成熟, 活性化を誘導する受容体である。これは Hsp-ペプチド複合体のクロスプレゼンテーションによる CD8⁺T 細胞活性化に対するライセンスを与えている (表 2)。

2. CWS

我々は山村雄一元大阪大学総長, 東市郎博士とともに結核菌菌体成分の最小単位 MDP のアミノ酸を置換し, キラー T 細胞の分化を誘導する MDP を決定した²⁰⁾。また, *Mycobacteria bovis* に属する *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) や BCG 細胞壁成分 (cell-wall skeleton, CWS) は BCG-CWS は, ミコール酸, アラビノガラクトン,

表3 新しい結核ワクチン

1. サブユニットワクチン
Mtb72f 融合タンパク質
85B-ESAT-6 融合タンパク質
α 抗原 (Ag85B), Ag85A, MPB51, ESAT-6, Hsp65
リコンビナントサイトカイン (IFN γ など) (吸入・注射)
新しい結核菌タンパク質抗原 Mtb32, Mtb39
その他
2. DNA ワクチン
Hsp65 DNA, IL-12 遺伝子, Hsp70 DNA, ESAT-6DNA, IL-6 遺伝子, IL-6 遺伝子 + IL-6R 遺伝子 + gp130 遺伝子, IFN γ 遺伝子, Mtb72f 遺伝子, IL-15 遺伝子, IL-18 遺伝子, M-CSF 遺伝子, 38 kD DNA, キラー T 細胞誘導結核菌タンパク質抗原遺伝子, CD40L 遺伝子, MPT64 DNA, MPT63 DNA, Kat G DNA, 上記の新しい結核菌タンパク質抗原遺伝子
3. リコンビナント BCG ワクチン
Mtb72f 遺伝子
Ag85A 遺伝子, Ag85B 遺伝子, Ag85C 遺伝子, MPB51 遺伝子, MDP-1 遺伝子, Hsp65 遺伝子
IL-6 遺伝子, IFN γ 遺伝子, IL-2 遺伝子, IL-12 遺伝子, IL-18 遺伝子
キラー T 細胞誘導結核菌タンパク質遺伝子
4. 弱毒化結核菌
弱毒化サルモネラ菌に結核免疫増強 DNA 導入し, 経口ワクチン
弱毒化リステリア菌に結核免疫増強 DNA 導入し, 経口ワクチン
5. キラー T 細胞移入

略語：巻末の「今号の略語」参照

ペプチドグリカン (PGN) を基本骨格として構成されており, MDP が遅延型の発赤を起こす最小単位として同定された。BCG 菌体成分は獲得免疫のキラー T 誘導効果とともに表 1 の TLR 活性化作用も有する。このように, 自然免疫と獲得免疫は関連機構が存在し, 今後次に述べる結核ワクチンの免疫増強効果を解明するために, 重要で興味深い課題である。

新しい結核ワクチン

結核ワクチンは ① サブユニットワクチン, ② DNA 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), その他に大別される (表 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

表4 新しい結核ワクチンの開発

(1) DNA ワクチン HVJ-リボソーム/Hsp66 DNA + IL-12 DNA	BCG より有効 (マウス, モルモット, カニクイザル)
(2) リコンビナント BCG ワクチン ① リコンビナント 72f BCG ② リコンビナント (Ag85A + 85B + MPBS1) BCG	BCG より有効 (マウス, モルモット, カニクイザル) BCG より有効 (マウス)
(3) サブユニットワクチン Mtb 72f 融合タンパク	BCG より有効 (カニクイザル) 多剤耐性結核患者 T細胞機能増強活性 (+) 第 I 相臨床試験
(4) 治療ワクチン IL-6 関連 DNA (マウス)	
(5) プライム-ブースター法 BCG (プライミング) + 新しいワクチン (ブースター) (カニクイザル)	
(6) 遺伝子ノックアウト弱毒化リステリアを用いた新しい結核ワクチン (経口)	
(7) 新しいベクター AAV ベクター (1,000 倍発現高率↑), アデノウイルスベクター -WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB Vaccines Working Group に選出	

略語: 巻末の「今号の略語」参照

は極めて少ない。我々は Hsp65 DNA + IL-12 DNA 予防ワクチンにて BCG ワクチンの 100 倍強力なワクチンの開発に成功した⁶⁾⁷⁾⁹⁾ (表 4)。

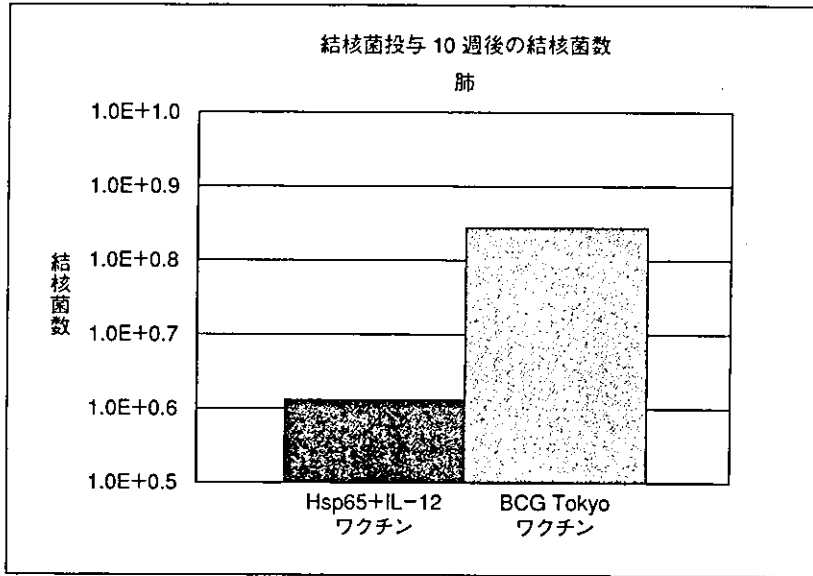
1. DNA ワクチン

我々は ① IL-12 DNA + Hsp65 DNA のワクチンが相乗効果を示し、遺伝子銃 (gene gun) を用いた遺伝子投与で BCG よりも極めて強力な (約 100 倍) 結核予防ワクチンであることを明らかにした (自治医科大学吉田博士との共同研究) (表 4)。IL-12 の p35 および p40 を CMV プロモーター下流域に挿入した発現プラスミドを作製した。さらに、ヒト型結核菌 H37RV 由来 Hsp65 DNA ワクチンの作製に成功した (図 8)。

HVJ リボソームをベクターに用いた場合、Hsp65 DNA 単独 (HVJ リボソーム/Hsp65) で BCG よりも有効であることをマウスの系で明らかにした (大阪大学医学部金田博士との共同研究) (表 4)。

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 遺伝

図8 Hsp65DNA+IL-12DNA ワクチンによる BCG より 100 倍強力な抗結核ワクチン効果 (マウス)



略語：巻末の「今号の略語」参照

子 + IL-6 受容体遺伝子 + gp130 遺伝子) ワクチンは, BCG よりも強力な治療ワクチン効果を示した⁶⁾⁷⁾⁹⁾.

以上のワクチン効果は, キラーT細胞や Th1 細胞の分化誘導を増強することによって発揮されることが示された⁶⁾⁷⁾⁹⁾.

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 VACCIENE GROUP MEETING メンバーに選出された.

一方, Huygen らは, Ag85A の DNA ワクチンを用い, マウスで抗原特異的キラーT細胞 (CTL) が誘導されることや, BCG 免疫と同等の防御効果が得られることを明らかにした.

2. リコンビナント BCG ワクチン

結核菌は 300 種以上のタンパク質を分泌するが, α 抗原 Ag 85B とそのファミリー (85A, Ag85C) DNA をリコンビナント BCG に使用した²⁾⁵⁾.

これらの遺伝子を PNN2 シャトルベクター (大腸菌⇄好酸菌) に組み込み BCG 東京菌に, 遺伝子を導入した. 我々は BA51