

表1 新しい結核ワクチン

①サブユニットワクチン
Mtb72f 融合蛋白質
85B-ESAT-6 融合蛋白質
α 抗原 (Ag85B), Ag85A, MPB51, ESAT-6, Hsp65
19kDa リボ蛋白質
リコンビナントサイトカイン (INF- γ など) (吸入・注射)
新しい結核菌蛋白質抗原 Mtb8.8, Mtb9.9, Mtb32, Mtb39, Mtb11
そのほか
②DNA ワクチン
Hsp65 DNA, IL-12 遺伝子, Hsp70 DNA, ESAT-6 DNA, 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, 38kDa DNA, キラー
T 細胞誘導結核菌蛋白質抗原遺伝子, CD40L 遺伝子, MPT64 DNA,
MPT63 DNA, Kat G DNA, 上記の新しい結核菌蛋白質抗原遺伝子
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, ESAT-6 遺伝子,
HSP85 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 細胞誘導結核菌蛋白質抗原遺伝子
④attenuated 結核菌
attenuated サルモネラ菌に結核免疫増強 DNA を導入した経口ワクチン
attenuated リステリア菌に結核免疫増強 DNA を導入した経口ワクチン
⑤キラー T 細胞移入

プラスミド, ③アデノウイルスベクター, ④HVJ リポソーム, ⑤改良型 HVJ エンベロープベクターを計画中である^{4-7, 15, 16, 23, 24}。

マウスでは BCG ワクチンを凌駕する新しい結核ワクチンはきわめて少ない。われわれは, HSP65 DNA+IL-12 DNA 治療にて BCG ワクチンの 100 倍強力なワクチンを開発した^{4, 5, 7}(表 2)。

■ DNA ワクチン

われわれは, ① IL-12 DNA+Hsp65 DNA のワクチンが相乗効果を示し, 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明らかにした(自治医科大学 吉田博士との共同研究)(表 2)。IL-12 の p35 および p40 を CMV プロモーター

下流領域に挿入した発現プラスミドを作製した。さらに, Hsp65 DNA ワクチンも作製した。

HVJ リポソームをベクターに用いた場合, Hsp65 DNA 単独(HVJ リポソーム/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 金田教授との共同研究)(表 2)。また, 後述の Hsp65 rBCG で初回免疫し HVJ リポソーム/Hsp65 DNA で追加免疫をかける priming-booster 法がより有効であることを明らかにした。アデノウイルスベクター (E1a, E1b, E3 領域を欠損させたヒト 5 型アデノウイルスベクターで非増殖性・非感染性に優れたベクター)に導入した IL-6 関連遺伝子(IL-6 遺伝子+IL-6 レセプター遺伝子+gp130 遺伝子)ワクチンは, BCG よりも強力な治療・予防ワクチン効果を示した(図 3)。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・誘導および Th1 サイトカイン(IL-2 および IFN- γ)の産生誘導を介して抗結核効果を発揮した^{4, 5, 7}。

アデノウイルスベクターに導入した IFN- γ DNA も BCG よりも強力な治療・予防ワクチン効果を示した^{4, 5, 7}。

以上 4 つのワクチン効果は, 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^{4, 5, 7}。

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²⁸。

■リコンビナント BCG ワクチン

結核菌は 300 種以上の蛋白質を分泌するが, 特にわれわれの共同研究者である長崎大学の山田博士らがクローニングした α 抗原 Ag85B とそのファミリー(Ag85A, Ag85C)が有名である。

これらの遺伝子を PNN2 シヤトルベクター(大腸菌 \leftrightarrow 好酸菌)に組み込み, BCG 東京菌に遺伝子を導入した。われわれは BA51(Ag85A+Ag85B+MPB51)rBCG は BCG よりも強力なワクチンで

表2 新しい結核ワクチン・診断法・治療モデルの開発

新しい結核ワクチン	
①サブユニットワクチン Mtb72f	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(+)
②DNA ワクチン Hsp65 DNA + IL-12 DNA HVJ リボソーム/Hsp65 DNA IL-6 関連遺伝子ワクチン (IL-6 DNA + IL-6R DNA + gp130 DNA) IFN- γ 遺伝子ワクチン	BCGより有効(マウス)100倍強力 BCGより有効(マウス) キラー T細胞活性増強 予防ワクチン・治療ワクチン
③リコンビナント BCG ワクチン (Ag85A + Ag85B + MPB51) リコンビナント Ag85B リコンビナント, Ag85A リコンビナント MDP-1 リコンビナント	BCGより有効(マウス) キラー T細胞活性増強 BCGより有効(マウス) BCGより有効(マウス)
新しい診断法 (DPPD)	
①ツベルクリン反応に代わる結核特異的診断 DPPD 蛋白質の遺伝子クローニングに成功	モルモット-結核感染特異的 ヒト (<i>in vitro</i>) ヒト (skin test)
新しい子後診断法 (キラー T細胞活性) 多剤耐性結核患者 CDB ⁺ キラー T細胞の granulysin mRNA 発現↓ (パーフォリン+ TRAIL)発現が重要	
ヒト生体内結核ワクチン解析モデル SCID-PBL/hu に ESAT-6 抗原を注射	
	ESAT-6に対するヒトキラー T細胞↑↑

あることを静脈感染の系および気道感染の系で明らかにした。さらに Ag85B rBCG ワクチン, Ag85A rBCG ワクチンや MDP1 rBCG ワクチンでも BCG 東京菌よりも強力なワクチン効果を得た^{4,5,7)}。また、結核菌の増殖がきわめて遅いことを調節する DNA 結合蛋白 MDP1 (結核免疫抗原性も Ag85B より強い) をコードする遺伝子を BCG に組み込み rBCG を作製し、BCG 東京よりも強力なワクチン効果を得た。IL-2 rBCG, IL-6 rBCG, IFN- γ rBCG, HSP65 rBCG を作製した。さらに最近、サブユニットワクチンでサルレベルで強力な予防効果が得られた Mtb72f 融合蛋白質の DNA を導入した Mtb72f-DNA rBCG の作製に成功した(以上は、山田 毅, 大原直也, 大塚研究所 松本 真博 博士らの共同研究)。

018 ● 130 — 臨床と微生物 Vol.29 No.2 2002.3.

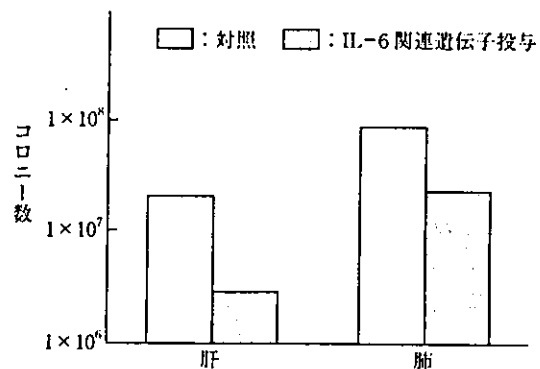


図3 IL-6 関連遺伝子(DNA)による結核ワクチン効果
ヒト型結核菌(H37RV) 5×10^5 個を静脈投与した Balb/c マウス (結核感染マウス) に、IL-6 関連遺伝子(IL-6 遺伝子 + IL-6 レセプター遺伝子 + gp130 遺伝子) をアデノウイルスベクターに挿入した DNA ワクチンを腹腔内投与した。結核菌感染後 4 週後の肺および肝の結核菌数を小川培地に培養してコロニー数で測定した。

■サブユニットワクチン

Reed 博士らは、Mtb72f 融合蛋白質(Mtb39 と Mtb32 の融合蛋白質)のサブユニットワクチンが カニクイザル(cynomolgus monkey, 最もヒトの肺結核に近いモデル。Nat Med 2 : 430, 1996 参照)で BCG よりも強力な予防ワクチン効果(生存率, 血沈, 体重, 肺の組織)を示すことを明らかにした^{4, 6, 27)}(表 2)。われわれは、ヒトの *in vitro* 系でも Mtb72f 融合蛋白質を用いて免疫応答が増強することを示し、ヒトへの臨床応用が最も近い、結核ワクチンを開発した(Reed 博士らとの共同研究)。そのほかにも種々の結核菌蛋白質抗原遺伝子のクローニングに成功し、サブユニットワクチン(Mtb72f, Mtb39, 32, 8.4, 11, 41, 9.9, 16, 40, 31f, 71f)で *in vitro* 刺激したところ、多剤耐性結核患者の T 細胞免疫能が増強した⁴⁾(表 1)。

■結核ワクチンの臨床応用への方向性

現在、最も有力なワクチンとして、Mtb72f 融合蛋白質サブユニットワクチン HVJ リポソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNA(岡田ら、カニクイザルで解析計画)があげられる。次の有力候補として Ag85B-ESAT-6 融合蛋白質(Anderson 博士ら)があげられる。いまだ臨床応用されている新しい結核ワクチンは報告されていないが、臨床応用ワクチン候補の筆頭としては Mtb72f 融合蛋白質サブユニットワクチンがあげられる。1 年以内に第 I 相臨床応用試験が計画されている。さらにわれわれは、Mtb72f DNA を BCG, または HVJ リポソームに組み込み、強力なワクチン開発を目指している^{4, 5, 7)}。

BCG ワクチンよりもはるかに切れ味の鋭い新しい結核ワクチン(DNA ワクチン, サブユニットワクチン)を開発した。近い将来 Mtb72f サブユニットワクチンが臨床応用されることや Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチンの臨床応用

されることも夢ではないと思われる。

(謝辞等)

当国立療養所近畿中央病院は呼吸器疾患(結核を含む)準ナショナルセンターとなった。日本の結核患者数の 43% の診断・治療を行っている国立病院・療養所 54 施設を統括し、国立病院・療養所呼吸器ネットワークを用い、結核の新しい予防・治療法の確立を全国規模で行う計画である。

自治医科大学 吉田栄人, 長崎大学 山田 毅, 大原直也, 大阪大学 金田安史, 大塚研究所 松本 真, 東京大学医科学研究所 齊藤 泉, BML 総合研究所 高森, 永田, Corixa 研究所 Reed 各博士らとの共同研究。厚生科学研究費新興・再興感染症研究事業「抗結核キラー T リンパ球とリコンビナント BCG-DNA ワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法」(岡田班)の大型プロジェクトの支援を得た。また共同研究者の当臨床研究センター井上 義一博士, 研究員の方々(喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永山紀子, 森 珠里, 金丸典子, 岡 美穂, 松本久美各氏)に深謝します。

- 1) 螺良英郎, 山中正彰, 岡田全司: 結核菌の逆襲, 再興感染症としての結核。感染・炎症・免疫 28 : 38-39, 1998.
- 2) 岡田全司: 免疫低下と結核。臨床科学 35 : 344-351, 1999.
- 3) Flynn JL, Chan J : Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19 : 93-129, 2001.
- 4) 岡田全司: 抗結核キラー T リンパ球とリコンビナント BCG-DNA ワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法(H-11-新興-2)。厚生科学研究費補助金実績報告書・研究報告書, p1-140, 2001.
- 5) Okada M, Tanaka T, Inoue Y *et al.* : New (DNA-recombinant BCG- and subunit-) vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity. p127-134. The 36th Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, 2001.
- 6) Gillis S, Okada M : New therapy, diagnosis and protection using recombinant BCG-, DNA- vaccination and cytotoxic T lymphocytes against *Mycobacterium tuberculosis* : new vaccine and new diagnosis. p355-359. 平成 12 年度新興・再興感染症研究推進事業研究報告集, 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団, 2001.
- 7) Okada M, Tanaka T, Inoue Y *et al.* : DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity in the patients with multi-drug resistant tuberculosis. p197-201. The 35th Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, 2000.
- 8) Okada M, Yoshida S, Ohara N *et al.* : Novel DNA and recombinant BCG vaccinations against tubercu-

- losis by the augmentation of cytotoxic activity. the Awaji International Forum on Infection and Immunity, p49, 2001.
- 9) Okada M, Yoshida S, Ohara N *et al.* : DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis by the augmentation of cytotoxic activity. *FASEB J* 15 : 1008, 2001.
 - 10) 岡田全司, 岸本忠三: リンホカインとモノカイン, 新内科学体系 年刊版 '84-C, p221-225, 山村雄一ほか監, 中山書店, 東京, 1984.
 - 11) 岡田全司: サイトカインと腫瘍免疫, 新医科学大系 8B 免疫応答-生体の防御機構 II, p269-284, 石井威望ほか編, 中山書店, 東京, 1996.
 - 12) Tanaka F, Abe M, Akiyoshi T *et al.* : The anti-human tumor effect and generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes by the *in vivo* transfer of the interleukin-6 gene using adenovirus vector. *Cancer Res* 57 : 1335-1343, 1997.
 - 13) Okada M, Yoshimura N, Kaieda T *et al.* : Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 7718-7721, 1981.
 - 14) Okada M, Sakaguchi N, Yoshimura N *et al.* : B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas : two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. *J Exp Med* 157 : 583-590, 1983.
 - 15) 岡田全司: 結核治療ワクチンと分子医学. 現代医療 32 : 83-88, 2000.
 - 16) 岡田全司: 新しい抗結核ワクチンの開発の現状, 第77回日本結核病学会総会シンポジウム「結核免疫学の動向と課題」, 2002.
 - 17) 岡田全司, 田中高生: 結核ワクチンの新しいストラテジー. 免疫・Immunology Frontier 10 : 2000-2008, 2000.
 - 18) Okada M, Klimpel GR, Kuppers RC *et al.* : The differentiation of cytotoxic T cells *in vitro*. I. Amplifying factor(s) in the primary response is Lyt1+cell dependent. *J Immunol* 122 : 2527-2535, 1979.
 - 19) Okada M, Yoshimura N, Ichimori Y *et al.* : Immunologic and molecular characterizations of T cell-derived T cell activating factor. *J Immunol* 136 : 1288-1294, 1986.
 - 20) Okada M, Kitahara M, Kishimoto S *et al.* : IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. *J Immunol* 141 : 1543-1549, 1988.
 - 21) Campos-Neto A, Rodrigues-Junior V, Pedral-Sampaio DB *et al.* : Improvement of the Mantoux test with a single and defined recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein. *Tubercle* (in press)
 - 22) Campos-Neto A, Rodrigues-Junior V, Pedral-Sampaio DB *et al.* : Improvement of the Mantoux test with a single recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein. US-JAPAN Cooperative Medical Science Program, p196-200, The 36th Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, 2001.
 - 23) Hess J, Schaible U, Raupach B *et al.* : Exploiting the immune system : toward new vaccines against intracellular bacteria. *Adv Immunol* 75 : 1-88, 2000.
 - 24) Anderson P : TB vaccines : progress and problems. *Trends Immunol* 22 : 160-168, 2001.
 - 25) Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL *et al.* : Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 400 : 269-271, 1999.
 - 26) Alderson MR, Bement T, Day CH *et al.* : Expression cloning of an immunodominant family of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using human CD4(+) T cell. *J Exp Med* 191 : 551-560, 2000.
 - 27) Reed S, Alderson M, Campos-Neto A *et al.* : Development of a recombinant tuberculosis vaccine. p159-164, The 36th Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, 2000.
 - 28) Huygen K, Content J, Denis O *et al.* : Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 2 : 893-898, 1996

* * *

分子呼吸器病

別刷

発行：株式会社 先端医学社
〒103-0004 東京都中央区東日本橋1-9-7 G1東日本橋ビル

肺抗酸菌症をめぐる研究の動向

結核に対するワクチンの開発

岡田全司* 田中高生**

☞ Lecture key notes

- ① 結核は世界最大の感染症であり、BCGよりも効果的なワクチンの開発が切望されている。結核におけるキラーT細胞の機能や役割については、重要であることは類推されているが、不明な点がいまだ多い。
- ② われわれは、BCGワクチンよりもはるかに切れ味のよい新しい結核ワクチン(DNAワクチン、サブユニットワクチン、リコンビナントBCGワクチン)を開発した。
- ③ これらのワクチン効果は、キラーT細胞の分化誘導を介して発揮されることを示し、ヒト結核においてgranulysin分泌キラーT細胞がきわめて重要なはたらきをしていることを明らかにした。すなわち、われわれは、このキラーT細胞の役割を解明する糸口をgranulysinという分子でつかみつつある。
- ④ また、ヒト生体内結核免疫解析モデルSCID-PBL/huを世界に先駆けて確立した。

はじめに

いまだに世界の人口の1/3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、最大の感染症の一つである^{1)~3)}。わが国でも、4年前から結核罹患率の増加が認められ、“結核緊急事態宣言”が出された。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にか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にか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。

い。われわれは、BCGよりもはるかに強力な新しいサブユニットワクチン、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^{4)~9)}。したがって、われわれの研究成果を中心に、新しい抗結核ワクチン開発の現状について検討する。また筆者らは、サイトカイン、キラーT細胞、遺伝子治療を長年研究しており、これらを基礎にして、まだ不明な点が多い結核免疫におけるキラーTの機能解明について述べる^{10)~15)}。一方、抗酸菌による肺感染症(通常結核と診断されることが多い)のうち、約20%は結核菌の亜型の非定型抗酸菌に起因することが示されている。しかし、これに対する効果的な治療法は少なく、非定型抗酸菌に対するワクチン開発も重要である。

キーワード

結核ワクチン、キラーT細胞、DNAワクチン、リコンビナントBCGワクチン、サブユニットワクチン、SCID-PBL/huモデル、臨床応用

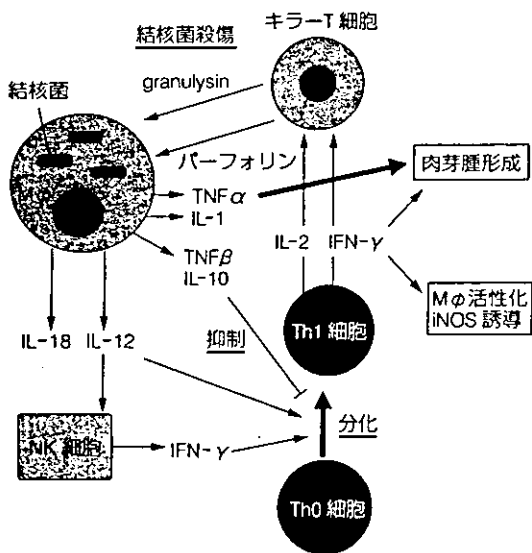
*本文中のキーワードはにて示しています。

*OKADA Masaji/国立療養所近畿中央病院臨床研究センター 結核研究部、**TANAKA Takao/国立療養所近畿中央病院臨床研究センター 結核研究部

- ☆ 結核免疫には、Mφ, キラーT細胞, ヘルパーT細胞, NK細胞が重要な役割を果たしている。
- ☆ キラーT細胞の分化・誘導にはキラーT細胞分化因子が必須である。

1. 結核感染と免疫

結核感染に対する免疫力はマクロファージ (Mφ), CD4⁺T細胞, NK細胞, γ/δT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①)。また, 1998年 Nature に結核菌 H37 Rv ゲノム全塩基が掲載され, 遺伝子



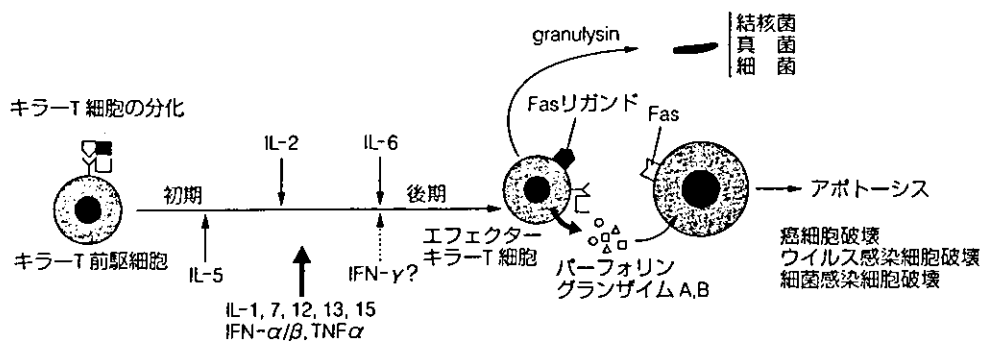
図① 抗結核免疫とマクロファージ・ヘルパーT・キラーT細胞活性化

レベルで結核免疫を解析しうることになった。

(1) キラーT細胞分化因子とキラーT細胞分化

筆者らは, 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はじめて明らかにした。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, 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, IL-2はキラーT細胞誘導に必須な因子の一つであることを示した (図②)¹⁶⁾。

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分化を誘導することを明らかにした¹³⁾¹⁷⁾。筆者らは, 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 (図②)¹⁸⁾。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 (表



図② キラーT細胞活性化と細胞傷害機構

☆ 結核患者 T 細胞は、キラー T 細胞活性の低下およびキラー T 細胞分化因子の産生が認められる。

表① 多剤耐性結核患者末梢血リンパ球 (PBL) における各因子の発現

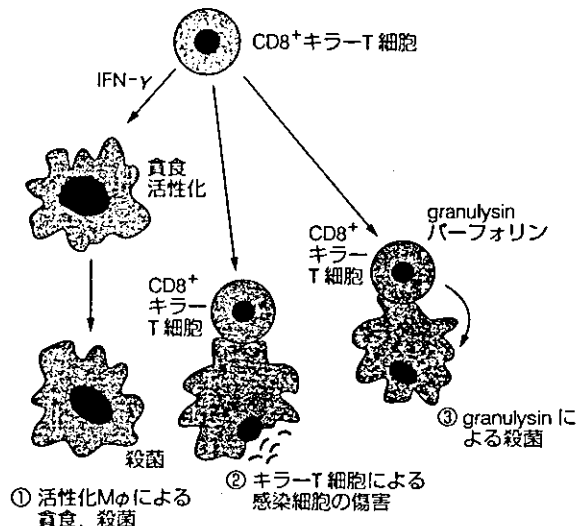
granulysin mRNA	↓↓
TRAIL mRNA	↓↓
キラー T 細胞分化因子産生	↓↓
IL-2 産生	↓
IFN- γ	↓
IL-6 産生	↓

TRAIL: 腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド

①)⁴⁾⁵⁾⁷⁾⁻⁹⁾。また、PPD に特異的なヒトキラー T 細胞の誘導系を確立した。糖尿病合併難治性結核患者では、PPD 特異的キラー T の分化誘導の著しい低下を明らかにした⁴⁾⁵⁾⁷⁾⁻⁹⁾。

(2) キラー T 細胞

CD8 あるいは $\beta 2$ 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。最近、CD8⁺T 細胞が結核菌で感染した M ϕ を Fas-independent, granule-dependent 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¹⁹⁾。この T 細胞は CD1-restricted でミコール酸, LAM, phosphatidyl inositol mannoside, glucose monomycolate, isoprenoid glycolipid (Cd1c と結合) などの結核菌 lipid と lipoglycan を認識する³⁾。CD1 の抗原結合グループは深く hydrophobic である。このキラー T の顆粒内の蛋白である 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。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より M ϕ に穴が開き、M ϕ 内の結核菌に直接



図③ キラー T 細胞によるマクロファージ内結核菌殺菌機構

CD8⁺キラー T 細胞は結核感染マクロファージ (M ϕ) や殺菌能の低下した M ϕ を破壊し、新たな非感染 M ϕ に結核菌を貪食させる。キラー T 細胞顆粒内に含まれるパーフォリンと granulysin を分泌して M ϕ 内の菌を直接殺す。またキラー T 細胞から産生される IFN- γ はキラー T 細胞を活性化する。

granulysin が作用するためと思われる。このように、細胞内病原体に対する免疫に直接関与することが明らかとなった。われわれは、BML 研究所高森博士、永田博士との共同研究で結核患者、とくに多剤耐性結核患者ではキラー T リンパ球の granulysin mRNA の発現および蛋白の発現が低下していることを明らかにした (表①)⁴⁾。

すなわち、われわれはキラー T 細胞の granulysin 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⁴⁾。Granulysin (分子量 9,000) は、キラー T や NK に存在する蛋白で saposin-like protein (SAPLIP) family のメンバーで NK lysis に 43% の homology を示す。一方、最

- ☆ キラーT細胞の *granulysin* が結核免疫に重要。
- ☆ 結核免疫に $IFN-\gamma$, $IL-6$, $TNF\alpha$, $IL-12$ のサイトカインが大切。

近, 順天堂大学榎垣博士, 八木田博士, 奥村博士らと共同研究をおこない, キラーTの TRAIL 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 (図②・表③)⁴⁾。

一方, ESAT-6 抗原に対するキラーTで, HLA-A2 とは 82~90 くらいの 9 個のアミノ酸 AMAS-TEGNV, HLA-B52 とは 69~76 くらいの LQNLARTI が結合してキラーT細胞がこれらを認識する。われわれは, 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を生体内で誘導することにはじめて成功した (図④)^{20)~22)}。

(3) サイトカインと結核免疫

抗結核免疫に $IFN-\gamma$ が重要であることは, マウスの系で詳細に解析されている²⁾。ヒトにおいても, $IFN-\gamma$ レセプター遺伝子に変異がみられた先天的 $IFN-\gamma$ レセプター欠損児に, BCG ワクチン注射にて重症全身性感染が認められたり *M. avium* 感染症

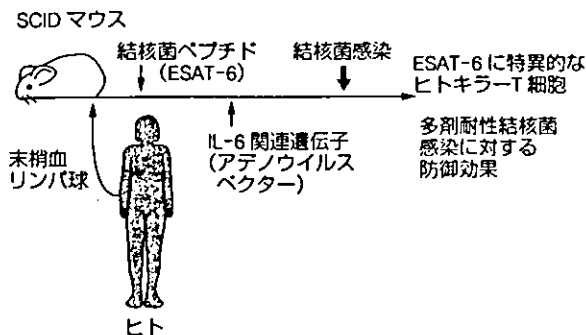
をきたした。マウスにても $IFN-\gamma$ gene ノックアウトマウスや $IFN-\gamma$ レセプター遺伝子ノックアウトマウスでは結核易感染性である。

LAM に $TNF\alpha$ の強い誘導活性が認められ, コードファクター (trehalose dimycolate : TDM) も強く $TNF\alpha$ を誘導し, マウス $M\phi$ 上の CD1d1 の発現を誘導した²³⁾。 $TNF\alpha$ は, 肉芽腫形成のみでなく慢性の長期感染結核に重要であり, 抗 $TNF\alpha$ 抗体投与マウスや, TNF レセプター ($TNF-Rp55$) 欠失マウスでは結核菌感染による死亡率が著増し, 肉芽腫形成も損なわれた重症の肺結核病理像を示した。慢性関節リウマチ患者の治療に, 最近抗 $TNF-\alpha$ 抗体を使用するが, 致死的な重症結核感染症を引き起こした。さらに, $IL-6$ 遺伝子ノックアウトマウスでも結核感染の増悪をきたしたり, $IFN-\gamma$ の産生誘導の欠損がみられ, $IL-6$ も非特異的防御とくに $M\phi$ の活性化やキラーT細胞分化を介して特異的な結核免疫に関与している可能性もある²³⁾。

$IL-12$ レセプター欠損マウスや $IL-12$ 欠損患者では, 結核菌感染・増殖を抑制できなかった。すなわち, $IL-12$ も抗結核免疫に重要なサイトカインであることが示された。また, リコンビナント $IL-12$ の投与にて BALB/c マウスの結核菌抵抗性が増し, $IL-12$ の生体内中和にて感染増悪をきたす²³⁾。

(4) マクロファージ ($M\phi$)

結核菌の増殖場所は, $M\phi$ 内である。一方, $M\phi$ は異物貪食能と細胞内殺菌能および抗原提示能をもつ。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。この $M\phi$ の結核免疫における役割の詳細は, 岡田ら *molecular medicine 2002* を参照されたい。



図④ 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

☆ (ツベルクリン反応にかわる) 新しい結核感染特異的診断法 DPPD 皮内反応。
 ☆ 結核ワクチンは、①サブユニットワクチン、②DNA ワクチン、③リコンビナント BCG ワクチンの3つに大別される。

(5) Toll-like レセプターとマクロファージ活性化

最近発見された Toll-like receptor (TLR) ファミリーが、innate immunity の重要な役割を果たしている²⁴⁾。結核菌の cell wall (LAM, mAGP, total lipid) による応答は、TLR 2 を介する。一方、結核生菌に対する反応には、TLR 2 と TLR 4 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 TLR 2 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 kDa の lipoprotein が TLR 2 を介して Mφ を活性化する。また、抗酸菌 DNA から見出された CpG モチーフ (パリンドローム配列) は、感染防御免疫能増強することが示されていたが、CpG レセプターに対する TLR 9 が審良²⁴⁾によりクローニングされた。

(6) Th1 リンパ球・Th2 リンパ球

CD 4⁺T 細胞が結核免疫に重要であることは、MHC class II^{-/-}マウスや CD 4^{-/-}マウス抗 CD 4 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岡田²⁾総説を参照)。

(7) 結核感染特異的遅延型反応 (診断)

ツベルクリン反応 (以下、ツ反と略す) は、日本では BCG 接種が全員に施行されるため、結核非感染者でも陽性に出る大きな問題点を抱えている。われわれは、これを break through する結核感染特異診断法 DPPD を開発しつつある。ツ反に用いられる PPD は多種の蛋白を含む。この中より、結核感染にきわめて特異性の高い、ツ反にかわる蛋白 DPPD のアミノ酸配列および遺伝子クローニングに成功し

表② 新しい結核ワクチン

① サブユニットワクチン
Mtb72f 融合蛋白質 85B-ESAT-6 融合蛋白質 α 抗原(Ag85B), Ag85A, MPB51, ESAT-6, Hsp65 19kDa リボ蛋白質 リコンビナントサイトカイン (IFN-γ など)(吸入・注射) 新しい結核菌蛋白質抗原 Mtb8.8, Mtb9.9, Mtb32, Mtb39, Mtb11 その他
② DNA ワクチン
HSP65 DNA, IL-12 遺伝子, HSP70 DNA, ESAT-6 DNA, 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, 38kDa DNA, キラーT 細胞誘導結核菌蛋白質抗原遺伝子, CD40L 遺伝子, MPT64 DNA, MPT63 DNA, Kat G DNA, 上記の新しい結核菌蛋白質抗原遺伝子
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, ESAT-6 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 細胞誘導結核菌蛋白質抗原遺伝子

た。リコンビナント DPPD 蛋白は結核感染に特異的で、BCG 接種群には反応しないことがモルモットで示された。ヒトでも結核感染特異性を示すことを、*in vitro* および skin test の系でわれわれは明らかにした⁶⁾²⁵⁾⁻²⁷⁾。

2. 結核ワクチン

①サブユニットワクチン、②DNA 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 (表②)。

☆ リコンビナント BCG ワクチンの作製・種類・抗結核効果.

ワクチンとして α 抗原 [Antigen 85 B], ESAT-6, 種々のサイトカイン, HSP 65, 38 kd, 19 kd lipoprotein, Mtb-8.8, -9.9, -32, -39, MDP 1 など, サブユニット-, DNA-, rBCG-ワクチンの形で多くの報告がおもにマウスの結核感染の系でなされている²⁸⁾²⁹⁾. また, さらに最近, Corixa 研究所 P. Alderson 博士 S. Gillis 博士および S. Reed 博士らは, T 細胞結核免疫を誘導する蛋白抗原遺伝子のクローニングを迅速かつ, 絨緞爆撃的におこなえる画期的な系を開発した. この系を用い, 強力な結核免疫を誘導する Mtb 9.9 A family など多種の蛋白抗原的遺

伝子のクローニングに成功し新しい結核ワクチン開発が飛躍的に進んでいる. しかしながら, 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. われわれは, HSP 65 DNA+IL-12 DNA 治療にて BCG ワクチンの 100 倍強力なワクチンの開発に成功した (表 3)⁴⁾⁵⁾⁷⁾.

(1) リコンビナント BCG ワクチン

リコンビナント BCG をキラー T 誘導結核蛋白遺伝子やサイトカイン遺伝子を BCG 菌に導入する PNN 2 シャトルベクター (大腸菌 \leftrightarrow 抗酸菌) を用い

表 3 新しい結核ワクチン・診断法・治療モデルの開発

新しい結核ワクチン	
① サブユニットワクチン Mtb72f	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 (+)
② DNA ワクチン HSP65 DNA+IL-12 DNA HVJ リポソーム/HSP65 DNA	BCG より有効 (マウス) <u>100 倍強力</u> BCG より有効 (マウス) キラー T 細胞活性増強 予防ワクチン・治療ワクチン
IL-6 関連遺伝子ワクチン (IL-6 DNA+IL-6R DNA+gp130 DNA) IFN- γ 遺伝子ワクチン	
③ リコンビナント BCG ワクチン (Ag85A+Ag85B+MPB5f) リコンビナント	BCG より有効 (マウス) キラー T 細胞活性増強
Ag85B リコンビナント, Ag85A リコンビナント MDP1 リコンビナント	BCG より有効 (マウス) BCG より有効 (マウス)
新しい診断法 (DPPD)	
① ツベルクリン反応にかわる結核特異的診断 DPPD 蛋白質の遺伝子クローニングに成功	モルモット-結核感染特異的 ヒト (<i>in vitro</i>) ヒト (skin test)
新しい予後診断法 (キラー T 細胞活性) 多剤耐性結核患者 CD8 ⁺ キラー T 細胞の granulysin mRNA 発現 ↓ (パーフォリン+TRAIL) 発現が重要	

☆ DNA ワクチンの作製・種類・抗結核効果.

て、われわれは長崎大学山田毅教授、大原直也助教授と共同研究で作製した。

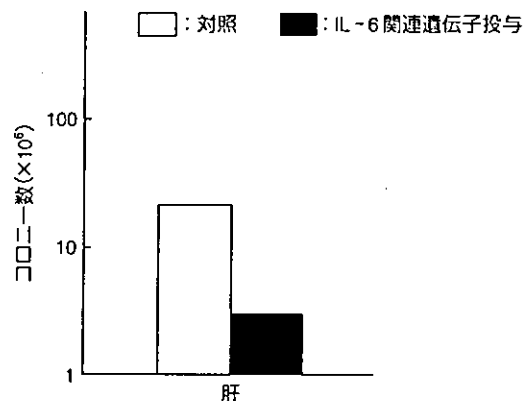
結核菌は 300 種以上の蛋白を分泌するが、とくにわれわれの共同研究者長崎大学山田教授らがクローニングした α 抗原 Antigen 85 B とそのファミリー (85 A, C) が有名である。285 アミノ酸からなり 40 アミノ酸のシグナルペプチドをもつ。Antigen 85 A, B, C は、フィブロネクチンとの結合活性や mycolyl transferase 活性をもつ。プロモーターは *Mycobacterium avium* の Ag 85 B 遺伝子、*Mycobacterium kansasii* の Ag 85 B 遺伝子、BCG の MPB 51 遺伝子のものを用いた。これらの遺伝子を、PNN 2 (大腸菌-抗酸菌) シャトルベクターに組み込み BCG 東京菌に、遺伝子を導入した。われわれは、BA 51 (Ag 85 A + Ag 85 B + MPB 51) リコンビナント BCG は BCG よりも強力なワクチンであることを i.v 感染の系および気道感染の系で明らかにした。

さらに、antigen 85B rBCG ワクチン、85A rBCG ワクチンや MDP1 rBCG ワクチンでも BCG 東京よりも強力なワクチン効果を得た⁹⁵⁾。また、結核菌の増殖がきわめて遅いことを調節する DNA 結合蛋白 MDP 1 (結核免疫抗原性も 85 B より強い) をコードする遺伝子を BCG に組み込み rBCG を作製し、BCG 東京よりも強力なワクチン効果を得た。IL-2 rBCG、IL-6 rBCG、IFN- γ rBCG、HSP 65 rBCG の作製に成功した。

(2) DNA ワクチン

われわれは、① IL-12 DNA + HSP 65 DNA のワクチンは相乗効果を示し、gene gun 投与により 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明らかにした (自治医科大学吉

田栄人講師との共同研究) (表③)。DNA ワクチンの作製は、IL-12 の p35 および p40 を CMV promotor 下流域に挿入した発現プラスミドを作製した。さらに、HSP 65 DNA ワクチンの作製に成功した。Lowrie ら³⁰⁾は、らい菌由来の HSP 65 gene を用いているのにくらべ、われわれはヒト型結核菌 H 37 Rv 由来の HSP 65 gene を使い、マウス IL-12 遺伝子はすでにマラリア DNA ワクチン (マウスモデル) として実績があるプラスミドベクターを使用した。② HVJ-liposome をベクターに用いた場合、HSP 65 DNA 単独 (HVJ-liposome/HSP 65) 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教授との共同研究) (表③)。③ アデノウイルスベクター (E1a, E1b, E3 region を欠損させたヒト 5 型アデノウイルスベクターで非増殖性・非感染性のすぐれたベクター) に



図③ IL-6 関連遺伝子 (DNA) による結核ワクチン効果

ヒト型結核菌 (H 37 RV) 5×10^6 個を静脈投与した BALB/c マウス (結核感染マウス) に、IL-6 関連遺伝子 (IL-6 遺伝子 + IL-6 レセプター遺伝子 + gp 130 遺伝子) をアデノウイルスベクターに挿入した DNA ワクチンを腹腔内投与した。結核菌感染後 4 週後の肝の結核菌数を小川培地に培養してコロニー数で測定した。

☆ サブユニットワクチンの種類と効果.

☆ SCID-PBL/hu を用いたヒト多剤耐性結核治療モデル.

導入した IL-6 関連遺伝子 (IL-6 gene+IL-6 レセプター gene+gp 130 gene) ワクチン (図⑤) は, BCG よりも強力な治療・予防ワクチン効果を示した. 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・誘導および Th1 サイトカイン (IL-2 および IFN- γ) の産生誘導を介して抗結核効果を発揮した⁴⁵⁷⁾. ④ アデノウイルスベクターに導入した IFN- γ DNA も BCG よりも強力な治療・予防ワクチン効果を示した⁴⁵⁷⁾.

これらの①～④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⁴⁵⁷⁾. すなわち, 結核死菌を貪食させた J774.1 M ϕ を標的細胞とし, ①～④のワクチン投与後結核感染させた Balb/c マウスの脾細胞を PPD や結核菌で *in vitro* で再刺激し, effector 細胞として反応させ, 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ることを明らかにした.

一方, Huygen らは, antigen 85 A 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³⁴⁾. さらに, Ag 85 A, Ag 85 B, Ag 85 C, MPB 51 DNA ワクチン用プラスミドベクターを作製した. これらの DNA ワクチンを組み合わせてワクチン効果を解析中.

(3) サブユニットワクチン

Corixa 研究所 Dr. Reed らは, 72 f fusion 蛋白 (Mtb 39 と Mtb 32 の fusion 蛋白) のサブユニットワクチンがカニクイザル (*cynomolgus monkey*, 最もヒトの肺結核に近いモデル³²⁾) のレベルで BCG

よりもはるかに強力な予防ワクチン効果 (生存率, 血沈, 体重, 肺の組織) を示すことを明らかにした⁴⁶³³²⁾. ヒトの *in vitro* 系でも 72 f を用いて免疫応答が増強し, ヒトへの臨床応用が最も近い, 結核ワクチンの開発に成功した (Reed 博士らとの共同研究). 種々の結核蛋白 gene のクローニングに成功し, サブユニットワクチン (72 f, Mtb-39, -32, -8.4, -11, -41, -9.9, -16, -40, -31 f, -71 f) で *in vitro* 刺激し, 多剤耐性結核患者の T 細胞免疫能が増強した (表⑥)⁴⁾.

一方, 多剤耐性結核患者に IFN- γ 吸入療法をおこなない, 投与期間中の多剤耐性結核菌の消失を認めている. しかしながら, IFN- γ 投与を中止するとふたたび多剤耐性結核菌が喀痰中に認められた. 副作用は発熱以外にとくに問題となるものはなかった.

(4) 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル

われわれが, 世界に先駆けて開発した SCID-PBL/hu の系で結核患者リンパ球を SCID マウスに生着させ, ESAT-6 のペプチドを免疫し, ESAT-6 に特異的なヒトキラー T 誘導を示す画期的な, 生体内ヒト免疫解析モデル (ヒト結核ワクチン効果解析モデル) を開発した (図④)⁴¹⁻⁷¹⁹⁾.

(5) 臨床応用に向けての新しい結核ワクチン

最も有力なものとして① Mtb 72 f fusion 蛋白サブユニットワクチン, ② われわれの HVJ-liposome/HSP 65 DNA+IL-12 DNA (カニクイザルで解析計画), ③ 85 B-ESAT-6 fusion 蛋白 (Dr. Anderson ら) があげられる. 臨床応用ワクチン候補の筆頭として Mtb 72 f サブユニットワクチンがあげられ, 1 年以内に臨床応用 phase I study が計画されている. さらに, われわれは Mtb 72 f DNA を

☆ 新しい結核ワクチンの臨床応用.

☆ 国立病院・療養所呼吸器ネットワークを用いた新しい結核ワクチンの開発.

BCG または HVJ-liposome に組み込み、きわめて強力なワクチン開発をめざしている⁴⁾⁵⁾⁷⁾。

おわりに

われわれは、結核におけるキラー T の役割を解明する糸口を granulysin という分子でつかみつつある。また、BCG ワクチンよりもはるかに切れ味の鋭い新しい結核ワクチン(DNA ワクチン, サブユニットワクチン)を開発した。臨床応用も近いと考える。

日本の結核患者数の 43% の診断・治療をおこなっている、国立病院・療養所 54 施設を統括し、国立病院・療養所呼吸器ネットワークを用い結核の新しい予防・治療法の確立を全国規模でおこなう計画である。当国立療養所近畿中央病院は、呼吸器疾患(結核を含む)準ナショナルセンターである。

自治医科大学吉田栄人博士, 長崎大学山田毅博士, 大原直也博士, 大阪大学金田安史教授, 大塚研究所松本真博士, 東京大学医科学研究所斎藤泉博士, Corixa 研究所 Reed 博士らとの共同研究。厚生科学研究費新興・再興感染症研究事業「抗結核キラー T リンパ球とリコンビナント BCG-DNA-ワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法」(岡田班) の大型プロジェクトの支援を得た。また、共同研究者の当国立療養所近畿中央病院臨床研究センター井上義一博士, 研究員の方々(桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 森珠里, 金丸典子, 岡美穂, 松本久美) に深謝する。

文 献

- 1) 螺良英郎ほか: 結核菌の逆襲, 再興感染症としての結核. 感染・炎症・免疫 28 : 38, 1998
- 2) 岡田全司: 免疫低下と結核. 臨床科学 35 : 344, 1999

- 3) Flynn JL *et al*: Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19 : 93-129, 2001
- 4) 岡田全司: 抗結核キラー T リンパ球とリコンビナント BCG-DNA-ワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法 (H-11-新興-2). 厚生科学研究費補助金実績報告書・研究報告書, 東京, 2001, pp 1-140
- 5) Okada M, *et al*: New (DNA-Recombinant BCG- and Subunit-) Vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity. Thirty-Sixth Tuberculosis and Leprosy Research Conference, ○○, ○○, 2001, pp 127-133
- 6) Gillis S *et al*: New therapy, diagnosis and protection using recombinant BCG-, DNA-Vaccination and cytotoxic T lymphocytes against *Mycobacterium Tuberculosis*: New vaccine and new diagnosis. 平成 12 年度新興・再興感染症研究推進事業研究報告集, 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団, 東京, 2001, pp 355-359
- 7) Okada M *et al*: DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity in the patients with multi-drug resistant tuberculosis. Thirty-Fifth research conference on tuberculosis and leprosy, 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団, 東京, 2000, pp 197-201
- 8) Okada M *et al*: Novel DNA and Recombinant BCG Vaccinations against Tuberculosis by the Augmentation of Cytotoxic Activity. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団, 東京, 2001, p 49
- 9) Okada M, *et al*: DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis by the augmentation of cytotoxic activity. *Faseb Journal*: A 1008, 2001
- 10) 岡田全司ほか: リンホカインとモノカイン. 新内科学体系; 年刊版 '84-C, 山村雄一ほか監修, 中山書店, 東京, 1984, p 221
- 11) 岡田全司: サイトカインと腫瘍免疫. 新医科学大系

- 8 B ; 免疫応答一主体の防御機構II, 石井威望ほか編集, 中山書店, 東京, 1996, p 269
- 12) Tanaka F *et al* : The anti-human tumor effect and generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human peripheral blood lymphocytes by the *in vivo* transfer of the Interleukin-6 gene using adenovirus vector. *Cancer Res* 57 : 1335-1343, 1997
 - 13) Okada M *et al* : Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 : 7717-7721, 1981
 - 14) Okada M *et al* : B cell growth factors and B cell differentiation factor from human T hybridomas. Two distinct kinds of B cell growth factor and their synergism in B cell proliferation. *J Exp Med* 157 : 583-590, 1983
 - 15) 杉村和久ほか : 細胞性免疫の調節機構. 岩波講座, 免疫科学 5, 山村雄一ほか編集, 岩波書店, 東京, pp 113-204, 1984
 - 16) Okada M *et al* : The differentiation of cytotoxic T cells *in vitro*, I. Amplifying factor (s) in the primary response is Lyt1+cell dependent. *J Immunol* 122 : 2527-2535, 1979
 - 17) Kaieda T *et al* : A human helper T cell clone secreting both killer helper factor (s) and T cell-replacing factor (s). *J Immunol* 129 : 46-51, 1982
 - 18) Okada M *et al* : IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the *in vitro* induction of cytotoxic T cells. *J Immunol* 141 : 1543-1549, 1988
 - 19) Stenger S *et al* : An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282 : 121-125, 1998
 - 20) 岡田全司 : 結核治療ワクチンと分子医学. 現代医療 32 : 83-88, 2000
 - 21) 岡田全司 : 新しい抗結核ワクチンの開発の現状. シンポジウム「結核免疫学の動向と課題」第77回日本結核病学会総会, 東京, 2002
 - 22) 岡田全司ほか : 結核ワクチンの新しいストラテジー. 免疫・*Immunology Frontier* 10 : 2000-2008, 2000
 - 23) Ryll R *et al* : Mycobacterial cord factor, but not sulfolipid, causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d1 on murine macrophages. *Microbes Infect* 3 : 611-619, 2001
 - 24) Akira S : Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol* 78 : 1-56, 2001
 - 25) Campos-Neto A *et al* : Improvement of the Mantoux test with a single and defined recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein. *Tubercle* : 2001 (in press)
 - 26) Campos-Neto A *et al* : Improvement of the Mantoux test with a single recombinant *Mycobacterium Tuberculosis* protein. Thirty-sixth tuberculosis and leprosy research conference, US-JAPAN Cooperative Medical Science Program, New Orleans, 2001, pp 196-200
 - 27) Coler RN *et al* : Cloning of a *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding a purified protein derivative protein that elicits strong tuberculosis-specific delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis* 182 : 224-233, 2000
 - 28) Hess J *et al* : Exploiting the immune system : toward new vaccines against intracellular bacteria. *Adv Immunol* 75 : 1-88, 2000
 - 29) Anderson P : TB vaccines : progress and problems. *Trends in Immunology* 22 : 160-168, 2001
 - 30) Lowrie DB *et al* : Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 400 : 269-271, 1999
 - 31) Reed S *et al* : Development of a recombinant tuberculosis vaccine. Thirty-Fifth research conference on tuberculosis and leprosy, ○○, ○○, 2000, pp 159-164
 - 32) Huygen K *et al* : Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 2 : 893-898, 1996

岡田全司 : OKADA Masaji

1949年, 和歌山県生まれ

1952年, 大阪大学大学院

(第三内科学)修了

専門 : 免疫学, 内科学, 遺伝子治療学

研究テーマ : 結核に対する新しいワクチン開発とキラーT関連分子による新しい診断・治療法の開発



遺伝子医学

Gene & Medicine

Vol.6 No.2 2002

第20号 別刷

株式会社 メディカル ドゥ
Medical Do. Co., Ltd.

結核に対する遺伝子ワクチンの開発

岡田全司¹・田中高生

国立療養所近畿中央病院臨床研究センター 結核研究部長¹

結核は世界最大の感染症であり、BCGよりも効果的なワクチンの開発が切望されている。結核におけるキラーT細胞の機能や役割については、重要であることは類推されているが、不明な点がいまだ多い。われわれは、このキラーT細胞の役割を解明する糸口をgranulysinという分子でつかみつつある。さらに、DNAワクチンのベクターとして、①gene gun ②plasmid ③adenovirus vector ④HVJ-liposomeを用い、また、リコンビナントBCGを作製し遺伝子ワクチンを作製した。その結果、BCGワクチンよりもはるかに切れ味のよい新しい結核ワクチン（DNAワクチン、サブユニットワクチン、リコンビナントBCGワクチン）を開発した。特にHsp65 DNA+IL-12 DNAワクチンは極めて強力な結核予防ワクチン効果を示した。これらのワクチン効果は、キラーT細胞の分化誘導を介して発揮されることを示した。



結核ワクチン、キラーT細胞、DNAワクチン、リコンビナントBCGワクチン、サブユニットワクチン、SCID-PBL/huモデル、臨床応用。

はじめに

いまだに世界の人口の1/3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、最大の感染症の一つである¹⁾²⁾。本邦でも4年前から結核罹患率の増加が認められ、“結核緊急事態宣言”が出された。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。われわれはBCGよりもはるかに強力な新しいサブユニットワクチン、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^{4)~9)}。従ってわれわれの研究成果を中心に、新しい抗結核ワクチン開発の現状について検討する。また著者らは、サイトカイン、キラーT細胞、遺伝子治療を長年研究しており、これらを基礎にして、まだ不明な点が多い結核免疫におけるキラーTの機能解明について述べる^{10)~15)}。

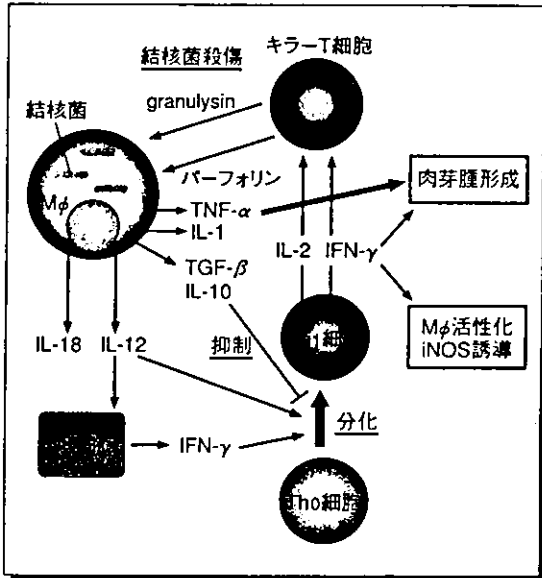
Masaji Okada¹・Takao Tanaka

Clinical Research Center, National Kinki-Chuo Hospital, Director¹

E-mail: okm@kinchu.hosp.go.jp

Development of Gene Therapy (Vaccines) against Tuberculosis

図① 抗結核免疫とマクロファージ、ヘルパーT、キラーT細胞活性化



1. 結核感染と免疫

結核感染に対する免疫力はMφ, CD4+T細胞, NK細胞, γ/δT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①)。

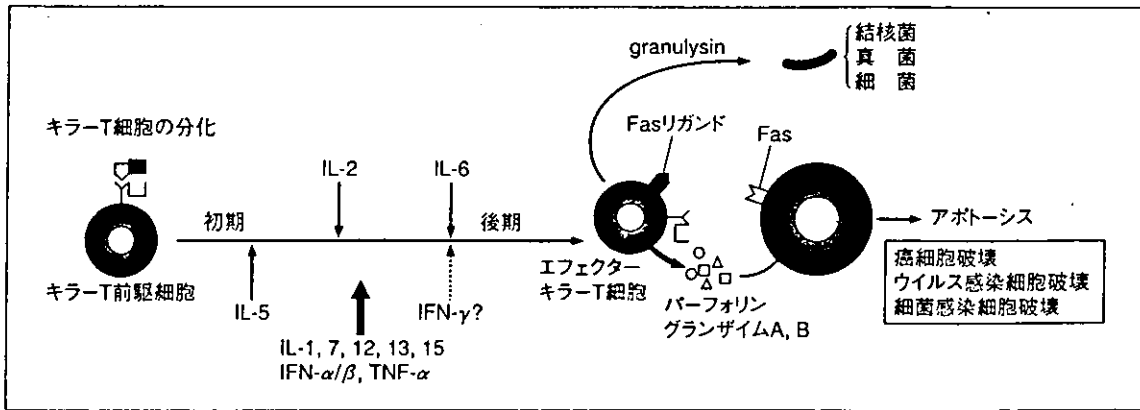
また, 1998年Natureに結核菌H37Rvゲノム全塩基が掲載され, 遺伝子レベルで結核免疫を解析しうることになった。

1. キラーT細胞分化因子とキラーT細胞分化

筆者らは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はじめて明らかにした。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, 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, IL-2はキラーT細胞誘導に必要な因子の一つであることを示した (図②)¹⁶⁾。

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分化を誘導することを明らかにした¹⁷⁾。筆者らは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 (図②)¹⁸⁾。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 (表①)^{4) 5) 7) 8) 9)}。また, PPDに特異的なヒトキラーT細胞の誘導系を確

図② キラーT細胞活性化と細胞傷害機構



表① 多剤耐性結核患者末梢血リンパ球(PBL)における各因子の発現

granulysin mRNA	↓ ↓
TRAIL mRNA	↓ ↓
キラーT細胞分化因子産生	↓ ↓
IL-2産生	↓
IFN-γ産生	↓
IL-6産生	↓

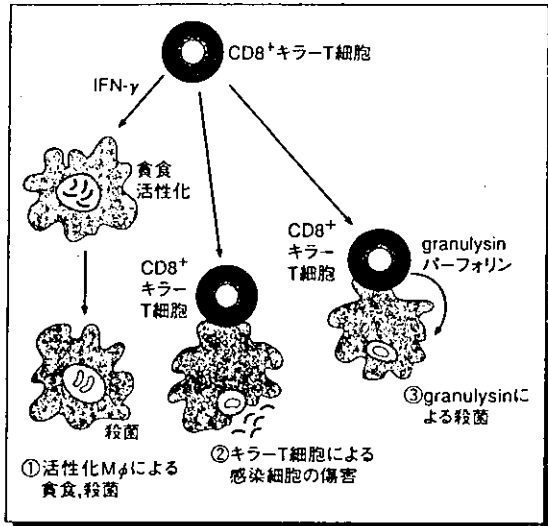
TRAIL: 腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド

立した。糖尿病合併難治性結核患者ではPPD特異的キラーTの分化誘導の著しい低下を明らかにした⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾。

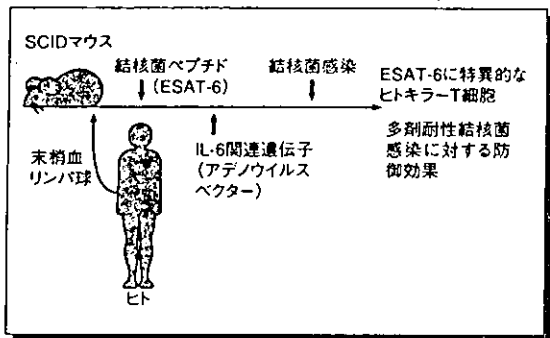
2. キラーT細胞

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。最近、CD8⁺T細胞が結核菌で感染したMφをFas-independent, granule-dependent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⁽¹⁰⁾。このキラーTの顆粒内の蛋白である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。さらにパーフォリンとの共存下でMφ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Mφに穴が開き、Mφ内の結核菌に直接granulysinが作用するためと思われる。このように、細胞内病原体に対する免疫に直接関与することが明らかとなった。われわれはBML研究所高森博士、永田博士との共同研究で結核患者、特に多剤耐性結核患者ではキラーTリンパ球のmRNAの発現および蛋白の発現が低下していることを明らかにした(表①)⁽⁴⁾。すなわち、われわれはキラーT細胞のgranulysin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⁽⁴⁾。Granulysin(分子量9000)はキラーTやNKに存在する蛋白でsaposin-like protein(SAPLIP) familyのメンバーでNKlysinに43%のhomologyを示す。一方、最近、順天堂大 榎垣博士、八木田博士、奥村博士らと

図③ キラーT細胞によるマクロファージ内結核菌殺菌機構



図④ 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



共同研究を行い、キラーTのTRAIL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(図③)⁽⁴⁾。

一方、ESAT-6抗原に対するキラーTでHLA-A2とは82~90位の9個のアミノ酸AMASTEGNV, HLA-B52とは69~76位のLQNLARTIが結合してキラーT細胞がこれらを認識する。われわれ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を生体内

で誘導することに初めて成功した (図4)^{20) 21) 22)}.

3. サイトカインと結核免疫

抗結核免疫にIFN- γ が重要であることはマウスの系で詳細に解析されている²⁾. ヒトにおいても, IFN- γ 受容体遺伝子に変異がみられた先天的IFN- γ レセプター欠損児に, BCG ワクチン注射にて重症全身性感染が認められたり *M. avium* 感染症を来した. マウスにても IFN- γ gene ノックアウトマウスや IFN- γ レセプター遺伝子ノックアウトマウスでは結核易感性である.

LAMにTNF α の強い誘導活性が認められ, コードファクター (trehalose dimycolate, TDM) も強くTNF- α をし, マウスM ϕ 上のCD1d1の発現を誘導した²³⁾. TNF- α は肉芽腫形成のみでなく慢性の長期感染結核に重要であり, 抗TNF- α 抗体投与マウスや, TNFレセプター (TNF-Rp55) 欠失マウスでは結核菌感染の死亡率が著増し, 肉芽腫形成も損なわれた重症の肺結核病理像を示した. 慢性関節リウマチ患者の治療に最近抗TNF- α 抗体を使用するが, 致死的な重症結核感染症を引き起こした. さらにIL-6遺伝子ノックアウトマウスでも結核感染の増悪を来したり, IFN- γ の産生誘導の欠損がみられ, IL-6も非特異的防御とくにM ϕ の活性化やキラーT細胞分化を介して特異的な結核免疫に関与している可能性もある²⁴⁾.

IL-12レセプター欠損マウスやIL-12欠損患者では結核菌感染・増殖を抑制できなかった. すなわちIL-12も抗結核免疫に重要なサイトカインであることが示された. また, リコンビナントIL-12の投与にてBALB/cマウスの結核菌抵抗性が増し, IL-12の生体内中和にて感染増悪を来す²⁵⁾.

4. 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 は異物食能と細胞内殺菌能および抗原提示能を持つ. 従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. このM ϕ の結核免疫における役割の詳細は文献24を参照されたい.

5. 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 class 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岡田総説²⁶⁾参照).

II. 結核ワクチン

1. 遺伝子ワクチン

結核ワクチンは2つに大別される. すなわち (1) 遺伝子ワクチンと (2) サブユニットワクチンである. さらに遺伝子ワクチンは, 二つに別れる. すなわち (a) DNA ワクチン, (b) リコンビナントBCG ワクチン

表2 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
19kDaリポタンパク質
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 Mtb8.8, Mtb9.9, Mtb32, Mtb39, Mtb11
その他
②DNAワクチン
Hsp65 DNA, IL-12遺伝子, Hsp70 DNA, ESAT-6 DNA, IL-6遺伝子, IL-6遺伝子+IL-6R遺伝子+gp130遺伝子, INF- γ 遺伝子, Mtb72f遺伝子, IL-15遺伝子, IL-18遺伝子, M-CSF遺伝子, 38kDa 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, ESAT-6遺伝子, HSP65遺伝子
IL-6遺伝子, INF- 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抗原遺伝子