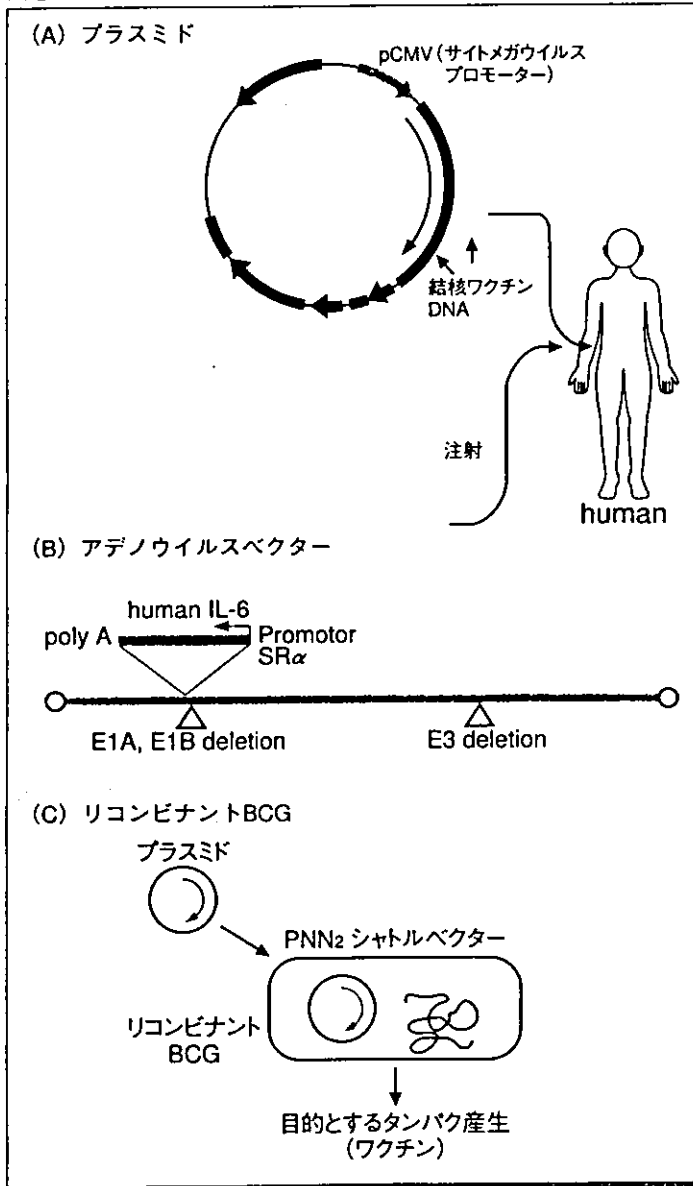


図5 DNAワクチンのベクター



(弱毒化結核菌を含む) に分かれる (表2)(図6)。

DNAワクチンのベクターとして、①gene gun ② plasmid ③adenovirus vector ④HVJ-liposome ⑤改良

型HVJエンベロープベクターも計画中。

ワクチンとして $\alpha$ 抗原[Antigen85B], ESAT-6, 種々のサイトカイン, HSP65, 38kd, 19kd lipoprotein, Mtb-8.8, -9.9, -32, -39, MDP1等, サブユニット-, DNA-, rBCG-ワクチンの形で多くの報告が主にマウスの結核感染の系でなされている<sup>25) 26)</sup>。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, じゅうたん爆撃的に行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Mtb9.9A family等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極めて少ない。われわれはHsp65DNA+IL-12DNA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)<sup>27)</sup>。

## 2. DNAワクチン

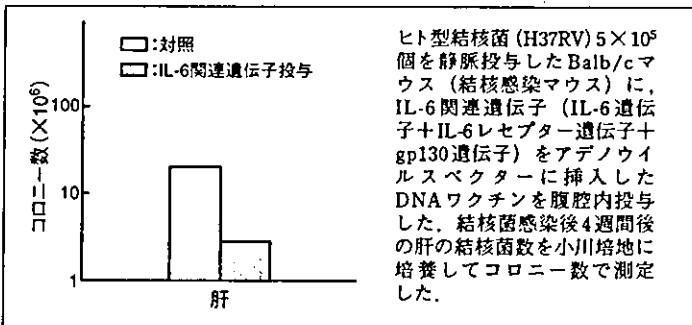
われわれは, ①IL-12 DNA+Hsp65 DNAのワクチンは相乗効果を示し, gene gun投与によりBCGよりも極めて強力な(約100倍)結核予防ワクチンであることを明らかにした(自治医科大学吉田栄人講師との共同研究)(表3)(図5A)。DNAワクチンの作製はIL-12のp35およびp40をCMV promoter下流

域に挿入した発現プラスミドを作製した。さらに, Hsp65 DNAワクチンの作製に成功した。Lowrieらはい菌由来のHsp65 geneを用いているのに比し, わ

表⑤ 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	BCGより有効 (マウス) 100倍強力
HVJリボソーム/Hsp65 DNA	BCGより有効 (マウス) キラーT細胞活性増強
IL-6関連遺伝子ワクチン (IL-6 DNA + IL-6R DNA + gp130 DNA)	予防ワクチン・治療ワクチン
IFN- $\gamma$ 遺伝子ワクチン	
③リコンビナントBCGワクチン	
(Ag85A + Ag85B + MPB51)リコンビナント	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	BCGより有効 (マウス)
MDP1リコンビナント	BCGより有効 (マウス)

図⑥ IL-6関連遺伝子 (DNA) による結核ワクチン効果



れわれはヒト型結核菌H37RV由来のHsp65 geneを用い、マウスIL-12遺伝子は既にマラリア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<sup>27)</sup>。②HVJ-liposomeをベクターに用いた場合Hsp65DNA単独(HVJ-liposome/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教授との共同研究)(表⑤)。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・非感染性の優れたベクター)に導入したIL-6関連

遺伝子(IL-6 gene+IL-6レセプターgene+gp130 gene)ワクチン(図⑥B)はBCGよりも強力な治療・予防ワクチン効果を示した(図⑥)。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- $\gamma$ )の産生誘導を介して抗結核効果を発揮した<sup>4) 5) 7)</sup>。④アデノウイルスベクターに導入したIFN- $\gamma$  DNAもBCGよりも強力な治療・予防ワクチン効果を示した<sup>4) 5) 7)</sup>。これらの①②③④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<sup>4) 5) 7)</sup>。すなわち、結核死菌を貪食させたJ774.1M $\phi$ を標的細胞とし、①②③④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- $\gamma$ 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、antigen85A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<sup>28)</sup>。さらに、Ag85A, Ag85B, Ag85C, MPB51DNA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。

なお、サブユニットワクチンも開発しており、これも比較のため下に記す。

Corixa研究所Dr.Reedらは72f fusion蛋白(Mtb39とMtb32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 Nature Med.1996) 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<sup>4) 6) 20)</sup>. ヒトの *in vitro* 系でも 72f 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).

サブユニットワクチンの詳細は molecular medicine 2002 を参照されたい.

### 3. 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PNN2シャトルベクター (大腸菌⇄抗酸菌) を用いてわれわれは, 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. (図⑤C)

結核菌は300種以上の蛋白を分泌するが, 特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 $\alpha$ 抗原Antigen 85Bとそのファミリー (85A, 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持つ. antigen 85A, B, Cはフィブロネクチンとの結合活性やmycolyl transferase活性を持つ. プロモーターは*Mycobacterium avium*のAg85B遺伝子, *Mycobacterium kansasii*のAg85 B遺伝子, BCGのMPB51遺伝子のものを用いた. これらの遺伝子をPNN2 (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BA51 (Ag85A+Ag85B+MPB51) 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マウス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Antigen85B rBCGワクチン, 85A 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<sup>4) 5) 7)</sup>. また, 結核菌の増殖が極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85B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- $\gamma$  rBCG, HSP65

rBCGの作製に成功した.

## III. 結核に対する遺伝子ワクチンの臨床応用

### 1. 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)<sup>4) 7) 19)</sup>.

### 2. 臨床応用に向けての新しい結核ワクチン

最も有力なものの一つとして, われわれのHVJ-liposome/HSP65DNA+IL-12DNA (カニクイザルで解析計画) が挙げられる. また, 臨床応用ワクチン候補の筆頭としてMtb72fワクチンが挙げられ, 臨床応用phase I studyが計画されている. われわれはMtb72f DNAをBCGまたはHVJ-liposomeに組み込み, 極めて強力なワクチン開発を目指している<sup>4) 5) 7)</sup>.

## ■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, リコンビナントBCG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. 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.

自治医大吉田栄人博士, 長崎大山田 毅博士, 大原直也博士, 大阪大金田安史教授, 大塚研究所松本真博

士、東大医科研斎藤泉博士、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」(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)に深謝します。

参考文献

- 1) 蝶良英郎, 山中正彰, 岡田全司: 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, J. L. and Chan, J.: Annu. Rev. Immunol. 19, 93-129, 2001.
- 4) 岡田全司: 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., Yoshida, S., Ohara, N., Yamada, T., Matsumoto, M., Sakatani, M. and Mori, T.: Thirty-Sixth Tuberculosis and Leprosy Research Conference. p.127-133, 2001.
- 6) Steven, G., Masaji, O.: 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) p355-359, 2001.
- 7) Okada, M., Tanaka, T., Inoue, Y., Katayama, Y., Yoshida S., Ohara, N., Yamada, T., Kayagaki, N., Yagita, H., Okumura, K., Sakatani, M. and Mori, T.: Thirty-Fifth research conference on tuberculosis and leprosy, p.197-201, 2000.
- 8) Okada, M., Yoshida, S., Ohara, N., Yamada, T., Kaneda, Y., Tanaka, T., Kita, Y., Kuwayama, S., Muraki, Y., Kanamaru, N., Fukuda, N., Inoue, Y., Matsumoto, M., Sakatani, M., Mori, T.: The Awaji International Forum on Infection and Immunity, P-049, 2001.
- 9) Okada, M., Yoshida, S., Ohara, N., Yamada, T., Inoue, Y., Minamoto, S., Sakatani, M., Mori, T.: Faseb Journal, A1008, 2001.
- 10) 岡田全司, 岸本忠三: 新内科学体系; 年刊版 '84-C, 山村雄一ほか監, 中山書店, 東京, p.221, 1984.
- 11) 岡田全司: 新医科学大系8B; 免疫応答-生体の防御機構II, 石井威望ほか編, 中山書店, 東京, p.269, 1996.
- 12) Tanaka, F., Abe, M., Akiyoshi, T. et al.: Cancer Res. 57, 1335-1343, 1997.
- 13) Okada, M., Yoshimura, N., Kaieda, T. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7718-7721, 1981.
- 14) Okada, M., Sakaguchi, N., Yoshimura, N. et al.: J. Exp. Med. 157, 583-590, 1983.
- 15) 杉村和久, 岡田全司: 岩波講座 免疫科学5, 山村雄一, ロバートAグッド, 石坂公成 (編), p113-204, 岩波書店, 東京, 1984.
- 16) Okada, M., Klimpel, G. R., Kuppers, R. C. et al.: J. Immunol. 122, 2527-2535, 1979.
- 17) Kaieda, T., Okada, M., Yoshimura, N. et al.: J. Immunol. 129, 46-51, 1982.
- 18) Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S. et al.: J. Immunol. 141, 1543-1549, 1988.
- 19) Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niaz, K. R. et al.: Science 282, 121-125, 1998.
- 20) 岡田全司: 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, 2002.
- 22) 岡田全司, 田中高生: 免疫・Immunology Frontier 10, p.2000-2008, 2000.
- 23) Ryll, R., Watanabe, K., Fujiwara, N., Hasunuma, R., Kumazawa, Y., Okada, M. and Yano, I.: Microbes Infect 3, 611-619, 2001.
- 24) 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子: Molecular Medicine 39, 144-154, 2002.
- 25) Hess, J., Schaible, U., Raupach, B. and Kaufmann, S. H. E.: in Immunol 75, 1-88, 2000.
- 26) Anderson, P.: Trends in Immunology 22, 160-168, 2001.
- 27) Lowrie, D. B., Tascon, R. E., Bonato, V. L. et al.: Nature 400, 269-271, 1999.
- 28) Huygen, K., Content, J., Denis, O. et al.: Nature Med. 2, 893-898, 1996.
- 29) Reed, S., Alderson, M., Campos-Neto, A., Dalemans, W., Orme, I., Tan, B., de La Cruz, E. C. and Skeiky, Y.: Thirty-Fifth research conference on tuberculosis and leprosy, P159-164, 2000.

最新医学・第57巻・第9号 (2002年9月号 別刷)

特集 最近のワクチン

## 新しい結核ワクチン

岡田全司

最新医学社

# 新しい結核ワクチン

岡田全司\*

## 要 旨

結核は世界最大の感染であり、BCG よりも効果的なワクチンの開発が切望されている。新規結核ワクチンは DNA ワクチン、サブユニットワクチンおよびリコンビナント BCG (rBCG) ワクチンに大別され、これを概説した。我々は BCG ワクチンよりもはるかに切れ味の良い新しい結核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。この効果は、結核菌に対するキラー T 細胞の分化誘導を介して発揮されることを明らかにした。また、rBCG ワクチンでは r (Antigen 85B + 85A + MPB51) BCG が強力な予防効果を示した。さらに 72f 融合タンパク質は、ヒトに近い結核感染モデルのカニクイザルで BCG よりもはるかに強力な予防効果を得、最も臨床応用に近い (1~2 年以内) ワクチンが開発された。さらにより強力な予防ワクチンおよび多剤耐性結核に有効な治療ワクチンを開発すべく、上記 DNA ワクチンおよび r72f BCG ワクチンをサルおよび我々が世界に先駆けて開発したヒト生体内結核免疫解析モデル SCID-PBL/hu で解析中である。

## はじめに

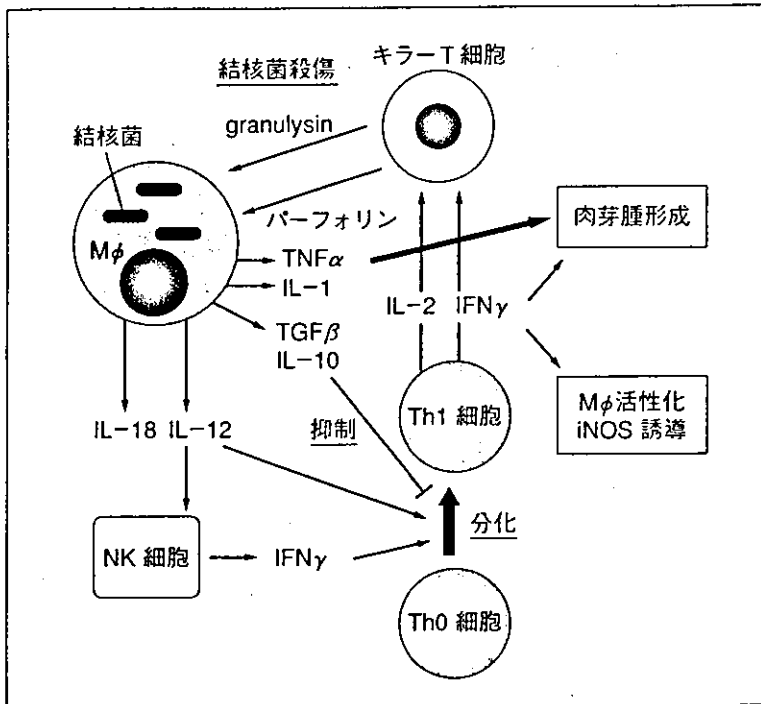
結核は、いまだに世界の人口の 1/3 が結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) の感染を受け、その中から毎年 800 万人の結核患者が発生し、200 万人が毎年結核で死亡している、世界最大の感染症の 1 つである<sup>1)</sup>。本邦でも 4 年前から結核罹患率の増加が認められ、1999 年「結核緊急事態宣言」が厚生

省 (当時) から出された。1998 年、米国疾病対策センター (CDC) は、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を開発する必要性を強く主張する発表を出した。また、結核撲滅対策委員会 (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。1998 年には、Cole らが『Nature』にヒト結核菌 H37Rv ゲノム全塩基配列を報告し、遺伝子レベルで抗結核免疫を解析しうることになった<sup>2)</sup>。さらに、ウシ型結核菌や BCG、種々の抗酸菌の DNA 解析がなされつつある (2002 年、第 4 回 World Congress on Tuberculosis)。

\* 国立療養所近畿中央病院 臨床研究センター

キーワード：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、  
キラー T 細胞、ヒト臨床応用

図1 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  
他の略語：巻末の「今月の略語」参照

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<sup>6-10</sup>。本稿では我々の研究成果を中心に、新しい結核ワクチン開発の現状について検討する。また我々は、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抗結核免疫におけるキラーT細胞の機能解明について述べる<sup>12-17</sup>。

### 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、CD4<sup>+</sup> T細胞、NK細胞、 $\gamma/\delta$  T細胞、キラーT細胞 (CD8<sup>+</sup> T細胞と CD8<sup>-</sup> T細胞) および肉芽腫形成の総合的な抵抗力である (図1)。

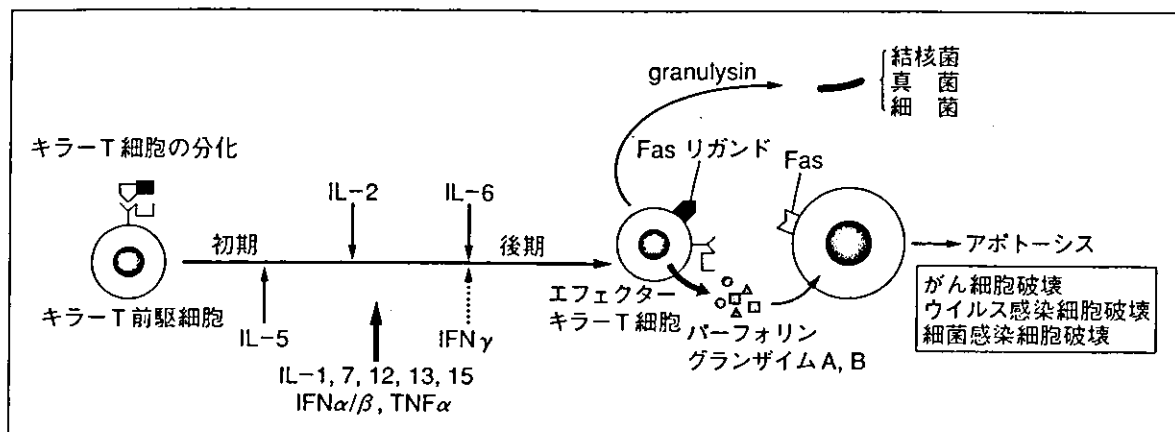
### 1. キラーT細胞 (CD8<sup>+</sup> T細胞)

CD8 遺伝子あるいは  $\beta_2$  マイ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、マウスは死亡する。すなわち、結核における CD8<sup>+</sup> T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である (図2)。

最近、CD8<sup>+</sup> T細胞が結核菌感染したマクロファージを Fas 非依存性、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<sup>18)19)</sup>。

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マクロファージ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マクロファージ細胞膜に

図2 キラーT細胞活性化と細胞傷害機構



略語：巻末の「今月の略語」参照

穴が開き、マクロファージ内の結核菌に直接 granulysin が作用するためと考えられる。このように、granulysin は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。

我々は、結核患者、特に多剤耐性結核患者末梢血リンパ球 (PBL) では、キラーT細胞の granulysin mRNA の発現が低下していることを明らかにした<sup>6)</sup>。このことから我々は、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<sup>6)</sup>。

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行い、キラーT細胞の TNF 関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL) とパーフォリンが抗結核免疫に重要であることを示す興味深い結果を得た<sup>6)</sup>。

結核菌に存在し、BCG に存在しない 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, 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。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<sup>20-23)</sup> (図3)。

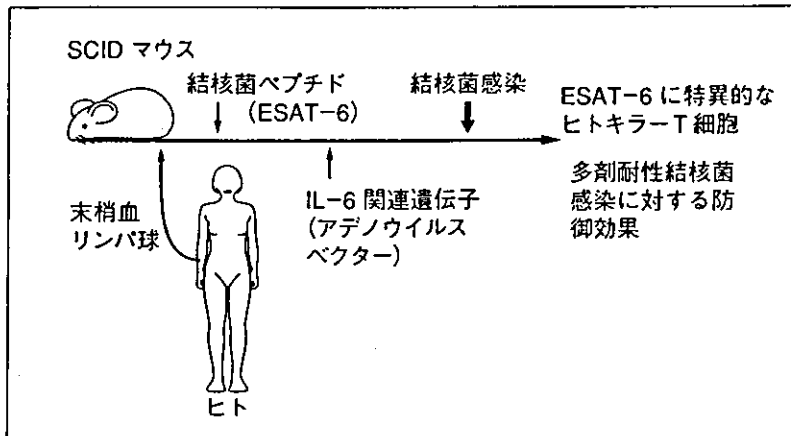
## 2. キラーT細胞分化とサイトカイン (キラーT細胞分化因子)

我々は、CD8<sup>+</sup> キラーT細胞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<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>24)25)</sup> (図2)。

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 細胞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 $\gamma$  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<sup>15)26)27)</sup>。我々は IL-6 がキラーT細胞誘導の後期の分化段階に作用することを解明した<sup>28)</sup> (図2)。



図3 SCID-PBL/hu マウスを用いた結核菌ペプチドに特異なヒトキラーT細胞の *in vivo* における誘導



略語：巻末の「今月の略語」参照

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 $\gamma$ , IL-6 の著明な低下を認めた<sup>6)7)9-11)</sup>。また、purified protein derivative (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 特異的なキラーT細胞の分化誘導の著しい低下を明らかにした<sup>6)7)9-11)</sup>。

### 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<sup>2)</sup>。ヒトにおいても、IFN $\gamma$  受容体遺伝子に変異が見られた先天性 IFN $\gamma$  受容体欠損児では、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。マウスにおいても、IFN $\gamma$  遺伝子ノックアウトマウスや IFN $\gamma$  受容体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、マウスマクロファージ上の CD1d1 の発現を誘導した<sup>29)</sup>。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 $\alpha$  受容体 (TNF-Rp55) ノックアウト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。最近、慢性関節リウマチ患者の治療に抗 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来したり、IFN $\gamma$  の産生誘導の欠損が見られ、IL-6 もマクロファージの活性化やキラー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<sup>2-4)</sup>。

IL-12 受容体ノックアウトマウスや 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<sup>2-4)</sup>。

### 4. マクロファージ、ヘルパーT細胞 (Th1 細胞、Th2 細胞)、結核感染特異的遅延型反応

これらの結核免疫機能は文献<sup>2)</sup>を参照。

表1 新しい結核ワクチン

1. サブユニットワクチン
Mtb72f 融合タンパク質
85B-ESAT-6 融合タンパク質
$\alpha$ 抗原 (Ag85B), Ag85A, MPB51, ESAT-6, Hsp65
リコンビナントサイトカイン (IFN $\gamma$ 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-6 DNA, IL-6 遺伝子,
IL-6 遺伝子+ IL-6R 遺伝子+ gp130 遺伝子, IFN $\gamma$ 遺伝子, Mtb72f 遺伝子, IL-15 遺伝子,
IL-18 遺伝子, M-CSF 遺伝子, 38kD 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 $\gamma$ 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「今月の略語」参照

## 5. Toll-like receptor とマクロファージ活性化

最近発見された Toll-like receptor (TLR) ファミリーが自然免疫 (innate immunity) の重要な役割を果たしている<sup>29)30)</sup>。結核菌の細胞壁 (LAM, mAGP, total lipid) に対する応答は TLR2 を介する。一方、結核生菌に対する反応には TLR2 と TLR4 が必要である。病原性の結核菌由来のマンノシル化 LAM (Man LAM) はマクロファージを活性化しないが、非病原性の抗酸菌は異なる糖脂質であるアラビノフラノシル化 LAM (Ara LAM) よりなり、これは TLR2 を介してマクロファージを活性化する。この差が発病の差となる可能性もある。結核菌体成分 19kD のリポタンパク質が、TLR2 を介してマクロファージを活性化する<sup>31)</sup>。また、抗酸菌 DNA から見いだされた CpG モチーフ (パ lind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 が審良らによってクローニングされた<sup>30)</sup>。

## 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1)。

DNA ワクチンのベクターとしては, ① 遺伝子銃, ② プラスミド, ③ アデノウイルスベクター, ④ HVJ 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<sup>6-9)20)22)32)33)</sup>。 $\alpha$ 抗原 (Ag85B), ESAT-6, 種々のサイトカイン, HSP65, 38kD, Mtb32, Mtb39, MDP1 などについて, サブユニットワクチン, DNA ワクチン, リコンビナント BCG ワクチンの形で多くの報告が, 主にマウスの結核感染の系でなされている<sup>34)</sup>。

表2 新しい結核ワクチン・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 Mtp72f	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  IL-6 関連遺伝子ワクチン (IL-6 DNA+IL-6R DNA+gp130) IFN $\gamma$ 遺伝子ワクチン	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
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 MDP1 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)
4. 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 <sup>11</sup>

略語：巻末の「今月の略語」参照

Reed 博士らは、T細胞結核免疫を誘導するタンパク質抗原遺伝子のクローニングを、迅速かつ絨緞爆撃に行える画期的な系を開発した<sup>39)</sup>。この系を用い、強力な結核免疫を誘導する Mtb9.9A ファミリーなど、多種のタンパク質抗原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<sup>6)7)9)</sup>(表2)。一方、長崎大学 山田博士、大原博士らは、キラーT細胞誘導結核菌タンパク質抗原遺伝子やサイトカイン遺伝子を BCG 菌に導入する PNN2 シヤトルベクター (大腸菌  $\leftrightarrow$  好酸菌) を用いて、リコンビナント BCG ワクチンを作製している。この方法は BCG 自身にアジュバント作用があり、BCG がベクターとしての働きも兼ねている。

#### サブユニットワクチン

Reed 博士らは、Mtb72f 融合タンパク質 (Mtb39 と Mtb32 の融合タンパク質) のサブユニットワクチンが、カニクイザル (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<sup>6)8)36)</sup>(表3)。我々はヒトの *in vitro* 系でも Mtb72f 融合タンパク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の開発に成功した (Reed 博士らとの共同研究)。そのほかにも種々の結核菌タンパク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, 39, 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<sup>9)</sup>(表2)。

また、多剤耐性結核患者に IFN $\gamma$  吸入療法を行い、投与期間中の多剤耐性結核菌の消失

表3 カニコイザルにおける Mtb72f 融合タンパク質サブユニットワクチンによる抗結核効果

予防ワクチン	結核感染生存率 (カニコイザル生存匹数 / 総数)
BCG ワクチン	0% (0 / 4)
Mtb72f 融合タンパク質ワクチン	100% (3 / 3)
Mtb8.4 タンパク質ワクチン	0% (0 / 3)

略語：巻末の「今月の略語」参照

を認めている。しかしながら、IFN $\gamma$  投与を中止すると再び多剤耐性結核菌が喀痰中に認められた。

#### DNA ワクチン

我々は IL-12 DNA + Hsp65 DNA のワクチンが相乗効果を示し、遺伝子銃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2）。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。

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（大阪大学医学部 金田博士との共同研究）（表2）。また、後述の Hsp65 リコンビナント BCG 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 受容体遺伝子 + 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4）。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 $\gamma$ ）の産生誘導を介して抗結核効果を発揮した<sup>6)7)9)</sup>（図5）。

アデノウイルスベクターに導入した IFN $\gamma$  DNA も、BCG よりも強力な治療・予防ワクチン効果を示した<sup>6)7)9)</sup>。

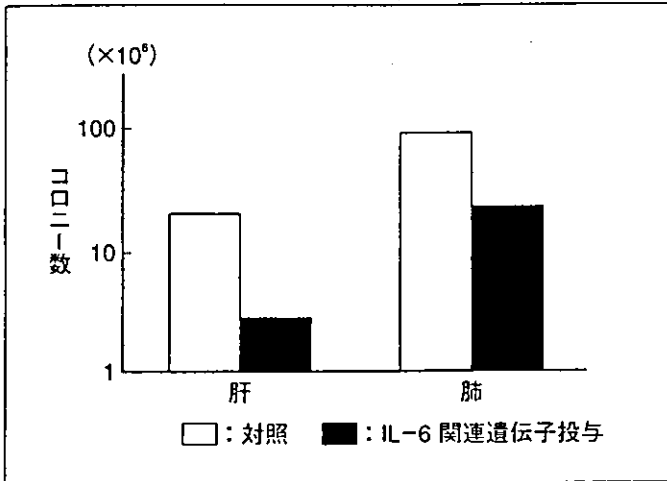
以上4つのワクチン効果は、キラーT細胞や Th1 細胞の分化誘導を増強することによって発揮されることが示された<sup>6)7)9)</sup>。まとめると、結核死菌を貪食させた J774.1 マクロファージを標的細胞とし、ワクチン投与後結核感染させた BALB/c マウスの脾細胞を PPD や結核菌で *in vitro* で再刺激し、エフェクター細胞として反応させ、IFN $\gamma$  の産生でキラー活性を測定した。その結果、ワクチン効果とキラー活性は見事な相関が認められることを明らかにした。

一方 Huygen らは、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<sup>7)</sup>。

#### 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、特に我々の共同研究者である長崎大学 山田博士らがクローニングした  $\alpha$  抗原 Ag85B とそのファミリー（Ag85A, Ag85C）が有名である。Ag85B は 285 アミノ酸残基

図4 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)  $5 \times 10^6$  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 受容体遺伝子 + 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.

略語: 巻末の「今月の略語」参照

からなり, 40 アミノ酸のシグナルペプチドを持つ<sup>20)</sup>.

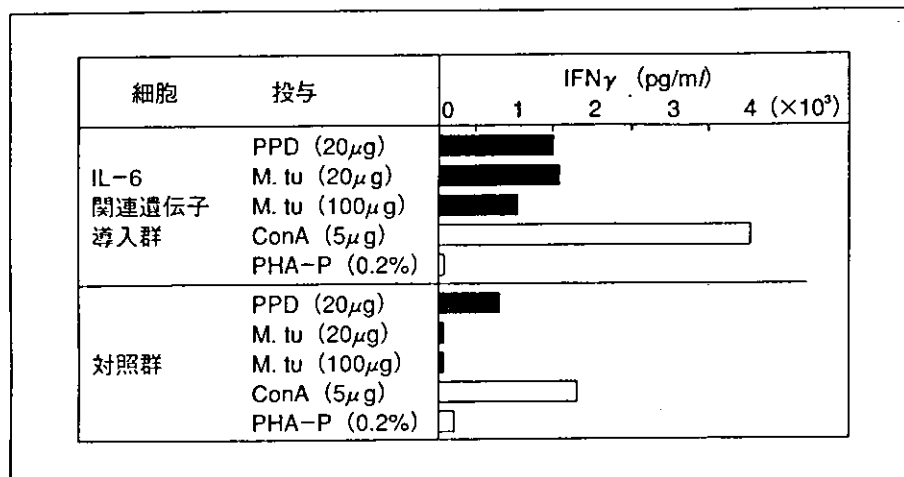
Ag85 の各コンポーネントをコードする遺伝子 (fbpA, fbpB, fbpC) と MPB51 をコードする遺伝子 (mpb51) は, BCG 菌のものを用いた. プロモーターは *M. avium* の Ag85B 遺伝子, *M. kansasii* の Ag85B 遺伝子, BCG の MPB51 遺伝子のものを用いた. これらの遺伝子を PNN2 シャトルベクター (大腸菌 ⇄ 好酸菌) に組み込み, BCG 東京菌に遺伝子を導入した. 我々は, BA51 (Ag85A + Ag85B + MPB51) rBCG が BCG よりも強力なワクチンであることを, 静脈感染の系およ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<sup>6)7)9)</sup>. また, 結核菌の増殖が極めて遅いことを調節する DNA 結合タンパク質 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 に組み込んで rBCG を作製し, BCG 東京菌よりも強力なワクチン効果を得た. さらに最近, サブユニットワクチンで, サルのレベルで強力な予防効果が得られた Mtb72f 融合タンパク質の DNA を導入した 72f リコンビナント BCG の作製に成功した. この 72f rBCG は, BA51 rBCG と同程度の極めて強力な結核菌に特異的な IFN $\gamma$  産生 T 細胞数の増強を誘導することを, Elispot Assay で明らかにした.

新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/hu (ヒト結核ワクチン解析モデル) の作製

我々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, 結核菌タンパク質に特異的なヒトキラー T 細胞誘導を示す, 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<sup>6)7)9)23)</sup> (図 3).

図5 IL-6 関連遺伝子を導入した結核感染マウス脾細胞におけるキラーT細胞の活性 (IFN $\gamma$ の産生)



ConA: コンカナバリンA, PHA-P: フィトヘマグルチニン-P,  
PPD: purified protein derivative, M. tu: 結核死菌  
他の略語: 巻末の「今月の略語」参照

#### 新しい結核ワクチンの臨床応用

現在最も有力なものとして, Mtb72f fusion 融合タンパク質サブユニットワクチン, HVJ リポソーム/HSP65 DNA + IL-12 DNA (岡田, Reed 博士, Tan 博士ら, カニクイザルで解析計画), Ag85B-ESAT-6 融合タンパク質 (Andersen 博士ら) が挙げられる。一方 Huygen の Ag85A DNA ワクチンはマウス, モルモットで有効であったが, サルの結核感染予防に対し有効でなかったという (2002 年, 第4回 World Congress on Tuberculosis)。一方, ワクシニアウイルスに Ag85A DNA を導入したワクチンや Lowrie らの HSP65 DNA ワクチンも臨床試験に近い将来考えられている。臨床応用ワクチン候補の筆頭としては Mtb72f 融合タンパク質サブユニットワクチンが挙げられ, 1年以内に第I相臨床試験が計画されている。さらに, 我々は Mtb72f DNA を BCG または HVJ リポソームに組み込み, 極めて強力なワクチン開発を目指している<sup>6)7)9)</sup>。

現在これらについて, HVJ リポソーム/

HSP65 DNA + IL-12 DNA, 72f 融合タンパク質, 72f rBCG などとの比較試験をカニクイザルのモデルで行っている。

おわりに

2002 年 6 月 3 ~ 5 日ワシントン D.C. で開催された第4回 World Congress on Tuberculosis の席上, NIAID 研究所長 Anthony Fauci は今最も臨床応用が期待される2つの結核ワクチンをスライドで示した (また, この会の新しい結核ワクチンの特別講演は Steven Reed 博士であった)。1つは Steven Reed 博士を中心とした我々の 72f 融合タンパク質サブユニットワクチンである。もう1つは Horowitz らの 85B rBCG ワクチンである。サルにおいては 72f ワクチンが明らかにすぐれていることより, 72f ワクチンを含めた我々の開発した DNA ワクチンや rBCG ワクチンが, 結核の発症予防や治療に役立つ日が極めて近い将来来るであろう。

謝辞

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て結核の新しい予防・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 斉藤 泉博士, Corixa 研究所 Reed 博士, Leonard 研究所 Babie Tan 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 (田中高生, 喜多洋子, 桑山さち子, 村木裕美子, 稲永由紀子, 森珠里, 金丸典子, 橋元里実, 松本久美, 岡 美穂) に深謝します。

#### 文 献

- 1) 螺良英郎, 他: 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. 臨科学 35: 344, 1999.
- 3) Flynn JL, et al: Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol 19: 93-129, 2001.
- 4) Schluger NW, et al: The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 157: 679-691, 1998.
- 5) Cole ST, et al: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 393: 537-544, 1998.
- 6) 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.
- 7) Okada M, et al: New (DNA-Recombinant BCG- and Subunit-) Vaccination against tuberculosis and cytotoxic activity. Thirty-Sixth Tuberculosis and Leprosy Research Conference, p127-133, 2001.
- 8) Steven Gillis, 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), p355-359, 2001.
- 9) 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, p197-201, 2000.
- 10) 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, P-049, 2001.
- 11) Okada M, et al: DNA and recombinant BCG vaccination against tuberculosis by the augmentation of cytotoxic activity. FASEB J: A1008, 2001.
- 12) 岡田全司, 他: 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, 他 監), p221. 中山書店, 東京, 1984.
- 13) 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 (石井威望, 他 編), p269. 中山書店, 東京, 1996.
- 14) 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.
- 15) Okada M, et al: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. Proc Natl Acad Sci USA 78: 7718-7721, 1981.
- 16) 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.
- 17) 杉村和久, 他: 細胞性免疫の調節機構. 岩波講座免疫科学 5 (山村雄一, 他 編), p113-204. 岩波書

- 店, 東京, 1984.
- 18) Stenger S, et al: Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 276: 1684-1687, 1997.
  - 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: 抗結核キラーT細胞とリコンビナントBCG・DNA ワクチンの開発による新しい予防・診断・治療法. *実験結核 40年の歩み* (実験結核研究会 編), p119-128, 2000.
  - 22) 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, 2002.
  - 23) 岡田全司, 他: 結核ワクチンの新しいストラテジー. *免疫 Immuno Front* 10: 2000-2008, 2000.
  - 24) 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: 2527-2533, 1979.
  - 25) Okada M, et al: The differentiation of cytotoxic T cells *in vitro*. II. Amplifying factor(s) produced in primary mixed lymphocyte cultures against K/D stimuli require the presence of Lyt2+ cells but not Lyt1+ cells. *J Immunol* 125: 300-307, 1980.
  - 26) 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.
  - 27) Okada M, et al: Immunologic and molecular characterizations of T cell-derived T cell activating factor. *J Immunol* 136: 1288-1294, 1986.
  - 28) 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.
  - 29) Ryll R, et al: Mycobacterial cord factor, but not sulfolipid, causes depletion of NKT cells and up-regulation of CD1d1 on murine macrophages. *Microbes Infect* 3: 611-619, 2001.
  - 30) Akira S: Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol* 78: 1-56, 2001.
  - 31) Brightbill HD, et al: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285: 732-736, 1999.
  - 32) Hess J, et al: Exploiting the immune system: toward new vaccines against intracellular bacteria. *Adv Immunol* 75: 1-88, 2000.
  - 33) Andersen P: TB vaccines: progress and problems. *Trends Immunol* 22: 160-168, 2001.
  - 34) Lowrie DB, et al: Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 400: 269-271, 1999.
  - 35) Alderson MR, et al: Expression cloning of an immunodominant family of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using human CD4(+) T cells. *J Exp Med* 191: 551-560, 2000.
  - 36) Reed S, et al: Development of a recombinant tuberculosis vaccine. Thirty-Fifth research conference on tuberculosis and leprosy, p159-164, 2000.
  - 37) Huygen K, et al: Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 2: 893-898, 1996.

---

### Novel Vaccines against Tuberculosis

Masaji Okada

Clinical Research Center, National Kinki-Chuo Hospital for Chest Diseases



## Brief Communication

# IFN- $\gamma$ overcomes low responsiveness of myeloid dendritic cells to CpG DNA

MASATO UCHIJIMA, TOSHI NAGATA, TAIKI AOSHI and YUKIO KOIDE

*Department of Microbiology and Immunology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan*

**Summary** Dendritic cells (DC) are professional APC that have an extraordinary capacity to prime naive T cells. It has been reported that human DC subsets express distinct toll-like receptor (TLR), which influences their function. In mice, we observed that plasmacytoid DC (pDC) express a higher level of TLR9 compared with myeloid DC (mDC) cultured with GM-CSF. However, we demonstrated that stimulation with IFN- $\gamma$  is capable of upregulating TLR9 expression in mDC to a level comparable with expression in pDC. Consistent with this observation, IL-12 p40 and IL-6 mRNA expression and IL-12 p70 secretion in response to CpG-oligodeoxynucleotides are enhanced in mDC pretreated with IFN- $\gamma$  compared with untreated cells. Therefore, TLR-mediated responses of DC subsets may be influenced not only by signals delivered by pathogens but also by regulatory signals from cytokines such as IFN- $\gamma$ .

**Key words:** CpG-oligodeoxynucleotide, IFN- $\gamma$ , myeloid dendritic cell, plasmacytoid dendritic cell, toll-like receptor 9.

## Introduction

Dendritic cells (DC) have a pivotal role in the interplay between the innate and adaptive immune responses against pathogens and tumours. They are a unique group of bone marrow-derived leucocytes that are specialized for uptake, transport, processing and presentation of antigen to T cells.<sup>1</sup> Although triggering of T cells into cell cycle progression is a central function of DC, it has also been suggested that DC subsets can influence the subsequent development of these dividing T cells. In humans, CD40 ligand-activated monocyte-derived DC, but not plasmacytoid DC (pDC) produced a large amount of IL-12 and induced Th1 rather than Th2 responses.<sup>2</sup> In mice, pDC (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> B220<sup>+</sup>) induced Th1 cells and myeloid DC (mDC) (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> B220<sup>-</sup>) induced Th2 cells when activated with CpG-DNA; however, both DC subsets have been shown to induce flexibly Th1 and Th2 cell development depending on antigen dose and differential toll-like receptor (TLR) ligation.<sup>3</sup> It has been reported that a given DC subset can induce either a Th1 or a Th2 response depending on the type of stimulation and pathogen.<sup>4</sup> Therefore, it seems likely that these DC subsets themselves may not have intrinsic capacity to direct either Th1 or Th2 cell development.

Recognition of the pathogen-associated molecular patterns involves members of the TLR family.<sup>5</sup> In humans, 11 TLR have been identified, and distinct DC subsets express different TLR.<sup>6,7</sup> For example, mDC express TLR2 and TLR4 whereas pDC express TLR7 and TLR9, indicating that distinct DC subsets respond to distinct microbial products.<sup>8</sup> In mice, pDC express low levels of TLR2, TLR3 and TLR4, and

high levels of TLR7 and TLR9.<sup>9</sup> In contrast, mDC express high levels of TLR4 and low levels of TLR9.<sup>3</sup> Bacterial CpG DNA and CpG-oligodeoxynucleotides (ODN) have been shown to stimulate mammalian immune cells through TLR9.<sup>10</sup> Therefore, pDC produce type I IFN, IL-6 and IL-12 p70 when activated with TLR9 ligand CpG.<sup>3</sup> In contrast, LPS stimulates mDC to produce IL-12 p70.<sup>3</sup>

In this study, we showed that IFN- $\gamma$  significantly increases TLR9 expression in mDC and thereby overcomes low responsiveness to CpG DNA.

## Materials and methods

### Mice

Female BALB/c mice (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) were kept under specific pathogen-free conditions and were fed autoclaved food and water *ad libitum* at the Institute for Experimental Animals of the Hamamatsu University School of Medicine. Two-month-old female mice were used in all experiments. All animal experiments were performed according to the Guidelines for Animal Experimentation, Hamamatsu University School of Medicine.

### Generation of bone marrow-derived mDC and pDC

Bone marrow-derived CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> mDC were generated as described previously.<sup>11</sup> In brief, bone marrow cells were isolated by flushing femurs with culture medium and red blood cells were lysed using 0.83% ammonium chloride. The cells ( $1 \times 10^6$ ) were placed in 12-well plates in 2 mL medium with 10 ng/mL GM-CSF and 10 ng/mL IL-4 (Pepro Tech EC, London, UK). The cultures were fed every 2 days by gently swirling the plates, aspirating the medium and adding fresh medium back. At day six, non-adherent cells were collected and resuspended in fresh medium and cultured for an additional 1 day in 12-well plates. CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> B220<sup>+</sup> pDC were generated by culturing bone marrow cells in culture medium containing 100 ng/mL Flt3 ligand (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Correspondence: Yukio Koide, Department of Microbiology and Immunology, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handa-yama, Hamamatsu 431-3192, Japan.  
Email: koide@hama-med.ac.jp

Received 23 August 2004; accepted 11 October 2004.

for 10 days at  $2 \times 10^6$  cells in 12-well plates in a volume of 2 mL. At day five, 1 mL medium was replaced by 1 mL fresh medium containing Flt3 ligand.<sup>12</sup> The purity after culture was always >85%.

#### CpG-ODN

Lipopolysaccharide-free phosphorothioate oligodeoxynucleotides (BEX, Tokyo, Japan) were used in all experiments. The nucleotide sequence of CpG-ODN used in this study is 5'-TGACTGTGAACCGTTCGAGATGA-3' (underlining indicates the immunostimulatory DNA sequence).

#### Preparation of total RNA and semiquantitative RT-PCR

Reverse transcriptase (RT)-PCR was performed as described previously.<sup>13</sup> The sequences of the primers used in this study are as follows: TLR9 forward, 5'-TGTTGCATAAGGCACAGAGC-3'; TLR9 reverse, 5'-CCTGAGCTATTCTGCTGTAGG-3'; IL-12 p40 forward, 5'-GGGACATCATCAAACCAGACC-3'; IL-12 p40 reverse, 5'-CCCAACCAAGCAGAATGCAGC-3'; IL-6 forward, 5'-TATGAAGTTCCTGTGTGCAA-3'; IL-6 reverse, 5'-CTTTGTATCTCTGGAAAGTTT-3'; G3PDH forward, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; and G3PDH reverse, 5'-TCCACCACCCTGTGCTGTA-3'.

#### Real-time quantitative RT-PCR

One  $\mu$ L of total RNA from each sample was used for cDNA synthesis. Nineteen  $\mu$ L of LightCycler mastermix (Fast Start DNA master SYBR Green I; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) was filled in the glass capillaries and 1  $\mu$ L cDNA was added as a template. Real-time quantitative PCR was performed using a LightCycler rapid thermal cycler (Roche Diagnostics). The manufacturer's LightCycler experimental run protocol was used.

#### Western blotting

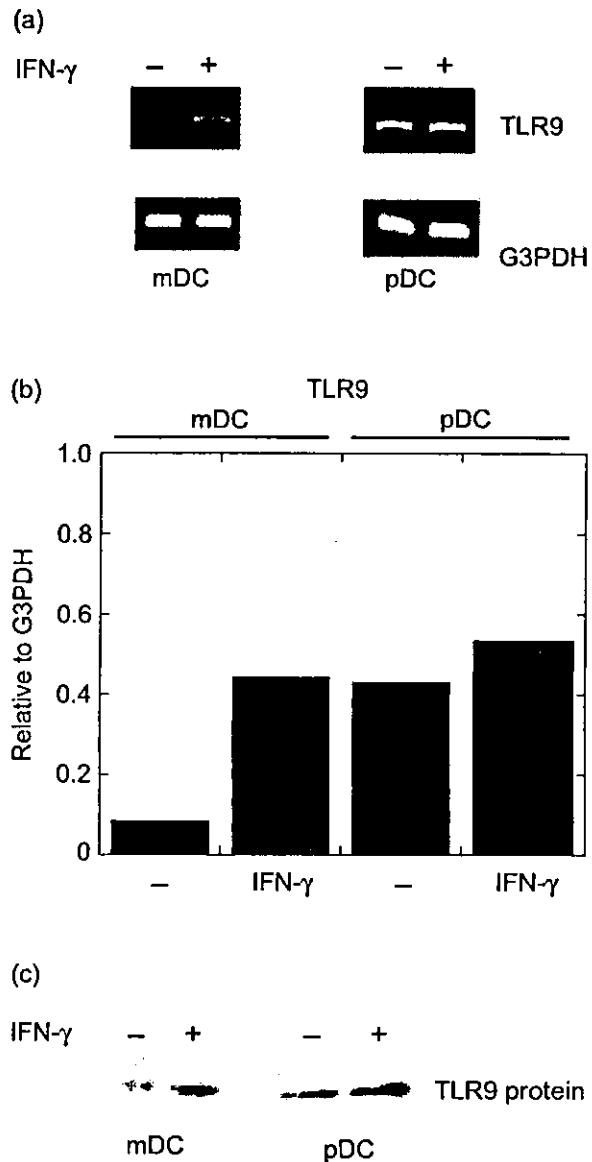
Bone marrow-derived mDC and pDC were stimulated with 5 ng/mL IFN- $\gamma$  for 12 h. After stimulation, cells were harvested and resuspended in lysis buffer. Protein concentrations were measured by Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Equal amounts of protein were loaded in each lane and separated by SDS-PAGE. Gels were transferred onto Hybond-P membranes (Amersham, Piscataway, NJ, USA) and blotted with antimouse TLR9 antibody (IMGENEX, San Diego, CA, USA).

#### ELISA

ELISA was performed as described previously.<sup>14</sup> To measure IL-12 concentration, antimurine IL-12 p70 mAb (PharMingen, San Jose, CA, USA) and antimurine IL-12 p40/p70 (PharMingen) were used as capture and detection mAb, respectively.

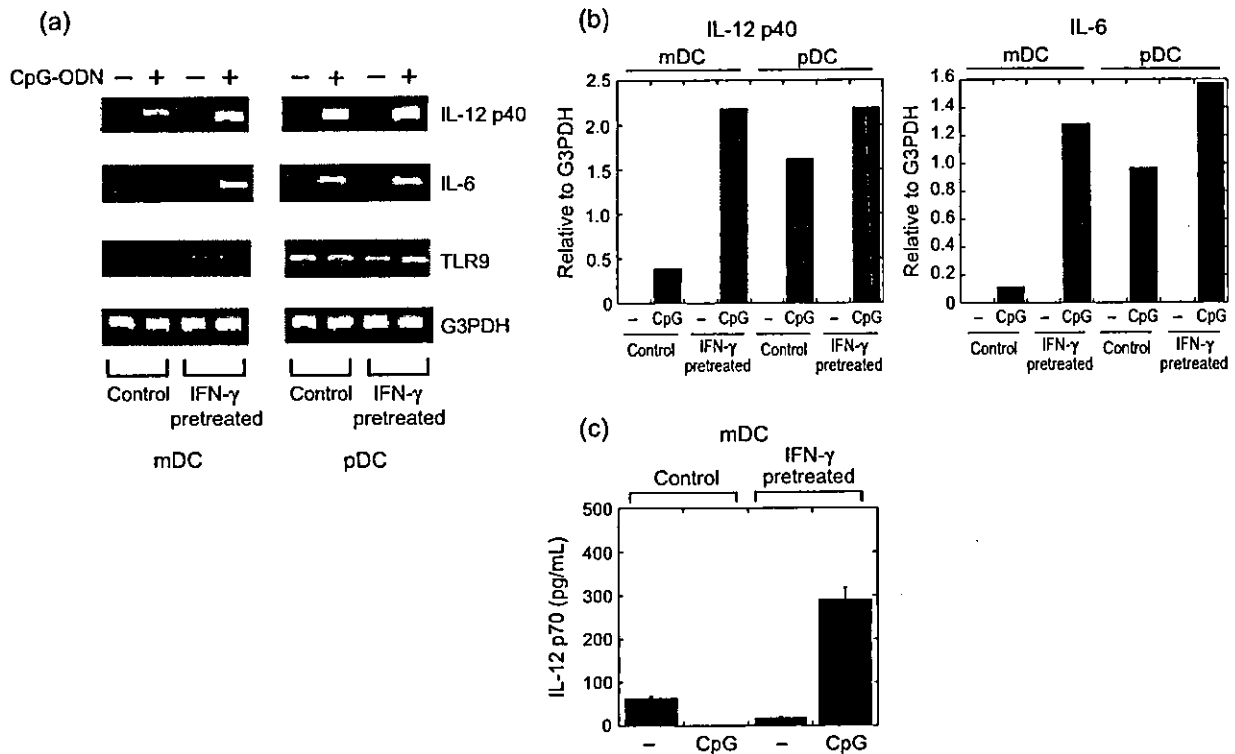
#### Results and discussion

First, we investigated the level of IFN- $\gamma$  expression in murine bone marrow-derived mDC in comparison with that in pDC. As shown in Figure 1a,b, both semiquantitative RT-PCR and real-time quantitative RT-PCR analyses revealed that TLR9 mRNA was faintly expressed in mDC. In marked contrast to mDC, TLR9 mRNA was highly expressed in pDC. This observation agrees well with a published report of murine DC subsets with respect to TLR expression.<sup>3</sup> To investigate the effect of IFN- $\gamma$  on expression of TLR9 mRNA in subsets



**Figure 1.** Upregulation of toll-like receptor (TLR)9 expression in myeloid and plasmacytoid dendritic cells (mDC, pDC) by IFN- $\gamma$ . (a) DC were stimulated with IFN- $\gamma$  (5 ng/mL) for 6 h and total RNA was isolated for first strand cDNA synthesis. Then, semiquantitative reverse transcriptase (RT)-PCR analysis were performed. (b) IFN- $\gamma$  mRNA expression was further analysed by quantitative real-time PCR using the same cDNA used in (a). Expression is relative to G3PDH. (c) mDC and pDC were treated with IFN- $\gamma$  for 12 h. Equal amounts of cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting for TLR9. Similar results were observed in three independent experiments.

of DC, murine bone marrow-derived mDC and pDC were stimulated with 5 ng/mL IFN- $\gamma$  for 6 h. After stimulation with IFN- $\gamma$ , mDC appeared to upregulate TLR9 mRNA expression to a level that was comparable with pDC (Fig. 1a,b). Expression peaked at 12 h and remained constant for 24 h after IFN- $\gamma$



**Figure 2** Effect of IFN- $\gamma$  pretreatment on CpG-oligodeoxynucleotide (ODN)-inducible gene expression. (a) Myeloid and plasmacytoid dendritic cells (mDC, pDC) were treated with IFN- $\gamma$  (5 ng/mL) for 12 h and washed. The cells were incubated for 2 h before stimulation with CpG-ODN for 6 h. Total RNA was isolated and semiquantitative reverse transcriptase (RT)-PCR was performed. (b) IL-12 p40 and IL-6 expressions were further analysed by quantitative real-time PCR using the same cDNA used in (a). Expression is relative to G3PDH. (c) IL-12 p70 protein concentrations were measured by ELISA. Control or IFN- $\gamma$  pretreated mDC were stimulated with CpG for 4 days and the supernatants were subjected to analysis.

stimulation (data not shown). The effect of IFN- $\gamma$  was confirmed by the observation that no IFN- $\gamma$ -induced increase of mRNA levels for TLR9 was observed in mDC and pDC from IFN- $\gamma$  receptor-deficient mice (data not shown).

Given that treatment of mDC with IFN- $\gamma$  significantly augmented TLR9 mRNA, we next investigated TLR9 protein expression in response to IFN- $\gamma$  (Fig. 1c). Control mDC showed only a detectable level of TLR9 protein. Consistent with mRNA expression, TLR9 protein expression in mDC was upregulated after 12 h treatment with IFN- $\gamma$ .

Because expression levels of TLR were expected to be reflected by their ability to produce cytokines in response to binding of their ligands, we next investigated cytokine mRNA induction of IFN- $\gamma$  pretreated mDC by CpG-ODN stimulation. As shown in Figure 2a, we observed that IL-12 p40 and IL-6 mRNA expression in response to CpG-ODN was enhanced in IFN- $\gamma$  pretreated mDC compared with expression in untreated cells. To obtain highly accurate quantitative data, we applied real-time RT-PCR analysis. Real-time quantitative RT-PCR confirmed the results obtained by semiquantitative RT-PCR (Fig. 2b). We also confirmed enhanced IL-12 p70 secretion from IFN- $\gamma$  pretreated mDC by CpG-ODN stimulation (Fig. 2c). It seems most likely that the enhanced cytokine mRNA and protein expression depends on enhanced

TLR9 expression but not on pretreated IFN- $\gamma$ , because CpG DNA induced IL-12 p40 gene expression has been reported to be independent of STAT1 or IFN consensus sequence binding protein.<sup>12</sup> In addition, DC pretreated with IFN- $\gamma$  did not induce expression of IL-12 p40 and IL-6 mRNA (Fig. 2a,b).

In humans, TLR9 expression is restricted to plasmacytoid DC.<sup>16</sup> In mice, however, TLR9 is highly expressed on bone marrow-derived and spleen plasmacytoid pDC, and to a lesser extent on GM-CSF cultured mDC.<sup>3</sup> Consistent with this report, we observed high levels of TLR9 mRNA and protein expression in pDC and significantly lower levels of expression in mDC.

Our data indicate that a high level of TLR9 expression is induced in mDC after stimulation with IFN- $\gamma$ , resulting in acquisition of enhanced responsiveness to CpG. In fact, many studies support a high degree of plasticity in the capacity of DC to prime T cells and drive their functional differentiation.<sup>17</sup> The mechanism of IFN- $\gamma$  inducible TLR9 in mDC remains unknown and awaits elucidation of the promoter sequence of the TLR9 gene.

Thus, TLR-mediated responses of DC may be influenced not only by signals delivered by pathogens such as LPS and CpG DNA, but also by regulatory signals from cytokines such as IFN- $\gamma$ .

### Acknowledgements

This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research and Centers of Excellence (COE) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; Health and Labour Science Research Grants for Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; and the United States–Japan Cooperative Medical Science Committee.

### References

- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**: 245–52.
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N *et al*. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; **283**: 1183–6.
- Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M *et al*. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J. Exp. Med.* 2003; **197**: 101–9.
- Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 2000; **192**: 219–26.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2001; **2**: 675–80.
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S *et al*. Quantitative expression of toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 2002; **168**: 4531–7.
- Zhang D, Zhang G, Hayden MS *et al*. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; **303**: 1522–6.
- Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochem. Biophys. Acta* 2002; **1589**: 1–13.
- Okada T, Lian ZX, Naiki M, Ansari AA, Ikehara S, Gershwin ME. Murine thymic plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 2003; **33**: 1012–19.
- Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H *et al*. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2001; **98**: 9237–42.
- Inaba K, Inaba M, Romani N *et al*. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 1992; **176**: 1693–702.
- Gilliet M, Boonstra A, Paturel C *et al*. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 2002; **195**: 953–8.
- Uchijima M, Yoshida A, Nagata T, Koide Y. 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.* 1998; **161**: 5594–9.
- Suzuki M, Aoshi T, Nagata T, Koide Y. Identification of murine H2-Dd- and H2-Ab-restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 2004; **72**: 3829–37.
- Bradford M, Schroeder AJ, Morse HC, Vogel SN, Cowdery JS. CpG DNA induced IL-12 p40 gene activation is independent of STAT1 activation or production of interferon consensus sequence binding protein. *J. Biomed. Sci.* 2002; **9**: 688–96.
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S *et al*. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 2001; **194**: 863–9.
- Kelsall BL, Biron CA, Sharma O, Kaye PM. Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nat. Immunol.* 2002; **3**: 699–702.