

Fig. 2 Innate immunity system and Acquired immunity system

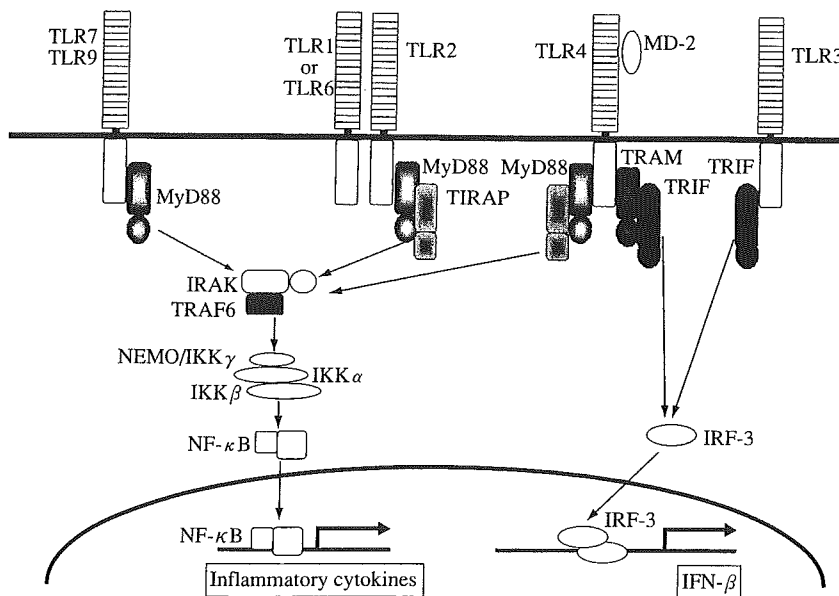


Fig. 3 Pathway of signal transduction through TLR

答のトリガーとしてきわめて重要な役割を担っていることが明らかになってきた。

TLRを介したシグナル伝達経路

そこでTLRによる病原体の認識から遺伝子発現にいたる分子機構を解析するため、TLRを介したシグナル伝達経路を解析した。TLRを介したシグナルは、すべて各TLRの細胞質内に保存されたTIRドメインから開始される。その下流でも、同じTIRドメインを持った分子群

(MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM)が重要な役割を担っていることがノックアウトマウスの解析から明らかになってきた⁴⁾。

MyD88は、すべてのTLRを介した炎症性サイトカインの誘導シグナルに必須である。しかしその後の解析から、TLR4を介したシグナルには、MyD88依存性の炎症性サイトカインの産生に必須のシグナルと、MyD88非依存性のシグナルが存在し、このシグナルではIFN- β およびIFN誘導性遺伝子が転写因子IRF3の活性化を通

して誘導されることが明らかになった。また、TLR3を介したシグナルでも、MyD88非依存性にIRF3の活性化が誘導され、IFN- β が産生される。TRIFは、TLR3、TLR4を介したMyD88非依存性の経路に必須の役割を果たす。TIRAPは、TLR2とTLR4によるMyD88を介したシグナルに特異的に関与している。TRAMはMyD88非依存性（TRIF依存性）経路の中で、TLR4を介したシグナルに特異的に関与している。このように、TIRドメインを有する分子群が、TLRを介した細胞内シグナル伝達経路において極めて重要な役割を担っていることが明らかになった（Fig. 3）。

TLRを介したシグナルの結核感染防御における役割

このような中で、TLRによる自然免疫系活性化の、生体レベルでの結核感染防御における役割について現在解析している。これまでに、MyD88欠損マウスで、結核菌やBCGの感染に対し感受性がやや高まることが報告されている。私たちは、TLRを介した自然免疫系の活性化が消失するMyD88/TRIF二重欠損マウスを用いて、結核感染における自然免疫系の関与について検討した。正常マウス、MyD88欠損マウス、TRIF欠損マウスではBCG感染による肺病変は観察されないが、MyD88/TRIF二重欠損マウスの肺では、多数の壊死性病変が観察された。この結果は、TLRを介した自然免疫系の活性化が結核感染防御にも生体レベルで重要な役割を担っていることを示している。BCG感染においては、Th1応答が感染

防御に重要な役割を担っている。MyD88欠損マウスでは、BCG感染後のTh1応答が正常と比べて3分の1程度に低下するが、MyD88/TRIF二重欠損マウスでもTh1応答の障害は同程度しか認められなかった。この結果は、TLRを介した自然免疫シグナル以外にもTh1誘導機構が存在し、さらに自然免疫系がTh1誘導以外の分子機構により結核感染を制御していることを示唆している。

ま と め

以上、TLRを介した自然免疫系の活性化が結核感染防御に関わっていることが明らかになってきた。しかし、TLR非依存性のTh1誘導機構も結核感染ではあることが示され、今後の解析の進展が待たれる。

文 献

- 1) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al.: The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86: 973-983.
- 2) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388: 394-397.
- 3) Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 335-376.
- 4) Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4: 499-511.

———— The 80th Annual Meeting Symposium ————

FRONTIER OF MYCOBACTERIUM RESEARCH

—— Host vs. Mycobacterium ——

Chairpersons: ¹Masaji OKADA and ²Taro SHIRAKAWA

Abstract During the past decade, we have observed advance in tuberculosis research including novel vaccines, innate immunity (TLR), SNP analysis and molecular mechanism of drug resistance. Worldwide genome project enabled the whole genome sequence of host resistant against tuberculosis as well as the whole genome sequence of *M. tuberculosis* H37Rv. DNA technology has also provided a great impact on the development of novel vaccine against TB.

In this symposium, we have invited leading researchers in the field of the frontier study of Mycobacterium research in order to provide general overview of the cutting edge of frontier research.

Molecular mechanism of drug resistance of *M. tuberculosis* has been clarified. On the other hand, molecular mechanism of host-defence (insusceptibility of host) against *M. tuberculosis* has not yet elucidated. Dr. Taro Shirakawa (Kyoto University) reviewed the susceptibility genes of host in TB infection and presented candidate genes associated with multi-drug resistant tuberculosis. Dr. Naoto Keicho (International Medical Center of Japan) tried to identify host genetic factors involved in susceptibility to pulmonary *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection by candidate gene approach and genome-wide approach.

In Japan, Dr. Masaji Okada (National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center) has been engaged actively in the development of new tuberculosis vaccines (HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA vaccine and recombinant 72f BCG vaccine). He showed basic strategy for construction of new candidate vaccines and also showed significant efficacy on the protection of tuberculosis infection using cynomolgus monkeys, which are very similar to human tuberculosis.

Dr. Hatsumi Taniguchi (University of Occupational and Environmental Health) presented that *M. tuberculosis* *mIHF* and the neighbor genes went into a dormancy-like state of *M. smegmatis* in J774 macrophage cells. This study might provide a weapon for elucidating the mechanism of dormancy of *M. tuberculosis* and the development of novel therapy.

Dr. Chiyoji Abe (Nippon Becton Dickinson Co.) reviewed the molecular basis of the resistance to anti-tuberculosis drugs. Most cases of resistance are related to simple nucleotide substitutions rather than to acquisition of new elements.

Dr. Kiyoshi Takeda (Kyushu University) showed interesting finding. He analyzed whether Toll-like receptor (TLR)-mediated activation of innate immunity in host defense against mycobacterial infection. MyD88/TRIF double deficient mice showed high sensitivity to mycobacterial infection,

indicating that innate immunity is involved in anti-mycobacterial infection.

1. SNP (single nucleotide polymorphism) analysis in association with *Mycobacterium tuberculosis*: Taro SHIRAKAWA (Department of Health Promotion & Human Behavior, Kyoto University Medical School, and RIKEN SRC Center)

Candidate gene approach was made on 18 SNPs in 11 genes in association with *M. tuberculosis*. Patients with multi-drug resistance against *M. tuberculosis* are also subjected. SNPs in *NRAMP1* gene were associated with the disease, and drug resistance, its mechanisms remain unknown.

2. Search for genes susceptible to pulmonary *Mycobacterium avium* complex infection: Naoto KEICHO (Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan)

Interaction among pathogens and host factors is important for development of infectious diseases. We are trying to identify host genetic factors involved in susceptibility to non-immunocompromized pulmonary *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection by candidate gene approach and genome-wide approach. Elucidation of functional significance of susceptibility gene polymorphisms will lead to a new strategy for control and prevention of the disease.

3. T cell immunity against Tuberculosis in host and the establishment of novel vaccine: Masaji OKADA (Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center)

T cell (CTL, Th1) immunity including granulysin play an important role in host defense against tuberculosis (TB) in human. Patients with TB or Multi-drug resistant TB showed suppression of all these immunities.

HVJ-liposome/Hsp65 DNA + IL-12 DNA vaccination was 100 fold more efficient than BCG on the elimination of *Mycobacterium tuberculosis* (M.TB) in the BALB/c mice. Cytotoxic T cells activity against M.TB was augmented. By using these new vaccines (Hsp 65 DNA + IL-12 DNA, recombinant 72f BCG) and the cynomolgus monkey models which are very similar to human tuberculosis, the prophylactic effect of vaccines was observed. Thus, these novel vaccines should provide a useful tool for the prevention of human TB infection.

4. *Mycobacterium tuberculosis* *mIHF* and the neighbor genes go into a dormancy-like state of *M. smegmatis* J15CS in J774

cells: Hatsumi TANIGUCHI (Department of Microbiology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health)

Mycobacterium smegmatis J15CS transformants harboring the *mIHF* gene or the *mIHF-gmk-Rv1390* genes showed no difference in *in vitro* growth and acid-fastness. However, transformants harboring *mIHF-gmk-Rv1390* formed short-rod cell morphology and decreased acid-fastness in the mouse macrophage-like cell line J774 compared to those of the other transformants, and the nuclei of the infected J774 cells also changed. Nevertheless, the colony forming units were similar.

These indicate that *mIHF* and the neighbor genes of *M. tuberculosis* might regulate a growth of mycobacteria in macrophages.

5. Molecular basis of the resistance to anti-tuberculosis drugs : Chiyoji ABE (Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.)

Considerable progress has been made toward understanding the molecular basis of the resistance to anti-tuberculosis drugs. Most cases of resistance are related usually to simple nucleotide substitutions rather than to acquisition of new elements. Multi-drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* arise a consequence of sequential accumulation of mutation conferring resistance to single therapeutic agents. The basis of resistance is not able to be explained yet in a substantial percentage of strains for other anti-tuberculosis drugs than rifampin and pyrazinamide. Further studies are required to fully understand the molecular mechanisms of resistance.

6. Toll-like receptors in anti-mycobacterial immune responses :

Kiyoshi TAKEDA (Department of Molecular Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University)

Toll-like receptors (TLRs) play an essential role in the recognition of specific patterns of microbial components. TLRs mediate activation of innate immunity and further development of antigen-specific adaptive immunity. In TLR signaling pathways, Toll/IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptors, such as MyD88, TIRAP, TRIF, and TRAM, have been shown to play pivotal roles. Thus, the molecular mechanisms for TLR-mediated activation of innate immunity have been largely understood. We analyzed whether TLR-mediated activation of innate immunity is involved in host defense against mycobacterial infection. MyD88/TRIF double deficient mice, in which TLR-dependent activation of innate immunity is abolished, showed high sensitivity to mycobacterial infection, indicating that innate immunity is critically involved in anti-mycobacterial responses.

Key words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Frontier study

¹General Director, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, ²Kyoto University Graduate School of Medicine

Correspondence to: Masaji Okada, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: okm@kch.hosp.go.jp)

NOVEL VACCINATION (HVJ-LIPOSOME / HSP65 DNA+ IL-12 DNA AND RECOMBINANT 72F BCG) AGAINST TUBERCULOSIS USING CYNOMOLGUS MONKEY

*Masaji Okada¹⁾, Takao Tanaka¹⁾, Shigeto Yoshida²⁾, Yoko Kita¹⁾, Noriko Kanamaru¹⁾, Satomi Hashimoto¹⁾, Yasufumi Kaneda³⁾, Toshihiro Nakajima⁴⁾, Naoya Ohara⁵⁾, Hiroko Takai¹⁾, Yukari Fukunaga¹⁾, Yoshikazu Inoue¹⁾, Makoto Matsumoto⁶⁾, Robert Gelber⁷⁾, Esterlina V.Tan⁷⁾, E.C.Dela Cruz⁷⁾, R.M.Abalos⁸⁾, L.J.Young⁸⁾, J.A.Burgos⁸⁾, David McMurray⁸⁾, Yasir Skeiky⁹⁾, Steven Reed⁹⁾, Mitsunori Sakatani¹⁾

¹⁾National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, ²⁾Jichi Medical School, ³⁾Osaka University, ⁴⁾Genomidea Co., ⁵⁾Nagasaki University, ⁶⁾Otsuka Pharmaceutical Co., ⁷⁾Leonard Wood Memorial Institute, ⁸⁾Texas A&M University, ⁹⁾Corixa Co.

[Abstract]

Two novel TB vaccines; a DNA vaccine combination expressing mycobacterial heat shock protein 65 (HSP65) and interleukin-12 (IL-12) by using the hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome (HSP65+IL-12/HVJ), and a recombinant BCG harboring the 72f fusion gene (72f rBCG) have been developed. These vaccines provide remarkable protective efficacy in mouse and guinea pig models, as compared to the current by available BCG vaccine. HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccination were 100 fold more efficient than parental BCG Tokyo vaccination, on the elimination of M. TB in lungs, liver, and spleen of BALB/c mice. In the present study, our studies were extended to a cynomolgus monkey model, which is currently the best animal model of human tuberculosis, to evaluate the HSP65+IL-12/HVJ and 72f rBCG vaccines. Vaccination with HSP65+IL-12/HVJ as well as 72f rBCG vaccines provided better protective efficacy as assessed by the Erythrocyte Sedimentation Rate, chest X-ray findings, body weight and immune responses (IFN- γ , IL-2, IL-6 production, and lymphocyte proliferation of cynomolgus monkey), than BCG. Most importantly, HSP65+IL-12/HVJ resulted in an increased survival for over a year. This is the first report of successful DNA vaccination and recombinant BCG vaccination against M. tuberculosis in the monkey model.

[Introduction]

In order to explore the preclinical use of tuberculosis DNA vaccine combinations of IL-12 DNA with Hsp65 DNA, we choose the viral-based hybrid antigen delivery system hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome because this delivery system results in a high transfection efficacy, repeated gene transfection without reduction of gene transfer efficiency *in vivo*, and no apparent toxicity. These characteristics of HVJ-liposomes support the feasibility of its clinical application not only for cancer gene therapy but also for DNA vaccinations.

Researchers have recognized that a nonhuman primate model of TB will be able to provide critical information for vaccine development.

In the present study, we evaluated the protective efficacy of HSP65+IL-12/HVJ and r72f BCG

in the cynomolgus monkey model, which is an excellent model of human tuberculosis [1]. These vaccines provided a strong prophylactic effect in monkeys challenged with *M. tuberculosis* as we have seen previously in mice.

[Materials and Methods]

DNA vaccines encoding *M. tuberculosis* HSP65, mouse IL-12 and guinea pig IL-12 were encapsulated with HVJ- liposomes [2]. Groups of animals (mice and guinea pigs) were vaccinated intramuscularly with HVJ-liposome DNA vaccines. Female BALB/c mice and C57BL/6 mice aged 6~8 weeks were infected by intravenous injection with *M.tuberculosis* H37Rv. DNA vaccination using adenovirus vector was initiated 3-7 days before the i.v. injection of *M.Tb*. DNA vaccination using gene gun (HSP65 DNA + IL-12 DNA) was initiated 14 days before the i.v. injection of *M.Tb*. IL-12 gene or heat shock protein (HSP65) gene derived from *M. tuberculosis* was constructed as DNA vaccine into plasmid using CMV promoter. HSP65 gene was also constructed with HVJ-liposome by Professor Kaneda of Osaka University, CTL activity was assessed by ⁵¹Cr-release and IFN-activity [3, 4]. A total of 16 cynomolgus monkeys were housed in a BL 3 animal facility of the Leonard Wood Memorial. Groups of animals were vaccinated three times with either the HVJ-liposome combination with HSP65 DNA plus human IL-12 DNA (HSP65 + hIL-12/HVJ: 400 µg i.m.), r72f BCG (1×10⁶ CFU i.d.), BCG Tokyo (1×10⁶ CFU i.d.) or saline. One month after the third vaccination, monkeys were challenged with the *M. tuberculosis* Erdman strain (5×10²) by intratracheally instillation, Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR), body weight, chest X-ray, immune responses, DTH reaction against PPD and survival periods were examined during 14 months [1].

[Results]

Mice vaccinated with HSP65 + mIL-12/HVJ had significantly reduced numbers of CFU [5] in the lungs, liver and spleen as compared with mice vaccinated with BCG (Yoshida et al., submitted for publication). CTL activity correlated with the protective efficacy of vaccination (Fig 1). The fusion protein Mtb72f (Mtb39 + Mtb32) vaccine was developed by Skeiky et al. [6]. To improve its vaccine efficacy, a recombinant BCG harboring the 72f fusion gene (r72f BCG) was generated [7]. The ELISPOT assay showed that r72f BCG induced a greater number of IFN-γ producing T-cells than BCG in the mouse model. In the guinea pig model, r72f BCG as well as HSP65 + gpIL-12/HVJ provided better protection against the pulmonary pathology caused by pulmonary challenge with TB than BCG vaccination (data not shown).

The purpose of this study was to evaluate two TB vaccines we have developed in a nonhuman primate model of *M. tuberculosis* infection. To this end, a total of 16 monkeys were vaccinated either with HSP65 + hIL-12/HVJ, r72f BCG, BCG or saline, followed by TB challenge by intratracheally instillation. Table 1 shows survival periods of vaccinated monkeys after TB challenge. All four monkeys in the control (saline) group died of TB infection within 8 months. In contrast, three and two monkeys from the 72f rBCG and HSP65 + hIL-12/HVJ groups, respectively, were alive more than 14 months post-infection (the termination period of the experiment). Survival periods of the remaining

monkeys in the both groups were much longer than those of saline control group. In addition, both HSP65 + hIL-12/HVJ and r72f BCG significantly improved ESR and chest X-ray findings. Body weights of the HSP65 + hIL-12/HVJ group also increased significantly, as compared to saline control group. IL-2 and IFN- γ production were augmented in the two groups vaccinated with HSP65 + hIL-12/HVJ and r72f BCG (data not shown). Furthermore, proliferation of PBL was strongly enhanced in the group vaccinated with HSP65 + hIL-12/HVJ in response to HSP65 protein 4 weeks after TB challenge. Taken together, these results clearly demonstrate that both HSP65 + hIL-12/HVJ and r72f BCG could provide protective efficacy against *M. tuberculosis* in the cynomolgus monkey model.

Furthermore, the new experimental models using SCID-PBL/hu mice and PBL from the patients with tuberculosis capable of analyzing the in vivo human CTL against tuberculosis were used for the assay of in vivo human T cell immunity induced by these vaccinations. In Cancer Research of 1997, we reported that the experimental models using SCID-PBL/hu mice and the IL-6 gene delivered in vivo by an adenovirus vector provide a new strategy capable of analyzing an anti-tumor effect and the in vivo induction of human CTL by cytokine gene therapy without using human body[8]. Therefore, we tried to apply these methods to the development of new vaccine (HSP65DNA+IL-12DNA vaccine) against tuberculosis. In preliminary experiment, HSP65DNA+IL-12DNA vaccine reduced number of CFU in the lung, liver and spleen in SCID-PBL/hu mice infected with H37Rv.

Taken together, these results indicate that the experimental models using cynomolgus monkeys as well as SCID-PBL/hu mice and HSP65+IL-12DNA vaccine might provide new strategies capable of developing new vaccines against tuberculosis.

[Discussion]

HSP65 + hIL-12/HVJ vaccine as well as r72f BCG vaccine exerted the significant prophylactic effect against TB, as indicated by: (1) prolongation of survival for over a year, (2) improvement of ESR and chest X-ray findings, (3) increase in the body weight and (4) augmentation of immune responses, in a cynomolgus monkey model which closely mimics human TB disease. It is very important to evaluate the long survival period in a monkey model, as human TB is a chronic infection disease. Furthermore, the decrease in the body weight of TB patients with TB is usually accompanied by progress of TB disease. Suppression of IFN- γ production, CTL activity and T-cell proliferation has also been observed in patients with TB [9].

Our results with the HSP65 + hIL-12/HVJ vaccine in the cynomolgus monkey model should provide a significant rationale for moving this vaccine into clinical trials. In fact, the 72f fusion protein vaccine entered Phase I testing after its evaluation in cynomolgus monkeys in Leonard Wood Memorial [4] by Reed and Skeiky. Thus, we are taking advantage of the availability of multiple animal models (mouse, guinea pig, and monkey) to accumulate essential data on the HVJ- liposome DNA vaccine in anticipation of a Phase I clinical trial.

[Acknowledgements]

This study was supported by a Health and Labour Science Research Grant from MHLW

shinko-2, H14-shinko- 1, H17-shinko- 5) and international collaborative study grants from Human Science Foundation.

References]

- Walsh GP, Tan EV, dela Cruz EC, et al. The Philippine cynomolgus monkey provides a new human primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med* 1996;2(4):430–6.
- Saeki Y, Matsumoto N, Nakano Y, et al. Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus): reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer. *Hum Gene Ther* 1997;8(17 (November)):2133–41.
- [3] Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, et al. Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78(12):7717–21.
- [4] Okada M, Tanaka T, Inoue Y, et al. New (DNA-rBCG-and Subunit-) vaccination against tuberculosis. In: Thirty-Sixth (US–JAPAN) Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2001. p. 127–32.
- [5] Miki K, Nagata T, Tanaka T, et al. Induction of protective cellular immunity against *M. tuberculosis* by attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. *Infect Immun* 2004;72(4):2014–21.
- [6] Skeiky YA, Alderson MR, Owendale PJ, et al. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol* 2004;172(12 (June)):7618– 28.
- [7] Ohara N, Yamada T. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine* 2001;19(30):4089–98.
- [8] Tanaka F, Abe M, Akiyoshi T, Nomura T, Sugimachi K, Kishimoto T, Suzuki T, and Okada M: 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 Research* 1997; 57: 1335-1343.
- [9] Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93–129.

Fig.1

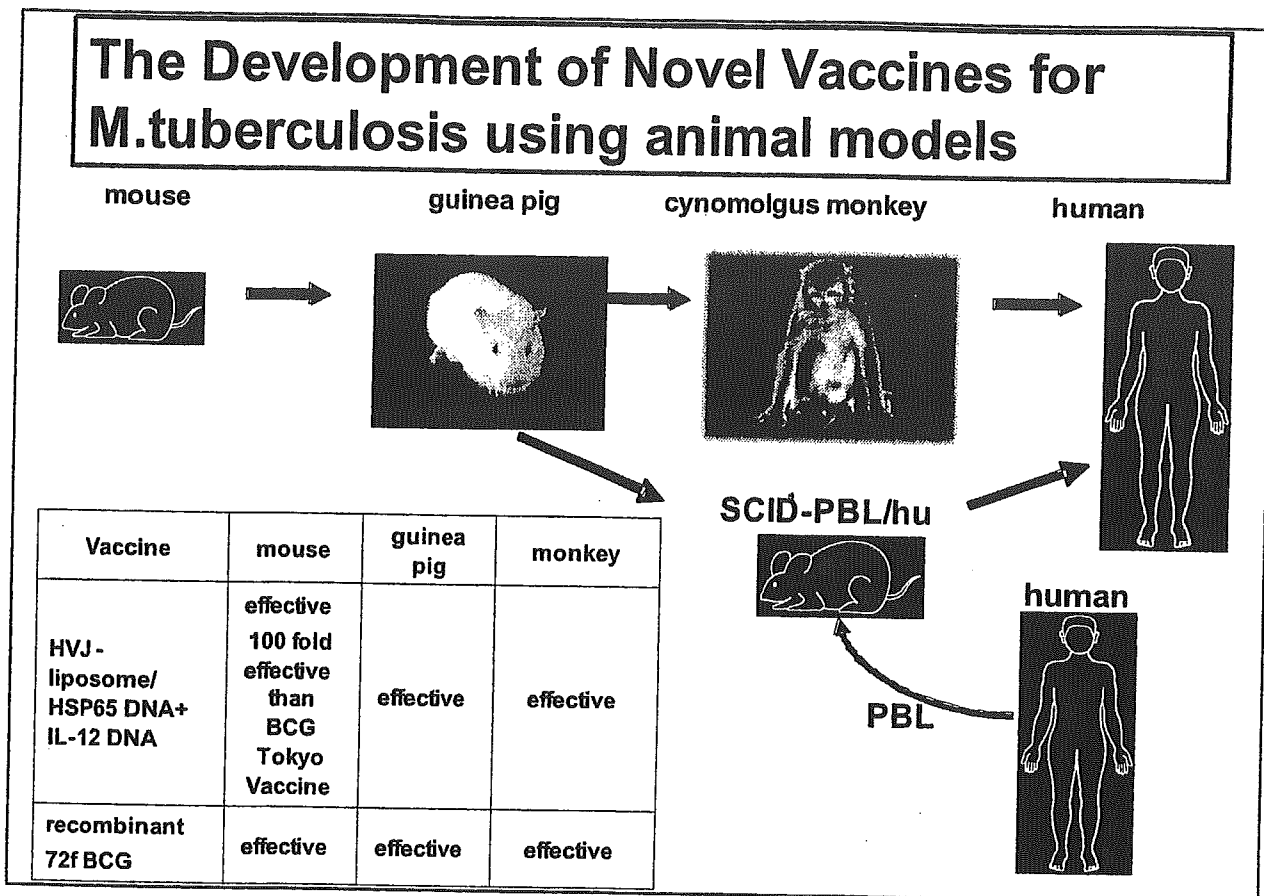


Table 1

Survival of cynomolgus monkeys immunized with HVJ-liposome/HSP65DNA+ IL-12 DNA vaccine and recombinant 72f BCG vaccine

Vaccination	Total monkeys	Survival	% Survival
HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNA	4	2	50
Recombinant 72f BCG	4	3	75
BCG Tokyo	4	2	50
Saline	4	0	0

Cynomolgus monkey (4 monkeys/group) were immunized three times (every 3 weeks) with (1) HVJ-liposome/ HSP65 DNA+ IL-12 DNA vaccine, (2) r72f BCG vaccine, (3) BCG Tokyo and (4) saline as control group as described in Section 2. One month after last immunization, M.TB (Erdman strain 5×10^2) was challenged by intratracheally instillation. Survival was studied more than 14 months.

● 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

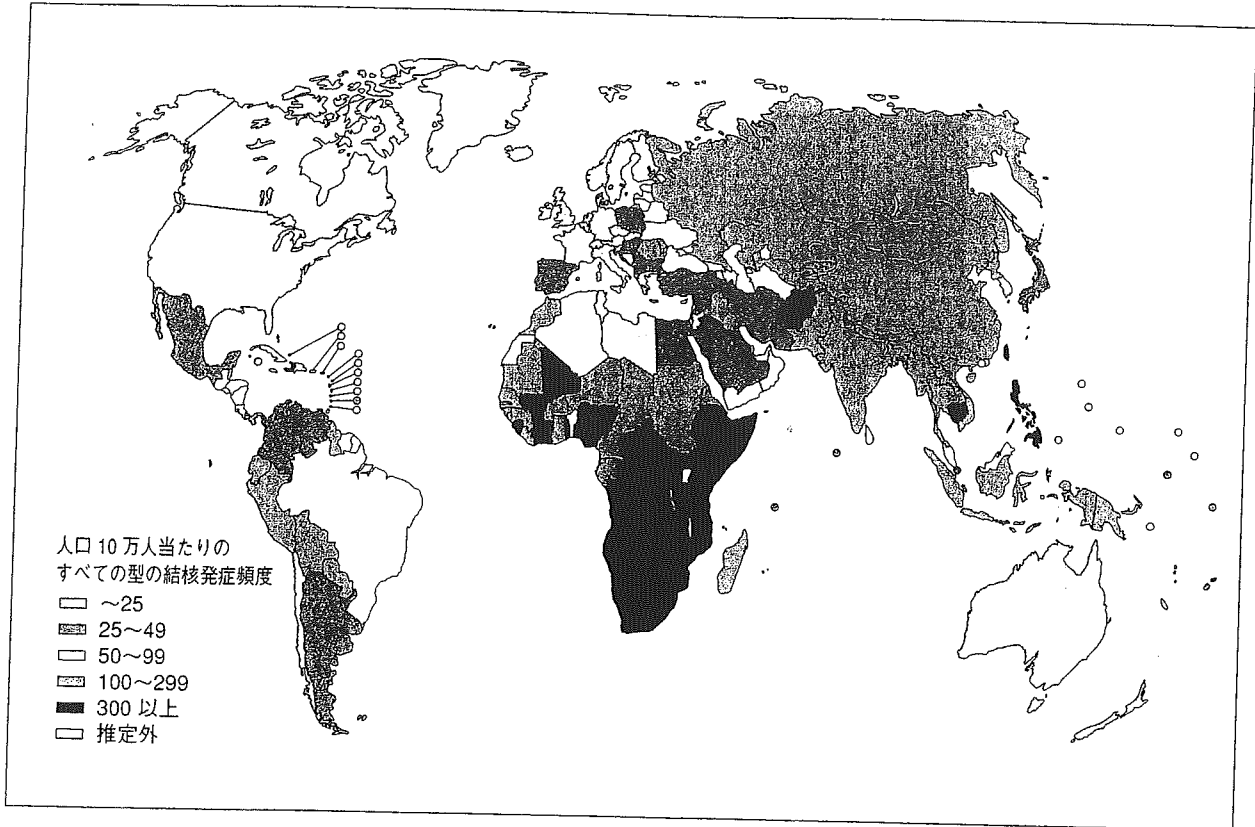
結核症は毎年 800 万人発症, 200 万人が死亡の世界最大の感染症である。結核に対する宿主抵抗性は獲得免疫の T 細胞免疫, 特にキラー T, Th1 細胞, 我々が示した結核菌殺傷タンパク質 granulysin が重要である。一方, TLR などを介する結核自然免疫も明らかとなりつつある。我々は世界に先駆けて BCG より 100 倍強力な Hsp65+IL-12 DNA ワクチンを開発した。T 細胞免疫を介する結核予防ワクチン効果を示した。

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⁾。

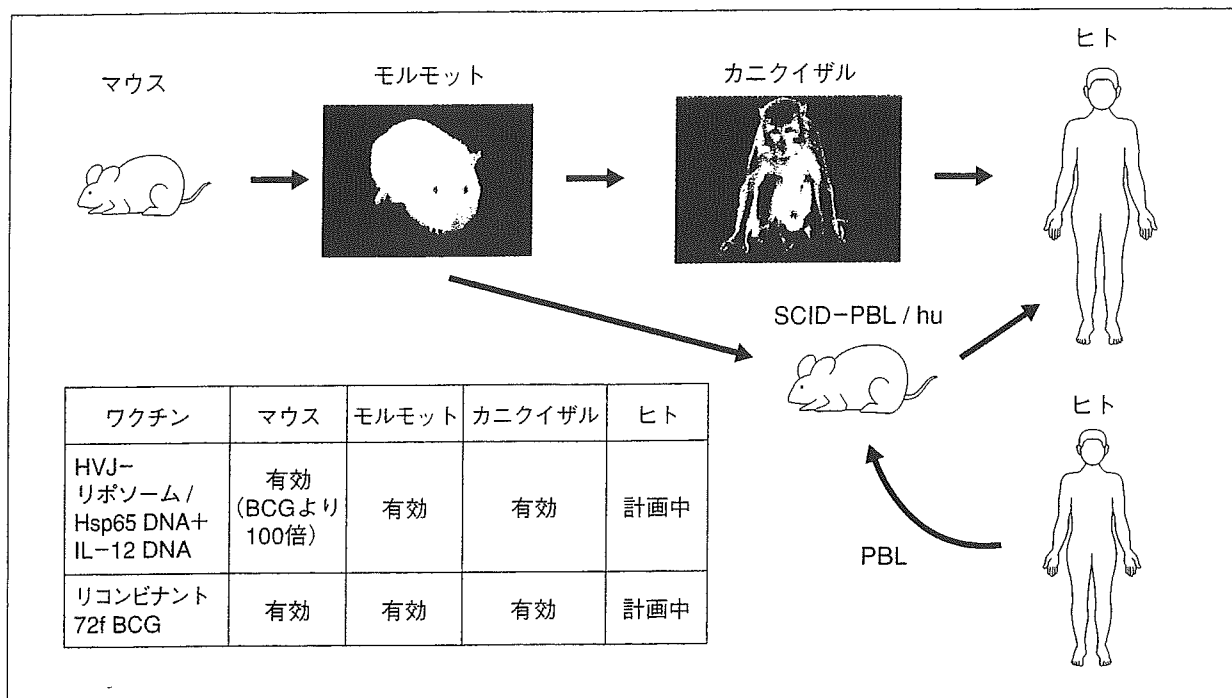
結核症

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（dormancy）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

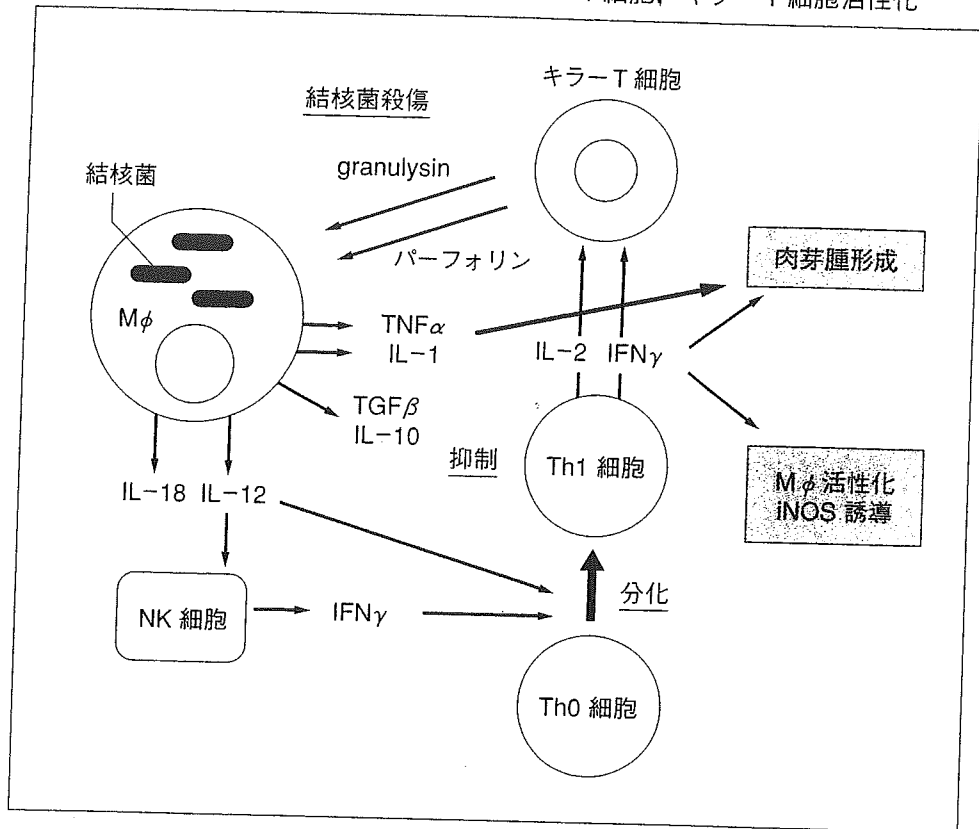
BCG は結核予防ワクチンとして、本邦では 2003 年 3 月まで小児、小、中学生の予防ワクチンとして使用されてきた。しかし、小児結核（特に結核性髄膜炎）には有効であるが成人に対してのワクチン効果は、ばらつきが大きく賛否両論であり、本邦でも BCG 接種は乳幼児のみと法改正がなされた¹⁰⁾。

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.

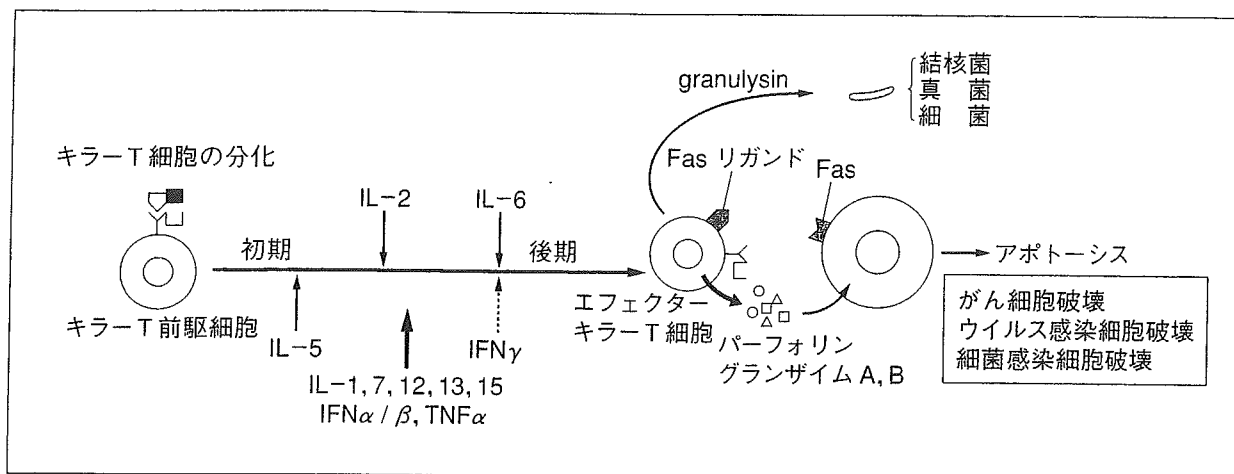
獲得免疫と結核

結核感染に対する免疫力は Mφ, $CD4^+$ T細胞, NK細胞, $\gamma\delta$ T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¹¹⁾.

1. キラーT細胞 ($CD8^+$ T細胞)

$CD8$ あるいは β_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 (図4).

図4 キラーT細胞活性化と細胞傷害機構

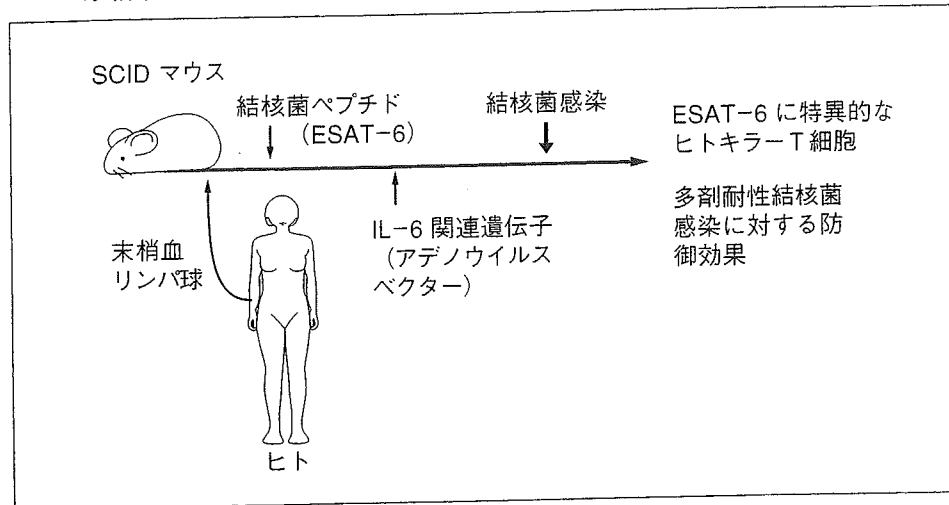


略語：巻末の「今号の略語」参照

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(Cd1c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 AMASTEAGNV, 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)

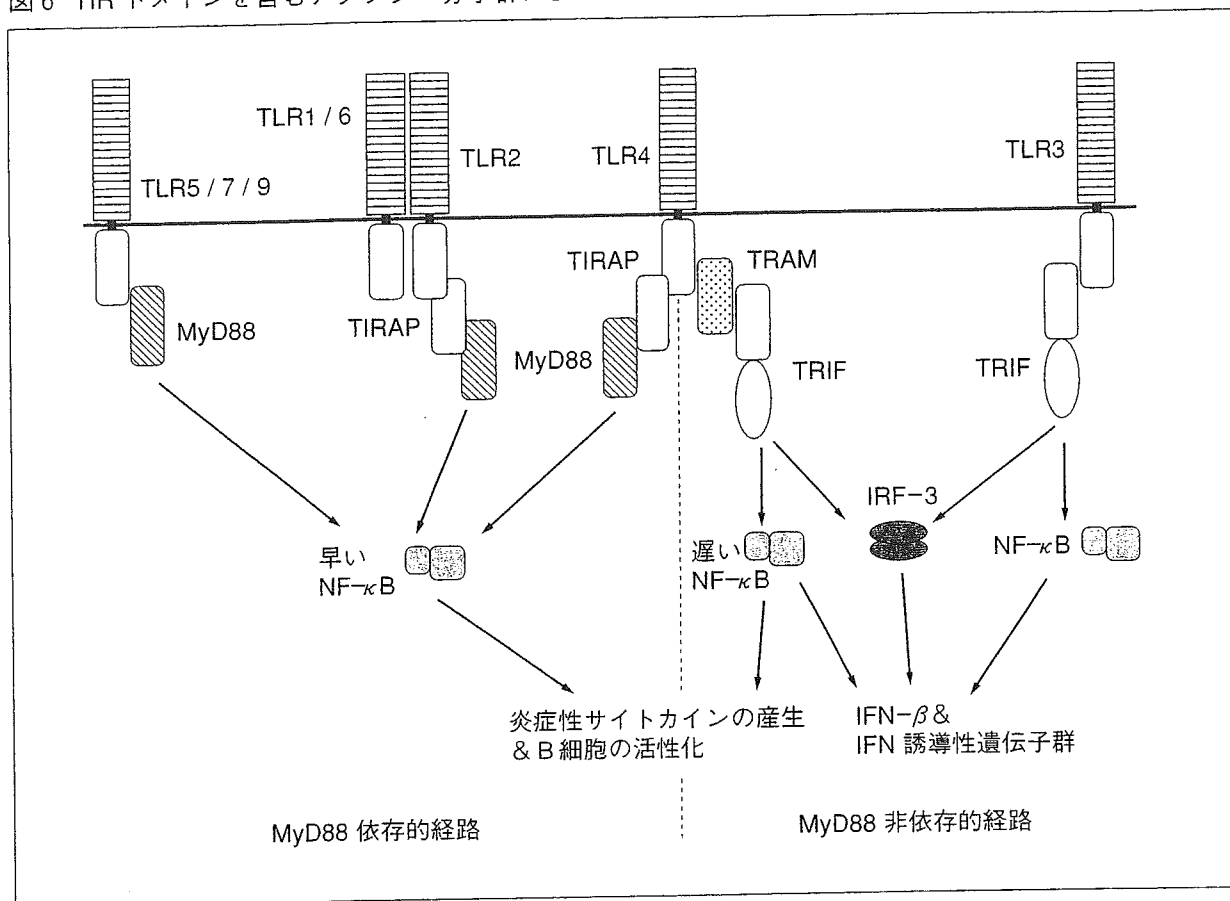
2. Toll-like受容体およびPathogen Recognition Receptorとマクロファージ・樹状細胞活性化

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δρο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 リピート	TLR9

略語：巻末の「今号の略語」参照

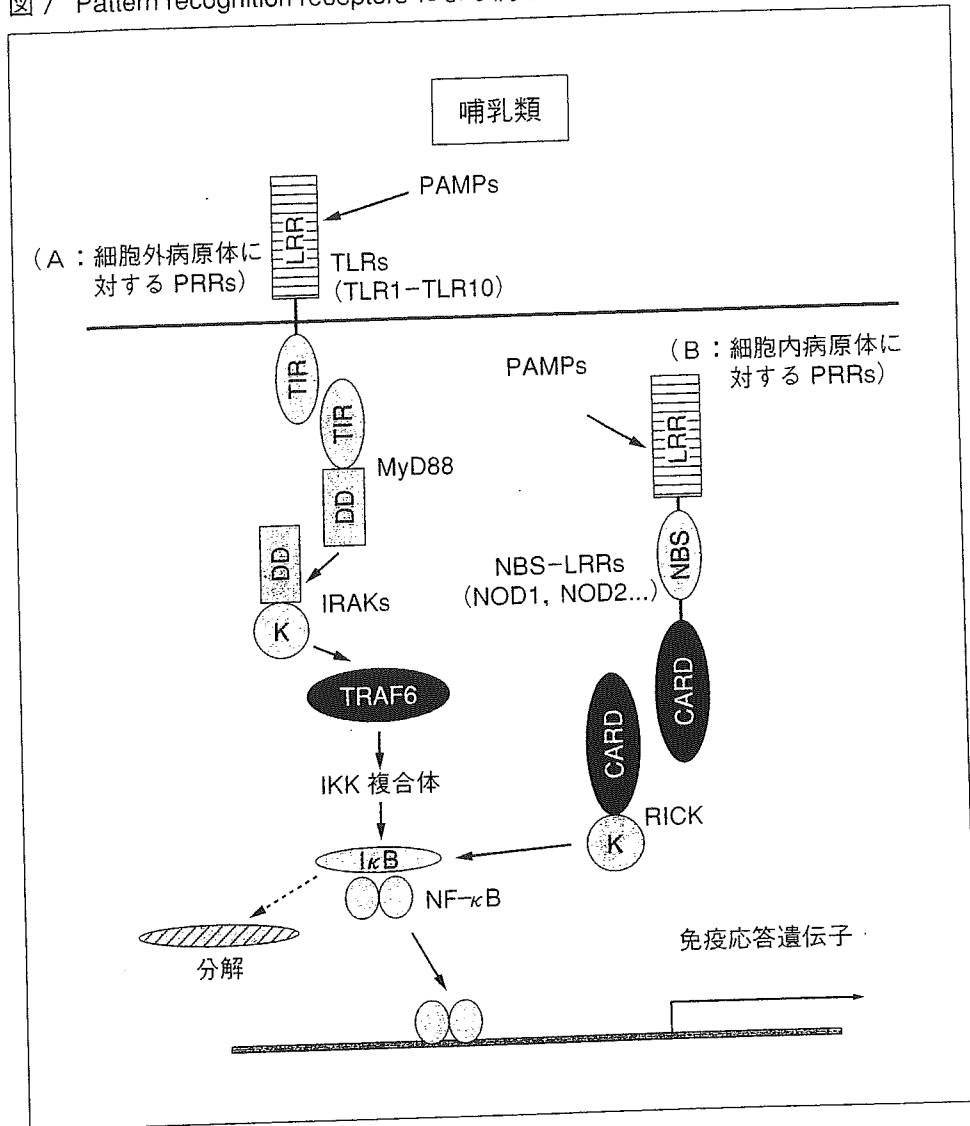
ジア人において *M. leprae* による結節性ハンセン症と関連している。

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、