

表3 新しい結核ワクチン

<p>1. サブユニットワクチン</p> <p>Mtb72f 融合タンパク質</p> <p>85B-ESAT-6 融合タンパク質</p> <p><math>\alpha</math> 抗原 (Ag85B), Ag85A, MPB51, ESAT-6, Hsp65</p> <p>リコンビナントサイトカイン (IFN<math>\gamma</math> など) (吸入・注射)</p> <p>新しい結核菌タンパク質抗原 Mtb32, Mtb39</p> <p>その他</p>
<p>2. DNA ワクチン</p> <p>Hsp65 DNA, IL-12 遺伝子, Hsp70 DNA, ESAT-6DNA, IL-6 遺伝子, IL-6 遺伝子 + IL-6R 遺伝子 + gp130 遺伝子, IFN<math>\gamma</math> 遺伝子, Mtb72f 遺伝子, IL-15 遺伝子, IL-18 遺伝子, M-CSF 遺伝子, 38 kD DNA, キラー T 細胞誘導結核菌タンパク質抗原遺伝子, CD40L 遺伝子, MPT64 DNA, MPT63 DNA, Kat G DNA, 上記の新しい結核菌タンパク質抗原遺伝子</p>
<p>3. リコンビナント BCG ワクチン</p> <p>Mtb72f 遺伝子</p> <p>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</p> <p>IL-6 遺伝子, IFN<math>\gamma</math> 遺伝子, IL-2 遺伝子, IL-12 遺伝子, IL-18 遺伝子</p> <p>キラー T 細胞誘導結核菌タンパク質遺伝子</p>
<p>4. 弱毒化結核菌</p> <p>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</p> <p>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</p>
<p>5. キラー T 細胞移入</p>

略語：巻末の「今号の略語」参照

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

### 新しい結核ワクチン

結核ワクチンは ① サブユニットワクチン, ② DNA ワクチン, ③ リコンビナント BCG ワクチン (弱毒化結核菌を含む), その他に大別される (表 3).

マウスでは BCG ワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチン

表4 新しい結核ワクチンの開発

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

略語：巻末の「今号の略語」参照

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

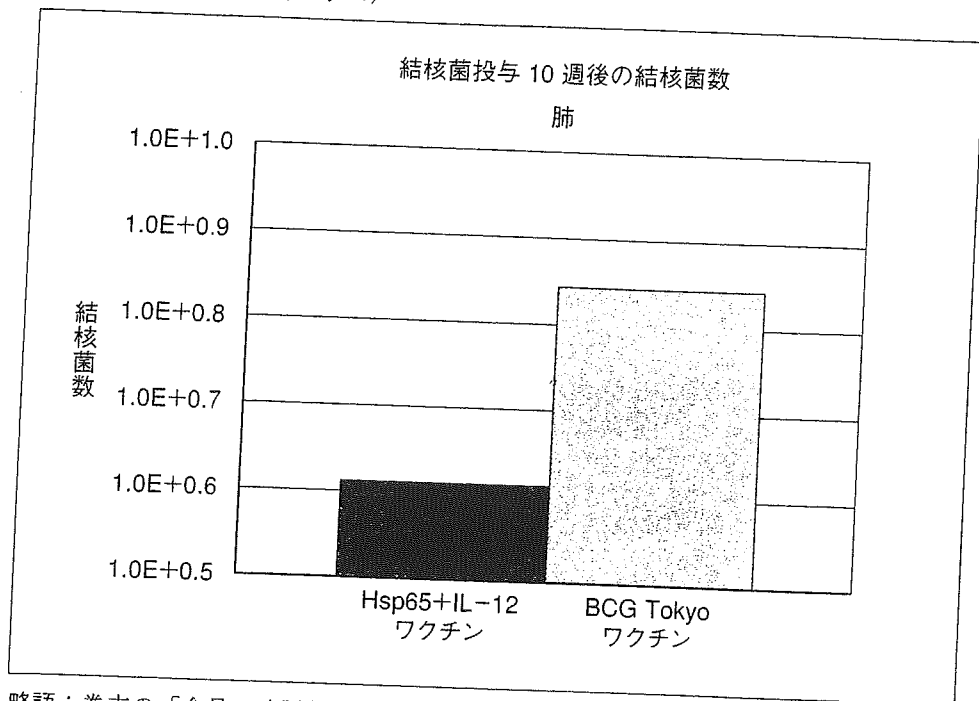
### 1. DNA ワクチン

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

HVJ リ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 4)。

アデノウイルスベクターに導入した IL-6 関連遺伝子 (IL-6 遺伝

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



略語：巻末の「今号の略語」参照

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

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

新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB VACCIENE GROUP MEETING メンバーに選出された.

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

## 2. リコンビナント BCG ワクチン

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

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) 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静脈感染の系および気道感染の系で明らかにした<sup>6)7)9)</sup>。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 細胞数の増加を誘導することを Elispot Assay で明らかにした。

### 3. サブユニットワクチン

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はマウス、モルモットの系で結核予防ワクチン効果を示した<sup>18)</sup>。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た (Reed 博士らとの共同研究)。さらに多剤耐性結核患者の T 細胞免疫能をも増強した<sup>6)</sup> (表 4)。

### 4. 遺伝子ノックアウト弱毒化菌体を用いた結核ワクチン

ある結核菌遺伝子を欠失させて弱毒化した結核菌をワクチンにする方法がある。我々は (浜松医大 小出教授と) さらに、*akt* 遺伝子を欠失させた無毒化リステリア菌に Ag85A-, 85B-, MPB51-DNA を導入し新しい結核ワクチンを開発した。このワクチンは経口ワクチンとして応用できる利点がある<sup>19)</sup>。

新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB VACCINE GROUP MEETING メンバーに選出された。

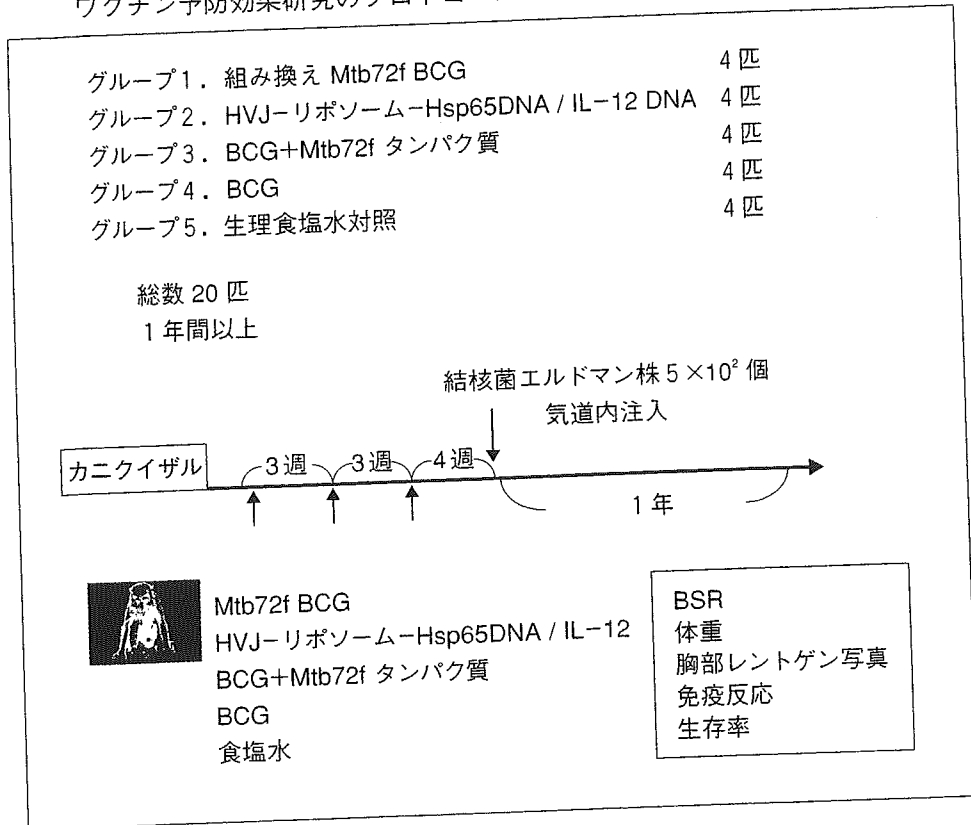
### 新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID - PBL / hu (ヒト結核ワクチン解析モデル) の作製

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)</sup> (図 5)。

### 新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル (最もヒトの肺結核に近いモデル<sup>22)</sup>) を用い BCG よ

図9 カニクイザル (ヒトの結核感染にもっとも近いモデル) を用いた新しい結核ワクチン予防効果研究のプロトコール



略語：巻末の「今号の略語」参照

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）を示すワクチン三種を開発した<sup>8)</sup> (図9) (表5). すなわち，現在最も有力なものとして HVJ リボソーム / Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン，r72f BCG ワクチンおよび Mtb72f fusion 融合タンパク質サブユニットワクチンが挙げられる．事実，我々はカニクイザルで結核感染後1年で，コントロール群（生食投与群）では4匹中4匹死亡（0% 生存）したが<sup>3)</sup>，Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン投与群は，4匹中2匹生存（50% 生存），r72f BCG ワクチンで4匹中3匹生存（75% 生存），BCG Tokyo + 72f fusion タンパク質で4匹中4匹生存（100%）生存を認め，これらのワクチン効果をサルレベルで認めた<sup>8)</sup> (表5). Ag85B-ESAT-6 融合タンパク質（Anderson 博士ら）も報告されているが，モルモット，サルでは効果は不明である．

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．72f

表5 カニクイザルにおける HVJ-リポソーム / Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチン, リコンビナント 72fBCG ワクチンおよび Mtb72f 融合タンパクサブユニットワクチンによる抗結核効果

予防ワクチン	結核予防 ワクチン効果	延命効果	血沈改善	体重増加	胸部X線 所見改善	免疫反応
						リンパ球増殖 反応増強
① HVJ-リポソーム / Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワク チン	++	++	++	+	+	+++
② リコンビナント 72f BCG ワクチン	++	++	+	+	+	+
③ 72f 融合タンパクワクチン	++	++	+	±	++	++
④ コントロール (生食)	-	-	-	-	-	-

略語：巻末の「今号の略語」参照

融合タンパク質サブユニットワクチン, ワクシニアウイルスに 85A DNA を導入したワクチンや r85B BCG (Horowitz ら) は第 I 相臨床試験となっている。

最も切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭として Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチンが挙げられる。リコンビナント 72fBCG も有効である。さらに、我々は Hsp65 DNA + IL-12 DNA ワクチンやリコンビナント 72f BCG ワクチンを組み合わせ、極めて強力なワクチン開発を目指している<sup>5~7)</sup>。

新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB VACCIENE GROUP MEETING メンバーに選出された (表 6)。

#### おわりに

当国立病院機構近畿中央胸部疾患センターは呼吸器疾患 (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・療養所政策医療呼吸器ネットワークを用い結核の新しい予防・治療法の確立が進展している。

サルにおいては 72f ワクチン Hsp65 DNA + IL-12 DNA / HVJ-リポソームワクチンが明らかにすぐれていることより, このワクチン

表6 最先端の新しい結核ワクチン4種  
(WHO STOP TB VACCINE MEETING)

- |  |
|--|
| 1. HVJ-リポソーム/Hsp65+IL-12 DNA ワクチン<br>M. Okada                            |
| 2. リコンビナント 85B BCG ワクチン<br>Horowitz                                      |
| 3. 85B-ESAT6 fusion タンパク質ワクチン<br>P. Andersen (モルモットでは BCG ワクチンよりも優れていない) |
| 4. リコンビナント 72f fusion タンパク質ワクチン<br>S. Reed, Y. Skeiky, S. Gillis         |

略語：巻末の「今号の略語」参照

が結核の発症予防や治療に役立つ日が来るであろう。

## 文 献

- 岡田全司: 結核 “分子予防環境医学: 生命科学研究の予防・環境医学への統合” (分子予防環境医学研究会編). p150-161, 本の泉社, 東京, 2003.
- 岡田全司, 他: 結核感染・新しい結核ワクチンの開発「感染症発症の分子機構-宿主と病原体の分子の攻防」. *Molecular Medicine* 39: 144-154, 2002.
- Flynn JL, et al: Immunology of Tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 19: 93-129, 2001.
- Schluger NW, et al: The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 679-691, 1998.
- 岡田全司: 新しい結核ワクチン. *最新医* 57: 1942-1952, 2002.
- 岡田全司: 厚生労働科学研究費補助金実績報告書 研究報告書, “結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究: [抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン (サブユニット・DNA-・リコンビナント BCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]” p1-140, 2004.
- Okada M, et al: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. *Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference* 171-175, 2002.
- Kita Y, et al: Novel recombinant BCG- and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 2005. (in press)
- 岡田全司, 他 編: 結核感染とサイトカイン. *医学の歩み: サイトカイン-state of arts* (泉 孝英, 他 編). p209-213, 医歯薬出版, 東京, 2004.
- 岡田全司: 結核ワクチン. *結核* 第4版, 医学書院, 2004. (in press)
- Cole ST, et al: Deciphering the biology of Mycobacterium Tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544, 1998.

- 12) Stenger S, et al: An Antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282: 121-125, 1998.
- 13) 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.
- 14) Okada M, et al: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7718-7721, 1981.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Akira S: Toll-like receptor and innate immunity. *Adv Immunol* 78: 1-56, 2001.
- 18) Skeiky Y A, 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* 172 (12): 7618-7628, 2004.
- 19) Miki K, et al: Induction of Protective Cellular Immunity against Mycobacterium tuberculosis by Recombinant Attenuated Self-Destructing Listeria monocytogenes Strains Harboring Eukaryotic Expression Plasmids for Antigen 85 Complex and MPB/MPT51. *Infection and Immunity* 72 (4): 2014-2021, 2004.
- 20) Igarashi T, et al: Adjuvant activity of synthetic N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine and related compounds on cell-mediated cytotoxicity in syngenic mice. *Cell Immunol* 34: 270-278, 1977.
- 21) 山本, 他: TLR を介するシグナル伝達機構における TRIF/TRAM の役割. (奥村 康, 他 編), *Annual Rev* p62-69. 中外医学社, 東京, 2005.
- 22) Walsh GP, et al: Philippin cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med* 2 (4): 430-436, 1996.

---

## Innate Immunity and Acquired Immunity in Tuberculosis

Masaji Okada

Clinical Research Center, National Hospital Organization,  
Kinki - Chuo Chest Medical Center





# 解説

## 結核ワクチン\*

岡田全司\*\* 田中高生\*\* 喜多洋子\*\* 桑山さち子\*\*  
 金丸典子\*\* 村木裕美子\*\* 橋元里実\*\* 岡田知佳\*\*  
 福永有可里\*\* 高井寛子\*\* 坂口弥生\*\* 古川いづみ\*\*  
 山田恭子\*\* 和泉谷美和\*\*

**Key Words :** TB vaccine, DNA vaccine, recombinant BCG vaccine, cytotoxic T cell, cynomolgus monkey

### 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、そのなかから毎年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。結核は最大の感染症のひとつである<sup>1)~4)</sup>。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。1998年、米国疾病予防管理センター(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、Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis(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

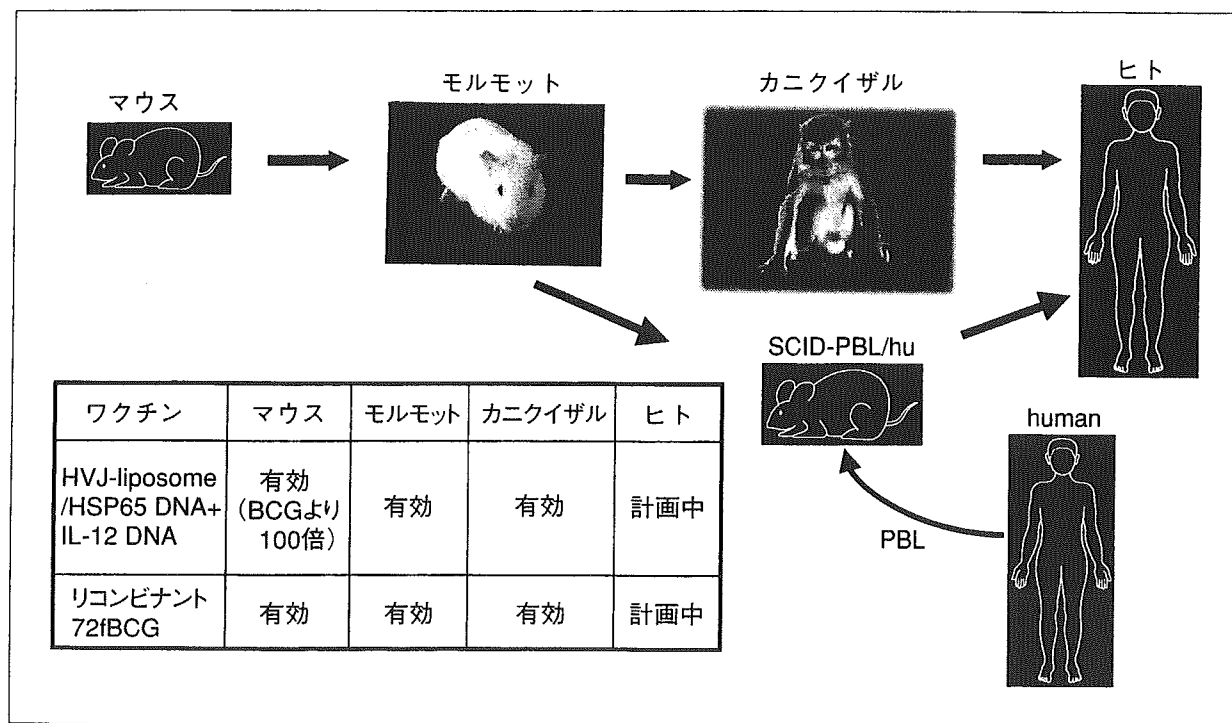


図1 新しい結核ワクチンの開発

\* Novel vaccines against tuberculosis.

\*\* Masaji OKADA, M.D., Ph.D., Takao TANAKA, Yoko KITA, Ph.D., Sachiko KUWAYAMA, Noriko KANAMARU, Yumiko MURAKI, Satomi HASHIMOTO, Chika OKADA, Yukari FUKUNAGA, Hiroko TAKAI, Yayoi SAKAGUCHI, Izumi FURUKAWA, Kyoko YAMADA & Miwa IZUMIYA : 独立行政法人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 [☎591-8555 堺市長曽根町1180] ; Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, Sakai 591-8555, JAPAN

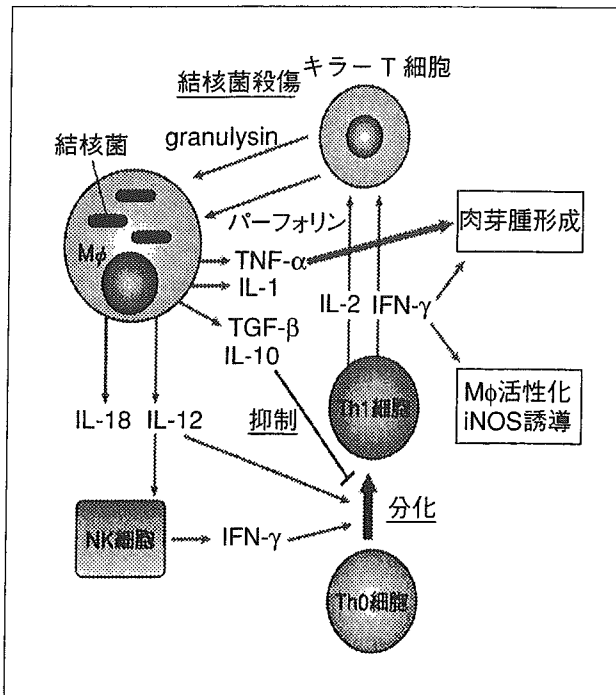


図2 抗結核免疫とマクロファージ, ヘルパーT  
キラーT細胞活性化

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1)<sup>5)~8)</sup>。そこで, 新しい抗結核ワクチン開発について述べ, また, 結核感染免疫におけるキラーTの機能解明についても述べる<sup>9)10)</sup>。

### 結核感染とサイトカイン

結核感染に対する免疫力はMφ, CD4<sup>+</sup>T細胞, NK細胞,  $\gamma/\delta$ T細胞, キラーT細胞(CD8<sup>+</sup>TとCD8<sup>-</sup>T)および肉芽腫形成の総合的な抵抗力である(図2)。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ようになった<sup>11)</sup>。

#### 1. キラーT細胞(CD8<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である(図3)。

キラーTのひとつの役割としてIFN- $\gamma$ 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Mφ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。最近, CD8<sup>+</sup>T細胞が結核菌に感染した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<sup>12)</sup>。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。われわれは結核患者, 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<sup>5)</sup>。

#### 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)

筆者らはCD8<sup>+</sup>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<sup>14)</sup>。IL-2はキラーT細胞誘導に必須な因子のひとつであることを示した<sup>13)</sup>(図2)。さらに, 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分化を誘導することをはじめて明らかにした<sup>14)~17)</sup>(図3)<sup>5)6)8)~10)</sup>。

#### 3. サイトカインと結核免疫

抗結核免疫にIFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12が重要である。IL-12とIFN- $\gamma$ 産生の間にはポジティブフィードバック機構が働いてIFN- $\gamma$ はMφからのIL-12産生を誘導し, IL-12はT細胞からのIFN- $\gamma$ 産生をさらに増殖し, 初期防御反応では感染局所にMφを集め, 特異的防御免疫が成立する(図2)<sup>1)</sup>。

結核性肉芽腫の形成にTNF- $\alpha$ の存在がもっとも重要である。

#### 4. マクロファージ(Mφ)

結核菌の増殖場所はMφ内である。一方, Mφ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, 結核菌が優位にたつか, ヒト(生体)が優位にたつかの戦争でもある(詳細は文献<sup>2)</sup>参照)。

#### 5. Toll-like受容体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<sup>18)</sup>。結核菌のcell wall (LAM, mAGP, total lipid)による応答は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。

#### 6. Th1リンパ球, Th2リンパ球

CD4<sup>+</sup>T細胞が結核免疫に重要であることはMHC

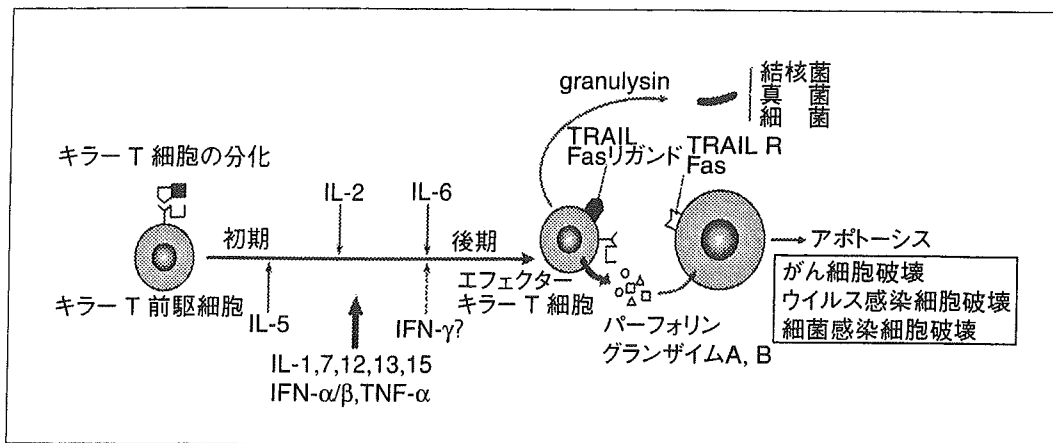


図3 キラー T 細胞活性化と細胞傷害機構

class II<sup>-/-</sup>マウスやCD4<sup>-/-</sup>マウス抗CD4抗体投与マウスで明らかとなっている<sup>19)</sup>(Th1細胞と結核免疫については文献<sup>2)</sup>参照)。

### 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、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)、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、①gene gun ②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<sup>6)~9)19)</sup>。α抗原(Ag85B)、ESAT-6、種々のサイトカイン、HSP65、38kDa、Mtb32、Mtb39、MDP1等について、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>20)21)</sup>。

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)。

#### 1. DNAワクチン

われわれはHSP65 DNA+IL-12 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(表2)。また、IL-12のp35およびp40をCMVプロモーター下流域に挿入した発現プラスミドを作製した。

さらに、ヒト型結核菌H37Rv由来HSP65 DNAワクチンの作製に成功した(図4,表2)。

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(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<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。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(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>22)</sup>。

#### 2. 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。これらの遺伝子をPNN2シャトルベクター(大腸菌⇔抗酸菌)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)

表1 新しい結核ワクチン

1. サブユニットワクチン
Mtb 72f fusion蛋白
85B-ESAT6 fusion蛋白
α 抗原 (Antigen 85B), Ag85A, MPB51, ESAT-6, Hsp65
19kd lipoprotein
リコンビナントサイトカイン(吸入・注射)(γ-IFN, など)
新しい結核蛋白抗原Mtb8.8, Mtb9.9, Mtb32, Mtb39, Mtb11等
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-6レセプター遺伝子+gp130
遺伝子, γ-IFN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 誘
導蛋白遺伝子, CD40L遺伝子, MPT64DNA, MPT63 DNA, Kat G DNA, 上記の新しい結核蛋白抗原遺伝子
3. リコンビナントBCGワクチン
①Mtb72f遺伝子
②Antigen 85A, 85B, 85C, MPB51-遺伝子, MDP-1遺伝子, ESAT-6遺伝子, HSP65遺伝子
③IL-6遺伝子, γ-IFN遺伝子, IL-2遺伝子, IL-12遺伝子, IL-18遺伝子
④キラー T 誘導結核蛋白遺伝子
4. attenuated結核菌
attenuatedサルモネラ菌に結核免疫増強DNA導入
attenuatedリステリア菌に結核免疫増強DNA導入
5. キラー T 細胞移入

表2 われわれの研究室の新しい結核ワクチン効果のまとめ

新しい結核ワクチンの開発	
(1)DNAワクチン	BCGより有効
HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA	(マウス, モルモット, カニクイザル)
(2)リコンビナントBCGワクチン	BCGより有効
①リコンビナント72f BCG	(マウス, モルモット, カニクイザル)
②リコンビナント(Ag85A+85B+MPB51)BCG	BCGより有効(マウス)
(3)サブユニットワクチン	BCGより有効(カニクイザル)
Mtb72f融合蛋白	多剤耐性結核患者 T 細胞機能増強活性(+)
	Phase I Study
(4)治療ワクチン	
IL-6 related DNA(マウス)	
(5)Priming-Booster Method	
BCG(priming)+新しいワクチン(booster)(カニクイザル)	
(6)遺伝子ノックアウトattenuatedリステリアを用いた新しい結核ワクチン(経口)	
(7)新しいベクター	
AAVベクター(1,000倍発現効率↑), Adenovirusベクター	
→WHO STOP TB PartnershipおよびWHO STOP TB Vaccines Working Groupに選出	

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と同程度のきわめて強力な結核菌に特異的なIFN-γ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。

### 3. サブユニットワクチン

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はマウス, モルモットの系で結核予防ワクチン効果を示した<sup>23)</sup>。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た(Reed博士らとの共同研究)。多剤耐性結核患者のT細胞免疫能が増強した<sup>6)</sup>(表2)。

一方、85B-ESAT6のfusion蛋白ワクチンがマウスとモルモットでBCGよりやや劣るが同程度に

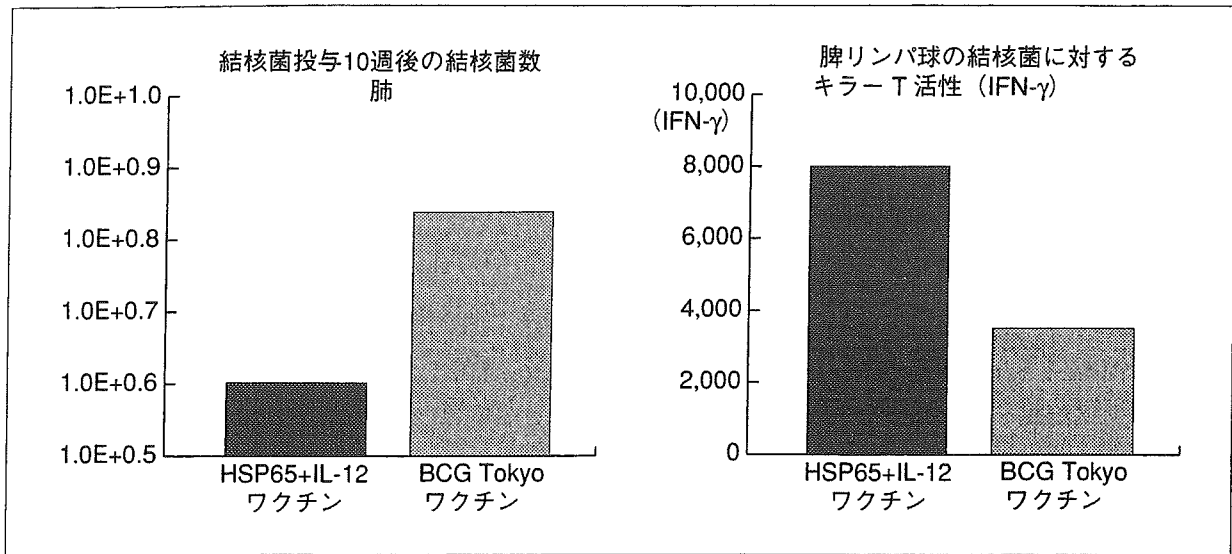


図4 HSP65+IL-12 DNAワクチンによるBCGより100倍強力な抗結核ワクチン効果(マウス)とサイトカイン(IFN-γ)産生キラー T 細胞増強効果

有効であることが報告されている。

#### 4. 遺伝子ノックアウトattenuated(弱毒化)菌体を用いた結核ワクチン

ある結核菌遺伝子を欠失させて弱毒化した結核菌をワクチンにする方法がある。われわれは(浜松医大・小出教授と)さらに、akt遺伝子を欠失させた無毒化リステリア菌にAg85A-DNAを導入し新しい結核ワクチンを開発した<sup>24)</sup>。このワクチンは経口ワクチンとして応用できる利点がある。

これらの1.~4.の新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価されWHO STOP TB PartnershipおよびWHO STOP TB Vaccine Group Meetingに選出された。

#### 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

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、結核菌蛋白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(図5)<sup>6)7)13)</sup>。

#### 新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル(cynomolgus monkey, もっともヒトの肺結核に近いモデル, Nature Medicine1996;

2:430. 参照)を用い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)を示すワクチン3種を開発した(図6)。すなわち, 現在もっとも有力なものとしてHVJリポソーム/HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン, r72f BCGワクチンおよびMtb72f融合蛋白質サブユニットワクチンがあげられる。(岡田, Reed博士, Tan博士ら, カニクイザルで共同研究)。事実, われわれはカニクイザルで結核感染後1年で, コントロール群(生理食塩水投与群)では4匹中4匹死亡(0%生存)したが, HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン投与群は, 4匹中2匹生存(50%生存), r72f BCGワクチンで4匹中3匹生存(75%生存), BCG Tokyo+72f fusion蛋白で4匹中4匹生存(100%生存)を認め, これらのワクチン効果をサルレベルで認めた(2003年第1回国際結核ワクチン学会)。Ag85B-ESAT6融合蛋白質も報告されているが, モルモット, サルでは効果は不明である。一方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85A DNAを導入したワクチンやr85B BCG(Horowitzら)もclinical trialに近い将来考えられている。もっとも切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭としてHSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンがあげられる。一方, BCG+Mtb72f融

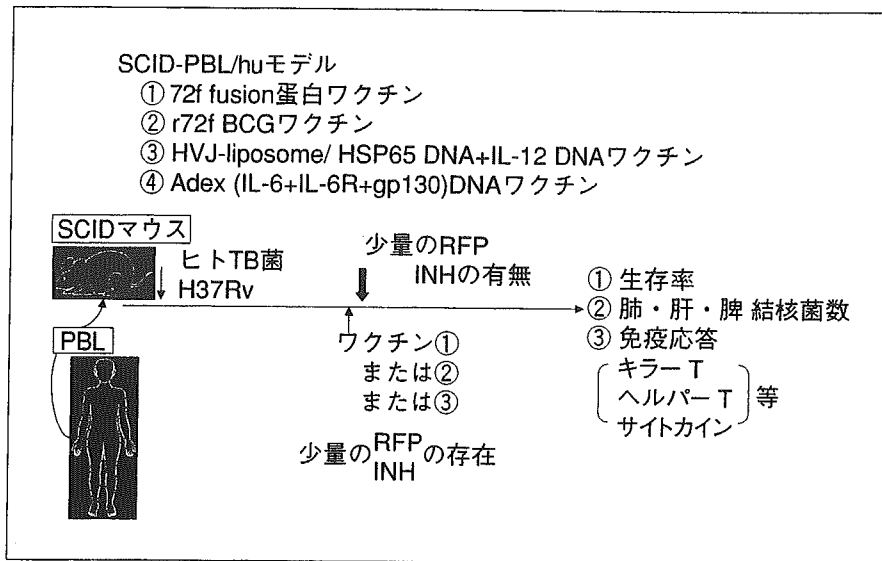


図5 新しい結核治療ワクチンの開発

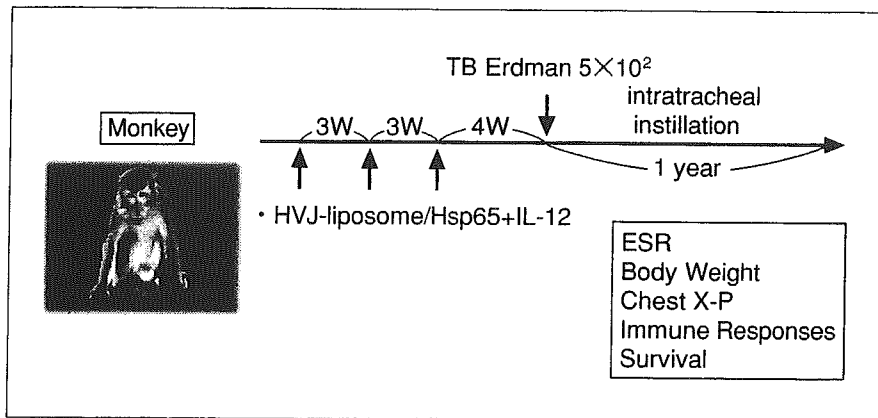


図6 プロトコール

表3 最先端の新しい結核ワクチン4種(WHO STOP TB Vaccine Meeting)

1. HVJ-liposome/HSP65+IL-12 DNAワクチン (Okada M)
2. recombinant 85B BCGワクチン (Horowitz)
3. 85B-ESAT6 fusion蛋白質ワクチン (Andersen P)  
(モルモットではBCGワクチンよりも優れていない)
4. recombinant 72f fusion蛋白質ワクチン (Reed S, Skeiky Y, Gillis S)

合蛋白質サブユニットワクチンは、第I相臨床試験が計画されている。さらに、われわれはHSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンと72f融合蛋白ワクチンやリコンビナント72f BCGワクチンを組み合わせ、きわめて強力なワクチン開発を目指している<sup>5)-7)</sup>。

このように、著者らはカンクイザルで結核感染後1年2か月経過観察し、コントロール群より著しく有効な、①HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン、②r72f BCGワクチン、③BCG Tokyo+72f fusion蛋白質ワクチンを開発した。Ag85B-ESAT6融合蛋白質ワクチン、ワクシニアウイルスに85A DNAを導入したワクチンやr85B BCGも clinical trialの候補ワクチンであるが、もっとも切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭としてHSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンがあげられる(表3)<sup>1)25)</sup>。

{WHO STOP TB Vaccine Group Meeting  
およびWHO STOP TB Partnership}

これらの新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価されWHO STOP TB PartnershipおよびWHO STOP TB Vaccine Group Meetingに選出された。HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA

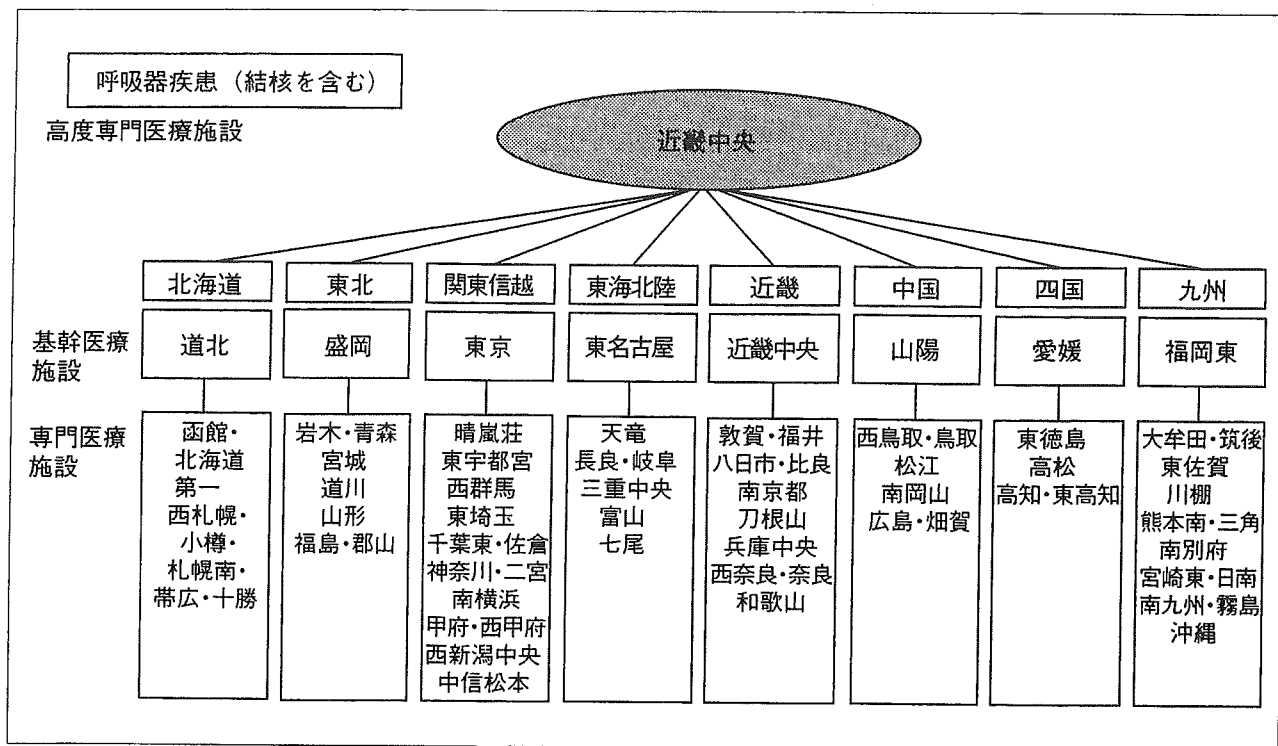


図7 国立病院機構政策医療呼吸器ネットワーク

ワクチンが高く評価された。当センターは呼吸器疾患(結核を含む)準ナショナルセンターであり、日本の結核患者数の約50%の診療を行っている政策医療呼吸器ネットワークを用い、サイトカインDNAワクチン(HSP65 DNA+IL-12 DNA)およびr72f BCGワクチンの臨床応用を計画している(表3)。

おわりに

当近畿中央胸部疾患センターは呼吸器疾患(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、国立病院機構呼吸器専門54施設を統括し、国立病院機構政策医療呼吸器ネットワークを用い結核の新しい予防・治療法の確立が進展している(図7)。

HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチンがBCGワクチンより1万倍強力な結核予防ワクチン効果を示す画期的な成果を得た。したがって、このワクチンを最優先で結核の発症予防や治療に対して臨床応用する計画が進んでいる。

文 献

1) 岡田全司. 結核. In: 分子予防環境医学研究会・

編. 分子予防環境医学: 生命科学研究の予防・環境医学への統合. 東京: 本の泉社; 2003. p. 150.  
 2) 岡田全司, 田中高生, 喜多洋子. 結核感染・新しい結核ワクチンの開発「感染症発症の分子機構—宿主と病原体の分子の攻防」. *Molecular Medicine* 2002; 39: 144.  
 3) Flynn JL, Chan J. *Immunology of Tuberculosis. Annu Rev Immunol* 2001; 19: 93.  
 4) Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 679.  
 5) 岡田全司. 新しい結核ワクチン. *最新医学* 2002; 57: 1942.  
 6) 岡田全司. 結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究: [抗結核キラー Tリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン(サブユニット・DNA・リコンビナントBCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]. In: 厚生労働科学研究費補助金実績報告書・研究報告書 2004. p. 1.  
 7) Okada M, Tanaka T, Inoue Y, et al. Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. *Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy*

- Research Conference ; 2002 Aug 21-23 ; Kyoto, Japan. 2002. p. 171.
- 8) 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. In : 平成12年度新興・再興感染症研究推進事業研究報告集. 東京：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団；2001. p. 355.
  - 9) 岡田全司, 岸本忠三. リンホカインとモノカイン. In : 山村雄一, 織田敏次, 黒岩義五郎, ほか・監. 新内科学体系；年刊版 '84-C. 東京：中山書店；1984. p. 221.
  - 10) 岡田全司. サイトカインと腫瘍免疫. In : 石井威望, 岡 博, 岸本忠三, ほか・編. 新医科学大系 8B；免疫応答－生体の防御機構Ⅱ. 東京：中山書店；1996. p. 269.
  - 11) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998 ; 93 : 537.
  - 12) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An Antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science 1998 ; 282 : 121.
  - 13) 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 1997 ; 122 : 2527.
  - 14) 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 1997 ; 57 : 1335.
  - 15) 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 : 7718.
  - 16) 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 1983 ; 157 : 583.
  - 17) 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 1988 ; 141 : 1543.
  - 18) Akira S. Toll-like receptor and innate immunity. Adv Immunol 2001 ; 78 : 1.
  - 19) Hess J, Schaible U, Raupach B, et al. Exploiting the immune system. Toward new vaccines against intracellular bacteria. Adv Immunol 2000 ; 75 : 1.
  - 20) Anderson P. TB vaccines. Progress and problems. Trends Immunol 2001 ; 22. 160.
  - 21) Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. Nature 1999 ; 400 : 269.
  - 22) Huygen K, Content J, Denis O, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. Nature Med 1996 ; 2 : 893.
  - 23) Reed S, Alderson M, Campos-Neto A, et al. Development of a recombinant tuberculosis vaccine. Thirty-Fifth research conference on tuberculosis and leprosy ; 2000 July 1-19 ; Yokohama, Japan. 2000. p. 159.
  - 24) Miki K, Nagata T, Tanaka T, et al. Induction of Protective Cellular Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by Recombinant Attenuated Self-Destructing *Listeria monocytogenes* Strains Harboring Eukaryotic Expression Plasmids for Antigen 85 Complex and MPB/MPT51. Infect Immun 2004 ; 72(4) : 2014.
  - 25) Kita Y, Tanaka T, Okada M, et al. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. Vaccine. In press 2004.

\* \* \*



Research paper

# Expression mapping using a retroviral vector for CD8<sup>+</sup> T cell epitopes: Definition of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by H2-D<sup>d</sup>

Taiki Aoshi, Mina Suzuki, Masato Uchijima, Toshi Nagata, Yukio Koide\*

*Department of Microbiology and Immunology, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handa-yama, Hamamatsu 431-3192, Japan*

Received 23 June 2004; received in revised form 29 November 2004; accepted 17 December 2004

Available online 1 February 2005

## Abstract

Identification of CD8<sup>+</sup> T cell epitopes is important because detection of specific CD8<sup>+</sup> T cells after infection or immunization requires prior knowledge of epitope specificity. Furthermore, identification of CD8<sup>+</sup> T cell epitopes permits the development of specific preventive and therapeutic approaches to both infections and tumors. Thus far, CD8<sup>+</sup> T cell epitopes have been identified either using an overlapping peptide library covering an entire protein, or using algorithms designed to identify likely peptides that bind to major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. The synthesis of overlapping peptides can be prohibitively expensive, and the algorithm programs used to predict CD8<sup>+</sup> T cell epitopes are not always accurate. Here we describe a retroviral expression system that specifically allows longer polypeptides and shorter peptides to be expressed in the cytoplasm, and thereby to be processed onto class I MHC molecules. T cells from mice that were immunized with a DNA vaccine encoding MPT-51 were probed against MHC-compatible cell lines retrovirally transduced with overlapping gene fragments encoding 120–140 amino acids of the MPT-51 molecule. After further testing of shorter peptide sequences, we identified a CD8<sup>+</sup> T cell epitope using cell lines expressing a relatively small number of algorithm-predicted candidate epitopes. We found that one of the requirements for cell surface display of the 20-mer peptide was the need for cotranslational ubiquitination. The restriction molecule was identified as D<sup>d</sup> following transduction with MHC class I genes followed by transduction with the oligonucleotide encoding the epitope. The retroviral expression system described here is cost-effective, particularly if the target molecule is large, and could be adapted to identifying T cell epitopes recognized in infectious disease and against tumor cell antigens.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Epitope mapping; CD8<sup>+</sup> T cells; Retroviral expression system; Algorithm

**Abbreviations:** aa, amino acid; CTL, cytotoxic T lymphocytes; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ELISPOT, enzyme-linked immunosorbent spot assay; 10FCS, 10% heat-inactivated fetal calf serum; HRP, horseradish peroxidase; MHC, major histocompatibility complex; mAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate-buffered saline; RT, reverse transcription; TAP, transporter associated with antigen processing.

\* Corresponding author. Tel.: +81 53 435 2334; fax: +81 53 435 2335.

E-mail address: koidelb@hama-med.ac.jp (Y. Koide).

0022-1759/\$ - see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.jim.2004.12.015

## 1. Introduction

CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes (CTL) play a pivotal role in protective immunity against infection with intracellular pathogens, such as certain bacteria and viruses (Uchijima et al., 1998; Flynn and Chan, 2001; Gulzar and Copeland, 2004). During an infection, many proteins derived from the pathogen are secreted or produced in the host cells. These proteins are processed by the MHC class I pathway. The endogenous MHC class I pathway targets cytosolic proteins, either self-derived or pathogen-derived, that are processed to peptides by the proteasome. The resulting peptides are actively transported into the endoplasmic reticulum by transporter associated with antigen processing (TAP) molecules, and are finally presented to CTL in the context of MHC class I molecules (Ortmann et al., 1994; Heemels and Ploegh, 1995). Following CTL recognition of pathogen-derived MHC/peptides complexes on the cell surface, the infected cells are killed and infection eliminated by the secretion of effector molecules, such as perforin, granzyme, and interferon- $\gamma$  (Barry and Bleackley, 2002).

Although intracellular pathogens possess a large number of peptides which have the potential to bind to MHC class I molecules, the CD8<sup>+</sup> T cell response is more limited, with only a minority of the potential binding motif-containing peptides from a given foreign protein being actually immunogenic (Sercarz et al., 1993; Barber and Parham, 1994). Various factors have been implicated in this limitation (epitope selection): (1) antigen processing by the proteasome (Eggers et al., 1995; Niedermann et al., 1996); (2) TAP-dependent peptide transport (Lauvau et al., 1999); (3) affinity of the peptide for the MHC (Chen et al., 1994; Sette et al., 1994); (4) the transport of MHC/peptide complexes to the cell surface (Levitsky et al., 1997); and (5) the response of the T-cell repertoire (Connolly, 1994; Cao et al., 1996).

To better understand CD8<sup>+</sup> T cell responses during infection, it is important to identify epitopes that are recognized by CD8<sup>+</sup> T cells. Identification of the epitopes, which typically consist of 8–10-mer peptides, is essential to detect specific CD8<sup>+</sup> T cells by the tetramer assay (Altman et al., 1996), intracellular cytokine staining, or the enzyme-linked immunosorbent spot assay (ELISPOT). In addition, identi-

fication of these epitopes permits the development of specific preventive and therapeutic approaches in both infectious disease and cancer (Nagata et al., 2004; Chen et al., 2004; Faure et al., 2004; Romero et al., 2004).

Overlapping peptide libraries have been widely employed for the identification of T cell epitopes. The libraries, consisting of 15–20-mer peptides overlapping by at least nine residues, span the whole protein of interest (Van der Zee et al., 1989). Once a T cell epitope has been mapped in a 15–20-mer peptide, the minimal T cell epitope can be delineated by preparing a set of peptides, which have been truncated from the N- or C-terminal end of the known active peptide. This is a very powerful method for mapping T cell epitope(s), but it requires numerous rounds of peptide synthesis, which can be prohibitively expensive for a large protein.

Recently, a number of programs that utilize algorithms that have been useful in predicting T cell epitopes for peptide mapping studies have been developed (Parker et al., 1994; Rammensee et al., 1999; Reche et al., 2002). These programs list and rank the possible candidates of T cell epitopes within a given protein sequence. However, it has been shown that these program methods are not infallible, and in some cases are no better than the use of the simple anchor residue motifs (Andersen et al., 2000). In general the immunogenicity of individual peptides predicted by such programs must be confirmed empirically, using any number of T cell assays, although some programs have incorporated various factors involved in the epitope processing (Peters et al., 2003). Currently, the combination of an overlapping peptide library with an epitope prediction program seems to be the most comprehensive and effective method for identification of CD8<sup>+</sup> T cell epitopes within a protein (Suzuki et al., 2004).

In this report, we describe a novel cost-effective retroviral expression method for the identification of CD8<sup>+</sup> T cell epitopes within antigens of interest. As a model antigen, we used MPT51, a major secreted protein of *Mycobacterium tuberculosis* (Wilson et al., 2004), since we recently demonstrated that MPT51 can induce T-cell-mediated immune responses and protective immunity upon challenge with *M. tuberculosis* (Miki et al., 2004). The retroviral expression system makes it possible to express large DNA

fragments in cells so that the location of CD8<sup>+</sup> T cell epitopes can be rapidly identified without preparing numerous synthesized peptides. Minimal CD8<sup>+</sup> T cell epitopes can be identified from the candidate DNA fragments using a computer-assisted algorithm. This method is particularly useful for mapping epitopes from large target molecules where the cost of synthesizing peptides is particularly high.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mice

BALB/c mice (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) were kept under specific pathogen-free conditions and fed autoclaved food and water ad libitum at the Institute for Experimental Animals, 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.

### 2.2. Cell lines

P815 mastocytoma cell line (H2<sup>d</sup>) and BW5147 T lymphoma cell line (H2<sup>k</sup>) were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (RPMI/10FCS) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.3. Construction of a plasmid DNA vaccine, pCI-MPT51

The DNA encoding the mature MPT51 molecule (D26486) was amplified from a plasmid, pMB49 (Ohara et al., 1995), by PCR with following primer pairs: forward primer with ATG starting codon, 5'-CCTCTAGAATGGCCCATACGAGAACCTGA-3'; reverse primer with stop codon, 5'-CAGGCTCTAGACATCGGCACCTGGCTTAGC-3' (underlined nucleotides indicate *Xba*I site). The PCR fragment was digested with *Xba*I and inserted into the *Xba*I site located downstream to the CMV immediate-early enhancer/promoter region of an expression plasmid pCI (Promega, Madison, WI). The nucleotide sequence was confirmed by automated DNA sequenc-

ing (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA) using a dye primer cycle sequencing kit (Applied Biosystems).

### 2.4. Construction of retroviral expression library

Three overlapping DNA fragments encoding fragments of the 266-amino acid (aa) mature MPT51 molecule of *M. tuberculosis* were generated from pCI-MPT51 by PCR amplification using the following primer pairs: for MPT51-F1 encoding aa 1–140, 5'-CCTCTAGAATGGCCCATACGAGAACCTGA-3' (forward primer) and 5'-GTTCTAGATTAGTACAAAAGCCCGACATC-3' (reverse primer); for MPT51-F2 encoding aa 78–198, 5'-ACTCTAGAAATGGATGGCAGCAAGCAGTG-3' and 5'-CCTCTAGATTACGGGTCCACACCCACACC-3'; and for MPT51-F3 encoding aa 135–266, 5'-CTTCTAGAATGTCGGGCTTTTTGTGA-3' and 5'-CAGGCTCTAGACATCGGCACCTGGCTTAG-3' (the forward primers have the ATG starting codon, while the reverse primers contain the TAA stop codon; underlined nucleotides indicate the *Xba*I site). The PCR fragments were digested with *Xba*I and inserted into the *Xba*I site of pBluescript II SK(–) (Stratagene, La Jolla, CA), the orientation of DNA fragments was confirmed by DNA sequencing, and then *Xho*I–*Not*I fragments were cloned into the retroviral expression vector, pDON-AI (Takara Bio, Tokyo, Japan), the multiple cloning site of which had been modified by us. Furthermore, DNA fragments encoding aa 1–100 of the mature MPT51 were amplified by PCR as 40 aa peptide stretches overlapping by 20 residues. The primer pairs used were as follows: for MPT51 1–40, 5'-CCTCTAGAATGGCCCATACGAGAACCTGA-3' and 5'-CCTCTAGATTAATCCGGGCCGGCGTTGAAG-3'; for MPT51 21–60, 5'-CCTCTAGAATGTTCCCTAGCCGGTGGGCCGC-3' and 5'-CCTCTAGATTACGAAATCCCCTTGCCCGCC-3'; for MPT51 41–80, 5'-CCCTCTAGAATGGTCAGTAACTGGGTCA CCG-3' and 5'-CCTCTAGATTAGCTGCATCCTGCTCCCAG-3'; for MPT51 61–100, 5'-CCTCTAGAATGGTGGTGGCA CCGCCGGTG-3' and 5'-CCTCTAGATTAGCCCCGGTTAGCGGC-CAGC-3'. The resultant PCR products were inserted into pDON-AI after cloning into pBluescript II SK(–) as described above.

Forward and reverse primers for MPT51 1–20, MPT51 21–40, and MPT51 41–60 were synthesized, annealed, and then inserted into the *Xba*I site of pDON-AI. The nucleotide sequences of the oligonucleotides were as follows:

MPT51 1–20 (forward) 5'-CTAGAATGGCCCC-CRACGAGAACCTGATGGTGCCAGCCC-CAGCATGGGCAGGGACATCCCCGTGGCC-TAAT-3';

MPT51 1–20 (reverse) 5'-CTAGATTAGGC-CACGGGGATGTCCCTGCCATGCTGGGGC-TGGGCACCATCAGGTTCTCGTAG-GGGGCCATT-3';

MPT51 21–40 (forward) 5'-CTAGAATGTTC-CTGGCCGGCGGCCCCACGCCGTGACT-TGCTGGACGCCTTCAACGCCGCCG- GACTAAT-3';

MPT51 21–40 (reverse) 5'-CTAGATTAGTCGG-GGCCGGCGTTGAAGGCGTCCAGCAGGTA-CACGGCGTGGGGGCCGCCAGGAA-CATT-3';

MPT51 41–60 (forward) 5'-CTAGAATGGTGAG-CAAGTGGGTGACCGCCGGCAACGCCAT-GAACACCCTGGCCGGCAAGGGCATCAGC-TAAT-3';

MPT51 41–60 (reverse) 5'-CTAGATTAGCT-GATGCCCTTGCCGGCCAGGGTGTT-CATGGCGTTGCCGGCGTCAACCCAGTTGCT-CACCAATT-3'.

In some experiments, the ubiquitin gene was fused to the 5' side of the above DNA fragments encoding the 20-aa length peptides. The ubiquitin gene was amplified from mouse cDNA with a forward primer (5'-TCACTAGTATGCAGATCTTCGTG AAGAC-3'; underline indicates the *Spe*I site) with the ATG starting codon and a reverse primer (5'-AATCTAGA CACCACACCTCTCAGGCGA AG-3'; underline indicates the *Xba*I site). Using the reverse primer, a glutamine residue at aa number 76 ( $G_{76}$ ) normally present in the ubiquitin protein was changed to a valine ( $V_{76}$ ) to avoid cleavage with deubiquitinase. After digesting the PCR product with *Spe*I and *Xba*I, the ubiquitin gene was inserted into pBluescript II SK(-) and then the DNA fragments encoding the MPT51 20-mers were inserted in the *Xba*I site to obtain ubiquitin/MPT51 20-mer fusion products. The

fused product was cut out with *Xho*I and *Not*I, and inserted in the *Xho*I-*Not*I site of a retroviral expression vector, pDON-AI. H2-K<sup>d</sup>, H2-D<sup>d</sup>, and H2-L<sup>d</sup> cDNA fused with the EGFP gene were also cloned into a retroviral vector.

The nucleotide sequences of the recombinant plasmids were confirmed by DNA sequencing using an ABI PRISM 310 genetic analyzer. Large-scale purification of expression vectors was achieved using a Qiagen Plasmid Mega kit system (Qiagen, Chatsworth, CA) and endotoxin was removed by Triton X-114 phase separation.

### 2.5. Retroviral infection and selection of G418-resistant transformants

Retroviral supernatant was generated by transfecting recombinant pDON-AI proviral constructs into the Phoenix ecotropic packaging cell line (purchased from the American Type Culture Collection, Manassas, VA, and used with the permission of Dr. G.P. Nolan, Stanford University School of Medicine, CA) according to Dr. Nolan's protocol (Grignani et al., 1998). A confluent 100-mm plate of retrovirus-producing cells was maintained in DMEM/10FCS. After 2 days, the culture supernatant contain-

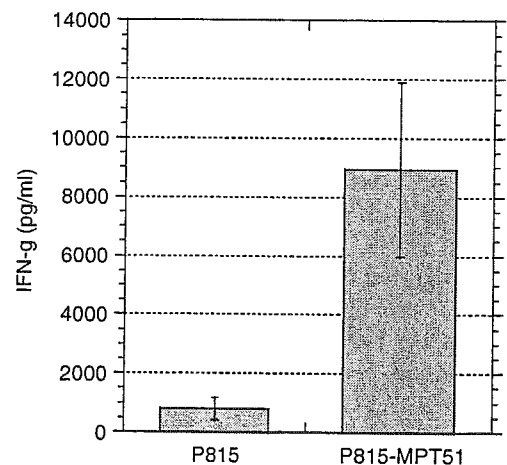


Fig. 1. P815 cells retrovirally transduced with gene encoding mature MPT51 stimulate splenocytes from BALB/c mice following gene gun immunization with pCI-MPT51. The immune splenocytes were stimulated with either wild-type P815 cells or MPT51-expressing P815 cells for 24 h and IFN- $\gamma$  concentrations were measured by ELISA. Data are presented as the mean  $\pm$  S.D. of triplicate wells. All data are representative of at least three independent experiments.