

測定することで定量した。一方、HSP65蛋白質については、遺伝子をBHK21細胞に導入後に細胞溶解物を調製し、20 μ Lの細胞溶解物に含まれるHSP65蛋白質量をウェスタンブロット法により比較検討した。チンを筋内に連続投与し、結核菌を感染させて評価を行なった。

2. DNAワクチンの有効性を向上するための研究

DNAワクチンの薬効向上のために、新規製剤の検討を行なった。従来の製剤の調製は、以下のようにして行なった。まず、氷上で冷却したHVJ-Eベクター溶液に界面活性剤を添加して、ベクターを構成する膜成分の透過性を一過性に増加させた。そして、DNAワクチン溶液を添加して氷上で静置する事でHVJ-Eベクター粒子中への封入を行なった。封入後は、バッファーを添加して界面活性剤を希釈した後に、遠心操作を行ってDNAワクチンを封入したHVJ-Eベクターを回収した。遠心により回収したHVJ-Eベクターは、生理食塩水で適切な濃度に調整した後に、有効性試験に使用した。新規製剤については、凍結乾燥処理したHVJ-Eベクターに対して、適切な量のDNAワクチン溶液を直接添加することで調製を行い、有効性検討に使用した。

3. DNAワクチンの製造技術の検討

本研究において開発を行っているHVJ-Eベクターは、臨床での実用化を目的としているため、薬効検討に使用するサンプルについては、治験薬GMPレベルの製造が可能なパイロットプラントでの製造を行なった。製造施設としては、産業技術総合研究所・関西センターに整備したパイロットプラントで実施し、それぞれの製造に際しては、製造記録（バッチレコード）を作製し

結核感染症に対する有効性については、動物モデルとして小動物（マウス、モルモット）と、中動物（サル）の3種類の評価系を用いて有効性の評価を行った。適切な投与間隔でHVJ-Eで製剤化したDNAワクチン。また、製造機器についても、GMP製造に対応した機器を使用して製造を行った。HVJ-Eベクターの製造法についても、GMPグレードでのスケールアップが可能な工程を選択して製造を実施した。

C. 研究結果と考察

1. DNAワクチンの構築改変と有効性評価

結核感染症に対する新規のDNAワクチンを臨床応用するためには、臨床において実績のあるプラスミドを用いて構築を行う必要がある。そこで、従来のpcDNA3.1ベクターを骨格とする構築を、臨床実績のある骨格へ改変した（図2）。構築したプラスミドを使用して、マウスIL-12遺伝子（図3A）とHSP遺伝子（図3B）の発現効率を蛋白質レベルで検討したところ、HSP65遺伝子とIL-12遺伝子で従来の構築に対してそれぞれ50%と200%程度の発現レベルが認められた。この結果から、新規構築においても遺伝子の発現が確認されたため、それらを用いて疾患モデル動物による薬効試験で更に比較検討を行うことにした。その結果、マウスモデルでELISPOTアッセイのデータを指標とした比較検討で、従来型と新規構築で同レベルの免疫の活性化が認められた。この結果から、新規構築においても薬効に必要な免疫の活性化が誘導されることが明らかとなった。今後は、下記に示す新規構築も含めて実用化に必要な薬効や安全性の検討を更に進める予定である。

図2. DNAワクチン用の新規プラスミド構築

新規ベクターの特徴

1. アンピシリン耐性でなくカナマイシン耐性：残留抗生物質の安全性リスク低減
2. 国内の遺伝子治療の治験での実績：臨床応用の申請
3. ミニマムな配列設計：製造効率、遺伝子導入効率、安全性(組み換えリスクの低減)の向上

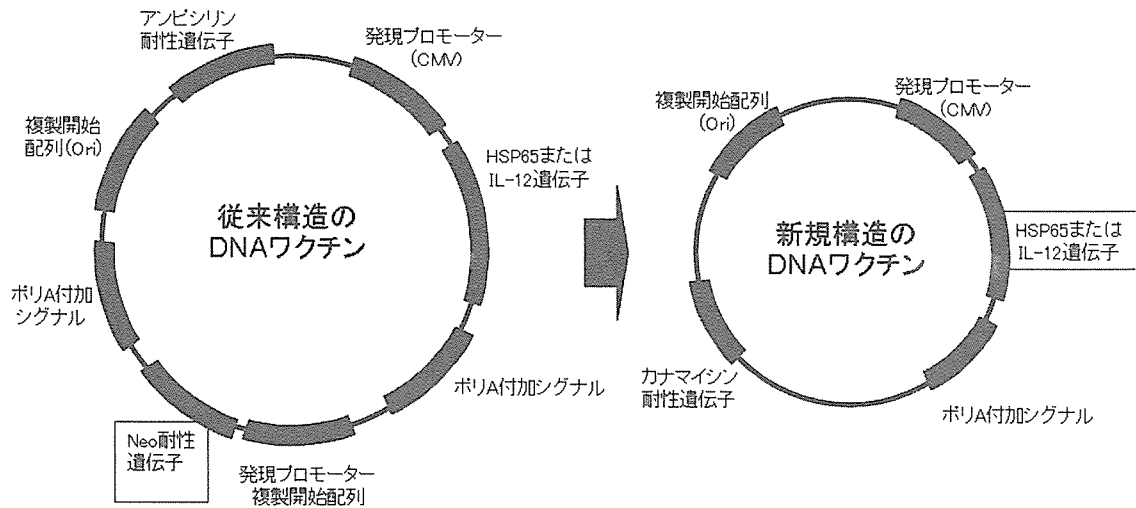
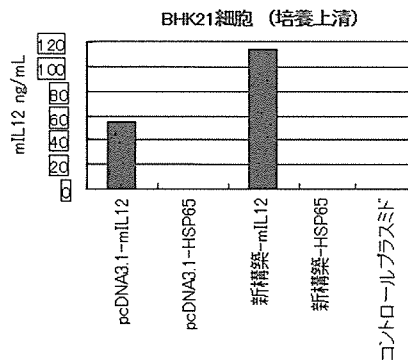


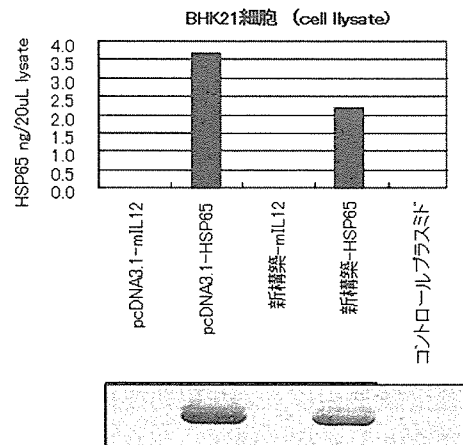
図3. 新規構築DNAワクチンの遺伝子発現レベル

サンプル: 各細胞にDNAワクチンを導入した後の培養上清 (Hybridoma SFM), または細胞溶解物 (cell lysate)
 検出: ELISA法 - mIL-12 p40/p70 (BIOSOURCE社) + 1 step slow TMB ELISA (Pierce社)
 Westernプロット

A. IL-12 ELISA



B. HSP65 Western Blotting



上記のようにして構築したDNAワクチンでは、IL-12とHSP65遺伝子は別々の構築上に存在しているため、開発時に2種類の成分の取り扱いになると予測される。そのため、有効性を検討するための前臨床試験を行う場合には、それぞれの配合比を検討して至適混合比を見出す必要がある。また、GMP製造を行う場合の品目数が増える上に、試験を行う場合に2成分となるため試験の群数の設定が複雑になる。そこで、構築を変更して1つのプラスミド上に2種類の遺伝子の発現ユニットを搭載することが出来るかを検討した。そのために、上記のようにして構築したプラスミドからマウス、ヒト、モルモットのIL-12遺伝子の発現ユニット（プロモーター+IL-12遺伝子+ポリA付加シグナル）を含むDNA断片をそれぞれ調製し、HSP65の発現プラスミドへ組み込みを行った(図4)。そして、構築したDNAワクチンについて培養細胞を用いて遺伝子の発現を検討した。その結果、BHK21細胞においてはHSP65遺伝子とIL-12遺伝子の発現レベルは共発現を行わない場合の70% (図5A) と20% (図5B) 程度のレベルまでそれぞれ減少することが明らかとなった。発現量低下の原因としては、共発現型のプラスミドではサイズが1.3倍~1.6倍程度に増加していることが原因と考えられる。今後、単独発現のプラスミドを2種類導入した場合と、共発現型プラスミドを導入した場合で、薬効を指標にした比較検討を実施し、臨床応用に使用する構築を選定する予定である。

また、臨床応用に必要な薬効薬理と安全性試験のために、新規構築での用量・用法設定についても検討を進める予定である。

2. DNAワクチンの有効性を向上するための研究

従来の製剤においても薬効（ワクチン効果、治療効果）が認められていたが、臨床応用と医薬品としての実用化を想定して、更に製剤面での開発を進めることにした。製剤開発の課題としては、薬効、保存安定性、取り扱いの簡便性のそれぞれの面での向上である。そこで、保存安定性の面で優れた凍結乾燥による製剤化条件について検討を行い、DNAワクチン(筋内投与、鼻腔内投与)に適した新規凍結乾燥製剤を開発した(図6)。そして、新規凍結乾燥製剤を用いて遺伝子の発現レベルをマウスへの筋内投与で行ったところ、レポーター遺伝子(LacZ遺伝子)の発現レベルを指標として、80倍以上の遺伝子発現増強が認められた。また、従来製剤はマイナス80度での凍結保存を必要としていたが、新規の凍結乾燥製剤については4度の冷蔵保存が可能となった。

以上のように、臨床応用や製品としての実用化に適した新規結核DNAワクチンの製剤化について検討を行い、従来の製剤よりも活性が高く、保存安定性に優れた製剤を開発することが出来た。新規製剤においては、DNAワクチンの単位重量あたりの遺伝子発現レベルについても増強が認められており、封入率の向上だけでなく、HVJ-EベクターとプラスミドDNAとの複合体形成のメカニズムも変化していることが示唆されている。現在、結核の動物疾患モデルに投与を行って遺伝子発現の増強によりDNAワクチンとしての薬効が増強されるかについて検討を進めており、データを取得した後に最終製剤の剤型を選定する予定である。

図4. 共発現型DNAワクチン用の新規プラスミド構築

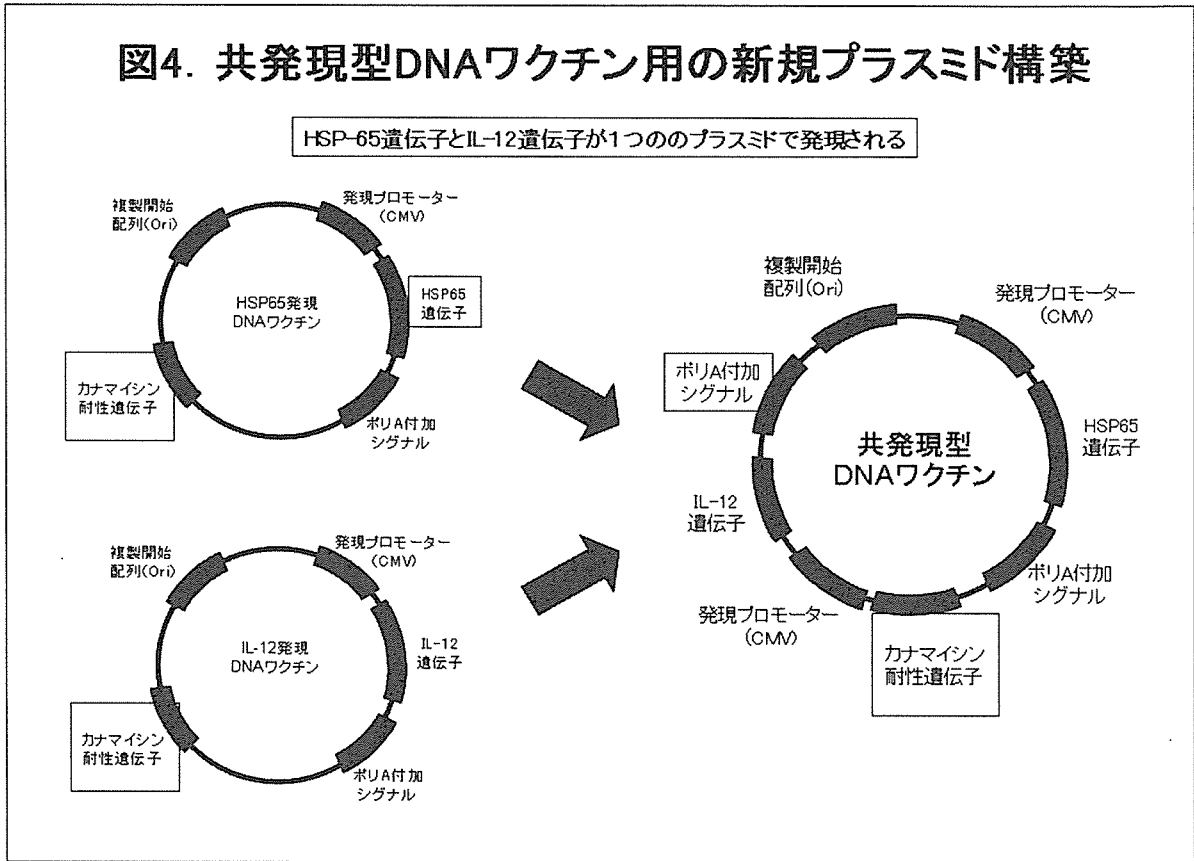
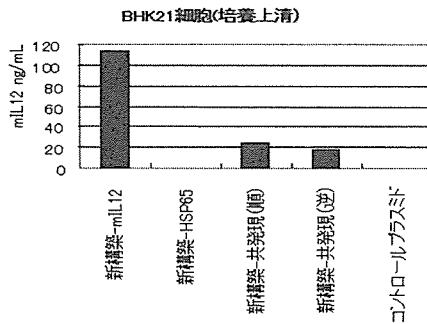


図5. 共発現型DNAワクチンの遺伝子発現レベル

A. IL-12 ELISA



B. HSP65 Western Blotting

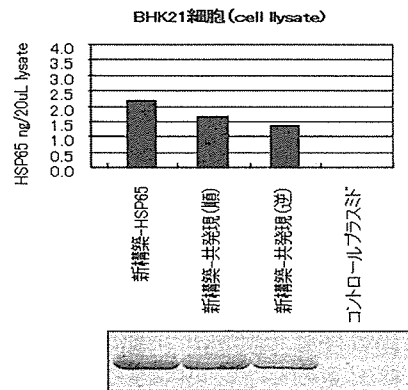
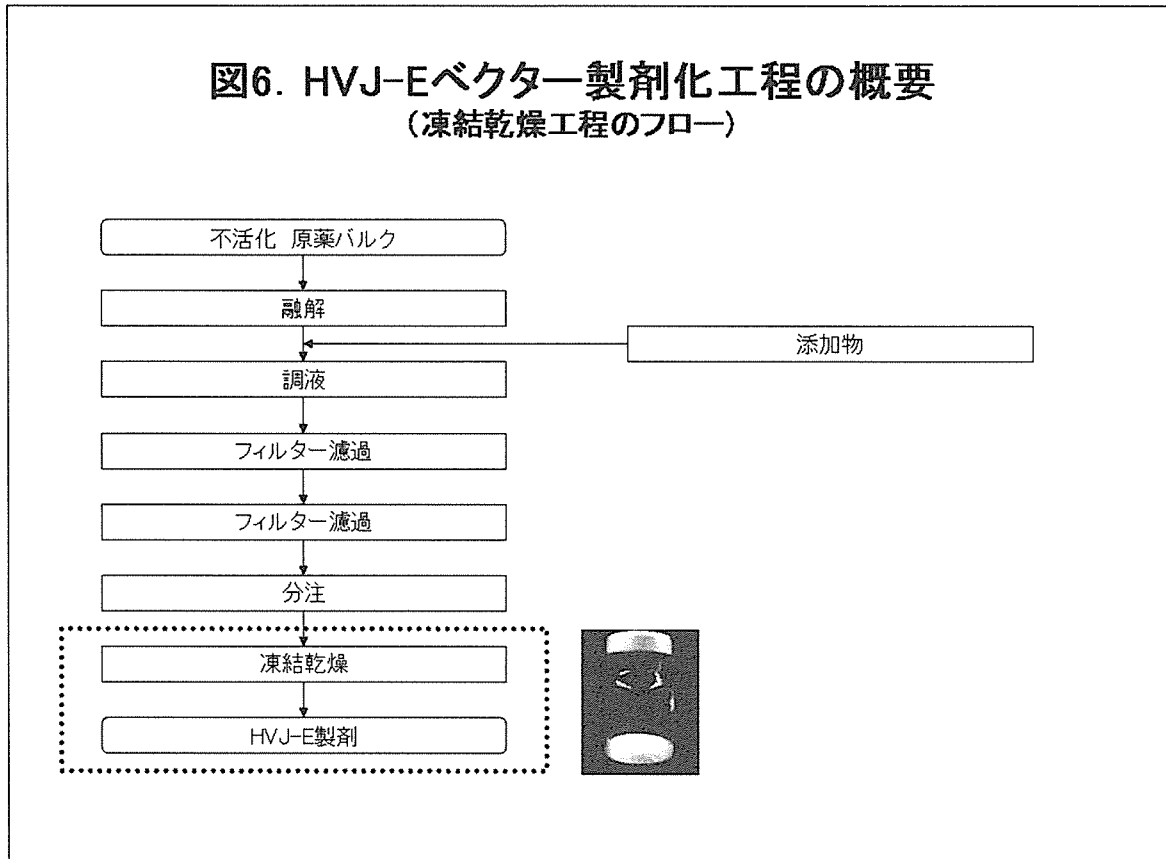


図6. HVJ-Eベクター製剤化工程の概要
(凍結乾燥工程のフロー)



3. DNAワクチンの製造技術の検討

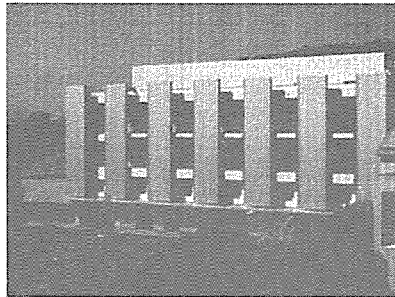
前臨床試験と臨床応用の実施を考慮して、実際に治験薬を製造する予定のパイロットプラントで製造したHVJ-Eベクターを使用して活性の評価を行った(図7)。製造後に品質試験により評価を行った結果、遺伝子導入活性など規格値として採用する予定の品質管理項目についての品質レベルが確認された。そこで、上記のようにして構築を行ったプラスミドDNAと技術を用いて製剤化を行い、疾患動物による薬効検討試験用に供与を行った。その結果、薬効に必要なHSP65蛋白質に対する特異的

免疫の誘導が認められることが明らかとなった。以上の結果から、治験薬製造を想定した製造施設と製造工程で製造を行ったDNAワクチンで、目的とする免疫の活性化が誘導できることが明らかとなった。

今後は、実験動物で有効性・安全性を確認する前臨床試験用のDNAワクチンの製造に向けて更に無菌製造工程の改良を行い、簡便でスケールアップに適した製造技術を開発する予定である。また、実用化に必要な臨床応用を目指して、製造工程と施設のバリデーションについて研究・開発を進める予定である。

図7. HVJ-E製造用パイロットプラント

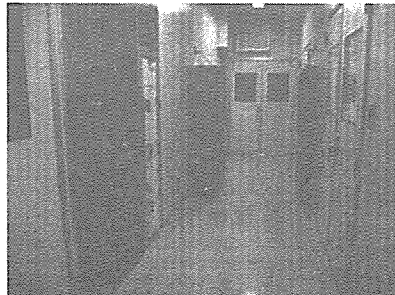
外観(産業技術総合研究所・関西センター)



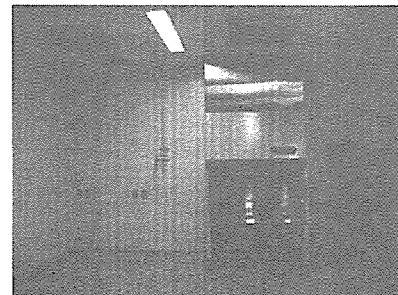
内部(HVJ-E製造室:滅菌水、スチーム)



内部(クリーンエリア廊下)



内部(HVJ-E製造室)



D. 結論

本年度の研究により、目的としていた臨床应用到に適したDNAワクチン用プラスミドの構築、製剤検討、治験薬用製造施設・製造工程のそれぞれの研究項目について成果をあげることが出来た。特に、新規製剤の開発により、目的とする遺伝子の発現レベルが80倍以上、比活性でも10倍以上増強された上、保存安定性についても向上した事は、実用化を進める上で重要な成果である。また、前臨床試験や臨床応用を進める上では、品質レベルの高いDNAワクチンを安定的に供給できる体制の構築が重要であるが、それらの製造技術・製造体制確立についても成果をあげることが出来た。今後

は、臨床応用を開始するために用法・用量設定のための薬効・薬理試験、安全性確保のための毒性試験、投与後の生体内でのDNAワクチンの挙動を確認する薬物動態試験の3種類の試験について、それぞれデータの取得を進める必要がある。

E. 健康危険情報

本研究を実施するにあたり、ジェノミディア株式会社は、池田ラボラトリーの所在地である独立行法人 産業技術総合研究所の規定に従い、国で定められている、組換えDNA実験、動物取り扱いに関する指針に従い、産業技術総合研究所で開催される各委員会で実験許可を受けてから実験を行っ

た。また、実験に従事するものの安全確保についても、産業総合技術研究所の規定に従い、年に1回行われる実験の安全講習に参加し、健康診断も受けて実験従事者の健康管理も確保した。更に、本研究で使用しているHVJをアルキル化剤であるベータプロピオラクトンとUV照射で不活性化して作成したHVJエンベロープベクター (HVJ-E) では、感染性は認められず安全性が高い事が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Fukamizu R, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Matsumoto M, McMurray DN, Dela Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Gelber R, Sakatani M., Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB., Vaccine. 2007 Jan 22

2. 学会発表

1. Masaji Okada, et. al., Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB., 第5回 国際ワクチン学会

2. 岡田全司等、「ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しいDNAワクチン開発：HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン」第10回 日本ワクチン学会 学術集会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 特許名称：「DNAワクチン組成物」、出願日：平成18年9月27日PCT出願、出願番号：PCT/JP2006/310162

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌の主要防御抗原MPT51を発現する第三世代レンチウイルスの
経気道免疫による肺ホーミング性特異的T細胞の誘導に関する研究

研究協力者 小出 幸夫 浜松医科大学感染症学 主任教授

研究要旨

我々が結核の防御抗原であることを証明したMPT51分子を発現する第三世代レンチウイルスベクターを経気道感染することにより、肺および脾臓に記憶CD8⁺T細胞を誘導することが出来た。しかし、縦隔リンパ節に記憶T細胞を検出できなかった。このことは、このワクチン法は肺結核の予防に有効であることのみならず、脾臓が特異的記憶T細胞のプールとなりうることを示唆している。

A. 研究目的

遺伝子導入効率が良く、安全性の高い第三世代レンチウイルスをワクチンベクターとして用い、経気道免疫を行うことにより、肺ホーミング性結核菌特異的T細胞を誘導する。これにより、肺結核の予防・治療に有効なワクチンおよびその接種法を開発する。同時に、結核菌特異的肺ホーミング記憶T細胞の体内動態を解明し、今後のワクチン開発に有効な情報を得る。

B. 研究方法

1. ワクチンの作製：SIN(self-inactivating)プラスミドにMPT51遺伝子を導入し、他の2つのパッケージング・プラスミドと共に293T細胞に遺伝子導入し、培養上清中ウイルスを得た。これを超遠心で1,000倍に

濃縮し、GFPを指標として力価を測定する。

2. ワクチンの接種：BALB/cマウスに 5×10^6 IUのMPT51レンチウイルスを経気道接種した。3. ワクチン効果の判定：(1) テトラマー法：H2-D^d/エピトープからなるテトラマーを用いて特異的CD8⁺T細胞数を定量した。縦隔リンパ節、肺および脾臓のリンパ球を対象として測定した。(2) IFN- γ 産生の測定：免疫マウスの縦隔リンパ節、肺および脾臓のリンパ球をMPT51で2日間刺激することにより、その上清中のIFN- γ 濃度をELISAで測定した。(3) キラーT細胞活性：免疫マウスのリンパ球を用いて、ペプチドをパルスしたP815細胞を標的細胞として⁵¹Cr遊離法で測定した。(倫理面への配慮)

本動物実験計画は実験動物の愛護を配慮して立案されており、浜松医科大学動物実験倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

1. 抗原提示細胞の動態：ワクチン経気道接種後の肺胞洗浄液（BALF）細胞における GFP を観察したところ、接種後 1 週から発現し、2 週でピークとなった。この GFP を発現している細胞は全て CD1c 陽性であり、一部は MHC クラス II(I-A^d) を発現している成熟樹状細胞であった。また、この GFP 陽性細胞は縦隔リンパ節に移行することが観察された。
2. MPT51 特異的 T 細胞の感作：テトラマ一法により、特異的 CD8⁺T 細胞を縦隔リンパ節と脾臓で測定した。縦隔リンパ節ではワクチン接種 2 週後から特異的 CD8⁺T 細胞が出現し、3 週後にピークとなり、その後、終息した。脾臓では特異的 CD8⁺T 細胞は検出出来なかった。
3. 再刺激による肺ホーミング性記憶 T 細胞の測定：ワクチン経気道接種 2 ヶ月後に BCG を経気道的に感染させたところ、5 日後に肺に特異的 CD8⁺T 細胞が出現し、記憶 T 細胞が誘導されていることを確認した。しかし、縦隔リンパ節に特異的 CD8⁺T 細胞は認められなかった。このことは、MPT51 刺激による IFN- γ 産生によっても確認された。
4. 免疫ルートの影響：レンチベクターを皮下接種した場合には MPT51 特異的 T 細胞を肺に認めなかった。しかし、脾臓ではこの特異的 T 細胞を検出出来た。

D. 考察

結核の防御抗原である MPT51 を発現する第三世代レンチウイルスベクターを経気道感染することにより、肺にホーミングする特異的 CD8⁺T 細胞を誘導することが出来た。しかし、同じウイルスベクターを皮下接

種しても肺ホーミング性 T 細胞を検出できなかった。このことは、肺結核の予防・治療にこのウイルスベクターの経気道接種が有効であることを意味する。また、興味深いことに、経気道免疫によって誘導した MPT51 特異的記憶 CD8⁺T 細胞は肺には認められたが、縦隔リンパ節には検出できなかった。この経気道免疫法では肺にエフェクター記憶 T 細胞が有効に誘導され、セントラル記憶 T 細胞の誘導が弱い可能性がある。現在、このメカニズムを研究中である。

E. 結論

結核の防御抗原である MPT51 を発現する第三世代レンチウイルスベクターを経気道感染することにより、肺にエフェクター記憶 CD8⁺T 細胞を誘導することが出来た。しかし、縦隔リンパ節に記憶 T 細胞を検出できなかった。

F. 健康危険情報

該当する健康危険情報は無かった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagata T, Uchijima M, Uchiyama H, Yamada T, Aoshi T, Koide Y: Immunization with gene encoding granulocyte- macrophage colony-stimulating factor inserted with a single helper T-cell epitope of an intracellular bacterium induces a specific T-cell subset and protective immunity. *Vaccine* 24 (21): 4548-4553. 2006.

2. Nakano H, Nagata T, Suda T, Tanaka T, Aoshi T, Uchijima M, Chida K, Nkamura H, Okada M, Koide Y: Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to a dominant epitope on Antigen 85A. *Vaccine* 24: 2110-2119, 2006.
 3. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Andoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Sata M, Yamada M, Iwaoka Y, Kanke K, Hiraishi H, Hirayama K, Arai H, Yoshii S, Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Curcumin Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis: Multicenter, Double-Blind, Randomized Clinical Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4:1502-1506, 2006.
 4. Kgeyama Y, Takahashi M, Torikai E, Suzuki M, Ichikawa T, Nagafusa T, Koide Y, Nagano A: Treatment with anti- TNF- α -antibody infliximab reduces serum IL-15 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* (in press).
 5. Uchijima M, Nagata T, Aoshi T, Koide Y: Role of the AP-1-like element on the inducible nitric oxide promoter region in response to CpG-DNA (submitted for publication).
 6. Enomoto N, Nagata T, Suda T, Uchijima M, Nakamura Y, Chida K, Nakamura H, Koide Y: Immunization with dendritic cells loaded with alpha-galactosylceramide at priming phase, but not at boosting phase, induces protective immunity against infection of intracellular bacteria (submitted for publication).
 7. 小出幸夫: マクロファージによる感染防御機構. *最新医学* 60:529-543, 2005.
2. 学会発表
1. Hashimoto D, Uchijima M, Suda Chida K, Miyoshi H, Nagata T, Koide Y: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *M. tuberculosis* induces lung-homing specific T cells; Determinants of Host Resistance, Susceptibility or Immunopathology to Pathogens: Integrating Knowledge from Experimental Models to Human Disease, Keystone Symposia, Keystone, CO, USA, January 6 - 11, 2006
 2. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Andoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y,

- Mitsuyama K, Sata M, Yamada M, Iwaoka Y, Kanke K, Hiraishi H, Hirayama K, Arai H, Yoshii S, Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Curcumin Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis: Multicenter, Double-Blind, Randomized Clinical Trial. Broad Medical Research Program, Los Angeles, USA, March 23-24, 2006.
3. Koide Y, Hashimoto D, Uchijima M, Suda Y, Chida K, Nagata T: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vectors encoding MPT51 from *M. tuberculosis* induces lung-homing specific T cells. 12th International Society for Infectious Diseases. Lisbon, Portugal, June 15-18, 2006.
 4. Enomoto N, Nagata T, Suda T, Uchijima M, Chida K, Nakamura H, Koide Y: Immunization with dendritic cells pulsed with α -galactocylceramide and a dominant CTL epitope elicits effective protective immunity against intracellular bacteria infection. 12th International Society for Infectious Diseases. Lisbon, Portugal, June 15-18, 2006.
 5. Koide Y, Hashimoto D, Uchijima M, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nagata T: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *M. tuberculosis* induces lung-homing specific T cells. Australasian Society for Immunology Conference 2006, Auckland, NZ, Dec. 3-7, 2006.
 6. 小出幸夫: シンポジウム: ワクチン現状と展望 (ワクチン研究の展望) 第79回日本細菌学会総会、金沢、平成18年3月29-31日
 7. 永田 年、内嶋雅人、小出幸夫: DNA ワクチンを用いた結核菌分泌蛋白 MPT51内HLA-A*0201拘束性CTLエピトープの同定. 第79回日本細菌学会総会、金沢、平成18年3月29-31日
 8. 内嶋雅人、永田 年、小出幸夫: ケモカインレセプターを標的とした抗結核菌DNAワクチンの解析、第79回日本細菌学会総会、金沢、平成18年3月29-31日
 9. Uchijima M, Nagata T, Shibata K, Koide Y: Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 efficiently induces antigen specific T-cell responses. 第36回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、平成18年12月11日~13日
 10. Wang L-X, Nagata T, Koide Y: Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein of *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51

overlapping peptide library. 第36
回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、
平成18年12月11日～13日

11. Cervantes J, Nagata T, Uchijima
M, Koide Y: Necrosis-like cell
death of *Listeria monocytogenes*
infected macrophages involves
caspase-1 activation. 第36回日本
免疫学会総会・学術集会、大阪、平成
18年12月11日～13日

12. Ikehara Y, Shiuchi N,
Kabata-Ikehara S, Yokoyama N,
Nagata T, Koide Y, Kuzushima K,
Takahashi T, Kojima N, Tsujimura
K: Cancer vaccine delivery
system using oligomannose coated
liposomes. 第36回日本免疫学会総
会・学術集会、大阪、平成18年12月
11日～13日

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新規結核DNAワクチンおよびバキュロウイルスビリオンワクチンの開発に関する研究

研究協力者 吉田 栄人 自治医科大学 講師

研究要旨

ヒトへの臨床治験に向けて、Hsp65遺伝子とヒトIL12p40p35遺伝子の両遺伝子を一つのプラスミドに挿入した改良型DNAワクチンを構築した。GMPレベルで、この改良型DNAワクチンを包埋したHVJエンベローブを生産し、サル実験を開始した。また組換えバキュロウイルス(AcNPV-CMV-Hsp65)を免疫したマウスの脾臓細胞では、Hsp65タンパクに反応してIFN- γ が産生されることが確認された。AcNPV-CMV-Hsp65ワクチンが感染防御効果を誘導する次世代の有望なワクチンとなりうることを示唆している。

A. 研究目的

結核感染率を激減させ、また多剤耐性結核等の難治性結核を治療しうる画期的な次世代ワクチンを開発することを最終ゴールとする。特に新規結核DNAワクチンの開発を目指す。合わせて、バキュロウイルス粒子を用いた新しいアイデアのワクチン開発にも取り組む。

B. 研究計画

IL-12遺伝子を”DNAアジュバンド”としたHsp65結核DNAワクチンをHVJエンベローブに包埋し(Hsp65+IL-12/Env)、これを実験モデル動物(マウス、モルモット、カニクイザル)に接種する。結核菌のエアゾル感染を行い、ワクチン効果を解析する。これらの動物実験結果をもとに、プロトタイプの改良および臨床試験申請のためのデータをまとめる。またDNAワクチンとは別に新規ワクチンベクターとしてバキュロウイルスベクターの改良

を行う。

C. 研究成果・考察

現在までにマウス、モルモット、ヒトよりIL-12遺伝子をクローニングし、DNAワクチン用高発現ベクターを独自に開発した。これにより、実験動物として、マウス、モルモット、カニクイザルを用いてHVJエンベローブDNAワクチンを評価することが可能となった。現在、DNAワクチンを接種したカニクイザルでは、致死量の結核菌を接種されてもレントゲン検査で結核病巣の陰影を見ることもなく、長期生存を続けている。

GMPレベルで生産したHVJエンベローブは、本年度より本格的にマウスモデルの実験を開始した。BCGで初回ワクチンをした後、Hsp65+IL-12/Envで追加ワクチンを行うと、BCG単独と比較して1万倍もの強力なワクチン効果を示すことが明らかとなった。並行して、治療用ワクチンと

しての効果も検討中である。

バキュロウイルスはヒトに感染しない安全性の高いウイルスベクターである。昨年度作製した (i) Hsp65タンパクをウイルスベリオン上に提示した組換えバキュロウイルス (AcNPV-Hsp65surf) (ii) Hsp65遺伝子をCMVプロモーター下流に挿入した組換えバキュロウイルス(AcNPV-CMV-Hsp65)の二種類の組換えバキュロウイルスは、マウスマクロファージRAW 264. 7細胞に作用し、NOの発現を強力に誘導することを見出した。結核菌は、マクロファージの細胞内殺菌をエスケープして増殖する。活性化マクロファージでは結核菌に対する殺菌活性が亢進するが、その重要な役割を果たしているのがNOであると考えられている。バキュロウイルスワクチンによりこの抗菌エフェクター分子であるNOが誘導されたことは、ワクチン開発に大きな期待がもたれる。さらにAcNPV-CMV-Hsp65を免疫したマウスの脾臓細胞では、Hsp65タンパクに反応してIFN-gが産生されることが確認された。これらの結果は、結核バキュロウイルスワクチンが感染防御効果を誘導する有望なワクチンとなりうることを期待させる。今後、上記の確立した動物実験系を用いて解析を行っていく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, Peiris JSM, Chen P-J, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M,

Sakatani M:

Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. Vaccine (2007) in press

2. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Fukamizu R, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Matsumoto M, McMurray D, Cruz D, Tan E, Abalus R, Burgos J, Gelber R, Sakatani M.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. Vaccine (2007) in press
3. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, Peiris JSM, Chen P-J, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS coronavirus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. Adv Exp Med Biol 581: 561-6, 2006.
4. Yoshida S & Watanabe H.:

- Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Mol Biol* 15:403-10, 2006.
5. Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Kanamaru N, Muraki Y, Hashimoto S, Inoue Y, Sakatani Y, Kobayashi E, Kaneda Y, Okada M.: DNA vaccine using hemagglutinating virus of Japan-liposome encapsulating combination encoding mycobacterial heat shock protein 65 and interleukin-12 confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* by T cell activation. *Vaccine* 24:1191-204, 2006.
 6. 吉田栄人: 遺伝子操作によるマラリアを媒介しないハマダラカの創出 —新規マラリアコントロールへの挑戦— *日本衛生動物学会誌 (総説)* 57:249-54, 2006.
 7. 吉田栄人: 遺伝子操作蚊を用いた蚊-マラリア原虫の寄生適応性解明 —マラリアコントロールに向けての新規戦略— *蚕糸・昆虫バイオテック(総説)* 75:161-6, 2006.
2. 学会発表
1. Yoshida S & Watanabe H.: Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. 11th International Congress of Parasitology - ICOPA XI (August 6-11, 2006, Glasgow, Scotland, United Kingdom)
 2. 周藤俊樹、吉田栄人、松岡裕之、嶋田陽平、川崎昌則、長村芳恵、林秀樹、問可和之、山田能久: ハマダラカ唾液腺からの抗血小板因子AAPPの発見。第29回日本血栓止血学会 (2006) 宇都宮.
 3. 吉田栄人: 遺伝子操作蚊を用いた病原体-蚊の寄生適応性解明 —マラリアコントロールに向けての新規戦略—: 独立行政法人 農業生物資源研究所主催公開シンポジウム「昆虫科学研究の未来 -昆虫を学ぶ、昆虫に学ぶ-」(2006) 東京.
 4. 吉田栄人、嶋田陽平、渡辺裕之: スポロゾイトの蚊唾液腺侵入メカニズム解明に向けてのアプローチ—唾液腺特異的に赤色蛍光タンパクを発現するトランスジェニックハマダラカ—。第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム (2006) 東京.
 5. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、吉田栄人: 海洋生物由来のレクチンを発現するトランスジェニックハマダラカのマラリア伝播阻止効果。第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム (2006) 東京.
 6. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、吉田栄人: 海洋生物由来のレクチンCEL-IIIを発現するトランスジェニックハマダラカのマラリア伝播阻止効果。第58回日本衛生動物学会東日本支部大会 (2006) 栃木.

7. 荒木一美、吉田栄人：ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) merozoite surface protein 1をウイルスベリオン上に提示した組換えバキュロウイルスのワクチン効果。第47回日本熱帯医学会・第21回日本国際保健医療学会合同大会 (2006) 長崎.
8. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、吉田栄人：海洋生物由来のレクチンを発現する遺伝子操作蚊のマラリア伝播阻止効果。第47回日本熱帯医学会・第21回日本国際保健医療学会合同大会 (2006) 長崎.
9. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、吉田栄人：ナマコのレクチンCEL-IIIを導入した遺伝子操作蚊によるマラリア伝播阻止。第58回日本衛生動物学会 (2006) 長崎
10. 吉田栄人：トランスジェニック蚊を用いたハマダラカーマラリア原虫の寄生適応性の解明。基盤研究 (C) (企画研究調査) 「感染現象のマトリックス的解明をめざす企画調査研究」シンポジウム 感染現象のマトリックス (2006) 東京.
11. 吉田栄人：トランスジェニック蚊を用いたハマダラカーマラリア原虫の寄生適応性の解明。第50回応用動物昆虫学会 (2006) つくば.
- H. 特許
1. 特願2006-32863「新規ウイルスベクター」(2006年) 吉田栄人、大庭義郎、播口徳充、水越真巳、川崎昌則、松本真
- I. その他 (新聞等の報道)
1. 2006.4.20. メディカルトレビュー 「結核DNA ワクチンの開発」
2. 2006.4.20. 日経新聞 「新ワクチンで結核撃退」
3. 2006.5.30. 朝日新聞電子版 「BCGを超える結核ワクチン開発 高齢者に用に期待」
4. 2006.11.27. 日経新聞 「蚊の遺伝子改変、マラリア防ぐ」
5. 2006.12.21. 日経産業新聞 「21世紀の気鋭」

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

組み換えBCGワクチン改良・開発の研究

研究協力者 大原直也 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 助教授

研究要旨

これまでに多種のリコンビナントBCG (rBCG) ワクチンが作製された。これらのrBCGを実用化するために薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しないBCG宿主—ベクター系構築のための研究を行った。チミン要求性を指標とするために、チミン合成経路の酵素thymidylate synthaseの遺伝子破壊株の作製実験をおこなった。BCGにおいてはthymidylate synthaseの遺伝子として、thyAおよびthyXの2つの遺伝子があるため、スクロース感受性遺伝子導入による、スクロースに対する感受性の変化を指標とした相同組換えにより、両遺伝子の2重欠損株の作製を試みたが、チミン要求株を得ることができなかった。

A. 研究目的

これまでに数百を超える新規結核ワクチンの候補が作製されてきたが、リコンビナントBCG (rBCG) ワクチンは有力な候補として位置づけられる。rBCGは感染防御に有効な抗原の遺伝子をBCGに導入したものであるが、これまでのrBCGのほとんどは、導入された遺伝子の保持について、同時に導入した薬剤耐性マーカーを指標としている。rBCGの実用化を考えた場合に薬剤耐性に関わる遺伝子を除くことが望ましい。そのため、薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しないBCG宿主—ベクター系の構築を考えた。本研究ではチミン要求性を指標としたBCG宿主—ベクター系を作製するための研究をおこなった。

B. 研究方法

BCGのチミジン合成に関与する酵素

thymidylate synthaseの遺伝子thyAおよびthyXの遺伝子をそれぞれの遺伝子の上流および下流の領域を含めてクローニングした。これらのDNA断片からthyAおよびthyXの読み枠 (ORF) を除き、隣接してカナマイシン耐性遺伝子 (aphII) およびスクロース感受性遺伝子 (sacB) を挿入した自殺プラスミドを作製した。このプラスミドをBCGに導入し、カナマイシン耐性を指標として、相同組み換えによりゲノム上のthyA隣接領域にプラスミドDNA (thyA (thyX)、sacB、aphII) が挿入された株を得た。得られた株をチミンおよびdTMP含有、スクロース含有、カナマイシン不含有培地で継代することにより、再度相同組み換えを起こし、変異型thyAあるいはthyXのみを有する株、すなわちthyA欠損株およびthyX欠損株を得た。さらにthyA、thyXの2重欠損株を作製するため、thyX欠損株

に対して上記のthyA破壊用プラスミドを導入し、カナマイシン耐性を指標として、相同組み換えによりゲノム上のthyA隣接領域にプラスミドDNA (thyA、sacB、aphII) が挿入された株を得た。得られた株をチミンおよびdTMP含有、スクロース含有、カナマイシン不含有培地で継代することにより、再度相同組み換えを起こし、野生型変異型thyAおよびthyXを有する株、すなわちthyAおよびthyX 2重欠損株の作製を試みた。

C. 研究結果

研究方法に述べた手順によりthyA欠損株およびthyX欠損株を得た。またthyX欠損株のthyA隣接領域にプラスミドDNA (thyA、sacB、aphII) が挿入された株を得た。それぞれの株についてその性状を調べたところ、完全合成培地であり、チミンおよびチミジンを含まないSauton培地上においても発育したことから、両遺伝子それぞれの単独欠損株においては栄養要求性において野生株と同じであることが示された。これらの株は、発育速度についても野生株との間で顕著な差は認められなかった。次に再度相同組み換えを起こした株を得るため、チミンおよびdTMP含有、スクロース含有、カナマイシン不含有培地で継代し、プレート上に生じたコロニーをPCRでスクリーニングを行った。400個のコロニーを調べたが、そのすべては野生型のthyAを持つ株、すなわちthyX単独欠損株に戻った株、あるいは2回目の組換えが生じず、スクロース感受性遺伝子が挿入されているにもかかわらず、スクロース耐性となった株であり、目的とする2重欠損株は得られなかった。

D. 考察

多くの真性細菌ではthymidylate synthaseの遺伝子として、thyAあるいはthyXのいずれかを持つことが知られている。そしてthyAを持つ大腸菌等においてはthyAを欠損させることでチミン要求株になる。結核菌ではこれまでの報告でthyXは必須の遺伝子であり、欠損すると致死になることが示唆されていたが、昨年度の本研究の結果、thyXを欠損させても致死にならないことが明らかになった。またthyAに関しても栄養要求株にならないことが示された。そのため、thyX欠損株上でのthyA領域2回の相同組換えによる両遺伝子の2重欠損株の作製を試みた。理論的にはthyX欠損株においてthyA領域を相同組換えさせた場合、2回目の相同組換えによって野生型thyAあるいは欠損方のthyAいずれもある比率で生じるはずである。しかし、結果に示したようにスクロース感受性を指標とした系では目的とする2重欠損株を得ることができなかった。その理由としては、2重欠損株はチミジン要求性であるので、野生型のthyAに戻った株に比べ発育速度が遅く、選択できなかったことが考えられる。またスクロース感受性を指標とする系での選択性が低いことも原因である。現在目的とする組換え体を確実に得られる系を確立中である。

E. 結論

チミン要求性を指標としたBCG宿主—ベクター系構築のための研究を行った。BCGではthyAおよびthyXの遺伝子2重欠損株を試みたが、スクロース感受性を指標とした相同組換えでは目的とする組換え体を得ることはできなかった。thyAおよびthyXの遺伝子2重欠損株は目的どおり致死と考えられるので、組換えを確実に

る系を確立する必要がある。

2006

F. 健康危険情報

一般の組み換えDNA実験に準ずる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hotokezaka H, Sakai E, Ohara N, Hotokezaka Y, Gonzales C, Matsuo K, Fujimura Y, Yoshida N, Nakayama K: TNF-alpha, lipopolysaccharide, and peptidoglycan induce cell fusion independently of RANKL at the latest step of differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells, *Journal of Cellular Biochemistry*, in press.
2. Matsuo K, Hotokezaka H, Ohara N, Fujimura Y, Yoshimura A, Okada Y, Hara Y, Yoshida N, Nakayama K: Analysis of amphotericin B-induced cell signaling with chemical inhibitors of signaling molecules, *Microbiology and Immunology*, 50, 337-348, 2006
3. Fujimura Y, Hotokezaka H, Ohara N, Naito M, Sakai E, Yoshimura Y, Narita Y, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K: The hemoglobin receptor protein of *Porphyromonas gingivalis* inhibits receptor activator NF- κ B ligand-induced osteoclastogenesis from bone marrow macrophages, *Infection and Immunity*, 74, 2544-2551,

2. 学会発表

1. Kamijo K, Ohara N, Abe M, Uchimura T, Hosoya H, Lee J, N Usuda, Miki T: Positioning of the cleavage plane by Rho signaling. The Cell Cycle, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A. 2006 {Abstracts, 2006}
2. Kamijo K, Ohara N, Abe M, Uchimura T, Hosoya H, Lee J, N Usuda, Miki T: Accumulation of Rho at the equatorial cell cortex for contractile ring formation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan 2006 {CD-ROM, 2006}
3. Ohyama H, Kogoe N, Takeuchi K, Nishimura F, Uemura Y, Matsushita S, Ohara N, Okano S, Abiko Y, Yamanegi K, Yamada N, Nakasho K, Terada N: The effect of 5' flanking region gene polymorphism of IL12RB2 on NK cell activity. Forty-first Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program, Kagoshima, Japan 2006 {Abstracts, 41-45, 2006}
4. Ohara N, Yoshimura M, Shoji M,

- Kondo Y, Nakayama K: Diverse effects of BCG infection on various stages of RANKL-induced osteoclast differentiation. Forty-first Joint Research Conference on Leprosy and Tuberculosis: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program, Kagoshima, Japan 2006 {Abstracts, 156-158, 2006}
5. 藤村裕治, 大原直也, 吉村満美子, 佛坂齊社, 内藤真理子, 中山浩次: Porphyromonas gingivalisのhomoglobin結合タンパクによる破骨細胞形成抑制作用について、第79回日本細菌学会総会, 金沢, 3月{日本細菌学雑誌, 61, p123, 2006}
6. 大原直也, 吉村満美子, 庄子幹郎, 近藤好夫, 中山浩次: 細菌感染症による破骨細胞形成の制御におけるMyD88の役割、第79回日本細菌学会総会, 3月{日本細菌学雑誌, 61, p149, 2006}
7. 内藤真理子, 庄子幹郎, 大原直也, 中山浩次: Porphyromonas gingivalisの血小板凝集活性に必須なIgGの特異性の解析、第79回日本細菌学会総会, 3月{日本細菌学雑誌, 61, p154, 2006}
8. 大原直也, 藤村裕治, 吉村満美子, 庄子幹郎, 佛坂齊社, 坂井詠子, 近藤好夫, 内藤真理子, 中山浩次: 細菌および菌体成分による破骨細胞形成抑制作用、第59回日本細菌学会九州支部総会, 第43回日本ウイルス学会九州支部総会, 9月{プログラムおよび抄録, p37, 2006}
9. 大原直也, 吉村満美子, 庄子幹郎, 近藤好夫, 中山浩次: 細菌感染によってもたらされる破骨細胞前駆細胞の分化の方向性、第48回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 9月{Journal of Oral Biosciences, 48, Suppl., p167, 2006}
10. 菊池有一郎, 大原直也, 上田青海, 平井要, 柴田幸永, 中山浩次, 藤村節夫: Porphyromonas gingivalisの新規低分子蛋白(UstA)と環境ストレスとの関係、第48回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 9月{Journal of Oral Biosciences, 48, Suppl., p202, 2006}
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし