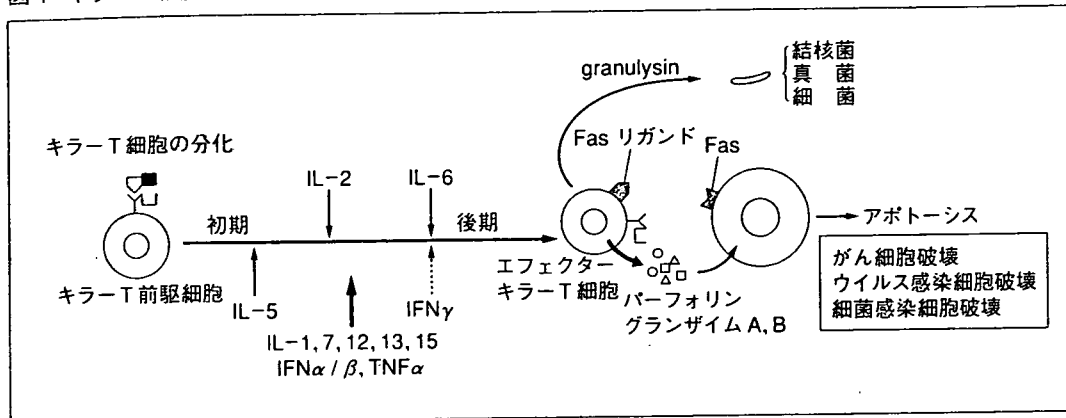


図4 キラーT細胞活性化と細胞傷害機構

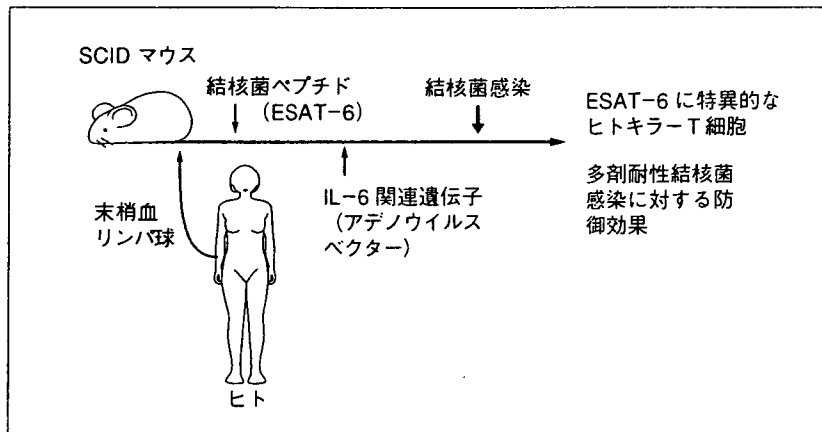


略語：巻末の「今号の略語」参照

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⁹⁾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²⁷⁾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)

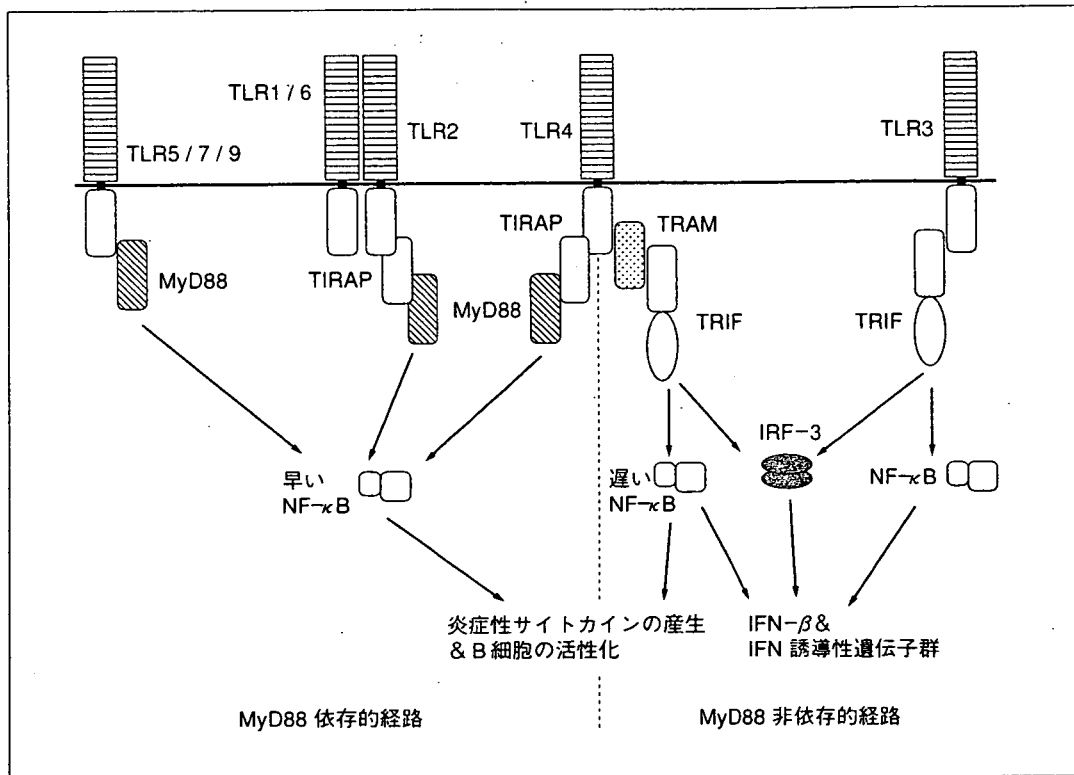
2. Toll-like受容体およびPathogen Recognition Receptorとマクロファージ・樹状細胞活性化

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

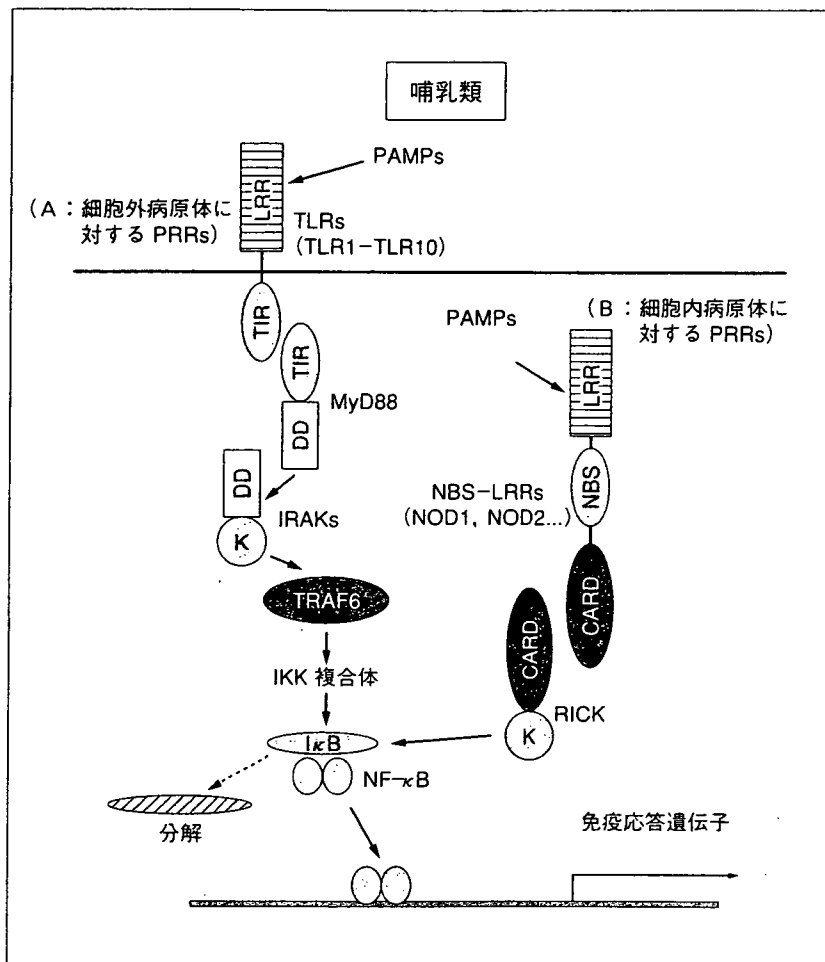
ジア人において *M. leprae* による結節性ハンセン症と関連している。

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,

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>α 抗原 (Ag85B), Ag85A, MPB51, ESAT-6, Hsp65</p> <p>リコンビナントサイトカイン (IFNγ 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-6 DNA, IL-6 遺伝子, IL-6 遺伝子 + IL-6R 遺伝子 + gp130 遺伝子, IFNγ 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, IFNγ 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⁶⁾⁷⁾⁹⁾ (表 4)。

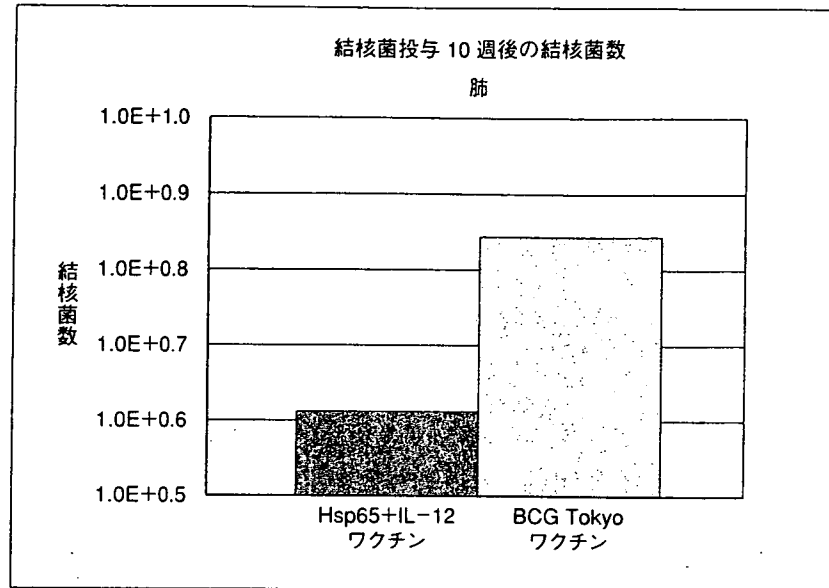
1. DNA ワクチン

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⁶¹⁾⁷⁹⁾.

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⁶¹⁾⁷⁹⁾.

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, α 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²⁾⁵⁾.

これらの遺伝子を PNN2 シャトルベクター (大腸菌 \leftrightarrow 好酸菌) に組み込み BCG 東京菌に, 遺伝子を導入した. 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^{67,79)}。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 γ 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¹⁸⁾。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⁶⁾ (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¹⁹⁾。

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。

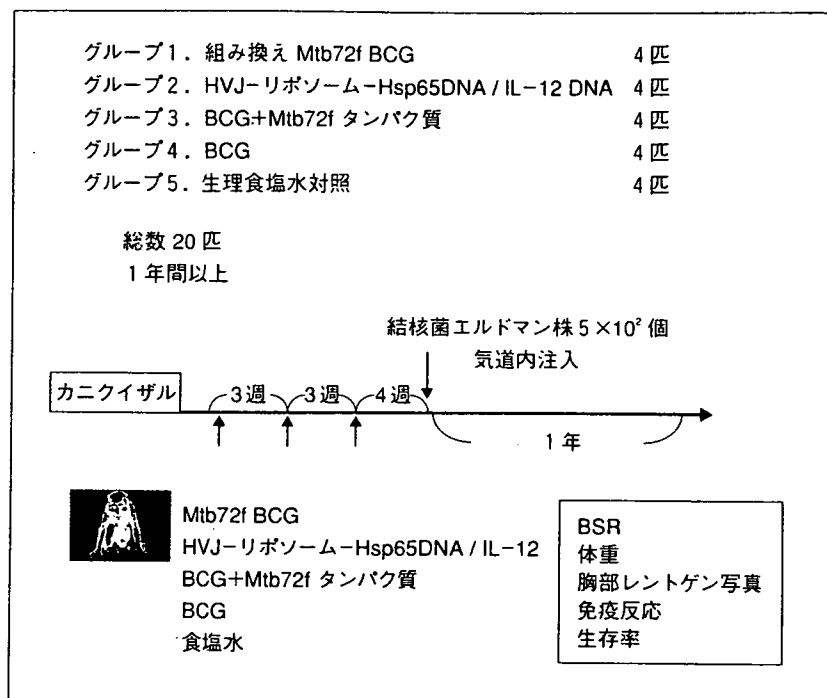
新しいヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID - PBL / hu (ヒト結核ワクチン解析モデル) の作製

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^{67,79)} (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²²⁾) 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⁸⁾（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，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⁸⁾（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-リボソーム / 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-リボソーム / 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⁵⁻⁷⁾。

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-リボ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-リボソーム / Hsp65 + IL-12 DNA ワクチン M. Okada
2. リコンビナント 85B BCG ワクチン Horowitz
3. 85B-ESAT6 fusion タンパク質ワクチン 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 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 J.L, et al: *Immunology of Tuberculosis*. *Annu Rev Immunol* 19: 93-129, 2001.
- Schluger N.W, 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 S.T, 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 G P, 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^{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。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

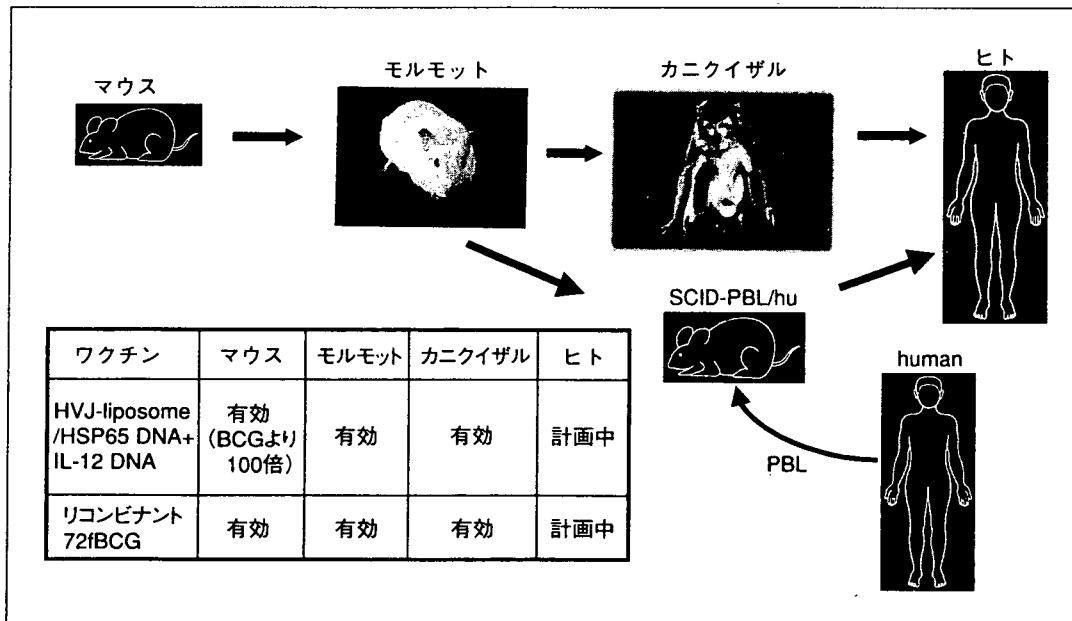


図1 新しい結核ワクチンの開発

* 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 堺市長曾根町1180] ; Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, Sakai 591-8555, JAPAN

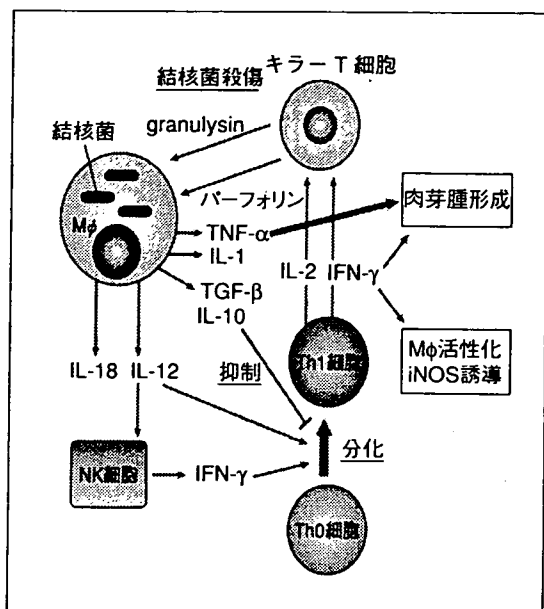


図2 抗結核免疫とマクロファージ, ヘルパーT
キラーT細胞活性化

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)^{5)~8)}。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⁹⁾¹⁰⁾。

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⁺T細胞, NK細胞, γ/δ 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ことになった¹¹⁾。

1. キラーT細胞(CD8⁺T細胞)

CD8あるいはβ₂ミクログロブリン遺伝子やTAP遺伝子ノックアウトマウスでは抗結核免疫が十分でなく、動物は死亡する。すなわち、結核におけるCD8⁺T細胞はマウスで抗結核免疫に重要である(図3)。

キラーTのひとつの役割として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⁺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¹²⁾。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⁵⁾。

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⁺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¹⁴⁾。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¹³⁾(図2)。さらに、IL-6, IFN-γがキラーT細胞分化因子として強力なキラーT分化を誘導することをはじめて明らかにした^{14)~17)}(図3)^{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。IL-12とIFN-γ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-γはMφからのIL-12産生を誘導し、IL-12はT細胞からのIFN-γ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)¹¹⁾。

結核性肉芽腫の形成にTNF-α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²⁾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¹⁸⁾。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⁺T細胞が結核免疫に重要であることはMHC

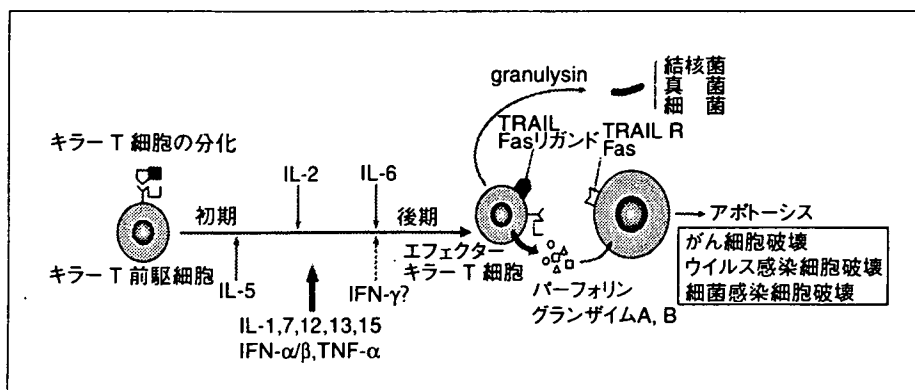


図3 キラー T 細胞活性化と細胞傷害機構

class II^{-/-}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¹⁹⁾(Th1細胞と結核免疫については文献²⁾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リボソーム ⑤改良型HVJエンベロープベクターを計画中である^{6)~9)19)}。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²⁰⁾²¹⁾。

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⁶⁾⁷⁾⁹⁾(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リボソームをベクターに用いた場合、HSP65 DNA単独(HVJリボソーム/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リボソーム/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⁶⁾⁷⁾⁹⁾。

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²²⁾。

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²³⁾。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⁶⁾(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

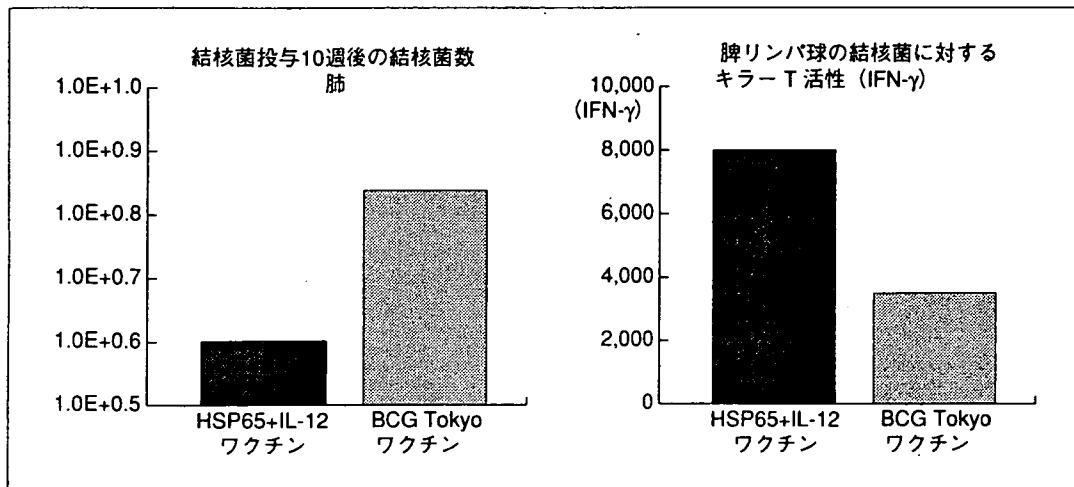


図4 HSP65+IL-12 DNAワクチンによるBCGより100倍強力な抗結核ワクチン効果(マウス)とサイトカイン(IFN-γ)産生キラーT細胞増強効果

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²⁴⁾。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)⁶⁾⁷⁾¹³⁾。

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リボソーム/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