

201225007A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御

を介した治療予防法の開発戦略

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

平成25(2013)年3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御
を介した治療予防法の開発戦略

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部长)

平成25(2013)年3月

目 次

総括研究報告書：結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御を介した治療予防法の開発戦略 牧野 正彦（国立感染症研究所）	-----1
分担研究報告書：初回免疫ワクチンの開発 牧野 正彦（国立感染症研究所）	-----8
分担研究報告書：結核及び非結核性抗酸菌の迅速な菌種同定法の確立と治療法開発 柴山 恵吾（国立感染症研究所）	-----13
分担研究報告書：新規ワクチン開発のための基礎研究 －Th1 誘導型ペプチドによる細胞障害性メモリーT 細胞の分化誘導機構の開発－ 田村 敏生（国立感染症研究所）	-----18
分担研究報告書：慢性持続感染機構解明のための抗酸菌制御システムの解析 星野 仁彦（国立感染症研究所）	-----23
分担研究報告書：自然免疫系による結核感染防御機構の解析 竹田 潔（大阪大学）	-----28
分担研究報告書：結核慢性感染の成立・維持における肺環境内恒常性に関する研究 河村 伊久雄（京都大学）	-----31
研究成果の刊行に関する一覧表	-----35

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御

を介した治療予防法の開発戦略

総括研究報告書

研究代表者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御を介した治療予防法の開発戦略

研究代表者 牧野 正彦（国立感染症研究所・感染制御部・部長）

研究要旨.

近年多くの新興感染症が発症している中、結核は古くから多くの人々の命を奪ってきた制御が極めて難しい再興慢性持続性感染症である。その制御にあたり現在最も重要視されているのは、発症予防方策の確立と薬剤耐性菌に対する新しい治療法の開発である。結核菌に対する生体防御反応には、自然免疫と獲得免疫の両者が関与し、とかく軽視されがちな自然免疫の活性化も結核制御において極めて重要な位置を占めている。宿主抗原提示細胞の細胞質で結核菌由来 DNA を認識する AIM2 遺伝子を除去すると、IL-1 の産生など自然免疫経路の活性化ばかりでなく、獲得免疫反応も十分に機能せず、結核菌感染個体の早期個体死を誘導することが明らかとなった。また、生体防御反応に負の因子を与える PD-1 分子を欠損させ、ワクチンとして投与した BCG の T 細胞の活性化能を増強させると、BCG の有するワクチン効果を増強させ得ることが明らかとなった。ワクチン開発においては、投与する分子の改善のみならず宿主の免疫機能を調整することが重要であることを示唆している。一方、ワクチン分子の開発においては、BCG の固有の欠点を凌駕し得るリコンビナント BCG の作製が検討され、これまで当研究班で開発してきたリコンビナント BCG である HSP70-MMP-II 遺伝子を組み込んだウレアーゼ欠損 BCG に、更に結核菌が活性化した際に発現する Cys0 遺伝子を組み込ませ、HSP70-Cys0-MMP-II 融合蛋白を分泌させると、全てのコンポーネントに作用する抗原特異的 T 細胞がポリクローナルに産生された。また、高齢者の肺結核を予防するためには、細胞障害性 T 細胞に容易に分化し得るメモリーサブセット CD8 陽性 T 細胞の存在とその機能維持が重要であるが、このメモリー T 細胞の産生には、IFN- γ 産生性ヘルパー CD4 陽性 T 細胞と IL-17F 産生性ヘルパー T 細胞が協調作用することが重要であることが明らかにされた。さらに、抗結核新規薬剤の開発においては、Rv2660c の基質結合部位に結合するリード化合物が確立された。これら化合物は、既存の抗結核薬では使用されておらず、多剤耐性菌にも有効に作用する新しい治療薬の開発が可能となったと考えられる。結核に対する予防法及び治療法開発の両面で一定の成果が上がった。

研究分担者

柴山 恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
田村 敏生（国立感染症研究所・感染制御部・室長）
星野 仁彦（国立感染症研究所・感染制御部・室長）
竹田 潔（大阪大学大学院医学研究科・免疫制御学・教授）
河村 伊久雄（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・准教授）

A. 研究目的

人類は太古の昔から結核に苦しめられ、

ロバート・コッホ以来 200 年近くの研究が積み重ねられてきた。しかし残念ながら、人類は未だ結核に対する制御法を勝ち得ていない。集団検診等の公衆衛生学的技法のみでは、もはや結核を制圧することはできず、診断・予防・治療の全ての側面において更なる努力が必要となっている。当研究班においては、予防法の開発・薬剤耐性菌にも有効に作用する新規薬剤の開発に力点を置いた研究を展開することを主目的とした。特に、予防法の開発においては、BCG に改良を加え、高齢者の肺結核のみならず、都市で近年問題となっている集団感染・集団発症（アウトブレイク）にも十分対応可能なリコンビナント BCG の開発のみならず、高齢者を対象としてワクチン接種を行った場合、宿主要因としての必須因子の解明、自然免疫反応を有効に利用したワクチン接種法、さらに既存のワクチンをより有効に作用させるための宿主獲得免疫応答能の調整法の開発など、多方面より予防法確立のための研究を行うことを目的として設定した。

以下に主な研究課題を挙げる。

1. 結核菌のマイクロ RNA を利用し、薬剤耐性結核菌の出現を予測する方策の開発（星野）
2. 結核菌に対する宿主自然免疫応答に基づく自然免疫応答を利用した結核治療法の開発（竹田）
3. 結核菌と宿主免疫応答の相互作用の結果、結核菌をマクロファージ等の抗原提示細胞内に封じ込めるために必要な宿主因子の解析（河村）
4. 結核発症を予防するための新規リコンビナント BCG の開発とその評価（牧野）
5. 結核菌の増殖に必須な酵素を選択的に阻害する化合物の同定を通じた新規抗結核薬の開発（柴山）
6. 農村型再燃型結核発症を抑制し得るタイプ 1 CD4 陽性 T 細胞の選択的活性化のための免疫学的戦略の開発（田村）

B. 研究方法

1. 結核菌由来 micro RNA の発現が多剤耐

性菌への形質転換を予想するためのバイオマーカーとなり得るか検索した（星野）。

2. 自然免疫応答への関与が想定されるヒアルロン酸合成酵素および AIM2 の結核感染防御における役割をノックアウトマウスを作製し解析した（竹田）。
3. 免疫性抑制シグナルである PD-1 シグナル経路を利用した抗結核 BCG ワクチンの効果増強法を検討した。ワイルドタイプ C57BL/6 マウスに BCG ワクチン接種後、PD-1 に対する抗体を投与し、その後に結核菌 H37Rv を経鼻感染させ、生存率を測定した（河村）。
4. ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に結核菌 Major Membrane Protein (MMP)-II をコードする遺伝子と BCG 菌由来 Heat Shock Protein (HSP) 70 及び Cys0 をコードする遺伝子を連結し組み込ませ、新しいリコンビナント BCG (BCG-dHCM) を作製した。BCG-dHCM の T 細胞活性化能を IFN- γ 産生能を指標に、樹状細胞の活性化能を細胞表面抗原の発現量及びサイトカイン産生能を指標に評価した。さらに、BCG-dHCM のワクチン効果をマウスを用いて評価した（牧野）。
5. 抗酸菌特異的加リン酸分解酵素 (Rv2613c) を標的とした新規抗結核薬の開発を目指し、Rv2613c の特異的な基質結合部位に結合する化合物を探索し、その酵素活性阻害能を検討した（柴山）。
6. 機能的 CD8 陽性キラー T 細胞 (CTL) の分化誘導に果たす IL-17F の役割をグランザイム B の産生を指標に検討した。さらに、IL-17F 産生性 CD4 陽性 T 細胞の表面抗原を解析して、特徴づけを行った（田村）。

倫理面への配慮 国立感染症研究所および当該研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しない

よう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を充分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。動物実験は、当該研究施設の動物実験委員会の承認を得た上で、実験動物倫理指針に基づいて実施した。

C. 研究結果

1. INH・SM・LVFX 単剤耐性結核菌では、薬剤感受性株に比し microRNA の発現が低下していることが明らかとなった(星野)。
2. AIM2 欠損マウスは、結核菌に対し高感受性を示した。その分子機構は、細胞質内に遊離された結核菌由来 DNA が AIM2 により認識され、その結果インフラマゾームの活性化および IL-1 β ・IL-18 の分泌誘導によることが明らかとなった(竹田)。
3. BCG 接種コントロール抗体投与結核菌感染マウス群では、結核菌感染後 17 ヶ月で生存率は 20%であったのに対し、BCG 接種抗 PD-1 抗体投与結核菌感染群では、感染後 17 ヶ月を経過してもマウスの生存率は 80%を示した。BCG 免疫に抗 PD-1 抗体を併用することにより、BCG のワクチン効果が亢進することが明らかとなった(河村)。
4. *M. smegmatis* を用いて活性化結核菌に発現するリコンビナント Cys0 蛋白を精製し、その免疫学的特性を評価したところ、Cys0 は樹状細胞及び CD4 陽性 T 細胞を活性化し、免疫原性を有していることが判明した。そこで、HSP70-Cys0-MMP-II 連結遺伝子を *UreC* ノックアウトリコンビナント BCG に組み込ませ、BCG-dHCM を作製した。BCG-dHCM は HSP70-Cys0-MMP-II 融合蛋白を分泌し、マウスに皮下接種すると、HSP70・Cys0 及び MMP-II に反応する抗原特異的メモリー T 細胞を多クローン的に産生した(牧野)。

5. IL-17F 産生細胞は、Th1 細胞および Th17 細胞とは異なるヘルパー T 細胞亜集団であり、その分化は IFN- γ あるいは T-bet に依存しない経路に誘導されていた。さらに、IL-17F 産生細胞はレジデントメモリー様の分化形態を示すことが明らかとなった(田村)。
6. 40 万種の化合物についてドッキングシミュレーション解析と阻害活性測定を行い、Rv2613c の活性のみを顕著に阻害する化合物 2 種類を同定した。この 2 種類は新規抗結核薬開発に向けて、リード化合物として有望であると考えられた(柴山)。

D. 考察

結核ワクチンの基本は、細胞性獲得免疫機構の活性化によって産生されるメモリー T 細胞の作出にある。ワクチンとして用いられている BCG の頻回投与は無効である一方、BCG の 1 回投与の有効期限には限りがある。したがって、ワクチン開発にあたっては、初回免疫ワクチンと追加免疫ワクチンの両者が必要となる。20 年ほど以前には、改良型 BCG ワクチンの開発が複数の研究所で展開され、実用化が期待されたが、現在では、そのほとんどが無効とされ、現存する改良型 BCG ワクチンは 1 種類のみとなっている。当研究班で行っているリコンビナントワクチンの開発は、世界的にも貴重な存在となっている。当研究班で行っている BCG ワクチンの開発戦略は、以前に脚光を浴びた戦略を踏襲するものであるが、使用されているコンポーネントは、新興・再興感染症研究事業において長い年月をかけて開発してきたものであり、当研究班以外の研究所では全く使用されていないものである。したがって、これまでの候補 BCG とは趣を大きく異にしており、少なくとも小動物を用いた解析では期待できるリコンビナント BCG が作出されている。結核菌は、活動期・休眠期を繰り返すため、完全に生体外へ排除することは極めて難しいが、活動期及び休眠期に発現される主要分子を活用して、更なる改良を繰り返すことにより、

より有効なワクチンが作製できると期待される。さらに、現在開発が進んでいる追加免疫用ワクチンは、BCG 接種後の追加免疫を念頭に置きながら、BCG が保有しない分子群を融合蛋白として作製し用いているが、理論的にはあまり有効とは考えられない。したがって、初回免疫用 BCG ワクチンの開発にあたっては、有効とされる追加免疫用ワクチンのコンポーネントを念頭に置いた開発も必要となってくる。今後の課題と考えられる。

一方、獲得免疫の活性化により産生されるメモリーT 細胞を用いた結核菌の生体外排除においては、メモリーT 細胞が抗原特異的に産生され、メモリーT 細胞が結核菌を貪食した抗原提示細胞と接触するためには、2~3 週間と時間を要する。非ワクチン接種マウスにおいては、エアロゾル感染した結核菌を貪食した樹状細胞が所属リンパ節へ移行し、未感作 T 細胞を活性化し、活性化した T 細胞が再び肺胞へ移行して、初めて結核菌感染抗原提示細胞に働きかけるため、移動及び活性化に長期間の時間が必要となる。ワクチン接種により、予めメモリーT 細胞を所属リンパ節内に作製しておくことにより、所属リンパ節における T 細胞の活性化に要する時間は短縮できるが、結核菌が感染からリンパ節へ移行するまでの時間は短縮できない。本年度の研究により、自然免疫の活性化が結核菌の生体外排除に極めて重要な役割を果たすことは改めて証明されたが、生体防御の観点からは、如何にして自然免疫担当細胞のプライミングを果たすかが重要となる。極めてハードルの高い課題であるが、同時に極めて重要である。

また、BCG の利点の 1 つは長期生体内に宿ることと考えられてきた。つまり、長期間生体内に存在するため、ワクチン効果も長期間期待できるとするものである。しかし、接種された BCG が生体内に長期間存在するためには、BCG そのものに対する生体防御反応はある程度抑制されたものであらねばならない。その場合、その後に生体内に侵入した結核菌に対する生体防御反応も

同時に弱い可能性がある。本年度の研究から、宿主の細胞性免疫抑制性シグナルを除去した宿主に BCG を接種すると、BCG に対する生体防御反応は非常に強く誘導され、BCG の早期生体外排除が誘導される一方で、結核菌に対するワクチン効果も増強されることが示された。ワクチン開発にあたって、これまでの概念を一掃する必要があるかもしれない。

多剤耐性菌に対応し得る新薬の開発は非常に長い道のりである。しかし、新薬開発と抗酸菌の耐性化の戦いはいつの時代でも遭遇する大きな問題であり、新しい観点からの新薬開発は永遠に続けられるべき重要な課題である。

E. 結論

昨年度まで展開してきた結核に対するワクチン開発、ワクチンの有効性を増強させる宿主要因の解明、さらに新規抗結核薬の開発に更なる進展がみられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Hattori, A. Yamamoto, S. Wada, K. Hatai, M. Makino, and N. Ishii. 2012. *Mycobacterium pseudoshottsii* isolated from 24 farmed fishes in western Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 74: 275-278.
- 2) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. 2012. Mutation analysis of mycobacterial *rpoB* genes and rifampicin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56: 2008-2013.
- 3) Tanigawa, K., D. Yan, A. Kawashima, T. Akama, A. Yoshihara, Y. Ishido, M. Makino, N. Ishii, and K. Suzuki. 2012. Essential role of hormone-sensitive

- lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *Microb. Pathog.*, 52: 285-291.
- 4) Nakanaga, K., Y. Hoshino, M. Wakabayashi, N. Fujimoto, E. Tortoli, M. Makino, T. Tanaka, and N. Ishii. 2012. *Mycobacterium shigaense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic mycobacterium that produced nodules in an erythroderma patient with severe cellular immunodeficiency and a history of Hodgkin's disease. *J. Dermatol.*, 39: 389-396.
 - 5) Saiga, H., S. Kitada, Y. Shimada, N. Kamiyama, M. Okuyama, M. Makino, M. Yamamoto, and K. Takeda. 2012. Critical role of AIM2 in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int. Immunol.*, 24: 637-644.
 - 6) Mori, S., R. R. Yotsu, K. Suzuki, M. Makino, and N. Ishii. 2012. Present situation of leprosy in Japan, 2006-2010: Analysis of drug resistance in new registered and relapsed cases by molecular biological methods. *J. Dermatol. Sci.*, 67: 192-194.
 - 7) Yotsu, R., N. Nakanaga, Y. Hoshino, K. Suzuki, and N. Ishii. 2012. Buruli Ulcer and current situation in Japan: a new emerging cutaneous mycobacterium infection. *J. Dermatol.*, 39: 587-593.
 - 8) Kamijo, F., H. Uhara, H. Kubo, K. Nakanaga, Y. Hoshino, N. Ishii, and R. Okuyama. 2012. A case of mycobacterial skin disease caused by *Mycobacterium peregrinum*, and a review of cutaneous infection. *Case Rep. Dermatol.*, 4: 76-79.
 - 9) Hamamoto, T., A. Yuki, K. Naoi, S. Kawakami, Y. Banba, T. Yamamura, R. Hikota, J. Watanabe, F. Kimura, K. Nakanaga, Y. Hoshino, N. Ishii, H. Shimazaki, K. Nakanishi, and S. Tamai. 2012. Bacteremia due to *Mycobacterium massiliense* in a patient with chronic myelogenous leukemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74: 183-185.
 - 10) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. 2012. Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous nontuberculous mycobacterial (NTM) infections. *J. dermatol.*, 40: 1-9.
 - 11) Hernandez-Cuellar, E., K. Tsuchiya, H. Hara, R. Fang, S. Sakai, I. Kawamura, S. Akira, and M. Mitsuyama. 2012. Nitric Oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol.*, 189: 5113-5117.
 - 12) Degang, Y., T. Akama, T. Hara, K. Tanigawa, Y. Ishido, M. Gidoh, M. Makino, N. Ishii, and K. Suzuki. 2012. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism proteins in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, in press.
2. 学会発表
 - 1) Kiyoshi Takeda. Probiotics and innate immunity: Implication for chronic disease prevention. 5th India Probiotics Symposium, December 15-16, 2012, Bagalore, India.
 - 2) Kiyoshi Takeda. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. The 4th AsiaHORCs Joint Symposium, November 11-14, 2012, Buyeo, Korea.
 - 3) Kiyoshi Takeda. Regulation of gut homeostasis by innate immunity. International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting 2012,

- October 23-26, 2012, Tokyo.
- 4) Kiyoshi Takeda. Regulation of gut homeostasis by innate immunity. The 34th Naito Conference, October 16-18, 2012, Sapporo, Japan.
 - 5) Kiyoshi Takeda. Regulation of gut homeostasis by innate immunity. The 7th RCI International Summer Program, June 22-27, 2012, Yokohama.
 - 6) Kiyoshi Takeda. Regulation of gut homeostasis by innate immunity. Macrophage Molecular and Cellular Biology 2012, June 15-16, 2012, Tokyo.
 - 7) Kiyoshi Takeda. Regulation of gut homeostasis by innate immunity. ICAD Forum, April 18-19, 2012, Tokyo.
 - 8) Yoshihiko Hoshino. Receptor of trehalose di-mycolate (TDM), mincle (macrophage inducible C-type lectine) determines the susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* EMBO conference serie "Tuberculosis 2012". September 10-18, 2012, Paris, France.
 - 9) 竹田潔. 腸管免疫と炎症制御. 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2012年7月 福岡
 - 10) 竹田潔. プロバイオティクス細菌による腸管免疫制御機構. 第12回日本抗加齢医学会総会 2012年6月 横浜
 - 11) 竹田潔. 自然免疫と消化管疾患. 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012年5月 大阪
 - 12) 竹田潔. 自然免疫系による慢性炎症性腸疾患の制御. 第49回日本臨床分子医学会学術総会 2012年4月 京都
 - 13) 鈴木幸一, Yang Degang, 石藤雄子, 大塚幹夫, 塘 忠顕, 斎藤一二三, 小林睦生, 赤間 剛 原 武史, 中永和枝, 星野仁彦, 四津里英, 牧野正彦, 石井則久. Buruli 潰瘍家族発症例の住居敷地内からの *Mycobacterium ulcerans* DNA 検出. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012年6月 札幌市
 - 14) 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. Bioluminescence 系の抗酸菌応用への基礎的検討. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012年6月 札幌市
 - 15) 甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 関塚剛史, 黒田 誠, 牧野正彦. らい菌 Kyoto-2 株の全ゲノムシーケンスにより同定された SNPs の解析. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012年6月 札幌市
 - 16) Degang Yang, Takeshi Akama, Takeshi Hara, Yuko Ishido, Masahiko Makino, Norihisa Ishii, and Koich Suzuki. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012年6月 札幌市
 - 17) 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. らい菌感染した樹状細胞から分泌されるエキソソームの解析. 第85回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012年6月 札幌市
 - 18) Shimohakamada, Y., T. Tamura, and M. Makino. Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. 第41回日本免疫学会総会・学術集会 2012年12月 神戸市
 - 19) 森茂太郎, 金玄, 林原絵美子, 柴山恵吾. *Mycobacterium avium* 由来 MAV_3489 と *M. smegmatis* 由来 MSMEG_2932 の機能解析. 日本農芸化学会 2013年度大会 2013年3月 仙台
 - 20) 河村伊久雄, 酒井俊祐, 光山正雄. PD-1 シグナル経路による抗結核防御免疫の制御. 第82回実験結核研究会 2012年5月 広島
 - 21) 河村伊久雄, 光山正雄. 結核菌による宿主感染防御の発現制御. 第87回日

本結核病学会 2012年5月 広島

- 22) Hernandez-Cuellar, E., K. Tsuchiya, H. Hara, R. Fang, S. Sakai, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. Nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. 第65回日本細菌学会関西支部総会 2012年11月 神戸
- 23) Hernandez-Cuellar, E., K. Tsuchiya, H. Hara, R. Fang, S. Sakai, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. Nitric

oxide-dependent suppression of the NLRP3 inflammasome activation. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月 神戸

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

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

初回免疫ワクチンの開発

分担研究報告書

研究分担者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・部長)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

初回免疫ワクチンの開発

研究分担者 牧野 正彦 （国立感染症研究所・感染制御部・部長）
研究協力者 塚本 裕美子 （国立感染症研究所・感染制御部・研究員）

研究要旨.

日本の結核対策の基本は、集団検診と *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) のワクチン接種であった。しかし、近年結核罹患率の減少率は鈍化すると同時に、多剤耐性菌が出現し集団発症例が増加するなど、BCG に代わる新たなワクチン開発・導入が不可欠となっている。本研究においては、現在用いられている BCG に改良を加え、より有効に作用する新規リコンビナント BCG を作出することを目的として設定した。これまでの BCG 改良戦略に基づき、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG をホスト BCG として用い、本 BCG に BCG 菌由来の heat shock protein (HSP)70、結核菌由来の活動期に発現する Cys0 及び major membrane protein (MMP)-II 遺伝子を連結した遺伝子を導入し、新しいリコンビナント BCG、BCG-dHCM を産生した。BCG-dHCM は菌体外へ HSP70-Cys0-MMP-II 融合蛋白を分泌し、また BCG-dHCM をパルスした樹状細胞はヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞及び未感作 CD8 陽性 T 細胞を活性化して大量の IFN- γ を産生した。未感作 CD8 陽性 T 細胞は TAP 及びプロテオゾームに依存した cytosolic cross-presentation 経路により活性化されていた。さらに、未感作 T 細胞の活性化はファゴゾームの成熟化が密接に関与していた。さらに、C57BL/6 マウスに BCG-dHCM を接種すると長期生存可能で、HSP70・Cys0・MMP-II さらには結核菌の細胞質蛋白による二次刺激に強く反応するメモリータイプの T 細胞を多クローンに効率的に産生した。したがって、ウレアーゼを欠損したリコンビナント BCG に結核菌由来の免疫原性蛋白及び活動期に発現する蛋白の遺伝子を導入することが、従来の BCG より有効に作用する BCG ワクチンを作成する上で有効と考えられた。

A. 研究目的

結核は毎年 200 万人の結核病死を誘導し、また、結核菌は全世界の 3 分の 1 の人に潜伏感染している。近年、多剤耐性結核菌が発生し、全世界に広まりつつあり、結核の発症を確実に予防する方策の確立が急務となっている。結核に対するワクチンとして *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) が広く使用されてきたが、BCG は小児の粟粒結核あるいは結核性髄膜炎の発症を予防する上では有効であるが、成人の肺結核は予防できないと考えられている。一方、有望な結核モ

デルマウスを用いた研究から、経気道感染した結核菌を貪食したマクロファージあるいは樹状細胞が所属リンパ節へ移動し、結核に対して最も有効に作用する CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を刺激するためには 7-10 日が必要であり、刺激されたリンパ球が結核菌殺戮に有効に作用するインターフェロンガンマ (IFN- γ) を充分産生するまでには 4-5 週必要であって、IFN- γ 産生されるまでの間結核菌は増殖し続けることが判明している。したがって、結核の発症を抑制するためには、ワクチン接種によっ

てメモリータイプのCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞を予め充分産生しておく必要がある。この意味において、BCGは未感作CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞を充分活性化することができず、そのためメモリーT細胞を十分に産生することができない。そのため、本研究においてはBCGに改良を加え、未感作T細胞を充分活性化できるリコンビナントBCGを作出することを目的とした。リコンビナントBCGの作出にあたっては、昨年までの研究実績に基づき、ウレアーゼ欠損リコンビナントBCGを宿主BCGとして用い、BCG由来のHSP70、活動期結核菌に発現するCys0及びMMP-II遺伝子を連結した融合遺伝子を導入した(BCG-dHCM)。BCG-dHCMの免疫学的性状解析と結核菌の増殖抑制効果を検討した。

B. 研究方法

UreC遺伝子欠損リコンビナントBCGに、結核菌由来MMP-II遺伝子にCys0とBCG由来のHSP-70遺伝子を結合させ、遺伝子導入リコンビナントBCG(BCG-dHCM)を作製した。正常健常人末梢血より、抗CD3抗体付着ダイナビーズを用いT細胞を除去した後、プラスチック付着性単球を得てリコンビナント(r)GM-CSF 50ng/mlおよびrIL-4(10ng/ml)を添加して樹状細胞を産生した。この樹状細胞に対して、リコンビナントBCGあるいはベクターコントロールBCG(BCG-261H)を感染させ成熟樹状細胞を得た。BCG感染樹状細胞のT細胞活性化能は、BCG感染樹状細胞をマイトマイシンC処理した後、自己のCD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞と4日間混合培養し、T細胞が産生するIFN- γ およびIL-2をELISA法で測定して評価した。T細胞は、抗CD4抗体あるいは抗CD8抗体付着ダイナビーズを用いて精製した。ナイーブT細胞は、これらT細胞からCD45RO陽性T細胞を除去して得た。CD45RO抗体は市販の抗体を用いた。IFN- γ およびIL-2は、市販のELISA用キットを用いて測定した。樹状細胞から産生される各種サイトカインも市販のキットを用いてELISA法で測定した。BCG感染樹状細胞にお

けるT細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞をMHC抗原に対する抗体およびCD86に対する抗体で処理した際のT細胞の活性化の減弱の程度で評価した。樹状細胞表面の抗原の発現程度は、FACSCaliburを用いて行った。抗体は市販の抗体を用いた。BCG-dHCM感染DCによるT細胞活性化機構を探索する目的で、DCを市販のChloroquine、Brefeldin A、Lactacystinで処理し、T細胞の活性化抑制能をT細胞からのIFN- γ の産生量により評価した。さらに、BCG-dHCMのメモリーT細胞産生能を測定する目的で、C57BL/6マウスにBCG-dHCMおよびBCG-261Hを皮下接種し、4週間後に脾臓を摘出し、脾中CD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞を*in vitro*でMMP-IIタンパクで刺激した際に、細胞内にIFN- γ を産生している細胞をFACSCaliburを用いて測定し算出した。倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

C. 研究結果

BCG-dHCMは菌体外へHSP70-Cys0-MMP-II融合蛋白を分泌し、樹状細胞に感染させるとIL-12p70・INF α ・IL-1 β などのサイトカインをベクターコントロールBCGに比し効率的に産生誘導した。また、樹状細胞の細胞表面の抗原を解析すると、MHCクラスI及びII・CD86さらにCD83抗原を強く発現させ、さらにM-CSFを用いて分化誘導したマクロファージからも大量のIL-12p40・IL-1 β ・TNF α 及びGM-CSFを産生させた。さらに、BCG-dHCMを樹状細胞及びマクロファージに感染させると細胞表面にMMP-IIを発現させ、これら抗原提示細胞を酸性化

抑制剤であるクロロキニンで前処理すると MMP-II の発現は抑制された。また、BCG-dHCM を樹状細胞に感染させた後、ヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を刺激すると大量の IFN- γ を産生し、T 細胞からの IFN- γ の産生は、BCG-dHCM 感染樹状細胞を抗 MHC 抗体あるいは抗 CD86 抗体で処理すると抑制され、さらにクロロキニンで樹状細胞を処理しても抑制された。また、BCG-dHCM をマクロファージに感染させ、メモリータイプの CD4 陽性 T 細胞を刺激しても IFN- γ は産生され、抗 MHC 抗体・抗 CD86 抗体及びクロロキノンの前処理で IFN- γ の産生は抑制された。さらに、BCG-dHCM 感染樹状細胞を用いて未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を刺激すると CCR7^{low} あるいは CD27^{low} のメモリータイプ CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞が効率的に産生された。さらに、C57BL/6 マウスに BCG-dHCM を皮下接種し、4 週あるいは 12 週後に脾 T 細胞を分離し、*in vitro* で MMP-II・HSP70・Cys0 あるいは結核菌 H37Rv 由来細胞質蛋白で再刺激すると、大量の IFN- γ を産生した。

D. 考察

IFN- γ はマクロファージを活性化して結核菌の殺戮を誘導するとともに、Th17 の活性化を抑制して好中球の肺内集積を抑制して急性炎症を抑制する上で極めて重要な役割を果たしている。したがって、抗結核ワクチンは、未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を強く活性化し効率的に IFN- γ を産生する能力を有している必要がある。本研究においては、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に HSP70-Cys0-MMP-II 連結遺伝子を導入し、新しくリコンビナント BCG (BCG-dHCM) を産生した。BCG-dHCM は、未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を強く活性化し、大量の IFN- γ を産生した。Cys0 は、これまでの研究からユビキチンスーパーファミリーに属し、活動期に発現し結核菌のマクロファージ内での生存を助長することが知られている。したがって、Cys0 は結核菌の生体外排除を誘導する上で良いターゲットと考えられる。一方で、HSP70

及び MMP-II は TLR2 に結合して自然免疫を活性化する。そのため、Cys0 を HSP70-MMP-II に連結させ、HSP70-Cys0-MMP-II をファゴゾーム内で分泌させることで、Cys0・HSP70・MMP-II の三者が協調的に作用し、樹状細胞及びマクロファージを活性化し大量のサイトカインを産生誘導した。さらに、BCG-dHCM をマウスに接種すると、HSP70・MMP-II のみならず Cys0 及び結核菌の細胞質蛋白に反応するメモリー T 細胞を産生した。昨年度、結核菌の肺内増殖を抑制し得るリコンビナント BCG として、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入した BCG-DHTM を作出した。BCG-DHTM においても未感作 T 細胞を活性化して IFN- γ の産生を誘導したが、抗原性因子として HSP70 と MMP-II を用いた。HSP70 は抗原性分子となる他にシャペロン効果を発揮すると同時にキラー T 細胞のプライミング作用を有するため、CD8 陽性 T 細胞の活性化が期待される。HSP70・MMP-II 遺伝子は共に結核菌のみならず BCG にも存在するために病原性因子としては考えにくい。これに対して、BCG-dHCM では結核菌の生育・増殖に深く関与する Cys0 を導入し、Cys0 に直接的に作用し得るメモリー T 細胞が産生可能であった。したがって、BCG-dHCM はワクチンとしての必要条件を満たし、今後有望なワクチンと考えられた。

E. 結論

ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に結核菌由来の免疫原性蛋白及び結核菌の生育に関与する遺伝子を導入すると、より有効に作用するリコンビナント BCG を作出することが可能と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Hattori, A. Yamamoto, S. Wada, K. Hatai, M. Makino, and N. Ishii. 2012. Mycobacterium pseudoshottsii isolated from 24 farmed fishes in

- western Japan. J. Vet. Med. Sci., 74: 275-278.
- 2) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. 2012. Mutation analysis of mycobacterial *rpoB* genes and rifampicin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56: 2008-2013.
 - 3) Tanigawa, K., D. Yan, A. Kawashima, T. Akama, A. Yoshihara, Y. Ishido, M. Makino, N. Ishii, and K. Suzuki. 2012. Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. Microb. Pathog., 52: 285-291.
 - 4) Nakanaga, K., Y. Hoshino, M. Wakabayashi, N. Fujimoto, E. Tortoli, M. Makino, T. Tanaka, and N. Ishii. 2012. *Mycobacterium shigaense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic mycobacterium that produced nodules in an erythroderma patient with severe cellular immunodeficiency and a history of Hodgkin's disease. J. Dermatol., 39: 389-396.
 - 5) Saiga, H., S. Kitada, Y. Shimada, N. Kamiyama, M. Okuyama, M. Makino, M. Yamamoto, and K. Takeda. 2012. Critical role of AIM2 in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Int. Immunol., 24: 637-644.
 - 6) Mori, S., R. R. Yotsu, K. Suzuki, M. Makino, and N. Ishii. 2012. Present situation of leprosy in Japan, 2006-2010: Analysis of drug resistance in new registered and relapsed cases by molecular biological methods. J. Dermatol. Sci., 67: 192-194.
 - 7) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. 2012. Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous nontuberculous mycobacterial (NTM) infections. J. dermatol., 40: 1-9.
 - 8) Degang, Y., T. Akama, T. Hara, K. Tanigawa, Y. Ishido, M. Gidoh, M. Makino, N. Ishii, and K. Suzuki. 2012. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism proteins in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. PLoS Negl. Trop. Dis., in press.
2. 学会発表
- 1) 鈴木幸一, Yang Degang, 石藤雄子, 大塚幹夫, 塘 忠顕, 斎藤一二三, 小林睦生, 赤間 剛 原 武史, 中永和枝, 星野仁彦, 四津里英, 牧野正彦, 石井則久. Buruli 潰瘍家族発生例の住居敷地内からの *Mycobacterium ulucerans* DNA 検出. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012 年 6 月 札幌市
 - 2) 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. Bioluminescence 系の抗酸菌応用への基礎的検討. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012 年 6 月 札幌市
 - 3) 甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 関塚剛史, 黒田 誠, 牧野正彦. らい菌 Kyoto-2 株の全ゲノムシーケンスにより同定された SNPs の解析. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012 年 6 月 札幌市
 - 4) Degang Yang, Takeshi Akama, Takeshi Hara, Yuko Ishido, Masahiko Makino, Norihisa Ishii, and Koich Suzuki. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. 第 85 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2012 年 6 月 札幌市
 - 5) 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. らい菌感染した樹状細胞から分

泌されるエキソソームの解析. 第 85 回
日本ハンセン病学 会総会・学術大会
2012 年 6 月 札幌市

本免疫学会総会・学術集会 2012 年 12
月 神戸市

- 6) Shimohakamada, Y., T. Tamura, and M. Makino. Enhancing effect of Peptide-25 on the induction of functional activation of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. 第 41 回日

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

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

結核及び非結核性抗酸菌の迅速な菌種同定法の確立と治療法開発

分担研究報告書

研究分担者

柴山 恵吾

(国立感染症研究所・部長)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

結核及び非結核性抗酸菌の迅速な菌種同定法の確立と治療法の開発

研究分担者	柴山 恵吾	(国立感染症研究所・細菌第二部・部長)
研究協力者	荒川 宜親	(名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学・教授)
研究協力者	森 茂太郎	(国立感染症研究所・細菌第二部・第四室・室長)
研究協力者	金 玄	(国立感染症研究所・細菌第二部・第四室・研究員)

研究要旨.

既存の抗結核薬に耐性を示す多剤耐性結核症や有効な抗菌薬が少ない非結核性抗酸菌症の治療に有用な新規抗結核薬の開発が臨床現場では強く求められている。そこで本研究グループでは、結核菌由来新規 diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) 加リン酸分解酵素である Rv2613c を標的とした新規抗結核薬の開発を目標に研究を行っている。これまでに、Rv2613c の詳細な機能構造相関解析を行い Rv2613c が特異的な基質結合部位を形成していることを明らかにするとともに、Rv2613c の特異的な基質結合部位と相互作用を行うことによってその活性を阻害する化合物の探索を立体構造情報に基づいたドッキングシミュレーション解析により進めてきた。本年度は、さらにドッキングシミュレーション解析による探索を進め、Rv2613c の特異的な基質結合部位と相互作用を行うことが可能であると予想される化合物を約 40 種類選んだ。阻害活性の測定結果から、4 種類の化合物が Rv2613c の活性を顕著に阻害し、2 種類の化合物が Rv2613c の活性を約 50%の阻害することが示された。さらに、Rv2613c に対する顕著な阻害活性が認められた 4 種類の化合物のうち、2 種類の化合物は Rv2613c 以外の抗酸菌由来 Ap₄A 加リン酸分解酵素の活性も顕著に阻害する一方で、*Saccharomyces cerevisiae* 由来 Ap₄A 加リン酸分解酵素の活性はほとんど阻害しないことが示された。従って、この 2 種類の化合物は結核菌や非結核性抗酸菌に特異的に殺菌活性を示す新規抗結核薬のリード化合物として有望であると考えられた。

A. 研究目的

多剤耐性結核菌や *Mycobacterium avium* に代表される非結核性抗酸菌が引き起こす難治性の感染症が大きな問題となっているにもかかわらず、有効な治療薬がほとんど存在しないことから、新たな治療法、特に新規抗結核薬の開発が臨床現場では強く求められている。現在、いくつかの新規抗結核薬の開発が進められているものの、それらの多くは既存の抗菌薬の構造類縁体であることから、薬剤耐性菌の早期出現や交差耐性等が懸念されている。そのため、新し

い作用機序をもつ新規抗結核薬の開発が重要な課題となっている。特に、結核菌や非結核性抗酸菌にのみ特異的に殺菌活性を示す新規抗結核薬が求められている。そこで本研究課題では、新規抗結核薬の標的となる結核菌由来タンパク質を選び、その詳細な機能と構造の相関を明らかにするとともに、相関解析結果に基づいて新規抗結核薬のドラッグデザインを行うことを目的としている。

これまでに、新規抗結核薬の標的候補として結核菌由来新規 diadenosine

tetraphosphate (Ap₄A) 加リン酸分解酵素 (Rv2613c) を選び、その詳細な機能と立体構造を明らかにしてきた (Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. 2010. *Protein Expr. Purif.*, 69:99–105., Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. 2010. *Acta Crystallogr.*, F66:279–281.). その結果、Rv2613c は他の類似酵素とは異なり、特徴的な 4 量体構造を形成して活性を保持していることが明らかとなった。さらに Rv2613c の機能構造相関解析の結果から、この特徴的な 4 量体構造を利用して Rv2613c は特異的な基質結合部位を形成していることが示された (Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. 2011. *J. Mol. Biol.*, 410:93–104.). これらの結果より、Rv2613c の特異的な基質結合部位と相互作用を行うことによって Rv2613c の活性を阻害する新規化合物をデザインすることが可能であると考えられた。Rv2613c は、遺伝子破壊株を用いた研究や *in silico* 解析の結果より新規抗結核薬の有力な標的候補の 1 つとして考えられていることから、Rv2613c の活性を阻害する新規化合物を見出すことは新規抗結核薬の開発につながるものとして期待されている。

そこで本年度は、昨年度から引き続き Rv2613c の立体構造情報に基づいたドッキングシミュレーション解析を行うことにより、Rv2613c の特異的な基質結合部位と相互作用を行うことが可能であると予想される化合物の選定を行うとともに、選ばれた化合物のうち Rv2613c に対して阻害活性を示す化合物の同定を行った。さらに、抗酸菌由来 Ap₄A 加リン酸分解酵素として予想される、*Mycobacterium avium* 由来 MAV_3489、並びに *M. smegmatis* 由来 MSMEG_2932 の発現と精製を行い、その活性を確認するとともに、Rv2613c の活性を阻害する化合物を用いて MAV_3489、並びに MSMEG_2932 に対する阻害活性の測定も行った。また同様に、Rv2613c の活性を阻害する化合物を用いて、昨年度までに Ap₄A 加リン酸分解酵素であることを明らかにした *Saccharomyces*

cerevisiae 由来 APA1 に対する阻害活性の測定も行った。

これらの研究を通じて、結核菌や非結核性抗酸菌に特異的に殺菌活性を示す新規抗結核薬のリード化合物の同定を試みた。

B. 研究方法

1. Rv2613c の特異的な基質結合部位と相互作用することが予想される化合物の探索

Rv2613c の特異的な基質結合部位と相互作用を行うことによってその活性を阻害する化合物の探索は、本研究課題で決定した Rv2613c の立体構造情報に基づいたドッキングシミュレーション解析により行った。ドッキングシミュレーション解析には、統合計算化学システム (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group)、並びに分子シミュレーションシステム (MFPresto) を用いた。ドッキングシミュレーション解析に使用した化合物データベースは、LigandBox データベース (<http://ligandbox.protein.osaka-u.ac.jp/ligandbox/cgi-bin/index.cgi?LANG=en>) から入手した。

2. *M. avium*、並びに *M. smegmatis* 由来 Ap₄A 加リン酸分解酵素の発現と精製

一次構造情報等から、Rv2613c と同様に Ap₄A 加リン酸分解であることが予想された、*M. avium* 由来 MAV_3489、並びに *M. smegmatis* 由来 MSMEG_2932 をコードする遺伝子をクローニングし、発現用ベクター pColdI にそれぞれ組み込み、大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株を宿主とした大量発現株を構築した。低温条件下で培養液中に 0.5 mM の IPTG を加えることによって、発現の誘導を行った。発現を誘導した菌体をそれぞれ集菌した後、超音波破碎と超遠心操作により、細胞抽出画分を得た。それぞれの細胞抽出画分から 2 種類のカラムクロマトグラフィーにより SAD-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行った。精製した MAV_3489、並びに MSMEG_2932 の酵素活性は、これまでに報告した方法 (Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa.