

Figure 3. Induction of CD8 positive CTL against TB by HVJ-Envelope/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine, and differentiation of CTL.

cells; (4) We also demonstrated the synergy of the vaccines, e.g., synergistic effect on the in vitro CTL induction was shown by the combination of Ksp37 and granulysin DNA vaccines.

These data indicate that all of our novel vaccines are able to induce the TB-specific CTL effectively and the combination regimen of those vaccines might provide the new strategy to get very strong protective and therapeutic efficacy against TB.

Discussion

In the present study, we studied the CTL differentiation against TB induced by the administration of novel vaccines (HSP65+IL-12/HVJ-E DNA vaccine, granulysin vaccine and Ksp37 vaccine). We found (1) 15K granulysin functions as a cytotoxic T cell differentiation factor (CTL differentiation factor). The therapeutic efficacy of 15K granulysin vaccine might be mediated by the induction CTL; (2) Ksp37 also acts as a CTL differentiation factor in mice; (3) Ksp37 vaccine induces the production of IL-2, IFN- γ and IL-6 from murine T cells and spleen cells; (4) Synergistic effect on the in vitro CTL induction is expected by the combination of Ksp37 vaccine and granulysin vaccine.

On the other hand, it was demonstrated that HSP65 +IL-12/HVJ-E DNA vaccine (HSP65 vaccine) has a prophylactic efficacy against TB and that the induction of CTL specific for TB is important for the efficacy of the vaccine. By using CD8 antibody and CD4 antibody we found CD8 positive CTL and CD4 positive T cell were required for the protective efficacy of HSP65 vaccine in vitro and in vivo. In contrast, BCG vaccine induced a little or no CTL against TB.

Table 2. The in vivo necessity CD8 positive T cells and CD4 positive T cells for prophylactic efficacy of the HVJ-Envelope/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine

	Vaccination			Antibody	Log ₁₀ CFU of TB in the lung
	1st	2nd	3rd		
G1	-	-	-	-	6.6 ± 0.3
G2	BCG	DNA	DNA	-	5.3 ± 0.3
G3	BCG	DNA	DNA	α CD8 Ab	5.9 ± 0.1
G4	BCG	DNA	DNA	α CD4 Ab	7.1 ± 0.5
G5	BCG	DNA	DNA	α CD8 Ab+ α CD4 Ab	8.4 ± 0.2

*p < 0.05 G2vsG3, G4; **p < 0.01. G2vsG5, Anti-CD8 antibody and/or Anti-CD4 antibody were injected i.p. every 5 d after the challenge of TB. BCG was used as a prime vaccine and the DNA vaccine was immunized twice (HVJ-Envelope/HSP65 DNA 50 μ g + IL-12 DNA 50 μ g) as boost vaccine. Four weeks after last immunization, 5 × 10⁵ H37Rv were challenged i.v. into mice. (G2-G3: p < 0.05); (G2-G4: p < 0.05); (G2-G5: p < 0.01).

There are increasing evidences which indicate the importance of cytotoxic cells.^{3,4} Their role in immunity to TB has been revealed by using knockout mice lacking a gene or genes related to major histocompatibility complex (MHC) class I (e.g., transporter associated with antigen processing-1, CD8, 2m, and MHC class I heavy chain). These genes are involved in the antigen presentation via MHC class I, by cell-transfer experiments and by depletion of CD8⁺ CTLs with antibodies. CD8⁺ CTLs play a major role in the control of the latent TB.^{1,4,6}

The CTLs other than CD8⁺ cells might be even more important in humans. It has been reported that there are additional effector modalities, such as granulysin, that are able to kill *M.*

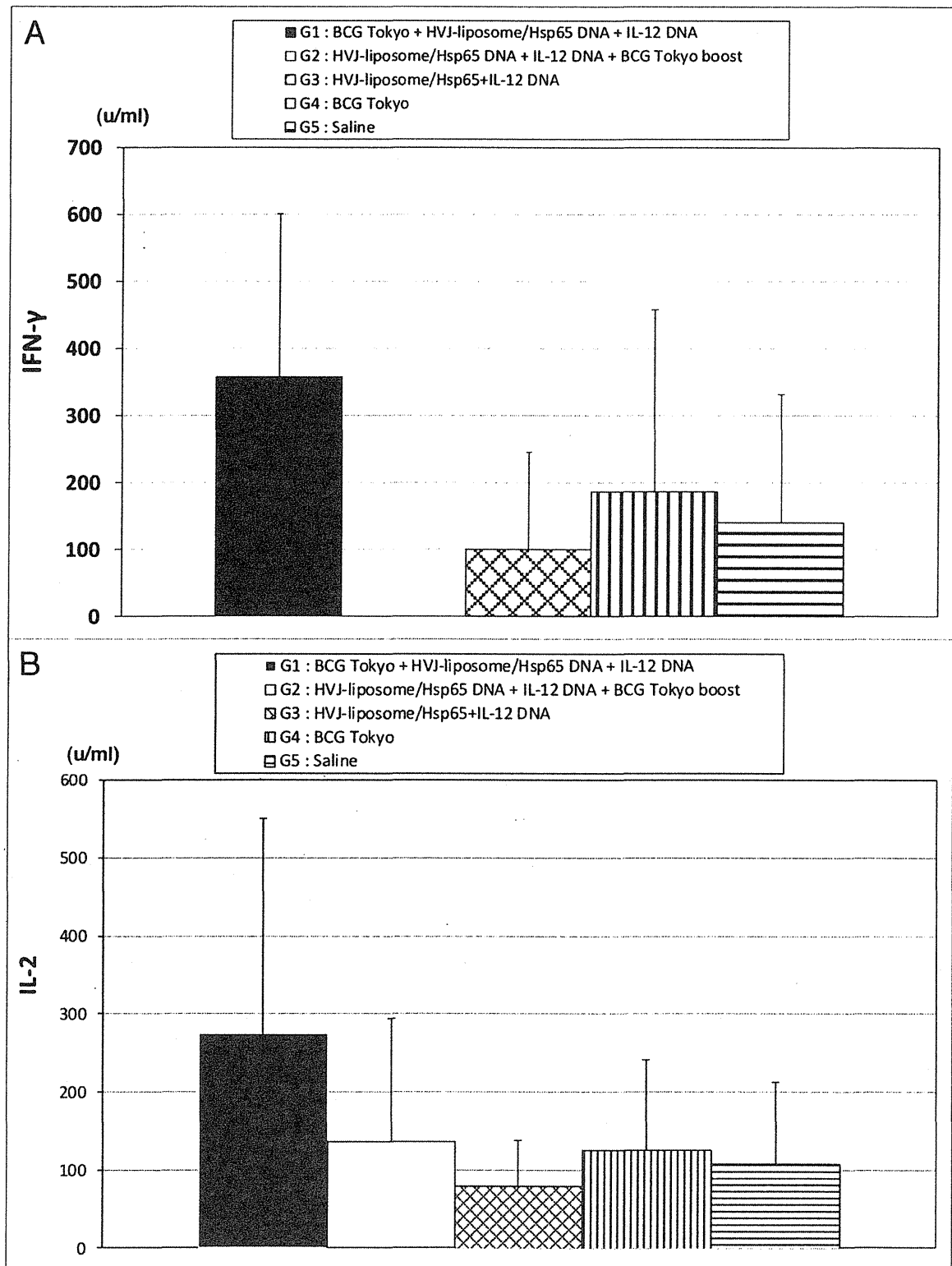


Figure 4. IFN- γ and IL-2 production efficacy of HSP65+IL-12/HVJ and BCG using prime-boost method against TB challenged cynomolgus monkeys. Group of animals were vaccinated three times (every three weeks) with (1^o) BCG Tokyo, (2^o) HSP65 +IL-12/HVJ, (3^o) HSP65+IL-12/HVJ = G1(■) BCG prime-HVJ/DNA boost group; (1^o) HSP65+IL-12/HVJ, (2^o) HSP65 +IL-12/HVJ, (3^o) BCG = G2(□) HVJ/DNA prime-BCG boost group; (1^o) HSP65+IL-12/HVJ, (2^o) HSP65 +IL-12/HVJ, (3^o) HSP65+IL-12/HVJ = G3(▨); (1) BCG, (2^o) saline, (3^o) saline = G4(▩) G4 group animals were vaccinated with BCG once.; (1^o) saline, (2^o) saline, (3^o) saline = G5(▪). (A) PBL from vaccinated monkeys on 56 d or 112 d after 1st immunization, were cultured for three days. IFN- γ activity on 56 d and IL-2 activity (B) on 112 days were assessed by ELISA.

tuberculosis.¹² Lymphocyte subsets that recognize antigens presented by molecules other than MHC class I were also reported to be involved in the immunity against TB. In addition to MHC class I molecule, these lymphocytes are able to utilize HLA-E or group I CD1 molecules (CD1a, CD1b, etc.) for the recognition of antigens.^{6,13,14}

The precise function of 15K granulysin has not yet been elucidated.¹⁵ We found that 15K granulysin was secreted from CD8 positive CTL and entered into human macrophages followed by the killing of *M. tuberculosis* in the cytoplasm.^{10,11} The expression levels of 15K granulysin protein and mRNA in CD8 positive T cells of the patients with drug sensitive TB were lower than that of the healthy volunteers. Among the TB patients, the expression level of 15K granulysin protein in CD8 positive T cells of the patients with multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) was significantly lower than that in the patients with drug-sensitive TB. The expressions of 15K granulysin after the stimulation with PHA-P, ConA, alloantigens or PPD antigens were significantly suppressed in the supernatants of PBL from MDR-TB patients.^{10,11} We have currently established 15K granulysin transgenic mice and 9K granulysin transgenic mice.¹¹ It was demonstrated that 15K granulysin transgenic mice as well as 9K granulysin transgenic mice were resistant to TB infection. The number of TB (C.F.U. in tissues) was decreased in those transgenic mice. As to the induction of anti-TB immunity, differentiation and proliferation of TB-specific CTL was augmented in those transgenic mice. In addition, enhanced production of cytokines was observed.

In the present study, we demonstrated that 15K granulysin has function as a CTL differentiation factor. Granulysin (15K) augmented the differentiation of CTL from precursor CTL into effector CTL. It has been reported that 15K granulysin is produced from effector CTL. Thus, it is suggested that the production of 15K granulysin is regulated by positive feedback loop system. Large amount of granulysin might enhance the induction of CTL resulting in the increase of the therapeutic efficacy. Recently, it was reported that 15K granulysin activated antigen-presenting cells (APC, dendritic cells or macrophages) and augmented the production of several cytokines.^{16,17} Therefore, 15K granulysin is able to activate the immune system effectively, since the target cell of it is both APC and CTL.

Vaccination with BCG prime-HSP65 + IL-12/HVJ boost showed better protective efficacy than BCG alone on the basis of the ESR, chest X-ray findings and immune responses. Importantly, treatment with HSP65 + IL-12/HVJ resulted in an increased survival for over a year.⁵

Significantly higher levels of cytokine production from PBL (IFN- γ and IL-2) were observed in prime (BCG)-boost (HSP65 vaccine) group than those in BCG vaccine group. Prime-boost method was reported in the study of MVA85A vaccine, which is a modified vaccine virus Ankara (MVA) strain expressing antigen 85A. In phase I clinical studies, this vaccine has induced high immune responses in previously BCG-vaccinated individuals.¹⁸ Boosting of BCG vaccination with MVA85A reduced the expression of immunoregulatory cytokine TGF- β .¹⁹ Aeras-402 DNA (DNA that expressed 85A, 85B and TB10.4) vaccine is a

Table 3. IL-2 production from PBL in the cynomolgus monkeys

(A)	(monkeys) Responder cell	H37Ra Ag	IL-2 (u/ml)
	vaccine-treated	(-)	2 \pm 3
	control	(-)	0 \pm 0
	vaccine-treated	(+)	13 \pm 4
	control	(+)	3 \pm 5

(B)	G4 (saline control)	IL-2 production (U/ml) (HSP65 stimulation)		Survival
	ID of monkeys	Baseline	Day53 Post-challenge	
	PR 6847 D	0.0	21.1	Survival
	PR 8018 B	0.0	43.2	Survival
	PR 5368 B	0.0	43.2	Survival
	PR PbB2-4F	0.0	0.0	Death (after 41 d)
	PrZ-51 AC	0.0	0.0	Death (after 55 d)

(A) Augmentation of IL-2 production from PBL by H37Ra stimulation in the monkeys treated with HVJ-Envelope/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine. (B) IL-2 production from PBL in the survived monkeys and the non-survived monkeys. PBL from monkeys on day 53 after TB challenge were stimulated with HSP65 protein for 3 d. ID (PR PbB2-4F) monkey and ID (PrZ-51 AC) were died after 41 d and 55 d, respectively.

Table 4. In vitro and in vivo CTL induction by 15K granulysin

	15K Granulysin	% Specific Cytotoxicity		
(A)	In vitro (5day MLC)			
	-	8.0	\pm	1.0
	+	23.0	\pm	0.5
(B)	In vivo CTL			
	spleen			
	-	1.0	\pm	0.2
	+	11.0	\pm	0.3
	LN			
	-	7.2	\pm	2.5
	+	22.5	\pm	2.8
	PEC			
	-	0.5	\pm	2.0
	+	28.5	\pm	1.0

(A) In vitro induction of human cytotoxic T cell by the stimulation with recombinant 15K granulysin protein. T cells from human PBL were obtained by nylon-wool column method. An amount of 1×10^6 T cells were cultured with CESS_{MHC} cells (Mitomycin C treated CESS tumor cells) in the presence of 15K granulysin for five days. CTL activity of effector cells was assayed using ⁵¹Cr-labelled CESS cells. Results are expressed as % Specific cytotoxicity \pm S.D. (B) In vivo induction of CTL by 15K granulysin. C57BL/6 were injected i.p. with 1×10^7 syngeneic FBL-3 tumor cells and then treated with recombinant 15K granulysin i.p. (5 μ g/mouse) six times. Twenty-one days after FBL-3 inoculation, mice were sacrificed, and spleen cells, lymph node (LN) cells and peritoneal exudates cells (PEC) were used as effector cells for CTL. Cytotoxic activity against FBL-3 cells were assessed using ⁵¹Cr release method.

recombinant adenovirus vector-based vaccine and expected as a boosting vaccine for BCG-primed individuals.⁶ Several other vaccines use a prime-boost strategy to enhance the immune responses.²⁰ Recently, Rahman et al. established a plasmid-based

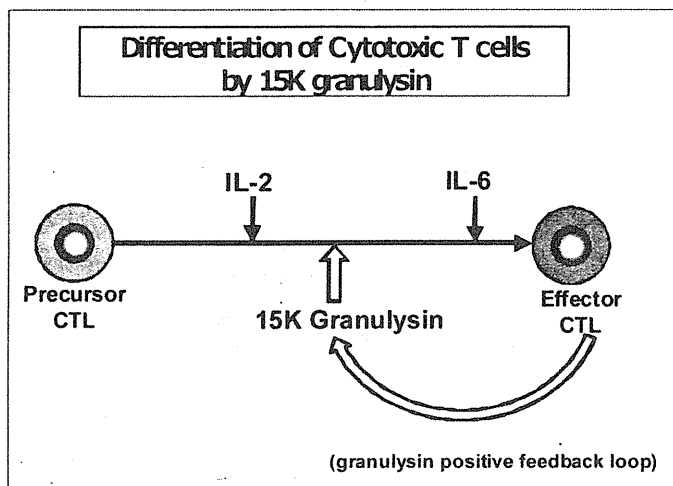


Figure 5. Differentiation of CTL by 15K granulysin and positive feedback loop of 15K granulysin in CTL induction. Precursor CTL are activated by IL-2 in the early stage of CTL induction of five day MLC. On the other hand, IL-6 acts, as a cytotoxic T cell differentiation factor, on the late stage of CTL induction as shown by Okada, et al. (J.I. 1988). 15K granulysin is produced from effector CTL, and induced the differentiation of CTL as a CTL differentiation factor. (Positive feedback loop by 15K granulysin).

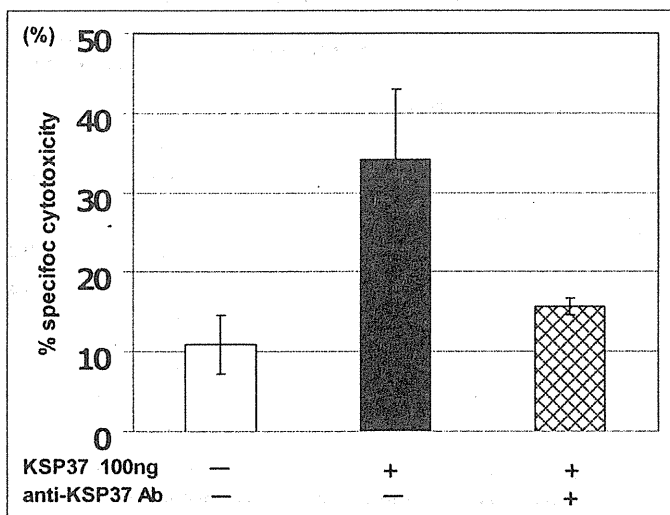


Figure 6. Induction of CTL differentiation by killer-specific secretory protein of 37 Kd (Ksp37). Splenic T cell from C57BL/6 mice (H-2^b) were obtained as described in (PNAS Okada et al. 1981), and cultured with uv-treated BALB/c (H-2^d) spleen cells (Mitomycin C treated) in the presence of 100 ng/ml rKsp37 and/or an anti-Ksp37 antibody for 5 d. CTL activity against P815 tumor cells (H-2^d) was assessed by using ⁵¹Cr assay.

vaccine (rBCG/rAd35 vaccine) which enhanced the activation of MHC class I-restricted CD8⁺ cytotoxic T cell. It is a recombinant BCG (rBCG) expressing a pore-forming toxin and TB antigens (Ag85A, 85B and TB10.4). A non-replicating adenovirus35 encoding the same TB antigens (rAd35) is used as a boost vaccine. The prime-boost method using rBCG and rAd35 vaccines were evaluated in nonhuman primate model.²¹ Similar to

our BCG prime- HSP65 + IL-12 DNA boost method, the results suggested that activation of CD8⁺ effector CTL followed by the production of granulysin at the local site were involved in the protective effects of this vaccine (prime-boost). Thus, induction of TB-specific CTL and the augmentation of the cytokine production (IFN- γ , IL-2) might be a critical factor to obtain the prophylactic efficacy.

Furthermore, we established other vaccines (granulysin vaccine and Ksp37 vaccine) which induced the differentiation of CTL against TB. The granulysin secreted from T cells and NK cells has a therapeutic effect against TB.

On the other hand, Ksp37 is expressed selectively in the effector subset of CD8⁺T cells, CD16⁺ NK cells and γ/δ T cells.²² Expression of Ksp37 mRNA was closely correlated with good prognosis of ovarian cancer and gliomas.²³ However, immunological function(s) of Ksp37 is still unclear. Ksp37 showed anti-TB effects by the induction of CTL in the present study. We demonstrated that Ksp37 vaccine also induced murine CTL both in vitro and in vivo. Ksp37 vaccine augmented the production of IL-2, IFN- γ and IL-6 from murine T cells and spleen cells. Synergistic effect on the in vitro CTL induction was observed by the combination of Ksp37 and granulysin vaccines. We also demonstrated the correlation between the activity of CTL induction/cytokine production and the efficacy of these vaccines in the mouse and monkey models.

In conclusion, our data might provide novel strategy to obtain strong protective and therapeutic efficacy. The important factors are the induction of CTL and production of several kinds of cytokines. In addition, the combination of several kinds of vaccines will enhance the efficacy of vaccines, which will be necessary for the vaccine for the severe TBs such as MDR-TB and XDR-TB. Similar to the treatment of cancers or infectious diseases, the regimen of combination therapy will provide useful rationale that is necessary to develop more effective vaccines against TB.

Materials and Methods

Bacteria. *M. tuberculosis* strains H37Rv and *M. bovis* BCG Tokyo, were kindly provided by Dr. I. Sugawara (JATA, Tokyo, Japan). *M. bovis* BCG Tokyo was maintained in synthetic Sauton's medium (Wako Chemicals, Osaka, Japan).¹

Animals. Inbred and specific pathogen-free female BALB/c mice and DBA/1 mice were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan). Mice were maintained in isolator cages, manipulated in laminar flow hoods, and used between 8 and 10 weeks of age as described previously.¹

Plasmid construction. The *HSP65* gene was amplified from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA, and cloned into pcDNA3.1 (+) (Invitrogen, San Diego, CA) to generate pcDNA-hsp65 (designated as HSP65 DNA) as described previously.¹ The *HSP65* gene was fused with mouse Ig κ secretion signal sequence, and pcDNA-Ig κ hsp65 was generated. For construction of the mouse IL-12 (mIL-12) p40 and p35 single-chain genes, *mIL12p35* and *mIL12p40* genes were cloned from pcDNA-p40p35,¹ fused and cloned into pcDNA3.1 (+) to generate pcDNA-mIL12p40p35-F (designated as mIL-12 DNA).

HVJ-E vaccination. HVJ-E was prepared as described previously.¹ The HVJ-E complex was aliquoted and stored at -70°C until use. DNA vaccines encoding *M. tuberculosis* HSP65 and IL-12 were encapsulated into HVJ-Envelope or HVJ-liposomes.²⁴ HVJ-liposomes and HVJ-Envelope were prepared as described previously.²⁵⁻²⁹ Groups of BALB/c mice were vaccinated 3 times at 3-week intervals with 100 μL of HVJ-E solution containing 50 μg of pcDNA-IgHSP65 and 50 μg of mL12 DNA.

Challenge infection of vaccinated animals and bacterial load determination. Mice were challenged by the intravenous route with 5×10^5 CFU of *M. tuberculosis* H37Rv 4 weeks after the third vaccination as described previously.¹

Methods for the evaluation of the prophylactic efficacy of the vaccine on the TB infection of the monkeys. Cynomolgus monkeys were housed in a BSL 3 animal facility of the Leonard Wood Memorial Research Center. The animals were vaccinated three times with the HVJ-envelope with expression plasmid of both HSP65 and human IL-12 (HSP65 + hIL-12/HVJ: 400 μg i.m.), and then challenged with the *M. tuberculosis* Erdman strain (5×10^2) by intratracheal instillation. Survival, immune responses (proliferation of PBL and cytokines production), body weight, ESR, PPD skin test and chest X-p findings were examined as described in our previous studies.^{5,6,8,9} All animal experiments were approved by the Leonard Wood Memorial Animal Care and Use Committee and the National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center Animal Care and Use Committee.

Methods for the evaluation of the therapeutic efficacy of the vaccine on the *M. tuberculosis*-infected monkeys. Cynomolgus monkeys were vaccinated nine times with the HVJ-envelope with expression plasmid of both HSP65 and human IL-12 (HSP65 + hIL-12/HVJ: 400 μg i.m.), one week after the challenge with the *M. tuberculosis* Erdman strain (5×10^2) by intratracheal instillation. Immune responses and survival were examined as described in our previous studies.^{5,8,9}

Reagents and antibodies. Fetal calf serum (FCS: lot AGC6341) was obtained from Hyclone (Logan, UT). Anti-L3T4, anti-Lyt2.2 monoclonal antibodies and anti-Thy1.2-antibody were provided.^{1,2}

Cell lines. A mouse mastocytoma cell line (P815: DBA/2 origin) was kindly provided by Dr. C. S. Henney (Fred Hutchinson Cancer Res. Center, Seattle).¹ The P815 cells were maintained in RPMI 1640 medium (Flow Laboratories, Inc. Mclean, VA) supplemented with 10% FCS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol.^{1,2}

Tuberculosis-specific cytotoxic test using ^{51}Cr release. Eight weeks after the final vaccination, CTL activity of spleen cells and mesenteric lymph node cells from vaccinated mice was assessed by using the ^{51}Cr -release assay. P815 mastocytoma cells, which have the same major histocompatibility complex (MHC) (H-2^d) as BALB/c mice, were transfected with pcDNA-hsp65 and used as HSP65 protein-expressing target cells. A total of 2×10^6 cells/ml effector splenic cells were treated with anti-CD8 antibody, anti-CD4 antibody or anti-Thy1.2 antibody followed by complement.¹ ^{51}Cr release was assessed using the ^{51}Cr -release assay^{10,30-34} at the Effector:Target (E:T) ratio of 50:1. Spontaneous lysis

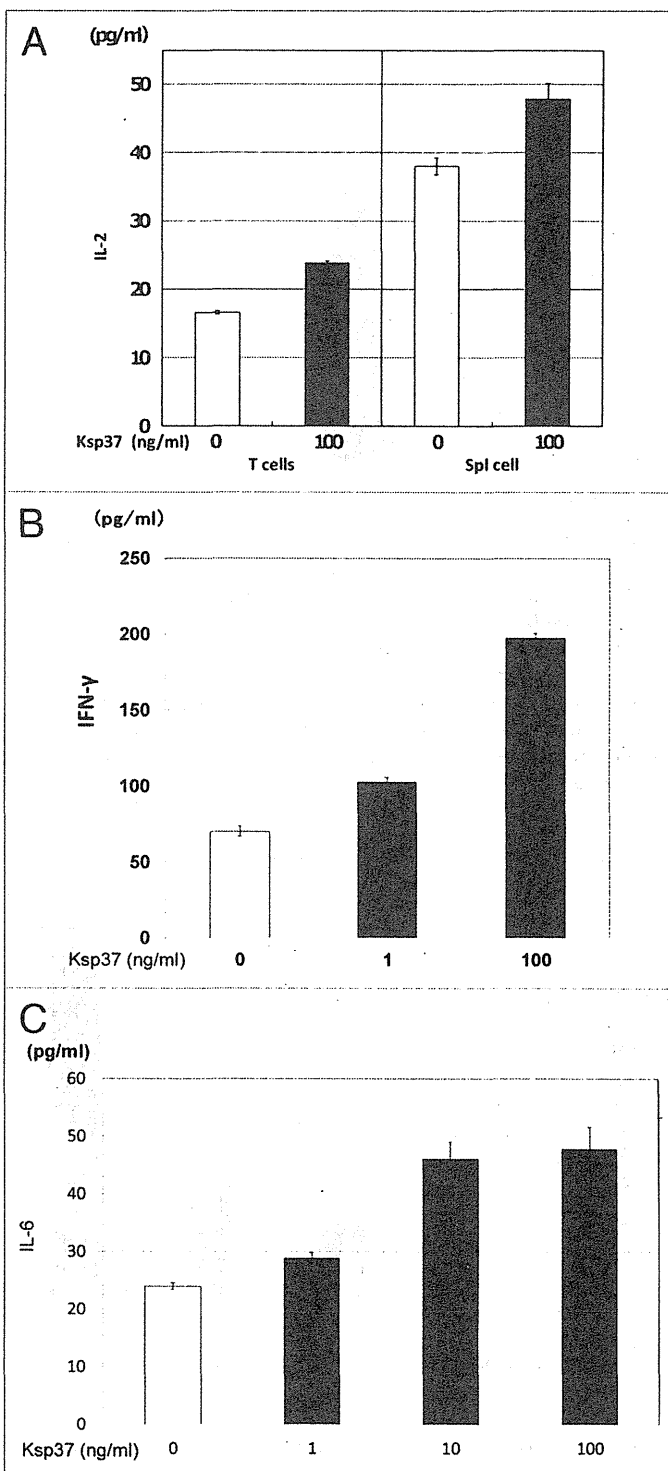


Figure 7. Augmentation of cytokines (IL-2, IFN- γ and IL-6) production by Ksp37 was also observed. (A) Augmentation of IL-2 production from T cells or spleen cells by Ksp37. An amount of 5×10^6 splenic T cells or spleen cells from C57BL/6 mice were cultured with 5×10^5 BALB/c spleen cells (Mitomycin-C treated) in the presence of rKsp37 for two days. IL-2, IFN- γ and IL-6 activities in the supernatants were assessed by ELISA. (B) Augmentation of IFN- γ production from spleen cells by Ksp37. (C) Augmentation of IL-6 production from spleen cells by Ksp37.

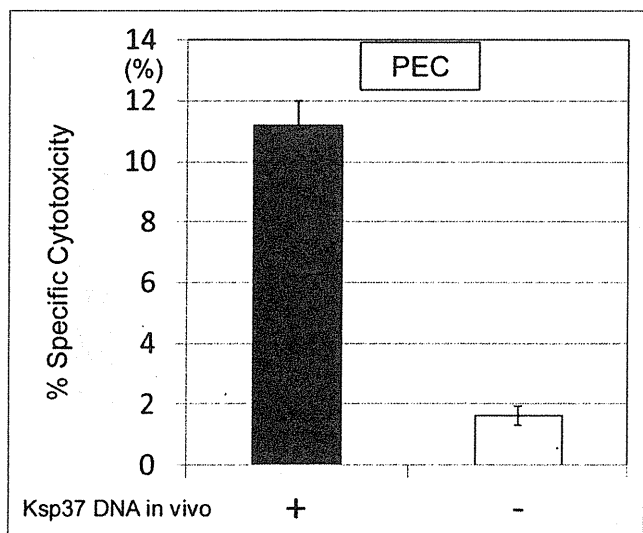


Figure 8. Augmentation of CTL differentiation in vivo by the treatment with Ksp37 DNA was demonstrated. C57BL/six mice were challenged with killed H37Ra antigen (1,000 μ g/mouse) in vivo (i.p.) and then treated with Ksp37 DNA (100 μ g/mouse, six times) i.m. Twenty-one days after challenge of killed TB antigen, and PEC (peritoneal exudate cells) from these mice were harvested. CTL activity against TB antigen (HSP65 antigen) was assessed by using ^{51}Cr EL-4 which had been transfected with HSP65 DNA.

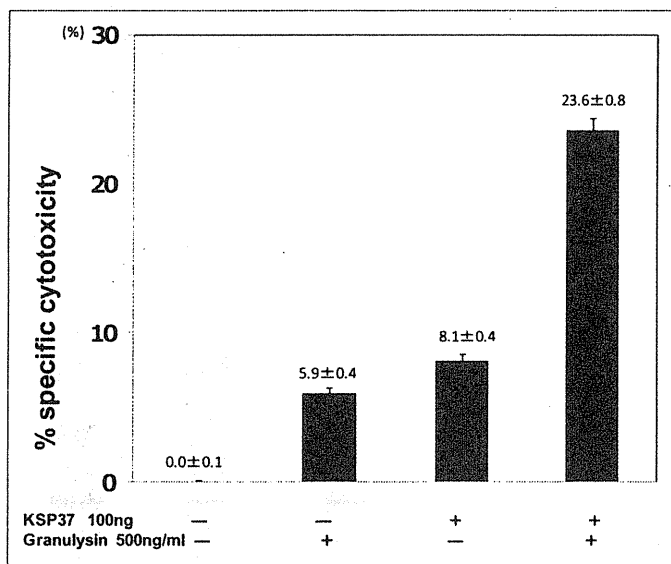


Figure 9. Synergistic efficacy of Ksp37 and granulysin on the in vitro CTL induction. Splenic T cells were cultured with uv-treated BALB/c spleen cells (Mytomycin C treated) in the presence or absence of 100ng/ml Ksp37 protein and 500ng/ml 15K granulysin protein for 5 d. Five days after culture, CTL activity against P815 tumor cells was assessed by using ^{51}Cr release assay.

(with medium alone) and maximum lysis (^{51}Cr release after three cycles of freeze-thaw) were set up for background and targets. Percent specific lysis was determined as: $[(\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})] \times 100$.³⁰⁻³⁴

Production of cytokines (IL-2 and IFN- γ). Mouse cytokines were measured in quantitative ELISAs for IL-2 and IFN- γ as described previously.^{1,2}

ELISPOT assay. The spleens were removed aseptically from vaccinated mice 3 weeks after the third vaccination. Antigen-specific IFN- γ -producing cells were determined by enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) as described previously.^{1,2}

Statistical analysis. Tukey-Kramer's HSD tests were used to compare \log_{10} value of CFU between groups following challenge and T cell responses between groups in ELISPOT assay. Student's t-tests were performed to compare T cell responses between groups in T cell proliferation assay and granuloma formation between groups following challenge. A *P*-value of < 0.05 was considered significant.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This study was supported by a Health and Labour Science Research Grant from MHLW (H17-shinko-5, H20-Shinko-14, H23-Shinko-2), grants from Osaka Tuberculosis research foundation and Grant-in-Aid for Scientific Research (B) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology Japan.

References

- Yoshida S, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Kanamaru N, Muraki Y, et al. 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* 2006; 24:1191-204; PMID:16216394; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.103>.
- Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, et al. Novel prophylactic vaccine using a prime-boost method and hemagglutinating virus of Japan-envelope against tuberculosis. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011:549281; PMID:21437226; <http://dx.doi.org/10.1155/2011/549281>.
- Boom WH. New TB vaccines: is there a requirement for CD8 T cells? *J Clin Invest* 2007; 117:2092-4; PMID:17671648; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI32933>.
- van Pinxteren LA, Cassidy JP, Smedegaard BH, Agger EM, Andersen P. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells. *Eur J Immunol* 2000; 30:3689-98; PMID:11169412; [http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141\(200012\)30:12<3689::AID-IMMU3689>3.0.CO;2-4](http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141(200012)30:12<3689::AID-IMMU3689>3.0.CO;2-4).
- Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, et al. Evaluation of a novel vaccine (HV)-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine* 2007; 25:2990-3; PMID:17280753; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.014>.
- Okada M, Kita Y. Tuberculosis vaccine development: The development of novel (preclinical) DNA vaccine. *Hum Vaccin* 2010; 6:297-308; PMID:20372079; <http://dx.doi.org/10.4161/hv.6.4.10172>.
- Walsh GP, Tan EV, dela Cruz EC, Abalos RM, Villahermosa LG, Young LJ, et al. The Philippine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med* 1996; 2:430-6; PMID:8597953; <http://dx.doi.org/10.1038/nm0496-430>.
- Kita Y, Tanaka T, Yoshida S, Ohara N, Kaneda Y, Kuwayama S, et al. Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 2005; 23:2132-5; PMID:15755583; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.057>.
- Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, et al. Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis. *Vaccine* 2009; 27:3267-70; PMID:19200841; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.064>.
- Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, et al. Novel therapeutic vaccine: granulysin and new DNA vaccine against Tuberculosis. *Hum Vaccin* 2011; 7(Suppl):60-7; PMID:21546794; <http://dx.doi.org/10.4161/hv.7.0.14563>.
- Kita Y, Okada M, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, et al. Development of therapeutic and prophylactic vaccine against Tuberculosis using monkey and transgenic mice models. *Hum Vaccin* 2011; 7(Suppl):108-14; PMID:21263229; <http://dx.doi.org/10.4161/hv.7.0.14571>.
- Stegelmann F, Bastian M, Swoboda K, Bhat R, Kiessler V, Krensky AM, et al. Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin, and perforin in CD8+ T cells provides a host defense mechanism against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2005; 175:7474-83; PMID:16301655.
- Woodworth JS, Behar SM. *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells and their role in immunity. *Crit Rev Immunol* 2006; 26:317-52; PMID:17073557; <http://dx.doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v26.i4.30>.
- Lewinsohn DM, Zhu L, Madison VJ, Dillon DC, Fling SP, Reed SG, et al. Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells: definition of antigenic specificity. *J Immunol* 2001; 166:439-46; PMID:11123322.
- Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998; 282:121-5; PMID:9756476; <http://dx.doi.org/10.1126/science.282.5386.121>.
- Casriello L, Stroncek DF, Finn MW, Wang E, Marincola FM, Clayberger C, et al. 15 kDa Granulysin versus GM-CSF for monocytes differentiation: analogies and differences at the transcriptomic level. *J Transl Med* 2011; 9:41; PMID:21501511; <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-9-41>.
- Clayberger C, Finn MW, Wang T, Saini R, Wilson C, Barr VA, et al. 15 kDa granulysin causes differentiation of monocytes to dendritic cells but lacks cytotoxic activity. *J Immunol* 2012; 188:6119-26; PMID:22586033; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1200570>.
- McShane H, Pathan AA, Sander CR, Keating SM, Gilbert SC, Huygen K, et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med* 2004; 10:1240-4; PMID:15502839; <http://dx.doi.org/10.1038/nm1128>.
- Fletcher HA, Pathan AA, Berthoud TK, Dunachie SJ, Whelan KT, Alder NC, et al. Boosting BCG vaccination with MVA85A down-regulates the immunoregulatory cytokine TGF-beta1. *Vaccine* 2008; 26:5269-75; PMID:18682270; <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.040>.
- Kaufmann SH, Hussey G, Lambert PH. New vaccines for tuberculosis. *Lancet* 2010; 375:2110-9; PMID:20488515; [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60393-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60393-5).
- Rahman S, Magalhaes I, Rahman J, Ahmed RK, Sizemore DR, Scanga CA, et al. Prime-boost vaccination with rBCG/trAd35 enhances CD8+ cytolytic T-cell responses in lesions from *Mycobacterium tuberculosis*-infected primates. *Mol Med* 2012; 18:647-58; PMID:22396020; <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2011.00222>.
- Ogawa K, Tanaka K, Ishii A, Nakamura Y, Kondo S, Sugamura K, et al. A novel serum protein that is selectively produced by cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* 2001; 166:6404-12; PMID:11342666.
- Elgaaen BV, Haug KB, Wang J, Olstad OK, Fortunati D, Onsrud M, et al. POLD2 and KSP37 (FGFBP2) correlate strongly with histology, stage and outcome in ovarian carcinomas. *PLoS One* 2010; 5:e13837; PMID:21079801; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013837>.
- Saeiki Y, Marsumoto N, Nakano Y, Mori M, Awai K, Kaneda Y. Development and characterization of cationic liposomes conjugated with HVJ (Sendai virus): reciprocal effect of cationic lipid for in vitro and in vivo gene transfer. *Hum Gene Ther* 1997; 8:2133-41; PMID:9414261; <http://dx.doi.org/10.1089/hum.1997.8.17-2133>.
- Kaneda Y, Nakajima T, Nishikawa T, Yamamoto S, Ikegami H, Suzuki N, et al. Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Mol Ther* 2002; 6:219-26; PMID:12161188; <http://dx.doi.org/10.1006/mthe.2002.0647>.
- Kaneda Y. New vector innovation for drug delivery: development of fusigenic non-viral particles. *Curr Drug Targets* 2003; 4:599-602; PMID:14577648; <http://dx.doi.org/10.2174/1389450033490740>.
- Kaneda Y, Yamamoto S, Nakajima T. Development of HVJ envelope vector and its application to gene therapy. *Adv Genet* 2005; 53:307-32; PMID:16240999; [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2660\(05\)53012-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2660(05)53012-8).
- Iro M, Yamamoto S, Nimura K, Hiraoka K, Tamai K, Kaneda Y. Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. *J Gene Med* 2005; 7:1044-52; PMID:15756713; <http://dx.doi.org/10.1002/jgm.753>.
- Mima H, Yamamoto S, Ito M, Tomoshige R, Tabata Y, Tamai K, et al. Targeted chemotherapy against intraperitoneally disseminated colon carcinoma using a carionized gelatin-conjugated HVJ envelope vector. *Mol Cancer Ther* 2006; 5:1021-8; PMID:16648574; <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0352>.
- Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, Yamamura Y, Kishimoto T. Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78:7717-21; PMID:6801660; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.78.12.7717>.
- Tanaka F, Abe M, Akiyoshi T, Nomura T, Sugimachi K, Kishimoto 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; 57:1335-43; PMID:9102222.
- Okada M, Sakaguchi N, Yoshimura N, Hara H, Shimizu K, Yoshida 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; 157:583-90; PMID:6600487; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.157.2.583>.
- Okada M, Klimpel GR, Kuppers RC, Henney CS. The differentiation of cytotoxic T cells in vitro. I. Amplifying factor(s) in the primary response is Lyt 1 + cell dependent. *J Immunol* 1979; 122:2527-33; PMID:156228.
- Okada M, Sakaguchi N, Yoshimura N, Hara H, Shimizu K, Yoshida 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; 157:583-90; PMID:6600487; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.157.2.583>.

結核ワクチン

ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた
新規結核予防ワクチン開発および臨床応用に向けて

喜多 洋子* 岡田 全司**

要 旨

BCG は成人結核予防ワクチンとして無効である。したがって、成人の結核に対して有効な新しい結核予防ワクチン HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンを開発した。プライムブースト法を用い、このワクチンはマウスの系で BCG よりも 1 万倍強力な結核予防ワクチン効果を示した。さらに、ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルでも強力な結核予防効果（生存率改善，赤沈，胸部 X 線，T 細胞免疫増強）を発揮した。他の新結核ワクチンについても言及した。

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、その中から毎年 870 万人（2011 年度）の結核患者が発生し、143 万人が毎年結核で死亡している。結核は世界の三大感染症の 1 つである¹⁻⁴⁾。1999 年、「結核緊急事態宣言」が厚生省より出された。1998 年、米国疾病対策センター（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を開発する必要性を強く主張した。また Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis (ACET) は、国民の健康の大敵である結核撲滅のためには BCG

に代わる有効なワクチンが必要であることを示した。しかしながら、BCG に代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。我々は、BCG よりもはるかに強力な新しい DNA ワクチンやサブユニットワクチン、リコンビナント BCG ワクチンの開発に成功した（表 1）⁵⁻⁸⁾。したがって、新しい抗結核ワクチン開発の現状について、ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた研究を中心に述べる⁶⁾⁷⁾。さらに、近年開発中の結核ワクチン（予防ワクチンおよび治療ワクチンも含む）のヒトへの臨床応用についても述べる。

現行の BCG ワクチンの有用性

大人（成人）結核に対しては、BCG ワクチンは予防効果がないという結論が世界保健機関（WHO）によって報告された。10 万人を超す南インド農民を対象として実施された大規模な比較試験（Chingleput study）では、

* 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

** 同センター長

キーワード：結核予防ワクチン，カニクイザル，
HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン，
生存率改善，細胞傷害性 T 細胞

表1 新しい結核ワクチンにおける動物実験モデルを用いた開発研究

ワクチン	マウス	モルモット	サル	SCID-PBL/hu	ヒト
HVJ-エンベロープ/ HSP65 DNA + IL-12 DNA	BCG ワクチンより 1 万倍 強力な予防ワクチン効果	有効	有効		計画 (第I相, II相)
	治療効果	計画	治療効果	治療効果	
	多剤耐性結核に治療効果 超多剤耐性結核に治療効果	計画	計画		計画 (第I相, II相)
HVJ-リボソーム/ HSP65 DNA + IL-12 DNA	BCG ワクチンより 100 倍 強力な予防ワクチン効果	有効	有効 (100% 生存)		
リコンビナント 72f BCG	予防ワクチン効果 (有効)	有効	有効		

有効性が否定される結果となった¹⁾²⁾ (ただし、小児における結核性髄膜炎や粟粒結核など、播種性のものには十分な予防効果がある)。したがって、成人の結核に対し有効な新しい結核ワクチンの開発が必須である¹⁾²⁾。

新しい結核ワクチン開発

新しい結核ワクチンは、① DNA ワクチン、② サブユニットワクチン、③ リコンビナント BCG ワクチン (弱毒化結核菌を含む)、④ その他に大別される。

1. DNA ワクチン

1) BCG ワクチンより 1 万倍強力な結核予防ワクチン

マウスの結核感染系では、BCG ワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンは極めて少ない。我々は、HSP65 DNA + IL-12 DNA (HVJ ベクター) のワクチンは、BCG ワクチンよりも 1 万倍強力な結核予防ワクチンであることを世界に先駆けて明らかにした。結核菌 H37Rv 由来の HSP65 DNA および IL-12 DNA をプラスミドに導入し、さらに HVJ ベクターに導入してワクチンとした

(図1)。

この HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンと BCG でマウスを免疫し結核菌を投与すると、マウス肺の結核菌数が BCG ワクチン単独投与群の 1/10,000 以下となった (これを 1 万倍強力と言う：図2)。肺病理像では、ワクチン投与群で結核病巣の著明な改善効果が認められた (図3)⁹⁾。

さらに、結核菌に対する CD8⁺ 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の分化誘導を増強した⁹⁾¹⁰⁾。この強力なワクチン効果と CTL 活性が相関した。また Th1 細胞の分化誘導、IFN γ 産生の増強をこのワクチンが発揮することも明らかにした (図4, 5)⁹⁾。

こ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 の Working Group on New TB Drugs (WGND) のメンバーに岡田が選出された。

2) HVJ-エンベロープの強力なアジュバント作用

Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ) を不活化した不活性化センダイウイルス粒子を、HVJ-エンベロープとして用いた。この

図1 HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン

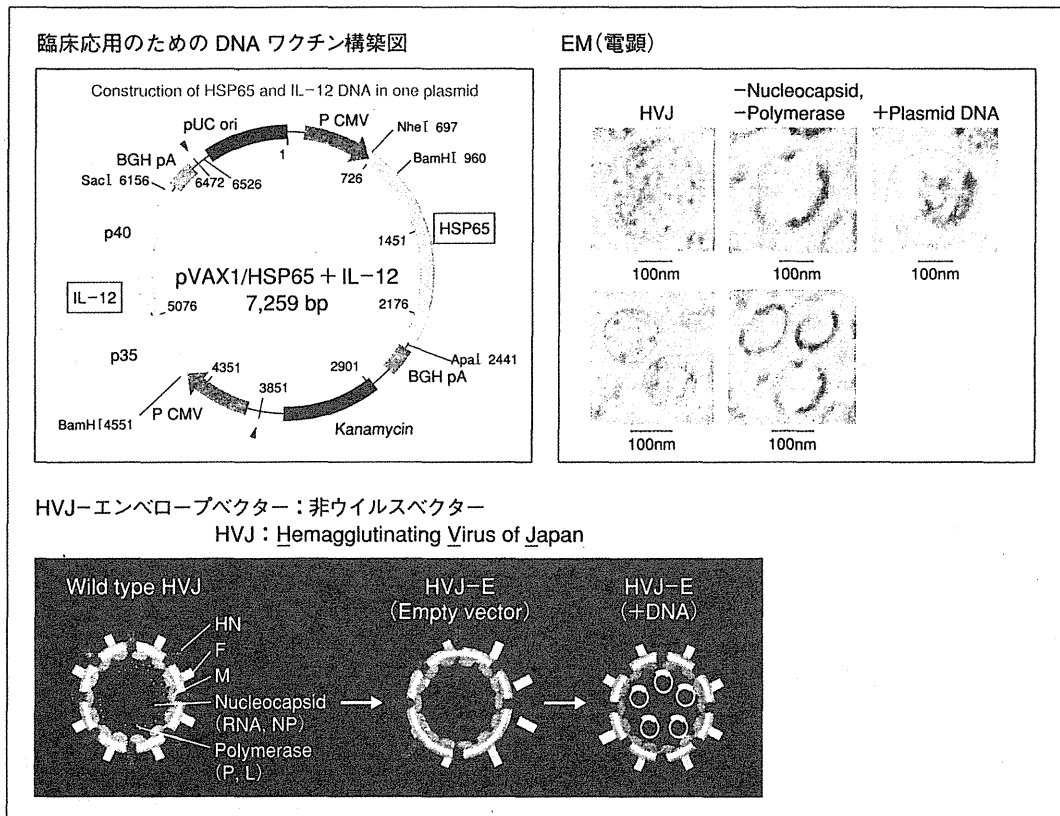
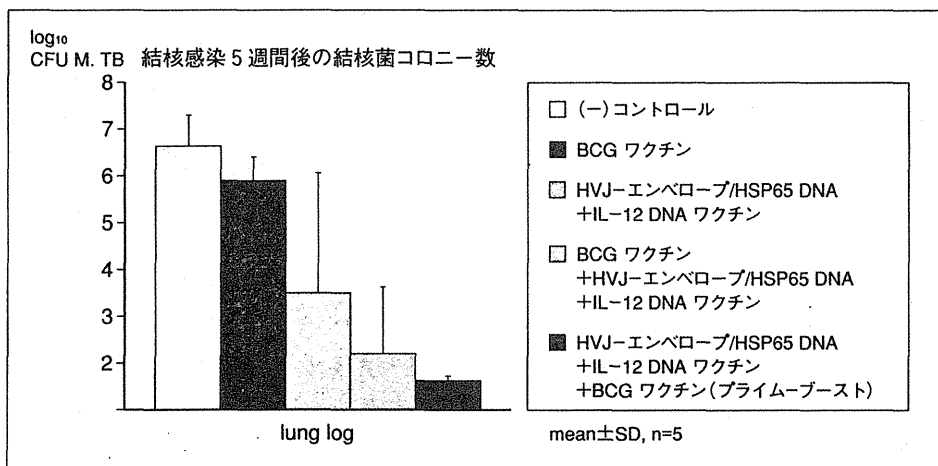


図2 マウスの結核感染モデルを用いた HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン (BCG より 1 万倍強力な)



HVJ-エンベロープに、pVAX-HSP65 DNA + IL-12 DNA を封入した (図1)。

この HVJ-エンベロープは、① 1 本鎖

RNA が RIG-I 受容体を介して強力な自然免疫を誘導する。② また、樹状細胞を活性化して IFNβ の産生を誘導し、③ NK 細胞の

図3 ワクチン投与した結核感染マウスの肺病理像

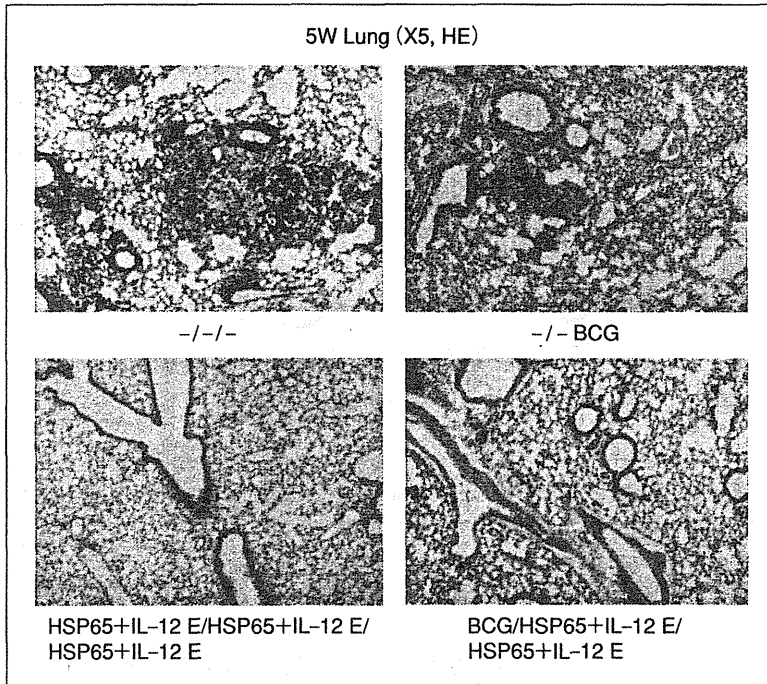
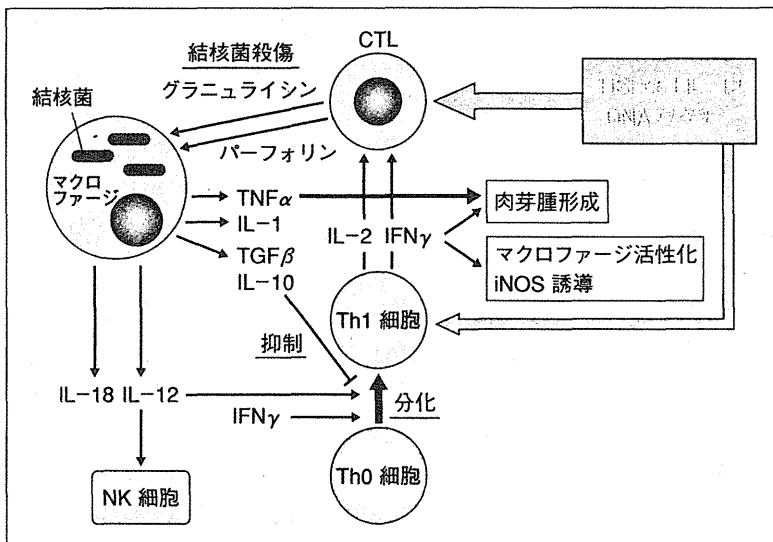


図4 HSP65 + IL-12 DNA ワクチンは CTL 免疫とヘルパー T 細胞免疫を増強した

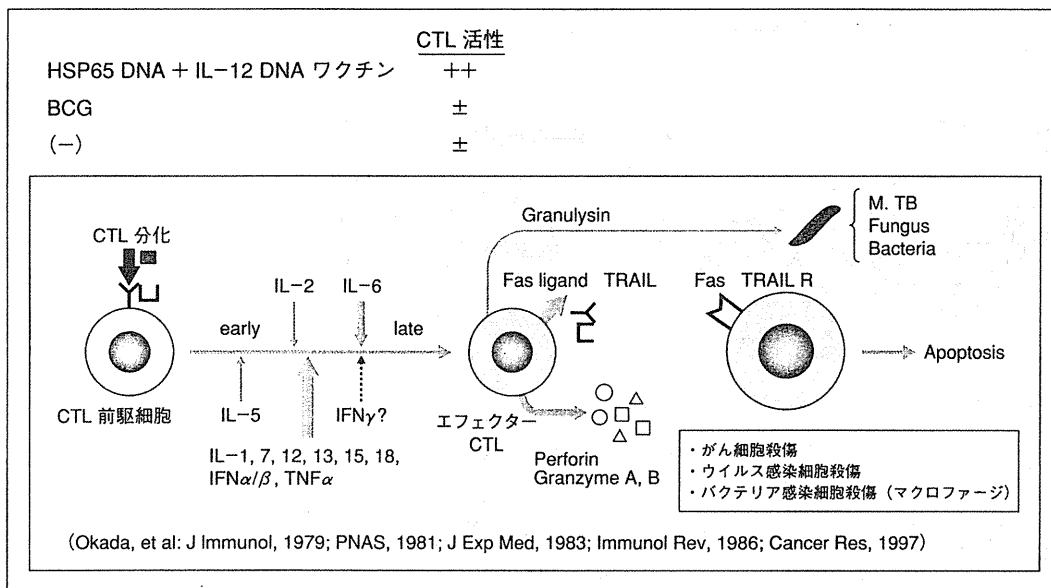


略語：巻末の「今月の略語」参照

活性化，④ IL-6 の産生を誘導する．IL-6 は制御性 T 細胞の誘導を制御する．したがって強力な免疫増強を誘導する¹⁰⁾．

以上の①～④の機序で，HVJ-エンベロープは強力なアジュバント効果を発揮する．

図5 HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン接種マウスの結核菌に対する CD8⁺ CTL の誘導



略語：巻末の「今月の略語」参照

3) DNA ワクチンのベクター

DNA ワクチンのベクターとしては、① gene gun, ② プラスミド, ③ アデノウイルスベクター, ④ HVJ-リポソーム, ⑤ 改良型 HVJ-エンベロープベクターがある⁴⁾.

2. サブユニットワクチン

Reed 博士らは、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が強力な結核予防ワクチン効果を示すことをマウスで明らかにした¹²⁾. Ag85B-ESAT6 サブユニットワクチンのマウスでのワクチン効果の報告もある.

3. リコンビナント BCG ワクチン

BCG 東京株に種々の遺伝子を導入し、リコンビナント BCG を作製した.

サブユニットワクチン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 (rBCG) の作製に成功した. この 72f rBCG ワクチン

は、サルでも結核予防効果を示した¹¹⁾.

結核ワクチンの臨床応用への展望

1. Stop TB Partnership

Stop TB Partnership (WHO) は 2012 年に、現在進行中でしかも臨床応用に有望な新しい結核ワクチン開発のリストを発表した (表 2)⁹⁾. 我々の HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンも候補の 1 つとしてその中に推奨されている (主だったものを表 2 に示した).

また WHO は、2006~2015 年に Global Plan to Stop TB として新しい有効な結核ワクチン開発、2050 年までに結核撲滅を目標としている.

2. 結核ワクチンの臨床応用の可能性

1) 新しい結核ワクチンの臨床応用

カニクイザル (cynomolgus monkey, 最もヒトの肺結核に近いモデル¹³⁾) を用い、BCG よりもはるかに強力な予防ワクチン効果 (生

表2 臨床応用に有望な新結核ワクチン開発リスト (WHO)

結核ワクチン名	ワクチンの種類	グループ名
① HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA	DNA ワクチン	Okada ら
② M72 + AS201	リコンビナントワクチン (第II相試験)	S. Reed, Y. Skeiky 博士
③ MVA85A	弱毒ワクシニアウイルスに Ag85A DNA 導入 (IIb)	H. McShane 博士ら
④ Ag85B-ESAT6 + IC31	リコンビナントワクチン (II)	P. Andersen 博士ら
⑤ Adenovirus35/AERAS-402 (85A, 85B, TB10.4)	アデノウイルスベクターを用いた DNA ワクチン (IIb)	AERAS 社
⑥ VPM1002 (リステリオリシン リコンビナント BCG)	リステリオリシン DNA を BCG に導入した BCG ワクチン (II)	S. Kaufmann 博士ら
⑦ Hybrid56 + IC31 (85B, ESAT6, Rv2660)	潜在性結核感染に発現する Rv2660 抗原を加えたリコンビナントワクチン (I)	P. Andersen 博士ら

存率, 血沈, 体重, 肺の組織) を示すワクチンが開発された⁴⁾⁶⁾⁷⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹⁴⁾. すなわち, 現在最も有力なものとして, HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンが挙げられる (表1, 2)¹⁵⁾. Ag85B-ESAT6 融合タンパク質 (Andersen 博士ら) も報告されている (第I相)¹⁶⁾. 最近, これに潜在性結核菌の発現抗原を加えたワクチンも研究されている¹⁶⁾. 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はなかったという. 72f 融合タンパク質サブユニットワクチン¹⁷⁾, ワクシニアウイルスに 85A DNA を導入したワクチン (MVA85A) は第II相試験. リステリオリシンを組み込んだ rBCG は第I相試験¹⁸⁾. McShane 博士らの MVA85A ワクチンは, アフリカでの第I相臨床試験では 85A タンパク質に対する免疫応答増強が認められた⁴⁾. しかし第II相臨床試験で, BCG ワクチンを接種した南アフリカの小児にこのワクチンをブーストワクチンとして投与した場合, この Ag85A DNA ワクチンの結核予防効果は認められなかった.

このように, いまだに臨床的にヒトの結核予防に有効なワクチンは開発されていない¹⁹⁾.

2) プライム-ブースト法 (乳幼児 BCG-成人 HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン)

我々は BCG ワクチンをプライムし, 新しいワクチンをブーストする方法を用い (図6), 結核予防効果を調べた. サルでこのプライム-ブースト法で 100% の生存を示した⁴⁾⁵⁾⁷⁾ (図7). このワクチンは, サルのリンパ球からの IFN γ 産生と IL-2 産生を増強した¹⁰⁾. 一方, BCG ワクチン単独投与群は 33% の生存率であった. また, ヒトへの臨床応用に近づけるために, プライムとブーストの間隔を4ヵ月と広くあけた実験を行った (図8A). その結果, プライム-ブースト法で 80% の生存を示した¹⁰⁾ (図8A). 一方, BCG ワクチン単独投与群は 40% の生存率であった¹⁰⁾. このように, ヒトの結核感染に最も近いカンクイザルを用いた実験系で, 強力な新しい結核ワクチンを我々は世界に先駆けて開発した. すなわち, 本邦では乳幼児に BCG 接種が義務づけられていることより, プライムワクチ

図6 プライムブースト法の確立：カニクイザルを用いた結核に対する、より効果的なワクチンの開発

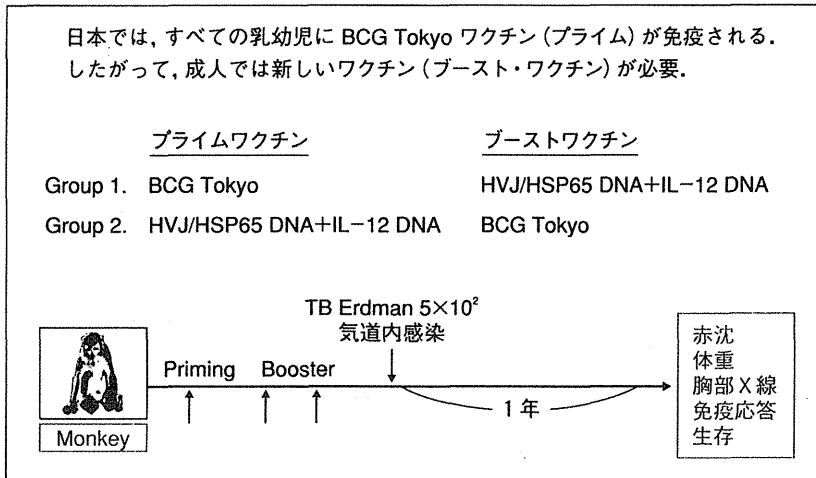
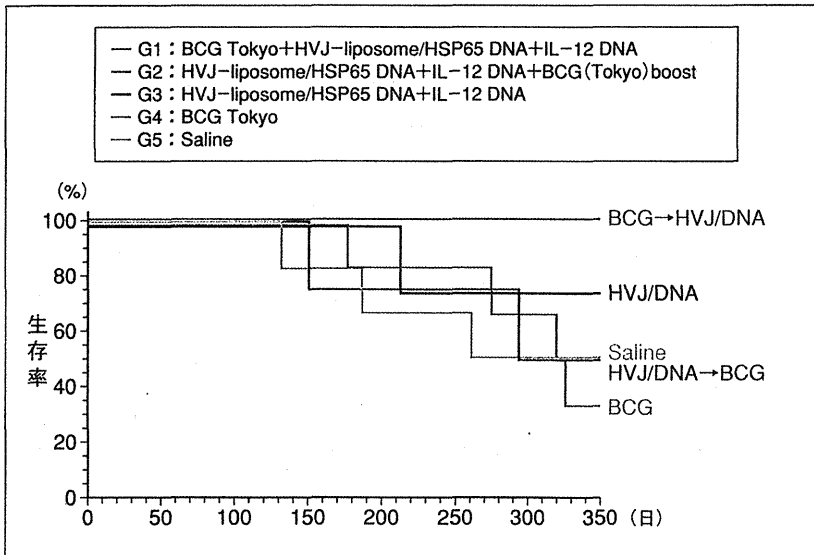


図7 カニクイザルを用いた HVJ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンと BCG を使ったプライムブースト法



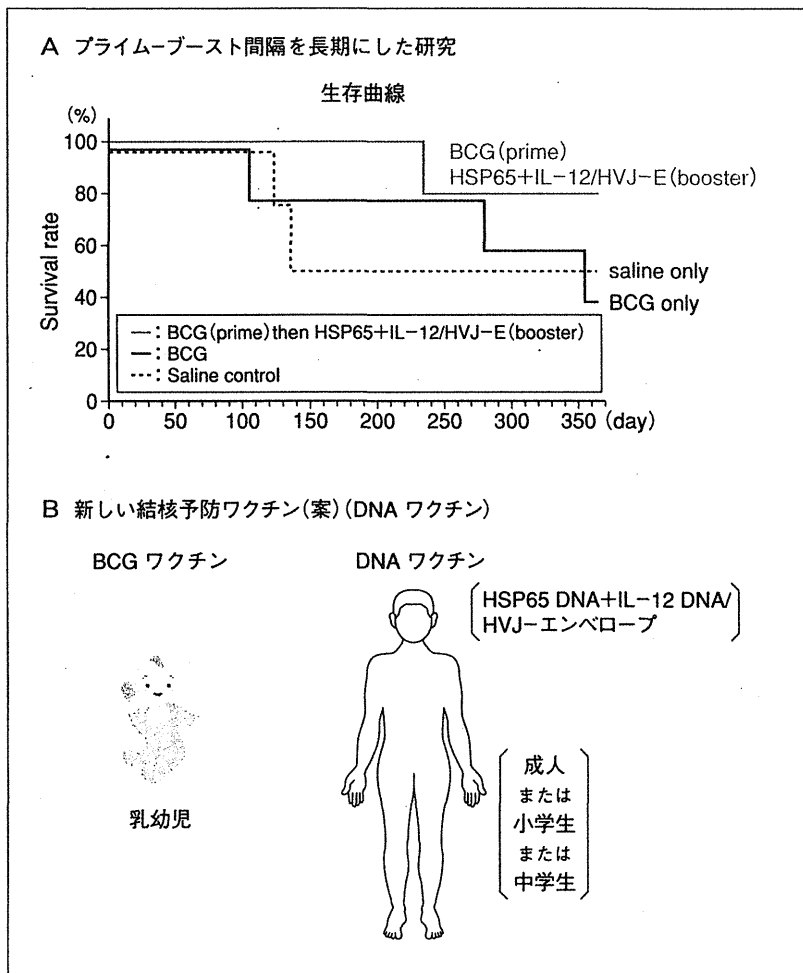
ンとして BCG ワクチンを用い、成人後 (中学生, 成人, 老人), この DNA ワクチンをブーストワクチンとして用いる結核ワクチンの臨床応用案である (図 8 B)¹⁾⁶⁻⁸⁾。

3) 結核治療ワクチンの臨床応用

我々の HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは、マウスの系で多

剤耐性結核 (MDR-TB) や超多剤耐性結核 (XDR-TB) に治療効果を発揮した。さらに、カニクイザルの系でも結核治療効果を発揮した⁶⁾²⁰⁾。したがって現在、厚生労働省、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) の指導のもとに第 I 相治験を計画している (橋元の稿参照)。

図8 臨床応用に向けたカニクイザルを用いた研究



おわりに

2009年 WHOの委員会において、我々の HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンによる、カニクイザルを用いた結核治療効果と結核予防効果が高く評価された。このワクチンが結核の発症予防や治療に役立つ日を夢見ながら、厚生労働省、PMDA の指導のもとに臨床治験を計画している。

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), p141-156. 本の泉社, 東京, 2010.
- 岡田全司: 新たな結核ワクチン. 感染・炎症・免疫 41 (1): 46-51, 2011.
- Flynn JL, et al: Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol 19: 93-129, 2001.
- Okada M, et al: Tuberculosis vaccine development: The development of novel (preclinical) DNA vaccine. Hum Vaccin 6 (3): 1-12, 2010.
- 岡田全司, 他: 5. 新しい結核ワクチンの開発. 小児科 51 (10): 1243-1251, 2010.
- Okada M, et al: Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis. Vaccine 27: 3267-3270, 2009.
- Okada M, et al: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA)

- against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine* 25: 2990-2993, 2007.
- 8) Okada M, et al: Novel prophylactic vaccine using a prime-boost method and hemagglutinating virus of Japan-envelope against tuberculosis. *Clin Dev Immunol*: e549281, 2011.
 - 9) Yoshida S, et al: 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: 1191-1204, 2006.
 - 10) Kita Y, et al: Development of therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis using monkey and granulysin transgenic mice models. *Hum Vaccin* 7: 108-114, 2011.
 - 11) Kita Y, et al: Novel recombinant BCG and DNA-vaccination against tuberculosis in a cynomolgus monkey model. *Vaccine* 23: 2132-2135, 2005.
 - 12) 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: 7618-7628, 2004.
 - 13) Walsh GP, et al: The Philippine cynomolgus monkey provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med* 2 (4): 430-436, 1996.
 - 14) Okada M, et al: The study of novel DNA vaccines against tuberculosis: Induction of pathogen-specific CTL in the mouse and monkey models of tuberculosis. *Hum Vaccin Immunother* 9 (3): 515-525, 2013.
 - 15) van Dissel J T, et al: Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31 promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in naïve human volunteers. *Vaccine* 28 (20): 3571-3581, 2010.
 - 16) Aagaard C, et al: A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nat Med* 17 (2): 189-194, 2011.
 - 17) Roels IL, et al: Improved CD4⁺T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* in PPD-negative adults by M72/AS01 as compared to the M72/AS02 and Mtb72F/AS02 tuberculosis candidate vaccine formulations: a randomized trial. *Vaccine* 31 (17): 2196-2206, 2013.
 - 18) Grode L, et al: Safety and immunogenicity of the recombinant BCG vaccine VPM1002 in a phase 1 open-label randomized clinical trial. *Vaccine* 31 (9): 1340-1348, 2013.
 - 19) Tameris MD, et al: Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet* 381: 1021-1028, 2013.
 - 20) Okada M, et al: Novel therapeutic vaccine: Granulysin and new DNA vaccine against Tuberculosis. *Hum Vaccin* 7: 60-67, 2011.

**Novel Prophylactic Vaccines Against Tuberculosis Using a Cynomolgus Monkey Model
(The Best Animal Model of Human Tuberculosis) and Their Clinical Trial**

Yoko Kita, Masaji Okada

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

結核ワクチン

多剤耐性結核治療ワクチンと T 細胞免疫

橋元里実* 西松志保* 岡田全司**

要 旨

多剤耐性結核 (MDR-TB) は難治性で、有効な治療法はない。したがって多剤耐性結核に治療効果を発揮する HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンを開発した。このワクチンは MDR-TB 感染マウスで MDR-TB 菌の減少、および超多剤耐性結核感染マウスで治療効果 (生存率改善) を示した。さらに、ヒトの結核感染に最も近いカンイクイザルで生存率改善などの結核治療効果を発揮した。したがって、臨床治験を計画している。このワクチンは細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 分化増強を示した。ほかに、グラニューライシンや Ksp37 の CTL 分化因子活性を有するタンパク質を発見した。これらの結核治療ワクチン効果についても述べる。

はじめに

リファンピシン (RFP) とイソニアジド (INH) に耐性である多剤耐性結核 (MDR-TB) は、極めて難治性である。さらに MDR-TB かつフルオロキノロン耐性、注射剤であるアミカシン、カナマイシン、カプレオマイシンの1つ以上に耐性の超多剤耐性結核 (XDR-TB) が発見され、大きな問題となっている。世界中では毎年約 50 万人の MDR-TB が発症する。日本では、MDR-TB 菌の約 30% が XDR-TB 菌である¹⁻³⁾。

したがって、新しい結核治療ワクチンおよ

び化学療法薬の開発が必須であり、世界中で競争の時代となっている。特に、結核治療における化学療法薬に対して必ず耐性菌が出現する。一方、結核治療ワクチンは耐性菌を誘導しない。したがって、結核免疫そのものを増強させ、結核菌を殺傷し、また耐性菌を出現 (誘導) させない結核治療ワクチンの開発が切望されている。

近年、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、結核免疫において最も重要な免疫担当細胞であることが、国際学会などでコンセンサスが得られている。したがって、CTL を活性化することにより、予防ワクチンおよび治療ワクチン効果が期待できる。

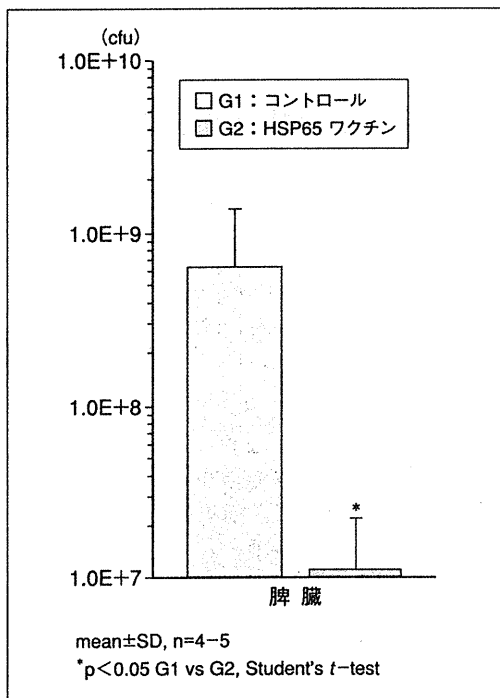
HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン (以下 HSP65 ワクチン) は、結核免疫を高め、マウスの系で MDR-TB および XDR-TB に対して強力な治療効果を示した。さらにヒトの結核感染に最も近いカニ

* 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

** 同センター長

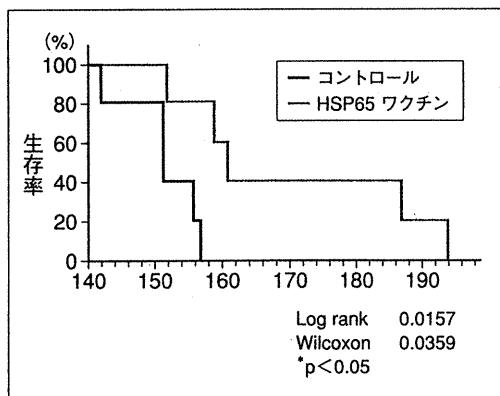
キーワード：結核治療ワクチン，
HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン，
細胞傷害性 T 細胞，
グラニューライシン，Ksp37

図1 多剤耐性結核(MDR-TB)感染マウスに対する治療ワクチン効果



MDR-TB 感染後, 1, 8, 15 日後にワクチンを投与し, 感染 30 日後の結核菌数を評価した. 群間の統計的有意差は Student's t 検定を用いた.

図2 超多剤耐性結核(XDR-TB)感染マウスに対する治療ワクチン効果



XDR-TB 感染後, 1, 8, 15 日後にワクチンを投与し, 生存率を評価した. 群間の統計的有意差は Log rank 検定および Wilcoxon 検定を用いた.

クイザルを用いて, 結核治療ワクチン効果を発揮した⁴⁻⁶⁾.

また, 結核菌に対する CTL の分化を誘導するグラニューライシンや Ksp37 を発見した⁷⁻⁹⁾. これらの結核治療効果についても言及する.

MDR-TB 治療ワクチン

1. マウス感染モデルにおける治療ワクチン効果

結核予防効果を示した HSP65 ワクチン (喜多らの稿参照) は, MDR-TB および XDR-TB に対して治療効果を発揮することを明らかにした^{10,11)}.

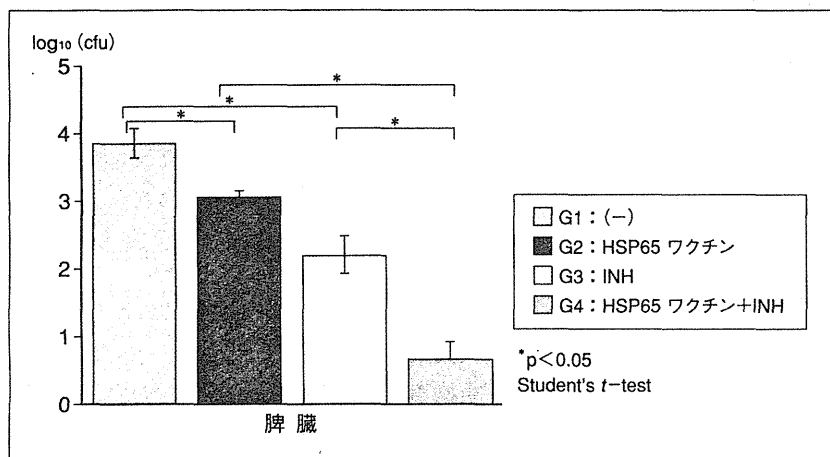
1) 新しい結核ワクチン HSP65 ワクチンの結核治療効果の特徴

(1) MDR-TB に対する治療効果を示した (図1).

(2) XDR-TB 感染マウスにおいて, ワクチン投与群ではコントロール群に比べて, 有意差を持って延命効果を発揮した (図2): MDR-TB および XDR-TB に対する強力な治療ワクチンを開発した. HSP65 ワクチンは, MDR-TB および XDR-TB に対しても治療ワクチン効果を発揮した. MDR-TB 菌または XDR-TB 菌をマウスに 5×10^5 cfu 静脈内投与した後, このワクチンを 3 回筋肉内注射して生存率と肺, 肝臓, 脾臓の結核菌数を測定した. MDR-TB を投与した研究では, 肺, 肝臓, 脾臓の MDR-TB 菌数が有意差 ($p < 0.05$) を持ってコントロール群 (生理食塩液投与群) より減少した. XDR-TB を投与した研究では, 有意差 ($p < 0.05$) を持ってこのワクチン投与群マウスはコントロール群に対して著明な延命効果を示した.

(3) 慢性の結核感染モデル (マウス) で, このワクチンの治療効果が実証された: H37Rv をエアゾールチャンバーを用いて吸入感染させることにより, 慢性の結核感染症マウスモ

図3 HSP65 ワクチンとイソニアジド (INH) との結核相乗効果



結核感染モデルマウスに感染1週間後に HSP65 ワクチンおよび INH (0.03mg/kg) を3週間6回投与し、感染から5週間後の脾臓の結核菌数を測定した。結核感染モデルマウスにおいて、単独投与群の HSP65 ワクチン投与群および INH 投与群で(-)より有意に結核菌の減少が認められた。さらに、HSP65 ワクチン+INH 投与群では単独投与群より著明な結核菌の減少が認められた。

デルを作製した。感染5週後に HSP65 ワクチンを治療投与したところ、肺、肝臓、脾臓の結核菌数の減少を認めた。

ワクチンの投与方法は、筋肉内、皮下予防接種より皮内投与のほうが強い結核治療効果を示した。

2) ヒト免疫モデルにおける治療ワクチン効果

ヒトの生体内にワクチンを投与して結核免疫や治療効果を予測する手段として、IL-2 受容体 γ 鎖ノックアウト NOD-SCID マウスで解析した。このマウスは T, B, NK 細胞が欠損していることから重度の免疫不全を呈するため、異種細胞や組織の移植に対する拒絶が少なく、ヒトの末梢血リンパ球 (PBL) ですら移植可能である。したがって、ヒト PBL を腹腔内投与して作製する IL-2 受容体 γ 鎖ノックアウト SCID-PBL/hu マウスを作製¹²⁾し、結核菌を感染させて解析した。HSP65 ワクチン治療群でこのマウスの肝臓の結核菌数の有意な減少が認められた。ヒト免疫モデルを用いた *in vivo* における HSP65 ワクチン

の結核治療の有効性が示された。

したがって、ヒトにおいてもこの HSP65 ワクチンは有効であることが強く示唆された。

3) INH との結核治療相乗効果 (図3)

有効性を高めるために、結核の感染に HSP65 ワクチンと INH の組み合わせ治療の相乗効果を検討した。この HSP65 ワクチン+INH 投与群は単独投与群に比べて、マウスの脾臓と肝臓での結核菌数が顕著に減少し、相乗効果が示された⁹⁾。

今後、投与期間の短縮、投与量の減少など、患者の負担軽減に繋がると期待される。

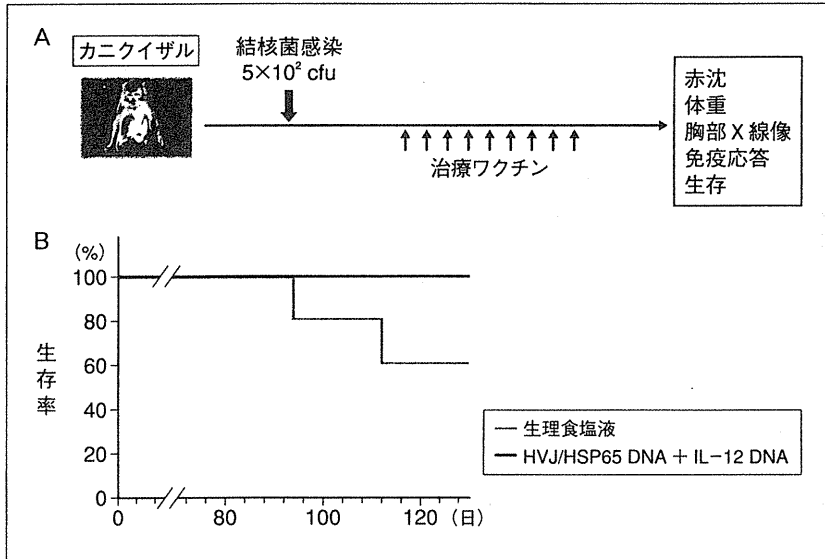
2. カニクイザル感染モデルにおける治療ワクチン効果

ヒトの結核感染に最も近いカニクイザル感染モデル¹³⁾においても、HSP65 ワクチンが治療効果を発揮し、T細胞を誘導した。

1) 治療ワクチン効果について

ヒト結核菌を気道投与感染させ、HSP65 ワクチンをサル筋肉内に9回投与した。治療効果は、生存率、赤沈、体重、免疫応答、

図4 カニクイザル感染モデルにおける結核治療ワクチン効果



A：治療ワクチン投与。ヒト結核菌 Erdman 株を 5×10² cfu 気道感染させ、1 週間後からワクチンを週 3 回、3 週間で計 9 回投与した。その後赤沈、体重、胸部 X 線像、免疫応答、生存などを評価した。

B：カニクイザルの治療ワクチン効果 (生存曲線)。結核感染後 130 日までの生存曲線。生食コントロール群は 60% の生存であったのに対し、HSP65 ワクチン投与群では 100% の生存であった。

胸部 X 線像などで評価した。(図 4 A)

生存率では、HSP65 ワクチン投与群は生理食塩液 (コントロール) 群に比べて改善が見られた。HSP65 ワクチン投与群では 100% 生存、一方、コントロール群では 60% の生存であった⁹⁾¹⁰⁾ (図 4 B)。また、ワクチン投与群では赤沈の改善効果が認められ、体重も増加した。

HSP65 で刺激した PBL の増殖反応を測定した結果、HSP65 ワクチン投与群ではコントロール群より増殖反応が増強された。

2) IL-2 産生と生存について

同様にカニクイザル感染モデルにワクチン投与後、結核死菌 H37Ra で刺激した PBL の IL-2 産生を測定した結果、HSP65 ワクチン投与群では IL-2 の産生がコントロール群より高くなった。また、コントロール群の IL-2 の産生は生存率と相関した。コントロール群

の PBL を HSP65 タンパク質で刺激し IL-2 の産生を測定したところ、結核感染後 53 日目までに死亡したサルは、生存しているサルに比べて明らかに IL-2 の産生が極めて強く抑制されており、IL-2 産生と生存率が相関することが示された¹⁷⁾¹⁸⁾。したがって HSP65 ワクチンは、IL-2 の産生を高めることにより延命効果を発揮すると考えられる。

以上のことから、MDR-TB に対しても、HSP65 ワクチンは結核免疫を高めることにより治療効果を発揮すると考えられる。

T 細胞免疫

1. 結核免疫における CTL の重要性

結核感染に対する免疫力は、マクロファージ、CD4⁺T 細胞、NK 細胞、 γ/δ T 細胞、CTL (CD8⁺CTL と CD8⁻CTL) および肉芽腫形成の総合的な抵抗力である¹³⁾⁴⁾。中でも、