様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月 １１ 日現在

機関番号：８２６０３
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2018
課題番号：１５Ｋ１９１００

研究課題名（和文）新規リコンビナントBCG接種と結核菌潜伏感染の関係：結核菌の完全排除は可能か？

研究課題名（英文）New recombinant BCG and dormancy state of tuberculosis: Is it possible to eliminate tuberculosis from host?

研究代表者
塚本　裕美子（Tsukamoto, Yumiko）

国立感染症研究所・ハンセン病研究センター　感染制御部・主任研究官

研究者番号：５０５５４５０７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究においては、抗結核菌ワクチン効果の高い組換えBCGであるBCG-PHM接種後に結核菌感染させたマウスの肺から結核菌由来RNA、およびマウス由来RNAを抽出しマウス肺における結核菌の遺伝子発現、宿主の遺伝子発現についてコントロールBCG接種群と比較して解析を行った。
　マウス肺中の結核菌由来RNAは極めて微量のRNAのみ抽出されるため、多数の遺伝子の発現を解析するのは困難であったが、休眠に関わる遺伝子の発現が示唆された。また、宿主細胞の遺伝子発現解析からBCG-PHMを接種することによってマウス肺において強い免疫応答が惹起されていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　本研究は、BCG接種を行ったマウス肺中に存在する結核菌が休眠状態に移行しているか解析する目的で実施された。結核菌に感染したヒトでは、免疫系により結核菌の増殖が抑制されるものの結核菌の一部は休眠状態となる。休眠状態の結核菌は肉芽腫と呼ばれる構造の中に存在し、免疫細胞からの攻撃を受けにくい。
　本研究においてBCG接種後に結核菌を感染させたマウスの肺中に存在する結核菌は休眠状態に移行していることが示唆されたため、抗結核菌ワクチンの開発には休眠状態に移行する結核菌への対応を考慮する必要があることが推測できた。

研究成果の概要（英文）：In this study, I inoculated mice with recombinant BCG, BCG-PHM. BCG-PHM is known to have high vaccine efficacy against tuberculosis. After mice were infected with tuberculosis, I purifired RNA from lungs of these mice. I then analysed gene expression by tuberculosis and by infected host cells.
From tuberculosis-infected murine lungs, I obtained only little amount of RNA derived from tuberculosis. Therefore, it was difficult to analysis the expression of many kinds of genes. However, it was suggested that the dormancy-related gene was upregulated in tuberculosis which infected BCG-PHM-vaccinated mice. It was also revealed that strong immune response was induced by tuberculosis infection after the inoculation of BCG-PHM in murine lungs.

研究分野：免疫学、細菌学

キーワード：BCG　結核菌　潜伏感染

１．研究開始当初の背景

(1) 結核菌の性質と BCG ワクチン

結核菌は、世界中で猛威を振るっている結核の起因菌である。治療には抗結核菌薬が使用されているが、多剤耐性菌の発生によりその脅威は増加している。結核菌は主に肺組織中で増殖する。結核は初回結核菌感染後急性的に発症する場合と潜伏感染結核菌の再燃により発症する場合に大別される。宿主による免疫応答が十分に機能しなかった場合には急性的に結核を発症する。宿主免疫が十分に機能した場合には結核菌の生体内での増殖は抑制され結核菌は休眠状態へと移行するが、宿主の免疫機能が減弱すると潜伏感染結核菌が再燃し発症する。

宿主免疫応答の主体は T 細胞による結核菌の増殖抑制である。増殖が効果的に抑制されると結核菌は肺中で休眠状態へと移行する。休眠期に移行した結核菌は代謝･増殖を行わないため、免疫応答による排除が困難である。

ワクチン接種は、ワクチンに対する免疫応答を惹起し、その免疫細胞の一部をメモリー細胞として生体内に保持することで病原体感染時に速やかに免疫応答を誘導することを目的としている。結核菌に対する BCG ワクチンの場合にも、ワクチン接種により生体内のナイーブ T 細胞の一部がエフェクターT 細胞へと分化し、その一部は静止期に移行しメモリーT 細胞として生体内に保持される。結核菌が感染した場合、このワクチンにより作製したメモリーT 細胞は結核菌感染細胞に反応しエフェクターT 細胞へと分化し速やかにサイトカイン産生など免疫応答を開始し結核菌の増殖を抑制する。

(2) これまでの研究成果　–リコンビナント BCG 株の作製–

研究代表者らはこれまで現行の BCG ワクチン株 BCG-Tokyo よりも強く結核菌の増殖を抑制するリコンビナント BCG 株を各種作製し報告してきた (引用文献 1-4)。更に、新しく作製したリコンビナント BCG (BCG-PHM) はこれまで作製した BCG の中で最も強く結核菌増殖抑制効果があることを見出した (引用文献 5)。この BCG-PHM は以下の 2 点の特徴を持ち、両者は相乗的に作用する。

① ウレアーゼ遺伝子(ureC)の欠損

ureC を欠損させたウレアーゼ欠損リコンビナント BCG 株は細胞内のファゴソームに寄生できず、現行の BCG 株に比し強く CD4 陽性ナイーブ T 細胞を活性化する。

② PHM 抗原の発現

BCG-PHM はシャペロン分子 HSP70 と強い抗原性を持つ MMP-II 分子、および蛋白質のプロテアソームでの分解を誘導するシグナルから成る融合抗原(PHM 抗原)を分泌する。この抗原の分泌により BCG-PHM は強く CD4 陽性および CD8 陽性ナイーブ T 細胞を活性化する。

BCG-PHM により誘導されるメモリーT 細胞は結核菌由来 HSP70, MMP-II を認識するものが主体である。先行研究において、MMP-II 分子は休眠状態の結核菌でその発現が減少すること(引用文献 6)が見出されている。したがって、BCG-PHM により誘導されるメモリーT 細胞は、休眠期の結核菌よりも増殖期の結核菌を強く認識すると予想される。

この BCG-PHM に関して、これまでの研究から以下の極めて興味深い結果が得られている。

・試験管内の実験で T 細胞免疫応答を強く誘導する。
・マウスに接種すると、生体内の結核菌増殖を BCG-Tokyo 株の 10 倍以上強く抑制する。
・BCG-PHM 接種下で結核菌数は強く抑制されるが、PBS 接種マウスの 1-5%の結核菌は生体内に長期間残存してしまい、全ての結核菌を生体外に排除することはできない。

２．研究の目的

BCG-PHM が結核菌増殖を強く抑制しながら残存結核菌が存在するという事実は以下の 2 つの可能性を示唆している。

(1) BCG-PHM より強力に作用する新たな抗結核ワクチンを開発し接種すれば結核菌を完全に生体外へ排除可能である

(2) 残存結核菌の存在は、強い免疫学的プレッシャーの中で早期に休眠期へと移行する結核菌固有の性状に基づくもので、ワクチンにより結核菌を完全に排除することは不可能である

この 2 つの可能性を判別することはワクチン開発において極めて重要であり、開発のゴール設定につながる。本研究ではこの 2 つの可能性を判別することを目的とする。

３．研究の方法

(1) 研究の方法として、マウスの肺中に存在する結核菌の発現する遺伝子の中で休眠菌のマーカーとなる遺伝子がどの程度発現しているか解析した。具体的には以下のような手順で行った。

①マウスにコントロール BCG もしくは BCG-PHM を皮下接種した。

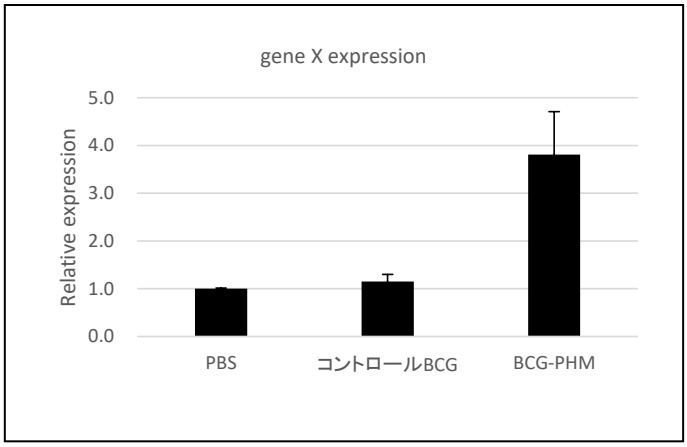
② BCG 接種後、マウスに結核菌を噴霧感染させた。

③結核菌感染後、マウスを解剖し肺を採取した。採取した肺を破砕し、破砕した肺組織を細胞溶解液中に置くことでマウス由来細胞を溶解した。
④マウス由来肺細胞中に存在していた結核菌を分離し、RNA を抽出した。この RNA から cDNA を合成し、休眠期および活動期の結核菌のマーカーとなる遺伝子について発現を解析した。

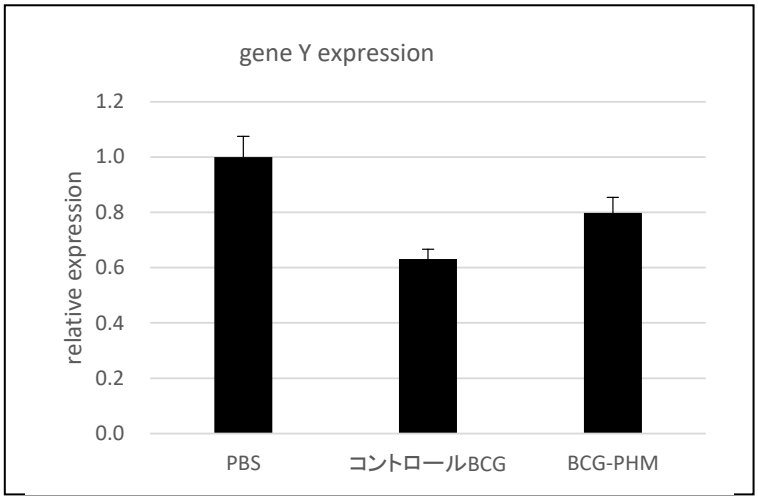
(2) また、BCG-PHM を接種したマウス肺において、結核菌感染した場合の免疫応答についてサイトカイン産生を指標として解析した。具体的には以下のような手順で行った。

①マウスに PBS、もしくはコントロール BCG もしくは BCG-PHM を皮下接種した。
② BCG 接種後一定期間をおいて、マウスに結核菌を噴霧感染させた。
③結核菌感染後一定期間をおいて、マウスを解剖し肺を採取した。採取した肺を破砕し、破砕した肺から RNA を抽出した。
④上記 RNA から cDNA を合成し、抗結核菌免疫応答に関与するとされるサイトカインについて発現を解析した。

４．研究成果
(1) マウス肺中の結核菌の遺伝子発現について
結核菌感染マウスの肺に残存する結核菌から抽出される RNA は微量にとどまり、複数の遺伝子マーカーを安定的に解析するのは困難であることが明らかになった。そのため、当初予定していた遺伝子群の発現については明確な結果は得られなかった。
その条件下においても、結核菌が休眠期であることを示すマーカーとされる遺伝子 X については比較的安定して解析を行うことができた。下図に示すように、結核菌由来 16SrRNA と比較して正規化し、PBS 接種群の肺から回収された結核菌での発現を基準に相対的な発現量を解析した。その結果、BCG-PHM を接種したマウスの肺中に存在する結核菌は、コントロール BCG を接種したマウスの肺中に存在する結核菌と比較して遺伝子 X の発現量が高いことが示唆された。



(2) マウス肺中の免疫応答について
結核菌感染マウスの肺から RNA を抽出し抗結核菌免疫応答に関わるサイトカインの発現量について解析を行った。下図に示すように、BCG-PHM を接種したマウスではコントロール BCG を接種した群と比較してサイトカイン Y の発現量が高いことが明らかになった。なお、この結果では PBS 群で最もサイトカイン Y の発現量が多くなっている。これは PBS 接種群では肺中に残存する結核菌数が多いため、結果としてサイトカイン Y 産生が強く誘導されたものと考えられる。コントロール BCG 群と BCG-PHM 群は、マウスに対する BCG 接種量を多くすることで肺中に残存する結核菌数が同程度になる条件下で比較した。



この結果から、BCG-PHM はマウス肺において結核感染時に強くサイトカイン Y の発現を誘導する可能性が示唆された。

(3) 考察

本研究の結果(1) で、BCG-PHM を接種したマウスに結核菌を感染させると、肺中に残存する結核菌には遺伝子 X が強く発現した。このことから BCG-PHM 接種マウスに結核菌が感染すると、結核菌は休眠状態に移行している可能性が示唆された。

また結果(2)からは、BCG-PHM を接種することでマウスの肺で強い免疫応答が誘導されていることが示唆された。以上の結果を合わせると、ワクチン効果の高い BCG-PHM を接種したマウスでは強い免疫応答が誘導されるが、結核菌も休眠状態に移行しているため BCG-PHM のみでの結核菌の生体からの完全排除は困難である可能性が高いと考えられる。

この結果から、結核菌の蔓延を防ぐためには初回免疫ワクチンの改良に加えて休眠期の結核菌に対応するための手法が必要とされることが示唆された。

<引用文献>

1. Mukai T, Tsukamoto Y, Maeda Y, Tamura T, and Makino M., Efficient Activation of Human T Cells of Both CD4 and CD8 Subsets by Urease Deficient-Recombinant BCG that Produced Heat Shock Protein 70-*Mycobacterium tuberculosis*-Derived Major Membrane Protein-II Fusion Protein., Clinical and Vanccine Immunology, 21, 2014, 1-11.

2. Tsukamoto Y, Maeda Y, Tamura T, Mukai T, Makino M., Polyclonal activation of naive T cells by urease deficient-recombinant BCG that produced protein complex composed of heat shock protein 70, CysO and major membrane protein-II., BMC Infectious Diseases 14, 2014, 179-189.

3. Mukai T, Maeda Y, Tamura T, Matsuoka M, Tsukamoto Y, Makino M., Enhanced activation of T lymphocytes by urease-deficient recombinant BCG producing heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. Journal of Immunology, 185, 2010, 6234-6243.

4. Mukai T, Maeda Y, Tamura T, Matsuoka M, Tsukamoto Y, Makino M., Induction of crosspriming of naive CD8+ T lymphocytes by recombinant BCG that secretes heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein., Journal of Immunology, 183, 2009, 6561-6568.

5. Tsukamoto Y, Maeda Y, Tamura T, Mukai T, Mitarai S, Yamamoto S, Makino M., Enhanced protective efficacy against tuberculosis provided by a recombinant urease deficient BCG expressing heat shock protein 70-major membrane protein-II having PEST sequence., Vaccine. 34, 2016, 6301-6308.

6. Voskuil MI, Visconti KC, Schoolnik GK., Mycobacterium tuberculosis gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy., Tuberculosis. 84, 2004, 218-27.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　0 件）

〔学会発表〕（計　0　件）

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。