

令和元年6月12日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09584

研究課題名(和文) 液性免疫誘導型新規抗結核ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of novel tuberculosis vaccine mainly targeting to humoral immunity

研究代表者

仁木 満美子 (Niki, Mamiko)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20438229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌感染防御における液性免疫の役割を解析すべく、結核菌抗原に対する血中IgGおよびIgAと、結核の病態を反映する臨床マーカーの相関について解析を行った。その結果、血中IgAが高い患者においては発症時の炎症マーカーが有意に低く、IgAが菌抑制的に働いている可能性が示唆された。さらに、抗原と抗体の結合力であるアビディティについて結核治療前および治療後における値の変動を比較したところ、治療前に休眠期特異抗原に対するIgAアビディティが高値を示した患者群においては血中CRP値が有意に低く、治療後に高いIgAアビディティを示した患者群では治療開始後60日目のCRP値が低値を示すことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗結核ワクチンとして現在用いられているものはBCGのみであるが、成人の肺結核に対してはその予防効果は疑問視されている。肺炎球菌などの経気道感染を起こす病原体については、粘膜上で誘導される分泌型IgAを主体としたワクチン開発が盛んに行われていることから、ワクチンによる気道粘膜における結核菌抗原特異的IgAの誘導は感染防御において高い効果を発揮すると考えられる。本研究では、活動期および休眠期の結核菌抗原に対する治療前および治療後の患者血清中特異抗体を測定し、臨床マーカーとの比較を行うことにより、感染防御および炎症抑制に働く液性粘液を誘導する抗原の同定につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：A novel tuberculosis vaccine to replace BCG has long been desired. Although cellular mediated immunity has been thought to be the most important immune response for protection against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), increasing evidences suggest that humoral immunity might also play an important role in the protection of Mtb infection.

To evaluate the role of humoral immunity against Mtb, we compared immunoglobulin titers against Mtb antigens to clinical and immunological parameters. We observed the IgA titers against Mtb antigens were significantly correlated with clinical status, including serum concentration of C reactive protein (CRP), suggesting that specific IgA antibodies protect the promotion of Mtb. We also found that changes in CRP during treatment were associated with high levels of specific IgA avidities to mycobacterial antigens. These observations lead to postulate the induction of humoral immunity should be included as an option in TB vaccine development strategies.

研究分野：細菌学

キーワード：結核 液性免疫 ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

結核は *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) を起炎菌とし、感染症による主な死亡原因の一つとして今なお世界中で深刻な問題となっている。世界人口のおよそ三分の一が潜在性結核と呼ばれる未発症の結核菌感染状態にあり、WHOの調査によると2013年にはおよそ900万人が罹患しており、150万人が死亡している。また、潜在性結核患者のうち10%が内因性再燃による成人性肺結核を発症するといわれており、HIV感染による免疫不全状態においては発症のリスクが30倍に跳ね上がることが報告されている。この現状を受け、WHOが2014年に採択した結核対策における新たな世界戦略では、2035年までに結核死亡率の95%減少、結核罹患率の90%減少が目標として掲げられており、目標の達成には予防的治療とワクチン開発の推進が不可欠であると結論づけられている。というのも、現在実用化されている抗結核ワクチンはウシ型結核菌弱毒株であるBCGのみであり、乳幼児の全身性結核や結核性髄膜炎においては高い予防効果が認められることから、結核蔓延国において小児の結核予防に大きく貢献しているが、成人の肺結核に対してはその予防効果は疑問視されているためである。結核菌は他の抗酸菌と異なり、環境や動物中で生育することができないことから、ワクチンによる感染防御によって結核菌保菌者を減少させることが最も効果的な結核対策であると考えられ、より効果的なワクチンの開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

結核菌感染に対する宿主の免疫機構はT細胞による細胞性免疫が主体であり、液性免疫は細胞内寄生菌である結核菌の防御には関与していないという理論が一般的であったことから、これまでのワクチン開発は細胞性免疫の賦活化を目指したものが主流であった。しかし、活動性結核患者の多くがTh1細胞による免疫応答が十分に確認されるにも関わらず結核を発症しているという事実や、BCG接種により複数の結核菌抗原に対する抗体の産生が誘導されること<sup>1</sup>、液性免疫が感染防御に無効であるとされていた病原真菌や細胞内寄生菌についても中和抗体誘導型ワクチンの開発が進んでいることなどから<sup>2</sup>、これまであまり研究がなされていなかった結核防御における液性免疫の役割が現在注目を集めつつある。実際に、結核菌の細胞壁成分である糖脂質抗原のリポアラビノマンナン (LAM) に対する IgG3 モノクローナル抗体<sup>3</sup>、およびタンパク抗原である -crystallin (Acr) に対する IgA モノクローナル抗体<sup>4</sup> がマウスを用いた感染モデルにおいて Mtb 感染防御作用を示したという報告もなされている。以上のことから、結核菌特異抗原に対する中和抗体を用いた新たな結核ワクチンの確立は大きな意義を持つと考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 結核菌特異抗原の精製

#### a. 組換えタンパク質の発現と精製

組換えタンパク質の発現は pET22b(+)によるヒスチジンタグ付組換えタンパク発現システムを用いた。結核菌抗原 (ESAT-6, CFP-10, MDP1, Ag85A, Acr, HBHA, HrpA) をコードする ORF を pET22b (+) に挿入し、得られたプラスミドを大腸菌 BL21 株に導入して各抗原を発現する組換え大腸菌を作製し、各組換えタンパク質を NI-NTA Agarose (QIAGEN) を用いたアフィニティクロマトグラフィーにて精製した。

#### b. 結核菌脂質抗原の抽出と精製

結核菌 H37Rv 株の菌体をオートクレーブ滅菌したのち、クロロホルム/メタノール (2:1) 混合液から有機層を回収し、さらにアセトン可溶画分と不溶画分に分離した。アセトン不溶画分はクロロホルムにて溶解し、脂質画分をシリカゲル薄層プレート (Analtech) を用いた薄層分離クロマトグラフィーにてさらに分離し、TDM を単離精製した。

### (2) 結核菌特異抗原に対する血中抗体価およびアビディティの測定

#### a. 東京病院における対象検体

東京病院にて、明らかに結核と思われる症状を認め、喀痰塗抹検査で陽性を示した患者 88 名を活動性結核患者群とし、初診時での採血サンプルから得られた血清を検体として解析を行った。また、これらの患者については初診時および治療経過中の臨床状態を評価するために、

治療開始前の喀痰について塗抹検査を行った際に確認された抗酸菌の量 (Smear at entry)、初診後から MGIT 陽性と診断されるまでの期間 (Positive conversion time)、治療開始から喀痰塗抹陰性と診断されるまでの期間 (Duration of culture negative)、初診時の血液検査での CRP 値 (CRP at entry) およびアルブミン値 (Albumin at entry)、治療開始 60 日目の血中 CRP 値 (CRP at the time after 60 days)、初診時の胸部レントゲンでの空洞形成率 (X-ray cavity, X-ray extent)、などの情報が保存されており、これらについても抗体価との相関を解析した。また、過去に結核に罹患、治療の経験があり、現在は結核の症状が認められない 84 名を陳旧性結核患者群とした。潜在性結核患者群は結核の症状が認められず、X線検査により結核と診断されていないにも関わらずインターフェロン 遊離試験で陽性と診断された 18 名を対象とした。さらに、健常者対照群として、呼吸器疾患に罹患しているが結核と診断されていない 77 名についても解析を行った。

#### b. 複十字病院における対象検体

複十字病院にて結核と診断された患者 90 名について、初診時および 6 ヶ月短期化学療法終了時に採血を行ったものから分離された血清をそれぞれ治療前、治療後血清として解析を行った。これらの患者についても、治療開始前の喀痰について塗抹検査を行った際に確認された

抗酸菌の量、治療開始から喀痰塗抹陰性と診断されるまでの期間、初診時の血液検査でのCRP値およびアルブミン値、初診時の胸部レントゲンでの空洞形成率などの情報が保存されており、血中抗体価との相関を比較した。

c. ELISA法を用いた血中抗体価の測定

タンパク抗原はブラッドフォード法にて濃度を測定し、PBSを用いて5 µg/ml~25 µg/mlになるように調製した。脂質抗原はヘキサンをを用いて4 µg/mlになるように調製した。これらを96穴マイクロプレートに1ウェルにつき100 µl添加し、室温で2時間静置したのちプレートをPBS-0.05% Tween20 (PBS-T)を用いて洗浄した。プレートの水気を除いたのち、5% スキムミルク含有PBS-Tを1ウェルにつき250 µl添加し、4°Cで一昼夜ブロッキングを行った。検体血清は1%スキムミルク含有PBS-Tを用いて100倍希釈し、ブロッキング後のマイクロプレートに1ウェルにつき70 µl添加したのち37°Cで1時間静置した。2次抗体としては、horse-radish peroxidase (HRP)で標識した抗ヒトIgGおよびIgA抗体を用い、1% skim milk含有PBS-Tで1000倍希釈したものを1ウェルにつき70 µl添加したのち37°Cで1時間静置した。検出には基質としてSure Blue Reserve (KPL)を1ウェルにつき100 µl添加し、室温で10分反応させたのち塩酸を添加して反応を停止し、450 nmにおける吸光度を測定した。

d. ELISA法を用いた血中抗体のアビディティ測定

各抗原に対する抗体のアビディティ測定は、ウェルに固層化された抗原とサンプル中の抗原特異的抗体を結合させたのち、タンパク変性剤の添加によって抗原・抗体間の結合を切断し、結合力の弱い抗体を除去することによって行った。c.の方法同様、マイクロプレートに抗原を固相化したのち、5% スキムミルク含有PBS-Tでブロッキングを行った。その後検体血清を1%スキムミルク含有PBS-Tを用いて100倍希釈し、ブロッキング後のマイクロプレートに1ウェルにつき70 µl添加したのち37°Cで1時間静置した。PBS-Tでプレートを洗浄したのち、各ウェルにPBS(変性剤非添加ウェル)もしくは7M尿素/PBS(変性剤添加ウェル)を100 µl添加し、室温で15分静置後PBS-Tで洗浄した。2次抗体としては、HRPで標識した抗ヒトIgGおよびIgA抗体を用い、1% skim milk含有PBS-Tで1000倍希釈したものを1ウェルにつき70 µl添加したのち37°Cで1時間静置した。検出には基質としてSure Blue Reserveを1ウェルにつき100 µl添加し、室温で10分反応させたのち塩酸を添加して反応を停止し、450 nmにおける吸光度を測定した。アビディティの値はavidity index (AI)で表し、下記の式によって算出した。

$$AI = (\text{変性剤非添加ウェルの吸光度} / \text{変性剤添加ウェルの吸光度}) \times 100$$

4. 研究成果

(1) 東京病院検体における解析

a. 各患者群における血中抗体価の比較

結核菌抗原に対する血中IgGの比較では、健常者群と比較して活動性結核患者群において高い抗体価を認め、特に、ESAT-6、CFP-10、Acr、HBHA、HrpAに対する抗体価は活動性結核患者群において有意に高値を示した。興味深いことに、MDP1、Ag85AおよびHrpAに対する抗体価は活動性結核患者群より陈旧性結核患者群で有意に高いことが明らかになった。さらに、MDP1およびHrpAに対する血中IgA抗体価は健常者群で最も高く、BCG接種による影響が示唆された。

b. 血中CRP値および各種結核病態マーカーの比較

活動性結核患者群を血中CRP値が高い群(≥2 mg/ml)と低い群(<2 mg/ml)に分け、結核病

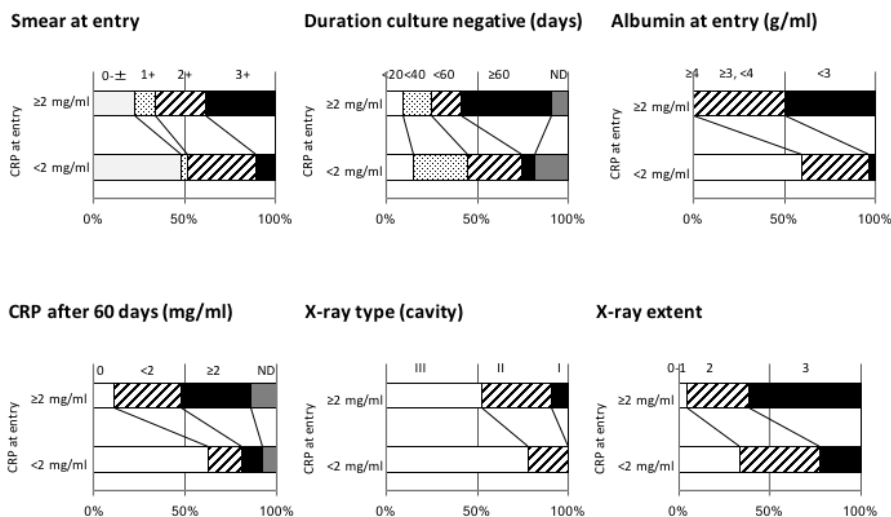


図1. CRP値と結核病態マーカーの相関

態マーカーとの相関を比較したところ、Smear at entry ( $r = 0.296, p < 0.05$ )、Duration of culture negative ( $r = 0.391, p < 0.01$ )、Albumin at entry ( $r = 0.687, p < 0.01$ )、CRP after 60 days ( $r = 0.528, p < 0.01$ )、X-ray cavity ( $r = 0.271, p < 0.05$ )、X-ray extent ( $r = 0.445, p < 0.01$ )が CRP と相関を示した(図1)。このことから、CRP 値は結核病態の重篤度を推定するマーカーとなりうることを示唆された。

c. 血中抗体価と各種結核病態マーカーの比較

血中抗体価と結核病態マーカーの相関を比較したところ、いずれの血中 IgG 抗体価も結核病態マーカーとの相関を示さなかったのに対し、HrpA に対する血中 IgA 抗体価は CRP 値と負の相関を示すことが明らかになった ( $r = -0.2505, p < 0.05$ )。このことから、HrpA に対する IgA は炎症抑制的に働いている可能性が示唆された。さらに、血中アルブミンとの相関では、ESAT-6 ( $r = 0.3304, p < 0.01$ )および Acr ( $r = 0.3334, p < 0.01$ )に対する血中 IgA が正の相関を示すことがわかった(図2)。この結果は、栄養条件が液性免疫応答に影響をあたえるという過去の報告<sup>5</sup>と一致するものと考えられる。

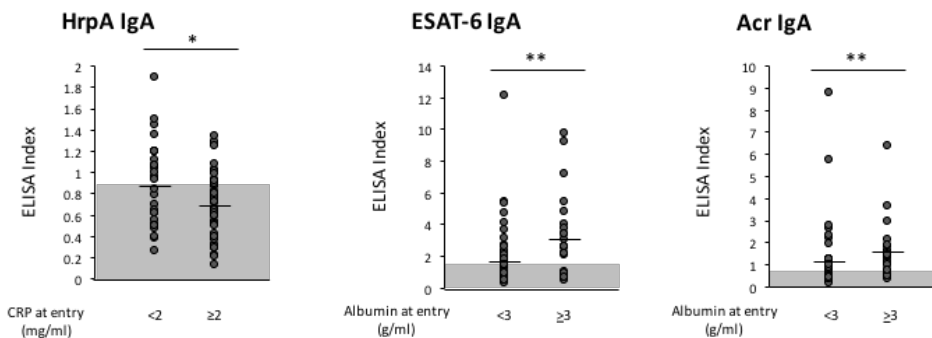


図2. 血中 IgA と CRP 値およびアルブミン値の相関

(2) 複十字病院検体における解析

a. 治療前後における血中 IgG 抗体価およびアビディティの変化の比較と病態マーカーとの相関

治療前後における血中 IgG およびそのアビディティを対象抗原ごとに比較したところ、Acr および HrpA に対する IgG 抗体価と、MDP 1 および Ag85A に対する IgG アビディティが治療により顕著に減少することが明らかになった。抗体価とアビディティの相関を解析したところ、治療前の CFP10 および MDP1 の IgG 抗体価とアビディティには正の相関が認められたのに対し、治療後は CFP10 のみが正の相関を示した。次に、結核病態マーカーと IgG 抗体価およびアビディティを比較したところ、治療前の CFP10 および MDP1 に対する IgG アビディティは血中 CRP 値と負の相関を示すことが明らかになった(図3)。このことから、抗原との高い結合性を示す IgG の誘導が結核菌感染による炎症の誘導を抑制していることが示唆された。さらに、HBHA および HrpA に対する抗体価は "Smear at entry" と正の相関を示し、これらの血中 IgG 抗体価は宿主の感染菌量を示す指標となることが示唆された。

a. 治療前後における血中 IgA 抗体価およびアビディティの変化の比較と病態マーカーとの相関

次に、治療による血中 IgA の推移を比較したところ、治療による IgA の抗体価の有意な変化は認められなかった。IgA 抗体価とアビディティの相関については、治療前においては CFP10 および MDP1 に対する IgA についてののみ負の相関が認められたのに対して、治療後は今回解析した抗原ほぼ全てに対する IgA の抗体価とアビディティは負の相関を示すことが明らかになった。また、血中 IgG は宿主内の感染菌量との

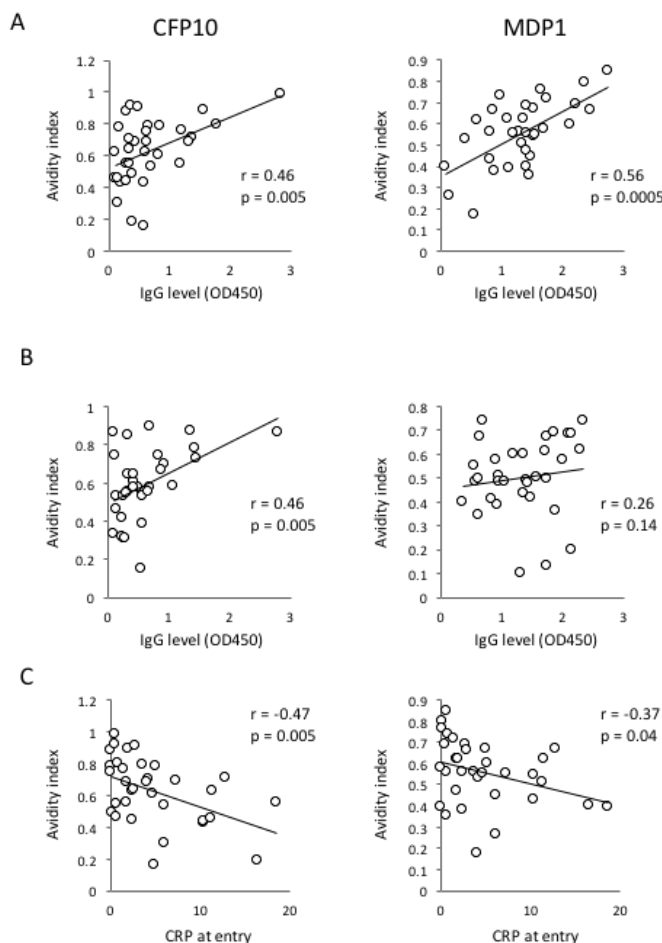


図3. 血中 IgG とアビディティの相関および CRP 値との比較

相関を示したのに対し、IgA においては抗体価およびアビディティともに相関は認められなかった。その一方で、治療前における HrpA に対する血中 IgA 抗体価は CRP 値と負の相関を示し ( $r = -0.39$ ,  $p = 0.026$ )、HrpA に対する IgA の誘導が炎症抑制的に働いていることが示唆された。さらに、MDP1 および Acr に対する IgA アビディティは治療後 60 日目における CRP 値と負の相関を示し、治療によるアビディティの獲得が CRP 値の抑制に関与している可能性が示唆された。

[引用文献]

1. de Vallière S, Abete G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect Immun.* 2005;73(10):6711-20.
2. Achkar JM, Chan J, Casadevall A. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Rev.* 2015;264(1):167-81.
3. Teitelbaum R, Glatman-Freedman A, Chen B, Robbins JB, Unanue E, Casadevall A, Bloom BR. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *PNAS.* 1998;95(26):15688-93.
4. Lopez Y, Yedo D, Falero-Diaz G, Olivares N, Sarmiento ME, Sifontes S, Solis RL, Barrios JA, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Acosta A. Induction of a protective response with an IgA monoclonal antibody against *Mycobacterium tuberculosis* 16kDa protein in a model of progressive pulmonary infection. *Int J Med Microbiol.* 2009;299(6):447-52.
5. Bhargava A, Chatterjee M, Jain Y, Chatterjee B, Kataria A, Bhargava M, Kataria R, D'Souza R, Jain R, Benedetti A, Pai M, Menzies D. Nutritional status of adult patients with pulmonary tuberculosis in rural central India and its association with mortality. *PLoS One* 2013;8:e77979

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Niki M, Yoshiyama T, Miyamoto Y, Okumura M, Niki M, Oinuma KI, Kaneko Y, Matsumoto S, Sasaki Y, Ogata H, Goto H, Kudoh S, Hoshino Y. Longitudinal Evaluation of Humoral Immunity and Bacterial and Clinical Parameters Reveals That Antigen-Specific Antibodies Suppress Inflammatory Responses in Active Tuberculosis Patients. *J Immunol Res.* 2018; 4928757. doi: 10.1155/2018/4928757. eCollection 2018 (査読有) .

[学会発表](計 1 件)

仁木 満美子、星野 仁彦、仁木 誠、老沼 研一、金子 幸弘

結核菌感染における液性免疫の役割 第 60 回日本感染症学会中日本地方会学術集会、2017 年

[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：星野 仁彦

ローマ字氏名：(HOSHINO, Yoshihiko)

所属研究機関名：国立感染症研究所

部局名：ハンセン病研究センター 感染制御部

職名：室長

研究者番号(8桁): 20569694

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大田 健

ローマ字氏名：(OTA, Ken)

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。