

令和元年6月10日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09946

研究課題名(和文) 結核を中心とした感染制御のための新規ワクチン開発と免疫学的評価

研究課題名(英文) Development of novel recombinant BCG vaccine and its immunological analysis

研究代表者

相澤 志保子(AIZAWA, Shihoko)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：30513858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、既存のBCGよりも強力に防御免疫を誘導可能な新たな結核ワクチンを作成することを目的に、BCGにMycobacterium kansasiiのAg85Bを発現させた新規組換えBCGワクチン(rBCG-Mkan85B)を作成し、マウスにおける免疫応答の解析を行った。rBCG-Mkan85Bを接種したマウスでは、BCG接種では不十分であった抗原特異的 polyfunctional CD8陽性細胞が強く誘導された。さらに、我々はAg85Bの新規CD8エピトープを2つ見出し、H2-Kdに提示されることを明らかにし、結晶構造解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結核の防御は国民衛生上重要な課題の一つである。結核ワクチンとしてBCGが古くから使われているが、成人におけるBCGの効果の限界が示唆されており、より効果的な結核ワクチンの開発・実用化が待たれている。本研究で作成した組換えBCGは既存のBCGよりも強力に結核抗原特異的T細胞を誘導できることから、新たな結核ワクチンの候補となりうる。また、近年患者数が増加傾向にある非結核性抗酸菌症のワクチンとなる可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：To improve immunization against the persistent health challenge of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) infection, we have studied the CD8+ T cell response to Bacillus Calmette-Guerin (BCG) and recombinant BCG (rBCG) in mice. Here, we generated CD8+ T cells with an rBCG-based vaccine encoding the Ag85B protein of M. kansasii, termed rBCG-Mkan85B, followed by boosting with plasmid DNA expressing the Ag85B gene (DNA-Mkan85B). We identified two MHC-I (H2-Kd)-restricted epitopes which induce cross-reactive responses to Mtb and other related mycobacteria. Tetramer staining indicated that the two H2-Kd-restricted epitopes elicit distinct CD8+ T cell populations, a result explained by the X-ray structure of the two peptide/H2-Kd complexes. These results suggest that rBCG-Mkan85B vector-based immunization and DNA-Mkan85B boost may enhance CD8+ T cell response to Mtb, and might help to overcome the limited effectiveness of the current BCG in eliciting tuberculosis immunity.

研究分野：感染免疫

キーワード：抗酸菌 結核 BCG 細胞傷害性T細胞 ヘルパーT細胞 非結核性抗酸菌

1. 研究開始当初の背景

感染症は現代においても、人々の健康に対する大いなる脅威である。結核、HIV/AIDS、マラリアは三大感染症と称され、早急な国境を超えた対策が必要である。日本は先進諸国の中では最も結核の罹患率が高く、結核の中蔓延国である。さらに、日本の近隣には、結核の罹患率が高い国が多く、日本を含めたアジアの結核患者数は全世界の約半分を占めている。近年は訪日外国人数が増加傾向にあるが、特に、中国、インド、フィリピンなど結核罹患率の高い国からの入国者が増加している。また、高齢化が進行しているわが国では、高齢者の結核患者の増加が顕著である。平成 26 年 (2014 年) の結核年報速報によると、日本における新登録結核患者の約 7 割は 60 歳以上である。総務省の試算では 2035 年には 65 歳以上が人口の 3 分の 1 を占めると見込まれており、高齢者の結核予防対策は重要な課題である。また、HIV/AIDS による細胞性免疫の低下や、関節リウマチや潰瘍性大腸炎の標準的治療として普及がめざましい TNF- 抗体薬に代表される分子標的治療も結核蔓延のリスクとなる。

結核は空気感染するため、感染防御対策が重要である。感染防御のゴールデスタンダードは、ワクチン接種である。結核に対する唯一のワクチンである BCG は、20 世紀の初頭から、全世界で使用されており、安全性が高く、安価で安定供給できる。しかし、BCG は小児の結核の重症化予防には効果的であるが、成人においては十分な結核発症予防効果がない。したがって、より効果的な結核ワクチンが求められており、現在多くの新規結核ワクチン開発が進められているが、実用化には至っていない。結核菌は細胞内寄生菌であるため、有効な結核防御には特異的細胞性免疫を誘導することが重要である。我々は、現行の BCG ワクチンは結核特異的 CD4 陽性ヘルパー T 細胞を誘導するが、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の誘導は弱いことを明らかにした。すなわち、既存の BCG は結核特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の誘導が不十分である可能性がある。

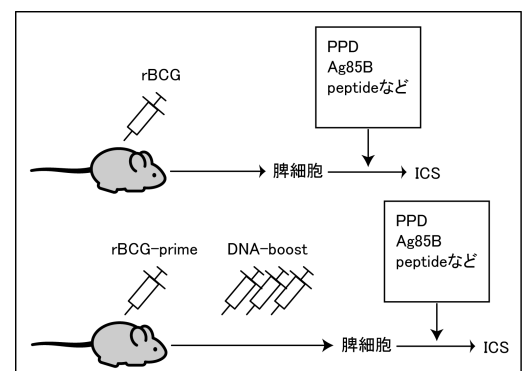
2. 研究の目的

我々は BCG の免疫原性を増幅するために、種々の外来性抗原を組み込んだ、組換え BCG ワクチンの研究開発を行い、特異的 T 細胞誘導に関する研究を進め、抗原発現が最適化された BCG、DNA、ワクシニアなどのベクター抗原の調製法を確立した (Ami et al. J. Virol, 2006; Someya et al. J. Virol. 2006 & 2007, Honda et al. J. Immunol. 2009, Honda et al. ProNAS, 2011)。そこで、これらのベクターを用いて、細胞性免疫を効果的に誘導する新規組換えワクチンを作成し、免疫学的解析・結核防御能の検討を経て、最終的には実用化を目指すことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 新規組換え BCG ワクチン (rBCG-Mkan85B) により誘導される免疫能の解析

抗酸菌で発現するシャトルベクターを用いて BCG に非結核性抗酸菌の一つである *Mycobacterium kansasii* の Antigen85B (Ag85B) 遺伝子を組み込んだ組換え BCG (rBCG-Mkan85B) を作成した。rBCG-Mkan85B 単独接種、もしくは *M. kansasii* の Ag85B をコードする DNA ワクチン (DNA-Mkan85B) をブースト接種したマウスの脾細胞を、結核抗原で刺激し、CD4 細胞、CD8 細胞それぞれの細胞が産生す



るサイトカインを測定した (intracellular cytokine staining; ICS) (右図)。本研究は、日本大学動物実験委員会、遺伝子組換え委員会の承認を得て行った。

(2) エピトープマッピング

オーバーラッピングペプチドを用いてエピトープマッピングを行い、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞それぞれの特異的な機能性エピトープを同定した。さらにマウスの MHC クラス I 分子には H-2D、H-2K、H-2L が MHC クラス II には I-A、I-E のサブクラスが存在するため、これらの blocking antibody もしくは、C1498 細胞 (H-2:b/b) に H2-D^d、H2-K^d、H2-L^d を発現させた細胞を用いて、抗原提示に使用されているサブクラスを明らかにした。また、C57BL/6 と BALB/c の F1 世代 (CB6F1, H-2: b/d) を用いて、rBCG-Mkan85B 特異的 T 細胞の誘導を同様に観察した。

(3) 結晶構造解析

同定したエピトープペプチドと H2-K^d のコンプレックスを作成し、結晶構造解析を行った。

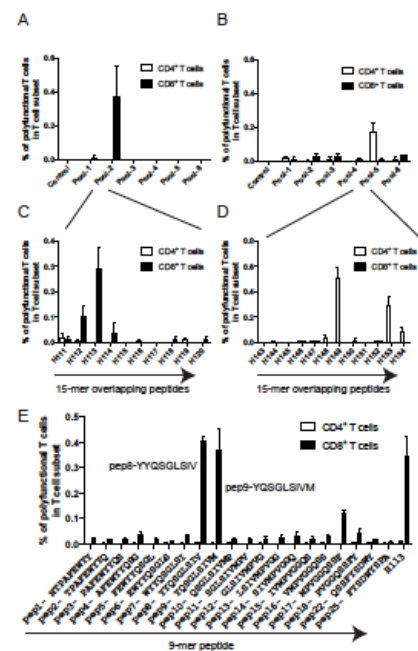
(4) rBCG-Mkan85B と rBCG-Mbov85B の比較

これまでに、他の研究者から BCG に *M. tuberculosis*、もしくは *M. bovis* の Ag85B を組み込んだ組換え BCG は報告されていた。*M. tuberculosis* と *M. bovis* の Ag85B は相同である。そこで、BCG に *M. bovis* の Ag85B を組み込んだ組換え BCG も同様に作成して、我々が新規に作成した rBCG-Mkan85B と比較を行った。

4. 研究成果

(1) rBCG-Mkan85B/DNA-Mkan85B 接種により、抗原特異的 Polyfunctional CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞が誘導された。

C57BL/6 (H-2: b/b) と BALB/c (H-2: d/d) に rBCG-Mkan85B を接種し、DNA-Mkan85B で追加免疫を行った。免疫したマウスの脾臓細胞を invitro で PPD、もしくはオーバーラッピングペプチドで刺激し、細胞内サイトカイン産生をフローサイトメトリーで検出した。その結果、C57BL/6 (H-2: b/b) では CD4T 細胞が誘導され、BALB/c (H-2: d/d) では CD8T 細胞が誘導された。そこで、15-mer もしくは 9-mer のペプチドを用いてエピトープマッピングを行い、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞それぞれの特異的な機能性エピトープを同定した (右図)。CD4 エピトープは既知のエピトープと同一であった。一方、BALB/c マウスにおいて、新規の CD8 エピトープを 2 つ (pep8 と pep9) を見出した。そこで、これらの epitope peptide を用いて CB6F1(H-2: b/d) で検討したところ、抗原特異的 Polyfunctional CD4 陽性細胞と抗原特異的 Polyfunctional CD8 陽性の両方が誘導されたことがわかった。興味深いことに、CB6F1 マウスにおいて誘導された CD4 陽性細胞は C57BL/6 マウスと同程度であったが、CD8 陽性細胞は BALB/c マウスの 6 倍程度強く誘導された。



(2) pep8 と pep9 は H2-K^d に結合する

C1498 細胞(H-2:b/b)に H2-D^d、H2-K^d、H2-L^dを発現させた細胞を用いた検討と H2-D^d、H2-K^d、H2-L^dそれぞれの中和抗体を用いた検討から、pep8 と pep9 は H2-K^dに結合することが明らかになった。

(3) pep8/ H2-K^d と pep9/H2-K^dの結晶構造解析

Pep8とPep9は共にCD8のエピトープとして機能するが、H2-K^dのペプチド収容溝のポケットとの結合は構造的に異なることが明らかになった。そのため、Pep8とH2-K^dのコンプレックスを認識するCD8細胞傷害性T細胞とPep9とH2-K^dのコンプレックスを認識するCD8細胞傷害性T細胞はポピュレーションが異なると考えられたため、テトラマーを作成し解析を行った。その結果、Pep8テトラマーとPep9テトラマーに結合するCD8陽性T細胞は異なるポピュレーションであることがわかった。

(4) rBCG-Mkan85B と rBCG-Mbov85B の比較

組み込んだAg85Bの発現をウェスタンブロットで解析したところ、BCGと比較して rBCG-Mbov85Bでは1.8倍程度の発現の上昇に留まったのに対し、rBCG-Mkan85Bでは9.3倍の上昇が見られた。さらに、これらの組換えBCGをマウスに接種し、上記(1)と同様に細胞性免疫誘導を検討した。その結果、rBCG-Mbov85Bを接種したマウスでは抗原特異的Polyfunctional CD8陽性細胞が誘導されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

MHC-restricted Ag85B-specific CD8⁺ T cells are enhanced by recombinant BCG prime and DNA boost immunization in mice. Shihoko Komine-Aizawa, Jiansheng Jiang, Satoru Mizuno, Satoshi Hayakawa, Kazuhiro Matsuo, Lisa F. Boyd, David H. Margulies, Mitsuo Honda. Eur J Immunol. In press. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

Shihoko Komine-Aizawa, Satoru Mizuno, Satoshi Hayakawa, Kazuhiro Mizuno, Mitsuo Honda. Induction of antigen 85B-specific CD8⁺ T cells by recombinant BCG protects against mycobacterial infection. 第47回日本免疫学会総会・学術集会. 2018年

相澤 (小峯) 志保子, 早川 智, 本多 三男. 組換え BCG ワクチンによる抗酸菌特異的免疫効果誘導. 第3回抗酸菌研究会. 2018年

相澤 (小峯) 志保子, Jiansheng Jiang, 早川 智, 松尾 和浩, Lisa F. Boyd, David H. Margulies, 本多 三男, 組換え BCG ワクチンによる抗酸菌特異的免疫の誘導と結核防御効果, 第88回実験結核研究会. 2018年

Shihoko Komine-Aizawa, Jiansheng Jiang, Satoshi Hayakawa, Kazuhiro Matsuo, Lisa F. Boyd, David H. Margulies, Mitsuo Honda. Induction of CD8⁺- MHC-I-restricted, antigen-specific T cells by recombinant BCG protects against mycobacterial infection. 2017年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 第40回日本分子生物学会年会. 2017年

Shihoko Komine-Aizawa, Jiansheng Jiang, Satoshi Hayakawa, Kazuhiro Matsuo, Lisa F. Boyd, David H. Margulies, Mitsuo Honda. Induction of CD8⁺- MHC-I-restricted, antigen-specific T cells by recombinant BCG protects against mycobacterial infection.

第 46 回日本免疫学会総会・学術集会．2017 年

相澤 (小峯) 志保子、本多 三男、松尾和浩、早川 智．抗酸菌由来 Ag85B の抗原提示における免疫学的解析．第 87 回実験結核研究会．2017 年

相澤 (小峯) 志保子、本多 三男、早川 智．非結核性抗酸菌防御能に優れた組換え BCG ワクチンの開発．第 91 回日本感染症学会．2017 年

相澤 志保子、早川 智、本多 三男．細胞傷害性 T 細胞を誘導可能な新規組換え BCG ワクチンの開発．第 44 回日本臨床免疫学会総会．2016 年

相澤 志保子、早川 智、本多 三男．抗結核 CD8T 細胞エピトープ分子の特性と組換えワクチン開発の試み．第 39 回日本分子生物学会年会．2016 年

Shihoko Komine-Aizawa, Satoshi Hayakawa, Kazuhiro Matsuo, Mitsuo Honda．MHC Class I presentation by highly functional epitope peptide of M. tuberculosis shared among mycobacterial antigen 85 complex．第 45 回日本免疫学会総会・学術集会．2016 年

〔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：本多 三男

ローマ字氏名：HONDA Mitsuo

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：上席研究員

研究者番号(8桁)：20117378

研究分担者氏名：早川 智

ローマ字氏名：HAYAKAWA Satoshi

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：30238084

(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。