

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04079

研究課題名(和文)結核菌潜伏感染カニクイザルによる結核発症機構の解明と発症阻止ワクチンの開発

研究課題名(英文) Study of tuberculosis and development of vaccine in latent infected cynomolgus monkeys.

研究代表者

保富 康宏 (Yasutomi, Yasuhiro)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・センター長

研究者番号：90281724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌を10CFUで気道投与したカニクイザルにおいては潜伏感染状態になることが確認された。潜伏感染カニクイザルはCTによる胸部像に以上は無く、IGRAにおいても感染初期は陽性反応を示したが、その後±(疑陽性)に移行し、際立った以上は見せていない。経鼻ワクチンではBCGワクチンに比較し優位に肺での防御効果が認められた。また、結核菌潜伏感染個体では非常に強い結核菌特異的免疫反応が誘導された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結核は世界中で蔓延し、800万人以上の新規患者、100万人以上の死亡者が報告されている。結核菌は宿主の体内環境に適応し長期に潜伏感染する細胞内寄生細菌である。世界保健機関(WHO)の報告では人類の30%が結核菌に感染していると述べられており、そのうちの5~10%が感染後2年以内に活動性結核を発症するが大半は非発症のままである。これらのことから、潜伏期の結核の発症を防御するような予防ワクチンや治療薬、発症に至る詳細な解析や診断マーカーの検討は極めて有意義であり、本申請研究ではカニクイザルを用いて詳細な検討を行い、ヒトへの応用に近い研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It was confirmed that the cynomolgus monkeys inoculated with Mycobacterium Erdman tuberculosis strain at 10 CFU by respiratory tract became latently infected at 9/10. These latently infected cynomolgus monkeys showed no more than the chest image by CT, and showed a positive reaction in IGRA in the early stage of infection, but after that, they moved to ± (false positive), and they did not show more than remarkable. When healthy cynomolgus monkeys were immunized with rHPIV2-EM1 and rHPIV2-Ag85B by intranasal administration, and then pathogenic M. tuberculosis was inoculated, a protective effect in the lung was found to be superior to the BCG vaccine. In addition, a very strong M. tuberculosis-specific immune response was induced in the latently infected M. tuberculosis individuals.

研究分野：免疫学

キーワード：結核 ワクチン 潜伏感染 カニクイザル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

結核は世界中で蔓延し、800 万人以上の新規患者、100 万人以上の死亡者が現在でも出ている。我が国でも毎年多くの発症者が確認されており、先進国中では中等度発症国 (14 人/10 万人) となっている。結核菌は宿主の体内環境に適応し長期に潜伏感染する細胞内寄生細菌であり、宿主の免疫力によって休眠状態になっている。世界保健機関 (WHO) の報告では人類の 30% が結核菌に感染していると述べられており、そのうちの 5~10% が感染後 2 年以内に活動性結核を発症するが大半は非発症のままである (*Tuberc. Lung Dis.* 2003)。また一生のうち潜伏性結核感染が活動性結核に進展する (治療後再発を含む) のは 10% と言われている (*Int. J. Epidemiol.* 2004)。しかしながら発症を防御するような予防ワクチンや治療薬、発症に至る詳細な解析や診断マーカーは存在しない。特に近年では多剤耐性結核の蔓延や、HIV など免疫不全症との合併症が大きな問題になっており、結核対策はさらに急務となっている。

現在世界中で用いられている唯一の結核ワクチンである BCG (Bacille Calmette-Guerin) は生後直ぐに接種され、その免疫反応は長期におよぶ。しかしながら 10 歳前後をピークにその効果は減弱し、17 歳前後で BCG 非接種者と同等の発病率になることが海外のコホート研究で確認されている。また、BCG の追加接種が成人の結核予防に効果が低いことも知られている。このために成人で効果のあるワクチンの開発研究は世界中で行われているが、実用化の目処が立ったものはない。また開発が進められているワクチンデザインのほとんどは感染早期に発現する抗原を用いて BCG の効果を高め、非感染者の感染または発症の防御を目的とした感染防御ワクチンである。結核菌のライフサイクルを考えた時、結核菌の潜伏感染時/再活性化時および発病者の治療効果を標的とした治療用ワクチンの開発は結核治療のブレイクスルーになると考える。そこで申請者らは、呼吸器粘膜を標的とする有効なワクチンベクターとして開発されたヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2) に、結核菌の潜伏感染時に発現する MDP1 と既知のワクチン効果がある ESAT-6 の 2 種類の結核抗原 (以後 EMI) を組み込んだリコンビナント HPIV2-EMI (rHPIV2-EMI) の開発を考案した。研究代表者らはこれまで HPIV2 に抗酸菌分泌抗原 Ag85B を組み込んだ rHPIV2-Ag85B の結核予防効果 (Watanabe et al., *Vaccine* 2013) を報告しており、rHPIV2-EMI と同時に投与することによる結核発症防御効果を検討する。MDP1 は結核菌全タンパク量の 7~10% を占め、結核菌の活動休眠期に発現が上昇する DNA 結合タンパクである。ヒトにおいて感染非発症状態では MDP1 特異的免疫反応は認められるが、結核発症者では消失することから、MDP1 特異的な免疫反応は発症予防に重要である。

カニクイザルは唯一最良のヒト結核モデルと考えられており、ヒトで認められる病変が観察され、ヒトと同様の潜伏性感染/再活性化が再現されることから、詳細な病態解析も行われている (*Nat. Med.* 2014)。報告から低量の結核菌感染にてカニクイザルの 45% が潜伏性感染になり (*Infect. Immun.* 2003, *Infect. Immun.* 2009)、ヒトでの報告同様に抗 TNF 抗体投与で再活性化を促せる (*J. Clin. Invest.* 2012)。申請者の所属する医薬基盤研究所霊長類医学科学センターは約 1600 頭のカニクイザルコロニーを保持している。これらカニクイザルは世界で唯一、系統を維持し SPF 化しており (Yasutomi Y. *Vaccine* 2010、Fujimoto et al., *Comp. Med.* 2010)、全ゲノムシーケンズの解析にも成功している (Higashino et al., *Genome Biol.* 2012)。

2. 研究の目的

本研究において解明されるべき点は 1) 新規粘膜免疫誘導型ワクチンによる潜伏状態からの肺結核発症抑制効果と誘導される免疫反応の検討、2) 潜伏感染から発症に至るメカニズムの解析や診断マーカーの探索である。この目的を遂行するために、カニクイザルの非感染/潜伏感染/活性化のそれぞれのモデルを樹立し、コロニーを作製・維持する。また申請者は有効な結核抗原である Ag85B の有する多くの生物活性を報告しており (Kuromatsu et al., *Cancer Gene Ther.* 2001, Takamura et al., *J. Immunol.* 2005, Kitagawa et al., *PLoS ONE* 2013, Tsujimura et al., *PLoS ONE* 2014)、Ag85B を組み込んだ rHPIV2-Ag85B を、結核菌潜伏期も標的とする rHPIV2-EMI と同時に投与することで結核菌の感染予防ならびに再活動化の抑制もできる新規粘膜免疫誘導型ワクチンの可能性を評価する。また現在までに、呼吸器粘膜に対する特異的な遺伝子導入ベクターの実用例、実用化ワクチンの報告はない。これらのことから本研究においては、呼吸器粘膜に抗原特異的な免疫反応を誘導する HPIV2 ベクターを用いた結核菌に対する経鼻を主とする呼吸器粘膜ワクチンの効果を解明する。これらのカニクイザルの血液サンプル等を経時的に解析することで、感染から発症に至る要因の探索を行う。以上の様に本研究では新規ワクチンにより誘導される免疫反応と、予防・治療効果

の解明および潜伏感染/活性化機構の解明を行う。

3. 研究の方法

研究期間内は結核菌の潜伏感染コロニーの樹立・維持を行った。また人為的な発症も行い、潜伏期から発症に至る要因などを探索する。ワクチン開発においては、平成29年度は2種の結核菌抗原(ESAT-6 と MDP1 : EM1) を組み込んだリコンビナント HPIV2 (rHPIV2-EM1、作製済み) をカニクイザルに投与し、抗原に対する免疫反応の解析を行いワクチン投与量などの基礎的な検討を行った。平成30年度は結核感染発症モデルのカニクイザルにおける rHPIV2-EM1 の予防効果および免疫反応を検討した。令和元年度は感染非発症・再活動化コロニーにおける rHPIV2-EM1 の予防/治療ワクチンとしての可能性を検討するとともに、経時的に採取した血液や解剖した臓器の生化学的解析を行い、再活性化抑制に関わる機構を解析した。

4. 研究成果

1) 結核潜伏感染カニクイザルコロニーの作製

結核菌 *Mycobacterium Erdman* 株を 10CFU で気道投与したカニクイザルにおいては9/10において潜伏感染状態をになることが確認された。これら潜伏感染カニクイザルはCTによる胸部像に以上は無く、IGRA においても感染初期は陽性反応を示したが、その後±(疑陽性)に移行し、際立った以上は見せていない。

2) rHPIV2-EM1 と rHPIV2-Ag85B の径鼻投与におけるワクチン効果

rHPIV2-EM1 と rHPIV2-Ag85B を健常カニクイザルに径鼻投与により免疫し、その後病原性結核菌を接種したところ、BCG ワクチンに比較し優位に肺での防御効果が認められた。また、結核菌潜伏感染個体では非常に強い結核菌特異的免疫反応が誘導された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizuno S, Soma S, Inada H, Kanuma T, Matsuo K, Yasutomi Y.	4. 巻 203
2. 論文標題 OCS1 antagonist-expressing recombinant BCG enhances anti-tuberculosis protection in a mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Immunol	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Soma S, Kawai S, Inada H, Watanabe K, Mizuno S, Kato S, Matsuo K, Yasutomi Y,	4. 巻 30
2. 論文標題 Primary role of suppressor of cytokine signaling 1 in Mycobacterium bovis BCG infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 471-480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/IAI.00376-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Takuya, Kanuma Tomohiro, Takahama Shokichi, Okamura Tomotaka, Moriishi Eiko, Ishii Ken J., Terahara Kazutaka, Yasutomi Yasuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 STING agonists activate latently infected cells and enhance SIV-specific responses ex vivo in naturally SIV controlled cynomolgus macaques	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-42253-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagatake Takahiro, Suzuki Hidehiko, Hirata So-ichiro, Matsumoto Naomi, Wada Yasuko, Morimoto Sakiko, Nasu Ayaka, Shimojou Michiko, Kawano Mitsuo, Ogami Kentaro, Tsujimura Yusuke, Kuroda Etsushi, Iijima Norifumi, Hosomi Koji, Ishii Ken J, Nosaka Tetsuya, Yasutomi Yasuhiro, Kunisawa Jun	4. 巻 30
2. 論文標題 Immunological association of inducible bronchus-associated lymphoid tissue organogenesis in Ag85B-rHP1V2 vaccine-induced anti-tuberculosis mucosal immune responses in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 471 ~ 481
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxy046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 保富康宏
2. 発表標題 粘膜免疫誘導型新規結核ワクチンの開発
3. 学会等名 日本結核病学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhiro Yasutomi
2. 発表標題 Recombinant BCG expressing SOCS1 antagonist as a novel TB vaccine
3. 学会等名 rd World Congress and Expo on Immunology（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	辻村 祐佑 (Tsujiyama Yusuke) (30512404)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 豊長類医科学研究センター・研究員 (84420)	
研究分担者	山本 拓也 (Yamamoto Takuya) (60752368)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 免疫老化プロジェクト・プロジェクトリーダー (84420)	