

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390289

研究課題名（和文）脂質をベースにした、新しい抗結核ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of a new class of lipid-based vaccines against tuberculosis

研究代表者

杉田 昌彦 (SUGITA MASAHIKO)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：80333532

研究成果の概要：結核の再興が社会問題化し、現行の BCG ワクチンに替わる新しい抗結核ワクチンの開発が望まれている。本課題においては、結核菌脂質に対する新しい免疫応答に着目し、その全容の解明と賦活法の確立を通して、脂質をベースにした新たな抗結核ワクチンを開発することを目的として研究を展開した。その結果、結核菌が産生する糖脂質の新たな生合成経路を発見し、それに対する免疫応答を実証することにより、有望な抗結核脂質ワクチンの候補が絞られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2007 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：感染免疫

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：感染症学、結核、脂質、ワクチン

1. 研究開始当初の背景

1999年に「結核緊急事態宣言」が出されるなど、結核症の再興が社会的注目を集めている。また、近年増え続けるエイズ患者においては結核を高率に発症しその予後を左右する。抗結核ワクチンとして弱毒化生菌ワクチンである BCG が長らく使用されてきたが、成人結核に対する効果は概ね不確実とされ、しかもエイズ患者など免疫不全患者には使用できないことから、BCG 接種は行政的にも大きく後退した。まさに BCG に替わる新しい抗

結核ワクチンの開発が社会的急務である。

多くの病原性微生物感染症において、タンパク質あるいはそれをコードする遺伝子をベースにした特異ワクチンが開発され、感染症の征圧に多大な貢献をしてきたことは言うまでもない。しかし、細胞内寄生細菌である結核菌は、タンパク質抗原を標的とした宿主防御反応を効率的に逃避、抑制する機構を進化の過程で獲得しており、しかも何十年の長期にわたり宿主体内で生存できるので、その間にヌクレオチド変換に伴うタンパク質抗原のアミノ酸変異を誘起することが可能

である。さらに、タンパク質抗原に対する免疫応答を担う中心的リンパ球である CD4 陽性 T 細胞は、エイズ患者において激減しているため、これらの患者ではタンパク質ワクチンの効果が期待できない。これらの事実は、現在精力的に進められている抗結核タンパク質ワクチン開発において大きな障壁となりうることを示唆しており、社会的要請である結核制御に向けて、新しい視点に立ったワクチン開発への期待が高まりつつある。

このような社会的背景も鑑み、研究代表者は、結核菌由来の脂質抗原を結合して T リンパ球に抗原提示する新しいタイプの抗原提示分子「グループ 1CD1 (CD1a, CD1b, CD1c)」に注目し、第一線の基礎研究を通してこの研究領域の基盤構築に貢献してきた。これらの研究の結果、結核菌が産生する脂質抗原を特異的に認識して活性化される CD1 拘束性 T リンパ球の存在が明らかとなり、このリンパ球を特異的に活性化することにより結核菌感染細胞が効率的に排除されることが実証された。しかもこれらの T リンパ球は、エイズ患者においてもその機能が比較的保たれている CD8 陽性 T リンパ球であった。これらの新たな知見、考察をもとに、結核菌から精製した脂質をサブユニットワクチンとして用いることにより、有効な抗結核防御応答が誘導されるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

本課題の研究目的は、以下の 2 点に集約される。

(1) モルモットを用いた結核菌脂質特異的免疫応答の解析

グループ 1CD1 遺伝子の存在やタンパク質発現が確認され、特異抗体などのリエージェントも開発が完了しているモルモットにおいて、結核菌より精製した種々の脂質抗原接種により、特異的なエフェクター・メモリー T リンパ球が誘導されるかどうか、また誘導されるとすればその免疫機能は何か、を明らかにする。

(2) 免疫標的となる抗酸菌脂質の生合成経路の解明

上記(1)で解明された免疫標的脂質が、宿主環境のなかで結核菌によりどのような機序で産生されるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 抗酸菌脂質の精製

M. avium complex (MAC; serovar 4) およ

び BCG (Tokyo 172 strain) を 7H9 メディウム中で培養し、菌体を得た。これらの菌体からクロロホルム・メタノールを用いて脂質成分を抽出し、さらに薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて、トレハロースジミコール酸 (TDM)、グルコースモノミコール酸 (GMM)、トレハロースモノミコール酸 (TMM)、グリコペプチドリピド (GPL) を単離精製した。得られた精製脂質は、おのおの質量解析を行い、分子種を確定した。

(2) モルモットの解析

4 週齢から 6 週齢のモルモット (strain 2) に対し、MAC あるいは BCG を個体当たり 1×10^8 個皮内投与し、感染を成立させた。6 週後に脱毛した側腹部皮内に精製脂質を投与し、皮膚反応を肉眼的また組織学的に解析した。すべての動物実験は、当該機関の動物委員会の承認を得て行った。

(3) 組織染色、電子顕微鏡観察

切除した皮膚サンプルをクロロホルムで固定したのち、定法に従ってギムザ染色を行った。また一部の組織サンプルについては凍結切片を作製し、抗モルモット CD4 抗体および FITC 標識抗マウス IgG 抗体を用いて蛍光染色した。

電子顕微鏡観察は、切除皮膚をグルタールアルデヒドおよび 2%酸化オスミウムにて固定したのち超薄切片を作製し、日立 H-7000 電子顕微鏡を用いて施行した。

(4) 切除皮膚におけるサイトカイン mRNA の検出

脂質をチャレンジした皮膚を切除し、RNA を抽出したのち、オリゴ dT とリバーストランスクリプターゼを用いて DNA を合成した。これを鋳型として用いた特異的 PCR を行い、サイトカインおよびコントロールの mRNA の存在を検証した。

(5) 脾臓細胞におけるサイトカイン mRNA の検出

モルモット脾臓細胞を採取し、溶血操作を行ったのち、必要に応じて CD4 陽性細胞を除去してアッセイに用いた。細胞を TDM 存在下あるいは非存在下で 16 時間培養したのち RNA を抽出し、上記の RT-PCR を施行した。一部の培養に対しては、抗 CD1 抗体 (6B5) あるいはコントロール抗体 (P3) を添加し、その阻害効果を検証した。

(6) Ag85A 遺伝子の単離およびリコンビナントタンパク質の作製

MAC のゲノム遺伝子を鋳型とした PCR を行い、MAC 由来 Ag85A 遺伝子を単離した。この遺伝子を pET-21c プラスミドベクターに挿入

し、大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。さらに大腸菌を破碎し可溶画分を得たのち、ニッケルレジンカラムを用いて His タグ付加 Ag85A リコンビナントタンパク質を精製した。

(7) ミコール酸転移酵素活性の測定

グルコース存在下あるいは非存在下に TMM とリコンビナント酵素を混和し、37°C で 1 時間反応させた。1 時間後にクロロホルム・メタノールを加えて反応を停止させ、脂質画分を抽出して TLC により展開した。TLC プレート上の脂質は、50%硫酸処理と焼き付けを行うことにより描出した。

4. 研究成果

(1) モルモットを用いた結核菌脂質特異的免疫応答の解析

抗酸菌感染によって誘導される脂質特異的メモリーT細胞応答の存在とその特質を明らかにすることは、抗結核脂質ワクチンの開発に不可欠と考え、優れた動物モデルであるモルモットを用いて研究を展開した。まず、MAC 感染モルモット皮内に、MAC より抽出した脂質を接種すると、2 日目をピークとした皮膚の硬結、紅斑が認められた。この皮膚反応は非感染モルモットでは認められなかったことから、典型的な遅延型アレルギー応答と考えられた。しかし、組織学的解析また電子顕微鏡観察から、浸潤細胞の主体は好酸球であることが判った。さらに皮膚局所では、TH2 サイトカインであるインターロイキン-5 (IL-5) が産生されていた。

この新しいタイプの遅延型アレルギー応答の本態を探るため、標的脂質の同定を行った。まず、脂質分画をさらに、クロロホルム分画 (主として中性脂質)、アセトン分画 (主として糖脂質)、メタノール分画 (主としてリン脂質) に分離し、それぞれの皮膚応答誘起作用をモニターしたところ、アセトン分画に高い活性が認められた。そこでアセトン分画に存在する主要な糖脂質 (TMM, GMM, GPL) を単離し、個々の活性を検討したところ、TMM によってのみ MAC 感染モルモットに皮膚応答を惹起することができた。

同様の反応は、BCG に感染したモルモットに BCG 由来の TMM を接種することによっても誘起できたことから、この皮膚応答の普遍性が確認された。また組織学的検証から、TMM によって誘導される好酸球優位の遅延型アレルギー応答は、PPD によって誘導される単核球優位の古典的遅延型アレルギー応答とは異質であることが示された。また前者は TH2 サイトカインの局所産生を特徴とし、後者は TH1 サイトカインの局所産生を特徴としていた。さらに、抗酸菌感染モルモットの脾

臓細胞を TMM で刺激することにより TH2 サイトカインの産生が誘起できたことから、TMM を標的としたメモリーT細胞の存在が示唆された。一方、この応答は抗 CD1 抗体では阻害されなかったことから、CD1 拘束性の応答である証拠は得られなかった。

これまでヒト結核病巣において、好酸球の浸潤が認められていたが、その免疫学的機序は不明であった。本研究によって、その機序のひとつが、TMM を標的とした遅延型アレルギー応答であることが判明した。私たちはこの新しい遅延型アレルギー応答を、好酸球性遅延型アレルギー応答 (eosinophilic delayed-type hypersensitivity) と呼ぶことを提案している。好酸球細胞質内に存在する顆粒は、結核菌を制御する活性物質を含有している。したがって、好酸球浸潤は結核感染防御の一機構と位置づけることが可能であり、TMM がこれまで考えられていたアジュバントとしての作用だけでなく、新たな抗結核ワクチンとして有効である可能性が示唆された。

(2) 免疫標的となる抗酸菌脂質の生合成経路の解明

上記のように TMM は宿主の自然免疫機構や獲得免疫機構を強く刺激する。このことは、細胞内寄生細菌である結核菌にとってきわめて不都合であり、結核菌などの病原性抗酸菌は宿主体内で TMM の産生を抑制する機構が存在するのではないかと考え、研究を展開した。

宿主外環境と比較して、宿主体内には高い濃度のグルコースが存在する。そこで、MAC を生理的なグルコース濃度を含む高濃度のグルコース存在下で培養したところ、TMM の産生が極端に減少することを観察した。またこれとは反対に、グルコース濃度依存的に産生が亢進する脂質を認めた。この脂質は GMM と同じ Rf 値を示すこと、質量分析で GMM と合致するパターンを認めたこと、ガスクロマトグラフィーにより分子内にグルコースを含有すること、また GMM 特異的 T 細胞株

(LDN5) を特異的に活性化することから、この分子が GMM であると結論づけた。すなわち、宿主内のような高濃度のグルコースが存在する環境では、抗酸菌は TMM の産生を抑制し、代わりに GMM を産生することが明らかとなった。GMM は TMM に比して宿主自然免疫系の刺激活性が微弱であることから、この変化は抗酸菌の宿主環境へのアダプテーションあるいは免疫逃避の一機構と考えられ、一方 GMM は CD1b 拘束性 T 細胞の標的分子となることから、抗結核脂質ワクチンの開発を進めるうえで、TMM と GMM の reciprocal な合成経路を明らかにすることが極めて重要であるとの考えに至った。

TDM 合成経路の最終ステップは1分子の TMM (ドナー) からもう1分子の TMM (アクセプター) へのミコール酸の転移であり、ミコール酸転移酵素 (Ag85) によって触媒される。高濃度のグルコース存在下での培養においても、TMM の産生量は変化しない。したがって、グルコースが競合的にミコール酸のアクセプターとして機能すると仮定すれば、TDM と GMM の reciprocal な生合成が一元的に説明できると考え、その仮説の検証を行った。

まず MAC より Ag85A をコードする遺伝子を単離し、大腸菌を用いて His タグ付加 Ag85A リコンビナントタンパク質を作製した。この酵素の存在下で、TMM を基質とした *in vitro* の酵素アッセイを施行したところ、TDM の産生が検出されたことから、このリコンビナントタンパク質がミコール酸転移酵素として機能していることが確認された。一方、グルコースを添加した条件でこの酵素反応を行うと、TDM の産生が抑制され、GMM と同じ Rf 値を示す脂質が産生されることを観察した。この脂質を精製し質量分析を行ったところ、GMM と合致するパターンが得られた。以上の結果は、Ag85A がグルコースをアクセプター分子として利用することにより GMM を産生することを示している。既存のミコール酸転移酵素と宿主体内のグルコースを利用して自然免疫刺激活性の高い TDM の産生を抑制し代替分子を産生することは、菌が宿主自然免疫系からエスケープするのに重要である。一方、新たに産生された GMM を標的とした CD1b 依存性キラーT細胞応答は結核菌感染を制御することが示されており、宿主側の重要な防御機構となる。したがって、GMM に対するメモリーT細胞応答を強化することは、宿主体内での生育菌を検知し制御するうえで、有効であることが示唆された。

以上の研究から、ミコール酸含有糖脂質を標的にした好酸球性遅延型アレルギー応答や CD1 依存性キラーT細胞応答に着目した新たな抗結核ワクチン開発の基盤が確立された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

① Hava DL, van der Wel N, Cohen N, Dascher CC, Houben D, Leon L, Agarwal S, Sugita M, van Zon M, Kent SC, Shams H, Peters PJ, Brenner MB. Evasion of peptide, but not lipid antigen presentation, through pathogen-induced dendritic cell maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 11281-11286, 2008. 査読有

② Matsunaga I, Naka T, Talekar RS, McConnell MJ, Katoh K, Nakao H, Otsuka A, Behar SM, Yano I, Moody DB, Sugita M. Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 283: 28835-28841, 2008. 査読有

③ Matsunaga I, Komori T, Ochi A, Mori N, Sugita M. Identification of antibody responses to the serotype-nonspecific molecular species of glycopeptidolipids in *Mycobacterium avium* infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 165-169, 2008. 査読有

④ Morita D, Katoh K, Harada T, Nakagawa Y, Matsunaga I, Miura T, Adachi A, Igarashi T, Sugita M. Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 889-893, 2008. 査読有

⑤ Otsuka A, Matsunaga I, Komori T, Tomita K, Toda Y, Manabe T, Miyachi Y, Sugita M. Trehalose dimycolate elicits eosinophilic skin hypersensitivity in mycobacteria-infected guinea pigs. *J. Immunol.* 181: 8528-8533, 2008. 査読有

⑥ Matsunaga I, Sugita M. Lipid-specific immune responses against tuberculosis; from basic science to medical applications. *Curr. Immunol. Rev.* 3: 145-150, 2007. 査読有

⑦ Sugita M, Barral DC, Brenner MB. Pathways of CD1 and lipid antigen delivery, trafficking, processing, loading and presentation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 314: 143-164, 2007. 査読有

⑧ 杉田昌彦、結核菌脂質成分に対する免疫応答の分子機序、日本細菌学雑誌、61 巻、405-413、2006 年、査読無

[学会発表] (計4件)

① 松永勇、中崇、加藤久美子、中尾瞳、大塚篤司、矢野郁也、杉田昌彦、ミコール酸転移酵素による脂質T細胞抗原の生合成、第81回日本生化学会総会、神戸、平成20年12月9-12日

② Otsuka A, Matsunaga I, Miyachi Y, Sugita M. Eosinophilic skin reactions to glycolipids define a novel form of hypersensitivity in mycobacterial infection. 第38回日本免疫学会総会、京都、平成20年12月1-3日

③ Otsuka A, Matsunaga I, Komori T, Tomita K, Toda Y, Manabe T, Miyachi Y, Sugita M. Eosinophilic skin reactions to glycolipids in mycobacterial infection represent a novel form of delayed-type hypersensitivity. *The International*

Investigative Dermatology 2008., Kyoto,
May 17-19, 2008.

④ 杉田昌彦、感染防御と脂質免疫 第81回
日本感染症学会教育講演、京都、平成19年4
月10日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 昌彦 (SUGITA MASAHIKO)
京都大学・ウイルス研究所・教授
研究者番号：80333532

(2) 研究分担者

松永 勇 (MATSUNAGA ISAMU)
京都大学・ウイルス研究所・助教
研究者番号：00254425

(3) 連携研究者

廣松 賢治 (HIROMATSU KENJI)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：80252237