

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15162

研究課題名(和文) SOCS1アンタゴニストを搭載した新規BCGワクチンの開発

研究課題名(英文) Evaluation of efficacy by rBCG-SOCS1DN vaccination in cynomolgus macaques

研究代表者

神沼 智裕 (Kanuma, Tomohiro)

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・プロジェクト研究員

研究者番号：30794044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：結核はわが国においても最大級の感染症である。結核予防ワクチンとしてBCGワクチンがあるものの、肺結核に対する明確な予防効果は認められていない。そこで本研究は、現行のBCGワクチンよりも有効な新規BCGワクチン開発の基盤づくりを目指した。我々は、BCGなど抗酸菌の宿主免疫反応を負に調節するSOCS1に着目し、SOCS1のアンタゴニストとして働くSOCS1変異体(SOCS1DN)を搭載したBCG株を作製した。作製したBCG-cynoSOCS1DNをワクチン株としてカニクイザルに接種した結果、現行BCGよりも炎症を軽減させ、T細胞応答を上昇させる有用性の高いワクチンであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結核を予防する手段としてBCGワクチンがあるが、肺結核に対する明確な予防効果は認められていない。そういった背景から世界中で肺結核予防ワクチンの研究開発が活発に行われている。しかしながら、未だ臨床の現場では有効なワクチンは存在していない。本研究では、世界的にも安全性の高いBCG Tokyo株を用いて、BCG-cynoSOCS1DNを作製した。この株を肺結核モデル動物であるカニクイザルをモデルとして用いて検証を行った。その結果、炎症反応を軽減させ、かつ効果のあるワクチン候補株の作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：Tuberculosis is one of the largest infectious diseases in Japan. Although there is a BCG vaccine as a tuberculosis preventive vaccine, no clear preventive effect on pulmonary tuberculosis has been observed. Therefore, this study aimed to lay the foundation for the development of a new BCG vaccine that is more effective than the current BCG vaccine. We focused on the cytokine suppressor molecule (SOCS) that negatively regulates the host immune response of mycobacteria such as BCG, and constructed a BCG strain carrying a SOCS1 mutant (SOCS1DN) that acts as an antagonist of SOCS1. As a result of inoculating cynomolgus monkeys with the prepared BCG-cynoSOCS1DN as a vaccine strain, it was suggested that this vaccine is highly useful in reducing inflammation and increasing T cell response compared to the current BCG.

研究分野：免疫学

キーワード：結核 BCGワクチン カニクイザル マクロファージ 感染症 免疫学 SOCS1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

結核の制圧は、世界の保健医療分野の最重要課題の一つである。わが国でも毎年2万5千人以上の患者が発生しており、この10年間は減少していない。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確認されている(Andersen P et al., Nat Rev Microbiol. 2005; Helen McShane et al., Nat Med. 2004)。このために成人で効果のある結核ワクチンの開発研究は世界中で行われているが、依然として実用化の目処が立ったものはない。

本研究は、成人における結核予防の観点から成人でも予防効果のあるBCGを作製するために、免疫応答をより高めることを目的として、BCGなど抗酸菌の宿主免疫反応を負に調節するサイトカイン抑制分子(SOCS)の機能を阻害することに着目した。SOCSはJAK/STATシグナル経路を抑制することにより、種々のサイトカイン産生を調節し、免疫応答の活性化を抑制する(Starr R et al., Nature 1997)。多くの病原体がSOCSを活性化させ、生体からの免疫反応の回避している。結核菌を含む抗酸菌もこの機構を持ち、BCGワクチンにおいてもSOCSは活性化され、免疫抑制機能が働く。一方、SOCSファミリーの一つであるSOCS1にアミノ酸変異を入れることで、SOCS1の機能を拮抗阻害することも可能である(Liu E et al., EMBO J. 2003)。そこで本研究は、このSOCS1アンタゴニスト(SOCS1DN)の免疫応答活性化機能に着目し、SOCS1による免疫応答の不活化を阻害できるBCG株の作製を目指す。

2. 研究の目的

申請者の所属する研究室では、既にマウスモデルにおいてSOCS1DNタンパク質安定発現BCG株のワクチン効果は確認済みである。そこで、前臨床試験としてカニクイザルモデルでのワクチン効果を検証する。

カニクイザルはヒトで認められている結核病変が観察でき、ヒトと同様の潜伏感染/再活性化が再現されることから(Nature Med 2014)、唯一最良のヒト結核モデルと考えられている(Infect Immun 2003, Infect Immun 2009)。本研究では新規結核ワクチンrBCG-SOCS1DNのワクチン効果とそれに伴う副反応についてカニクイザルを用いて詳細に解析する。

3. 研究の方法

始めにカニクイザル末梢血単核球(PBMC)からcDNAを合成し、cynoSOCS1発現プラスミドDNAを作製した。作製したこのプラスミドDNAを用いて、cynoSOCS1のKIRドメインに点変異を入れてcynoSOCS1DNを作製した。そして、作製したcynoSOCS1とcynoSOCS1DNの機能解析を検討した。COS-7細胞にそれぞれのプラスミドDNAを遺伝子導入し、JAK2シグナル経路への影響およびSTAT1のリン酸化への影響を解析した。次に、rBCG株にcynoSOCS1DNを遺伝子導入し、cynoSOCS1DNタンパク質安定発現株の作製を行った。作製したrBCG-cynoSOCS1DN株をカニクイザルマクロファージに感染させ、感染後の上清中の炎症性サイトカインの産生をELISA法により解析した。さらに、rBCG-cynoSOCS1DN株をマクロファージに感染させることで、SOCS1DNがマクロファージ内でどのように作用するのかをJAK2シグナル経路に着目して検証した。

In vivo 実験において、現行のBCGワクチン株とrBCG-cynoSOCS1DN株をそれぞれ皮下接種し、接種後の局所的な副反応の観察および抗原特異的なT細胞応答の解析をフローサイトメーターを用いて行った。抗原特異的なT細胞応答の解析はカニクイザルPBMCを用いて、精製ツベルクリンを抗原として細胞へ刺激し、その刺激によりIFN- γ を産生するCD4⁺T細胞の解析を行った。

4. 研究成果

作製したcynoSOCS1プラスミドDNAとcynoSOCS1DNプラスミドDNAをCOS-7細胞へ遺伝子導入し、発現したそれぞれのタンパク質の機能を解析した。その結果、cynoSOCS1DNタンパク質発現細

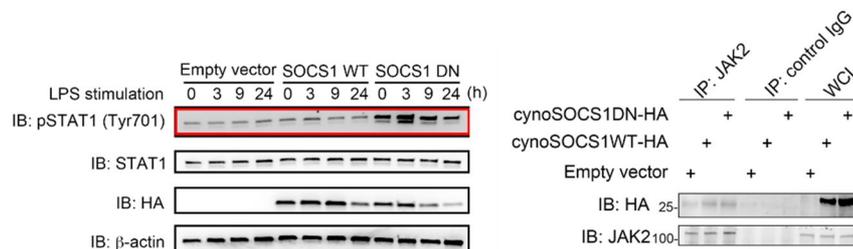


図1. cynoSOCS1DNはSTAT1のリン酸化を延長し、JAK2とも相互作用する
cynoSOCS1プラスミドDNAとcynoSOCS1DNプラスミドDNAそれぞれをCOS-7細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入48時間後にLPS刺激し、経時的にSTAT1のリン酸化をウエスタン・ブロット法で確認した。
また、SOCS1DNとJAK2の相互作用をIP-ウエスタン・ブロット法で確認した。

胞において、cynoSOCS1DN タンパク質発現細胞よりも STAT1 のリン酸化の延長が確認された。また、この cynoSOCS1DN は JAK2 と相互作用していることも確認された (図 1)。

次に、作製した rBCG-cynoSOCS1DN 株をカニクイザルマクロファージに感染させた結果、現行 BCG 株よりも rBCG-cynoSOCS1DN 株の方が炎症性サイトカインの産生量が有意に減少していることが明らかとなった (図 2)。このことは、rBCG-cynoSOCS1DN 株は現行 BCG よりも炎症応答が弱いことが示唆された。また、rBCG-cynoSOCS1DN 株感染マクロファージ内における SOCS1DN の作用について検証を行った。その結果、STAT1 のリン酸化の延長が確認された。さらに、STAT1 シグナル経路の IRF1 の発現が亢進していること、そして IRF1 の下流に位置する IL-12 の産生量が有意に上昇していることが確認された (図 3)。この結果を受けて、rBCG-cynoSOCS1DN 株を接種することで現行 BCG 株よりも Th1 有意の免疫応答が示唆された。

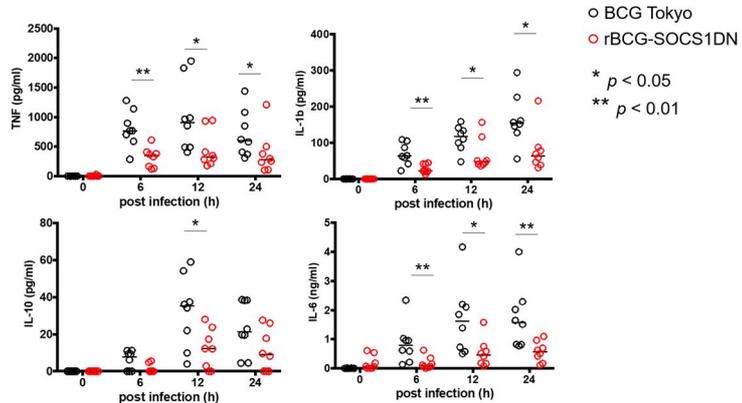


図2. リコンビナントBCG-SOCS 1 DNは炎症性サイトカインの産生が弱い。マクロファージを用いてBCG-SOCS1DN感染後の培養上清中のサイトカインをELISA法により検出した。

カニクイザルを用いた *in vivo* 実験において、現行 BCG 株と rBCG-cynoSOCS1DN 株をそれぞれ接種し、

副反応および免疫応答の比較検討を行った。その結果、接種部位の炎症が現行 BCG 株接種群では接種後 4 週目で確認さ

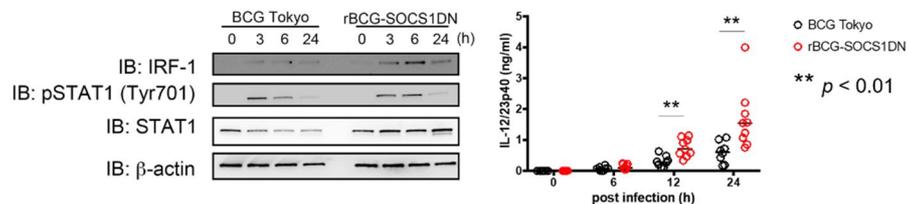


図3. 感染マクロファージにおけるSOCS 1 DNはIRF1の発現亢進とIL-12産生増加に関与する。マクロファージを用いてBCG-SOCS1DN感染後のSTAT1のリン酸化とIRF1の発現をウエスタン・プロット法により検出した。また、培養上清中のIL-12の産生量をELISA法により検出した。

れたが、rBCG-cynoSOCS1DN 株接種群では炎症は確認されなかった。このことは *in vitro* 実験の検証結果と相関し、現行 BCG 株よりも安全性に寄与する可能性を示す。また、ワクチン接種後の PBMC における免疫応答を解析した結果、現行ワクチン接種群よりも抗原特異的な CD4⁺ T 細胞応答が上昇傾向にあることが確認された (図 4)。

以上の結果より、rBCG-SOCS1DN は現行ワクチンよりも副反応が起こりにくいことが示唆され、免疫力が低下している患者さんへの接種が期待される。さらに抗原特異的な免疫応答の上昇傾向から結核予防効果にも期待され、新規結核予防ワクチンとして期待される。

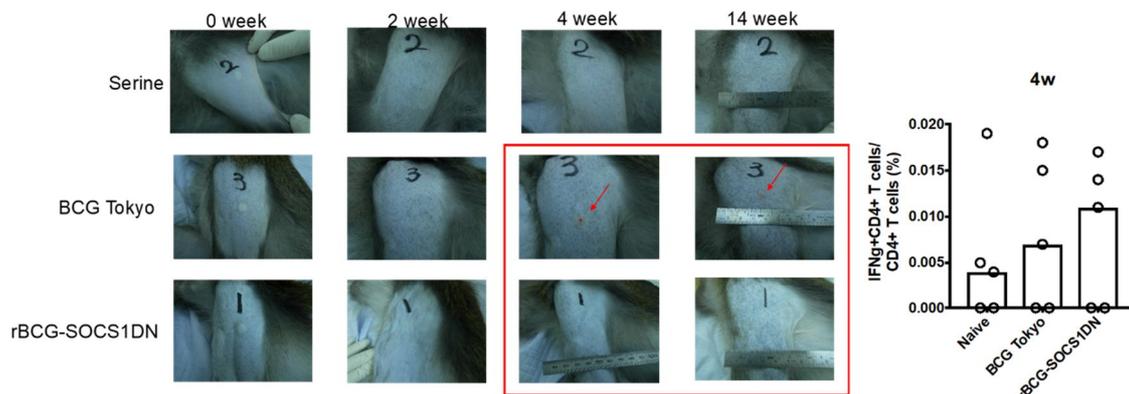


図4. リコンビナントBCG-SOCS 1 DN接種は副反応を軽減させ、免疫応答を上げる

カニクイザルにBCG Tokyo株、BCG-SOCS1株を皮内接種後の接種部位の炎症反応と接種 4 週目の抗原特異的なCD4⁺ T細胞応答をフローサイトメーターを用いて検討した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Mizuno Satoru, Soma Shogo, Inada Hiroyasu, Kanuma Tomohiro, Matsuo Kazuhiro, Yasutomi Yasuhiro	4. 巻 203
2. 論文標題 SOCS1 Antagonist-Expressing Recombinant Bacillus Calmette-Guerin Enhances Antituberculosis Protection in a Mouse Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 188 ~ 197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1800694	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0件

〔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
研究協力者	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・霊長類医学科学研究センター・センター長 (84420)	