

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07536

研究課題名（和文）結核ワクチン開発を指向した抗酸菌特有の翻訳後修飾付加ポリペプチドの抗原性検証

研究課題名（英文）Antigenic verification of post-translationally modified polypeptides unique to Mycobacterium tuberculosis for tuberculosis vaccine development.

研究代表者

尾関 百合子 (Ozeki, Yuriko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00169301

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：結核は現在も甚大な被害をもたらす疾患である。現行唯一の結核ワクチンとしてBCGが存在するが、この効果は十数年しか持続せず、成人での発症が相次いでいる。BCGに変わる新規結核ワクチン開発が世界中で実施されているが、未だBCGを超えるワクチンはない。私達は強い防御免疫を誘導する結核菌抗原を結核菌と同じ種類の弱毒抗酸菌に発現させた。本抗原は翻訳後修飾を有し、BCG接種成人の末梢血細胞から結核防御に必須のサイトカインを多量に産生し、アジュバントとの組み合わせでその効果は増強した。これらの結果から、本抗原とアジュバントの組み合わせはBCGの効果を持続させるブースターワクチン候補として有望である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト-ヒト感染に対する最も好ましい手段はワクチンであると考えられる。私達は結核菌が産生する抗原に着目し、BCG接種成人がどの抗原を認識しているのかに注目した。その結果から、特有の翻訳後修飾の重要性を見いだした。本研究は修飾付加抗原の機能とそれに対する宿主応答を解析する点に学術的意義があり、ブースターワクチン開発に利用出来る点に社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Tuberculosis (TB) remains a devastating disease. The only existing TB vaccine is BCG, but its efficacy lasts only for a decade or more, and there has been a series of cases of TB in adults. We have expressed Mycobacterium tuberculosis antigen, which induces strong protective immunity, in the same species of attenuated Mycobacterium tuberculosis. The antigen has post-translational modifications and produces large amounts of cytokines essential for tuberculosis protection from peripheral blood cells of BCG-inoculated adults, and the effect was enhanced in combination with an adjuvant. These results suggest that the combination of this antigen and adjuvant is promising as a booster vaccine candidate to sustain the effect of BCG.

研究分野：細菌学

キーワード：結核 結核菌抗原 翻訳後修飾 ワクチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

結核は現在も甚大な被害をもたらす疾患である。現行唯一の結核ワクチンとしてBCGが存在するが、この効果は十数年しか持続せず、成人での発症が問題となっている。そのため、BCGに変わる新規結核ワクチン開発が世界中で実施されているが、未だBCGを超えるワクチンはない。生ワクチンを超える成分ワクチンは現実的ではなく、成人期以降にBCGの防御効果を再度復活させる追加免疫ワクチン開発が希求されている。

2. 研究の目的

BCGの効果を持続、復活させる追加ワクチンは抗原選択が重要な課題となる。私達は実際に結核菌が産生する抗原の中から宿主に強く認識され、免疫応答が活性化される抗原を見出すこと、その抗原の性質、宿主認識機構を明らかにすること、追加ワクチン抗原としての可能性を追求することを目的とした。

3. 研究の方法

私達は開発中のワクチン抗原を含む6種類の抗原およびすでに私達がマウスに対する免疫原性から着目していた結核菌抗原XについてヒトPBMCからのIFN-gamma誘導能を比較した。成分ワクチンは抗原保護、免疫原性の向上にアジュバントが必要となるが、これについても検討した。さらに強い免疫応答を示した抗原について翻訳後修飾をマス解析により同定した。ヒトPBMCの認識機構についてもフローサイトメトリー解析を行って検討した。

4. 研究成果

マウスに対する免疫原性が確認されている結核菌抗原Xについて弱毒抗酸菌 *M. smegmatis* を宿主とした発現系を作成した。本来の結核菌Xは翻訳後修飾を有することが報告されていたので、Xの翻訳後修飾を確認するための抗体を作成した。本発現系から精製したmXはこの抗体に反応するのに対し、大腸菌を宿主として発現誘導したX(eX)は全く反応せず、mXが翻訳後修飾を有することが推察された。

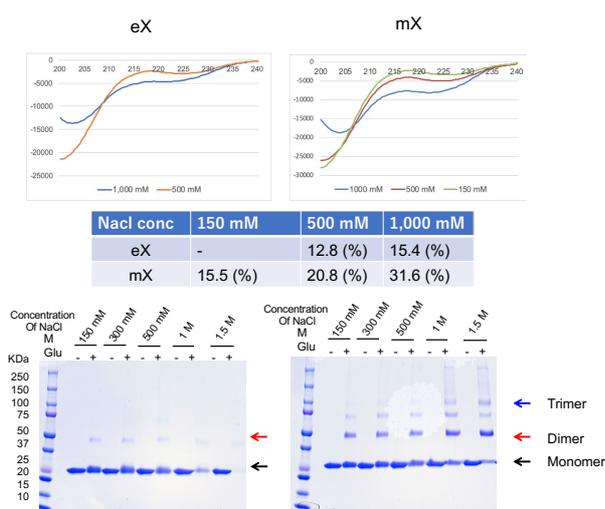


図1. eX, mXのCD解析およびクロスリンク円二色性(CD)解析スペクトルと α -ヘリックス含量(上、中)。それぞれの塩濃度のeX, mXをグルタルアルデヒド(Glu)と30分反応後、SDS-PAGEを実施した(下)。

精製した eX と mX の性状を比較するため、円二色性解析 (CD 解析) を実施した。mX は eX よりも α -ヘリックスの割合が高く、クロスリンクによる分子の会合状態も異なり、mX は eX よりもオリゴマー化しやすいことが判明した (図 1)。

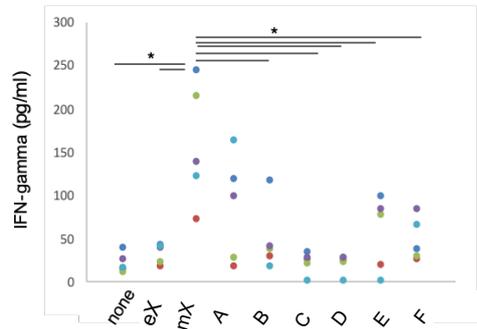


図2. PBMCからのIFN-gamma産生量
BCG接種歴のある成人PBMCを各抗原と培養し、上清中のIFN-gammaを測定した。
*, $p < 0.05$

eX、mX、および開発中のワクチン抗原を含む 6 種類の抗原の免疫原性を比較するため、BCG 接種歴を有する成人の PBMC と共培養し、IFN-gamma 産生量を比較した。その結果、mX で最も高かった (図 2)。

成分ワクチンとしてはアジュバントも重要な要素となる。結核菌抗原 X は DNA と結合する性質を有するため、種々の CpG DNA と mX とのコンプレックスを作成し、BCG 接種歴を有するヒト PBMC からの IFN-gamma 産生量を比較することで、適切な CpG DNA を選択した。著名な CpG DNA として知られている ODN (Class A, B, C) に加え、伊保等が発明したヒト PBMC からの IFN- α 産生能に優れた G9.1、及びこれらの Negative DNA (CpG を GpC に変更) をアジュバントとして検討した。その結果、G9.1 をアジュバントとして用いた場合に顕著な IFN-gamma 産生増強がみられた。

IFN-gamma 産生量が mX とアジュバントとの結合性と関連しているかを知るために、mX とそれぞれの ODN との結合性を分子間相互作用解析で検討した。その結果、mX と G9.1 は強く結合する事が明らかとなった。

次に mX と G9.1 のコンプレックスがどのようにヒト細胞と相互作用しているのかを知るため、mX、G9.1、および mX と G9.1 のコンプレックスをヒト PBMC に加え、結合細胞をフローサイトメトリーで検討した。mX 単独よりも mX と G9.1 のコンプレックスは特定の細胞集団への結合が増加した。

mX は上記の抗体により認識されたが、翻訳後修飾の詳細を知るため、質量解析を実施した。その結果、eX はほとんど翻訳後修飾が見られなかったのに対して、mX には著しい翻訳後修飾が見られた。

以上の結果は翻訳後修飾を有する mX と G9.1 との組み合わせは結核発症予防のための有望なブースターワクチン候補であることを示唆していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Ilinov A, Nishiyama A, Namba H, Fukushima Y, Takihara H, Nakajima C, Savitskaya A, Gebretsadik G, Hakamata M, Ozeki Y, Tateishi Y, Okuda S, Suzuki Y, Vinnik YS, Matsumoto S	4. 巻 11
2. 論文標題 Extracellular DNA of slow growers of mycobacteria and its contribution to biofilm formation and drug tolerance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 10953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-90156-z	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 該当する
1. 著者名 Nishiuchi Y, Tateishi Y, Hirano H, Ozeki Y, Yamaguchi T, Miki M, Kitada S, Maruyama F, Matsumoto S.	4. 巻 10
2. 論文標題 4)Direct Attachment with Erythrocytes Augments Extracellular Growth of Pathogenic Mycobacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiol Spectr.	6. 最初と最後の頁 e0245421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.02454-21.	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 該当する
1. 著者名 Ishikawa S, Ozeki Y, Suga S, Mukai Y, Kobayashi H, Inouchi E, Kaboso SA, Gebretsadik G, Dewi DNS, Nishiyama A, Tateishi Y, Takihara H, Okuda S, Yoshida S, Misawa N, Matsumoto S.	4. 巻 12
2. 論文標題 5)Monitoring IgG against Mycobacterium tuberculosis proteins in an Asian elephant cured of tuberculosis that developed from long-term latency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08228-7.	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 該当する
1. 著者名 Hakamata M, Takihara H, Iwamoto T, Tamaru A, Hashimoto A, Tanaka T, Kaboso SA, Gebretsadik G, Ilinov A, Yokoyama A, Ozeki Y, Nishiyama A, Tateishi Y, Moro H, Kikuchi T, Okuda S, Matsumoto S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Higher genome mutation rates of Beijing lineage of Mycobacterium tuberculosis during human infection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 17997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75028-2.	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 Tateishi Y, Minato Y, Baughn AD, Ohnishi H, Nishiyama A, Ozeki Y, Matsumoto S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Genome-wide identification of essential genes in Mycobacterium intracellulare by transposon sequencing - Implication for metabolic remodeling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 5449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62287-2.	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 Tateishi Y, Ozeki Y, Nishiyama A, Miki M, Maekura R, Fukushima Y, Nakajima C, Suzuki Y, Matsumoto S.	4. 巻 21
2. 論文標題 Comparative genomic analysis of Mycobacterium intracellulare: implications for clinical taxonomic classification in pulmonary Mycobacterium avium-intracellulare complex disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Microbiol.	6. 最初と最後の頁 5449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12866-021-02163-9.	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 Maeyama JI, Iho S, Suzuki F, Hayashi D, Yamamoto T, Yamazaki T, Goto Y, Ozeki Y, Matsumoto S, Yamamoto S.	4. 巻 128
2. 論文標題 Evaluation of a booster tuberculosis vaccine containing mycobacterial DNA-binding protein 1 and CpG oligodeoxynucleotide G9.1 using a Guinea pig model that elicits immunity to Bacillus Calmette-Guerin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tuberculosis	6. 最初と最後の頁 102067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tube.2021.102067.	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 Osada-Oka M, Goda N, Saiga H, Yamamoto M, Takeda K, Ozeki Y, Yamaguchi T, Soga T, Tateishi Y, Miura K, Okuzaki D, Kobayashi K, Matsumoto S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Metabolic Adaptation to Glycolysis Is a Basic Defense Mechanism of Macrophages for Mycobacterium Tuberculosis Infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 781-793.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz048.	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 Maekura R, Kitada S, Osada-Oka M, Tateishi Y, Ozeki Y, Fujicawa T, Miki M, Jyunko O, Mori M, Matsumoto S.	4. 巻 63
2. 論文標題 Serum Antibody Profiles in Individuals With Latent Mycobacterium Tuberculosis Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 130-138.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12674.	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 Dewi DNSS, Mertaniasih NM, Soedarsono, Ozeki Y, Artama WT, Fihiruddin, Niki M, Tateishi Y, Ato M, Matsumoto S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Characteristic Profile of Antibody Responses to PPD, ESAT-6, and CFP-10 of Mycobacterium Tuberculosis in Pulmonary Tuberculosis Suspected Cases in Surabaya, Indonesia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Braz J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 246-253.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjid.2019.07.001.	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 Yamashita Y, Oe T, Kawakami K, Osada-Oka M, Ozeki Y, Terahara K, Yasuda I, Edwards T, Tanaka T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matsumoto S, Ariyoshi K.	4. 巻 eCollection02807.
2. 論文標題 CD4 + T Responses Other Than Th1 Type Are Preferentially Induced by Latency-Associated Antigens in the State of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 PMID: 31849981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.02807.	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西山晃史、清水将裕、小寺哲幸、Anna Savitskaya、尾関百合子、真柳浩太、山口雄大、立石善隆、松本壮吉
2. 発表標題 Inactivation of DNA function by intrinsically disordered histone-like protein in mycobacteria.
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口雄大、寒川訓明、尾関百合子、松本壮吉、富田修平
2. 発表標題 抗酸菌のプロテアーゼclpは有望な新規抗結核薬標的である
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 立石善隆、尾関百合子、西山晃史、松本壮吉
2. 発表標題 Mycobacterium intracellulare 菌株間における生存必須遺伝子プロファイルの比較
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 立石 善隆、港 雄介、西山 晃史、尾関 百合子、松本 壮吉
2. 発表標題 Transposon sequencingによる非結核性抗酸菌の生存必須遺伝子とバイオフィーム形成必須遺伝子の検出
3. 学会等名 第57回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山晃史、林美佳世、北本竜生、立石善隆、岡真優子、西内由紀子、Xiuhao Chen、藤原 守、金古堅太郎、伊藤紀美子、尾関百合子、松本 真、松本壮吉
2. 発表標題 新規抗結核薬デラマニドは抗酸菌内で酸化型NADと付加体を形成する
3. 学会等名 第57回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山晃史, 古寺哲幸, 清水将裕, Anna Savitskaya, Shymaa Enany, 真柳浩太, 山口雄大, 尾関百合子, 立石 善隆, 松本 壮吉
2. 発表標題 低酸素休眠抗酸菌の主要タンパク質 Mycobacterial DNA-binding protein 1
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 袴田 真理子, 井内 絵梨奈, 横山 晃, 尾関 百合子, 西 山 晃史, 立石 善隆, 大橋 璃子, 菊地 利明, 田井中 一貴, 松本 壮吉
2. 発表標題 組織透明化/3次元イメージング「CUBIC」による抗酸菌感染の生体内モニタリング
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 智史, 井内 絵梨奈, 菅 里美, 向井 康彦, 小林 悠, 尾関 百合子, 西山 晃史, 立石 善隆, 松本 壮吉
2. 発表標題 結核菌に感染したアジアゾウにおける 12 種類の抗原に対する IgG レベルの評価
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾関 百合子, 横山 晃, 林 大介, 山本 十糸子, 大石 紳二, 伊保 澄子, 前山 順一, 西山 晃史, 立石 善隆, 山本 三郎, 松本 壮吉
2. 発表標題 結核ブースターワクチンの BCG 接種健康者由来リンパ球に対する防御応答惹起性
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大原 由貴子, 小林 悠, 尾関 百合子, 西山 晃史, 立石 善隆, 奥田 修 二郎, 神谷 重樹, 北所 健悟, 松本 壮吉
2. 発表標題 抗酸菌症治療薬を目指した標的蛋白質の発現と精製
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ガプリスタディク ガプリミカエル, 稲泉 茜, 西山 晃史, 山口 雄大, 尾関 百合子, 立石 善隆, 濱本 洋, 関水 和久, 松本 壮吉
2. 発表標題 Antimycobacterial Activities of Lysocin E Against Mycobacterial Species In Vitro
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡 真優子, 尾関 百合子, 山口 雄大, 松本 壮吉
2. 発表標題 マクロファージの HIF-1 による糖代謝調節は結核菌の増殖抑制に機能する
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾関 百合子, 松本 壮吉
2. 発表標題 抗酸菌組み換え蛋白質と核酸アジュバントを用いた結核ブースターワクチンの開発
3. 学会等名 2019年度中部乳酸菌研究会
4. 発表年 2019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	富山 智香子 (Tomiya Chikako) (80359702)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------