

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08968

研究課題名(和文) カニクイザル結核モデルを用いたBCGの防御効果と潜伏感染誘導機構の解明

研究課題名(英文) The immune responses induced by BCG vaccination in the non-human primate TB model

研究代表者

辻村 祐佑 (Tsujimura, Yusuke)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・主任研究官

研究者番号：30512404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：現在唯一実用化されている結核ワクチンであるBCGの予防効果について、ヒト結核病態を再現できるカニクイザルを用いて評価した。本実験から BCGは全身性結核には非常に強い防御効果を示すものの、肺結核に対する効果は弱いこと、BCGのワクチン効果と相関する結核抗原特異的免疫応答や肺局所への浸潤細胞は同定されなかったこと、BCGワクチンと肺への肉芽腫形成との関連性は認められないことを見出した。また血漿のメタボローム解析からBCGのワクチン効果を示さなかった個体ではメチオニン・システイン代謝経路に異常が認められた。今回のBCGワクチンの結果から肺結核にも効果を示す追加免疫法の開発が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、15種類のワクチン候補が第2相臨床試験のパイプラインに乗っているが実用化されたものはない。また、結核ワクチンの防御効果と相関する指標がないことが開発を困難にしていると考えられる。そこで本実験では、ヒト結核病態を再現でき、また後ろ向き実験も可能なカニクイザルを用いて結核感染実験を行うことで結核病態やワクチン効果に相関する要因を解析し、結核の撲滅に向けた基盤づくりを目指した。また、ヒト結核モデルであるカニクイザルを用いた動物実験を行うことは、ヒトへの実用化をも視野に入れた有意義な結果を導き出すことが可能であり、その成果として医学領域に大きく貢献できる知見が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The crucial point is that observation of efficacy for vaccine candidates in a non-human primate (NHP) model of Mtb infection is required to advance the candidates to clinical studies. In this study, cynomolgus macaques were used to assess immunogenicity, course of infection and protection against Mtb challenge following BCG i.d immunization. BCG is the only licensed vaccine currently. The primary goal of this study was to establish an ideal monkey model of Mtb infection that reflects the preventive effects of BCG observed in humans. In our NHP TB model, BCG vaccination could not prevent pulmonary TB showing an increase of the bacterial burden in the lungs and aggravation of granulomas quality, although the vaccination provided complete protection against extrapulmonary dissemination of TB. Factors reflecting vaccine efficacy and pathophysiology were not found in immunological or biochemical analyses in our NHP model.

研究分野：免疫学 ワクチン学

キーワード：結核 BCG カニクイザル

1. 研究開始当初の背景

結核制圧は、世界の保険医療分野の最重要課題の一つであり、成人の特に肺結核で効果のある結核ワクチンの開発研究が世界中で行われているが、依然として実用化の目途が立ったものはない。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-Guérin) は、成人の肺結核に対して効果がないという報告もあるが、未だ不明な点が多い。また、BCG 再接種の有効性が認められたこと(文献1)や現在開発が進められているワクチンデザインのほとんどが BCG の効果をもつ感染防御ワクチンであること(文献2)を考えると、BCG の有する結核防御効果の特徴や誘導される免疫応答を把握することは大変重要である。結核治療のブレイクスルーには、結核の発症という非常に複雑で大規模な宿主と結核菌の攻防をより詳細に把握することが必要と考え、唯一ヒト結核病変が再現できるカニクイザルを用いて、結核菌感染から潜伏・発症の様々なステージの基礎データを回収することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、未だ明確ではない BCG の結核防御効果について、ヒトと同様の結核病態を示し、潜伏感染/再活性化の検討が行える唯一の動物モデルであるカニクイザルを用いて詳細に解析し、結核病態を正確に把握することで結核研究の基盤を作ることである。カニクイザルを用いた BCG の効果試験や結核感染・発症/非発症個体の解析は、明確な感染時期と発症時期が分かることから、ヒトに対応する発病要因のデータベース作成にも利用できる。またヒトでの実用化をも視野に入れた新規ワクチンや新薬だけでなく、診断技術の開発にも活用できる有意義な結果を導き出すことが可能である。

カニクイザル結核感染モデルを樹立し、BCG の肺結核・全身性結核に対する防御効果、結核防御効果を示す個体と活動性結核になる個体の違いを規定する要因、BCG と肉芽腫形成の関係について検討した。

3. 研究の方法

(1) BCG の肺結核・全身性結核に対する防御効果の検討

カニクイザルに BCG を皮内接種し、14 週後に結核菌 Erdman 株を 50 CFU 経気道感染する。感染後は 2-4 週間隔で臨床診断 (CT 検査、体重、体温、咳、食欲不振などの確認)、血液検査 (赤血球沈降速度 (ESR)、血球算定、C 反応性蛋白 (CRP) 等) を行い、基礎的データを記録する。また、感染後 6 週目に結核感染診断法である抗原特異的インターフェロン-γ 遊離検査 (IGRA) を行い感染の有無も確認する。

感染後 3 カ月もしくは期間内に顕著な病変 (体重 20% 減など) が確認された時点を終点として安楽殺・解剖を行う。採取した主要臓器 (肺、脾臓、肝臓、腎臓) とリンパ節における分離菌数を測定するとともに、解剖材料の HE 染色および抗酸菌染色による組織学的解析も行い、BCG の防御効果の詳細を評価する (図 1)。

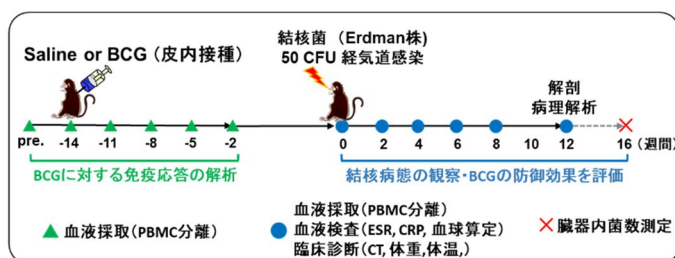


図1 カニクイザルを用いたBCG効果試験および結核感染実験のスケジュール

(2) BCG 投与サルにおける結核感染前後の免疫応答と防御効果の相関

経時的に回収した末梢血単核球 (PBMC) を特異的結核抗原 (PPD、オーバーラッピングペプチド (Ag85B, ESAT-6, MDP1, CFP10)) で刺激し、フローサイトメーターおよび ELISPOT 解析にて免疫応答を検討する。また、BCG 接種後 6 週目に回収した肺胞洗浄液中の自然免疫担当細胞 (T 細胞、MAIT 細胞、NKT 細胞、好中球、マクロファージなど) をフローサイトメーターにて解析する。1) で得られたワクチン効果および結核病態と免疫応答の相関関係を検討する。

(3) BCG は殺菌能の高い肉芽腫を感染局所に誘導できるのか検討

1) の剖検時、肺の結節 (肉芽腫) を回収し、個々の結節の分離菌数を測定することで殺菌能を評価する。菌数測定の手順は、結節サンプルをすり潰して PBS にて段階希釈し、7H10 プレートに塗布後 37 °C で培養する。培養 4 週後のコロニー数から菌数を算出する。培養 4 週後の時点でコロニーが生えなかった結節を殺菌能有とする。また、病理学的解析においても肉芽腫の特徴や結核菌の有無を確認し、BCG の防御効果と肺局所の病態を把握する。

(4) BCG のワクチン効果および結核病態と相関する血中マーカーの探索

結核感染前に経時的に回収していた血漿 (BCG 接種前および BCG 接種 3 週後) を用いてメタボローム解析を行い、BCG のワクチン効果や結核病態と相関する血中代謝産物を同定する。

4. 研究成果

(1) BCG の肺結核・全身性結核に対する防御効果の検討

我々の樹立したカニクイザル結核感染モデルにて BCG のワクチン効果を評価した。対照 (PBS) 群および BCG 群を 10 頭ずつ使用し、Erdman 株を 50 CFU 経気道感染させ、12 週間経時的に観察した。IGRA 検査にて 20 頭全頭が感染していることは確認した。血液生化学検査 (赤血球沈降速度や CRP、A/G 比) や CT 解析などの臨床診断において対照群に比べ BCG 群では有意に結核の進行が抑えられていた。また臓器内菌数を測定した結果、脾臓や肝臓といった全身性の結核に対する非常に強い BCG のワクチン効果を確認した。しかし興味深いことに肺結核に対する BCG の有意な効果は認められなかった。(図 2)

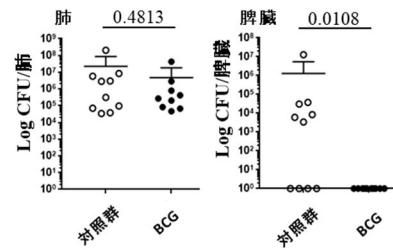


図2 臓器内菌数測定によるBCGの効果試験

(2) BCG 投与サルにおける結核感染前後の免疫応答と防御効果の相関

BCG による結核の防御効果を確認した結果、BCG の効果が認められなかった個体が 10 頭中 1 頭確認された。そこで BCG の効果に起因する免疫応答を解析するため末梢血単核球細胞および肺胞洗浄液細胞を用いて結核抗原特異的免疫反応および肺浸潤細胞のフローサイトメトリー解析を行った。BCG 接種 9 週後の肺胞洗浄液細胞中の結核抗原特異的なメモリー T 細胞ではサイトカイン産生が確認されたが、BCG の効果がなかった個体にてサイトカイン産生の強い誘導が確認された。対照群と比較して複数のサイトカインを同時に産生する細胞 (IFN- γ + IL-2 + TNF および IL-2 + TNF) 産生細胞が有意に上昇していたが、BCG のワクチン効果との関連性は認められなかった (図 3)。自然免疫担当細胞 (T 細胞、MAIT 細胞、NKT 細胞、好中球、マクロファージなど) とワクチン効果の関連性を検討したが、BCG のワクチン効果が有ったサルと無かったサルの間に関連はなかった。

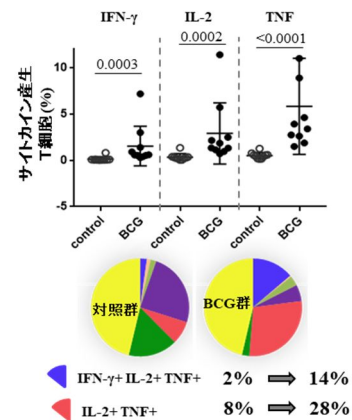


図3 BCG投与による免疫応答誘導

(3) BCG は殺菌能の高い肉芽腫を感染局所に誘導できるのか検討

結核病態のホールマークであり結核菌の封じ込めや殺菌にも重要な役割を果たすとされる肉芽腫の形成に対する BCG ワクチンの効果について検討した。その結果、対照群と比較して BCG 接種群の肉芽腫の数に有意な差は認められず、殺菌能を有する肉芽腫誘導にも BCG の効果は確認できなかった。また BCG の効果があった個体と無かった個体の比較検討においても、肉芽腫形成に差は認められなかった (図 4)。

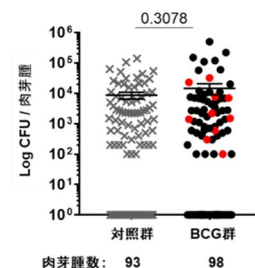


図4 殺菌能を有する肉芽腫形成
BCGの効果があった個体(黒丸)となかった個体(赤丸)

(4) BCG のワクチン効果および結核病態と相関する血中マーカーの探索

BCG 接種にて効果が有った個体と無かった個体の血漿を用いたメタボローム解析を行った。その結果、BCG ワクチンの効果を示さなかった個体ではメチオニン・システイン代謝経路に異常が認められた。しかし、BCG 接種群 10 頭のうちの 1 頭のみのものであることから他の個体での再現性を確認する必要がある。

< 引用文献 >

- Nemes E, Geldenhuys H, Rozot V, et al. Prevention of M.tuberculosis infection with H4:IC31 vaccine or BCG revaccination. *N Engl J Med.* 379(2):138-149. 2018.
- Hatherill M, Tait D, Mcshane H. Clinical testing of tuberculosis vaccine candidates. *Microbiol Spectr.* 4(5). 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Okamura Tomotaka, Shimizu Yuya, Asaka Masamitsu N., Kanuma Tomohiro, Tsujimura Yusuke, Yamamoto Takuya, Matsuo Kazuhiro, Yasutomi Yasuhiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Long-term protective immunity induced by an adjuvant-containing live-attenuated AIDS virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Vaccines	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41541-021-00386-5	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 Tsujimura, Y., Shiogama, Y., Soma, S., Okamura, T., Takano, J., Urano, E., Murakata, Y., Kawano, A., Yamakawa, N., Asaka, M. N., Matsuo, K., Yasutomi, Y.	4. 巻 205
2. 論文標題 Vaccination with intradermal Bacille Calmette-Guerin provides robust protection against extrapulmonary tuberculosis but not pulmonary infection in cynomolgus macaques.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3023-3036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2000386.	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 Tajiri, K., Imanaka-Yoshida, K., Tsujimura, Y., Matsuo, K., Hiroe, M., Aonuma, K., Ieda, M., Yasutomi, Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 A new mouse model of chronic myocarditis induced by recombinant Bacille Calmette-Guerin expressing a T-cell epitope of cardiac heavy chain-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 794-809
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22020794.	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1件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻村 祐佑
2. 発表標題 カニクイザルを用いた結核モデルの構築と新規結核ワクチン開発
3. 学会等名 第18回 霊長類医科学フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------