

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390255

研究課題名(和文)糖脂質に対するサルT細胞応答の実証に基づく、新たな抗結核ワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of a new type of anti-tuberculosis vaccines by the use of lipid immunity

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：世界人口の約3分の1が結核菌に感染しており、現行唯一の抗結核ワクチンであるBCGに代わる新たなワクチン開発が社会的急務である。研究代表者は結核菌脂質に対する免疫応答について、第一線の研究を進めてきた。本研究ではこの知見を活用し、脂質をベースにした新しいコンセプトの抗結核ワクチン開発に向けて、その研究基盤の確立を目指した研究を進めた。その結果、モルモットにおいて結核を制御する新しい脂質ワクチンの原型を確立できた。またサルを用いた実験から脂質に対する免疫応答を効率的に誘導できるプロトコルを見いだした。以上から抗結核脂質ワクチン開発の基盤を確立できた。

研究成果の概要(英文)：As about one third of the world population is infected with Mycobacterium tuberculosis, the infectious agent that causes human tuberculosis, the development of more effective vaccines than BCG, the only anti-tuberculosis vaccine currently available worldwide, is urgently needed. This principal investigator has contributed to advances in the frontier research of immune responses against tuberculosis-associated lipids. In this project, this research group has attempted to extend the basic achievements to the development of a new type of lipid-based vaccines against human tuberculosis. Using the guinea pig model of human tuberculosis, this group was successful in establishing a prototypic lipid vaccine. Furthermore, a new protocol capable of efficiently eliciting lipid-specific immune responses has been established for non-human primates, such as rhesus monkeys. These contributions provide the basis for the future development of anti-tuberculosis vaccines against human tuberculosis.

研究分野：感染症内科学

キーワード：結核 ワクチン 脂質

1. 研究開始当初の背景

世界人口の3分の1(約20億人)が結核菌に感染している。ウシ結核菌弱毒株 bacillus Calmette-Guerin (BCG) は現行唯一の抗結核ワクチンとして使用されてきたが、成人結核に対する効果は不確定であり、BCGに代わる新しい抗結核ワクチンの開発が社会的急務である。

多くの微生物感染症において、タンパク質抗原をベースにした特異ワクチンが開発され、感染症の制圧に多大な貢献をしてきた。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応答を効率的に抑制するさまざまな機構を進化の過程で獲得しており、新しい発想に基づくワクチン開発が期待される。

このような社会的・学術的背景を鑑み、研究代表者は、結核菌由来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「CD1」に着目し、第一線の基礎研究を通してこの研究領域の基盤確立に大きく貢献してきた(文献①,②)。またCD1トランスジェニックマウスやモルモットを用いた免疫解析基盤を確立し、当該研究を世界的に主導してきた。さらにアカゲザル結核モデルにおいて、脂質特異的T細胞応答の存在を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究課題において、ヒト結核と類似した病態を示すモルモットおよびアカゲザルを活用し、結核菌脂質を標的とした免疫応答の全容を解明する。さらにその知見をもとに、脂質ワクチンという新たな結核制御のプロトタイプを構築、提唱する。

3. 研究の方法

これまでの解析から、結核菌ミコール酸含有脂質(グルコースモノミコール酸 GMM、トレハロースジミコール酸 TDM、グリセロールモノミコール酸 GroMM)が有望なワクチン候補あるいはアジュバント候補となることが示されつつある(図1)。

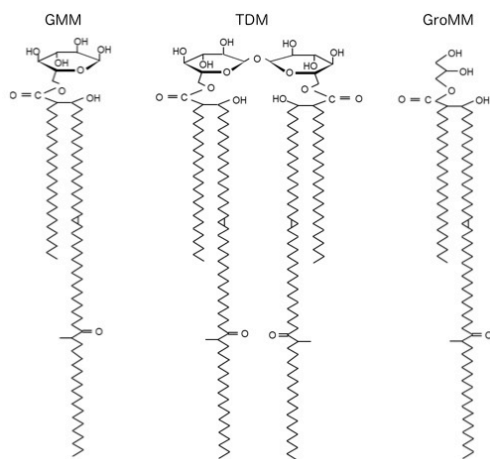


図1 結核菌ミコール酸含有脂質の構造

これらについて、大量精製を進めるとともに、それらをリポソームに搭載し、宿主応答の質とマグニチュードを評価した。ウシ結核菌弱毒株 BCG (Tokyo 172株) を5Lの7H9液体培地(炭素源として、GMMの場合は5%グルコース添加、TDMの場合は0.2%グルコース添加、GroMMの場合は5%グリセロール添加)で培養し、菌体を回収した後、クロロフォルム・メタノールにより総脂質の抽出を行った。得られた脂質を適切な展開溶媒を用いて二次元シリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC)に展開し、GMM, TDM, GroMMに相当する分画を採取した。異なる極性を持つ展開溶媒を用いてこの操作を3回繰り返し、明らかな不純物のない標品を得た。さらに目的標品が得られていることおよびその純度を、液体クロマトグラフィーならびにマスマスペクトロメトリーにより評価し、品質管理基準を満たしていることを確認した。これらの精製脂質を単独あるいは混合し、ステアリン酸付加オクタアルギニンを構成成分とした人工リポソームに搭載した。

得られたミコール酸含有脂質搭載リポソームをモルモット(Hartley, 3週齢メス)皮内に接種した。この接種を3週毎に3回繰り返し、皮膚の応答をコントロールリポソームと比較した。またリポソーム接種3週後にウシ結核菌弱毒株 BCG を攻撃接種し、所定の時間後脾臓を採取したのち、寒天培地を用いて生菌数を測定した。

アカゲザルに対してウシ結核菌弱毒株 BCG (1×10^8 cfu) あるいは GMM リポソーム(50マイクログラム)を皮内接種したのち、定期的に採血を行った。末梢血単核球を採取し、GMM リポソームの存在下あるいは非存在下でインターフェロンガンマ ELISPOT 法を施行し、GMM 特異的 T 細胞数を決定した。また末梢血単核球を GMM リポソーム存在下あるいは非存在下に6時間培養したのち、さらにブレフェルジン A を添加して6時間の追加培養を行った。培養後細胞を回収し、抗 CD4 抗体(eFluor 450)、抗 CD8 抗体(PE-Cy7)で標識したのち、細胞固定と膜透過処理を行った。さらに抗インターフェロンガンマ抗体(PE)と抗腫瘍壊死因子アルファ抗体(FITC)によるマルチカラー標識を行い、フローサイトメトリーにより解析した。

GMM リポソーム接種あるいは空リポソーム接種皮膚組織を採取し、マイクロビーズを用いて破碎したのち、RNA を抽出した。さらに逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、これを鋳型としたリアルタイム PCR により種々のサイトカインの発現を評価した。またアカゲザル GMM 特異的 T 細胞株を樹立し、CFSE 標識を行った。T 細胞株を樹立したのと同個体にウシ結核菌弱毒株 BCG を接種し、これと同時に CFSE 標識 GMM 特異的 T 細胞株を静脈注射した。この操作の4日後に感染部位組織を採取し、組織化学解析に供した。

なおすべての研究において、生命倫理や動

物愛護、安全対策の観点から、法令を遵守し、実験実施機関の規定に則り、承認を得た遂行した。

4. 研究成果

GMM は宿主由来のグルコースに対するミコール酸転移反応によって生合成される（文献③）。したがって体内増殖病原性結核菌のマーカー脂質と位置づけることができる。本研究ではモルモットおよびアカゲザルを用い、GMM に対する T 細胞応答の特質を明らかにするとともに、ワクチン開発を目指した人為的賦活法の開拓を行った。

まずモルモット皮内に 3 回の GMM リポソームを接種したのち GMM 皮内テストを実施したところ、皮膚の発赤と硬結を観察した。GMM 特異的 T 細胞応答の拘束分子として、モルモット CD1c3 が機能することを確認した。そこで GMM リポソーム接種モルモットおよび空リポソーム接種モルモットに対し、ウシ結核菌弱毒株 BCG を攻撃接種し、脾臓における生菌数を経時的にモニターした。空リポソーム接種モルモットでは、1 週、2 週、4 週において生菌数が漸増した。一方 GMM リポソーム接種モルモットでは、1 週において空リポソーム接種モルモットと同等の菌量を認め、2 週間には顕著な減少を認め、4 週間には生菌の存在を検出しなかった。以上の結果から、GMM リポソーム接種により GMM 特異的 T 細胞応答が誘起され、接種個体に結核抵抗性が賦与されると結論づけた。

次いで、アカゲザルにおける GMM 特異的 T 細胞応答の評価を行った。BCG 接種アカゲザルより経時的に末梢血単核球を採取し、インターフェロンガンマ ELISPOT 法により GMM 特異的 T 細胞を同定した。その結果、BCG 接種後 2 週より GMM 特異的 T 細胞が出現することが分かった。さらに追加的 BCG 接種を行うと、GMM 特異的 T 細胞の速やかな増加を認めた。マルチカラーフローサイトメトリーにより GMM 特異的 T 細胞のマーカー分子とサイトカインプロファイルを検証した結果、GMM 特異的 T 細胞は CD4、CD8 陽性 T 細胞ポピュレーションに広く分布すること、またインターフェロンガンマと同時に結核免疫に重要な腫瘍壊死因子アルファを分泌することを観察した。またこれらの GMM 特異的 T 細胞応答は、主として CD1c 分子に依存して誘起されることを示した。

さらに GMM によって誘起される組織応答について検証を行った。感作モルモット皮内に GMM リポソームを接種し、2 日後に組織を採取し組織像を検討したところ、単核球に浸潤を主体とした炎症像を認めた。組織から RNA を採取しリアルタイム PCR 法により種々のサイトカインの発現をモニターした結果、GMM 接種部位ではインターフェロンガンマ（Th1 サイトカイン）の RNA 発現が顕著に増加していることが分かった。一方、インターフェロン 10（Th2 サイトカイン）やインターフェロ

ン 17（Th17 サイトカイン）は発現量に変化がないか、むしろ減少していた。これと呼応して CXCL9/10/11 といういわゆる Th1 ケモカインの発現上昇を認めた。以上より GMM によって誘起される組織応答は、結核防御に重要な Th1 サイトカイン応答を主体とするものであることが分かった。また結核菌感染細胞のアポトーシス誘導に働くパーフォリンや殺菌因子グラニュリシンの顕著な発現誘導を認めた。

結核菌感染組織に GMM 特異的 T 細胞がリクルートされるかどうかは不明であった。そこでアカゲザル個体より GMM 特異的 T 細胞株を樹立し、それを蛍光標識したのち、BCG 接種した同一個体に静注により投与した。BCG 接種部位において形成される肉芽腫組織のなかに蛍光標識された GMM 特異的 T 細胞が多数存在することを示した。以上の結果をもとに、感染組織において誘起される GMM 特異的組織応答のモデルを構築し発表した（図 2）。

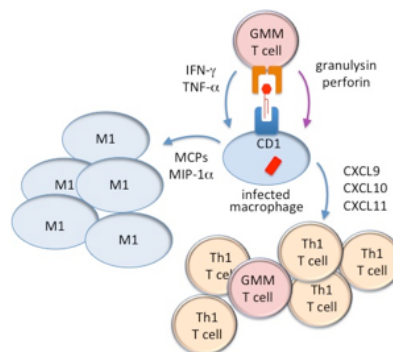


図 2 GMM によって誘起される組織応答

上記の結果より、モルモットと同様に、アカゲザルにおいて GMM 特異的 T 細胞応答を人為的に賦活することにより、結核に対する抵抗性を賦与できる可能性を考え、その検証に着手した。しかしながら、アカゲザル皮内に GMM リポソームを接種しても末梢血における GMM 特異的 T 細胞数はほとんど増加せず、モルモットとは異なる結果が得られた。アカゲザルにおける GMM 特異的 T 細胞応答の誘導には GMM リポソームだけでなく適切なアジュバントの存在が必須と考え、模索した。その結果、GMM と TDM を 8:1 の比率で搭載したリポソームをアカゲザル皮内に接種することにより効率的に GMM 特異的 T 細胞応答を誘起できることを見いだした。この結果は、脂質ワクチン開発のプロトタイプとして重要である。

TDM はマクロファージに発現した自然免疫受容体 Mincle に認識され、そのアジュバント作用を発揮する。TDM のアジュバント効果を検証する試みのなかで、GroMM がヒト Mincle の新たな天然リガンドとして機能することを見いだした。NFAT-GFP リポーターア

ッセイから、マウス Mincle は TDM を認識するが、GroMM に対する反応性はまったく認めなかった。したがって、Mincle の GroMM 認識には顕著な種差が存在することが分かった。そこでヒト Mincle を発現したトランスジェニックマウスを作製し、さらにマウス Mincle ノックアウトマウスと交配することにより、マウス Mincle 陽性マウス (mMincle マウス)、ヒト Mincle 陽性マウス (hMincle マウス)、Mincle を発現しないマウス (Mincle null マウス) を樹立した。Mincle null マウス由来の骨髄マクロファージは TLR4 リガンドであるリポ多糖に反応したが、TDM と GroMM に対する反応性を認めなかった。mMincle マウス由来骨髄マクロファージはリポ多糖と TDM に反応したが GroMM には反応しなかった。これに対して hMincle マウス由来骨髄マクロファージはリポ多糖、TDM、GroMM のすべてに反応し、顕著な腫瘍壊死因子アルファの分泌を認めた。最後にこれら 3 種のマウス皮膚に GroMM リポソームを接種したところ、hMincle マウスにおいてのみ好酸球の浸潤を主体とした炎症応答を認めた。以上の結果は、ヒトとマウスにおける結核免疫の違いを説明する分子機序として注目される。

〈引用文献〉

- ① Otsuka A, Matsunaga I, Komori T, Tomita K, Toda Y, Manabe T, Miyachi Y, Sugita M. (2008) Trehalose dimycolate elicits eosinophilic skin hypersensitivity in mycobacteria-infected guinea pigs. *J. Immunol.* 181(12): 8528-33.
- ② Komori T, Nakamura T, Matsunaga I, Morita D, Hattori Y, Kuwata H, Fujiwara N, Hiromatsu K, Harashima H, Sugita M. (2011) A microbial glycolipid functions as a new class of target antigen for delayed-type hypersensitivity. *J. Biol. Chem.* 286(19): 16800-6.
- ③ Matsunaga I, Naka T, Talekar RS, McConnell MJ, Katoh K, Nakao N, Otsuka A, Behar SM, Yano I, Moody DB, Sugita M. (2008) Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 283(43): 28835-41.

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 3 件)

- ① Hattori Y, Morita D, Fujiwara N, Mori D, Nakamura T, Harashima H, Yamasaki S, Sugita M. Glycerol monomycolate is a novel ligand for the human, but not mouse macrophage inducible C-type lectin, Mincle. (2014) *J. Biol. Chem.* 289(22):

15405-12.

DOI: 10.1074/jbc.M114.566489.

- ② Morita D, Miyamoto A, Hattori Y, Komori T, Nakamura T, Igarashi T, Harashima H, Sugita M. Th1-skewed tissue responses to a mycolyl glycolipid in mycobacteria-infected rhesus macaques. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441(1): 108-13.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.021.

- ③ Morita D, Hattori Y, Nakamura T, Igarashi T, Harashima H, Sugita M. Major T cell response to a mycolyl glycolipid is mediated by CD1c molecules in rhesus macaques. (2013) *Infect. Immun.* 81(1): 311-6.
DOI: 10.1128/IAI.00871-12

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 杉田昌彦、脂質免疫：結核菌やエイズウイルスに対抗する新しい獲得免疫システム、第 89 回日本感染症学会総会、2015 年 4 月 (京都)

- ② 杉田昌彦、CD1 と脂質免疫、第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2013 年 11 月 (東京)

- ③ Sugita M, Morita D, Igarashi T. Lipid-specific adaptive immunity in tuberculosis and AIDS. 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. 2012 年 8 月 (韓国、ソウル)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/SugitaLab.html>

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

五十嵐 樹彦 (IGARASHI, Tatumiko)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：90467431

中村 孝司 (NAKAMURA, Takashi)

北海道大学・薬学研究科 (研究院)・助教

研究者番号：20604458

原島 秀吉 (HARASHIMA, Hideyoshi)

北海道大学・薬学研究科 (研究院)・教授

研究者番号：00183567

(3) 連携研究者

()

研究者番号：