

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790492

研究課題名(和文) ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスを用いた粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of vaccine against Mycobacterium tuberculosis by intranasal immunization with replication-deficient recombinant human parainfluenza type 2 virus-Ag85B in mice.

研究代表者

渡邊 健太 (WATANABE, KENTA)

独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・研究員

研究者番号：20582208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：結核ワクチン抗原Ag85Bをヒトパラインフルエンザ2型ウイルスに組み込んだ新規結核ワクチン(hPIV2-Ag85B)の開発を行った。これを複数回、経鼻投与により免疫したマウスにおいて結核菌の攻撃接種を行ったところ、肺においては結核菌の菌数に顕著な減少が認められた。さらに、抗原特異的なIFN- γ 産生細胞数の上昇も認められた。また、このウイルスベクター自体がアジュバント効果を持ち、呼吸器粘膜の活性化に作用し得ることも示唆された。以上の結果より、rhPIV2-Ag85Bは新しい結核ワクチンとして有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Since Mycobacterium tuberculosis (Mtb) normally enters hosts via the mucosal surface of the lung, the best defense against Mtb is mucosal vaccines that are capable of inducing both systemic and mucosal immunity. In this study, I assessed the effectiveness of a novel mucosal TB vaccine using recombinant human parainfluenza type 2 virus (rhPIV2) as a vaccine vector in BALB/c mice. Replication-competent rhPIV2 (M gene-eliminated) expressing Ag85B (rhPIV2-Ag85B) was constructed by reverse genetics technology. Intranasal administration of rhPIV2-Ag85B induced Mtb-specific immune responses, and the vaccinated mice showed a substantial reduction in the number of CFU of Mtb in lungs and spleens. In addition, it was revealed that rhPIV2-Ag85B in itself has an adjuvant activity through the retinoic acid-inducible gene 1 receptor. These findings provide further evidence for the possibility of rhPIV2-Ag85B as a novel TB vaccine.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：粘膜免疫 結核ワクチン ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

結核は世界中で発生している感染症であり、その被害は甚大である。世界総人口の3分の1に当たる20億人が結核菌の感染者であるとされ、特にその多くがアジア・アフリカ地域に集中している。日本もまた、先進国の中では罹患率が比較的に高く、年間約3万人近くが新規に結核を発症し、2000人以上が死に至っている。こうしたことから、WHOにより日本は「中程度の蔓延国」に分類されており、効果的な対策が確立されていないのが現状である。現在世界中で用いられている結核ワクチンであるBCG (Bacille Calmette-Guerin)は、生後直ぐに接種され、結核に特異的な免疫反応は長期に及ぶ。しかしながら12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であることが海外のコホート研究で確認されている。また、BCGの追加接種が成人の結核予防に効果が無いことも知られている。このために成人で効果のあるワクチンの開発研究は世界中で行われており、現在までに、改良型BCG (J Clin Invest. 2005) やワクシニアウイルスあるいはアデノウイルスベクターを用いたワクチン (Nat Med. 2004, Infect Immun. 2006) 等が新しい結核ワクチンの候補として報告されているが、実用化の目処が立ったものはない。

一方、多くの病原体が消化器や呼吸器等の粘膜面から感染を成立させることから、感染防御には粘膜と全身の両者の免疫反応を誘導する粘膜ワクチンが必要であると考えられる。結核の感染防御においても同様であり、特に結核病変で重要であるのは肺を中心とした呼吸器における病態であることから、結核予防には呼吸器粘膜における結核菌特異的免疫反応の誘導が重要である。粘膜の免疫反応は、ワクチンの皮下接種といった全身投与ではその誘導が困難であり、粘膜面に直接的に抗原を伝達する必要がある。加えて結核菌は細胞内寄生細菌であることから、細胞性免疫を誘導するために細胞内で抗原を発現する必要もある。BCGは細胞内で抗原を発現することが可能であるが、現行のような皮内接種では粘膜免疫の誘導はほとんど期待できない。このため、小児や非感作動物で効果的なBCG投与とは別に、呼吸器粘膜にワクチン抗原を直接伝達する手法が結核予防には極めて有効であると考えられている。

2. 研究の目的

(1) 以上の背景から、本研究では呼吸器粘膜における有効なベクターとしてヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)を用いる手法を考案した。hPIV2はヒトの呼吸器粘膜に感染をするウイルスであるが、病原性は示さない。このhPIV2は、リバーシジェネティック法で作製され (Virology. 2001)、M遺伝子の欠損により生体内での複製をとめることが出来るため極めて安全なウイルス

ベクターである。本研究では、これに結核予防ワクチン抗原として有効であることが多く報告されている抗酸菌Ag85Bを組み込んだリコンビナントhPIV2 (rhPIV2-Ag85B)を用いることとした。このrhPIV2-Ag85Bを経鼻投与し、粘膜ワクチンとして結核の感染防御に有用なワクチンに利用できるのかをマウスおよびカニクイザルを用いた動物実験で検討し、高い結核予防効果を示す粘膜ワクチン型の結核ワクチンの開発を目指す。

(2) 本研究における結核ワクチンの開発において解明されるべき点は「誘導される免疫反応」と「結核予防効果」である。rhPIV2-Ag85Bにより呼吸器粘膜で発現したAg85B抗原が、実際にはどのように粘膜免疫を誘導するのかについて詳細に解析し、ワクチンとしての感染防御効果を評価する。加えて、ウイルスベクター自体に対する免疫応答についても細胞レベルで検討し、ワクチンとして用いた時の影響について明らかにする。さらに、現在多くの国で平均生後約3か月の時点でBCGが投与されていることから多くのワクチンにおいて初回のワクチン(prime)と2回目の接種ワクチン(boost)を異なる2種のワクチンを用いて使用するprime/boostワクチンの研究が行われているが、本研究においてもBCGワクチンによるprimeとrhPIV2-Ag85Bワクチンをboostに用いるprime/boostを投与された個体でのrhPIV2-Ag85B接種によるブースター効果ワクチンも試み、この効果の機所も解明する。またカニクイザルを用いた解析においては、最適なワクチン投与量の検定や、ワクチン投与に起因する副作用等も検討することで、ヒトでの臨床応用に繋がる解析結果を得ることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) rhPIV2-Ag85B投与によって誘導される粘膜免疫反応の解析

マウスはBALB/cを用い、rhPIV2-Ag85BまたはコントロールrhPIV2を2週間隔で4回、経鼻投与する。

一部の免疫マウスにおいては、投与後1週目に呼吸器粘膜でのAg85Bの発現を免疫組織学的に確認する。

免疫マウスは解剖後、肺縦隔リンパ節細胞および脾細胞を用いて以下の試験を行う。分離された細胞の培養上清から、抗原刺激特異的な種々のサイトカイン(IL-2、6、10、12等)やケモカイン(MIP-1、MCP-1、RANTES等)インターフェロン等を測定し、誘導された粘膜免疫について解析する。抗原刺激に関しては、リコンビナントAg85Bタンパク(rAg85B)とAg85Bを発現するリコンビナントワクシニアウイルス(rVV)を用いて行う。これらの測定は刺激細胞のmRNA発現においても検討する。脾細胞およびリンパ節細胞の刺激培養においては、CD4およびCD8細胞を分離し、

各々のインターフェロン（IFN- γ ）特異的な ELISPOT 反応においても検討する。また、免疫マウスでの Ag85B 特異的抗体（IgG および IgA）の産生を血清、肺胞洗浄液等から ELISA 法を用いて測定する。

（2）rhPIV2-Ag85B 免疫によるワクチン効果の検討

上述の免疫マウスにおいては結核菌攻撃接種実験も行う。結核菌は *Mycobacterium kurono* 株を用い、既報に基づき噴霧感染する。感染 7 週後に解剖し、防御効果を肺および脾臓における分離菌数で判定する。菌の分離は情報どおり小川培地を用い 4 週後のコロニー数を測定する。感染実験においてはリンパ節細胞および脾臓細胞でのサイトカイン、ケモカインおよびインターフェロンの発現を mRNA にて確認する。これら解剖材料は通常の HE 染色による組織標本と抗酸菌染色による組織標本を作製し、これにおいてもワクチンの効果を判定する。

（3）呼吸器上皮細胞を用いた hPIV2 ベクターに対する免疫応答の解析

気道上皮由来の培養細胞を用いた実験系を確立し、これに rhPIV2-Ag85B を感染させることで、ウイルスベクターに対する細胞の反応を分子レベルで詳細に解析する。これにより、ウイルスベクターの持つ特性がワクチン効果にどのような影響を与えるのかを明らかにすることができる。具体的には、以下の解析を行う。細胞が示す免疫応答を RANTES、IFN- γ 、IFN- β 等の発現、分泌を指標として解析し、hPIV2 を認識する細胞内レセプターおよびシグナル伝達系を同定する。

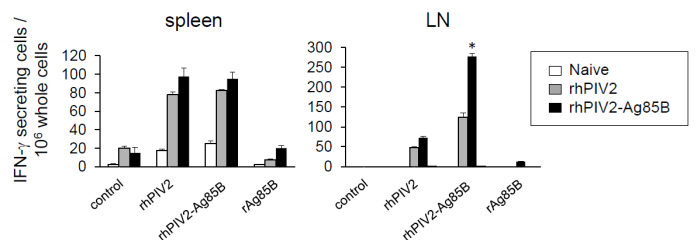
4. 研究成果

（1）ベクターウイルスのヌクレオプロテイン(NP)の直前に、代表的な結核抗原である Ag85B を挿入し、さらに M 遺伝子を欠損させることで、自己増殖能を欠いた組換え体を作成した。hPIV2 を含むモノメガウイルスの特徴として、蛋白発現量はその位置に依存し、ゲノムの 3 末端側から順に発現量が多くなることが報告されている。まずこのことを確認するため、作製した組換え体を細胞に感染させ、挿入した Ag85B 抗原の発現量の比較を行った。結果、最も 3 末端側に挿入された Ag85B は、ウイルス構成蛋白である NP よりも早期に検出され、また RNA で比較しても、その発現量が多いことが示された。このことから、このワクチンを免疫された場合、Ag85B がドミナントな抗原として宿主に提示されることが示唆された（図 1）。



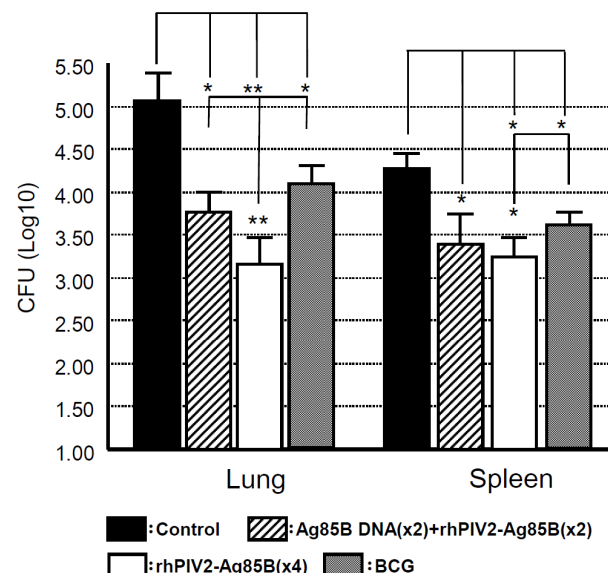
【図 1】

（2）次に、rhPIV2-Ag85B 免疫マウスにおいて誘導される免疫反応の解析を行った。マウスへの免疫は、2 週間隔で 4 回の経鼻投与を行い、最終免疫の 2 週後に結核菌 *kurono* 株で攻撃接種を行った。比較として、DNA ワクチンと hPIV2 を組み合わせた免疫、並びに既存の BCG による免疫も行い、感染 8 週後でその効果を比較した。各免疫マウスから分離した脾臓細胞と肺のリンパ節細胞を Ag85B 抗原およびウイルスベクターのみで再刺激し、それぞれの抗原に対する反応を比較したところ、脾臓細胞においては有意な差は認められなかったものの、肺リンパ節細胞においては、Ag85B 抗原が存在する分、より高い反応が認められた。このことから、*in vivo* においても、挿入抗原 Ag85B がドミナントな抗原として免疫を誘導していることが示唆された（図 2）。



【図 2】

（3）さらに、実際のワクチン効果を検討するため、免疫マウスに対する感染実験を行った。感染 8 週後に各臓器中の菌数を測定したところ、コントロールと比較して、rhPIV2-Ag85B を 4 回免疫マウスにおいて、菌数の顕著な減少像が確認できた。このワクチン効果は、既存の BCG 免疫群と比較しても有意に高く、効率的に菌の増殖が抑制されていることが示された（図 3）。



【図 3】

(4)そこで次に、rhPIV2-Ag85B ワクチンがこのように BCG と比較しても高いワクチン効果を示すことができた、その免疫学的なメカニズムを明らかにしようと考えた。結核においては、感染の早い段階でのエフェクター細胞の誘導が遅れ、このことによって感染初期に菌が一気に増殖してしまい、発症をコントロールできないという発症メカニズムが報告されている。すなわち、感染早期に菌の増殖を抑制させる免疫反応を誘導することが結核ワクチンには重要である。そこで、(3)同様にマウスを用いた感染実験を行い、この免疫応答の解析を行った。ただし、今回は感染後2週後にマウスを解剖し、感染早期において誘導される免疫反応を確認した。

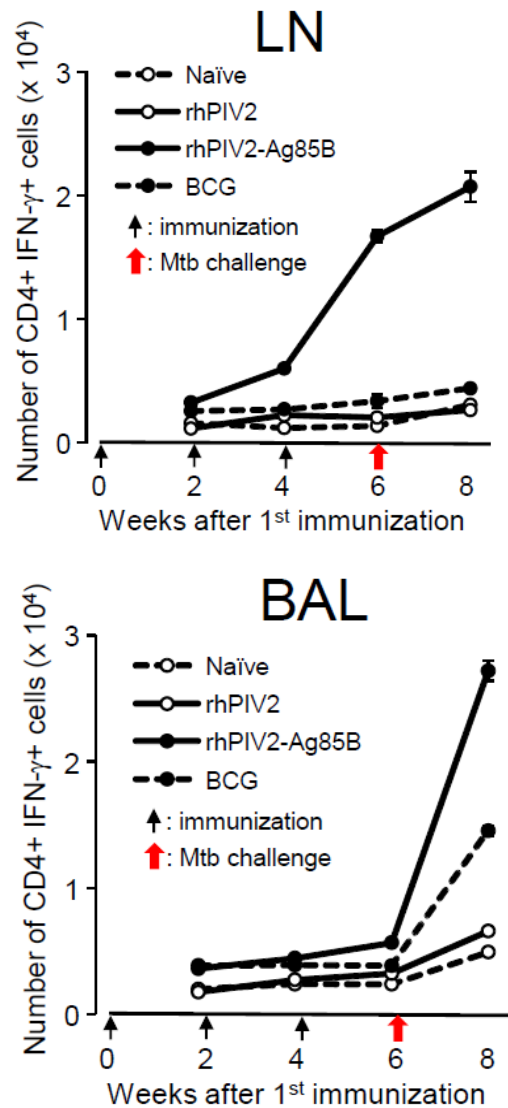
Ag85B 特異的 CD4 細胞の誘導を、抗原再刺激による IFN- γ の産生細胞数で評価したところ、何も免疫していないコントロールマウス、あるいは BCG を免疫したマウスでは、特に抗原特異的な CD4 細胞の誘導は肺リンパ節でも肺胞洗浄液中にも認められず、結核菌感染2週後においても有意な上昇は起こらなかった。一方、rhPIV2-Ag85B を免疫したマウスにおいては、免疫を重ねるごとに、まず肺リンパ節への抗原特異的 CD4 細胞の集積が認められ、結核菌感染が起こるとそれが一気に肺の方に動員されていることが示された。このことが、高いワクチン効果につながっているのではないかと推察できた(図4)。

(5)最後に、hPIV2 ウイルスベクターを認識しているレセプターの同定を行った。一般的に RNA ウイルスに対するレセプターとしては、RIG-I、MDA5 ならびに TLR3 が報告されており、これらに標的を絞り、まず siRNA によりこれらレセプターのノックダウン細胞を作成した。これに hPIV2 を感染させ、IFN- γ の産生誘導を確認したところ、RIG-I ノックダウン細胞においてのみ、有意な産生低下が認められた(図5)。

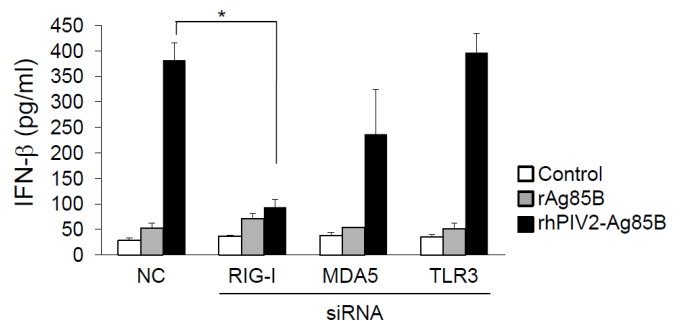
さらに、RIG-I 以下のシグナル伝達経路についての解析も行ったところ、ウイルス感染によって強く誘導されていた IRF3 のリン酸化が、RIG-I のノックダウンによって抑制されることから、RIG-I の下流シグナルとして IRF3 が深く関与していることが示唆された(図6)。また、IL-6、IL-15 といったサイトカインの産生上昇、ならびに代表的な co-stimulation molecule である ICAM-1 の発現も上昇していた。このことから、hPIV2 をベクターとして用いたワクチンでは、他の何らアジュバントを添加することなく自然免疫を活性化し、それに続く獲得免疫の活性化にも有利に働くことが推察された。

以上の結果より、本研究で開発した hPIV2 ワクチンは、挿入抗原 Ag85B を速やか、かつ大量に発現することで抗原特異的な免疫誘導を効率的に行い、ベクターに対する免疫反応の影響を受けることなく結核ワクチンと

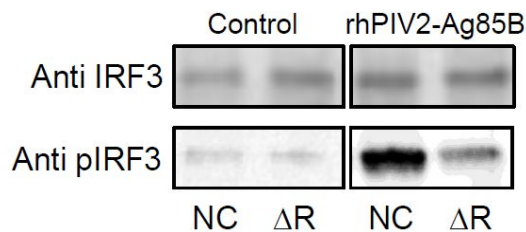
して機能することが示された。また、経鼻投与によって感染局所の呼吸器粘膜において速やかな抗原特異的免疫応答を誘導することで、感染早期から菌をコントロールすることが可能であり、このことが結核ワクチンとして効果的に機能した要因であると考えられる。



【図4】



【図5】



【図6】

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 1件)

Watanabe K (1番目), Matsuo K (9番目), Yasutomi Y (10番目), 他7名.

Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization

Vaccine

査読有り

2014 Mar 26;32(15):1727-35.

doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.108.

〔学会発表〕(計 4件)

渡邊健太、保富康宏

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスをベクターとした新規結核ワクチンの開発
第154回日本獣医学会学術集会

岩手県盛岡市

平成24年9月15日

渡邊健太、松尾和浩、保富康宏

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスをベクターとした粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発、第16回日本ワクチン学会学術集会

神奈川県横浜市

平成24年11月17~18日

渡邊健太、松尾和浩、保富康宏

ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスをベクターとした新規結核ワクチンの開発
第17回日本ワクチン学会学術集会

三重県津市

平成25年12月1日

Kenta Watanabe, Kazuhiro Matsuo, Yasuhiro Yasutomi

Intranasal immunization with recombinant vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immunity
第42回日本免疫学会学術集会

千葉県千葉市

平成25年12月11日~13日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 健太 (WATANABE, Kenta)

独立行政法人医薬基盤研究所

霊長類医科学研究センター

研究員

研究者番号: 20582208

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松尾 和浩 (MATSUO, Kazuhiro)

日本BCG研究所研究開発部

研究開発部長

研究者番号: 70521095