

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：84412

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590532

研究課題名(和文)二種類の新結核ワクチンによる新しいキラーT細胞分化機構とレセプターの解明

研究課題名(英文)receptor

研究代表者

岡田 全司 (Okada, Masaji)

独立行政法人国立病院機構(近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：40160684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌に対する抵抗力は主として結核菌に対するキラーT細胞により発揮される。(1)世界に先駆けて、HSP65 DNA+IL-12 DNAワクチン(HSP65ワクチン)及び15K Granulysin(Gra)ワクチンが強力なキラーT分化活性を示すことを明らかにした。(2)このことよりキラーTにGraレセプターの存在が強く示唆された。このレセプターの単離を試みている。(3)Graは産生するキラーTを中心にGra-Graポジティブフィードバックループを形成。(4)HSP65ワクチンとGraワクチンの相乗的キラーT分化と治療効果が示された。

研究成果の概要(英文)：Cytotoxic T cells against M. tuberculosis are one of most important immune cells for the protection of tuberculosis infection in human.

(1)It was demonstrated first that HSP65 DNA+IL-12 DNA vaccine (HSP65 vaccine) and 15K Granulysin vaccine exerted the activity of cytotoxic T cell differentiation factor in the present study. (2)Therefore, the presence of the receptor for granulysin was strongly suggested. We are now isolating the granulysin receptor. (3)We found granulysin-granulysin positive feedback loop. Granulysin was produced from CTL, and granulysin act on the differentiation of CTL. (4)HSP65 vaccine and Granulysin vaccine exerted synergistic therapeutic efficacy against TB infection in mice, and showed the synergistic differentiation of CTL.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：結核ワクチン Granulysin granulysinレセプター キラーT細胞分化 結核予防ワクチン 結核治療ワクチン ポジティブフィードバック レセプター単離

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置付け

米国 CDC (1998 年) 及び ACET は結核撲滅には、政府・学術機関・企業が一体となって新世代のワクチン開発の必要性を発表。BCG に代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。

結核患者 (940 万人/年) の世界的な増加、多剤耐性結核 (50 万人/年) や超薬剤耐性結核 (XDR-TB) が本邦でも大問題。BCG ワクチンは成人結核に無効であり、成人結核に有効な結核予防ワクチンや多剤耐性結核治療ワクチンが全世界で切望。

我々は BCG より 1 万倍強力な、結核予防 HSP65 (ヒト結核菌由来 heat shock protein 65) DNA+IL-12DNA ワクチンを開発した (HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan のエンベロープベクターを使用)。さらに、この HSP65 ワクチンは多剤耐性結核や XDR-TB に対し治療効果を発揮し (WHO 会議で高い評価) 強力なキラー T 分化活性を有する発見。一方、BCG はキラー T 分化活性が極めて低い (Vaccine. 2006)。抗結核効果がキラー T 分化誘導と相関 (Vaccine. 2009)。HSP はキラー T 細胞を活性化した (IL-12/IL-15 の存在下)。(岡田) (Figueiredo, Blood 2009)

一方、granulysin がキラー T 分化因子の一つであることを発見し、マウスで結核治療効果を示した (特許取得)。granulysin 遺伝子導入マウス (15K granulysin Tg と 9K granulysin Tg) を作製した (Human Vaccine 2010, in press)。これらの Tg マウスはキラー T 分化誘導活性と結核治療効果を初めて示す発見が独創的。

ヒト CD8⁺T 細胞は granulysin を発現する CD8⁺ CD57⁺ (陽性) T 細胞と、IL-15 に反応して著明な増殖反応を示す CD8⁺ CD57⁻ (陰性) T 細胞に分かれる (J. I. Priol 2006)。

世界に先駆けて岡田は、(a) リンホカイン [キラー T 細胞分化因子、B 細胞分化因子 (後に IL-6 と命名)] 産生ヒト T 細胞ハイブリドーマを初めて確立し、IL-6 の発見につながった (PNAS 1981, J.E.M 1983)。(b) キラー T 細胞分化因子を初めて発見 (J. I. 1979, PNAS 1981, J.E.M 1983)。(c) IL-6 はキラー T 分化因子の発見 (J. I. 1988)。生体内ヒト T 免疫解析 SCID-PBL/hu を初めて作製 (Cancer Res. 1997, Vaccine. 2007)。

(2) これまでの研究成果を踏まえ着想に至

った経緯

granulysin は産生するキラー T を中心に granulysin-granulysin positive feedback ループを形成して、結核菌に対する抵抗性を増強する pathway が存在する仮説の着想に至った。

一方、HSP65 ワクチンは IL-15 とキラー T 分化を相乗的に誘導した。分化したキラー T は IFN- γ を介し M より IL-12/15 産生を誘導することが報告されている。したがって、HSP65 ポジティブフィードバックの存在する仮説の着想に至った。

2. 研究の目的

- (1) 本研究において、我々が世界に先駆けて発見した強力な結核予防効果・治療効果を示す新しい HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチン (略して HSP65 ワクチン) 及びグラニューライシン (granulysin: キラー T 由来結核菌殺傷タンパク) ワクチンの二種類の結核ワクチンによる新しいキラー T 細胞分化機構を解明するとともにこれらのレセプターの単離解明の研究を行うことを目的。
- (2) 結核慢性感染症に対する免疫としてキラー T 細胞が最も重要である。granulysin によるキラー T 分化機構ならびに granulysin レセプターは不明であり、granulysin レセプターの単離及び遺伝子クローニングを行う。世界に先駆けて作製した granulysin 遺伝子導入マウスならびに SCID-PBL/hu を用いて解明する。
- (3) これら二種のワクチンによるキラー T 分化誘導過程が異なる結果を得たことより、granulysin-granulysin ポジティブフィードバック経路及び HSP65 ポジティブフィードバック経路を証明する。
- (4) 一方、HSP65 ワクチンの M、DC 上のレセプターの解析や MyD88 や TLR 活性化機構解明を行う。

3. 研究の方法

二種類の新しい結核ワクチンの多剤耐性結核に対するキラー T 細胞分化機構とそれらのレセプターの解明。

- (1) granulysin ワクチンと HSP65 ワクチンの多剤耐性結核、超薬剤耐性結核 (XDR-TB) に対する異なるキラー T 分化機構と相乗的キラー T 分化の解明。
- (2) granulysin ワクチンのキラー T 細胞分化機構の解明。
in vitro 及び in vivo (マウス、

granulysin 遺伝子導入マウス、サル)を用いた解析。

SCID-PBL/hu 及び granulysin Tg SCID-PBL/hu マウスを用いて、ヒト生体内抗結核作用解明。

- (3) granulysin レセプターの単離及び遺伝子クローニング。

granulysin レセプター発現 T 細胞クローン確立

酵母を用いた two-hybrid system で遺伝子解明。

(a) granulysin を GAL4-DNA binding domain との融合タンパクとして発現するプラスミドを構築する。(b) ヒト T 細胞、ヒト M、ヒト樹状細胞 (刺激有る無し) の cDNA ライブラリーを GAL-4-activator domain 融合タンパクで発現するように構築する。(c) granulysin と granulysin レセプターが結合した時にレポーターの lacZ の発現量が up。lacZ 発現量の多いクローンの遺伝子クローニングを行い、レセプターを解明する。

4. 研究成果

- (1) 世界に先駆けて HSP65 ワクチン及び 15K granulysin (Gra) が強力なキラー T 分化活性を示すことを明らかにした。Gra は IL-6 によるキラー T 分化に関与するが、一方、HSP65 ワクチンは IL-6 と異なるキラー T 分化過程の活性化が示された。一方、HSP65 ワクチンは Gra とキラー T 分化を相乗的に誘導し結核治療効果が示唆された。
- (2) 15K Gra はキラー T 分化因子としてキラー T 前駆細胞に作用した。このことより T 細胞上に Gra レセプターの存在が強く示唆された。
- (3) Gra は産生するキラー T を中心に Gra-Gra ポジティブフィードバックループを形成して、結核菌に対する抵抗性を増強する経路が存在することが示唆された。リコンビナント 15K Gra タンパクをヒト末梢血 T リンパ球を反応性細胞として用いる in vitro のヒト MLTC (mixed lymphocyte-tumor culture) の系に加えたところ、4 日後に抗原特異的キラー T 細胞の誘導が著明に増強された。すなわち、エフェクター・キラー T 細胞から 15K Gra が産生・分泌され、これがキラー T 細胞分化因子の作用を発揮し、キラー T 細胞前駆細胞からエフェクター・キラー T 細胞の分化を強く誘導する。
- (4) キラー T より産生される Killer secretory protein of 37 kD (KSP37) 蛋白と Gra はキラー T 分化相乗効果を示した。

- (5) すなわち、リコンビナント KSP37 の作製に成功し、これを MLTC の系に加えた。リコンビナント KSP37 は有意にキラー T 細胞の分化を誘導した。また KSP37 は IL-12 の産生、IFN- γ の産生及び IL-6 の産生も増強した。

さらにリコンビナント KSP37 とリコンビナント 15K Gra を MLTC の系に同時に加えると、相乗的なキラー T 細胞分化を誘導した。

- (6) 15K Gra に対するキラー T 細胞上のレセプター遺伝子を Yeast Two Hybrid System で解析した。

- (7) Human 15K Granulysin と相互作用をするタンパク質、Granulysin receptor の探索を目的として、タンパク質の相互作用解析手段として知られる Yeast Two-Hybrid 法を用いた検討を行った。なお、3 種類のヒト組織由来ライブラリー、Human Normal PB CD8+ Cytotoxic T Cells cDNA Library、Human Lymph Node cDNA Library、Universal Human cDNA Library を用いてスクリーニングを行った。

スクリーニングの結果、CD8+ Cytotoxic T Cells 由来ライブラリーから 0 個、Lymph node 由来ライブラリーから 3 個、Universal 組織由来ライブラリーから 23 個の陽性クローンを得た。これらの陽性クローンについて、ライブラリー由来遺伝子の抽出を行い、シーケンス解析を行った結果、9 種類の遺伝子を同定した。同定した遺伝子がコードするタンパク質が、Granulysin タンパク質と真に相互作用をするかを、真の陽性・偽陽性判定試験にて確認したところ、相互作用を示すものは 6 遺伝子だった。しかしながら、判定試験の結果からは、これらの 6 遺伝子由来のタンパク質と Granulysin との相互作用は強くないことが示唆された。

- (8) 具体的な成果

Bait 発現酵母の作製

Gal4 DNA-binding domain 融合 Granulysin 発現酵母 (Y2HGold [pGBKT7-GRN]) の作製を行い、ウェスタンブロット法で、Granulysin の発現確認を行った結果、Gal4 DNA-binding domain 融合 Granulysin と考えられる分子量、約 35 kDa の位置にバンドを確認した。

Prey 発現酵母の作製

3 種類の Gal4 activation domain 融合 Library タンパク質発現酵母 (Y187[pGADT7-Library]) について力価を測定したところ、3 種類すべての株で 2×10^7 cfu/ml 以上の力価があり、スクリーニングに使用する株として問題ないことを確認した。

Yeast Two-Hybrid ライブラリースクリ

ーニング

3 種類の Library タンパク質発現酵母 (Y187[pGADT7-Library]) について、それぞれ Granulysin 発現酵母 (Y2HGold[pGBKT7-GRN]) を接合させ、選択培地に播種することでスクリーニングを行った。接合効率、スクリーニングされるクローン数について、3 種類すべてにおいて十分な数値となり、十分量のクローン数でスクリーニングしたことを確認した。

Y187 [pGADT7-CD8+ Library] を用いたスクリーニングでは、1 次スクリーニングで 249 個の陽性クローンを得たにもかかわらず、その中から 2 次スクリーニングで陽性を示したクローンは 0 個だった。Y187[pGADT7-LymphLibrary] を用いたスクリーニングでは、1 次スクリーニングで 4 個の陽性クローンを得た。いずれもコロニーの形状は、青く大きく生育していた。また、その中で 2 次スクリーニングでも陽性を示したものは 3 クローンだった。

Y187[pGADT7-Universal Library] を用いたスクリーニングでは、1 次スクリーニングで 24 個の陽性クローンを得た。いずれもコロニーの形状は、青く大きく生育していた。また、その中で 2 次スクリーニングでも陽性を示したものは 23 クローンだった。

陽性クローンの解析

2 次スクリーニングにて陽性を示したクローン、計 26 クローンについてコロニー-PCR を行い、PCR 断片からシーケンス解析を行った。その結果、同一遺伝子が導入されているクローンが複数種観察されたため、遺伝子として 9 種類を確認した。

抽出された 9 遺伝子について、これを基に発現したタンパク質が本当に Granulysin タンパク質と相互作用をするのか(真の陽性)、あるいは単独でレポーター遺伝子の転写を自律的に活性化しただけなのか(偽陽性)を確認するための判定試験を行った。その結果、Homo sapiens SNAP-associated protein (SNAPIN), transcript variant 1 は、Granulysin 遺伝子を挿入していないプラスミド pGBKT7 DNA-BD cloning vector との同時形質転換群において選択培地にて青いコロニーの生育が見られ、自律活性化能を確認したため、偽陽性と判定した。また、Homo sapiens ataxin 10 (ATXN10) と Homo sapiens chromosome 13 genomic scaffold, alternate assembly CHM1_1.0 は、Granulysin 発現プラスミドとの同時形質転換群においてコロニーの生育が悪く、青色呈色がほとんど見られなかったため、Granulysin との相互作用が弱いあるいはほとんどないと考

えられ、陰性と判断した。

考察

本試験にて抽出された遺伝子は、すべて細胞内で機能を持つタンパク質をコードするもので、膜タンパク質をコードするものは得られなかった。Granulysin receptor が膜タンパク質であると仮定するならば、今回の結果は目的タンパク質を得られていないと結論付けられる。また、相互作用の強さからも、Granulysin receptor それ自身を得たとは判断しにくい。しかし Granulysin が、今回得られた遺伝子から発現したタンパク質と真に相互作用をするならば、抽出された遺伝子の名前が重要なのではなく、遺伝子から発現したタンパク質の構造が、granulysin receptor と何らかのホモロジーがあることが考えられる。今後のさらなる探索に加え、得られた遺伝子についてはアミノ酸配列からのシミュレーションも有効と考えた。

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 18 件)

Pitabut N, Okada M (13 番目/16 人中), Khusmith S, Keicho N. : Potential function of granulysin, other related effector molecules and lymphocyte subsets in patients with TB and HIV/TB coinfection. , International Journal of Medical Sciences. 査読有 10(8):2013;1003-1014.

岡田全司、結核におけるワクチンへの期待“次世代型感染症ワクチン”、最新医学、査読無、69(4): 2014、795-803

岡田全司、喜多洋子、橋元里実、西田泰子、仲谷均、西松志保、木岡由美子、結核予防(DNA)ワクチンの開発状況 予防接種 Q&A 改訂 3 版、小児内科、査読無、45、2013、281-283

岡田全司、結核の免疫反応「免疫学的機序からみた呼吸器疾患」、日本胸部臨床、査読無、72(12)、2013、1336-1345

岡田全司、はじめに(序論) 最新医学、査読無、68(11)、2013、2437-2438

岡田全司、小林信之、小出幸夫、座談会：結核の現状・問題点と最新の知見。最新医学、査読無、68(11)、2013、2439-2450
喜多洋子、岡田全司、ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた新規結核予防ワクチン開発及び臨床応用に向けて、最新医学、査読無、68(11)、2013、2479-2487

橋元里実、西松志保、岡田全司、多剤耐性結核治療ワクチンと T 細胞免疫、最新医学、査読無、68(11)、2013、2488-2495
Okada M(14 番目/15 人中), Kita Y, : The

study of novel DNA vaccines against tuberculosis: Induction of pathogen-specific CTL in the mouse and monkey models of tuberculosis. Human Vaccines and Immunotherapeutics, 査読有, 9(3):2013;515-525.

Y Kita, M Okada (15 番目/15 人中).: Novel therapeutic vaccines [(HSP65+IL-12)DNA-, granulysin- and Ksp37-vaccine] against tuberculosis and synergistic effects in the combination with chemotherapy. Human Vaccines and Immunotherapeutics. 査読有, 9(3):2013;526-533.

Siddiqi UR, Okada M, (7 番目/9 人中).: Elevated anti-tubercular glycolipid antibody titers in healthy adults as well as in pulmonary TB patients in Thailand. International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases, 査読有, 16(4): 2012;532-538.

Okada M (1 番目/17 人中).: Novel prophylactic vaccine using a prime-boost method and hemagglutinating virus of Japan envelope against tuberculosis. Clin Dev Immunol, 査読有, 2011 DOI: 549281

Okada M (1 番目/10 人中).: Anti-IL-6 receptor antibody causes less promotion of tuberculosis infection than anti-TNF- antibody in mice.: Clin Dev Immunol. 査読有, 2011 DOI: 404929

Pitabut N, Okada M (13 番目/14 人中), Khusmith S.: Decreased plasma granulysin and increased interferon-gamma concentrations in patients with newly diagnosed and relapsed tuberculosis. Microbiol Immunol, 査読有, 55(8):2011;565-573.

Okada M, Kita Y, et al.: Novel therapeutic vaccine: Granulysin and new DNA vaccine against Tuberculosis. Human Vaccines, 査読有, 7:2011;60-67.

Kita Y, Okada M, et al.: Development of therapeutic and prophylactic vaccine against tuberculosis using monkey and granulysin transgenic mice models. Human Vaccines, 査読有, 7:2011;108-114.

岡田全司、新たな結核ワクチン、感染・炎症・免疫、査読無、41、2011、46-51

[学会発表](計 30 件)

Okada M, A novel therapeutic vaccine against tuberculosis in the cynomolgus monkey model and clinical trial. 7th Vaccine & ISV Congress,

2013 年 10 月 27 日 ~ 2013 年 10 月 29 日, Barcelona, Spain

Okada M, Novel therapeutic vaccines against tuberculosis and their synergistic efficacy. 44th Union World Conference on Lung Health, 2013 年 10 月 30 日 ~ 2013 年 11 月 03 日, Paris, France

岡田全司、新しい結核ワクチンについて、第 89 回日本結核病学会総会 (招待講演), 2014 年 05 月 09 日 ~ 2014 年 05 月 10 日、長良川

Yoko Kita, Masaji Okada, The study of novel vaccines against tuberculosis and differentiation of CTL using monkeys and mice. 9th WCVII (招待講演), 2014 年 04 月 29 日、30 日, Genova, Italy

岡田全司、新しい結核予防・治療ワクチンの開発と T 細胞免疫研究 (今村賞受賞講演) 第 87 回日本結核病学会総会、2012 年 05 月 10 日、広島

Yoko Kita, Masaji Okada, グラニューライシン及び Ksp37 蛋白により、キラー T 細胞誘導及び抗腫瘍効果、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 09 月 20 日、札幌

Masaji Okada, Activation of CTL by novel vaccines (Granulysin-, Ksp37- and HSP65 DNA+ IL-12 DNA- vaccines) against tuberculosis in vivo. 第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 05 日、神戸

Okada, M, The study of novel vaccines against tuberculosis and differentiation of CTL using monkeys and mice. 8th WCVII 2012, 2012 年 06 月 05 日, Barcelona, Spain

Kita, Y., and M. Okada, Novel therapeutic vaccines [(Hsp65+IL-12)DNA-, granulysin- and Ksp37-vaccine] against tuberculosis and synergistic efficacy with chemotherapy. 8th WCVII 2012, 2012 年 06 月 06 日, Barcelona, Spain

Okada M, Novel therapeutic vaccines against tuberculosis and their synergistic efficacy using chemotherapy. The 43rd Union World Conference on Lung Health, 2012 年 11 月 13 日, Kuala Lumpur, Malaysia

Okada M, A Novel Therapeutic Vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) Against Tuberculosis Using the Cynomolgus Monkey Model. Gordon Research Conferences, 3 Jul, 2011, Lucca, Italy

M Okada, A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccines against Tuberculosis Using the Cynomolgus

Monkey Model and Mouse Model, 5th Vaccine and ISV Annual Global Congress, 2 Oct, 2011, Seattle, USA
M Okada, Novel therapeutic vaccines against tuberculosis using the cynomolgus monkey model. 42th IUATLD, 11 Nov, 2011, Lille, France
Okada M, NOVEL VACCINES AGAINST TUBERCULOSIS AND DIFFERENTIATION OF CTL. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conferences. US-JAPAN Cooperative Medical Science, 8 Dec, 2011, Saitama
Okada M, A novel therapeutic and prophylactic vaccines against tuberculosis by the activation of CTL in monkey models and murine models, Phacilitate vaccine forum(招待講演), 19 Sep, 2011, Singapore
M Okada, A Novel Therapeutic Vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis by the Augmentation of Immune Responses Using Monkey Models. 51th ICAAC, 17 Sep, 2011, Chicago, USA

〔図書〕(計 1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 4件)

名称：感染症治療剤
発明者：岡田全司、高森靖、安井正文
権利者：岡田全司、高森靖、安井正文、近畿中央胸部疾患センター院長
種類：特許
番号：8288509号
取得年月日：2012年10月16日
国内外の別：国外 米国

名称：感染症治療剤
発明者：岡田全司、高森靖、安井正文
権利者：岡田全司、高森靖、安井正文、近畿中央胸部疾患センター院長
種類：特許
番号：2243489号
取得年月日：2012年10月31日
国内外の別：国外 欧州

名称：感染症治療剤

発明者：岡田全司、高森靖、安井正文
権利者：岡田全司、高森靖、安井正文、近畿中央胸部疾患センター院長

種類：特許
番号：1484066号
取得年月日：2012年11月21日
国内外の別：国外 欧州

名称：感染症治療剤
発明者：岡田全司、高森靖、安井正文
権利者：岡田全司、高森靖、安井正文、近畿中央胸部疾患センター院長

種類：特許
番号：2485882号
取得年月日：2013年01月08日
国内外の別：国外 カナダ

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 全司 (OKADA, Masaji)
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
・臨床研究センター長
研究者番号：40160684

(2) 研究分担者

鈴木克洋 (SUZUKI, Katsuhiro)
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
・統括診療部長
研究者番号：00206468

露口一成 (TSUYUGUCHI, Kazunari)
国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
・臨床研究センター・感染症研究部長
研究者番号：00359308

吉田栄人 (YOSHIDA, Shigeto)
金沢大学・医薬保健研究域薬学系・教授
研究者番号：10296121

大原直也 (OHARA, Naoya)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70223930

(3) 連携研究者

()

研究者番号：