

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04869

研究課題名(和文) アカゲザル脂質免疫研究を基盤にした、新たな抗結核ワクチンの開発

研究課題名(英文) Lipid immunity in rhesus monkeys and development of a new anti-tuberculosis vaccine

研究代表者

杉田 昌彦 (SUGITA, Masahiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：80333532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：結核は依然としてグローバルな感染症であり、現行唯一の抗結核ワクチンであるBCGワクチンに代わる新たな抗結核ワクチンの開発は、社会的急務と言える。研究代表者は結核菌脂質を標的とした新しい免疫応答の研究を展開し、その成果をもとに抗結核脂質ワクチンの可能性を追究してきた。本研究において、抗結核脂質ワクチン候補を絞り込み、その生合成経路や宿主体内で誘起される免疫応答についてサルやモルモットを用いた研究を展開し、今後につながる基礎知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Tuberculosis remains to be a global threat to humans. The only currently available anti-tuberculosis vaccine, BCG, has been used for decade, but development of alternative vaccines is definitely required. The principal investigator has attempted to develop a new type of lipid-based vaccines against tuberculosis. In this study, the vaccine candidate lipid was studied extensively in terms of its biosynthesis as well as its immunological properties. The findings obtained in this study provide an important basis for the development of anti-tuberculosis lipid vaccines.

研究分野：感染免疫

キーワード：結核 脂質ワクチン

1. 研究開始当初の背景

結核の再興が社会問題化し、1999年に結核緊急事態宣言が出されたことは記憶に新しい。また近年増え続けるエイズ患者においては、結核を高率に発症しその予後を左右するとともに、結核菌の reservoir population として社会的影響が危惧される。抗結核ワクチンとして弱毒化生菌ワクチンである BCG が長らく使用されてきたが、成人結核（二次結核）に対する効果は概ね不確実であり、しかもエイズ患者など免疫不全患者には使用できないことから、BCG 接種は平成 15 年度より行政的にも大きく後退した。まさに、BCG に替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に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、しかも何十年にわたって宿主体内で生存することから、その間に塩基変換によるタンパク質抗原エピトープの変異を誘導することが可能である。さらに、タンパク質抗原に対する免疫応答を担う中心的リンパ球である CD4 陽性 T 細胞はエイズ患者において激減しているため、これらの患者ではタンパク質ワクチンの効果が期待できない。これらの事実は、現在精力的に進められている抗結核タンパク質ワクチンの開発において大きな障壁となりうる事が予想され、社会的要請である結核制御に向けて、新しい視点に立ったワクチン開発への期待が高まっている。

上記のような社会的背景も鑑み、研究代表者の杉田は、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「グループ 1 CD1 (CD1a, CD1b, CD1c) 分子」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構築に大きく貢献してきた。この結核菌脂質特異的グループ 1 CD1 拘束性 T 細胞群の活性化を基盤とした新ワクチン開発が期待される。

2. 研究の目的

これまでの研究から、有望な抗結核脂質ワクチン候補のひとつとしてグルコースモノミコール酸を絞り込んだ。本研究においては、グルコースモノミコール酸の生合成経路と免疫認識機構を明らかにすることにより、新ワクチン開発の基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) リコンビナント Ag85A の調整と結晶構造解析

Ag85A 遺伝子を pET21c プラスミドベクターに挿入し、大腸菌 Rosetta2 (DE3) pLysS 株を用いてリコンビナントタンパク質の生合

成を行った。IPTG 存在下培養によりタンパク質発現を誘導したのち大腸菌を回収し、ソニケーション操作で破碎した。破碎液上清を回収し、ニッケルカラムにロードしたのち、300 mM イミダゾールによりリコンビナントタンパク質を溶出した。溶出サンプルの分子アイデンティティと収量ならびに純度は、モノ Q クロマトグラフィー、SDS-PAGE、クマシー染色により確認した。精製 Ag85A リコンビナントタンパク質をグルコース存在下で結晶化母液と混合し、得られた結晶を理研 SPring-8 大型放射光施設で解析し、結晶構造データを収集した。

(2) 抗酸菌培養と脂質精製

American Type Culture Collection より得た抗酸菌株 *M. avium* (serovar 4) を用い、7H9 メディウムをベースとした液体培地で培養した。脂質の精製は既報 (*J Biol Chem* 283:28835, 2008) の記載に従い行った。菌体より抽出した総脂質をクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) に溶解したのち冷アセトンを加え、不溶画分を回収した。さらにこの画分を薄層クロマトグラフィーにより展開し、グルコースモノミコール酸を含んだ分画を単離精製した。精製したグルコースモノミコール酸をマススペクトロメトリに供し、分子確認を行った。また得られた精製グルコースモノミコール酸を、ステアリン酸付加オクタアルギニンを含むリポソームに封入し、モルモット皮内接種実験に用いた。

(3) モルモット実験

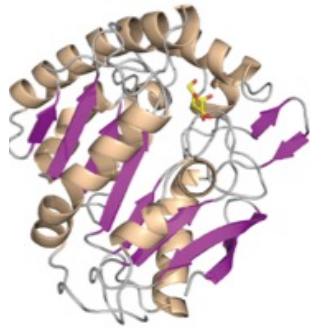
動物実験は法令に基づき学内当該委員会の承認の上遂行した。抗酸菌株生菌 (1×10^8 CFU) あるいはこれに相当する加熱処理死菌を接種し、6 週後に GMM (5 mg) 含有リポソームあるいはコントロールリポソームを Hartley モルモット皮内接種した。以後経時的に皮膚硬結径を測定した。

4. 研究成果

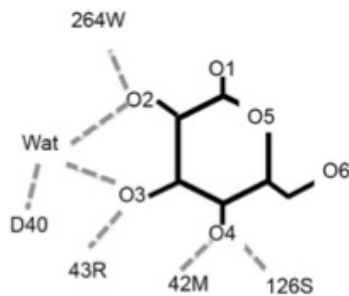
(1) グルコースモノミコール酸合成酵素の同定とその構造解明

リコンビナント酵素を用いた試験管内での酵素活性実験によりミコール酸転移酵素のひとつである Ag85A がグルコース基質へのミコール酸転移を触媒する能力を有することが示唆されていた (*J Biol Chem* 283:28835, 2008)。しかし、本来 Ag85A は二分子のトレハロースモノミコール酸を結合し、一方のトレハロースモノミコール酸から他方のトレハロースモノミコール酸へのミコール酸転移の結果としてトレハロースジミコール酸生成を触媒すると考えられており、グルコースモノミコール酸生成の実態や詳細な分子機序は不明であった。そこで本研究において Ag85A とグルコース基質の共結晶構造の解明を目指した研究を展開した。リコンビナント Ag85A タンパク質をグルコース存在下で結晶

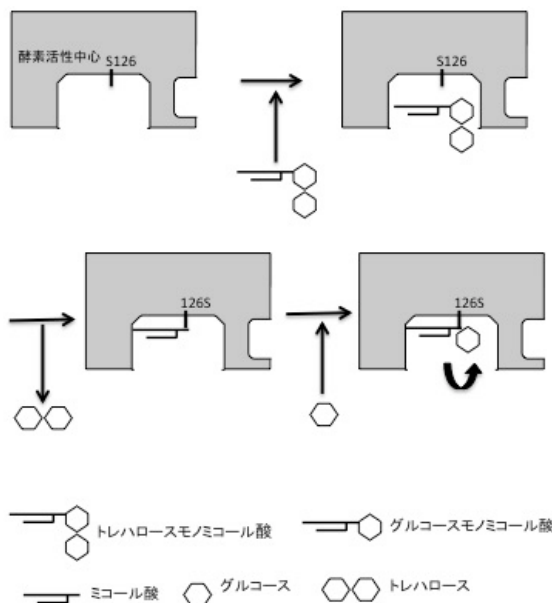
化し、X線結晶構造が決定された。



さらにグルコース一分子が126番目のセリンを主体とした酵素活性中心に結合していることを確認した。



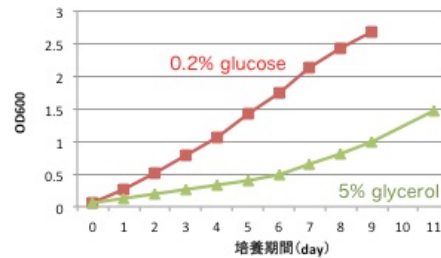
このことはグルコースがAg85Aの基質として働くことを構造学的に支持した。さらにグルコースモノミコール酸合成の基質であるグルコースとトレハロースジミコール酸合成の基質であるトレハロースモノミコール酸が酵素活性中心において競合することにより、それぞれの酵素反応産物のreciprocalな産生がもたらされるという従来の想定 (*J Biol Chem* 283:28835, 2008) が構造学的に実証された。以上の結果をもとに、下記の分子モデルを提唱した。



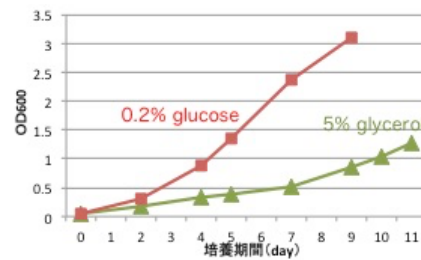
(2) 感染個体におけるグルコースモノミコール酸新生と免疫応答の実証

グルコースモノミコール酸を産生しない抗酸菌の人口培養系を確立し、これをモルモット個体に接種することにより個体内でグルコースモノミコール酸産生が生じることをそれに対する免疫応答を指標に評価する研究を展開した。

7H9 に市販の ADC エンリッチメントを添加した標準人工培地においては 0.2% のグルコースが存在する。したがって、これを用いて抗酸菌株を培養した場合、グルコースモノミコール酸の産生が生じる。そこで炭素源であるグルコースをグリセロールに代え培養を試みた。その結果、グリセロール添加培地においてはグルコース添加培地における場合より抗酸菌の発育は遅延したものの、抗酸菌の増殖を認めた。

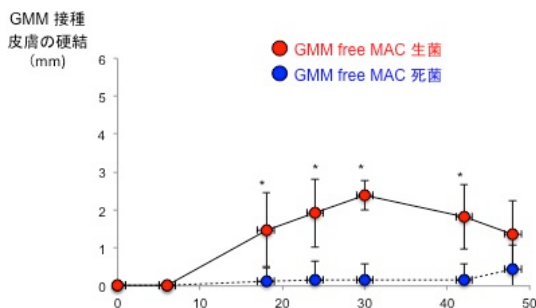


またこの抗酸菌を回収し、脂質解析を行ったところ、グルコースモノミコール酸の産生を認めなかった。一方、この抗酸菌を再度グルコース添加培地に移したところ、順調な生育ならびにグルコースモノミコール酸の産生を認めた。



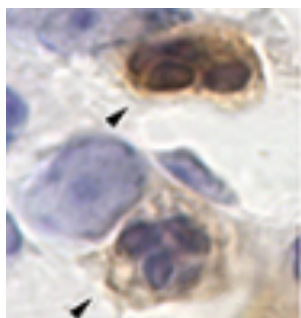
このようにして準備したグルコースモノミコール酸非産生抗酸菌株をモルモットに接種した。また同菌を熱処理により死菌としたサンプルを比較対照として接種した (各群 3 匹のモルモットを使用)。6 週後にグルコースモノミコール酸封入リポソームを皮内接種し、経時的に接種部位の硬結径をモニターしたところ、抗酸菌生菌接種個体においてはグルコースモノミコール酸に対する特異的組織応答が認められたのに対し、死菌接種個体においてはグルコースモノミコール酸に対する応答が検出されなかった。このことから、グルコースモノミコール酸を産生していなかった抗酸菌株生菌が、感染後宿主内のグルコースを利用してグルコースモノミコール

酸を新生し、その結果としてグルコースモノミコール酸特異的 T 細胞応答が誘起されたと結論づけた。

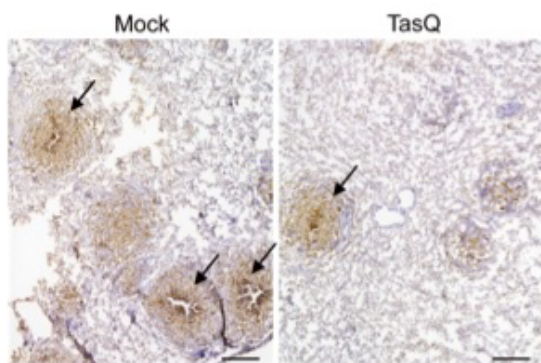


(3) 結核肉芽腫形成における好中球 S100A9 タンパク質の機能解明

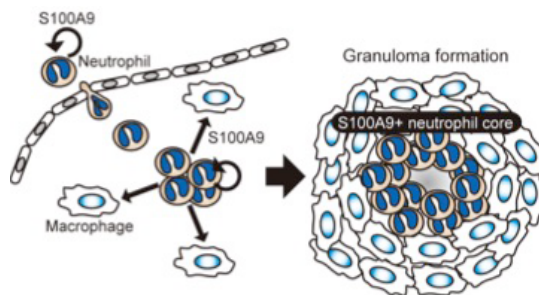
本研究を推進する過程で、結核特有の病態である肉芽腫形成の機序を理解することが肝要と考え、その解析を進めた。モルモット結核モデルより肉芽腫組織を採取し、それを免疫原としてマウスモノクローナル抗体を作製したところ、肉芽腫中心部に存在する好中球に特異的に反応する抗体クローンを得た。



生化学的解析からこの抗体クローンの認識抗原が S100A9 タンパク質であることを見出した。さらにモルモット結核モデルにおいて S100A9 阻害剤であるタスキニモドの効果を検証したところ、タスキニモド投与個体においては肉芽腫形成が顕著に阻害されることを見出した。



S100A9 タンパク質は S100A8 タンパク質とヘテロダイマーを形成して好中球やマクロファージの活性化等、急性炎症に関与すると考えられてきた生理活性物質である。これが結核慢性病態に関与する可能性が出てきた。その点において、タスキニモドがヒトがんの治療薬として注目されていることは興味深い。未だ詳細な機序解明には至っていないが、好中球 S100A9 分子が結核肉芽腫形成の鍵分子として機能する可能性が高い。これらの研究結果をもとに、結核制御において抗結核脂質ワクチンとタスキニモドの併用の発想が得、その検証を開始するに至った。



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 3 件)

① Yuya Yoshioka, Tatsuaki Mizutani, Satoshi Mizuta, Ayumi Miyamoto, Satoru Murata, Toshiaki Ano, Hiroshi Ichise, Daisuke Morita, Hiroyuki Yamada, Yoshihiko Hoshino, Tatsuaki Tsuruyama, and Masahiko Sugita. Neutrophils and the S100A9 protein critically regulate granuloma formation. *Blood Advances* 査読有、1 巻、2016、184-192
DOI: 10.1182/bloodadvances.2016000497

② 藤原永年、杉田昌彦、結核菌脂質の特徴と機能、*結核*、査読なし、改訂版、2017、98-121

③ 水谷龍明、杉田昌彦、肉芽腫形成を制御する S100A9 陽性好中球、*医学のあゆみ*、査読なし、263 巻、2017、671-672

[学会発表] (計 1 件)

① 水谷龍明、吉岡佑弥、大内結貴、森田大輔、杉田昌彦、結核肉芽腫形成を制御する好中球機能の解明、生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会、第 90 回日本生化学会)、2017

[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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.infront.kyoto-u.ac.jp/ex_ivr/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・再生医科学研究所・
教授
研究者番号： 80333532

(2) 研究分担者

中村 孝司 (NAKAMURA, Takashi)
北海道大学・薬学研究院・助教
研究者番号： 20604458

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし