

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10035

研究課題名(和文)ライソゾーム逸脱型BCG-Tokyo新規ワクチン開発と免疫学的評価

研究課題名(英文)Development of novel recombinant BCG vaccine and its immunological analysis

研究代表者

本多 三男 (HONDA, Mitsuo)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：20117378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：BCGに結核菌由来のAntigen 85Bを組み込んだ組換えBCG (rBCG-Mbov85B)を作成した。rBCG-Mbov85Bは、BCGに比較して1.8倍のAntigen 85B抗原を発現した。結核菌の感染実験では対照群と比較して、BCG、rBCG-Mbov85B、接種群で、肺と脾臓内の生菌数が減少した。また、BCGにGFPを発現させたrBCG-GFPをしTHP-1に感染させ、タイムラプス動画を撮影し貪食や、細胞内での動態を観察した。その結果、rBCG-GFPはTHP-1内で少なくとも48時間は生存することが観察されたが、細胞内での増殖、あるいは殺菌の観察はできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結核は世界3大感染症の一つであり、地球上で最も多くの人類が感染している感染症である。100年近くBCGが結核のワクチンとして使用されてきたが、その効果は限定的である。結核は空気感染するため、感染防御のゴールドスタンダードとしてのワクチンは非常に重要である。本研究において、現行のBCGよりも効果が期待できる新たな組換えBCG (rBCG-Mbov85B)を開発することができた。また、GFPを発現するBCG (rBCG-GFP)はBCGによる免疫誘導メカニズムを詳細を検討する上で有効なツールとなりうる。日本を含め、世界的な結核罹患率を減少させるために、結核に対する免疫の理解を進めることは重要である。

研究成果の概要(英文)：We developed a new recombinant BCG (rBCG) based vaccine encoding the Ag85B protein of *M. tuberculosis*, termed rBCG-Mbov85B. Western blot analysis of rBCG-Mbov85B lysates showed 1.8 times higher expression of an Antigen 85B than parental BCG lysates. BCG or rBCG-Mbov85B immunization significantly reduced bacterial load in lungs and spleen compared with naive animals. We also developed another new recombinant BCG, which expressed GFP, termed rBCG-GFP, to observe the phagocytosis of immune cells. We challenged the rBCG-GFP to THP-1, then observed the intracellular dynamics of rBCG-GFP. The intracellular rBCG-GFP could be detected at least for 48 hours. The proliferation or sterilization of rBCG-GFP could not be observed during our observation.

研究分野：感染免疫

キーワード：結核 BCG 細胞性免疫 ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染症は現代において、ますます、人類の幸福に対する大いなる脅威である。結核は過去の病気と捉えられがちであるが、厚生労働省の過去 10 年間の資料によると、現在でも結核の集団感染が年間 25~50 程度発生している。多くの先進諸国の結核罹患率は、低蔓延国の水準である 10 を下回っているが、わが国では 14.4(平成 27 年)と未だ中蔓延国に留まっている。さらに、高齢者の結核患者増加、HIV/AIDS による細胞性免疫の低下や、関節リウマチや潰瘍性大腸炎の標準的治療として普及がめざましい TNF- α 抗体薬に代表される分子標的治療も結核蔓延のリスクとなる。結核は空気感染するため、感染防御対策が重要である。感染防御のゴールドスタンダードは、ワクチン接種である。結核に対する唯一のワクチンである BCG は、20 世紀の初頭から、全世界で使用されており、安全性が高く、安価で安定供給できる。しかし、BCG は小児の結核の重症化予防には効果的であるが、成人においては十分な結核発症予防効果がないことが臨床的に報告されている。したがって、より効果的な結核ワクチンが求められており、現在多くの新規結核ワクチン開発が進められているが、実用化には至っていない。

2. 研究の目的

結核菌は細胞内寄生菌であるため、有効な結核防御には特異的**細胞性免疫**を誘導することが重要である。我々は、現行の BCG ワクチンは結核特異的 CD4 陽性ヘルパー T 細胞を誘導するが、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の誘導が弱いことを明らかにした。すなわち、既存の BCG は結核特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の誘導が不十分である可能性がある。そこで、より効率的に結核特異的細胞性免疫を誘導可能なワクチンを組換え BCG の手法を用いて開発することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

我々がこれまでに開発した抗酸菌で発現可能なシャトルベクターを用いて結核菌由来抗原の一つである Antigen 85B を BCG-東京株に発現させ、新たな結核抗原を付与した組換え BCG - Tokyo 株を作製した。組み込んだ抗原の BCG での発現をウェスタンブロット法で確認した。この新たな組換え BCG (rBCG-Mbov85B)を我々が以前に開発した組換え BCG (rBCG-Mkan85B)と同様にマウスに接種し、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導をフローサイトメトリーを用いて解析した。また、一定期間後に、*Mycobacterium tuberculosis* を感染させ、解剖し、肺、脾臓内の生菌数を解析し、感染防御能を比較した。

さらに、生体内での BCG の貪食や抗原提示を詳細に検討するため、GFP を発現する BCG (rBCG-GFP)を作成した。rBCG-GFP を *in vitro* で THP-1 細胞に感染させ、タイムラプス動画を撮影した。

4. 研究成果

新たに作成した組換え BCG (rBCG-Mbov85B)の Antigen 85B の発現をウェスタンブロットで解析した。その結果、rBCG-Mbov85B は BCG に比較して、Antigen 85B を 1.8 倍程度、発現していた。以前に作成した rBCG-Mkan85B は 9 倍程度の発現を示した。*in vivo* での免疫誘導能を解析するために、マウスに rBCG-Mkan85B もしくは rBCG-Mbov85B をそれぞれ接種した。免疫したマウスの脾臓細胞を採取し、エピトープペプチドで *in vitro* で刺激し、種々のサイトカインを産生する細胞をフローサイトメトリーで

検出した。その結果、rBCG-Mkan85B を接種したマウスの方が rBCG-Mbov85B を接種したマウスよりも、抗原特異的に複数のサイトカインを同時に産生する polyfunctional CD4 陽性ヘルパーT 細胞が多く検出された。

Mycobacterium tuberculosis の感染実験においては、ワクチン非接種マウスに比較して、BCG、rBCG-Mbov85B、rBCG-Mkan85B を接種したマウスのグループは、肺と脾臓内の生菌数が減少した。

BCG の貪食、抗原提示を詳細に検討するために、BCG に GFP を発現させた rBCG-GFP を作成した。抗酸菌で発現可能なプラスミドに GFP を組み込み、BCG にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入した。得られた BCG を 7H9 培地、7H10 培地で培養し、蛍光顕微鏡下で発光していることを確認した。rBCG-GFP を in vitro で THP-1 に感染させ、タイムラプス動画を撮影し、THP-1 による rBCG-GFP の貪食や、細胞内での動態を観察した。その結果、rBCG-GFP は THP-1 内で少なくとも 48 時間は生存することが観察されたが、細胞内での増殖、あるいは殺菌の観察はできなかった。今後、実験条件を再検討する必要がある。さらに、rBCG-GFP をマウスに接種して、in vivo での観察を計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Komine Aizawa Shihoko, Jiang Jiansheng, Mizuno Satoru, Hayakawa Satoshi, Matsuo Kazuhiro, Boyd Lisa F., Margulies David H., Honda Mitsuo	4. 巻 49
2. 論文標題 MHC-restricted Ag85B-specific CD8+ T cells are enhanced by recombinant BCG prime and DNA boost immunization in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1399 ~ 1414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/eji.201847988	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相澤（小峯）志保子、Jiansheng Jiang、松尾和浩、Lisa F. Boyd、David H. Margulies、本多三男
2. 発表標題 組換えBCGワクチンによる抗酸菌特異的免疫の誘導と結核防御効果
3. 学会等名 第88回実験結核研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相澤（小峯）志保子、早川 智、本多三男
2. 発表標題 組換えBCGワクチンによる抗酸菌特異的免疫効果誘導
3. 学会等名 第3回抗酸菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shihoko Komine-Aizawa, Satoru Mizuno, Satoshi Hayakawa, Kazuhiro Mizuno, Mitsuo Honda
2. 発表標題 Induction of antigen 85B-specific CD8+ T cells by recombinant BCG protects against mycobacterial infection
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shihoko Komine-Aizawa, Satoru Mizuno, Satoshi Hayakawa, Kazuhiro Matsuo, Mitsuo Honda
2. 発表標題 Recombinant BCG over-expressed Mycobacterium antigens enhanced Ag85B-specific CD8+ T cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究分担者	相澤 志保子 (Aizawa Shihoko) (30513858)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	