

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08939

研究課題名（和文）抗酸菌の防御における細胞性免疫応答の解析と新規ワクチン開発

研究課題名（英文）Study on cellular immunity against Mycobacterium and development of new vaccine

研究代表者

相澤 志保子 (AIZAWA, Shihoko)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：30513858

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：患者数の増加が続いている非結核性抗酸菌症（NTM症）の感染防御対策として、NTMに対する細胞性免疫の解析と新たなワクチンの開発を目指した。我々が作成したrBCG-Mkan85BとDNAワクチン（DNA-Mkan85B）をマウスに接種し、NTM症の原因の一つである、*Mycobacterium kansasii*を感染させた。rBCG-Mkan85BとDNA-Mkan85Bを接種したマウスでは、*M. kansasii*感染後の肺内の菌数が非接種群、BCG接種群のマウスよりも低下した。また、抗原特異的ヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞を誘導できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

rBCG-Mkan85B/DNA-Mkan85B接種はNTMに対する新たなワクチンとして有効である可能性が示唆された。NTM症はヒトからヒトへ感染することはないが、治療抵抗性である。本研究の成果は、世界的に患者数が増加傾向にあるNTM症に対する防御戦略開発において、新たな緒となりうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to analyze cellular immunity against NTM and to develop a new vaccine to protect against infection with non-tuberculous mycobacterial tuberculosis (NTM). We examined whether our rBCG Mkan85B/DNA vaccine (DNA-Mkan85B) system could be a novel vaccine against NTM in mice. rBCG Mkan85B/DNA-Mkan85B inoculated mice showed a significant decrease in the number of bacteria in the lungs after *M. kansasii* infection. The number of bacteria in the lungs of rBCG-Mkan85B/DNA-Mkan85B immunized mice was lower than that of mice in the control or BCG-vaccinated groups. In addition to antigen specific helper T cells, cytotoxic T cells could be induced. These result suggest that rBCG-Mkan85B/DNA Mkan85B may be an effective novel vaccine candidate against NTM.

研究分野：感染免疫

キーワード：抗酸菌 BCG 組換えBCG 細胞性免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、非結核性抗酸菌症患者数が世界的に著しく増加している。非結核性抗酸菌(non-tuberculosis mycobacteria:NTM)は結核菌群とらい菌以外の約 150 種類の抗酸菌の総称であるが、ヒトに病原性を有するのは約 50 種程度といわれている。NTM はヒト-ヒト感染せず、水系や土壌などの環境中に豊富に存在する菌から感染が成立すると考えられている。2014 年の呼吸器疾患拠点病院に対するアンケート調査によると、肺 NTM 症の罹患率は 14.7/10 万人と結核の罹患率を上回ったことが報告された。今後も人口の高齢化、肺結核の低蔓延化に伴い NTM 症患者数が増加することが推定されている。

NTM は結核菌同様に細胞内寄生菌であるため、これらの菌の排除には特異的細胞性免疫を誘導することが重要である。肺に基礎疾患を有する患者に加えて、AIDS、白血病、臓器移植後など Th1 系のサイトカインの異常がある患者での NTM 症罹患率は高い。Th1 細胞分化のマスターレギュレーターである T-bet の欠損マウスでは野生型に比べて肺 MAC 症の増悪がみられることも報告されている。しかし、近年、肺に器質的疾患がなく、免疫学的にも問題ないとみられる中高年女性での NTM 症が多く報告されている。現在、NTM 症の疫学調査、診断法の開発、耐性菌の検出方法の開発などが進められているが、*M. avium* complex (MAC)や *M. kansasii* などの NTM に対する特異的細胞性免疫応答に関しては不明な点が多い。そのうえ、NTM 症は結核と異なり空気感染はしないが、結核よりも抗結核薬の効果が低く治療抵抗性であることが知られている。特に耐性菌の場合には治療に難渋する。さらに治療終了後の再燃・再感染も問題となる。感染症対策のゴールデンスタンダードは感染予防である。結核には、成人における有効性は限定的ではあるが、BCG ワクチンがあるのに対し、現在のところ NTM に対する予防法は確立されていない。

NTM のような細胞内寄生菌の排除には CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の誘導が重要である。そのためには、MHC クラス I に効率よく抗原提示されるワクチンが求められる。その方法の一つとして外来抗原遺伝子を BCG に組み込んで強発現させる、いわゆる組換え BCG の手法がある。我々はこれまでに、現行の BCG ワクチンは結核特異的 CD4 陽性ヘルパー T 細胞を強力に誘導するが、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導は弱いという知見をふまえ、BCG に *Mycobacterium kansasii* の antigen 85B (Ag85B) を組み込んだ新規組換え BCG (rBCG-Mkan85B) を作成した (Komine-Aizawa S, et al. 2019. Eur J Immunol. 特許第 6451933 号)。Ag85B は抗酸菌が生体内に感染した際に最も多く分泌する蛋白の一つであり、抗酸菌全般に広く保存されているが、菌種によってアミノ酸配列が若干異なる。結核菌と BCG の Ag85B は全く同一の配列であるが、*M. kansasii* と結核菌、BCG の Ag85B の相同性は 89% である。rBCG-Mkan85B は既存の BCG に比べて約 9 倍の Ag85B を生体内に産生する。我々はこれまでの研究で、rBCG-Mkan85B 接種はマウスの抗原特異的細胞性免疫を誘導することを明らかにした。さらに、Ag85B における 2 つの CD8 エピトープを新規に見出した (Komine-Aizawa S, et al. 2019. Eur J Immunol. 特許第 6828871 号)。

2. 研究の目的

本研究では、我々が作成した rBCG-Mkan85B と発見した CD8 エピトープを用いて、NTM 症における MHC クラス I への抗原提示、特異的 CD8 細胞傷害性 T 細胞の誘導などの細胞性免疫の解析を行うことを目的とした。我々が見出した CD8 エピトープペプチドのアミノ酸配列は結核・BCG と *M. kansasii* とでは、2 アミノ酸が前後入れ替わっている。しかし、どちらの配列も同様にエピトープとして機能することが明らかになっており、日本で罹患率の高い *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. abscessus* は *M. kansasii* と同じ配列を有している (Komine-Aizawa S, et al. 2019. Eur

J Immunol.）。また、肺の器質的疾患を有さず、基礎疾患もない患者の NTM 症予防にはワクチンが有効である可能性があるため、rBCG-Mkan85B が NTM 症のワクチンとして機能するか検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) rBCG-Mkan85BのNTM感染防御能の評価

rBCG-Mkan85Bを接種したマウスに*M. kansasii*を経気道的に感染させた。感染6週間後に解剖し、肺および脾臓内の生菌数を検出することでワクチン効果を評価した。

(2) NTM症における細胞性免疫応答の解析

施設内倫理委員会の承認のもと、書面で同意を得たNTM患者、結核罹患歴のある患者から全血を採取し、末梢血単核球(PBMCs)を分離した。得られたPBMCsをNTM由来抗原やペプチドで刺激し、細胞表面マーカーや細胞内サイトカイン産生などをフローサイトメトリーを用いて解析した。

(3) ペプチドワクチン作成

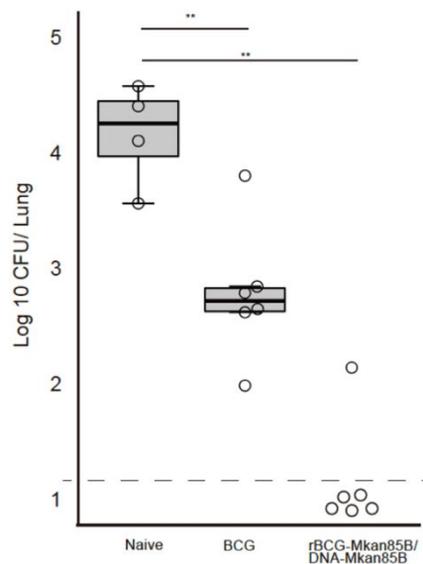
細胞内寄生菌の排除に重要な細胞性免疫を効率よく誘導するためには、抗原タンパクを細胞内に導入させ、抗原提示させる戦略、いわゆるペプチドワクチンの効果が期待される。そこで、本研究では、細胞内にタンパクを透過させることができる膜透過性ペプチド(cell penetrating peptide; CPP)とエピトープペプチドとの融合タンパクを合成し、細胞質内への導入を試みた。

4. 研究成果

(1) rBCG-Mkan85BのNTM感染防御能の評価

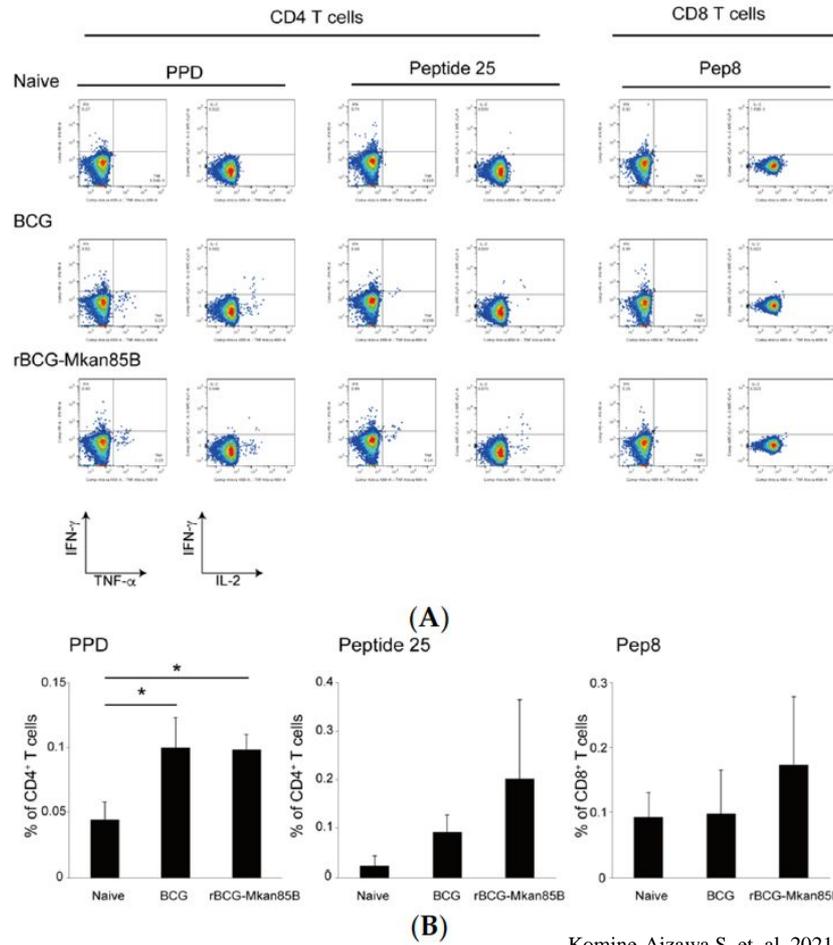
rBDGMkan85B/DNAMkan85B接種群、非接種群、BCG接種群のマウスにそれぞれ*M. kansasii*を経気道感染させ、感染6週間後に解剖し、臓器内生菌数を調べた。肺内の生菌数は非接種群、BCG接種群と比較して、rBDG-Mkan85B/DNA-Mkan85B接種群で有意に低下した(図1)。BCG接種、rBCG-Mkan85B単独接種では抗原検査特異的CD4陽性ヘルパーT細胞を誘導可能であったが、CD8陽性細胞傷害性T細胞を誘導できなかった。一方、rBDG-Mkan85B/DNA-Mkan85B接種群では抗原検査特異的CD4陽性ヘルパーT細胞とCD8陽性細胞傷害性T細胞の両方を誘導することができた(図2)。この結果から、rBCG-Mkan85B/DNA-Mkan85B接種はNTMに対する新たな防御戦略として有効である可能性が示唆された。(Komine-Aizawa S, et. al. 2021 Vaccines)

図 1



Komine-Aizawa S, et. al. 2021 Vaccines

図 2

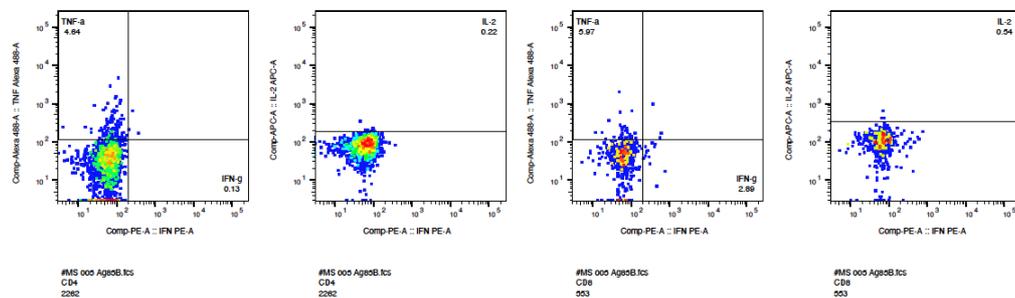


Komine-Aizawa S, et. al. 2021 Vaccines

(2) NTM症における細胞性免疫応答の解析

施設内倫理委員会の承認のもと、書面で同意を得たNTM患者、結核罹患歴のある患者から全血を採取し、末梢血単核球(PBMCs)を分離した。得られたPBMCsをNTM由来抗原やペプチドで刺激し、細胞表面マーカーや細胞内サイトカイン産生をフローサイトメトリーにて解析した(図3)。しかし、COVID-19の流行下のため、十分な患者検体を集めることが困難であり、本研究期間内に発表するには至らなかった。

図3



(3) ペプチドワクチン作成

目的とするペプチドを大腸菌で発現させる実験を行なった。しかし、想定よりも発現効率が悪く、より効率の良い発現系を検討中である。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Komine-Aizawa S, Mizuno S, Matsuo K, Namiki T, Hayakawa S, Honda M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Recombinant BCG-Prime and DNA-Boost Immunization Confers Mice with Enhanced Protection against Mycobacterium kansasii	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vaccines9111260.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shihoko Komine-Aizawa, Satoru Mizuno, Satoshi Hayakawa, Mitsuo Honda
2. 発表標題 Recombinant BCG-prime and DNA-boost vaccination confers enhanced protection against Mycobacterium kansasii in mice
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021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

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 The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program: The 54th Mycobacteria Panel Meeting（日米医学協力計画 抗酸菌症専門部会 第54 回日米合同会議）（新型コロナウイルス感染蔓延のため中止。誌上发表）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shihoko Komine-Aizawa
2. 発表標題 Recombinant BCG over-expressed Mycobacterium antigens enhanced Ag85B-specific CD8+ T cells
3. 学会等名 令和元年度日本大学学部連携研究推進シンポジウム 免疫と生殖の共進化 大野 乾 没後20年記念シンポジウム（新型コロナウイルス感染蔓延のため中止。誌上発表）（国際学会）
4. 発表年 2020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	舩廣 善和 (MASUHIRO Yoshikazu) (00336083)	日本大学・生物資源科学部・准教授 (32665)	
研究分担者	早川 智 (HAYAKAWA Satoshi) (30238084)	日本大学・医学部・教授 (32665)	
研究分担者	権 寧博 (GON Yasuhiro) (80339316)	日本大学・医学部・教授 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------