

機関番号：13802

研究種目：基盤研究C

研究期間：2008～2010

課題番号：20590438

研究課題名（和文）結核菌低分子量分泌タンパク T細胞エピトープの同定と
抗結核ワクチンへの応用研究課題名（英文）Identification of low-molecular-mass secretory proteins of
Mycobacterium tuberculosis and the application to development of anti-tuberculosis
vaccines

研究代表者

永田 年 (NAGATA TOSHI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：90275024

研究成果の概要（和文）：

本研究では、CFP11 (Rv2433c)、CFP17 (Rv1827)、TB18.5 (Rv0164)の3種の結核菌の低分子量分泌タンパク抗原のマウスおよびヒトの優勢（ドミナント）T細胞エピトープの同定を試みた。純系マウスおよびヒトHLAトランスジェニックマウスに、各タンパク抗原をコードするプラスミドDNAを免疫後、脾細胞のインターフェロン- γ （ガンマ）の産生を指標にしてT細胞エピトープ領域を決定した。本研究で得られた結果は、結核菌感染におけるT細胞応答の解析、ワクチン開発にとって有益である。

研究成果の概要（英文）：

We identified here murine and human dominant T-cell epitopes of three low-molecular-mass secretory proteins, CFP11 (Rv2433c), CFP17 (Rv1827), TB18.5 (Rv0164) of *Mycobacterium tuberculosis*. Plasmid DNAs encoding these proteins were immunized to two inbred mice and HLA-DRB1*0401 transgenic mice. T-cell epitopes were determined based on IFN- γ production from immune spleen cells. The results obtained here is feasible for analysis of the role of antigen-specific T cells during *M. tuberculosis* infection and the vaccine development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
2009年度	1,000,000円	300,000円	1,300,000円
2010年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
総計	3,700,000円	1,110,000円	4,810,000円

研究分野：医学

科研費の分科・細目：細菌学

キーワード：DNAワクチン、結核、低分子量分泌タンパク、T細胞エピトープ

1. 研究開始当初の背景

結核菌等の細胞内寄生細菌に対する感染防御には、細胞性免疫、中でも1型ヘルパーT細胞(Th1)と細胞傷害性T細胞(CTL)が重要であることが知られている。現在、抗結核ワクチンとしてはBCGワクチンが用いられているが特に成人におけるその感染防御効果については疑問がもた

れており、より効果のあるワクチンの開発が求められている。我々は細胞内寄生細菌であるリステリア(*Listeria monocytogenes*)をモデルとしてT細胞指向性DNAワクチンの研究をおこない、優勢（ドミナント）T細胞エピトープを用いたエピトープワクチンが感染防御に有効であることを明らかにしてきた(Nagata et al., DNA Cell Biol 23: 93-106, 2004)。結核菌に対する感染防御免疫においても

優勢（ドミナント）T細胞エピトープに対する免疫応答が重要な役割を果たすと考えられる。これまで我々は、結核菌の主な分泌タンパクであるMPT51が主要な感染防御抗原分子であること（Miki et al., *Infect Immun* 72: 2104-2021, 2004）、MPT51のマウスCTLエピトープの同定（Suzuki et al., *Infect Immun* 72: 3829-3837, 2004）、MPT51のヒトHLA-A*0201拘束性CTLエピトープの同定（Aoshi et al., *Infect Immun* 76: 1565-1571, 2008）をおこなってきた。本研究はこれらの研究を進展させ、結核菌の低分子量分泌タンパクを結核ワクチンの標的分子として、そのT細胞エピトープの同定、エピトープワクチンの開発をめざすものである。なお結核菌T細胞エピトープの同定は、結核症の診断にも有益である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、結核菌の感染防御抗原および診断用抗原として有用と考えられる結核菌由来低分子量分泌タンパクであるCFP11 (Rv2433c)、CFP17 (Rv1827)、TB18.5 (Rv0164)のマウスおよびヒトCD8⁺およびCD4⁺優勢（ドミナント）T細胞エピトープを同定し、それを用いた、抗原特異的T細胞検出法およびエピトープワクチンの可能性を検討することである。ヒトT細胞エピトープの同定には、HLAトランスジェニックマウスを用いる。

3. 研究の方法

ペプチド：CFP11 (Rv2433c; 96 アミノ酸)、CFP17 (Rv1827; 162 アミノ酸)、TB18.5 (Rv0164; 161 アミノ酸)の各結核菌分泌タンパクの低分子量分泌タンパク分子の全長を網羅する20merのペプチドからなるペプチドライブラリーを作製した。タンパク全長を網羅するように、10アミノ酸が互いに重なるように、20アミノ酸からなるペプチドを、BioSynthesis社（Luwisville, TX, USA）に委託して合成した。合成したペプチドはPBS（リン酸緩衝液）に溶解し最終濃度1mMとし、-80℃にて保存し、実験に供した。

遺伝子：CFP11, CFP17, TB18.5の各結核菌タンパ

クをコードする遺伝子を、結核菌H37Rv株ゲノム遺伝子よりPCR法を用いて増幅した。このPCR産物を、真核細胞発現プラスミドであるpCI（Promega, Madison, WI, USA）のマルチクローニングサイトにクローニングし、pCI-CFP11, pCI-CFP17, pCI-TB18.5を作製し、マウスへの免疫に供した。

マウス：BALB/c、C57BL/6の各純系マウス、およびヒトHLA-DRB1*0401トランスジェニックマウス（004149-MM; Taconic Farms, Inc., Hudson, NY, USA）を実験に供した。

免疫方法：2μgの上記pCI-CFP11, pCI-CFP17, pCI-TB18.5の各プラスミドをコートした0.5mgの1ミクロン金粒子（Bio-Rad Laboratories）を、剃毛したマウス腹腔にヘリオス遺伝子銃システム（Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA）を用い免疫した。これを7日間の間隔を空けて、4回免疫した。

T細胞解析方法：マウスへの最終免疫後2週間以上経過後、脾臓を摘出し、免疫マウス由来T細胞を予測された当該MHC結合ペプチド（1μM）で48時間刺激した。その後、上清中に産生されるIFN-γをELISA法で測定する。また抗IFN-γ抗体を用いたELISPOT法により、各ペプチドに特異的T細胞の数をカウントした。フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン検出法によって各ペプチドに特異的なT細胞をカウントした。さらに細胞内IFN-γ染色をもちいてIFN-γ産生T細胞数を計測した。これらの解析により、T細胞にIFN-γを誘導する能力のある20アミノ酸からなるペプチドを同定した後、そのペプチドの中からコンピューターアルゴリズムの結果を参考にして、9, 10アミノ酸からなるT細胞エピトープ候補のペプチドを合成し、再度、上記解析法により、実際にそのペプチドがT細胞にIFN-γを誘導する能力があるかを検証した。またCD8⁺T細胞エピトープペプチドのMHC拘束性を、TAP2タンパク欠損細胞であるRMA-S細胞の細胞表面MHCクラスI分子へのペプチド結合試験により解析した。

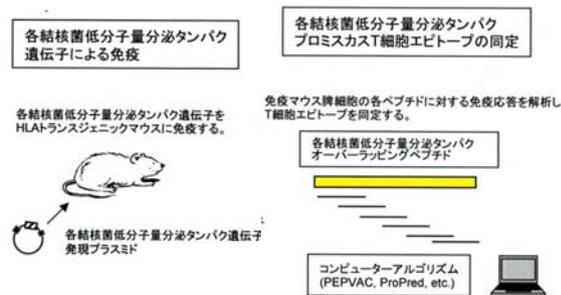


図1. T細胞の解析方法

コンピューターアルゴリズム：ペプチドのマウス MHC クラス I 分子への結合予測は、以下のコンピューターアルゴリズムを用いて検討した。(1)

BIMAS

(http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform)、(2) SYFPEITHI

(<http://www.syfpeithi.de/>)、(3) RANKPEP

(<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>). ペプチドのヒト HLA-DRB1*0401 分子への結合予測は、以下のコンピューターアルゴリズムを用いて検討した。(1) ProPred

(<http://www.imtech.res.in/raghava/propred>)、(2)

RANKPEP.

4. 研究成果

1) 純系マウスへのDNAワクチン免疫とマウス T 細胞エピトープの同定

BALB/c、C57BL/6の純系マウスに、pCI-CFP11, pCI-CFP17, pCI-TB18.5を、7日間隔で、計4回免疫した。最終免疫後4週以上経た後、IFN- γ ELISAを行い、T細胞にIFN- γ を産生させる能力を指標にしてT細胞エピトープを含む20merのペプチド領域を同定した。

コンピューターアルゴリズムの解析から、そのペプチド領域内の最小のT細胞エピトープ領域を推定し、8~10アミノ酸からなるペプチドを合成した。それらを用い免疫マウス脾細胞を刺激しIFN- γ の産生を指標にして、最小のT細胞エピトープ領域を同定した。またそのMHC拘束性を、ペプチド結合試験により明らかにした(表1)。

その結果、BALB/c、C57BL/6の各純系マウスで、

CFP11, CFP17, TB18.5の各結核菌タンパクで優勢(ドミナント)T細胞エピトープが1つ存在した。それら優勢T細胞エピトープは、C57BL/6マウスにおけるTB18.5のT細胞エピトープを除いて、CD8⁺T細胞エピトープであった。C57BL/6マウスにおけるTB18.5のT細胞エピトープは、CD4⁺T細胞エピトープであった。

Table 1
T-cell epitope candidates in CFP11, CFP17, and TB18.5.

T-cell epitope candidates in CFP11, CFP17, and TB18.5				
Peptide	Amino acid sequence	Estimated scores for restriction molecules ^a		
		K ^d	D ^d	L ^d
CFP11 (BALB/c)				
p69-86 (P9)	PFLVASVGYLGARRGVRR			
p76-84 (9mer)	GYLGARRGV	1000 <u>24</u> 17.9	— ^b	2.0
p70-78 (9mer)	FLVASVGYL	115.2 <u>16</u>	1.2	5.0 <u>13</u>
CFP11 (C57BL/6)				
p60-78 (P8)	VRMVINYLVPLVASVGY			
p64-71 (8mer)	INYLVPFL	6.6 <u>18</u> 10.7	—	—
p61-69 (9mer)	RMVINYLVLP	0.2	3.9 <u>13</u>	—
CFP17 (BALB/c)				
p52-70 (P7)	PPGSALLVVKRGPVAGSRF			
p61-79 (P8)	KRGPVAGSRFLDQAITS			
p62-70 (9mer)	RGVAGSRF	5	120 <u>20.8</u>	15 <u>12</u>
p62-69 (8mer)	RGVAGSR	—	4	—
p63-71 (9mer)	GPVAGSRFL	57.6 <u>9</u>	1	195 <u>23</u>
CFP17 (C57BL/6)				
p112-130 (P14)	DVGSVNGTYVNRPEVDSAV			
p113-121 (9mer)	VGSVNGTYV	—	14.3 <u>23</u>	—
p113-122 (10mer)	VGSVNGTYVN	—	13	—
p116-123 (8mer)	VNGTYVNR	0.38 <u>13</u>	13	—
p117-126 (10mer)	VNGTYVNRPEV	—	14.3	—
p118-126 (9mer)	VTYVNRPEV	—	12 <u>12.9</u>	—
TB18.5 (BALB/c)				
p82-100 (P10)	AVYYPGENQIQVTVMQQGEL			
p83-91 (9mer)	VYYPGENQI	3456 <u>23</u> 19.5	—	—
p84-91 (8mer)	VYYPGENQI	2000 <u>14.1</u>	—	—

Epitopes predicted by computer algorithms are shown.
^aEstimated scores are derived from BIMAS (bold), SYFPEITHI (underlined), or RANKPEP (plain).
^b—; score not shown in the program.

表1. マウスT細胞エピトープ解析結果

2) HLA-DR0401 TgマウスへのDNAワクチン免疫とヒトHLA-DR0401拘束性T細胞エピトープの同定

純系マウスと同様、HLA-DRB1*0401トランスジェニックマウスに、pCI-CFP11, pCI-CFP17, pCI-TB18.5を、7日間隔で、計4回免疫した。最終免疫後4週以上経た後、IFN- γ ELISAを行い、T細胞にIFN- γ を産生させる能力を指標にしてT細胞エピトープを含む20merのペプチド領域を同定した。現在、図のように、TB18.5抗原のP16ペプチドで刺激した時に、有意なIFN- γ の産生を確認している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計13件)

1. Uto T, Tsujimura K, Uchijima M, Seto S, Nagata T, Suda T, Chida K, Nakamura H, Koide Y: A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of heat shock protein 70. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 査読有, 61, 189-196, 2011.
 2. 永田 年、小出幸夫: 結核菌に対するT細胞誘導ワクチンの試み. *日本細菌学雑誌*, 査読無, 65 (2), 309-324, 2010.
 3. Eweda G, Suzuki D, Nagata T, Tsujimura K, Koide Y: Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secretory proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*, 査読有, 28, 4616-4625, 2010.
 4. Nagata T, Koide Y: Induction of specific CD8+ T cells against intracellular bacteria by CD8+ T-cell-oriented immunization approaches. *J Biomed Biotechnol*, 査読有, 2010, Article ID 764542.
 5. Suzuki D, Nagata T, Eweda G, Matsumoto S, Matsumoto M, Tsujimura K, Koide Y: Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding 1 (MDP1) using DNA vaccination. *Vaccine*, 査読有, 28, 2020-2025, 2010.
 6. Wang L-X, Nagata T, Tsujimura K, Uchijima M, Seto S, Koide Y: Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination. *Vaccine*, 査読有, 28, 2026-2031, 2010.
 7. Yamamura Y, Tsujimura K, Seto S, Uchijima M, Hozumi H, Nagata T, Koide Y: Immunogenicity of latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. *Procedia in Vaccinology*, 査読有, 3, 19-26, 2010.
 8. Tsujimura K, Ikehara Y, Nagata T, Koide Y, Kojima N: Induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to peritoneal macrophages. *Procedia in Vaccinology*, 査読有, 1, 127-134, 2009.
 9. Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Koide Y: In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium. *Vaccine*, 査読有, 26, 5123-5127, 2008.
 10. Aoshi T, Nagata T, Suzuki M, Uchijima M, Hashimoto D, Rafiei A, Suda T, Chida K, Koide Y: Identification of HLA-A*0201-restricted T-cell epitope on the MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis*, by MPT51 overlapping peptide screening. *Infect Immun*, 査読有, 76, 1565-1571, 2008.
 11. Nagata T, Koide Y: Anti-infective vaccine strategies. In Liu D (ed.) *Handbook of Listeria monocytogenes*, 査読無, p. 449-480, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2008.
 12. Hashimoto D, Nagata T, Uchijima M, Seto S, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nakamura H, Koide Y: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific CD8+ T-cell responses in the lung. *Vaccine*, 査読有, 26, 5095-5100, 2008.
 13. Cervantes J, Nagata T, Uchijima M, Shibata K, Koide Y: Intracellular *Listeria monocytogenes* induces pyroptosis in murine macrophages. *Cell Microbiol*, 査読有, 10 (1), 41-52, 2008.
- [学会発表] (計 12 件)
[国際学会] (計 5 件)
1. Nagata T, Eweda G, Suzuki D, Tsujimura K, Koide Y: Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Keystone Symposia, Tuberculosis: Immunology, Cell Biology and Novel Vaccination Strategies*, Vancouver, USA, January 15-20, 2011.
 2. Eweda G, Suzuki D, Nagata T, Tsujimura K, Koide Y: Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secreted proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis* with

DNA immunization. DNA Vaccines 2010, New Orleans, USA, March 2-4, 2010.

3. Yamamura Y, Tsujimura K, Uchijima M, Seto S, Nagata T, Koide Y: Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. DNA Vaccines 2010, New Orleans, USA, March 2-4, 2010.
4. Wang LX, Nagata T, Koide Y: Characterization of an HLA-DR4-restricted CD4+ T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* by DNA vaccination. DNA Vaccines 2008, Las Vegas, USA, Dec 9-11, 2008.
5. Suzuki D, Nagata T, Koide Y: Characterization of murine T-cell epitopes in mycobacterial DNA-binding protein 1. DNA Vaccines 2008, Las Vegas, USA, Dec 9-11, 2008.

[国内学会] (計7件)

1. 永田 年、エウィーダ ガダ、鈴木大介、辻村邦夫、小出幸夫: DNAワクチンを用いた結核菌低分子量分泌蛋白のマウスT細胞エピトープの同定. 第83回日本細菌学会総会、横浜、2010(平成22年3月27~29日).
2. 山村泰弘、瀬戸真太郎、内嶋雅人、穂積宏尚、永田 年、辻村邦夫、小出幸夫: DNAワクチンを実施したマウスにおける結核菌の潜伏感染関連抗原の免疫原性. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2009(平成21年12月2~4日).
3. 永田 年、鈴木大介、辻村邦夫、小出幸夫: DNAワクチンを用いた結核菌低分子量分泌蛋白のマウスT細胞エピトープの同定. 第82回日本細菌学会総会、名古屋、2009(平成21年3月12~14日).
4. 内嶋雅人、永田 年、辻村邦夫、小出幸夫: ケモカイン融合型DNAワクチンにより誘導される抗原特異的CD8⁺およびCD4⁺細胞の解析. 第82回日本細菌学会総会、名古屋、2008(平成21年3月12~14日).
5. 鈴木大介、永田 年、松本壮吉、小出幸夫: MDP1 タンパクのマウスT細胞エピトープの解析.

第38回日本免疫学会総会・学術集会、京都、2008(平成20年12月1~3日).

6. 右藤智啓、内嶋雅人、永田 年、辻村邦夫、小出幸夫: 結核菌抗原MPT51にHeat-shock protein 70(HSP70)を結合させた分子融合型DNAワクチンは抗原特異的T細胞を効率よく誘導する. 第38回日本免疫学会総会・学術集会、京都、2008(平成20年12月1~3日).
7. 内嶋雅人、永田 年、辻村邦夫、柴田 清、小出幸夫: MIP-1 α -MPT51 融合型DNAワクチンにより誘導される抗原特異的CD8⁺およびCD4⁺T細胞の解析. 第38回日本免疫学会総会・学術集会、京都、2008(平成20年12月1~3日).

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

1. 名称: 「新規ペプチド及びこのペプチドから成る抗結核菌ワクチン」
発明者: 小出幸夫、鈴木美奈、青枝大貴、永田 年
種類: 特許
番号: 特許第4472307号
取得年月日: 21年3月12日

[その他]

ホームページ

<http://www2.hama-med.ac.jp/w1c/basic/environ/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 年 (NAGATA TOSHI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90275024

(2) 研究分担者

辻村邦夫 (TSUJIMURA KUNIO)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10227407
小出幸夫 (KOIDE YUKIO)
浜松医科大学・医学部・理事
研究者番号: 30126809