

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390304

研究課題名（和文） 糖脂質特異的免疫応答に着目した、新たな抗結核ワクチンの開発

研究課題名（英文） Development of glycolipid vaccines against tuberculosis

研究代表者

杉田 昌彦 (SUGITA MASAHIKO)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：80333532

研究成果の概要（和文）：生体内増殖菌が宿主由来のグルコースを基質として産生するグルコースモノミコール酸によって誘起される T 細胞応答を、モルモットを用いて検証した。その結果、グルコースモノミコール酸が感作個体において遅延型アレルギー応答を誘起することを初めて実証した。さらに、グルコースモノミコール酸によって誘起されるメモリー応答は、TH1 サイトカイン産生に極度にシフトしたものであった。以上より、グルコースモノミコール酸が新しいタイプの結核ワクチンとして機能することが考えられた。

研究成果の概要（英文）：Glucose monomycolate that pathogenic mycobacteria biosynthesize by utilizing host-derived glucose was tested for its ability to induce specific T cell responses in guinea pigs. It was shown for the first time that the glycolipid species was capable of eliciting delayed-type hypersensitivity in sensitized animals. Furthermore, the glucose monomycolate-induced T cell response was highly skewed to the production of the protective TH1-type cytokines. Thus, these results underscored the possibility that glucose monomycolate could function as a novel type of anti-tuberculosis vaccines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：細菌、感染症、脂質、免疫学、結核

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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。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ている。抗結核ワクチンとしてウシ型結核菌の弱毒化生菌ワクチンである BCG

が多くの国々で長らく使用されてきたが、成人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。

(2) 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、感染症の征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機構を進化の過程で獲得しており、しかも、何十年の長期にわたって宿主体内で生存できるので、その間にヌクレオチド変換に伴うタンパク質抗原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。

(3) 上記のような社会的背景も鑑み、研究代表者の杉田は、結核菌由来の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「CD1」に注目し、第一線の基礎研究を通して、この研究領域の基盤確立に大きく寄与してきた。これらの研究の結果、結核菌が産生する脂質抗原を特異的に認識して活性化される CD1 拘束性 T リンパ球の存在が明らかとなり、このリンパ球を活性化することにより結核菌感染細胞が高率よく排除されることが実証された。しかもこれらの T 細胞群は、エイズ患者においてもその機能が比較的保たれている CD8 陽性（あるいはダブルネガティブ）T 細胞であった。これらの新たな知見と考察をもとに、結核菌から精製した脂質をサブユニットワクチンとして用いることにより、有効な抗結核防御反応が誘導されるのではないかと考えるに至った。実際、後述のように、研究代表者の最近の研究から、結核菌細胞壁を構築するミコール酸含有糖脂質（グルコースモノミコール酸）が有望なワクチン候補として上ってきた。

## 2. 研究の目的

結核菌糖脂質を標的としたメモリー T 細胞応答の存在と感染防御における重要性が初めて明らかとなり、糖脂質をベースにした新しい抗結核ワクチン開発の可能性が高まっている。本研究では、これまでに絞り込んだ糖脂質ワクチン候補について、モルモットを用いた検証とデリバリーシステムの開発を行い、新しい抗結核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) グルコースモノミコール酸の精製

BCG (Tokyo 172 株) あるいは M. avium (serovar 4) を液体培地 (7H9 medium, 2% グルコース添加) で培養し、菌体を回収した後、クロロフォルム・メタノールにより総脂質の抽出を行った。得られた脂質を一次元シリカゲル薄層クロマトグラフィーに展開し、グルコースモノミコール酸のスポットから糖脂質の抽出を行った。同じ展開溶媒を用いてこの操作を最低 3 回繰り返す、明らかな不純物のない精製標品を得た。さらに目的標品が得られていることおよびその純度を、HPLC ならびにマスマスペクトロメトリにより評価し、品質管理基準を満たしていることを確認した。

### (2) グルコースモノミコール酸のリポソーム化

クロロフォルムに溶解した精製グリセロールモノミコール酸を卵ホスファチジルコリン、コレステロール、およびステアリン酸付加オクタアルギニンと混和し、減圧乾固することにより脂質膜を得た。ここに滅菌水を加え、超音波処理によりリポソーム化を行った。

### (3) グルコースモノミコール酸特異的 T 細胞アッセイ

T 細胞抗原受容体の発現を欠いた T 細胞株 (J. RT3) に、グルコースモノミコール酸特異的 CD1b 拘束性 T 細胞株 (LDN5) より単離した T 細胞抗原受容体アルファ鎖およびベータ鎖をコードする遺伝子をトランスフェクトした。これにより特異的抗原認識機能を有した T 細胞株 (J. RT3/LDN5) を作製し、レスポンド細胞として用いた。この細胞を CD1b 陽性抗原提示細胞およびグルコースモノミコール酸抗原と培養し、産生されるインターロイキン 2 の濃度を、市販の ELISA キットを用いて測定した。

### (4) モルモット実験

生後 3 週のマウスハートレーモルモットを SPF 環境で飼育し、実験を行った。まず BCG ワクチン株を皮下に注射し、6 週後に 5 ug のグルコースモノミコール酸/リポソームを皮内接種した。抗原のチャレンジ後、経時的に皮膚硬結の長径をモニターした。さらに、組織サンプルを採取し、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色を行うとともに、抗モルモット CD8 抗体、抗モルモットヘルパー/インデューサー T 細胞抗体を用いた蛍光組織染色を行った。

また BCG 接種モルモットから表在リンパ節を単離し、抗原刺激を行ったのち、細胞より RNA を抽出した。この RNA を鋳型とした RT-PCR を行い、種々のサイトカイン遺伝子の発現を検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) グルコースモノミコール酸のリポソーム化

リン脂質、コレステロールによって構成されるリポソームに、適量のステアリン酸付加オクタアルギニンを添加することにより、膜表面の陽性荷電を高めたリポソームを作製し、グルコースモノミコール酸を封入した。得られたリポソームにおけるグルコースモノミコール酸の封入率はおおよそ 60-85%であった。

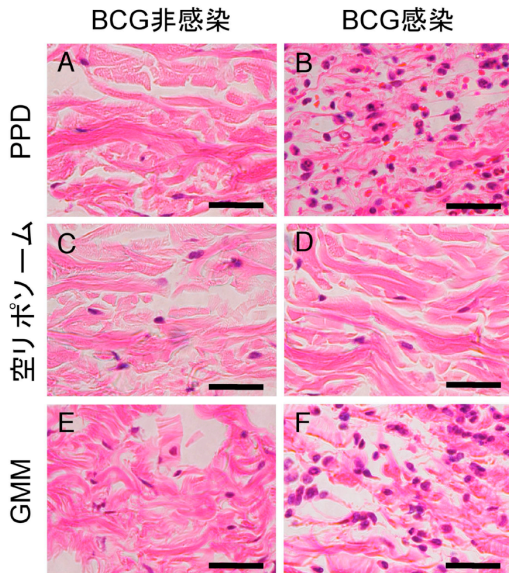
得られたリポソーム化グルコースモノミコール酸の抗原活性を J. RT3/LDN5 を用いて検証したところ、従来の抗原調製法に比して、10 倍から 1,000 倍の高い効率で、T 細胞に抗原提示されることが分かった。

##### (2) グルコースモノミコール酸による遅延型アレルギー応答の実証

BCG 接種モルモットに対してグルコースモノミコール酸/リポソームを皮内接種したところ、数時間後より硬結と腫脹を伴う皮膚応答が認められた。この応答はおおよそ 48 時間をピークとし、その後徐々に消退した。

組織学的には、単核球の浸潤を主体とし (図 1E, F)、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞がともに増加していた。以上のことから、このグルコースモノミコール酸により誘起される応答は、遅延型の経時的変化を示し、感作が必要で、単核球の浸潤を伴うことから、遅延型アレルギー応答であると結論した。

図 1

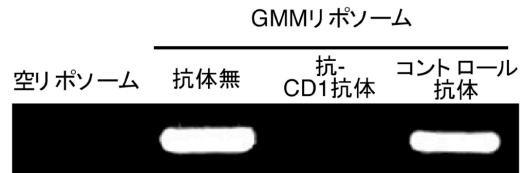


すなわち、旧来の PPD などタンパク質を標的とした遅延型アレルギー応答とは別に、糖脂質を主体としたアレルギー応答の存在が初めて明らかになった。

##### (3) グルコースモノミコール酸によって誘起される TH1 型サイトカイン応答

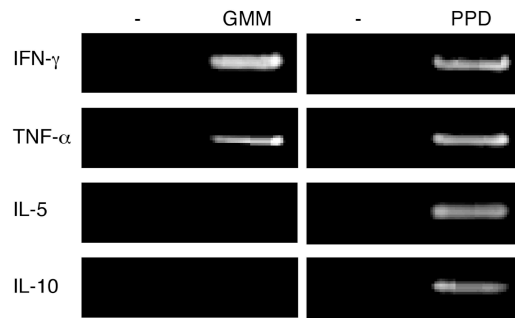
BCG 接種モルモットリンパ節細胞をグルコースモノミコール酸で刺激し、RT-PCR を行ったところ、インターフェロンガンマ遺伝子の顕著な発現が認められた。このサイトカイン応答は抗 CD1 抗体により完全に阻害されたことから、CD1 依存的応答であることが確認された (図 2)。

図 2



インターフェロンガンマや腫瘍壊死因子アルファなど TH1 型サイトカインは結核菌に対する宿主防御に極めて重要な役割を果たす。一方、TH2 型サイトカインはそれに対して阻制的に働く。BCG 接種モルモットリンパ節のグルコースモノミコール酸に対するインターフェロンガンマ以外のサイトカイン応答のプロファイリングを行ったところ、すべてのサイトカインが産生される PPD 刺激とは別に、グルコースモノミコール酸刺激では TH1 サイトカインのみが誘導された (図 3)。

図 3



##### (4) まとめ

グルコースモノミコール酸を標的とした遅延型アレルギー応答を実証した。この応答は非タンパク質抗原により誘起されること、また非 MHC 分子である CD1 分子により拘束されることから、これまでは知られていなかった新しいタイプの遅延型アレルギー応答である。この応答は極度に TH1 型サイトカイン産生にシフトしていたことから、この皮内応答は結核防御の成立をモニターする診断的価値を有するものと考えられる。さらに、グルコースモノミコール酸が新たな抗結核ワクチンとして利用される可能性が示された。

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2件)

Komori T, Nakamura T, Matsunaga I, Morita D, Hattori Y, Kuwata H, Fujiwara N, Hiromatsu K, Harashima H, Sugita M. A microbial glycolipid functions as a new class of target antigen for delayed-type hypersensitivity. J. Biol. Chem. 286(19): 16800-16806, 2011.

Hattori Y, Matsunaga I, Komori T, Urakawa T, Nakamura T, Fujiwara N, Hiromatsu K, Harashima H, Sugita M. Glycerol monomycolate, a latent tuberculosis-associated mycobacterial lipid, induces eosinophilic hypersensitivity responses in guinea pigs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 409(2): 304-307, 2011.

[学会発表] (計2件)

杉田昌彦: ミコール酸含有糖脂質の生合成と免疫認識～抗酸菌バイオロジーの新たな世界～ 第85回日本結核病学会学術集会 京都 2010年5月20-21日

杉田昌彦: 結核菌脂質を標的とした新しい免疫応答 第53回日本感染症学会中日本地方学術総会 京都 2010年11月12-13日

[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.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/SugitaLab.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 昌彦 (SUGITA MASAHIKO)  
京都大学・ウイルス研究所・教授  
研究者番号: 80333532

(2) 研究分担者

原島 秀吉 (HARASHIMA HIDEYOSHI)  
北海道大学・薬学研究科(研究院)・教授  
研究者番号: 00183567

松永 勇 (MATSUNAGA ISAMU)  
京都大学・ウイルス研究所・准教授  
研究者番号: 00254425

(3) 連携研究者

該当なし