

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 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010-2011

課題番号：22890091

研究課題名（和文）サル結核モデルを用いた新たな脂質ワクチンの検証

研究課題名（英文）New tuberculosis lipid antigen vaccine using rhesus infection model.

研究代表者

桑田 啓貴 (Hirotaka Kuwata)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：60380523

研究成果の概要（和文）：

脂質ベースの新しい抗結核ワクチン開発が必要となっている。本課題では、抗酸菌から抽出したミコール酸糖脂質を用いて、アカゲザルを用いたワクチン効果の検証を行い、免疫応答を検証することによって、ワクチンとしての可能性を評価した。結果として、当該ミコール酸は、特異的 IFN-gamma の発現を誘導することが確認された。このことから、霊長類モデルを用いた特異的免疫誘導効果の検証により、抗酸菌糖脂質がワクチンとして有用であることが検証された。

研究成果の概要（英文）：

New development for anti-TB vaccination based on lipid chemistry has been eagerly expected. Mycobacterial mycolates were evaluated and confirmed for their ability to induce specific responses as therapeutic agents in Rhesus macaque vaccine model. As the results, mycolates augmented the specific induction of IFN-gamma from lymphocyte derived from peripheral blood. Taken together, it is validated that Mycobacterium mycolate can be a strong candidate for anti TB vaccination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：感染症内科学

科研費の分科・細目：研究活動スタート支援

キーワード：免疫学、微生物学、感染症、細菌

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てことは記憶に新し

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ている。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った。

2. 研究の目的

結核菌脂質を標的とした CD1 拘束性メモリー T 細胞応答の存在と感染防御における重要性が明らかとなり、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。しかしこれまでの研究は、モルモットなど小動物モデルの解析にとどまっており、これらの動物とヒトとの免疫系の相違から、ヒト結核制御の具体的な方策を確立するには至っていない。そこで本研究では、これまでに絞り込んだ脂質ワクチン候補について、アカゲザルを用いた免疫解析と効果検証を行い、新しい抗ヒト結核脂質ワクチンの実現に向けた基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト末梢血を用いた *in vitro* の解析ならびにモルモット個体を用いた *in vivo* の解析結果から最も有望な脂質ワクチンと考えているグルコースモノミコール酸 (GMM) について、アカゲザルを用いて免疫検証を進めた。まず、炭素鎖長の異なる 2 つの分子種について、大量精製を行った後リポソームに封入し、次いで、これらのリポソーム化 GMM をアカゲザルに皮内投与し、特異的 T 細胞応答をモニターすることにより最適な免疫法を確立した。最後に、病原性結核菌に対する宿主防御の成否を検証し、その結果をもとに、GMM の抗ヒト結核脂質ワクチンとしての有効性を

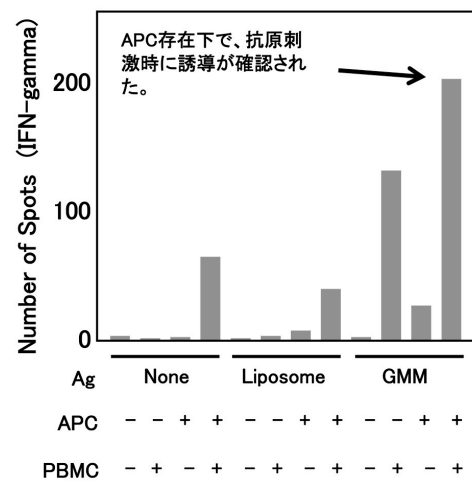
明らかにした。

4. 研究成果

1) 抗酸菌の一種 *Mycobacterium avium* complex (MAC) を標準液体培地で培養し、菌体回収後、総脂質の抽出を行った。総脂質をシリカゲル薄層クロマトグラフィーに展開し、目的分画を回収し、展開-分画回収操作の繰り返しにより、糖脂質標品を得た。

2) 高純度のミコール酸糖脂質を得た後、ミコール酸糖脂質のリポソーム化を行った。申請者の研究室では、ミコール酸含有糖脂質をオクタアルギニン含有リポソームに組み込んだ。

3) 次に、アカゲザルを用いてミコール酸糖脂質による免疫誘導能の評価を行った。リポソーム化ミコール酸糖脂質をアカゲザルの下腿皮膚に投与し、一定期間後に採決を行い、末梢血中のミコール酸特異的 T 細胞の存在を、ELISPOT 法により検証した。その結果、ミコール酸糖脂質特異的な活性化 T 細胞の存在を



確認した (下図)。

4) さらに、検証に必要なツールとして、CD1b とミコール酸からなるテトラマーの開発を行った。この時、使用するミコール酸の種類には長鎖と短鎖が存在するが、短鎖の方が効

率的に T 細胞を標識することができた。

5) 加えて、ミコール酸の投与方法についても検討した。プライミングの段階において、高純度に精製したミコール酸を用いる場合と比べて、BCG 菌体にミコール酸を高発現させた株を用いた場合の方がより強く免疫応答を惹起できることが明らかとなった。

6) サルにおける抗原提示細胞の解析を行うため、末梢血からマクロファージおよび樹状細胞を誘導し、結核菌糖脂質の抗原提示能を検討した。抗原提示分子 CD1a, b, c はいずれも、M-CSF あるいは GM-CSF/IL-4 の誘導によって発現上昇が認められた。これらの細胞と T 細胞を共培養することにより、IFN-gamma の発現誘導が認められたことから、マクロファージおよび樹状細胞の両方が抗原提示に関わっていると考えた。

以上、霊長類モデルを用いた特異的免疫誘導効果の検証により、抗酸菌ミコール酸糖脂質のワクチンとしての可能性が高いことを明らかとした。以上のデータを基に、引き続きより高率ワクチンの開発を進めることを予定している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1) 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. 2011 13; 286, p16800-6.

2) Jaqaman K*, Kuwata H*, Touret N, Collins R, Trimble WS, Danuser G, Grinstein S.

(*: Equal contribution)

“Cytoskeletal control of CD36 diffusion promotes its receptor and signaling function.”

Cell. 2011 19; 146, p593-606.

[学会発表] (計 1 件)

1) 桑田啓貴, Grinstein S.

“Cytoskeletal control of CD36 diffusion promotes its receptor and signaling function.”

第 40 回日本免疫学会学術集会、2011 年 11 月 27 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

なし

○ 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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑田啓貴 (Kuwata Hirotaka)
京都大学ウイルス研究所、助教
研究者番号：60380523

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし