

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 29日現在

機関番号：84420

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890255

研究課題名（和文）SOCS1 アンタゴニストを組み込んだ BCG を用いた新規結核ワクチンの開発
研究課題名（英文）Development of novel vaccine against tuberculosis using recombinant BCG expressing SOCS1 antagonist

研究代表者

渡邊 健太（WATANABE KENTA）

独立行政法人 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・研究員

研究者番号：20582208

研究成果の概要（和文）：新規結核ワクチンとして、SOCS 分子の変異体アンタゴニストを発見する組換え BCG を作製し、マウスを用いてそのワクチン効果を検討した。組換え BCG を免疫したマウスでは、結核抗原特異的な免疫応答が既存の BCG よりも強く認められ、また、攻撃接種実験においても高い防御効果が認められた。これらの結果より、この組換え BCG が新規結核ワクチンとして利用可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：I developed novel vaccine against tuberculosis using recombinant BCG expressing dominant negative of SOCS1 (rSOCS-DN/BCG), and evaluated the effectiveness in mice. rSOCS-DN/BCG immunization elicited Mycobacterium antigen specific immune responses. Furthermore the immunization with rSOCS-DN/BCG showed significant protection against tuberculosis in mice. These results indicated further evidences for the possibility of rSOCS-DN/BCG as a novel vaccine against tuberculosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,210,000	363,000	1,573,000
2011 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,320,000	696,000	3,016,000

研究分野：免疫学、細菌学

科研費の分科・細目：医歯薬学、免疫学

キーワード：結核ワクチン、BCG、SOCS1

1. 研究開始当初の背景

(1) 結核は、世界の総人口の約 1/3 に当たる 20 億人が感染しているとされており、毎年 800 万人が発病し、200 万人が命を落としている最大の感染症の一つである。その多くは発展途上国で発生しているが、日本でも毎年約 3 万人以上が発病し、2 千人以上が死に至っており、その被害は甚大である。また、

日本は先進国の中では罹患率が比較的に高く、結核は依然として我が国最大の細菌感染症でもある。

(2) 現在世界中で用いられている結核ワクチンである BCG (Bacille Calmette-Guérin) は、生後直ぐに接種され、その免疫反応は長期におよぶ。特に、乳幼児に対する BCG 接種

は、結核性髄膜炎や粟粒結核に対して極めて高い予防効果があることが証明されている。しかしながら、12歳前後をピークにその効果は減弱し、17歳前後でBCG非接種者と同等の発病率であることが海外のコホート研究で確認されている。また、BCGの追加接種が成人の結核予防に効果が無いことも知られている。このために成人で効果のある結核ワクチンの開発研究は世界中で行われているが、現在のところ実用化の目処が立ったものは確立されていない。

(3) 結核菌の病原性の一つとして、抗原提示細胞等の食細胞に感染し、その感染細胞内で生存、増殖するという特徴が挙げられる。その際、宿主細胞が持つサイトカインシグナル制御分子(SOCS)を活性化させることで、宿主の免疫反応から回避をすることが知られている。これは結核菌やそのワクチンであるBCG等の抗酸菌でも認められる現象である。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえた上で、本研究ではSOCS1分子を人為的に制御し、SOCS1による生体のサイトカイン制御を解除することによって、ワクチン効果を増大させる手法を試みた。SOCS1のJAK分子結合部位を置換した変異体アンタゴニスト(拮抗物質遺伝子: SOCS1-DN)を組み込んだリコンビナントBCG(rSOCS1-DN/BCG)を用い、BCG等の抗酸菌が保持する生体のSOCSによるサイトカイン抑制機構を阻害し、サイトカインの産生亢進を促すことによりワクチンとしての抗原性(免疫原性)を増強させる全く新しい結核ワクチンの開発研究を行った。

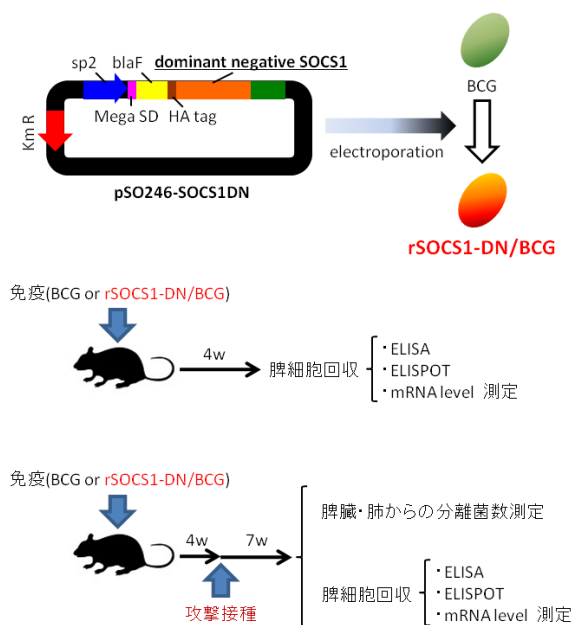
3. 研究の方法

(1) 通常のBCGおよびrSOCS1-DN/BCGをマウス皮内に投与した2群、および対称群で以下の実験の比較検討を行った(図1)。

投与後4週においてマウス脾細胞を分離し、これを結核菌由来の抗原で刺激する。抗原としては、菌分泌抗原であり、ワクチンの標的抗原でもあるAg85Bタンパク(Ag85B)を用い、リコンビナントAg85B(rAg85B)の添加、およびAg85Bを発現するワクシニアウイルスを感染させた脾細胞との共培養によって刺激した。刺激された細胞の培養上清からAg85B刺激特異的な種々のサイトカイン(IL-2、6、10、12等)やケモカイン(MIP-1、MCP-1、RANTES等)、インターフェロン等を測定し比較検討を行った。これらの測定は刺激細胞のmRNAの発現においても検討した。脾細胞の刺激培

養においてはCD4およびCD8細胞を分離し、各々のインターフェロン γ (IFN- γ)特異的なELISPOT反応においても検討を行った。

(2) 免疫マウスにおいては結核菌攻撃接種実験も行った。結核菌は*Mycobacterium kurono*株を用い、既報に基づき噴霧感染した。感染7週後に解剖し、防御効果を肺および脾臓における分離菌数で判定を行った。菌の分離は情報どおり小川培地を用い4週後のコロニー数を測定した。これら解剖材料は通常のHE染色による組織標本と、抗酸菌染色による組織標本を作製し、これにおいてもワクチンの効果を判定した。



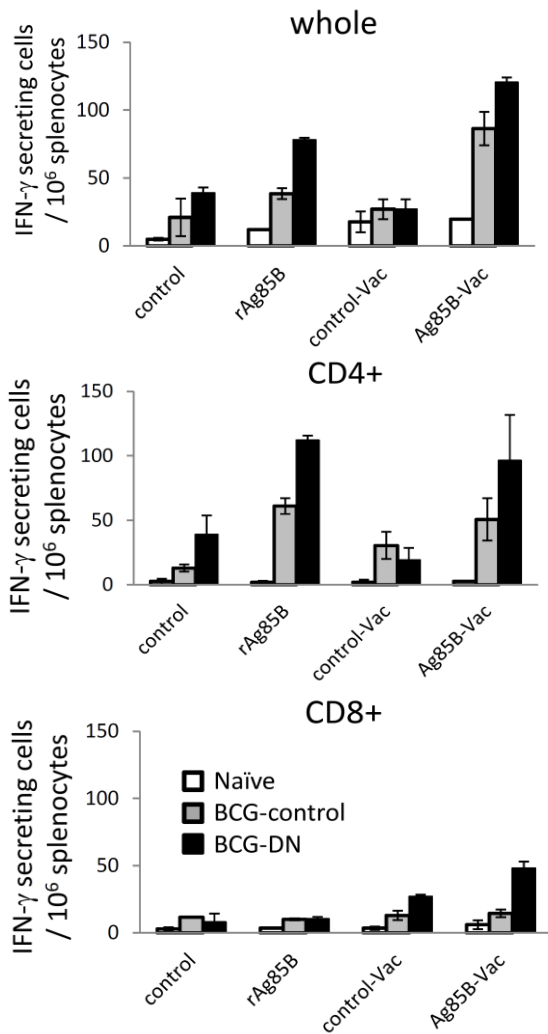
【図1 実験の方法】

(3) また、マクロファージ系細胞、あるいは樹状細胞を用い、これにrSOCS1-DN/BCGを感染させることで、*in vitro*での解析も行った。細胞は、マウス骨髄細胞から誘導して作製し、これに既存のBCGとrSOCS1-DN/BCGを同じ条件下で感染させ、サイトカインの産生、細胞内シグナル経路の活性化などを指標として細胞の経時的に観察した。

4. 研究成果

(1) 作製したrSOCS1-DN/BCGを免疫したマウスから脾細胞を分離し、結核抗原Ag85Bに特異的な反応をIFN- γ のELISPOT反応で確認したところ、既存のBCGを免疫した群よりも有意に高い反応を示した(図2)。特に、CD4細胞(図2中段)ではrAg85Bで刺激した場合に強い反応が誘導され(rAg85B)、一方でCD8細胞(図2下段)ではワクシニアウイルス感染細胞との共培養刺激において高い反

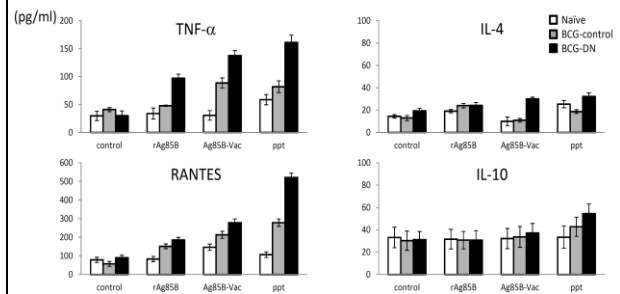
応を示した (Ag85B-Vac)。また、コントロールとして用いた Ag85B を発現しないワクシニアウイルス感染細胞との共培養では反応が認められなかった (control-Vac)。結核菌は細胞内寄生菌であり、免疫マウスにおいて CD8 細胞の反応も強く誘導されたことは、結核ワクチンとして rSOCS1-DN/BCG が十分な機能することを示唆するものであり、さらに既存の BCG よりも高い免疫反応が認められたことから、この rSOCS1-DN/BCG の有用性が期待できた。



【図2 脾臓を用いた ELISPOT】

また同様に、rSOCS1-DN/BCG を免疫したマウスの脾細胞を用いて、この培養上清中のサイトカイン量を ELISA で測定したところ、TNF- α 、RANTES 等において、BCG 免疫群よりも高い産生量が確認された (図3)。しかしながら、IL-4、IL-10 などいくつかのサイトカインにおいては免疫による顕著な産生上昇が認められず、また BCG 免疫群との有意な差も認められなかった。この結果からも、rSOCS1-DN/BCG を免疫することで結核抗原特

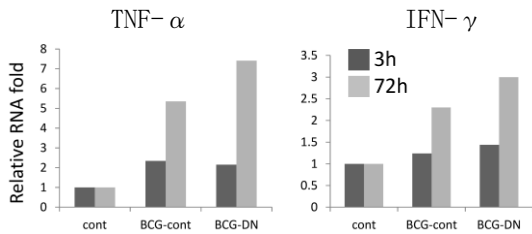
異的な免疫応答を活性化させ、特定のサイトカイン類の産生の誘導が可能であることが示された。



【図3 培養上清中のサイトカイン】

(2) また攻撃接種実験においても、rSOCS1-DN/BCG は高い防御効果を示した。免疫マウスは4週後に噴霧感染によって攻撃接種を行い、感染7週後に解剖し、防御効果を肺および脾臓における分離菌数で判定を行った。結果、rSOCS1-DN/BCG 免疫群において有意な菌数の減少が認められ、既存の BCG と比較しても有意に低い値であった。この結果から、rSOCS1-DN/BCG が実際に結核ワクチンとして防御効果を持つことが示された。今回の結果はマウスを用いた実験によるものであるが、今後はこれを発展させ、カンクイザルを用いて同様の検討を行うことで、最終的にはヒトでの臨床応用が可能な結核ワクチンの確立が期待できる。

(3) 最後に、培養細胞を用いた *in vitro* 解析を行い、rSOCS1-DN/BCG から産生された SOCS アンタゴニストが細胞内でどのように機能しているのかを分子レベルで解析した。rSOCS1-DN/BCG ならびに通常の BCG を感染させたマクロファージの mRNA を経時的に回収し、real time PCR を用いて感染により発現が上昇する因子を比較解析したところ、TNF- α あるいは IFN- γ といったサイトカインにおいて、rSOCS1-DN/BCG を感染させた細胞で有意に高い発現が認められた (図4)。また、SOCS が制御している JAK-STAT 経路に関わる分子についても解析したところ、JAK2 分子のリン酸化などに強い亢進が認められ、SOCS アンタゴニストがドミナントネガティブ体として機能することで細胞内のシグナル制御機構が解除され、細胞の活性化が誘導されていることが確認できた。同様の結果は樹状細胞でも認められ、宿主が結核菌に感染した場合の生体防御反応の第一段階であるマクロファージや樹状細胞を活性化させることが、その後続いて起こる結核菌に対する特異的な免疫応答を強力に誘導し、結果として感染防御につながることを示唆された。



【図4 感染マクロファージの活性化】

一般的に、これまでの結核予防に対するワクチンは、現在用いられている BCG に抗原性の高い蛋白を過剰発現させたものや、一部のサイトカイン遺伝子を組み込んだものが主流である。しかしながら、こうしたリコンビナント BCG ワクチンでの結核予防効果は十分な効果が得られていない。本研究で用いた SOCS1 アンタゴニストの様に、サイトカイン全体を抑制する生体分子のアンタゴニストを組み込み、ベクター自身の免疫反応を増強させるという試みは、既存の研究・報告とは全く異なる画期的なものである。また、SOCS1 をターゲットとした結核ワクチン研究も初めてのものであり、広い範囲の免疫制御に関わる分子に焦点を当てた研究であることから、本研究で得られた結果は今後、結核に限らず多くの感染症にも応用可能である。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 健太 (WATANABE KENTA)

独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター・研究員

研究者番号：20582208

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松尾 和浩 (MATSUO KAZUHIRO)

日本 BCG 研究所・研究開発部・研究開発部長

研究者番号：70521095