

令和元年6月21日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2018

課題番号：25460558

研究課題名(和文) 粘膜投与型新規結核ブースターワクチンに用いるアジュバントの有効性とその作用機構

研究課題名(英文) Efficacy of adjuvant for new mucosal tuberculosis booster vaccine and its mechanisms

研究代表者

前山 順一 (Maeyama, Jun-ichi)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・主任研究官

研究者番号：40199641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： CpGモチーフを含む新規オリゴDNAであるG9.1を粘膜アジュバントとして用いた場合、ジフテリアトキソイドとの経鼻投与で特異的抗体産生および毒素中和活性の増強が認められた。この反応は、TLR9および形質細胞様樹状細胞(pDC)の関与が認められた。また、マウス骨髄細胞と共培養したところ、IFN- γ が強く誘導された。さらにTh1免疫特異的転写因子であるT-betが強く発現した。以上よりG9.1は、pDCのTLR9を介してTh1免疫を増強する粘膜アジュバントであることが示された。その作用機構としてIFN- γ が重要な因子であった。モルモットの皮膚反応での結核ブースターワクチンの評価系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘膜アジュバントG9.1の作用機構の解明を目指すことで粘膜免疫増強機構の一端を明らかにすることによって、粘膜ワクチンによる投与法の改良・簡素化・経済性からの接種率の向上も期待でき、国民の健康のみならず国際的にも貢献が期待できる。

結核防御免疫の評価系確立は、結核ワクチンの開発を促進することが期待できる。ブースターワクチンが人への適用に至れば、BCG初回免疫による結核免疫の増強を図ることができる。成人肺結核の予防対策に対して、結核の中蔓延国である日本国民の健康のみならず、発展途上国など国際的にも貢献ができる。

研究成果の概要(英文)： When G9.1, which is a novel oligo DNA containing CpG motif, was nasally administered as a mucosal adjuvant with diphtheria toxoid, enhancement of the specific antibody production and that of the diphtheria antitoxin titers were observed. Involvement of TLR9 and plasmacytoid dendritic cells (pDC) in adjuvanticity of G9.1 was confirmed. Coculture of mouse bone marrow cells with G9.1 strongly induced IFN- γ production. T-bet, which is a specific transcription factor for Th1 cells, was strongly expressed. Therefore, G9.1 was shown to be a mucosal adjuvant that enhances Th1 immunity via TLR9 of pDC. And, also, IFN- γ produced by pDC near the mucosal membrane is an important factor as mechanisms of adjuvanticity of G9.1.

The evaluation system of tuberculosis booster vaccine efficacy by delayed type hypersensitivity reaction against tuberculosis antigen was established by guinea pigs administered BCG with low immunostimulatory ability as prime immunization.

研究分野：細菌学

キーワード：アジュバント ワクチン 粘膜免疫 結核 CpG 感染防御

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的に新興・再興感染症が深刻化している。中でも結核は世界人口の約3分の1が感染し、毎年多くの新規患者と死亡が確認され、世界規模での対応が求められる重要な細菌感染症である。BCGは唯一の結核予防ワクチンで、小児の結核性髄膜炎や粟粒結核には極めて有効であるが、成人の肺結核に対する効果には限界があるとされている。わが国では、乳幼児期に接種したBCGによる免疫が低下する10代半ばから老年にいたる世代での肺結核発症が問題となっている。また、BCG再接種は、有効性など様々な理由で行わない一方、現在もBCGを凌駕する新ワクチンは実用化していない。ゆえに我々は、新規結核ワクチンとして、BCGプライム免疫の効果を増強し、成人期以降の低下した結核免疫を増強するブースターワクチンの開発を目指している。初回免疫としては、我が国では乳幼児期でのBCGの定期接種が定められているので、これを前提とした新規結核ブースターワクチンの開発を目指すことは、効率的で有効な戦略である。

2. 研究の目的

粘膜投与型の新規結核ブースターワクチンの開発を目指し、それに用いるアジュバントの効果とその作用機構を解析することである。現在、成人期以降の肺結核対策が喫緊の課題とされている。ゆえに我々は、乳幼児期に接種する結核予防ワクチン、BCGによるプライム免疫の効果を増強することによって、成人期以降の低下した結核免疫を増強するブースターワクチンの開発を目指している。その開発には用いるアジュバントの効果と作用機構の解明が欠かせない。そこで形質細胞様樹状細胞(pDC)に認識される新規のCpGモチーフを含むオリゴDNA(CpG-DNA)G9.1を用いて、その効果と作用機構の解析を行い、特に以下のことを検討する。
(1) 結核菌の組換えタンパク質に対する免疫応答のG9.1による増強効果とpDCの関与
(2) 動物モデルによる結核予防効果の評価系確立とワクチン候補におけるG9.1の効果

3. 研究の方法

(1) マウスまたはモルモットに、評価法の確立しているモデル抗原としてのジフテリアトキソイド(以下DT)および結核菌の組換えタンパク質をアジュバントと共に経鼻投与し、粘膜及び全身の免疫応答の増強、感染防御能の増強、これらへのpDCの関与など免疫細胞の応答を比較検討した。
(2) ブースターワクチンの有効性検討のために、BCGを用いた成人期以降の低下した結核免疫の動物モデル系を確立する。続いてブースターワクチン候補として実際に結核菌抗原とアジュバントを投与し、それによる免疫応答を検討した。

4. 研究成果

(1) G9.1の免疫増強効果: マウス鼻腔にDTとG9.1、または対照ワクチンとしてDTと組換えコレラトキシンBサブユニット(rCTB)を投与し、防御免疫反応を測定した。DTにG9.1を組み合わせて投与すると、血清中に毒素中和活性が発現し、抗DT抗体価が上昇した。また、肺・鼻洗浄液に粘膜IgA抗体価の上昇が認められた。DT+rCTB投与マウスと比較すると、血清に特異的IgG2a/IgG2c抗体(Th1免疫の指標)、脾細胞に対する抗原刺激でIFN- γ が多く産生された。

マウス骨髄細胞をG9.1と24時間共培養したところ、IFN- γ の産生が強く誘導された。また、IgA産生に重要な役割を果たすBAFFの産生が有意に増強した。さらにTh1細胞の特異的な転写因子であるT-betが強く発現した。

G9.1+DTを、C57BL/6wild、TLR9ノックアウト(KO)、及びMyD88 KOマウスのそれぞれに経鼻投与したところ、KOマウスでは抗体産生が著しく低下した。G9.1の経鼻投与により誘導される免疫応答にpDCが関与するかどうかを明らかにするため、抗pDC抗体を投与してマウスからpDCを除去し、G9.1+DTを経鼻投与した。pDC除去マウスでは、DT特異的IgG抗体の産生が無処置マウスに比べて低いことが示された。結核菌抗原を投与したC57BL/6マウスにおいてG9.1との同時投与で結核菌抗原に特異的なIgG2c産生を増強した。以上よりG9.1は、pDCのTLR9を介してTh1免疫を増強するアジュバントであることが示された。

(2) 作用機構へのIFN- γ の関与: CpG DNAであるG9.1はpDCにIFN- γ の産生を誘導する。このことがG9.1の作用機構であることを解明するため、IFN- γ を粘膜アジュバントとして用いた場合に抗体産生が増強されるかどうか確認した。BALB/cマウスを用いて、DTとIFN- γ を同時経鼻投与したところ、抗原特異的血清IgG抗体産生(図1)およびジフテリア毒素に対

する毒素中和抗体産生の増強が認められ、G9.1と比較しても同等以上の高値を示した。さらにサブクラス IgG2a 抗体産生の増強作用も認められた。また、マウス骨髄細胞を用い *in vitro* で pDC に対する抗体、IFN- γ 受容体抗体を加えた場合および IFN- γ 受容体ノックアウトによって、G9.1による IFN- γ 産生の低下が認められた。以上のことから、マウスにおいて G9.1 による粘膜アジュバント作用は、粘膜近傍の pDC により産生される IFN- γ が作用機構の重要な因子であることが示唆された。

(3) 結核ブースタワクチンの評価系構築： 遅延型過敏反応 (DTH) で結核ブースタワクチンの有効性を評価するため、免疫賦活能の低い現行 BCG のサブポピュレーションをプライム免疫として用い、ブースタワクチン投与後のモルモットの皮膚反応およびマウスの足蹠反応を測定することによって結核防御免疫を評価する系を構築した。これを踏まえ、実際に結核菌を噴霧感染させたところ、BCG を初回免疫した後、結核菌抗原と G9.1 の組み合わせでブースターとして皮内投与したとき、モルモットにおいては、DTH による評価系とほぼ同様な有効性評価が得られ、有用性が示された。一方マウスにおいては、系統によって結核菌や BCG に対する感受性が異なり、DTH と感染防御能との間に乖離があることが分かった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

- ① Iho S, Maeyama J, and Suzuki F. CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 査読有 2015,11(3), 755-760.
- ② Maeyama J, Takatsuka H, Suzuki F, Kubota A, Horiguchi S, Komiya T, Shimada I, Murata E, Osawa Y, Kitagawa H, Matsuki T, Isaka M, Yamamoto S, Iho S. A Palindromic CpG-Containing Phosphodiester Oligodeoxynucleotide as a Mucosal Adjuvant Stimulates Plasmacytoid Dendritic Cell-Mediated TH1 Immunity. *PLoS One*. 査読有 2014,9(2): e88846.
- ③ Taniguchi K, Takii T, Yamamoto S, Maeyama J, Iho S, Maruyama M, Iizuka N, Ozeki Y, Matsumoto S, Hasegawa T, Miyatake Y, Itoh S, Onozaki K. Reactivation of immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* by boosting with the CpG oligomer in aged mice primarily vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG. *Immun Ageing*. 査読有 2013,10(1):25.

[学会発表](計 2 2 件)

瀧井猛将、宮竹佑治、谷口恵一、伊藤佐生智、大原直也、前山順一、林 大介、山本三郎、肥田重明、小野崎菊夫、*Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 sub-type 間での酸化ストレス応答の差違の解析、日本薬学会第 139 年会、2019

Jun-ichi Maeyama, Hideki Asanuma, Daisuke Hayashi, Fumiko Suzuki, Yuriko Ozeki, Matsumoto Sohkichi, Sumiko Iho, Saburo Yamamoto, A novel phosphodiester backbone oligodeoxynucleotide promotes vaccine ability to tuberculosis and flu, 12th Vaccine Congress, 2018

前山順一、林大介、山本十糸子、向井徹、岡林佐知、田村敏生、山崎利雄、尾関百合子、松本壮吉、伊保澄子、山本三郎、カニクイザルを用いた MDP1 と G9.1 からなる結核ブースターワクチン候補の有効性評価、第 91 回日本細菌学会総会、2018

Daisuke Hayashi, Jun-ichi Maeyama, Toshiko Yamamoto1, Toshio Yamazaki, Tetsu Mukai, Toshiki Tamura, Sachi Okabayashi, Fumiko Suzuki, Yuriko Ozeki, Akira Yokoyama, Yuriko Suzuki, Yasushi Ami, Yoshitaka Goto, Sumiko Iho, Sohkichi Matsumoto and Saburo Yamamoto, The effects of the booster vaccine composed of MDP1 and G9.1 against tuberculosis in cynomolgus monkeys, The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences

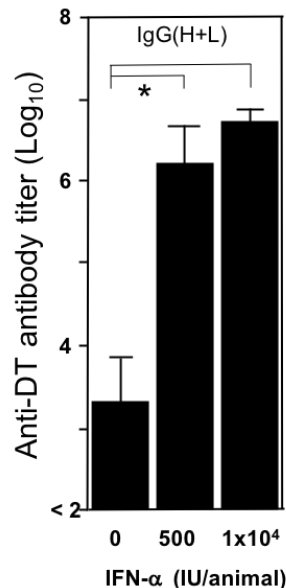


図 1: IFN- α による抗体産生の増強 (* : $p < 0.05$)

Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018

Jun-ichi Maeyama, Daisuke Hayashi, Toshiko Yamamoto, Toshio Yamazaki, Fumiko Suzuki, Yuriko Ozeki, Matsumoto Sohkiichi, Sumiko Iho, Saburo Yamamoto, Phosphodiester-linked new oligodeoxynucleotide promotes vaccine ability to tuberculosis, The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, 52nd Mycobacteria Panel Meeting, 2018

Hideki Asanuma, Koichiro Tateishi, Kayoko Sato, Hideki Hasegawa, Jun-ichi Maeyama, Sumiko Iho, Saburo Yamamoto, Kohtaro Fujihashi, Norio Yamamoto, Essential roles for protective SIgA Abs induced by nasal G9.1 combined influenza VLP vaccine, 第 46 回日本免疫学会学術集会、2017

山本三郎、林大介、山本十糸子、小山明、前山順一、網康至、須崎百合子、向井徹、岡林佐知、田村敏生、山崎利雄、松本壮吉、尾関百合子、伊保澄子、鈴木史子、後藤義孝、新規結核抗原 MDP1 と CpG ODN G9.1 からなる結核ブースターワクチンのカニクイザルに対する有効性、第 21 回日本ワクチン学会、2017

立石恒一郎、山本典生、佐藤佳代子、長谷川秀樹、前山順一、伊保澄子、山本三郎、小田切孝人、藤橋浩太郎、浅沼秀樹、2 つの感染モデルを用いた CpG-ODN G9.1 添加経鼻インフルエンザワクチンの有効性、第 21 回日本ワクチン学会、2017

Maeyama J, Suzuki F, Ozeki, Y, Asanuma, H, Matsumoto S, Iho, S, Yamamoto, S, Study of a novel CpG oligodeoxynucleotide to promote vaccine ability against TB or Flu, the 2017 International Society for Vaccines Annual Congress, 2017

Hideki Asanuma, Koichiro Tateishi, Hideki Hasegawa, Norio Yamamoto, Kayoko Sato, Jun-ichi Maeyama, Sumiko Iho, Saburo Yamamoto, Takato Odagiri, Kohtaro Fujihashi, Enhancement of protective mucosal immunity against influenza virus infection by a combination of Influenza antigen plus G9.1 (CpG ODN) as nasal adjuvant, International Congress on Mucosal Immunology 2017, 2017

前山順一、山崎利雄、林大介、山本十糸子、尾関百合子、鈴木史子、山口雄大、松本壮吉、伊保澄子、山本三郎：遅延型過敏反応から検討した MDP1 および G9.1 からなる結核ブースターワクチン候補の免疫条件、第 90 回日本細菌学会総会、2017

鈴木史子、岩崎博道、前山順一、松本壮吉、山本三郎、伊保澄子：形質細胞様樹状細胞を標的とする TLR 9 リガンドのアジュバントとしての作用メカニズム、第 20 回日本ワクチン学会学術集会、2016

前山順一、山崎利雄、山本十糸子、林大介、鈴木史子、尾関百合子、松本壮吉、伊保澄子、山本三郎、組換え結核菌抗原 MDP1 および DNA アジュバント G9.1 からなる結核ブースターワクチン候補の最適化の試み、第 89 回日本細菌学会、2016

前山順一、山崎利雄、山本十糸子、林大介、鈴木史子、尾関百合子、松本壮吉、伊保澄子、山本三郎、組換え結核菌抗原 MDP1 および DNA アジュバント G9.1 からなる結核ブースターワクチン候補の最適化の試み、第 89 回日本細菌学会、2016

Yamamoto S, Yamamoto T, Hayashi D, Iho S, Matsumoto S and Maeyama J, Discovery of CpG-DNA and Research on Novel TB Vaccine Candidate Development, 50th U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program, TB, Leprosy Panel, 2016

Maeyama J, Hayashi D, Suzuki F, Ozeki Y, Matsumoto S, Yamamoto S, Development and evaluation of new tuberculosis booster vaccine candidates, 第 44 回日本免疫学会、2015

前山順一、山崎利雄、山本十糸子、林大介、松本壮吉、伊保澄子、山本三郎、TLR 9 リガンドである G9.1 をアジュバントとして用いた結核ブースターワクチンの開発、第 18 回日本ワクチン学会、2015

前山順一、山崎利雄、山本十糸子、林大介、松本壮吉、伊保澄子、山本三郎、結核菌組換えタンパク質 MDP1 および CpG-DNA である G9.1 を用いた結核ブースターワクチンの開発、第 88 回日本細菌学会、2015

Maeyama J, Suzuki F, Yamamoto S, Iho S, A novel phosphodiester oligodeoxynucleotide containing palindromic CpG motif as a mucosal adjuvant stimulates plasmacytoid dendritic cell-mediated Th1 Immunity, 第 43 回日本免疫学会、2014

前山順一、山崎利雄、山本十糸子、林大介、松本壮吉、網康至、須崎百合子、伊保澄子、山本三郎：結核菌組換えタンパク質および TLR 9 リガンドを用いた結核ブースターワクチンの結核菌噴霧感染による評価、第 87 回日本細菌学会総会、2014

②① 前山順一、山崎利雄、山本十系子、林大介、松本壮吉、網康至、伊保澄子、山本三郎：結核ブースターワクチンとしての結核菌組換えタンパク質 MDP1 および TLR9 リガンド G9.1 アジュバントの結核菌噴霧感染による評価、第17回日本ワクチン学会学術集会、2013

②② Takii T, Taniguchi K, Yamamoto S, Maeyama J, Iho S, Maruyama M, Iizuka N, Ozeki Y, Matsumoto S, Itoh S, Onozaki K. : Boosting effect of Oligo B in super aged mice primarily vaccinated with Mycobacterium bovis BCG on the protection activity against Mycobacterium tuberculosis infection. From Range Mycobacteria Conference, 2013.

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：免疫刺激 G9.1 の抗結核ブースターワクチン創出への応用

発明者：伊保澄子、前山順一、松本壮吉、山本三郎

権利者：国立大学法人福井大学、国立感染症研究所、公立大学法人大阪市立大学、日本ビーシーエー製造株式会社

種類：特許

番号：特許第 5906019 号

取得年：平成28年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：伊保 澄子

ローマ字氏名：Iho Sumiko

所属研究機関名：福井大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：80151653

(2)研究協力者

研究協力者氏名：井坂 雅徳

ローマ字氏名：Isaka Masanori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。