

## 結核を中心とした感染制御のための 新規ワクチン開発と免疫学的評価

相澤 (小峯) 志保子<sup>1)</sup>, 中西照幸<sup>2)</sup>, 早川 智<sup>1)</sup>, 江角眞理子<sup>1)</sup>, 須崎 愛<sup>1)</sup>, 本多三男<sup>1)</sup>

### Novel vaccine development and evaluation of immune responses for mycobacterial infection

Shihoko Komine-AIZAWA<sup>1)</sup>, Teruyuki NAKANISHI<sup>2)</sup>, Satoshi HAYAKAWA<sup>1)</sup>,  
Mariko ESUMI<sup>1)</sup>, Ai SUZAKI<sup>1)</sup>, Mitsuo HONDA<sup>1)</sup>

#### 要旨

結核の防御におけるBCGワクチンの限界が示唆されており、より効果的な結核ワクチンの開発・実用化が待たれている。さらに非結核性抗酸菌症の増加が問題になっている。我々は、抗原特異的細胞傷害性CD8陽性エフェクターT細胞を誘導させることを目的に、BCGに*Mycobacterium kansasii*のAg85Bを発現させた新規組換えBCGワクチン(rBCG85B)を作成し、マウスにおける免疫応答の解析を行った。さらに、rBCG85B免疫マウスに結核菌を感染させて結核防御能を解析した。その結果、BALB/c(H2<sup>d</sup>)マウスにおいて、結核菌由来のAg85Bに対する抗原特異的CD8陽性エフェクターT細胞を誘導する新規エピトープを発見した。*M.kansasii*, *M. leprae*由来のAg85BのCD8エピトープでも同様にCD8陽性エフェクターT細胞が誘導された。結核菌感染実験においては、rBCG85B/DNA85B免疫は、BCG免疫よりも臓器内の生菌数を低く抑えられた。rBCG85B/DNA85Bは効率よく結核特異的CD8エフェクター細胞を誘導できるため、新規結核ワクチンの有力な候補となりうる。さらに非結核性抗酸菌やらい菌のワクチンとしても有効である可能性が示唆された。

#### 1. はじめに

結核、HIV/AIDS、マラリアは三大感染症と称され、早急な国境を超えた対策が必要とされている。なかでも、結核は空気感染するため、感染防御対策が重要である。結核に対する唯一のワクチンであるBCGは、20世紀の初頭から、全世界で使用されており、安全性が高く、安価で安定供給できる。しかし、BCGは小児の結核の重症化予防には効果的であるが、成人においては十分な結核発症予防効果がないといわれている<sup>1), 2)</sup>。したがって、より効果的な結核ワクチン開発が求められており、多くの新規結核ワクチン開発が進められているが、実用化には至っていない<sup>3), 4)</sup>。結核菌は細胞内寄生菌であるため、有効な結核防御には特異的細胞性免疫の誘導が重要である<sup>5)</sup>。我々は、現行のBCGワクチンは結核特異的CD4陽性ヘルパーT細胞を誘導するが、CD8陽性細胞傷害性T細胞は誘導しないことを明ら

かにした。すなわち、既存のBCGは結核特異的CD8陽性細胞傷害性T細胞の誘導が不十分である可能性がある。そこで、効率の良い細胞性免疫誘導を目指して、結核菌が感染後早期に生体内で大量に分泌するタンパク質の一つであるAg85Bを標的抗原として、組換えBCGワクチン(rBCG85B)を開発した。本研究ではマウスモデルを用いて、このワクチンの有効性と感染防御機構の解析を行った。また、近年結核に類似の症状を呈する非結核性抗酸菌症患者が、日本を含む世界各国で増加している。Ag85Bはさまざまな抗酸菌に共通する分泌タンパクであるため、この組換えBCGワクチンの非結核性抗酸菌症予防への応用もあわせて検討した。

#### 2. 対象及び方法

##### マウス

BALB/c, C57BL/6J マウスをチャールズリバーか

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

相澤 (小峯) 志保子 : aizawa.shihoko@nihon-u.ac.jp

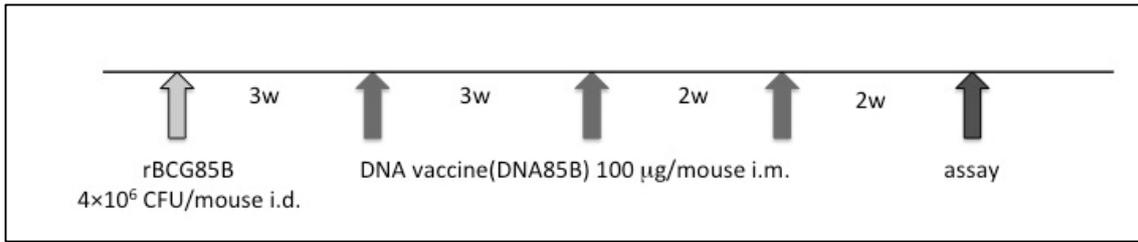


図 1 免疫スケジュール

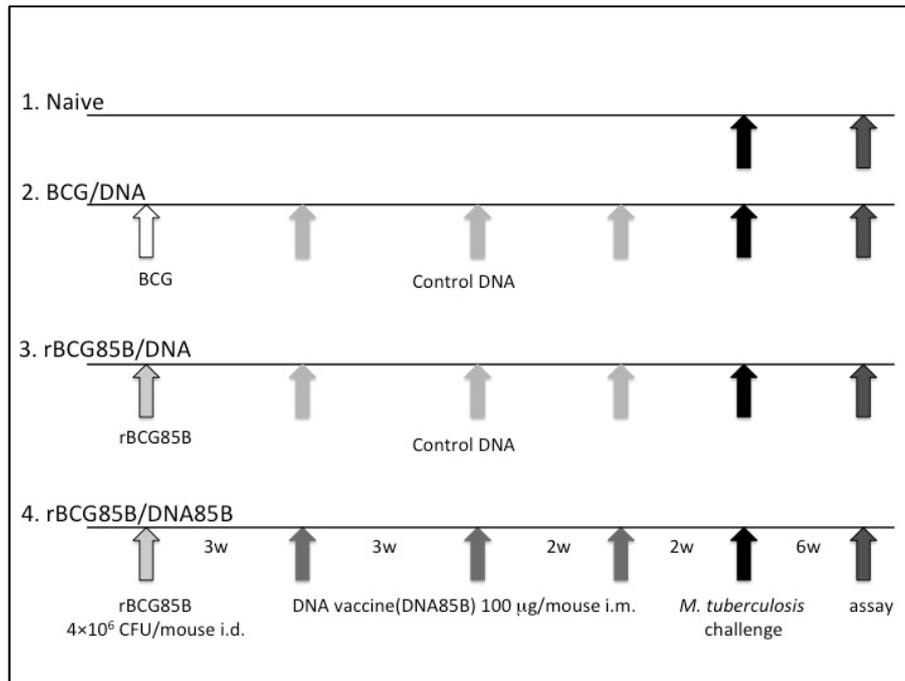


図 2 結核菌噴霧感染実験スケジュール

ら購入した。BALB/cとC57BL/6JのF1世代であるCB6F1/slcマウスを日本SLCより購入した。動物実験は日本大学動物実験委員会の承認を得て行った。

### エピトープマッピング

新規組換えBCGワクチン(rBCG85B)をマウス(C57BL/6J, BALB/c, CB6F1/slc)に接種し, Ag85BのDNAワクチン(DNA85B)を3回ブースト接種した(図1)。

最終接種の2週間後に解剖し, 脾細胞を*in vitro*にて結核抗原で刺激し, CD4陽性T細胞, CD8陽性T細胞それぞれが産生するサイトカイン(TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2など)をフローサイトメトリーで測定した。MHCのハプロタイプが異なる2つの系統のマウスで, *M.tuberculosis* Ag85B (*Mtb*85B)特異的T細胞の誘導が異なることが明らかとなった。すなわち,

C57BL/6J (H2<sup>b</sup>)では*Mtb*85B特異的CD4T細胞が誘導され, BALB/c (H2<sup>d</sup>)では*Mtb*85B特異的CD8T細胞が誘導された。そこで, オーバーラッピングペプチドを用いてエピトープマッピングを行い, CD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞それぞれの特異的な機能性エピトープを同定した。さらに, マウスのMHCクラスI分子にはH-2D, H-2K, H-2Lのサブクラスが存在するためこれらを発現させた細胞株と, blocking antibodyを用いて, 抗原提示に使用されているサブクラスを明らかにした。また, C57BL/6JとBALB/cのF1マウス(CB6F1/slc, H2<sup>b/d</sup>)でも同様に検討した。

### rBCG85Bの結核感染防御能の評価

マウス(C57BL/6J, BALB/c, CB6F1/slc)を①BCG接種群, ②rBCG85B単独接種群, ③rBCG85B/

DNA85B ワクチン群, ④対照群の4グループにわけた。rBCG85B/DNA85B ワクチン群ではrBCG85B ワクチン接種3週間後から booster としてDNA85B ワクチンを2週間隔で3回接種した。BCG ワクチン接種群とrBCG85B ワクチン単独接種群ではBCG ワクチン接種もしくはrBCG85B ワクチン接種3週間後からコントロールDNAを2週間隔で3回接種した。最終の接種から2週間後に結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* Erdman 株を噴霧感染させた。6週間後に解剖し、肺、脾臓をホモジナイズし、小川培地、もしくは7H10培地で培養し組織中の生菌数を検出した (図2)。本研究は日本BCG研究所、結核研究所との共同研究にて行った。

### rBCG85B の非結核抗酸菌症予防への応用

rBCG85B をマウス (C57BL/6J, BALB/c, CB6F1/slc) に接種し、DNA85B ワクチンを3回ブースト接種した (図1)。最終接種の2週間後に解剖し、脾細胞を *in vitro* にて *M.kansasii*, *M.leprae* 由来のエピトープペプチドで刺激しCD4陽性T細胞, CD8陽性T細胞それぞれが産生するサイトカイン (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2) をフローサイトメトリーで測定した。

## 3. 結果

### 3.1 新規組換え BCG ワクチン (rBCG85B) により誘導される免疫能の解析・エピトープマッピング

rBCG85B をMHCハプロタイプの異なるBALB/c (H2<sup>d</sup>) とC57BL/6J (H2<sup>b</sup>) に接種し免疫応答を解析した。rBCG85B もしくはBCG接種3週間後から booster としてDNA85B ワクチン, もしくはコントロールDNAを2週間隔で3回接種した。最終の接種から2週間後に脾細胞を *in vitro* において *Mtb85B* のプールペプチドで刺激し, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2を産生するCD4陽性T細胞, CD8陽性T細胞をフローサイトメトリーで検出した (細胞内サイトカイン染色)。なお, 2種類以上のサイトカインを産生するT細胞を polyfunctional effector T細胞とした。既存のBCG接種では, *Mtb85* 特異的 polyfunctional CD8陽性 effector T細胞は検出されなかった。一方, rBCG85B接種ではBALB/cにおいて *Mtb85* 特異的 polyfunctional CD8陽性 T effector細胞の誘導がみられた。一方, C57BL/6Jにおいては *Mtb85* 特異的 polyfunctional CD8陽性 T effector細胞が誘導されなかつ

た。次に, それぞれのマウスの系統においてエピトープマッピングを行った。その結果, C57BL/6Jにおける polyfunctional CD4陽性 effector T細胞を誘導するエピトープを見出し, 既知のCD4エピトープ (P25) と同一であることを確認した。しかし, BALB/cではこのCD4エピトープペプチド刺激による polyfunctional CD4陽性 effector T細胞の誘導はみられなかった。一方, BALB/cにおいては polyfunctional CD8陽性 effector T細胞を誘導可能である新規のエピトープを発見した。しかし, C57BL/6Jにおいては, このエピトープによるCD8陽性T細胞の誘導はみられなかった。したがって, これらのエピトープはH2ハプロタイプに拘束されていると考えられる。そこで, これらのマウスのF1世代であるCB6F1/slc (H2<sup>b/d</sup>) の免疫応答を同様に解析したところ, CD4, CD8共に *Mtb85* 特異的 polyfunctional effector T細胞が誘導された。特に, polyfunctional CD8陽性 effector T細胞に関しては, BALB/cよりも強い誘導がみられた。この結果から, 新規組換えBCGワクチンであるrBCG85Bは, 既存のBCGに比べて効率よく結核菌特異的細胞傷害性T細胞を誘導できることが明らかとなった。また, 抗原特異的CD8細胞の強い誘導には, 同一の抗原特異的CD4陽性ヘルパーT細胞の存在が重要であることが示唆された。

次に, マウスのH2 (MHCクラスI分子) にはH2-D, H2-K, H2-Lのサブクラスが存在するため, これらを発現させた細胞, もしくは blocking antibodyを用いて, 抗原提示に使用されているMHCクラスIのサブクラスを調べた。C57BL/6J由来の細胞 (H2<sup>b</sup>) であるC1498細胞株にH2-D<sup>d</sup>, H2-K<sup>d</sup>, H2-L<sup>d</sup>を発現させた細胞 (米国NIH Marglies博士より分与いただいた) にそれぞれCD8 エピトープペプチドを加え2時間培養した後洗浄し, rBCG85B / DNA85B を接種したBALB/cもしくはCB6F1/slcマウスの脾細胞を刺激した。その結果, H2-K<sup>d</sup> + CD8 エピトープペプチドで刺激した場合のみ, CD8陽性T細胞中にサイトカイン産生細胞を認めた。一方, H-2D<sup>d</sup>, H-2D<sup>d</sup>+H-2K<sup>d</sup>, H-2L<sup>d</sup>の blocking antibody存在下にrBCG85B/DNA85Bを接種したBALB/c, もしくはCB6F1/slcマウスの脾細胞をCD8エピトープペプチドで刺激した場合には, anti- H-2D<sup>d</sup>+H-2K<sup>d</sup> antibodyを加えた場合のみCD8陽性T細胞中のサイト

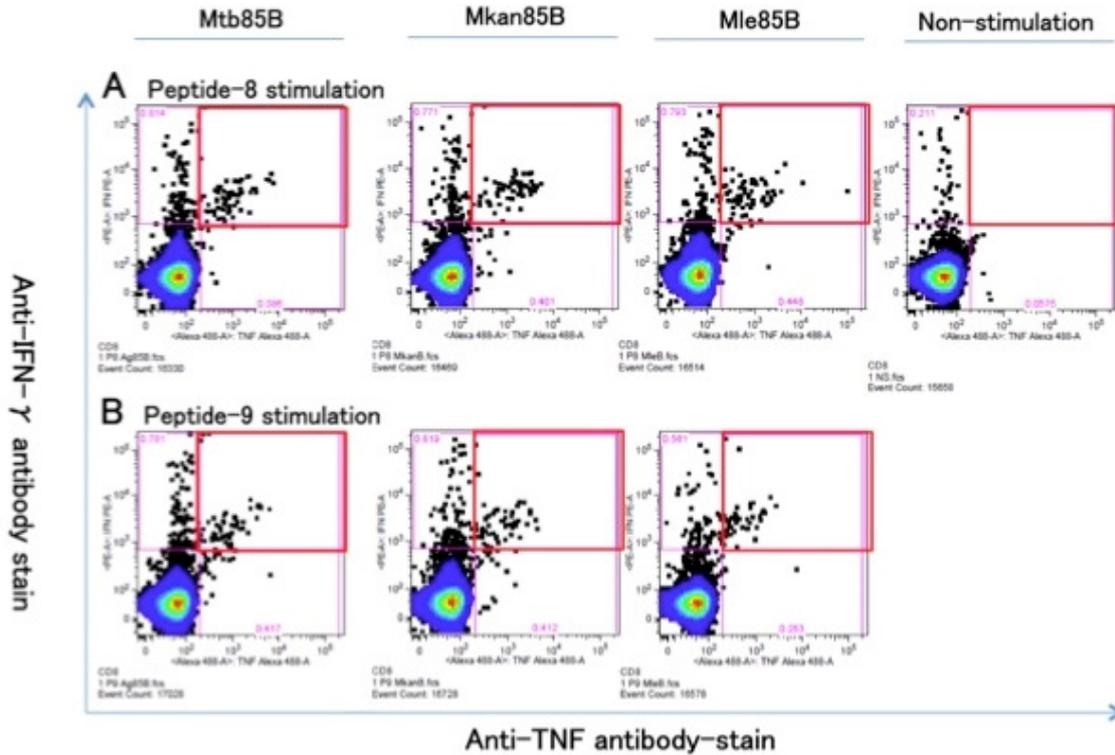


図3 rBCG85B/DNA85B免疫により *M.kansasii* 由来、*M.leaprae* 由来のAg85B特異的polyfunctional CD8陽性T細胞が誘導された

カイン産生細胞がみられなくなった。以上の結果から、我々が発見したCD8エピトープペプチドはH2-K<sup>d</sup>に抗原提示されることが明らかになった。

### 3.2 rBCG85Bの結核感染防御能の評価

マウス (C57BL/6J, BALB/c, CB6F1/slc) を①BCG接種群, ②rBCG85B単独接種群, ③rBCG85B/DNA85Bワクチン群, ④対照群の4グループにわけ、それぞれ免疫した。最終の接種から2週間後に結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* Erdman株を噴霧感染させた。6週間後に解剖し、肺、脾臓内の生菌数を検出した。全てのマウスの系統において、対照群よりもBCGワクチン接種群の組織内生菌数が抑えられた。BALB/cマウスとCB6F1/slcマウスにおいては、BCGワクチン接種群よりもrBCG85Bワクチン単独接種群とrBCG85B/DNA85Bワクチン群での組織内生菌数が低く抑えられた。BALB/cマウスではrBCG85Bワクチン単独接種群よりもrBCG85B/DNA85Bワクチン群でさらに組織内生菌数が低下した。一方、CB6F1/slcマウスではrBCG85Bワクチン単独接種でもrBCG85B/DNA85Bワクチン群

と同程度 ( $10^3$ CFU/lung程度) まで組織内生菌数が低下した。C57BL/6JマウスではBCGに対してrBCG85B/DNA85Bの優位性がみられなかった。この結果から、結核感染防御には結核菌特異的CD8陽性細胞傷害性T細胞とCD4陽性ヘルパーT細胞の両方が重要であること、rBCG-Ag85Bワクチンは既存のBCGワクチンに比較して、結核感染予防に優れていることが明らかになった。

### 3.3 rBCG85Bの非結核性抗酸菌症予防への応用

Ag85Bはさまざまな抗酸菌に共通する分泌タンパクであるが、菌種ごとにアミノ酸配列に多少の相違がみられる。我々が作成したrBCG85Bワクチンは *M.bovis* BCGに *M.kansasii* のAg85Bのプラスミドを組み込んでいるため、*M.bovis* BCGのAg85Bと *M.kansasii* のAg85Bを共に発現する系である。結核菌 *M.tuberculosis* と *M.bovis* のAg85Bのアミノ酸配列は、ほぼ同一であるが、*M.kansasii* のAg85Bとは89%程度の一致率である。一方、国内で多くみられる非結核性抗酸菌症の原因菌である *M.avium*, *M.intracellulare* の配列は *M.kansasii* とほぼ一致する。我々が

新規に発見したCD8エピトープの部分をも、*M. kansasii*の配列と比較すると、*M. tuberculosis*と*M. bovis*では2カ所の相違（前後入れ替わり）がみられたが、*M. avium*, *M. intracellulare*とは100%一致した。また、ハンセン病の原因菌であるらい菌*M. leprae*とでは1カ所の相違であった。そこで、rBCG85B/DNA85Bを接種したCB6F1/slcマウスの脾細胞を*M. tuberculosis*と*M. kansasii*, *M. leprae*のAg85B配列によるCD8エピトープペプチドでin vitroにて刺激し、細胞内サイトカイン産生をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、全てのAg85Bのエピトープペプチドで同様にpolyfunctional CD8 effector T細胞が誘導された（図3）。この結果から、rBCG85B/DNA85Bは結核菌のみならず、近年患者数の増加がみられている種々の非結核性抗酸菌症やらい菌のワクチンとしても有効である可能性が示唆された。

#### 4. 考 察

生体内に感染した結核菌の排除には免疫系が十分に働くことが重要である。細胞傷害性T細胞は結核菌に感染した細胞をperforinやgranzymesなどの細胞傷害性顆粒、またはFas-FasLの経路やTNFなどにより、apoptosisに陥らせる。apoptosisの状態になった感染細胞が未感染マクロファージに貪食されることにより、生体内から結核菌の排除が進む<sup>5)</sup>。抗原特異的CD8陽性細胞傷害性T細胞を誘導するためには、MHC class Iへの抗原提示、すなわち樹状細胞におけるクロスプレゼンテーションによる抗原提示が必要である。しかし、BCGは樹状細胞に貪食されても、クロスプレゼンテーションされにくいことが知られている<sup>2)</sup>。そのため、BCG免疫では抗原特異的CD4陽性ヘルパーT細胞は誘導可能であるが、CD8陽性細胞傷害性T細胞の誘導は弱いと考えられる。これまでも細胞傷害性T細胞を有効に誘導するワクチンを目指して、Ag85BをBCGに組み込むことにより、新たなワクチンを作成する試みがなされてきた<sup>3), 6), 7)</sup>。これらのワクチンは*M. tuberculosis*のAg85Bを単独で、あるいはAg85AやTB10.3などの他の抗原と同時にBCGに組み込む構造になっている。Ag85Bは抗酸菌で広く保存されており生体内で結核菌が感染早期に大量に産生し分泌するタンパクの一つであるが<sup>8)</sup>、*M. tuberculosis*と*M. bovis* BCG

のAg85Bのアミノ酸配列は相同で、*M. kansasii*の配列との相同性は89%である<sup>9), 10)</sup>。我々は、*M. kansasii*のAg85BをBCGに組み込んでrBCG85Bを作成した。rBCG85BはBCG自身のAg85Bに加えて、組み込んだ*M. kansasii*のAg85Bを大量に産生・分泌することを確認した。rBCG85Bに加えてAg85Bの遺伝子をコードしたプラスミドDNAをDNAワクチンとして追加接種することで、既存のBCGでは誘導が不十分であったMtb85B特異的polyfunctional CD8陽性T細胞を誘導可能であった。さらに2つのCD8エピトープを同定した。これらのエピトープは種々の抗酸菌で1~2アミノ酸の違いがあるが、結核菌と*M. kansasii*由来の配列のエピトープに加えて、らい菌由来の配列でも有効なCD8陽性T細胞エピトープとして機能した。近年、非結核性抗酸菌症患者が増加しているが、*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. abscessus*, *M. ulcerans*などの非結核抗酸菌のエピトープ部分の配列は*M. kansasii*と相同である。したがって、rBCG85B/DNA85Bワクチンは結核のみならず、非結核性抗酸菌症やハンセン病の予防にも有効である可能性がある。

我々が新たに発見したCD8エピトープは、H2-K<sup>d</sup>に拘束されることが明らかになった。Ag85Bの既知のCD4エピトープ (P25) はH2<sup>b</sup>に拘束されることが報告されている<sup>11, 12)</sup>。そこで、BALB/c (H2<sup>d</sup>)とC57BL/6J (H2<sup>b</sup>)のF1世代のマウスであるCB6F1/slc (H2<sup>b/d</sup>)を用いて実験を行った。CB6F1/slcマウスでは、Ag85B特異的CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞が共に誘導された。興味深いことにAg85B特異的CD4陽性T細胞の誘導はC57BL/6マウスと同程度であったのに対し、BALB/cに比較して6倍程度のAg85B特異的CD8陽性T細胞が誘導された。このことから、細胞傷害性T細胞の誘導には、同一抗原を認識するヘルパーT細胞の存在が重要であることが示唆された。

結核菌感染実験においては、既存のBCGに比較してrBCG85B/DNA85B免疫は肺内の生菌数が低く抑えられた。これは、rBCG85B/DNA85B免疫によるMtb85B特異的CD8陽性細胞傷害性T細胞の誘導によるものと考えられる。

今後はrBCG85BとDNA85Bの接種量、接種から感染までの期間などについても検討を進める予定である。さらに、ヒトにおけるMHC (HLA)とマウス

のH2には対応がみられないので、ヒトにおいても我々が発見したエピトープが機能するか検討が必要である。

## 5. 結語

rBCG85B/DNA85B免疫は結核由来Ag85B特異的CD8陽性細胞傷害性T細胞を誘導可能であり、既存のBCGよりも優れた結核防御能を示した。rBCG85B/DNA85B免疫は新規結核ワクチンの有力な候補となりうる。さらに非結核性抗酸菌やらい菌のワクチンとしても有効である可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究の成果は、平成28年度日本大学学術研究助成金(総合研究)、JSPS科研費16K09946の支援によりなされたものであり、ここに深謝いたします。

## 文献

- 1) Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathog* 2012;8:e1002607.
- 2) Ryan AA, Nambiar JK, Wozniak TM, et al. Antigen load governs the differential priming of CD8 T cells in response to the bacille Calmette Guerin vaccine or *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2009;182:7172-7.
- 3) Horwitz MA, Harth G. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 2003;71:1672-9.
- 4) Kaufmann SH, Weiner J, von Reyn CF. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *Int J Infect Dis* 2017;56:263-7.
- 5) Nunes-Alves C, Booty MG, Carpenter SM, Jayaraman P, Rothchild AC, Behar SM. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nat Rev Microbiol* 2014;12:289-99.
- 6) Radosevic K, Wieland CW, Rodriguez A, et al. Protective immune responses to a recombinant adenovirus type 35 tuberculosis vaccine in two mouse strains: CD4 and CD8 T-cell epitope mapping and role of gamma interferon. *Infect Immun* 2007;75:4105-15.
- 7) D'Souza S, Rosseels V, Romano M, et al. Mapping of murine Th1 helper T-Cell epitopes of mycolyl transferases Ag85A, Ag85B, and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2003;71:483-93.
- 8) Karbalaee Zadeh Babaki M, Soleimanpour S, Rezaee SA. Antigen 85 complex as a powerful *Mycobacterium tuberculosis* immunogene: Biology, immunopathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design. *Microb Pathog* 2017;112:20-9.
- 9) Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Yamada T. Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular alpha antigen. *J Bacteriol* 1988;170:3847-54.
- 10) Matsuo K, Yamaguchi R, Yamazaki A, Tasaka H, Terasaka K, Yamada T. Cloning and expression of the gene for the cross-reactive alpha antigen of *Mycobacterium kansasii*. *Infect Immun* 1990;58:550-6.
- 11) Tamura T, Ariga H, Kinashi T, et al. The role of antigenic peptide in CD4+ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int Immunol* 2004;16:1691-9.
- 12) Kariyone A, Higuchi K, Yamamoto S, et al. Identification of amino acid residues of the T-cell epitope of *Mycobacterium tuberculosis* alpha antigen critical for Vbeta11(+) Th1 cells. *Infect Immun* 1999;67:4312-9.