

医療分野研究成果展開事業/研究成果最適展開支援プログラム (AMED・A-STEP)

平成 27 年度成果報告書(公開)

プロジェクトリーダー (企業責任者)	日本ビーシージー製造株式会社 中央研究所 山本 三郎
研究責任者	国立大学法人新潟大学 医歯学総合研究科 松本 壮吉
参加機関	日本ビーシージー製造株式会社、国立大学法人新潟大学、 国立大学法人福井大学、国立感染症研究所、
研究開発課題	新規結核菌抗原と DNA アジュバントを用いた成人肺結核に対するブースターワクチンの開発

1. 研究開発の目的

結核は三大感染症のひとつであり、人類に甚大な健康被害をもたらす最大級の細菌感染症である。結核の予防には、結核菌を継代弱毒化させた生ワクチン BCG が利用されてきた。しかし、BCG は乳幼児の結核性髄膜炎や粟粒結核には 80%以上の高い予防効果が認められるものの、成人の肺結核に対する効果は不定であり、BCG 接種者であっても 15 歳以降の若年成人に結核罹患率の上昇が確認されている。このため、成人期の重要な疾患である肺結核の根絶を目的に、乳児期に接種した BCG をプライムワクチンとし、新規結核菌たんぱく質 MDP1 を抗原、Th1 免疫増強効果の高い CpG オリゴ DNA (G9.1) をアジュバントとするブースターワクチンを開発する。

2. 研究開発の概要

われわれ自身の発見に基づき、結核菌が常に産生する新規抗原 MDP1 と新しい免疫増強性 DNA アジュバント G9.1 の組み合わせにより、細胞性免疫を主体とした結核免疫の賦活化を図るブースターワクチンを創出する。さらにこのプライム-ブースターワクチンによる抗結核免疫の惹起メカニズムを解析する。

3. 研究開発の成果(平成 27 年度)

(1) 組換え MDP1 の精製【新潟大学】

MDP1 遺伝子を挿入した pET-22b(+)-vector で形質転換した大腸菌 BL21(DE3)pLys 株を培養し、IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) を添加して MDP1 の発現を誘導した。1 リットル培養から、およそ 0.5 mg の MDP1 を精製した。エンドキシンの除去を行うと、1 リットル培養からおよそ 0.25 mg のエンドキシンフリーMDP1 を精製した。MDP1 はトリプトファンを有せず 280 nm の吸光度では測定不可であるため、230 nm の吸光度で沈降速度を測定した(有坂文雄東京工業大学名誉教授との共同研究)。その結果、これまで MDP1 は 2 量体や多量体形成が指摘されていたが、生理的な塩濃度(150 mM NaCl)では単量体であることが判明した。また架橋実験でも、単量体であることを確認した。

(2) G9.1 の合成【福井大学】

G9.1 をエンドキシン 5 EU/mg 以下で合成した。G9.1(5'-GGGGGGGGGACGATCGTCG-3')を構成する polyG は多量体形成に寄与する可能性が示された。G9.1 は、キャリアタンパク質の存在下で高い活性を示し、DNA 結合性抗原 MDP1 との組み合わせに適していると考えられた。

(3) MDP1 と G9.1 の混合比の最適化の検討 (a)【福井大学・新潟大学】 (b)【国立感染症研究所・日本ビーシージー製造株式会社】

- (a) ヒト末梢血単核球(PBMC)や形質細胞様樹状細胞(pDC)に IFNs 産生を増強する、MDP1 と G9.1 の混合比を検討した。pDC を、1 分子の G9.1 に 0.1~2.0 分子の MDP1 を組み合わせた混液と共培養すると、IFN- $\alpha$ 産生が 100 倍以上増加した。PBMC を、1 分子の MDP1 に 0.5~10 分子の G9.1 を組み合わせた混液と共培養すると、IFN- $\gamma$ 産生が 5~10 倍増加した。MDP1 と G9.1 を組み合わせたブースターワクチンは少量投与で効果が期待され、0.05~0.1  $\mu$ M MDP1 に対する G9.1 の最適混合比は 0.05~0.5  $\mu$ M (MDP1 : G9.1 = 1 : 0.5 ~ 10)であった。
- (b) 結核菌噴霧感染実験においてモルモット脾臓に十分な防御反応を誘導した混合モル比 1 : 3.3 (MDP1 : G9.1)のブースターワクチンは、目標値 10 mm 以上の DTH 反応を引き起こすことを確認した。

(4) MDP1+G9.1 の投与方法、投与量、投与間隔の検討【国立感染症研究所・日本ビーシージー製造株式会社】

投与間隔は、結核菌噴霧感染実験においてモルモット脾臓に顕著な防御効果を示した3週程度が最短と考えられた。また、20  $\mu$ g 以上の MDP1 の投与により目標値 10 mm 以上の DTH 反応が誘導されることを確認した。

(5) MDP1+G9.1 ブースターワクチンの免疫機序解明 (a)【新潟大学】 (b)【福井大学】 (c)【国立感染症研究所】 (d)【日本ビーシージー製造株式会社】

- (a) PPD、MDP1、又は G9.1 で刺激した PBMC から採取した RNA からゲノム由来の DNA を除去し、逆転写を行って cDNA を得た。T細胞分化を担う転写因子のプライマーを構築し、通常の PCR で増幅を確認した後、1 名のドナーに関してリアルタイム PCR による解析を TaqMan プローブ法で実施した。G9.1 刺激で防御的 TH1 応答のマーカーである *T-bet* の発現亢進が認められた。
- (b) ヒト PBMC を MDP1 又は G9.1 と共培養し、樹状細胞サブセットの分化成熟を評価した。MDP1 と G9.1 はそれぞれ、mDC1、mDC2、及び pDC に共刺激分子の発現を亢進した。そのメカニズムとして、G9.1 により活性化された pDC より産生される IFN- $\alpha$ の関与が示された。
- (c) MDP1+G9.1 で免疫した C57BL/6 マウスについて脾臓単核球の FACS 解析を実施した。その結果、IFN- $\gamma$ 産生細胞が CD8 陽性T細胞群で増加することが示された。
- (d) 抗結核ワクチン BCG で免疫したモルモットは、結核菌噴霧感染後の肺内菌数をコントロールできるが感染を防御できない。一方、脾臓では感染をほぼ制御した。BCG 免疫モルモットと非免疫モルモットについて結核菌噴霧感染後 1~4 週後に免疫細胞を採取し FACS で細胞抗原を解析した。

(6) カニクイザルでのワクチン接種や結核菌感染実験系の構築【国立感染症研究所・日本ビーシージー製造株式会社】

カニクイザルの免疫解析を行うため感染研村山庁舎内 P2 施設にサル 3 頭を導入し飼育を始めた。今後の結核菌感染実験は同ハンセン病研究センターP3 施設にて行う。