

博士(医学) 山村 泰弘

### 論文題目

Immunogenicity of latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice

(潜伏期結核菌が発現するタンパク質群をコードする DNA で免疫したマウスにおける各抗原の免疫原性の検討)

### 論文の内容の要旨

#### [ はじめに ]

結核は代表的な再興感染症で、現在もなお 20 億人（世界人口の約 3 分の 1）以上の人々が結核菌に感染している。肺に侵入した結核菌は、まず肺胞マクロファージによって貪食され、T 細胞を中心とした宿主の免疫応答が惹起されるが、結核菌が完全に除去されることは少ない。その結果、結核菌は感染したマクロファージの中で長期間生存し、潜伏感染状態が成立する。最も一般的な病型である成人肺結核の最大の原因は、潜伏感染した結核菌の再活性化による内燃性再燃である。一方、結核のワクチンとして約 90 年前に開発され、現在も世界中で広く使用されているウシ結核菌の弱毒株である BCG は、新生児や小児の結核には効果があるものの、成人の肺結核には予防効果が乏しい。したがって、結核の再燃を予防する新しいワクチンならびに潜伏感染者の診断の基準となる生体マーカーの開発が早急に必要とされている。今回我々は、これらの要求を実現するための基礎データを収集すべく、潜伏期結核菌が発現（活動期結核菌は非発現）することが報告されている、32 種類のタンパク質をコードする DNA で免疫したマウスにおいて、各抗原の免疫原性の検討を行った。

#### [ 材料ならびに方法 ]

結核菌の潜伏期関連タンパク質をコードする遺伝子は結核菌または BCG のゲノム DNA を鋳型として PCR で調製した。TubercuList の情報に基づきプライマーを設計した。得られた DNA は、pCI ベクター（DNA ワクチン用）および pET-28b(+)ベクター（タンパク精製用）へ挿入した。

抗原遺伝子を挿入した pET-28b(+)ベクターで大腸菌 BL21(DE3)を形質転換させ、イソプロピル-β-D(-)-チオガラクトピラノサイド（IPTG）を用いてタンパク発現を誘導し、7M 尿素でタンパク質を抽出した。そして Ni<sup>2+</sup>-ニトリロ三酢酸（Ni-NTA）アガロースを用いてタンパク質を精製し、抗原として使用した。

Helios gene gun system を用い、抗原遺伝子を含む pCI ベクターで、BALB/c および C57BL/6 マウスを 2 週間の間隔で 3 回 DNA ワクチンを施行した。

最終免疫から 2 週間後に脾細胞と血清を採取した。脾細胞は対応する抗原タンパク質存在下で 2 日間培養を行い、ELISA で培養液中のインターフェロン（IFN）- γ 濃度を測定した。

また、ELISAにて血清中の抗原特異的抗体を測定した。

#### [結果]

解析を行った32種類の候補抗原のうち、BALB/cでは12種類、C57BL/6では9種類の抗原でT細胞応答が誘導された。そのうちRv1998c、Rv2031c、Rv2032、Rv2623、Rv3132cに関しては、両系統でT細胞応答が誘導された。

また、血清中の抗体価はBALB/cでは12種類(26種類を解析)、C57BL/6では3種類(21種類を解析)の抗原に対して高い値を示した。そのうちRv2029c、Rv2626c、Rv3132cは両系統のマウスにおいて抗体産生を強く誘導した。

以上の結果より、Rv3132cは両系統でT細胞応答・抗体産生ともに惹起できることが明らかとなった。

#### [考察]

細胞内寄生細菌である結核菌に対する免疫応答は、CD4陽性ヘルパーT細胞(Th)とCD8陽性細胞傷害性T細胞(CTL)の両者が関与するが、前者のうちIFN- $\gamma$ を産生するTh1細胞が、特に重要な役割を果たすと考えられている。したがって、Th1細胞優位の免疫応答を惹起できる抗原の検索は、結核ワクチンの開発にとって非常に大きな課題である。T細胞による抗原認識は主要組織適合性抗原(MHC)によって拘束を受ける(分子によって提示できる抗原ペプチドのアミノ酸配列が異なる)。そのため、MHCの多様性を考慮に入れると、より大きな集団を対象としたワクチンの開発には、多くの候補抗原の同定が必要となる。

本研究では、BALB/cでは12種類、C57BL/6では9種類の抗原でT細胞応答を誘導できることが明らかとなったが、ヒトとマウスのMHCの違いを考慮に入れると、これらの抗原群の全てがヒトでも免疫原性を持つとは考えにくい。しかし、Th1細胞に対して抗原提示を行うMHCクラスII分子はクラスIに比べ、結合するペプチドのアミノ酸配列の制限が厳しくなく、異なるクラスII分子(更には種を超えた同分子)に結合するペプチドも報告されている。したがって、両系統でT細胞応答が誘導されたRv1998c、Rv2031c、Rv2032、Rv2623、Rv3132cに関しては、ヒトでも免疫原性を持つ可能性が期待できる。現在、これらの抗原特異的なマウスT細胞の表面形質(CD4/CD8)およびヒトでの免疫応答について解析中である。

結核に対するワクチン・プロトコールや治療戦略の確立に加え、より迅速で正確な診断と予後を予測するための生体マーカーの開発も重要課題である。現在、調製した抗原群に対するヒトの免疫応答の解析を開始しており、潜伏感染者のRv3132cに対する抗体価が、健常者より高いという結果を得ている(未発表データ)。

#### [結論]

潜伏期結核菌が発現する抗原32種類の免疫原性について、DNAワクチンを施したマウスで検討した。BALB/cでは12種類、C57BL/6では9種類の抗原でT細胞応答が誘導され、BALB/cでは12種類、C57BL/6では3種類の抗原に対して抗体産生が誘導された。特に、Rv3132cでは両系統でT細胞応答・抗体産生ともに惹起できた。

## 論文審査の結果の要旨

成人肺結核の最大の原因は潜伏感染した結核菌の再活性化による内因性再燃であるため、それを予防する新しいワクチン開発、および潜伏感染者の診断マーカーの開発は重要な課題である。今までにクオンティフェロンによる診断法があるが、それに勝る結核抗原の探索は重要である。そこで、潜伏期結核菌が発現すると報告されている 32 種類の蛋白質をコードする DNA でマウスを免疫して獲得される各抗原の免疫原性を網羅的に解析することにより、基礎的データの蓄積を試みた。

結核菌の潜伏期関連タンパク質をコードする遺伝子を PCR 増幅し、pCI ベクター、pET-28b(+)ベクター（蛋白精製用）に挿入した。前者を遺伝子銃で BALB/c, C57BL/6 のそれぞれ 2 匹のマウスに DNA ワクチンを施行、免疫後に脾細胞と血清を採取した。脾細胞を精製した抗原蛋白質で刺激し、ELISA でインターフェロン  $\gamma$  濃度測定（T 細胞応答）、血清中の特異抗体を ELISA で測定した（抗体産生）。

32 種類の候補抗原のうち、BALB/c では 12 種類、C57BL/6 では 9 種類の抗原で T 細胞応答が誘導された。また、血清中の抗体価は BALB/c では 12 種類、C57BL/6 では 3 種類の抗原に対して高い値を示した。そのうち、Rv3132c は両系統で T 細胞応答・抗体産生ともに惹起できた。

本研究により、結核菌に対して免疫反応を強く惹起する蛋白抗原をマウスを使って探索し、見出すことができた。この結果は、ヒトでも免疫原性を有し、ワクチンとして、また診断マーカーとして有効な抗原の開発への応用が期待できる。

審査委員会では、従来までの個々の抗原の検討ではなく、新しい網羅的なスクリーニングによる新規マーカーの探索手法を高く評価した。

以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 前川 真人  
副査 大西 一功 副査 小川 法良