

博士(医学) 穂積宏尚

論文題目

Immunogenicity of dormancy-related antigens in individuals infected with *Mycobacterium tuberculosis* in Japan

(日本人の結核菌感染者における休眠期関連抗原の免疫原性)

論文の内容の要旨

[はじめに]

全世界で20億人以上が結核菌に感染しており、結核は単一の病原微生物による世界最大の感染症である。結核菌が主要感染部位である肺に侵入すると、宿主の免疫応答が惹起されるため、感染初期に結核を発症するのは感染者の5-10%のみである。しかし未発症の感染者でも完全に除菌されることは少なく、結核菌は潜伏感染状態を獲得し、潜伏感染者の5-10%で免疫能の低下に伴い再燃が起こる。現行の抗結核ワクチンであるBCG(弱毒化ウシ結核菌)の予防効果は、乳幼児の粟粒結核等に対しては有効性が認められているが、内因性再燃が大部分を占める成人の肺結核等に対する効果は疑問視されており、その効果を凌駕あるいは補完するサブユニット・ワクチンの開発が必要とされている。

DosR regulon にコードされるタンパク質群(休眠期関連抗原)は主に結核菌の休眠期に産生され、その潜伏感染の維持に不可欠と考えられている。したがって本タンパク質群を抗原として潜伏期/再活性化初期の結核菌を標的とした新規ワクチンを開発できれば、再燃をも制御できるワクチン戦略の構築が可能となる。

[目的]

日本人における結核菌感染者の休眠期関連抗原に対するT細胞応答および抗体産生応答を解析し、ワクチンとして有用な候補抗原を明らかにする。

[対象および方法]

今回の研究は浜松医科大学の医の倫理委員会によって承認されており、全ての参加者から同意文書を得て行われた。

QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube test(QFT 検査)が陽性であるが、胸部レントゲン写真にて活動性結核を疑う所見がなく、喀痰や気管支鏡検査検体での微生物検体で結核菌が証明されない参加者を結核菌潜伏感染者(LTBI)と定義した。一方、喀痰や気管支鏡検査検体の微生物検査で結核菌が同定された場合は活動性結核患者(ATB)と定義した。

休眠期関連抗原タンパク質(DosR タンパク質)は、それぞれの遺伝子を結核菌のゲノムDNAを鋳型としてPCR法にて増幅し、大腸菌発現システム(pET)を用いて産生した。大腸菌で産生させたタンパク質は、Histidine タグを用いて精製し、最終的に33種類のDosRタンパク質を調製した。

T細胞応答は14人のLTBIと12人のATBから構成される26人の連続した結核菌感染者を対象として、Enzyme-linked immunosorbent spot assay(ELISPOT法)により検討した。静脈血から分

離した末梢血単核球を組換えタンパク質で 18 時間刺激し、ガンマインターフェロン産生細胞を検出して、その数を計測した。

血清抗体価は、14 人の LTBI と 28 人の ATB から構成される 42 人の連続した結核菌感染者を対象として、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) により、IgG クラスの活性について検討した。

ELISPOT 法及び ELISA 法で得られた結果は、抗原タンパク毎に LTBI と ATB の二群間の差について、マンホイットニーの U 検定により統計学的に比較した。

[結果]

33 種類の DosR タンパク質抗原のうち、6 つの抗原 (Rv0570、Rv1996、Rv2004c、Rv2028c、Rv2029c、Rv3133c) が ATB よりも LTBI で有意に強い T 細胞応答を誘導した。これに対し、5 つの抗原 (Rv0080、Rv1738、Rv2007c、Rv2031c、Rv2032) に対する抗体産生応答が LTBI よりも ATB で有意に強いことが判明した。

[考察]

結核菌の排除には T 細胞 (特に CD4 陽性 T 細胞) が重要な役割を果たすことから、LTBI で有意に強い T 細胞応答を誘導する抗原群に対する免疫応答は、潜伏期結核菌の封じ込めに寄与している可能性が示唆された。したがって、これらの抗原群を用いた新規ワクチンの開発が期待されるが、その効果の検証には、動物を用いた潜伏感染モデルでの実験が必要である。

今回我々が行った DosR タンパク質に対する T 細胞応答の解析結果とヨーロッパやアフリカでの結果は各々異なっている。T 細胞応答は個人間で多様性のある Human Leukocyte Antigen (HLA) によって拘束を受け、個々の HLA の発現頻度は人種によって異なることから、人種の違いはその大きな要因の 1 つと想定される。したがって、日本人をはじめとする東アジア人を対象としてワクチンを開発するに当たって、今回の結果は重要なものと考えられる。

本研究では DosR タンパク質に対する血清抗体価についても検討したが、その結果は T 細胞応答の結果とは一致しなかった。その理由は不明であるが、結核菌抗原に対する抗体産生量は抗原暴露量を反映しているとされており、これらの抗体応答は LTBI と ATB を区別するバイオマーカーとして応用できる可能性がある。

[結語]

DosR タンパク質に対する T 細胞応答は潜伏状態の結核菌に対する防御因子として貢献している可能性がある。それゆえ、今回同定した 6 つの抗原は日本人において結核菌再活性化を制御する新しいワクチンの標的候補となり得る可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

結核は世界的に最も患者数の多い感染症の一つであり、その予防対策は極めて重要である。結核菌感染者の多くは潜伏感染へ移行し、免疫機能低下等によって再燃、再活性化することが知られている。成人における肺結核の大部分はこのような内因性再燃例である。現在の抗結核ワクチン

である BCG は、小児の粟粒結核等に対して予防効果が認められるが、成人の肺結核に対する有効性は疑問視されている。結核菌の潜伏感染からの再燃による発症を予防しうる新たなワクチンの開発が必要である。結核菌は潜伏期に DosR regulon がコードするタンパク質群を発現するが、この発現が潜伏感染の維持に重要な役割を果たす。近年、この DosR タンパク質が免疫原性を示すことが明らかとなり、潜伏期／再燃初期を標的としたワクチンの候補抗原として注目されている。申請者は、33 種類の DosR タンパク質を大腸菌で発現、精製し、日本人結核菌感染者について各 DosR タンパク質に対する T 細胞応答及び抗体産生応答を解析した。

その結果、6 種類の DosR タンパク質 (Rv0570、Rv1996、Rv2004c、Rv2028c、Rv2029c、Rv3133c) が、活動性結核例より潜伏感染例で有意に高い T 細胞応答を示すこと、一方、5 種類の同タンパク質 (Rv0080、Rv1738、Rv2007c、Rv2031c、Rv2032) に対する抗体誘導能は、潜伏感染例に比べ活動性結核例の方が有意に高いことが明らかとなった。DosR タンパク質に対する T 細胞応答は、潜伏期の防御免疫として寄与することが考えられる。本研究で同定した、潜伏感染例で高い T 細胞応答を示す 6 種類の DosR タンパク質は、再活性化を制御する新規抗結核ワクチンの抗原として期待されることを審査委員会では高く評価した。

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 鈴木 哲朗
副査 岩下 寿秀 副査 伊藤 泰介