

第75回総会ランチタイムセミナー

リコンビナントBCGの研究

山田 毅

長崎大学歯学部

The 75th Annual Meeting Lunch-Time Seminar

STUDY ON RECOMBINANT BCG

*Takeshi YAMADA

*Nagasaki University

The progress of study on recombinant BCG was stated briefly. And then our studies on recombinant BCG were mentioned. Recombinant BCG secreting α antigen-fused merozoite surface protein 1 (MSP 1) was prepared and tested for its ability to control infections of *Plasmodium yoelii*. Result turned out it controlled the infection better than recombinant MSP 1 mixed with Freund incomplete adjuvant did. Recombinant BCG secreting excess amounts of antigen 85 complex A controlled infection of *Mycobacterium leprae*. Addition of recombinant BCG secreting α antigen-fused IL-2 to peritoneal exudate cells induced IFN- γ resulting in killing bladder cancer cells more efficiently than parental BCG did.

Key words: Recombinant BCG, Malaria vaccine, Vaccine against leprosy, Recombinant vaccine against bladder cancer

キーワード: リコンビナント BCG, マラリアワクチン, ハンセン病のワクチン, 膀胱癌のワクチン

1. リコンビナント BCG 研究の始まりと 現在までの経過と成果

BCG が強い細胞性免疫賦活作用を持っていることを利用し、組換え技術により BCG からさまざまな細胞内寄生性の病原体による感染を予防する抗原を発現させ、従来のワクチンよりも効力が優れているワクチンをつくろうというアイデアは、約 14~15 年前の 1986 年頃からあった。米国とフランスでその形質転換のためのベクター

が作製された。非定型抗酸菌 *Mycobacterium fortuitum* が持っているプラスミドと大腸菌由来のプラスミド (クロマイを不活化する酵素をコードする遺伝子とカナマイを不活化する酵素をコードする遺伝子を持つ) を融合したベクターを electroporation で BCG に送り込み、クロマイあるいはカナマイ耐性の BCG をプレートの上で選択することにより組換え体を得ることが可能となった。

そこで外来の抗原を効率よく発現させ効率のよい免疫

*〒852-8102 長崎県長崎市坂本 2-20-6

* 2-20-6, Sakamoto, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8102 Japan.
(Received 12 Jun. 2000)

を誘導することが次の重要課題となった。著者のグループは、結核菌から比較的大量に分泌され抗体誘導能が最も優れている抗原として35年前に著者の恩師米田正彦と福井良雄両博士が世界ではじめて分離精製した α 抗原に着目し、これを利用しようと考えた。 α 抗原はフィブロネクチン (FN) に結合し IFN- γ を誘導し、TNF- α を誘導した抗体産生も誘導するミコール酸合成酵素である。著者のグループの松尾和浩はまずその遺伝子をクローニングし全塩基配列を決めた。同じく内藤真理子はそのフィブロネクチンに結合する重要な生物学的活性のドメインを明らかにし、ヒトの FN のインテグリンドメインとヘパリンドメインに結合することを明らかにした。松尾は外国の研究者が明らかにしたミコール酸合成のドメインの近くに HIV-1, gag の p17 の B-cell エピトープを決定したうえその遺伝子をベクターに挿入した。そのベクターを BCG に送り込み外来抗原を BCG に分泌させることに成功した。分泌させた理由は、生菌は感染防御をするが死菌は感染防御をしないという事実があるので、分泌させると感染防御効果がよさそうであると思われたからである。おそらく分泌された抗原は細胞質にでてプロセッシングを受けクラス 1 の MHC に結合し提示され CD8+ を活性化するからだろう。また大量発現もできるだろう。

次の年の1991年に2つの論文が外国から発表された。これらとわれわれの論文の違いはまずベクターのプロモーターである。彼等は熱ショックタンパク質 (hsp) のプロモーターを利用しており、われわれは分泌タンパク質抗原の遺伝子を利用している。HIV-1 抗原を発現させ動物に投与し抗体産生とキラー T リンパ球の活性化をみた。著者のグループの分泌系ベクターを利用し本田三男博士と生田和良のグループは独立にキラー T の誘導がみられることを確認した。

その間フランス、ベルギーのグループもそれぞれのさまざまなプロモーターでシステムの開発を行っている。彼等は最近、破傷風毒素に対する抗体を産生するのに必要なこの毒素の C 末端のある部分と百日咳を予防する百日咳毒素の N 末端部分をコードする DNA を融合しベクターに挿入し、これを BCG に送り込み多価ワクチンを作製した。これを動物に投与すると抗原に反応する抗体産生や IL-2 産生があることを報告している。

以上述べたように、組換え BCG を動物に投与すると外来の抗原に反応する免疫反応を誘導するという報告はたくさん発表されてきた。次の最も重要な課題は動物で予防実験を成功させることであった。実際に動物で感染を予防した成功例が3つ J. Exp. Med. に発表された。米国のグループはライム病をおこす *Borrelia burgdoferi* の細菌表層にあるリポプロテインの遺伝子を

hsp 60 のプロモーターに繋ぎカナマイシンを不活化する酵素の遺伝子とミコバクテリアの DNA 複製遺伝子を持つベクターに挿入し BCG に送り込み組換え体を分離し調べてみると、BCG の表層にリポプロテインがみられた。これを動物に投与すると *B. burgdoferi* に反応する抗体を産生し、かつ動物の血中での *B. burgdoferi* の増殖を抑制したと報告した。もう1つの論文は、肺炎 surface protein A 球菌の N-末端部分を発現するリコンビナント BCG を作製しこれでネズミを免疫しておくことこの菌の感染による死を防御したと報告した。

私のグループは動物がマラリア原虫で死亡するのを予防することに成功した。マラリアは世界の人口の40%が感染の脅威に曝されており、年間の罹患者数は3~5億、推定死亡者は200~300万人である。人類はいまだにそれに対するワクチンを手にすることができないまま、新しい世紀を迎えようとしている。

2. リコンビナント BCG による結核の予防

では、組換え BCG により結核を予防するための研究はどこまで進んでいるか？ まず感染防御能を持つ抗原の分離同定が先決である。その後でこれを BCG から強制的に大量発現させればよい。現在最も有力視されている α 抗原を含む Antigen 85 complex について歴史的経緯を次に述べる。

α 抗原と同じファミリーに属する Antigen complex C の3次元構造が今年の Nature Structural Biology に発表された。この抗原は、35年前の1965年に私の恩師米田正彦先生と福井良雄先生が結核菌の分泌タンパク質のなかで最も抗原性が高い抗原として分離精製されたものである。それから14年後の1979年にノルウェーのグループが抗原性の強いものとして Ag 85 complex をみつけ、さらに7年後に各々を精製し A, B, C と名づけた。しかしこれらは実は米田先生がみつけた α 抗原のファミリーであることがわれわれの実験で分かった。われわれは α 抗原の遺伝子をクローニングし一次構造をきめた。N-末端のアミノ酸配列をみても、また DNA ハイブリダイゼーションによっても、Ag 85 complex A, B, C は相同性の高いものであり、そのなかで B は α 抗原であることが分かった。これらのタンパク質は抗酸菌特有のミコール酸合成酵素であることが外国の研究者により明らかとなり、その後永井定生先生が一つの相同性の高いタンパク質をみつけ MPB 51 と名づけ、この遺伝子を大原直也君がクローニングし塩基配列を決定した。大塚製薬の共同研究者松本真君はこれもミコール酸合成酵素であることを証明した。またこれらのタンパク質は IFN- γ を誘導し、フィブロネクチンに強く結合するタ

ンパク質であることが報告された。FNに結合する性質は重要である。その性状により結核菌は組織につよく接着することができ、膀胱癌の治療に使われ役にたっているのである。内藤真理子はFN結合ドメインも決定した。 α 抗原をCNBrやtrypsinで切断しどの断片がFNを結合するか調べ27個のアミノ酸からなる断片が結合ドメインであることを決定した後、さらにこの断片をカバーするペプチドを合成し最小結合ドメインを決定した。

このドメインは人のFNのインテグリンドメインとヘパリンドメインに結合することも分かってきた。免疫担当細胞の表面にはインテグリンやヘパリンがありFNが結合するが、その結合に α 抗原ドメインがどのような作用をするのだろうか？ その結合を強めるのか弱めるのか？ その結果どのような生化学的反応がおこるか？ それによりIFN- γ を誘導するのだろうか？あるいはFNに結合することはIFN- γ の誘導には関係がないのだろうか？ 興味は広がっていく。

われわれが外来抗原を分泌させるために使用している α 抗原は細胞性免疫活性化する能力が最もすぐれており結核を予防することができることを米国のグループが報告した。

3. リコンビナントBCGによるハンセン病の予防

人類の歴史において、ハンセン病との闘いは永く、またその影響力は実際にその病に罹患した者をはるかに超えるものであった。この病気を根絶するためには、有効なワクチンの開発が必要である。

われわれは、 α 抗原を大量分泌する組換え体BCG投与はヒト・ライ菌のマウス足蹠での増殖を著明に抑制することを見出し、ハンセン病予防ワクチン開発への道を開いた。

4. リコンビナントBCGによる膀胱癌の治療と予防

膀胱癌の治療にBCGが使われている。摘出術の後抗癌剤を投与するが、術後BCG投与は治療効率が優るといふ報告がある。組換えBCGを使用すればもっと効率がよくなると思われる。

われわれは α 抗原にIL-2を繋いだ融合タンパク質をコードするプラスミドをBCGに送り込みBCGに分泌させた。このBCGで活性化したネズミの腹腔細胞は膀胱癌細胞を野生型BCGよりも効率よく殺した。

5. BCGのアジュバント作用とは何か？

結核菌の感染を受けると95%以上の人は強い独特のTh1優勢の細胞性免疫により菌の増殖を抑える。ツベ

ルクリン反応が高くなる。結核菌を食べたマクロファージはなぜか知らぬがTh1を動員するケモカインを分泌すると考えられる。次いでTh1優勢の細胞性免疫を高める。なぜ結核菌は細胞性免疫を高めることができるのか？ この謎を解くために多くの免疫学者が研究しており全容はまだ解明されていないが、次のようなことは分かってきた。

結核菌はGC含量の多いDNAを持っていることで有名である。最近になってunmethylated CGモチーフは免疫担当細胞にIFN- γ やIL-12やIL-6等さまざまなサイトカインを誘導産生させることが分かってきた。一般に細菌は人の細胞に比べてGC含量が多くこのunmethylated CGモチーフを20倍も多く持っているといわれているが、結核菌は病原性微生物のなかで最もGC含量が多い菌であるから、この点でも優れたアジュバントの能力を持っているといえる。

そのDNA genomeには250の脂質合成および分解酵素をコードする遺伝子がある。大腸菌は50個しか持っていない。脂質は全菌体の40%を占める。主にcellwallにあつて全cellwallの60%を占める。ミコール酸は超高級脂肪酸で、ヒトはこれを分解する酵素を持っていない。いったん感染するとヒトは完全にこれを排除することが困難である。菌は残存菌としてヒトと共存している。

菌はアセチルコウエンザイムAから2重結合を持つ2ないし3個の炭素にリン酸が2個ついた化合物をつくりこれから脂質をつくるが、この低分子化合物は $\gamma\delta$ T細胞を活性化することが分かってきた。結核病巣に $\gamma\delta$ T細胞が多いが、これが原因の1つである。これに加えて大量の脂質はCD1に結合しマクロファージ表面に提示され未熟T細胞を刺激しさまざまなサイトカインを誘導しアジュバント活性を高めている。

大量の脂質を合成したり分解したりするために250個の酵素を産生していると前述したが、多くは分泌タンパク質として外にでて仕事をする。このなかに含まれる α 抗原はマクロファージにTNF- α を誘導産生させるし、また抗原特異的感染防御をする抗原である。また、これらのタンパク質は脂質をつくる役割を担うため脂溶性が強いのが特徴である。水溶性に乏しいのでこれを助けるための熱ショックタンパク質をたくさん持っている。このタンパク質も免疫活性が強いことで有名である。このように脂質の代謝に関係する遺伝子にゲノムDNAを使用しているため増殖に必要なリボソームの遺伝子を最少限度に節約している。脂質が表層に多いので栄養になる分子が通過しにくいのでますます増殖は遅い。それに加え増殖を抑えるタンパク質を大量に産生し遅発育性を演出していることもわれわれの研究で分かってきた。こ

の遅発育性は宿主の細胞性免疫を誘導するための基本的条件となっている。われわれはBCGのこのような細菌

学的特徴を利用しリコンビナントBCGを開発しようとしているのである。