

# CpGモチーフと結核免疫

山本 三郎

キーワード：CpG, BCG, オリゴヌクレオチド, IFN, DNA

## 1. BCG由来核酸画分

1960年代後半から1970年代にかけ、結核の予防ワクチンであるBCGを使ったがんの免疫療法がOldやZbarらのマウス・モルモットによる研究やMortonらのヒトメラノーマに対する治療、Mathéらの小児白血病への臨床研究を含め幅広く検討された。これは結核ワクチンとして1920年代以来の使用経験から安全性が確認されているBCGワクチンをがんの免疫治療に適用しようと考えたものである。しかし、BCGは弱毒といえども増殖する可能性のある生菌であるので免疫機能が低下したがん患者への投与に対する危惧が指摘されたことなどからBCG生菌によるがんの免疫療法は膀胱がんに対する以外は下火となっていった。そのため、BCG菌体からの抗腫瘍活性物質単離が欧米を中心に行われたが、わが国においてはTokunagaらが水溶性の抗腫瘍活性成分を得ることを試みた<sup>1)2)</sup>。BCG菌体の細胞質画分をストレプトマイシンで沈殿させ、さらに精製した核酸画分はMY-1と命名された。このMY-1は腫瘍中に頻回投与するとモルモット腫瘍Line-10の腫瘍増殖を抑制し、また多数のマウス腫瘍の増殖を抑制した。MY-1をDNase処理すると抗腫瘍活性はほとんど失われる。それに対しRNase処理では抗腫瘍活性は増強する。これらからMY-1に含まれる核酸中のDNAが抗腫瘍活性の本質であることが明らかとなった。こうしてDNAの免疫増強効果が世界ではじめて発見された<sup>3)~6)</sup>。

## 2. 免疫増強性 CpGモチーフ

MY-1は45塩基鎖長を中心とした一重鎖オリゴヌクレオチドの集合体である。BCGのたんぱく質cDNAから

多数のオリゴヌクレオチドを無作為に合成してその免疫増強活性を調べると、13個のうち6個のオリゴヌクレオチドのみが活性を示し、残りには活性はなかった(Table 1)。すなわち同じBCG由来のDNA配列であっても、すべてが活性をもつわけではないことが判明した。次に「活性ある配列」と「活性のない配列」を比較した。BCG-A2とBCG-A4はどちらも45塩基鎖長の一重鎖オリゴヌクレオチドであるが、両者の活性はまったく異なった。BCG-A4は用量に応じてNK細胞活性を増強したが、BCG-A2はどの濃度でもNK活性を誘導できなかったため、BCG-A4の有効配列を決めるため、BCG-A4の5'側の30塩基鎖長のBCG-A4aと3'側の30塩基鎖長のBCG-A4bを比べると、BCG-A4aには活性があるが、BCG-A4bには活性がないことがわかった。すなわち、BCG-A4aの配列の中に活性配列があり、BCG-A4bやBCG-A2には活性配列がない。そこで有効配列としてBCG-A4aにあるGACGTCという6塩基からなるパリンδροーム配列を仮定してみた。一般にパリンδροーム配列は制限酵素の認識部位として知られており、なんらかの生物学的特異性をもつのではないかと考えたためである。数種類のcDNAからとったオリゴヌクレオチドを調べると、GACGTCパリンδροームを含むオリゴヌクレオチドはいずれも活性があったが、このパリンδροームを含まない配列では活性はなかった。パリンδροーム配列をもたず、したがってNK活性を誘導できないオリゴヌクレオチドにこのGACGTC配列を挿入したところ、新たな修飾塩基配列は活性を示した。そこでパリンδροームの重要性を確かめるため、GACGTC配列のGとTを交換したGACTGC配列をつくると、これを含むオリゴヌクレオチド配列は活性を失っ

**Table 1** The base sequence of cDNA for BCG antigens

Names	Antigens	Nucleotide residue	Base sequence									Stimulatory activity <sup>a)</sup>
BCG-A1	65kDa	327-371	AACGA	GGGGC	ATGAC	CCGGT	GCGGG	GCTTC	TTGCA	CTCGG	CATAG	No
BCG-A2	65kDa	694-738	AAAAG	AAGTG	GGGTG	CCCCC	ACGAT	CACCA	ACGAT	GGTGT	GTCCA	No
BCG-A3	65kDa	735-779	TCCAT	CGCCA	AGGAG	ATCGA	GCTGG	AGGAT	CCGTA	CGAGA	AGATC	Yes
BCG-A4	65kDa	813-857	ACCGA	TGACG	TCGCC	GGTGA	CGGCA	CCACG	ACGGC	CACCG	TGCTG	Yes
BCG-A4a	65kDa	813-842	ACCGA	TGACG	TCGCC	GGTGA	CGGCA	CCACG				Yes
BCG-A4b	65kDa	828-857				GGTGA	CGGCA	CCACG	ACGGC	CACCG	TGCTG	No
BCG-A5	65kDa	1145-1189	TATGC	GGTTC	GACAA	GGGCT	ACATC	TCGGG	GTAAT	TCGTG	ACCGA	No
BCG-A6	65kDa	1552-1596	ACGAG	ACCAC	CATCG	TCGAG	GCGCG	CGGTG	ACACC	GACGC	CATCG	Yes
BCG-A7	65kDa	1962-2006	GCCGA	GAAGG	TGCGC	AACCT	GCCGG	CTGGC	CACGG	ACTGA	ACGCT	Yes
BCG-A8	65kDa	2371-2415	ACCGA	GAACA	GCCAC	GCAGT	CGTGT	AGGCA	ACCTT	TGGCC	GCTGT	No
BCG-M1	MPB70	1-45	GCGCA	TCTGG	TGGGC	CCGGG	CTGCG	CGGAA	TACGC	GGCAG	CCAAT	No
BCG-M3	MPB70	410-455	ACGCC	GACGT	CGTCT	GTGGT	GGGGT	GTCTA	CCGCC	AACGC	GACGG	Yes
BCG- $\alpha$ 1	$\alpha$ -antigen	348-392	CGACT	ACAAC	GGCTG	GGATA	TCAAC	ACCCC	GGCGT	TCGAG	TGGTA	Yes

a) Stimulatory activity was assessed by augmentation of mouse NK cell activity after co-culture with each oligonucleotide.

**Table 2** Effect of exchange neighboring mononucleotides on the NK-stimulatory activity of oligonucleotides

Names	Base sequence <sup>a)</sup>					Stimulatory activity <sup>b)</sup>
BCG-A4a	ACCGAT	<u>GACGTC</u>	GCCGGT	GACGGC	ACCACG	Yes
BCG-A4a M1	ACCGAT	<u>GACTGC</u>	GCCGGT	GACGGC	ACCACG	No
BCG-A4a M2	ACCAGT	<u>GACGTC</u>	GCCGGT	AGCGGC	ACCACG	Yes

a) Two neighboring mononucleotides in BCG-A4a were exchanged to either BCG-A4a M1 or BCG-A4a M2. Underline indicates palindrome sequences.

b) Stimulatory activity was assessed by augmentation of mouse NK cell activity after co-culture with each oligonucleotide.

た。しかしパリンドロームの外側配列にある2塩基を入れ替えても、このオリゴヌクレオチドの活性にはなんの影響もないことがわかった<sup>7)8)</sup> (Table 2)。

パリンドロームの外側配列の影響を調べるため、30塩基からなるホモオリゴマー (G-30, A-30, T-30, C-30) を合成した。いずれのホモオリゴマーも活性は示さなかったが、これらに AACGTT や GACGTC などのパリンドロームを挿入すると、マウス脾細胞のNK活性を増強した。もっとも活性が高まったのは、ホモオリゴマーがGのときであった。また、パリンドロームのサイズと位置が活性に与える影響について検討し、10塩基パリンドロームが最大の活性を示すことが判明した。一方、パリンドロームの位置はサイズほど大きな影響を与えないこともわかった。さらにパリンドロームが常に活性を高めるのかを調べるため、6塩基パリンドロームのすべての組み合わせを4種類の (A, T, G, C) 塩基から64種類をつくり、それらのパリンドローム配列を挿入した64種類のオリゴヌクレオチドのNK細胞増強活性を調べたところ、パリンドロームだからといって活性があるわけではないこともわかった。一方、活性のある配列を詳細に調べると、すべて CpG モチーフを含んでいることがわかった<sup>9)10)</sup>。

### 3. 種々の生物由来 DNA の免疫増強活性

MY-1 の免疫活性の普遍性を調べるため、いくつかの

DNA サンプルを検討した。*S. aureofaciens*, *M. bovis* BCG, *P. putida*, *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* およびウシ胸腺、サケ白子の核酸画分を MY-1 と同様に調製し、抗腫瘍効果・IFN 産生誘導活性・NK 細胞活性を調べたところ、核酸画分の免疫増強活性は、すべての被験細菌で認められたが、ウシやサケなど動物核酸は活性をもたなかった。次にさらに多数の各種ゲノム DNA について検討した。*M. lysodeikiticus*, *M. bovis* BCG, *E. coli*, *M. pneumoniae*, *C. perfringens* の DNA は有意な活性を示した。また  $\phi$  X174 ファージやアデノウイルス、無脊椎動物のカイコ、ウニ、エビ、ムラサキガイ由来の DNA は活性を示した。これに対し、脊椎動物である魚類のサケ・ニシン・マス、鳥類のニワトリ、両生類のカエル、哺乳類のヒト・ウシ・マウス・ウサギ・ブタそれぞれの DNA はいずれも活性は認められなかった。またイネ・トマト・パセリ・ホウレンソウなど植物 DNA にも活性は全くなかった<sup>11)</sup>。脊椎動物のゲノムでは、細菌 DNA とは異なり、CpG ジヌクレオチドの C (シトシン) の5位がメチル化されていることが知られている。Krieg らは、大腸菌 DNA または非メチル化 CpG モチーフをもったオリゴヌクレオチドによって B 細胞活性化が起こると述べている<sup>12)</sup>。生物種による DNA の免疫増強活性の違いは、細菌 DNA は CpG シトシンが非メチル化であるのに対し、動物 DNA ではメチル化されていること、免疫増強活性の中心部位である CpG モチーフ配列の遺伝子上の出現頻度が細菌

では動物より高いことからもたらされる。

#### 4. CpG-DNAのレセプター

自然免疫は病原体の感染に際し、各種細菌に共通する分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns ; PAMPs) を Toll receptor を通じて認識し、その結果産生される抗菌ペプチドを武器に感染防御を司る無脊椎動物にも備わったシステムである。哺乳動物では PAMPs の種類に対応した Toll-like receptors (TLRs) が存在し、PAMPs 特異的自然免疫が形成される。TLR ファミリーは微生物が体内に侵入するとき、細胞膜などにおいて認識の中心的な役割を果たしていることが明らかとなった。TLR2 は TLR1 とともにグラム陽性菌の外膜に存在するペプチドグリカンやリポタンパク質・リポペプチドの、TLR4 はグラム陰性菌に存在するリポ多糖 (LPS) の、TLR6 は TLR2 とヘテロ二量体を形成してマイコプラズマのリポペプチドの、TLR5 は腸内細菌など運動性細菌が保有する鞭毛のたんぱく質であるフラジェリンの、TLR3 はウイルス感染の際に産生される二本鎖 RNA および二本鎖 RNA 類似の構造体であるポリイノシンポリシチジン酸 (polyI: C) を認識することが報告されている。これらの TLR のリガンドは、いずれも免疫応答を強く活性化し、アジュバントとして機能することが知られている。Hemmi らは TLR-9 が CpG-DNA の認識に必須であることを明らかにした<sup>13)</sup>。ヒトでは TLR9 は主として B リンパ球と形質細胞様樹状細胞 (pDC) に発現しており、自然免疫の中心として病原体やがん細胞にいち早く対応して大量の IFN- $\alpha$  を産生する細胞が pDC であることは 1999 年に示された<sup>14)~16)</sup>。

CpG-DNA には配列の特徴と細胞選択的な免疫刺激活性から 3 種類のタイプがあり、それぞれ TLR9 を介した異なる免疫応答を誘導する。D/A タイプの CpG-DNA は IFN- $\alpha$  産生を強く誘導するが、成熟化誘導活性は低く、B 細胞に直接的な免疫刺激活性を示さない。K/B タイプは B 細胞に免疫刺激活性を示し、成熟化を強く促進し、IL-12 誘導能が高いのに対し、IFN- $\alpha$  誘導能は低い。TCG の繰り返し配列を有しすべてがチオール化されている C タイプの配列では、ポリクローナルな B 細胞活性化や pDC による IFN- $\alpha$  産生を誘導する。このような CpG-DNA の細胞選択性や配列特異性には、TLR9 に対するコファクター分子や CpG-DNA 構造の親和性がかかわると考えられている<sup>17) 18)</sup>。

#### 5. CpG-DNA と TLR9 のシグナル伝達

TLR9 は小胞体 (ER) に存在し、エンドサイトーシスなどによって細胞に取り込まれた CpG-DNA と直接結合してエンドソームに、その後はライソソームに観察され

ることが報告された<sup>19)</sup>。CpG-DNA による IFN- $\alpha$  産生は phosphatidylinositol-kinase (PI3K) の阻害剤やエンドソームの酸性化阻害剤によって完全に阻害される<sup>20)</sup> ことから、PI3K はエンドソーム内での CpG-DNA と TLR9 との結合に関与し、CpG-DNA はエンドソームの酸性化によってなんらかの修飾や分解を受けると考えられる<sup>21)</sup>。CpG-DNA によるサイトカイン誘導のメカニズムについては、TLR9 から NF- $\kappa$ B の活性化に至る経路が明らかにされている<sup>13) 22) 23)</sup>。それにはアダプター分子 MyD88 が必須であり、MyD88 は serine/threonine kinase の IL-1 associated kinase (IRAK) をリクルートする。その結果、TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) の下流で c-Jun N-terminal kinase, p38MAPK, I $\kappa$ B $\alpha$  kinase (IKKs) が活性化される。次に I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化による NF- $\kappa$ B の活性化が起きて IL-12 遺伝子や TNF- $\alpha$  遺伝子の転写が誘導される。しかし、このようなシグナル伝達経路だけでは pDC における IFN- $\alpha$  産生を説明するには不十分であり、MyD88 以下の経路は確定されていない。著者らはヒト pDC について得られた下記の成績に基づいて、IFNAR 非依存性の TLR9 シグナル伝達モデルを提案している<sup>20)</sup>。① p38MAPK を介した IFNAR 非依存性の STAT1 リン酸化：CpG-DNA による IFN- $\alpha$  産生の誘導はエンドソームの成熟と p38MAPK に依存して惹起され、IFN- $\alpha$  の発現に至るまで IFNAR のオートクラインを必要としない。CpG-DNA 添加 2 時間後には STAT1 の tyrosine701 部位のリン酸化 (pY-STAT1) と serine727 部位のリン酸化 (pS-STAT1) の増強が認められるが、これらのリン酸化には IFN- $\alpha$  / $\beta$  抗体の影響を受けず、p38MAPK 阻害剤 SB203580 によって抑制される。IFN- $\alpha$  によって誘導される pY-STAT1 が SB203580 によって抑制されないことから、CpG-DNA による STAT1 リン酸化は p38MAPK 依存性という点でも IFNAR を介した STAT1 リン酸化と区別される。② ISGF3 の核移行：CpG-DNA 添加 3 時間後の核抽出液に ISGF3 の構成成分であるリン酸化 STAT1, STAT2, IRF-9 が観察され、転写因子 ISGF3 の形成と活性化が起こっていることが推測される。③ IRF-7 と IRF-3 および IFN- $\alpha$  の発現：pDC には構成的に IRF-7 が発現しており、CpG-DNA 刺激後 3 時間よりその発現が増大する。CpG-DNA 刺激により構成的 IRF-7 が核に移行することから、新たに合成された IRF-7 も逐次活性化され核へ移行すると考えられる。IRF-7 の発現に続いて IFN- $\alpha$  mRNA が、2 時間後の一過性発現を経て 4 時間から本格的に誘導されるが、この過程は p38MAPK に依存して進行し、IFNAR シグナルを必要としない。一方、IRF-3 は、pDC ではすでにリン酸化され活性化している可能性がある。④ NF- $\kappa$ B の活性化：pDC では NF- $\kappa$ B p50 と p65 が活性化されており、その

活性は CpG-DNA 刺激により増強し、SB203580 によって阻害される。CpG-DNA による IFN- $\alpha$  の産生は PDTC, MG132, CAPE, Dex などの NF $\kappa$ B 阻害剤で完全に抑制されることから、p38MAPK 依存性に活性化された NF- $\kappa$ B は、IRF-7 の転写亢進を介して IFN- $\alpha$  の誘導にかかわると考えられる。

免疫増強性は、CpG-DNA の刺激を受け、最終的には、NF $\kappa$ B, MAPK カスケードを活性化させるに至るシグナル伝達経路を活性化してサイトカインを産生すると考えられる。取り込み率は細胞の種類や活性化の状態によって異なる。G に富む配列は、細胞膜やマクロファージスカベンジャーレセプターへの結合能が高い。オリゴ G の背景配列をもつオリゴ B (5'-GGGGGG GGGGGG AACGTT GGGGGG GGGGGG-3') は IFN- $\alpha$  産生や NK 活性誘導能が高いので、取り込み効率も活性発現にかかわっていると考えられる。しかし、スカベンジャーレセプターをもたない細胞でも CpG-DNA の活性が発現されることを考えると、細胞膜上の DNA 結合様式はさまざま、細胞の種類や活性化の状態によって異なって発現されているのかもしれない。CpG-DNA によるヒト NK 細胞活性化の昂進は、I 型 IFN の産生に依存していること、その IFN は CpG-DNA の刺激によって末梢血中の未熟な樹状細胞 (DC; CD4(+), CD11c(-)) が産生すること、IFN  $\alpha$  遺伝子の転写因子である IRF-7 が増えることなどがわかった。そのほか、CpG-DNA で誘導されるマウス脾細胞の IFN- $\gamma$  産生細胞は NK 細胞であるが、その IFN  $\gamma$  産生は、IL-12 抗体で抑制されること、細菌 DNA や CpG-DNA が単球・マクロファージを刺激して IL-12 や TNF  $\alpha$  産生を誘導し、その結果、非付着細胞から IFN  $\gamma$  が産生されること、純化した NK 細胞は CpG-DNA に反応できず、CpG-DNA による NK 活性の増強は IL-12, IFN  $\alpha/\beta$ , TNF  $\alpha$  産生に依存していること、NK 細胞の活性化はマクロファージ依存性であり、NK 細胞は IL-12 で活性化されると細菌 DNA に対する反応性を獲得して IFN  $\gamma$  産生が増加することなどが報告されている。これら CpG-DNA に応答性の NK 細胞の表面抗原は NK1.1(+) CD3(-) である。一方、マウス骨髄細胞を CpG-DNA と培養すると、NK 活性が増強する。その増強効果は、TNF  $\alpha$  抗体、IFN  $\gamma$  抗体、IL-18 抗体で阻止されるが、IFN  $\alpha$  抗体では抑えられない。IL-12 抗体は、CpG-DNA による骨髄 NK 細胞活性の誘導を抑制しないが、TNF  $\alpha$  抗体による阻止効果を増強する。これらから、NK 細胞は活性化されることによって CpG-DNA に対する応答性を獲得すると考えられる。

CpG-DNA が細胞に取り込まれると、マウス脾細胞の IFN  $\alpha/\beta$  産生を著しく増加すること、細胞上の Mac-1 分子やスカベンジャーレセプターへの結合性は、非結合の

オリゴヌクレオチドを共存させることにより阻害されること、さらにウシ胸腺 DNA など非活性な DNA で細胞をあらかじめ処理しておく、あとから加えた CpG-DNA の取り込みが阻害され、細胞の活性化も抑制されることより、細胞への結合と取り込みは、CpG モチーフ非依存的で塩基特異性はないと考えられる。また、マクロファージでは、取り込まれた CpG-DNA が、AP-1 や NF $\kappa$ B の活性化を起こしてサイトカイン mRNA の転写が開始される。一方、クロロキン、モノニンシン、パフィロマイシン A などのエンドゾーム阻害剤は、免疫増強性 DNA による活性化を完全に抑制することから、エンドゾームの成熟、酸性化が起こった後に、CpG モチーフ特異的シグナルが伝えられると考えられる。

## 6. 感染症に対する CpG-DNA のアジュバント活性

CpG-DNA の細菌感染症、ウイルス感染症に対する治療効果が報告されている。機序としては、CpG-DNA が B 細胞、マクロファージや樹状細胞、あるいは NK 細胞を活性化して、IgG, ケモカイン、サイトカインの産生をもたらす、これらを介して pro-Th1 免疫応答を増強することがその一部と考えられている。一方、CpG-DNA を感染症予防ワクチンに添加することにより、ワクチンアジュバントとして利用しようとの検討も行われている。マウスなど動物実験でよく使われるフロイントアジュバントは、ヒトに対しては強い毒性のため使用できない。一方、CpG-DNA はヒトに対しほとんど毒性を示さないで、たとえば、市販の B 型肝炎ワクチンに添加してアジュバント効果があることが霊長類を用いた実験で示されている。HBV ワクチンに CpG-DNA を添加すると、ワクチン単独投与に比べ、はるかに強くかつ免疫の立ち上がりも優位に早いことが報告されている。これまでにマウスから得られた結果によると、① CpG-DNA は抗原が何であっても使える万能のアジュバントであり、② 新生児のように免疫系が未熟であっても十分な効果が期待でき、③ CpG-DNA は強く、早い免疫応答を誘導するため、抗原量を少なくできるため安全性をさらに高められる、④ CpG-DNA は粘膜免疫の誘導にも強いアジュバント活性をもつ、ことなどが知られている。また投与方法は、経口・経鼻にかかわらず、全身に強い抗体産生と細胞障害性 T リンパ球活性を誘導できる。これまでに慢性疾患やがんに対する治療ワクチンの可能性も検討されており、動物実験モデルでは、① CpG-DNA がもたらす Th1 免疫応答によって慢性の HBV 感染マウスモデルの免疫トレランスに効果があった、② CpG-DNA は HBV や HCV の慢性感染にみられる Th2 に偏った免疫バイアスを Th1 に戻すことができるなどの成果が報告されている。

BCG ワクチン接種におけるアジュバントとして CpG-DNA が使われた例として Freidag らの報告がある<sup>24)</sup>。マウスに BCG を CpG-DNA の存在または非存在下に免疫し、6 週後に強毒結核菌のエルドマン株を噴霧感染したところ、BCG のみで免疫したマウスの肺の残存菌量が、非免疫の場合に比べ 1~2 logCFU の減少であったのに対し、(BCG+CpG-DNA) 免疫マウスでは、さらに 2~5 倍の低下をもたらした。またマウス脾細胞を抗原特異的に刺激したときの培養上清中に産生される IFN- $\gamma$  量は BCG 単独免疫に比べ、BCG+CpG-DNA で免疫したマウス脾細胞では有意に高い産生量であった。

免疫増強性 CpG-DNA は共投与された抗原に対する免疫応答を増強することが知られている。免疫アジュバントとして免疫増強性 CpG-DNA の有利な点は、共投与抗原やプラスミドに対する Th1 偏向の免疫応答をもたらすことにあり、IFN- $\alpha/\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-18 の産生を促進する。これらのサイトカインは Th1 応答を促進し細胞性免疫を増強することが知られている<sup>25)~27)</sup>。また Th1 応答は抗酸菌感染に対して防御能を発揮することが知られている。免疫増強性 CpG-DNA は *M. tuberculosis* や *M. avium* 感染に対する抵抗性を付与する<sup>28) 29)</sup>。免疫増強性 CpG-DNA は IL-12 と TNF- $\alpha$  を誘導することが知られているので、IL-12 と TNF- $\alpha$  産生誘導をコントロールする塩基配列が GACGTT のヘキサマーを含む 18 鎖長の一重鎖オリゴヌクレオチドであって、有害な副反応を除いた有用なオリゴヌクレオチドとして提案された<sup>37)</sup>。免疫増強性 CpG-DNA によって惹起される Th1 反応の優位性は、Th2 タイプのアレルギー疾患の治療の際に有益となるかもしれない。免疫増強性 CpG-DNA と Th2 タイプ抗原の共投与は Th1 タイプの免疫応答に向かわせ、抗原暴露に伴うアレルギー性疾患を抑制する<sup>30)</sup>。

## 7. CpG-DNA と抗結核 DNA ワクチン

DNA ワクチンは、①感染性がない、②真核細胞で複製しない、③ワクチンのデザインが簡単、④増幅・精製・保存が容易、⑤宿主細胞の染色体に取り込まれずエピゾームとして存在する、⑥細胞性免疫を誘導する、⑦内因性抗原として発現するため MHC-I に抗原提示される、⑧薬剤耐性遺伝子などプラスミドに含まれる CpG モチーフによるアジュバント効果が期待できる等の特徴がある。AACGTT のような免疫増強性 DNA 配列を遺伝子上流に組み込んだプラスミドを投与すると、有効配列が分子内アジュバントとしてワクチン効率をあげ、IFN  $\gamma$  によって誘導される IgG2a 産生が増加する。また、Th1 サイトカインである IFN  $\gamma$  や IL-12 が誘導され、Th2 サイトカインである IL-4 が減少することなどが報告されている。また Th2 免疫応答を抑制することから、ぜん

そくや花粉症などのアレルギー性疾患治療への応用が期待されている。エイズや肝炎はじめ様々な感染症に対しても DNA ワクチンの効果が検討されている。

結核に対するワクチンである BCG は、生菌による免疫がもっとも効果的で、死菌では効果が激減する。そこで生菌の分泌する菌由来たんぱく質が結核防御に有効であるとの作業仮説に基づき、多数の分泌たんぱく質の抗結核効果が検討されてきた。抗原たんぱく質遺伝子をコードしたプラスミド DNA に抗原特異的な免疫応答を効果的に惹起することが見出された。多くの細菌、ウイルス、寄生虫、がんなどの抗原をコードするプラスミドが研究された<sup>31)~36)</sup>。Sato らは、免疫増強性 CpG 配列である 5'-AACGTT-3' パリンドロームを含むプラスミドは Th1 免疫応答を増強することを見出した<sup>37)</sup>。そこで筆者らは、このプラスミドに抗原遺伝子を組み込み、結核菌に感受性の高いモルモットを免疫することによって抗結核ワクチン効果の有無を判定した。すなわち、BCG の抗原たんぱく質である Ag85A、Ag85B、Ag85C または MPB51 をコードする遺伝子をサイトメガロウイルス由来のプラスミド pACB に挿入し、ハートレー系モルモット 5 匹を 1 群として各プラスミド 100 マイクログラムを 3 週間おきに 3 回モルモットに筋肉内注射して免疫した。陽性コントロールとしては  $1 \times 10^3$  CFU の BCG ワクチンを初回のプラスミド注射時に皮内注射した。陰性コントロールとしては生理的食塩水または空のプラスミドベクターを注射し、3 回目のプラスミドの注射から 6 週後に有毒結核菌 *M. tuberculosis* H37Rv 株をモルモットあたり 5~10 CFU 吸入されるよう、マジソン式噴霧感染装置で気道感染させた。噴霧およびその後の飼育はすべて生物学的封じ込めレベル 3 (BSL3) の動物実験室および動物飼育室で行った。感染の 5 週後に、モルモットを麻酔下に安楽殺し、剖検して脾臓と肺を摘出した。脾臓および肺はホモジナイザーで均質化後、生理的食塩水で希釈し、各 0.1 ml を Middlebrook 7H10 寒天平板に接種した。寒天平板を培養缶に入れ 37°C で培養し、3 週後の集落数を計測することにより臓器内残存生菌とし、平均 logCFU を結核抵抗性の指標とした。その結果、BCG 免疫または各抗原遺伝子含有のプラスミドで免疫したモルモットでは脾臓と肺の結核菌増殖抑制を認めた<sup>38)</sup> (Fig. 1, 2)。プラスミドに含まれる CpG モチーフは、メチル化によって活性が低下することから、DNA ワクチンにおける分子内アジュバントとして免疫増強活性に重要な役割を担っていると考えられる。

CpG モチーフを有し、BCG のたんぱく質抗原遺伝子を挿入された DNA ワクチンは、ベクターコントロールまたは生理的食塩水の陰性コントロールに比べ、有意な結核菌からの防御反応を誘発した。BCG ワクチンは、

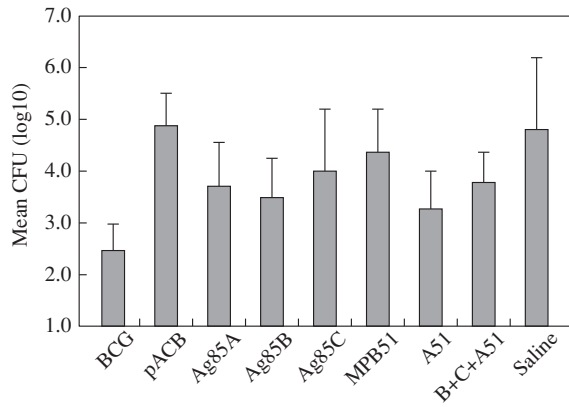


Fig. 1 The numbers of *M. tuberculosis* H37Rv recovered from the lung vaccinated with plasmid DNA

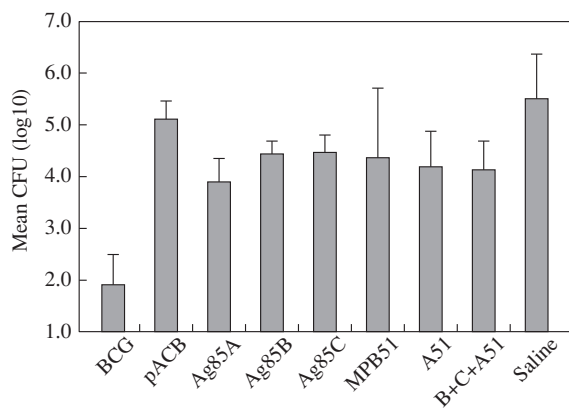


Fig. 2 The numbers of *M. tuberculosis* H37Rv recovered from the spleen vaccinated with plasmid DNA

近年、成人肺結核に対する防御能力について疑問が出されていることから、BCGを接種して10数年後にDNAワクチンで追加免疫を与える方法は結核免疫を増強する有力なツールとなろう。

## 謝 辞

本研究の一部は厚生労働省科学研究費補助金政策創薬総合研究事業国際共同研究事業の援助を受けた。共同研究者：山本十糸子，後藤義孝，蔵本悦郎，伊保澄子，佐藤由紀夫，大原直也，松本壮吉，松尾和浩，山田 毅，徳永 徹，クリスチン・マクファーランド，デービッド・マクマレー。

## 文 献

1) Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, et al.: Anti-tumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst.* 1984 ; 72 : 955-962.

2) Shimada S, Yano O, Inoue H, et al.: Antitumor activity of the DNA fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. II. Effects on various syngeneic mouse tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1985 ; 74 : 681-688.

3) Yamamoto S, Kuramoto E, Shimada S, et al.: In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of IFN- $\alpha/\beta$  and IFN- $\gamma$  with DNA fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn J Cancer Res.* 1988 ; 79 : 866-873.

4) Tokunaga T, Yamamoto S, Namba K : A synthetic single-stranded DNA, poly (dG, dC), induces IFN- $\alpha/\beta$  and IFN- $\gamma$  augments natural killer activity and suppresses tumor growth. *Jpn J Cancer Res.* 1988 ; 79 : 682-686.

5) Tokunaga T, Yamamoto T, Yamamoto S : How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn J Infect Dis.* 1999 ; 52 : 1-11.

6) Yamamoto S, Yamamoto T, Tokunaga T : The discovery of immunostimulatory DNA sequences. *Springer Semin Immunopathol.* 2000 ; 22 : 11-19.

7) Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, et al.: Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated NK activity. *J Immunol.* 1992 ; 148 : 4072-4076.

8) Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, et al.: Ability of oligonucleotides with certain palindromes to induce IFN production and augment NK cell activity is associated with their base length. *Antisense Res Dev.* 1994 ; 4 : 119-122.

9) Kuramoto E, Yano O, Kimura Y, et al.: Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation. *Jpn J Cancer Res.* 1992 ; 83 : 1128-1131.

10) Sonehara K, Saito H, Kuramoto E, et al.: Hexamer palindromic oligonucleotides with 5' CG3' motif(s) induce production of interferon. *J IFN Cytokine Res.* 1996 ; 16 : 799-803.

11) Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, et al.: DNA from bacteria, but not vertebrates, induces IFN, activates NK cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol.* 1992 ; 36 : 983-997.

12) Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al.: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 1995 ; 374 : 546-549.

13) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al.: A toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000 ; 408 : 740-745.

14) Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al.: Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* 2002 ; 168 : 4531-4537.

15) Siegel FP, Kadowaki N, Schodell M, et al.: The nature of the principal type I interferon-producing cells in human blood. *Science.* 1999 ; 284 : 1835-1837.

16) Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et al.: Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med.* 1999 ; 5 : 919-923.

17) Kimura Y, Sonehara K, Kuramoto T, et al.: Binding of oligoquanylate to scavenger receptors is required for oligo-

- nucleotides to augment NK cell activity and induce IFN. *J Biochem.* 1994 ; 116 : 991–994.
- 18) Lee SW, Song MK, Baek KH, et al.: Effects of a hexameric deoxyriboguanosine run conjugation into CpG oligodeoxynucleotides on their immunostimulatory potentials. *J Immunol.* 2000 ; 165 : 3631–3639.
  - 19) Verthelyi D, Zeuner RA : Differential signaling by CpG DNA in DCs and B cells: not just TLR9. *Trends Immunol.* 2003 ; 24 : 519–522.
  - 20) Takauji R, Iho S, Takahashi H, et al.: CpG-DNA-induced IFN- $\alpha$  production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors. *J Leukocyte Biol.* 2002 ; 72 : 1011–1019.
  - 21) Ishii KJ, Takeshita F, Gursel I, et al.: Potential role of phosphatidylinositol 3 kinase, rather than DNA-dependent protein kinase, in CpG DNA-induced immune activation. *J Exp Med.* 2002 ; 196 : 269–274.
  - 22) Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, et al.: The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effect of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol.* 2003 ; 170 : 3059–3064.
  - 23) Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, et al.: Immune cell activation by bacterial CpGDNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6. *J Exp Med.* 2000 ; 192 : 595–600.
  - 24) Freidag BL, Melton GB, Collins F, et al.: CpG oligonucleotides and interleukin-12 improve the efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in mice challenged with *M. tuberculosis*. *Infect Immun.* 2000 ; 68 : 2948–2953.
  - 25) Cooper AM, Magram J, Ferrante J, et al.: Interleukin 12 (IL12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med.* 1997 ; 186 : 39–45.
  - 26) Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, et al.: An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 1993 ; 178 : 2249–2254.
  - 27) Juffermans NP, Leemans JC, Florquin S, et al.: CpG oligonucleotides enhance host defense during murine tuberculosis. *Infect Immun.* 2002 ; 70 : 147–152.
  - 28) Hayashi T, Rao SP, Takabayashi K, et al.: Enhancement of innate immunity against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun.* 2001 ; 69 : 6156–6164.
  - 29) Lipford GB, Sparwasser T, Bauer M, et al.: Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur J Immunol.* 1997 ; 27 : 3420–3426.
  - 30) Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, et al.: Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol.* 1998 ; 160 : 2555–2559.
  - 31) Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, et al.: Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science.* 1993 ; 259 : 1745–1749.
  - 32) Barry MA, Lai WC and Johnson SA; Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature.* 1995 ; 377 : 632–635.
  - 33) Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, et al.: DNA-based immunization by in vitro transfection of dendritic cell. *Nat Med.* 1996 ; 2 : 1122–1128.
  - 34) Gardner MJ, Doolan DL, Hedstrom RC, et al.: DNA vaccines against malaria : Immunogenicity and protection in a rodent model. *J Pharm Sci.* 1996 ; 85 : 1294–1300.
  - 35) Doolan DL, Hedstrom RC, Wang R, et al.: DNA vaccines for malaria : past, the present & the future. *Indian J Med Res.* 1997 ; 106 : 109–119.
  - 36) Robinson HL, Montefiori DC, Johnson RP, et al.: Neutralizing antibody-dependent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat Med.* 1999 ; 5 : 526–534.
  - 37) Sato Y, Roman M, Tighe H, et al.: Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science.* 1996 ; 273 : 352–354.
  - 38) Yamamoto S, Yamamoto T, McMurray DN, et al.: Discovery of immunostimulatory CpG-DNA and its application to tuberculosis vaccine development. *Jpn J Infect Dis.* 2002 ; 55 : 37–44.

## CpG MOTIF AND TUBERCULOSIS IMMUNITY

Saburo YAMAMOTO

**Abstract** A potent immunostimulatory effect of DNA containing an unmethylated CpG motif was found in the course of research on water-soluble components from BCG possessing antitumor activity. Because such CpG motifs are relatively common in bacterial DNA, but rare in mammalian animal and plant DNA, they may be evolutionary adaptation augmenting innate immunity, most likely in response to pathogens that replicate within the host cells, such as viruses and intracellular bacteria. Microbial infection induces innate immunity by triggering pattern-recognition system. The infected cells produce proinflammatory cytokines that directly combat microbial invaders and express costimulating surface molecules, which develop adaptive immunity by inducing distinct T cell differentiation. Bacterial DNA with unmethylated CpG-DNA stimulates vertebrate immature immune cells to induce maturation and to produce Th1 cytokines as well as TNF- $\alpha$ . Therefore, CpG-DNA functions as an adjuvant for regulating the initiation

of Th1 differentiation. DNA vaccine including genes encoding mycobacterial proteins either MPB64 or HSP65 was assessed the ability to prevent the growth of bacilli in the lungs and spleens of guinea pigs after pulmonary challenge of virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Immunization with two constructs such as MPB64 and HSP65 elicited protective responses compared to a vector control or saline control. The roles of immunostimulatory CpG motifs in DNA vaccine developments and therapeutic applications have been discussed.

**Key words:** CpG, BCG, Oligonucleotide, IFN, DNA

Japan BCG Laboratory

Correspondence to: Saburo Yamamoto, Japan BCG Laboratory, 3-1-5, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-0022 Japan. (E-mail: yamamoto@bcg.gr.jp)