

新規結核ブースターワクチン候補分子の提案

－結核菌生来の翻訳後修飾を有する蛋白質の
優れたインターフェロンガンマ誘導性－

新潟大学大学院医歯学総合研究科細菌学分野の尾関百合子客員研究員、吉田豊客員研究員、西山晃史講師、松本壮吉教授らの研究グループは、同研究科呼吸器・感染症内科学分野の菊地利明教授、茂呂寛准教授、国立感染症研究所の山本三郎客員研究員、前山順一主任研究官、公益財団法人ルイ・パストゥール医学研究センターの伊保澄子研究員、京都大学の片平正人教授との共同研究で、結核菌と類似した天然変成領域（注1）に翻訳後修飾（注2）を有する蛋白質 Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) が、抗結核ワクチン BCG を小児期に接種した成人の末梢血刺激で、結核防御に必須とされるインターフェロンガンマ (IFN-gamma) の産生を強く誘導することを見いだしました。また福島県立医科大学総合内科・臨床感染症学講座の安田一行講師、長崎大学病院感染制御教育センターの田中健之病院准教授、長崎大学熱帯医学研究所の山下嘉郎客員研究員等による、フィリピンでのフィールド研究結果では、MDP1 応答性の IFN-gamma 産生は健常者で顕著で、結核患者では殆ど認められないことが報告されています（安田等、*Front Immunol.*, 2024）。これらの研究結果は、BCG の効果が低下した成人への追加ワクチン抗原として、生来の翻訳後修飾が付加された MDP1 の有用性を示しています。

【本研究成果のポイント】

- 免疫原性を有する結核菌抗原（注3）が新規ワクチン候補分子として検討されてきたが、その多くは本来の結核菌抗原の立体構造や翻訳後修飾が考慮されていなかった。また発症を抑え込んでいる無症候感染者よりも発症を許した結核患者において、防御免疫の指標とされる IFN-gamma をより強く産生誘導する蛋白質が、ワクチン候補として試験されてきたという矛盾があった。
- MDP1 に対する IFN-gamma 誘導は、結核非発症者>結核患者である。本研究グループは、弱毒迅速発育抗酸菌を利用し、結核菌 MDP1 に酷似した翻訳後修飾を天然変成領域に有するリコンビナント MDP1 (mMDP1) を取得することに成功した。
- 上記 mMDP1 は BCG 接種歴を有する成人末梢血から、結核予防に必要な IFN-gamma を他のワクチン候補抗原よりも多量に産生した。また、アジュバント（注4）として新規に考案された DNA (G9.1) とのコンビネーションでさらに多量の IFN-gamma が誘導された。
- 翻訳後修飾を有した MDP1 (mMDP1) と G9.1 のコンビネーションは減弱する BCG 効果を賦活するブースターワクチンとしての可能性が期待される。

I. 研究の背景

結核は現在も世界で年間 100 万人を超える死亡が報告されている最大級の感染症です。一方で、世界人口の 1/4 の無症候感染者（潜在性結核（LTBI）（注 5））が存在し、殆どの感染者で、発症が抑制されています。

現行の抗結核ワクチンとして BCG が投与されていますが、世界で年間 1 千万人を超える結核患者の発生が報告されているように、効果が十分とはいえません。そのため、BCG に代わるワクチン開発が進められていますが、効果の高い生ワクチンである BCG を超える新規ワクチンは実現していません。BCG は子供の結核に高い効果があることから、成人期に免疫を再活性化する、ブースターワクチンの開発が現実的な選択として有望視されています。また、結核の防御において、サイトカイン IFN-gamma の産生は、必須であることもわかっています。

これまでの抗結核ワクチン開発は免疫原性を有する結核菌抗原が新規ワクチン候補分子として検討されてきましたが、その多くは本来の結核菌抗原の立体構造や翻訳後修飾が考慮されていません。また発症を抑え込んでいる無症候感染者よりも発症を許した結核患者において、IFN-gamma 産生をより強く産生誘導する分子が、ワクチン候補として注目されてきたという矛盾があります。

一方で生産性の観点から、ワクチン候補分子は大腸菌など簡便なモデル生物で生産されていますが、病原体（結核菌）に特有の蛋白質の翻訳後修飾が付加される分子（*Front Immunol, van Els et al. 2014*）もあり、そのような翻訳後修飾付加体が本物の病原体の侵入に対する防御応答に、必要な場合があることも報告されていました。

II. 研究の概要

本研究では、結核菌の生存自体にも必須で、休眠誘導能もあり（西山等、*Nucleic Acid Res., 2024*）、増殖している結核菌および増殖を停止した休眠菌（多くの潜伏感染菌は休眠期にあると考えられている）いずれもが産生する蛋白質 MDP1 を、迅速発育抗酸菌に発現させ、mMDP1 を精製しました。mMDP1 は大腸菌で生産した MDP1（eMDP1）では見られない、多数の翻訳後修飾を C 末端に有し、それは結核菌本来のもの（吉田等、*BBRC., 2023*）と類似していました。

mMDP1 は eMDP1 に比べ、結核菌の弱毒株である BCG 接種経験をもつ成人由来の末梢血単核球から大量の IFN-gamma を誘導しました。また、新しいタイプの DNA アジュバントである、G9.1 とのコンビネーションで、その産生量は増大しました。さらにフィリピンサンラザロ病院で実施した臨床研究結果から、mMDP1 に対する IFN-gamma は、結核患者よりも無症候感染者で高いことも判明しました（安田等、*Front Immunol, 2024*）。

これらの結果は、①結核発症を抑制している人で、MDP1 に対する IFN-gamma 応答が起きていること、②本来の結核菌 MDP1 と同様の翻訳後修飾と免疫原性を有する mMDP1 は、特に G9.1 をアジュバントとするコンビネーションで、BCG 効果を賦活するブースターワクチンとして有用であること、を示しています。

III. 研究の成果

今回、結核菌 MDP1 遺伝子を組み込んだプラスミドを弱毒迅速発育抗酸菌 *M. smegmatis* に導入し、mMDP1 を発現させて、精製しました。mMDP1 は従来から使用されていた eMDP1 と比較し、 α ヘリックス含量、オリゴマー化の程度など、顕著な差があることがわかりました。また、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) の結果、eMDP1 には翻訳後修飾がほとんど見られませんでした。mMDP1 は、結核菌の産生する MDP1 と似て、C 末端のリシンにメチル化やアセチル化、サクシニル化などの、おびただしい翻訳後修飾が付加されていました (図 1)。

ID	Lys residues	Methyl	Dimethyl	Trimethyl	Acetyl	Succinyl
1	K3	0.022	0.0109	0.0132	0.1003	0.0368
2	K13	0.022	0.0638	0.0207	0.0342	0.3415
3	K38	0.067	0.0940	0.0050	0.0190	0.0337
4	K70	0.013	0.1069	0.0087	0.0393	0.0033
5	K72	0.011	0.0735	0.0175	0.0667	0.0610
6	K86	0.257	0.0285	0.0182	0.0364	0.0000
7	K103	0.221	0.0240	0.0000	0.0418	0.0286
8	K112	0.717	0.0708	0.0512	0.0282	0.0313
9	K113	0.660	0.1011	0.0599	0.0244	0.0714
10	K116	0.464	0.1138	0.0563	0.0585	0.2143
11	K117	0.546	0.1343	0.0483	0.0665	0.0500
12	K121	0.379	0.1541	0.0533	0.1012	0.0202
13	K122	0.407	0.1952	0.1167	0.1187	0.0139
14	K125	0.571	0.1295	0.1081	0.0884	0.0000
15	K128	0.613	0.0876	0.0759	0.0323	0.0071
16	K129	0.829	0.0484	0.0359	0.0199	1.0000
17	K133	0.980	0.1667	0.4545	0.3000	0.0000
18	K138	0.897	0.1500	0.2667	0.0000	0.0000
19	K142	0.738	0.0526	0.1233	0.0707	0.2857
20	K146	0.506	0.2143	0.0968	0.0816	0.1667
21	K147	0.617	0.0791	0.0658	0.0982	0.0000
22	K151	0.702	0.1166	0.2143	0.0000	0.0000
23	K155	0.658	0.1605	0.0775	0.0857	0.0556
24	K156	0.632	0.1884	0.2000	0.0800	0.0396
25	K159	0.347	0.5673	0.0792	0.0430	0.1250
26	K162	0.795	0.0643	0.0615	0.0000	0.3333
27	K166	0.452	0.2077	0.2903	0.0336	0.1429
28	K167	0.420	0.2635	0.1458	0.1008	0.2000
29	K170	0.618	0.1838	0.0444	0.1008	0.0000
30	K173	0.583	0.2423	0.0515	0.0267	0.0000
31	K174	0.736	0.0709	0.0538	0.1667	0.0000
32	K178	0.943	0.0959	0.0000	0.1667	0.0000
33	K183	0.990	0.0032	0.0000	0.0016	0.0000
34	K187	0.902	0.0489	0.0096	0.0232	0.0000
35	K191	0.415	0.1959	0.0412	0.0811	0.0016
36	K192	0.381	0.1334	0.1889	0.1224	0.0000
37	K196	0.537	0.1349	0.0635	0.0402	0.0016
38	K201	0.800	0.1047	0.0305	0.0079	0.0435
39	K205	0.781	0.1651	0.0113	0.0096	0.0048
40	K206	0.772	0.1541	0.0305	0.0032	0.0000
41	K214	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000



図 1. mMDP1 の翻訳後修飾

Lys residues: MDP1 アミノ酸配列中のリシン (K) 番号、Methyl: メチル化、Dimethyl: ジメチル化、Trimethyl: トリメチル化、Acetyl: アセチル化、Succinyl: スクシニル化
 数値はその箇所のリシンが修飾されている割合、全体を 1 として表記

抗結核免疫に IFN-gamma 産生は必須とされます。mMDP1 は eMDP1 やワクチン抗原を含む MPT32、MPT45 (Antigen 85C)、MPT46、MPT53、MPT59 (Antigen 85B)、MPT63 などの結核菌抗原よりも BCG 接種成人の末梢血から有意に多量の IFN-gamma 産生を誘導しまし

た (図 2)。

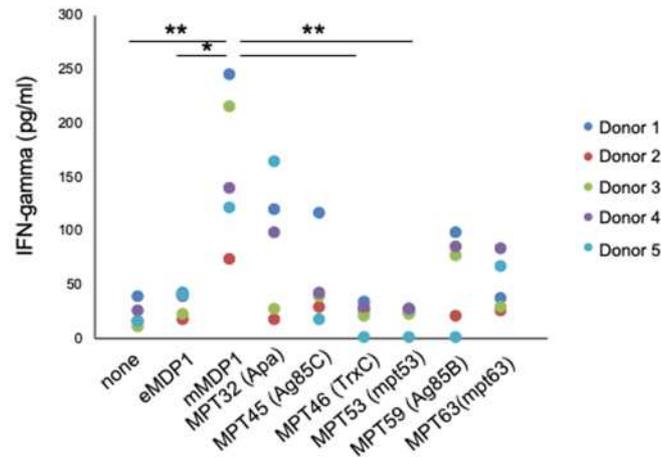


図 2. BCG 接種成人末梢血からの IFN-gamma 産生量

eMDP1: 大腸菌生産 MDP1、mMDP1: 抗酸菌 (*M. smegmatis*) 生産 MDP1

MPT32、MPT45、MPT46、MPT53、MPT59、MPT63: 開発中のワクチン抗原を含む結核菌が分泌する蛋白質

MDP1 は DNA と結合性を有し、DNA と混合して免疫することで、動物実験において結核防御効果を誘導することが先行研究からわかっていました。そこで今回、アジュバントとしてヒトの IFN-gamma 産生誘導に適した DNA について試験しました。その結果、新しいタイプの CpG-DNA (注 6) である G9.1 (5'-GGGGGGGGGACGA:TCGTCG-3') と mMDP1 のコンビネーションが最も多量の IFN-gamma 産生を誘導することがわかりました (図 3)。

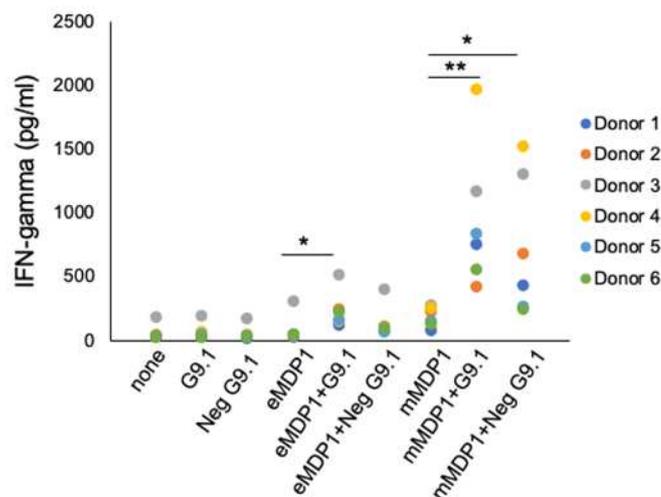


図 3. mMDP1 と G9.1 とのコンビネーションによる BCG 接種成人末梢血からの IFN-gamma 産生の増強

BCG 接種成人末梢血を eMDP1 あるいは mMDP1 と DNA (G9.1, Neg G9.1 (注 7)) のコンビネーションで培養し、産生された IFN-gamma 量。

またフィリピンにおけるフィールド調査で、mMDP1 を抗原として末梢血を培養すると、活動性結核患者よりも無症候感染者のグループで IFN-gamma 産生量が有意に高いことも報告されました。

このような結果から、mMDP1 の結核ワクチンへの利用が期待されます。

IV. 今後の展開

今回報告した結果は BCG 接種者の末梢血を用いた *in vitro* 実験であり、生体での防御試験を行っていません。最終的なヒトでの治験を実施する前に、免疫系が人間に似たサルや結核感受性のモルモットを用いた感染防御能の確認実験が必要です。

本研究グループは、結核菌蛋白質 Antigen 85 に対する抗体が、発症前から上昇することを見いだしています。一方で MDP1 に対する IFN-gamma 産生応答が、結核の発症抑制と相関するのであれば、MDP1 や Antigen 85 に対する免疫応答で、結核の発症と無症候化を診断できる可能性があることから、結核流行地での検証試験を実施していく予定です。発症傾向診断を実現できれば、的確な発症前の予防投薬により効率的な結核コントロールが可能になります。

また結核流行地の結核を発症していない人で見られる、MDP1 に対して IFN-gamma を産生する T 細胞が、実際に結核発症の阻止に関与しているかを、前向きコフォート研究にて検証していくことが重要だと考えられます。

V. 研究成果の公表

本研究成果は、2024 年 4 月 21 日、Springer Nature 社の発行する科学雑誌「Scientific Reports」に掲載されました (Sci. Rep. 2024 Apr 21)。

論文タイトル：Recombinant Mycobacterial DNA-binding Protein 1 with post-translational modifications boosts IFN-gamma production from BCG-vaccinated individuals' blood cells in combination with CpG-DNA

著者：Yuriko Ozeki, Akira Yokoyama, Akihito Nishiyama, Yutaka Yoshida, Yukiko Ohara, Tsukasa Mashima, Chikako Tomiyama, Amina K. Shaban, Atsuki Takeishi, Mayuko Osada-Oka, Takehiro Yamaguchi, Yoshitaka Tateishi, Jun-ichi Maeyama, Mariko Hakamata, Hiroshi Moro, Toshiaki Kikuchi, Daisuke Hayashi, Fumiko Suzuki, Toshiko Yamamoto, Sumiko Iho, Masato Katahira, Saburo Yamamoto, & Sohkiichi Matsumoto

doi: 10.1038/s41598-024-58836-8

VI. 謝辞

本研究は、科学技術振興機構 (JST) A-STEP (AS23140067G, AS2615045Q)、日本学術振興会 (JSPS) 基盤研究 C (19K07536、16K08774、23K06543)、日本医療研究開発機構 (AMED) 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業(22fk0108129)、革新的先端研究開発支援事業 AMED-CREST(22gm1610009)による支援を受けて実施されました。

【用語解説】

(注 1) 天然変成領域：一部の蛋白質の内部（または全体）に存在する領域。アミノ酸配列の低複雑性や偏ったアミノ酸組成のために一定の立体構造をとることができず、まるで変性しているかのように振る舞う。

(注 2) 翻訳後修飾：蛋白質が合成された後（翻訳後）に、蛋白質へ付加されるさまざまな修飾。メチル化、アセチル化、糖鎖付加、リン酸化などが知られている。

(注 3) 結核菌抗原：結核菌が産生する蛋白質をさす。

(注 4) アジュバント：ワクチンと一緒に投与する物質でワクチン効果を高める。

(注 5) 潜在性結核（LTBI）：結核菌に感染しているが、菌が増殖を停止し、結核を発症していない状況。

(注 6) CpG-DNA：シトシン（C）とグアニン（G）の連続配列をもつ非メチル化 DNA。哺乳類ではメチル化されることが多いが、細菌ではメチル化されていない。

(注 7) Neg G9.1: G9.1 (5'-GGGGGGGGGACGA:TCGTCG-3') の下線部分の C と G の配列を入れ替えた DNA (5'-GGGGGGGGGAGCA:TGCTCG-3') 。

関連論文

Evaluation of cytokine profiles related to *Mycobacterium tuberculosis* latent antigens using a whole-blood assay in the Philippines.

Front Immunol. 2024 Apr 10;15:1330796. doi: 10.3389/fimmu.2024.1330796.

著者

Ikkoh Yasuda, Naomi Ruth D. Saludar, Ana Ria Sayo, Shuichi Suzuki, Akira Yokoyama, Yuriko Ozeki, Haruka Kobayashi, Akihito Nishiyama, Sohkiichi Matsumoto, Sharon E Cox, Takeshi Tanaka, Yoshiro Yamashita

関連参考論文 Yoshida

Limited proteolysis of mycobacterial DNA-binding protein 1 with an extended, lysine-rich, intrinsically disordered region to unveil posttranslational modifications.

Biochem Biophys Res Commun. 2023 Nov 12;681:111-119.

著者

Yoshida Y, Nishiyama A, Suameitria Dewi DNS, Yamazaki T, Yokoyama A, Kobayashi D, Kondo H, Ozeki Y, Matsumoto S.

関連参考論文

Dynamic action of an intrinsically disordered protein in DNA compaction that induces

mycobacterial dormancy.

Nucleic Acids Res. 2024 Jan 25;52(2):816-830. doi: 10.1093/nar/gkad1149.

著者

Nishiyama A, Shimizu M, Narita T, Kodera N, Ozeki Y, Yokoyama A, Mayanagi K, Yamaguchi T, Hakamata M, Shaban AK, Tateishi Y, Ito K, Matsumoto S.

本件に関するお問い合わせ先

【研究に関すること】

新潟大学大学院医歯学総合研究科細菌学分野

客員研究員 尾関 百合子（おぜき ゆりこ）

E-mail : yuriozeki@med.niigata-u.ac.jp

【広報担当】

新潟大学医歯学系総務課

TEL : 025-227-2005

E-mail : shomu@med.niigata-u.ac.jp