

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5994127号
(P5994127)

(45) 発行日 平成28年9月21日(2016.9.21)

(24) 登録日 平成28年9月2日(2016.9.2)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
A 6 1 K	39/04 (2006.01)	A 6 1 K	39/04
A 6 1 P	31/06 (2006.01)	A 6 1 P	31/06

請求項の数 9 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2013-533675 (P2013-533675)	(73) 特許権者	593192069 日本ビーシーエー製造株式会社 東京都文京区大塚一丁目5番21号
(86) (22) 出願日	平成24年9月11日(2012.9.11)	(73) 特許権者	505314022 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 大阪府茨木市彩都あさぎ7丁目6番8号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/073213	(74) 代理人	100101454 弁理士 山田 卓二
(87) 国際公開番号	W02013/039069	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(87) 国際公開日	平成25年3月21日(2013.3.21)	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
審査請求日	平成27年3月16日(2015.3.16)		
(31) 優先権主張番号	特願2011-199422 (P2011-199422)		
(32) 優先日	平成23年9月13日(2011.9.13)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な組換えBCGワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

発現ベクターが、

a) サイトカインシグナル抑制因子1 (SOCS1) のキナーゼ阻害領域のフェニルアラニンがアスパラギン酸に1アミノ酸置換された変異体タンパク質をコードする塩基配列からなるDNA、

ここでキナーゼ阻害領域の1アミノ酸置換の位置は、配列番号1の塩基配列がコードする変異体タンパク質アミノ酸配列のN末から59位に対応する位置である、

b) SP2、hsp60、hsp70及びAntigen 85Bからなる群から選択されるいずれか一つの遺伝子の転写プロモーターの塩基配列からなるDNA、

c) blaF、blaC、Antigen 85B及びMPB64からなる群から選択されるいずれか一つの遺伝子のシグナルペプチドをコードする塩基配列からなるDNA、

d) SD配列からなるDNA、及び、

e) hsp60、Antigen 85B及びM. kansasii由来抗原からなる群から選択されるいずれか一つの遺伝子の転写ターミネーターの塩基配列からなるDNA

を含む、pSO246の大腸菌-抗酸菌シャトルベクターであることを特徴とする、発現ベクター。

【請求項2】

カナマイシン耐性遺伝子をさらに含む、請求項1に記載の発現ベクター。

10

20

【請求項 3】

シグナルペプチドをコードする塩基配列が、b l a Fシグナル配列である、請求項 1 又は 2 に記載の発現ベクター。

【請求項 4】

転写ターミネーターをコードする塩基配列が、Antigen 85 Bターミネーター配列である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の発現ベクター。

【請求項 5】

1 アミノ酸置換されたサイトカインシグナル抑制因子 1 (SOCS1) をコードする塩基配列が配列番号 1 である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の発現ベクター。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれかの発現ベクターを、BCG菌に導入して得られた組換えBCG菌。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の組換えBCG菌を含有する、BCGワクチン。

【請求項 8】

サイトカインとケモカインの産生誘導能を増強させる、請求項 7 に記載のワクチン。

【請求項 9】

請求項 6 に記載のBCG菌を含む、結核発症予防用組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サイトカインシグナル抑制因子のドミナントネガティブ変異体を発現する組換えBCG菌の作製とそれを含有する結核予防ワクチンに関するものである。

【背景技術】

【0002】

現在、世界中で広く結核ワクチンとして用いられているBCGワクチン(Mycobacterium bovis BCG)は、小児の結核性髄膜炎ならびに粟粒結核に対しては80%の防御効果を示しているが、成人の肺結核に対する予防効果は十分とは言えない。結核は世界三大感染症の一つであり、世界中で毎年930万人の新規患者の発生が認められる。わが国では25,000人以上の患者の発生があり、結核中度蔓延国となっている。有効な4剤の組み合わせによる治療法は確立されているが、近年になってそれらの2剤以上に対して耐性を示す多剤耐性結核菌の感染が広がり、さらに3剤以上に耐性を持つ高度多剤耐性菌の出現も多く報告されており、有効な新規結核ワクチンの開発は急務となっている。

【0003】

現在、BCGを含む抗酸菌の分子生物学的な研究が進み、BCGに外来遺伝子を導入して、その生物学的な性質を改良し、より有効な結核ワクチンを開発する試みが世界中で行われている(非特許文献1, 2、特許文献1, 2)。例えば、米国のNPO法人であるAERAS Global TB Vaccine Foundationを中心として、BCG菌に対して、結核菌の防御抗原分子の過剰発現やサイトカイン遺伝子等の組み込みなどが試みられているが、まだ十分な結核予防効果を上げている訳ではなく、打開策についても決定打と見られるものは見出せていない。また、国内においても、近畿中央胸部疾患センターで、抗原Ag85B等の遺伝子を組み込んだ組換えBCGを用いた結核予防効果が報告されている(非特許文献3)。しかし、また充分効果を上げているようには見えない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特表2008-517013号公報

【特許文献2】特表2001-518781号公報

10

20

30

40

50

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】 *J. Immunology*, 2007, 179: 8418 - 8424【非特許文献2】 *Tuberculosis* 2009, Jan; 89(1): 62 - 67 (2008)

【非特許文献3】 化学療法の領域、Vol. 23、No. 3 447 - 453 (2007年)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の一つの目的は、サイトカインシグナル伝達のレベルで様々なサイトカイン産生を高めることのできる組換えBCG菌を提供することであり、更なる一つの目的は、この組換えBCG菌を有効成分とする、有効性の高い結核予防ワクチンを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、結核ワクチンとしてのBCG菌の有効性を増強するために、新たな試みとしてBCG等の抗酸菌に対する宿主免疫反応を負に調節するサイトカイン抑制分子 (suppressor of cytokine signaling: SOCS) に着目した。即ち、SOCS分子はJAK/STATシグナル経路を抑制することにより、種々のサイトカインの産生を調節することが知られている (Yoshimura et al. *Nat Rev Immunol.* 7, 454 - 65 (2007) など)。例えば、BCG菌の感染によりSOCSの発現がマクロファージ (M ϕ) や樹状細胞 (DC) 等において増強され、免疫反応を抑制することが近年報告されている (Imai et al. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39, 173 - 180 (2003), Narayana and Balaji *J. Biol. Chem.* 283, 12501 - 12511 (2008))。

【0008】

このようなSOCSの発現増強が原因となって、BCGワクチンの効果が限定的になっている可能性が示唆されている。このSOCS1の働きによる免疫反応の抑制を解除できれば、BCGワクチンの効果を増強できるのではないかと考えられる。なお、SOCSは8個の分子群からなるSOCSファミリーを形成しており、その中でもSOCS1は、現在、IFN γ 、IFN β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21のシグナル伝達を制御することが明らかにされている。

そこで、本発明者らは、SOCS1分子の働きを抑制し、Th1型免疫反応を亢進させる、新しい組換えBCG菌の作製を検討した。まず、SOCS1の機能に対し拮抗的に働くアンタゴニストであるSOCS1ドミナントネガティブ変異体 (1アミノ酸の変換) を作製し (SOCS1dn)、このSOCS1dn発現ベクターを組み込んだ組換えBCG菌 (rBCG-SOCS1dn) を作製した。試験管内での解析により、このrBCG-SOCS1dn感染細胞では、JAK2リン酸化抑制の解除が観察され、SOCS1によるリン酸化抑制が解除できることが明らかとなった。

【0009】

上記組換えBCG菌 (rBCG-SOCS1dn) を用いたマウス吸入感染実験により、結核菌特異的免疫反応が増強されていることが明らかになり、rBCG-SOCS1dnが機能して、感染DCにおいてSOCS1の機能を抑制し、その結果として抗酸菌特異的免疫反応を増強することを明らかにした。本発明者らは、以上の知見に基づき本発明を完成した。なお、本発明の知見は、上記非特許文献1、2、3や特許文献1、2で報告されているような結核菌の感染防御に働く抗原遺伝子をBCG菌に導入して、そのワクチン活性増強を目指すストラテジーとは、全く異なるコンセプトに基づくものである。本発明のような宿主由来のタンパク質遺伝子をBCG菌に組み込み、宿主のシグナル伝達経路を

10

20

30

40

50

制御して、より有効なワクチンを開発しようというコンセプトは、本発明者らの知る限り過去に例がない。

【 0 0 1 0 】

本発明が提供する例示的な実施態様は、以下の(1)~(20)である。

(1) BCG菌組換え用のサイトカインシグナル抑制因子の発現ベクターであって、
a) ドミナントネガティブな1アミノ酸置換されたサイトカインシグナル抑制因子1(SOCS1)の塩基配列からなるDNA又は当該塩基配列と同一性が90%以上であり当該1アミノ酸置換を有する塩基配列からなるDNA、及び
b) シグナルペプチドをコードする塩基配列からなるDNAを含む、発現ベクター。

(2) BCG菌組換え用のサイトカインシグナル抑制因子の発現ベクターであって、
a) ドミナントネガティブな1アミノ酸置換されたサイトカインシグナル抑制因子1(SOCS1)の塩基配列からなるDNA、

b) SP2、hsp60、hsp70及びAntigen 85Bからなる群から選択されるいずれか一つの遺伝子の転写プロモーターの塩基配列からなるDNA、

c) blaF、blaC、Antigen 85B及びMPB64からなる群から選択されるいずれか一つの遺伝子のシグナルペプチドをコードする塩基配列からなるDNA、

d) SD配列からなるDNA、及び

e) hsp60、Antigen 85B及びM. kansasii由来抗原からなる群から選択されるいずれか一つの遺伝子の転写ターミネーターの塩基配列からなるDNA

を含む、発現ベクター。

(3) カナマイシン耐性遺伝子をさらに含む、(1)又は(2)に記載の発現ベクター。

(4) 発現ベクターが、

a) ドミナントネガティブな1アミノ酸置換されたサイトカインシグナル抑制因子1(SOCS1)の塩基配列からなるDNA、

b) SP2、hsp60、hsp70及びAntigen 85Bからなる群から選択されるいずれか一つの遺伝子の転写プロモーターの塩基配列からなるDNA、

c) blaF、blaC、Antigen 85B及びMPB64からなる群から選択されるいずれか一つの遺伝子のシグナルペプチドをコードする塩基配列からなるDNA、

d) SD配列からなるDNA、及び、

e) hsp60、Antigen 85B及びM. kansasii由来抗原からなる群から選択されるいずれか一つの遺伝子の転写ターミネーターの塩基配列からなるDNA

を含む、大腸菌-抗酸菌シャトルベクターである、(1)~(3)のいずれかに記載の発現ベクター。

(5) 大腸菌-抗酸菌シャトルベクターがpSO246である、(4)に記載の発現ベクター。

(6) シグナルペプチドをコードする塩基配列が、blaFシグナル配列である、(1)~(5)のいずれかに記載の発現ベクター。

(7) 転写ターミネーターをコードする塩基配列が、Antigen 85Bターミネーター配列である、(1)~(6)のいずれかに記載の発現ベクター。

(8) 1アミノ酸の置換部位がSOCS1のキナーゼ阻害領域である、(1)~(7)のいずれかに記載の発現ベクター。

(9) 1アミノ酸の置換部位がN末から59位の位置である、(1)~(8)のいずれかに記載の発現ベクター。

(10) 59位のアミノ酸が、フェニルアラニンから、アスパラギン酸に変わっている、(1)~(9)のいずれかに記載の発現ベクター。

(11) ドミナントネガティブな1アミノ酸置換されたサイトカインシグナル抑制因子1(SOCS1)の塩基配列が配列番号1である、(1)~(10)のいずれかに記載の発現ベクター。

10

20

30

40

50

(12)(1)~(11)のいずれかの発現ベクターを、BCG菌に導入して得られた組換えBCG菌(rBCG-SOCS1dn)。

(13)BCG菌がBCG東京株である、(12)に記載の組換えBCG菌。

(14)(12)又は(13)の組換えBCG菌を含有する、BCGワクチン。

(15)結核予防用ワクチンである、(14)に記載のBCGワクチン。

(16)サイトカイン及び/又はケモカインの産生誘導能を増強させる、(14)又は(15)に記載のワクチン。

(17)サイトカイン及びケモカインの産生誘導能が、IFN-、TNF-及びRANTESからなる群から選択される少なくとも1つのサイトカインの産生誘導能及び/又はAntigen 85B特異的細胞性免疫誘導能である、(14)~(16)のいずれかに記載のワクチン。

10

(18)(14)~(17)のいずれかに記載のワクチンを投与することを含む、結核の感染防御方法。

(19)(1)~(11)のいずれかの発現ベクターをBCG菌に導入することを含む、BCGワクチンの製造方法。

(20)BCG菌にドミナントネガティブな1アミノ酸置換されたサイトカインシグナル抑制因子1(SOCS1)を発現させることを含む、BCG菌に対する免疫の増強方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明は、組換えBCG菌(rBCG-SOCS1dn)であって、生体に投与されると速やかにマクロファージや樹状細胞に取り込まれ、その細胞内でSOCS1dn蛋白質を産生する組換えBCG菌(rBCG-SOCS1dn)を提供する。産生されたSOCS1dn蛋白質は、元々細胞内に存在するSOCS1蛋白質と拮抗的に作用して、SOCS1によるJAKリン酸化阻害活性を抑制する。一つの実施態様において、本発明の組換えBCG菌は、免疫個体におけるIFN-のシグナルを増強してIFN-の産生能を高め、宿主のBCG親株に比して格段に高い免疫誘導能を持つ。従って、この組換えBCG菌を有効成分とするワクチンは、結核ワクチンとして、これまでにない増強された宿主サイトカイン産生能と増強された免疫誘導能を備えている。

20

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】SOCS1dn遺伝子(配列番号1)のBCGでの発現プラスミドの構築ストラテジーを示した流れ図である。

30

【図2】(a)図は、最終的に構築したSOCS1dn発現プラスミドの構造を模式的に示した図である。図中KmRは、カナマイシン耐性遺伝子を、SP2はSP2プロモーターを、megaSDは、シャインダルガーノ(SD)配列を、blaFは、Mycobacterium fortuitum由来ラクタマーゼ遺伝子のシグナルペプチド配列を、terminatorはM. kansasii由来抗原遺伝子のターミネーターを示す。(b)図は、その発現プラスミドを導入したrBCG-SOCS1dnの菌体抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、PVDF膜にプロットした後、抗SOCS抗体と反応する蛋白質を検出したウエスタンブロット解析の図である。約37kDaの位置に特異的なバンドが認められる。

40

【図3】は、RAW264.7細胞にBCG Tokyo株およびrBCG-SOCS1dnを試験管内で感染させ、JAK2タンパク質のリン酸化を調べるために行なったウエスタンブロット解析の図である。

【図4】(a)図は、rBCG-SOCS1dnを免疫したマウスの脾細胞を用いて、組換えAntigen 85B蛋白質またはantigen 85B遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルスで刺激した後のIFN-産生細胞数をELISPOT法で評価した結果である。(b)図は、同様の免疫マウス脾細胞を、組換えAntigen 85B蛋白質、antigen 85B遺伝子を発現する組換えワクシニアウイルスまたはPPD刺激後に試験管内で一定時間培養し、培養上清中のTNF-およびRANTESの産

50

生量を測定した結果である。

【図5】rBCG-SOCS1dnおよびBCG東京親株を免疫したマウスに結核菌を噴霧感染し、4週および8週後の肺と脾臓での結核菌を還元培養して菌数を比較したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

- 本発明の第一の態様 -

本発明の第一の態様において、SOCS1ドミナントネガティブ変異体の遺伝子配列を含有するベクターが提供される。当該ベクターの例には、配列番号2で表される塩基配列からなるベクターが挙げられる。

本発明において使用される「SOCS1ドミナントネガティブ変異体(SOCS1dn)」は、SOCS1の活性を阻害する変異タンパク質であって、野生型のSOCS1タンパク質のキナーゼ阻害領域に存在するアミノ酸が1アミノ酸置換を起こした変異体タンパク質であり得る。特に好ましい例としては、野生型のSOCS1タンパク質のPhe-59がAsp-59に1アミノ酸置換を起こしたタンパク質が挙げられる。このようなSOCS1dnをコードする遺伝子は、野生型のSOCS1遺伝子のPhe-59をAsp-59に1アミノ酸置換を起こすような遺伝子変異を導入することにより得ることができる(Hanada et al., J. Biol. Chem. 276, 40746-40754 (2001))。また、その変異の導入方法としては、PCRプライマー内に変異を導入し、PCRでその変異を含むDNAを増幅後クローニングする方法や、Kunkel法による部位特異的変異導入法などの公知の方法を用いることができる。

また、本発明が提供する発現ベクターは、野生型のSOCS1のアミノ酸配列と80%以上、90%以上、95%以上、98%以上または99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるSOCS1変異体をコードするDNAを含んでもよい。そのような同一性を有するアミノ酸配列からなるSOCS1変異体は、野生型のSOCS1タンパク質のキナーゼ阻害領域に存在するアミノ酸が1アミノ酸置換を起こした変異体タンパク質であって、SOCS1の活性を阻害する蛋白質であり得る。

SOCS1dn遺伝子の例には、配列番号1で表される塩基配列からなる遺伝子が挙げられる。

【0014】

本明細書において「発現ベクター」とは、特定の外来遺伝子を発現させるために用いられるベクターである。本発明が提供する発現ベクターの例には、SOCS1dnをBCG菌で分泌発現させるための転写プロモーター、シャインダルガーノ(SD)配列、シグナルペプチドおよび転写ターミネーターを含み、且つBCG菌などの抗酸菌で複製可能なレプリコンを有するプラスミドDNAが挙げられる。

本発明において使用される「転写プロモーター」は、本発明の目的遺伝子の発現に関わる重要な因子であり、その強度が強くて、mRNAを多量に産生できるものであり得る。好ましいものとして、例えばSP2(Spratt et al., FEMS Microbiol. Lett. 224: 139-142 (2003))、hsp60、hsp70、Antigen 85Bなどのプロモーターを挙げることができる。より好ましくは、SP2を挙げることができる。

本発明において使用される「転写ターミネーター」は、転写を止めてRNAポリメラーゼのターンオーバーを改善する目的で搭載されるものであり得、例えばhsp60、Antigen 85B、M. kansasii由来抗原などのターミネーターを挙げることができる。好ましいものとしては、Antigen 85Bのターミネーターを挙げることができる。

本発明において使用される「SD配列」は、転写で産生されたmRNAが、16SリボゾームRNAの3'末端と相補性を持つことで結合し、タンパク質への翻訳を進めるための重要な配列であり得る。例えば、4-5塩基の通常SD配列と共に、結合力がより強力なmegaSDと呼ばれる11塩基(AGAGGAGAG)のものを使用することが

10

20

30

40

50

できる (Mederie et al. Infect. Immun. 70:303-314 (2002))。このましいSD配列としては、megaSDを挙げることができる。

【0015】

本発明において使用される「シグナルペプチド」は、分泌タンパク質が膜を通過する際に必要な20-40アミノ酸残基からなるペプチド配列であり得る。なお、SOCS1は元来宿主細胞の細胞質内で働くタンパク質であり、概して細胞質内で働くタンパク質は膜を通過しにくい構造を持つことから、本発明において使用されるSOCS1dnタンパク質も細胞膜を通過し難いと考えられる。そこで、膜透過に働くシグナルペプチドにSOCS1dnを繋いで菌体外に分泌させることが、重要であると考えられた。本発明において使用されるシグナルペプチドとしては、抗酸菌由来のシグナルペプチドが挙げられ、それは、BCG菌からSOCS1dnタンパク質を効率的に分泌させる。例えば、blaF (Timm et al. Mol. Microbiol. 12:491-504 (1994)), blaC (McDonough et al. J. Bacteriol. 187:7667-7679 (2005)), Antigen 85B (Matsuo et al. J. Bacteriol. 170:3847-3854 (1988)), MPB64 (Yamaguchi et al. Infect. Immun. 57:283-288 (1989))など様々な抗酸菌由来のシグナルペプチド遺伝子を使用することができる。好ましいものとしては、blaFを挙げることができる。

10

20

【0016】

更に本発明が提供する発現ベクターには、通常の発現ベクターに存在する、抗生物質耐性遺伝子や複製起点 (replication origin = ori) などが存在してもよい。例えば、抗生物質耐性遺伝子としては、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子 (KmR)、ハイグロマイシンなどを挙げることができる。目的に応じて、適宜、抗生物質耐性遺伝子を選択することが出来る。複製起点としては、例えばSV40、ColEI ori、pUC ori、2μ ori、pBR322 ori、Ori-Mなどが挙げられ、目的に応じて適宜選択することが出来る。

本発明において使用される「大腸菌 - 抗酸菌シャトルベクター」は、BCG菌のような抗酸菌と大腸菌の両方で発現可能なベクターであり得、このベクターにSOCS1dn遺伝子と転写プロモーター、シャインダルガーノ (SD) 配列、シグナルペプチドおよび転写ターミネーターを包含させるとことにより、より効率的にSOCS1dnタンパク質を発現することができる。本発明で使用可能な大腸菌 - 抗酸菌シャトルベクターは、公知のもので特に限定されるものはなく、例えば、pSO246、PNN2等のものを挙げることができる。

30

【0017】

- 本発明の第二の態様 -

本発明の第二の態様において、SOCS1の59位がフェニルアラニン (Phe) からアスパラギン酸 (Asp) に変化したドミナントネガティブ変異体の遺伝子配列を含有したベクターで形質転換された組換えBCG菌が提供される。

40

本明細書において、「BCG菌」とは、ウシ型結核菌が継代培養されて人に対する毒性が失われて抗原性だけが残った細菌のことであり、作製者の名前を取って名付けられたカルメット・ゲラン桿菌 (Bacille de Calmette et Guerin) の略称である。BCG菌の例には、BCG東京株が挙げられる。

発現ベクターをBCG菌に導入する方法としては、抗酸菌への発現ベクターの導入方法を利用することができる。本発明が提供する発現ベクターを用いて電気穿孔法でBCG菌に導入する方法を用いてもよい。また、相同組換えを利用して部位特異的にゲノムDNAに当該遺伝子を挿入することも可能である。

本発明が提供する「組換えBCG菌」は、本発明が提供する発現ベクターで組換えられ

50

、SOCS1タンパク質を発現するようになったBCG菌であり得る。組換えBCG菌を選択するためには、BCG菌に本発明の発現ベクターを導入した後、市販の抗酸菌培養用の7H10等の寒天培地にカナマイシンやハイグロマイシン等の薬剤を加えた寒天培地上で、約3週間37℃で培養することによって得られるコロニーをピックアップすることにより、組換えBCG菌を選択することができる。

【0018】

更に、組換えBCG菌におけるSOCS1タンパク質の発現確認は、以下のように行うことができる。まず、組換えBCG菌の一部を採取し、7H9培地やソートン培地などの液体培地中、37℃で約2週間培養することにより菌を増殖させた後に、超音波破碎法などで菌体を破碎することにより菌体抽出液を調製する。培養上清中の蛋白質は、
10
硫酸沈殿、トリクロロ酢酸沈殿などの一般的な生化学的方法で濃縮して菌体分泌蛋白質混合物を調製する。これらのサンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ニトロセルロース製のフィルターに電気的に吸着(ブロット)させた後に、市販の抗SOCS1抗体と反応する蛋白質を検出するウエスタンブロット法により、SOCS1タンパク質の発現を確認することができる。

【0019】

- 本発明の第三の態様 -

本発明の第三の態様において、上記組換えBCG菌を有効成分とするBCGワクチンが提供される。

本発明が提供する「BCGワクチン」は、IFN- γ 等の種々のサイトカイン産生能が向上したBCG生菌ワクチンであり得る。例えば、本発明が提供するBCGワクチンは、IFN- γ 、THF- β 及びRANTESからなる群から選択される少なくとも1つのサイトカインの産生誘導能及び/又はAntigen 85B特異的細胞性免疫誘導能が増強されたワクチンであり得る。好ましくは、本発明が提供するBCGワクチンは、結核予防ワクチンとして使用される。
20

一つの実施態様において、本発明は、宿主のBCG東京株由来のワクチンと比較して、IFN- γ 産生細胞数が増大すると共にAntigen 85B特異的細胞性免疫誘導能が増強され、TNF- α とRANTESの産生量が増大するBCGワクチンを提供する。

また、一つの実施態様において、本発明が提供するBCGワクチンは、投与されたSOCS1ドミナントネガティブ変異体(SOCS1dn)により、投与された対象(ヒト)
30
で、サイトカインとケモカイン(例えば、IFN- γ 、THF- β 、RANTES)の産生の増加が惹起され、BCG菌に対する免疫(例えば、BCG菌に対する抗体産生)が増強される。

「サイトカインとケモカインの産生誘導能」は、本発明が提供する組換えBCG菌の免疫原性を評価する指標となり得るものであり、以下の方法で評価することができる。まず、適量の組換えBCGの生菌を生理食塩水等の媒体に懸濁させたものをマウス、モルモット等の小動物に皮下接種する。2-8週後の脾細胞を採取し、Antigen 85BやPPD等のBCGあるいは結核菌由来抗原蛋白質で刺激した後、IFN- γ 産生細胞数をELISPOT法により測定することにより評価することができる。更に、上記免疫感作動物の脾細胞を*in vitro*で一定期間培養後、培養上清中の種々のサイトカイン
40
もしくはケモカインの濃度をELISA法により定量することにより、サイトカインもしくはケモカイン産生能を評価することができる。これらの評価試験の結果、本明細書実施例において作製されたBCGワクチンは、それが投与された動物(例えば、マウス)において、IFN- γ 産生細胞数が増大すると共にAntigen 85B特異的細胞性免疫誘導能が増強され、TNF- α とRANTESの産生量が増大していることが示された。

なお、本発明が提供するBCGワクチンは、従来のBCGワクチンと同様の処方ヒトに投与できる。投与量は、適宜、効果を勘案して調整することができる。

また、本発明が提供するBCGワクチンは、結核予防用組成物であり得、医薬品として許容できる担体(添加剤も含む)と共に製剤化することができる。医薬品として許容できる担体としては、例えば、賦形剤(例えば、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロー
50

ス、ポリビニルピロリドン等)、崩壊剤(例えば、カルボキシメチルセルロース等)、滑沢剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム等)、界面活性剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム等)、溶剤(例えば、水、食塩水、大豆油等)、保存剤(例えば、p-ヒドロキシ安息香酸エステル等)などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。よって、本発明は、一つの実施態様において、本発明が第二の態様で提供するBCG菌と医薬品として許容できる担体を混合することを含む、BCGワクチンの製造方法を提供する。また、本発明は、一つの実施態様において、本発明が提供するBCGワクチンをヒトに投与することを含む、結核感染防御方法を提供する。

【0020】

以下、実施例および試験例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれによってなんら限定されるものではない。

【実施例】

【0021】

以下、実施例および試験例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれによってなんら限定されるものではない。

【0022】

(実施例1) SOCS1dn分泌発現ベクターの構築

構築の流れ図を図1に示す。まず、SP2プロモーター(Spratt et al., FEMS Microbiol. Lett. 224: 139-142 (2003))、megaSD配列(Mederie et al. Infect. Immun. 70: 303-314 (2002))、M. fortuitum由来-lactamase遺伝子(blaF)のシグナルペプチド遺伝子(Genbank L25634 (ヌクレオチド番号1274-1369))、及びM. kansasii由来抗原ターミネーター遺伝子(Genbank X53897 (ヌクレオチド番号1221-1396))を、5'側からこの順に並んだ発現カセットをpUC18プラスミドに搭載してpA717Nベクター(配列番号3)を作製した。次に、pcDNA3.1(Invitrogen社製)にクローニングされている、N末端にHAタグを持つSOCS1dn遺伝子をXhoI-EcoRI消化により切り出し、pCR2.1-TOPOベクターにサブクローニングしてpCR2.1-TOPO-SOCS1dnを得た。このプラスミドからNcoI-BamHI消化によりNcoI以降終止コドンまでを含むDNA断片を切り出し、blaFシグナル配列の3'末端の一部とSOCS1dnの5'末端の一部を含む合成DNAアダプターを介して、pA717NプラスミドのSP2プロモーターの下流に位置するNarI-BamHI部位にクローニングし、pA717N-SOCS1dn(配列番号2)を得た。このプラスミドからSOCS1dn発現カセットをKpnI消化で切り出し、大腸菌-抗酸菌シャトルベクターpSO246 [Matsumoto et al. FEMS Microbiol. Lett. 135: 237-43 (1996)]のKpnI部位に導入し、SOCS1dn分泌発現ベクターpSO-SOCS1dnを得た(図2(a))。

【0023】

(実施例2) SOCS1dnを発現する組換えBCG菌の構築

pSO-SOCS1dnおよびpSO246(配列番号4)を常法により電気穿孔法でBCG東京株に形質転換し、カナマイシン添加7H10-OADC寒天培地(ベクトンディッキンソン社製)で2-3週間、37℃で培養した。コロニーをピックアップし、カナマイシン添加7H9-ADCエンリッチメント液体培地(ベクトンディッキンソン社製)中で2週間振とう培養した。OD600nmが0.5に達した時点で菌体を遠心分離で集め、超音波破碎にて菌体抽出液を調製した。その一部をSDS-PAGEに供し、PVDF膜にプロットした後に、一次抗体としてヤギ抗SOCS1ポリクローナル抗体、二次抗体としてHRP標識抗ヤギIgG抗体(Gene Tex社製)と反応させた(ウエスタンブロット解析)。バンドの検出にはECL Advanced Western Blotting Detection Kit(GE Healthcare社製)を用いた

10

20

30

40

50

。結果を図2(b)に示す。pSO-SOCS1dnを導入したBCGでは、空ベクターのpSO246を導入したBCGには見られない特異的なバンドが認められ、SOCS1dn蛋白質が著量発現していることがわかった。一方、同じ組換えBCGクローンを、ADCエンリッチメントを含まず2%グリセリン含有、カナマイシン添加7H9液体培地(ベクトンディッキングソン社製)で2-3週間、37℃で培養し、OD600nmが0.5に達した時点で菌体を遠心分離で除いて上清を回収後、0.45µmのフィルター(ミリポア社製)を通して完全に除菌した。この上清1mlに等量の10%トリクロロ酢酸水溶液を加えて混和し、氷中で30分間静置後、遠心分離にて沈殿したタンパク質の混合物を回収した。このサンプルを上記と同様にウエスタンブロット解析を行なったところ、発現したSOCS1dnタンパク質がBCG菌体外に分泌されていることがわかった。

10

【0024】

(試験例1) rBCG-SOCS1dnのJAK2リン酸化抑制解除効果の解析(in vitro assay)

RAW246.7細胞を12 well plateに 2×10^5 個/wellに調整して播き、RPMI1640培地中、37℃, 5% CO₂存在下で18時間培養後、MOI=10になるようにBCG-TokyoまたはrBCG-SOCS1dnを加え、さらに24時間培養を行った。培養後、細胞を回収し、100µlのLysis Buffer(50mM Tris-HCl(pH7.4)、250mM NaCl、50mM NaF、5mM EDTA、0.1% Nonidet P-40、1% protease inhibitor mix(GE Healthcare社製)を加え、4℃で1時間溶解させた。さらに超音波処理にて細胞を破碎し、細胞抽出液とした。これをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開後、PVDF膜にブロットし、ウサギ抗JAK2抗体(EPTOMICS社製)及びウサギ抗pJAK2抗体(EPTOMICS社製)を用いてウエスタンブロット解析を行なった。結果を図3に示す。

20

BCG-Tokyo感染RAW264.7細胞では、非感染細胞に比べてJAK2のリン酸化が抑制されており、SOCS1の発現亢進による効果だと考えられる。一方、rBCG-SOCS1dn感染細胞では、JAKリン酸化が認められ、SOCS1によるリン酸化抑制が解除されていることがわかった。

【0025】

(試験例2) rBCG-SOCS1dnによるマウスでのBCG特異的IFN-γ産生の増強試験

30

Balb/cマウスにBCG東京株又はrBCG-SOCS1dnそれぞれを0.1mgずつ皮下接種し、4週後の脾臓を採取して脾細胞を調製後、組換えAntigen 85B蛋白質あるいはAntigen 85B発現型組換えワクシニアウイルスで刺激した後のIFN-γ産生細胞数を市販のELISPOT kit(MABTEC社製)で測定した。結果を図4(a)に示す。rBCG-SOCS1dn免疫群ではBCG東京免疫群と比較して有意に高い頻度でspot-forming cellが認められ、Antigen 85B特異的細胞性免疫誘導能が増強されていることがわかった。また免疫マウスの脾細胞を各種抗原で刺激後に培養し、培養上清中のTNF-αおよびRANTESを定量したところ、rBCG-SOCS1dn免疫群ではBCG東京免疫群と比較してこれらの濃度が高く、サイトカインおよびケモカイン産生誘導能が増強されていることがわかった(図4(b))。

40

【0026】

(試験例3) rBCG-SOCS1dnによるマウスでの結核菌感染防御能の増強試験

Balb/cマウスにBCG東京株とrBCG-SOCS1dnをそれぞれ0.5mgずつ皮下接種し、陰性対照として生理食塩水のみを皮下接種した群をおいた。免疫4週後に結核菌H37Rv株(マウス1匹あたり47 colony forming unit)を、Glas-Col社製噴霧感染装置model 099C A4212を用いて噴霧感染させた。感染4週および8週後に肺および脾臓を採取し、一定重量の臓器をグラインダーですり潰して1%小川培地(日本ビーシー製造(株)製品)に播き

50

培養した。培養4週後に結核菌のコロニー数を計測し、BCG東京株免疫マウスよりも菌数が少ないかどうかで、感染防御能増強効果を評価した(図5)。肺ではBCG東京株およびrBCG-SOCS1dn免疫で差がなく、むしろBCG親株の方が防御効果が高い傾向にあったが、脾臓ではrBCG-SOCS1dn免疫マウスの方が菌数が低く、結核菌防御効果が増強されていた。

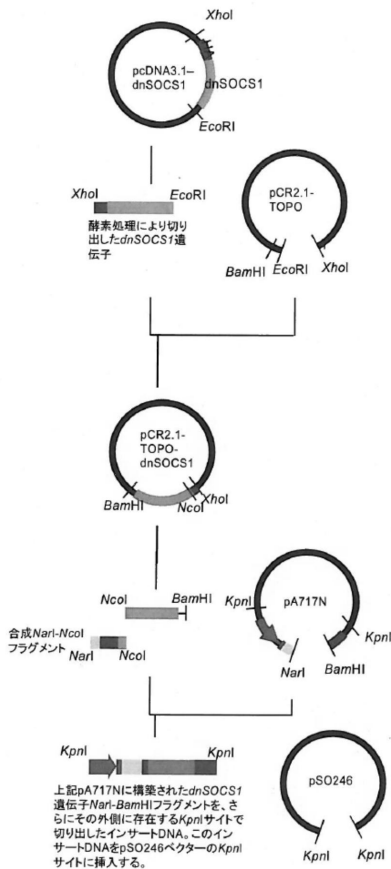
【産業上の利用可能性】

【0027】

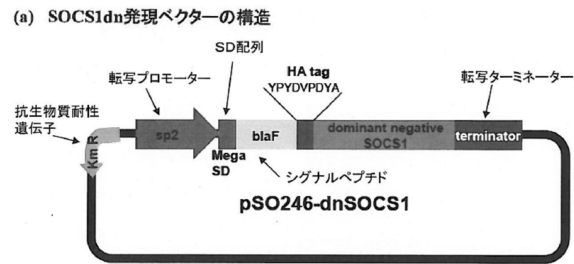
本発明が提供することができるSOCS1dnタンパク質発現ベクターを用いて作製された組換えBCG菌は、菌体外にSOCS1dnタンパク質を分泌することができ、マクロファージや樹状細胞におけるサイトカインおよびケモカイン産生誘導能を増強させ得る。それ故、本発明が提供することができる組換えBCGワクチンを有効成分とするBCGワクチンは、結核ワクチンの有効性が増強され、近年、蔓延が危惧される多剤耐性結核菌に関する有望な結核予防ワクチンであり得る。

10

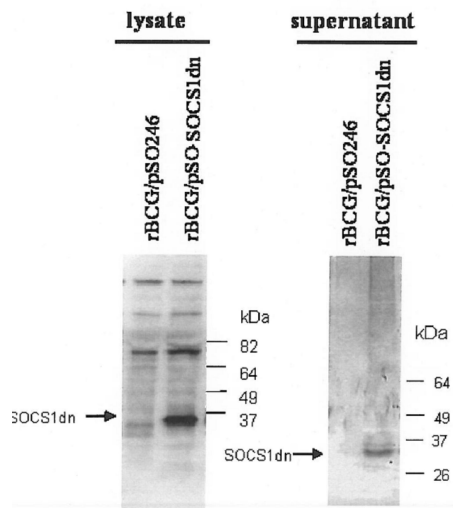
【図1】



【図2】

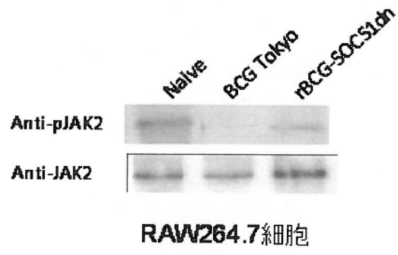


(b) ウェスタンブロット解析



【 図 3 】

ウエスタンブロット法による rBCG-SOCS1dn の JAK2リン酸化抑制解除効果解析 (in vitro assay)

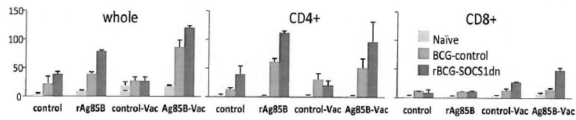


• MOI=10
• 24h after infection

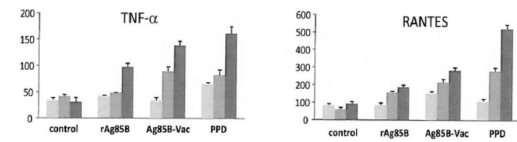
rBCG-SOCS1dn 感染により、RAW264.7細胞での JAK2のリン酸化抑制が解除されている。

【 図 4 】

(a)



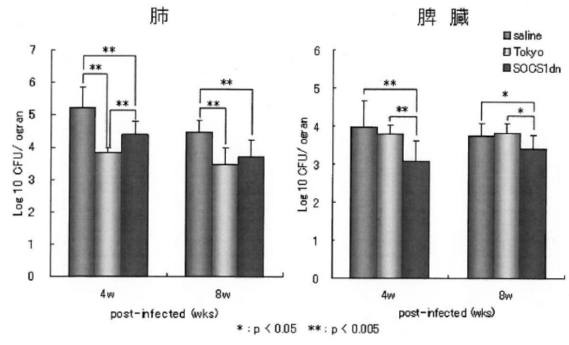
(b)



【 配列表 】

0005994127000001.app

【 図 5 】



フロントページの続き

- (72)発明者 松尾 和浩
東京都清瀬市松山3 - 1 - 5 日本ピーシージー製造株式会社内
- (72)発明者 水野 悟
東京都清瀬市松山3 - 1 - 5 日本ピーシージー製造株式会社内
- (72)発明者 川原 守
東京都清瀬市松山3 - 1 - 5 日本ピーシージー製造株式会社内
- (72)発明者 保富 康宏
茨城県つくば市八幡台1 - 1 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター内
- (72)発明者 渡邊 健太
茨城県つくば市八幡台1 - 1 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター内

審査官 西村 亜希子

- (56)参考文献 特表2001-518781(JP, A)
特表2008-517013(JP, A)
FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2003年, Volume 39, Issue 2, p. 173-180
J. Biol. Chem., 2001年, Vol. 276, No. 44, p. 40746-40754
Clin. Exp. Immunol., 2000年, Volume 119, Issue 1, p. 92-98
Clin. Exp. Immunol., 2004年, Volume 137, Issue 1, p. 24-34
FEMS Microbiol. Lett., 2003年, Volume 224, Issue 1, p. 139-142
AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1997年, Vol. 13, No. 18, p. 1573-1581
Infect. Immun., 2002年, Vol. 70, No. 1, p. 303-314
Infect. Immun., 1990年, Vol. 58, No. 2, p. 550-556
FEMS Microbiol. Lett., 1996年, Volume 135, Issue 2-3, p. 237-243
J. Immunol., 2009年, Vol. 183, No. 2, p. 1253-1262
Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006年, Volume 347, Issue 1, p. 200-207
Nat. Biotechnol., 2004年, Vol. 22, No. 12, p. 1546-1553
Tuberculosis (Edinb), 2002年, Vol.82, No.6, p. 283-291
Accession No. NP_003736.1 suppressor of cytokine signaling 1 [Homo sapiens], GenBank[online], 2012年 7月21日, [検索日2016年3月1日]インターネット<URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/4507233?sat=17&satkey=16412101>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09
A61K 39/04
A61P 31/06
C12N 1/21
JSTPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)
PubMed