

厚生科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

ツベルクリン検査、BCG等に代わる結核等の抗酸菌症に係る新世代の診断技術及び予防技術の開発に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・病原微生物部部長)

平成14(2002)年3月

目 次

総括研究報告書：ツベルクリン検査、BCG等に代わる結核等の抗酸菌症に係る新世代の診断技術及び予防技術の開発に関する研究 牧野 正彦（国立感染症研究所）	1
分担研究報告書：アデノウィルスベクターを用いた新しい結核診断法及び抗結核免疫賦活能の解析 竹森 利忠（国立感染症研究所）	7
分担研究報告書： γ -線照射処理抗酸菌による感染防御免疫の誘導 荒川 宜親（国立感染症研究所）	17
分担研究報告書：結核菌病原因子と宿主応答 小林 和夫（大阪市立大学大学院医学研究科）	19
分担研究報告書：新しい診断法及び予防法の開発のための病原性及び抗原性因子の研究 牧野 正彦（国立感染症研究所）	23
研究成果の刊行に関する一覧表	37

平成13年度 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

ツベルクリン検査、BCG等に代わる結核等の抗酸菌症に係る
新世代の診断技術及び予防技術の開発に関する研究

総括研究報告書

主任研究者

牧野 正彦

（国立感染症研究所・病原微生物部部長）

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

ツベルクリン検査、BCG 等に代わる結核等の抗酸菌症に係る新世代の
診断技術及び予防技術の開発に関する研究

主任研究者 牧野 正彦 国立感染症研究所 病原微生物部長

研究要旨 抗酸菌感染症に対する新しい診断技術ならびに治療法および予防法の開発に関する基礎的研究を行った。ツベルクリン反応に代わる結核菌感染者を診断するための診断技術を確立するため、結核菌特異的抗原をコードする遺伝子を抗原提示細胞である樹状細胞に高率に発現させ、特異的 T 細胞の反応を誘導させることで結核症の補助診断法を確立する系を計画し、樹状細胞に発現し得る Ag85a 抗原の調整に成功した。非結核性抗酸菌感染症の迅速鑑別診断法の開発を目指し dnaA 遺伝子が有用である可能性を示唆した。抗酸菌感染の制御を目的として、抗酸菌および抗酸菌に対する宿主の生体防御反応を検索した。その結果、病原性抗酸菌に共通して観察される遅増殖性をもたらす遺伝子領域が存在することを明らかにした。結核菌由来ミコール酸糖脂質、trehalose dimycolate が肉芽種性炎症を惹起し、その際、炎症誘導性サイトカインや単球走化性ケモカインが誘導されていることを示した。また、抗酸菌の感染を受けると、マクロファージではサイトカインや成長因子などをコードする遺伝子の発現が変化した。治療法および予防法の開発を目的として、二つの研究を構築した。第 1 は、結核菌を大量の γ -線照射して“半生ワクチン”を作成するもので γ -線照射により RNA 合成能などは保持され、生菌の性状を残す不活化菌が作成し得ることを BCG を用いて証明した。第 2 には、リコンビナントワクチンの開発を目指しワクチン候補分子を特定するものであり、抗酸菌の菌膜には細胞性免疫を誘導する抗原分子が複数存在し、その一つにリポタンパクがあつて、IL-12, IFN- γ の産生をもたらすことを明らかにした。

分担研究者	竹森 利忠	国立感染症研究所	部長
	荒川 宜親	国立感染症研究所	部長
	小林 和夫	大阪市立大学大学院	教授

A. 研究目的

抗酸菌感染症は未だ世界的脅威であり、国民をその恐怖から守ることは、国民の精神的健康状態を改善し向上させる上で不可欠である。しかし、抗酸菌および非結核性抗酸菌感染症に対する予防法としては、未だに BCG が使用されているのが現状で十分な信頼は得られていない。また、これらの感染症に対する迅速かつ信頼される診断法も確立されていない。本研究では、こうした状態を打破し一歩前進するため、感染を

成立させる菌由来責任遺伝子を特定するとともに、感染により発現が変化する宿主遺伝子を同定する。さらに、この結果に立脚し、病態を分子レベルで解明すると同時に、特異的かつ有効な新しい診断法および治療法ならびに予防法の開発を目指すものである。そこで、以下の研究を展開することを目的とした。

1. 結核菌感染症に対し、ツベルクリン反応に代わる診断補助検査法の確立。
2. 非結核性抗酸菌感染症に対する迅速

鑑別診断法の開発。

3. 病原性因子の一つ、遅発育性をもたらす抗酸菌遺伝子の同定。
4. 炎症、特に肉芽種性炎症を誘導する抗原の分子機構解析。
5. 抗酸菌感染症に変化する宿主マクロファージの遺伝子群の解析。
6. 抗酸菌感染症に対するワクチンとしての γ -線照射結核菌の“半生ワクチン”としての有効性。
7. リコンビナントワクチンの開発を目指した抗酸菌由来分子の同定と、その候補分子であるリポタンパクの作成と有効性の検討。

B. 研究方法

1. A Simplified System for Rapid Generation of Recombinant Adenoviruses を用い、Ag85 遺伝子組み込みアデノウイルスを作成し、HIVgag タンパクに相当する cDNA 断片と Ag85a を融合させ、VLP(ウイルス様粒子)を精製した(竹森)。
2. 報告されている数種の抗酸菌遺伝子情報をもとに dnaA 遺伝子領域内に存在する 600bp を診断用遺伝子候補とした。DNA を得て PCR により増幅し塩基配列を決定した(牧野)。
3. 大腸菌—抗酸菌シャトルベクターを用い、らい菌 DNA ライブラリーを作成した。大腸菌クローンよりコスミドを抽出し、DNA 配列を決定し、らい菌ゲノム地図上にマッピングした(牧野)。
4. Trehalose dimycolate (TDM)をマウスに免疫し、細胞性免疫の発現を DTH により測定した。病理学的検索を行い、サイトカインのタンパク発現を酵素抗体法で解析した(小林)。
5. 各種抗酸菌を健常人末梢単球に感染させ、感染前後におけるマクロファージより poly A + RNA を調整し、市販のナイロン膜 DNA アレイとハイブリダイズさせた(牧野)。
6. BCG 菌および結核菌に γ -線照射し、小川培地等を用い、コロニー形成能を調べ

た。照射後の RNA 合成および mRNA の安全性を ^3H -uridine の取り込みと RT-PCR 法で検索した(荒川)。

7. 抗酸菌を菌膜・細胞質などに分画し、樹状細胞にパルスした後、自己 T 細胞の活性化能をサイトカイン産生を指標に検索した。サイトカインは、ELISA 法により定量化した。また、リポタンパク (LpK) は、らい菌遺伝子を用い大腸菌発現ベクターを構築した後、His-Bind カラムにより精製した(牧野)。

倫理面への配慮 各所属機関の倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。動物実験に際しては、各施設の動物実験倫理指針に沿って行った。

C. 研究結果

1. アデノウイルスベクターにヒト型コドンに変換した Ag85 遺伝子を挿入し、pShuttle Ag85 GFP を作製した。シャトルベクターを用いて遺伝子発現を確認した後、E1 および E3 を欠くアデノウイルス遺伝子 pAd Easy を pShuttle Ag85 GFP とともに大腸菌に co-transfection することで pAd85 GFP を得た。さらに、293 細胞に transfection してリコンビナントウイルス Ad Ag85 AFP を作製した。また、HIV-Igag を用い Ag85a 発現ウイルス様粒子 (VLP) を作製した(竹森)。
2. 各種抗酸菌ゲノム DNA をテンプレートに用い、dnaA 遺伝子の 600bp 領域を PCR 法により増幅した。抗酸菌種により長さの異なる PCR 産物が得られた。5' 末端側の 140bp と 3' 末端側 207bp の 2ヶ所によく保存された領域が存在し、内部には変異に富む領域が得られた。この変化

に富んだ領域を用いると抗酸菌の系統樹を作製することが可能であった(牧野)。

3. らい菌ゲノムライブラリーとして 800 個の大腸菌クローンを作製した。それぞれのクローンから得られたコスミドは平均長 35kb のらい菌 DNA 断片として有していた。これらのクローンをらい菌ゲノム地図上へマッピングした。さらに、これらコスミドの中の一つ B90 は迅速発育性抗酸菌(非病原性)*M. smegmatis* の増殖を著しく阻害した(牧野)。
4. 結核菌由来 TDM は遅延型足蹠腫脹反応を惹起し、血管内投与すると肉芽種炎症を誘導した。こうした病変の形成には、単球走化性ケモカインや炎症惹起性サイトカイン、細胞性免疫誘導性サイトカインの発現が関与していた。また、TDM の炭素鎖長が病原性をもたらす因子の一つと考えられた(小林)。
5. 抗酸菌感染早期(3時間)で、宿主マクロファージの種々のサイトカインをコードする遺伝子、インスリン様成長因子受容体など細胞遊走や増殖に関わる分子群をコードする遺伝子の発現増強が観察された(牧野)。
6. 40 万ラドの γ -線照射により BCG 菌および結核菌の増殖が阻害された。しかし、 γ -線照射によりエステラーゼ活性、RNA 合成能、PPD 投与に対する遅延型過敏症の誘導能は損なわれず、明らかな体重減少などの毒性はモルモットを用いても観察されなかった(荒川)。
7. 抗酸菌を菌膜・細胞質・菌壁に分画し、その抗原性を樹状細胞を抗原提示細胞とし、自己の T 細胞の IFN- γ 産生能を指標として検索すると、抗酸菌膜に最も強い抗原性が確認された。菌膜は、樹状細胞を刺激し IL-12 を産生し、CD8 陽性 T 細胞を刺激しパーフォリン産生を誘導するなど Type 1 の CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞の活性化をもたらした(牧野)。
8. らい菌特異的リボタンパク(LpK)を大腸菌を用いて発現・精製した。¹⁴C-グリセ

ロールを用い脂質附加を確認し、シグナルペプチダーゼの阻害剤 Globomycin 存在下で合成が阻害された。LpK は、正常健康者単球を刺激し IL-12 の産生を誘導した(牧野)。

D. 考察

ツベルクリン反応に代わる新世代の結核補助診断法の開発を目指し、抗原提示細胞—T 細胞による細胞性免疫応答システムの開発を試みた。結核菌特異抗原を樹状細胞にアデノウイルスを用いて効率よく取り込ませ、T 細胞の増殖応答を指標とする全く新しい取り組みである。In vitro で結果を得ることから定量性に富みかつ極めて鋭敏であることが予想され、今後の研究成果に大きな期待がかかる。結核菌の潜伏性保菌者と結核発症者の識別、BCG 菌と結核菌の識別など特異性を充分検討する必要があるが、実用化されれば大きな厚生行政への貢献となる。

非結核性抗酸菌の 25 種を識別するキットは全世界を通じて現存せず、dnaA 領域を用いたキットが開発されれば全世界で初めて 25 種の抗酸菌を同定するキットが誕生することになる。現在、臨床上問題となる抗酸菌は、結核菌・らい菌を除くと数種類の菌に留まるが、今後高齢化社会を迎え、いわゆる“自然免疫不全者”が増加するため。新たな病原性抗酸菌が出現・認識されたり、人獣共通抗酸菌が出現するなどの恐れがある。そうした場合に慌てることなく対応し得るキットを開発しておくことは、時代を先取る重要な厚生行政である。実用化に向けて今後の研究に大きな期待がかかる。

病原性抗酸菌の最も大きな特徴の一つは遅増殖性である。これまで、遅増殖性をもたらす遺伝子について全世界的に興味を持たれ、種々の検討が加えられてきたが全て徒労に終わっている。抗酸菌の中で、生命維持に必要な最小限の遺伝子セットのみを有していると考えられるらい菌をモデル病原性抗酸菌として用い、構成する全ての遺伝子をコスミドとして分離精製したが、そ

の中に遅発育性を規定する可能性のあるものが単離された。この成果は、抗酸菌研究を著しく容易にする可能性を秘め、かつ生体防御応答を利用した新たな治療法の開発に繋がる可能性が大きい。

抗酸菌に対する生体防御反応と抗酸菌による炎症反応は密接に関与しているが、両者の違いを認識することは予防法・治療法の開発に重要である。その違いを分子レベルで明らかにするため、抗酸菌壁に存在する TDM に着目した。生体防御を有効に惹起する免疫学的機構の解析が急がれる。

抗酸菌感染症に対する予防法を確立するため、有効なワクチン候補の探索に三つの試みがなされた。第1は、大量の γ -線照射を結核菌に施すことにより半生ワクチンを作製する試みである。mRNA の合成はなされるものの病原性は剥奪され、PPD に代表される遅延型免疫反応が誘導された。今後さらなる展開がなされるべきと考える。第2および第3は、樹状細胞を用いて CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞のタイプ1反応を誘導することを最大の目的として、ワクチン候補分子を探索したものである。自然免疫および獲得免疫活性化経路の両者を賦活することで、ポリクローナルな細胞性免疫応答を誘導し得る分子を特定することが、抗酸菌ワクチンとして最も重要であり、かつ信頼されるワクチンの作製に直接的に結びつくと考えられる。抗酸菌の細胞膜には、こうした目的によく合致した分子が複数存在することが証明され、かつその中でもリポタンパクが有効である可能性が示唆された。抗酸菌感染症に対する予防法を開発する上で大きな一歩が記された。

E. 結論

ツベルクリン反応に代わる新世代の結核症補助検査法の開発に糸口が見つかり、抗酸菌の最大かつ共通した特徴である遅発育性を誘導する責任遺伝子領域の候補が明らかにされた。また、予防法開発に向けた新しい半生ワクチンおよびワクチン候補分子の特定に一定の成果が上げられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomaguchi, H., N. Jahan, B. C. Mandal, Y. Yogi, K. Kawatsu, Y. Yoshizawa, H. Okamura, and M. Makino. IL-12 and IL-18 synergistically induce the bactericidal activity of murine peritoneal cells against *M. leprae*. *Jpn. J. Leprosy*, 70:113-119, 2001.
- 2) Umemura, M., K. Hirose, W. Wajjwaiku, H. Nishimura, T. Matsuguchi, Y. Gotoh, M. Takahashi, M. Makino, and Y. Yoshikai. Impaired IL-15 production associated with susceptibility of murine AIDS to mycobacterial infection. *J. Leukoc. Biol.* 69(1):138-148, 2001.
- 3) Makino, M., A. Utsunomiya, Y. Maeda, S. Shimokubo, S. Izumo, and M. Baba. Association of CD40 ligand expression on HTLV-I-infected T cells and maturation of dendritic cells. *Scand. J. Immunol.*, in press, 2002.
- 4) Kawamura, M., T. Naito, M. Ueno, T. Akagi, K. Hiraishi, I. Takai, M. Makino, T. Serizawa, K. Sugimura, M. Akashi, and M. Baba. Induction of mucosal immunity following intravaginal administration of inactivated HIV-1-capturing nanospheres in mice. *J. Med. Microbiology*, in press, 2002.
- 5) Takasuka, N., M. Enami, S. Itamura, and T. Takemori. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing exogenous nucleotides in the NS segment induces mucosal immune response against the exogenous gene product in mice. *Vaccine*, in press, 2002.
- 6) Shimoda, M., T. Nakamura, Y. Takahashi, H. Asanuma, S. Tamura, T.

- Kurata, T. Mizuochi, N. Azuma, C. Kanno, and T. Takemori. Isotype-specific selection of high-affinity memory B cells in nasal-associated lymphoid tissue (NALT). *J. Exp. Med.*, 1597-1607, 2001.
- 7) Takahashi, Y., H. Ohta, and T. Takemori. Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity*, 14:181-192, 2001.
- 8) Yoshizawa I., Y. Soda, T. Mizuochi, S. Yasuda, T. A. Rizvi, T. Mizuochi, T. Takemori, and Y. Tsunetsugu-Yokota. Enhancement of mucosal Immune response against HIV-1 Gag by DNA immunization. *Vaccine*, 19:2995-3003, 2001.
- 9) Kodama, M., R. Hayashi, H. Nishizumi, F. Nagawa, T. Takemori, and H. Sakano. The PU.1 and NF-EM5 binding motifs in the Igk3' enhancer are responsible for directing somatic hypermutations to the intrinsic hotspots in the transgenic Vk gene. *Int. Immunol.*, 13:1415-1422, 2001.
- 10) Kobayashi, K., K. Kaneda, and T. Kasama. The immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc. Res. Tech.*, 53:241-245, 2001.
- 11) Yamagami, H., T. Matsumoto, N. Fujiwara, T. Arakawa, K. Kaneda, I. Yano, and K. Kobayashi. Trehalose 6,6' -dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect. Immun.*, 69:810-815, 2001.
- 12) Ueda, S., N. Fujiwara, T. Naka, I. Sakaguchi, Y. Ozeki, I. Yano, T. Kasama, and K. Kobayashi. Structure-activity relationship of mycoloyl glycolipids derived from *Rhodococcus* sp. 4306. *Microb. Pathog.*, 30:91-99, 2001.
- 13) Maeda, S., M. Matsuoka, N. Nakata, M. Kai, Y. Maeda, K. Hashimoto, H. Kimura, K. Kobayashi, and Y. Kashiwabara. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45:3635-3639, 2001.
- 14) 藤原永年、山上博一、上田定男、矢野郁也、小林和夫. 結核菌糖脂質と宿主応答機構. *炎症・再生* 21:133-138, 2001.
2. 学会発表
- 1) 野間口博子, 與儀ヤス子, 川津邦雄, 牧野正彦, 吉澤雄介, 岡村春樹. マウス腹腔内マクロファージのらい菌殺菌機構の解析. 第74回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2001年5月 米子
- 2) 鈴木幸一, 石井 健, 木村博昭, 中田 登, 前田百美, 武下文彦, 牧野正彦. 宿主細胞内日本鎖核酸とらい菌感染とによる抗原提示能の活性化. 第74回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2001年5月 米子
- 3) 前田百美, ブイ・バン・ホアン, 橋本 研, 中田 登, 前田伸司, 柏原嘉子, 牧野正彦. ハンセン病患者血清に反応する未知なる抗原の分子免疫学的解析. 第74回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2001年5月 米子
- 4) 牧野正彦, 橋本 研, 前田百美, 松岡正典. らい菌の正常健常者末梢単球由来樹状細胞の抗原提示能に及ぼす影響. 第31回日本免疫学会総会 2001年12月 大阪
- 5) 梅村正幸, 西村仁志, 松口徹也, 牧野正彦, 須田貴司, 吉開泰信. IL-15はマウス後天性免疫不全症候群の病態の進展を抑制する. 第31回日本免疫学会総会 2001年12月 大阪
- 6) Maeda Y., B. V. Hoang, S. Shrisunggam, S. Maeda, P. J. Brennan, Y.

- Kashiwabara, and M. Makino. Molecular and immunological analysis of a protein against leprosy. International Symposium on Mycobacterial Diseases: Pathogenesis, Protection and Control, Jan., 2001, Bose Institute, Calcutta, India.
- 7) 山本紀一、神山恒夫、小浦美奈子、高橋宜聖、竹森利忠. UV 感受性を示す抗マラリヤ感染防御機構の解析. 第 31 回日本免疫学会総会、大阪、2001 年
- 8) 井上薫、藤巻秀和、高橋宜聖、竹森利忠、野原恵子. ダイオキシンの脾臓における胚中心形成に及ぼす影響. 第 31 回日本免疫学会総会、大阪、2001 年
- 9) 外山博近、岡田誠治、武田紳江、市井啓仁、有馬雅史、高橋宜聖、竹森利忠、黒田嘉和、幡野雅彦、徳久剛史. メモリー B 細胞の分化における胚中心の役割. 第 31 回日本免疫学会総会、大阪、2001 年
- 10) 高橋宜聖、水落次男、幡野雅彦、徳久剛史、竹森利忠. ホメオボックス遺伝子 Hox11 による胚中心クローン選択機構の修飾. 第 31 回日本免疫学会総会、大阪、2001 年
- 11) 北田清悟、豊島直美、前倉亮治、藤原永年、小林和夫、矢野郁也、小倉 剛. 2001. 肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 症患者における血清抗 glycopeptidolipid (GPL) 抗体の特性. 結核、76 : 320、2001. 第 76 回日本結核病学会総会 (宜野湾、4 月).
- 12) 樋口一恵、小林和夫、原田登之、関谷幸江、森下加奈、後藤正道. 2001. UV 処理結核死菌と BCG 生菌における免疫力の比較. 結核、76 : 340、2001. 第 76 回日本結核病学会総会 (宜野湾、4 月)
- 13) 持田恵子・荒川宜親. ガンマー線照射結核菌の増殖能と mRNA 発現に関する研究. 第 76 回日本結核病学会総会、平成 13 年 4 月 20~21 日、沖縄県宜野湾市
- H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

平成13年度 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

アデノウィルスベクターを用いた新しい結核診断法
及び抗結核免疫賦活能の解析

分担研究報告書

分担研究者

竹森 利忠（国立感染症研究所・免疫部長）

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

アデノウィルスベクターを用いた新しい結核診断法及び抗結核免疫賦活能の解析

分担研究者	竹森 利忠	（国立感染症研究所・免疫部部長）
研究協力者	大竹かおり	（感染研免疫部・研究員）
	高須賀直美	（感染研免疫部・研究員）
	新保 武志	（感染研免疫部・実習生）
	森川 裕子	（北里大生命科学研・教授）
	榎並 正芳	（金沢大学医学部生化学第一・助教授）

研究要旨

ツベルクリン反応に代わる結核菌感染診断検査を確立するため、結核菌特異的抗原遺伝子を抗原提示細胞に発現させ、それに対するT細胞の反応の有無を測定する系の確立を計画した。樹状細胞をターゲットとする結核菌特異的発現ベクター構築の第一ステップとして、解析のしやすいBCG/結核菌共通抗原Ag85aについてコドンに高等真核動物細胞での発現に適した使用に変換した。このAg85aをアデノウィルスベクターに組み込み、ウィルス粒子を得て、ウィルス感染細胞がAg85aを発現することを確認した。更に、コドン変換Ag85aをHIVgag末端に融合させシャトルベクターGAPプロモーター下流に挿入し、酵母細胞を形質転換し最終的にAg85aを発現するVLP（ウィルス様粒子）を得た。アデノウィルス、VLPはそれぞれ強力な抗原提示細胞である樹状細胞に感染することを確認した。一方、新しい粘膜指向性結核ワクチン開発の一環としてCAT組み込みインフルエンザウィルスを作製し、これをネズミに経鼻的に感染し、その生体反応を解析した。その結果、このベクターが呼吸器粘膜系免疫反応を活性させるデリバリーとして有用であることを明らかにした。

A. 研究目的

迅速で敏感なBCGワクチン接種及び結核菌感染の判定を可能にする検査システムを確立する。このため、高等真核動物細胞のコドン読み枠に変換した、結核菌/BCG特異的遺伝子Ag85a及び結核菌特異的遺伝子ESAT6をアデノウィルスベクターに組み込む。第一ステップとして操作のしやすいモデル実験を組み、組み換えウィルスを試験管内で末梢血に感染させることにより、BCG及び結核菌に感作された小動物、あるいはBCG接種者由来Tリンパ球が特異的に反応し活性される至適条件を明らかにする。さらにこの条件を踏まえ、臨床検体を対象に、結核菌特異的遺伝子ESAT6組み込みアデノウィルスを用いた検査システムの特異性、感度を検討し、臨床診断薬としての有

用性を検討する。同時に、この組み換えウィルスを呼吸器粘膜免疫をターゲットとした抗結核ワクチンとして利用し、その有効性を検討する。

B. 研究方法

- ツベルクリンに換わる新たな免疫学的診断法の開発
 - Ag85遺伝子組み込みアデノウィルス（pShuttle Ag85 GFP）作製の手段にはTong-Chenらの提供するA Simplified System for Rapid Generation of Recombinant Adenovirusesを用いた（図1）。アデノウィルス作製過程では、E1E3遺伝子をもつ野生株の出現が問題になるが、E1E3非発現HeLa細胞を用いて野生株の混入がないことを確認した。

(2) HIV gag 蛋白に相当するcDNA断片と Ag85aを融合し、シャトルベクターの GAPプロモーター下流に挿入した。このプラスミドを酵母細胞に導入し、酵母スフェロプラストの培養上清からVLPを精製しAg85aの発現をWestern blotにて確認した。

2. 新たな結核ワクチン作製のためのデリバリーの検討

(1) インフルエンザウイルス株

N110株：親株WSN (H1N1) より、NS1蛋白のC末側52%を欠失させた弱毒株であり、本実験ではウイルスベクターのコントロールとして用いた。NS2Acat株：NS1のN末151残基に、自己切断活性を持つFMDVの2A protease配列を挟んで、chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 全配列が発現するように挿入した株であり、試験株として用いた。

(2) マウスの免疫

麻酔下にて、BALB/cマウス (♀, 6~8w) の両鼻腔より、N110株 (3×10^3 pfu (0.1 LD₅₀) per head) あるいはNS2Acat株 (2×10^5 pfu/head) を投与した。

(3) CAT mRNAおよびHA mRNAの検出

マウスの組織より、total RNAを抽出し、oligo dT₁₂₋₁₈ primerを用いて逆転写反応を行った。CAT及びHAに特異的なprimerを用いて、各遺伝子をPCRにて検出した。

(4) DTHの測定

マウスの右耳介にCAT蛋白5 µgを、左耳介にはPBSのみを対照として皮内注射し、24時間及び48時間後に耳介の厚さをマイクロメーターで測定した。Specific ear swelling=[(24-hour measurement of right ear - 0-hour measurement of right ear)-(24-hour measurement of left ear - 0-hour measurement of left ear)] x 10⁻³mm.

(5) IFN-γの産生

マウス胸腔内より肺及び気管支のリンパ節を採取し、MACSを用いてCD90⁺細胞を集めた。抗原提示細胞として放射線照射した脾細胞を加え、CAT蛋白あるいはWSNウイルス蛋白刺激により、CD90⁺細胞から産生されるIFN-γを、ELISAによ

り測定した。

C. 研究結果

1. ツベルクリンに換わる新たな免疫学的診断法の開発

(1) Ag85a組み込みアデノウイルスベクター強力な抗原提示細胞である樹状細胞に効率良く遺伝子を導入するアデノウイルスベクターに、コドンヒット型に改変したAg85遺伝子を挿入しpShuttle Ag85 GFPを作製した。導入遺伝子の発現指標としてIRESシークエンスの下流にEGFP遺伝子を挿入し、また、プロモーターにはユビキチンプロモーターを採用した。pShuttle Ag85 GFPをCos細胞に導入し、抗Ag85抗体を用いてWestern BlotによりAg85蛋白の発現確認を確認し(図2B)、また、EGFP発現はFACSにより確認し(図2A)、作製プラスミドが機能することを確認した。シャトルベクターでの発現を確認後、pShuttle Ag85 GFPとE1E3を除くアデノウイルス遺伝子をもつpAdEasyをBJ5181大腸菌にco-transformationすることで相同組換えによりpAdAg85 GFPを得た(pAdAg85 GFP)。次に、pAdAg85 GFPをPac I酵素で直線化し、E1E3遺伝子を持つ293細胞にリポフェクタミンによりtransfectionし、リコンビナントウイルス AdAg85GFPを得た。AdAg85GFPの発現確認は、シャトルベクターでの発現と同様に、Cos細胞をもちいて確認した(図3)。

(2) Ag85a発現ウイルス様粒子(VLP)の作製 Gag-Ag85a蛋白発現酵母スフェロプラスト細胞上清から精製したVLPの脂質二重膜を除去し、gag-Ag85aがVLPで発現されていることをそれぞれ抗体を用いたWestern blotにより確認した。図4に示すように全長のAg85a遺伝子をgagに融合した場合発現が弱く、そのため、これまで抗原決定基の確認がなされている部位のcDNA切片をそれぞれgagと融合させVLPを作製した。Ag85aのアミノ酸81から114を発現するcDNA断片とp1-p6除去gag遺伝子との融合が最も発現効率

の良いたことが明らかとなった。

2. 新たな結核ワクチン作製のためのデリバリーの検討

NS2AcatおよびN110株をBALB/cマウスに経鼻感染させ肺内におけるウイルスの増殖を調べたところ、N110株、NS2Acat株ともに感染後4日目をピークとする増殖がみられた。投与量の違いにもかかわらず、N110株はピーク時において気管支肺胞洗浄液中に 10^4 pfu以上が検出されたのに対し、NS2Acat株では、その約1/10しか検出されず、さらに感染後7日目には、検出限界以下であったことから、NS2Acat株はN110株と比べて、より弱毒であることが確認された。

NS2Acat株免疫マウス肺におけるmRNAの発現をRT-PCRで調べたところ、少なくとも感染1日-3日後にかけてCAT mRNAの発現が認められ、これはウイルスのHA mRNAの発現と同様であった。脾臓や頸部リンパ節では、発現が認められなかったことから、ウイルス感染は限局的であることが示唆された。

マウスにNS2Acat株あるいはN110株を免疫し、3週間後のCAT蛋白に対するDTH反応を調べた。図5に示したように、NS2Acat株感染マウスにおいてのみ、DTH反応の誘導がみられた。

*In vitro*においてCAT蛋白あるいはWSNウイルス蛋白の存在下に培養した時の ^3H -thymidineの取り込み、及びIL-4、IFN- γ の産生を指標として、免疫20日後のマウス肺及び気管支のリンパ節T細胞反応を測定した。WSNウイルス蛋白刺激に対し、NS2Acat株及びN110株感染マウス由来T細胞は、いずれの指標においても、同様の強い活性化反応を示した。一方、CAT蛋白刺激に対しては、NS2Acat株感染マウス由来T細胞のみが、弱い活性化反応を示したことより、NS2Acat株免疫による局所T細胞の感作が示唆された。

表1. 局所リンパ節T細胞のCAT及びWSNウイルス蛋白刺激によるIFN- γ 産生

Stimulators	NS2Acat	N110
None	8.3 \pm 0.7	0
CAT protein (2 μ g/ml)	28.1 \pm 0.2	3.4 \pm 0.4
WSN protein (2 μ g/ml)	229.4 \pm 1.7	212.8 \pm 6.9

D. 考察

本研究において、新しい結核感染診断法のために必要となる結核菌特異的抗原発現の抗原提示細胞の作製を可能とするベクターを完成した。第一ステップとして解析のしやすいBCG菌・結核菌共通遺伝子を組み込んだアデノウイルスを作製し、このウイルス感染細胞がAg85aを発現することがFACS、Western blotによる解析により確認された。結核菌感作T細胞への抗原提示には樹状細胞の成熟が必要であり、アデノウイルスベクター感染が樹状細胞の成熟を促すか否かについては今後の検討課題である。一方同様の目的で作製されたHIV gag-Ag85a発現VLPは、HIV gag VLPがTLRを介した刺激で樹状細胞を成熟させることが予備実験で明らかなることから、樹状細胞の活性と抗原提示機能の亢進については問題ないものと思われる。但しAg85aの発現量を増強する目的でGag蛋白末梢にAg85a断片をつないだため、広汎なT細胞活性を限定する可能性もあり検討が必要である。いずれのデリバリーが樹状細胞を強力なAg85a提示細胞として変換するか、現在検討中である。

E. 結論

新規結核感染診断法の開発に必要なAg85a組み込みアデノウイルスベクターとgag-85VLPを作製した。また外来性抗原組み込みインフルエンザウイルスベクターが呼吸器附属免疫を活性化することを明らかにした。

F. 研究危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Takasuka N., Enami M., Itamura S. and Takemori T. Intranasal inoculation of a recombinant influenza virus containing exogenous nucleotides in the NS segment induces mucosal immune response against the exogenous gene product in mice. Vaccine, in press, 2002

(2) Shimoda, M., Nakamura, T., Takahashi, Y., Asanuma, H., Tamura, S., Kurata, T., Mizuochi, T., Azuma, N., Kanno, C., and Takemori, T. Isotype-specific selection of high-affinity memory B cells in nasal-associated lymphoid tissue (NALT). J. Exp. Med., 1597-1607, 2001

(3) Takahashi, Y., Ohta, H., Takemori, T. Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. Immunity, 14:181-192, 2001

(4) Yoshizawa I., Soda, Y., Mizuochi, T., Yasuda, S., Rizvi, T. A., Mizuochi, T., Takemori, T. and Tsunetsugu-Yokota Y. Enhancement of mucosal Immune response against HIV-1 Gag by DNA immunization. Vaccine, 19:2995-3003, 2001.

(5) Kodama, M., Hayashi, R., Nishizumi, H., Nagawa, F., Takemori, T. and Sakano H. The PU.1 and NF-EM5 binding motifs in the Igk3' enhancer are responsible for directing somatic hypermutations to the intrinsic hotspots in the transgenic Vk gene. Int. Immunol 13:1415-1422, 2001

2. 学会発表

[第31回日本免疫学会総会、大阪、2001年]

(1) 山本紀一、神山恒夫、小浦美奈子、高橋宜聖、竹森利忠「UV感受性を示す抗マラリヤ感染防御機構の解析」

(2) 井上薫、藤巻秀和、高橋宜聖、竹森利忠、野原恵子「ダイオキシンの脾臓における胚中心形成に及ぼす影響」

(3) 外山博近、岡田誠治、武田紳江、市井啓仁、有馬雅史、高橋宜聖、竹森利忠、黒田嘉和、幡野雅彦、徳久剛史「メモリーB細胞の分化における胚中心の役割」

(4) 高橋宜聖、水落次男、幡野雅彦、徳久剛史、竹森利忠「ホメオボックス遺伝子Hox11

による胚中心クローン選択機構の修飾」

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

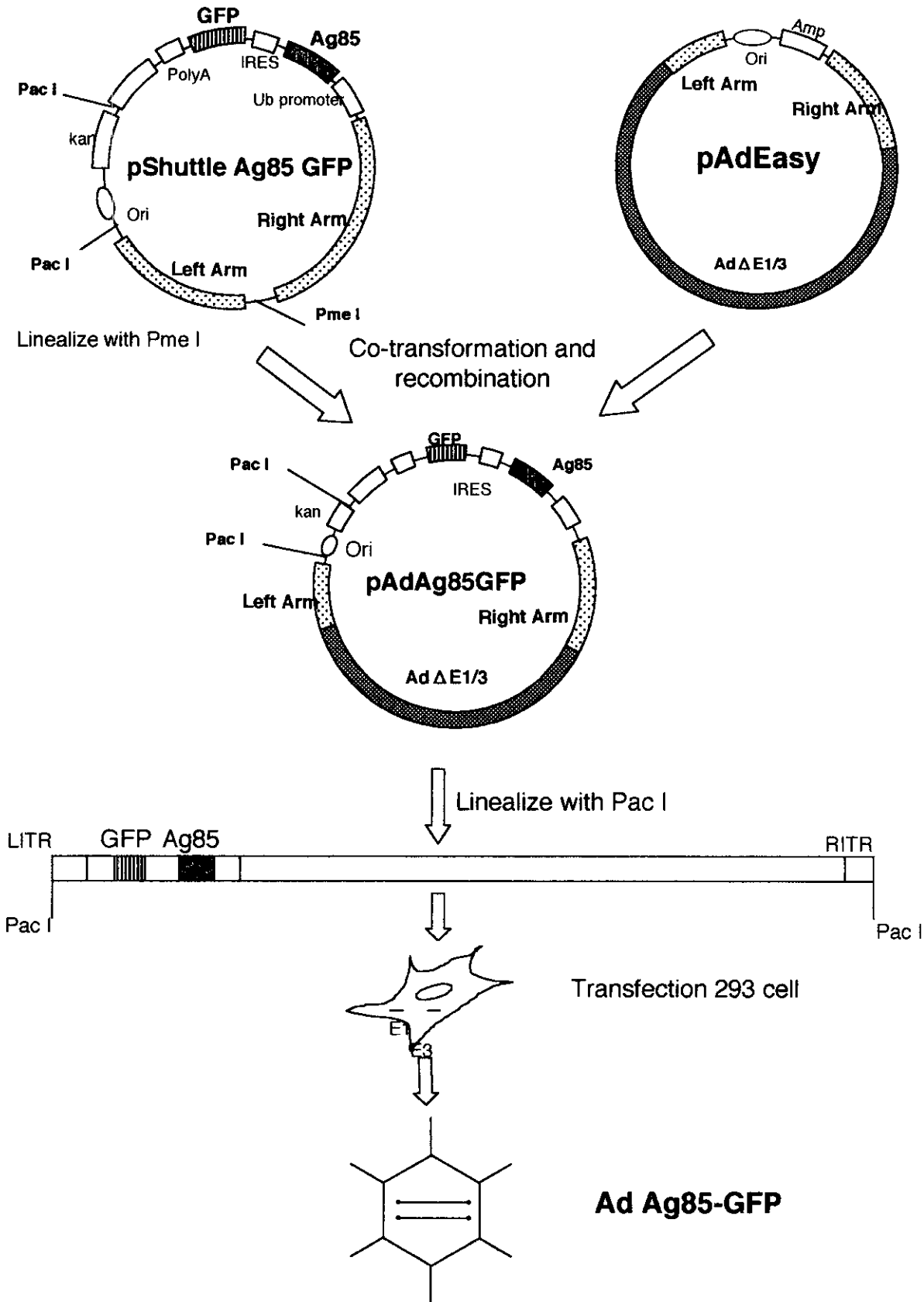


图 1 : A Simplified System for Rapid Generation of Recombinant Adenoviruses

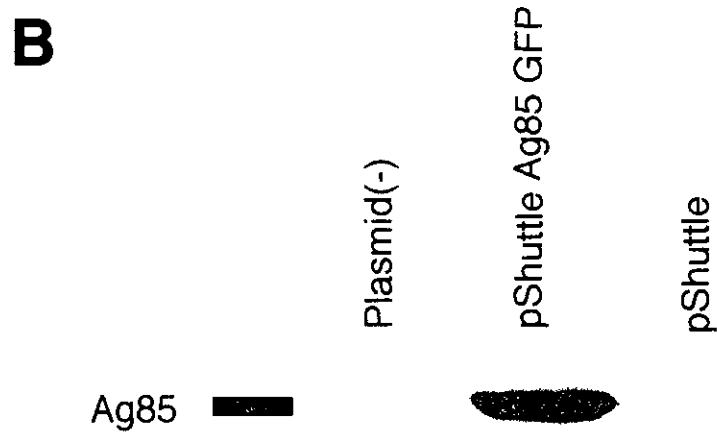
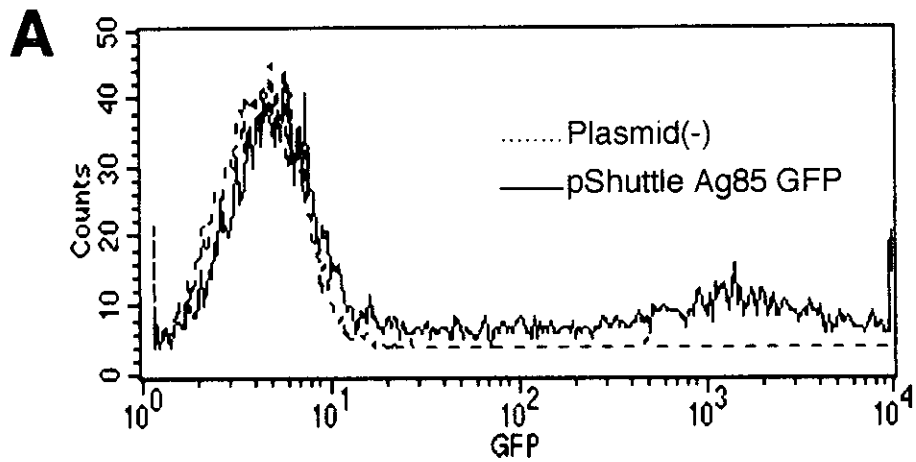


図 2 : COS細胞を用いたShuttle Vectorの発現確認

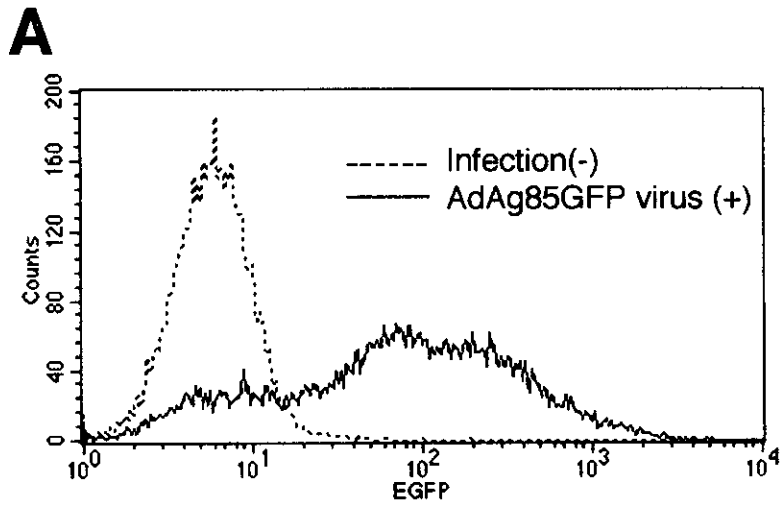


図 3 : COS細胞を用いたAdAg85 GFPの発現確認

VLP yields of HIV-1 Gag-Ag85A fusions

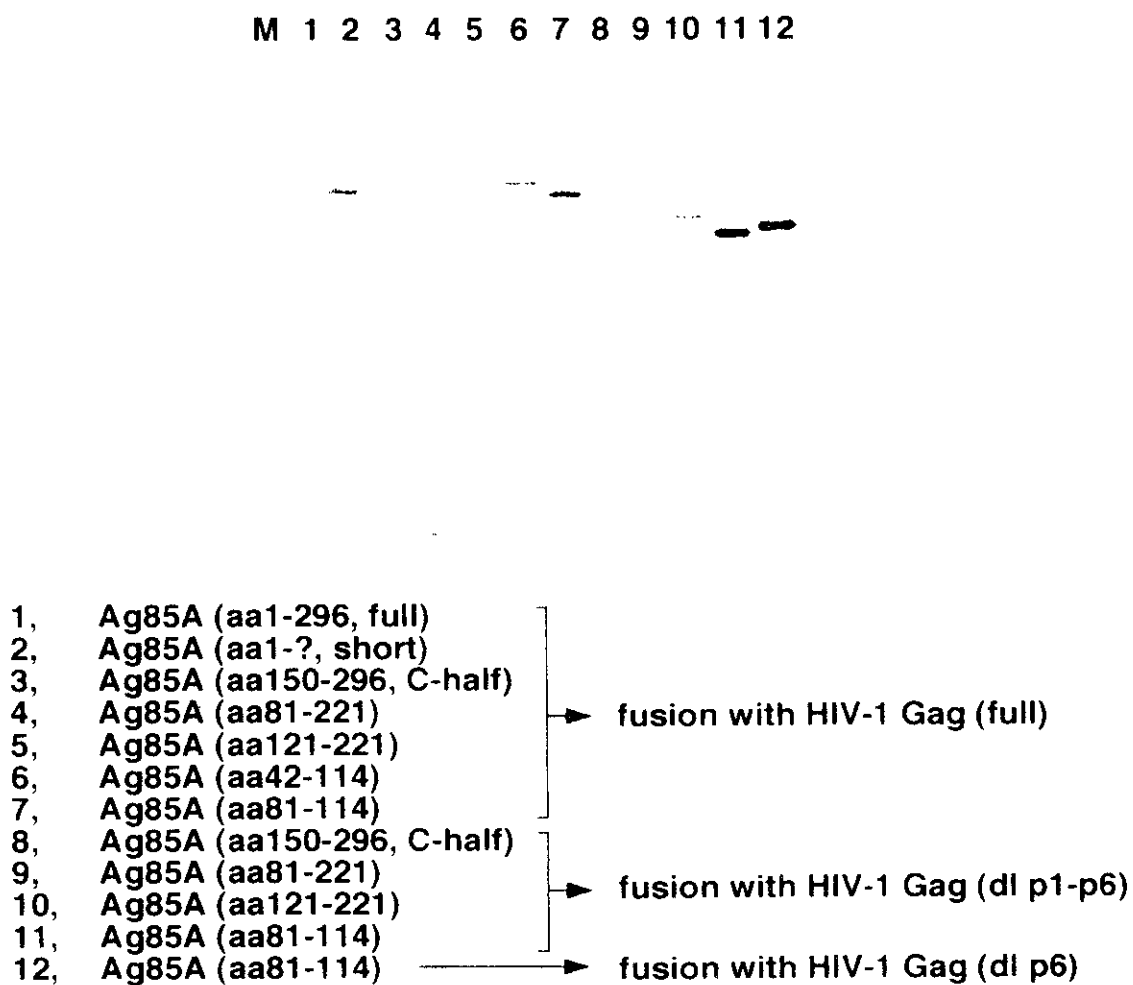


図 4 : Gag-Ag85a VLP における Ag85a の発現

(Open column) 24 h post-challenge
(Closed column) 48 h post-challenge
*P<0.005 compared with negative controls

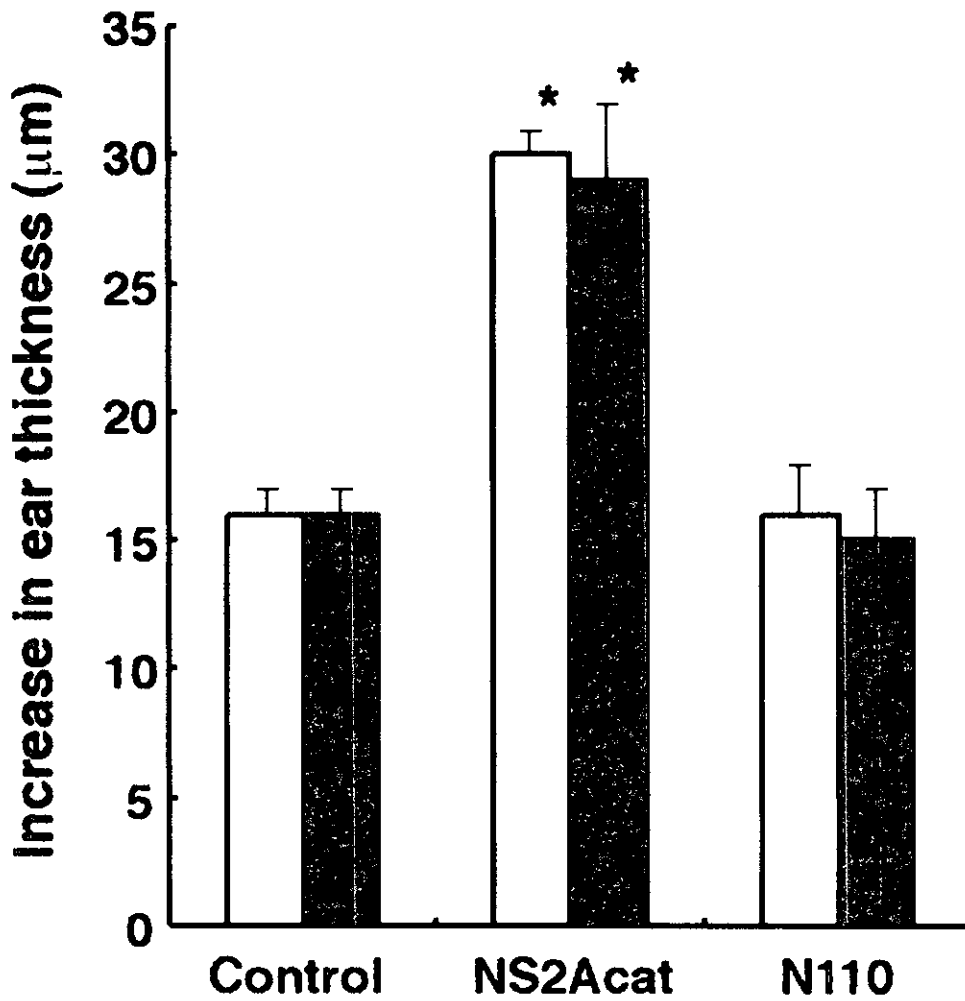


図5 : NS2Acat による DTH 反応の誘導

平成13年度 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

γ -線照射処理抗酸菌による感染防御免疫の誘導

分担研究報告書

分担研究者

荒川 宜親（国立感染症研究所・細菌・血液製剤部部長）