

## 感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発

所 属 国立感染症研究所 生物活性物質部  
研究者 鈴木 和男

### 分担研究者

- (1) 国立感染症研究所免疫部 赤川清子、谷山忠義
- (3) 国立感染症研究所細菌部 倉 文明
- (4) 国立感染症研究所生物活性物質部 大川原明子
- (5) 日本製薬(株) 土田和徳
- (6) 日本化薬(株) 安部史紀
- (7) 第一製薬(株) 難波憲司
- (8) 横浜市立大学木原生物学研究所 荒谷康昭
- (9) 北里大学薬学部 砂塚敏明
- (10) 帝京大学医学部 越尾 修

### 要 旨

結核感染防御や腫瘍増殖抑制および病因性 MPO-ANCA 産生抑制に関与する抗原提示細胞の調節機構を解析し、疾患モデルマウスを用いて病因性 MPO-ANCA 産生の自己免疫疾患の治療および重篤化を抑制する物質の開発を目指し、新規の結核感染防御ワクチン、腫瘍増殖抑制剤、ならびに抗原提示細胞の機能調節物質およびこれら疾患の抑制治療法の検討が進んだ。

### 1. 研究目的

微生物感染における重要な防御機構として宿主の免疫応答は、微生物そのものに対する応答に加え、宿主に対する異常免疫反応や免疫不全が二次的に誘導されることがある。感染症の中でも結核は、現在でも日本における単一原因菌の死亡者数第一位の感染症であり、その防御機構の解析と結核患者における免疫機能の増強法が強く望まれている。

そこで、本研究では、結核感染防御や腫瘍増殖抑制および病因性 MPO-ANCA 産生抑制に関与する抗原提示細胞の調節機構を解析し、疾患モデルマウスを用いて病因性 MPO-ANCA 産生の自己免疫疾患の治療および重篤化を抑制する物質の開発を目指す。

#### 1) MPO-ANCA の解析の標準化と MPO-ANCA 関連疾患の治療薬

MPO とその自己抗体 MPO-ANCA が、血管炎症症候群の病態に関与し、活性化好中球からの活性酸素産生や MPO の放出が血管壁の壊死・断裂に関わる可能性から、本研究では、モデルマウスを用いて、病因解析と病因性 MPO-ANCA の産生抑制物質を探索する。これらの血管炎の死因に感染症との関連から MPO の感染防御能の解析と組織傷害との関連を MPO の欠損マウスを用いて解析する。また、MPO が動脈硬化などを助長している可能性が示唆されているが、個体レベルでの証明は全くなされていないことから MPO ノックアウトマウスを使い、*Candida albicans* などの真菌感染に加え、クリプトコッカスや *Legionella pneumophila* に対する易感染性を比較する。

#### 2) 抗原提示細胞機能解析および調節因子

DC やマクロファージの分化や機能を制御する薬剤を開発して、免疫の活性化や抑制を人為的に制御できるようにする。

#### 3) 新規リコンビナント BCG の創製と抗結核生体防御機構の解析

ストレプトマイシン、リファンピシンなどの抗生物質の開発にもかかわらず、依然として結核は、日本における最も死亡者数の多い感染症である。最近では、抗結核剤の開発は手詰まりの状況や HIV の感染者における結核の発病など多くの問題点を抱えており、使用されている BCG に外来遺伝子を導入したリコンビナント BCG を作製してより強力な抗結核用薬の創製とそれによる生体の抗結核応答の詳細な解析を目的としている。

## 2. 研究方法

### 1) MPO-ANCA の解析とモデルマウスによる臨床応用に関する研究

MPO-ANCA 評価系の標準品を作製した。

マウス MPO-ANCA 測定法の確立と標準品の作製したが、問題点が一部残った。

MPO 欠損マウスにより、組織傷害に MPO が関与を検討した。

### 2) 抗原提示細胞の分化および疾患の発症における役割に関する研究

デオキシスパガリン及びマクロライド誘導体は、樹状細胞の分化を検討した。

樹状細胞に分化誘導可能な、ヒトの CD34 陽性細胞株を樹立した。

エリスロマイシンを出発原料として、抗菌活性と消化管運動促進作用（モチリン様作用）に必須と考えられるジメチルアミノ基やアグリコン部を有機化学的に変換したいくつかの誘導体を作製した。

### 3) 新規リコンビナント BCG の創製と抗結核生体防御機構の解析

BCG に安定的に外来遺伝子を発現する BCG—ベクター系の確立と結核菌の抗原遺伝子リコンビナント BCG 株を作製した。

ヒトサイトカイン遺伝子を組み込んだリコンビナント BCG および結核菌抗原とマウス IFN- $\gamma$  の両方を組み込んだリコンビナント BCG の樹立した。

## 3. 研究成果

### 1) MPO-ANCA の解析の標準化と MPO-ANCA 関連疾患の治療薬：

加齢に伴って半月体形成性糸球体腎炎を高率に、また急速に自然発症する SCG/Kj マウスを用いて以下のことを明らかにした。

- (1) SCG/Kj マウスの末梢好中球は腎炎発症に伴って有意に増加し、またその MPO 放出は亢進していた。特に、腎炎発症初期には無刺激で MPO 放出が亢進していた。
- (2) SCG/Kj マウス血清中の MPO-ANCA 値はノーマルマウスのそれに比較して高値であり、糸球体への好中球浸潤数と正の相関を示した。
- (3) 腎傷害の指標は糸球体への好中球浸潤数、無刺激時の MPO 放出率と正の相関を示した。一方、半月体形成 score は活性酸素産生能と負の相関を示した。

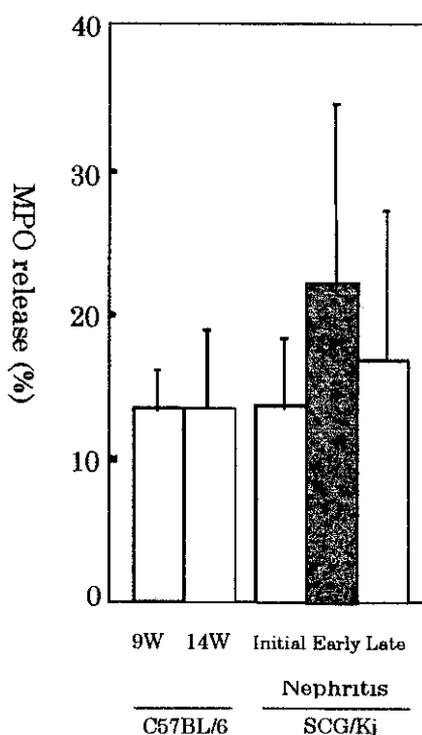


図 1. SCG/Kj マウス無刺激好中球の MPO 易放出性

- (4) 市販ヒト MPO と精製ヒト MPO-III を担体としたアフィニティカラムを作製した。
- (4-1) 高力価血漿、低力価血漿、グロブリン製剤より、MPO アフィニティカラムを用い比活性の高い MPO-ANCA 標品を作製し、その純度が高いことを確認した。
- (4-2) MPO カップリングカラムの抗体結合量が低値であったため、この方法では治療実験に供する収量を得ることが困難であることが判明した。

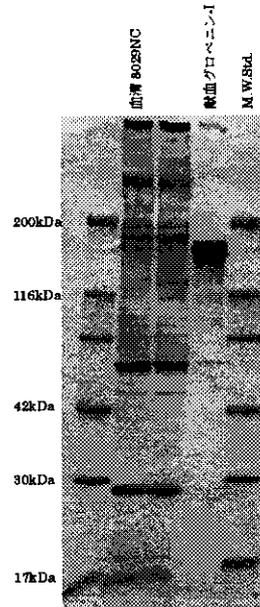


図 2. MPO-ANCA 精製

- (5) *Cryptococcus neoformans* (Cn) 感染に対する生体防御におけるミエロペルオキシダーゼ (MPO) の役割を、MPO 欠損マウスを用いて個体レベルで解析し、以下の重要知見を得た。
- (5-1) Cn 肺感染 48 時間後における肺での残存菌数は、野生型マウスと MPO 欠損マウスで差異はなかった。
- (5-2) 野生型マウスは Cn 肺感染後半年間まったく死亡しなかったが、MPO 欠損マウスは感染数日後から死亡し始め、2 ヶ月以内にすべてが死亡した。
- (5-3) 感染後 2 ヶ月間の諸臓器における残存菌数は、MPO 欠損マウスが野生型マウスよりも有意に高く、特に肺と脳において顕著であった。  
以上から、MPO 欠損は Cn に対する初期生体防御能には影響しないが、比較的長期の生体防御能の低下を導くことが判明した。
- (5-4) C57BL/6 バックグラウンドの MPO 欠損マウスでは、マクロファージで *Legionellapneumophila* が増殖できず、ヒトの感染モデルとして適当でない。そこで、マクロファージで *L. pneumophila* が増殖できる A/J マウスに戻し交配することにより、A/J-MPO<sup>-/-</sup>マウスを作成した。
- (5-5) このマウスに  $3 \times 10^4$  (4)、 $10^5$  (5)、あるいは  $10^6$  (6) の *L. pneumophila* が肺に入るように鼻腔内投与すると、いずれの投与量でも A/J-MPO<sup>-/-</sup>マウスの方が、菌がよく増殖し、菌のクリアランスが遅れた。 $10^6$  の投与量では、野生型マウスが全例生存したにもかかわらず、MPO<sup>-/-</sup>マウスは 7 日以内にほとんど死亡した。
- (5-6) このことから、これまで報告された真菌 *Candida albicans* のみならず、浴場で感染しやすい細胞内寄生細菌 *L. pneumophila* においても、MPO が生体防御に重要であることが示された。
- (6) 血管炎に関与する内皮細胞のアポトーシス：
- (6-1) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  にて刺激したところ、Apoptosis の特徴である、DNA の fragmentation が起こっていることが確かめられた。
- (6-2) HUVEC は TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  あるいは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激により、MAPK Family の磷酸化が起こり、そのうち、

特に p38 MAPK が強く磷酸化された。

- (6-3) HUVEC の TNF- $\alpha$  刺激にて、MAPK family 上流の MAPKK のうち、MKK3 や MKK6 の磷酸化は起こらず、MKK4(SEK1) の磷酸化が起こっていた。
- (6-4) 未刺激の好中球の p38 は磷酸化されていた。HUVEC に好中球を接触させたところ、p38 は脱磷酸化されたが、cytochalasin B/FMLP 刺激(CF-刺激)したところ、再び磷酸化された。
- (6-5) HUVEC は CF-刺激すると Caspase 8 の活性化が起こり、切断されて 18kDa の活性型(c-Cas8)になったが、好中球の脱顆粒成分で刺激しても起こった。IL-1 $\beta$  や H2O2 では変化が認められなかった。また、未刺激の好中球には、Caspase 8 の活性化が認められた。

## 2) 抗原提示細胞機能解析および調節因子：

昨年度、14員環マクロライドであるエリスロマイシンの生体内代謝産物 EM201 が、樹状細胞に発現する CD1 分子の発現を特異的に抑制することをあきらかにした。そこで、EM201 の抑制作用の分子機構解明を目指したが、今年度は、材料であるヒト単球をえることが困難であったことより、これら薬剤が IL-2 依存性のリンパ球増殖応答も抑制することを見いだしていたため、その系を用いて作用機構の解明を目指した。

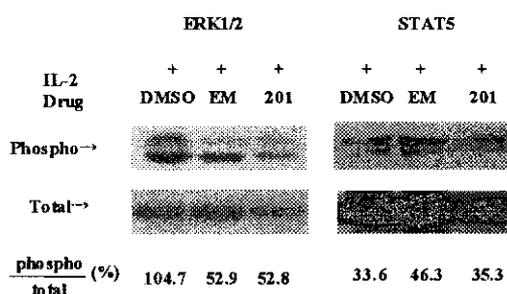


図3. IL-2 誘導 ERK1/2 及び STAT5 の活性化への EM 及び EM201 の影響

その結果、

- (1) EM 同様 EM201 も IL-2 依存性の増殖を抑制したことより、この抑制作用は、抗菌活性とは関連しないことが示唆された。
- (2) EM, EM201 は、IL-2 依存性の ERK1/2 のリン酸化を抑制した。
- (3) このリン酸化抑制作用は T 細胞増殖抑制作用同様、EM より EM201 の方が強かった。
- (4) EM, EM201 は、STAT5, p38MAPK のリン酸化は抑制しなかった。
- (5) これらの結果より、EM の IL-2 依存性 T 細胞増殖抑制作用は、Rapamycin とは異なることが示唆された。
- (6) マクロライド抗生物質エリスロマイシン(EM)を化学修飾し、これまで約 100 種の誘導体を合成した。結果、ヒト単球白血病細胞(THP-1)の分化増強活性が、EMA よりもかなり強く、しかも抗菌活性が全く消失した EM701 類縁体を創製する事が出来た。そのうち、EM703 や EM720 は EMA より約 100 倍強いマクロファージ分化増強作用を有していた。更に、EM703 はマウスを用いた Bleomycin による肺繊維症モデルとインフルエンザ肺炎モデルで優れた治療効果を示した。
- (7) 免疫抑制剤として知られているスパガリン (MeDSG) は GM-CSF と IL-4 により誘導される DC 分化に対し、CD1 の発現を強く抑制したが、その他のマーカーの発現には大きく影響しなかった。
- (8) MeDSG 存在下に形成された DC は、抗原提示機能が若干抑制されていることが明らかになった。
- (9) MeDSG は M-CSF によるマクロファージ分化は抑制しないが、GM-CSF によるマクロファージ分化を抑制することが判明した。
- (10) 以上の結果より、MeDSG は、GM-CSF の作用を抑制していることが示唆されたので、GM-CSF 依存性細胞株 TF-1 の増殖への影響を検討した結果、DSG 誘導体は TF-1 細胞の G0/G1 期の細胞を増加させると同時に subG1 期の細胞も増加させ、アポトーシスの増加と増殖抑制の両面から細胞数を減少させ

低ることが知られた。

### 3) 新規リコンビナント BCG の創製と抗結核生体防御機構の解析

- (1) ヒトへの応用の前に、モルモットの系を用いてリコンビナント BCG の抗結核免疫活性を測定するため、モルモットインターフェロン-ガンマー遺伝子をクローニングし、モルモットインターフェロン-ガンマーを大量に発現するリコンビナント BCG を作成した。
- (2) モルモットインターフェロン-ガンマーを定量するための抗モルモットインターフェロン-ガンマー抗体を作成できた。

## 4. 考 察

微生物感染における重要な防御機構として宿主の免疫応答は、微生物そのものに対する応答に加え、宿主に対する異常免疫反応や免疫不全が二次的に誘導されることがある。感染症の中でも結核は、現在でも日本における単一原因菌の死亡者数第一位の感染症であり、その防御機構の解析と結核患者における免疫機能の増強法が強く望まれている。そこで、新規リコンビナント BCG の創製と抗結核生体防御機構を解析する。一方、結核の初期防御に、好中球の殺菌酵素 myeloperoxidase (MPO) が重要な役割を果たしていることが判明してきている。しかし、この MPO は、好中球自己抗体 (MPO-ANCA) の標的分子となり、血管炎や腎炎など自己免疫疾患の発症やその重篤化に関与していることが判明し、T細胞の活性化または免疫寛容を誘導する上で必須である。MPO-ANCA では抗原提示細胞上の HLA-DR9 拘束性 T細胞と B細胞のクローンが病態と関係することがつきとめられた (Clin. Immunol., 1998, Clin. Neph., 2000)。また、本研究では、結核感染防御や腫瘍増殖抑制および病理性 MPO-ANCA 産生抑制に関与する抗原提示細胞の調節機構を解析し、疾患モデルマウスを用いて病理性 MPO-ANCA 産生の自己免疫疾患の治療および重篤化を抑制する物質の開発を目指すとともに、新規の結核感染防御ワクチン、腫瘍増殖抑制剤、ならびに抗原提示細胞の機能調節物質の開発およびこれら疾患の抑制治療法をめざすことができた。

## 5. まとめ

本研究では、結核感染防御や腫瘍増殖抑制および病理性 MPO-ANCA 産生抑制に関与する抗原提示細胞の調節機構を解析し、疾患モデルマウスを用いて病理性 MPO-ANCA 産生の自己免疫疾患の治療および重篤化を抑制する物質の開発を目指し、新規の結核感染防御ワクチン、腫瘍増殖抑制剤、ならびに抗原提示細胞の機能調節物質およびこれら疾患の抑制治療法の検討が進んだ。具体的には、以下に示す。

### 1) MPO-ANCA の解析の標準化と MPO-ANCA 関連疾患の治療薬

SCG/Kj マウスの末梢好中球数は、腎炎発症に伴って有意に増加し、MPO 放出の亢進を認めた。また、MPO-ANCA 値は高値であり、糸球体への好中球浸潤数と正の相関を示し、腎傷害指標と糸球体への好中球浸潤数、無刺激時の MPO 放出率と正の相関を示した。また、ヒト MPO-III を担体としたアフィニティカラムを作製した。一方、MPO 欠損は Cn に対する初期生体防御能には影響しないが、比較的長期の生体防御能の低下を導くことが判明し、浴場で感染しやすい細胞内寄生細菌 *L. pneumophila* においても、MPO が生体防御に重要であることが示された。

### 2) 抗原提示細胞機能解析および調節因子

EM201 が IL-2 依存性のリンパ球増殖応答も抑制し、その作用機構を解析した結果、EM, EM201 は、IL-2 依存性の ERK1/2 のリン酸化を抑制したが、STAT5, p38MAPK のリン酸化は抑制しなかった。一方、EM を化学修飾し、約 100 種の誘導体を合成した。このうち、EM703 や EM720 は EMA より約 100 倍強いマクロファージへの分化を増強した。更に、EM703 を用いてマウスを用いた Bleomycin による肺繊維症モデルとインフルエンザ肺炎モデルで優位な治療効果を示した。

スパガリンは、DC 分化やマクロファージ分化を抑制するが、GM-CSF 依存性 TF1 細胞を用いて機能を解析した結果、GM-CSF 依存性シグナルが抑制していることが示唆された。

### 3) 新規リコンビナント BCG の創製と抗結核生体防御機構の解析

- (1) モルモットインターフェロン-ガンマー遺伝子のクローニングし、モルモットインターフェロン-ガンマーを大量に発現するリコンビナント BCG を作成した。
- (2) 抗モルモットインターフェロン-ガンマー抗体を作成した。

## 6. 研究発表

1. Frederik Vilhardt, Olivier Plastre, Makoto Sawada, Kazuo Suzuki, Maciej Wiznerowicz, Etsuko Kiyokawa, Didier Trono, and Karl-Heinz Krause. The HIV-1 Nef Protein and Phagocyte NADPH Oxidase Activation. *J Biol. Chem.* 277: 42136-43, 2002.
2. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M. C., Maeda, N., and Koyama, H : Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 40: 557-563, 2002.
3. Kohji Ichimori, Naoto Fukuyama, Hiroe Nakazawa, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Shunya Takizawa, Yosuke Kmeoka, Akiko Ishida-Okawara, Fumikazu Kohi and Kazuo Suzuki. Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. *Free Radical Research.* in press.
4. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M. C., Maeda, N., and Koyama, H : Critical role of myeloperoxidase and NADPH-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 185: 1833-1837, 2002.
5. Akagawa, K.S. : Functional heterogeneity of colony-stimulating factor induced human monocyte-derived macrophages. *Int. J. Hematol.* 76:27-34, 2002.
6. Terada, S., Takizawa, M., Yamamoto, S., Ezaki, O., Itakura H. and Akagawa K.S. : EPA inhibits CSF-induced human monocyte-survival and maturation into macrophage through the stimulation of H2O2 production *J. Leukocyte. Biol.* 71:981-986, 2002 .
7. Funatsu, T., Taniyama, T., Tajima, T., Tadakuma, H. and Namiki, H. : Rapid and sensitive detection Method of a bacterium by using a GFP reporter phage. *Microbiol. Immunol.*, 46, 365-369 (2002)
8. Nagai, T., Sobajima, H., Iwasa, M., Tsuzuki, T., Kura, F., Amemura-Maekawa, J., and Watanabe, H. : Neonatal sudden death by *Legionella pneumonia* due to home water birth using an ever-ready 24-hour-a-day bath system. *J. Clin. Microbiol.* 2003. in press.
9. Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Watanabe, H., Gondaira, F., Sugiyama, J. : Analysis of *Legionella Pneumophila* Serogroup 1 Isolates in Japan by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Monoclonal Antibodies. In *Current Status and Emerging Perspectives*, ASM Press, USA, 2002, p. 302-304.
10. Okada, C., Kura, F., Wada, A., Inagawa, H., Lee, G.-H., Matsushita, H. : Cross-reactivity and sensitivity of two *Legionella* urinary antigen kits, Biotest EIA and Binax Now, to extracted antigens from various serogroups of *L. pneumophila* and other *Legionella* species, *Microbiol Immunol* 46:51-54, 2002.
11. Abe F., Aoyagi T. Physiological roles of ectoenzymes indicated by the use of aminopeptidase inhibitors. In: Langner J, Ansorge S, editors. *CD13/Aminopeptidase N and CD26/Dipeptidylpeptidase IV in Medicine and Biology*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002. p.95-122.
12. 安部史紀 Aminopeptidase inhibitor. *Current Therapy.* 2002; 20: 27-31.
13. Abe, F. and Aoyagi, T. : Inhibitors of CD13/APN as biological response modifiers, as antitumor drugs and myeloid restitution. In: Ansorge S (eds) *CD13/APN and CD26/DPIV- ectopeptidases with high impact in medicine and biology*. Kluwer/Plenum, London, in press, 2002.
14. Tsuchihashi, Y., Oishi, K., Yoshimine, H., Suzuki, S., Kumatori, A., Sunazuka, T., Omura, S., Matsushima, K. and Nagatake, T. Fourteen-Membered Macrolides suppress IL-8 Production, but Do Not Promote Apoptosis of Activated Neutrophils *Antimicrob. Agents. Chemocher.* 46, 1101-1104 (2002)
15. Sunazuka, T., Omura, S., Iwasaki, S., and Omura, S. *Chemical Modification of Macrolides Macrolide Antibiotics II; Chemistry, Biology, and Practice* (Omura, S., Ed), Academic Press, New York p99-180 (2002)
16. Omura, S., Miyadera, H., Ui, H., Shiomi, K., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Nagamitsu, Takano, D., Sunazuka, T., Harder, Kolbl, A. H., Namikoshi, M., Miyoshi, H., Sakamoto, K., Kita, K. An Anthelmintic Compound, Nafuredin, Shows Selective Inhibition of Complex I in Helminth Mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 60-64 (2001)
17. A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, Y. Hashimoto, Y. Aratani, H. Koyama, N. Maeda, S. Naoe, K. Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation.* 25: 381-387, 2001.

18. K. Suzuki. Neutrophil functions of patients with vasculitis related to MPO-ANCA. International Journal of Hematology 74, 134-143, 2001.
19. Mochida-Nishimura, K., Akagawa, K.S. and Rich, E.A.: Interleukin-10 Contributes Development of Macrophage Suppressor Activities by Macrophage Colony-Stimulating Factor, but not by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. Cell. Immunol., 214, 81-88, 2001.
20. Hashimoto, S., Komuro, I., Yamada, M. Akagawa, K.S.: IL-10 inhibits GM-CSF-dependent human monocyte survival at the early stage of the culture and inhibits the generation of macrophages, J. Immunol. 167:3619-3625, 2001.
21. Komuro, I., Keicho, N., Iwamoto, I., and Akagawa, K.S.: Human alveolar macrophages and GM-CSF-induced monocyte-derived macrophages are resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via their high basal- and inducible-levels of catalase activity, J. Biol. Chem. 276: 24360-24364, 2001
22. Terada, S., Takizawa, M., Yamamoto, S., Ezaki, O., Itakura H. and Akagawa K.S.: Suppressive mechanisms of EPA on human T cell proliferation. Microbiol. Immunol., 45(6), 473-481, 2001
23. Narita, T., Amano, F., Yoshizaki, K., Nishimoto, N., Nishimura, T., Tajima, T., Namiki, H. and Taniyama, T.: Assignment of the SH3KBP1 to human chromosome band Xp22.1-p21.3 by in situ hybridization. Cytogenet. Cell Genet 93:133-134 (2001)
24. Nishimura, T., Narita, T., Miyazaki, E., Ito, T., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Martial, J.A., Bellfroid, E.J., Vissing, H. and Taniyama, T.: Characterization of the Human FcγRIIB Gene Promoter: Human Zinc-Finger Proteins (ZNF140 and ZNF91) that Bind to Different Regions Function as Transcription Repressors. Int. Immunol., 13:1075-1084 (2001)
25. Abe, F., Ino, K., Bierman, P.J. and Talmadge, J.E.: Bestatin, an inhibitor of aminopeptidases: preclinical and clinical studies. In: Mizutani H (eds) Cell-Surface Aminopeptidases: Basic and Clinical Aspects. ELSEVIER, Amsterdam, 155-159, 2001.

#### 7. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1) 特許取得   | なし |
| 2) 実用新案登録 | なし |
| 3) その他    | なし |