

Fig. 3. *In Vitro* Activities of Novel Quinolones against *M. leprae*

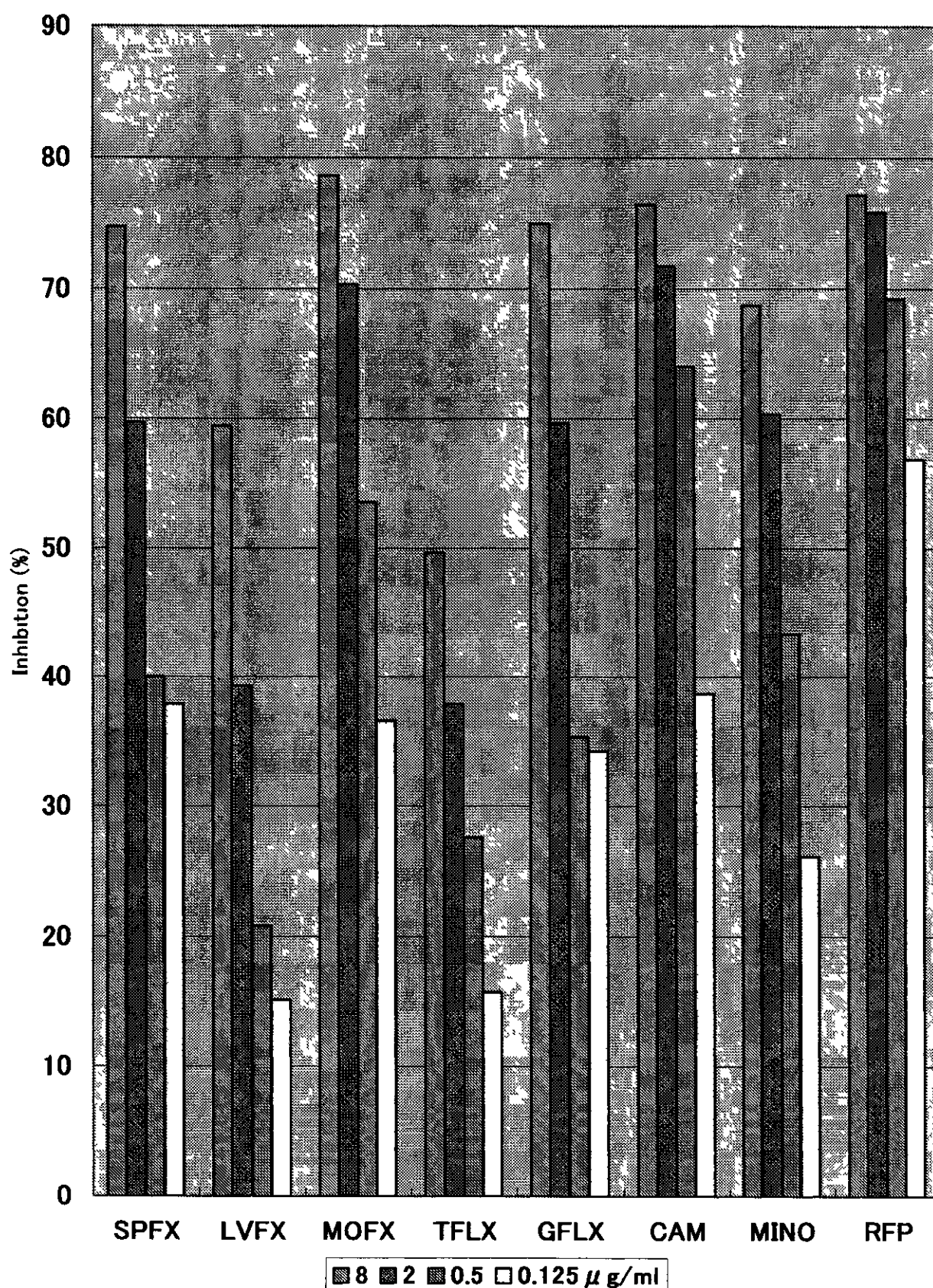


Fig. 4. Activities of Moxifloxacin against *M.leprae* in Nude Mice

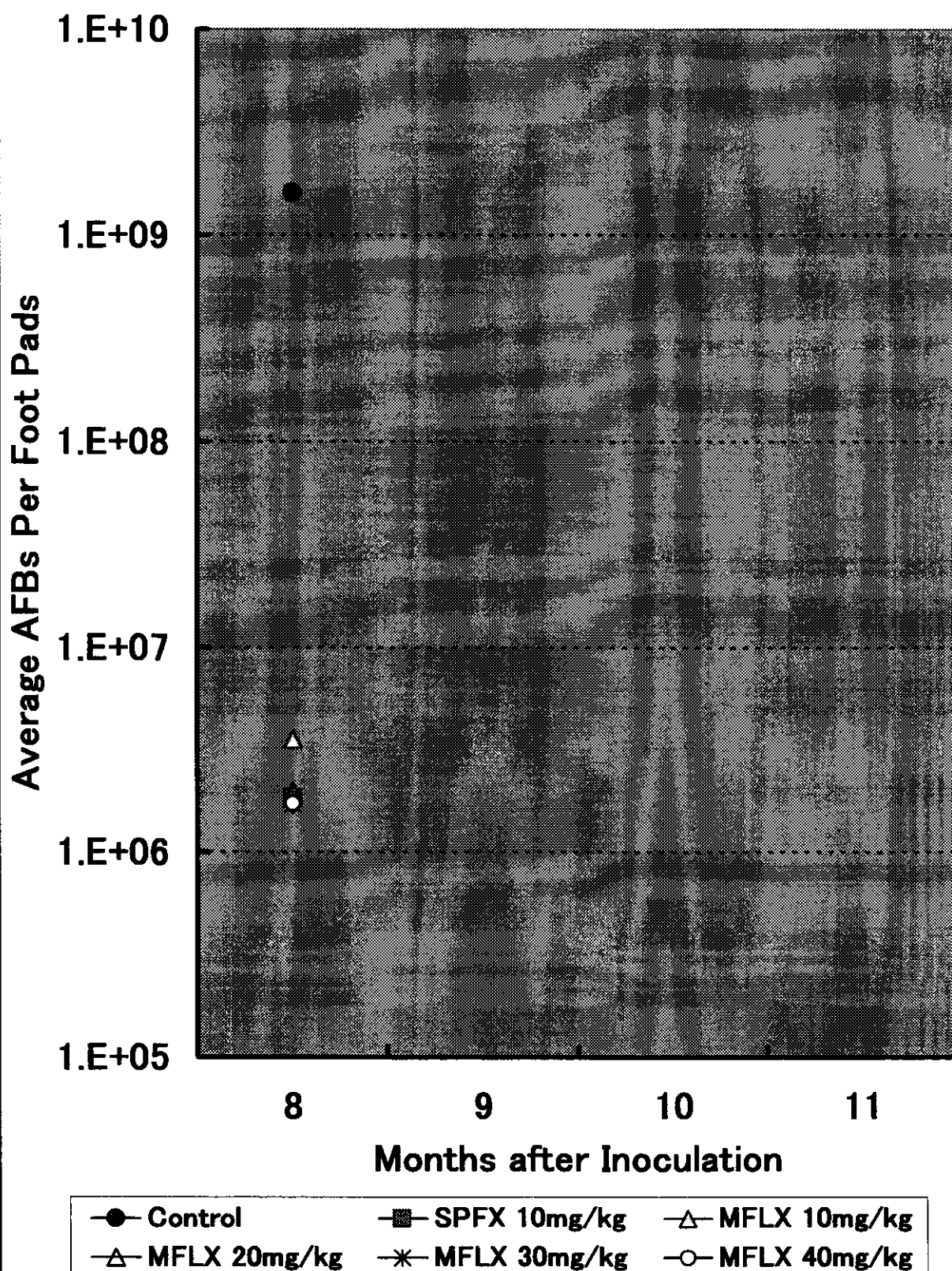
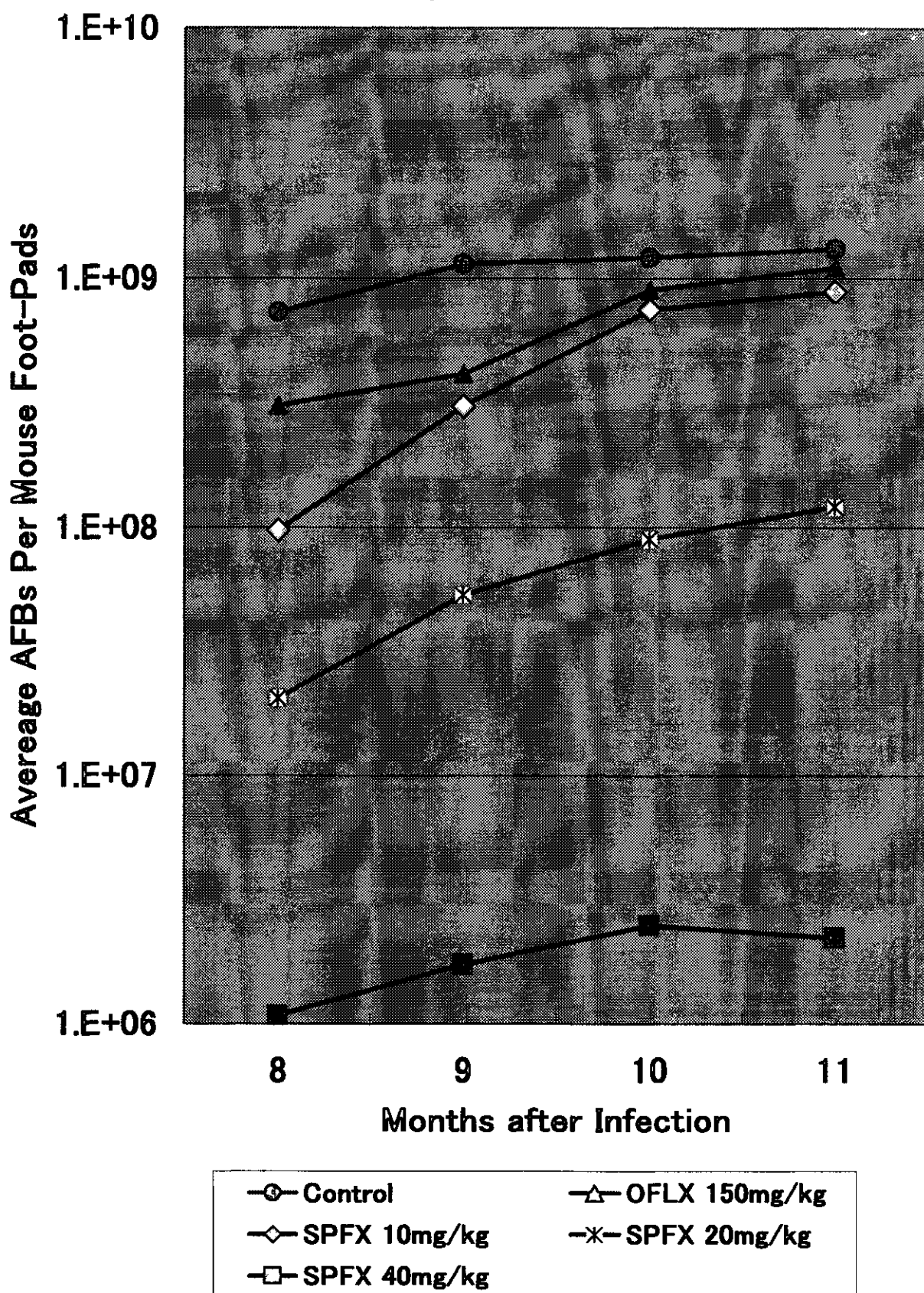


Fig. 5. Activity of SPFX against OFLX-Resistant *M.leprae* in Nude Mice



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

らい菌菌膜抗原の細胞性免疫誘導能の検討

平成 15 年度 分担研究報告書

分担研究者 牧野 正彦

(国立感染症研究所 ハンセン病研究センター)

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

らい菌菌膜抗原の細胞性免疫誘導能の検討

分担研究者 牧野 正彦
国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 部長

研究要旨 らい菌に対する生体防御反応としては、CD4 陽性 T 細胞を中心とした細胞性免疫反応が最も重要である。我々はこれまでに、らい菌構成成分画中細胞膜が最も抗原性に富んでいることを見出してきたか、細胞膜中に存在し、細胞性免疫反応を誘導する抗原は未だ同定されていない。そこで、細胞膜をゲル濾過法で分画し、高細胞性免疫反応を示す患者血清を用いスクリーニングした結果、細胞性免疫誘導性抗原として Major Membrane Protein-II (MMP-II) が得られた。精製 MMP-II は正常健常者末梢単球由来樹状細胞を成熟化させ、IL-12 p70 を産生し、さらに樹状細胞を介して自己 CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を活性化した。また、少菌型患者 T 細胞は、MMP-II パルス樹状細胞に著しく強く反応し、すでに *in vivo* で MMP-II に感作されている可能性が示唆された。従って、らい菌菌膜中に存在する MMP-II は、抗抗酸菌生体防御反応を誘導する抗原の一つと考えられた。

A 研究目的

らい菌に対する生体防御反応として、抗らい菌細胞性免疫反応は最も重要な免疫反応である。これまでに、らい菌を構成する種々の分画の内、らい菌菌膜は最も抗原性に富んでいることを明らかにしてきた。一方、ハンセン病は個々のらい菌に対する細胞性免疫応答の強さにより種々の病型を呈することが知られ、Paucibacillary Type (PB Type) では限局性病変を形成する。この際、宿主免疫担当細胞はらい菌由来抗原を認識し、細胞性免疫反応を惹起し、らい菌の広範な拡大を抑制する。しかし、このような細胞性免疫応答を誘導するらい菌構成成分に関する研究は多くはなされておらず、抗原性分子の同定には至っていない。本研究では、PB 型患者血清を用い、末梢単球由来樹状細胞 (DC) を抗原提示細胞として、PB 型に見られる病変抑制性細胞性免疫を誘導するらい菌抗原を同定することを目的とした。

B 研究方法

正常健常者末梢血より単球由来樹状細胞 (DC) を rGM-CSF および rIL-4 を用いて誘導した。DC を MMP-II を用いて刺激した際、DC より産生される IL-12 p70 は ELISA 法にて測定した。MMP-II パルス DC の抗原提示能は、自己 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞をレスポンダー細胞として用いた際に T 細胞から産生される IFN- γ を指標とした。らい菌が保有し、T 細胞を中心とした細胞性免疫反応を誘導し得る抗原の探索は以下の通り行った。らい菌を分画し、らい菌菌膜を得た後、可溶化し、さらに、ゲル濾過法にて分画した。各分画を DC にパルスし、それぞれの菌膜分画の抗原性を抗原パルス DC の抗原提示能により測定した。また、らい菌に対する細胞性免疫反応を示す PB 型患者より得た血清を用い、菌膜をウェスタンブロット法で検索し、抗原性の強い菌膜分画に共通して存在するバンドを得た。このバンドを抽出し、得られたタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定し、目的とし

たタンパク質を同定した。得られたタンパク質をコートする遺伝子を PCR 法にて増幅した後、大腸菌に挿入し精製タンパクを得た。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ト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、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(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。

C 研究結果

強い細胞性免疫反応を PB 型患者によって認識されている抗原は、樹状細胞表面に発現している可能性が高い。そこで、らい菌感染樹状細胞 (DC) を検索したところ、DC は PB 型患者血清と反応し、さらに、らい菌細胞膜に対するポリクローナル抗体で陽性に染まった。しかし、らい菌菌壁あるいは細胞質に対する抗体は陰性であった。また、PB 型患者血清は、らい菌菌膜をパルスした DC のみを認識し、らい菌菌壁あるいは細胞質をパルスした DC は認識しなかった。そこで、らい菌菌膜を可溶化し、さらに、ゲル濾過法により分画した。ゲル濾過各分画には種々のタンパクが含まれていることを銀染色で確認した後、それぞれの菌膜画分を DC にパルスし、その抗原性を検索した。DC により刺激された T 細胞から産生される IFN- γ を指標とすると、二つの分画に CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を強く刺激し得る抗原が含まれている可能性が示唆された。そこで、PB 型患者血清を抗酸菌の細胞壁と細胞質で吸収した後、ウェスタンブロット法で上記 2 分画を検索し、両者に共通して存在するバンドを抽出し、その N 末端アミノ酸配列を解析した。その結果、細胞膜の主要タンパク成分である Membrane Protein-II (MMP-II) が同定された。そこで、

T7 expression system を用い、大腸菌で MMP-II を産生し精製し、以下の実験に用いた。まず、MMP-II の抗原性について検索した。MMP-II を DC にパルスしたところ、DC 表面の HLA-ABC、HLA-DR、CD86 および CD83 抗原の発現量が MMP-II の濃度依存性に増強した。また、DC を MMP-II で刺激すると IL-12 p70 が産生され、マクロファージを刺激すると IL-10 が産生された。いずれも MMP-II の量に依存性であった。そこで、MMP-II がこれら抗原提示細胞を活性化する機序を解明する目的で、TLR-2 との関連について検索した。TLR-2 は、抗酸菌に対する自然免疫を活性化する抗原提示細胞のレセプターとして知られている。TLR-2 を transfect した HEK293 細胞を MMP-II で刺激したところ、MMP-II の濃度依存性に HEK293 細胞内のレポーター遺伝子が活性化され、MMP-II が抗原提示細胞を刺激する際に、TLR-2 が重要な役割を果たしていることが判明した。さらに、MMP-II パルス DC を用いて、自己の CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を刺激したところ、MMP-II 濃度依存性に T 細胞が活性化され IFN- γ が産生された。しかし、TH2 サイトカインである IL-4 は産生誘導されなかった。また、T 細胞の活性化は CD4 陽性 T 細胞優位であり、抗原パルス DC を外来性 CD40L で処理すると、DC の T 細胞活性化能はさらに増強した。また、MMP-II パルス DC は、ナイーブタイプの T 細胞をも活性化し IL-2 を産生させた。さらに、PB 型患者 DC を MMP-II でパルスすると、CD40L 非存在下で自己の T 細胞を強く活性化した。その程度は、正常健常者に比し著しく高い値であった。

D 考察

細胞性免疫反応は、抗酸菌感染症に対する生体防御反応の中心的役割を果たす。しかし、らい菌を構成する成分の中で、宿主細胞免疫応答を有効かつ効率的に活性化する分子については検討はほとんどなされておらず、従って、細胞性免疫を誘導する分子も同定されていない。細胞性免疫賦活能を有する抗原の同定は、らい菌感染症に対す

るワクチンの開発に直接的に結びつくため、極めて重要な研究課題である。本研究においては、らい菌に対して強い細胞性免疫反応を示す PB 型患者血清と、抗原性に富むらい菌菌膜を用いて上記抗原の同定を試みた。その結果として MMP-II が同定された。MMP-II は、1990 年に major native protein として同定され、1994 年 Bacterioferrin と同一分子であることが明らかにされたか、その抗原性、特に細胞性免疫賦活能については未検索のまま放置されてきた。本研究を通じ、MMP-II は DC を活性化・成熟化し、IL-12 を産生し、またマクロファージを刺激し IL-10 を産生させた。さらに、DC に MMP-II をパルスすると、自己の T 細胞を活性化・タイプ 1 CD4 陽性およびタイプ 1 CD8 陽性 T 細胞を活性化した。これらのことは、MMP-II は自然免疫 (innate immunity) および獲得免疫 (adaptive immunity) の両者を活性化することを示すものである。また、自然免疫の活性化には抗原提示細胞上の TLR2 が MMP-II ligand として作用している可能性が強く示唆された。さらに、PB 型患者リンパ球は、MMP-II パルス DC に強い反応を示したことより、PB 型患者 T 細胞は in vivo において、MMP-II に感作されている可能性が示唆された。つまり、MMP-II はらい菌に対する細胞性免疫を誘導する際の重要な抗原であると想定された。

E 結論

らい菌由来 MMP-II は、らい菌に対する生体防御反応を誘導する重要な抗原の一つである可能性が示唆された。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) 牧野正彦 らい菌と樹状細胞の相互作用 臨床免疫 39 (2) 109-115, 2003
- 2) Maeda Y, M Gidoh, N Ishii, C Mukai, and M Makino Assessment of cell mediated immunogenicity of

Mycobacterium leprae-derived antigens Cell Immunol, 222 69-77, 2003

- 3) Kai, M, Y Maeda, S Maeda, Y Fukutomi, K Kobayashi, Y Kashiwabara, M Makino, M A Abbasi, M Z Khan, and P A Shah Active surveillance of leprosy contacts in country with low prevalence rate Intl J Lepr Other Mycobact Dis, in press, 2003
- 4) Maeda, Y, P J Brennan, and M Makino Studies of lipoproteins of *Mycobacterium leprae* Jpn J Leprosy, in press, 2004

2 学会発表

- 1) 牧野正彦, 前田百美 タイプ 1 細胞性免疫を誘導するらい菌抗原の探索 第 76 回日本細菌学会総会 2003 年 4 月 熊本
- 2) 中田 登, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 前田伸司, 松岡正典, 牧野正彦 大腸菌 - 抗酸菌シャトルコスミトを用いたらい菌 Tha153 株整列クローンライブラリの作製と遺伝子解析 第 76 回日本細菌学会総会 2003 年 4 月 熊本
- 3) 甲斐雅規, 藤田由希子, 矢野郁也, 牧野正彦 らい菌由来糖脂質の解析 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003 年 7 月 神戸
- 4) 宮本友司, 武下文彦, 中田 登, 前田百美, 甲斐雅規, 牧野正彦, 向井 徹 抗酸菌 Fibronectin Attachment Protein の機能解析 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003 年 7 月 神戸
- 5) 前田百美, 遠藤真澄, 寺尾恵治, 牧野正彦 シュワン細胞とらい菌の相互作用の解明 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003 年 7 月 神戸
- 6) 武下文彦, 向井 徹, 宮本友司, 牧野正彦 らい菌 Fibronectin Attachment Protein (FAP) を標的にした DNA ワクチンの検討 第 76 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2003 年 7 月 神戸

- 7) 甲斐雅規, 中田 登, 牧野正彦 速発育性抗酸菌 *M. smegmatis* のトランスポゾン変異株ライブラリーの作製と解析 第 86 回日本細菌学会関東支部総会 2003 年 10 月 横浜
- 8) 宮本友司, 武下文彦, 中田 登, 前田百美, 甲斐雅規, 牧野正彦, 向井 徹 *Mycobacterium smegmatis* 由来 Fibronectin Attachment Protein の解析 第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 神戸
- 9) 牧野正彦, 前田百美, 木村博昭, 武下文彦, 稲垣勝也 らい菌感染マクロファージの抗原提示能の増強 第 33 回日

- 本免疫学会総会 2003 年 12 月 福岡
- 10) Makino M., Y Maeda, H Kimura, and F Takeshita Up-regulation of antigen presenting function of mycobacteria infected macrophage US-Japan Cooperative Medical Science Program 38th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Newark, USA, July 21-23, 2003

H 知的財産権の出願・登録状況

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

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

らい菌特異的リポタンパクの機能解析

平成 15 年度 分担研究報告書

分担研究者 前田 百美

（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

らい菌特異的リポタンパクの機能解析

分担研究者 前田 百美 国立感染症研究所ハンセン病研究センター病原微生物部 研究員

研究協力者 山下 康子 国立感染症研究所ハンセン病研究センター病原微生物部

研究要旨

これまでにらい菌のリポ蛋白 LpK を同定し精製した。LpK はヒト末梢血単球を刺激し、細胞性免疫応答の誘導に重要な IL-12 を産生することを明らかにしてきた。本研究では、IL-12 誘導に関わるリポ蛋白活性中心部位を同定し、単球による認識機構について明らかにすることを目的とした。種々の truncated LpK の発現ヘクターを作製し、大腸菌で蛋白を発現させ、目的の蛋白を HisBind カラムまたはゲル濾過カラムを用いて精製した。ヒト末梢血単球を 0.5 nM の N 末端 60 アミノ酸残基を持つ脂質付加蛋白で刺激すると、700 pg/ml の IL-12 を産生するか、同じアミノ酸配列を持つ脂質非付加蛋白では同程度の IL-12 産生誘導に、10 nM 以上の蛋白を要した。C 末端の 192 アミノ酸を含む truncated LpK では全く IL-12 が産生されなかったことから、脂質を含む N 末端 60 アミノ酸部分が IL-12 誘導に重要な役割をしていると考えられた。近年、TLR2 は病原体の認識に密接に関与することが判明している。リポ蛋白 LpK または上記 truncated LpK と TLR2 の関与について検討した結果、脂質を有する LpK はすべて TLR2 を介して宿主細胞を刺激することか明らかとなった。脂質を含む LpK の N 末端 60 アミノ酸がらい菌感染防御機構に重要な役割を担っていると考えられた。

A 研究目的

らい菌ゲノムデータベースでは脂質付加を受けることが予想される蛋白をコードする遺伝子は約 30 種存在する。しかし、らい菌のリポ蛋白の存在はこれまで明らかにされず、研究は充分に行われていない。30 種の遺伝子の中で LpK と命名したリポ蛋白に着目したところ、LpK は生体防御反応に重要な役割を果たすサイトカイン IL-12 を誘導することを明らかにして

きた。LpK は Th1 タイプ CD4 陽性 T 細胞及び Tc1 タイプ CD8 陽性 T 細胞活性化にも関わっている。そこで、本研究では幾つかの truncated LpK を作製し、末梢血単球を刺激する LpK の活性部位を同定し、自然免疫反応と深く関与する TLR2 との関係についての検討を目的とした。

B 研究方法

Truncated LpK の作製にあたり、プライ

マーを合成し、図1の蛋白をコードする遺伝子断片をPCRで得、大腸菌発現ヘクターに導入し、DH5 α に導入した。蛋白の精製はHisBindカラム(Novagen)またはゲル濾過カラムHiLoad 26/60 Superdex 75 (Amersham Pharmacia)で行った。正常健康者ヒト末梢血単球(10⁵細胞/ウエル)を、精製した蛋白で24時間刺激後、培地上清中のIL-12 p40を測定した。樹状細胞はヒト末梢血単球より分化誘導したのち、精製した抗原でパルスした。その抗原提示能による自己T細胞の活性化は、IFN- γ を指標に分析した。IL-12及びIFN- γ の測定はBD PharmingenのOptEIAキットを用いてELISA法で半定量化した。

倫理面への配慮 国立感染症研究所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に注意を払った。

C 研究結果

図1で示すようにLpKおよび4種のtruncated formsを作製した。LpKのN末端にシステイン残基を欠くLpK(n1)は脂質付加を受けない蛋白である。N-LpK(1)はN末端に脂質付加をうける60アミノ酸残基からなる。N-LpK(n1)は脂質付加を受けない60アミノ酸のみからなる。C末端の179~371アミノ酸部分からなる蛋白はC-LpKである。これらの蛋白を大腸菌で発

現精製し、ヒト末梢血単球を刺激した際のIL-12 p40の産生を検討した。0.5 nMのリポ蛋白LpKで単球を刺激すると、700pg/mlのIL-12を産生するが、同じアミノ酸配列を持つ脂質非付加蛋白LpK(n1) 0.5 nMではIL-12が産生されず、5 nM以上の大量の蛋白で刺激すると初めてIL-12が産生された(図2)。同様に0.5 nMのN末端60アミノ酸残基を持つ脂質付加蛋白N-LpK(1)を用いると親LpKと同等のIL-12が産生されるか、N-LpK(n1)では産生されず、20 nM以上の蛋白を必要とした。C末端の192アミノ酸を含むC-LpKでは全くIL-12が産生されなかった。このことは、脂質を含むN末端60アミノ酸部分がIL-12誘導に重要な役割を果たしていることを示している。これらtruncated LpKを樹状細胞にパルスし、抗原提示細胞として用い、自己のCD4陽性及びCD8陽性T細胞の活性化をIFN- γ 産性能で調べた。LpKまたはN-LpK(1)をパルスした樹状細胞はT細胞を刺激し有意にIFN- γ を産生したが、C-LpKでは全くIFN- γ は産生されなかった。LpK(n1)またはN-LpK(n1)はわずかながらCD4陽性T細胞を刺激した。このことはLpKの脂質部分及びN末端60アミノ酸を含む領域がT細胞活性化に関与していることを示す。Toll-like receptor2 (TLR2)は細菌由来リポ蛋白並びにリポペプチドの認識に重要な役割を果たすことが明らかにされているため、truncated LpKとTLR2の関係を調べた。脂質付加蛋白LpKまたはN-LpK(1)は

reporter gene assay で有意な活性を示し、宿主細胞の活性化に TLR2 の関与が明らかとなった。

D 考察

LpK の N 末端の脂質付加領域を含む LpK の 60 アミノ酸が末梢血単球及び樹状細胞活性化に関わっていることが明らかとなった。LpK の C 末端 192 アミノ酸を含む蛋白は全く抗原提示細胞も刺激せず、T 細胞活性にも関与していなかった。LpK または N-LpK (I) は TLR2 の関与によって T 細胞を刺激することか明らかとなった。従って、LpK の活性中心は、N 末端の脂質付加領域を含む 60 アミノ酸に存在した。本領域は抗原提示細胞が中心となって営まれるらい菌に対する自然免疫および獲得免疫反応を賦活し得ることを示すもので、抗酸菌に対するワクチンを構築する上で有用な情報を与えるものと期待する。

E 結論

らい菌由来のリポ蛋白 LpK は、脂質を含む N 末端部分が生体防御反応に重要な役割を担っていた。抗酸菌感染症のワクチン候補として有用であることが示唆された。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Kai, M Maeda Y Maeda S, Fukutomi Y, Kobayashi, K, Kashiwabara, Y Makino M, Abassi, MA, Khan, MZ, and Shah PA. Active surveillance of leprosy contacts in country with low prevalence rate *International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases* (in press)
- 2) Maeda Y, Gidoh M, Ishii N, Mukai C, and Makino M. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae* derived antigens *Cellular Immunology* 222, 69-77 2003
- 3) Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ Maeda Y Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, and Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy *Nature Medicine* 9, 5, 525-532, 2003

2 学会発表

- 1) 牧野正彦、前田百美 タイプ 1 細胞性免疫を誘導するらい菌抗原の探索、第 76 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月 熊本
- 2) Makino M, Maeda Y, Kimura, H, and Takeshita, F Upregulation of antigen presenting function of mycobacteria infected macrophage, 38th US-Japan Conference on Tuberculosis And Leprosy, Newark USA, July 21-23, 2003
- 3) 前田百美、遠藤真澄、寺尾恵治、牧野正彦 シュワン細胞とらい菌の相互作用の解明、

日本ハンセン病学会総会、2003年7月 神戸

4) 前田百美 らい菌のリポ蛋白に関する研究、
日本ハンセン病学会総会、2003年7月 神戸

5) 宮本友司、武下文彦、中田 登、前田百美、
甲斐雅規、牧野正彦、向井 徹
Mycobacterium smegmatis 由来
Fibronectin Attachment Proteinの解析、
日本分子生物学会年会、2003年12月 神戸

6) 牧野正彦、前田百美、木村博昭、武下文彦、
稲垣勝也 らい菌感染マクロファージの抗原
提示能の増強、日本免疫学会総会、2003
年12月 福岡

H 知的財産権の出願 登録状況

- 1 特許取得 なし
- 2 実用新案登録 なし
- 3 その他 なし

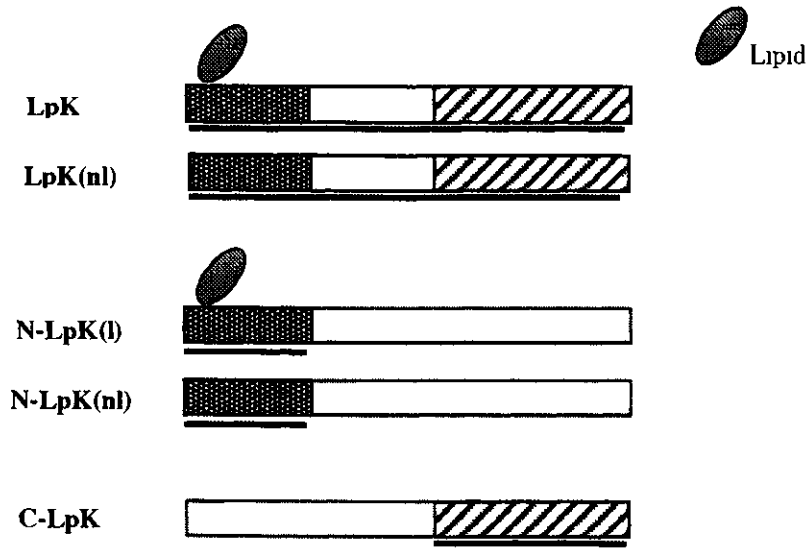


图1 Schematic representation of the truncated forms of LpK (l lipidated, nl.non-lipidated)

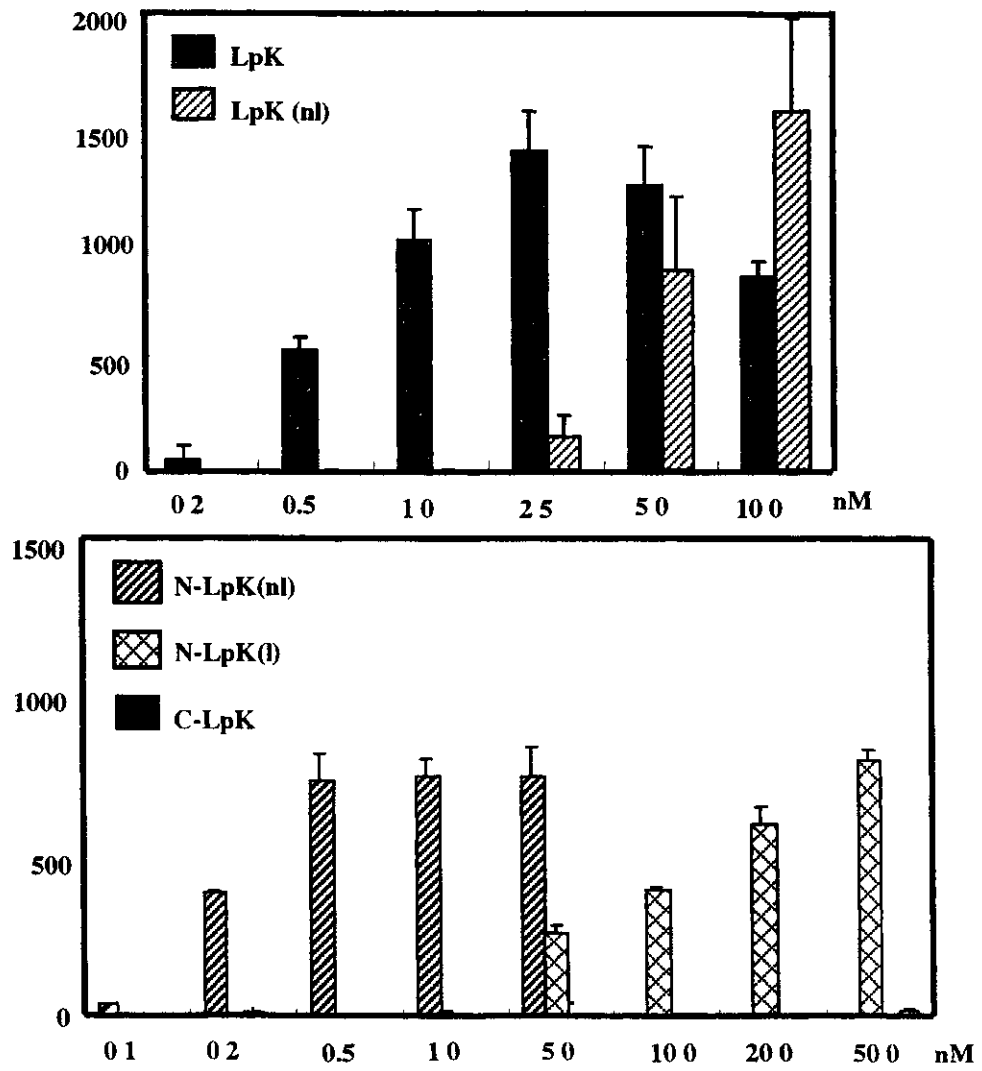
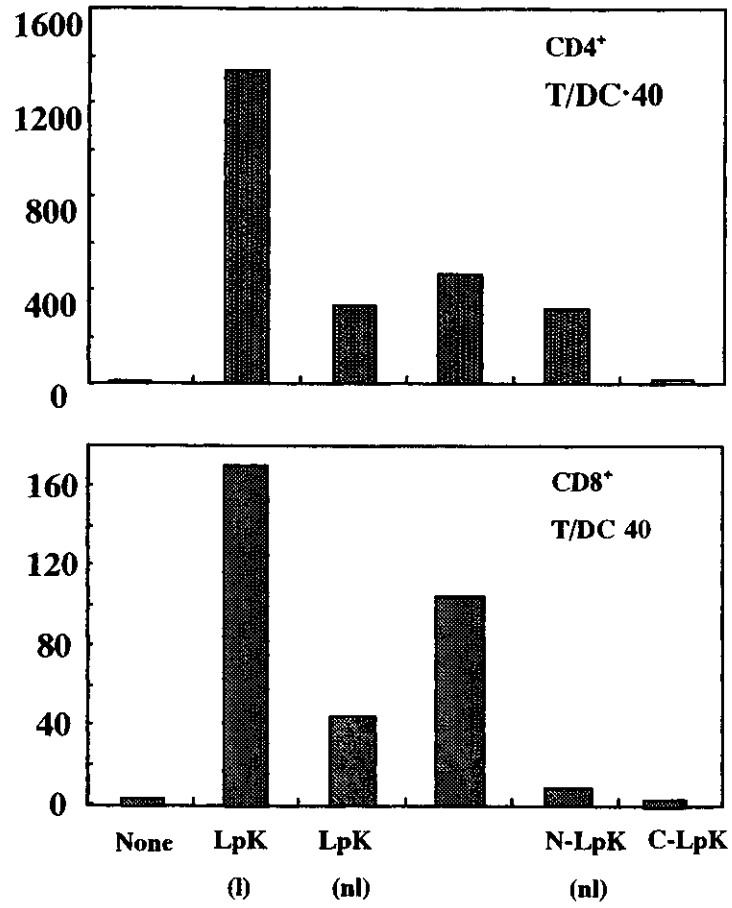


图2 IL-12 p40 production from human peripheral blood monocytes



☒ 3. IFN- γ production from autologous T cells stimulated with Ag pulsed DCs

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

高効率にNKT細胞を誘導するペプチド型ワクチンの
デザインに関する研究

平成 15 年度 分担研究報告書

分担研究者 大山 秀樹

(埼玉医科大学 医学部)

高効率に NKT 細胞を誘導するペプチド型ワクチンのデザインに関する研究

分担研究者 大山秀樹 埼玉医科大学医学部免疫学講座 講師

研究要旨．iNKT 細胞は、初期の免疫応答において重要な制御機構を担っていると考えられる。これら iNKT 細胞は、糖脂質抗原を認識するか、その拘束分子である CD1d 分子には、ペプチドが結合し得ることが報告されている。我々は、これまで Th 細胞の認識するペプチドのアナログか、Th 細胞応答の質的変化をもたらすことを報告してきた。本分担研究課題は、アナログペプチドを用いて iNKT 細胞免疫応答性を人為的に制御する免疫療法を確立することを目的とした。本年度は、その可能性についての手かかりを得るために、CD1d 分子によって提示された抗原ペプチドが、樹立した iNKT 細胞株の増殖応答を誘導するか否かについて調べた。その結果、コンビナトリアル・ペプチド・ライブラリーを含む CD1d 分子結合性ペプチドのすへては、V α 24NKT 細胞に対して全くアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を有さなかった。これらのことから、CD1d 分子結合性ペプチドの同定、およびそのアナログによる iNKT 細胞応答性を人為的に制御することは、現在の計画によっては不可能であることが示唆された。

A 研究目的

インバリエント NKT (iNKT) 細胞は、T 細胞抗原受容体 (V α 24 iTCR) を介した刺激により IFN- γ 、および IL-4 を短時間に大量に産生することから、免疫応答の初期における重要な免疫制御機構を担っていると考えられている。また、iNKT 細胞は、多型のない CD1d 分子によって提示された糖脂質抗原を認識することか知られている。従って、iNKT 細胞の免疫応答を人為的に制御することができれば、種々の免疫疾患の進行を抑制することが可能となる。我々は、これまで Th 細胞の認識するペ

プチドに変異を加えたアナログペプチドを用いて、Th 細胞応答性を増強、あるいは抑制することが可能であることを示してきた。本研究では、多型のない CD1d 分子に結合し、V α 24 iTCR が認識するペプチドを同定し、そのアナログにより iNKT 細胞応答性を人為的に制御することを目的とする。

B 研究方法

1) NKT 細胞株の樹立

V α 24 陽性 T 細胞は、健康人末梢血単核細胞 (PBMCs) から FITC-conjugate 抗ヒト V α 24 抗体 (Beckman-Coulter 社

製) および anti-FITC microbeads (Miltenyi Biotec 社製) を用いて positive selection することによって分離した。rhIL-2(100U/ml)存在下において、得られた細胞と α -GalCer を提示させた後に X 線照射した抗原提示細胞(APC) とを共培養(7日間おきに複数回刺激)することによって α -GalCer を特異的に認識する iNKT 細胞株を樹立した。なお、初代培養においては未熟樹状細胞(iDC)を、また2週目以降は allogenic PBMCs を APC として用いた。iDC は、allogenic PBMCs から anti-CD14 microbeads (Miltenyi Biotec 社製) を用いて分離した CD14 陽性細胞を IL-4 (100U/ml) および GM-CSF (100ng/ml) 存在下で 5 日間培養することによって誘導した。

2) NKT 細胞株性状の同定

樹立した iNKT 細胞の性状を、フローサイトメーター (FACScan, Becton-Dickinson 社製) で細胞表面分子の発現を調べることにより確認した。なお、フローサイトメトリーは、抗ヒト CD4 抗体、抗ヒト CD8 α 抗体 (BD Pharmingen 社製) および抗ヒト CD8 β 抗体、抗 V α 24 抗体、抗 V β 11 抗体、抗 CD161 抗体 (Beckman-Coulter 社製) をそれぞれ一次抗体として用いて行なった。

3) 抗原ペプチドの合成

CD1d 分子に結合することか知られている 2 種のペプチド (OVAp260-278 ,

INFEKLTEWTSSNVCEER、p99 ペプチド , YEHDFFHHIREWGNHWKNFLA-VM)、CD1d 分子結合性モチーフを含むコンヒナトリアルペプチドライブラリー (XXFXX[IL]XXWXXXXXXXXXX) および長さの異なるコンヒナトリアルペプチドライブラリー (X9、X11、X13、X15、X17、X19) を F-moc 法によって合成し、逆相高速液体クロマトグラフィーを行うことによって精製した。

4) ペプチドに対する応答性の評価

合成したペプチドかヒト V α 24NKT 細胞株に誘導するアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性のそれぞれを抗原存在下における増殖能を指標とすることによって評価した。すなわち、V α 24NKT 細胞株をさまざまな濃度の抗原ペプチドおよび APC 存在下で 48 時間培養後、 3 H-thymidine を添加し、16 時間後の取り込み量を調べることによってアゴニスト活性を評価した。また、アンタゴニスト活性は、 α -GalCer および APC 存在下において、さまざまな濃度の抗原ペプチドを加えることによる V α 24NKT 細胞株の増殖阻害を 3 H-thymidine の取り込み量を調べることにより評価した。

(倫理面への配慮)

本研究課題は健常者由来の末梢血単核球から NKT 細胞株を樹立した。本研究の趣旨および意義についての十分な説明を行ない、同意を得た上で被験者の

選定を行なった。

C 研究結果

1) NKT 細胞の樹立

PBMCs から MicroBeads を用いて V α 24 陽性細胞を positive selection することによって分離調整し、rhIL-2(100U/ml) 存在下において、 α -GalCer を提示させた APC と共培養することによって α -GalCer を特異的に認識する iNKT 細胞株を樹立することに成功した。このことは、1) 樹立した T 細胞株が APC 存在下において抗原濃度依存的に増殖活性を示すこと、2) irrelevant である cerebroside に対してはまったく増殖活性を示さないことから確認することかてきた。なお、 1×10^8 個の PBMC から分離調整することができた V α 24 陽性細胞は 1.2×10^5 個 (0.12%) てあった。

2) NKT 細胞株性状の同定

PBMCs から分離した V α 24 陽性細胞を rhIL-2(100U/ml) 存在下で α -GalCer + X 線照射した抗原提示細胞 (APC) と共培養した 3 週後および 6 週後の細胞表面分子 (V α 24、V β 11、CD4、CD8、CD161) の発現をフローサイトメトリーで解析した。V α 24、V β 11 および CD161 とともに 3 週後および 6 週後の細胞において、ほぼ 100% の陽性率を示した。一方、3 週目における CD4⁺ 細胞および CD8⁺ 細胞の割合は、それそ

れ 9.02% および約 30% てあり、CD4⁻CD8⁻ 細胞が多くを占めていたのに対して、6 週目においては、CD4⁺ 細胞、81.05%、CD4⁻CD8⁻ 細胞、18.46% となり、CD4⁺ 細胞が多くを占めた。なお、CD8⁺ 細胞の割合は、0.07% てあった。

3) 合成ペプチドに対する応答性の評価

合成したペプチドがヒト V α 24NKT 細胞に誘導するアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性のそれぞれを評価した。今回合成したペプチドのすべては、V α 24NKT 細胞に対して全くアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を示さなかった。

D 考察

マウス CD1d 分子はペプチドと結合し得ることか報告されている (Tangri, S et al PNAS 95 14314-14319, 1998)。これら CD1d - ペプチド複合体を認識する T 細胞は、多様な TCR を発現する T 細胞集団から構成されている。しかし、ヒトの V α 24 iNKT 細胞に相当するマウス V α 14 iNKT 細胞はペプチド抗原を認識しないことが知られている。

本研究の結果は、ヒト V α 24 iNKT 細胞もマウス V α 14 iNKT 細胞と同様に、CD1d - ペプチドを認識する可能性が低いことを示唆するものである。

マウスにおいては、発生の比較的早期より V α 14 インハリアント TCR 遺伝子の再構成か開始して、この TCR を発現する T 細胞亜集団か末梢に出現する。

以上の結果および報告から、ヒト iNKT 細胞は、i) 発生の初期段階で発現する特殊な内因性の糖脂質リガンドを認識して分化すること、ii) 糖脂質抗原のみを認識し、ペプチド抗原を認識しない TCR を発現する T 細胞亜集団であると考えられ、当初の「CD1d 分子結合性ペプチドの同定、およびそのアナログによる iNKT 細胞応答性を人為的制御」という本分担研究課題の目的の方向性を大きく変更する必要があると考える。

E 結論

ヒトの V α 24 iNKT 細胞株を健常者末梢血から樹立し、それら細胞が認識するペプチドを同定し、そのアナログにより iNKT 細胞応答性を人為的に制御することを目的として、本分担研究課題を行なった。しかし、コンビナトリアルペプチドライブラリーを含めて、考えられ得る CD1d 分子結合性ペプチドのすへては、V α 24NKT 細胞に対して全くアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を有さなかった。これらのことから、CD1d 分子結合性ペプチドの同定、およびそのアナログによる iNKT 細胞応答性を人為的制御することは、大変困難であり、本分担研究課題の目的の方向性を大きく変更する必要があると考える。

F 健康危険情報

特記事項なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Matsushita S, Ohyama H, Kudo H, Tabata H, Matsuoka T HLA-mediated signaling via HLA-peptide-TCR complex determines immune responses of antigen-presenting cells *Current Topics in Peptide & Protein Research, in press*
- 2 Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y Tumor necrosis factor-alpha gene (*TNF- α*) -1031/-863, -857 single nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese *Journal of Clinical Periodontology*, 30, 524-531, 2003
- 3 Meguro M, Nishimura F, Ohyama H, Takashiba S, Murayama Y, Matsushita S Ligation of IFN- γ -induced HLA-DR Molecules on Fibroblasts Induces RANTES Expression via c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Pathway *Cytokine*, 22, 107-115, 2003
- 4 工藤 英子, 河野 隆幸, 西村 英紀, 大山 秀樹ら 歯周治療により炎症マーカーが改善したと考察された重度歯周炎を伴うリウマチ患者の症例報告 *日本歯科保存学雑誌*, 46, 110-117, 2003
- 5 大山 秀樹 歯周病医療から健康科学への貢献とその展望 -生物学の立場から- その2 - サ・クインテッセンス, 22(5), 199-203, 2003
- 6 松下 祥, 植村 靖史, 大山 秀樹 分子擬態による T 細胞セルフトレランスの破綻 *BIO Clinica*, 18, 678-682, 2003