

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

6. 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明

分担研究者 近藤 一博 (東京慈恵会医科大学微生物学講座第1教授)

研究協力者 伊藤 裕章 (大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学)
指原 淳志 (大阪大学大学院医学系研究科小児科学)
山西 弘一 (大阪大学大学院医学系研究科微生物学)

研究要旨 様々な慢性難治性疾患の原因として、多くのウイルスが候補に挙げられている。この中でもヘルペスウイルスは、潜伏感染と再活性化を繰り返して生じることができるため、「慢性」疾患の病態を説明し易く、多くの疾患との関係を指摘されてきた。 β -ヘルペスウイルス亜科は、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒトヘルペスウイルス (HHV-)6、HHV-7 からなり、ほとんどの人に小児期に感染し、マクロファージ系細胞や脳内で潜伏感染・再活性化を生じる。このため β -ヘルペスウイルスは、多くの免疫疾患や中枢神経疾患患者から、再活性化したウイルスが検出され、疾患との関係が報告されているが、潜伏感染動態を直接検証する手段がなかったために、結論には至っていない。

本研究では、 β -ヘルペスウイルスの潜伏感染特異的蛋白の宿主細胞への影響、免疫機構への影響を検討することにより、ヘルペスウイルスの潜伏感染と疾患との関係を検討する。今年度までに、3種のウイルスの潜伏感染遺伝子・蛋白を複数同定し、遺伝子機能解析のための組み換えウイルス作成法も確立した。また、潜伏感染・再活性化の中間に存在し潜伏感染遺伝子を活発に発現する、中間状態の存在を見いだした。これらの成果によって、 β -ヘルペスウイルスの潜伏感染・再活性化と慢性難治性の神経疾患や消化器疾患との関係を検討することが可能となった。

A. 研究目的

β -ヘルペスウイルスは多くの慢性難治性疾患患者で、ウイルスの再活性化が生じることが観察されている。しかし、このウイルスの再活性化は、疾患の結果として生じたのか、再活性化を生じることが疾患の原因や増悪因子となっているのかは、現在の技術では調べることができない。本研究は、この問題を解決するために、i) β -ヘルペスウイルスの潜伏感染と再活性化を直接検査できる方法を開発し、ii) これを用いて、 β -ヘルペスの関与が疑われる疾患と潜伏感染・再活性化の関係を再検討し、iii) β -ヘルペスによる慢性難治性疾患の発症機序を解明して行くことを目的とする。

B. 研究方法

- i) 潜伏感染を直接検討可能な検査法の開発と患者検体の検討: β -ヘルペスウイルスの潜伏感染と再活性化を直接検査できる方法を開発するために、HCMV および HHV-6 の *in vitro* の潜伏感染系を用いて、潜伏感染に特異的な遺伝子発現および蛋白を同定する。また、これから得られる潜伏感染特異的遺伝子にコードされる蛋白を発現させ、これに対する患者の免疫反応を検討する。
- ii) 潜伏感染特異的遺伝子発現の解析による再活性化機序の解明: *In vitro* の実験系および、骨髄移植患者の検体を用いて、ウイルスの再活性化時における潜伏感染特異

的遺伝子の発現を経時的に観察する。これにより、再活性化の最初の段階で生じるウイルス遺伝子を同定し、再活性化機序の解明と再活性化が宿主細胞機能にあたる影響を検討する。

- iii) 遺伝子組み換えウイルスを用いた病原遺伝子の解析: ウイルスと疾患の関係を検証するためには、ウイルス遺伝子が宿主細胞にあたる影響によって、疾患の病態が説明可能でなければならない。ウイルス遺伝子の *in vivo* での解析には、遺伝子 knock out ウイルスなどの組み換えウイルスの作成が必要であるが、HHV-6 と HHV-7 の組み換えウイルスの作成は、これまで誰も成功していなかった。このため、これらのウイルスの組み換え体を作成する技術を開発し、遺伝子機能を解析する。

C. 研究結果

上記の方法をもちいて、HHV-6 の潜伏感染特異的遺伝子発現の発現調節と潜伏感染特異的遺伝子にコードされる蛋白の発現を検討した。この結果、a) HHV-6 の潜伏感染からの再活性化は、潜伏感染特異的遺伝子の発現亢進と潜伏感染特異的遺伝子にコードされる IE1 蛋白の翻訳促進によって生じること、b) 潜伏感染と再活性化の間に、比較的安定な中間状態が存在することを見いだした。

潜伏感染特異的遺伝子蛋白に対する患者の血清抗体の反応を検討したところ、クローン病患者の 8 例中 4 例 (50%) で陽性となることが判明した。健康成人ではこの反応が見られなかったため、これはクローン病と HHV-6 の関連を示すものと考えられた。同じ検査を多発性硬化症患者 10 例に対して行なったが、陽性者はいなかった。

また、HHV-6 の組み換えウイルスを世界に先駆けて作成することに成功し、遺伝子機能を *in vivo* で観察することを可能にした。この結果、HHV-6 とサイトメガロウイルスの潜伏感染時の遺伝子発現が、同じ仕組みで調節されていることが判明した。

D. 考察

我々が今回見いだした潜伏感染の中間状態は、潜伏感染と再活性化の間にある比較的安定な状態であり、*in vivo* および *in vitro* の観察で少なくとも 1 週間存続することが判明した。この状態では、ウイルスの増殖はみられないが、潜伏感染特異的遺伝子を中心にウイルス遺伝子の発現が活発に見られ、マクロファージや脳内で潜伏感染を生じる HHV-6 が、免疫系や中枢神経系に持続的な影響をあたる「場」となると考えられる。

クローン病患者で、潜伏感染特異的遺伝子蛋白に対する異常な反応が見られたことに関しては、a) 患者において潜伏感染蛋白の発現が異常に亢進している、あるいは、b) 患者がこの蛋白に対してもともと強い免疫反応を示す傾向にある、という 2 通りの解釈が可能である。しかし、上述の「中間状態」の観察と総合して考えると、クローン病患者で多くの HHV-6 潜伏感染マクロファージが中間状態をとることによって、宿主免疫系を修飾し、この結果として、免疫疾患であるクローン病が生じている可能性がある。

今後は、症例数を増やし、患者の病状や疾患の型と抗 HHV-6 潜伏感染蛋白抗体価の関係や、治療成績や予後との関係について検討することを予定している。

また、組み換えウイルスを用いた観察により、HHV-6 とサイトメガロウイルスの潜伏感染時の遺伝子発現が、同じ仕組みで調節されていることが判明したことから、これらのウイルスの再活性化が同時に生じる可能性が示唆される。実際に、HHV-6 とサイトメガロウイルスの再活性化が観察される疾患は重複することが多い。これらのことから、疾患と再活性化の検討をする際には、再活性化が原因となるか、結果として再活性化が生じるかの区別が、ますます重要になると考えられる。今回新たに見いだされた、再活性化の前段階である中間状態は、この意味でも重要な指標になると考えられる。

E. 結論

今回の β -ヘルペスウイルスの潜伏感染特異的

遺伝子の研究から、潜伏感染特異的遺伝子蛋白が、慢性難治性疾患研究に対して有用なマーカーとなることが示唆された。また同時に、少なくとも一部のクローン病患者と HHV-6 の潜伏感染が関係することが示唆された。

今後、臨床疫学研究により、疾患に対する潜伏感染蛋白の関連をさらに検討し、同時にマクロファージなどの潜伏感染宿主細胞機能に対する潜伏感染蛋白の影響を解明すれば、慢性難治性疾患における β -ヘルペスウイルスの関与がかなり明らかになるものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Kondo, Sashihara J, Shimada K, Amo K, Miyagawa H, Takemoto M, Yamanishi K. 2003. Recognition of a Novel Stage of Beta-Herpesvirus Latency in Human Herpesvirus 6. *Journal of Virology*; 77(3):2258-64.
2. K. Kondo, Nozaki H, Shimada K, Yamanishi K. 2003. Detection of a gene cluster that is dispensable for human herpesvirus 6 replication and latency. *Journal of Virology*; 77(19):10719-24.
3. M. Takemoto, Mori Y, Ueda K, Kondo K, Yamanishi K. 2004. Productive human herpesvirus 6 infection causes aberrant accumulation of p53 and prevents apoptosis. *Journal of General Virology*; 85: 869-879.
4. K. Shimada, Kondo K, Yamanishi K. 2004. Human Herpesvirus 6 Immediate-Early 2 Protein Interacts with Heterogeneous Ribonucleoprotein K and Casein Kinase 2. *Microbiology and Immunology* (in press).
5. K. Tanaka-Taya, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, Shintaro Okada S, Yamanishi K. 2004. Human herpesvirus 6 (HHV-6) transmits from parent to child by integration form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *Journal of Medical Virology* (in press)

2. 学会発表

1. 近藤一博、山西弘一 ヒトヘルペスウイルス(HHV)-6 及び HHV-7 の遺伝子治療用ベクターへの応用 第 51 回日本ウイルス学会 (平成 15 年 10 月 27-29 日 京都)
2. K. Kondo, H. Nozaki, K. Shimada, and K. Yamanishi. Analysis of the beta herpesvirus latency-associated gene expression using recombinant human herpesvirus 6. The 28th International Herpesvirus Workshop (平成 15 年 7 月 26-31 日) Madison Wisconsin USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

7. 難治性血管炎を誘発する真菌を主とした感染症

分担研究者 鈴木 和男 (国立感染症研究所生物活性物質部室長)

研究要旨 真菌感染に由来する分子などによって、腎炎、SLEをはじめとする難治性血管炎が誘導されることが指摘されている。*Candida* 症や *Aspergillus* 症は、主に好中球機能の低下にともなった日和見感染で、その主たる原因は、好中球殺菌酵素の不全によるものである。一方、好中球殺菌酵素の不全は、重篤な免疫不全を誘発し、自己抗体産生性の難治性血管炎の発症に関与することが強く示唆されている。とりわけ、われわれは、真菌由来分子によって誘導される好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) が、難治性血管炎の病態に相関していることを明らかにした。また、*C. albicans* 由来分子の glycoprotein CADS/CAWS が血管炎を誘導する。その誘導にはマウスの系統差があることを示した。こらかのことから、CADS/CAWS 誘導に反応する遺伝子群を特定するため、系統差を利用して遺伝子マップ解析をし、CADS/CAWS での誘導にかかわるサイトカインや好中球の活性化を検討し、TNF α 、IL-6 および IL-10 の関与を認めた。また、CAWS 投与初期には、好中球が血中に一過的動員され活性化状態にあることがわかった。

A. 研究目的

これまで、*Candida* 症や *Aspergillus* 症が、殺菌酵素の不全を有する好中球機能の低下による日和見感染の結果として引き起こされることが報告されている (Med. Mycol., 2002, J. Infect. Dis. 2002, J. Infect. Dis. 1 2000)。さらに、われわれは、マウスの遺伝子欠損の実験から、好中球の殺菌酵素の不全を要因とする好中球機能の低下が、カンジダ症やアスペルギルス症を誘発している報告してきた (Infection Immunity 1999, J. Infectious Diseases 2000)。また、難治性疾患の腎炎、SLEをはじめ難治性血管炎は、好中球機能不全により誘導されることが指摘されていること。また、真菌由来分子によって引き起こされる好中球顆粒内殺菌酵素の不全が、重篤な免疫不全の誘発や、自己抗体の産生に関与するなど、難治性血管炎の発症およびその要因になっていることを示してきた。難治性血管炎の1つの病態のマーカーとして臨床検査として現在広く利用されている好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA) も血管炎の病因と深く関与していることも明らかにしてきた。

難治性血管炎のなかでも、microscopic polyangiitis (MPA)などの顕微鏡所見では、多くの好中球浸潤が認められることがあるなど、血管炎の病態に炎症細胞が関与していることが病理所見から観察されている。このことから、血管炎の組織には、マイクロファージ、好中球、リンパ球の炎症細胞の浸潤が観察される。本来、炎症細胞は外来異物などを排除する生体防御機能として作用するが、血管傷害もひきおこしていると推定されている。これと関連して、血管炎患者には血清中に ANCA が上昇するや、好中球抗体と好中球が血管炎に関与していることが明らかになってきている。

ところで、自己抗体 MPO-ANCA 抗体が好中球を活性化し、生体側に不利な細胞傷害を引き起こすことがわかってきている。臨床のデータに加えて、モデルマウスにおいても明らかにされてきている。特に、カンジダ菌成分による血管炎誘導の際においても、MPO-ANCA が血清に顕著に検出される。そこで、われわれは、真菌由来分子が MPO-ANCA 産生と活性化好中球による難治性血管炎の発症に関与しているかについて病態モデルマウスでの解析を進め、真菌

由来分子によって、殺菌酵素の不全をともなって血管炎の誘導が引き起こされることを示した(Inflammation 2001)。すなわち、*C. albicans* derived substances (CADS/CAWS)の接種によって冠状動脈炎を発症するモデルマウスにおいて、血管炎発症にともない、好中球抗体 MPO-ANCA が誘導される。この MPO-ANCA 上昇には、MPO が関与してことを MPO ノックアウトマウス (MPO-KO) に CADS を接種して証明した。また、好中球殺菌酵素の不全が、重篤な免疫不全の誘発や、自己抗体産生性の難治性血管炎の発症に関与することが強く示唆されている。とりわけ、好中球自己抗体 ANCA が病態に相関していることを明らかにした(Inflammation 2001)。そこで、本研究では、*C. albicans* 由来分子の glycoprotein CADS/CAWS が血管炎を誘導するが、マウスの系統差があることに注目し、CADS/CAWS 誘導に反応する遺伝子群を特定することにした。CADS/CAWS による誘導でのサイトカイン産生におけるマウスの系統差および好中球の機能を解析した。また誘導の際のマウスの系統差を利用して遺伝子マップ解析もあわせて検討した。

B. 研究方法

- 1) 血管炎モデルマウスの調整:本疾患モデルは、川崎病リスクの冠状動脈炎発症モデルとして作られ、罹患児糞便から分離した *C. albicans* 由来物質 (CADS および CAWS) により誘導した。
- 2) DBA/2, C57BL/6, C3H/HeN, CBA/2 マウスに CADS/CAWS を 5 日間 ip 投与を第 1、5 週に施行し、9 週後に冠状動脈炎の病理評価により染色体マーカとのリンクを算出した。また、別途、初期投与 1 週間後に、脾臓細胞を分取し培養し、CADS/CAWS を加えて、培養液中へのサイトカインの遊離を ELISA 法により測定した。
- 3) マウス血清中の MPO-ANCA 値:ヒトおよびマウス MPO の ELISA により測定した。

C. 研究結果

- 1) CAWS によって、CADS 同様、冠状動脈炎が誘導された。冠状動脈炎の頻度は、

DBA/2 で 100%近い値を示した (図 1)。冠状動脈炎の程度は、DBA/2, C57BL/6, C3H/HeN の順であり、CBA/2 は冠状動脈炎がほとんど検出されなかった。



図 1. CAWS による冠状動脈炎

- 2) CAWS 誘導の各種系統マウスの脾臓を CAWS の種々の濃度で刺激し、産生されたサイトカインを測定した。その結果、冠状動脈炎の程度と連動して、炎症性サイトカイン $TNF-\alpha$ 産生は、DBA/2 で高値を示した (図 2)。しかし、CBA/2 では殆ど検出されなかった。一方、他の炎症性サイトカインも同様の結果を示した。しかし、抗炎症性サイトカイン IL-10 はそれとは逆の結果を示した。
- 3) 冠状動脈炎は、増殖性肉芽腫性炎の像を呈した。個体間で明らかな組織学的差異は見出せなかった。一方、サイトカインの誘導は、マウス系統によって異なり、顕著にあらわれたサイトカインは、Interferon- γ , $TNF-\alpha$, IL-1, IL-6, IL-10 であった。血管炎誘導モデルにおいては、これらのサイトカインは CAWS 誘導の冠状動脈炎との相関が認められた。このことから、本モデルにおける冠状動脈炎発生抑制には複数の遺伝子の関与が考えられた。N2, N3 におけるヘテロ出現数を検討した結果、少なくとも 3 個の染色体上に抑制遺伝子がマッピングされた。具体的には、真菌由来分子によって誘導されるサイトカイン産生と活性化好中球に重要な役割を担っているものと考えられる遺伝子群は、Chr-1, Chr-4

は誘導遺伝子、Chr-4 は抑制性の 3 箇所の候補部位があがった。

以上から、*Candida albicans* 由来糖ペプチドが、MPO および MPO-ANCA 産生と発症誘導に不可欠であり、サイトカインと連動する活性化好中球に重要な役割を担っており、すくなくとも 3 箇所の染色体部位の遺伝子が関与しているものと考えられる。

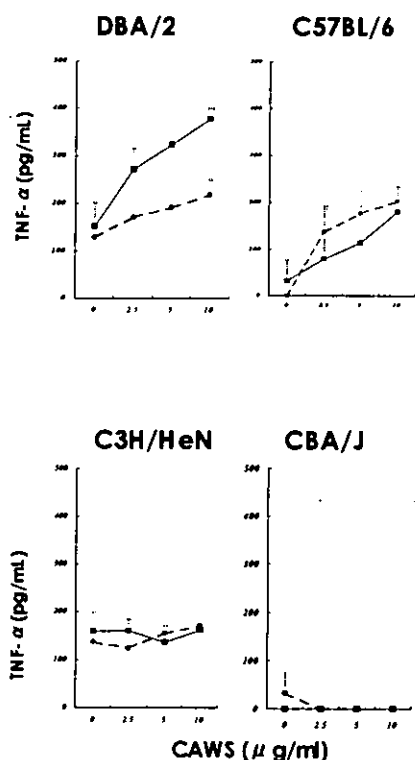


図 2. CAWS による TNF α 産生の亢進
 実線：脾臓を CAWS で刺激
 点線：PBS 刺激の control

D. 考察

Candida albicans 由来糖ペプチドにより冠状動脈炎が誘発される。その誘発には、好中球殺菌酵素 MPO およびその自己抗体 MPO-ANCA の産生が発症誘導に不可欠であることをわれわれは明らかにしてきた。CAWS などの真菌由来分子が炎症性サイトカインを誘導し、それと連動する好中球の活性化が重要な役割を担っているものと考えられる。

本モデルマウスは、今回主としておこなった CAWS の実験の他にも CADS の接種によって誘発される冠状動脈炎を発症するモデルマウスとして、Murata らが作製している。本動脈炎誘発モデルマウスでは、増殖性肉芽腫性炎を冠状動脈に高率に惹起させることが可能であり、病変の組織像および分布の類似性から川崎病動脈炎モデルとして考えられている。本モデルマウスは、カンジダ菌体抽出物をマウス腹腔内に接種することにより系統的動脈炎を惹起させる。

一方、マウス系統により発症頻度に差が認められている。この発症の原因に MPO と MPO-ANCA にあるのではないかと考え、MPO 遺伝子欠損マウスを用いて血管炎発症と好中球抗体 MPO-ANCA の誘導との関係を調べ、MPO が主たる要因になっていることをすでに報告した。その系統差を利用した染色体マップから今回 3 箇所の候補部位があがった。

E. 結論

真菌感染に由来する分子などによって、腎炎、SLE をはじめとする難治性血管炎が誘導される。とりわけ、カンジダ菌由来分子が血管炎を誘導し、難治性血管炎の病態マーカーである好中球自己抗体 ANCA も病態と連動した。

一方、マウス系統により発症頻度に差が認められている。この発症の原因に MPO と MPO-ANCA にあるのではないかと考え、MPO 遺伝子欠損マウスを用いて血管炎発症と好中球抗体 MPO-ANCA の誘導との関係を調べ、MPO が主たる要因になっていることをすでに報告した。その系統差を利用した染色体マップから Chr-1, Chr-4 は誘導遺伝子、Chr-4 は抑制性の遺伝子として、3 箇所の候補部位があがった。*Candida albicans* 由来糖ペプチドが、発症誘導に不可欠で、サイトカインと連動する活性化好中球が重要な役割を担っているものと考えられる。

本研究は、大川原明子、長尾朋和、越尾修、亀岡洋祐（以上一国立感染研）、直江史郎、高橋啓、大原関利章（以上一東邦大・医）、大野尚仁、三浦典子（以上一東京薬大）の諸先生方の協力により行なわれた研究をもとに記載した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akiko Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, Eri Muso, Takahiko Ono, Kan Saiga, Kyuichi Nemoto, Kazuo Suzuki. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrology, Dialysis and Transplantation*, 2004 in press
2. Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K. and Yamamoto, K., Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 314: 46-53, 2004.
3. Ohashi, Y.Y., Kameoka, Y., Persad, A.S., Kohi, F., Yamagoe, S., Hashimoto, K., and Suzuki, K. Novel missense mutation found in Japanese patient with myeloperoxidase deficiency. *Gene* in press.
4. Ichimori, K., Fukuyama, N., Nakazawa, H., Aratani, Y., Koyama, H., Takizawa, S., Kameoka, Y., Ishida-Okawara, A., Kohi, F., and Suzuki, K. Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - Study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. *Free Radical Research* 37: 481-489, 2003.
5. Murata, K., Inami, M., Kubo, S., Kimura, M., Yamashita, M., Hosokawa, H., Nagao, T., Suzuki, K., Hashimoto, K., Shinkai, H., Koseki, H., Taniguchi, M., Ziegler, S.F., H., Nakayama, T. CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type-II collagen antibodies. *Int. Immunol.* 15: 987-992, 2003.
6. Nunoi, H., Kohi, F., Kajiwara, H., Suzuki, K. Prevalence of Inherited Myeloperoxidase Deficiency in Japan. *Microbiol Immunol.* 47: 527-531, 2003.
7. Sakamoto, M., Hasegawa, A., Sugaya K., Hashimoto, K., Kimura, M., Yamashita, M., Suzuki, K., Nakayama, T. Distinct calcium response induced by T-cell antigen receptor stimulation in thymocytes and mature T cells. *Bioimages* 11: 1-8, 2003.
8. Suzuki, K. Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA-related vasculitis *Internal Med.* 42: 552-553, 2003.
9. Kamei, K., Sano, A., Kikuchi, K., Makimura, K., Niimi, K., Suzuki, K., Uehara, Y., Okabe

N., Nishimura, K., Miyaji, M. The trend of imported myucoses in Japan. *J. Infect. Chemother.* 9: 16-20, 2003.

10. Mie Ito, Oda, Yamagoe S. Suzuki K, Tanokura, M. Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16 kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. *Protein Expression Purif.* 27: 272-278, 2003.
11. 鈴木和男 血管炎をめぐる世界の動き「医学のあゆみ」206:123-126, 2003
12. 鈴木和男 血管炎発症機構の解析研究—活性化好中球の関与「医学のあゆみ」206:133-139, 2003
13. 鈴木和男 ANCA関連血管炎の発症機序—活性化好中球の関与—リウマチ科 29:228-236, 2003.
14. 大川原明子、鈴木和男、猪原登志子、小野孝彦、武曾恵理、雑賀 寛、根本久一：半月体形成性腎炎モデルとしての SCG/Kj マウスの好中球機能 *Pharma Medica* 21: 157-161, 2003.

2. 学会発表

1. Kazuo Suzuki Seminar in the Department of Biochemistry, Cornell University, Medical School (New York City, USA). "Role of activated neutrophils in vasculitis development: in-vivo imaging", June 6, 2003, New York City, USA.
2. 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 nicotineamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*." Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
3. Kazuo Suzuki "Role of activated neutrophils in vasculitis development". Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
4. Nagao, T., Koshio, O., Mabuchi, A., Ohno, N., Takahashi, K., Minamitani, H., Suzuki, K. "Imaging of renal microvascular injury induced by immune abnormality" Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
5. Koshio, O., Nagao, T., Ishida-Okawara, A., Mabuchi, A., Suzuki, K. "The contribution of PMN and the degranulated substances to the activation of p38 MAPK and Caspase 8 in the introduction of Apoptosis of human

- Endothelial cell" Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
6. Kazuo Suzuki Seminar in Marine Biological Laboratories. "Role of activated neutrophils in vasculitis development: in-vivo imaging" USA, June 13, 2003, Woods Hole.
 7. 猪原登志子、小野孝彦、野垣文昭、北徹、鈴木和男、武曾恵理「ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療効果の検討」第 46 回日本腎臓病学会学術総会、2003 年 5 月 23 日、東京
 8. Kazuo Suzuki International Symposium Sponsored by Center of Excellence for Advanced Life Science on the Base of Bioscience and Nanotechnology, Sapporo (北海道大学 21 世紀 COE プログラム) —バイオとナノを融合する新生命科学拠点— ナノ・イメージングによって切り開く新たなバイオ医療 "In-vivo Imaging of Vasculitis", 2003 年 7 月 19 日、札幌
 9. Manger, B., Suzuki, K. 5th International Symposium on IVIG-Intravenous Immunoglobulins in the Third Millenium, "Chair Talk: The Use of IVIG in Collagen Vascular Diseases, Vasculitis and Atherosclerosis", September 25-27, 2003, Interlaken, Switzerland
 10. Ito-Ihara, T., Suzuki, K., Ono, T., Nogaki, F., Suyama, K., Kita, T., Muso, E. 5th International Symposium on IVIG-Intravenous Immunoglobulins in the Third Millenium. "Beneficial effect of intravenous immunoglobulin for patients with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA)-associated rapidly progressive glomerulonephritis", September 25-27, 2003, Interlaken, Switzerland
 11. 鈴木和男「血管炎の研究がめざす新たな展開：特に ANCA 関連血管炎」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 12. 高橋啓、大原関利章、鈴木和男、直江史郎「マウス系統的血管炎誘発モデルにおける動脈病変の免疫組織学的検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 13. 武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦、野垣文昭、北徹、鈴木和男「ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療効果の検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 14. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、大野尚仁「真菌多糖の in vitro における IFN- γ 産生増強作用の検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 15. 長谷川明洋、長尾朋和、村田薫、稲見真倫、鈴木和男、中山俊憲「関節炎および血管炎の発症における CD69 分子の役割」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 16. 越尾修、長尾朋和、石田-大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「血管炎への好中球の関与と炎症性サイトカインによるヒト血管内皮細胞のアポトーシス誘導シグナルの検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学研究会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 17. 鈴木和男「レビュートーク：血管炎に関与するインターフェロノン」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
 18. 三浦典子、新郷裕子、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大川原明子、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 由来可溶性菌体外多糖 CAWS の血管炎誘発活性」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
 19. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、栗原和記、Keiko Ozato、鈴木和男、大野尚仁第「真菌多糖の樹状細胞分化の調節におよぼす影響—IRF-8 欠損マウスの解析から—」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
 20. 越尾修、長尾朋和、石田-大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「血管炎に関与する TNF α および IL-1 β によるヒト血管内皮細胞のアポトーシス誘導シグナルの検討」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京

21. 鈴木和男、大川原明子、長尾朋和、村山研、亀岡洋祐、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大野尚仁、三浦典子、武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦「血管炎発症における活性化好中球の関与」第14回日本生体防御学会、2003年7月31日～8月2日、京都
22. 鈴木和男、松岡俊行、栗原和記、佐々木健夫、Keiko Ozato「血管炎に關与する異常好中球：IRF-8 ノックアウトマウスによる解析」第14回日本生体防御学会、2003年7月31日～8月2日、京都
23. 鈴木和男、大川原明子、長尾朋和、村山研、亀岡洋祐、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大野尚仁、三浦典子、武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦「血管炎発症における活性化好中球の関与」第14回日本生体防御学会、2003年7月31日～8月2日、京都
24. 鈴木和男、南谷晴之、山本健二、眞島利和「日本バイオイメージング学会と化学工学会の連携による『ナノとバイオの融合学理構築、産業基盤形成』シンポジウム—公開シンポジウム「ナノとバイオの融合学理構築、産業基盤形成」開催から学ぶ—」、2003年9月10日～11日、松島
25. 鈴木和男、長尾朋和、長谷川明洋、中山俊憲、大野尚仁、三浦典子、越尾修、馬淵綾子、南谷晴之「新しいイメージング技術へ向けて—IVI技術(in-vivo imaging)—」2003年9月10日～11日、松島
26. 大川原明子、猪原登志子、武曾恵理、小野孝彦、雑賀寛、根本久一、鈴木和男「糸球体腎炎の発症、進行における好中球活性化の役割- SCG/Kj マウスを用いた解析 -」第15回腎とフリーラジカル研究会、2003年9月20日、東京
27. Mabuchi, A., Nagao, T., Koshio, O., Suzuki, K., and Wheatley, A.M. "Induction of F4/80^{high+} Mac-1^{high+} nonparenchymal adherent liver cell suppressor function in T cell-mediated murine hepatic injury: involvement of nitric oxide?" American Association of Liver Diseases in 2003, October 24-28, 2003, Boston, USA..
28. 鈴木和男、長尾朋和、越尾修、馬淵綾子、大野尚仁、高橋啓、南谷晴之、直江史郎「In-vivo イメージングによる腎微小血管傷害の解析」第8回血管炎研究会、2003年10月18日、秋田
29. 三浦典子、三川浩輝、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋啓、直江史郎、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 菌体外多糖画分 CAWS の DBA/2 マウスに対する血管炎誘発活性と反応性の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日～25日、八王子
30. 長谷川明洋、長尾朋和、村田薫、稲見真倫、鈴木和男、中山俊憲「関節炎の発症におけるCD69分子の役割」第9回MPO研究会、2003年10月24日～25日、八王子
31. 川上真紀子、鈴木和男、F. Vilhardt, K-H Krause, 澤田誠「脳内細胞ミクログリアのMPO産生」第9回MPO研究会、2003年10月24日～25日、八王子
32. 荒谷康昭、倉文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Maeda、小山秀機「ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのクリプトコッカス感染防御能の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日～25日、八王子
33. 長尾朋和、長谷川明洋、中山俊憲、大野尚仁、三浦典子、越尾修、馬淵綾子、南谷晴之、鈴木和男「In-vivo イメージングによる腎微小血管傷害の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日～25日、八王子
34. 大原関利章、横内幸、若山恵、山田仁美、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、直江史郎、高橋啓「カンジダ菌体抽出物誘導動脈炎モデルにおける動脈炎形成過程の経時的検討」第9回MPO研究会、2003年10月24日～25日、八王子
35. 三浦典子、三川浩輝、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋啓、直江史郎、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 菌体外多糖画分 CAWS の DBA/2 マウスに対する血管炎誘発活性と反応性の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日～25日、八王子
36. 大川原明子、武曾恵理、猪原登志子、高野薫、野口洋子、松田潤一郎、鈴木和男「遺伝的ネフローゼ腎炎モデルマウスICGNの好中球活性化の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日～25日、八王子
37. 亀岡洋祐、Amanda Persad、池田文恵、仁保善之、鈴木和男「新規ミエロペルオキシダーゼ欠損症患者に同定された遺伝子変異」第9回MPO研究会、2003年10月24日～25日、八王子

38. 鈴木和男「MPO-ANCA 関連血管炎」第 9 回 MPO 研究会、2003 年 10 月 24 日～25 日、八王子
39. 越尾修、長尾朋和、大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「The contribution of PMN and the degranulated substances to the activation of p38 MAPK and Caspase 8 in the introduction of Apoptosis of human Endothelial cell」第 76 回日本生化学会大会、2003 年 10 月 16 日～18 日、横浜
40. 星野昭芳、花木賢一、鈴木和男、山本健二「生体内移入細胞標識マーカーとしての量子ドットの応用」第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会、2003 年 10 月 29 日～31 日、横浜
41. 鈴木和男「細胞・組織障害のメカニズム解析ー血管炎を分子とバイオイメージングで解析するー」第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会、2003 年 10 月 29 日～31 日、横浜
42. 長尾朋和・長谷川明洋・越尾 修・馬淵綾子・南谷晴之・中山俊憲・鈴木和男「活性酸素誘導の血小板血栓形成における CD69 の役割」第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会、2003 年 10 月 29 日～31 日、横浜
43. 星野昭芳、花木賢一、鈴木和男、山本健二「生体内移入細胞標識マーカーとしての量子ドットの応用」第 12 回日本バイオイメージング学会学術集会、2003 年 10 月 29 日～31 日、横浜
44. 三川浩輝、三浦典子、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、直江史郎、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 由来菌体外多糖画分 CAWS による致死的血管炎誘発メカニズムの解析」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
45. 大川原明子、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男「*C. albicans* 由来物質 CAWS によって誘起されるマウス冠状動脈炎発症における活性化好中球の役割について」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
46. 村田薫、稲見真倫、長谷川明洋、久保秀一、宮本健志、木村元子、山下政克、長尾朋和、鈴木和男、谷口克、中山俊憲「CD69 ノックアウトマウスにおける抗 type II コラーゲン抗体誘導性関節炎発症の抑制」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
47. 長尾朋和、長谷川明洋、越尾 修、馬淵綾子、南谷晴之、中山俊憲、鈴木和男「活性酸素誘導性の血小板血栓形成における CD69 の役割」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
48. 村山 研、長尾朋和、越尾 修、長谷川明洋、中山俊憲、新井孝夫、鈴木和男「活性化好中球における CD69 分子の表面局在」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
49. 濱野慶朋、広瀬幸子、鈴木和男「MPO-ANCA 関連半月体形成性腎炎自然発症モデル SCG/Kj マウスの遺伝的解析」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
50. 武曾恵理、大川原明子、鈴木和男「遺伝的ネフローゼ腎炎モデルマウス ICGN の好中球活性化の解析」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
51. 鈴木和男 “Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA-related vasculitis” 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
52. Aratani, Y., Kura, F., Suzuki, K., and Koyama, H. “*In vivo* role of myeloperoxidase for the host defense against fungal and bacterial infections.” 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
53. 荒谷康昭、倉 文明、鈴木和男、小山秀機「*Cryptococcus neoformans* 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の役割」第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10 日、福岡
54. 亀岡 洋祐、Persad Amanda、橋本 雄之、鈴木和男「ミエロペルオキシダーゼの第 8 ヘリックスにおける日本人集団の変異頻度」第 26 回 日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 10～13 日、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

8. クローン病の病因微生物の関与

分担研究者 中島 淳 (横浜市立大学大学院分子消化管内科学助教授)

研究要旨 Crohn 病(以下 CD) は若年者に発症し腸管に潰瘍を形成する原因不明の難病で、これまで欧米に多く発症していたが、近年わが国においても患者数が急増しており、その原因究明と治療法の開発は厚生行政上も急務の課題である。CD にはその初期病変として直径 1-2 mm の Aphtoid Lesion が内視鏡的には知られている。今回の研究ではこの初期病変における Virus の存在確認を分子生物学的手法を用いて網羅的に検索し同定することを目的として本年度より着手した。網羅的遺伝子発現解析のデータベースから Virus 特異的な遺伝子発現は認められないものの癌遺伝子である、myc, ras の発現が認められた。今後解析手法を交付してさらに解析を進めていく予定である。

A. 研究目的

Crohn 病(以下 CD) は若年者に発症し腸管に潰瘍を形成する原因不明の難病で、これまで欧米に多く発症していたが、近年わが国においても患者数が急増しており、その原因究明と治療法の開発は厚生行政上も急務の課題である。本疾患は消化管を主座とする自己免疫性疾患と考えられているが微生物、とりわけ Virus の関与を示唆する報告が多く報告されてきているが、いまだコンセンサスは得られていない。CD にはその初期病変として直径 1-2 mm の Aphtoid Lesion が内視鏡的には知られている。我々はこれまで CD 患者の初期病変における遺伝子発現のプロファイリングを行い疾患に関与の強く疑われる遺伝子についてモデル動物を用いて Validation を行いいくつかの治療に応用可能な遺伝子を同定してきた。今回の研究ではこのノウハウを用いて初期病変における Virus の存在確認を分子生物学的手法を用いて網羅的に検索し同定することを目的として本年度より着手した。

B. 研究方法

CD の患者より大腸内視鏡下に初期病変を採取し Virus の存在確認を分子生物学的手法を用い

て網羅的に検索し同定することを学内倫理委員会に申請し生検材料を採取し解析する。また、すでに別の研究プロジェクトで行ってきた初期病変における網羅的遺伝子発現解析のデータベースから Virus 由来の遺伝子の発現の有無を Bioinformatics の手法を用いて検索した。

(倫理面への配慮)

平成 15 年 10 月に学内倫理委員会において承認を得たのち、十分な患者様の同意を得て検体を採取している。

C. 研究結果

学内倫理委員会の承認を平成 15 年 10 月に得たのを受け生検材料の採取に着手し、現在 4 検体が集まっている。また、別の研究プロジェクトで行ってきた初期病変における網羅的遺伝子発現解析のデータベースから Virus 特異的な遺伝子発現は認められないものの癌遺伝子である、myc, ras の発現が認められた。

D. 考察

CD の初期病変は疾病の発症に関与する異常を示唆する情報が含まれている可能性が極めて

高いと考えられる。SARS など他の感染性疾患における進行病変での解析には疾患の原因究明には非特異的反応が多くその解析は大変困難を極めているのは周知の事実である。CD の初期病変解析はこのような問題無しに疾患の発症に直接つながる異常を同定できる可能性があると考えられる。今後は研究班のほかの分担研究者のかたがたと協力して解析をどう行っていくかが重要な点であると考えられる。

E. 結論

今後検体数が 10 検体程度になったところで Virus 解析に着手する。研究の進捗状況が遅いのは、本年度が初年度であるため倫理委員会の申請に時間がとられたためである。

初期病変における網羅的遺伝子発現解析のデータベースから Virus 由来の遺伝子の発現の有無を Bioinformatics の手法を用いて検索した範囲では Virus 特異的遺伝子は見つけることができなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iijima H, Neurath MF, Nagaishi T, Glickman JN, Nieuwenhuis EE, Nakajima A, Chen D, Fuss IJ, Utku N, Lewicki DN, Becker C, Gallagher TM, Holmes KV, Blumberg RS. Specific Regulation of T Helper Cell 1-mediated Murine Colitis by CEACAM1. *J Exp Med* 16, 199(4), 471-82, 2004.
2. Katayama K, Wada K, Miyoshi H, Ohashi K, Tachibana M, Furuki R, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakajima A, Kadowaki T, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Kamisaki Y, Mayumi T. RNA interfering approach for clarifying the PPAR γ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA. *FEBS Letters*, 2004, in press.
3. Abe Y, Inamori M, Togawa J, Kikuchi T, Muramatsu K, Chiguchi G, Kawamura H,

- Kobayashi N, Kirikoshi H, Sakaguchi T, Takamura T, Nakajima A, Ueno N, Sekihara H. The Comparative effects of single intravenous doses of omeprazole and famotidine on intragastric pH. *J Gastroenterol*, 2004, in press.
4. Matsuhashi N, Nomura S, Nakajima A, Kamisaki M. Inflammatory fibroid polyps of the stomach and *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2004, in press.
5. Kudo C, Wada K, Masuda T, Yonemura T, Shibuya A, Fujimoto Y, Nakajima A, Niwa H, Kamisaki Y. Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of the caspase cascade and regulation of the cell cycle. *J Neurochemistry*, 2004, in press.
6. Inamori M, Togawa J, Takahashi K, Yoneda M, Fujisawa N, Iwasaki T, Ozawa Y, Kikuchi T, Muramatsu K, Chiguchi G, Matsumoto S, Kawamura H, Abe Y, Kirikoshi H, Kobayashi N, Sakaguchi T, Takamura T, Nakajima A, Ueno N, Sekihara H. Comparison of the effect on intragastric pH of a single dose of omeprazole or rabeprazole: which is suitable for on-demand therapy? *J Gastroenterol Hepatol* 18(9), 1034-8, 2003.
7. Inamori M, Togawa J, Kawamura H, Abe Y, Naitoh H, Nagase H, Nakajima A, Saito T, Tominaga S, Ueno N, Tanaka K, Sekihara H. Severe ulceration of the stomach after endoscopic injection sclerotherapy. *Endoscopy* 35(12), 1082, 2003.
8. Kudo C, Kori M, Matsuzaki K, Yanai K, Nakajima A, Shibuya A, Niwa H, Kamisaki Y, Wada K. Diclofenac inhibits proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biochemical Pharmacology* 66, 289-295, 2003.
9. Matsuhashi N, Nishi Y, Nagoshi D, Kanemoto H, Nakajima A. Epidemic enterocolitis possibly as a result of norwalk virus infection presenting as ischemic colitis. *Digestive Endoscopy* 15, 138-141, 2003.
10. Katayama K, Wada K, Nakajima A, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakagawa S, Kadowaki T, Nagai R, Kamisaki Y, Blumberg R, Mayumi T. A Novel PPAR γ Gene Therapy to Control Inflammation Associated With Inflammatory Bowel Disease in a Murine Model. *Gastroenterology* 124, 1315-1324, 2003.
11. Inamori M, Togawa J, Nagase H, Abe Y, Umezawa T, Nakajima A, Saito T, Ueno N, Tanaka K, Sekihara H, Kaifu H, Tsuboi H, Kayama H, Tominaga S, Nagura H. Clinical characteristics of Japanese reflux esophagitis

patients as determined by Los Angeles classification. *J Gastroenterol Hepatol* 18, 172-176, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

2. 学会発表

1. 山田佳彦、中島 淳、関原久彦
Dehydroepiandrosterone (DHEA)のアポトーシス抑制作用と長寿における役割 第100回日本内科学会講演会 シンポジウム 福岡 平成15年4月1日
2. Nobutaka Fujisawa, Emi Osawa, Atsushi Nakajima. Suppression of Colon Tumorigenesis By PPAR γ . アメリカ消化器病学会ポスター発表 フロリダ州オーランド 平成15年5月18日
3. Hideki Iijima, Takashi Nagaishi, Markus Neurath, Jonathan Glickman, Atsushi Nakajima, Thomas Gallagher, Kathryn Holmes, Richard S. Blumberg. Specific Regulation of T Helper-1 Mediated Murine Colitis by CEACAM1. アメリカ消化器病学会 プレナリーセッション フロリダ州オーランド 平成15年5月19日
4. Atsushi Nakajima, Alan David Levine IBD Research Forum アメリカ消化器病学会 AGA Research Forum 座長 フロリダ州オーランド 平成15年5月20日
5. 松橋信行、中島 淳 難治性潰瘍性大腸炎の治療における tacrolimus (FK506)の位置付け—ciclosporinとの対比 第74回日本消化器内視鏡学会関東地方会 シンポジウム 平成15年6月
6. 中島淳、永瀬肇、上野規男、松橋信行 Crohn 病の腸管狭窄に対する治療法の選択 第74回日本消化器内視鏡学会関東地方会 シンポジウム 平成15年6月
7. 中島淳、松橋信行、鈴木淳 虚血性腸疾患に対する PPAR γ リガンドによる治療の可能性 第66回日本消化器内視鏡学会総会 シンポジウム (動脈硬化と腸疾患)
8. 藤澤信隆、米田正人、中島淳 PPAR γ による大腸癌の chemoprevention に関する検討 第45回日本消化器病学会 パネルディスカッション 平成15年10月16日
9. N. Fujisawa, M. Yoneda, H. Takahashi, E. Osawa, T. Yoshii, A. Nakajima. Chemopreventive effects of peroxisome proliferators-activated receptor gamma on colon carcinogenesis. 11th UEGW, 1-5 November, 2003.

9. 難治性気道感染症における細菌感染 人氣道上皮細胞上におけるインフルエンザ菌の バイオフィーム産生

分担研究者 永武 毅 (長崎大学熱帯医学研究所教授)

研究協力者 渡辺 浩、大石 和徳 (長崎大学熱帯医学研究所)

研究要旨 非莢膜保有インフルエンザ菌(NTHi)の人氣道上皮細胞上のバイオフィーム産生について検討した。慢性閉塞性肺疾患患者より分離された NTHi がバイオフィーム産生能をもつことを biofilm growth assay と continuous flow chamber を使用した confocal laser scanning microscopy (CLSM)により明らかにし、同様に人氣道上皮細胞上でのバイオフィーム産生を走査型、透過型電子顕微鏡や CLSM で観察した。また NTHi のバイオフィーム産生には sialic acid が重要な役割をはたしていることが示唆された。

A. 研究目的

近年、小児の中耳炎や特に慢性閉塞性肺疾患を基礎疾患にもつ成人に下気道感染を引き起こす代表的な細菌である NTHi が in vitro や動物実験での鼓膜上でバイオフィームを産生するという報告がなされている。我々は、本菌の人氣道上皮細胞上におけるバイオフィーム産生を検討することを目的として基礎的研究を行った。

B. 研究方法

慢性閉塞性肺疾患患者の喀痰より分離された 3 種類の NTHi についてマイクロプレート上で 8, 16, 24 時間同菌を培養し、biofilm growth assay を行い、in vitro でのバイオフィーム産生能を評価した。次に、continuous flow chamber を用いて、持続的な培養液の流れ (180 μ l/min) の下での NTHi のバイオフィーム産生を CLSM で経時的に 1 週間毎日観察した。更に、プレート上で人氣道上皮細胞を培養し、monolayer になったところで NTHi を感染させ、気道上皮細胞上でのバイオフィーム産生を CLSM で経時的に 1 週間毎日観察した。NTHi のバイオフィーム

産生に関する遺伝子を明らかにするため、それぞれ licD, lic3A, lsgA, lsgB, lsgB-F, lsgG, rfe, htrB, pgm, galE, siaA, siaB を削除した mutant を作成し、biofilm growth assay をそれぞれの mutant と野生株に対して行い、いくつかの mutant と野生株に対して、continuous flow chamber を用いての CLSM の経時的な観察も行った。また、同様に野生株の観察において、sialic acid を加えた培養液と加えない培養液でバイオフィーム産生の比較を CLSM で行った。

C. 研究結果

3 種類の NTHi は biofilm growth assay において、いずれも経時的に増加するバイオフィーム産生が確認された。continuous flow chamber では、持続的な培養液の流れの下でも NTHi は約 3 日間でおおよそ 20 μ m の高さをもったバイオフィームを形成することが CLSM で確認された。人氣道上皮細胞上でも NTHi が経時的に増加するバイオフィームを産生することが走査型、透過型電子顕微鏡および CLSM で認められた。種々の mutant と野生株に対する biofilm growth assay の比較では野生株に比べて lsgG, rfe, siaA, siaB を削除した mutant においてバイオフィーム

ム産生が明らかに低下していた。これらの mutant でのバイオフィーム産生の低下は同様に continuous flow chamber を用いた CLSM の経時的な観察でも確認されている。また、野生株の CLSM での観察において、sialic acid を加えない培養液下では、加えた培養液下でのバイオフィーム産生の明らかな低下が認められた。

D & E. 結論及び考察

今回の研究より NTHi はバイオフィーム産生能を有し、気道上皮細胞上でもバイオフィームを産生することが確認され、またそのバイオフィーム産生には sialic acid が重要な役割をはたしていることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Motomura K, Masaki H, Terada M, Onizuka T, Furumoto A, Asoh N, Oishi K, Nagatake T. A retrospective analysis of community-acquired pneumonia between 2000 and 2002 in a community hospital. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 42: 68-74, 2004.
2. Watanabe H, Hoshino K, Sugita R, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Nagatake T. Possible high rate of transmission of nontypeable *Haemophilus influenzae*, including beta-lactamase-negative ampicillin-resistant strains, between children and their parents. *J Clin Microbiol*. 42: 362-365, 2004.
3. Amano H, Morimoto K, Senba M, Wang H, Ishida Y, Kumatori A, Yoshimine H, Oishi K, Mukaida N, Nagatake T. Essential contribution of monocyte chemoattractant protein-1/C-C chemokine ligand-2 to resolution and repair processes in acute bacterial pneumonia. *J Immunol*. 17: 398-409, 2004.
4. Nagatake T. Positioning of various anti-bacterial agents and their appropriate use in the era of multiple bacterial drug resistance. 7. Tetracyclines. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. 92: 2141-2148, 2003.
5. Saha SK, Baqui AH, Darmstadt GL,

Ruhulamin M, Hanif M, El Arifeen S, Santosham M, Oishi K, Nagatake T, Black RE. Comparison of antibiotic resistance and serotype composition of carriage and invasive pneumococci among Bangladeshi children: implications for treatment policy and vaccine formulation. *J Clin Microbiol*. 41: 5582-5587, 2003.

6. Takahashi H, Oishi K, Yoshimine H, Kumatori A, Moji K, Watanabe K, Nalwoga H, Tugume SB, Kebba A, Mugerwa R, Mugenyi P, Nagatake T. Decreased serum opsonic activity against *Streptococcus pneumoniae* in human immunodeficiency virus-infected Ugandan adults. *Clin Infect Dis*. 37: 1534-1540, 2003.
7. Watanabe H, Asoh N, Hoshino K, Watanabe K, Oishi K, Kositsakulchai W, Sanchai T, Kunsuikmengrai K, Kahintapong S, Khantawa B, Tharavichitkul P, Sirisanthana T, Nagatake T. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* and molecular characterization of multidrug-resistant serotype 19F, 6B, and 23F pneumococci in northern Thailand. *J Clin Microbiol*. 41: 4178-4183, 2003.
8. Masaki H, Asoh N, Kawazoe K, Watanabe K, Onizuka T, Shimogama S, Yamaryo T, Watanabe H, Oishi K, Nagatake T. Possible relationship of PFGE patterns of *Moraxella catarrhalis* between hospital- and community-acquired respiratory infections in a community hospital. *Microbiol Immunol*. 47: 379-385, 2003.
9. Yamaryo T, Oishi K, Yoshimine H, Tsuchihashi Y, Matsushima K, Nagatake T. Fourteen-member macrolides promote the phosphatidylserine receptor-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*. 47: 48-53, 2003.
10. Asoh N, Watanabe H, Fines-Guyon M, Watanabe K, Oishi K, Kositsakulchai W, Sanchai T, Kunsuikmengrai K, Kahintapong S, Khantawa B, Tharavichitkul P, Sirisanthana T, Nagatake T. Emergence of rifampin-resistant *Rhodococcus equi* with several types of mutations in the *rpoB* gene among AIDS patients in northern Thailand. *J Clin Microbiol*. 41: 2337-2340, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

10. 慢性肺疾患における細菌の関与とその治療法の開発

分担研究者 村田 幸作 (京都大学大学院農学研究科教授)

研究協力者 橋本 渉、河井 重幸 (京都大学大学院農学研究科)

研究要旨 緑膿菌は、アルギン酸を主成分とするバイオフィーム(BF)を分泌し、周囲から隔離されたエコシステムを示す。BF は抗生物質などの効果を低減させるため、緑膿菌 BF 感染症は難治性となる。この感染症に対する治療法を確立するためには、緑膿菌の BF が関わるエコシステムの理解が必要である。本年度は、緑膿菌における BF 分解機構に焦点を当て、それに関わる分子の同定と機能解析を行った。その結果、緑膿菌がペリプラズムと細胞質に各々局在するアルギン酸リアーゼ AlgL と PA1167 の協調作用によりアルギン酸 BF を完全分解していることが示唆された。

A. 研究目的

バイオフィーム(BF)は、自然環境下における微生物の重要な生存様式(エコシステム)であるが、その系の複雑さのために十分な解析が進んでいない。鞭毛と線毛を持ち活発な運動性を示す緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)も、環境条件に応じて菌体外に多糖アルギン酸[マンヌロン酸 M とグルロン酸 G から成り、MM, MG ブロック構造を持つ(図 1)]を分泌し、これを BF として周囲から隔離された生存様式を示す。また、ヒトに対して日和見的に感染し、体内で BF が形成されると、重篤な呼吸器疾患(cystic fibrosis など)を発症する。緑膿菌 BF 感染症は、BF の病巣局所への固着性と抗菌物質に対する抵抗性のため難治性となる。従って、緑膿菌の生存様式に関する微生物学的特性の理解とこの細菌感染症の治療には、BF の形成・分解制御機構の詳細な解析が必要である。緑膿菌の BF 形成には、ポリリン酸キナーゼ(PPK)によって合成されるポリリン酸依存的な運動性が関与していることが示唆されている。

浮遊性の緑膿菌は、鞭毛運動により宿主細胞表面に移動し、付着する。その後、緑膿菌は、線毛の伸縮運動によりマイクロコロニーを形成し、アルギン酸を合成・分泌することにより BF を形成する。さらに、一部の緑膿菌が BF

を分解することにより遊離し、別の感染部位を求めて移動する(図 2)。

この BF 分解・遊離が、BF 感染症の重篤化に繋がっている。従って、BF の合成と分解制御機構を解析することは、緑膿菌エコシステムの理解に繋がる。アルギン酸の合成・分泌機構は、酵素・遺伝学的によく研究されている。しかし、アルギン酸 BF の分解に関して、ペリプラズムに局在するアルギン酸分解酵素(リアーゼ、AlgL)の存在が報告されているが、その遺伝子がアルギン酸合成オペロンに存在すること、及びその基質特異性が MM ブロックであることから、緑膿菌におけるアルギン酸 BF の完全分解に関する知見は乏しい。

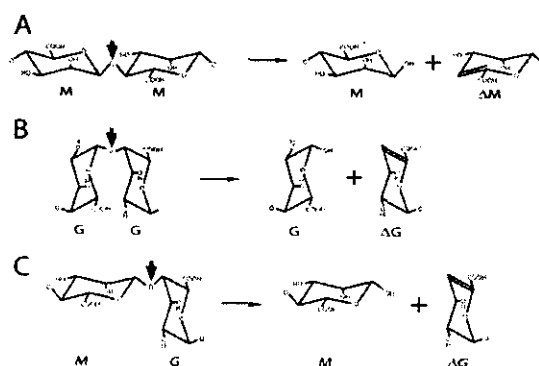


図 1. アルギン酸ブロック構造とアルギン酸リアーゼ反応(A,MM;B, GG; C,MG)

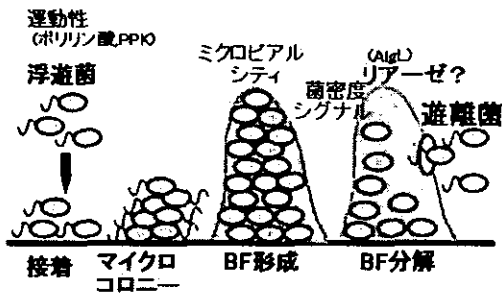


図2. 緑膿菌 BF 形成過程

本研究では、緑膿菌におけるアルギン酸 BF の完全分解機構に焦点を当て、それに関わる分子の同定と機能解析を行い、アルギン酸代謝経路を確定した。

B. 研究方法

緑膿菌由来機能不明タンパク質 (PA1167) 遺伝子を、緑膿菌 PAO1 株より PCR 法によりクローニングした。PA1167 遺伝子を大腸菌高発現ベクターにサブクローニングし、PA1167 の大腸菌大量発現株を育種した。アルギン酸リアーゼ活性は、海藻由来アルギン酸を基質とし、反応により生じる不飽和糖質をチオバルビツール酸 (TBA) 法により比色定量することにより測定した。既報に従い、3 種類のアルギン酸 (MM, GG, MG) ブロック構造を海藻アルギン酸より精製した。比較生化学的解析のため、AlgL を昨年度の報告書に従い調製した。PA1167 と AlgL の二次構造含量を、円偏光二色性 (CD) 分析により決定した。

(倫理面への配慮) 組み換え DNA 実験は、文部科学省の組み換え DNA 実験の指針に則って行った。

C. 研究結果

多糖リアーゼは 1 次構造に基づいて、14 のファミリーに分類され、アルギン酸リアーゼはファミリー PL-5 と -7 に大別される (図 3)。

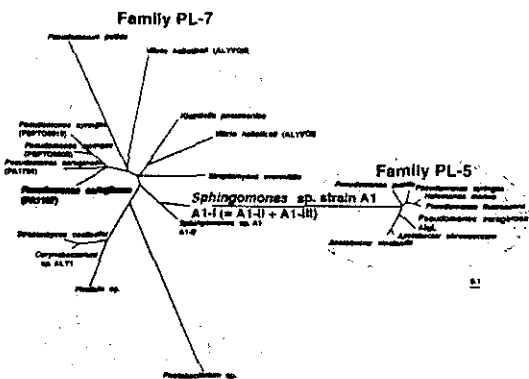


図3. アルギン酸リアーゼファミリー

AlgL はファミリー PL-5 に属しており、ファミリー PL-5 アルギン酸リアーゼは MM ブロック特異的に作用することが知られている。一方、ファミリー PL-7 は、主に GG ブロック特異的に作用する酵素を含んでいる。ファミリー PL-7 に、緑膿菌の機能不明タンパク質 PA1167 が見出された。PA1167 と性質が明らかにされている他のファミリー PL-7 アルギン酸リアーゼについて、アラインメント解析を行った結果、N 末端及び C 末端側に各々存在する触媒反応に重要な二つの保存配列が、PA1167 においても保存されていた (図 4)。また、各タンパク質の分子量も類似していた。

<i>Pseudomonas</i>KPSLEINMSTIPKPF...
<i>Sphingomonas</i>AFAAASISLAKNNSLDFK...
<i>Klebsiella</i>MLSDVNSASLGSLSVFEPAVFRKRVPLKLNLSLDFVPSGINDI...
<i>Corynebacterium</i>KTLDFVACILAAALTAATLQVNSMVVSGSAAAKKEDTSLKQKALDTRVTLKIGSISD...
<i>Pseudomonas</i>AIIITGTCIGQVYRDEDFQSTADG...IDPFWVNGEYV...EHSQTEELSLKSGD...
<i>Sphingomonas</i>VATPDLKIVYQKIEFVTKDGS...LAFNCRASIVYTIANTK...PEELAKMLDFIHF...
<i>Alteibacillus</i>PACQITFFPLAAGYDSEKPFVLEKGGKVFAYLISGAFSTKNT...TPPERDAKMLKAGEIS...
<i>Corynebacterium</i>KPSLISCRALDITFACAFNPFQVNAKDTVQVFFAANVYVY...GSGEYFPEELKIVSVDKES...
<i>Pseudomonas</i>VQNSYAPA.....DNWLEALPIKAVPST.....FAMTICQINAG...
<i>Sphingomonas</i>AVNSHWQV.....KENTLKGAVGVVPPA.....IATLVNGKAV...
<i>Klebsiella</i>IATCGVSRNNHVLSSAPLSQKFAQGVVTLKATLQVHVTPEQVNVQAVTISGAFAR...
<i>Corynebacterium</i>KASMSATGQ.....THTWVREAFNLPVAVK...KLVASGSLKQD...
<i>Pseudomonas</i>GFM.....SQCAADVAVLLVQLK...LIDQRYQALVVERPEKQDTRAY...TLMKIS...
<i>Sphingomonas</i>GNNAPLQVQVPEK...ZLQFLVQNSAKQDQVHY...FSEELI...
<i>Klebsiella</i>SDYRIRLVKELVHCKVTVFVNSPPEKQVQVPSMELIQLVNSKQVAPTRKPEAL...
<i>Corynebacterium</i>KQD...VIVFVRLKIVTELLITLSEKQVHMLKSTFQV...
<i>Pseudomonas</i>VLAGVYVYVTVFEEGALQVYV...GALKQGLDQVNAQV...VNAVFLVQD...
<i>Sphingomonas</i>ELKQVQDQIIVQDQVDFWVNSQV...KSTVPEAKKAKWELK...KPKA...ZTFK...SA...
<i>Klebsiella</i>ALGZVFFVFDQVTKALVTVLQVLEKQVSNVAVSDFQVAGLII...FNADVQKQVTFD...
<i>Corynebacterium</i>ALMTVFQVYVQVQVYIATYINQV...QVTLISHTERKSP...KLVK...FQVNS...
<i>Pseudomonas</i>P.....SKAVYRATPSLELVSHQ...
<i>Sphingomonas</i>DY.....SPTKALVYIKLQVYKES...
<i>Klebsiella</i>K.....PQGVQVATPYELFATKQVGF...
<i>Corynebacterium</i>KSPQESVNTQVQSLYKLVQVHS...

図4. ファミリー PL-7 タンパク質のアラインメント解析 (*Pseudomonas*, PA1167; *Sphingomonas*, A1-II; *Klebsiella*, ALY; *Corynebacterium*, ALY; □, 保存配列)

そこで、PA1167 の機能解析に着手した。ゲノム構造既知の緑膿菌 PAO1 株より抽出したゲノム DNA を鋳型とする PCR 反応により、PA1167 遺伝子(0.7kb)をクローニングした。発現ベクターpET-3aのT7プロモーターの下流に本遺伝子を挿入したプラスミドで、大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株を形質転換した。形質転換株がアルギン酸リアーゼ活性を示したことから、PA1167 はアルギン酸リアーゼであると同定された。形質転換株の細胞抽出画分から、硫酸分画(0-30%)、陽イオン交換(CM-トヨパール 650M)、並びにゲル濾過(Sephacryl S-200HR)カラムクロマトグラフィーを用いて、分子量 25kDa の PA1167 を精製した。PA1167 の反応至適条件及び熱安定性を調べた結果、本酵素は、至適 pH と温度をそれぞれ 8.5 と 40°C に持ち、42°C 10 分間の熱処理により 50% の活性を失うことが分かった。PA1167 と AlgL の基質特異性と作用様式に関して、以下の知見を得た(図 5)。

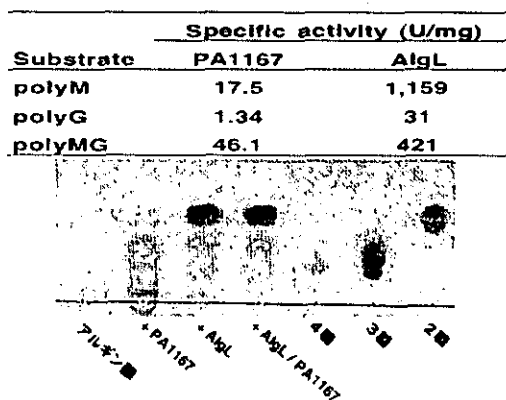


図 5. PA1167 と AlgL の基質特異性と作用様式 (上, 基質特異性; 下, 作用様式 (TLC))

AlgL は MM ブロックを含む polyM に高い活性を示したのに対し、PA1167 は MG ブロックから成る polyMG を良好の基質とした。しかし、PA1167 の 3 種類のブロック構造に対する活性は、AlgL のそれより低い値を示した。PA1167 をアルギン酸と反応させると TBA で検出される種々の重合度のオリゴ糖が生じることより、PA1167 はアルギン酸にエンド型で作用し、 β -脱離反応を触媒することが明らかになった。また、PA1167 は、AlgL によるアルギン酸分解物をさらに低分子化した。CD 分析により、AlgL

は α タンパク質であるのに対し、PA1167 は β 構造を多く含むことが分かった。

D. 考察

緑膿菌におけるアルギン酸 BF 完全分解に関わる分子として、PA1167 を新規なアルギン酸リアーゼであることを明らかにした。PA1167 と AlgL との間に、分子量(PA1167, 25kDa; AlgL, 41kDa)、比活性(polyMG)(PA1167, 46.1U/mg; AlgL, 421U/mg)、至適 pH(PA1167, 8.5; AlgL, 6.2)、基質特異性(PA1167, polyMG; AlgL, polyM)、及び 2 次構造(PA1167, β ; AlgL, α)において相違が見られた。両酵素の polyG に対する低活性は、緑膿菌のアルギン酸が GG ブロック構造を持たないことに起因すると考えられた。PA1167 の酵素活性は AlgL のそれと比較すると低いことから、緑膿菌においては AlgL がアルギン酸 BF 分解の主要酵素として機能することが示唆された。PA1167 遺伝子は、シグナルペプチドをコードしていないため、緑膿菌において細胞質に局在することが予想された。実際、大腸菌で発現させた PA1167 は、N 末端ペプチドが切断されず、細胞質に局在していた。また、PA1167 遺伝子は、PAO1 株ゲノム上、アルギン酸合成オペロンに存在する AlgL 遺伝子と 2.7Mb 離れた位置にコードされているため、その発現は、アルギン酸合成並びに AlgL と独立していると考えられた。

E. 結論

緑膿菌におけるアルギン酸代謝を図 6 にまとめた。

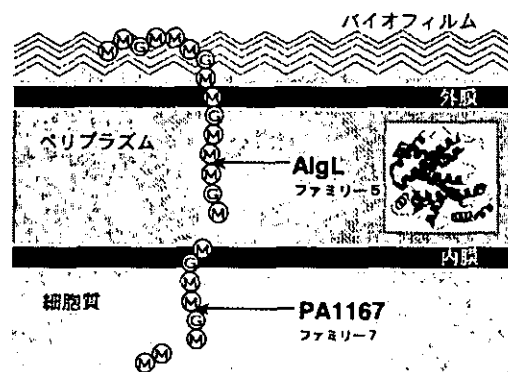


図 6. 緑膿菌におけるアルギン酸代謝

緑膿菌は、AlgL をアルギン酸分解の主要酵素として、ペリプラズムに分泌し、AlgL によりアルギン酸の MM ブロックを切断後、その反応産物(MG ブロック)を細胞質に取り込み、PA1167 の作用により、アルギン酸を完全分解することが想定された。今後、AlgL と PA1167 によるアルギン酸 BF 分解制御機構を解析することにより、緑膿菌 BF を菌自身の AlgL 或いは PA1167 で分解し、BF 内の菌を遊離させるとともに、遊離菌を抗生物質で処理する新規な治療法の開発が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Osamu Miyake, Akihito Ochiai, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata: On the origin and diversity of bacterial alginate lyases of families PL-5 and -7 in *Sphingomonas* sp. strain A1. *J. Bacteriol.*, In press.
- Osamu Miyake, Eiko Kobayashi, Hirokazu Nankai, Wataru Hashimoto, Bunzo Mikami, and Kousaku Murata: Post-translational processing of polysaccharide lyase: maturation route for gellan lyase in *Bacillus* sp. GL1. *Arch. Biochem. Biophys.*, 422(2):211-220, (2004).
- Masayuki Yamasaki, Satoko Moriwaki, Wataru Hashimoto, Bunzo Mikami, and Kousaku Murata: Crystallization and preliminary X-ray analysis of alginate lyase, a member of polysaccharide lyase family PL-7, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallog. sect. D*, 59:1499-1501 (2003).
- Wataru Hashimoto, Osamu Miyake, Hirokazu Nankai, and Kousaku Murata: Molecular identification of α -L-rhamnosidase of *Bacillus* sp. strain GL1 as an enzyme involved in complete metabolism of gellan. *Arch. Biochem. Biophys.*, 415(2):235-244 (2003).
- Shigetaru Mori, Sae Akao, Osamu Miyake, Hirokazu Nankai, Wataru Hashimoto, Bunzo Mikami, and Kousaku Murata: Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel unsaturated glucuronyl hydrolase from *Bacillus* sp. GL1. *Acta Crystallog. sect. D*,

59, 946-949 (2003).

- Shigetaru Mori, Sae Akao, Hirokazu Nankai, Wataru Hashimoto, Bunzo Mikami, and Kousaku Murata: A novel member of glycoside hydrolase family 88: overexpression, purification, and characterization of unsaturated glucuronyl hydrolase of *Bacillus* sp. GL1. *Protein Expr. Purif.*, 29 (1):77-84 (2003).
- Osamu Miyake, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata: An exotype alginate lyase in *Sphingomonas* sp. A1: overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of alginate lyase IV (A1-IV). *Protein Expr. Purif.*, 29 (1):33-41 (2003).
- Yumiko Mishima, Keiko Momma, Wataru Hashimoto, Bunzo Mikami, and Kousaku Murata: Crystal structure of AlgQ2, a macromolecule (alginate)-binding protein of *Sphingomonas* sp. A1, complexed with an alginate tetrasaccharide at 1.6-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 278(8):6552-6559 (2003).
- Wataru Hashimoto, Hirokazu Nankai, Bunzo Mikami, and Kousaku Murata: Crystal structure of *Bacillus* sp. GL1 xanthan lyase, which acts on the side chains of xanthan. *J. Biol. Chem.*, 278(9):7663-7673 (2003).
- 橋本 渉: 細菌の形態形成制御と高分子物質の輸送・分解機構に関する構造生物学的研究. *日本農芸化学会誌*, 77(12):1218-1225 (2003).
- 三島由美子、門間敬子、河井重幸、橋本 渉、三上文三、村田幸作. *Sphingomonas* sp. A1 株由来アルギン酸結合タンパク質の構造生物学的研究 *応用微生物学研究*, 1(2):115-122 (2003).
- 南海浩一、河井重幸、橋本 渉、三上文三、村田幸作: *Bacillus* sp. GL1 におけるキサンタン分解系の酵素学的・遺伝学的解析、及びキサンタンリアーゼの X 線結晶構造解析. *応用微生物学研究*, 1(1):26-34 (2003).
- 橋本 渉、三上文三、村田幸作: 細菌における巨大分子利用の高次バイオシステム. *バイオサイエンスとインダストリー*, 61(4):25-28 (2003).
- 橋本 渉、三上文三、村田幸作: 微生物の「超チャンネル」—細胞の高分子利用戦略. *バイオサイエンスとインダストリー*, 61(4):9 (2003).

2. 学会発表

- 橋本 渉、上野雄介、三島由美子、三宅 統、