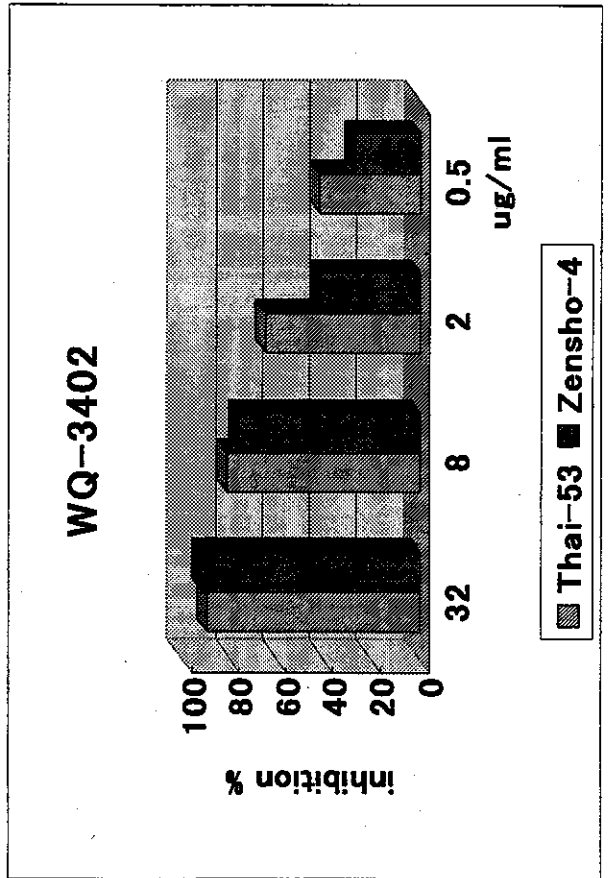
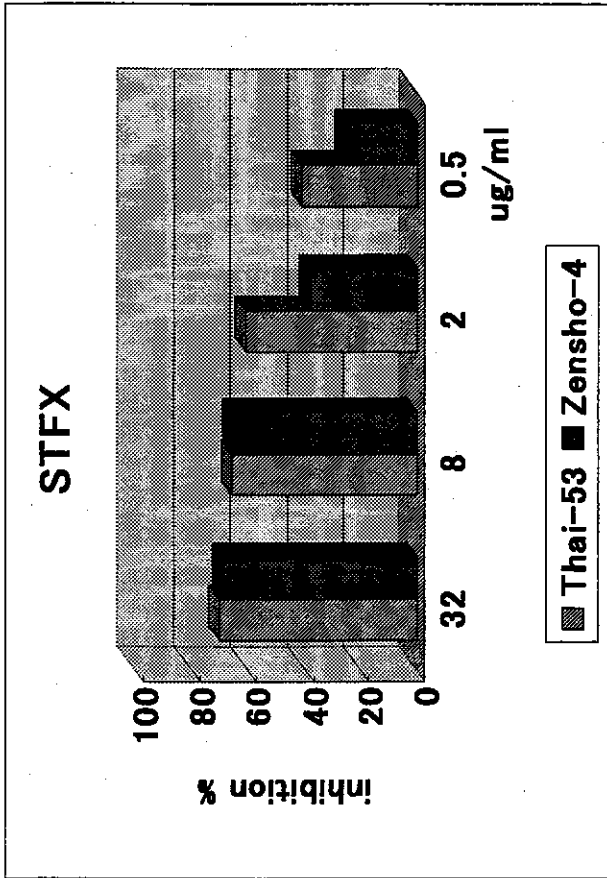
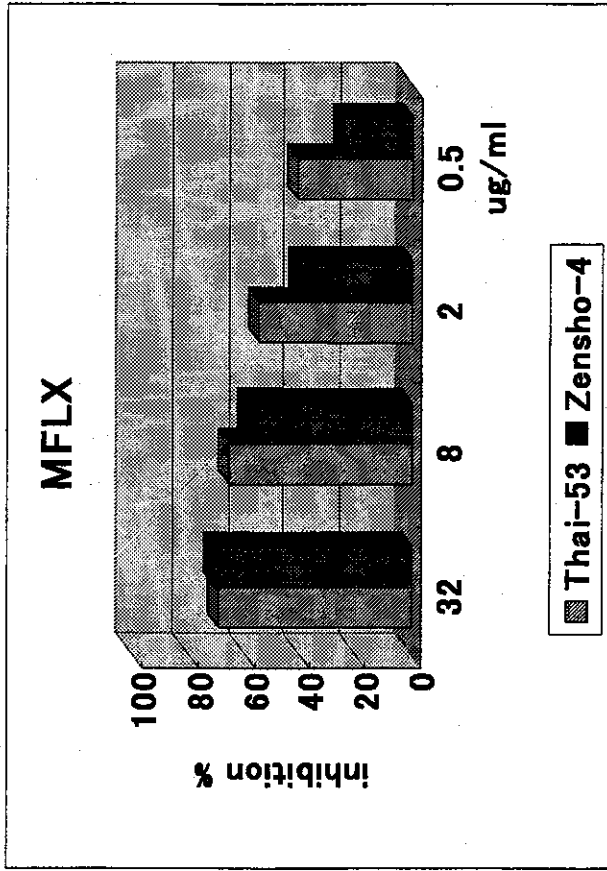


Fig. 4b. *In Vitro* Activities of Fluoroquinolones against *M.leprae*



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16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 病原微生物部 部長

研究要旨. ハンセン病に対する新規ワクチンの開発を目指し、本研究班において新たに同定したらい菌細胞膜中の抗原性分子 Major Membrane Protein-II (MMP-II)の抗原提示細胞との相互作用について検討した。抗原提示細胞としてマクロファージおよび樹状細胞を中心に解析し、とりわけこれら細胞の抗原提示能に焦点をあてた。マクロファージは、MMP-II 刺激により IL-10 および TNF α を産生したが、IL-12p70 は産生しなかった。MMP-II パルスにより細胞表面に MMP-II 抗原を微弱ながら発現したが、自己T細胞を活性化するためには大量のマクロファージを要した。一方、樹状細胞は、炎症性サイトカイン IL-12p70 および TNF α を産生したが IL-10 の産生は観察されなかった。MMP-II パルス樹状細胞は、その表面に MMP-II 抗原を有意に発現し T 細胞を強く活性化した。この T 細胞の活性化は MHC および CD86 抗原依存性であり、細胞表面の MMP-II 抗原をモノクローナル抗体を用いてマスクすると抑制された。さらに、少菌型ハンセン病患者メモリーT細胞は正常健常者よりも強く MMP-II により活性化されたが、Naïve T細胞の MMP-II 反応性は両者でほぼ同じであった。従って、少菌型患者で MMP-II に強く反応している T細胞は、メモリーT細胞であると考えられた。このことは、少菌型ハンセン病患者T細胞は、in vivo において MMP-II 抗原により感作されているものと考えられた。

A. 研究目的

ハンセン病は、皮膚および末梢神経を主病巣とする慢性感染症である。末梢神経障害に起因する四肢の障害は、社会的生活に重大な障害を与え、生産性の低下に直接的に繋がる。現在尚全世界を通じ年間数十万人の新規患者が発症しており、有効なワクチンの開発が切望されている。らい菌に対する生体防御反応は、細胞性免疫により営まれているため、病原体侵入時に迅速に対応し得るメモリータイプの T 細胞を産生することが、ワクチンの最大の目的となる。メモリーT細胞は抗原提示細胞との相互作用により、ナイーブ T 細胞が抗原特異的に活性化され産生される。これまでに我々は、らい菌を 3 つの構成成分（細胞膜・細胞

壁・細胞質）に分画した時、細胞膜が最も抗原性に富んでいることを見出し、さらに細胞膜の中には少菌型患者血清と反応するタンパク Major Membrane Protein (MMP)-II が存在することを明らかにしてきた。本年度は、精製した MMP-II を用い、MMP-II と抗原提示細胞との相互作用、とりわけ抗原提示能すなわち T 細胞活性化能に焦点を当てて検討した。

B. 研究方法

正常健常者の末梢血をインフォームドコンセントのもと供与を受け、Ficoll-Paque Plus を用いてリンパ球を得た。末梢リンパ球よりプラスチック付着性単球を作製して、樹状細胞およびマクロファージのプレ

カーサーとして用いた。樹状細胞は、GM-CSF および IL-4 を用いて分化・誘導し、マクロファージは M-CSF を用いて作製した。これらのサイトカインは市販のものを用いた。MMP-II は、既報のらい菌ライブラリーより該当部分を大腸菌に挿入し、クローニング後発現させ、精製蛋白を得た。MMP-II を用いて樹状細胞およびマクロファージを刺激した際の培養上清中に含まれる IL-12p70、TNF α 、および IL-10 は ELISA 法により測定した。ELISA は、市販のキットを用いて行った。MMP-II と抗原提示細胞上のレセプターとの関係は、予想されるレセプター TLR-2 を HEK293 細胞に発現させ、MMP-II で TLR-2 発現 HEK293 細胞を刺激した際の NF- κ B 依存性ルシフェラーゼ活性を Reporter Gene Assay で測定した。MMP-II パルス樹状細胞の表面抗原の発現程度は、FACScaliber を用いて測定した。解析には、市販の抗体を用いた。MMP-II をパルスした樹上細胞あるいはマクロファージを stimulator として用いて T 細胞を刺激した際、T 細胞から産生される IL-2 および IFN- γ は ELISA 法で測定した。ELISA 法には、市販のキットを用いた。

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

新たに同定した抗原性タンパク分子 Major Membrane Protein (MMP)-II と抗原提示細胞との相互作用を抗原提示能を中心に

解析した。

- 1) 正常健常者末梢単球由来マクロファージを GM-CSF を用いて分化・誘導した後、MMP-II 刺激により産生されるサイトカインを検索したところ、IL-10 および TNF α を産生したが、IL-12 は産生しなかった。
- 2) マクロファージに MMP-II をパルスすると、その細胞表面に MMP-II を発現したが、自己 CD4 陽性 T 細胞を有効に活性化するには至らなかった。
- 3) 一方、正常健常者末梢単球より GM-CSF と IL-4 を用いて分化・誘導した樹状細胞を MMP-II で刺激すると、大量の IL-12p70 と TNF α が産生された。また、IL-10 の産生は完全に抑制されていた。
- 4) 樹状細胞に MMP-II をパルスすると、40~80% の樹状細胞が細胞表面に MMP-II を強く発現した。
- 5) MMP-II パルス樹状細胞は、自己ナイーブ T 細胞を刺激し、IL-2 および IFN- γ を産生し、自己のメモリー T 細胞をも刺激して大量の IFN- γ を産生させた。CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞の両者が活性化されたが、CD4 陽性 T 細胞優位であった。
- 6) これら T 細胞の活性化は、樹状細胞表面の MHC 抗原・CD86 抗原あるいは MMP-II 抗原の発現をモノクローナル抗体を用いてマスクすると抑制された。従って、T 細胞の活性化はこれらの分子に依存しているものと考えられた。
- 7) 正常健常者と少菌型ハンセン病患者の T 細胞の MMP-II 反応性を次に検討した。ナイーブ T 細胞を Responder として用いると両者に明らかな差はなかったが、メモリー T 細胞の反応性を比較すると少菌型患者で非常に強い T 細胞活性化が観察された。従って、少菌型患者で

は、主にメモリータイプT細胞がMMP-IIに反応していて、これらT細胞はin vivoでらい菌中のMMP-IIを認識し、感作されているものと考えられた。

D. 考察

らい菌に対する生体防御反応を司る上で、抗原提示細胞は極めて重要な役割を果たす。第一は、T細胞を刺激し、さらにIL-12などのサイトカインを産生しT細胞に作用させることで、タイプ1 T細胞を産生することである。第二として、らい菌病巣において、肉芽性病変を形成し、らい菌を病変局所に封じ込めることである。前者は、活性化樹状細胞により行われ、後者は主にマクロファージが中心となって形成される。この点において、MMP-IIは樹状細胞とマクロファージの両者を刺激し活性化させ、さらに必要なサイトカインを産生させたことは、MMP-IIは抗原提示細胞を必要かつ十分に活性化したことを示している。

T細胞をMMP-IIパルス樹状細胞で刺激する際、樹状細胞上のMHC抗原あるいはCD86抗原、またはMMP-II抗原に対するモノクローナル抗体を用いて被覆するとT細胞の活性化は抑制されたことより、T細胞の活性化は抗原特異的であることが判明した。さらに、MMP-IIパルス樹状細胞はメモリーT細胞に加えナイーブT細胞も活性化したことより、MMP-IIは目的としたワクチン候補分子である可能性が極めて高いと予想される。さらに、樹上細胞によるナイーブT細胞の活性化の程度を正常健常者と少菌型ハンセン病患者との間で比較検討すると、両者はほぼ同程度であった。一方、メモリーT細胞について両者で比較すると、少菌型ハンセン病患者T細胞は、正常者T細胞に比し明らかに強いIFN- γ 産生を示した。これらのことから、患者T細胞はらい菌感染を受けたために、in vivoでMMP-II抗原により感作されていると考えられた。

以上より、MMP-IIは抗原提示細胞およびT細胞を活性化する免疫原性に富んだらい

菌抗原であることが判明した。

E. 結論

少菌型ハンセン病患者血清によって認識されるらい菌膜中の蛋白抗原MMP-IIは、細胞表面抗原TLR-2と結合し、樹状細胞およびマクロファージを活性化し、抗らい菌生体防御反応を構築する上で重要な役割を果たすサイトカインを産生した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, Y., P. J. Brennan, and M. Makino. Studies of lipoproteins of *Mycobacterium leprae*. Jpn. J. Leprosy, 73: 15-21, 2004.
- 2) 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., 72(1):50-53, 2004.
- 3) 牧野正彦. 結核・ハンセン病. 倉田毅編, ネオエスカ 感染症・アレルギーと生体防御, 同文書院出版, 2004.
- 4) 牧野正彦, 鈴木幸一, 福富康夫, 山下康子, 前田百美, 宮本友司, 向井 徹, 中田 登, 甲斐雅規, 山崎利雄, 儀同政一, 松岡正典. ハンセン病基礎医学研究のトピックス. Jpn. J. Leprosy, 2004, in press.
- 5) Miyamoto, Y., T. Mukai, F. Takeshita, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, and M. Makino. Aggregation of mycobacteria caused by disruption of fibronectin-attachment protein-encoding gene. FEMS Microbiol. Letters, 236:227-234, 2004.
- 6) Kimura, H., Y. Maeda, F. Takeshita, L. E. Takaoka, M. Matsuoka, and M. Makino.

- Upregulation of T-cell-stimulating activity of mycobacteria-infected macrophages. *Scand. J. Immunol.*, 60:278-286, 2004.
- 7) Yamashita, Y., Y. Maeda, F. Takeshita, P. J. Brennan, and M. Makino. Role of the polypeptide region of 33 kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. *Cell. Immunol.*, 229:13-20, 2004.
- 8) Maeda, Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. Identification of Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immunity*, 2004, in press.
2. 学会発表
- 1) Development of a new vaccine candidate against mycobacteria. Makino, M., M. Maeda, T. Mukai, and N. Ishii. 4th The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Awaji Island, Hyogo, Japan.
- 2) Study of the interaction of *M. leprae* with Schwann cells. Maeda, Y., M. Endoh, K. Terao, and M. Makino. 4th The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Awaji Island, Hyogo, Japan.
- 3) The genes involved in glycosylation steps of mycobacterial glycopeptidolipids. Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yana, and M. Makino. 4th The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 30 August-2 September, 2004, Awaji Island, Hyogo, Japan.
- 4) Identification of anti-mycobacterial host defense-associated antigen and assessment of its immunological significance. Makino, M., Y. Maeda, and T. Mukai. Fortieth Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program. 39th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, December 7-10, 2004.
- 5) Loop-mediated isothermal amplification of the *dnaA* sequence for rapid detection of *Mycobacterium leprae*. Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, T. Yamazaki, and M. Makino. Fortieth Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program. 39th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, December 7-10, 2004.
- 6) Regulation by clofazimine of cytokine production in *M. leprae*-infected macrophages. Fukutomi, Y., F. Takeshita, M. Matsuoka, and M. Makino. Fortieth Anniversary US-Japan Cooperative Medical Science Program. 39th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, December 7-10, 2004.
- 7) らい菌由来抗原MMP-II分泌型BCG株の作製とその免疫学的性状解析. 稲垣勝也, 前田百美, 牧野正彦. 日本農芸化学会 2004 年度 (平成 16 年度) 大会 2004 年 3 月 広島
- 8) らい菌ゲノム DNA の株間における多様性の検討. 中田 登, 松岡正典, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 9) らい菌由来抗原 MMP-II の分泌型および脂質付加型発現抗酸菌株の作製. 稲垣勝也, 前田百美, 牧野正彦. 第 77 回日本細菌学会総会 2004 年 4 月 大阪
- 10) サルシュワン細胞のらい菌感受性の検討. 前田百美, 牧野正彦, 遠藤真澄, 寺尾恵治. 第 77 回日本細菌学会総

- 会 2004年4月 大阪
- 11) 抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipids (GPLs)糖酵素遺伝子の破壊株作製とその機能解析. 宮本友司, 向井 徹, 武下文彦, 中田 登, 甲斐雅規, 牧野正彦. 第77回日本細菌学会総会 2004年4月 大阪
 - 12) らい菌由来 Major Membrane Protein-II による自然免疫および獲得免疫の活性化. 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹, 武下文彦, 山下康子, 稲垣勝也, 石井則久. 第77回日本細菌学会総会 2004年4月 大阪
 - 13) らい菌由来リポ蛋白 LpK の IL-12 産生活性中心の解析. 山下康子, 前田百美, 武下文彦, 牧野正彦. 第77回日本細菌学会総会 2004年4月 大阪
 - 14) DC-SIGN を介した抗酸菌感染の解析. 向井 徹, 宮本友司, 前田百美, 牧野正彦. 第77回日本細菌学会総会 2004年4月 大阪
 - 15) *M. smegmatis katG* 変異株の機能. 福富康夫, 甲斐雅規, 中田 登, 牧野正彦. 第77回日本細菌学会総会 2004年4月 大阪
 - 16) LAMP 法によるらい菌遺伝子の検出. 向井 徹, 宮本友司, 武下文彦, 牧野正彦. 第77回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2004年5月 大宮
 - 17) らい菌ゲノム DNA の多様性についての検討. 中田 登, 松岡正典, 甲斐雅規, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第77回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2004年5月 大宮
 - 18) クロファジミンによるマクロファージのサイトカイン産生調節. 福富康夫, 武下文彦, 松岡正典, 牧野正彦. 第77回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2004年5月 大宮
 - 19) 抗酸菌感染マクロファージにおける菌の細菌内寄生と排除に関わる分子機構. 鈴木幸一, 武下文彦, 中田 登, 松岡正典, 牧野正彦. 第45回日本組織細胞化学学術集会 2004年10月 鹿児島
 - 20) 自然免疫および獲得免疫の活性化能を有する新たな抗酸菌抗原の同定. 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹, 山下康子, 石井則久. 第34回日本免疫学会総会 2004年12月 札幌
 - 21) ヒトマクロファージのらい菌食食とサイトカイン産生. 福富康夫, 牧野正彦. 第34回日本免疫学会総会 2004年12月 札幌
- 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16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 主任研究官

研究要旨

これまでに、らい菌のリポ蛋白 LpK を同定し、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た。今回 LpK のN末端 13 アミノ酸配列を含む合成リポペプチド Palmitoyl-Cys (2,3-di (palmitoyloxy)-propyl)-Leu-Pro-Asp-Trp-Leu-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr-Gly-Gly-OH (lipoK) を合成し、抗原提示細胞の活性化を検討した。その結果、lipoK は抗原提示細胞上に発現する TLR2 を認識し、単球由来樹状細胞の抗原提示能を増強した。従って、lipoK はらい菌感染防御機構に重要な役割を担っていることが明らかになった。

A. 研究目的

我々は、らい菌のリポ蛋白をコードする遺伝子の中で 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。さらに、昨年 LpK の幾つかの truncated LpK を作製し、N末端の脂質付加領域を含む 60 アミノ酸が末梢血単球及び樹状細胞の活性化に関わっていることを明らかにした。そこで、LpK のN末端の免疫活性をより詳細に明らかにするため、LpK のN末端 13 アミノ酸配列を含むリポペプチドを合成し、その免疫活性を検討した。

B. 研究方法

LpK のN末端 13 アミノ酸配列を含む合成リポペプチドの配列は Palmitoyl-Cys (2,3-di (palmitoyloxy)-propyl)-Leu-Pro-Asp-Trp-Leu-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr-Gly-Gly-OH である。作成した合成リポペプチドを以下 lipoK と称した。lipoK は 20% 酢酸に溶解し、-80℃ に保存した。正常健常者ヒト末梢血単球 (10⁵ 細胞/ ウエル) を、lipoK で 24 時間刺激したのち、培養上清中の IL-12 p40 を測定した。樹状細胞はヒト末梢血単球よりサイトカインを用い分化誘導したのち、精製した抗原で

パルスし、その抗原提示能を自己 T 細胞の活性化 (IFN- γ 産生) を指標に分析した。TLR2 の antagonistic 抗体は Genentech から分与を受けた。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

ヒト末梢血単球から分化した樹状細胞を合成 lipoK, またはらい菌で刺激した際の細胞表面マーカーを FACS caliber を用いて検討した。図 1 に示すように、0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の lipoK で樹状細胞を刺激すると、HLA-ABC, HLA-DR, CD83, CD86 の発現が増強した。らい菌存在下では lipoK は活性化マーカーの発現をさらに増強した。つぎに樹状細胞用いて活性型 IL-12 (IL-12 p70) の産生量を ELISA で測定した。CD40 リガンド存在下らい菌で樹状細胞を刺激しても IL-12 は全く産生されなかったが、lipoK で刺激すると lipoK の濃度依存的に IL-12 が産生された (図 2)。またらい菌と共に lipoK で刺激すると

IL-12 の産生量が増加した。このことは、lipoK は 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。lipoK を樹状細胞にパルスし、抗原提示細胞として用いて、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。lipoK 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 (図 3)。このことから、脂質部分及び N 末端 13 アミノ酸を含む領域が T 細胞活性化に関わっていることが明らかとなった。つぎに、TLR2 に対する中和抗体を用いて、樹状細胞の表面に発現している TLR2 をブロックすると、lipoK による T 細胞の活性は抑制されたことから、lipoK の認識に TLR2 が重要な役割を果たすことが明らかになった。同様に、樹状細胞をらい菌で刺激すると、有意な IFN- γ 産生性 T 細胞の活性化が観察されるが、lipoK 存在下でらい菌刺激すると樹状細胞の抗原提示能はさらに増強された (図 4)。らい菌プラス lipoK による T 細胞の活性も TLR2 抗体で部分的ではあるが、ブロックされるため、TLR2 の関与が再び確認された。さらに lipoK のハンセン病末梢神経障害に関与するシュワン細胞のアポトーシス誘導への関与を検討した。0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の lipoK でシュワン細胞を刺激しても核変性は確認できなかったことから、lipoK のシュワン細胞アポト

ーシスへの関与は極めて低いと考えられた。

D. 考察

LpK の N 末端合成リポペプチド lipoK は樹状細胞の活性化を誘導することが明らかとなった。lipoK は TLR2 を認識し、樹状細胞の抗原提示能を増強し、T 細胞を活性化した。このことは、13 アミノ酸を含むリポペプチド (LipoK) は、らい菌に対する自然免疫および獲得免疫反応の両者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知見を与えるものと期待する。

E. 結論

らい菌由来の lipoK は、生体防御、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) Maeda, Y., Brennan, P.J., and Makino, M. Studies of lipoproteins of *Mycobacterium leprae*. Japanese Journal of Leprosy. 73, 209-215, 2004

2) Yamashita, Y., Maeda, Y.,

Takeshita, F., Brennan, P.J., and Makino, M. Role of the polypeptide of a 33 kDa mycobacterial lipoprotein for efficient IL-12 production. Cellular Immunology. 229, 13-20, 2004

3) 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. 72, 1, 50-53, 2004

2. 学会発表

1) Makino, M., Maeda, Y., and Mukai, T. Identification of anti-mycobacterial host defense-associated antigen and assessment of its immunological significance, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 40th Anniversary, Kyoto, Japan, Dec 7-10, 2004.

2) 前田百美、牧野正彦、遠藤真澄、寺尾恵治:サルシュワン細胞のらい菌感受性の検討、第77回日本細菌学会総会、2004年4月 大阪。

3) 稲垣勝也、前田百美、牧野正彦:ら

い菌由来抗原 MMP-II の分泌型および脂質付加型発現抗酸菌株の作製、第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月 大阪。

- 4) 牧野正彦、前田百美、向井 徹、武下文彦、山下康子、稲垣勝也、石井則久：らい菌由来 Major Membrane Protein-II による自然免疫および獲得免疫の活性化、第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月 大阪
- 5) 山下康子、前田百美、武下文彦、牧野正彦：らい菌由来リポ蛋白 LpK の IL-12 産生活性中心の解析、第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月 大阪

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 |

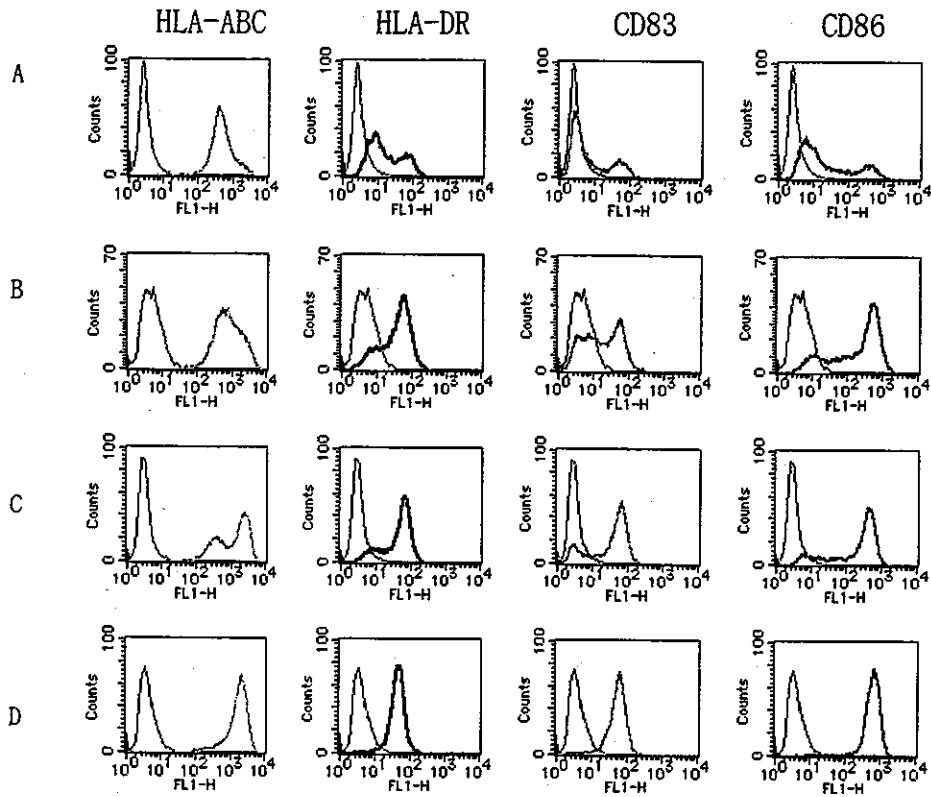


Figure 1. FACS analyses of the surface markers on dendritic cells. Stimulation of dendritic cells by A: None, B: *M. leprae*, C: LipoK, D: LipoK + *M. leprae*

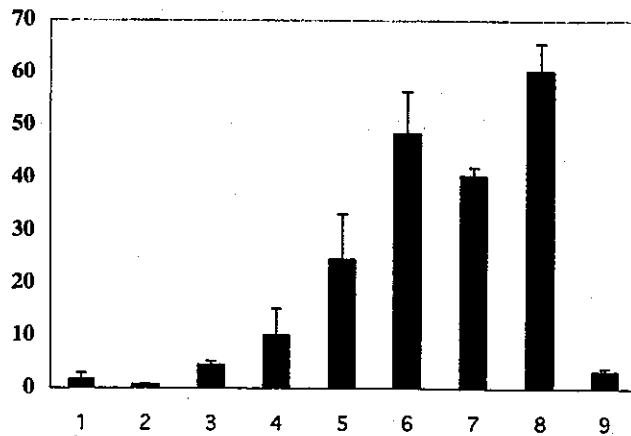
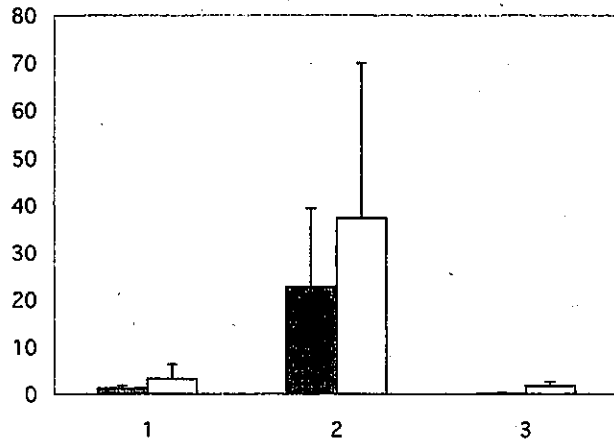
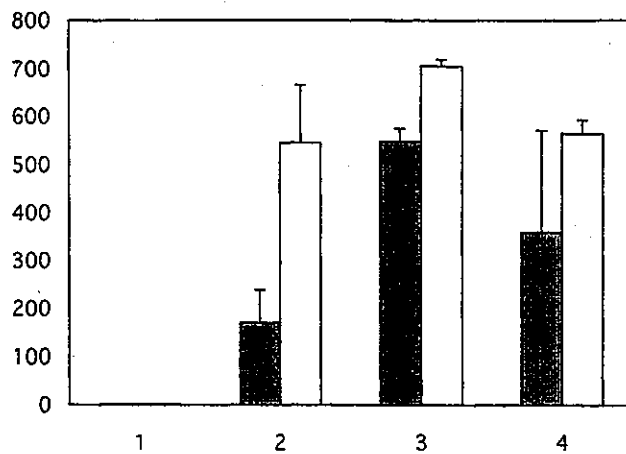


Figure 2. IL-12 p70 production from dendritic cells. 1. None, 2. ML, 3. lipoK (0.1), 4. lipoK (0.1) + ML, 5. lipoK (0.2), 6. lipoK (0.2) + ML, 7. lipoK (0.4), 8. lipoK (0.4) + ML, 9. ML + CD40L. ML = *M. leprae*, unit: $\mu\text{g/ml}$



☒ 3. IFN- γ production from CD4+ T cells stimulated with dendritic cells pulsed with 1. None, 2. lipoK, 3. lipoK (pre-incubation with TLR2 antibody) ■ T/DC:40 □ T/DC:20



☒ 4. IFN- γ production from CD4+ T cells stimulated with dendritic cells pulsed with 1. None, 2. ML, 3. ML + lipoK, 4. ML+lipo (pre-incubation with TLR2 antibody), ML= *M. leprae* ■ T/DC:40 □ T/DC:20

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

ハンセン病易感受性宿主検出のための
分子予防医学的研究

平成16年度 分担研究報告書

分担研究者 大山 秀樹

（兵庫医科大学 医学部）

ハンセン病易感受性宿主検出のための分子予防医学的研究

分担研究者 大山秀樹 兵庫医科大学医学部病理学第1講座 講師

研究要旨：IL-12 レセプター (IL-12R) β 2 鎖の発現量の違いは、Th1/Th2 細胞の分化誘導において中心的な役割を果たしている。この分子の発現の違いがハンセン病患者の病型成立機序において重要な役割を担っていることが示唆されている。この病型間における IL-12R β 2 分子発現量の違いを免疫遺伝学的観点から解明することを目的に、*IL12RB2* の転写制御領域の多型解析およびその多型が転写制御に及ぼす影響を明らかにすることをを行った。その結果、1) 被験者ゲノムにおいて、1035 A>G、-1023 A>G、-650 delG および -464 A>G の計4種類の SNPs を検出したこと、2) 4種類すべての SNPs において T型患者に比べて L型患者の保有頻度が有意に高いこと、3) これらの多型は、同遺伝子の転写活性を低下させ、T細胞の低 IFN- γ 産生を誘導することが明らかとなった。本研究で明らかにした4種類の SNPs は、ハンセン病病型の成立機序において鍵を握る遺伝的要因として考えることができ、早期発見を含めたハンセン病に対する分子予防医学的アプローチの展開を可能にする候補因子のひとつであると考えられる。

A. 研究目的

IL-12 レセプター (IL-12R) は、110kDa の IL-12R β 1 鎖および 85kDa の IL-12R β 2 鎖からなるヘテロダイマーである。ヒト IL-12 分子との結合において、 β 1 鎖および β 2 鎖は同等に関与する。しかし、 β 1 鎖は様々な細胞表面に高発現するものの、 β 2 鎖は高々2~300分子/細胞程度しか発現していない。さらに、IL-12R β 2 鎖の 800 番目のチロシン残基が STAT4 分子の活性化に関与することも明らかとなったことから、IL-12R β 2 鎖の発現量の違いが、Th1/Th2 細胞の分化誘導において中心的な役割を果たすことが示唆されている。

Kim らは、病型の異なるハンセン病患者病巣の IL-12R β 2 分子の遺伝子発現量が異なることを示した (Kim J *et al*, *J Immunol*, 2001)。この現象を免疫遺伝学的観点から解明することができれば、ハンセン病に対する感受性診断に応用することが可能となる。

本研究課題は、ハンセン病に対する感受性についての早期診断法を確立することを目的に、同遺伝子の転写制御領域の多型解析およびその多型性が転写制御に影響することの機序の解明を試みるものである。感受性についての遺伝情報が提供されれば、早期発見を含めたハンセン病に対する分子予防医学

的アプローチの展開を可能にすることが考えられる。

B. 研究方法

1. 被験者：国立療養所に入所するハンセン病患者であったドナー176名（L型患者；130名，T型患者；46名）および健常者68名を被験者とした。なお，ドナーの臨床的分類は，Ridley & Jopling の分類に合わせ，らい反応および全身の後遺症の程度から判定した。

2. *IL12RB2* 制御領域の多型解析：各被験者から調整した末梢血単核球より，QIAamp DNA mini kit[®] を用いることによって抽出した。抽出したゲノムDNAを試料として，ダイレクト・シーケンス法を用いることによって各被験者における *IL12RB2* 制御領域の塩基配列を決定した。すなわち，全ゲノムDNAを鋳型としてPCRを行なうことにより *IL12RB2* の -1253 番目から+99 番目までの領域を増幅した後，Chain-termination 反応を行なった PCR産物を ABI PRISM 377 DNA Sequencer（Perkin Elmer 社製）を用いて，同塩基配列を解析した。

ハプロタイプの決定は，pGEM-T Easy plasmid (Promega) をベクターとして用いて *IL12RB2* の -1247 番目から+55 番目までの領域のサブクローニングした後，同領域をシーケンスすることにより行なった。

3. *IL12RB2* 制御領域における多型が転写活性に及ぼす影響についての評

価：*IL12RB2* の転写制御領域において検出することができた各ハプロタイプについて，-1247 番目から+55 番目までの領域をルシフェラーゼ・レポーター・ベクター（pGL3）に組み込んだコンストラクトと同時に遺伝子導入効率のコントロールとなる *Renilla* ルシフェラーゼ・レポーター・プラスミド（pRL-TK）を Jurkat 細胞にトランスフェクトして一定期間培養を行なった。その後，Dual Luciferase reporter gene assay system[®]（Promega）を用いて，発光強度を計測することによって，*IL12RB2* 転写制御領域におけるそれぞれのハプロタイプが有する転写活性を比較した。

4. *IL12RB2* 制御領域における多型が mRNA 発現に及ぼす影響についての評価：被験者を *IL12RB2* 制御領域の SNPs の有無によって分類し，それぞれの被験者の末梢血単核球から T 細胞濃縮画分を得た。それら細胞を rhIL-12（1.0 ng/ml）存在下で PHA 刺激後，一定時間培養した細胞画分を破碎し，TRIZOL[®] を用いることによって全 mRNA を回収した。得られた試料の *IL12RB2* の遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR 法を行ない SNPs の有無と遺伝子発現を比較することによって，それらの相関の有無を評価した。

5. DNA 結合タンパクの同定：ゲルシフト・アッセイ法を用いることによって，*IL12RB2* 制御領域の多型が DNA への結合性に影響を与える結合タンパクの同定

を試みた。すなわち、抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体およびリコンビナント IL-12 存在・非存在下で一定時間刺激した健常者末梢血単核球由来のT細胞から抽出した核タンパクと ^{32}P 標識した合成2本鎖オリゴDNAとを一定時間結合させ、ゲル上に展開した後、SNPs の有無によってその移動度を比較することによって、DNA 結合タンパクの存在を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究課題は、埼玉医科大学倫理委員会および国立療養所栗生楽泉園倫理委員会において、倫理的側面から検討がなされ、実施についての承認を得ている。さらに、研究の実施にあたっては、本研究課題の目的を提示した上で、各ドナーに対して遺伝子および細胞を採取することによって考えら得る全ての利益、不利益を十分に説明した上で十分にインフォームド・コンセントが得られたドナーからのみ、試料の提供を受けた。

C. 研究結果

1. *IL-12RB2* 制御領域の多型解析：

-1035 A>G, -1023 A>G, -650 delG および -464 A>G の計4種類のSNPsの保有頻度をL型患者、T型患者および健常者を対象として調べた。その結果、それらすべてのSNPs保有頻度は、1) L型およびT型をあわせたハンセン病患者群と健常者群との間には有意な差が存在しないこと、2) T型患者に

比べてL型患者において有意に高いことが分かった。また、患者および健常者に関わらず、-1035, -1023, -650 および -464 各ポジションにおけるそれぞれの allele は、連鎖不平衡の関係にあることが分かった。さらに、各ポジションにおいてひとつでもヘテロ接合体であるドナーを無作為に抽出した17名について、同領域のDNAのsubcloningを行ない、各fragmentのhaplotype解析を行なった。その結果、各ポジションがすべてアレル1であるハプロタイプ1 (-1035A - -1023A - -650G - -464A ; 41.2%) が一番高頻度であり、逆に各ポジションがすべてアレル2であるハプロタイプ2 (-1035G - -1023G - -650delG - -464G ; 32.4 %) が2番目に多かった。その他、ハプロタイプ3 (-1035A - -1023A - -650delG - -464A ; 11.8%), ハプロタイプ4 (-1035G - -1023G - -650G - -464A ; 8.3%) およびハプロタイプ5 (-1035A - -1023A - -650delG - -464G ; 5.9%) を検出した。さらに、Hardy-Weinberg平衡に従い、各群におけるハプロタイプ1の保有頻度を算出し、各群間で比較した結果、L型患者の保有頻度はT型患者および健常者のそれに比べて、有意に低いことが分かった。

2. *IL-12RB2* 制御領域における多型が転写活性に及ぼす影響についての評価：上記それぞれのハプロタイプの転写活性を比較するために、ハプロタイプ1から5のそれぞれについて、

-1247 番目から+55 番目までの領域を pGL3 Basic vector に組み込み、それぞれ作成したコンストラクトを Jurkat 細胞に移入した Dual Luciferase reporter gene assay を行なうことによって評価した。その結果、遺伝子多型を有するハプロタイプ 2, 3, 4 および 5 のそれぞれの RLU (Relative Luciferase Unit) 値は、ハプロタイプ 1 のそれに比べて有意に低かった。このことは、それぞれのポジションに多型が存在することによって、転写活性が低下することが分かった。

3. IL-12RB2 制御領域における多型が mRNA 発現に及ぼす影響についての評価: 健常被験者の末梢血単核球から T 細胞濃縮画分を分離調整し、IL-12 存在下で一定時間 PHA 刺激した時の細胞画分から全 mRNA を回収し、リアルタイム PCR を行なうことによって IL-12RB2 の遺伝子発現量を各被験者間で比較した。その結果、ハプロタイプ 1 のホモ接合体に比べて、ハプロタイプ 1 と他のハプロタイプとのヘテロ接合体は IL-12Rβ2 mRNA 発現量は低い傾向を示した。またそれら培養上清に産生された IFN-γ を定量した結果、IL-12Rβ2 mRNA 発現量と同様にヘテロ接合体の産生量はホモ接合体のそれに比べ、低い傾向を示した。

4. DNA 結合タンパクの同定: ゲルシフト・アッセイ法を用いることによって、IL12RB2 制御領域の多型によって DNA への結合性が変化する核タンパクの同定

を試みた。その結果、-650delG の配列には結合するが、-650G の配列には結合しないタンパクが存在することが分かった。この核タンパクは、活性化 T 細胞を IL-12 存在下で培養した時に比べて、非存在下で培養した時のほうが核内に多く含まれている可能性が示された。

なお、-1035 A>G、-1023 A>G の変異によって DNA への結合性が変化する核タンパクの存在は確認できなかった。

D. 考察

L 型ハンセン病患者の病巣局所において、IL-12Rβ2 mRNA 発現量が低いという現象は、ハンセン病の免疫病理から考えると大変納得できる。事実、Kim らは、L 型ハンセン病患者の病巣局所における IL-12Rβ2 分子の遺伝子発現は T 型患者のそれに比べ有意に低いことを示している (Kim J *et al*, *J Immunol*, 2001)。本研究は、それら現象を免疫遺伝学的側面から明らかにすることを試みたものであり、同遺伝子の転写制御領域の多型が L 型患者の低遺伝子発現に影響することの可能性を示した。これらのことから考えると、L 型患者に見られる細胞性免疫応答の破綻には、抗原非特異的な遺伝的素因も関与するかもしれない。

近年、van Rietschoten らは、IL12RB2 の転写制御領域に -464 A>G SNP が存在すること、またその変異は GATA-3 binding site を消失させることにより、その転写活性を増幅させることを報告

した (van Rietschoten JG et al, Tissue Antigens, 2004)。この報告は、我々の結果と全く矛盾するものである。しかし、1) van Rietschoten JG らの報告の中に SNP の有無による GATA-3 分子との結合性の比較が実際に行なわれていないこと、また、2) GATA-3 のターゲット分子は IL-12R β 2 ではなく STAT4 であることから考えると、この矛盾に対する結論を導くためには、更なる解析が必要となる。IL-12R β 2 分子の低発現性を示す L 型患者に同 SNP が高頻度に検出されるという本研究の結果から考えると、同 SNP は、IL-12R β 2 分子の発現を低下させる遺伝的要因であると考えることが適当であると考え。

E. 結論

IL12RB2 転写制御領域の遺伝子多型を L 型患者および T 型患者を対象として解析を行なった。その結果、L 型患者において高頻度に検出される 4 種類の 1 塩基多型 (SNPs) を同定した。これら多型は、同遺伝子の転写活性を低下させ、T 細胞の低 IFN- γ 産生を誘導することから、ハンセン病病型の成立機序において鍵を握る遺伝的要因のひとつとして考えることができる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohyama, H., Ogata, K., Takeuchi, K., Namisato, M., Fukutomi, Y., Nishimura, F., Naruishi, H., Ohira, T., Hashimoto, K., Liu, T., Suzuki, M., Uemura, Y., Matsushita, S. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor β 2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. J. Clin. Pathol., *in press*.
2. Kato, N., Ohyama, H., Nishimura, F., Matsushita, S., Takashiba, S., Murayama, Y. Role of helper T cells in the humoral immune responses against 53-kDa outer membrane protein from *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol. Immunol., *in press*.
3. 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., 6: 1-20, 2004.
4. Ohyama, H., Kato, N., Takeuchi, K., Uemura, Y., Nishimura, F., Matsushita, S. Monocytes of distinct clinical types of leprosy are differentially activated by crosslinking class II HLA molecules to secrete IL-12. APMIS 112: 271-274, 2004.

2. 学会発表

1. Liu, T., Kohsaka, H., Uemura, Y., Ohyama, H., Matsushita, S. Positional effect of amino acid replacement on peptide antigens for the enhancement of IFN- γ production. 60th American Academy of Allergy Asthma & Immunology. (San Francisco, USA) 2004 March, Journal of Allergy & Clinical Immunology, 113, 216-217.