

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17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）

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、らい菌に対する生体防御反応を司る分子として、リポ蛋白 LpK を同定し、その活性中心はN末端部分に存在することを明らかにしてきた。本年度は、らい菌が強い親和性を示すマクロファージと LpK の相互作用に焦点をあて、特にマクロファージの抗原提示能に及ぼす影響を中心に検討を加えた。マクロファージは細菌などの異物を貪食し、殺菌する作用を有することが知られている。しかし、らい菌はマクロファージに貪食されても、マクロファージのスカベンジャー機能をかいくぐり長期間細胞内に生存する。そこで、LpK の N 末端をコードするリポペプチド lipoK を作製し、マクロファージを刺激したところ、lipoK はマクロファージ上に発現する TLR2 を認識し、マクロファージを活性化した。マクロファージは、lipoK の刺激により炎症性サイトカイン IL-12 及び TNF- α の産生を誘導した。LipoK をパルスしたマクロファージは、自己 CD4 陽性 T 細胞を刺激し、有意に IFN- γ を産生した。従って、lipoK は、抗らい菌生体防御機構を賦活し、免疫療法に活用し得る重要な分子であることが示唆された。

A. 研究目的

らい菌のリポ蛋白 LpK は末梢単球および単球由来樹状細胞を刺激し、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。LpK の活性中心を探索するため、LpK 由来の truncated LpK を作製し、N末端の脂質付加領域がこれらのサイトカインの産生に重要な役割を果たすことをこれまでに明らかにしてきた。LpK の N 末端 13 アミノ酸配列を含むリポペプチドは、樹状細胞を刺激し、らい菌に対する自然免疫および獲得免疫反応の

両者を賦活することを明らかにした。少菌型ハンセン病患者においては、らい菌感染部位に樹状細胞が集積し、細胞性免疫反応を誘導する。LpK は、この反応をさらに高める役割を担うと想定される。一方、多菌型ハンセン病患者では、らい菌はマクロファージに親和性を示し、長期に細胞に宿る。そこで本年度は単球から分化誘導したマクロファージをリポペプチドが賦活し得るか検討した。

B. 研究方法

LipoK の N 末端 13 アミノ酸を含む合成リポペプチド (lipoK) は 20% 酢酸に溶解後、 -80°C に保存した。正常健康者ヒト末梢血単球 (10^5 細胞/ ウェル) を、lipoK で 24 時間刺激した後、培養上清中に産生される IL-12 p40 を測定した。マクロファージはヒト末梢血単球よりサイトカイン GM-CSF を用い分化誘導したのち、lipoK 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) を指標に解析した。TLR2 の antagonistic 抗体は Genentech から分与を受けた。マンノース受容体の抗体は市販の抗体を用いた。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マクロファージを lipoK またはらい菌で刺激し、その細胞表面マーカーを FACS calibur を用いて検討した。0.3 $\mu\text{g/ml}$ の lipoK でマクロファージを刺激すると、HLA-ABC, HLA-DR, CD83, CD86 の発現に変化は見られなかった (図 1)。らい菌存在下でも lipoK は活性化マーカーの発現を増強しなかった。しかしながら、培養上清中の IL-12 p40 の産生量を ELISA 法で測定し

たところ、lipoK で刺激すると IL-12 が産生された。らい菌単独でマクロファージを刺激しても IL-12 は全く産生されなかったが、lipoK と共に刺激すると IL-12 の産生量は相乗的に増加した (図 2)。IL-12 の産生量は、らい菌と lipoK の濃度に依存していた。このことは、lipoK は樹状細胞のみならず、マクロファージでも、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。次に、lipoK をマクロファージにパルスし、抗原提示細胞として用いて、自己の CD4 陽性 T 細胞の活性化を IFN- γ 誘導能を指標に検討した。lipoK をパルスしたマクロファージは T 細胞を刺激し有意に IFN- γ を産生した (図 3)。lipoK 存在下では、らい菌感染マクロファージは T 細胞をさらに活性化した。脂質部分を持つペプチドが T 細胞活性化に重要な役割を果たしていると考えられた。そこで、マクロファージの受容体に対する中和抗体を用いて、表面に発現している受容体をブロックすると、サイトカイン産生能がどのように変化するか検討した。らい菌及び結核菌はマンノース受容体を介しマクロファージ内に貪食されることが知られている。しかしマンノース受容体に対する抗体で細胞表面をブロックしても、らい菌と lipoK による IL-12 あるいは TNF- γ の産生量は変わらなかった (図 4)。同様に、Toll like receptor2 (TLR2) の中和抗体を用いて、マクロファージからの IL-12 または TNF- α の産生量を検討すると、サイトカイン産生能は有意に低下した。従って、IL-12 及び TNF- α のマクロファージからの産生は TLR2 を介することが明

らかになった。コントロールとしてマウスの IgG を用いても、サイトカインの産生量には変化がなかった。

D. 考察

LipoK は樹状細胞の活性化を誘導することを昨年報告したが、lipoK はマクロファージをも同様に TLR2 を認識して活性化することが明らかとなった。lipoK はマクロファージ表面に発現し、抗原提示に関わる抗原の発現程度には、大きな役割を及ぼさなかったが、Th1 タイプの T 細胞の活性化を促進するサイトカインの発現は有意に高め、その結果として、lipoK でパルスしたマクロファージは T 細胞を強く活性化した。このことから、LipoK は、らい菌感染マクロファージを活性化し、抗らい菌生体防御反応を増進させる作用を有するものと考えられた。LpK 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、少菌型ハンセン病のみならず、多菌型ハンセン病患者の免疫療法剤として使用しうる可能性があると思定された。

E. 結論

リポペプチド lipoK は、マクロファージを活性化することから、免疫療法に活用する分子として、または、抗酸菌感染症のワクチン候補分子として有用であると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda Y, Mukai T, Spencer J, and Makino M. Identification of an

immuno-modulating agent from *Mycobacterium leprae*. *Infection and Immunity*. 73, 2744-2750, 2005.

- 2) Makino M, Maeda Y, and Ishii N. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium leprae*. *Cellular Immunology*. 233, 53-60, 2005.

- 3) Makino M, Suzuki K, Fukutomi Y, Yamashita Y, Maeda Y, Miyamoto Y, Mukai T, Nakata N, Kai M, Yamazaki T, Gidoh M, and Matsuoka M. Current advances in leprosy research activities. *Jap Journal of Lep*. 74, 3-22, 2005.

2. 学会発表

- 1) Makino, M., Maeda, Y., and Mukai, T. IL-1 at the early stage of monocyte differentiation to dendritic cells impairs functional activities of dendritic cells, US-Japan Cooperative Medical Science Program, 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Seattle, USA, July 28-30, 2005.

- 2) 前田百美、向井徹、山下康子、牧野正彦：らい菌膜免疫調整性蛋白の同定、第 78 回日本ハンセン病学会総会、2005 年 5 月 青森。

- 3) 福富康夫、前田百美、牧野正彦：クロファジミンにより細胞死誘導、第 78 回日本ハンセン病学会総会、2005 年 5 月 青森。

- 4) 牧野正彦、前田百美、向井 徹：らい菌感染末梢血単球由来サイトカインの

樹状細胞による生体防御に及ぼす影響、
第78回日本細菌学会総会、2005年4月
東京

- 5) 前田百美、石井則久、向井徹、甲斐雅
規、福富康夫、北田清悟、小林和夫、矢
野郁也、牧野正彦：MMP-II を用いたハ
ンセン病血清診断法の開発、第78回日
本細菌学会総会、2005年4月東京

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

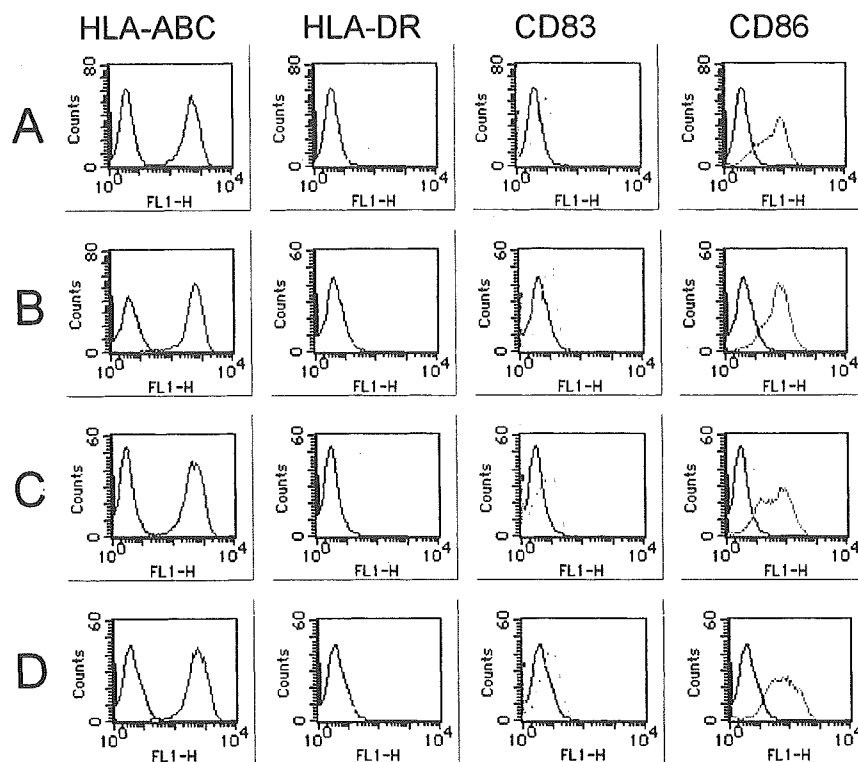


图1. FACS analyses of the surface markers on monocyte derived macrophages. Stimulation of macrophages by A: None, B: *M. leprae*, C: LipoK, D: LipoK + *M. leprae*

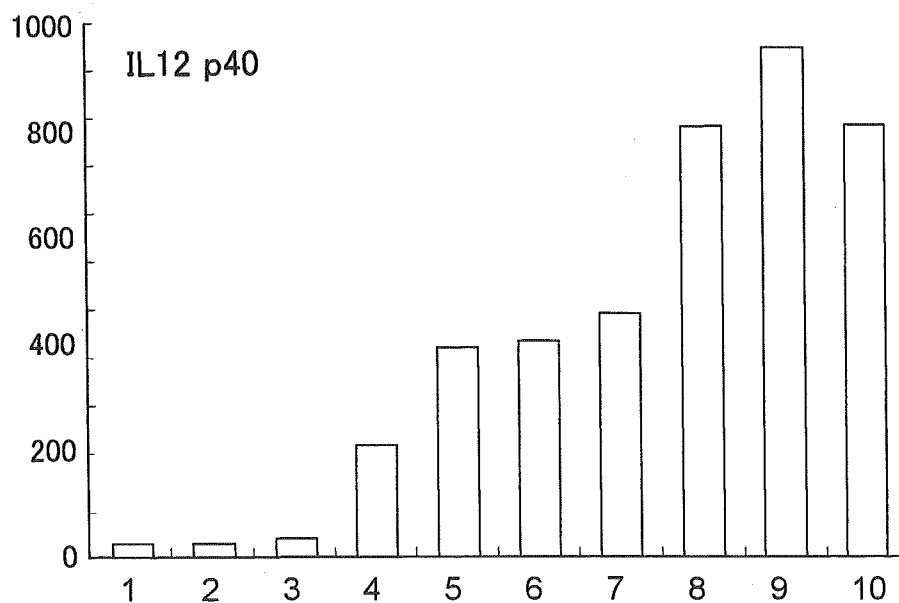


图2. IL-12 p40 production from macrophages. 1.None, 2.ML(50), 3.ML(100), 4.lipoK (0.1), 5. lipoK (0.1)+ ML(50), 6. lipoK (0.1)+ML(100), 7. lipoK (0.2) , 8.lipoK(0.2) + ML(50), 9. lipoK (0.2)+ML(100), 10. lipoK (0.3), ML= *M.leprae*, unit for lipoK: $\mu\text{g/ml}$

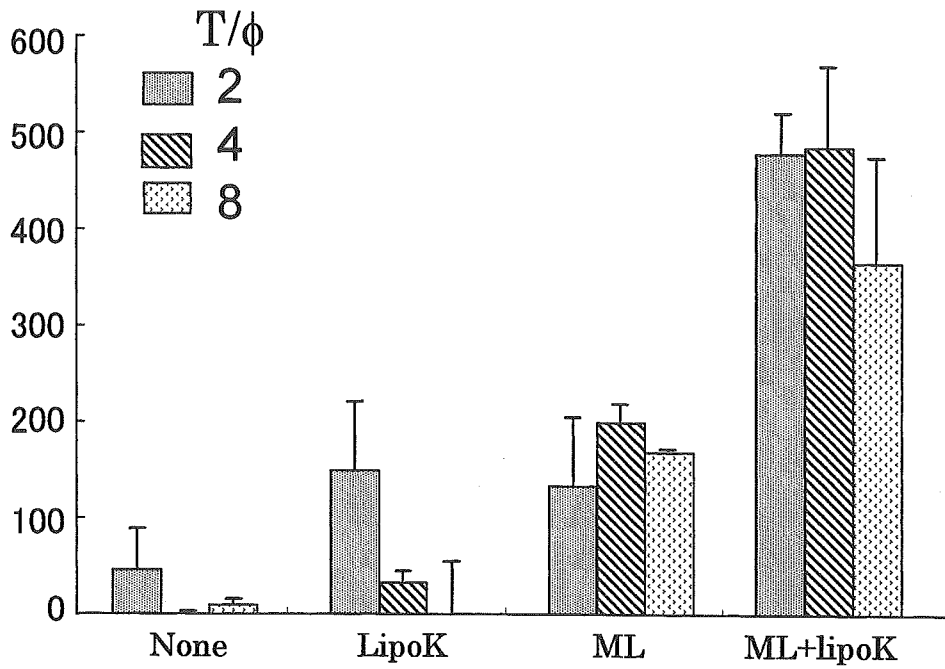


图3. IFN- γ production from CD4+ T cells stimulated with macrophages pulsed with 1.None, 2. lipoK, 3.ML, 4. ML+ lipoK

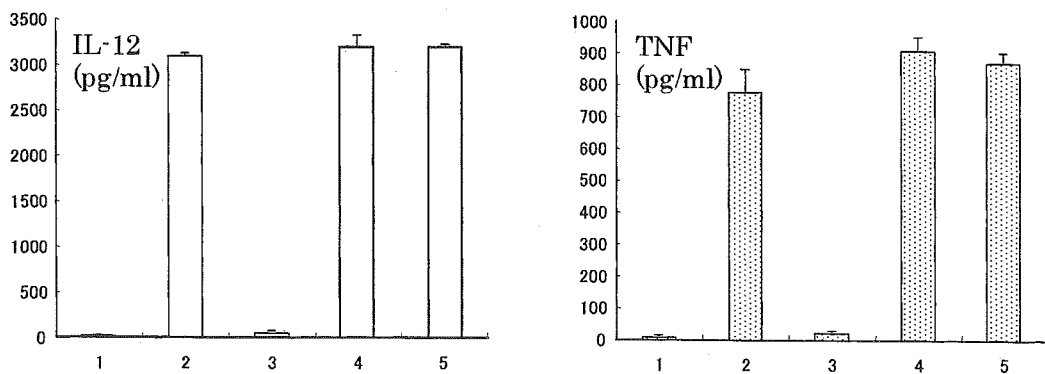


图4. Inhibition of TLR2 and mannose receptor with their respective antibodies on macrophages. Macrophages were stimulated with *M. leprae* (MOI:100) and lipoK (0.3 μ g/ml), and the cytokines secreted were measured 24 hours later. 1. None, 2. ML+lipoK, Preincubation with: 3.TLR2, 4. Mannose receptor, 5. Normal mouse IgG for 1h, and then pulsed with ML+lipoK.

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17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：前年度の本研究課題において我々は、L型ハンセン病患者に高頻度に検出される *IL12RB2* 転写制御領域の多型が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を明らかにした。そこで本年度は、検出された *IL12RB2* の転写制御領域の多型が宿主防御に及ぼす影響、さらにはそれに関わる機序を明らかにするために、*IL12RB2* の転写制御領域の多型がNK細胞機能に及ぼす影響を調べるとともに、それぞれの細胞の転写制御に関わる核タンパクを特定することを試みた。その結果、*IL12RB2* 転写制御領域の遺伝子多型は、NK細胞における *IL-12R β 2* 鎖遺伝子の高発現性およびIFN- γ の高産生性と相関し、同領域の遺伝子多型がT細胞に対して及ぼす影響と全く逆であることが分かった。また、NK細胞由来の核蛋白とT細胞由来の核蛋白とでは、*IL12RB2* 転写制御領域の多型の有無によって結合する核蛋白が異なることも示された。これらの結果は、*IL12RB2* 転写制御領域の多型とその結合性核蛋白を対象とするが、ハンセン病に対するゲノム創薬開発の糸口となり得ることの可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

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すことが知られている。ハンセン病患者病巣における *IL-12R β 2* 分子の遺伝子発現に着目した場合、病型の異なる患者間の遺伝子発現量に差があることが示された (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。

前年度の本研究課題において我々は、ハンセン病患者を対象とした *IL12RB2* の転写制御領域の多型解析を行った結果、多くの被験者が共通して有する4種類のSNPsを検出することに成功した。それら

SNPsは、T型患者に比べてL型患者において有意に多く検出される。また、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もあわせて報告した。しかし、これらの遺伝子多型によって低遺伝子発現が誘導される機序、さらにこれらの遺伝子多型がT細胞以外の宿主防御細胞機能に対してどのように影響するかについても、何も分かっていない。

そこで本年度は、検出された *IL12RB2* の転写制御領域の多型が宿主防御に及ぼす影響、さらにはそれに関わる機序を明らかにするために、*IL12RB2* の転写制御領域の多型がNK細胞機能に及ぼす影響を調べるとともに、それぞれの細胞の転写制御に関わる核タンパクを特定することを試みた。

B. 研究方法

1. 被験者：既に *IL12RB2* 制御領域の多型解析によって genotype が判明しており、特記すべき疾患を有さない健常者 11 名を被験者とした。なお、すべての被験者について、*IL12RB2* 制御領域における -1035, -1023, -650 および -464 の計 4 部位の多型を解析することによって、各被験者の haplotype を特定した。

2. NK 細胞の調整：末梢血単核球から付着細胞を除去した後、さらに磁気ビーズを用いた negative selection 法によって分離調整した細胞画分を NK 細胞濃縮画分として以下の実験に供した。すなわち、被験者末梢血単核球を Ficol-Paque 比重遠心法によって分離調整した後、ヒト血清で表面処理を行なったプレートで 2 時間 37°C, 5%CO₂ 存在下で培養した。浮遊細胞を回収し、その細胞懸濁液を StemSep® NK 細胞濃縮システム (StemCell Technologies 社製) で処理することによって高純度の NK 細胞を得た。

3. *IL12RB2* 制御領域における多型が NK 細胞の IFN- γ 産生に及ぼす影響についての評価：各被験者を *IL12RB2* 制御領域の多型によって分類し、それぞれの被験者における NK 細胞の IFN- γ 産生量を測定した。すなわち、NK 細胞濃縮画分 (1.2 \times 10⁵ cells/well: 96 well plate) をヒトリコンビナント IL-2 (50U/ml) および IL-12 (R&D 社製; 1.0 ng/ml) 存在下で一定時間 (48, 72 時間) 培養し、それぞれの培養上清を回収した。上清に含まれる IFN- γ 量は human IFN- γ ELISA kit (Endogen 社製) を用いることによって測定した。

4. *IL12RB2* 制御領域における多型が NK

細胞の IL-12 レセプター β 2 分子 mRNA 発現に及ぼす影響についての評価：ヒトリコンビナント IL-2 (50U/ml) および IL-12 (1.0 ng/ml) 存在下で一定時間 (24, 48 時間) 培養した後回収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：質量分析計を用いて、*IL12RB2* 制御領域の多型の有無によって DNA 結合性が影響を受ける核タンパクの特定を T 細胞および NK 細胞それぞれについて試みた。すなわち、健常者末梢血 T 細胞画分および NK 細胞画分のそれぞれから抽出した核タンパクとビオチン標識した合成 2 本鎖オリゴ DNA とを一定時間結合させた後、アビジン・コートされたアガロースビーズと共培養することによって、DNA-タンパク複合体をビーズ上に結合させた後に回収し、高塩濃度バッファーを用いることによってタンパクのみを回収し、質量分析計にかけることによって特定することを試みた。なお、T 細胞由来の核タンパクは、抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体およびリコンビナント IL-12 存在下で 1 時間培養した健常者末梢血 T 細胞画分から、また NK 細胞由来の核タンパクはヒトリコンビナント IL-2 および IL-12 存在下で 1 時間培養した NK 細胞からそれぞれ精製した。

(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岡山大学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. *IL12RB2* 制御領域における多型が NK 細胞の IFN- γ 産生に及ぼす影響について

各被験者を *IL12RB2* 制御領域の多型の有無によって分類し、それぞれの被験者における NK 細胞の IFN- γ 産生量を測定した結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) *IL12RB2* 転写制御領域に多型を有さないハプロタイプ (ハプロタイプ 1) のホモ接合体の被験者から採取した NK 細胞に比べて、ハプロタイプ 1 以外のハプロタイプのヘテロ接合体およびホモ接合体の被験者から採取した NK 細胞は、有意に高い IFN- γ 産生を示した ($p < 0.01$)。
- 2) *IL12RB2* 転写制御領域にハプロタイプ 1 以外のハプロタイプのホモ接合体の被験者から採取した NK 細胞は、ヘテロ接合体の被験者から採取した NK 細胞に比べて、高い IFN- γ 産生を有する傾向を示した。

以上の結果から、同領域の遺伝子多型は、NK 細胞と T 細胞の IFN- γ 産生に全く逆の影響を及ぼすことが示された。

2. *IL12RB2* 制御領域における多型が NK 細胞の IL-12 レセプター $\beta 2$ 分子 mRNA

発現に及ぼす影響についての評価：健康被験者の末梢血単核球から NK 細胞濃縮画分を分離調整し、ヒトリコンビナント IL-2 (50U/ml) および IL-12 (1.0 ng/ml) 存在下で一定時間 (0, 24, 48 時間) 培養した細胞画分から全 mRNA を回収し、リアルタイム PCR を行なうことにより *IL12RB2* 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 のホモ接合体から採取した NK 細胞に比べて、ハプロタイプ 1 以外のハプロタイプのヘテロ接合体およびホモ接合体から採取した NK 細胞の *IL12RB2* の遺伝子発現は、0, および 24 時間後において高い傾向を示した。48 時間後においては、被験者群間において発現量の差はなかった。

3. **DNA 結合タンパクの同定：**質量分析計を用いて、*IL12RB2* 制御領域の多型の有無によって DNA 結合性が影響を受ける核タンパクの特定を T 細胞および NK 細胞のそれぞれから精製した核タンパクを用いて行った。その結果、精製することができたタンパク量が少なかったため特定するには至らなかったが、1) -650G DNA-T 細胞由来の核タンパク、2) -464A DNA-T 細胞由来の核タンパク、および 3) -464G DNA-NK 細胞由来の核タンパクのそれぞれの組み合わせにおいて、特異的に結合するタンパクの存在が示唆された。

D. 考察

昨年度の本研究課題において、*IL12RB2* の転写制御領域に検出した -1035 A>G、-1023 A>G、-650 delG および -464 A>G の計 4 種類の SNPs が、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

導することを示した。さらにこれら SNPs は、L 型患者において有意に多く検出されたことから、これら SNPs が L 型患者の低細胞免疫応答性の遺伝的背景を説明する上での一つの拘束要因になり得ることを示唆するに至った。しかし、本年度の結果によって、検出した SNPs が、T 細胞においては IL-12Rβ2 鎖遺伝子の低発現、またそれに伴う低 IFN-γ 産生を誘導するのに対して、NK 細胞においては、IL-12Rβ2 鎖遺伝子の高発現、および IFN-γ の高産生性と相関する可能性が示唆された。これら SNPs が NK 細胞における遺伝子発現に及ぼす直接的な影響は、今後 NK 細胞株を宿主細胞とした reporter gene assay 等を行うことによって明らかとなるであろう。

T 細胞由来核タンパクには、SNPs を含まない -650G DNA および -464A DNA と結合するが、SNP を含む -650 delG DNA および -464G DNA とは結合が弱い核タンパクが含まれる。一方、NK 細胞由来の核タンパクには、SNP を含む -464G DNA とは結合するが、SNPs を含まない -464A DNA とは結合しない核タンパクが含まれる。以上の結果から、T 細胞と NK 細胞との間で、IL-12Rβ2 鎖遺伝子の発現に関与する核タンパクが全く異なることによって、IFN-γ 産生能が全く逆となっている可能性がある。また、T 細胞由来の核タンパクには -650G DNA および -464A DNA のそれぞれに結合する核タンパクが存在することから、-650 および -464 番目の塩基によるハプロタイプが、T 細胞の IL-12Rβ2 鎖遺伝子の発現を規定しているのかもしれない。

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)。本年度の我々の結果と彼女らの仮説は、NK 細胞の系において合致する。このことから、NK 細胞の転写活性には GATA-3 が関与しているのかもしれない。今年度において、タンパク量が少なかったため、核タンパクを特定するにいたらなかった。実験系を改良することによって、これらのことを明らかにしたい。

L 型患者の多くは、*IL12RB2* 転写制御領域に多型性を有する。前年度、T 細胞に着目することによって、それら患者の低細胞免疫応答性の一遺伝素因となり得ることを示した。しかし、本年度における NK 細胞の IL-12Rβ2 鎖遺伝子発現および IFN-γ 産生の結果は、前年度の T 細胞のそれと全く逆の結果を示した。抗酸菌感染症において NK 細胞は、菌由来の糖タンパクおよび脂質を直接認識することによって、IFN-γ 産生が誘導されることが示唆されている。このことから考えると、病型樹立のメカニズムにおいて、IL-12 による NK 細胞の IFN-γ 産生誘導は関与しないかもしれない。これらのことについても今後更なる解析によって、その全様がつかめるであろう。

E. 結論

IL12RB2 転写制御領域の遺伝子多型は、NK 細胞における IL-12Rβ2 鎖遺伝子の高発現性および IFN-γ の高産生性と相関する。これらの結果は、*IL12RB2* 転写制御領域の

遺伝子多型がT細胞のそれらに対して及ぼす影響と全く逆であった。また、NK 細胞由来の核蛋白とT細胞由来の核蛋白とでは、*IL12RB2* 転写制御領域の多型の有無によって結合する核蛋白が異なることも示された。これらの結果は、*IL12RB2* 転写制御領域の多型とその結合性核蛋白を対象とするが、ハンセン病に対するゲノム創薬開発の糸口となり得ることの可能性を示唆するものである。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura, Y., Yamada, N., Ohyama, H., Nakasho, K., Nishizawa, Y., Okamoto, T., Futani, H., Yoshiya, S., Okamura, H., Terada, N. Effect of interleukin-18 on metastasis of mouse osteosarcoma cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2006, in press.
2. Yamada, N., Tsujimura, T., Ueda, H., Hayashi, S., Ohyama, H., Okamura, H., Terada, N. Down-regulation of osteoprotegerin production in bone marrow macrophages by macrophage colony-stimulating factor. *Cytokine.* 31(4):288-297, 2005.
3. 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.*, 58(7),740-743, 2005.
4. Kuhara, A., Yamada, N., Sugihara, A., Ohyama, H., Tsujimura, T., Hayashi, S., Terada, N. Fos plays no role in apoptosis of epithelia in the mouse male accessory sex organs and uterus. *Endocr J.*, 52(1):153-158, 2005.
5. 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.*, 20(2), 112-117, 2005.
6. Liu, T., Kohsaka, H., Suzuki, M., Takagi, R., Hashimoto, K., Uemura, Y., Ohyama, H., Matsushita, S. Positional Effect of Amino Acid Replacement on Peptide Antigens for the Increased IFN- γ Production from CD4T cells. *Allergol. International.* 54(1)117-122, 2005.
7. 植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, 成田弥生, 大山秀樹, 松下祥: インバリアント NKT 細胞による Th1/Th2 バランスの調整. *臨床免疫*, 44(6) 682-688, 2005.

2. 学会発表

1. Ohyama, H., Ogata, K., Takeuchi, K., Uemura, Y., Oyama, M., Ohara, N., Namisato, M., Kogoe, N., Yamada, N., Terada, N., Matsushita, S. Polymorphism on the 5' flanking region of the IL-12 receptor β 2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. US-Japan Cooperative Medical Science Program. Fortieth Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Seattle, USA) 2005 July, Proceedings, 100-104.
2. 大山秀樹: 歯肉および歯根膜線維芽細胞に発現するクラス II HLA 分子が細胞機能に果たす役割. 第 48 回秋季歯周病学会秋季学会 (札幌), 2005 年 9 月, 日本歯周病学会誌, 47(秋季特別号), 47.
3. 大山秀樹, 緒方是嗣, 畑中加珠, 並里まさ子, 中村佳照, 山田直子, 辻村亨, 寺田信行, 松下祥: *IL12RB2* 転写制御領域の遺伝子多型がハンセン病患者の病型成立機序に及ぼす影響. 第 94 回日本病理学会総会 (横浜), 2005 年 4 月, 日本病理学会会誌, 94(1), 225.
4. 中村佳照, 山田直子, 大山秀樹, 辻村亨, 西沢恭子, 岡村春樹, 寺田信行: Interleukin-18 によるマウス骨肉腫細胞 (LM8) の肺転移抑制. 第 94 回日本病理学

- 会総会(横浜), 2005年4月, 日本病理学会会誌, 94(1), 226.
5. 辻村亨, 佐竹真, **大山秀樹**, 藤元治朗, 寺田信行: 痔再生における *c-kit* レセプターチロシンキナーゼの役割. 第94回日本病理学会総会(横浜), 2005年4月, 日本病理学会会誌, 94(1), 230.
 6. 吉澤さゆり, 西村英紀, 目黒道生, 畑中加珠, **大山秀樹**, 高柴正悟: ヒト歯肉線維芽細胞上に発現する HLA-DR 抗原と会合するリン酸化タンパク質の性状解析. 第48回秋季歯周病学会秋季学会(札幌), 2005年9月, 日本歯周病学会誌, 47(秋季特別号), 114.
 7. Yoshizawa, S., Nishimura, F., Meguro, M., Takeuchi-Hatanaka, K., **Ohyama, H.**, Takashiba, S. Signal Transduction Molecules in Gingival Fibroblast via HLA-II molecules. 53rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (Okayama) 2005 November, Program and Abstracts of Papers, 130.
 8. 劉天懿, 植村靖史, 鈴木元晴, 成田弥生, 中野和久, 涌井昌俊, **大山秀樹**, 松下祥: エストロゲンが DC を介して Th 応答性に及ぼす影響の評価. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会(盛岡), 2005年10月, Japanese J. Allergology, 54(8・9), 1092.
 9. 植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, 成田弥生, 中野和久, 涌井昌俊, **大山秀樹**, 松下祥: ビスフェノール A およびノニルフェノールが DC を介して Th 応答性に及ぼす影響の評価. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会(盛岡), 2005年10月, Japanese J. Allergology, 54(8・9), 1092.
 10. 劉天懿, 植村靖史, 鈴木元晴, 成田弥生, **大山秀樹**, 中野和久, 涌井昌俊, 松下祥: エストロゲン受容体シグナルがヒト樹状細胞に与える機能的影響の解析. 第35回日本免疫学会総会・学術集会(横浜), 2005年12月, 日本免疫学会総会・学術集会記録, 35, 150.
 11. 植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, 成田弥生, **大山秀樹**, 中野和久, 涌井昌俊, 松下祥: V α 24 インバリアント NKT 細胞サブセットによる DC を介した免疫制御機構の解析. 第35回日本免疫学会総会・学術集会(横浜), 2005年12月, 日本免疫学会総会・学術集会記録, 35, 155.
 12. 成田弥生, 植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, **大山秀樹**, 中野和久, 涌井昌俊, 菊地博達, 松下祥: ヒト樹状細胞におけるリアノジン受容体サブタイプの発現と免疫応答性への関与の可能性. 第35回日本免疫学会総会・学術集会(横浜), 2005年12月, 日本免疫学会総会・学術集会記録, 35, 155.
 13. 鈴木元晴, 植村靖史, 劉天懿, 成田弥生, **大山秀樹**, 松下祥: 脱落膜 non-invariant NKT 細胞の妊娠子宮 Th2 環境維持における役割. 第35回日本免疫学会総会・学術集会(横浜), 2005年12月, 日本免疫学会総会・学術集会記録, 35, 266.
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得(申請中)
名称; 「インターフェロンガンマ(IFN- γ)低産生に関わる IL12R プロモーター領域の多型とその検出方法」
発明考案者; 緒方是嗣, 大山秀樹, 松下祥, 山本卓志
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

効率的粘膜免疫誘導法の開発

平成17年度 分担研究報告書

分担研究者 向井 徹

（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター）

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

効率的粘膜免疫誘導法の開発

分担研究者 向井 徹 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 第1室長
協力研究者 宮本友司 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 第1室研究員

研究要旨 ハンセン病の感染経路としては、鼻腔からの感染が可能性として挙げられている。そのため、感染予防ワクチンの開発として、鼻腔内に抗らい菌免疫を誘導する投与法の開発を目的とした。粘膜親和蛋白 σ 因子は、粘膜への免疫誘導能を上昇させた。また、より native に近い抗原の大腸菌発現・調整法の検討を行ったが、いずれも可溶化蛋白としての調整は困難であった。抗酸菌による蛋白発現・調整の検討を必要とすることが示唆された。らい菌由来タンパク質である fibronectin attachment protein (FAP)は、初期の感染過程において宿主細胞との接着に関与することが明らかになっている。そこで、らい菌 FAP の抗原性及び病原性を解析するため、*Mycobacterium bovis* BCG の FAP 遺伝子破壊株を構築し、らい菌由来 FAP 発現 BCG の構築を行った。その結果、BCG 由来 FAP の発現が消失し、かつらい菌由来 FAP のみを発現する組換え株を構築した。

A. 研究目的

ハンセン病の感染経路としては、鼻腔からの感染が可能性として挙げられている。そのため、感染予防ワクチンの開発として、鼻腔内に抗らい菌免疫を誘導する投与法の開発を目的とした。また、らい菌を含む抗酸菌に存在するタンパク質 fibronectin attachment protein (FAP) は、初期感染過程における細胞接着に関与することが知られているが、その機構や細胞間の相違など詳細な面は明らかになっていない。そこで、BCG の FAP 破壊株を作製・解析することで病原性因子としての機能解析、さらにワクチンのターゲット分子としての可能性を検討した。

B. 研究方法

粘膜上に存在する M 細胞特異的に結合する σ 因子とらい菌由来蛋白 FAP および major Membrane protein II (MMP II)を大腸菌由来 Maltose binding protein (MBP)との融合蛋白として大腸菌発現・精製を行った。調整蛋白を、

Balb/c マウスへ 20 μ g/頭、7日間隔、3回鼻腔内投与し、NALT 及び脾臓細胞を調整し、免疫応答解析に用いた。MBP 蛋白は、大腸菌由来の 47kDa と大きな蛋白であるため、ワクチン抗原として用いる際には、その除去が望ましい。そのため、His-MMP II と σ 因子のみの融合蛋白(His-MMP II- σ)を調整するため各種シャペロン蛋白共役発現系及び発現蛋白の立体構造をより native に近い形で発現する大腸菌を用い、15°C、24 時間誘導発現の系により可溶化 MMP II- σ の調整を試みた。

FAP 蛋白の解析では、モデルとした BCG において破壊株を作製するため FAP 遺伝子の周辺領域を持つ破壊株作製用ベクターを構築した。本ベクターを野生株に導入し、染色体上のターゲット配列と相同組換えを起こした株について、薬剤マーカーを指標とした選抜により破壊株の単離を行った。さらに、らい菌 FAP の発現には染色体組込み抗酸菌ベクターを使用した。遺伝子破壊株の確認は PCR 及びウエスタンブロットティングにより行った。

(倫理面への配慮)

動物実験については、動物実験委員会の承認後行った。研究の実施にあたっては、諸内規や作業方式に従い、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

C. 研究結果

経鼻免疫による細胞性免疫の解析では、鼻腔内免疫マウスの NALT 細胞及び脾細胞の抗原添加による IL-4 産生能の検討を行った。その結果、NALT 組織では、 σ 因子融合群は、非融合群と比較し、IL-4 産生の有意な上昇は認められなかった(図 1)。His-MMP II- σ 蛋白の可溶性発現検討では、以下のシャペロン共発現系の検討を行った。1. dnaK-dnaJ-grpE griES-groEL, 2. groES-groEL, 3. dnaK-dnaJ-grpE, 4. groES-groEL-tig, 5. tig また、発現に用いる宿主大腸菌は、1. Origami B: S-S bond 形成が高レベル, 2. Rosetta 2: 頻度の少ない tRNA を供給, 3. Rosetta-gami: 両者の性質を兼ね備える、以上 3 株を用い検討した。その結果、いずれの系でも MMP II- σ 蛋白は可溶化されず、inclusion body として発現した。対照として、用いた His-MMP II は、inclusion body も産生されたが、可溶化画分にも発現された(表 1)。

FAP 蛋白の解析では、単離した株を PCR によって解析した結果、染色体上の FAP 遺伝子が完全に欠失している遺伝子破壊株であることを確認した。また、破壊株の菌体より調製した無細胞抽出液に対して抗 FAP 抗体によるウェスタンブロッティングを行ったところ、FAP の発現が消失していることが判明した(図 2)。さらに、らい菌 FAP 発現ベクターを導入した破壊株のウェスタンブロッティングを同様に行った結果、らい菌 FAP のみが発現していることが明らかとなった(図 3)。

D. 考察

昨年度までに、 σ 因子の融合により、非融合群と比較し、抗体価の上昇、NALT 細胞、脾

細胞の抗原に対する細胞増殖応答の上昇および IFN γ の産生能の上昇を示してきた。本年度は、IL-4 産生能の検討を行なったが、優位な差を認めることは出来なかった。しかし、これらの結果より、 σ 因子は、非融合に比較し、粘膜面への抗らい菌誘導は、有意に上昇していると考えられた。これまで、常に MBP 融合蛋白を用いてきたが、本蛋白自身が、抗原となる。その影響を除くため、His-MMP II- σ の形状での大腸菌による蛋白調整を試みたが、可溶化は困難であった。今後、抗酸菌による発現系の構築は必要と考えられた。

FAP 蛋白の解析では、BCG における FAP 遺伝子破壊株の作製を試みた結果、FAP の発現が消失した株を取得することができた。このことは、BCG をモデルとした FAP の機能解析において重要な比較対象株を得たことを示している。さらに、この破壊株を基に作製したらい菌 FAP 発現株は、らい菌に特異的な FAP の抗原性や機能を検討する上で有用であり、且つ BCG を利用したハンセン病に対する生菌ワクチンの候補と成り得ると考えられる。

E. 結論

σ 因子融合蛋白による、マウス鼻腔内免疫により、IL-4 の産生に影響は与えなかった。

BCG をモデルとした FAP 遺伝子破壊株を作製し、らい菌 FAP を特異的に発現する BCG 組換え株の構築に成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. Identification of immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immunity*, 73: 2744-2750, 2005.
- 2) Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. Identification and characterization of the genes involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipids biosynthesis. *J.*

Bacteriol., 188:86-95, 2006.

- 3) Mukai, T., Y. Miyamoto, T. Yamazaki, and M. Makino. Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA* gene. FEMS Microbiol. Lettr., 254:232-239. 2006.
- 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, 74:3-22, 2005.

2. 学会発表

- 1) Makino, M., Y. Maeda, and T. Mukai. IL-1 at the early stage of monocyte differentiation to dendritic cells impairs functional activities of dendritic cells. Fortieth Annual U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Seattle, USA, July 28-30, 2005.
- 2) Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuka, and M. Makino. Rapid detection of *Mycobacterium leprae* by a loop-mediated isothermal amplification method. Fortieth Annual U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Seattle, USA, July 28-30, 2005.
- 3) 宮本友司, 向井 徹, 中田 登, 甲斐雅規, 前田百美, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 細胞内寄生に影響を与える抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipids の構造. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
- 4) 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹. らい菌感染末梢血単球由来サイトカインの樹状細胞による生体防御反応に及ぼす影響. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
- 5) 前田百美, 石井則久, 向井 徹, 甲斐雅規, 福富康夫, 北田清悟, 小林和夫, 矢野郁也, 牧野正彦. MMP-II を用いたハンセン病血清診断法の開発. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
- 6) 前田百美, 向井 徹, 山下康子, 牧野正彦. らい菌膜免疫調整性蛋白の同定. 第 78 回日本ハンセン病学会総会 2005 年 5 月 青森
- 7) 向井 徹, 宮本友司, 松岡正典, 牧野正彦. LAMP 法によるらい菌遺伝子診断法の確立. 第 78 回日本ハンセン病学会総会 2005 年 5 月 青森
- 8) 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹. Analysis of mechanisms of multibacillary leprosy development: the role of IL-1 β . 第 35 回日本免疫学会総会 2005 年 12 月 横浜

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

図1. 各種らい菌蛋白鼻腔内投与マウスのIL-4産生能比較

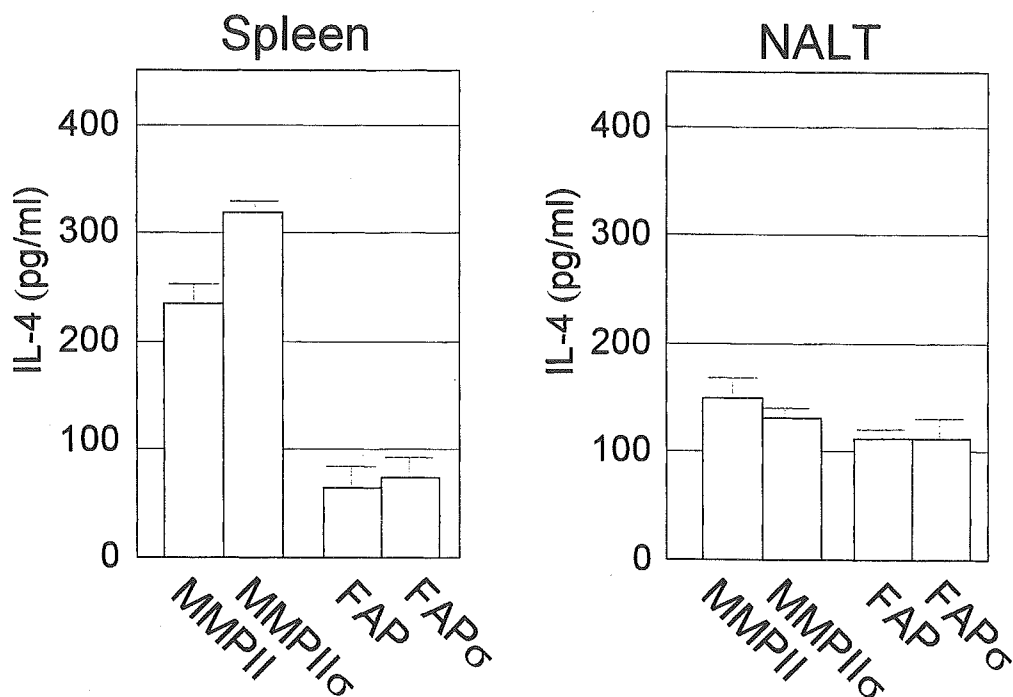


表1. 共試シャペロン系と大腸菌株

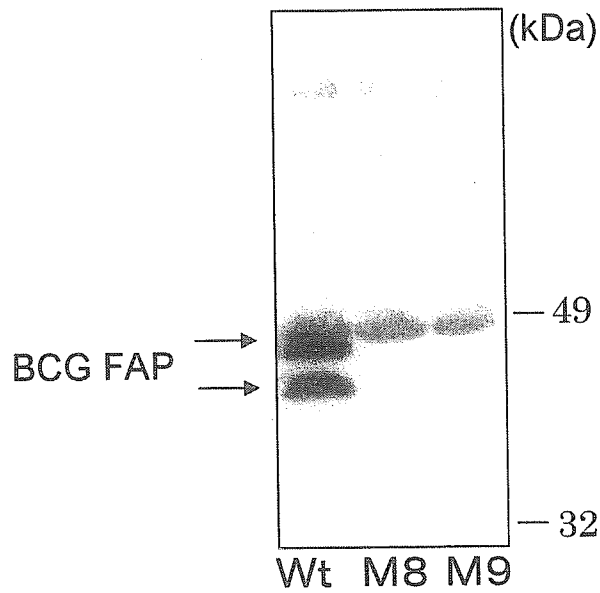
シャペロン共発現系

1. dnaK-dnaJ-grpE
griES-groEL
2. groES-groEL
3. dnaK-dnaJ-grpE
4. groES-groEL-tig
5. tig

大腸菌株

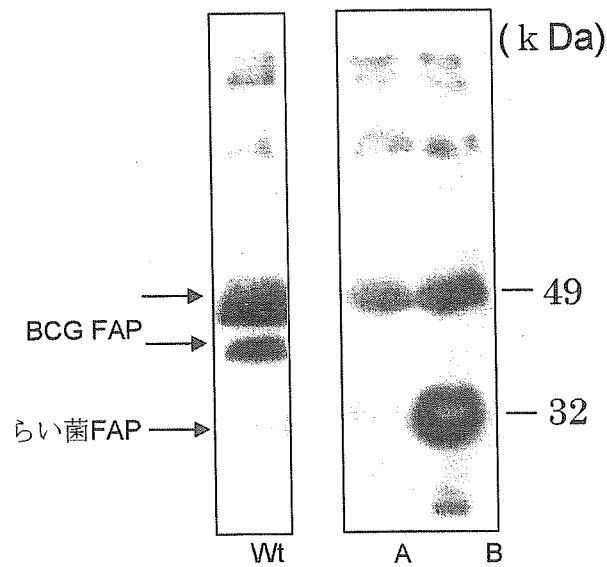
1. Origami B S-S bond形成が高レベル
2. Rosetta2 頻度の少ないtRNAを供給
3. Rosetta-gami 1及び2の特性を持つ

図2. ウェスタンブロッティングによるFAP破壊株の確認。



Wt; BCG野生株、M8及びM9; 任意に破壊株として選抜した株

図3. FAP破壊BCG株におけるらい菌FAPの発現



Wt; BCG野生株

A; M8(破壊株) /control vector

B; M8(破壊株)/らい菌FAP expression vector