

樹状細胞に対する分子標的抗結核ワクチンに関する研究

研究協力者 小出 幸夫 浜松医科大学感染症学生体防御分野 教授

研究要旨

ナイーブ T 細胞を効率よく感作する樹状細胞 (DC) に結核菌抗原を取り込ませる目的で、DC に発現している受容体 (CCR5, CD91) に対するリガンド (MIP1- α と HSP70、Thrombospondin-1) と結核菌防御抗原の融合蛋白ワクチンを作製し、その有効性を比較した。その結果、MIP1- α / 結核菌防御抗原融合蛋白ワクチンが最も強力に CD4⁺、VD8⁺ T 細胞を感作できた。

A. 研究目的

結核に対する感染防御免疫としては、CD4⁺ T 細胞のみならず CD8⁺ T 細胞も重要な働きをしていることが知られている。これらの T 細胞の感作には抗原提示細胞として、樹状細胞 (DC) が重要な役割を果たす。特に、CD8⁺ T 細胞の感作には cross-priming を行う DC が必須である。そこで、我々は DC に効率よく結核菌の防御抗原が取り込まれる「DC を標的とした新規抗結核ワクチン」の研究を行った。DC の標的分子としては CCR5 と CD91 を用いた。これらの分子のリガンドと防御抗原の融合タンパクを作製し、分子標的ワクチンとした。CCR5 のリガンドとしては MIP1- α (CCL3) を、CD91 のリガンドとしては 1) 結核菌由来 HSP70 と 2) Thrombospondin-1 (TSP-1) のヘパリン結合ドメイン (HBD) を用いた。

B. 研究方法

1) DC 標的 DNA ワクチンの作製

- i) MIP1- α / MPT51 DNA ワクチン：結核菌の感染防御抗原をコードする MPT51 遺伝子と MIP1- α 遺伝子を 14 アミノ酸のリンカー DNA を挟み結合した。
- ii) 結核菌由来 HSP70 遺伝子を 14 アミノ酸のリンカー DNA を挟み MPT51 と結合した。この際、HSP70 は N 末と C 末側に分断して用いた。
- iii) TSP-1 の HBD 遺伝子と MPT51 遺伝子を結合した。

上記組換え DNA を発現ベクター pCI に挿入することにより、DNA ワクチンを作製した。

2) DNA ワクチンの接種

遺伝子銃を用い、金粒子に被覆したプラスミド 2 μ g を剃毛したマウス腹部皮膚に接種する。これを 2 週間毎に 3 回繰り返す、追加免疫を行った。

3) ワクチン効果の検討

- (1) T 細胞による抗原特異的各種サイトカイン産生能の測定：最終免疫 3 週間後の BALB/c マウス脾細胞を MPT51 又はペプチド (MPT51₂₄₋₃₂) で 2 日間刺激し、その培養

上清中に産生される各種サイトカインをサイトカイン・ビーズアレイにより測定する。この際、感染防御に重要な役割を果たす IFN- γ につき、特に注目する。

- (2) テトラマー法による特異的 CD8⁺ T 細胞の検出：最終免疫 3 日後の BALB/c マウス脾細胞を PE 標識 H2-D^d/MPT51₂₄₋₃₂ テトラマーと FITC 標識抗 CD8 抗体で反応させ、MPT51 特異的 CD8⁺ T 細胞を flow cytometry で定量する。

- (3) 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 活性の測定：

【in vitro CTL 活性の測定】最終免疫 3 週後の BALB/c 脾細胞を MPT51₂₄₋₃₂ ペプチドで 5 日間 in vitro 刺激を行った後、これをエフェクター細胞とする。そして、同ペプチドでパルスした ⁵¹Cr 標識 P815 細胞を標的細胞として、⁵¹Cr 遊離法にて CTL 活性を測定する。【in vivo CTL 活性の測定】標的細胞として MPT51₂₄₋₃₂ ペプチドでパルスした BALB/c 脾細胞を用いる。これを高濃度 (5 μ M) の CFSE で標識し、パルスしないコントロール脾細胞を低濃度 (0.5 μ M) の CFSE で標識することにより、両者を識別可能にする。両者を同数 (1×10^7)、免疫 BALB/c マウスに静注し、16 時間後の脾細胞における高濃度 CFSE 細胞と低濃度 CFSE 細胞を flow cytometry で解析する。CTL 活性 = % CFSE^{Low} / % CFSE^{Hi}。

C. 研究結果

作製した 3 種の融合タンパクワクチンは何れも DC に結合することを、コンフォーカル顕微鏡で確認した。

- (1) MPT51 は BALB/c マウスに特異的 CD8⁺ T 細胞を、C57BL/6 マウスに特異的 CD4⁺ T 細胞を誘導できるが、3 種の融合タンパクを発現する DNA ワクチンは何れ

も MPT51 単独よりも顕著に多くの特異的 T 細胞を誘導できた。但し、TSP-1 の HBD は三量体を形成して CD91 に結合するため、S-S 結合の部位まで含める必要があった。また、HSP70 は C 末側に CD91 との親和性が認められた。

- (2) 同様に、強力な細胞障害性 T 細胞を誘導できることが in vitro, in vivo で確認できた。
- (3) MIP1- α /MPT51 融合タンパクワクチンはアジュバントなしで、MPT51 特異的 T 細胞を誘導できた。しかし、コントロールとして用いた MIP1- γ の α 末を欠損させた MIP1- α /MPT51 融合タンパクワクチンは MPT51 特異的 T 細胞を全く誘導できなかった。

D. 考察

以上より、我々の DC 標的ワクチンはそれ自身アジュバント効果を示すこと、cross-priming により効率よく CD8+ T 細胞を誘導できることが確認された。これらの3種の融合蛋白ワクチンの T 細胞感作能を比較すると、MIP1- α > HSP70 > TSP-1 であった。そこで今後、MIP1- α と複数の防御抗原を融合した混合ワクチンを用いて、結核菌感染防御能を検討する予定である。

E. 結論

ナイーブ T 細胞を効率よく感作する DC に結核菌抗原を取り込ませる目的で、DC に発現している受容体に対するリガンドと結核菌防御抗原の融合蛋白ワクチンを作製し、その有効性を比較した。その結果、MIP1- α /結核菌防御抗原融合蛋白ワクチンが最も強力に CD4+, VD8+ T 細胞を感作できた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoshi T, Nagata T, Suzuki M, Hashimoto D, Refiei A, Suda T, Chida K, Koide Y: Identification of HLA-A*0201-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from Mycobacterium tuberculosis, using combination of MPT51 overlapping peptide library and computer algorithms. Infect Immun (in press).
2. Hashimoto D, Nagata T, Uchijima M, Seto S, Suda T, Chida, K, Miyoshi H, Nakamura H, Koide Y: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from Mycobacterium tuberculosis induces specific CD8+ T-cell responses in the

lung. Vaccine (in press)

3. Ikehara Y, Shiuchi N, Kabata-Ikehara S, Nakanishi H, Yokoyama N, Takagi H, Nagata T, Koide Y, Kuzushima K, Takahashi T, Tsujimura K, Kojima N: Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells. Cancer Letters (in press)
4. Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Koide Y: In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium. Vaccine (in press).
5. Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 protein efficiently induces antigen-specific T-cell responses. Vaccine (in press).
6. Cervantes J, Nagata T, Uchijima M, Shibata K, Koide Y: Intracytosolic Listeria monocytogenes induces cell death through caspase-1 activation in murine macrophages. Cell Microbiol (in press).
7. Nagata T and Koide Y: Anti-infective vaccine strategies In: Liu D ed. Handbook of Listeria monocytogenes. (in press)
8. Enomoto N, Nagata T, Suda T, Uchijima M, Nakamura Y, Kingo C, Nakamura H, Koide Y: Immunization with dendritic cells loaded with α -galactosylceramide at priming phase, but not at boosting phase, enhances cytotoxic T-lymphocyte activity against infection of intracellular bacteria. FEMS Immunol Med Microbiol 51:350-362, 2007.
9. Kgeyama Y, Takahashi M, Torikai E, Suzuki M, Ichikawa T, Nagafusa T, Koide Y, Nagano A: Treatment with anti-TNF- α antibody infliximab reduces serum IL-15 levels in patients with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol 26 (4): 505-509, 2007.
10. Koide Y: Curucumin for maintenance therapy in ulcerative colitis (Letter). Clin Gastroenterol Hepatol 5:642, 2007.
11. 小出幸夫: 私達の研究 (56) 「細胞内寄生細菌感染症をめぐってーワクチン研究およびイメージング解析による感染機構の解明ー」. 化学療法の領域 23(11): 101-112, 2007.

2. 学会発表

1. Hashimoto D, Nagata T, Suda T; Chida K, Koide Y: Intracellular administration of third-generation lentivirus vectors encoding MPT51 from Mycobacterium tuberculosis induces specific T-cell responses in the lung. American thoracic society, May 18-23, 2007. (San Francisco, USA).
2. Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Koide Y: In vivo heterogeneity of individual T-cell epitope-specific helper T cells against an intracellular bacterium. DNA Vaccine 2007, May 23-25, 2007. (Malaga, Spain).
3. Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 efficiently induces antigen specific T-cell responses. DNA Vaccine 2007, May 23-25, 2007 (Malaga, Spain).
4. Koide, Y, Hashimoto, D, Uchijima, M, Suda, T, Chida, K, Nagata, T: Intratracheal administration of an alternative genetic vaccine, third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from Mycobacterium tuberculosis, induces lung-homing specific T cells. DNA Vaccine 2007, May 23-25, 2007 (Malaga, Spain). Seto S, Koide Y: Live Mycobacterium tuberculosis blocks phagosome-lysosome fusion by dissociation of late endosomal protein, Rab7, from phagosome in macrophages. The 42th US-Japan conference of tuberculosis and leprosy, Sept. 11-14, 2007, (Zhengzhou, Henan, China).
5. 瀬戸真太郎、小出幸夫：結核菌感染マクロファージにおける膜小胞輸送機構のイメージ解析。第90回日本細菌学会関東支部総会、平成19年10月12、13日（東京）
6. Cervantes J, Nagata T, Uchijima M, Koide Y: Nuclear changes associated with cell death of Listeria monocytogenes-infected macrophages. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、平成19年11月20日～22日、（東京）
7. Uchijima M, Nagata T, Shibata K, Koide Y: Genetic fusion of MIP-1a to a mycobacterial MPT51 antigen enhances the antigen-specific CD8+ T- and CD4+ T-cell responses. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、平成19年11月20日～22日、（東京）
8. Wang L-M, Nagata T, Koide Y: Characterization of human HLA-DR4-restricted CD4+ T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from Mycobacterium tuberculosis. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、平成19年11月20日～22日、（東京）

H. 知的財産権の出願・登録情報 無し

新規結核DNAワクチンおよびバキュロウイルスビリオンワクチンの開発に関する研究

研究協力者 吉田 栄人 自治医科大学 講師

研究要旨

ヒトへの臨床治験に向けて、Hsp65遺伝子とヒトIL12p40p35遺伝子の両遺伝子を一つのプラスミドに挿入した改良型DNAワクチンを用いてHVJエンベロープ-DNAワクチンを生産し、サル免疫・感染実験を継続している。またNon-human viral vectorとして昆虫ウイルスの一種であるバキュロウイルス(AcNPV)を用いた新規結核ワクチンの開発を行っている。本年度はHsp65遺伝子を導入した3種類のAcNPVをマウスに接種し、その免疫応答および感染防御効果を検討した。その結果、明確な感染防御効果は見られなかった。

A. 研究目的

結核感染率を激減させ、また多剤耐性結核等の難治性結核を治療する画期的な次世代ワクチンを開発することを最終ゴールとする。特に新規結核DNAワクチンの開発を目指す。合わせて、バキュロウイルス粒子を用いた新しいアイデアのワクチン開発にも取り組む。

B. 研究方法

IL-12遺伝子を”DNAアジュバンド”としたHsp65結核DNAワクチンをHVJエンベロープに包埋しHsp65+IL-12/Env)、これを実験モデル動物(マウス、モルモット、カニクイザル)に接種する。結核菌のエアゾル感染を行い、ワクチン効果を解析する。これらの動物実験結果をもとに、プロトタイプの改良および臨床試験申請のためのデータをまとめる。またDNAワクチンとは別に新規ワクチンベクターとしてバキュロウイルスベクターの改良を行う。

C. 研究結果・D. 考察・E. 結論

バキュロウイルスはヒトに感染しない安全性の高いウイルスベクターである。昨年度作製した(i) Hsp65タンパクをウイルスビリオン上に提示した組換えバキュロウイルス(AcNPV-Hsp65surf)、(ii) Hsp65遺伝子をCMVプロモーター下流に挿入した組換えバキュロウイルス(AcNPV-CMV-Hsp65)の二種類の組換えバキュロウイルスに加え、AcNPV-Hsp65surfとAcNPV-CMV-Hsp65を合わせ持つ組換えバキュロウイルス(AcNPV-Dual-Hsp65)を構築した。これらの組換えAcNPVをマウスに接種し、強毒結核菌でチャレンジを行った。その結果、AcNPV-Hsp65surf接種マウスではHsp65に対してIFN- γ 産生細胞が出現していることがELISPOT assayで確認された。しかし、肺からの菌分離ではコントロール群と有意な差は見られず、ワクチン効果は観察されなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida S, Shimada Y, Kondoh D, Kouzuma Y, Ghosh AK, Jacobs-Lorena M, Sindén RE.: Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. PLoS Pathogens (2007) in press.
2. Yoshida S, Sudo T, Niimi M, Tao L, Sun B, Kambayashi J, Watanabe H, Enjou L, Matsuoka H.: Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. Blood 111:2007-14, 2007.
3. Yoshida S, Shimada Y, Watanabe H.: Novel approach toward infectious diseases--combating malaria by using genetically engineered mosquitoes. Nippon Rinsho 5:1715-26, 2007.
4. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, Peiris JSM, Chen P-J, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS coronavirus using SCID-PBL/hu mouse models. Vaccine 25:3038-40, 2007.
5. 吉田栄人: マラリア防圧—遺伝子操作蚊からのアプローチ—(総説). 治療 2007 in press.

6. 吉田栄人: マラリアコントロールへの新たな挑戦—遺伝子操作によるマラリア非媒介蚊作製— (総説) . Medical Bio 4:70-77, 2007.

の敵マラリア撲滅に挑む」 Techno Innovation (社団法人 農林水産先端技術産業振興センター) 66:52-3, 2007

2. 学会発表

1. Yoshida S.: Generation of genetically engineered mosquitoes refractory to malaria parasites -Challenge for malaria control through the genetic manipulation of its vector-. International Congress of Insect Biotechnology & Industry (2007) Korea.
2. Yoshida S, Sudo T, Watanabe H, Luo E, Matsuoka H, Ishii A.: An inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, asaliva protein from a malaria vector mosquito. EMBO WORKSHOP 2007 "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Diseases Vectors" (2007) Greece.
3. 吉田栄人: 遺伝子操作蚊を用いたハマダラカマラリア原虫の寄生適応性の解明 —マラリアコントロールに向けての新規戦略—。第48回日本熱帯医学学会特別講演 (2007) 大分.
4. 荒木一美、吉田栄人: ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*) のmerozoite surface protein-1₁₉をウイルスベリオン上に提示した組換えバキュロウイルスのワクチン効果。第48回日本熱帯医学学会 (2007) 大分.
5. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、Eappen G.Abraham、Marcelo Jacobs-Lorena、Robert E.Sinden、吉田栄人: 海洋生物由来のレクチン CEL-IIIを発現する遺伝子操作蚊のマラリア伝播阻止効果。第76回日本寄生虫学会 (2007) 大阪.
6. 吉田栄人、周藤俊樹、松岡裕之、嶋田陽平、川崎昌則、長村芳恵、林秀樹、問可和之、山田能久: ハマダラカ唾液に含まれる抗血小板凝集活性を有する *Anopheles* Anti-Platelet Aggregation Protein。第59回日本衛生動物学会 (2007) 大阪.

H. 特許

1. 国際特許PTC/JP2007/51295号「Novel vaccine vector」 (2007年) Yoshida S, Ohba Y, Hariguchi T, Mizukoshi M, Kawasaki M, Matsumoto M.

その他 (新聞・雑誌報道)

1. 吉田栄人「トランスジェニック蚊を駆使して人類

新規結核ワクチンとしてのリコンビナントBCGに関する研究

研究協力者 大原直也 国立感染症研究所 免疫部 室長

研究要旨

これまでに多種のリコンビナントBCG (rBCG) ワクチンが作製された。これらのrBCGを実用化するために薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しない、栄養要求性を指標としたBCG宿主-ベクター系構築のための研究を行った。このためBCGチミン要求株とチミン合成遺伝子をマーカーとして保持しているプラスミドを作製した。その途上、これまで示唆されていることとは異なり、チミン合成経路の酵素thymidylate synthaseの遺伝子欠損株は必須ではないことが明らかになった。

A. 研究目的

これまでに数多くの新規結核ワクチンの候補が作製されてきたが、その中で遺伝子組み換えによるリコンビナントBCG (rBCG) ワクチンは有力な候補として位置づけられている。rBCGは感染防御に有効な抗原あるいはサイトカイン等の遺伝子をBCGに導入したものであるが、これまでのrBCGのほとんどは、導入された遺伝子を乗せたベクターの保持の選択を、同時に導入した薬剤耐性マーカーを指標としている。特に結核の治療薬であるカナマイシン耐性遺伝子が多用されているのが現状である。rBCGの実用化を考えると薬剤耐性に関わる遺伝子を除くことが望ましい。そのため薬剤耐性遺伝子をマーカーとして使用しない、栄養要求性を指標としたBCG宿主-ベクター系の構築をおこなう。

B. 研究方法

BCGのチミジン合成に関与する酵素thymidylate synthase (TS) の遺伝子thyAおよびthyXの遺伝子をそれぞれの遺伝子上流および下流の領域を含めてクローニングする。昨年作製したthyX欠損株をもとにthyAとthyX ORFの二重欠損株を作製する。thyA 遺伝子に隣接した位置にカナマイシン耐性遺伝子 (aphII) に置換し、さらにthyA ORFとカナマイシン耐性遺伝子 (aphII) を挟む形でその前後に大腸菌λファージ組み換え酵素Creの認識配列であるlox配列を挿入したプラスミドを構築する。このプラスミドからthyA領域全体を切り出し、BCG thyX欠損株に導入する。カナマイシン耐性を指標として、ゲノム上のthyA領域が導入したDNAに置換された株を選択する。次にアセトアミドで誘導されるスメグマ菌アセトアミダーゼ転写調節領域にCre遺伝子ORFをつなぎ、このcre発現カセットを抗酸菌-大腸菌シャトルベクターに挿入する。lox配列挿入株に導入をこのプラスミドで形質転換後、培地へのアセトアミド添加によりCre組み換え酵素を発現させ、lox配列に挟まれたthyA領域をゲノムから取り除く。その後継代することによりCre発現用プラスミドを脱落

させ、薬剤耐性遺伝子を含有しないチミン要求性株を作製する。

チミン合成遺伝子を乗せたプラスミドは大腸菌および抗酸菌で機能するプロモーターにthyAおよびthyXを結合させた発現カセット、大腸菌での複製起点および抗酸菌での複製起点より構成されるプラスミドを作製する。このプラスミドは大腸菌チミン要求株を用いることにより、薬剤耐性マーカーを含めずに構築する。

(倫理面への配慮)

特記なし

C. 研究結果

thyX欠損株をもとにthyA欠損株の作製を試みた。まずthyAあるいはthyXの単独欠損株を作製したと同様の方法で二重欠損株の作製を試み400個以上のクローンをスクリーニングしたが、目的の株を得ることはできなかった。次に、厳密に部位特異的組換えを起こすことが可能な大腸菌λファージのCre-loxシステムを応用した。研究方法に述べた方法で、ゲノム上にlox配列を挿入後、Cre発現プラスミドの導入を行なった。アセトアミドの添加によりCre組み換え酵素の発現が確認された。

thyXを選択マーカーとしたベクターは抗酸菌での複製起点としてpAL5000の最小領域、大腸菌での複製起点としてpBlueScriptIIの最小領域を用いて作製し、大腸菌チミン要求株でこのプラスミド保持の選択が確認された。

D. 考察

これまでの研究でチミン要求性を指標とした宿主-ベクター系を完成させるためにはthyAとthyX両遺伝子二重欠損株を作製する必要性が示された。しかしthyX欠損株の単純な相同組換えによるthyA欠損 (二重欠損株) 作製を試みたが目的の株は得られなかった。その理由としては、2重欠損株はチミン要求性であるので、発育速度が非常に遅く、選択できなかったこと

が考えられる。次に試みたCre-loxシステムは組み換え効率が高いため、目的のクローンを得られる可能性が高い。現時点で最終のスクリーニングをおこなっているところであり、近日中に作業を終える予定である。

E. 結論

チミン要求性を指標としたBCG宿主—ベクター系構築のための研究を行った。BCGではTSとしてthyAおよびthyXの両者を持つ。遺伝子欠損株による栄養要求株作製には両遺伝子欠損二重欠損株の作製が必要であったが、そのための組み換え法としては部位特異的高効率の組み換えシステムが必要であった。なお、大腸菌栄養要求株を用いたモデル実験でチミン要求性を指標とした宿主—ベクター系が成立することが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Hotokezaka H, Sakai E, Ohara N, Hotokezaka Y, Gonzales C, Matsuo K, Fujimura Y, Yoshida N, Nakayama K: TNF- α , lipopolysaccharide, and peptidoglycan induce cell fusion independently of RANKL at the latest step of differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells, *J Cell Biochem* 101: 122-134, 2007
- kusaki T, Ohara N, Hara Y, Yoshimura A, Yoshiura K: Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population, *J Periodont Res* 42: 541-545, 2007
- Tang C, Yamada H, Shibata K, Maeda N, Yoshida S, Wajjwalku W, Ohara N, Yamada T, Kinoshita T, Yoshikai Y: Efficacy of Recombinant BCG Vaccine Secreting IL-15/Ag85B fusion protein on Protection against Mycobacterium tuberculosis, *J Infect Dis*, in press.
- 岡部真裕子、大原直也、小林和夫. 結核, 保健の科学 49:691-697,2007(総説)

2. 学会発表

- Kondo Y, Yoshimura M, Ohara N, Shoji M, Yukitake H, Naito M, Fujiwara T, Koji Nakayama K: One of the bacterial tetratricopeptide repeat-containing proteins is involved in virulence of the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. The 2nd International Symposium for Interface Oral Health Science, Feb 2007. Sendai, Japan.

- Ohara N, Yoshimura M, Okabe M, Nakayama K, Kobayashi K: Construction and characterization of the thymidylate synthase mutants derived from BCG. China-Japan-US Tuberculosis Seminar and Forty-second Tuberculosis and Leprosy Research Conference: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. Sep 2007. Zhengzhou, China.
- Tang C, Yamada H, Shibata K, Maeda N, Yoshida S, Wajjwalku W, Ohara N, Yamada T, Yoshikai Y: Efficacy of recombinant BCG vaccine secreting IL-15/Ag85B fusion protein on protection against Mycobacterium tuberculosis. China-Japan-US Tuberculosis Seminar and Forty-second Tuberculosis and Leprosy Research-Conference: The United State-Japan Cooperative Medical Science Program. Sep 2007. Zhengzhou, China.
- Ohara N: Recombinant BCG vaccines: current status. 2nd Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases. Nov 2007. Nagasaki, Japan.
- 内藤真理子、平川英樹、山下敦士、大原直也、庄子幹郎、中山恵介、吉村文信、久原哲、服部正平、林哲也、中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 株の全ゲノム塩基配列決定、第1回日本ゲノム微生物学会, 2007年3月
- 大原直也: 細菌による破骨細胞分化の制御。ワークショック骨と感染症研究の新展開、第80回日本細菌学会総会, 2007年3月
- 内藤真理子、大原直也、庄子幹郎、中山恵介、吉村文信、林哲也、中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 株の全ゲノム塩基配列決定、第80回日本細菌学会総会, 2007年3月
- 近藤好夫、吉村満美子、大原直也、庄子幹郎、雪竹英治、内藤真理子、藤原卓、中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* のTPRドメイン蛋白質欠損株の解析、第80回日本細菌学会総会, 2007年3月
- 北里海雄、布施隆行、大原直也、渡辺健、小林信之: MIP-T3と微小管との結合機構の解析、平成19年度日本生化学会九州支部例会, 2007年5月
- 菊池有一郎、大原直也、上田青海、平井要、柴田幸永、中山浩次、藤村節夫: *Porphyromonas gingivalis* ECFシグマ因子群の遺伝子挿入変異株の作製、第49回歯科基礎医学会学術大会ならびに

総会, 2007年8月

11. 内藤真理子、大原直也、庄子幹郎、吉村文信、中山浩次：Porphyromonas gingivalis ATCC33277株の全ゲノム塩基配列決定、第49回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2007年8月
12. Yoshimura A, Yamaguchi R, Kaneko T, Ohara N：日本人におけるTLR4 遺伝子多型と中等度および重度歯周炎との関連/Association between a TLR4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 2007年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記なし

QFT-2Gによる臨床例の検討

研究協力者 倉島篤行 独立行政法人国立病院機構東京病院 臨床研究部長

研究要旨

QFT検査で用いられる刺激抗原ESAT-6, CFP10は、結核菌群の他M. kansasii, M. marinum, M. szulgaiに含まれている。28例のM. kansasii症例においてQFT-2G検査を施行、陽性は5例であり、M. kansasii症例では結核症とは免疫応答の程度が異なると考えられた

A. 研究目的

H18年度研究において、QuantiFERON-TBG2キットによるIFN- γ 複数回測定108例でのESAT-6刺激IFN- γ 値の推移を検討、経過中ESAT-6刺激IFN- γ 値の上昇が0.1以上、かついずれかの値が0.35以上は18例に見られた。

この中で1例に M. szulgai感染が見られた。QFT検査で用いられる刺激抗原ESAT-6、CFP-10は、M. bovisを継代培養している間に欠落した領域RD-1に存在し、BCGには含まれないがゆえに結核菌群特異抗原として用いられている。

しかし結核菌群のほかM. kansasii, M. marinum, M. szulgaiには含まれていることが知られている。

抗酸菌塗抹陽性で結核を疑って結核病棟に入院し、QFT-2G陰性で、M. kansasii 症であった例にしばしば遭遇したため、M. kansasii 症におけるQFT-2Gの検討を行った。

B. 研究方法

M. kansasii 症にて治療した例で、治療開始前あるいは開始7日以内にQFT-2G検査を施行してきた28例の結果を検討した。

C. 研究結果

M. kansasii症28例でのQFT-2G検査結果は陽性が5例(18%)、判定保留が4例(14%)、陰性が18例(64%)、判定不可が1例(4%)であった。

このうち過去結核治療歴なしでは陽性が13%であったのに対し過去結核治療歴ありでは50%が陽性であった。

D. 考察

M. kansasii感染症でのQFT-2G測定値結果を年代階級別に表現すると高齢になるほどIFN- γ 値の上昇が見られた。更に過去治療歴のないM. kansasii感染症24例での年代階級別のQFT-2G測定陽性率は2005年の年代階級別結核推定既感染率と同様な傾向を示した。すなわち

M. kansasii 症でのQFT-2G測定陽性はM.

kansasii菌感染に対するIFN- γ 値ではなく過去の結核菌感染を見ている可能性が高い。すなわちM. kansasii菌がESAT-6、CFP-10を保有していても、それによる免疫応答は結核菌より程度が弱いと考えられた。

E. 結論

M. kansasii 症にて治療した例で、治療開始前あるいは開始7日以内にQFT-2G検査を施行してきた28例の結果を検討し、陽性は5例(18%)であり、M. kansasii 症では、結核とは免疫応答の程度が異なること考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mai HN, Hijikata M, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kimura K, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Nagai H, Kurashima A, Kajiki A, Oketani N, Hayakawa H, Tanaka G, Shojima J, Matsushita I, Sakurada S, Tokunaga K, Keicho N: Pulmonary Mycobacterium avium complex infection associated with the IVS8-T5 allele of the CFTR gene. Int J Tuberc Lung Dis 2007 Jul;11(7):808-13
2. Tanaka G, Shojima J, Matsushita I, Nagai H, Kurashima A, Nakata K, Toyota E, Kobayashi N, Kudo K, Keicho N: Pulmonary Mycobacterium avium complex infection: association with NRAMP1 polymorphisms. Eur Respir J 2007 Jul;30(1):90-6
3. Takakura S, Tsuchiya S, Isawa Y, Yasukawa K, Hayashi T, Tomita M, Suzuki K, Hasegawa T, Tagami T, Kurashima A, Ichiyama S: Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory samples by transcription-reverse transcription concerted reaction with an automated system. J Clin Microbiol 2005 Nov;43(11):5435-9

4. 倉島篤行:非結核性抗酸菌症の治療. 診断と治療 2007 Nov;95(11):2008-14
 5. 田村厚久, 蛇沢晶, 益田公彦, 島田昌裕, 久能木真喜子, 金子有吾, 松井芳憲, 川島正裕, 鈴木純子, 有賀晴之, 大島信治, 松井弘稔, 永井英明, 赤川志のぶ, 長山直弘, 川辺芳子, 町田和子, 倉島篤行, 中島由槻, 四元秀毅:気管支結核の現状 103例の解析. 結核 2007 Aug;82(8):647-54
 6. 永井英明, 川辺芳子, 有賀晴之, 嶋山文子, 島田昌裕, 久能木真喜子, 松井芳憲, 川島正裕, 鈴木純子, 大島信治, 益田公彦, 松井弘稔, 田村厚久, 長山直弘, 赤川志のぶ, 町田和子, 倉島篤行, 四元秀毅:HIV感染症における結核感染診断に対するの QuantiFERON-TB第2世代の有用性についての検討. 結核 2007 Aug;82(8):635-40
 7. 倉島篤行:高齢者の抗酸菌感染症. 日本臨床 2007 Mar;65 増刊3 490-4
 8. 松井芳憲, 赤川志のぶ, 川島正裕, 鈴木純子, 益田公彦, 田村厚久, 永井英明, 長山直弘, 川辺芳子, 町田和子, 倉島篤行, 四元秀毅:リファンピシンを含む結核治療におけるシクロスポリン投与量の検討. 結核 2007 Jul;82(7):563-7
 9. 倉島篤行:非結核性抗酸菌症の治療. 日本胸部臨床 2007 Jul;66(7):549-57
 10. 田村厚久, 蛇沢晶, 益田公彦, 島田昌裕, 市川昌子, 久能木真喜子, 金子有吾, 川島正裕, 鈴木純子, 有賀晴之, 八木理充, 大島信治, 松井弘稔, 永井英明, 赤川志のぶ, 長山直弘, 川辺芳子, 町田和子, 倉島篤行, 中島由槻, 四元秀毅:肺癌と活動性肺抗酸菌症の合併 特徴と推移. 日本呼吸器学会雑誌 2007 May;45(5):382-93
 11. 倉島篤行:抗結核薬副作用への対応. 呼吸器科 2007 Apr;11(4):383-9
 12. 倉島篤行:非結核性抗酸菌症治療の展望. 結核 2007 Mar;82(3):195-9
 13. 倉島篤行:非結核性抗酸菌症の診断と治療. 日本医事新報 2007 Feb;(4321):105
 14. 倉島篤行:非侵襲性肺アスペルギルス症治療の新たな展開. 結核 82:143-147, 2007
 15. 倉島篤行:肝硬変に合併した結核症例の検討 結核 81(7):457-465, 2006
 16. 倉島篤行:肺結核とアスペルギルス症. 最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC 41、呼吸器 6 結核・非結核性抗酸菌症. 最新医学社 227-238, 2006.
 17. 西村富啓, 河野晴一, 倉島篤行, 久保博昭, 小池勇一:RifampicinのPharmacokineticsに対する食事の影響. 臨床薬理 2006 Nov;37(6):353-7
 18. 倉島篤行:非結核性抗酸菌症. Modern Physician 2006 Mar;26(3):385-8
 19. 倉島篤行, 長山直弘:非結核性抗酸菌症の治療 肺MAC症の治療 再排菌例の検討. 結核 2006 Jan;81(1):38-41
 20. 大橋里奈, 赤川志のぶ, 倉島篤行, 土屋香代子, 宮本牧, 益田公彦, 田村厚久, 永井英明, 長山直弘, 川辺芳子, 町田和子, 四元秀毅, 蛇沢晶:過敏性肺炎類似のびまん性陰影を呈した肺 Mycobacterium avium症の1例. 結核 2006 Jan;81(1):19-23
 21. 倉島篤行:目でみる症例 肺結核症. 内科 2005 Dec;96(6):1121-6
 22. 倉島篤行:肺結核. クリニカ 2005 Nov;32(6):351-7
 23. 倉島篤行:現在および近未来の結核に対する対応および問題点. Current Concepts in Infectious Diseases 2005 Oct;24(3):6-9
 24. 倉島篤行:非結核性抗酸菌症. Medicina 2005 Oct;42(10):1720-2
 25. 川辺芳子, 町田和子, 倉島篤行, 小松彦太郎, 四元秀毅:肺癌と活動性肺抗酸菌症の混在する病態の検討. 結核 2005 May;80(5):413-9
 26. 倉島篤行:非結核性抗酸菌症の診断と治療. JIM: Journal of Integrated Medicine 2005 May;15(5):398-402
 27. 倉島篤行:気密空間における感染性疾患. 日本胸部臨床 2005 Apr;64(4):325-32
 28. 倉島篤行:非結核性抗酸菌症. 診断と治療 2005 Feb;93(2):239-44
2. 学会発表
 1. 益田公彦, 田村厚久, 有賀晴之, 川島正裕, 金子有吾, 島田昌裕, 鈴木純子, 永井英明, 赤川志のぶ, 川辺芳子, 町田和子, 倉島篤行, 蛇沢晶, 四元秀毅:結核性胸膜炎における局所麻酔下胸腔鏡の意義. 第47回日本呼吸器学会総会, 東京, 2007. 2. 倉島篤行, 鈴木純子, 川島正裕, 島田昌裕, 久能木真喜子, 金子有吾, 大島信治, 有賀晴之, 益田公彦, 松井弘稔, 長山直弘, 田村厚久, 赤川志のぶ, 永井英明, 川辺芳子, 町田和子, 中島由槻, 四元秀毅: Mycobacterium avium complex検出肺微

小病変の進展例と非進展例の検討. 第82回日本結核病学会総会, 大阪, 2007

3. 大島信治, 川辺芳子, 倉島篤行, 川島正裕, 島田昌裕, 久能木真喜子, 松井弘稔, 赤川志のぶ, 町田和子, 田村厚久, 永井英明, 長山直弘, 四元秀毅, 大嶋秀元, 平澤誠, 竹田信邦, 瀬下明子, 長野誠, 伊藤伸子: アンプリコアマイコバクテリウムPCR産物を利用したPCR-Invader法による抗酸菌迅速検出検査の有用性について. 第82回日本結核病学会総会, 大阪, 2007
4. 有賀晴之, 川辺芳子, 永井英明, 倉島篤行, 島田昌裕, 久能木真喜子, 金子有吾, 川島正裕, 大島信治, 鈴木純子, 益田公彦, 松井弘稔, 田村厚久, 長山直弘, 町田和子, 四元秀毅, 蛇沢晶, 渡邊亜矢子, 井上康子: 体腔液QFTを用いた結核性漿膜炎の診断. 第82回日本結核病学会総会, 大阪, 2007
5. 川辺芳子, 有賀晴之, 永井英明, 赤川志のぶ, 町田和子, 倉島篤行, 中島由槻, 四元秀毅, 渡邊亜矢子, 井上康子: 職員健診におけるQFT-2G検査の適用. 第82回日本結核病学会総会, 大阪, 2007
6. 有賀晴之, 川辺芳子, 永井英明, 倉島篤行, 鈴木純子, 益田公彦, 松井弘稔, 田村厚久, 長山直弘, 赤川志のぶ, 町田和子, 蛇沢晶, 四元秀毅: 活動性結核性胸膜炎の新しい特異的診断法 Pleural fluid cell-QuantiFERON TB 2G(FC-QFT). 第46回日本呼吸器学会総会, 東京, 2006.

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

研究協力者 矢野郁也 BCG 日本BCG研究所 取締役研究顧問

研究要旨

BCGワクチンに代る次世代サブユニットワクチン開発に必要な免疫強化物質をBCG菌を始めとする抗酸菌細胞壁より抽出単離し、構造解析を行うと共に免疫学的性質、毒性、病巣形成能等を比較した。今年度は種々Mycobacteriaから抽出したCord factor(trehalose 6,6'-dimycolate)7種について検討した結果、免疫強化活性と毒性には明らかな乖離が認められた。

A. 研究目的

結核ワクチンを始め難治性感染症や癌免疫療法を確立するための自然免疫強化物質が求められている。BCG菌を始めとする抗酸菌の細胞壁には細胞壁骨格(CWS)、コードファクター(TDM)、LAMやLM等のリポグリカン、PIM₂やPIM₆等のマンノースリン脂質が強力な細胞性免疫強化活性を有していることから、これらの細胞壁成分がアジュバント物質として注目されてきたがその効果や安全性(毒性)についての研究は十分ではない。新しい抗結核ワクチンや癌免疫療法剤として抗原と同時に必要なアジュバントの開発が必須である。

B. 研究方法

BCG菌細胞壁主要構成成分としてcord factor(TDM、TMM)、lipoarabinomannan(LAM)、Lipomannan(LM)及び細胞壁骨格(CWS)を精製単離し、各々の精密構造を解明し、ヒト末梢血及びマウスによるin vivoの系におけるTh-1、Th-2免疫増強能を解析して免疫療法又はワクチンアジュバント開発を行う。

C. 研究結果

コードファクター(TDM及びTMM): M. bovis BCG始め、M. tuberculosis、M. avium、M. phlei等各種抗酸菌よりTDM(及びTMM)を単離し、TOF-MASS分析を中心に構造、を解析し、ミセル粒度、毒性(マウス体重減少)、肉芽腫形成能(肺、脾)、胸腺萎縮能(アポトーシス)を比較検討した。サイトカイン産生能についてはTNF- α 、IFN- γ 産生能を中心に比較検討した。TDMはclassical adjuvantとして知られるが、毒性のため実用化に適さないとされているが結核菌以外のTDMは毒性が低く、アジュバント脂質として十分に使用に耐えられるものが見出された(文献)。

リポグリカン(LAM及びLM)及びPIM: M. bovis BCG菌より単離したLAMはマンノースキャップを有するMW15000~18000のリポグリカンでマンノース

20~40、アラビノース30~50からなる。一方LMはアラビノースを含まずマンノース20~40からなるホモリポグリカンでLAM/LM比は4:1、PIMはマンノース2~6個を含む成分で、このうちLAM/LMはヒト末梢血単核球に対して強力なTh-1免疫を誘導する。LMはTh-2免疫反応を抑制し、ワクチンアジュバントとして又抗アトピー剤としての効果が期待される。各種mycobacteriaのLAM/LM成分について検討した(投稿中)。

細胞壁骨格(CWS)及びarabinose mycolate: BCG-CWSは、既に30年前より抗癌免疫療法剤として期待されたアジュバント活性物質であるが、高分子ヘテロリポグリカンのため調製法が困難で、純度や活性面で均一でなく実用化には至っていなかった。新たに改良して調製した標品は純度も高く、TLR-2及びMyD88のみに反応しモルモットline 10 hepatomaのリンパ節転移を強力に阻止した。又新しい抗結核成分ワクチンアジュバントとしても期待され、抗癌DCアジュバントとしても用いられて、抗アトピー性Th-1増強、Th-2抑制剤としても可能性がある。

D. 考察 E. 結論

BCG菌のもつ強力な免疫活性は既に結核ワクチンのみならず膀胱癌免疫療法剤としても広く用いられている。より安全で効果的な次世代BCG製剤として菌体から抽出単離して得られるこれらcell wall成分は、モデル動物からヒトへの臨床応用が期待されるが、分子構造的には今後drug delivery systemの開発が必須であり、現在製剤化に向けたDDSの開発研究を進めている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kai M, Fujita Y, Maeda Y, Nakata N, Izumi S, Yano I, Makino M.: Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in Mycobacterium leprae. FEBS Lett, 581, 3345-3350, 2007.

- 2 . Miyamoto Y, Mukai T, Maeda Y, Nakata N, Kai M, Naka T, Yano I, Makino M.: Characterizaion of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from Mycobacterium aviumcomplex. J Bacteriol, 188, 5515-5522, 2007.
- 3 . Maeda Y, Mukai T, Kai M, Fukutomi Y, Nomaguchi H, Abe C, Kobayashi K, Kitada S, Mekura R, Yano I, Ishii N, Mori T, Makino M.: Evaluation of membrane protein II as a tool for serodiagnosis of leprosy. FEMS Microbiol Lett, 272, 202-205, 2007.
- 4 . Homhuan A, Kogure K, Akaza H, Futaki S, Naka T, Fujita Y, Yano I, Harashima H.: New packaging method of mycobacterial cell wall using octaarginine-modified liposomes; Enhanced uptake by and immunostimulatory activity of dendritic cells. J. Controlled Res. 120, 60-69, 2007.
- 5 . Fujita Y, Okamoto Y, Uenishi Y, Sunagawa M, Uchiyama T, Yano I.: Molecular and supramolecular structure related differences in toxicity and granulomatogenic activity of mycobacterial cord factor in mice. Mycob.Pathog. 43(1):10-21, 2007.
- 6 . Kitada S, Nishiuchi Y, Hiraga T, Naka N, Hashimoto H, Yoshimura K, Miki K, Miki M, Motone M, Fujikawa T, Kobayashi K, Yano I, Maekura R.: Serological test and chest computed tomography findings in patients with MAC lung disease. Eur. Respir. J. 29:121701223, 2007.
- 7 . Fujiwara N, Nakata N, Maeda S, Naka T, Doe M, Yano I, Kobayashi K.: Structural characterization of a specific glycopeptidolipid containing a novel N-acyl-deoxy sugar from Mycobacterium Intracellulare serotype 7 and genetic analysis of its glycosylation pathway. J. Bacteriol. 189(3), 1099-1108, 2007.

ヒトマクロファージの結核菌殺菌機構の解明

研究協力者 赤川清子 北里研究所基礎研究所嘱託部長

研究要旨

Hck およびC/EBPβの発現と、ヒトマクロファージ (Mφ) の抗結核菌活性の発現との関係を検討をした。結核菌感染により、M 型MφおよびIL-10 処理GM 型MφでのみHck およびC/EBPβの発現増強が認められ、GM 型Mφでは認められなかったことより、ヒトMφの結核菌の殺菌や増殖抑制活性の発現とHck およびC/EBPβの発現増強が相関することが知られた。

A. 研究目的

結核は、世界3大感染症の一つで有り、その征圧は世界的に要求されている。特に多剤耐性結核 (MDR-TB) の増加や超多剤耐性結核 (XDR-TB) の出現などが近年激しく、その対策がWHOの警告にみるように世界的に要求されている。

多剤耐性結核の制御のためには新薬の開発が重要であるが、抗菌剤は耐性菌の出現が常に伴う。そのため、宿主の抗結核防御機構の増強による病気の制御が必要である。本研究では結核菌はマクロファージ (Mφ) を主な増殖、生存の場所とするため、Mφの結核菌の殺菌、増殖制御機構を明らかにし、Mφの殺菌、増殖抑制活性の増強法の開発に役立つ。

ヒト単球よりM-CSFで分化誘導したM型MφとGM-CSFで分化誘導したGM型Mφ (ヒト肺胞Mφ に形質が似ている) は結核菌感受性が異なり、前者は結核菌を殺菌するとともに、結核菌の増殖を抑制する因子を産生すること、一方後者は結核菌の増殖を促す。また、これら両Mφ の結核菌感染感受性の違いは、NRAMP1 の発現およびMAPカインースの活性化の違いと関連する。

今回、Src カインースの一つであるHck および転写因子C/EBPβの発現の違いが、Mφの結核菌感染感受性の違いと関係するか否か検討をした。

B. 研究方法

リコンビナントヒト (rh) GM-CSF は、Shaeing Plau 社より、rhM-CSF は、森永乳業よりそれぞれ供与された。rhIFN-γおよびγ hIL-10 は、Genzyme 社より購入した。ヒト単球の調整は、正常ボランテア の末梢血よりリンホブレップにて分離した単球より、CD14 ビーズ抗体とMACS によりCD14 陽性の単球画分を分離精製した。これら単球をM-CSF (100ng/ml) およびGM-CSF (50 ng/ml)存在下に10%FCS を含むRPMI1640 培地で1週間培養し、M 型Mφ及びGM 型Mφを作製した。M 型MφおよびGM 型Mφの結核菌 (H37Rv) 感染前後のHck および

C/EBPβの発現をウエスタンブロットで調べた。また、GM 型M φをIL-10 で処理すると結核菌の増殖を抑制することより、これらIL-10 処理GM 型MφのHck およびC/EBPβの発現も検討した。

(倫理面への配慮)

正常ボランテアよりの血液の採取に関しては、インフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

1) M型MφはHckを強く発現し、結核菌感染によりその発現はさらに増強した。一方、GM型Mφ ではHckの発現は弱く、結核菌感染によっても発現増強はほとんど認められなかった。IL-10 処理GM型Mφは、M型Mφ同様結核菌感染によりHckの発現増強を認めた(図1)。

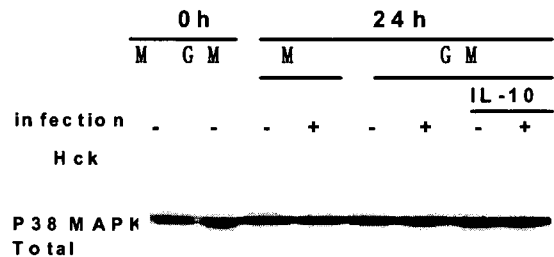


図1 Expression of Hck in *M. tuberculosis* H37Rv infected-human monocyte-derived macrophages.

2) M 型Mφは結核菌感染によりC/EBPβ の強い発現を認めたが、GM 型Mφでは認められなかった。しかし、IL-10 処理GM 型Mφでは、M 型Mφ同様結核菌感染によりC/EBPβの発現が認められた(図2)。

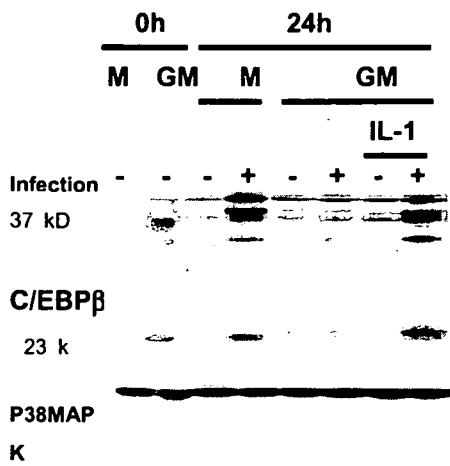


図2 Expression of C/EBP β in *M. tuberculosis* H37Rv infected-human monocyte-derived macrophages.

D. 考察

今回、ヒトMφの結核菌の殺菌および増殖抑制活性の発現とHckの発現とが相関することが知られた。最近、ヒトMφにおいてHckの発現の違う2種類のリソソームの存在が知られ、殺菌にはHckを発現するリソソームとファゴソームの融合が重要であることが示唆された。このことより、M型MφおよびIL-10処理GM型Mφでは、Hck陽性リソソームの発現が高く、そのため効率良く結核菌の殺菌増殖抑制活性が誘導されると考えられる。

また、結核菌をはじめ細胞内寄生性細菌感染へのC/EBP β の重要性は、ノックアウトマウスの実験から示唆されているが、ヒトMφの場合も結核菌の殺菌および増殖抑制活性の発現とC/EBP β の発現が相関したことより、ヒトMφの抗結核菌活性の発現におけるC/EBP β の重要性が示唆された。

我々は、既にM型MφとGM型Mφにおける、HIV-1の増殖応答の違いは、HckとC/EBP β の発現パターンの違いによること、またこれらの分子の発現パターンを変化させることで、HIV-1の増殖応答を変えることができることを報告している。

もし、HckおよびC/EBP β の発現の違いが結核菌の殺菌や増殖抑制活性の違いと関係するならば、これら分子の発現を変えることで、Mφにおける結核菌の増殖を制御することができるかもしれない。

E. 結論

結核菌感染により、M型MφおよびIL-10処理GM型MφでのみHckおよびC/EBP β の発現増強が認められたことより、ヒトMφの結核菌の殺菌や増殖抑制活性の発現とこれらの分子の発現が相関することが知られた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 赤川清子: マクロファージの多様性とその起源、“生体防御医学事典”(鈴木和男監修)、p132-138, 朝倉書店, 2007

2. 学会発表

なし

知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
高鳥毛敏雄	ホームレス研究 —釜ヶ崎からの発信—	高田敏・桑原 洋子・逢坂隆 子編	7 ホームレ スの健康と保 健・医療	信山社		2007	172- 187
中島俊洋	第2章 遺伝子治 療用医薬品等の品 質・安全性確保、第 6節 非ウイルスベ クター、バイオ医薬 品の開発と品質・安 全性確保	早川堯夫監修		アイ・エル・ シー		2007	631-65 1
赤川清子	マクロファージの多 様性とその起源	鈴木和男監修	生体防御医 学事典	朝倉書店		2007	132- 138
服部俊夫	ウイルス感染とバイ オディフェンス		Mebio			2007	24:16-2 1
服部俊夫	内部障害のリハビリ テーション.	佐藤徳太郎編	HIV感染症	医師薬出 版		2007	213-22 8

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
岡田全司	Neuritogenic Effects of T Cell- Derived IL-3 on Mouse Splenic Sympathetic Neurons In Vivo.	The Journal of Immunology,	180	4227-4234	2008
岡田全司	Evaluation of a novel vaccine (HVJ- liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB.	Vaccine	25(16)	2990-2993	2007
岡田全司	Pulmonary Mycobacterium avium complex infection associated with the IVS8-T5 allele of the CFTR gene.	Int J Tuberc Lung Dis.	11(7)	808-813	2007
岡田全司	Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models.	Vaccine	25(16)	3038-3040	2007
岡田全司	Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis- Comparison between Multidrug- Resistant Strains and Pan-Sensitive Strains.	Kekkaku	82(6)	531-538	2007

岡田全司	Molecular epidemiological analysis of Mycobacterium kansasii isolates.	Kekkaku	82(2)	103-110	2007
岡田全司	Novel Vaccination (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) Against Tuberculosis Using Cynomolgus Monkey.	" 13 th International Congress of Immunology " Edit Jorge Kalil, Edecio Cunha-Neto, Luiz Viente Rizzo, MEDIMOUUD Intern		119-122	2007
岡田全司	平成17年度国立病院機構共同臨床研究「国立病院機構における臨床研究部の活性化と適切な評価法に関する研究」班:施設長を対象とした臨床研究部・研究センターに関するアンケート調査	医療	61(8)	546-553	2007
岡田全司	新しい結核ワクチン	感染症	7	14-18	2007
岡田全司	国際ワクチン学会“学会レポート”.Fifth World Congress on Vaccines, Immunization and Immunotherapy	感染・炎症・免疫	37	66-67	2007
岡田全司	新しい結核ワクチンの新展開.	最新医学		125-130	2007
岡田全司	新しい結核ワクチンの開発	呼吸と循環			in press
岡田全司	BCGと新たな結核ワクチン	呼吸器科			in press
岡田全司	新しい結核ワクチンの新展開	結核	82(10)	794-797	2007
岡田全司	抗酸菌研究の最前線 新しい結核ワクチン開発	結核	82(10)	794-797	2007
岡田全司	結核菌の分子疫学的解析 多剤耐性結核菌と全剤感受性結核菌との比較	結核	82(6)	531-538	2007
岡田全司	新しい結核ワクチン	結核	7(1)	14-18	2007
菅原 勇	BCG vaccination enhances reistance to M. tuberculosis infection in guinea pigs fed a low casein diet.	Tohoku J Exp Med	211	259-268	2007
菅原 勇	Prenatal exposure to diesel exhaust impairs mouse spermatogenesis.	Inhal Toxicol	19	275-281	2007
菅原 勇	Evaluation of accuracy ofclinical diagnosis of TB by annual autopsy report.	Kekkaku,	82	165-171	2007

菅原 勇	Airway inflammatory responses to oxidative stress induced by low-dose diesel exhaust particle exposure differ between mouse strains.	Exp Lung Res	33	227-244	2007
菅原 勇	Histological classification of systemic Mycobacterium avium complex infections in slaughtered domestic pigs.	Comp Immunol Microbiol Infect Dis			2007 in press
菅原 勇	Recombinant BCG Tokyo (Ag85A) protects cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>) infected with H37Rv <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Tuberculosis	87	518-525	2007
菅原 勇	Lack of correlation between embB mutation and ethambutol minimal inhibitory concentration in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> clinical isolates from China.	Antimicrob Agents Chemother	51	4515-4517	2007
菅原 勇	Retinoic acid therapy attenuates the severity of tuberculosis while altering lymphocyte and macrophage numbers and cytokine expression in rats infected with <i>M.</i>	tuberculosis. J Nutr,	137	2696-2700	2007
菅原 勇	Overview of anti-tuberculosis drugs and their resistance mechanisms.	Curr Reviews Medicinal Chem	11	1177-1185	2007
菅原 勇	Detection of streptomycin resistance in <i>M. tuberculosis</i> clinical isolates from China as determined by denaturing HPLC analysis and DNA sequencing.	Microbes Infect	9	1538-1544	2007
菅原 勇	Comparison of usefulness between VNTR analysis and RFLP in the genotyping of <i>M. avium</i> .	Kekkaku	82	741-748	2007
菅原 勇	Report of the meeting for researchers in charge of TB molecular epidemiology in Japan, China and Korea.	Kekkaku	12	925-927	2007
菅原 勇	Frequency of MDR-TB/XDR-TB strains isolated from chronic pulmonary tuberculosis patients in Japan.	Kekkaku	12	891-896	2007

野内英樹	The Khanh Hoa Health Project: Characterization of Study Population and Field Site Development for Clinical Epidemiological Research on Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases	Tropical Medicine and Health	35(2)	61-63	2007
服部俊夫	Serological response against MAC glycolipid antigens in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).	Microbiology and Immunology,			2007 in press
服部俊夫	Increased synthesis of anti-TBGL IgG and IgA with cavity formation in pulmonary tuberculosis.	Clinical Vaccine and Immunology.			2007 in press
服部俊夫	Anti-tuberculosis drug susceptibility testing of Mycobacterium bovis BCG.	Int J Tuberc Lung Dis.	11(12)	1334-1338	2007
服部俊夫	Clathrin-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into target cells expressing ACE2 with the cytoplasmic tail deleted. J.	Virology.	81(16)	8722-8729	2007
服部俊夫	Up-regulation of hepatitis C virus replication by human T-cell leukemia virus type I-encoded Tax protein.	Virology	369(1)	198-205	2007
服部俊夫	Small RNA Molecules as Therapeutic Gents for Viral Infectious Diseases,	Journal of Pharmacology and Toxicology	2	103-113	2007
服部俊夫	Efavirenz-induced neurological symptoms in rare homozygote CYP2B6 *2/*2 (C64T).	Int. J. STD AIDS.	18(8)	575-576	2007
服部俊夫	Secondary bronchiolitis obliterans organizing pneumonia in a patient with carbamazepine-induced hypogammaglobulinemia.	Thorax,	62	100	2007
服部俊夫	Decreased expression of antioxidant enzymes and increased expression of chemokines in COPD lung.	pulmonary pharmacology & Therapeutics	20	596-605	2007
服部俊夫	ウイルス感染とバイオディフェンス	Mebio	24	16-21	2007
高鳥毛敏雄	Loss of conserved 7-methylguanosine modification in 16SrRNA confers low-level streptomycin resistance.	Mol. Microbiol	63(4)	1096-1106	2007
高鳥毛敏雄	Development of in-house Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of Mycobacterium tuberculosis and evaluation in sputum samples of Nepalese patients.	JMM			2007 in press

高鳥毛敏雄	The recovery of avium-intracellulare complex (MAC) from the residential bathroom of patients with pulmonary MAC. Clin.	Infect. Dis.	45(3)	347-351	2007
高鳥毛敏雄	結核高罹患地域における医療施設外来受診者に対する結核検診の意義.	結核	82(5)	455-458	2007
高鳥毛敏雄	ホームレス者の結核の実態とその対策に関わる研究－結核検診の3年間の実践から.	結核	82(1)	19-25	2007
竹田 潔	Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency.	J. Exp. Med.	204	2233-2239	2007
竹田 潔	STAT3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice.	Hepatology	46	1564-1573	2007
竹田 潔	Bone marrow retaining colitogenic CD4 ⁺ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis.	Gastroenterology	132	176-189	2007
阿部千代治*	Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy.	FEMS Microbiol Lett	272	202-205	2007
阿部千代治	Synthesis of new sugar derivatives from Stachys sieboldi Miq and antibacterial evaluation against Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium, and Staphyrococcus aureus.	Bioorg Med Chem Lett	17	2487-2391	2007
阿部千代治	結核菌のバイオハザード対策	Med Technol	36	136-141	2008
阿部千代治	今回の結核菌検査指針改訂のポイント	結核	83	46-47	2008
阿部千代治	バクテックMGIT 960結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ (MGIT AST)および小川標準法によるイソニアジド低濃度薬剤感受性検査の判定不一致に関する検討.	結核	82	449-454	2007
坂谷光則	Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome / HSP65 DNA + IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB.	Vaccine	25(16)	2990-2993	2007
坂谷光則	Pulmonary Mycobacterium avium complex infection associated with the IVS8-T5 allele of the CFTR gene.	Int J Tuberc Lung Dis	11(7)	808-813	2007
坂谷光則	Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models.	Vaccine	25(16)	3038-3040	2007
坂谷光則	Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis- Comparision between Multidrug-Resistant Strains and Pan-Sensitive Strains.	Kekkaku.	82(6)	531-538	2007