

に作成したハンセン病治療指針の全面改訂を行ったハンセン病治療指針(第2版)を、ハンセン病医学夏期講座などで配布し講義を行った。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 儀同政一：ニューキノロン系抗菌薬の構造式と抗らい菌活性の相関、日本ハンセン病学会雑誌、78：17-23, 2009.

2. 学会発表

1) 儀同政一、松岡正典：rifabutin と doxycycline の抗らい菌活性、第81回日本ハンセン病学会総会、熊本、2008

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

Fig. 1. Activity of DC-159a against *M. leprae* in Nude Mice

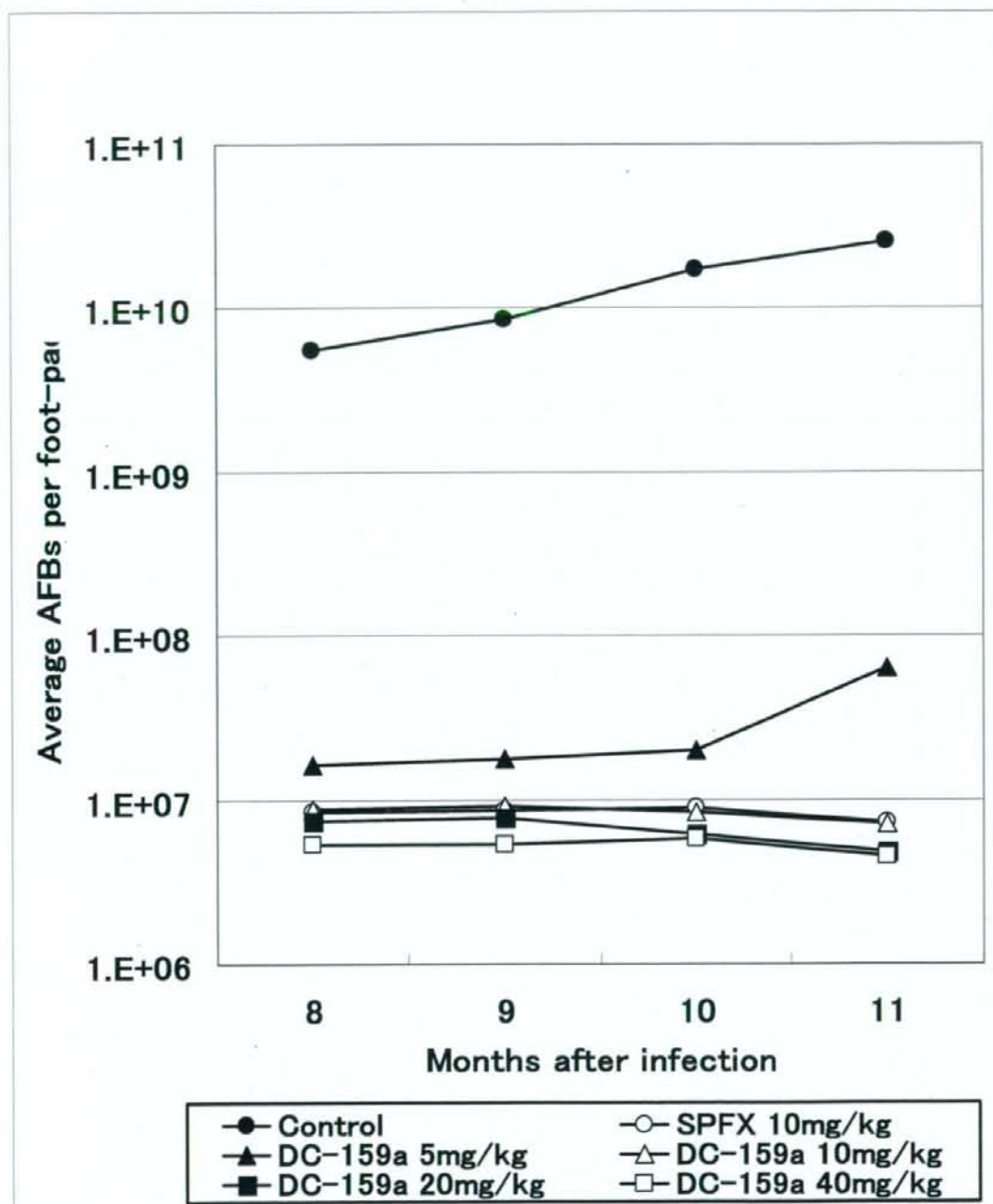
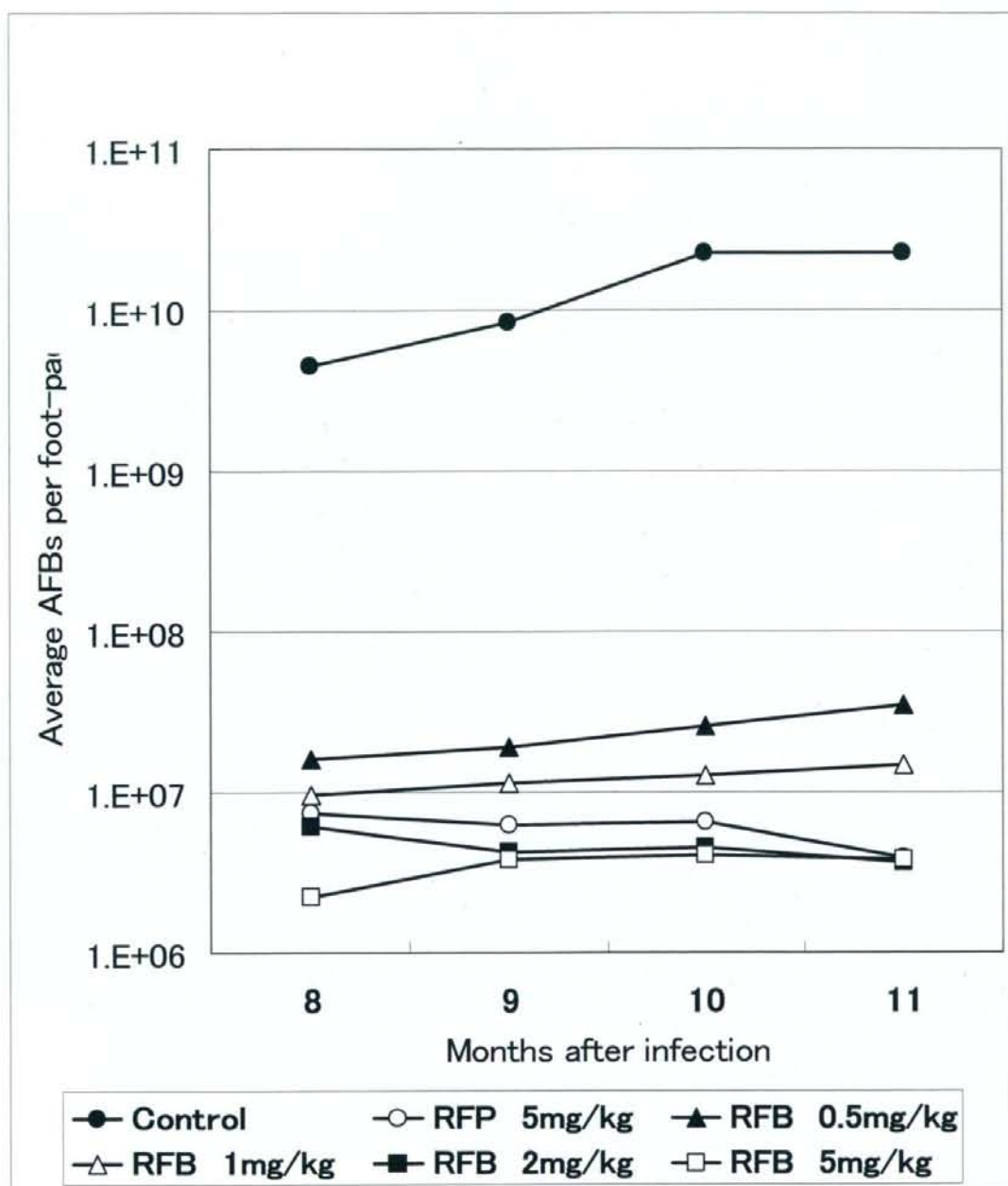


Fig. 2. Activity of Rifabutin against *M. leprae* in Nude Mice



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

宿主内におけるらい菌の殺傷および
菌増殖機構の解析

平成20年度 分担研究報告書

研究分担者 福富 康夫

（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

宿主内におけるらい菌の殺傷および菌増殖機構に関する研究

研究分担者 福富康夫 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二室長

研究要旨 らい菌が宿主内で増殖、または殺菌される機構を *in vitro* において解明することを目的として、らい菌が寄生して増殖するマクロファージ内におけるらい菌の動態を探った。その結果、35 度で培養するとマウスマクロファージやヒトマクロファージ内においてらい菌の代謝活性が 2 週間以上保持されることを見出し、さらに 35 度にて IFN γ 存在下で培養した M-CSF 誘導ヒトマクロファージ(M-マクロファージ)に抗らい菌活性(らい菌の代謝活性減少)が誘導され、この時スーパーオキシドを産生する NADPH オキシダーゼを構成する幾つかの phox タンパクサブユニットの発現が増強していることが判明した。一方、GM-CSF 誘導ヒトマクロファージ(GM-マクロファージ)は IFN γ に対する応答性が弱く、抗らい菌活性を誘導しにくかった。また、発現増強のみられないタンパクサブユニットがあった。よって、phox タンパク発現量の変動がハンセン病におけるらい菌に対する殺菌作用に影響を与えている可能性が示唆された。さらに、酸化窒素 NO 合成酵素阻害剤ではマウスマクロファージの抗らい菌活性は抑制されたが、M-マクロファージの抗らい菌活性は抑制されなかったことからヒトにおいて殺菌分子としての NO の関与は少ないことが確認された。

A. 研究目的

ハンセン病において、LL型ではらい菌が宿主細胞であるマクロファージ内で増殖するが TT 型では殺菌される。殺菌にはマクロファージの活性化が大きく関与しているが、その機構について詳細は不明である。よって、その機構を調べることで特徴的な病態形成の原因を解明し、新たな治療法を開発するための有益な情報を得る。

B. 研究方法

マウスマクロファージの培養:リタイアメス ICR マウス腹腔常在細胞を、アンピシリン 50 μ g/ml 含有 10%ウシ胎児血清(FBS)-RPMI1640 また

は DMEM 培地に浮遊させ、 1×10^6 個の細胞をカバースリップの入った 24 穴プレートウェル中にて 2 時間ないし一晩培養した。Hanks 液にてカバースリップを十分に洗い非附着細胞を除いた後、マクロファージの張り付いた同カバースリップを再び 24 穴プレート中にて培養した。ヒトマクロファージの培養:健康人末梢血よりフィコールを用いた比重勾配遠心法により単核球を分離して AIM 培地に浮遊させカバースリップの入った 24 穴プレートウェル中 (2×10^5 /well) にまき 37 度で 1 時間培養した。HBSS にてウェル内を洗浄し非附着細胞を除いて単球を精製し M-CSF もしくは GM-CSF を加えた 20%FBS 添加 RPMI1640 培地にて 1 週

間以上培養し単球からマクロファージに分化させてかららい菌を感染させた。

マクロファージへのらい菌感染:ヌードマウスフットパッドに接種して増殖したらい菌を回収して精製し、 3.3×10^7 個/mlに調整し300 μ lづつ(らい菌 1×10^7 個/ウェル)マクロファージが張り付いたカバースリップの入ったウェルに添加した。そして、マウスマクロファージの場合は4時間、ヒトマクロファージの場合は20時間培養し、カバースリップを取り出しHBSS液にて洗浄、さらに培養を継続した。そして、0.1N NaOH溶液中にカバースリップを入れマクロファージを可溶化して菌を得てradiorespirometryにて菌の代謝活性を測定した。

Radiorespirometry: BuddemeyerやFranzblauらの方法を改変してらい菌の脂肪酸 β 酸化反応を測定した。Wheaton社製の4mlガラスバイアルにらい菌を含んだ $1 \mu\text{Ci/ml}$ の $1\text{-}^{14}\text{C}$ -パルミチン酸(NEC075H)含有抗酸菌培養用7H12培地を1ml加え、雑菌の増殖を防ぐためにアンピシリンとアンフォテリシンB(Sigma社製)を添加した。よく混合後、バイアルのキャップをゆるめて、NaOH処理シンチレータを添加した20ml容量プラスチックバイアル中にこのバイアルを挿入した。プラスチックバイアルのキャップを強く閉め、32度にセットしたふ卵器中にて静置培養した。そして7日目にシンチレーションカウンターにて放出されたアイソトープ量を測定した。

抗酸菌染色:カバースリップ上のらい菌感染マクロファージを塩基性フクシン液で20分間室温にて染色し、1%塩酸アルコールによる脱色、メチレンブルーによる対比染色後に光学顕微鏡下で観察した。

ウエスタンブロッティング:らい菌感染ヒトマクロファージにIFN γ を添加し、5%CO $_2$ 存在下で

35度にて一定期間培養した後Sigma社製 cell lytic M 溶液にて細胞を可溶化して lysate を得た。SDS 電気泳動を行って lysate から分離したタンパクをさらに PVDF 膜に転写、各種抗体(抗 phox 抗体(Cell Signal Technology 社)、抗 iNOS 抗体、抗 SOD 抗体(Santa Cruz 社)を4度にて一晩反応させ、次に HRP 標識二次抗体を反応させ化学発光による X 線フィルムへの露出で各種タンパクを検出した。検出後は PVDF 膜を stripping buffer (Pierce 社) に浸して振とうさせて抗体を除去し再度抗体を反応させて別のタンパク検出を行った。

(倫理面での配慮)

国立感染症研究所実験動物委員会の承認を得、実験動物指針に則り実験を行った。実験期間中の動物は、心理的、生理的苦痛の軽減を目的とした処置を施した。

C. 研究結果

われわれは、脱カルボキシル化代謝反応(β 酸化)を定量する radiorespirometry にてらい菌の代謝活性を測定し、マクロファージ内らい菌の生存率評価を行っている。ヌードマウスより得られた新鮮ならい菌を in vitro にてマウスマクロファージに貪食させ培養した。マクロファージ内のらい菌の生存率は 37 度では早期に低下し、35 度に下げると著明に生存率は上昇した(Fig. 1)。また、マクロファージあたりの感染菌量を変えて 35 度で培養し経時的に菌の代謝を調べたところ、各菌量群とも 1 週間目までは感染時の代謝量が維持されていたが、それ以降は徐々に代謝が減少した(Fig. 2)。同様に、ヒト健常人末梢血より単球を得て、M-CSF もしくは GM-CSF を添加し一週間以上培養してマクロファージを得た(各々 M-マクロファージ、GM-マクロファージ)。そして、一晩らい菌存在下で 35 度にて培養し貪食させ(マクロファージ

への取り込みは抗酸菌染色にて確認)、これら感染マクロファージを35度で培養を継続した。M-マクロファージ、GM-マクロファージ中のらい菌は2週間以上にわたって代謝活性を維持していた(Fig. 3)。

次に、35度で培養したらい菌感染ヒトM-マクロファージにおいてphox(phagosome oxidase)タンパクの発現をWestern blot法により調べたところ、IFN γ 添加によりp22-phoxとp47-phoxの発現が著明に増加した(Fig.4)。らい菌感染の有無はあまり影響がなかったが感染すると若干の増強作用がみられた(Fig.4)。また、p40-phox、p67-phoxの発現はIFN γ 刺激でも変化がなかった(Fig.4)。GM-マクロファージでも同様にp47-phoxの発現増強があったがp67-phoxには変化がなかった(Fig.5)。M-マクロファージとGM-マクロファージでp22-phox発現の違いがあり、M-マクロファージではIFN γ 刺激で発現が増強したが、GM-マクロファージでは変化がなく未刺激の状態でも発現量が多かった(Fig.5)。

一方、スーパーオキシドをスカベンジするスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)の発現は両マクロファージ共に変化がなかった(Fig.4,5)。マウスマクロファージではIFN γ による活性化で誘導型酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現が著明に増強し上清中に酸化窒素が蓄積するが、ヒトマクロファージでは上清中の酸化窒素の蓄積がみられず、iNOSの発現増強もみられなかった(昨年度報告)。NO合成阻害剤を用いても、ヒトマクロファージの抗らい菌活性は影響を受けなかった。一方、マウスマクロファージの抗らい菌活性は著明に抑制された(Fig.6)。

D. 考察

ハンセン病はらい菌によって引き起こされる慢性感染症である。マウスフットパッド接種による動物実験でらい菌の最適発育温度は25~30度といわれている。らい菌は皮膚近くの末梢神経中のシュワン細胞やマクロファージ内で増殖し低体温部を好む。本研究のin vitroでの結果はこのin vivoの観察を裏付ける重要な情報も提供している(Figs.1,2,3)。

らい菌は培養できないためマクロファージのらい菌に対する殺菌作用の解析は困難であったが、現在ではらい菌はヌードマウスフットパッドやアルマジロに接種してin vitro増殖したものが得られ、また、菌のATPやPGL量を測定したり、放射性同位元素標識パルミチン酸の代謝量を測定(radiorespirometry)することで、らい菌の生存率をより正確に定量することができる。そして、radiorespirometryを用いてマウスマクロファージの抗らい菌活性が調べられ、細胞性免疫の主役を担っているIFN γ がTNFと共同してマクロファージを活性化し抗らい菌活性を発現することが証明されている。本研究ではTNFの関与は明らかでないが、IFN γ 刺激したマクロファージ中のらい菌の代謝低下、すなわち抗らい菌活性を認めた。ハンセン病において小菌型であるTT型では病巣でTh1型サイトカインが主に発現しており、その中でIFN γ がマクロファージを活性化して抗らい菌作用を発揮すると長い間いわれてきたがそれを証明したことになる。また、二種類のCSFで誘導されたマクロファージについて、M-CSFで誘導されたM型マクロファージの方がGM-CSFで誘導されたGM-マクロファージより抗らい菌活性が誘導されやすいことは非常に興味のあるところである。マウスマクロファージではIFN γ によって酸

化窒素合成酵素が強く発現誘導され、この酵素により酸化窒素が産生され抗酸菌に対し殺菌的に作用することが知られている。一方、ヒトにおいては酸化窒素の産生と抗菌作用との関連は明確にはなっておらず、われわれの結果でもIFN γ でiNOSが誘導できなかった。以前よりマクロファージの産生するH₂O₂やスーパーオキシドが殺菌作用を有することが報告されている。スーパーオキシド産生はNADPHオキシダーゼによって酸素分子に電子が付加される反応で起こる。NADPHオキシダーゼは主にファゴソーム膜に局在するgp91-phoxタンパクとp22-phoxタンパク、そして細胞質に存在するp40-phoxタンパク、p47-phoxタンパクとp67-phoxタンパクそれぞれのサブユニットからなり、活性化に伴い細胞質の2つのタンパクは細胞質からファゴソーム膜に移動しファゴソーム膜上の2つのタンパクと複合体を形成すると報告されている。また、タンパクリン酸化も活性化に関わっている。われわれの観察結果ではヒトM-マクロファージのIFN γ 刺激でいくつかのphoxタンパクが著明に増加することが判明した。一方、GM-CSF誘導マクロファージは抗らい菌活性を誘導しにくくIFN γ 刺激してもp22-phoxは発現増強がみられなかった。GM-マクロファージはスーパーオキシド産生能が低いのもかもしれない。SODはスーパーオキシドをスカベンジする酵素であるがM-マクロファージにおいてSODの発現は変化しなかったことから、IFN γ 添加によりphox発現が特異的に増加することがスーパーオキシドの蓄積につながり、TT型ハンセン病にみられるような殺菌作用の増強につながっている可能性が示唆された。また、ヒトマクロファージの殺菌におい

てNOの関与は、NO合成阻害剤を用いた結果から、昨年度の報告（IFN γ 刺激によるiNOSタンパク発現量変化なし）と同様やはり少ないと思われた。

E. 結論

IFN γ 存在下で培養したM-CSF誘導マクロファージに抗らい菌活性が誘導され、この時スーパーオキシドを産生するNADPHオキシダーゼタンパクサブユニットphoxの幾つかの発現が増強していることが判明した。一方、GM-CSF誘導マクロファージには抗らい菌活性を誘導しにくく発現増強のみられないphoxもあった。よって、phoxタンパク発現量の変動がハンセン病における抗らい菌に対する殺菌作用に影響を与えている可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kai M, Nguyen Puc NH, Hoang Thi TH, Nguyen AH, Fukutomi Y, Maeda Y, Miyamoto Y, Mukai T, Fujiwara T, Nguyen TT, and Makino M.: Serological Diagnosis of Leprosy in Patients in Vietnam by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with *Mycobacterium leprae*-Derived Major Membrane Protein II. Clin Vaccine Immunol 15: 1755-1759, 2008.

2. Yasuo Fukutomi, Yumi Maeda, Masanori Matsuoka, and Masahiko Makino: Temperature Dependency for Survival of *Mycobacterium leprae* in Macrophages. Jpn J lepr 78(1): 7-16, 2009.

2. 学会発表

1. 福富康夫・前田百美・牧野正彦：クロ

ファジミンにより誘導されるマクロファージの細胞死と caspase 等細胞内情報伝達分子の動態、第81回日本細菌学会総会、京都、2008年3月

2. 前田百美、田村敏生、**福富康夫**、牧野正彦：LipoKの細胞障害性T細胞活性化及びエキソゾーム産生に及ぼす影響、第81回日本細菌学会総会、大阪、2008年3月

3. **福富康夫**・前田百美・牧野正彦：ヒトマクロファージ内におけるらい菌の生存機構、第81回日本ハンセン病学会総会、熊本

、2008年5月

4. **Yasuo Fukutomi** and Masahiko Makino: Enhanced phox expression in *M.leprae* infected human macrophages stimulated with IFN- γ . 第38回日本免疫学会総会・学術大会、京都、2008年12月

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

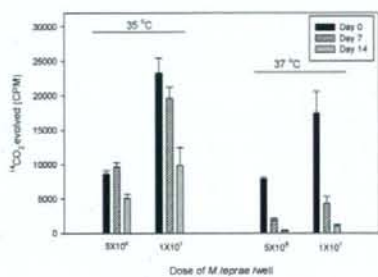


Fig.1. Metabolic activity of *M.leprae* in mouse macrophages cultured *in vitro* by radiorespirometry analysis

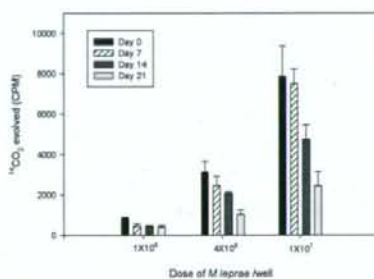


Fig.2. Metabolic activity of *M.leprae* in mouse macrophages cultured *in vitro* by radiorespirometry analysis

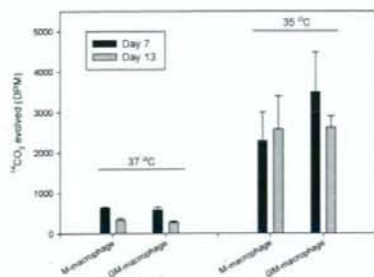


Fig.3. Metabolic activity of *M.leprae* in human macrophages cultured *in vitro* by radiorespirometry analysis

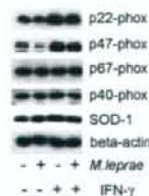


Fig.4. NADPH oxidase (phox) expression in human M-macrophages by stimulation with *M.leprae* and IFN- γ

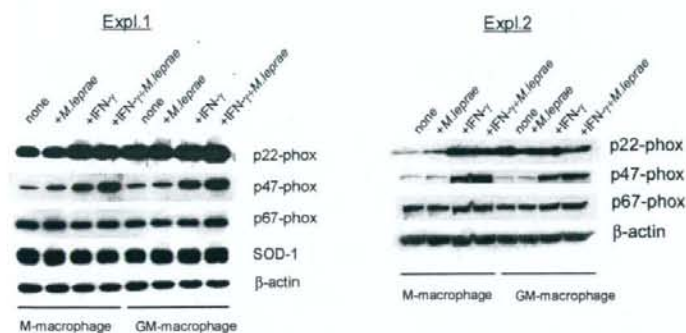


Fig.5. NADPH oxidase expression in human M-and GM-macrophages by stimulation with *M.leprae* and IFN- γ

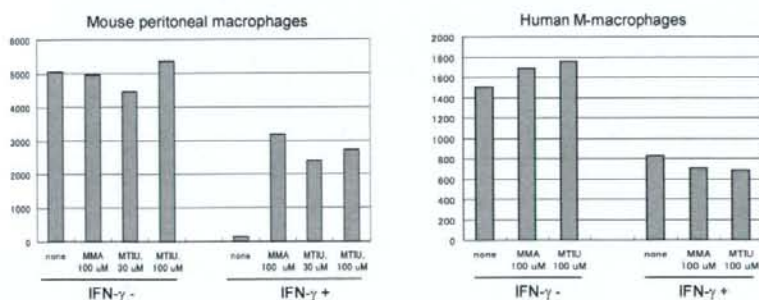


Fig.6. Effect of NO inhibitors on anti-*M.leprae* response in mouse and human macrophages.

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

免疫原性機能低下を凌駕する
細胞性免疫賦活法の開発

平成20年度 分担研究報告書

研究分担者 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

免疫原性機能低下を凌駕する細胞性免疫賦活法の開発

研究分担者 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：らい菌のリポ蛋白 LpK の N 末端をコードするリポペプチド LipoK を用いて、その免疫学的役割を検討した。LipoK は NF- κ B を介して樹状細胞を活性化し、大量に IL-12 を産生した。T 細胞と混合培養すると、有意に IFN- γ を産生され、LipoK 存在下では、67.5% の CD4 陽性 T 細胞または 38.9% の CD8 陽性 T 細胞が分裂している事が判明した。昨年度 CD8 陽性 T 細胞からパーフォリン及びグランザイム B 産生が有意に増強したことを報告した。今回、CD8 陽性細胞と同様に CD4 陽性細胞も CTL 活性があることが判明した。その際、IL-2 は必須でないことから、他の分子が主に関与していると考えられた。らい菌の生存率を調べると、LipoK はらい菌の殺戮に関与している事が明らかになった。LipoK は免疫療法分子として活用できることが示唆された。

A. 研究目的

らい菌のリポ蛋白 LpK の N 末端部分が重要であるが、大量に精製できないため、13 アミノ酸配列を含むリポペプチド LipoK を合成し、免疫活性を検討した。LipoK により成熟した樹状細胞が抗原を T 細胞に提示し、活性化することを明らかにした。

生体防御において感染した細胞を破壊するため、CTL 細胞の果たす役割が大きい事が知られている。そこで、CTL が標的細胞に接触すると、パーフォリン (perforin) を分泌させ、細胞膜に孔をあ

ける。また、グランザイム (granzyme) は細胞障害性 T 細胞の顆粒内に存在して、標的細胞の破壊に関与する蛋白分解酵素です。つまり、CTL はパーフォリンによって標的細胞表面に孔を開けて、そこからグランザイムを注入して標的細胞を破壊することが知られている (図 1)。そこで今回 LipoK における、CD8 陽性 T 細胞からのパーフォリン及びグランザイム B の産生能及び CD4 陽性 T 細胞の役割を検討した。

B. 研究方法

LpK の N 末端 13 アミノ酸を含む合成リ

ポペプチド (LipoK) は 25mg/ml の濃度で -80°C に保存した。樹状細胞は正常健康者ヒト末梢血単球よりサイトカインを用いて分化誘導したのち、LipoK またはらい菌でパルスし、24 時間後に IL-12 p70 の産生を測定した。CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞は Human T Lymphocyte Enrichment Set (BD) を用いて精製した。T 細胞の増殖は Molecular Probes 社のカルボキシフルオレセイン・ジアセテート (CFSE) を用いて、フローサイトメトリで測定した。IL-12 及び IFN- γ の測定は BD Pharmingen の OptEIA キットを用いて ELISA 法で半定量化した。パーフォリン、グランザイム B 産生 T 細胞は FACS Calibur を用いて以下の方法で定量した。樹状細胞-T 細胞培養後、5 日目に Golgi stop (BD) を添加し、18 時間後に細胞を回収し標識抗体を用いて intracellular 染色した。

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を漏出しないように注意を払った。

C. 研究結果

末梢血単球から分化した樹状細胞を LipoK 及びらい菌で刺激すると、大量の IL-12 p70 が産生された。NF- κ B のインヒビターである parthenolide 存在下で刺激

すると、parthenolide の濃度依存的に IL-12 の産生が抑制された (Fig. 1)。今回 T 細胞増殖を、CFSE 標識 T 細胞を用いて、フローサイトメトリで分析した。その結果、67.5% の CD4 陽性 T 細胞、38.9% の CD8 陽性 T 細胞、が分裂している事が判明したが、LipoK のみでは T 細胞はほとんど分裂していなかった (Fig. 2)。CTL 活性に重要なパーフォリンまたはグランザイム産生能を解明した。LipoK をらい菌感染樹状細胞にパルスすると、自己の CD8 陽性 T 細胞内パーフォリンまたはグランザイム B 産生能が増加した。CD4 陽性 T 細胞からの産生能の報告は少ないが CD8 と同様にパーフォリンまたはグランザイム B 産生能の増加が見られた (perforin-13.9%, granzyme B 17.3%) Fig. 3。つぎに、IL2 の中和抗体を用いて、CD8 陽性 T 細胞からのパーフォリン産生の変化を検討した (Fig. 4)。その結果、中和抗体存在かではパーフォリン産生の変化がなかったことから、LipoK 及びらい菌の刺激により IL-2 以外の分子が主にパーフォリン産生に関わっていることが考えられる。リコンビナント IL-2 を大量 (100U/ml) に樹状細胞-CD8 陽性 T 細胞培養中に添加すると CD4 の不足が補えるので、そこに IL-2 の中和抗体をいれると、パーフォリン産生が低下していた。パーフォリン産生している状態のらい菌生存率を Buddemeyer 法で測定すると、コントロールに比べて約 50% のみ生存している事から、LipoK はらい菌の殺戮に関与していると考えられる。

D. 考察

LipoK は TLR2 を認識し、NF- κ B を介して、らい菌感染樹状細胞を成熟し、T 細胞を活性化した。CD4 及び CD8 陽性 T 細胞の増殖も見られた。さらに LipoK はパーフォリン及びグランザイム B を分泌する CD8 のみならず、CD4 陽性 T 細胞数を促進した。このことから、LipoK は、らい菌感染樹状細胞を活性化し、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。

E. 結論

リポペプチド lipoK は、NF- κ B を介して樹状細胞を活性化し、CD4 陽性 T または CD8 陽性 T 細胞における CTL 活性を誘導した。CTL 活性により感染細胞を破壊し、らい菌が殺戮された。したがって、lipoK は免疫療法分子として活用しうる分子であり、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) Mukai T, Maeda Y, Tamura T, Miyamoto Y, Makino M. CD4(+) T-cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. FEMS Immunol Med Microbiol. 53(1):96-106, 2008.
- 2) Kai M, Nguyen Phuc NH, Hoang Thi TH, Nguyen AH, Fukutomi Y, Maeda Y,

Miyamoto Y, Mukai T, Fujiwara T, Nguyen TT, Makino M. Serological diagnosis of leprosy in patients in Vietnam by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein II. Clin Vaccine Immunol. 15:1755-1759, 2008.

2. 学会発表

- 1) Maeda Y, Tamura T, Fukutomi Y, Kai M, Makino M, Lipopeptide (LipoK) of *Mycobacterium leprae* activates antigen presenting cells and type I T cells. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, Jan 30- Feb 4, 2008.
- 2) 前田百美, 田村敏生、福富康夫、牧野正彦、LipoK の細胞障害性 T 細胞の活性化及びエキソゾーム産生に及ぼす影響、第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月
- 3) 宮本友司、向井 徹、甲斐雅規、前田百美、中 崇、矢野郁也、牧野正彦、*Mycobacterium avium complex* 血清型 8 型株における糖脂質抗原の生合成経路の解析、第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月
- 4) 甲斐雅規、前田百美、福富康夫、宮本友司、向井 徹、牧野正彦、らい菌由来免疫原性タンパク、MMP-II を用いた血清診断、第 81 回日本ハンセン病学会総会、2008 年 5 月

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

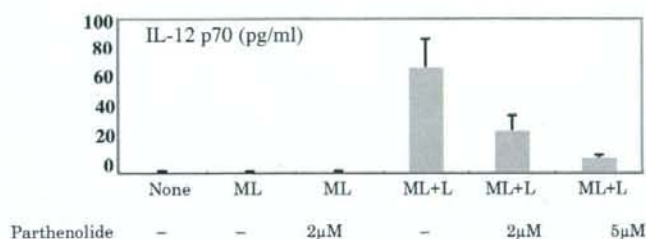


Fig. 1 Effect of parthenolide on IL-12 production. DCs pulsed with *M. leprae* (ML) or ML and LipoK (L) for 24 hours and IL-12 production in the supernatant was measured by ELISA.

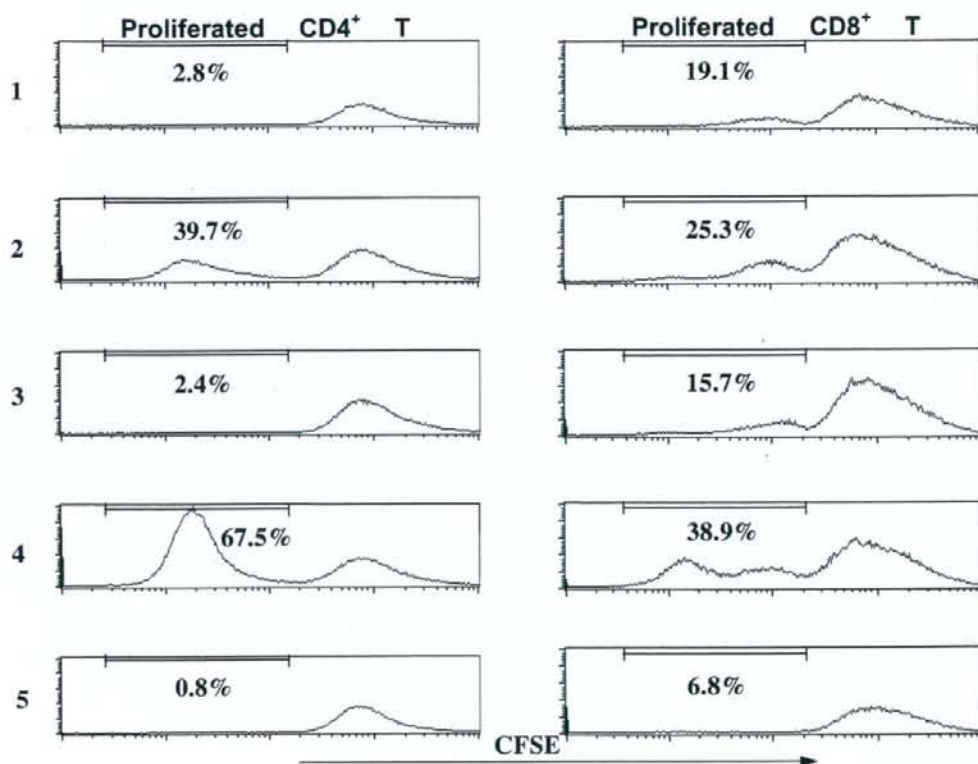


Fig. 2. Proliferation of T cells as measured by flow cytometric analyses using CFSE labelled CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Percentage value indicates the amount of cells undergoing proliferation. Before DC-T cells co-culture, DCs were stimulated with 1. None, 2. *M. leprae*, 3. LipoK, and 4. ML+LipoK. In 5. no DCs were included.

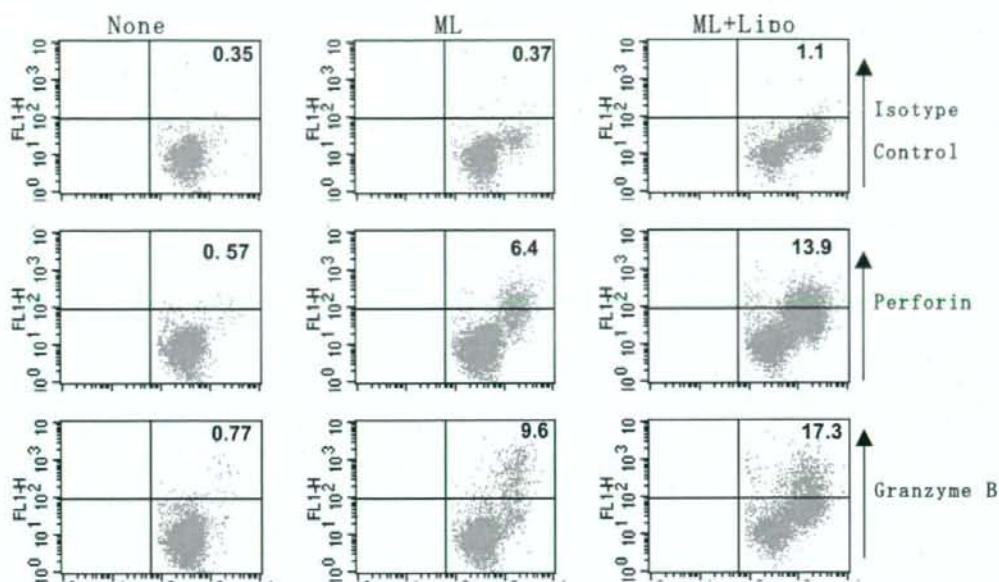


Fig. 3. Intracellular production of perforin and granzyme B from CD4⁺ T cells

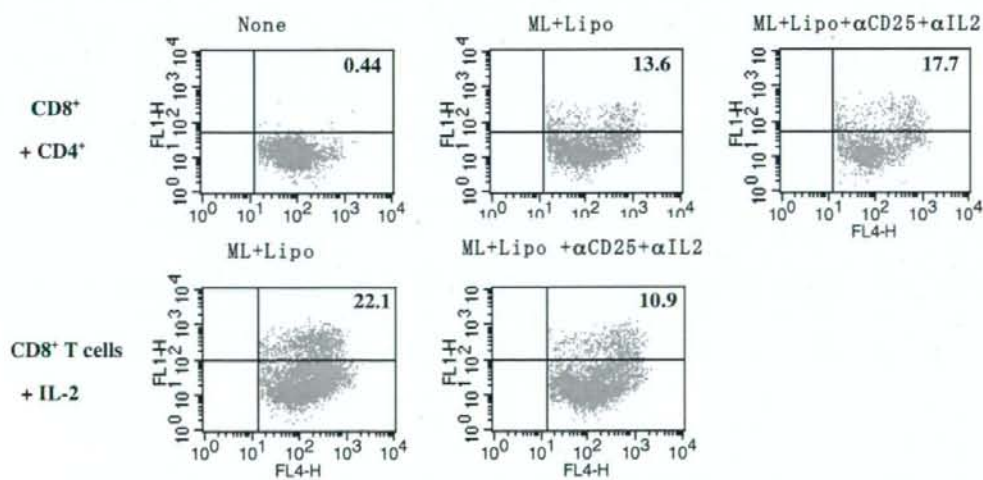


Fig. 4. Involvement of IL-2 on perforin production from activated CD8⁺ T cells

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

免疫機能亢進抗原の開発

平成20年度 分担研究報告書

研究分担者 向井 徹

（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター）

免疫機能亢進抗原の開発

研究分担者 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・室長

研究協力者 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・主任研究官

研究要旨 ハンセン病に対するワクチンとして、これまで結核のワクチンであるBCGの使用が試みられたが、その効果は低いと報告されている。BCGは、長期間の使用から、その安全性が示されている。そのためBCGの改変により、その免疫抗原としての能力を向上させ、らい菌蛋白を発現させる開発を行ってきた。これまでに、pH環境調節に重要とされる、urease 遺伝子の破壊株の作製を行い、各種らい菌分泌型蛋白発現を行った。今年度は、安定したらい菌蛋白発現を保つBCG菌株に必要と考えられるプロモーター領域の検索を行い、抗酸菌ファージより非常に強いプロモーター活性を持つ領域を同定した。これまでの成果は、安定したハンセン病ワクチンとしての組換えBCGの作製を可能にすると考えられた。

A. 研究目的

現在、ハンセン病の予防ワクチンは、存在せず、らい菌と同じ抗酸菌感染症である結核のワクチンであるBCGの使用が試みられてきた。しかし、その有効性は低いものとされ、新規のハンセン病ワクチンの開発が望まれている。そこで、長期の知見より、安全性の非常に高いBCGを改変することによりハンセン病ワクチン開発を行った。これまでに、細胞内での菌の生存に働く urease 遺伝子の破壊株の作製を行い、さらにより生体が蛋白を認識し易くするために菌体より分泌型にらい菌を発現する遺伝子の構築、およびその発現解析を行ってきた。しかし、これらの解析はプラスミドにより行われたが、実際のワクチン株としての使用には、その安定性に欠ける。長期培養では、プラスミドの菌体からの脱落によりらい菌蛋白発現の欠落株が優位になることが考えられる。また、プラスミドを菌体に維持するためには、培地への薬剤の添加が不可欠になる。

そのため、らい菌蛋白発現遺伝子はプラスミド型によるものではなく、BCG ゲノム遺伝子内への組込みが必要になる。しかし、プラスミド型では、1菌体内に約10コピーのらい菌遺伝子が存在するが、組込み型では、1コピーのみであり、これは、発現タンパク量が、激減することを意味する。そのため、これまで既存の抗酸菌プロモーターよりも非常に強いプロモーターが必要であり、その領域の検索・同定を行った。

B. 研究方法

大腸菌ではプラスミド型、抗酸菌では、integrate型になる pMV306 ヘプロモーターマーカーとして用いる蛍光蛋白 mOrange 遺伝子配列を組込んだ(pMV306-Orange)。抗酸菌ファージTM4ゲノム遺伝子を超音波処理後、mOrange 遺伝子上流域に組込み、抗酸菌 *M. smegmatis* へ遺伝子導入を行い、ライブラリーを作製した。導入1週間後、蛍光

蛋白を発現し、赤色を呈するコロニーを選択し、導入された TM4 遺伝子領域の塩基配列を解析し、同定を行った。同領域を再度 pMV306 へ組み込み、*M. smegmatis* へ遺伝子導入を行い、そのプロモーター活性の再現性を確認した。(図1)

C. 研究結果

M. smegmatis のライブラリー27,200 コロニーを screening した結果、蛍光灯下で、赤色を示す12クローンを選択した(図2)。そのクローンよりゲノムDNAの調整を行い、mOrange 遺伝子上流域の塩基配列決定をした。その結果、TM4抗酸菌ファージゲノムマップの右側に集中する4領域が同定された。再現性の確認のため、当該領域を InFusion 法により pMV306-orange へ組み込み、*M. smegmatis* へ遺伝子導入を行った。その結果、いずれの遺伝子領域も既存の強プロモーターとされる hsp60 プロモーターよりも強い赤色を呈し、強発現は当該領域に由来することが確認された(図3)。

D. 考察

BCG を用いたハンセン病ワクチン開発では、必然的にらい菌遺伝子を BCG 菌体内へ導入し、らい菌蛋白を産生させる必要がある。そのためには、BCG 菌体内において強いプロモーターが必要になる。これまでに知られているプロモーター領域は、BCG と同じ抗酸菌由来のものが用いられてきた。しかし、これらプロモーターでは、抗酸菌自身が必要とする蛋白発現量を超えることはできないと考えられ、外来遺伝子をゲノムへ導入しても、本来の蛋白量として産生され、これまでの“BCG使用では、ハンセン病へのワクチン効果が非常に低い”ことを凌駕することは困難であると考えられる。そのため今回、抗酸菌の病原体である抗酸菌ファージを標的として、プロモーター検索を行った。その結果、hsp60 を遥かに超える、強力な領域を同定することができた。今後、同領域の活性が、BCGにおいても同様であるのか、らい菌蛋白を同様に発現することができるのか、検討する必要があると考えられる。

E. 結論

免疫原性の向上した BCG 株の改変を目指し、1コピー遺伝子でも充分ならい菌蛋白産生の可能性のある領域を抗酸菌ファージより同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. CD4⁺ T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 53:96-106, 2008.
- 2) Kai, M., N. P. N. Ha, H. T. T. Huong, N. H. An, Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, T. Fujiwara, N. T. Tan, and M. Makino. Serological diagnosis of leprosy in patients in Vietnamese by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein-II. Clin. Vaccine Immunol., 15:1755-1759, 2008.
- 3) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. *Mycobacterium avium* complex *gtfTB* gene encodes glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid. J. Bacteriol., in press, 2009.
- 4) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. GM-CSF mediated T cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., in press, 2009.

2. 学会発表

- 1) CD4⁺ T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant BCG. Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, Y. Miyamoto, and T. Tamura. 43rd

Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.

- 2) Construction of *ureC*-disrupted BCG which expressing *M. leprae* MMP II antigen. Mukai, T., Y. Miyamoto, and M. Makino. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
- 3) *Mycobacterium avium* complex serovar 8. Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, and M. Makino. 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
- 4) *Mycobacterium avium* complex 血清型 8 型株における糖脂質抗原の生合成経路の解析. 宮本友司, 向井 徹, 甲斐雅規, 前田百美, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都

- 5) 遺伝子破壊による BCG 菌ミコール酸のサブクラス変換. 甲斐雅規, 宮本友司, 向井 徹, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 6) らい菌由来免疫原生タンパク、MMP-II を用いた血清診断. 甲斐雅規, 前田百美, 福富康夫, 宮本友司, 向井 徹, 牧野正彦. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2008 年 5 月 熊本
- 7) 常温輸送臨床検体の LAMP 法によるらい菌遺伝子検出. 向井 徹, 和泉眞蔵, Teky Budiawan, 宮本友司, Cita Rosita, Indropo Agusni, 松岡正典, 牧野正彦. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2008 年 5 月 熊本

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