

- T. Wada, C. Shirai, and Y. Kawakami. Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 47:3340-3342, 2009.
- 2) Wada, T., and T. Iwamoto. Allelic diversity of variable number of tandem repeats provides phylogenetic clues regarding the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family. *Infect. Genet. Evol.*, 9:921-926, 2009.
2. 学会発表
- 1) 神戸市結核菌バンク株の分子疫学解析による世代間の感染と地理的分布についての検討. 岩本朋忠, 藤山理世, 白井千香, 河上靖登. 第68回日本公衆衛生学会総会 2009年10月 奈良
- 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

平成21年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

ハンセン病におけるマクロファージの機能解析

分担研究報告書

研究分担者

福富 康夫

(国立感染症研究所・室長)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進感染症研究事業）
分担研究報告書

ハンセン病におけるマクロファージの機能解析

研究分担者 福富 康夫（国立感染症研究所・感染制御部・室長）
研究協力者 前田 百美（国立感染症研究所・感染制御部・主任研究官）
研究協力者 牧野 正彦（国立感染症研究所・感染制御部・部長）

研究要旨

ハンセン病を引き起こすらい菌は細胞内寄生菌である。LL型ハンセン病ではらい菌はマクロファージ内で増殖するが、TT型では殺菌作用が亢進しているため、病巣内では菌が稀にしかみられない。ヒト細胞内でのらい菌に対する殺菌機構は不明な点が多い。そこで、*in vitro*におけるヒトマクロファージの活性化と同細胞中のらい菌の生存率との関係を探ったところ、M-CSF誘導ヒトマクロファージ（M-マクロファージ）においてIFN γ により抗らい菌活性（らい菌の代謝活性減少）が誘導され、この時ウエスタンブロットや共焦点レーザー顕微鏡による観察、さらにはFACS解析によりNADPHオキシダーゼを構成する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、NADPHオキシダーゼが産生する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の発現量はあまり変化しなかった。さらに、酸化窒素(NO)合成酵素の発現には変化がみられず、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示唆された。スーパーオキシドは殺菌分子として知られており、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。

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を目的とする。

B. 研究方法

ヒトマクロファージの培養：健常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培地に浮遊させプラスチック製のフラスコにまき37度で1時間培養した。ハンクス液にてウェル内を洗浄し非付着細胞を除いて単球を精製しM-CSFを加えた20%FBS添加RPMI1640培地にて1週間培養し単球からマクロファージ

に分化させた。トリプシン処理をして細胞を回収して、12穴プレートもしくは8ウェルガラスチェンバースライドにまいて培養を継続した。

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、マクロファージが張り付いたウェルに添加して貪食させた。培養後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。なお、マウスの使用については国立感染症研究所動物実験委員会からの承認を得ており、倫理面への配慮がなされている。

Radiorespirometry： Buddemeyer や Franzblauらの方法を改変してらい菌の脂肪酸・酸化反応(基質：1-¹⁴C-パルミチン酸

(NEC075H) を測定した。

ウェスタンブロッティング：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 度にて一晚反応させ、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。

共焦点レーザー顕微鏡による観察：らい菌を oregon green にて蛍光標識してマクロファージが入っている 8 ウェルチェンバースライドに添加した。培養後、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、メタノール処理後に抗 phox 抗体等とインキュベートし、洗浄後 Alexa633 標識二次抗体を反応させた。同時に Hoechst33342 による核染色も行った。そして、共焦点レーザー顕微鏡下で細胞を観察した。得られた画像中の各細胞について overlay を行い各グループにおける細胞の蛍光強度平均値を得た。

FACS 解析：12 穴プレート中のマクロファージを 4%パラホルムアルデヒドで固定し、メタノール処理後に抗 phox 抗体とインキュベートしさらに FITC 標識二次抗体を反応させた。ラバーポリスマンで細胞をはがして FACS にて蛍光強度を測定した。

C. 研究結果

ヒト健常人末梢血より単球を得て、M-CSF を添加し一週間以上培養してマクロファージを得た (M-マクロファージ)。そして、一晚らい菌存在下で 35 度にて培養し貪食させ取り込ませた。これら感染マクロファージを 35 度で継続培養した。その結果、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。次に、35 度において 100U/ml の IFN γ 存在下で M-マクロファージにらい菌を添加し 24 時間培養した。さらに IFN γ 存在下で 7 日間培養を継続した後らい菌を回収して代謝活性を調べたところ、IFN γ 非存在下での培養と比較して活性が低下していた。NADPH オキシダーゼ関連タンパクである 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ていた。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。一方、gp91-phox はバンドが検出できなかった。また、p40-phox、p67-phox の発現は IFN γ 刺激でもバンドの濃度はあまり変化がみられなかった。スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の発現量も IFN γ による発現の増減がみられなかった。さらに、IFN γ を加えても酸化窒素合成酵素 iNOS の発現増強はみられなかった。一方、FACS による解析では p22、p47、さらには p67 それぞれの phox とともに IFN γ により発現が増強していることが判明した (Fig. 1)。Western blot 法では検出できなかった gp91-phox も IFN γ により発現が増強していることが明らかとなった。共焦点レーザー顕微鏡による細胞の蛍光強度定量によっても phox タンパク全般において IFN γ により発現が増強していたが、iNOS や SOD の発現に著明な変化はなかった (Fig. 2)。共焦点レーザー顕微鏡では緑色蛍光色素で標識したらい菌と赤色 (Alexa633 標識二次抗体の発する蛍光を赤色で表現した擬似カラー) の p22-phox や p47-phox が同一場所に存在 (co-localize) する像が得られた (Fig. 3)。

D. 考察

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る。しかし、われわれはヌードマウスフットパッドにらい菌を接種して継代しており、常時 viability の高いらい菌を実験に供与している。本研究では、IFN γ 刺激したヒト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いわれており、それが本研究で証明された。マウスマクロファージでは IFN γ によって iNOS が強く発現誘導されて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 オキシダーゼに依存している。NADPH オキシダーゼは主にファゴゾーム膜に局在する 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サブユニットタンパク群はファゴゾーム膜に移動しファゴゾーム膜上の gp91-phox タンパクと p22-phox タンパクと複合体を形成し NADPH オキシダーゼとしての活性を発現すると報告されている。われわれの観察結果ではヒト M-マクロファージの IFN γ 刺激でこれら phox タンパクが著明に増加することが判明した。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 IFN γ 刺激でも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でスーパーオキシドが蓄積する可能性が示唆された。さらに、らい菌近傍への phox タンパクの集積がみられたことから NADPH オキシダーゼが活性化してらい菌がスーパーオキシドにさらされていると思われた。このことは TT 型ハンセン病にみられるような IFN γ が強く発現している病巣では殺菌作用が増強されていることを示唆している。また、ヒトマクロファージの殺菌において酸化窒素の関与は少ないと思われた。

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 の発現が増強していることが判明した。らい菌周囲への phox タンパクの集積もみられ

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。

図の説明

Fig. 1. FACSによるIFN γ 刺激したマクロファージのphoxタンパク発現解析。M-CSF存在下で培養して得られたヒト単球由来マクロファージをIFN γ で6日間培養した後、抗phoxタンパク抗体で染色してFACSで解析した。

Fig. 2. 共焦点レーザー顕微鏡によるNADPHオキシダーゼ(phox)タンパク等の発現解析。M-CSF存在下で培養して得られたヒト単球由来マクロファージをIFN γ で6日間培養した後、抗phoxタンパク抗体、抗iNOSタンパク抗体、抗SOD抗体で染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。得られた画像から各細胞の平均蛍光強度を測定し一細胞あたりの平均値とSDを得た。

Fig. 3. 共焦点レーザー顕微鏡によるらい菌感染マクロファージにおける NADPH オキシダーゼ(p22-phox タンパクと p47-phox タンパク)の細胞内局在。M-CSF 存在下で培養して得られたヒト単球由来マクロファージを IFN γ で 6 日間培養した後、oregon green でラベルしたらい菌を添加し 3 日間培養した。細胞を固定して抗 phox タンパク抗体で染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。画像(元の画像はカラー)：左かららい菌(緑)、中央は phox タンパク(赤)、右はマージした画像。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Temperature Dependency for Survival of *Mycobacterium leprae* in Macrophages. *Jpn. J. lepr.*, 78:7-16, 2009.

2. 学会発表

- 1) 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小胞体ストレスタンパクの動態。福富康夫、前田百美、牧野正彦。第 82 回日本細菌学会総会、

2009年3月、京都.

- 2) Evaluation of exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected dendritic cells. Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, and M. Makino. 第82回日本細菌学会総会、2009年3月 京都.
- 3) 結核・ハンセン病に対するワクチンの開発研究の最前線、シンポジウム 2: 「らい菌の宿主体内での生き延び策をどう捉え、どう対抗するのか」. 田村敏生、福富康夫、牧野正彦. 第82回日本ハンセン病学会総会、2009年5月 島根.
- 4) Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages and expression of ER stress proteins in the cells. Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. US-Japan Cooperative

Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.

- 5) The fate of mycobacteria in human dendritic cells and macrophages. Maeda, Y., Y. Fukutomi, H. Wang, T. Tamura, and M. Makino. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.

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. FACS analysis of phox expression in human macrophages

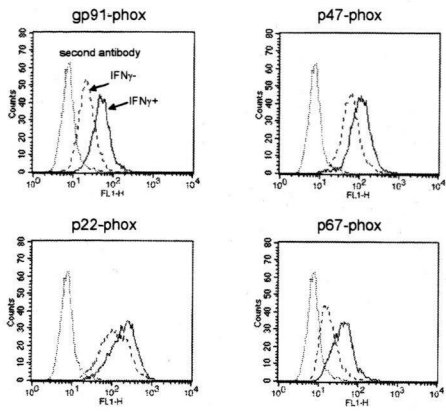


Fig.2. NADPH oxidase expression in IFN γ -stimulated human M-macrophages

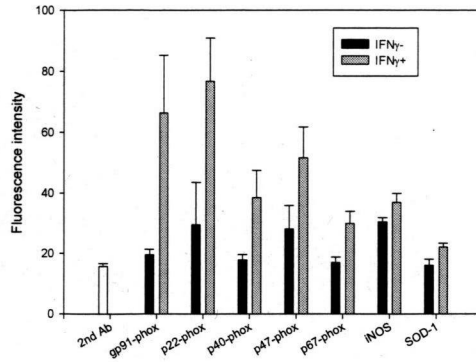
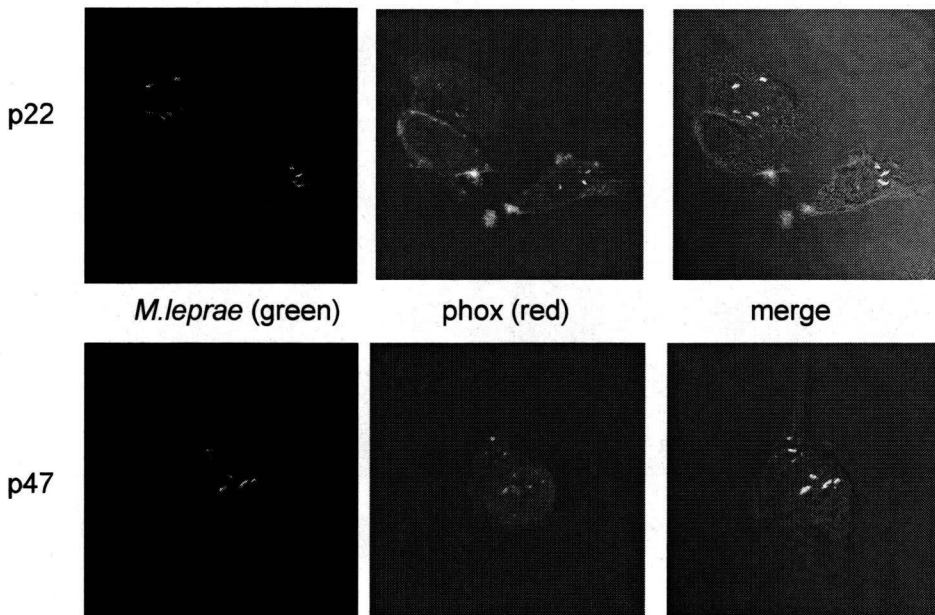


Fig.3. Co-localization of *M.leprae* with p22- and p47-phox under confocal laser microscopic observation



平成21年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

新規結核ワクチンの開発と応用

分担研究報告書

研究分担者

岡田 全司

(国立病院機構近畿中央胸部疾患センター・センター長)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）
分担研究報告書

新規結核ワクチンの開発と応用

研究分担者 岡田 全司（NHO 近畿中央胸部疾患センター・臨床研究センター長）

研究要旨

（1）新しい治療ワクチンの開発：HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは初めて結核治療ワクチンとしても有効であることが示された。本年度はマウスに結核菌をエアゾル感染した後、ワクチンを投与し、結核菌減少効果すなわち治療効果を肺・肝・脾で認めた。またカニクイザルに結核菌を気道感染させた後ワクチンを投与し、延命効果及び免疫反応増強を認め、治療ワクチン効果を認めた。

（2）他の結核治療ワクチンとこのワクチンは治療相乗効果を示した。

（3）新しい結核予防ワクチンの開発：HSP65 DNA + IL-12 DNA の強力なワクチンを開発した。

新しいHVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは、カニクイザル（最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med. 1996）で強力な結核予防効果を示した。このワクチンはサルで延命効果、胸部X線所見（結核病巣）、血沈、体重で強い改善傾向がみられた。さらにリンパ球増殖反応の増強や、IL-2、IL-6、IFN- γ の産生増強が示された。

（4）さらに、ヒトのプライムブースターに近い長期間（4ヶ月）をプライムブースター期間とした。カニクイザルの系で HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンは BCG プライミング、この HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンブースターで延命効果が認められた。

A. 研究目的

結核罹患率の増加、集団感染が頻発、AIDS や糖尿病患者の免疫不全疾患に高頻度に合併、薬剤耐性結核が増え、いわゆる難治性結核の対策が早急に望まれている。したがって、新しい治療法・予防法・診断法の研究が必須である。

すなわち、①新しい治療ワクチンの開発。②BCG よりも強力な新しい DNA ワクチンやリコンビナント BCG ワクチンの開発を行う。すなわち、新しい治療・予防の臨床研究を目的とする。③キラーT細胞の結核免疫に対する詳細なメカニズムや結核治療に関与する研究は不明である。したがって、これらを解明するとともに、結核予後診断、難治性結核診断法を開発する。

B. 研究方法

- （1）IL-12 gene及びヒト結核菌由来H37Rv Hsp (heat shock protein) 65 DNAをHVJエンベロープベクターに導入した。
- （2）DBA/1マウスにH37Rv 20CFU/mouseをエアロゾル気道感染もしくは、 5×10^5 /mouseをi.v投与した後、HSP65DNA+IL-12DNAワクチンを3回投与し、治療効果を解析した。エアロゾル感染にはMcMurray博士が開発したエアロゾル・チャンバーを用いた。
- （3）カニクイザルにヒト結核菌Erdman株を経気道投与した。その1週間後より9回このワクチンを生体内投与し治療効果を解析した。結核感染前、後、ワクチン投与後約3週毎に体重、体温、血沈、胸部X線、ツ反、免疫反応及び生存率を解析した。
- （4）カニクイザルにこのワクチンを3回生

体内投与し、最終免疫4週後にヒト結核菌Erdman株を経気道投与した。ワクチン投与前、中、感染後約3週毎に体重、体温、血沈、胸部X線、ツ反及び生存率を解析し1年以上経過観察した。1回目の免疫と2回目の免疫の間隔（プライム・ブースター間隔）を4ヶ月とした。（倫理面への配慮）

- (1) 当院は呼吸器疾患（結核を含む）の研究ネットワーク・グループリーダー施設として、国立病院機構の約60施設を束ねている。したがって、倫理委員会は院外委員5名（関西学院大学院長、大阪国際大学政経学教授等）及び各方面の医療従事者（事務系の人も含む）の院内委員5名により構成し、倫理面には十分な配慮をしている。
- (2) DNAワクチン、新しい化学療法、新しい診断法等、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除やインフォームドコンセントに関する文面も記載されている。
- (3) DNAワクチンの臨床応用は、各国の倫理委員会や組換えDNA安全委員会の承認を得てから施行する。
- (4) 治験届の提出とGCPに基づき実施する。
- (5) 実験動物に対しても動物愛護上の配慮が十分なされている。国立病院機構近畿中央胸部疾患センター動物実験委規程の規則に従って、3R（Refinement, Replacement, Reduction）の原則に基づき動物実験委員会で承認された実験を行なっている。

C. 研究結果

- (1) カニクイザル（最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med. 1996）で解析した。Priming-Booster法で最も強力な新しい結核ワクチンを作製しつつある。本邦では乳幼児にBCG接種を行う。したがって成人におけるboosterワクチンとして上記のワクチンをサル系の系で行った。

PrimingはBCG東京ワクチンを用いた。さらにBCGワクチンと新ワクチンのプライミング・ブースターの間隔を長期の4ヶ月とした。この結果、BCGプライム・DNAワクチンブースター群は強力な延命効果を示した。このように、ヒトの結核感染に最も近いカニクイザルを用いた実験系で、強力な新しい結核ワクチンを我々は世界に先駆けて開発した。すなわち、本邦では乳幼児にBCG接種が義務づけられていることにより、プライミングワクチンとしてBCGワクチンを用い、成人ワクチン（小学生、中学生、成人、老人）として切れ味のするどい我々が開発したHVJ/HSP65DNA+IL-12DNAワクチンをブースターワクチンとして用いることにより強力な新しい結核ワクチンの臨床応用が可能となる案を計画中である。

- (2) さらに、カニクイザルを用い、治療ワクチン効果を得た。このHVJ-エンベロープ / HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチン生存率の改善効果が得られた。さらに体重増加及び免疫反応の増強の治療効果を得た。
- (3) DBA/1マウスにH37Rvをエアロゾル感染させた後、HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNAで治療すると、肺・肝・脾の結核菌数の有意な減少を認めた。すなわち、治療ワクチン効果が得られた。
- (4) 結核患者、特に多剤耐性結核患者ではGranulysin（ヒト・キラーT細胞由来）の産生の低下が認められた。（Human Vaccine in press）また、難治性結核（糖尿病合併等）においてもGranulysinやキラーT細胞分化因子であるIL-6産生の低下が認められた。さらに、granulysinは他のサイトカインや上記ワクチンと相乗的治療効果を示した。

D. 考察

- (1) 新しい結核治療ワクチンの開発
HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは、治療ワクチン効果を示すことがマウス及びサル（カニクイザル）でも示された。世界の最先端のワクチンであることが

示された。

- (2) 新しい結核ワクチン、HSP65DNA+IL-12 DNAワクチンはプライム・ブースター法を用いて、カニクイザルの系でBCGよりも有効な結核予防ワクチンであることを明らかにした。
- (3) これらのワクチンの臨床応用を計画している。
- (4) granulysinとサイトカイン及び上記DNAワクチンの最も強力な治療効果がどの組み合わせで認められるか解析中である。
- (5) これらの研究等が極めて高く評価されWHO (World Health Organization : 世界保健機関) よりGlobal Partnership to stop TB (WHO TB stop Partnership) に選出された。さらにWHO STOP TB Vaccine MeetingのメンバーならびにWHO STP TB WGND (Working group on new drug) に選出された。

したがってこれらの新しい結核ワクチンを本邦のみでなく全世界に供給して国際貢献を行う用意がある。

E. 結論

- (1) 新しい治療ワクチンの開発：このHSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは初めて結核治療ワクチンとしても有効であることが示された。マウスに結核菌をエアロゾル気道感染した後、ワクチンを投与し、結核菌減少効果が肺・肝・脾で認められた。カニクイザルに結核菌を気道感染させた後ワクチンを投与し、延命効果及び免疫反応増強が認められ、治療ワクチン効果が認められた。
- (2) 新しい結核予防ワクチンの開発 HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンの強力なワクチンを開発した。
新しいHVJ-エンベロープ / HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンは、カニクイザル(最もヒト結核感染に近いモデル Nature Med. 1996) で強力な結核予防効果を示した。
- (3) HVJ-エンベロープ/ HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンと、BCGのpriming-booster

法でBCG単独より1万倍強力な結核予防ワクチンを得た。

- (4) キラーT細胞やNK細胞から産生されるgranulysinは多剤耐性結核や難治性結核患者では、その産生が低下した。granulysinは難治性結核の予後診断法となることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada, M., Y. Kita, T. Nakajima, N. Kanamaru, S. Hashimoto, T. Nagasawa, Y. Kaneda, S. Yoshida, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, C. Kishigami, Y. Inoue, M. Matsumoto, D. N. McMurray, E. C. Dela Cruz, E. V. Tan, R. M. Abalos, J. A. Burgos, P. Saunderson, and M. Sakatani. Novel prophylactic and therapeutic vaccine against Tuberculosis. Vaccine, 27:3267-3270, 2009.

2. 学会発表

- 1) A Novel Therapeutic and Prophylactic Vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis Using The Cynomolgus Monkey Model. Okada, M., Y. Kita, N. Kanamaru, S. Hashimoto, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, C. Kishigami, S. Nishimatsu, Y. Inoue, T. Nakajima, T. Nagasawa, Y. Kaneda, S. Yoshida, M. Matsumoto, P. Saunderson, E. V. Tan, E. C. Dela Cruz, D. McMurray, and M. Sakatani. 3rd World Vaccine Meeting 2009, 4-7 Oct., 2009, Singapore.
- 2) A novel therapeutic vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis using the Cynomolgus monkey model. Okada, M., Y. Kita, N. Kanamaru, S. Hashimoto, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, C. Kishigami, S. Nishimatsu, Y. Sekine, T. Nakajima, Y. Kaneda, P. Saunderson, E. V. Tan, D. McMurray, and M.

- Sakatani. 49th ICCAC (Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy) 12~15 Sep., 2009, San Francisco.
- 3) Activation of CD8 positive cytotoxic T-cells by a novel vaccine (HSP65 DNA+ IL-12 DNA) against tuberculosis in vivo. Okada, M., Y. Kita, N. Kanamaru, S. Hashimoto, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, C. Kishigami, S. Nishimatsu, Y. Sekine, and T. Nakajima. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009年12月4日(金) 大阪
 - 4) Novel therapeutic and prophylactic vaccine (HVJ-Envelope/Hsp65DNA+IL-12DNA) against tuberculosis using cynomolgus monkey. Okada, M., Y. Kita, T. Nakajima, N. Kanamaru, S. Hashimoto, T. Nagasawa, Y. Kaneda, S. Yoshida, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, C. Kishigami, S. Nishimatsu, M. Matsumoto, E. V. Tan, P. Saunderson, and M. Sakatani. 第15回遺伝子治療学会 2009年7月9日 大阪
 - 5) 新しい結核治療ワクチン (HVJ-エンベロープ/Hsp65+IL-12 DNA) の開発. 岡田全司、喜多洋子、金丸典子、井上義一、坂谷光則. 第84回結核病学会総会 2009年7月2, 3日 北海道 結核 84 巻5号 Page403(2009.05)
 - 6) ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた結核に対する新しい治療ワクチン開発: HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン. 喜多洋子・金丸典子・井上義一・坂谷光則・岡田全司. 第84回結核病学会総会 2009年7月2, 3日 北海道 結核 84 巻5号 Page403(2009.05)
 - 7) 新しい結核治療ワクチン (HVJ-エンベロープ/Hsp65+IL-12 DNA) の開発 (カニクイザル感染系を用いて). 喜多洋子、金丸典子、橋元里実、西田泰子、仲谷均、高尾京子、岸上知恵、西松志保、井上義一、坂谷光則、岡田全司. 第79回実験結核研究会総会 2009年7月1日 北海道
 - 8) 結核に対する新しい治療ワクチン (Hsp65+IL-12 DNA) の開発. 岡田全司、喜多洋子、金丸典子、橋元里実、西田泰子、仲谷均、高尾京子、岸上知恵、井上義一、吉田栄人、中島俊洋、金田安史、坂谷光則. 第49回日本呼吸器学会学術講演会 2009年6月12日-14日 東京 日本呼吸器学会雑誌 47 巻増刊 Page291(2009.05)
 - 9) ヒト結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用いた新しい結核治療ワクチン開発: HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン. 喜多洋子、金丸典子、橋元里実、西田泰子、仲谷均、高尾京子、岸上知恵、吉田栄人、中島俊洋、坂谷光則、金田安史、E. V. Tan、D. L. C. Paul Saunderson、岡田全司. 第49回日本呼吸器学会学術講演会 2009年6月12日-14日 東京 日本呼吸器学会雑誌(1343-3490)47 巻増刊 Page291(2009.05)
 - 10) 超薬剤耐性結核に対する新しい結核治療ワクチン (HVJ-エンベロープ/HSP65DNA+IL-12DNA ワクチン) 開発. 岡田全司、喜多洋子、金丸典子、橋元里実、西田泰子、仲谷均、高尾京子、岸上知恵、西松志保、井上義一、吉田栄人、中島俊洋、金田安史、坂谷光則. 第63回国立病院総合医学会 2009年10月23日~24日 仙台
 - 11) ヒト結核感染に最も近いカニクイザルを用いた、新しい結核治療ワクチン (HSP65 DNA + IL-12 DNA) 開発研究. 喜多洋子、金丸典子、橋元里実、西田泰子、仲谷均、高尾京子、岸上知恵、西松志保、井上義一、吉田栄人、中島俊洋、坂谷光則、金田安史、E. V. Tan、E. L. C. DelaCruz、Paul Saunderson、岡田全司. 第63回国立病院総合医学会 2009年10月23日~24日 仙台
 - 12) A novel therapeutic and prophylactic

vaccine (HVJ-Envelope/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against Tuberculosis using the Cynomolgus monkey model. Okada, M., Y. Kita, N. Kanamaru, S. Hashimoto, Y. Nishida, H. Nakatani, K. Takao, C. Kishigami, S. Nishimatsu, Y. Inoue, T. Nakajima, T. Nagasawa, Y. Kaneda, S. Yoshida, M. Matsumoto, P. Saunderson, E. V. Tan, E. C. Dela Cruz, D. McMurray, and M. Sakatani.

US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th US-JAPAN Conference on Tuberculosis and Leprosy, 29-31 July, 2009, Fukuoka

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

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

結核菌によるファゴリソソーム形成阻害過程の研究

分担研究報告書

研究分担者

小出 幸夫

(浜松医科大学・理事)

結核菌によるファゴリソーム形成阻害過程の研究

研究分担者 小出 幸夫（浜松医科大学・理事）

研究要旨.

本研究において結核菌ファゴソームの小胞輸送機構の解明をめざし、生化学的に単離した結核菌ファゴソームに含まれるタンパク質のプロテオーム解析を行った。結核菌ファゴソームとラテックスビーズファゴソームからタンパク質を抽出して、2次元電気泳動法によって含有タンパク質の比較を行った。ラテックスビーズファゴソーム画分にはカテプシンなどリソソームに多く含まれるタンパク質が優位を占めていた。結核菌ファゴソーム画分には Grp78 や PDI など小胞体を構成するタンパク質が多数含まれていた。次に結核菌ファゴソーム含有タンパク質の網羅的同定を LC-MS/MS をもちいて行った。結核菌ファゴソーム画分には Rab7 や LAMP-1 などの後期エンドソーム、リソソームタンパク質が含まれていた。また、ER 由来タンパク質やリボソーム構成タンパク質も多数含まれていた。以上の結果は、結核菌ファゴソームは後期エンドソームやリソソームと融合することができること、しかし、結核菌ファゴソームと小胞体との融合が優先的に行われるためファゴリソーム形成が阻害されることを示唆する。

A. 研究目的

結核菌は細胞内寄生性細菌である。結核菌は感染マクロファージ内においてファゴソームとリソソームの融合（ファゴリソーム形成）を阻害することによって、増殖能を獲得している。これまで我々は、ファゴソームへのカテプシン D の局在に機能する、もしくはファゴソーム内の酸性化に機能する Rab GTPase が結核菌ファゴソームからかい離することによってファゴソーム熟成が阻害され、その結果、結核菌ファゴソームにおけるファゴリソーム形成が阻害されることを明らかにした。しかし、結核菌がファゴソーム内で増殖するために必要な小胞輸送の改変機構について明らかになっていない。本研究は結核菌ファゴソームの小胞輸送機構の解明を目指し、生化学的に単離した結核菌ファゴソーム画分に含まれるタンパク質のプロテオーム解析を行った。本結果は今後の結核治療薬およびワクチン開発において非常に有効である。

B. 研究方法

1. 結核菌ファゴソーム画分の単離：Raw264.7 マクロファージに *Mycobacterium tuberculosis* Erdman を貪食させたのち Beatty et al (Cell Microbiol. 2002; 4: 167-76) の方法に従ってファゴソーム画分を単離した。すなわち、結核菌を Raw264.7 マクロファージに 6 時間貪食させて、細胞を回収した。ファゴソーム膜を破壊しないように細胞を破碎した。感染マクロファージ破碎液をショ糖密度勾配遠心分離法、およびフィコール重層遠心分離法を行った。沈殿画分を PBS で洗浄後、結核菌ファゴソーム画分とした。
2. 二次元電気泳動法：ファゴソーム画分抽出タンパク質の二次元電気泳動を行った。一次元目ゲルに抽出タンパク質を浸透させた後、電気泳動を行った。ストリップに含まれるタンパク質を SDS-PAGE によって展開することによって二次元目電気泳動を行

った。タンパク質スポットの可視化は銀染色法によって行った。

3. LC-MS/MS によるファゴソーム画分タンパク質の網羅的同定: ファゴソーム画分抽出タンパク質を SDS-PAGE で展開して、銀染色を行った。バンドを切り出し、ゲル内分解法を行った。ゲル中に含まれるタンパク質をトリプシン処理を行い、分解ペプチドを抽出した。断片ペプチドを nano-LC-MS/MS (ABI Q-STAR XL) によって検出した。得られた MS/MS スペクトルをデータベース検索 (Mascot 検索) することによってタンパク質同定を行った。

4. GFP 融合 ER 由来タンパク質発現マクロファージにおける結核菌の観察: pEGFP-N2 に calreticulin、または Grp78 をクローニングしたプラスミドを作成した。これらのプラスミドをもちいて Raw264.7 マクロファージに電気穿孔法で遺伝子導入した。GFP 融合 ER 由来タンパク質発現マクロファージに DsRed 発現結核菌を感染させた。感染マクロファージをパラフォルムアルデヒドで固定して、LS-1 共焦点レーザー顕微鏡システム (横河電機) を用いて共焦点レーザー顕微鏡法によって観察した。

C. 研究結果

1. 結核菌ファゴソームの生化学的分離: 結核菌を Raw264.7 マクロファージに感染させて、Beatty et al (Cell Microbiol. 2002; 4: 167-76) の方法に従ってファゴソーム画分を単離した。単離したファゴソーム画分に含まれる細胞内小器官を観察するため、ファゴソーム画分の切片を透過型電子顕微鏡法で観察した。結核菌ファゴソーム画分には、結核菌ファゴソームと付着する膜小胞以外の細胞内小器官は見つからなかった。このことは、結核菌ファゴソーム画分には他の細胞内小器官の混入はないことを示す。結核菌ファゴソームとラテックスビーズファゴソームの形態比較を行った。ラテックスファゴソーム内膜には電子線を透過しない物質や小胞が存在していたが、結核菌ファゴソーム内膜は透過性であった。以上の結果は、結核菌ファゴソームにおいてファ

ゴリソーム形成が阻害されていることを示す。

2. 結核菌ファゴソーム画分の二次元電気泳動: 結核菌ファゴソーム画分とラテックスビーズファゴソームに含まれるタンパク質を二次元電気泳動法によって展開した。結核菌ファゴソーム画分において、銀染色によって 200 以上のスポットが観察された。ラテックスビーズファゴソーム画分において顕著なスポットは、これまでの報告と同様に、カテプシンなどの加水分解酵素、Cycap などのリソソーム特異的タンパク質であった。結核菌ファゴソーム画分においては、リソソーム特異的なタンパク質スポットは見つからず、calreticulin、Grp78、PDI など小胞体特異的タンパク質が顕著なスポットであった。このことは結核菌ファゴソームと小胞体由来膜小胞の融合、もしくは小胞体と直接融合することを示唆する。

3. 結核菌ファゴソーム画分に含まれるタンパク質の網羅的同定: 結核菌ファゴソーム画分抽出タンパク質の網羅的同定を LC-MS/MS 法によって行った。SDS-PAGE で結核菌ファゴソーム画分を展開して、銀染色を行った。切り出したバンドをトリプシン処理後、断片ペプチドを抽出した。抽出したペプチドを nano-LC-MS/MS によって質量解析を行った。結核菌ファゴソーム画分には後期エンドソームマーカータンパク質である Rab7 や v-ATPase のサブユニットタンパク質、リソソームマーカータンパク質である LAMP-1 や LAMP-2 などが含まれていた。また、ミトコンドリア特異的シャペロンの CH60 も含まれていた。また、小胞体タンパク質である Grp78、PDI、リボソームサブユニットタンパク質も同定した。このことは、結核菌ファゴソームは後期エンドソームやリソソームと融合することができること、しかし、小胞体由来小胞との融合が優先されるために結核菌ファゴソームのファゴソーム熟成が阻害されることを示唆する。

4. イメージ解析による結核菌ファゴソームと小胞体との相互関係: GFP 融合 calreticulin、または Grp78 を発現するマクロファージに DsRed 発現結核菌を感染さ

せて、イメージ解析により結核菌ファゴソームと小胞体との相互関係を調べた。結核菌ファゴソームの周りを取り囲むように小胞体が存在した。このことは結核菌ファゴソームと小胞体の融合を示唆する。

D. 考察

これまで結核菌ファゴソームに含まれるタンパク質の解析は、特定のリソソームタンパク質の結核菌ファゴソームにおける局在を明らかにすることにとどまってきた。また、結核菌ファゴソームのマーカータンパク質である Coronin-1(TACO)は生化学的に単離した結核菌ファゴソームに特異的に含まれるタンパク質として同定された(Cell. 1999 May 14;97(4): 435-47)。しかし、Coronin-1 は一般的ファゴソームにおいても局在するタンパク質として明らかになっている(J Cell Biol. 2001 Jan 8;152(1): 165-80)。本研究において、結核菌ファゴソームに Rab7 や v-ATPase などの後期エンドソームタンパク質、LAMP-1 や LAMP-2 などのリソソームタンパク質が局在することが明らかになった。また、数多くの小胞体タンパク質が結核菌ファゴソームに局在することも明らかになった。以上の結果は、結核菌ファゴソームは後期エンドソームやリソソームと融合することができること、しかし、結核菌ファゴソームと小胞体との融合が優先的に行われるためファゴリソソーム形成が阻害されることを示唆する。また、本実験結果は、MHC class I による結核菌抗原のクロスプレゼンテーション機構に結核菌ファゴソームと小胞体との融合が関与することを示唆する。

E. 結論

結核菌ファゴソームのプロテオーム解析の結果は、結核菌ファゴソームは後期エンドソームやリソソームと融合することができること、しかし、結核菌ファゴソームと小胞体との融合が優先的に行われるためファゴリソソーム形成が阻害されることを示

唆する。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Seto, S., S. Matsumoto, I. Ohta, K. Tsujimura, and Y. Koide. Dissection of Rab7 localization on *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. Biochem. Biophys. Res. Commun., 387:272-277, 2009.
 - 2) Seto, S., S. Matsumoto, K. Tsujimura, and Y. Koide. Differential recruitment of CD63 and Rab7-interacting-lysosomal-proteins to *Mycobacterium tuberculosis* phagosome in macrophage. Microbiol. Immunol., in press.

2. 学会発表

- 1) Alternative localization of Rab GTPases to phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis* in inhibition of phagolysosome biogenesis. Seto, S., and Y. Koide. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th US-Japan conference on tuberculosis and leprosy, July, 2009, Fukuoka.
- 2) 結核菌ファゴソームのプロテオミクスによる分子解剖. 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 第92回日本細菌学会関東支部会総会 2009年11月 東京
- 3) Proteomic analysis revealed the interaction of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome with endoplasmic reticulum. 瀬戸真太郎、辻村邦夫、小出幸夫. 第83回日本細菌学会総会 2010年3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

平成21年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

薬剤耐性結核菌の迅速検出法

分担研究報告書

研究分担者

鈴木 定彦

(北海道大学・教授)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業研究事業）
分担研究報告書

薬剤耐性結核菌の迅速検出法

研究分担者 鈴木 定彦（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・教授）
研究協力者 中島 千絵（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・博士研究員）

研究要旨.

野生型、74番目のコドン単独変異、94番目のコドン単独変異、および74番目と94番目のコドン2重変異をもつ結核菌DNAジャイレースAサブユニットを組換え蛋白質として発現させ、精製後、同様に発現・精製した結核菌DNAジャイレースBサブユニットと組み合わせてDNAジャイレース活性を評価した。その結果、74番目または94番目のコドンに単独変異を有するAサブユニットを成分とするDNAジャイレースでは野生型のそれを成分とするものに比べて活性の低下が見られた。一方、74番目と94番目のコドン2重変異をもつAサブユニットを成分とするDNAジャイレースでは、野生型に比べて活性の上昇が見られた。上記組み換えDNAジャイレースそれぞれの各種ニューキノロン剤に対する耐性は、74番目および94番目のコドン2重変異をもつAサブユニットを構成成分とするDNAジャイレースでは94番目のコドン単独変異のそれよりも低かった。以上の結果より、DNAジャイレースの活性と耐性が相まって菌株レベルでの耐性が決定される事が推測された。

A. 研究目的

イソニアジド、リファンピシンを含む2剤以上の抗結核剤に耐性結核菌により発症した結核を多剤耐性結核と呼ぶ。近年、多剤耐性結核が増加傾向を見せ大きな問題となっている。多剤耐性結核の治療には1次抗結核剤以外の薬剤を用いる。これらの中でもニューキノロン剤は重要と考えられる。本研究ではニューキノロン剤耐性獲得に係る遺伝子変異を網羅的に解析し把握することにより、ニューキノロン剤耐性結核菌の迅速遺伝子診断法を確立する事を目的として研究を進めている。ニューキノロン剤耐性結核菌においては、*gyrA* 遺伝子および *gyrB* 遺伝子上のキノロン耐性決定領域 (QRDR) での遺伝子変異が高頻度に見られ、特に *gyrA* 遺伝子上の変異は重要と考えられている。また、QRDR の遺伝子変異の位置と種類により耐性の度合いも異なる事が知られている。最近 *gyrA* 遺伝子 QRDR 上の 74番目のコドン (GCC : アラニン) から TCC (セ

リン) への変異がニューキノロン剤耐性臨床分離結核菌において見いだされた。面白い事にこの変異は単独に見いだされることはなく、必ず 94番目のコドン (GAC : アスパラギン酸) から GGC (グリシン) への変異と付随して見いだされた。また、94番目のコドンの単独変異を有する臨床分離結核菌に比べて 74番目のコドン変異を同時に有する結核菌は4倍以上高い濃度のニューキノロン剤にも耐性を示す事が明らかとなった。本研究では、74番目のコドン変異のニューキノロン高濃度耐性化のメカニズムを明らかにするために実験を進めた。

B. 研究方法

組換え DNA ジャイレースの大腸菌での発現および精製

DNA ジャイレース A および B サブユニットをコードする *gyrA* および *gyrB* 遺伝子は結核菌株 H37Rv 由来 DNA を鋳型として PCR 法により増幅させて用いた。 *gyrA* および

gyrB 遺伝子はそれぞれカルボキシ末端およびアミノ末端に6個のヒスチジンがつく様に設計した。部位特異的変異は表1に示すプライマーを用いて導入した。

PCR法により得られたDNA断片は塩基配列を確認した後、発現ベクターpETに連結させ、大腸菌株BL21へ導入した。組み換え蛋白の発現は培養液中に最終濃度1mMのイソプロピル-β-D-ジチオガラクトピラノシドを添加後更に3時間培養する事により実施した。

組換え発現大腸菌ライセート中に含まれるDNAジャイレースAおよびBサブユニットはニックルアガロースに吸着させた後、イミダゾール溶出により精製表品として取得した。

DNAジャイレースアッセイ

上記で精製したAおよびBサブユニットを等モルずつ混合し、DNAジャイレースを再構成して実験に用いた。ジャイレース活性の評価は、リラックス型のプラスミド(pBR322)を基質として反応させ、スーパーコイル化した部分のDNA量を、アガロースゲル電気泳動を用いた方法により定量する事により実施した。定量には、ネット上で入手可能な画像解析ソフトウェアImage Jを用いた。

イレースアッセイ系に添加し、DNAジャイレースの活性を50%阻害するニューキノロン剤の濃度(IC50)を求めた。

倫理面への配慮

ヒト由来検体を用いていないため、倫理面への配慮は行っていない。遺伝子組み換え実験は北海道大学遺伝子組換え生物等の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の承認(承認番号17(88))に基づいて実施した。

C. 研究結果

野生型、74番目のコドン単独変異、94番目のコドン単独変異、および74番目と94番目のコドン2重変異をもつ結核菌DNAジャイレースAサブユニットを組換え蛋白質として発現させ、精製後、同様に発現・精製した結核菌DNAジャイレースBサブユニットと組み合わせてDNAジャイレースを構築し、それらの活性を評価した。その結果、74番目または94番目のコドンに単独に変異を有するAサブユニットを成分とするDNAジャイレースでは野生型のそれを成分とするものに比べて活性の低下が見られた。一方、非常に興味深い事には、74番目と94番目のコドンの両方に同時に変異をもつAサブユニットを成分とするDNAジャイレース

TABLE 1. Nucleotide sequences of primers used in PCR for mutagenesis

Primer Name ^a	Sequence ^b (nucleotide position)
A74S_S	5'-CGCCAAGTCG T CCCGGTCGGTTG-3' (210-232)
A74S_AS	5'-CAACCGACCGGGACGACTTGGCG-3' (232-210)
D94G_S	5'-GTCGATCTACGGCAGCCTGGTGC-3' (270-292)
D94G_AS	5'-GCACCAGGCTGCCGTAGATCGA C-3' (292-2702)
A74S-D94G_S	5'-GCAACTACCACCCGCACGGC-3' (245-264)
A74S-D94G_AS	5'-GCCGTGCGGGTGGTAGTTGC-3' (264-245)

^a S, sense; AS, antisense.

^b Relevant codons are underlined, and mutated bases are shown in bold type.

ニューキノロン剤による阻害

ニューキノロン剤としてシプロフロキサシン(CPFX)、レボフロキサシン(LVFX)およびガチフロキサシン(GTFX)を用いた。それぞれの薬剤を最終濃度320μg/mlを起点として2倍階段希釈して上記DNAジャ

イレースでは、野生型Aサブユニットを成分とするものに比べて活性の上昇が見られた(図1)。