

総脂質画分のマクロファージ系細胞応答について検討した。HEK293-TLR2 (HEK-Blue-2) 或いは HEK293-TLR4 (HEK Blue-4) 細胞を I, II 型脂質画分で刺激し、TLR2, 4 アゴニスト分子のスクリーニングを試みた。Chloroform/methanol 抽出総脂質画分は I, II 型ともに HEK-TLR2 細胞と濃度依存的に反応したことから、総脂質画分に TLR2 アゴニスト分子の存在が示唆された。そこで、さらに TLC の移動度から 3 分画して詳細を検討した。極性の比較的高い Fr. 1, 2 に活性を認めた。最も極性の低い Fr. 3 は反応しなかった。PGL は Fr. 3 に含まれ、cord factor, trehalose-monomycolate (TMM) は Fr. 2 に含まれた。Fr.1 は chloroform:methanol:acetone:acetic acid/90:10:6:1 の展開溶媒系において原点付近の画分であるため、さらに極性の高い展開溶媒系 chloroform:methanol:water/60:30:6 で展開したところ、phosphatidylinositol mannoside (PIM) のうちマイナーな PIMs (monoacyl, diacyl PIM<sub>2</sub>) 分子の存在を確認した。本研究での総脂質画分は C:M で抽出しており、TLR2 のアゴニストである PIM<sub>4</sub>, PIM<sub>6</sub> は含まれない。Fr. 2 には PIM は存在せず、TLR2 で活性化される他の脂質分子の存在が認められた。

2) BCG 亜株の NO ストレス、酸化ストレス、pH 感受性の比較

*In vitro* での一酸化窒素ストレス、及び酸化ストレスに対する感受性試験を行った結果、Japan, Danish, Glaxo, Pasteur 株が一酸化窒素に対して比較的耐性であり、Russia, Japan, Birkhaug, Connaght 株が過酸化ストレスに対して比較的耐性を示した。

3) BCG-I 型と BCG-II 型の遺伝子発現の差異 : BCG3405c - BCG3405c, BCG 2953 - BCG 2957, BCG 2958 - BCG 2960 の発現

昨年度、遺伝子発現における差を明らかにする目的で実験を行なったところ、RD16 領域の BCG3405c - BCG3408 および細胞壁糖脂質 phthiocerol dimycocerosate (PDIM) の合成酵素をコードしている遺伝子群 BCG 2953 - BCG 2957 (*ppsA-E*)、PDIM の輸送に関わるトランスポーターをコードしている遺伝子群 BCG 2958 - BCG 2960 (*drrA-C*) は BCG Tokyo 172 株 I 型で発現し、II 型では発現量がわずかであることが明らかになった。BCG3405c - Rv3408 の発現を他の亜株を含めて RT-PCR 法で調べたところ、Tokyo I 型と Moreau 株では BCG3405c - BCG3408 の遺伝子がすべて発現しており、Tokyo II 型、Pateur 株、Russia 株では発現していなかった。

BCG3405c 遺伝子産物が転写因子である可能性が示唆されていたため、BCG3405c - BCG3408 の発現と BCG 2953 - BCG 2957, BCG 2958 - BCG 2960 の発現の関係を調べるために、Tokyo 株 II 型に I 型の BCG3405c および BCG3406 - Rv3408 を導入した。その結果、BCG3405c あるいは BCG3406 - Rv3408 を導入することにより II 型における BCG 2953 - 2958 の遺伝子の発現レベルが上昇した。

5) BCG 亜株の遅延型過敏反応誘導能および抗結核免疫誘導能の比較検討

調べたすべての BCG 製品については、同等の PPD 皮膚反応および抗結核免疫誘導能を示した。

## II. 組換え BCG ベクター系の開発と応用

### 1) エイズワクチンの開発

1-1) 高コピー変異型プラスミドベクターの構築  
変異型 pS0246R は、元の pS0246 と比較して、*M. smegmatis* では約 5 倍、BCG では 3-4 倍にコピー数が増加していた。この値は、Bourn らの報告 [Bourn et al. *Tuberculosis* (2007)] にほぼ一致していた。

### 1-2) Gag 発現レベルの比較・検討

細菌には、一般的な Sec 分泌系と twin-arginine translocase (Tat) 分泌系の二種の蛋白質分泌系が存在する。Sec 分泌系依存性の *M. kansasii* 由来 antigen 85B 分泌シグナル (own promoter) と Tat 分泌系依存性の *blaF* ( $\beta$  ラクターマーゼ遺伝子) シグナル (SP2 promoter) にそれぞれ *gag* 遺伝子を繋いだ発現カセットを構築し、これらを pS0246 及び pS0246R に導入した発現ベクターを保持する BCG 東京株での Gag 発現レベルを、ウエスタンブロットと Gag p24 ELISA 法で比較・検討した。コドンに至適化した *gag* 遺伝子を用いた場合、pS0246 では組換え体が得られたが、pS0246R では得られなかった。pNL4-3 由来の野生型 *gag* 遺伝子を antigen 85B 分泌シグナルに繋いだ場合、pS0246R を用いても組換え体を得られ、pS0246 を用いた場合よりも lysate で約 5 倍、培養上清で約 10 倍の Gag 抗原を発現していることがわかった。これは、コドン至適化による発現増強とほぼ同じレベルであった。

### 1-3) 組換え BCG でのプラスミド安定性評価

Gag 高発現株が得られた pS0-A717N-gagB (*blaF* signal + コドン至適化 *gag* 遺伝子) pS0-240S-gagB (antigen 85B signal + コドン至適化 *gag*) 及び pSOR-240S-NLgag (antigen 85B signal + 野生型 *gag*) の三種の組換え BCG 株での、液体培養時のプラスミドの安定性を調べたところ、pS0-A717N-gagB で欠失が認められたが、他の二種では欠失は見られず、高コピー型プラスミドを用いると、コドン至適化と同程度の発現レベルが得られるにもかかわらず、組換えプラスミドは安定であることが判った。

### 1-4) マウス GM-CSF の BCG からの分泌発現

コドン至適化 GM-CSF 遺伝子を *blaF* シグナルペプチドに繋いで BCG での発現を調べたところ、培養上清中にも菌体抽出液中に検出されたバンドよりわずかに小さな分子量の位置にポジティブなバンドが検出され、シグナルペプチドが正常な位置で切断された成熟型 GM-CSF が分泌されているものと考えられる。

### 2) BCG ベクターによる SIV ウイルス血症抑制効果の評価系の検討

接種後 3, 4 週における血漿中のウイルスコピー数を調べた。この間、A 群においてその減少が著しいのは A-2 であり、B 群では B-2、C 群では C-2 および C-3、D 群では D-1 および D-2 であった。例外の A-2, C-2 を除いて接種後 3 週での特異的刺戟における IFN $\gamma$  の産生細胞の比率が高いことが認められた。C-2 では、刺戟における比率増加が、IFN $\gamma$ 、IL-2、TNF $\alpha$  全てにおいて認められない。一方、コピー数にあまり変化の認められない個体では、特異的刺戟における IL-2 の産生が検出さ

れることが認められた。A-2 に代表されるように、群としてコピー数の低下が認められる場合は、比較して TNF- $\alpha$  の産生が認められた。

### III. TLR 制御を取り入れた新規 DNA アジュバントの開発

1) IFN- $\alpha$  の産生を抑制するウイルスに感染した形質細胞様樹状細胞に IFN- $\alpha$  を誘導する技術の検討

1-1) 19 年度は、RSV-A2 株に感染した形質細胞様樹状細胞では IRF-7 活性化のプロセスが阻害されるため、G91 を添加しても IFN- $\alpha$  が産生されないことを報告した。本年度は、RSV 感染 Hep2 培養液に大量に存在する炎症性サイトカインが IFN- $\alpha$  産生抑制に関与しているかどうかを検討した。形質細胞様樹状細胞に RSV-A2 (moi=5) を、4°C、室温、または 37°C で、1 時間から 8 時間接触させた後、細胞を洗浄し、10%FCS 添加 RPMI1640 培地を加えて再培養した。炎症性サイトカインの産生を指標に検討した結果、感染に必要な前培養は、4°C、1 時間で十分であった。そこで形質細胞様樹状細胞に RSV-A2 を添加して 4°C で 1 時間前培養し、洗浄後再培養して IFN- $\alpha$  の産生を測定した。その結果、RSV-A2 に感染した形質細胞様樹状細胞は、IFN- $\alpha$  産生は依然として低い、G91 には反応して IFN- $\alpha$  を産生し得ることが示された。

RSV-A2 の NS1 タンパク質は、IFN- $\alpha$  遺伝子の転写因子である IRF-7 の活性化を抑制した。そこで IRF-7 活性化に依存して発現する IP-10 の誘導について同様に検討したところ、RSV-A2 に感染した形質細胞様樹状細胞では、産生量が、RSV-long に感染した形質細胞様樹状細胞に比べて極めて低いことが示された。しかし Hep2 培養上清を除去したのち G91 を添加して再培養すると、IP-10 産生は、RSV を感染させずに G91 を添加して培養したときのレベル以上に増強した。

1-2) RSV-long に感染した形質細胞様樹状細胞の IFN- $\alpha$  産生は、Hep2 培養上清を除去するだけで、7~50 倍と強く増加した。

本年度は、RSV 感染 Hep2 培養液に高濃度で検出される IL-29 が、形質細胞様樹状細胞の IFN- $\alpha$  産生にどのような影響を与えるかについて検討した。IL-29 を、RSV 感染 Hep2 培養液で検出された濃度 (>14ng/mL) に近い 10ng/mL で、形質細胞様樹状細胞に添加して培養した。IL-29 の単独添加培養では IFN- $\alpha$  は産生されなかったが、G91 を共添加して培養すると G91 単独添加時の約 2 倍多く産生された。これは、IL-29 が形質細胞様樹状細胞に IRF-7 の発現を誘導することによるのかもしれない。そこで IRF-7 に依存して発現する IP-10 の産生について同様に検討した。IP-10 は IL-29 単独でもある程度誘導されたが、G91 を共添加すると G91 単独添加の場合の 2 倍以上強く産生された。これらの結果は、RSV 感染により産生される IL-29 が IFN- $\alpha$  産生の抑制に関わる可能性は少ないことを示唆している。

2) 形質細胞様樹状細胞におけるアポトーシス誘導因子の発現

2-1) 20 年度では、形質細胞様樹状細胞に G91 を作用させると Bcl-3 の発現が亢進することを報告

した。G91 は Bcl-3 を誘導して形質細胞様樹状細胞の生存を促進していることが示唆される。本年度は、5 名の健康成人について、末梢血から分離した形質細胞様樹状細胞を G91 添加、非添加で培養し、TRAIL, Bim, Bcl-2 の mRNA の発現変化を検討した。その結果、G91 添加培養により TRAIL の発現が 16~217 倍と強く亢進することが示された。Bim や Bcl-2 の発現に、G91 添加・非添加培養間における有意な変化はみられなかった。

### IV. BCG 細胞壁骨格 (BCG-CWS) の抗腫瘍性免疫活性

BBN を投与し、Na ascorbate で発癌誘発を促進したラットは、各群とも (n=3-7), 10 週後膀胱壁の肥厚と共に孤立性又は多発性の絨毛様 (papilloma) 腫瘍の発育を示した。

化学物質投与期間中の BBN 摂取量は、各群で同等で、有意な変動は認められなかった。一般状態の観察では膀胱内投与群の、無処置群を除く各群に、軟便、下痢又は血尿が軽度に一定の傾向なく観察された。静脈内投与群では R8 BCG-CWS 高用量 (1.0-2.0 mg) 投与直後に軽度のチアノーゼ、呼吸緩徐、流涙、皮膚蒼白などが一過性に認められたが低用量では認められなかったことから R8-リポソームの静脈内投与時の毒性所見と考えられる。静脈内投与による死亡は認められなかった。膀胱内投与群の体重、摂餌量及び摂水量に、被験物質処置による影響は明らかではなかった。静脈内投与の体重推移では高用量群に軽度の体重増加抑制傾向が認められた。

BBN 発癌ラットのうち R8-BCG CWS 1.0 mg/rat/week 10 週間膀胱内投与群は膀胱腫瘍の発育を強力に抑制した (99%) ほか、静脈内投与によっても 0.1 mg で 75 % 以上の抑制を示したことから R8 BCG-CWS リポソームは強力な抗膀胱癌免疫療法剤として有用と考えられる。

病理学的には、ラット表在性膀胱癌は、前がん状態及び発癌状態 (単純増生、乳頭様結節様増生および乳頭腫・癌腫) に分類されるが、R8 BCG-CWS リポソーム投与により papilloma (乳頭腫) の抑制効果が最も顕著に認められた。又膀胱内直接投与のみならず静脈内投与による表在性膀胱癌抑制効果が顕著に認められた。

### V. 劇症型連鎖球菌の病原因子の粘膜ワクチン化の検討

1) 抗原のトキシイド化と免疫反応

NADase と M タンパクの精製大腸菌より組換え体として NADase および M タンパク質を作製、精製、トキシイド化して経鼻免疫用抗原として使用した。精製結果として NADase (50kDa)、M タンパク質 (54kDa) 共に、各推定分子量と同一の単一バンドとして得る事ができた。

NADase のトキシイド化では、0.05%ホルムアルデヒドで NADase 活性の 7 割が消失し、これ以上のホルムアルデヒド濃度を上昇しても活性消失に影響を及ぼさない事が明らかとなった。

はじめに、NADase または M タンパクをトキシイド化せずに、そのままの状態を rCTB と共にマウスへ経鼻投与した。その結果、血清中の抗体価は

両抗原共に特異抗体価が上昇しなかった。そのため各抗原のトキシイド化を試み、再度マウスへ経鼻投与し各抗原のトキシイド化とホルムアルデヒド濃度、抗原性の変化の有無を ELISA 抗体価、中和抗体価、劇症型 A 群連鎖球菌攻撃により確認した。NADase トキシイドの rCTB との経鼻投与で抗 NADase IgG 抗体は、トキシイド化しない NADase と比べ、トキシイド化により抗体価が上昇した。またホルムアルデヒド濃度が 0.1%にまで上昇しても逆に抗体価は低下した。NADase トキシイド免疫マウス血清と NADase の毒素中和比率と細菌攻撃結果、NADase トキシイド化後の酵素消失率から、NADase はホルムアルデヒド濃度 0.05%でトキシイド化に至適であり、中和抗体も得られ、細菌の攻撃からも逃れた事が示された。

NADase のトキシイド化の至適条件を元に、ICR、C57BL/6、BALB/c マウスへ、実験系を拡大し、NADase トキシイドと rCTB の経鼻投与による NADase 抗体価の上昇や中和抗体価を測定した。

抗 NADase IgG 抗体価は、マウスの各系統で rCTB の有無に関係なく上昇した。抗 NADase IgA 抗体価は、ICR、BALB/c マウスで有意差が得られなかったが、C57BL/6 において rCTB の添加により IgA 特異抗体価が有意差を持って上昇した。

NADase 中和抗体価は、ICR で有意差が出なかったが、C57BL/6、BALB/c において有意に中和抗体が上昇した。

#### 2) フィブリノゲン結合活性測定

M タンパクの抗貪食作用は、フィブリノゲンへの結合が重要であり、その結合を阻害すると貪食されるとの報告がある。そこで、精製 M タンパクのフィブリノゲン結合能とトキシイド化フィブリノゲン結合能を測定した。ビオチン化フィブリノゲンを作製し、M タンパクとの結合を ELISA 法で測定すると、固相化した M タンパクに対して濃度依存的にフィブリノゲンが反応した。またビオチン化フィブリノゲンにフィブリノゲンを混合し M タンパクに対して競合反応を行わせると、ビオチン化フィブリノゲンに競合反応を示し、M タンパクとの結合との特異反応をしている事も示された。またトキシイド化 M タンパクのフィブリノゲンとの結合は、トキシイド化に伴い低下した。精製 M タンパクは、抗貪食作用に関与するフィブリノゲン結合能を有し、トキシイド化によってその結合が低下していることが示された。ホルムアルデヒド濃度は終濃度 0.1%でフィブリノゲン結合能を阻害した。

#### 3) M タンパクの抗貪食活性

M タンパクの抗貪食作用がトキシイド化によって低下しているかを更に検討すべく、ICR マウス腹腔好中球 (PEN) および血中好中球 (PMN) と貪食測定用マイクロビーズを用いて、M タンパクおよび M タンパクトキシイド添加による影響を測定した。PMN に M タンパクを添加すると抗貪食作用は低下しむしろビーズ貪食を促進した。またトキシイドを添加するとビーズ貪食を阻害した。同様の結果を PEN でも確認した。

### D. 考察

#### I. BCG の多様性について

BCG 亜株間の細菌学的、遺伝学的、分子生物学的な差異の基礎的な知見を積み重ね、さらに構成成分や免疫活性の相関とともに明らかになってきた。今後、免疫記憶や有効性について検討を重ねていくことで、よりよいワクチンの選択と接種の施行方法に関する、今後のワクチン行政に貢献できると考えられる。

#### 1) 脂質生化学的比較解析とワクチン効果への影響

唯一の結核ワクチンである BCG 株は Pasteur 研究所より配布された時期により性状は不均一であり、その抗原性やワクチンの有効性に差があると考えられている。本研究では抗酸菌に特徴的な細胞表層脂質成分に焦点を当て、その分布と宿主応答を明らかにした。我が国の結核ワクチン株 BCG Tokyo 172 株はコロニーの形態が S (Smooth) 型、R (Rough) 型の 2 種類が混在しているが、主要コロニーは S 型の I 型であった。I、II 型はコロニー形状が異なることから細胞表層の構造に差があることが示唆された。本研究において II 型が表現型として PGL, PDIM を欠損していることは、細胞表層の疎水性に影響し、コロニー形状の変化に関わっていると考えられた。その生合成遺伝子の解析から *ppsA* 遺伝子の変異による機能欠損であることが示された。II 型菌の I 型 *ppsA* 遺伝子相補株では、I 型と同様の PGL 産生が確認されたが、その発現量は明らかに低く、他のオペロンが転写因子として抑制的に制御している可能性が考えられた。今後、これら生合成遺伝子群の解明は、BCG ワクチン株の抗原性、ワクチン効果の増強に加え抗結核薬のターゲット分子としての有用性も含め新思考を提供できる可能性がある。

#### 2) BCG 亜株の NO ストレス、酸化ストレス、pH 感受性の比較

生化学試験の結果、Pasteur 研究所からの分与時期の近縁の株間で形質がよく似ていることが明らかとなった。Pasture 研究所からの分与時期が早い株 (Russia, Japan) は酸化ストレスに対する耐性が高いことが示された。ヒトとマウスでは殺菌機構に違いがあり、ヒトの細胞では活性酸素中間体より活性酸素中間体が殺菌に働いていると言われていることから、酸化ストレスに耐性を示す株が宿主細胞内で生存しやすいことが示唆される。

#### 3) BCG-I 型と BCG-II 型の遺伝子発現の差異

BCG Tokyo 株 I 型と II 型の遺伝子発現プロファイルを調べた結果、RD16 領域の BCG3405c-BCG3408、BCG 2953 - BCG 2957 (*ppsA-E*)、BCG 2958 - BCG 2960 (*drxA-C*) は BCG Tokyo 172 株 I 型で発現し、II 型では発現量がわずかであった。BCG3405c-Rv3408 の発現を他の亜株でも調べたところ BCG3405c が完全長である Pasteur 株と Russia 株では BCG3405c-BCG3408 の発現が Tokyo 株 I 型と同様に認められず、BCG3405c の下流部分が欠損している Moreau 株では BCG3405c-BCG3408 のすべての遺伝子が BCG Tokyo 株 II 型と同様に発現していた。このことから、BCG3405c 内に存在する塩基配列がこの領域の遺伝子を負に制御する可能性が考えられた。BCG3405c-BCG3408 と BCG 2953 - BCG 2957、BCG 2958 - BCG 2960 の遺伝子発現の関連性については

次に I 型 BCG3405c あるいは BCG3406 - BCG3408

を II 型に導入することによって BCG 2953 - BCG 2958 のメッセージ RNA 量が増加した。このことから BCG3405c および BCG3406 - BCG3408 の遺伝子産物が BCG 2953 - BCG 2957 と BCG 2958 - BCG 2960 の転写を制御している可能性が示された。今後 BCG3405c および BCG3405 - BCG3408 の転写調節因子としての役割を明らかにしていく必要がある。

## II. 組換え BCG ベクター系の開発と応用

BCG ベクターについて組換え BCG ワクチン、エイズワクチンを構築し、安定性、安全性、及びモルモット、サルでの有効性の向上を確認してきたが、さらにこれまで見いだされた点を改良し、前臨床試験・臨床試験を目指したい。今後行われる臨床試験はワクチン接種後の効果判定に相当期間がかかることが考えられる。従って安全性に関しては一層注意深く検証していく必要がある。

### 1) エイズワクチンの開発

コドン至適化は BCG ベクターの免疫原性を高めるための有効な方法だが、発現レベルが BCG 菌体にストレスがかかってしまうまで上昇してしまうと、欠失や脱落によってプラスミドを排除してしまう傾向にある。しかし、今回開発した多コピー数プラスミドを用いると、それに匹敵する Gag 発現増強効果が得られる上に、菌体内でプラスミドベクターも安定に保持されており、実用化上極めて有用なツールになるものと期待される。

BCG からの GM-CSF の分泌発現は既に報告があるが、分泌レベルは約 10 ng/ml 程度であった [Ryan et al. *J. Immunol.* (2007)]。今回得られた分泌株は上清を濃縮することなくウエスタンブロット法で検出可能なレベルの GM-CSF が分泌していることから見ると、報告の少なくとも 50-100 倍の分泌レベルが得られたことになる。これは、*blaF* シグナルを使ったこととコドン至適化した効果によるものと考えられる。生物活性の確認が待たれる。

### 3) 栄養要求性を指標とする新しい抗酸菌の宿主-ベクター系開発

抗生物質耐性遺伝子の代わりに *ThyX* を指標とした宿主-ベクターシステムの構築を試みた。BCG  $\Delta$  *ThyX* を宿主、*thyX* を保持した pNN5 をベクター、7H10-ADS 寒天培地を選択培地とした組み合わせでは 85 % でプラスミド保有株を得ることができた。このことは簡便な 2 次スクリーニングを行なうことで目的のクローンが得られることを意味しており、この宿主-ベクターシステムを利用できる可能性を示している。形質転換 6 カ月後のプラスミドの保持率を調べたところ、カナマイシンで選択した場合と同様の保持率であったことから、長期にわたりプラスミドが保持されていること、すなわち安定な宿主-ベクターシステムであることが示された。

### 4) 組換え HIV ワクチン開発のためのサルエイズモデルによる有効性の検討

マカク属サル類への SIV 感染は、ヒトにおけるエイズの感染病態の非常に近いモデルとして、ワクチンの評価に用いられている。その病態は、接種後数週における血漿中ウイルスコピー数のピ

ーク、およびそれに続く持続的なウイルス量 (set point 値) の維持とそれに伴う effector memory CD4 T 細胞の減少である。これらの病態を阻止するあるいはどれだけ低減させることが出来るかにより、ワクチンの有効性が評価される。Gag 蛋白を標的とした細胞性免疫誘導型ワクチンでは、感染防御に効果を示すことはなく感染後のウイルス量を制御あるいは検出不可能なまでに低下あるいは排除させることが期待されている。

このような血漿中のウイルス量を制御することが期待されている細胞性免疫反応については、従来、特異的抗原刺激における INF  $\gamma$  の産生で評価することが一般的であった。今回、ウイルス血症のピーク後のウイルスコピー数の変化に着目し、接種後 3 週から 4 週のウイルスコピー数の減少に関わる特異的細胞性免疫反応として、INF  $\gamma$ 、IL-2、TNF  $\alpha$  の産生について検討を行ったところ、INF  $\gamma$  は、コピー数の減少とかなり相関が認められたが、例外も多く、IL-2 の産生があるものについては、減少が認められないことが示唆された。TNF  $\alpha$  の産生は、減少と関係があると考えられ、減少に有効な反応は、INF  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$  の産生が認められ、IL-2 産生細胞が少ないことが、コピー数の減少に関与する可能性がある。このように、細胞性免疫反応を評価するためには、数種類のサイトカイン産生について総合的に評価することが求められると考えられる。

## III. TLR 制御を取り入れた新規 DNA アジュバントの開発

G91 を効果的に用いるために、ウイルス感染細胞に由来する物質が形質細胞様樹状細胞への影響を阻止できる方法を用いることで、INF- $\alpha$  産生抑制能のある微生物の感染に対する防御能誘導が可能になると考えられる。

形質細胞様樹状細胞では type I IFN や RSV を作用させても TRAIL が発現した。誘導された TRAIL が果たす役割は不明である。G91 のアジュバントとしての実用化には、TRAIL 発現の増強がどのような免疫反応を誘導するのかを明らかにする必要があると思われる。

## IV. BCG-CWS の抗腫瘍性免疫活性

BCG ワクチンの膀胱内投与は、これまで癌免疫療法の中で化学療法に替わる最も強力な治療法として注目されているが生菌なるが故の副作用を避けられなかったので、R8 添加カチオン性リポソーム (MEND) 化によって副作用の少ない高薬効免疫療法剤としての製剤化が可能であると考えられた。

## V. 劇症型連鎖球菌の病原因子の粘膜ワクチン化の検討

劇症型 A 群連鎖球菌の NADase と M タンパクについて rCTB をアジュバントとして用いて粘膜免疫した場合の発症防御および感染防御を検討した。

NADase は従来の A 群連鎖球菌では産生されず、劇症型に変化した際に産生、発現して来たタンパク質である。このタンパク質は、細胞中の NAD を

消費して細胞毒性を示す。劇症型と称する現象に由来する原因物質として考えられている。今回このタンパク質をトキシド化し、粘膜免疫する事で血清中に中和抗体を産生する事を示した。このNADase トキシドの粘膜免疫で、劇症型発症の抑制効果につながるものと期待出来る。

## E. 結論

### I. BCG の多様性について

1) BCG 亜株は細胞表層脂質成分に偏在性があり、ミコール酸のサブクラス組成から 2 つのクラスターに分けることが出来た。我が国の結核ワクチン株 BCG Tokyo 172 株はコロニー形状の異なる I, II 型が混在するが、脂質分子の網羅的解析から、PDIM, PGL が II 型に欠損していた。この表現型は PDIM 生合成遺伝子 *ppsA* 遺伝子の変異によることが明らかとなり、他の遺伝子群が転写因子として負の制御を行っている可能性も示唆された。また、自然免疫を惹起する TLR2 アゴニスト脂質分子の存在が確認された。これらの細胞表層脂質分子の偏在性が BCG 亜株間の抗原性、ワクチン効果に寄与していると考えられた。

2) *In vitro* での一酸化窒素ストレス、及び酸化ストレスに対する感受性試験を行った結果、Japan, Danish, Glaxo, Pasteur 株が一酸化窒素に対して比較的耐性であり、Russia, Japan, Birkhaug, Connaght 株が過酸化ストレスに対して比較的耐性を示した。その一方、モルモットに対する BCG の遅延型過敏反応試験及び抗結核免疫誘導能において、調べた BCG 亜株間に差異は認められなかった。

3) BCG-I と BCG-II の遺伝子発現パターンの違いを明らかにした。BCG Tokyo 株 I 型と II 型の遺伝子発現プロファイルを調べた結果、RD16 領域の BCG3405c-BCG3408, BCG 2953 - BCG 2957 (*ppsA-E*)、BCG 2958 - BCG 2960 (*draA-C*) は BCG Tokyo 172 株 I 型で発現し、II 型では発現量がわずかであった。BCG3405c および BCG3406 - BCG3408 の遺伝子産物が BCG 2953 - BCG 2957 と BCG 2958 - BCG 2960 の転写を制御している可能性が示された。

### II. 組換え BCG ベクター系の開発と応用について

1) コドン最適化以外で外来抗原発現を増強できる方法を検討し、プラスミドのレプリコンに変異を導入した高コピー変異型プラスミドを用いると、オリジナルのプラスミドを用いた場合よりも BCG での HIV-1 Gag の発現レベルが約 10 倍上昇するにもかかわらず、組換えプラスミドが安定に保持されることがわかった。このベクターは、組換え BCG を用いたエイズワクチン開発において極めて有用である。

2) rBCG-SIVgag/rDIs-SIVgag で免疫したカニクイザルにおける、SIVmac239 感染によるウイルス血症を有意に低下させる細胞性免疫の評価は、SIVgag 蛋白刺激に対する T 細胞の IFN $\gamma$ 、IL-2、TNF $\alpha$  産生を総合的に評価する必要があることが示唆された。

3) BCG のチミジル酸合成酵素 ThyX の NADPH 酸化活性を利用した新規 BCG 宿主 - ベクターシステムを構築した。このシステムは安定であり、薬剤耐性非依存的に組換え BCG を選択可能であり、したが

って、他領域への応用、すなわち、汎用性が期待される。

### III. TLR 制御を取り入れた新規 DNA アジュバントの開発

IFN- $\alpha$  産生抑制作用をもつ微生物の感染に対して G91 は、感染由来物質が形質細胞様樹状細胞へ作用することを防ぐ技術を組み合わせることにより、防御免疫を誘導することが可能になると思われた。G91 は、形質細胞様樹状細胞に TRAIL の発現を増強した。

### IV. BCG-CWS の抗腫瘍性免疫活性

R8 MEND BCG-CWS は、これまでのどの CWS 製剤にもまさる製剤として尿路上皮癌の治療に有用な免疫療法剤となると期待される。

### V. 劇症型連鎖球菌の病原因子の粘膜ワクチン化の検討

NADase を CTB と共に粘膜免疫投与する事で中和抗体が産生された。劇症型発症を抑制する事が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Hayashi D, Takii T, Fujiwara N, Fujita Y, Yano I, Yamamoto S, Kondo M, Yasuda E, Inagaki E, Kanai K, Fujiwara A, Kawarazaki A, Chiba T and Onozaki K: Comparative studies of immunostimulating activities in vitro among Mycobacterium bovis Calmette-Guerin (BCG) substrains. FEMS Immunol Med Microbiol 56: 116 - 128, 2009.

2) Ichinohe T, Maeyama J, T, Hasegawa H et al. Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia. J Med Virol. 82(1) 128-37, 2010

3) Arakawa T, Hayashi H, Itoh S, Takii T, Onozaki K: IL-1-induced ERK1/2 activation up-regulates p21 (Waf1/Cip1) protein by inhibition of degradation via ubiquitin-independent pathway in human melanoma cells A375. Biochem Biophys Res Commun. 2010 392(3):369-372.

4) Itoh S, Hamada E, Kamoshida G, Yokoyama R, Takii T, Onozaki K, Tsuji T: Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) binds to human immunoglobulin G (IgG) and inhibits complement activation via the classical pathway. Mol Immunol. 2010 47(4):932-938.

5) Horita Y, Takii T, Chiba T, Kuroishi R, Maeda Y, Kurono Y, Inagaki E, Nishimura K, Yamamoto Y, Abe C, Mori M, Onozaki K.: Synthesis of new sugar derivatives and evaluation of their antibacterial activities against Mycobacterium tuberculosis. Bioorg Med Chem Lett. 2009 19(22):6313-6316.

6) Uenishi Y, Takii T, Yano I, Sunagawa M.: Separation and molecular characterization of mycolic acid from the cell wall skeleton of Mycobacterium bovis BCG Tokyo 172 (SMP-105) and BCG substrains by normal-phase high performance liquid

chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry.

*J Microbiol Methods*. 2009 77(3):320-322.

- 7) Yahagi A, Umemura M, Tamura T, Kariyone A, Begum M D, Kawakami K, Okamoto Y, Satoru Hamada S, Oshiro K, Kohama H, Arakawa T, Ohara N, Takatsu K, and Matsuzaki G. Suppressed induction of mycobacterial antigen-specific Th1-type CD4+ T cells in the lung after pulmonary mycobacterial infection. *Int. Immunol. in press*.
- 8) Hosono, N., Iho, S., Kishi, S., Urasaki, Y., Yoshida, A., Kurooka, H., Yokota, Y., Ueda, T. Glutathione S-transferase M1 inhibits dexamethasone-induced apoptosis in association with the suppression of Bim through dual mechanisms in a lymphoblastic leukemia cell line. *Cancer Sciences* (in press).
- 9) Iho, S., Osawa, Y., Takatsuka, H., Maeyama, J-I., Kitagawa, H., Yamamoto, S. Unique characteristics of palindromic CpG-oligodeoxynucleotide. In BCG vaccine and adjuvant (in press).
- 10) Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J. Kang, A. Shibata, K. Hirata, S. Kitada, R. Maekura, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2009. Virulence of Mycobacterium avium complex strains isolated from immunocompetent patients. *Microb. Pathog.* 46: 6-12.
- 11) Hirayama, Y., M. Yoshimura, Y. Ozeki, I. Sugawara, T. Udagawa, S. Mizuno, N. Itano, K. Kimata, A. Tamaru, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2009. Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. *PLoS Pathog.* 5: e1000643.
- 12) 小林和夫. 2009. マイコバクテリウム属 (抗酸菌). 標準微生物学 第10版 (平松啓一、中込治 編) 東京: 医学書院. 286-298. ISBN: 978-4-260-00638-5
- 13) 大原直也、小林和夫. 2009. 抗酸菌 (マイコバクテリウム) 感染症. コンパクト内科学 (井上修二、上原誉志夫、金澤真雄、川口 実、代田常道 編) 京都: 金芳堂. 418-420. ISBN: 978-4-7653-1382-7
- 14) Hasegawa T, Okamoto A, Kamimura T, Tatsuno I, Hashikawa SN, Yabutani M, Matsumoto M, Yamada K, Isaka M, Minami M, Ohta M. Detection of invasive protein profile of Streptococcus pyogenes M1 isolates from pharyngitis patients. *APMIS*. 2010 Mar;118(3):167-78.
- 15) Minami M, Wakimoto Y, Matsumoto M, Matsui H, Kubota Y, Okada A, Isaka M, Tatsuno I, Tanaka Y, Hasegawa T. Characterization of Streptococcus pyogenes Isolated from Balanoposthitis Patients Presumably Transmitted by Penile-Oral Sexual Intercourse. *Curr Microbiol*. 2010 Jan 28.
- 16) Hasegawa T, Minami M, Okamoto A, Tatsuno I, Isaka M, Ohta M. Characterization of a virulence-associated and cell-wall-located DNase of Streptococcus pyogenes. *Microbiology*. 2010 Jan;156(Pt 1):184-90. Epub 2009 Oct 22.
- 17) Minami M, Kamimura T, Isaka M, Tatsuno I, Ohta M, Hasegawa T. Clindamycin-induced CovS-mediated

regulation of the production of virulent exoproteins streptolysin O, NAD glycohydrolase, and streptokinase in Streptococcus pyogenes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jan;54(1):98-102. Epub 2009 Oct 5.

18) Minami M, Ohmori D, Tatsuno I, Isaka M, Kawamura Y, Ohta M, Hasegawa T. The streptococcal inhibitor of complement (SIC) protects Streptococcus pyogenes from bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) from Streptococcus salivarius. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 ;298(1):67-73.

19) Suzuki H, Kidokoro M, Fofana IB, Ohashi T, Okamura T, Matsuo K, Yamamoto N, Shida H. Immunogenicity of newly constructed attenuated vaccinia strain LC16m8Delta that expresses SIV Gag protein. *Vaccine* 11: 966-971 (2009)

20) Honda M, Wang R, Kong W-P, Kanekiyo M, Akahata W, Xu L, Matsuo K, Natarajan K, Robinson H, Asher TE, Price DA, Douek DC, Margulies DH, Nabel GJ. Different vaccine vectors delivering the same antigen elicit CD8+ T cell responses with distinct clonotype and epitope specificity. *J. Immunol*. 183: 2425-34 (2009)

21) Promkhatkaew D, Matsuo K, Pinyosukhee N, Thongdejaroen W, Leang-Aramgul P, Sawanpanyalert P, Warachit P. Prime-boost vaccination using recombinant *Mycobacterium bovis* BCG and recombinant vaccinia virus DIs harboring HIV-1 CRF01\_AE gag in mice: influence of immunization routes. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 40: 273-81 (2009)

22) M. Okazaki, K. Ohkusu, H. Hata, H. Ohnishi, K. Sugawara, C. Kawamura, N. Fujiwara, S. Matsumoto, Y. Nishiuchi, K. Toyoda, H. Saito, S. Yonetani, Y. Fukugawa, M. Yamamoto, H. Wada, A. Sejimo, A. Ebina, H. Goto, T. Ezaki, and T. Watanabe. 2009. *Mycobacterium kyorinense* sp. nov., a novel slowly growing Mycobacterium sp. related to *Mycobacterium celatum* isolated from human clinical specimens. *IJSEM*. 59:1336-1341.

23) Y. Kawamura, J. Tomida, Y. Morita, T. Naka, S. Mizuno, and N. Fujiwara. 2009 "Lysobacter enzymogenes subsp. cookii" Christensen 1978 should be recognized as an independent species *Lysobacter cookii* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett*. 298:118-23.

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

##### (1) 特許取得

1) 米国特許. Kitagawa, H., Iho, S., Yamamoto, S., Matsuki, T. Immunostimulatory oligonucleotide that induces interferon alpha. 2009/10/6(登録許可)  
国際公開番号 W02005/083076A1(USA).

##### 2) 特許取得: 瀧井猛将

1. 「抗結核化合物、及びその利用」  
出願番号: 特願 2009-037185
2. 「抗結核薬及びその用途」  
出願番号: 特願 2009-021026

## クロイツト・フェルト・ヤコブ病 (CJD) 特異的な、簡便かつ迅速髄液検査法の開発

所 属 国立感染症研究所 感染病理部  
研究者 飛梅 実  
研究期間 平成19年4月～平成22年3月

本研究では、CJD 等のプリオン病の早期診断を目的として、疾患特異的な髄液中マーカー検出法の開発を目標とする。プリオン病の生前診断は、臨床所見から判断されるが、他の疾患との共通症状も多く、客観的診断材料を提供する検査法が存在しない。本研究では、プリオン病特異的に脳脊髄液中に放出される疾患マーカーを高精度に検出する系を開発し、プリオン病の早期診断及び他疾患との鑑別材料を臨床に提供することを目指す。

### 分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 感染病理部、  
佐多 徹太郎、高橋 秀宗、
- (2) 北海道大学大学院医学研究科・大場 雄介
- (3) 熊本大学大学院医薬学研究科・森岡 弘志
- (4) 岸本医科学研究所 ・伊藤 禎司

### A. 研究目的

本研究で申請者らは、CJD に代表されるヒトプリオン病を早期にかつ特異的に診断しうる検査法を開発する。

プリオン病の一つであるクロイツト・フェルト・ヤコブ病 (CJD) は、年間 100 万人に 1 人の発症率の疾患であり、治療法は存在しない致死性疾患である。本邦では毎年 120 人程度が報告されている。臨床症状は、他の神経症状等を伴う疾患と重複するものが多い。また、CJD の確定診断は脳組織からのプリオン蛋白質の検出により下されるため、生前の確定診断は困難である。CJD 発症の原因となるプリオン蛋白質は伝達性 (感染性) で、不活化が難しく手術機器等を介した水平伝播が懸念される。食人に起因する kuru 病、狂牛病 (BSE) に由来するバリエーション CJD (vCJD) や硬膜移植における医原性 CJD (iCJD) の解析からプリオン暴露後、臨床症状を呈するまで長期の潜

伏期が存在することが報告されている。実際に海外では、狂牛病 (BSE) に由来するバリエーション CJD (vCJD) 罹患者からの輸血によりプリオン病が伝播した例が報告されている。臓器移植技術が飛躍的に向上した現在、本邦でもこのようなリスクは存在し、簡便、迅速かつ特異的なプリオン病の早期確定診断系の確立は急務である。

プリオン蛋白質は中枢神経系の神経細胞の変性・脱落を誘導することが知られている。この神経細胞崩壊に際し、患者髄液中に障害された神経細胞由来と考えられる 14-3-3  $\gamma$  蛋白質が検出される。申請者らは現在、国内の病院からの依頼に答え、髄液中の 14-3-3  $\gamma$  蛋白質濃度測定を行っており、結果は判断材料の一つとして用いられている。しかしながら、検出系は手技等が煩雑で濃度測定には不向きなウエスタンブロット法であり、検出できる施設は国内では限られている。本研究で申請者らは、髄液中の CJD 特異的な 14-3-3 蛋白質濃度を簡便、迅速かつ特異的に検出できる系の開発を行うと同時に、他疾患との鑑別マーカーの検索を行い、臨床への有効な判断材料を提供できる系の開発を行う。

### B. 研究方法

- ① エライザ法を用いた 14-3-3 タンパク質検出

## 系の開発

①-1 GST 融合 14-3-3・タンパク質を標準試料とした髄液中 14-3-3・タンパク質濃度測定系確立

髄液中に放出された 14-3-3 タンパク質の濃度を算出するため、標準試料として大腸菌発現系を用いた GST 融合 14-3-3・タンパク質を精製した。ヒト 14-3-3・タンパク質 cDNA を PCR 法にて増幅し pGEX ベクターに組み込み、GST 融合 14-3-3・タンパク質発現プラスミドを構築した。作製したプラスミドを大腸菌 DH5a 株に導入し、アンピシリンによる薬剤選択後、IPTG を用いたタンパク質発現誘導を行った。IPTG による発現誘導 12 時間後に、大腸菌を遠心法にて回収した。回収された大腸菌は 1%Tryton 含有細胞溶解液で溶解後、GST に親和性の高いグルタチオンセファロースカラムを用いて GST 融合 14-3-3・タンパク質を精製した。SDS-page および抗 14-3-3g タンパク質特異的マウスモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法を用いて、GST 融合 14-3-3g タンパク質の精製度等の確認を行った。

①-2 His 融合 14-3-3 タンパク質発現系の構築

各種抗体との反応性、ウエスタンブロット法を用いた髄液中 14-3-3g 濃度測定の精度向上のため、哺乳動物細胞発現 His 融合 14-3-3g タンパク質発現系の構築を行った。ヒト 14-3-3g タンパク質 cDNA を His 融合タンパク質発現ベクター p c DNA HisMax に導入した。構築した発現ベクターをヒト腎臓由来細胞株 293T 細胞に導入した。導入 48 時間後に細胞を回収し、1%Tryton 含有細胞溶解液で溶解後、His に親和性の高いニッケルカラムを用いて His 融合 14-3-3・タンパク質を精製した。

①-3 14-3-3 タンパク質特異的抗体の選定

14-3-3 タンパク質には 7 種のアイソフォームが存在することが報告されている。これらのうち神経細胞に多く含まれるアイソフォームが・および・である。また、CJD 患者での病態の進行に伴い上昇が報告されている 14-3-3 タンパク質も・および・であることが報告されている。髄液中に含まれるこれらアイソフォームを高感度かつ特異的に検出できる抗体の選別を行った。標的として His 融合 14-3-3g および b アイソフォームを標的としたウエスタンブロット法を用いて、抗体の特異性および感度について検討した。SDS-Page には、12%アクリルアミド NuPage gel (invitrogen 社) を用い、50ug/lane および 5ug/lane の精製 14-3-3

タンパク質を泳導したのち、PVDF メンブレンに転写した。5%スキムミルク含有 0.1%Tween20 PBS 溶液で室温 30 分間ブロッキングを行った。抗 14-3-3 $\gamma$  及び  $\beta$  抗体は最終濃度 1ug/ml の濃度になるよう 5%スキムミルク含有 0.1%Tween20 PBS 溶液で希釈し、4°C で 12 時間反応させた。0.1%Tween20 PBS 溶液で洗浄後、Dako 社の HRP 標識抗マウス抗体または HRP 標識抗ウサギ抗体を室温で 1 時間反応させた。0.1%Tween20 PBS 溶液で洗浄後、ECL 発光システムを用いて発光させ、フジフィルム社の LAS3000 システムを用いて検出した。

①-4 サンドイッチエライザを用いた 14-3-3 タンパク質検出法の作製

エライザ法としては 96well マイクロプレートを用いる 2 抗体サンドイッチ法にて行った。マイクロプレートへの固相化は物理吸着法、酵素標識にはペルオキシダーゼを用いた。抗体は購入可能なモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体 (ウサギ) としエピトープ領域が異なる 2 種の組み合わせにてサンドイッチ法の検討を行った。測定サンプルは、国立感染症研究所にて調製されたリコンビナント 14-3-3 $\gamma$  蛋白及び 14-3-3 $\beta$  蛋白を用いて感度と特異性の確認を行った。反応は固相抗体と測定サンプルの第一反応と洗浄後の酵素標識抗体の第二反応に分けた 2 ステップ法にて実施し、反応時間を十分かけて測定した。検出はペルオキシダーゼの基質として TMB を発色剤として用い、硫酸反応停止後の波長 450nm の吸光度を測定して比較した。目標感度として、14-3-3 $\gamma$  については現在ウエスタンブロット法を用いた髄液検査のカットオフ値である 25ng/ml 以下が必要であり、下限濃度数 ng/ml を目標にアッセイの確認を行った。

①-5 14-3-3g タンパク質特異的に結合するペプチド選定

14-3-3 タンパク質は細胞中で豊富に含まれる細胞内シグナル伝達分子である。細胞外からの種々の刺激を細胞内へ伝える仲介の機能を果たしていると考えられる。細胞内シグナル伝達分子の一つである Raf-1 はリン酸化特異的に 14-3-3 タンパク質と結合することが報告されており、この 14-3-3 タンパク質に対する結合配列を合成し、14-3-3 タンパク質を検出できるか否かについて検討した。Raf-1 に存在する 14-3-3 タンパク質結合配列を合成し、ファーウエスタンブロット法を用いて検出した。Raf-1 はリン酸化特異的に 14-3-3 に結合することから、リン酸化フォームお



よび非リン酸フォームのペプチドを合成し、個々の反応性について検討した。

#### ①-6 エライザ法による 14-3-3・タンパク質検出法の作製

現状では髄液中の 14-3-3g タンパク質濃度はウエスタンブロット法を用いて行っている。ウエスタンブロット法は検出感度および特異性に優れるが、簡便かつ迅速な方法ではない。この問題に対し、エライザ法による髄液中 14-3-3・検出系作製を試みた。通常の抗原検出エライザではマイクロプレート上に抗原捕捉様抗体を固相化させ検体中に含まれる抗原を捕捉する。捕捉された抗原に対する特異的な抗体をさらに添加し、抗原を検出するサンドイッチエライザが一般的である。しかしながら、14-3-3 タンパク質は 7 種のアイソフォームを有し、各アイソフォーム特異的な抗体の作製が難しいため、マイクロプレート上に固相化する抗体に抗 14-3-3・マウスモノクローナル抗体を用い、検出用抗体の代用として 14-3-3g 結合ペプチドを用いた。

#### ② 新規 14-3-3 濃度測定系の開発

##### ②-1 新規 14-3-3 検出法の検討

プリオン感染成立と共作用する生体側分子の動態について解析するため、分子標的治療薬イマチニブが承認された疾患である、慢性骨髄性白血病 (Chronic myelocytic leukemia, CML) をモデルとして、患者腫瘍細胞に対するイマチニブの効果を評価する分子イメージングシステムを構築した。薬剤効果の判定には FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) の系を用いた。FRET モニター分子の発現ベクターは N 末から YFP の変異体 Venus、ヒト CrkL、ECFP の順にタンデムに並んだキメラタンパク質を発現するように、遺伝子工学的手法を用いて作製した。

##### ②-2 FRET を用いた 14-3-3 検出

髄液中 14-3-3 を FRET 法を用いて検出するため、蛍光分子 Venus へ 14-3-3 結合配列を付加した分子を作成した。また抗 14-3-3 抗体及び抗マウス IgG AlexaFluor594 を準備し用いた。

#### ③新規 14-3-3 抗体の作成

エライザの感度・特異性向上のため、更なる 14-3-3 アイソフォーム特異的な抗体を作成する。14-3-3 タンパク質は分子量約 30kDa のサブユニットからなる二量体タンパク質で、そのサブユニッ

トは、いずれのアイソフォームにおいても、9 個の  $\alpha$ -ヘリックスとそれらを繋ぐ短いリンカーペプチドから構成されている。14-3-3 タンパク質の立体構造は報告されており、その N 末端側から 4 個の  $\alpha$ -ヘリックス ( $\alpha 1 \sim \alpha 4$ ) は、二量体形成に関与していることが知られている。14-3-3 タンパク質に対して選択的結合性を示し、さらには、 $\beta$  および  $\gamma$  の 2 つのアイソフォームを識別する抗体を作製するために、14-3-3 タンパク質の立体構造情報を基に抗体作製に用いる抗原タンパク質 (または、ペプチド) の開発を計画した。

#### ④新規プリオン感染マーカーの検索

マウス神経芽細胞腫由来細胞株である N2a 細胞は、外来 PrPsc の感染成立および増幅が可能な細胞株として知られている。この N2a 細胞のサブクローンである N2a-1 および N2a-5 細胞は、PrPsc に対し非感受性または高感受性細胞株として北大・堀内教授らのグループにより樹立された。本研究では、これらの細胞株を Fluorescence 2D Difference Gel Electrophoresis (2D DIGE) (ファルマシア社) system を用いた比較 2 次元泳動法により展開し、プリオン感染に関与する宿主因子の検索を行った。等量の N2a-1 および N2a-5 細胞溶解液を作成し、それぞれ蛍光色素 Cy2 および Cy3 で標識した。またコントロールとして半量の N2a-1 と N2a-5 細胞溶解液を混合し、Cy5 により標識した。これら標識された細胞溶解液を、同じ 1 次元および 2 次元電気泳導ゲルにより展開した。また、Cy2 および Cy3 で標識される細胞溶解液を変え、同様にゲル上に展開した。泳導後のゲルをファルマシア社製 Typhoon のシステムにより、蛍光輝度を蛋白量として解析し、N2a-1 と N2a-5 細胞で発現に有意の差のあるタンパク質を検索した。

#### (倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は動物愛護倫理規程に則り、申請・承認を受けた方法で実施した。即ち、必要最小限のマウス数を使用し、採血時にはマウスに対して麻酔処置を施して負担を最大限軽減し、実験終了後は安楽死の処置を行った。

①-1 GST 融合 14-3-3・タンパク質を標準試料とした髄液中 14-3-3・タンパク質濃度測定系確立

大腸菌内での GST 融合ヒト 14-3-3 g タンパク質発現は可能であった。精製タンパク質の SDS-Page 後の CBB 染色および 14-3-3g 特異的抗体を用いたウエスタンブロットによる解析から、目的の分子量を有し、抗体との反応性も有していることを確認した。精製 14-3-3g タンパク質を段階希釈してのウエスタンブロットでのでは、濃度計測に必要な標準曲線作製に十分耐えうる直線性を有していた。また臨床検体の髄液中に含まれる 14-3-3g 濃度も精製 14-3-3g で作製する標準曲線のレンジ内であり、濃度測定に供する精製標準品として使用可能であることが明らかとなった。

①-2 His 融合 14-3-3 タンパク質発現系の構築ヒト細胞内での His 融合ヒト 14-3-3 タンパク質発現は可能であった。ヒト 14-3-3g および bcDNA を精製タンパク質の SDS-Page 後の CBB 染色および 14-3-3g 特異的抗体を用いたウエスタンブロットによる解析から、目的の分子量を有し、抗体との反応性も有していることを確認した。精製 14-3-3g タンパク質を段階希釈してのウエスタンブロットでのでは、濃度計測に必要な標準曲線作製に十分耐えうる直線性を有していた。

①-3 14-3-3 タンパク質特異的抗体の選定市販抗体の 14-3-3 $\gamma$  及び  $\beta$  タンパク質に対する特異性を検討した結果、 $\gamma$  アイソフォームに対しては 1 種類の特異的な抗体のが存在した。しかしながら、 $\beta$  アイソフォームに対する特異的な抗体は存在せず、 $\gamma$  および  $\beta$  アイソフォームの両者に反応性を有した。

①-4 サンドイッチエライザを用いた 14-3-3 タンパク質検出法の作製

用いた抗体によりアッセイ系を構築した結果では、何れの抗体の組み合わせにおいて目標とする感度は得られず、カットオフ値の検出も難しい結果となった。14-3-3 $\gamma$  のエライザ法検討において、 $\gamma$  以外のアイソフォームを認識しない様に  $\gamma$  特異的なペプチド配列領域を合成し免疫して調製されたウサギポリクローナル抗体とアイソフォーム選択性の低い領域のペプチドを免疫して調製されたウサギポリクローナル抗体のサンドイッチ系は 14-3-3 $\gamma$  蛋白を完全特異的に検出することはできず、検出感度も 100ng/ml 程度と目標に達せず、ブ

ランク発色が高めになる傾向が確認された。

14-3-3 $\beta$  については認識領域が異なるモノクローナル抗体にてサンドイッチ系を検討したが、特異性はさらに低い結果となった。

①-5 14-3-3・タンパク質特異的に結合するペプチド選定

N 末端にビオチンを標識した Raf-1 の 14-3-3 タンパク質結合配列ペプチドを合成した。Raf-1 はリン酸化特異的に 14-3-3 タンパク質に結合することから、同時にリン酸化フォームのペプチドを作成した。配列を以下に示す。

非リン酸化ペプチド：Biotin-GGQRSTSTP

リン酸化ペプチド：Biotin-GGQRSTpSTP

これらペプチドの 14-3-3g タンパク質への反応性を調べるため、精製 GST 融合 14-3-3g タンパク質を SDS-Page で展開し、PVDF メンブランに転写した。BSA 含有 0.1%Tryton PBS で 0.5ug/ml の濃度に希釈したペプチドを反応させた。結合したペプチドの検出には HRP 標識ストレプトアビジンを用い、ECL 発色法にて可視化した。

リン酸化ペプチドおよび非リン酸化ペプチドともに GST 融合 14-3-3g および His 融合 14-3-3g タンパク質を認識した。しかし、その反応性はリン酸化ペプチドの方が強く、①-3 で用いた抗 14-3-3g マウスモノクローナル抗体と同等以上の反応性を有していた。

①-6 エライザ法による 14-3-3・タンパク質検出法の作製

上述の通り 14-3-3 タンパク質には 7 種のアイソフォームが存在する。14-3-3g タンパク質を特異的に検出するため、マイクロプレート上に図 1 で用いた抗 14-3-3g マウスモノクローナル抗体を物理的吸着法を用いて固相化した。1ug/ml に希釈した抗体を 96well プレートの 1well あたり 100ul 添加し、4℃で 12 時間吸着させた。洗浄およびブロッキング操作の後、His 融合 14-3-3g タンパク質を 25ng/ml および 100ng/ml の濃度で 100ul 添加した。37℃で 2 時間反応させた後、洗浄を行った。検出には Raf-1 タンパク質の 14-3-3g 結合配列を有したペプチドを用いた。リン酸化ペプチドを用いて検出した場合、添加した His14-3-3g タンパク質濃度依存的に吸光度の上昇を認めたが、非リン酸化ペプチドを用いた場合では、吸光度の値は低く、バックグラウンドレベルであった。

またリン酸化ペプチドを用いた検出法では、CJD 患者髄液に含まれる 14-3-3g タンパク質を検出することが可能であった。

## ② 新規 14-3-3 濃度測定系の開発

### ②-1 新規 14-3-3 検出法の検討

BCR-ABL のチロシンキナーゼ活性のモニター分子を作製した。このために、CML 細胞内における BCR-ABL の第一の基質であり、そのリン酸化状態と CML の病勢とに関連が報告されている CrkL に着目した。CrkL は SH2 と 2 つの SH3 からなるアダプター分子であり、207 番目のチロシンが BCR-ABL によってリン酸化されると、自身の SH2 ドメインがリン酸化チロシンと分子内結合することで構造変化が生じると考えられている。この CrkL の両端に YFP と CFP を付加することで、リン酸化依存的に CFP と YFP が近接し、FRET が生じることが期待される。しかし、予想に反し、CrkL の全長に蛍光タンパク質を付加しただけ (Pickles-1.0) では、BCR-ABL 依存的な FRET 効率の上昇はほとんど認められなかった。一方、CrkL の C 末側を削った Pickles-2.0 においては、BCR-ABL の発現依存的に FRET 効率が 30% 上昇した。次に、イマチニブの効果について Pickles を用いて評価した。Pickles と BCR-ABL を発現する 293F 細胞に、様々な濃度のイマチニブ処理を行い、FRET 効率を評価したところ、予想通り、容量依存的に FRET 効率の減少が認められた。特にその減少は  $0.01 \mu\text{M}$  で有意に減少していた。一方、イムノブロット法で Pickles と内在性の CrkL のリン酸化状態を検討すると、有意な減少は少なくとも  $1 \mu\text{M}$  以上の濃度域でのみ認められた (図 c)。そこで、免疫ブロット法と FRET 分析における、Pickles のダイナミックレンジを計算して、比較ところ、FRET の方が、イムノブロット法に比べて、ダイナミックレンジが広いことが明らかとなった。したがって、我々が今回開発した手法は、イマチニブの薬効評価に関して、より高い感度とより広い測定域を有する手法であることが明らかとなった。

### ②-2 FRET を用いた 14-3-3 検出

14-3-3 $\gamma$  蛋白質はリン酸化セリンを含む特徴的なペプチド配列と特異的に結合することが知られている。このペプチドと Venus (GFP 変異体) の融合蛋白質を作製し、14-3-3 $\gamma$  蛋白質に対するマウスモノクローナル抗体とその二次抗体の Fc 領域を AlexaFluor594 で修飾した抗体を用いれば、14-3-3 $\gamma$  とこれらの蛋白質混合液中では、14-3-3 $\gamma$  非存在下で観察されない Venus 励起光による AlexaFluor594 蛍光が観察される。

Venus probe-1、抗 14-3-3 $\gamma$  抗体及び AF594 化抗マウス IgG 抗体を用いて、14-3-3 $\beta$  もしくは 14-3-3 $\gamma$  存在下において Venus 励起光 (480nm)

による FRET が生じるかどうかを検討したが、 $100 \text{ pg}/\mu\text{L}$  14-3-3 存在下において、期待された FRET は生じなかった。一方、Venus probe-2 を用いた場合には、期待通り FRET が観察された。Venus probe-2 を用いた場合の感受性は 14-3-3 $\beta$  に比べて 14-3-3 $\gamma$  の方が高かった。さらに、実際の髄液サンプルの総蛋白質濃度 ( $150 \sim 450 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ) 下においても特異性があるかどうかを BSA を用いて検討した。その結果  $200 \text{ pg}/\mu\text{L}$  BSA 溶液中においても同様に FRET は観察された。最後に、本 FRET 法による 14-3-3 $\gamma$  検出濃度限界を検討した。現在までのところ、 $10 \text{ pg}/\mu\text{L}$  14-3-3 $\gamma$  について測定可能であろう結果が得られている。

### ③新規 14-3-3 抗体の作成

14-3-3 $\beta$  と  $\gamma$  タンパク質を識別する抗体作製のためのエピトープとなり得る部位を探索したところ (全体構造を重ねあわせたものを Fig. 1 (a) に示す)、 $\alpha$ -ヘリックスを繋ぐループ構造が僅かながら異なる 2 カ所 (region 1, および, region 2;) に注目した。これらの領域をヒト PCNA (増殖細胞核抗原; Proliferating Cell Nuclear Antigen) で抗体ができやすい部位であることが知られている IDC loop (Interdomain connecting loop) に導入したタンパク質を調製し、これらをマウスに免疫することにより 14-3-3 $\beta$  および 14-3-3 $\gamma$  識別抗体を作製することを計画しヒト PCNA 発現ベクター pT7PCNA の IDC loop 領域へ 14-3-3 配列を挿入した。上記により作成し、精製したタンパク質をマウスに免疫した。

### ④新規プリオン感染マーカーの検索

2D DIGE 解析により、両細胞間で発現に差異の存在した分子のゲル上のスポットを回収し、ゲルからタンパク質を精製・回収した。回収したタンパク質をトリプシン処理後、LC/MS 解析により含まれるアミノ酸配列から分子の同定を行った結果、10 の候補分子を同定した。

### D. 考察

CJD 患者髄液中の 14-3-3 蛋白濃度は、 $25 \text{ ng}/\mu\text{l}$  以上であり、我々の開発した系より高い感度が必要とされる。さらに、個々の 14-3-3 アイソフォームを認識できる高い特異性が要求される。そのため、新規の抗 14-3-3 抗体作出は必須であると考えられた。

### E. 結論

エライザ法および FRET 法を用いた新規の 14-3-3 濃度測定系を開発した。今後、感度・特異度の改善及び、患者髄液を用いた検討を行う。結果については現在英文雑誌に投稿中である。

プリオン感染成立に関与すると考えられる宿主因子を同定した。感染時の作用機序を解析することにより、新規マーカー候補分子の同定に至ると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

該当なし

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当事項なし。

### 2. 実用新案登録

該当事項なし。

### 3. その他

該当事項なし。

## クロイツト・フェルト・ヤコブ病 (CJD) 特異的な、簡便かつ迅速髄液検査法の開発

所 属 国立感染症研究所 感染病理部  
研究者 飛梅 実

本研究では、CJD 等のプリオン病の早期診断を目的として、疾患特異的な髄液中マーカー検出法の開発を目標とする。プリオン病の生前診断は、臨床所見から判断されるが、他の疾患との共通症状も多く、客観的診断材料を提供する検査法が存在しない。本研究では、プリオン病特異的に脳脊髄液中に放出される疾患マーカーを高精度に検出する系を開発し、プリオン病の早期診断及び他疾患との鑑別材料を臨床に提供することを目指す。

### 分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 感染病理部、  
佐多 徹太郎、高橋 秀宗、
- (2) 北海道大学大学院医学研究科・大場 雄介
- (3) 熊本大学大学院医薬学研究科・森岡 弘志
- (4) 岸本医科学研究所 ・伊藤 禎司

### A. 研究目的

本研究で申請者らは、CJD に代表されるヒトプリオン病を早期にかつ特異的に診断しうる検査法を開発する。

プリオン病の一つであるクロイツト・フェルト・ヤコブ病 (CJD) は、年間 100 万人に 1 人の発症率の疾患であり、治療法は存在しない致死性疾患である。本邦では毎年 120 人程度が報告されている。臨床症状は、他の神経症状等を伴う疾患と重複するものが多い。また、CJD の確定診断は脳組織からのプリオン蛋白質の検出により下されるため、生前の確定診断は困難である。CJD 発症の原因となるプリオン蛋白質は伝達性 (感染性) で、不活化が難しく手術機器等を介した水平伝播が懸念される。食人に起因する kuru 病、狂牛病 (BSE) に由来するバリエーション CJD (vCJD) や硬膜移植における医原性 CJD (iCJD) の解析からプリオン暴露後、臨床症状を呈するまで長期の潜

伏期が存在することが報告されている。実際に海外では、狂牛病 (BSE) に由来するバリエーション CJD (vCJD) 罹患患者からの輸血によりプリオン病が伝播した例が報告されている。臓器移植技術が飛躍的に向上した現在、本邦でもこのようなリスクは存在し、簡便、迅速かつ特異的なプリオン病の早期確定診断系の確立は急務である。

プリオン蛋白質は中枢神経系の神経細胞の変性・脱落を誘導することが知られている。この神経細胞崩壊に際し、患者髄液中に障害された神経細胞由来と考えられる 14-3-3  $\gamma$  蛋白質が検出される。申請者らは現在、国内の病院からの依頼に答え、髄液中の 14-3-3  $\gamma$  蛋白質濃度測定を行っており、結果は判断材料の一つとして用いられている。しかしながら、検出系は手技等が煩雑で濃度測定には不向きなウエスタンブロット法であり、検出できる施設は国内では限られている。本研究で申請者らは、髄液中の CJD 特異的な 14-3-3 蛋白質濃度を簡便、迅速かつ特異的に検出できる系の開発を行うと同時に、他疾患との鑑別マーカーの検索を行い、臨床への有効な判断材料を提供できる系の開発を行う。

### B. 研究方法

- ① エライザ法を用いた 14-3-3 タンパク質検出系の開発

免疫抗原として、熊本大学の森岡らにより調製

された PCNA 蛋白のヒンジ部分に新たに選定した 14-3-3 蛋白の  $\gamma$  特異的なペプチド配列を組み込んだリコンビナント抗原を使用し、マウスへ免疫した。免疫は各抗原 100  $\mu$ g/回・匹を TiterMaxGold をアジュバンドとして用いて行い、各マウス 1 週間間隔で 4 回ずつ行った。抗体産生の確認は、リコンビナント野生型 PCNA、リコンビナント 14-3-3  $\gamma$  (106-116) 組み込み PCNA (免疫抗原)、そして国立感染症研究所にて調製されたホールのリコンビナント 14-3-3  $\beta$ 、リコンビナント 14-3-3  $\gamma$  を用いてエライサ法にて行った。

## ②新規 14-3-3 抗体の作成

14-3-3 タンパク質は分子量約 30kDa のサブユニットからなる二量体タンパク質で、そのサブユニットは、いずれのアイソフォームにおいても、9 個の  $\alpha$ -ヘリックスとそれらを繋ぐ短いリンカーペプチドから構成されている。14-3-3 タンパク質の立体構造は報告されており、その N 末端側から 4 個の  $\alpha$ -ヘリックス ( $\alpha 1$ - $\alpha 4$ ) は、二量体形成に関与していることが知られている。14-3-3 タンパク質に対して選択的結合性を示し、さらには、 $\beta$  および  $\gamma$  の 2 つのアイソフォームを識別するモノクローナル抗体を作製するために、14-3-3 タンパク質の X 線結晶構造解析結果より得られた構造情報を基に、目的の抗体作製に用いる抗原タンパク質 (または、ペプチド) の開発を行った。

## ③新規 14-3-3 濃度測定系の開発

### 発現ベクターの作製

#### cDNA および発現ベクターの入手先

発現ベクターの骨格には pGEX-4T3 及び pGEX-6T1 ベクターを用いた (GE ヘルスケア・ジャパン)。EYFP の変異体である Venus の cDNA は宮脇博士 (理化学研究所) から譲渡された。ヒト 14-3-3  $\beta$ 、14-3-3  $\gamma$  の cDNA は研究代表者 (飛梅博士) より分与された。

### pGEX-4T3-Venus probe の作製

Venus の終止コドンに欠失した cDNA の 5' および 3' 末端にそれぞれ制限酵素 EcoRI と XhoI の認識配列が導入されるように設計・合成したプライマー DNA を用いて PCR 反応を行い、増幅 DNA 断片を調製した。また、14-3-3 結合配列のオリゴ DNA は、5' および 3' 末端にそれぞれ制限酵素 XhoI と NotI の認識配列が導入されるように設計し、北海道システムサイエンスに合成を依頼した。得られた 1 本鎖 DNA は、アニーリング反応を経て、オリゴ DNA

断片に調製した。上記のようにして得た Venus 増幅 DNA 断片とオリゴ DNA 断片を、制限酵素 EcoRI と NotI で開環させた発現ベクター pGEX に組み換えて、pGEX-Venus probe を得た。

pGEX-6T1-14-3-3 $\beta$  及び pGEX-6T1-14-3-3 $\gamma$  の作製 14-3-3  $\beta$  の cDNA の 5' および 3' 末端にそれぞれ制限酵素 EcoRI と NotI の認識配列が導入されるように設計・合成したプライマー DNA を用いて PCR 反応を行い、増幅 DNA 断片を調製した。これにより得た 14-3-3  $\beta$  増幅 DNA 断片を、制限酵素 EcoRI と NotI で開環させた発現ベクター pGEX-6T1 に組み換えて、pGEX-6T1-14-3-3  $\beta$  を得た。pGEX-6T1-14-3-3  $\gamma$  についても上記と同様にして調製した。

### リコンビナント蛋白質の精製

pGEX- pGEX-4T3-Venus probe 導入した大腸菌 BL21 株をアンピシリン含有 LB 培地、37°C で培養し、培地の 600nm における吸光度が 0.4~0.6 を示す程度で、最終濃度 1mM になるように IPTG を添加し、目的蛋白質の発現誘導を行った。2 時間後に大腸菌を回収し、超音波破碎、界面活性剤 (1% Triton-X) 処理によって、蛋白質を分離し、グルタチオンセファロース 4B (GE ヘルスケア・ジャパン) を用いて精製した。最終的に、20mM グルタチオン溶液 (pH 8.0) を用いて溶出を行い、GST-Venus-probe 蛋白質を得た。14-3-3  $\beta$  及び 1-14-3-3  $\gamma$  は、最終的な溶出前に Pre-scission Protease (GE ヘルスケア・ジャパン) を加え、4°C で 2 時間インキュベーションを行った後、上記と同様にグルタチオンによる溶出を行うことで、GST タグを除去した 14-3-3  $\beta$  及び 1-14-3-3  $\gamma$  蛋白質を精製した。精製蛋白質濃度は、micro BCA Protein Assay (Pierce 社) を用いて測定した。

### 抗体

抗 14-3-3  $\gamma$  抗体は、Upstate 社から、抗マウス IgG 抗体-AlexaFluor594 は Invitrogen 社から購入した。GST プルダウンアッセイとウエスタンブロットイングアッセイバッファー (0.05 % NP-40/PBS) に、精製蛋白質 14-3-3  $\beta$  ( $\gamma$ ) 及び GST-Venus probe をそれぞれ 20  $\mu$ g 加え、4°C で 1 時間ゆるやかに混合させた後、10  $\mu$ L のグルタチオンセファロース 4B 溶液を加え、さらに 4°C で 1 時間ゆるやかに混合させた。得られた混合溶液を遠心分離し、沈殿を過剰量 PBS で洗浄した後、50  $\mu$ L の SDS サンプリングバッファーを加え、5 分間煮沸を行った。煮沸後のサンプルを遠心分離

し、得られた上清を定法に従いウエスタンブロットによる解析を行った {Biochem Biophys Res Commun. 2008;368(3):p575-81.}。

#### 蛍光分光法

500  $\mu$ L PBS(pH 7.4)中に 500 ng の精製蛋白質 14-3-3 及び 10  $\mu$ g の GST-Venus probe を加え、4°C 下で 1 時間ゆるやかに混合させた後、5  $\mu$ g の抗マウス IgG 抗体-AlexaFluor594 を加え、さらに 1 時間、4°C にてゆるやかに混合させ、分光光度計 FP-750 (日本分光社)を用いて 480 nm の励起により生じる蛍光のスペクトルを測定した。

#### ④新規プリオン感染マーカーの検索

マウス神経芽細胞腫由来細胞株である N2a 細胞は、外来 PrPsc の感染成立および増幅が可能な細胞株として知られている。この N2a 細胞のサブクローンである N2a-1 および N2a-5 細胞は、PrPsc に対し非感受性または高感受性細胞株として北大・堀内教授らのグループにより樹立された。本研究では、これらの細胞株を Fluorescence 2D Difference Gel Electrophoresis (2D DIGE) (ファルマシア社) system を用いた比較 2 次元泳動法により展開し、プリオン感染に関する宿主因子の検索を行った。等量の N2a-1 および N2a-5 細胞溶解液を作成し、それぞれ蛍光色素 Cy2 および Cy3 で標識した。またコントロールとして半量の N2a-1 と N2a-5 細胞溶解液を混合し、Cy5 により標識した。これら標識された細胞溶解液を、同じ 1 次元および 2 次元電気泳動ゲルにより展開した。また、Cy2 および Cy3 で標識される細胞溶解液を変え、同様にゲル上に展開した。泳動後のゲルをファルマシア社製 Typhoon のシステムにより、蛍光輝度を蛋白量として解析し、N2a-1 と N2a-5 細胞で発現に有意の差のあるタンパク質を検索した。

#### (倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は動物愛護倫理規程に則り、申請・承認を受けた方法で実施した。即ち、必要最小限のマウス数を使用し、採血時にはマウスに対して麻酔処置を施して負担を最大限軽減し、実験終了後は安楽死の処置を行った。

### C. 研究結果

#### ① エライザ法を用いた 14-3-3 タンパク質検出系の開発

免疫したマウスから採取した血清による抗体価の測定では、免疫 4 週間後で 14-3-3  $\gamma$  ペプチド

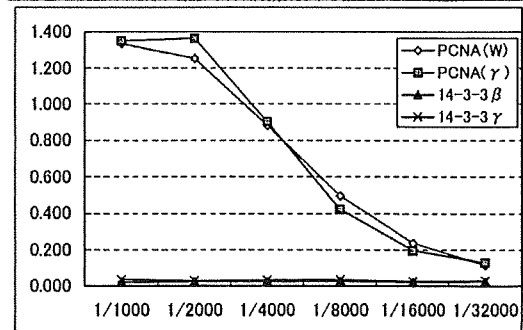
組み込み PCNA を免疫したマウスにおいて免疫抗原に対する抗体の生成が確認された。

14-3-3  $\gamma$  ペプチド組み込み PCNA に対するマウス抗血清に関して、リコンビナント野生型 PCNA、そしてホールのリコンビナント 14-3-3  $\beta$ 、リコンビナント 14-3-3  $\gamma$  に対するそれぞれの反応性を確認したところ、免疫原に最も強い反応性を示すものの野生型 PCNA に対しても強い反応が認められたが、ホールのリコンビナント 14-3-3  $\gamma$  に対しては僅か痕跡程度の反応性しか観察されなかった。

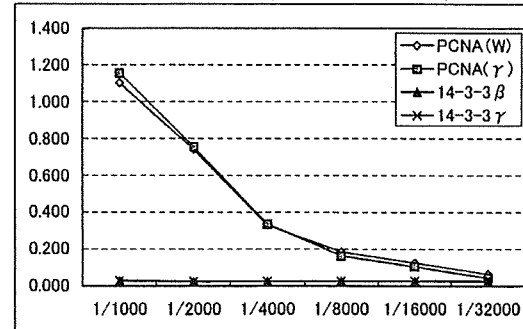
(資料 1)当初 PCNA ヒンジ部分は抗体に認識され易い部位として標的ペプチドの組み込み蛋白として設計されたが、昨年とは別の  $\gamma$  ペプチド領域を組み込んだ免疫結果においても組み込みペプチドに選択的な抗体の誘導は得られず、最終目的とするホールの 14-3-3 蛋白に反応する抗体の生成が確認できなかったため、免疫以降のモノクローナル抗体の調製は断念した。

資料 1  
免疫の結果

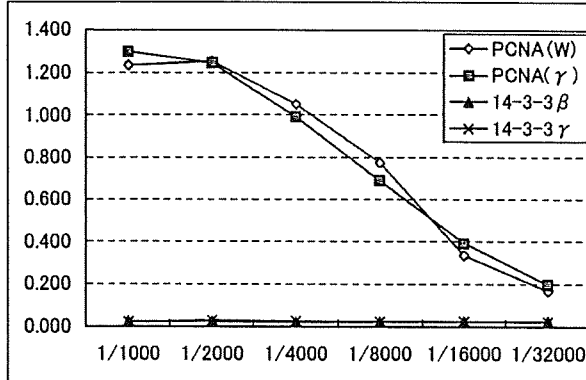
14-3-3: $\gamma$	mouse#1	A450/630nm			
		Dilution	PCNA(W)	PCNA( $\gamma$ )	14-3-3 $\beta$
Day28 (最終免疫)	1/1000	1.335	1.352	0.020	0.035
	1/2000	1.254	1.366	0.023	0.028
	1/4000	0.882	0.902	0.023	0.032
	1/8000	0.495	0.421	0.025	0.034
	1/16000	0.236	0.198	0.022	0.025
	1/32000	0.114	0.128	0.023	0.029



14-3-3: $\gamma$	mouse#2	A450/630nm			
		Dilution	PCNA(W)	PCNA( $\gamma$ )	14-3-3 $\beta$
Day28 (最終免疫)	1/1000	1.104	1.158	0.028	0.031
	1/2000	0.741	0.756	0.022	0.025
	1/4000	0.328	0.335	0.024	0.024
	1/8000	0.183	0.163	0.025	0.026
	1/16000	0.124	0.104	0.024	0.027
	1/32000	0.064	0.044	0.023	0.029

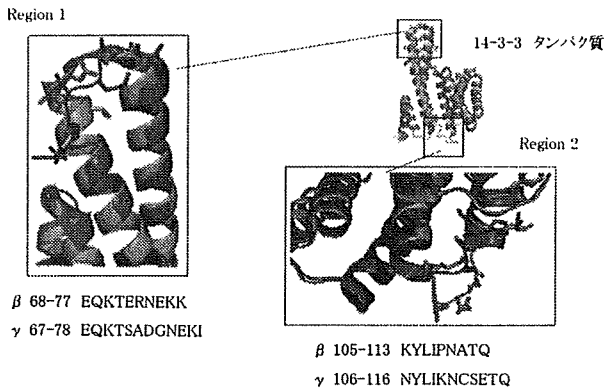


14-3-3: $\gamma$		A450/630nm			
	mouse#3				
	Dilution	PCNA(W)	PCNA( $\gamma$ )	14-3-3 $\beta$	14-3-3 $\gamma$
Day28 (最終免疫)	1/1000	1.233	1.296	0.025	0.022
	1/2000	1.251	1.243	0.024	0.029
	1/4000	1.049	0.989	0.021	0.026
	1/8000	0.773	0.688	0.023	0.024
	1/16000	0.337	0.395	0.024	0.025
	1/32000	0.167	0.198	0.025	0.023



## ②新規 14-3-3 抗体の作成

region 2 を導入した融合タンパク質 (hPCNA /  $\beta$  (105-113), および, hPCNA /  $\gamma$  (106-116)) の調製とマウスへの免疫 (苫小牧臨床検査センター, 伊藤 禎司 博士に依頼), さらには, (2)  $\alpha$ -ヘリックス/ループ/ $\alpha$ -ヘリックス構造を取ることが知られているペプチド (AELAALEAELAALE-GGGGGG-KLXXLKXXLKXKA) ; Matsubara, T. et al., Biochemistry 47, 6745-6751, 2008) のループ部分 (GGGGGG) へ, region 1, および, region 2 の導入を計画した。



region 1, および, region 2 の遺伝子を発現ベクター pGEX-1 $\lambda$ T の MCS (Bam HI / Eco RI) に挿入し, GST との融合タンパク質として発現させた。

↓ Overexpression in *E. coli* system

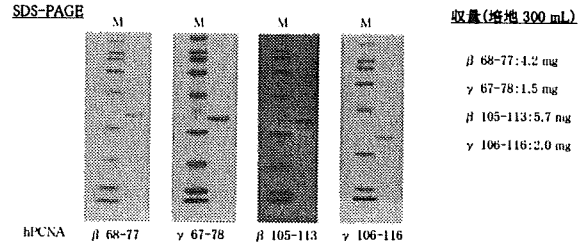
↓ Sonication

↓ Q-sepharose Fast Flow

↓ Gel-filtration (HiLoad 26/60 Superdex 200 pg) ←

↓ Anion-exchange chromatography (MonoQ HR5/5)

2-3 cycles



GST/14-3-3  $\beta$  (68-77)-HLH-peptide

GST/14-3-3  $\gamma$  (67-78)-HLH-peptide

GST/14-3-3  $\beta$  (105-113)-HLH-peptide

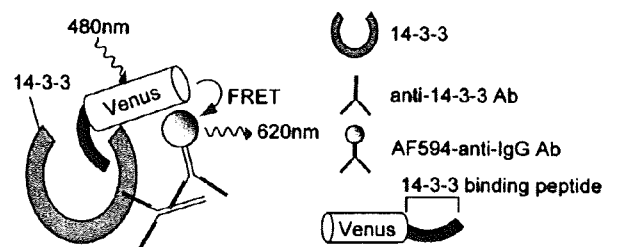
GST/14-3-3  $\gamma$  (106-116)-HLH-peptide

上記 4 種類の融合タンパク質は, それぞれグルタチオンセファロース樹脂を用いたアフィニティクロマトグラフィーによる精製を行っている. 現在, 純度の高い融合タンパク質が得られており, 必要量の融合タンパク質を獲得後, それぞれ Thrombin による切断, 逆相 (C-18) クロマトグラフィーによる精製を行い, マウスへの免疫を予定している。

## ③新規 14-3-3 濃度測定法の開発

FRET を利用した簡便かつ高感度の 14-3-3 検出系モデル

### FRETを利用した14-3-3検出系モデル

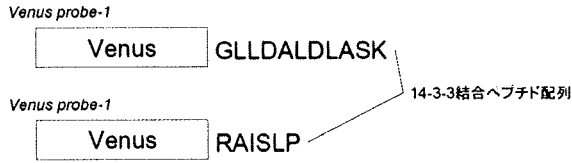


14-3-3 $\gamma$  蛋白質はリン酸化セリンを含む特徴的なペプチド配列と特異的に結合することが知られている. このペプチドと Venus (GFP 変異体) の融合蛋白質を作製し, 14-3-3 $\gamma$  蛋白質に対するマウスモノクローナル抗体とその二次抗体の Fc 領域を AlexaFluor594 で修飾した抗体を用いれば, 14-3-3 $\gamma$  とこれらの蛋白質混合液中では, 14-3-3 $\gamma$  非存在下で観察されない Venus 励起光による AlexaFluor594 蛍光が観察される。

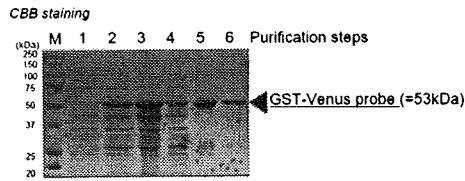


14-3-3 と Probe 分子との結合を示す生化学実験

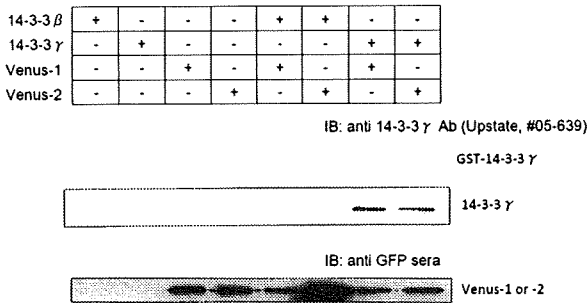
精製した蛋白質を用いて *in vitro* 結合実験 (GST pull down assay) を行った。Venus probe-1 または Venus probe-2 と 14-3-3 $\gamma$  間の結合をウェスタンブロッティング法を用いて検出したところ、抗 14-3-3 $\gamma$  抗体で検出されたバンドは、いずれも Venus probe-1 及び Venus probe-2 存在下においてのみ確認された。



参考文献 Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 ;103(46):pp17237-42.



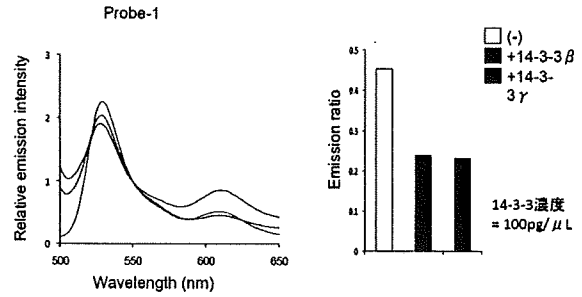
GST pull down assay



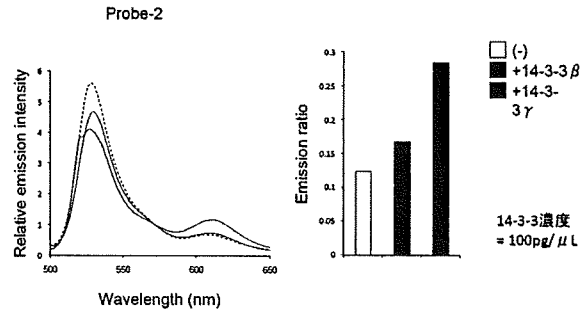
14-3-3 と Probe 分子との FRET 観察

次に、Venus probe-1、抗 14-3-3 $\gamma$  抗体及び AF594 化抗マウス IgG 抗体を用いて、14-3-3 $\beta$  もしくは 14-3-3 $\gamma$  存在下において Venus 励起光 (480nm) による FRET が生じるかどうかを検討したが、100 pg/ $\mu$ L 14-3-3 存在下において、期待された FRET は生じなかった。一方、Venus probe-2 を用いた場合には、期待通り FRET が観察された。Venus probe-2 を用いた場合の感受性は 14-3-3 $\beta$  に比べて 14-3-3 $\gamma$  の方が高かった。さらに、実際の髄液サンプルの総蛋白質濃度 (150~450 pg/ $\mu$ L) 下においても特異性があるかどうかを BSA を用いて検討した。その結果 200 pg/ $\mu$ L BSA 溶液中においても同様に FRET は観察された。最後に、本 FRET 法による 14-3-3 $\gamma$  検出濃度限界を検討した。現在までのところ、10 pg/ $\mu$ L 14-3-3 $\gamma$  について測定可能であろう結果が得られている。

~特異性について~

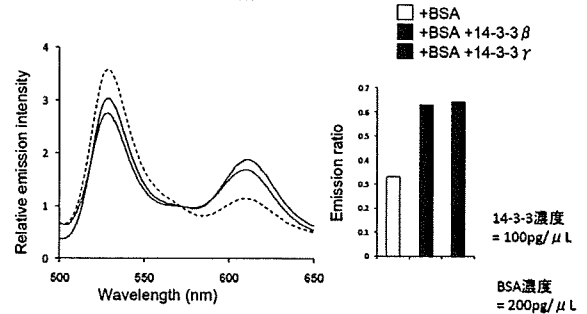


~特異性について~

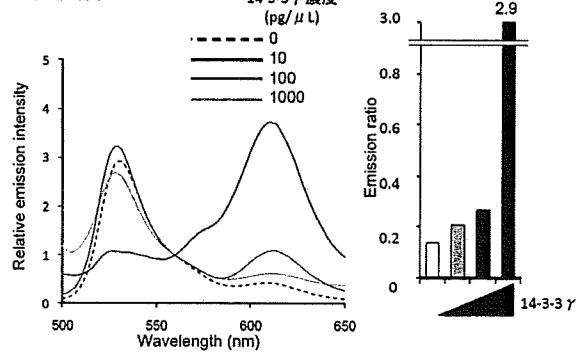


~特異性について~その2

BSA存在下におけるProbe-2の活性



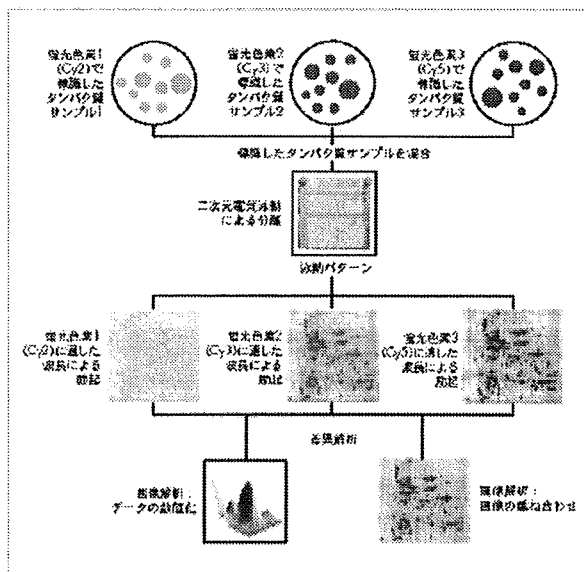
測定限界について



④新規プリオン感染マーカーの検索

た結果を以下に示す。

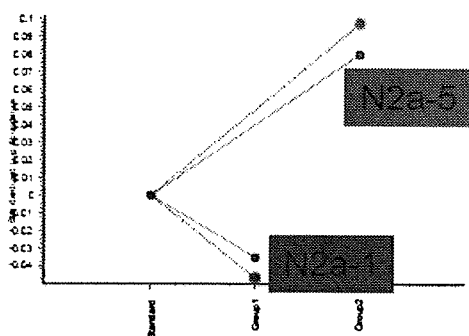
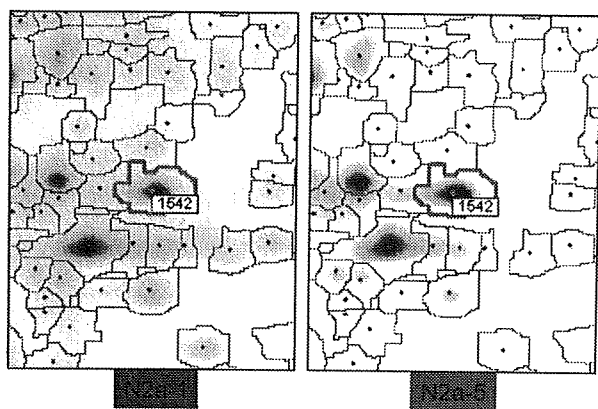
Fluorescence 2D Difference Gel Electrophoresis (2D DIGE) 技術の概要



Penpherin
Secretogogin, precursor
KRAB zinc finger protein
Zinc finger protein 120 isoform 1
Chloride intracellular channel 1
leucine rich repeat containing 8 family, member E
Putative RNA-binding protein 15 (RNA-binding motif protein 15) (One-twenty two protein) isoform 5
tripartite motif-containing 17
PREDICTED similar to Zinc finger protein QZF (Zinc finger protein 200) (Zfp-200) isoform 7
Similar to sorting nexin 13

2D DIGE 解析により、両細胞間で発現に差異の存在した分子のゲル上のスポットを回収し、ゲルからタンパク質を精製・回収した。

発現に差異のあるスポットの比較例



回収したタンパク質をトリプシン処理後、LC/MS 解析により含まれるアミノ酸配列から分子の同定を行う

D. 考察

① エライザ法を用いた 14-3-3 タンパク質検出系の開発

14-3-3 蛋白質に対する特異抗体の調製には殆どその蛋白特異的な領域の合成ペプチドを用いた方法が取られている。今回ペプチドの免疫に当っては、遊離のペプチド状態でキャリアー蛋白に結合して免疫する方法とは別に、抗体が認識し易い蛋白構造をとる PCNA 蛋白のヒンジ部分に遺伝子組み換え的に挿入したペプチドで免疫することにより、遊離状態に比べてより強固に結合する抗体が得られること、さらに抗体の産生がヒンジに優先的に起こることを期待して 14-3-3 ペプチド組み込み型 PCNA 蛋白によるマウスの免疫を行った。しかし、今回ペプチド領域を変え効果を確認したが、結果としては組み込んだペプチドに対する選択的な抗体産生は得られず、得られた抗血清は 14-3-3 蛋白とは反応しなかった。野生型 PCNA の免疫ではヒンジに特異的な抗体の産生がえられていることから、組換えそのものによる構造変化も抗体の認識に影響している可能性がある。蛋白構造が明らかなキャリアー蛋白をペプチド抗体の組換え用に用いる試みは前例を見ないものであり、興味ある試みではあったが、組換え部分に選択的に抗体を誘導する方法として PCNA を用いる方法はペプチドの長さや種類を変えた今回も有効な成果が得られず、特異的抗体を調製できる手段と

はならなかった。

### ③新規 14-3-3 濃度測定法の開発

Venus probe-2 を利用することで、14-3-3 $\beta$  及び 14-3-3 $\gamma$  蛋白質を簡便かつ迅速に検出する新技術が期待される結果を得た。今後の課題を以下にあげる。

#### 感度及び特異性の改善

CJD 患者髄液中の 14-3-3 蛋白濃度は、100 pg/ $\mu$ L 以下であり、我々の開発した系では 10 pg/ $\mu$ L 程度が検出限界であり、より高い感度が必要とされる。さらに、個々の 14-3-3 アイソフォームを認識できる高い特異性が要求される。

14-3-3 結合配列：14-3-3 結合配列は、一般的にはリン酸化セリンを含む配列である。そこで、現在我々が使用しているペプチド配列をリン酸化することで、感度及び特異性が上昇することが期待される。

1. FRET 効率：感度の改善のために、現在使用している FRET ドナー (Venus) 及びアクセプター (AlexaFluor594) を再検討する。GST 融合蛋白質である Venus から GST を分離することで、立体障害が減り FRET 効率が上昇する可能性がある。また、現在使用している AlexaFluor594 は、480nm 励起にて cross excitation が若干観察されてしまい、バックグラウンドが上昇する。そこで、480nm 励起における cross excitation が起こらないようなより長波長側に励起スペクトルを有するアクセプター分子を検討する。
2. 抗 14-3-3 抗体：現在使用している抗 14-3-3 $\gamma$  抗体の Fc 領域に蛍光分子を修飾することで、抗 14-3-3 $\gamma$  抗体-AlexaFluor594 を作製する。この抗体を用いることで、ドナーアクセプター間の距離が縮まり、FRET 効率が上昇することが期待される。さらに、この方法が成功すれば、二次抗体を必要としないので、簡便性が上がる。

#### 実用性の検討

これまでの結果は、すべて *in vitro* における実験結果であり、実際の患者髄液サンプルを用いた場合、はたして本検出系が機能するかどうかを検討する必要がある。

### ④新規プリオン感染マーカーの検索

プリオンに高感受性の N2a-5 細胞で高発現の因子を同定した。しかしながら、個々の機能については不明であり今後の解析が必要である。

#### E. 結論

FRET 法を用いた新規の 14-3-3 濃度測定系を開発した。今後、感度・特異度の改善及び、患者髄液を用いた検討を行う。結果については現在英文雑誌に投稿中である。

プリオン感染成立に関与すると考えられる宿主因子を同定した。感染時の作用機序を解析することにより、新規マーカー候補分子の同定に至ると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

該当なし

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

該当事項なし。

##### 2. 実用新案登録

該当事項なし。

##### 3. その他

該当事項なし。

## 多様な生理活性を持つ機能性成分の安定化による新たな難治性慢性疾患の予防および治療法の構築

所 属 (独) 国立健康・栄養研究所 補完成分プロジェクト  
研究者 矢野 友啓  
研究期間 平成 19 年 4 月～平成 22 年 3 月

### 研究要旨

新規トコトリエノール安定化体(トコトリエノール・シクロデキスト包接体とトコトリエノールエーテル誘導体)を用いて、酸化ストレスや慢性炎症等が要因となって引き起こされる慢性疾患(難治性腫瘍、変形性関節症等)に対する予防・治療の可能性を探るために安定化体の製造法の構築、各疾患モデル系を用いたトコトリエノール安定化体の効果やその作用機構の解析を行なった。

### 分担研究者

- (1) (独) 医薬基盤研究所 野村大成
- (2) 大阪大学大学院 宮崎純一
- (3) 東北大学大学院 小野哲也
- (4) 静岡県立大学大学院 大島寛史
- (5) 名古屋学芸大学 池田彩子
- (6) お茶の水女子大学大学院 池本真二 (平成 21 年 3 月 31 日まで)
- (7) 日本アムウェイ合同会社 栗下昭弘
- (8) オリザ油化 (株) 岡田忠司
- (9) シクロケム (株) 寺田啓二

### A. 研究目的

アスベストが主因で引き起こされる中皮腫、C 型肝炎により誘発される肝臓癌、食事の欧米化により増加し続ける乳癌、肥満、ストレス等で引き起こされる 2 型糖尿病、変形性関節症等の慢性疾患について、その治療にかかる医療費の増加、慢性疾患の難治性、長期薬剤の服用に伴った副作用等の問題から、現在の治療法に加えて、これらの慢性疾患の予防・治療に有効と考えられる新たな予防・治療戦略が必要になってくる。

この新たな予防・治療戦略構築のために、ビタミン E 同族体であるトコトリエノール (T3) の

安定体を用いて、T3 の抗酸化および非抗酸化作用に基づく多様な生理活性を生体内で十分に生かした、上記の慢性疾患(難治性腫瘍、2 型糖尿病、変形性関節症等)に対する安全でかつ実効性のある予防・治療法を構築めざす。

### B. 研究方法

トコトリエノール安定化体の作成：米ぬかよりヘキササン抽出後、高温真空条件化で蒸留および濃縮し、ビタミン E 高濃度画分を分取した。この高濃度画分から合成吸着剤を充填したカラムを用いて、