

厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

再燃・再発患者に対する血清診断法および  
モニタリングシステムの開発

平成21年度 分担研究報告書

研究分担者 鮫島 朝之

(国立療養所 星塚敬愛園)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

ハンセン病の再燃・再発患者に対する血清診断法および  
モニタリングシステムの開発

研究分担者 鮫島朝之 国立療養所星塚敬愛園 内科医長

研究要旨 ハンセン病に対する血清診断法としてらい菌の細胞膜蛋白 Major Membrane Protein (MMP)-II に対する抗体価を、ELISA 法により測定し、再燃・再発が疑われる患者の早期診断のためのモニタリングシステムの開発を行う。

A. 研究目的

らい菌の細胞膜蛋白 Major Membrane Protein (MMP)-II は、その血清抗体が日本人ハンセン病患者の多菌、少菌型の両方で陽性を示し従来の PGL-1 より診断用抗原として有用である。国内外で発症しうる再燃・再発患者に関して増悪時の血清 MMP-II 抗体価と細胞性免疫能や病態との関連性を解明することで再燃・再発の早期診断のためのモニタリングシステムの開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

国立療養所星塚敬愛園の平成 21 年度入所者検診の血清 231 名分：(男 112 名、女 119 名、平均年齢 81.2 歳) と平成 20-21 年度職員検診の健常者血清 71 名分 (男 34 名、女 37 名、平均年齢 50.1 歳) を対象とし、MMP-II 抗体価を ELISA 法で測定した。これらの結果について ROC (受信者動

作特性) 曲線による解析を行い、Cut-off 値を決定し測定値を各病型ごとに比較検討した。また、これらを平成 16~18 年度入所者検診時に行った定性 PGL-1 抗体検査と比較した。

さらに平成 9 年から 14 年に皮膚生検で再燃・再発と診断された 4 例はいずれも多菌型 (MB) であったが、うち 2 例のみが平成 17 年~20 年度の血清と平成 21 年度の血清が保存されており、MMP-II 抗体価を比較できた。

(倫理面への配慮)

過去の生検組織、血液 (保存血清) の使用や定期検診時または随時に同意を得て採取した血液の使用については、個々人ごとに研究内容、使用目的等を説明し、個人情報漏洩しない方法でデータの管理を行う旨を伝えた。また、採血時に気分不良となった

場合は適切な処置を行い対応すること、本研究に参加しなくても不利益としないこと、研究の途中で参加を中止できることなども説明した。内容の理解が困難な個人については、なるべく家族あるいは後見人に付き添ってもらい、出来るだけ研究内容等の理解がすすむように丁寧に説明を行った。同意書の得られた例の生検組織、血液のみを研究で使用した。尚、本研究は、昨年12月に開催された第1回国立療養所星塚敬愛園倫理委員会で承認されたものである。

### C. 研究結果

MedCalc softwareにてROC曲線による解析を行いCut-off値(吸光度)を0.3507とした。(Sensitivity 43.67%、Specificity 95.77%)、多菌(MB)、少菌(PB)型別のMMP-II抗体陽性例はMB=81/165(49.10%)、PB=13/66(19.70%)、健常者では3/71(0.04%)であった。さらに病型のL型を皮疹の範囲が広い順にL3、L2、Lの3つに分類し病型を以下の6つに分けた上で、吸光度(平均値)との関係を比較したところ、L3(50例):0.3648、L2(57例):0.3621、L(56例):0.3244、B-BL(11例):0.3059、BT(14例):0.2846、T(55例):0.2812のように、皮疹の範囲が広い病型ほど抗体価(吸光度)が高

い傾向を示した。定性PGL-1抗体検査の陽性例(平成16~18年度)は、比較的少なくMB=12/165(7.3%)、PB=1/66(1.5%)であった。皮膚生検で再燃・再発とされた2例のMMP-II抗体価は、再燃・再発時より6年以上経過していたためか、Cut-off値より著明に高い値は示さなかった。

### D. 考察

皮膚生検で再燃・再発と診断された4例はいずれも多菌型(MB)であったが、皮膚病変の広範な多菌型(MB)の症例ほどMMP-II抗体価が高い傾向にあり、これらの群で再燃・再発の可能性が高いことが推測された。生検標本で診断のついた再燃・再発と近い時期の血清が保存されている症例はかなり少ないので、各病型の保存血清によるMMP-II抗体価の経時的変化とこれら血液の採取時期(平成15年以降)に近い病歴上の再燃・再発症状や病状変化との関連性、さらには個々の細胞性免疫能との関係等についても今後、検討してゆく必要があるものと考えられた。

### E. 結論

MMP-II抗体陽性例はMB=81/165(49.10%)、PB=13/66(19.70%)であり、定性PGL-1抗体の陽性率より高かった。抗体価(吸光度)と各病型

については、L3, L2 など皮膚病変の  
広範囲の症例ほど高値を示す傾向に  
あった。皮膚生検と血清保存の時期  
がやや異なる再燃・再発例（2例と  
もMB）では、MMP-Ⅱ抗体価と病状  
の関連性は明らかではなかった。

#### G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

#### 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 なし

厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

らい菌のマクロファージ内寄生機構に関する研究

平成21年度 分担研究報告書

研究分担者 鈴木 幸一

(国立感染症研究所 ハンセン病研究センター)

らい菌のマクロファージ内寄生機構に関する研究

研究分担者 鈴木 幸一 国立感染症研究所ハンセン病研究センター  
感染制御部・室長

研究要旨 らい菌の生存に重要な役割を果たすと考えられるファゴゾーム内の脂質蓄積機構に関して検討を行った結果、らい菌を感染させたマクロファージにおいては、脂質蓄積に関与する *adipose differentiation-related protein (ADRP)* や *perilipin* の発現が誘導されることが明らかになった。

A. 研究目的

ハンセン病の起病因菌であるらい菌は、マクロファージのファゴゾーム内で長期間生存し増殖するという、あらゆる細菌の中でも最も顕著な細胞内寄生性を示すが、そのメカニズムについてはほとんど明らかになっていない。この点を解明することは、ハンセン病の診断、治療など全てに通じる重要な課題である。

LL型ハンセン病において、らい菌は宿主マクロファージのファゴゾーム内で増殖するという顕著な細胞内寄生性を示す。そのようなファゴゾームは、脂質を蓄えて *xanthomatous* に、時に *cystic* に拡張しており、らい菌はその中に浮かぶようにして生存している。このことは、らい菌が典型的な細胞内寄生を可能とした生物種であることを示すとともに、らい菌の生存にはそのようなファゴゾーム内環境が必要であることを示唆している。また、マクロファージのファゴゾームは、本来貪食した外来性細菌などの異物を消化し自然免疫および獲得免疫系を

活性化する役割を担っているが、らい菌や結核菌はそのような場所で生存を可能とする極限環境微生物であると位置付けることも出来る。したがって、らい菌の生物学的特性やハンセン病の病態を理解し治療戦略を立てる上で、このようなマクロファージ内寄生の分子機構を明らかにすることは極めて重要である。

B. 研究方法

従来、抗酸菌のマクロファージ内寄生に関する研究は、結核菌や *M. bovis* B.C.G. を用いたものが多かったが、我々は上記のような観点から、らい菌感染における細胞内寄生の分子機構に関する研究を行ってきた。すなわち培養ヒトマクロファージにらい菌を感染させ、経時的に mRNA とタンパクを調製し、各種遺伝子発現やタンパク発現を RT-PCR、Realtime-PCR および Western blotting により確認した。

本研究では人体材料は扱わない。

C. 研究結果

らい菌感染によって、細胞内の脂質の蓄積や代謝に重要な役割を果たす PAT タンパクである adipophilin/adipose differentiation-related protein (ADRP) や perilipin の発現が誘導され維持されることが明らかとなった。また、らい菌は、ライソゾーム融合を阻害する機能を持つアクチン結合タンパク CORO1A の発現も同時に誘導するとともに、自然免疫活性化に必要な Toll 様受容体や TNF- $\alpha$  のシグナルを抑制することが判明した。

#### D. 考察

らい菌感染マクロファージでは、脂質の蓄積に関わる遺伝子発現が誘導され、菌の生存に有利な細胞内環境が構築されると考えられた。今後さらに検討を進めることにより、ハンセン病の病態の理解や新たな治療戦略の開発につながると考えられる。

らい菌は、感染後に宿主マクロファージの遺伝子発現を制御することで、自らの生存に適した環境を構築していることが明らかになってきた。このような作用は、らい菌の死菌やラテックスビーズでは起こらないことから、らい菌生菌由来の未知の物質に関わる可能性が考えられた。そこで現在、DNA マイクロアレイを用いたらい菌全遺伝子発現解析を行い、宿主マクロファージに作用するらい菌由来遺伝子産物の探索を行っている。

らい菌は試験管内培養ができず、はなはだ困難な研究対象ではあるが、高率な偽遺伝子発現や厳格なファゴゾーム内寄生という、他の生物には無い大きな特徴を有している。今後らい菌に関する基礎研究から得られた成果

が、広く生物学全体に還元されることが期待される。

#### E. 結論

らい菌は宿主マクロファージに感染後、ファゴゾーム内に脂質を蓄積するために宿主遺伝子発現を誘導し、自身の生存に有利な細胞内環境を構築していると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ, Koyama S, Aoshi T, Akira S, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Yamanaka Y, Hirano H, Suzuki K, Okuda K. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant. *J Immunol* 182:1593-601, 2009.
2. Akama T, Suzuki K, Tanigawa K, Kawashima A, Wu H, Nakata N, Osana Y, Sakakibara Y and Ishii N. Whole genome tiling array analysis of *Mycobacterium leprae* RNA reveals high expression of pseudogenes and non-coding regions. *J Bacteriol* 191(10):3321-3327, 2009.
3. Bang PD, Suzuki K, Phuong LT, Chu TM, Ishii N and Khang TH. Evaluation of PCR-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. *J Dermatol* 36(5):269-276, 2009.
4. Tanigawa K, Suzuki K, Kimura H,

- Takeshita F, Wu H, Akama T, Kawashima A, and Ishii N. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin Exp Immunol*, 156(2):495-501, 2009.
5. Nakamura K, Akama T, Pham DB, Sekimura S, Tanigawa K, Wu H, Kawashima A, Hayashi M, Suzuki K and Ishii N. Detection of RNA expression from pseudogenes and noncoding genomic regions of *Mycobacterium leprae*. *Microb Pathog* 47(3):163-167, 2009.
  6. Kobiyama K, Takeshita F, Jounai N, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Ishii KJ, Kawai T, Sasaki S, Hirano H, Ishii N, Okuda K and Suzuki K. Extra-chromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA. *J Virol*. 2009 Nov 11. [Epub ahead of print].
1. 鈴木幸一、永岡譲、森修一、石井則久。2008年における世界のハンセン病の現況について。日本ハンセン病学会誌 78:25-34, 2009.
  2. 赤間剛、鈴木幸一、谷川和也、川島晃、Huhehasi Wu、石井則久。タイリングアレイを用いたらい菌全ゲノムにおける発現部位の検出。日本ハンセン病学会誌 78:49-54, 2009.
  3. 鈴木幸一、中村和昭、谷川和也、川島晃、Huhehasi Wu、赤間剛、林もゆる、関村 慎、Pham Dang Bang、石井則久。らい菌ゲノム由来 RNA 発現の網羅的解析とその意味するもの。日本ハンセン病学会誌 78: 61-65, 2009.
  4. 石井則久、森修一、永岡譲、鈴木幸二。WHO 第9回ハンセン病制圧のための技術勧告 (Technical Advisory Group: TAG) 会議報告。日本ハンセン病学会誌 78:75-88, 2009.
  5. 石井則久、鈴木幸一。地球温暖化に伴う輸入感染症。皮膚科の臨床 51:7-11, 2009.
  6. 永岡譲、石田裕、鈴木幸一、石井則久。ミャンマーにおけるハンセン病制圧記念行事 (2009) の報告。日本ハンセン病学会誌 78:251-253, 2009.
  7. 石井則久、鈴木幸一。抗酸菌感染症。皮膚科の臨床 51(11):1599-1606, 2009.
2. 学会発表
1. 赤間剛、鈴木幸一、谷川和也、川島晃、Huhehasi Wu、林もゆる、石藤雄子、石井則久、宮村達男。DNA マイクロアレイによるらい菌全遺伝子の発現解析。第82回日本ハンセン病学会。2009年5月13-15日。出雲。
  2. 谷川和也、鈴木幸一、川島晃、Huhehasi Wu、赤間剛、林もゆる、中村和昭、相沢清香、Pham Dang Bang、石藤雄子、木村博昭、生山祥一郎、武下文彦、石井則久。らい菌は宿主マクロファージのTLRシグナルを抑



制し細胞内寄生環境を構築する。第82回日本ハンセン病学会。2009年5月13-15日。出雲。

3. 細川篤、山口さやか、宮里仁奈、上里博、照屋操、谷川和也、鈴木幸一、松岡正典、矢島幹久、石井則久。TT～BT型が疑われたハンセン病の1例。第82回日本ハンセン病学会。2009年5月13-15日。出雲。

4. 松尾英一、坂井哲夫、野間口博子、鈴木幸一、脇坂晟、藤岡保範、神谷茂。血管病変とHI75の神経侵入。第82回日本ハンセン病学会、シンポジウム1、ハンセン病神経障害総論と最近の知見。2009年5月13-15日。出雲。

5. 鈴木幸一。らい菌の細胞内寄生機構。第82回日本ハンセン病学会、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、どう対処するのか。2009年5月13-15日。出雲。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

難治症例に対する免疫療法の開発

平成21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（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

難治症例に対する免疫療法の開発

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  
感染制御部・主任研究官

研究要旨 我々は、LpK の N 末端をコードするリポペプチド LipoK を作製し、樹状細胞を刺激したところ、LipoK は樹状細胞を活性化した。そこで、今回は抗原提示細胞に由来するエキソソームに着目した。樹状細胞から放出されるエキソソームに含む免疫賦活性分子を調べた結果、LipoK 刺激により、らい菌感染樹状細胞は MHC Class I, Class II 及び CD86 分子を多く発現していた。さらに、らい菌抗原も多く検出された。らい菌及び LipoK により成熟した樹状細胞は自己の CD4 陽性 T 細胞 および CD8 陽性 T 細胞を刺激して、IFN-g 産生を誘導した事はすでに報告している。今回、活性化した CD4 及び CD8 陽性 T 細胞からパーフォリン及びグランザイム B のみならず、granulysin の産生が増強されたことが明らかとなった。LipoK はらい菌感染防御機構に重要な役割を担っている。従って、難治症例に対する免疫療法に活用し得る分子であることが明らかとなった。

A. 研究目的

私たちは、リポ蛋白 LpK がらい菌に対する生体防御反応を司る分子であることを見出し、その活性中心は N 末端部分に存在することを明らかにしてきた。そこで、LpK の N 末端をコードするリポペプチド LipoK を作製し、樹状細胞を刺激したところ、LipoK は TLR2 を認識し、樹状細胞を活性化した。

今回、抗原提示細胞から分泌されるエキソソームの役割に注目した。エキソソームは、細胞から分泌される微小小胞である。エキソソームは、エンドソームに由来し、細胞膜と融合することによって内部の小胞を細胞外環境に放出する。抗原提示細胞に由来するエキソソームは、T 細胞を活性化させる一群の免疫賦活性分子を含むこと

から、生体防御に重要な役割を果たす事が推測される。そこで、樹状細胞におけるエキソソーム放出に対する、らい菌または LipoK の影響を解析した。

また、細胞障害性 T リンパ球 (CTL) は、顆粒依存的機序により細胞内病原体を殺すことが明らかになっており、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。今回 CTL 内に新たに見つかった顆粒に存在する蛋白 granulysin の発現を検討した。

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 の濃度で保存した。樹状細胞は正常健常

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て得たのち、抗原またはらい菌でパルスし、その抗原提示能を自己T細胞の活性化を指標に分析した。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。granulysin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、6日目にGolgi stop (BD)を添加し、18時間後に細胞を回収しintracellular染色を行い、解析した。エキソソームの精製はヒトMHC Class II ビーズを用いて行った。樹状細胞をらい菌またはLipoKで刺激したのち、培地中のエキソソームをビーズでトラップし、その蛍光強度をInfinite200(Tecan)プレートリーダーを用いて測定した。エキソソームが含む表面抗原(MHC-Class I, MHC-Class II, CD86)の測定にはFACS Caliburを用いた。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないように注意を払った。

### C. 研究結果

らい菌感染樹状細胞をLipoKでパルスし、放出されるエキソソームをClass II ビーズで精製し、フローサイトメトリで分析した。その結果、LipoKの刺激により、MHC Class I, Class II および CD86 抗原は、らい菌感染樹状細胞から得られたエキソソームより、多く含まれていた (Fig 1)。さらに、

らい菌を蛍光色素 FITC でラベルし、樹状細胞を刺激すると、分泌されるエキソソームには LipoK 刺激によって、蛍光強度が増加することが確認された。Fig. 2 に示した実験データは 2 回の別々な結果である。つぎに、らい菌またはLipoKで刺激した樹状細胞を用いて、T細胞からの granulysin 産生能を調べた。らい菌のみでは granulysin 産生 CD8 陽性細胞はほとんど (1.67%) 見られないが、らい菌存在下でLipoKをパルスした樹状細胞は CD8 陽性 T 細胞を刺激し、有意に granulysin を産生した (18.9%)。近年 CD4 陽性 T 細胞が CTL の役割を果たしているとの報告がある、そこで、granulysin 産性能を CD4 陽性細胞で検討したところ、LipoK の刺激により、granulysin 産生細胞が増強していることも明らかとなった (28.4% v/s 0.64%)。昨年は、CTL 活性に重要なパーフォリンまたはグランザイム産生機構を解明する事を試みた。らい菌感染樹状細胞を LipoK にパルスすると、自己の CD4 または CD8 陽性 T 細胞内パーフォリン及びグランザイム B 産生が増加した。らい菌のみではこれらの産生量は少ない事から、これら分子の産生において、脂質部分を持つ LipoK が重要な役割を担っていると考えられた。さらに、CTL 活性に、CD4 陽性細胞の共存が必須であることを確認した。

### D. 考察

LipoK は、樹状細胞を成熟させ、らい菌抗原を T 細胞に提示することによって免疫応答を引き起こすことを明らかにしてきた。LipoK は TLR2 を認

識し、エキソソームを放出した。さらに、LipoK は自己 CD8 陽性 T 細胞のみならず、CD4 陽性 T 細胞から大量の granulysin を分泌しうる物質であることが判明した。この事は、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

LipoK は TLR-2 を介して、感染細胞を活性化し、エキソソームを放出する。この微小小膜は T 細胞を活性化させる一群の免疫賦活性分子を持つことから、生体防御に重要な役割を果たす事が考えられる。

感染細胞を破壊するためには、CTL 細胞が重要な役割を担っている。LipoK によってより多く、パーフォリンが産生され、グランザイムおよび Granulysin が分泌された。したがって、LipoK は免疫療法分子として活用しうると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Hatta MM, Makino M, Ratnawati, Mashudi, Yadi, Sabir M, Tandirogang N, Rusyati LMM, Kai M, Fukutomi Y, Miyamoto Y, Mukai T, and Maeda Y. Detection of serum antibodies to *M. leprae* Major Membrane Protein-II in leprosy patients from Indonesia. *Lep Rev.* 80: 402-409, 2009 (in press).
2. Maeda Y, Tamura T, Matsuoka M, and Makino M. Inhibition of the multiplication of *Mycobacterium leprae* by vaccination with a rec

ombinant *M. bovis* BCG strain that secretes major membrane protein II in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 16:1399-1404, 2009.

#### 2. 学会発表

- 1) 前田百美、田村敏生、福富康夫、牧野正彦、Evaluation of exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected dendritic cells、第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月
- 2) 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小胞体ストレス蛋白の動態、第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月
- 3) 前田百美、Hatta M, Ratnawati, Mashudi, Yadi, Sabir M, Tandirogang N, Rusyati LMM, 甲斐雅規、向井 徹、宮本友司、福富康夫、牧野正彦、Major Membrane Protein-II を用いた血清診断法、第 82 回日本ハンセン病学会総会、2009 年 5 月
- 4) 向井 徹、宮本友司、前田百美、牧野正彦、らい菌蛋白調整に用いる発現用プロモーターの同定、第 82 回日本ハンセン病学会総会、2009 年 5 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

## Expression of surface markers on DC-derived exosomes

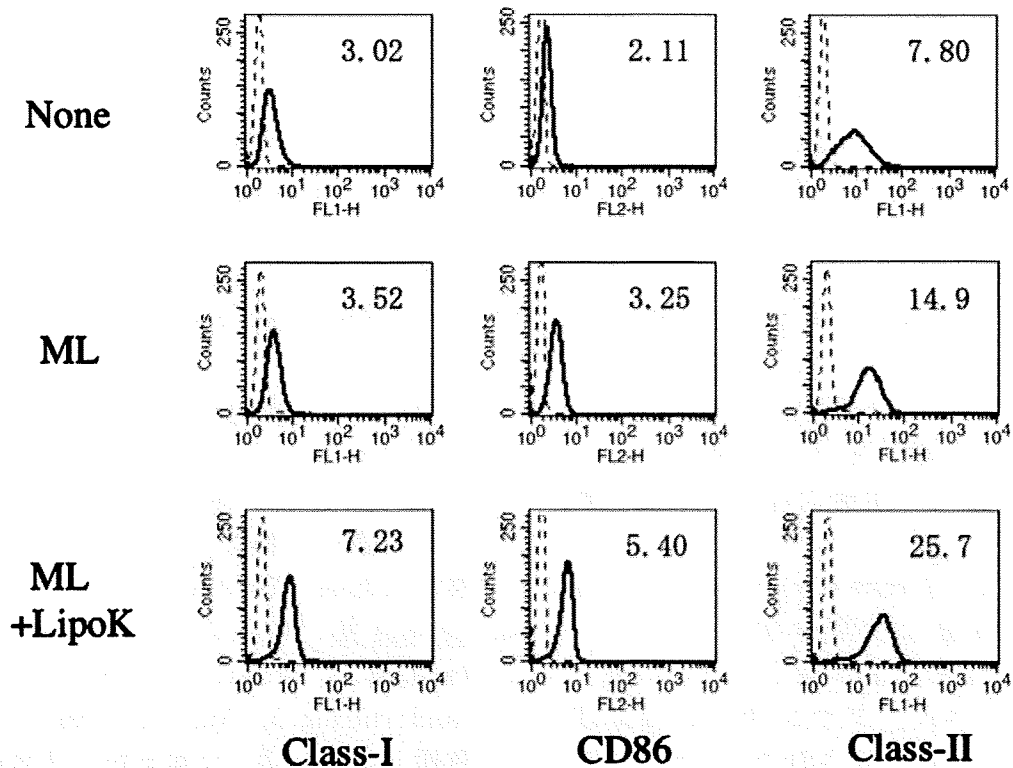


Fig. 1 樹状細胞から分泌されるエクソソームのフローサイトメトリーによる解析。ML：らい菌

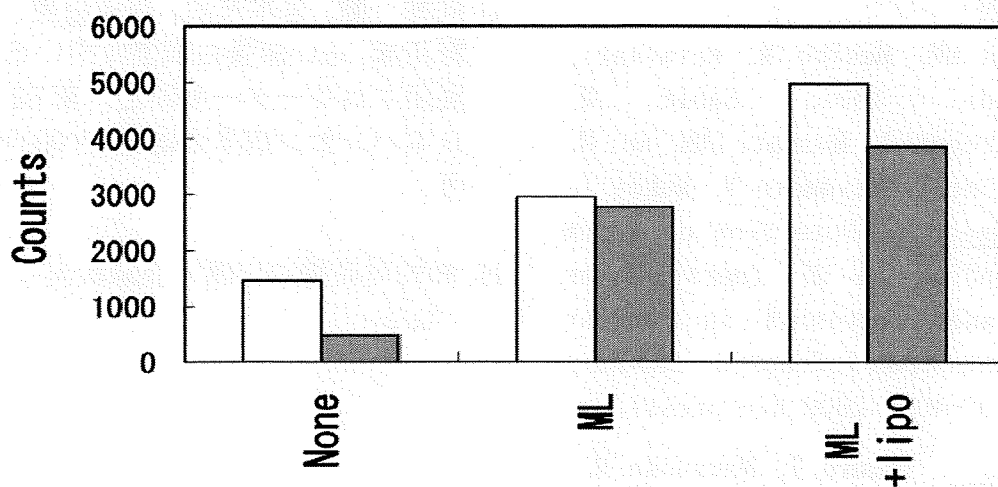


Fig. 2 樹状細胞から得られたエクソソームの蛍光強度。y 軸は蛍光強度、ML：らい菌、lipo は LipoK と同様、□ 実験 1 ■ 実験 2

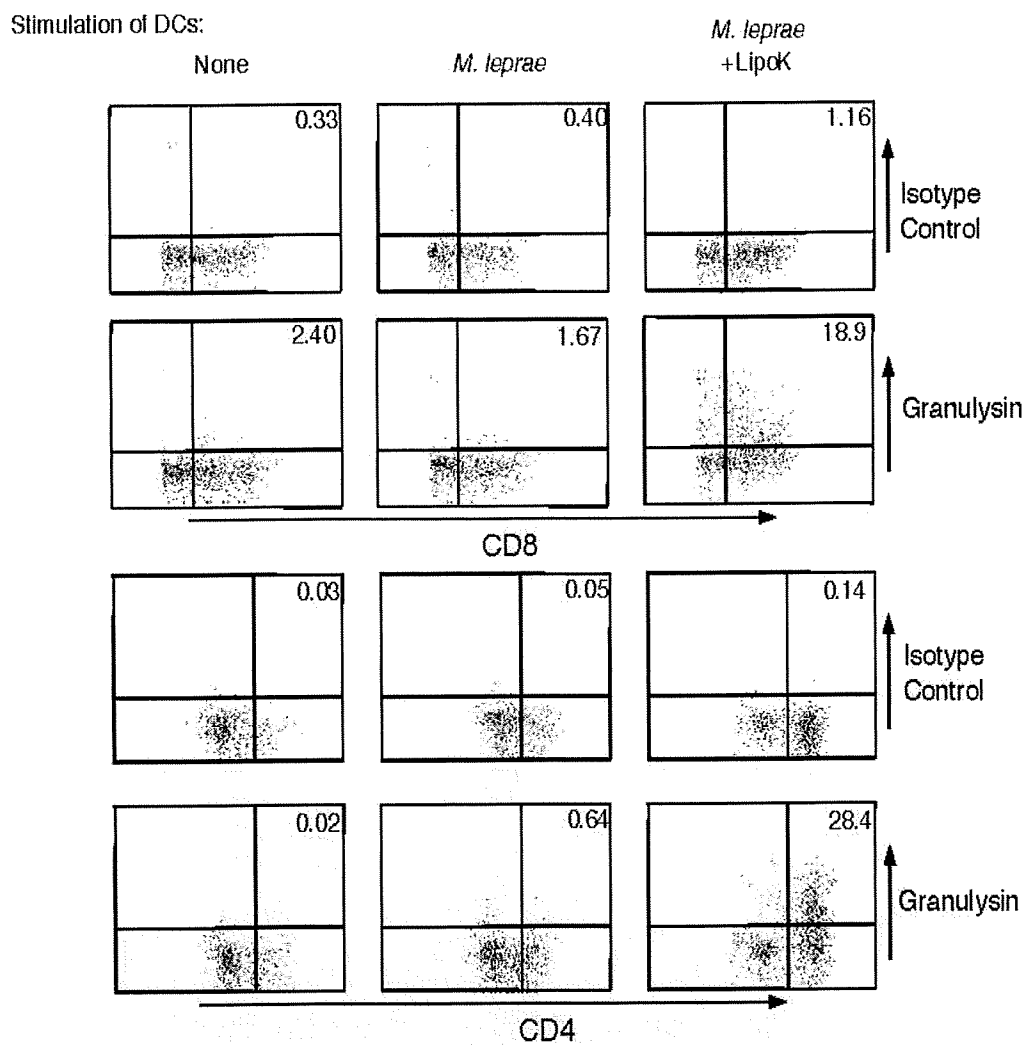


Fig. 3 CD8 陽性細胞及び CD4 陽性 T 細胞から granulysin の産生が LipoK 刺激によって増強された。

厚生労働科学研究費補助金  
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

## ハンセン病予防法に関する研究

平成21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)



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

ハンセン病予防法に関する研究

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  
感染制御部・室長

研究要旨 結核のワクチンである BCG は、その長期の使用より、安全性は非常に高いと考えられる。しかし、ハンセン病予防ワクチンとしての使用では、その効果は低いと報告されている。そのため BCG の改変により、そのワクチンとしての能力を向上させる開発を行った。抗原として、菌由来 Hsp70 とらい菌 MMPII 融合蛋白を BCG に plasmid により発現させ、マウスにおいてらい菌増殖を抑制することを見出してきた。この抗原を、安定かつ充分量 BCG に 1 コピー遺伝子から発現する promoter 候補領域を抗酸菌フェージに同定してきた。今回、蛍光蛋白により、これらの領域の解析を行い、さらに、抗原候補である融合蛋白の発現を行った。その結果、in vitro 及び in vivo において、promoter の発現能は同じ傾向の強度であり、組込み型による Hsp70 とらい菌 MMPII 融合蛋白は、対照とした plasmid 型発現と同等の蛋白発現量を確認した。これまでの成果は、安定したハンセン病ワクチンとして組換え BCG の構築を可能にすると考えられた。

A. 研究目的

ハンセン病の予防ワクチンは、現在存在しない。これまで、ハンセン病と同じ抗酸菌感染症である結核のワクチン 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。BCG は、長期の使用より、安全性の非常に高いことが知られている。そのため、BCG を改変することによるハンセン病ワクチン開発を進めた。

これまでに、菌由来 Hsp70 とらい菌 MMPII 融合蛋白は、マウスにおいてら

い菌の増殖抑制に効果的であることを示してきた。しかし、これは plasmid 発現による検討であり、実際のワクチンとしての使用では、plasmid の脱落、その防止のための培地への薬剤添加など、らい菌抗原発現 BCG の安全性・安定性には疑問が残る。そのため、BCG ゲノムへの組込み型により効果的・安全・安定な組換え BCG が必要となる。しかし、既存の promoter では充分量の抗原が組込み型遺伝子発現では不十分なため、抗酸菌フェージより強力な promoter 領域を同定した。本年は同定された領域のさらなる解析及び

Hsp70 と MMP II 融合蛋白の組み込み型発現による産生量の検討を行った。

一方、ワクチン開発において、感染動物実験が必要になる。しかし、らい菌感染による神経症状等の臨床症状を示す動物は、ヒトとサルのみである。そのため、幼若カニクイザル及び妊娠ザルとその新生仔へらい菌の接種を行い、らい菌感染モデル系の開発を行った。

## B. 研究方法

### 改変 BCG の構築

大腸菌ではプラスミド型、抗酸菌では、組込み型になる pMV306 へ、プロモーターマーカーする蛍光蛋白 EGFP 遺伝子を組込んだ (pMV306-EG)。抗酸菌ファージ TM4 ゲノム遺伝子より同定された領域を EGFP 遺伝子上流域に組み込み、抗酸菌 *M. smegmatis*、BCG へ遺伝子導入を行い、蛍光蛋白の発現量を比較した。さらに、EGFP 発現 BCG をマウス腹腔内に投与し、腹腔内マクロファージ内における発現量の比較を行った。P85 領域を promoter とし、BCG もしくはらい菌 Hsp70 と BCG もしくはらい菌 MMP II 融合蛋白遺伝子を pUC18 へ組み込んだ。この plasmid を、抗酸菌ファージ由来 integrase を発現する pJV53 を維持する BCG clone A-53 へ、遺伝子導入を行い Hygromycin 耐性、urease 陰性 clone を選択した。選択された clone を完全合成培地 Sauton' s 培地で培養し、上清を濃縮後、抗 MMP II 単抗体によりウエスタンブロット法を行い Hsp70-MMP II 融合蛋白の分泌量の比較を行った。

カニクイザルによるらい菌感染系の構築

平成 17 年に独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで繁殖育成された 6-8 ヶ月齢の幼若カニクイザル 6 頭を 3 群に分け、らい菌を鼻腔内、鼻先端部、左手根部に各 2 頭へ接種した。らい菌接種および感染動物の維持は、医薬基盤研究所 P2 感染実験施設内で行った。らい菌接種前、接種後 5 年間にわたり 2 ヶ月間隔で血漿・鼻腔内洗浄液を採取し PGL-I 抗体及びらい菌特異 PCR 法によりモニターを行った。また、平成 20 年度に 1 組、平成 21 年度に 2 組の妊娠 4 週ザルへ菌接種後、その出生仔へ 1、4、8 週時に母ザル共に、鼻腔内、鼻尖へ菌接種を行い経過観察を行った。

### (倫理面への配慮)

動物実験は、各施設の動物実験委員会の承認を受け行った。研究の実施にあたっては、各施設の諸内規や作業方式に従い、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に努めた。

## C. 研究結果

### 改変 BCG の構築

抗酸菌ファージ遺伝子より promoter と予想された領域を EGFP 遺伝子上流に組み込まれた抗酸菌 *M. smegmatis*、BCG の蛍光蛋白の発現量の比較では、P38、P40、P79、P85 および P86 領域が両菌種において同様に対照とした plasmid 発現型 Hsp60 promoter より強い発現量を示した (図 1 A)。さらに、組換え BCG は、マウス腹腔内マクロファージにおいても同様の傾向を示した (図 1 B)。P79、P85 を用い

た Hsp70-MMP II 融合蛋白発現 urease 破壊 BCG 株は、P85 を promoter として用いた場合、plasmid 型 Hsp60 promoter 発現と同等の蛋白を上清へ分泌した。(図 2 B) した。

#### カニクイザルによるらい菌感染系の構築

幼若サル、鼻尖接種の 1 頭に接種後 5 8、5 9 月目に鼻腔洗浄液の nested PCR 法の 2nd において陽性が確認された。6 0 月目のサンプルでは、陽性は確認されなかった。PGL-1 抗体の検討では、1 頭に昨年より継続して偽陽性を認めるが、他の全検体では陰性であった(図 3)。妊娠群においては、鼻腔洗浄液の PCR で、突発的に陽性を認めた。

#### D. 考察

##### 改変 BCG の構築

BCG を用いたハンセン病ワクチン開発では、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。これまでの plasmid による遺伝子発現では、ワクチンとして安全性と安定性は非常に疑問である。そのため、BCG 菌体内において働く強いプロモーターが必要になる。抗酸菌ファージ由来 promoter による、BCG ゲノムに組み込まれた 1 コピー遺伝子由来蛋白産生量の検討では、*M. smegmatis*、BCG と異なる菌種および in vitro および in vivo において、対照として用いた plasmid 型 Hsp60 promoter より強い傾向が示された。これまで強い promoter を同定する試みが数々の研究者により行われている。しかし、*M.*

*smegmatis* で得られた結果が BCG で同様の結果を得ることは少なかった。しかし、今回同定した領域は、抗酸菌ファージ由来であるため、宿主の選択性は認められず、in vivo においても同等の発現能傾向を示した。また、目的とする Hsp70-MMP II 融合蛋白発現においても、発現蛋白のサイズが大きい場合、蛍光蛋白発現で認められたほどの強度の差は認められなかったが、傾向は同様のためワクチン効果を得るに充分と考えられる分泌量を P85 により認めた。今後、安全性を担保するために、選択に使用した Hygromycin 耐性遺伝子の除去を進める。

#### カニクイザルによるらい菌感染系の構築

鼻尖接種幼若サルの接種後 5 8、5 9 月目の鼻腔内洗浄液に、らい菌遺伝子を nested PCR 法の 2nd PCR により検出した。1<sup>st</sup> PCR および 16sRNA を標的とした PCR 法では検出されなかったため、存在する菌量は極微量であると考えられた。また、6 0 月目の洗浄液からは検出されなかった。6 0 月目は、接種されたサルでは、6 歳齢であり、ヒトでは、青年期に相当する。ヒトにおいて感染後 1 0 - 3 0 年で発症等何らかの徴候が認められることが多いことから、カニクイザルにおいても生理的にヒトの成熟時期と一致したと考えられる。現在、菌の排泄が、鼻腔内洗浄液に認められるのみであるが、今後、皮疹、神経肥厚等の症状の発症の可能性が考えられた。

#### E. 結論

BCG において抗酸菌ファージ由来

promoter 領域は、ワクチン効果に充分量の抗原を安定的に産生させる可能性を示した。

らい菌接種サルにおいて接種後、約5年でらい菌の排泄を鼻腔内洗浄液に認めた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2009. Induction of cross-priming of naïve CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by recombinant Bacillus Calmette-Guérin that secretes heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. J. Immunol., 183: 6561-6568.
- 2) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. 2009. 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., 55: 39-46.
- 3) Hatta, M., M. Makino, Ratnawati, Mashudi, Yadi, M. Sabir, N. Tandirogang, L. M. M. Rusyati, M. Kai, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, T. Mukai, and Y. Maeda. 2009. Detection of serum antibodies to *M. leprae* Major Membrane Protein-II in leprosy patients from Indonesia. Leprosy Review, in press.

### 2. 学会発表

- 1) Mukai, T., Y. Maeda, Y. Miyamoto, and M. Makino. Identification of Strong Mycobacterial Promoters from Mycobacteriophage TM4.

US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.

- 2) 宮本友司, 向井 徹, 中 崇, 甲斐雅規, 前田百美, 矢野郁也, 牧野正彦. *Mycobacterium avium* complex における glycopeptidolipid 生合成遺伝子群の転写制御解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 3) 甲斐雅規, 藤原永年, 宮本友司, 向井 徹, 矢野郁也, 牧野正彦. BCG 菌ミコール酸のサブクラス合成遺伝子の解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 4) 向井 徹, 宮本友司, 前田百美, 牧野正彦. らい菌蛋白調整に用いる発現用プロモーターの同定. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲市
- 5) 前田百美, Mochammad Hatta, Ratnawati, Mashudi, Yadi, Muhammad Sabir, Nataniel Tandirogang, Luh Made Mas Rusyati, 甲斐雅規, 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦. Major membrane Protein-II を用いた血清診断法. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲市
- 6) 向井徹. 抗酸菌感染症ワクチンの開発～高発現組換え BCG の構築～. 第 5 回 霊長類医科学セミナー 2009 年 1 2 月 つくば市

## 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