

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23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

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

研究協力者 後藤 正道 国立療養所星塚敬愛園 園長

研究要旨 らい菌の細胞膜蛋白 Major Membrane Protein(MMP)-II に対する血清抗体価を昨年と同様に当園入所者群と正常対照群につき ELISA 法で測定し、ハンセン病の再燃・再発との関連性を検討した。さらに細胞性免疫能に関し、らい菌の細胞質蛋白 MLC (*Mycobacterium leprae* cytosolic protein)や MMP-II 刺激、96 時間後に培養末梢血単核球細胞より上清中へ産生される INF- γ 、IL-10 などのサイトカインを ELISA 法で定量し、同時に T 細胞内のサイトカインをフローサイトメトリーで測定した。MMP-II 血清抗体価は、多菌型で 88.8%、少菌型で 59.6%が陽性を示し、皮膚病変の広範であった多菌型ほど抗体価高値であり、昨年までと同様の傾向であった。MMP-II (2 又は 4 μ g/ml)刺激後の培養細胞上清中の INF- γ 、IL-10 の産生量は、多菌型で少菌型よりやや少なかった。MMP-II の刺激では、MLC の刺激より IL-10 の産生がいずれの病型でもやや多い傾向であった。皮膚生検標本を用いた MMP-II 抗体による免疫染色では、8 例中 6 例に陽性所見を認めたが、1 例は菌陰性であった。皮膚スミア検査で陽性所見を認めた症例の MMP-II 抗体価は、3 年連続で軽度高値を示した。再燃・再発のモニタリングシステムの確立には、血清 MMP-II 抗体価の変動をチェックすること以外に MMP-II 刺激などによる細胞性免疫能の評価も今後必要と考えられた。

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、増悪時の血清 MMP-II 抗体価と細胞性免疫能との関連性を解明することで、ハンセン病の再燃・再発を起こす可能性の高い患者の拾い上げや再燃・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した。

B. 研究方法

国立療養所星塚敬愛園の平成 23 年度の入所者検診時の血清 200 名分(男 97 名、女 103 名、平均年齢 83.1 歳)を用い MMP-II 血清抗体価(吸光度)を ELISA 法により、昨年までと同様に測定し ROC (受診者動作特性)曲線による解析を行った。正常対照群は 78 名(男 38 名、女 40 名、当園職員 71 名、鹿屋医療センター受診者 7 名、平均年齢 51.9 歳)とした。

細胞性免疫能は、培養末梢血単核球細胞にらい菌細胞質蛋白 *M. leprae* cytosolic protein(MLC)の 4, 8, 15 μ g/ml、あるいは MMP-II の 2, 4, 15 μ g/ml を添加し、96 時間後に樹状細胞により活性化された T 細胞等より産生された培養上清中 INF- γ 、IL-10 などのサイトカインを ELISA 法で定量した。同時に T 細胞内のこれらサイトカインをフローサイトメトリーで測定し、それぞれのサイトカイン陽性細胞の割合(%)を CD4+細胞および CD8+細胞ごとに算出した。(コントロールとして IgG1 を用いた。)細胞性免疫能の評価は、入所者群 20 名(少菌型 9 名、多菌型

11 名、平均年齢 84.6 歳)、正常対照群 16 名(当園職員 6 名、当園外来 5 名、鹿屋医療センター 5 名、平均年齢 71 歳)について行った。

また、平成 9 年以降に皮膚生検が施行された 8 例(内 3 例が再発例)について Fite 染色に加え PGL-1 抗体、MMP-II 抗体による免疫染色を行い、再燃・再発との関連性を検討した。皮膚スミア検査で陽性所見(BI=4)を認め、皮疹を認めないが再発の可能性を否定できないため、内服治療を開始した症例(CBL 型、86 歳、男性)があり、この症例の平成 21-23 年度の 3 年分の検診時保存血清について MMP-II 抗体価を ELISA 法で同時に測定し経時的な変化について評価した。

(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ならないこと、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。同意書の得られた血液、生検組織のみ研究で使用した。尚、本研究は、平成21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。また鹿屋医療センターにおいては、平成22年7月に行われた同センター生命倫理委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

MMP-II 抗体価の陽性率は、多菌型で88.8%、少菌型で59.6%が陽性を示し、定性 PGL-1 抗体の陽性率より高かった。昨年度同様、MedCalc software にて ROC 曲線による解析を行い Cut-off 値 (吸光度) を 0.2559 とした (Sensitivity 80.5%、Specificity 80.8%)。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、抗体価(吸光度)の平均値を示した。(括弧内は昨年度の値)

L3 :0.5624 (0.4628)、
L2 :0.6083 (0.4582)、
L :0.4732 (0.3876)、
B-BL:0.5104 (0.3310)、
BT :0.3844 (0.3364)、
T :0.3476 (0.2941)

昨年度、本年度のいずれも L3 と BT 間、L3 と T 間、L2 と BT 間、L2 と T 間などの各群間において Unpaired Student's t-test で吸光度の値に有意差 ($p < 0.05$ あるいは $P < 0.01$) が認められた。昨年度までと同様に L2、L3 など過去の皮膚病

変の広範囲な多菌型の症例ほど抗体価(吸光度)は高値を示した。

培養上清中へ産生されるサイトカインの ELISA 法による測定では、MLC と MMP-II の $15 \mu\text{g/ml}$ の刺激では、INF- γ 、IL-10 の産生量が多かったため、より少量の刺激での検討を行った。特に MMP-II ($2, 4 \mu\text{g/ml}$) 刺激の 96 時間後の培養細胞上清中 INF- γ 、IL-10 の産生量は、多菌型で少菌型よりやや少ない傾向がみられた。また MMP-II ($2, 4 \mu\text{g/ml}$) による刺激の場合、MLC の刺激($4, 8 \mu\text{g/ml}$) の場合より IL-10 の産生がやや多い傾向がみられた。(Table 1.) 細胞内サイトカイン産生に関するフローサイトメトリーを用いた検討では、これまでのところ病型による有意な差異を認めなかった。(Table 2.)

皮膚生検標本を用いた MMP-II 抗体による免疫染色では、8 例中 6 例に陽性所見を認めた。これら陽性例の内、再発例を含む活動期の 5 例は Fite 染色でらい菌を認めたが、他の 1 例は菌陰性であった。

皮膚スミア検査で陽性所見を認めた症例の MMP-II 抗体価(吸光度)は、

平成 21 年度:0.4050、
平成 22 年度:0.3710、
平成 23 年度:0.3200

(Cut-off 値:0.2559)であり 3 年連続で軽度高値を示した。

D. 考察

皮膚病変の広範であった多菌型ほど MMP-II 血清抗体価は今年度も高かったが、細胞性免疫能の病型による差異については、今後さらに症例数を増やしての検討が必要と考えられた。ハンセン病の再燃・再発の可能性についての評価は、MMP-II 血清抗体価の持続高値例もあるため、抗体価の観察だけでは不十分と考えられた。また、皮膚生検でらい菌陰性の時期にも MMP-II 抗体染色が陽性となる場合があることは、ハンセン病の治癒期でも MMP-II 血清抗体価が高値を示す例があることと関連性があることが推察された。皮膚スミア検査で陽性所見を認めた症例では、今後も MMP-II 血清抗体価の測定を含め、慎重に経過観

察が必要と思われた。

E. 結論

ハンセン病における再燃・再発のモニタリングシステムの確立には、血清 MMP-II 血清抗体価の変動をチェックすること以外に MMP-II 刺激などによる細胞性免疫能の評価も今後必要と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

	Control 10例		PB 6例 (IFNは5例)		MB 8例 (IFNは7例)	
	INF- γ pg/ml	IL-10 pg/ml	INF- γ pg/ml	IL-10 pg/ml	INF- γ pg/ml	IL-10 pg/ml
MLC- MMP-	134.9 \pm 115.1	23.1 \pm 8.6	1299.7 \pm 1368.4	46.4 \pm 24.1	403.5 \pm 531.0	16.7
MLC 4 μ g/ml	539.5 \pm 429.1	47.7 \pm 3.7	1615.0 \pm 1578.9	67.9 \pm 66.8	1767.4 \pm 2609.5	131.7
MLC 8 μ g/ml	789.1 \pm 679.0	14.1	1888.9 \pm 1333.0	78.7 \pm 93.4	2573.7 \pm 4675.0	38.6 \pm 42.5*,**
MMP-II 2 μ g/ml	1919.1 \pm 2162.3	570.7 \pm 403.8	1733.4 \pm 1207.4	1224.3 \pm 1319.7	1024.2 \pm 767.6	773.6 \pm 448.7*
MMP-II 4 μ g/ml	2913.4 \pm 3088.9	617.2 \pm 504.4	1706.6 \pm 1282.3	932.6 \pm 1157.9	1267.5 \pm 828.5	890.4 \pm 564.7**

Table 1. MLC、MMP-II刺激による末梢血単核球培養上清中のINF- γ 、IL-10の産生量(pg/ml)

値は、means \pm standard deviations

Welch's t-test *,**, p<0.01

Table 2. 刺激後の陽性CD4/8細胞(UR)の割合: 平均値、SD(standard deviation)

刺激条件	病型	IgG1(%)		IL-10 (%)		INF- γ (%)	
		CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
MLC- MMP-	正常9例	0.50	4.40	0.46	4.32	0.56	4.50
	SD	0.27	1.23	0.66	1.52	0.65	1.55
MLC 4 μ g/ml	正常9例	0.89	4.61	0.42	4.68	0.53	5.00
	SD	0.72	2.05	0.16	1.64	0.49	1.83
MLC 8 μ g/ml	正常8例	0.79	4.62	0.49	4.46	0.33	4.94
	SD	0.77	2.03	0.59	1.58	0.22	1.59
MMP-II 2 μ g/ml	正常9例	0.74	4.35	0.36	4.72	0.67	4.51
	SD	0.67	2.05	0.28	1.51	0.86	1.71
MMP-II 4 μ g/ml	正常8例	0.87	4.37	0.50	4.58	0.49	4.16
	SD	0.72	1.87	0.67	1.97	0.39	1.76
MLC- MMP-	PB6例	0.46	3.43	0.30	6.52	0.55	3.96
	SD	0.51	2.05	0.23	4.38	0.55	3.15
MLC 4 μ g/ml	PB6例	0.37	5.66	0.19	5.43	0.37	4.55
	SD	0.23	3.74	0.14	3.65	0.20	3.91
MLC 8 μ g/ml	PB6例	0.53	4.99	0.62	6.05	0.17	4.69
	SD	0.54	3.25	0.83	4.11	0.12	4.33
MMP-II 2 μ g/ml	PB6例	0.39	4.39	0.20	5.09	0.32	4.82
	SD	0.34	2.85	0.17	4.05	0.18	3.67
MMP-II 4 μ g/ml	PB6例	0.25	4.31	0.37	5.04	0.45	5.16
	SD	0.14	3.31	0.29	3.93	0.56	4.32
MLC- MMP-	MB8例	0.38	6.51	0.64	7.38	0.59	6.38
	SD	0.28	2.82	0.38	3.12	0.58	2.54
MLC 4 μ g/ml	MB8例	0.60	7.12	0.54	7.81	0.87	8.39
	SD	0.32	3.18	0.47	3.11	0.85	3.57
MLC 8 μ g/ml	MB8例	0.42	6.87	0.62	8.27	0.75	7.92
	SD	0.19	2.84	0.58	4.05	0.49	3.37
MMP-II 2 μ g/ml	MB8例	0.83	7.78	0.68	8.10	0.68	8.09
	SD	0.63	4.19	0.72	3.03	0.54	3.88
MMP-II 4 μ g/ml	MB8例	0.96	7.42	0.59	8.28	0.50	8.12
	SD	0.77	3.40	0.64	3.84	0.26	4.83

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23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)

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

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第8室長

研究要旨 らい菌がマクロファージのファゴゾーム内の脂質を維持する機構として、脂質の異化作用に関わる宿主の代表的な酵素である hormone sensitive lipase (HSL)タンパクのリン酸化が感染後1時間ではほぼ消失することを示した。多剤併用療法薬剤のうちクロファジミンは、らい菌感染による宿主遺伝子発現変化を打ち消すことを証明した。

A. 研究目的

ハンセン病の起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。

多菌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、脂質を蓄えており、らい菌はその中で生存している。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、上記のような観点から、らい菌の特殊性を解

明するために細胞内寄生の分子機構に関する研究を行う必要がある。そのために培養ヒト前単球由来THP-1細胞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。また、コントロールとして、らい菌加熱死菌およびラテックスビーズを用い同様の検討を行った。

THP-1細胞は10%ウシ胎児血清、2%非必須アミノ酸を添加したRPMI1640培地で培養し、 3×10^6 のTHP-1細胞に 3×10^7 の菌を用いた(MOI 10)。RNAの抽出はRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用い、cDNAはHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いた。PCR反応は以下のプライマーを用いた。HSL: 5'-CTCCTCATGGCTCAACTCCTTCC-3' (forward), 5'-AGGGGTTCTTGACTATGGGTG-3' (reverse); ADRP: 5'-TGTGGAGAAGACCAAGTCTGTG-3' (forward), 5'-GCTTCTGAACCAGATCAAATCC-3' (reverse); actin: 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' (forward); 5'-TGTGGTGGTGAAGCTGTAGC-3' (reverse)。増幅にはPCR thermal cycler DICE (TaKaRa Bio)を用い、既報の如くtouch down PCRを行った。

細胞からのタンパクは、50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP40, 20% glycerolとタンパク分解酵素阻害剤を

含む液で可溶化した後に遠心分離した上清を用いた。タンパクはSDS PAGEで分離後PVDF膜に転写後PBSTで洗浄し5% nonfat milk含PBSTでブロッキングした後に1次抗体と反応させた。洗浄後ビオチン標識2次抗体およびストレプトアビジン-HRPと反応させ、ECL Plus reagent (GE Healthcare)にて検出した。一部の実験では、THP-1細胞を24穴プレートに入れた円形カバーガラス上で培養した後に脂肪染色や免疫染色を行った。

また、多菌型ハンセン病患者の多剤併用療法(MDT)後の皮膚スミア材料を用いたRT-PCRにより消失していたHSL発現が回復する機序を解明する目的で、らい菌感染THP-1細胞を種々の濃度のリファンピシン、ダプソンおよびクロファジミンとともに培養し、HSL発現への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

ハンセン病組織皮膚スミア材料は、「国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査」で承認された内容に則って行った。

C. 研究結果

脂質の異化作用に関わる代表的な酵素である hormone sensitive lipase (HSL) タンパクの総量はらい菌感染6時間後より減少を示したのに対し、タンパク機能発現に重要である Ser563 位および

Ser565 位のリン酸化は感染後1時間でほぼ消失することが特異抗体を用いた Western blotting の結果明らかとなった。したがって、らい菌感染によって HSL の RNA およびタンパク発現レベルが抑制される以前に、HSL の脱リン酸化が起こり脂質異化作用が抑制されることが判明した。このことは、らい菌感染後速やかに THP-1 細胞内に脂質蓄積が起こり、免疫染色によって確認される HSL タンパクの減少と一致する結果であった。

また、多剤併用療法薬剤のうちクロファジミンは、らい菌感染によって発現量が低下した HSL 量を増加させ、らい菌感染により誘導される ADRP のレベルを下げるという、感染によって引き起こされる宿主遺伝子発現変化を打ち消す作用があることを証明した。リファンピシンおよびダプソンにはそのような作用は無かった。

D. 考察

HSL は、ホルモンが誘導する脂肪の異化作用を誘導する酵素として脂肪細胞で初めて発見された。脂肪細胞以外にマクロファージを始めとする多くの細胞で発現することが知られているが、マクロファージでは主に細胞質中に局在し、脂質を分解する際に脂肪的表面に移動することで、蓄積された TAG を遊離脂肪酸とグリセロールに分解して、再びエネルギーとして細胞外へ放出させる役割を担

っている。

THP-1 細胞にらい菌を感染させると短時間で HSL 発現が減少するが、さらに短時間のうちの HSL タンパクの脱リン酸化を行うことでその機能を阻害することが明らかになった。HSL 発現は *in vivo* においては、エネルギーレベルの変化によって修飾されることが知られている。

MDT 治療後の多菌型ハンセン病患者皮膚スミア材料における HSL 発現回復のメカニズムとしたクロファジミンの直接作用である可能性が示唆された。すなわち、クロファジミンはらい菌そのものに対する薬効だけでなく、らい菌感染によって減少した宿主マクロファージの脂質異化作用を回復させ、結果として細胞内の脂質が減少するように代謝状態を変化させることで、殺菌的に作用する可能性が示された。このことは、菌そのものの代謝活性などとは無関係に、細胞内寄生をしているという状態に対して薬効があることを示唆するものであり、リファンピシンおよびダプソンではそのような効果を認めなかったことからクロファジミンに特異的な作用であると考えられた。

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すると考えられた。一方で多剤併用療法薬剤のうち

クロファジミンはそのような作用を打ち消す働きがありそれが薬理作用の1つとして働いている可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki K, Akama T, Kawashima A, Yoshihara A, Yotsu RR and Ishii N. Current status of leprosy: epidemiology, basic science and clinical perspectives. *J Dermatol* 38:1-9, 2011.
- 2) Suzuki K, Tanigawa K, Kawashima A, Miyamura T and Ishii N. Chimpanzees used for medical research shed light on the pathoetiology of leprosy. *Future Microbiol* 6(10):1151-1157, 2011.
- 3) 石井則久、鶴殿俊史、藤澤道子、伊谷原一、谷川和也、宮村達男、鈴木幸一。チンパンジーとハンセン病。日本ハンセン病学会誌 80:29-36, 2011.
- 4) 森修一、鈴木幸一、スマナバルア、石井則久。2010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 80:37-46, 2011.
- 5) 四津里英、鈴木幸一、森修一、石井

則久。ハンセン病の診断。日本ハンセン病学会誌 80:59-70, 2011.

2. 学会発表

- 1) 永岡譲、鈴木幸一、谷川和也、石井則久。1型らい反応で再発したハンセン病の1例。第74回日本皮膚科学会東京支部学術大会。2011年2月11-12日、東京。
- 2) 松尾英一、坂井哲雄、野間口博子、鈴木幸一、脇坂晟、藤岡保範、神谷茂。らい菌人工培養の完成報告、並びに派生する周辺医学知識拡大の展望。第84回日本ハンセン病学会総会。2011年5月12-14日、岡山。
- 3) N. Ishii, K. Suzuki. Overview of Mycobacterioses. 22nd World Congress of Dermatology, Mycobacterial Skin Disease Symposia, May 24-29, Seoul.
- 4) 桜井準也、佐宗亜衣子、星野敬吾、谷川和也、森修一、石井則久、鈴木幸一、平田和明。鍋被り葬と分子古病理学—らい菌DNAの検出—。日本考古学協会第77回(2011年度)総会。2011年5月28-29日、東京。
- 5) K. Suzuki, T. Udonon, M. Fujisawa, K. Tanigawa, G. Idani, T. Miyamura and

N. Ishii. Infection during Infancy and Long Incubation Period of Leprosy: A West African Chimpanzee Shows Signs of Leprosy after 30 Years in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology). September 6-10, 2011, Sapporo.

- 6) 鈴木幸一。古病理学における感染症証明への分子病理学の応用。第65回日本人類学会大会、シンポジウム 5「古病理学の新たな展開」。2011年11月4-6日、那覇。

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23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:これまでに、LipoKが宿主のらい菌感染防御機構に大きな役割を担っていることを明らかにしてきた。LipoKによりT細胞からIFN- γ 産生が誘導され、細胞傷害性分子であるグラニューライシンおよびグランザイムBの産生能が増強された。しかしながら、T細胞の活性化にLipoKがどのように関わっているか、その機序は不明であった。そこで、菌体成分の分布をらい菌膜蛋白に対する抗体で調べたところ、T細胞存在下では菌体成分は細胞の膜の方に移行していた。さらに、LipoKはらい菌感染樹状細胞が放出するエクソソーム中の抗原提示関連分子及びらい菌膜蛋白由来分子の含量を増強することで、T細胞の活性化を増強することが分かった。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

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、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。さらに、LpKのN末端をコードしたリポペプチド LipoKにより、樹状細胞が刺激され、T細胞からのグランザイムBまたはグラニューライシンの産生が増強された。そこで、その機序を解明するため、らい菌抗原を用いて抗原の分布をコンフォーカル顕微鏡で観察し、T細胞の活性化に関与しているエクソソ-

ームの解析を行った。エクソソームに着目することで、今後らい菌由来の新たな分子を同定できると考えられた。

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0.05mg/mlの濃度で分注し保存した。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して分析し

た。T 細胞は Dynabeads untouched human T cell を用いて精製した。樹状細胞-T 細胞培養後、4-6 日目に細胞を染色し、コンフォーカル顕微鏡で観察した。抗らい菌膜タンパクに対するポリクローナル抗体はブレナン博士から分与された。細胞内らい菌を確認するため、オーラミンO抗酸菌染色を行った。T 細胞と混合培養した樹状細胞の活性化は、表面抗原 MHC class I, II, CD86 の発現を指標とし FACS Calibur にて測定した。培地中に放出されるエクソソームの精製はヒト MHC Class II ビーズを用いて行った。

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

感染細胞を破壊する機構において CTL 細胞が重要な役割を担っている。らい菌感染樹状細胞を LipoK 刺激すると、より多くのパーフォリン、グランザイム、グラニュライシンが T 細胞から産生された。その条件下で樹状細胞の変化をコンフォーカル顕微鏡で観察すると、らい菌の膜抗原が樹状細胞の膜表面側に観察さ

れることから、らい菌のタンパクがプロセッシングを受けていると考えられる (Fig. 1)。らい菌感染樹状細胞を T 細胞と混合培養するとそのような現象は見られないが、樹状細胞を LipoK で刺激すると、細胞膜側に菌体成分が見られることから、LipoK は TLR2 を介し、より強力に T 細胞に抗原提示を行うと考えられる。つぎに樹状細胞の細胞表面の抗原を FACS で分析すると、MHC class I, II, CD86 の発現が増加していることが明らかになった (Fig.2)。樹状細胞を LipoK で刺激したのみでも、細胞表面抗原の発現が増強されるが、T 細胞と混合培養すると、さらに樹状細胞が活性化される事が分かった。

らい菌感染樹状細胞を LipoK でパルスし、放出されるエクソソームを ClassII ビーズで精製し、解析を行った。これまでに、FITC(蛍光)ラベルしたらい菌を用いると LipoK 刺激によって、エクソソームの蛍光強度が増加することが確認された。Class I, II, CD86 抗原も検出された、らい菌抗原の存在を確認するため、ウエスタン法で解析を行った。その結果、約 35kD のバンドが抗らい菌膜抗体で検出された (Fig.3)。LipoK の刺激によって、らい菌抗原がエクソソーム中にも存在し、何らかの T 細胞活性化に関わっていると考えられた。

D. 考察

LipoK は、樹状細胞を活性化し、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。そのメカニズムを解明するため、らい菌膜蛋白に対する抗体で LipoK で活性化した樹状細胞を染めた。その結果、樹状細胞の膜側にらい菌抗原が移行することから、LipoKはらい菌抗原のプロセッシングにも関わっていると考えられた。さらに、LipoK はらい菌感染樹状細胞が分泌するエキソソーム中の抗原提示関連分子及びらい菌膜蛋白由来分子の含量を増強することで、T細胞の活性化を増強することが示唆された。

E.結論

LipoK は、らい菌感染細胞を活性化し、T細胞の存在下でより高い効率で細胞内菌が抗原提示され、T細胞が活性化されることから、LipoK は免疫療法に活用しうる分子であると考えられた。

G.研究発表

論文発表

- 1) Maeda Y, Tamura T, Fukutomi Y, Mukai T, Kai M, Makino M. A lipopeptide facilitate induction of *Mycobacterium leprae* killing in host cells. PLoS Negl Trop Dis. 5(11): e1401, 2011.
- 2) Fukutomi Y, Maeda Y, Makino M. Apoptosis inducing activity of clofazimine in macrophages. Antimicrob

Agents Chemother. 55(9): 4000-4005, 2011

2.学会発表

- 1) 福富康夫、前田百美、松岡正典、牧野正彦、ハンセン病におけるマクロファージのらい菌に対する殺菌機構の解明、第84回日本ハンセン病学会総会、2011年5月
- 2) Maeda Y, Tamura T, Kai M, Fukutomi Y, Makino M, Induction of intracellular killing of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells by a lipopeptide mediated activation of T cells. IUMS Congress, Sapporo, Japan, Sept 6-10, 2011.
- 3) Mukai T, Matsuoka M, Maeda Y, Miyamoto, Fukutomi Y, Makino M, Identification of novel promoter of mycobacteriophage TM4 to obtain fluorescent *Mycobacterium leprae*. IUMS Congress, Sapporo, Japan, Sept 6-10, 2011.
- 4) Miyamoto Y, Matsuoka M, Fukutomi Y, Mukai T, Kai M, Maeda Y, Makino M, Characterization of intracellular metabolites from *Mycobacterium leprae*. IUMS Congress, Sapporo, Japan, Sept 6-10, 2011.

H.知的財産権の出願・登録状況 なし

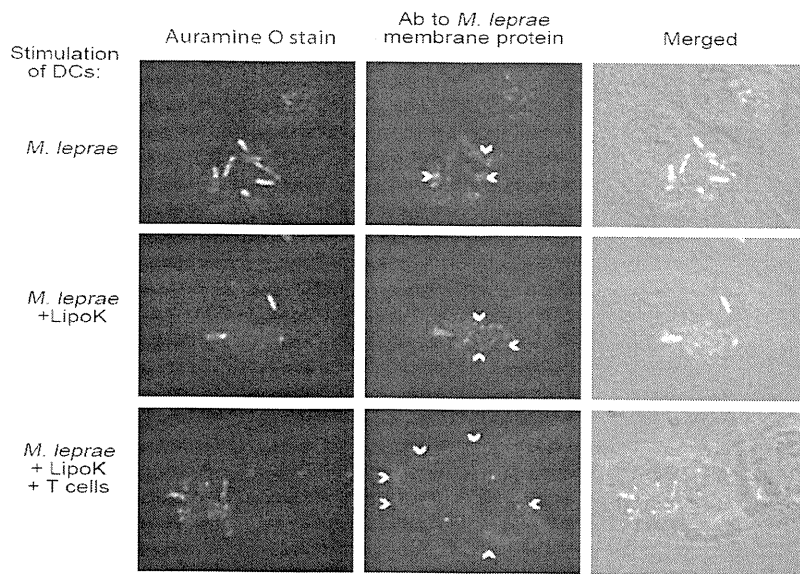


Figure 1. Localization of the membrane components of *M. leprae* at the periphery of DCs. Arrow heads indicate staining of *M. leprae* membrane proteins.

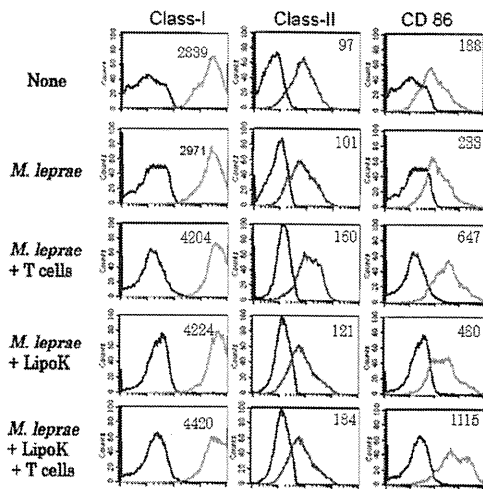


Figure 2. Expression of DC surface antigen after co-culture with T cells. Numbers indicate

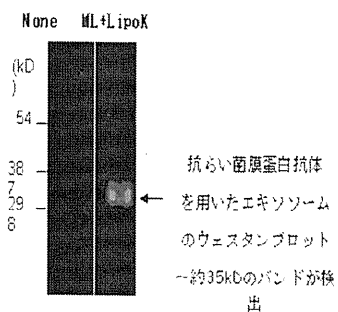


Figure 3. Western blot shows band of about 35kD protein

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23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)

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 ハンセン病のワクチンとして BCG の使用は、その効果の評価は様ざまである。しかし、BCG は、結核のワクチンとして長期間使用され、安全性は非常に高いと考えられる。らい菌と同じ抗酸菌である BCG の改変およびらい菌抗原を発現させることにより、ワクチンとしての能力向上の開発を行った。これまでの抗原解析では、抗酸菌由来 Hsp70 とらい菌 MMPII の融合蛋白を BCG に plasmid 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。さらに、本抗原を、BCG ゲノムに組み込まれた1コピー遺伝子から安定かつ充分量発現する promoter 候補領域を抗酸菌ファージに同定してきた。抗原候補である融合蛋白の発現を行った。その結果、組み込み型による Hsp70 とらい菌 MMPII 融合蛋白は、plasmid 型発現と同等の発現量を確認した。さらに、安全性を得るために、BCG クローニングに用いた薬剤耐性遺伝子の除去を行い、長期に渡る組換え BCG の培養においても十分量の抗原を分泌した。安定・安全なハンセン病ワクチンとして使用が可能であると考えられた。

A. 研究目的

BCG は、樹立以来、長期間の使用より安全性の非常に高いことが知られている。BCG は、ハンセン病と同じ抗酸菌感染症である結核のワクチンのため、ハンセン病ワクチンとして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必要と考えられる。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、plasmid 発現による BCG 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、現実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、抗原

発現遺伝子の BCG ゲノムへの組み込み型による組換え BCG が必要となる。しかし、既存の promoter では組み込み型遺伝子発現量は不十分なため、抗酸菌ファージより強力な promoter 領域を同定してきた。同定された領域より強い3プロモーター領域を用い BCG もしくはらい菌 Hsp70 とらい菌 MMPII 融合蛋白の組み込み型発現 BCG を構築し、プラスミド発現と同等の抗原産生量であることを示してきた。今回、構築された BCG より、薬剤耐性遺伝子除去を行った。

一方、ワクチン開発において、その効果と安全性の評価のために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進めた。

B. 研究方法

らい菌抗原発現 BCG の構築

抗酸菌ファージ由来 promoter と BCG もしくはらい菌 Hsp70 とらい菌 MMP II 融合蛋白遺伝子を pUC18 へ組み込んだ。その領域の上下流にウレアーゼ配列を導入した。この plasmid を、抗酸菌ファージ由来 recombinase 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、ウレアーゼ試験陰性 clone を選択した。選択された clone より pJV53 を脱落したクローンを選択し、resolvase を発現する pYUB870 を導入した。さらに hygromycin 感受性の株を選択し、pYUB870 を脱落したクローンを選択した。各段階で菌体を可溶化し抗 MMP II 単抗体によるウエスタンブロット法を用い発現の確認を行った。

カニクイザルによるらい菌感染系の構築

平成16年度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 6 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進めた。

(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

Promoter として P79,P85,P86 を、Hsp70 として BCG もしくはらい菌由来を、MMP II としてらい菌由来を持つ plasmid を urease 配列内に組み込み urease 破壊各種抗原発現 BCG 株を構築した。安全・安定な BCGV 構築のためまず、カナマイシン耐性遺伝子を持つ pJV53 脱落クローンを選択した。次に Hygromycin 遺伝子両端にある res 配列と反応し、耐性遺伝子を切り出す resolvase をコードする pYUB870 を遺伝子導入後、hygromycin 感受性菌を選択した。さらにカナマイシン遺伝子を持つ pYUB870 を脱落させ発現クローンを選択した。各種クローンの菌体外分泌能を、sauton 培地培養後、濃縮しウエスタンブロット法にて分泌量を比較した。

カニクイザルらい菌感染系の構築

昨年度、幼若サル、鼻尖接種の1頭に接種後58、59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が、その後この個体では陽性は認められなかった。妊娠群においては、2 頭の母ザルに鼻腔洗浄液の PCR で、陽性を認めた。(図2)

D. 考察

改変 BCG の構築

安全かつ安定な組換え BCG を構築するために、これまで抗酸菌内で強力に働く promoter 領域を抗酸菌ファージ