

201123022A

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

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御

を介した治療予防法の開発戦略

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

平成24(2012)年3月

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

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御  
を介した治療予防法の開発戦略

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

平成24(2012)年3月

## 目 次

総括研究報告書：結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御を介した治療予防法の開発戦略 牧野 正彦（国立感染症研究所）	-----1
分担研究報告書：初回免疫ワクチンの開発 牧野 正彦（国立感染症研究所）	-----10
分担研究報告書：結核及び非結核性抗酸菌の迅速な菌種同定法の確立と治療法開発 荒川 宜親（国立感染症研究所）	-----17
分担研究報告書：新規ワクチン開発のための基礎研究 －Th1 誘導型ペプチドによる細胞障害性メモリーT 細胞の分化誘導機構の開発－ 田村 敏生（国立感染症研究所）	-----21
分担研究報告書：慢性持続感染機構解明のための抗酸菌制御システムの解析 星野 仁彦（国立感染症研究所）	-----26
分担研究報告書：自然免疫系による結核感染防御機構の解析 竹田 潔（大阪大学）	-----30
分担研究報告書：結核慢性感染の成立・維持における肺環境内恒常性に関する研究 河村 伊久雄（京都大学）	-----33
研究成果の刊行に関する一覧表	-----38

平成23年度 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)

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御  
を介した治療予防法の開発戦略

総括研究報告書

研究代表者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

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）  
総括研究報告書

結核等抗酸菌感染症における生体防御及び抗菌制御を介した治療予防法の開発戦略

研究代表者 牧野 正彦（国立感染症研究所・感染制御部・部長）

研究要旨.

中国・ロシアで出現し全世界に広がりつつある多剤耐性結核菌は世界の恐怖であり、日本に多い北京株は耐性化し易いこともあって日本もこの恐怖から逃れることは容易ではないと同時に、この問題に的確に対処する方法を人類は未だ勝ち得ていない。この問題に対応し抜本的対策を打ち立てるため、発展性に富んだ基礎的かつ応用的開発研究を行うことを大目標として設定した。生体防御反応に負の因子を与える PD-1 分子を欠損させると、マウス生体内で結核菌に対する CD4 陽性 T 細胞が抗原特異的に異常に強く活性化され、マクロファージにおいてサイトカインストームを発生させ、非常に強い炎症反応を惹起し、早期の個体死を誘導した。結核の制御においては、炎症反応と生体防御反応をバランス良く保つことが重要であることが示唆された。ワクチンの開発においては、非常に大きな進展があった。初回免疫ワクチンとしてリコンビナント BCG の開発を目標として設定したが、生体内において経気道感染した結核菌の増殖を従来の BCG に比し有意に強く抑制し得るリコンビナント BCG が開発された。日本国内初の開発であった。また、結核は未だに高齢者に有意に認められる慢性感染症であるが、その発症を予防する上で CD8 陽性キラー T 細胞の果たす役割は極めて大きい。CD8 陽性キラー T 細胞の産生には、IL-17F を介した樹状細胞の活性化が必須であることがつきとめられ、今後追加免疫用ワクチンの開発が進展するものと期待される。結核に対する新しい治療法の開発にも大きな進展があった。結核菌特異的遺伝子の作用を阻害するリード化合物の探索が行われ、7 種のリード化合物が同定され、新規抗結核薬の開発の道筋が得られた。また、結核菌感染早期に自然免疫反応を利用して結核菌の増殖を抑制する分子が同定された。今後、結核菌曝露者に対する発症予防剤の開発に繋がると期待される。

研究分担者

荒川 宜親（名古屋大学大学院医学研究科・細菌学・教授）  
田村 敏生（国立感染症研究所・感染制御部・室長）  
星野 仁彦（国立感染症研究所・感染制御部・室長）  
竹田 潔（大阪大学大学院医学研究科・免疫制御学・教授）  
河村 伊久雄（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・准教授）

A. 研究目的

日本人結核患者から分離同定される結核菌の 70%は北京株である。全世界に恐怖を与えている多剤耐性菌は特に中国及びロシアで蔓延しており、こうしたことから判る

ように北京株は極めて耐性化し易い。一方、アメリカ・ヨーロッパで分離される耐性菌は、北京株とは異なる亜集団に分類される。したがって、日本では独自の耐性菌対策を確立する必要性が高い。耐性菌への対応の

基本は、発症予防方策の樹立、早期発見技術の開発、耐性菌の簡易・迅速診断技術の開発、現行の治療法に代わるより有効な治療法の開発である。北京株が耐性化し易い遺伝的背景として、歴史的 BCG 接種も考察されている。すなわち、不十分なワクチンを長期にわたり投与したための結果として北京株が誕生したと考えられている。当研究班では、こうした歴史的背景に立って予防方策と治療法策の開発に重点を置いた研究を展開した。

また、結核菌の主感染ルートは経気道飛沫（エアロゾル）感染である。結核菌が肺胞にまで達すると、肺胞内の免疫学的特殊性に立脚した肺胞内分裂が促進される。そこで、肺胞内の免疫学的特殊性をより詳細に検討し、治療・予防法の開発を容易にすることを主目的とした基礎研究を行うことを第二の目的とした。

以下に主な研究課題を挙げる。

1. 結核菌のマイクロ RNA を利用し、結核菌の伝播性を把握する方策の開発（星野）
2. 結核菌と宿主免疫応答の相互作用の結果、結核菌をマクロファージ等の抗原提示細胞内に封じ込めるために必要な宿主因子の解析（河村）
3. 結核菌に対する宿主自然免疫応答に基づく自然免疫応答を利用した結核治療法の開発（竹田）
4. 結核菌の増殖に必須な酵素を選択的に阻害する化合物の同定を通じた新規抗結核薬の開発（荒川）
5. 結核発症を予防するための新規リコンビナント BCG の開発とその評価（牧野）
6. 農村型再燃型結核発症を抑制し得るタイプ 1 CD4 陽性 T 細胞の選択的活性化のための免疫学的戦略の開発（田村）

## B. 研究方法

1. 結核菌 H37Rv から Total RNA を抽出し、さらに micro RNA (mRNA) を精製し、出現頻度の高い 6 種類を選択した。H37Rv に対して、Oxidative stress 及び Hypoxic stress を負荷し、mRNA の発現

量を PCR 法で解析した（星野）。

2. 免疫性抑制シグナルである PD-1 を欠損する遺伝子改変マウスに結核菌 H37Rv を 300 cfu 経鼻感染させ、本マウスの結核菌感受性を肺内結核菌数及び生存率で解析した。さらに、PD-1 欠損マウスの CD4 陽性 T 細胞の結核異常高感受性に果たす役割を検討した（河村）。
3. 自然免疫関連遺伝子の結核感染防御における役割を遺伝子欠損マウスを作製して解析した。候補遺伝子として Guanylate-binding protein (GBP) family、Hyaluronan synthase 1.3 (HAS1, HAS3) 及び細胞内 DNA センサーとして同定された Absent in Melanoma 2 (AIM2) を選択して検討した（竹田）。
4. 抗酸菌特異的加リン酸分解酵素 (Rv2613c) にのみ結合して、本酵素の活性を阻害する新規化合物をデザインするために必要なリード化合物候補の探索を、Rv2613c の立体構造情報に基づいて結合計算化学システムによるドッキングシュミレーション解析を行った（荒川）。
5. ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に結核菌 Major Membrane Protein (MMP)-II をコードする遺伝子と BCG 菌由来 Heat Shock Protein (HSP) 70 をコードする遺伝子を連結し組み込ませ、新しいリコンビナント BCG (BCG-DHTM) を作製した。BCG-DHTM の T 細胞活性化能を IFN- $\gamma$  産生能を指標に、樹状細胞の活性化能をフェノタイプ及びサイトカイン産生能を指標に評価した。さらに、BCG-DHTM のワクチン効果をマウスを用いて評価した（牧野）。
6. 機能的 CTL の分化誘導性樹状細胞の産生における IL-17F の役割を検討した。さらに、IL-17F を産生する活性化 CD4 陽性の特徴づけを FACS を用いて解析した（田村）。

倫理面への配慮 国立感染症研究所および当該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細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。動物実験は、当該研究施設の動物実験委員会の承認を得た上で、実験動物倫理指針に基づいて実施した。

### C. 研究結果

1. 選択した 6 種類の mRNA の発現は、低 pH 条件と低酸素条件とは異なるパターンを示した (星野)。
2. 正常マウスに比し、PD-1 欠損マウスは結核菌に対して著しい感受性を示し、種々の炎症性サイトカインやケモカインの産生が亢進し、マクロファージと好中球を中心とした炎症性細胞の著明な肺胞浸潤と広範な炎症性病変が惹起され、早期の個体死が誘導された。PD-1 欠損マウスの肺内に IFN- $\gamma$  産生性抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の著明な増加が認められ、RAG2 欠損マウスへの CD4 陽性 T 細胞の移入実験等により、CD4 陽性 T 細胞の非生理的異常活性化が、著しい炎症と個体死を誘導していることが判明した (河村)。
3. GBP family あるいは HAS1 を欠損するマウスは野生型マウスと比し結核菌感受性に差は認められなかった。一方、AIM2 欠損マウスは、野生型マウスに比し有意に強い結核菌感受性を示し、肺及び肝臓における結核菌数の上昇と早期の個体死が誘導された。その原因として IL-18 と IFN- $\gamma$  の産生欠如が大きく関与していると考えられた (竹田)。
4. 特徴的な多量体構造を利用した特異的な基質結合部位を形成している結核菌由来 Rv2613c にのみ結合して活性を阻害する新規化合物をデザインするために必要なリード化合物が 14 種類選定

された。これら候補化合物は、複数の環構造やリン酸基、スルホ基を有する構造が多く、既存の抗結核薬の構造とは類似性を有していなかった (荒川)。

5. BCG-DHTM は、ヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を強く活性化し大量の IFN- $\gamma$  を産生した。未感作 CD8 陽性 T 細胞の活性化は、BCG-DHTM から分離された HSP70-MMP-II 融合蛋白に依存し、その活性化は Cytosolic 経路による Cross Presentation により生じていた。さらに、BCG-DHTM をマウスに接種すると、メモリー T 細胞を産生し、その効果は長期持続した。さらに、BCG-DHTM を皮下接種すると、親 BCG に比し有意に強く経気道感染して結核菌の増殖を抑制した (牧野)。
6. IL-17F が CTL の産生に不可欠な樹状細胞を産生誘導し、さらに IL-17F は Th17 細胞とは異なる細胞集団であり、かつ IFN- $\gamma$  非産生性ヘルパー T 細胞であることが判明した (田村)。

### D. 考察

一般に耐性菌は、不十分な治療が原因となり生体内に残存する起因菌が変化し誕生すると考えられている。日本においては、結核に対する治療方法は確立されており、6 ヶ月からの半強制的入院加療を義務付けられているため、不十分な治療が原因となって耐性菌が作出される確率は比較的低い。そのことは、近年の日本における MDR 及び XDR の出現率からも裏付けられている。しかし、その一方薬剤が投与されれば必ずその薬剤に対して耐性を獲得する菌が存在することも事実であり、さらに、結核菌の場合抗結核薬に直面する以前より耐性を獲得している菌も存在する。また、交通手段が非常に発達し、海外からヒトを介して耐性菌が日本へ運び込まれることも危惧されている。このような状況下で、日本の真の MDR あるいは XDR に対する対処法を考えた時、日本ではこれに打ち勝つすべを現在までに勝ち得ていない。したがって、結核の発症を未然に防ぐ予防方策の確立と、多剤耐性

菌を念頭に置いた新しい治療法の確立は、近い将来までに達成しなければならない急務となっている。

予防法の確立においては、ワクチンの果たす役割が大きい。日本の結核は、若青年層をも巻き込む都市型結核と高齢者が中心となる農村型結核に大別される。基本的に両者を抑制する方法として、初回免疫ワクチンの果たす役割は大きく、改良型 BCG の開発に大きな期待が寄せられている。本研究班で作製したリコンビナント BCG は、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に結核菌の MMP-II と BCG の HSP70 をコードする遺伝子を連結し導入したものであるが、現行の BCG-Tokyo 株に比し、非常に強くヒトの未感作 CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞を活性化、タイプ 1 T 細胞へと分化誘導し、ひいては細胞傷害性を有するキラー CD8 陽性 T 細胞を産生するとともに、両サブセットメモリー T 細胞を *in vivo* 及び *in vitro* で産生した。したがって、抗結核ワクチンとしての必要条件を十分満たしていた。さらに、期待された通りに経気道感染した結核菌の増殖を強く抑制した。現在の BCG を凌駕する新規リコンビナント BCG が国内で初めて開発された。

一方、遺伝子改変マウスを用いた研究からも重要な結論が得られた。免疫抑制性副因子 PD-1 を欠損するマウスに BCG を接種すると、BCG に対して強い免疫反応が惹起され、BCG は逸早く生体外へ排除される。ところが、同じ PD-1 欠損マウスに結核菌を感染させると、BCG を接種した時と同様に強い免疫反応、特にマクロファージを強く活性化し、サイトカインバーストを誘導する。こうした著しく強い免疫反応状況下では、結核菌はむしろこの反応を利用して増強し、感染マウスの個体死を誘導する。しかし、PD-1 欠損マウスに BCG を接種し、強力に T 細胞を活性化し大量のメモリー T 細胞を産生した後、結核菌を感染させると結核菌の増殖は強く抑制された。したがって、結核菌抗原に反応するメモリー T 細胞を大量に産生しておくこと、極めて有効に結核菌の増殖を抑制することが改めて証明された。す

なわち、初回免疫ワクチンは、未感作の T 細胞を強く活性化しメモリー T 細胞を産生する能力を有していることが絶対的条件であることが証明された。T 細胞は CD4 陽性 T 細胞も CD8 陽性 T 細胞もいくつかの亜集団に分類される。抗結核作用を有する T 細胞はタイプ 1 T 細胞である。本研究班においては、タイプ 1 CD4 陽性 T 細胞及びタイプ 1 CD8 陽性 T 細胞を選択的に活性化する因子を探索した。日本の結核は都市型と農村型に分かれ、都市型結核はアウトブレイクといった華々しい感染症をしばしば呈するが、依然として農村型結核も重要な位置を占め、日本の結核の 80% は高齢者結核であり、その多くが再燃型結核となっている。幼児期に 1 回接種した初回免疫ワクチンが 70~80 年間その効力を維持することは甚だ難しく、追加免疫ワクチンまたはコンポーネント・サブユニットワクチンが重要となる。再燃型結核の発症を抑制するためには、CD8 陽性 T 細胞の活性化が重要である。本年度の研究により、CD8 陽性 T 細胞を活性化するために必須な樹状細胞の活性化を誘導する因子として IL-17F が同定された。さらに、IL-17F は、これまで明らかにされてこなかった CD4 陽性 T 細胞亜集団から分泌されることも明らかとなった。今後、IL-17F の産生を誘導する抗原の同定が期待される。

新しい治療法の実現においては、二つの大きな研究成果が得られた。現在の日本の結核化学療法は 4 剤を用いた多剤併用療法であり、この 4 剤に対して耐性を示す結核菌も同定されており、異なる 4 剤による併用療法の開発が待たれ、現在では 3 種類の薬剤が認可を待つに至っている。こうした薬剤が開発され臨床で用いられたとしても、これらに対する耐性菌もやがて出現するであろう。そうした意味において新規結核薬の開発は永遠のテーマであるといっても過言ではない。結核治療においては 6 ヶ月間の薬剤投与が基本となっているため、広域な病原体に効果を示す薬剤は副反応を示す可能性も高い。すなわち、結核菌に特異的に作用する薬剤の開発が必須である。本研究班では、結核菌細胞壁に存在し結核菌の



構造形成に深く関与する遺伝子が産生する酵素が結核菌特異的であり、この酵素の機能を阻害する化合物を *in silico* で同定した。現状では、化合物の同定から新薬開発までは平均 13 年必要とされており、今後長い道のりが予想されるが、新薬にまで育つことを期待したい。

結核菌に対する生体防御反応では自然免疫の果たす役割は大きい。これまでマクロファージを介した自然免疫を誘導する SLPI などの宿主由来分子が結核菌の増殖を抑制することを見出し、さらに、本年度新たな自然免疫活性化経路が明らかとなった。この酵素を阻害する因子が同定されれば、自然免疫を介した新しい治療薬、特に排菌患者接触者に予防的投与し得る薬剤が開発されるものと期待される。以上のように、新しい予防・治療法の開発において大きな進展がみられた。

#### E. 結論

結核に対する新しいワクチン開発において一定の成果が挙げられ、研究班が目指すワクチン開発の方向性が正しいことが証明された。さらに、新しい治療法の開発に大きな進展があった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Hattori, A. Yamamoto, S. Wada, K. Hatai, M. Makino, and N. Ishii. 2011. *Mycobacterium pseudoshottsii* isolated from 24 farmed fishes in western Japan. *J. Veterinary Medical Science*, in press.
- 2) Nakanaga, K., Y. Hoshino, M. Wakabayashi, N. Fujimoto, E. Tortoli, M. Makino, T. Tanaka, and N. Ishii. 2011. *Mycobacterium shigaense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic mycobacterium that produced nodules in an erythroderma patient with severe cellular immunodeficiency and a history of Hodgkin's disease. *J. Dermatol.*, in press.
- 3) Ariga, H., H. Nagai, A. Kurashima, Y. Hoshino, S. Shoji, and Y. Nakajima. 2011. Stratified Threshold Values of QuantiFERON Assay for Diagnosing Tuberculosis Infection in Immunocompromised Populations. *Tuberculosis Research and Treatment*, in press.
- 4) Otsuki, T., S. Izaki, K. Nakanaga, Y. Hoshino, N. Ishii, and K. Osamura. 2011. Cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection: a sporadic case in Japan. *J. Dermatol.*, in press.
- 5) Onoe, H., K. Nakanaga, R. R. Yotsu, Y. Hoshino, N. Ishii, T. Takeuchi. 2011. Buruli ulcer accompanied by pain in a Japanese patient. *J. Dermatol.*, in press.
- 6) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, and M. Makino. 2011. A lipopeptide facilitate induction of *Mycobacterium leprae* killing in host cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5 : e1401.
- 7) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. 2011. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan from 1980 to 2010. *J. Clin. Microbiol.*, 49: 3829-3836.
- 8) Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, K. Kobayashi, H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.*, 193: 5766-5774.
- 9) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. 2011. Apoptosis-inducing activity

- of clofazimine in macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 4000–4005.
- 10) Kai, M., N. H. Ngvyen Phvc, H. A. Ngvyen, T. H. Pham, K. H. Ngvyen, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Makino, and T. T. Ngvyen. 2011. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. *Clin. Infect. Dis.*, 52: e127–e132.
  - 11) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. 2011. Immunostimulatory activity of major membrane protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.*, 18: 235–242.
  - 12) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. 2011. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae folPI* gene and Dapsone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 762–766.
  - 13) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Era, K. Matsumoto, Y. Kanazawa, A. Tomita, M. Furuta, M. Washizu, M. Makino, and N. Ishii. 2011. Multiple cases of cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection in a “hot spa” in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 49: 613–617.
  - 14) Saiga, H., Y. Shimada, and K. Takeda. 2011. Innate immune effectors in mycobacterial infection. *Clin. Dev. Immunol.*, 2011: 347594.
  - 15) Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. 2011. Structural insights into the novel diadenosine 5', 5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetrphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J. Mol. Biol.*, 410: 93–104.
  - 16) Daim, S., I. Kawamura, K. Tsuchiya, H. Hara, T. Kurenuma, Y. Shen, S. R. Dewamitta, S. Sakai, T. Nomura, H. Qu, and M. Mitsuyama. 2011. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein in *Mycobacterium smegmatis* induces low tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 production in murine macrophages. *J. Med. Microbiol.*, 60: 582–591.
2. 学会発表
    - 1) Makino, M., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and T. Mukai. Naïve T cell activation by urease-deficient recombinant BCG that produces HSP70–MMP–II fusion protein. US–Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7–9 December, 2011, Saitama, Japan.
    - 2) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of mycobacteria. US–Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7–9 December, 2011, Saitama, Japan.
    - 3) Tamura, T., and M. Makino. The role of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein in the induction of Th1 immune response. US–Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7–9 December, 2011, Saitama, Japan.
    - 4) Mukai, T., Y. Maeda, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Development of a stable and high recombinant protein expression system in mycobacterium. US–Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7–9 December, 2011, Saitama, Japan.

- 5) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Anti-*M. leprae* activity and phox localization in human macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 6) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, T. Mukai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Increased expression of cytolytic effector proteins in human T cells co-cultured with dendritic cells by stimulation with *Mycobacterium leprae* lipopeptide. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 7) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, I. Yano, and M. Makino. Functional analysis of *mmaA2* and *mmaA4* in *Mycobacterium bovis* BCG Connaught. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 8) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. Yotsu, N. Ishii, and M. Makino. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan, 1980-2010. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 9) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* *rpoB* gene and rifampicin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. 51<sup>st</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 17-20 September, 2011, Chicago, USA.
- 10) Tamura, T., and M. Makino. Peptide-25 of Ag85B induces Th1 differentiation in a T-bet-independent manner. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 11) Maeda, Y., T. Tamura, M. kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Induction of intracellular killing of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells by a lipopeptide-mediated activation of T cells. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 12) Nakata, N., M. Matsuoka, M. Makino, and M. Kai. Whole-genome comparison of *Mycobacterium leprae* strains differing in growth rate. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 13) Mukai, T., M. Matsuoka, Y. Maeda, Y. Miyamoto, Y. Fukutomi, and M. Makino. Identification of novel promoter of Mycobacteriophage TM4 to obtain fluorescent-*Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 14) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. kai, Y. Maeda, and M. Makino. Characterization of intracellular metabolites from *Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.

- 15) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, I. Yano, and M. Makino. Establishment and characterization of knockout mutants of *Mycobacterium bovis* BCG gene involved in mycolic acid synthesis pathway. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 16) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. Activation of human naïve T cells of both CD4 and CD8 subsets by *Mycobacterium tuberculosis* major membrane protein II. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 17) Kiyoshi Takeda. Regulation of intestinal homeostasis by microbiota and innate immunity. The 46<sup>th</sup> US-Japan Cholera Conference, Dec 13-15, 2011, Kolkata, India
- 18) Kiyoshi Takeda. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. The New Zealand Australian Society for Immunology Branch Meeting 2011, June 30-July1, 2011. Wellington, New Zealand
- 19) Mori, S., K. Shibayama, J. I. Wachino, and Y. Arakawa. Structural Insights into the Novel Diadenosine Tetraphosphate Phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
- 20) Kawamura, I., K. Tsuchiya, H. Hara, R. Fang, and M. Mitsuyama. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to secretion of IL-1 $\alpha$  from infected macrophages through the induction of calcium influx. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September, 2011, Hokkaido, Japan.
- 21) Sakai, S., I. Kawamura, K. Tsuchiya, T. Okazaki, and M. Mitsuyama. PD-1 regulates the balance between protective and pathologic immune responses during murine tuberculosis. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September, 2011, Hokkaido, Japan.
- 22) 甲斐雅規, 松岡正典, 宮本友司, 中田登, 牧野正彦. 増殖能の異なるらい菌株間のゲノム比較解析. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
- 23) 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・学術大会 2011年5月 岡山市
- 24) 向井 徹, 松岡正典, 前田百美, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦. 蛍光蛋白発現らい菌構築のための検討. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
- 25) 中田 登, 甲斐雅規, 牧野正彦. 培養可能抗酸菌を利用したらい菌リファンピシン耐性変異の解析. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山
- 26) 中永和枝, 星野仁彦, 四津里英, 牧野正彦, 石井則久. 日本のブルーリ潰瘍: 確定診断のための検査に関する検討. 第84回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2011年5月 岡山市
- 27) 田村敏生, 下袴田陽子, 牧野正彦. 結核菌分泌蛋白由来 Peptide-25 による T-bet 非依存的 Th1 分化誘導機構の解析. 第40回日本免疫学会総会 2011

- 年 11 月 千葉
- 28) 塚本裕美子、田村敏生、牧野正彦.  
Immunostimulatory activity of major membrane protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. 第 40 回日本免疫学会総会 2011 年 11 月 千葉
- 29) Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, A unique subset of intestinal myeloid cells suppress T cell-dependent intestinal inflammation. 第 40 回日本免疫学会学術集会 (国際シンポジウム) 2011 年 11 月 27-29 日、千葉
- 30) Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama. Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. 日本食品免疫学会第 7 回学術大会、2011 年 10 月 18-19 日、東京
- 31) 竹田潔, 自然免疫と炎症性疾患. 第 48 回日本眼感染症学会、2011 年 7 月 8-10 日、京都
- 32) 竹田潔, 自然免疫による腸管免疫の制御. 第 28 回日本医学会総会、2011 年 4 月 8-10 日、東京
- 33) 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親. 結核菌由来新規 diadenosine 5', 5'''-P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>-tetrphosphate 加リン酸分解酵素の活性発現に関わる構造的要因の解明. 第 63 回日本生物工程学会 2011 年 9 月 東京
- 34) 河村伊久雄. 結核菌の病原性と宿主免疫応答. 第 28 回日本医学会総会 2011 年 4 月 東京
- 35) 河村伊久雄, 陳<sup>1</sup>, 酒井俊介, 光山正雄. 結核菌感染マクロファージの IL-1 $\alpha$ 産生における RD1 遺伝子領域の役割. 第 81 回実験結核研究会 2011 年 6 月 東京
- 36) 河村伊久雄, 酒井俊介, 土屋晃介, 原英樹, 光山正雄. 結核菌感染マクロファージの interleukin-1 $\alpha$ 産生における RD1 遺伝子領域の重要性. 第 22 回日本生体防御学会学術総会 2011 年 6 月 沖縄
- 37) Daim, S., I. Kawamura, K. Tsuchiya, H. Hara, T. Yamamoto, H. Qu, and M. Mitsuyama. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein in *Mycobacterium smegmatis* induces low tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 production in murine macrophages. 第 64 回日本細菌学会関西支部総会 2011 年 11 月 大阪
- 38) Kawamura, I., C. Xi, S. Sakai, K. Tsuchiya, H. Hara, M. Mitsuyama. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to secretion of IL-1 $\alpha$  from infected macrophages through the induction of calcium influx. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 千葉
- 39) 星野仁彦. 日本人の Genetic background と IGRA 第 86 回日本結核病学会総会 ミニシンポジウム 3 IGRA の新しい展開 平成 23 年 5 月 東京
- 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23年度 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)

初回免疫ワクチンの開発

分担研究報告書

研究分担者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・部長)

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

初回免疫ワクチンの開発

研究分担者 牧野 正彦 （国立感染症研究所・感染制御部・部長）  
研究協力者 塚本 裕美子 （国立感染症研究所・感染制御部・研究員）

研究要旨.

結核は 20 世紀最大の恐怖を与えた慢性細菌感染症であり、ワクチン開発を含む結核制御法の確立は急務となっている。これまでワクチンとして弱毒化牛型結核菌 *Mycobacterium bovis* BCG が用いられてきたが、成人肺結核の発症を予防することはできなく、BCG に代わる新規ワクチンの開発が切望されている。BCG が効かない最大の理由は、BCG が抗原提示細胞に感染するとファゴゾームを形成し、ライソゾームとの融合を阻止する、すなわち、その結果として BCG が充分 T 細胞を活性化できないことにある。したがって、BCG に代わるワクチン、とりわけ改良型 BCG の作製にあたっては、新規 BCG が容易にライソゾームに移行し得る方策を BCG に組み込ませる必要がある。これまでにこの点について検討を加え、BCG からウレアーゼをコードする遺伝子を除去すること、BCG が積極的に結核菌由来の主要抗原を細胞内で分泌する能力を付与することが有効であることを突き止めている。さらに、新しい結核菌由来主要抗原として MMP-II 蛋白が有用な働きを示し得ることも突き止めている。そこで、ウレアーゼ欠損 BCG に HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入した新しいリコンビナント BCG (BCG-DHTM) を作製し、その T 細胞活性化能を評価した。HSP70 は MMP-II 蛋白に対するシャペロン効果を期待して用いた。BCG-DHTM は、非常に強く樹状細胞・マクロファージ・ナイーブ CD4 陽性 T 細胞及びナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化した。また、マクロファージを介しての CD4 陽性 T 細胞の活性化を可能とした。さらに、BCG-DHTM は、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞からパーフォリン産生性 CD8 陽性 T 細胞の分化誘導を可能とした。また、C57BL/6 マウスに皮下接種すると、MMP-II に反応するメモリータイプの CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞が効率的に産生されることが判明した。したがって、BCG-DHTM は、効率的にメモリー T 細胞を産生し、結核菌に対する有用なワクチンになり得ることが判明した。

A. 研究目的

病原性抗酸菌に対するワクチンの作製にあたっては、ワクチン候補分子を用いた抗原特異的メモリー T 細胞の産生が重要である。BCG は結核に対するワクチンとして、幅広く用いられ一定の予防効果を挙げてきた。しかし、近年では、成人あるいは高齢者の肺結核を予防することはできないことが明らかとなっている。BCG は、本質的にナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化し、IFN-

γ などのタイプ 1 サイトカインを産生するが、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化を誘導することができず、改良の余地を残している。BCG に改良を加えるにあたっては、その弱点を凌駕する方策を周到しなければならない。BCG の最大の欠点は、抗原提示細胞に感染した際、ファゴゾームを形成し、ライソゾームとの融合を阻止することにある。したがって、感染した BCG が効率的にライソゾームへ移行する方策を樹立するこ

とが重要となる。これまでに我々は、らい菌をモデルとして種々の方法でこの問題に取り組んできた。第1の方法は、BCGの有する *UreC* 遺伝子を除去し、*UreC* がコードするウレアーゼを取り除くことで、ファゴゾーム内のアンモニアの産生を抑制し、ファゴゾームの酸性化を促進してライソゾームとの融合を容易にした。第2の方法は、BCG から積極的に病原性抗酸菌の主要抗原を分泌させ、分泌された抗原がライソゾームへ取り込まれ易い状況を作成することであった。これまでに主要抗原として Major Membrane Protein-II (MMP-II) を用い、さらに、シャペロン効果を有しアジュバント活性を持つ heat shock protein (HSP) 70 を併用した。すなわち、HSP70 遺伝子と MMP-II 遺伝子を融合させ、これを BCG に遺伝子導入した。二つの方策は何れも有効であって、*UreC* 遺伝子を取り除いたリコンビナント BCG は CD4 陽性 T 細胞の活性化に有効であり、HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入したリコンビナント BCG は CD8 陽性 T 細胞の活性化に有効であった。さらに両方法を組み合わせ、BCG-ΔUT に HSP70-MMP-II 遺伝子を導入したリコンビナント BCG を作製すると、T 細胞活性化能とメモリー T 細胞の産生能ともに、さらに増強した。結核菌の免疫原性蛋白として ESAT6・CFP10・Ag85complex などが用いられ、ワクチンの開発に利用されてきた。しかし、これらの分子を用いたワクチンでは一定の効果が確認できるものの、その効果は十分ではなく、更なる改良が用いられている。一方、我々は昨年度、結核菌由来の MMP-II 蛋白は強い T 細胞活性化能を有していて、主要抗原の一つとして考えられることを報告してきた。そこで、*UreC* 遺伝子欠損 BCG に BCG 由来 HSP70 と結核菌由来 MMP-II の遺伝子を融合させ組み込ませた新しいリコンビナント BCG (BCG-DHTM) を作製し、その T 細胞活性化能を評価することを目的とした。

## B. 研究方法

*UreC* 遺伝子欠損リコンビナント BCG に、結核菌由来 MMP-II 遺伝子に BCG 由来の

HSP-70 遺伝子を結合させ、遺伝子導入しリコンビナント BCG (BCG-DHTM) を作製した。正常健常人末梢血より、抗 CD3 抗体付着ダイナビーズを用い T 細胞を除去した後、プラスチック付着性単球を得てリコンビナント (r) GM-CSF 50ng/ml および rIL-4 (10ng/ml) を添加して樹状細胞を産生した。この樹状細胞に対して、リコンビナント BCG あるいはベクターコントロール BCG (BCG-261H) を感染させ成熟樹状細胞を得た。BCG 感染樹状細胞の T 細胞活性化能は、BCG 感染樹状細胞をマイトマイシン C 処理した後、自己の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞と 4 日間混合培養し、T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  および IL-2 を ELISA 法で測定して評価した。T 細胞は、抗 CD4 抗体あるいは抗 CD8 抗体付着ダイナビーズを用いて精製した。ナイーブ T 細胞は、これら T 細胞から CD45RO 陽性 T 細胞を除去して得た。CD45RO 抗体は市販の抗体を用いた。IFN- $\gamma$  および IL-2 は、市販の ELISA 用キットを用いて測定した。樹状細胞から産生される各種サイトカインも市販のキットを用いて ELISA 法で測定した。BCG 感染樹状細胞における T 細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞を MHC 抗原に対する抗体および CD86 に対する抗体で処理した際の T 細胞の活性化の減弱の程度で評価した。樹状細胞表面の抗原の発現程度は、FACSCalibur を用いて行った。抗体は市販の抗体を用いた。BCG-DHTM 感染 DC による T 細胞活性化機構を探索する目的で、DC を市販の Chloroquine、Brefeldin A、Lactacystin で処理し、T 細胞の活性化抑制能を T 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生量により評価した。さらに、BCG-DHTM のメモリー T 細胞産生能を測定する目的で、C57BL/6 マウスに BCG-DHTM および BCG-261H を皮下接種し、4 週間後に脾臓を摘出し、脾中 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を *in vitro* で MMP-II タンパクで刺激した際に、細胞内に IFN- $\gamma$  を産生している細胞を FACSCalibur を用いて測定し算出した。さらに、BCG-261H 及び BCG-DHTM  $1 \times 10^4$  CFU を C57BL/6 マウスに皮下接種し、4 週間後に結核菌 H37Rv を 100 CFU/肺で噴霧感染



し、6 週間後に肺を機械的に処理し、コーンアッセイで肺内の結核菌数を測定した。倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

### C. 研究結果

コントロール BCG としてベクターコントロール (BCG-261H) を用いて、BCG-DHTM のナイーブ T 細胞の活性化能を検討した。BCG-DHTM は、非常に強くナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化した。BCG-DHTM はマクロファージを介してもメモリータイプ CD4 陽性 T 細胞を活性化することが可能であった。これら樹状細胞及びマクロファージを介した BCG-DHTM による CD4 陽性 T 細胞の活性化は抗原特異的であり、BCG-DHTM を感染させた抗原提示細胞を HLA-DR あるいは CD86 抗原に対する抗体で処理すると、その活性化は 90%以上抑制された。次いで、BCG-DHTM のナイーブ CD8 陽性 T 細胞活性化を検討すると、BCG-DHTM は、強くナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化し IFN- $\gamma$  の産生を誘導した。この T 細胞の活性化は抗原特異的であって、BCG-DHTM 感染樹状細胞表面を抗 HLA-ABC 抗体あるいは抗 CD86 抗体で処理すると、その T 細胞活性化能は強く抑制された。BCG-DHTM の T 細胞活性化機構を解析するため、BCG-DHTM の抗原提示細胞活性化能を評価した。BCG-DHTM は強く樹状細胞を刺激し、大量の IL-12p70・IL-1 $\beta$ ・TNF $\alpha$  の産生を誘導した。また、BCG-DHTM は樹状細胞表面上の HLA-DR・CD86・CD83 抗原の発現を増強させた。BCG-DHTM による T 細胞活性化機構をより詳細に検討する目的で、樹状細胞を予めクロロキニンで処理し、その後

BCG-DHTM を感染させると、BCG-DHTM の感染によって誘導される MMP-II の発現が著しく抑制され、同時に、BCG-DHTM によるナイーブ CD4 陽性 T 細胞及びナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化が有意に抑制された。マクロファージによる CD4 陽性 T 細胞活性化もクロロキニン処理で抑制された。一方、樹状細胞を Brefeldin A あるいは Lactacystin で処理しても、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化は同様に抑制された。このことから、BCG-DHTM は HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌し、分泌された融合タンパクが CD4 陽性 T 細胞の活性化と CD8 陽性 T 細胞の活性化をもたらし、CD8 陽性 T 細胞の活性化はクロスプレゼンテーション機構によって生じているものと考えられた。CD4 陽性 T 細胞存在下で CD8 陽性 T 細胞を BCG-DHTM で刺激すると、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞からパーフォリン産生性実効型 T 細胞が産生され、さらに、遊走能マーカーを有するメモリー T 細胞が産生された。また、C57BL/6 マウスに BCG-DHTM を皮下接種すると、効率良く MMP-II あるいは HSP70 に反応し、IFN- $\gamma$  を産生するメモリー T 細胞が産生された。その効果は長期持続した。さらに、BCG-DHTM と BCG-261H の結核に対するワクチン効果を検討したところ、BCG-DHTM は BCG-261H に比し、有意に結核菌の増殖を抑制し、従来の BCG に比しより強いワクチン効果を有することが判明した。

### D. 考察

結核菌に対するワクチン作製においては、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を強く活性化し、それぞれのメモリー T 細胞を産生することが必須である。両サブセットの T 細胞を効率的に産生するためには、ワクチン分子は T 細胞活性化に秀でている樹状細胞を強く活性化することが求められる。しかし、これまで用いられていた ESAT6・CFP10 といった分子は獲得免疫を活性化する能力は持っているものの、樹状細胞の活性化等自然免疫応答はむしろ抑制し得る欠点を持っている。この点結核菌由来 MMP-II はらい菌由来 MMP-II 同様、TLR2 を介し樹

状細胞を活性化し得ることがこれまでの検索で明らかとなっている。したがって、MMP-II はワクチン主要分子としてより有効に作用するものと期待される。一方、ワクチンとして用いられてきた現行の BCG では、どちらの T 細胞をも強く活性化する能力が弱く、そのため改善が求められている。T 細胞を充分活性化し得ない最大の原因は、BCG が抗原提示細胞に取り込まれた場合、ファゴゾームを形成しライソゾームとの融合を阻止することで、機能的な Phago-lysosome を形成し得ないことにある。この欠点を凌駕するため、二つの大きな試みを行ってきた。一つは、BCG 感染ファゴゾームを酸性化することでライソゾームとの融合を促進させることであり、この目的のため *UreC* 遺伝子を欠損させたところ、CD4 陽性 T 細胞を強く活性化し、メモリー CD4 陽性 T 細胞の産生が可能となった。第二の試みは、ファゴゾームの中でタンパクを分泌させることであった。分泌されたタンパクにより、CD8 陽性 T 細胞がより強く活性化されることを期待し、抗酸菌主要抗原である MMP-II と HSP70 を融合させファゴゾームの中で分泌させると、期待した通り、この融合タンパク特異的に CD8 陽性 T 細胞が活性化された。さらに、両方法を組み合わせると両方策は相乗作用を示し、より強く両サブセットの T 細胞を活性化することが可能であった。このことは、本年度の研究により MMP-II はらい菌由来であっても結核菌由来であっても同様であることが明らかとなった。さらに、BCG-DHTM の結核菌生体内増強抑制効果は従来の BCG に比し強いことが判明した。日本国内で初めて BCG に比し有効に作用するワクチンが作製された。

#### E. 結論

ウレアーゼ欠損 BCG に BCG 由来 HSP70 遺伝子と結核菌由来 MMP-II 遺伝子を連結した遺伝子を導入した新規リコンビナント BCG (BCG-DHTM) は、未感作ヒト CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞を強く活性化すると同時に両サブセットのメモリー T 細胞を効率的

に産生した。さらに、日本国内で初めて従来の BCG に比し有効に作用する BCG が産生された。

#### G. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Hattori, A. Yamamoto, S. Wada, K. Hatai, M. Makino, and N. Ishii. 2011. *Mycobacterium pseudoshottsii* isolated from 24 farmed fishes in western Japan. J. Veterinary Medical Science, in press.
  - 2) Nakanaga, K., Y. Hoshino, M. Wakabayashi, N. Fujimoto, E. Tortoli, M. Makino, T. Tanaka, and N. Ishii. 2011. *Mycobacterium shigaense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic mycobacterium that produced nodules in an erythroderma patient with severe cellular immunodeficiency and a history of Hodgkin's disease. J. Dermatol., in press.
  - 3) Maeda, Y., T. Tamura, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, and M. Makino. 2011. A lipopeptide facilitate induction of *Mycobacterium leprae* killing in host cells. PLoS Neglected Tropical Diseases, 5: e1401.
  - 4) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. 2011. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan from 1980 to 2010. J. Clin. Microbiol., 49: 3829-3836.
  - 5) Naka, T., N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, K. Kobayashi, H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol., 193: 5766-5774.
  - 6) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. 2011. Apoptosis-inducing activity

- of clofazimine in macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 4000-4005.
- 7) Kai, M., N. H. Ngvyen Phvc, H. A. Ngvyen, T. H. Pham, K. H. Ngvyen, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Makino, and T. T. Ngvyen. 2011. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. *Clin. Infect. Dis.*, 52: e127-e132.
  - 8) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. 2011. Immunostimulatory activity of major membrane protein II from *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol.*, 18: 235-242.
  - 9) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. 2011. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae folP1* gene and Dapsone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 762-766.
  - 10) Nakanaga, K., Y. Hoshino, Y. Era, K. Matsumoto, Y. Kanazawa, A. Tomita, M. Furuta, M. Washizu, M. Makino, and N. Ishii. 2011. Multiple cases of cutaneous *Mycobacterium massiliense* infection in a "hot spa" in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 49: 613-617.
2. 学会発表
- 1) Makino, M., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and T. Mukai. Naïve T cell activation by urease-deficient recombinant BCG that produces HSP70-MMP-II fusion protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 2) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Metabolome analysis of mycobacteria. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 3) Tamura, T., and M. Makino. The role of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein in the induction of Th1 immune response. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 4) Mukai, T., Y. Maeda, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Development of a stable and high recombinant protein expression system in mycobacterium. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 5) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Anti-*M. leprae* activity and phox localization in human macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 6) Maeda, Y., T. Tamura, M. Kai, T. Mukai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Increased expression of cytolytic effector proteins in human T cells co-cultured with dendritic cells by stimulation with *Mycobacterium leprae* lipopeptide. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 7) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, I. Yano, and M.

- Makino. Functional analysis of *mmaA2* and *mmaA4* in *Mycobacterium bovis* BCG Connaught. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
- 8) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. Yotsu, N. Ishii, and M. Makino. Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan, 1980-2010. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 7-9 December, 2011, Saitama, Japan.
  - 9) Nakata, N., M. Kai, and M. Makino. Mutation analysis of the *Mycobacterium leprae* *rpoB* gene and rifampicin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. 51<sup>st</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 17-20 September, 2011, Chicago, USA.
  - 10) Tamura, T., and M. Makino. Peptide-25 of Ag85B induces Th1 differentiation in a T-bet-independent manner. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
  - 11) Maeda, Y., T. Tamura, M. kai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Induction of intracellular killing of *Mycobacterium leprae* in human dendritic cells by a lipopeptide-mediated activation of T cells. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
  - 12) Nakata, N., M. Matsuoka, M. Makino, and M. Kai. Whole-genome comparison of *Mycobacterium leprae* strains differing in growth rate. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
  - 13) Mukai, T., M. Matsuoka, Y. Maeda, Y. Miyamoto, Y. Fukutomi, and M. Makino. Identification of novel promoter of Mycobacteriophage TM4 to obtain fluorescent-*Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
  - 14) Miyamoto, Y., M. Matsuoka, Y. Fukutomi, T. Mukai, M. kai, Y. Maeda, and M. Makino. Characterization of intracellular metabolites from *Mycobacterium leprae*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
  - 15) Kai, M., H. Yamada, N. Fujiwara, S. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, I. Yano, and M. Makino. Establishment and characterization of knockout mutants of *Mycobacterium bovis* BCG gene involved in mycolic acid synthesis pathway. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.
  - 16) Tsukamoto, Y., M. Endoh, T. Mukai, Y. Maeda, T. Tamura, M. Kai, and M. Makino. Activation of human naïve T cells of both CD4 and CD8 subsets by *Mycobacterium tuberculosis* major membrane protein II. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 6-10 September, 2011, Sapporo, Japan.