

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

薬剤耐性獲得機構解明とその迅速感受性試験法開発への応用に関する研究

研究分担者 鈴木 定彦 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 教授
研究協力者 中島 千絵 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 特任助教

研究要旨 薬剤耐性ハンセン病対策には、早期発見と、らい菌の薬剤感受性を踏まえた適切な治療の徹底が重要である。そのためには精度ならびに特異性が高く、安価な薬剤感受性試験法の開発と実用化が鍵となる。本研究では、昨年度に作出した組換えらい菌 DNA ジャイレースに対する新規キノロン剤の阻害効果を評価した。その結果、当該新規キノロン剤が低濃度でらい菌 DNA ジャイレースを阻害できることを見出し、ハンセン病治療薬の候補となりうる事を明らかにした。

A. 研究目的

現在のハンセン病の治療は世界保健機構（WHO）推奨の多剤併用療法により実施されているが、既に複数の国々で薬剤耐性ハンセン病患者が出現しており問題となっている。我が国でもそれは例外でなく、薬剤耐性ハンセン病対策は、厚生労働行政の課題となっている。

薬剤耐性ハンセン病対策には、世界規模での薬剤耐性菌の伝播状況を把握し、それによって現行の多剤併用療法の効果を評価し、耐性菌の拡散防止対策を立案し、以て、その有効性の維持を図る必要がある。そのためには、薬剤耐性ハンセン病の早期発見と、らい菌の薬剤感受性を踏まえた適切な治療の徹底が重要である。そのためには精度ならびに特異性が高く、安価な薬剤感受性試験法の開発と実用化が鍵となる。このような安価な薬剤感受性試験法が臨床現場に実装され、迅速な薬剤感受性試験が可能となった場合には、適切な治療が可能な薬剤が必

要となる。

細菌感染症の治療薬としてニューキノロン系抗菌薬が注目されている。本研究の対象とした新規キノロンは、キノロン骨格の7位にスピロ型二環性アミノピロロピリジン基、8位にメトキシ基を導入することで、長い血中半減期と優れた組織移行性を実現した新規ニューキノロン系抗菌薬である。本研究では当該薬剤の作用メカニズムを解明する事を目的として、らい菌を含む各種細菌の組換えDNA ジャイレースに対する阻害活性を評価した。

B. 研究方法

1) 組換え DNA ジャイレース

DNA ジャイレース A、B 両サブユニットをコードする *gyrA*、*gyrB* 遺伝子を、らい菌 Thai53 株由来 DNA を鋳型として PCR 法により増幅させ、発現ベクター pET に連結、大腸菌へ導入してヒスチジンタグを有する組換え蛋白質として発現させた。更に、同様の手法により結核菌、*Salmonella enterica*、

ならびに *Campylobacter jejuni* 由来 DNA を鋳型として PCR 法により DNA ジャイレース A, B 両サブユニットをコードする *gyrA*, *gyrB* 遺伝子を増幅させ、発現ベクター pET に連結、大腸菌へ導入して組換え蛋白質として発現させた。発現させた全ての蛋白質はニックル-アガロースカラムクロマトグラフィーにより精製した後、以下の実験に供した。

2) 組換え DNA ジャイレースの活性

精製した A, B サブユニットを等摩尔ずつ混合し再構成した DNA ジャイレースを実験に用いた。ジャイレース活性の評価は、リラックス型のプラスミドを基質として、スーパーコイル型のプラスミドへと転換する活性（スーパーコイル化活性）を定量する事により実施した。

3) キノロン剤のスーパーコイル化活性への阻害効果

新規キノロン、シタフロキサシン；SIT、シプロフロキサシン；CIP、ならびにレボフロキサシン；LVX を様々な濃度で上記アッセイ系に添加し、DNA ジャイレースのスーパーコイル化活性を 50% 阻害する薬剤の濃度 (IC₅₀) を求めた。

(倫理面への配慮)
該当せず

C. 研究結果

1) 組換え DNA ジャイレース

全ての蛋白質において 200ml の大腸菌培養液から 1 mg 以上の組換え蛋白質が精製でき、その純度は 95% 以上であった。

2) 組換え DNA ジャイレースの活性

精製した種々の組換え DNA ジャイレースのスーパーコイル化活性評価の結果、どの DNA ジャイレースも ATP 依存的にリラックス型のプラスミドをスーパーコイル型のプラスミドへと転換する活性を有していることが証明された。

3) キノロン剤のスーパーコイル化活性に対する阻害効果とスーパーコイ

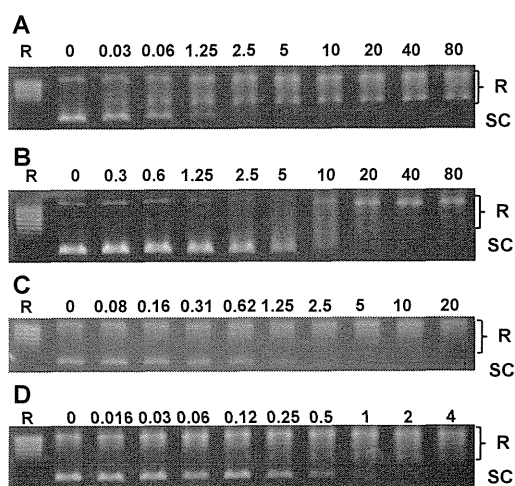


図1. 新規キノロンの各種細菌由来組換えDNA ジャイレースに対する阻害活性
A. らい菌, B. 結核菌, C. *S. enterica*, D. *C. jejuni*.
各写真上部の数字は新規キノロンの濃度 ($\mu\text{g/ml}$). R:リラックス型プラスミッドDNA, SC:スーパーコイル型プラスミッドDNA。

ル型プラスミッド切断誘導能

図1 A, B, C, D にそれぞれ新規キノロンによるらい菌、結核菌、*S. enterica*、ならびに *C. jejuni* の DNA ジャイレースのスーパーコイル化活性に対する阻害効果評価試験結果を示す。本試験では新規キノロンの濃度依存的にスーパーコイル化プラスミドの減少が見られた。スーパーコイル化阻害効果評価試験で得られた結果から種々のキノロン剤の IC₅₀ を算出し、表1にまとめた。

表1 各種DNAジャイレースに対するニューキノロン剤のIC₅₀ (μg/mL)

	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>S. enterica</i>	<i>C. jejuni</i>
新規キノロン	0.7	2.5	0.4	1.0
LVX	4.5	13.5	0.4	1.1
SIT	0.5	1.6	0.2	0.4
CIP	2.3	11.2	0.3	1.0

D. 考察

本研究で評価に供した新規キノロンはキノロン剤のうちでもSITに次ぐ強い活性を示した。一方、*S. enterica*、ならびに *C. jejuni* のDNA ジャイレースに対する新規キノロンの阻害効果は、SITのそれよりも低く、LVXならびにCIPと同等であったが、十分使用に堪えうるものであると考えられた。

E. 結論

新規キノロンは多剤耐性ハンセン病治療に有効であるものと考えられた。本研究の最終目標である迅速な薬剤感受性試験が可能となった場合には、新規キノロンはハンセン病の治療薬候補となりうるものと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Aye KS, Ling H, Hattori T, Iwamoto T, Fukushima Y, Suzuki H, Suzuki Y, Matsuba T. (2013) A simple multiplex PCR for the identification of Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* with a lineage-specific mutation in Rv0679c. J. Clin. Microbiol. 51(7):2025-2032

- 2) Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Bunchoo S, Roienthong D, Mukai T, Nakajima C, Hamada S, Suzuki Y. (2013) Applicability of in-house loop-mediated isothermal amplification for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex grown on solid media. Jpn. J. Infect. Dis. 66 (3):249-251

- 3) Poudel A, Maharjan B, Nakajima C, Fukushima Y, Pandey BD, Beneke A, Suzuki Y. (2013) Characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Nepal. Tuberculosis 93(1):84-88

2. 学会発表

- 1) Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Khin Saw Aye, Suzuki Y. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Asian Countries. Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. Aug 17 – 18, 2013, Sapporo, Japan
- 2) Khin Saw Aye, Aye Aye Win, Win Le May, Min Thein, Nakajima C, Suzuki Y. Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of Extra-Pulmonary Tuberculosis. Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. Aug 17–18, 2013, Sapporo, Japan
- 3) Maharjan B, Shrestha B, Beneke A, Suzuki Y, Nakajima C, Paudel A. Evaluation of Genotype MTBDRsl for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides.

Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. Aug 17-18, 2013, Sapporo, Japan

The 1st Korea-Japan Leprosy Meeting. Nov 15 - 16, 2013, Seoul, Korea.

4) Suzuki Y, Yokoyama K, Kim H, Nakajima C. Genetic background of the DNA gyrase in quinolone resistance.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許 該当無し
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他 該当無し

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)

再燃・再発に関する免疫学的診断法の開発

平成25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・再発に関する免疫学的診断法の開発

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 ハンセン病の再燃・再発に関連する免疫反応の検討過程で昨年度は、症例ごとのばらつきが大きかったことや、刺激無しの条件での高い値などが出たため、今年度は実験方法を変更した。繰り返した場合、後遺症の治療が困難となってくるハンセン病の再燃・再発のし易さを判定する方法を MMP-II 血清抗体価の測定法以外に、再度開発することを目的とし以下の検討を行った。末梢血単核球細胞を培養し MMP-II、MLC 等の添加による刺激後に産生されるサイトカインを ELISA、フローサイトメトリーで解析し、病型、臨床症状や経過との関連性を検討した。ハンセン病の少菌型 5 名、多菌型 5 名および正常対照群 5 名について末梢血単核球細胞を分離し、MMP-II (2 もしくは $4 \mu\text{g/ml}$)、MLC (4 もしくは $8 \mu\text{g/ml}$) さらに PHA ($2.5 \mu\text{g/ml}$) を添加し 96 時間培養した。ELISA 法での IFN- γ 産生は、MLC、MMP-II、PHA 刺激の条件でより明らかとなった。正常対照群と少菌型において IFN- γ 産生量は、多菌型よりやや多かった。IL-10 の産生量は、各群間で著明な差を認めなかった。フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン染色陽性細胞の割合は、少菌型、多菌型とも MMP-II、PHA の刺激条件で IFN- γ 抗体および IL-10 抗体陽性細胞のいずれについても CD4⁺細胞において増加する傾向がみられた。少菌型で 1 例再発を認めたが、昨年度以降の経過も含めて検討した。ELISA 法での IFN- γ 産生量は、各刺激条件で皮疹の出現時から約 6 ヶ月後まで高く、その後低下した。今回は細胞性免疫能についてサイトカイン陽性細胞の割合についても経過を追って検討したが、IFN- γ 抗体および IL-10 抗体陽性細胞ともに皮疹の出現時が CD4⁺あるいは CD8⁺細胞において比較的多い傾向であった。これらの結果に基づきハンセン病の再燃・再発について早期診断が出来れば有意義と考えられた。

A. 研究目的

ハンセン病の再燃・再発は比較的少ないが、繰り返す場合は後遺症の治療に難渋することがよく知られている。このような症例の早期診断は重要な課題と考えられる。

らい菌の細胞膜蛋白 MMP (Major membrane protein)-II に対する血清抗体による診断法は、従来の PGL-I 抗体測定法と比較して陽性率が高く、再燃・再発の予測に有用と考えられたが、抗体価持続高値の症例があることが、

平成 21 年から 23 年度の「ハンセン病の再発・再燃症例に対する予防・診断・治療とハンセン病の啓発に関する研究」班の分担研究の結果で明らかとなっている。したがって再燃・再発に関する新たな診断法の開発が必要と考えられる。

MMP-II は T 細胞からの IFN- γ などのサイトカイン産生を惹起することが知られているが、末梢血単核球細胞の培養系に MMP-II および MLC (*Mycobacterium leprae* cytosolic protein) 等を添加して産生されるサイトカインを ELISA およびフローサイトメトリーで詳細に解析し、病型や臨床症状とその経過等との関連性も同時に検討してゆくことでハンセン病の再燃・再発のおこし易さを判定する方法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

同意の得られた国立療養所星塚敬愛園入所者のハンセン病の少菌型 (PB) の 5 名 (男 3 名、女 2 名)、多菌型 (MB) の 5 名 (男 2 名、女 3 名)、および国立療養所星塚敬愛園および鹿屋医療センターの外来受診者である正常対照群の 5 名 (男 3 名、女 2 名) について末梢血約 10ml を採取した。この血液より単核球細胞を分離し、一時凍結保存し、解凍後これらの細胞 (細胞数 0.5×10^5 個/well) に MMP-II を 2、4 μ g/ml、MLC を 4、8 μ g/ml、さらに刺激効果の指標となる物質として PHA (Phytohemagglutinin-P) 2.5 μ g/ml を別々に添加し 96 時間培養した。Golgi-Stop は、昨年度は培養終了の約 8 時間前に添加していたが、細胞内サイトカインの染色性を上げる目的で本年度は約 15 時間前に加えた。培養上清中へ産生される IFN- γ 、IL-10 な

どのサイトカインについて ELISA で測定を行った。ELISA 用プレートの洗浄液は、以前より頻繁に交換した。フローサイトメトリーでは、培養細胞中の CD4⁺ および CD8⁺ 細胞におけるそれぞれ IFN- γ 、IL-10 に対する抗体での染色陽性細胞の割合 (%) を算出した。(コントロールとして IgG1 抗体を用いた。) また、細胞内サイトカインの抗体による染色性をより安定させるため Intracellular Cytokine Staining Starter Kit (BD) を新たに用いた。

少菌型の 1 例は平成 24 年 4 月に再発したが、血清 MMP-II 抗体価については、再発前後の 7 回分の血清、ELISA およびフローサイトメトリーについては、再発時および内服治療中の同年 11 月 (約 6 ヶ月後) と翌年 4 月の治癒期の血液検体を用いた。他の少菌型、多菌型の症例では治癒期の血液検体を用いた。

(倫理面への配慮)

過去の生検組織、血液検体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。同意書の得られた例の血液、生検組織のみを研究で使用した。尚、本研究は、国立療養所星塚敬愛園倫理委員会および鹿屋

医療センターの生命倫理委員会の承認を受け行った。

C. 研究結果

ELISA では IFN- γ の産生量は、いずれの群においても、刺激なしの条件では昨年度より低い値であり、PHA の刺激効果は比較的明らかであった。MLC の刺激では少菌型で、MMP-II の刺激では正常対照群と少菌型で反応がやや強くみられた(刺激無しの条件で正常対照群: 64.6 ± 16.6 pg/ml、少菌型: 57.8 ± 12.9 pg/ml、多菌型: 57.8 ± 6.0 pg/ml、MLC $8 \mu\text{g/ml}$ で正常対照群: 62.6 ± 12.1 pg/ml、少菌型: 153.0 ± 150.8 pg/ml、多菌型: 58.1 ± 11.8 pg/ml、MMP-II $4 \mu\text{g/ml}$ で正常対照群: 123.3 ± 88.3 pg/ml、少菌型: 76.5 ± 25.7 pg/ml、多菌型: 63.2 ± 15.4 pg/ml)。ELISA での IL-10 の産生量は、各群間で著明な差を認めなかった。いずれの条件でも症例数が少ないためか統計学的に有意差が明らかなのは少なかった(Table 1.)。フローサイトメトリーによる検討では、少菌型、多菌型とも CD4⁺細胞において刺激のない条件より MMP-II $4 \mu\text{g/ml}$ 、PHA $2.5 \mu\text{g/ml}$ などの刺激条件で IFN- γ 抗体、IL-10 抗体染色陽性細胞の割合が増加する傾向がみられた(Table 2.)。

上記の少菌型の 1 例は、平成 24 年 4 月に大腿部の環状紅斑を認めたが、皮膚生検組織の病理検査結果(抗酸菌染色は陰性)なども参考としハンセン病の再発初期(I-BT)と考えられた。血清 MMP-II 抗体価は皮疹出現の前後で著明な変化は見られなかった。ELISA 法での IFN- γ 産生量は、各刺激条件で皮疹の出現時から約 6 ヶ月後まで高く、その後低下した。フローサイトメトリーでは再発時、刺激の条件で IFN- γ 抗

体染色陽性細胞は CD8⁺ 細胞において最も増加し、6 ヶ月後では CD4⁺ 細胞において最も増加した。IL-10 抗体染色陽性細胞は、再発時、CD4⁺、CD8⁺ 細胞において最も増加した。

D. 考察

ELISA 法では、IFN- γ 産生は刺激の条件により正常対照群と少菌型において多菌型よりやや多く、フローサイトメトリーによる細胞内サイトカイン(IFN- γ および IL-10)染色陽性細胞の割合は、少菌型、多菌型とも MMP-II、PHA の刺激で CD4⁺ 細胞において増加する傾向がみられた。これらは治癒期の血液を用いた結果であるが、再燃・再発ではない状態の免疫反応として重要と考えられた。今回、再発例の少菌型 1 例について免疫反応の経過を観察することが出来たが、ELISA 法での IFN- γ 産生量は、各刺激条件で皮疹の出現時から約 6 ヶ月後まで高くその後低下した。サイトカイン陽性細胞は再発の皮疹の出現時に CD4 あるいは CD8 陽性細胞において比較的多い傾向であった。再発例のこのような免疫反応の変化は、今後同様の症例を蓄積してゆくことでより貴重な参考資料になりうると考えられた。少菌型、多菌型、正常対照群いずれもさらに症例数を増やしての検討が必要と思われる。また、培養中に細胞数が減少して、刺激物質に対する反応が弱くなる可能性も考えられたため、末梢血単核球細胞数を 0.5×10^5 個/well から 1.0×10^5 個あるいは 2.0×10^5 個/well へ増やしての検討もさらに行う予定である。ELISA においては細胞性免疫に関して IL-2 の測定も行い、フローサイトメトリーでは IFN- γ 抗体あるいは IL-10 抗体で陽性となった細胞についてソ

ーティング等を用い、表面マーカーなども含め詳細な解析を行うことも検討中である。

E. 結論

ハンセン病の再燃・再発の可能性について、MMP-II 血清抗体価測定に加え細胞性免疫能の変化に関する手法を用いて早期診断が出来れば有意義と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

1) 皮疹の出現前後に MMP-II 血清抗体価の変化が観察できたハンセン病少菌型の 1 例。鮫島朝之，前田百美，後藤正道，牧野正彦．日本ハンセン病学会雑誌 82(1/2)：41 -41 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

PBMC: 0.5x10 ⁵ /well	Control 5例		PB 5例(再発例:1年後)		MB 5例	
	IFN- γ	IL-10	IFN- γ	IL-10	IFN- γ	IL-10
MLC- MMP- PHA-	64.6 \pm 16.6	72.8 \pm 6.3	57.8 \pm 12.9 ^a	69.2 \pm 2.8	57.8 \pm 6.0	69.0 \pm 1.1
MLC 4 μ g/ml	61.9 \pm 14.7	72.2 \pm 5.1	66.6 \pm 16.4 ^b	69.4 \pm 3.9	69.7 \pm 30.2	68.6 \pm 3.5
MLC 8 μ g/ml	62.6 \pm 12.1	72.2 \pm 7.6	153.0 \pm 150.8	70.5 \pm 3.5	58.1 \pm 11.8	69.5 \pm 5.3
MMP-II 2 μ g/ml	125.5 \pm 115.8	83.5 \pm 12.5	85.5 \pm 46.5	79.4 \pm 7.4	60.2 \pm 7.3	74.7 \pm 10.7
MMP-II 4 μ g/ml	123.3 \pm 88.3	87.5 \pm 14.6	76.5 \pm 25.7	78.4 \pm 5.7	63.2 \pm 15.4	76.6 \pm 10.2
PHA 2.5 μ g/ml	511.9 \pm 826.9	82.6 \pm 10.9	92.2 \pm 19.8 ^{a,b}	74.6 \pm 5.3	93.2 \pm 72.9	73.2 \pm 5.0

培地: 10%AB serum+RPMI+Penicillin Means \pm SD (Standard deviation) Student's t test: ^a p<0.05, ^b p<0.05

Table 1. MLC、MMP-II、PHA刺激による末梢血単核球培養(96時間後)上清中のIFN- γ 、IL-10の産生量(pg/ml)

	Controls 5 Cases					
	IFN- γ Ab		IL-10 Ab		IgG	
	CD4(%)	CD8(%)	CD4(%)	CD8(%)	CD4(%)	CD8(%)
PHA- MLC- MMP-	0.23 \pm 0.19	0.36 \pm 0.15	0.20 \pm 0.11	0.24 \pm 0.08	0.27 \pm 0.24	0.40 \pm 0.15
MLC 4 μ g/ml	0.31 \pm 0.28	0.44 \pm 0.23	0.24 \pm 0.25	0.19 \pm 0.16	0.22 \pm 0.19	0.35 \pm 0.32
MLC 8 μ g/ml	0.25 \pm 0.28	0.30 \pm 0.13	0.29 \pm 0.17	0.18 \pm 0.16	0.13 \pm 0.08	0.22 \pm 0.15
MMP-II 2 μ g/ml	0.24 \pm 0.22	0.35 \pm 0.16	0.26 \pm 0.20	0.20 \pm 0.12	0.13 \pm 0.15	0.12 \pm 0.08
MMP-II 4 μ g/ml	0.34 \pm 0.30	0.41 \pm 0.22	0.27 \pm 0.15	0.35 \pm 0.33	0.23 \pm 0.20	0.21 \pm 0.19
PHA 2.5 μ g/ml	0.88 \pm 0.84	0.85 \pm 0.28	0.48 \pm 0.22	0.63 \pm 0.64	0.31 \pm 0.21	0.59 \pm 0.52

	PB 5 Cases					
	IFN- γ Ab		IL-10 Ab		IgG	
	CD4(%)	CD8(%)	CD4(%)	CD8(%)	CD4(%)	CD8(%)
PHA- MLC- MMP-	0.29 \pm 0.07	0.31 \pm 0.10	0.30 \pm 0.19	0.18 \pm 0.14	0.48 \pm 0.18	0.16 \pm 0.10
MLC 4 μ g/ml	0.28 \pm 0.14	0.20 \pm 0.10	0.28 \pm 0.21	0.12 \pm 0.09	0.25 \pm 0.18	0.07 \pm 0.04
MLC 8 μ g/ml	0.25 \pm 0.14	0.16 \pm 0.11	0.23 \pm 0.20	0.12 \pm 0.14	0.34 \pm 0.39	0.10 \pm 0.20
MMP-II 2 μ g/ml	0.23 \pm 0.21	0.18 \pm 0.11	0.31 \pm 0.21	0.08 \pm 0.11	0.22 \pm 0.29	0.19 \pm 0.26
MMP-II 4 μ g/ml	0.49 \pm 0.28	0.25 \pm 0.14	0.45 \pm 0.30	0.21 \pm 0.23	0.28 \pm 0.17	0.12 \pm 0.18
PHA 2.5 μ g/ml	0.49 \pm 0.23	0.38 \pm 0.26	0.55 \pm 0.49	0.25 \pm 0.27	0.46 \pm 0.41	0.24 \pm 0.21

	MB 5 Cases					
	IFN- γ Ab		IL-10 Ab		IgG	
	CD4(%)	CD8(%)	CD4(%)	CD8(%)	CD4(%)	CD8(%)
PHA- MLC- MMP-	0.33 \pm 0.13	0.38 \pm 0.17	0.21 \pm 0.13	0.16 \pm 0.15	0.26 \pm 0.18	0.31 \pm 0.12
MLC 4 μ g/ml	0.31 \pm 0.14	0.25 \pm 0.18	0.28 \pm 0.12	0.28 \pm 0.42	0.21 \pm 0.19	0.15 \pm 0.09
MLC 8 μ g/ml	0.18 \pm 0.18	0.18 \pm 0.12	0.35 \pm 0.14	0.19 \pm 0.09	0.21 \pm 0.31	0.22 \pm 0.17
MMP-II 2 μ g/ml	0.30 \pm 0.22	0.24 \pm 0.14	0.39 \pm 0.26	0.15 \pm 0.15	0.23 \pm 0.14	0.14 \pm 0.12
MMP-II 4 μ g/ml	0.35 \pm 0.24	0.25 \pm 0.12	0.47 \pm 0.16	0.19 \pm 0.13	0.16 \pm 0.08	0.28 \pm 0.09
PHA 2.5 μ g/ml	0.36 \pm 0.52	0.30 \pm 0.25	0.51 \pm 0.36	0.28 \pm 0.28	0.33 \pm 0.47	0.35 \pm 0.13

Table 2. MLC、MMP-II、PHA刺激によるINF- γ 、IL-10陽性CD4/CD8細胞の割合(%): 各群5例ずつ

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)

免疫療法の開発

平成25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

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 らい菌由来リポペプチド LipoK で活性化したらい菌感染樹状細胞から放出されるエクソソームの解析を行なった。らい菌または LipoK で刺激した樹状細胞から放出されるエクソソームは CD4 陽性 T 細胞を直接活性化し、培養上製中に IFN- γ または TNF- α が産生された。この事から、らい菌感染樹状細胞から放出される、エクソソームは T 細胞を活性化しうる分子を含むことが明らかとなった。そこで、得られた、エクソソームの miRNA 発現プロファイリングを行い、幾つかの miRNA の発現がらい菌感染樹状細胞から得られたエクソソームで上昇していた。その一つ、miR373 は E-カドヘリン蛋白の制御をすることが知られており、ハンセン病状への関与が注目される。ハンセン病患者血液中に含まれる抗 E-カドヘリン抗体は正常健常者に比べて抗体価が若干高かった。この事から樹状細胞から得られるエクソソームの解析はハンセン病の病態を知る上で重要であると考えられた。

A. 研究目的

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、樹状細胞を活性化することを報告した。抗原提示細胞から放出されるエクソソームの役割に注目した。エクソソームは、血液、尿、腹水などの液体や細胞培養液中に存在する微小胞であり、様々な細胞から放出され、マイクロ RNA (miRNA) や蛋白質を含むことから、体内の離れた場所にある細胞や組織に情報を伝達する事が可能と報告されているが未だに十分な知見は得られていない。エクソソームのマーカーとして Tetraspanins, Alix, TSG101 などが知られている。樹状細胞から放出されるエクソソームの

miRNA 解析をこれらのマーカーを確認し、リアルタイム PCR で解析を行った。

B. 研究方法

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、リポペプチド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。CD4 陽性 T 細胞は BD IMag CD4 T lymphocyte Enrichment Set を用いて精製した。培地中に分泌される IFN- γ は BD 社の OptiEIA ELISA キットを用いて測定した。培地中に放出されるエクソソームの精製は Invitrogen のキットを用いて行った。miRNA 解析は SBI

社の SeraMir キットを用いて 380 コの miRNA を検出し、比較検討を行った。リアルタイム PCR は ABI Prism-7900HT 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

これまでに、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精製し、フローサイトメトリーで分析した結果、LipoK の刺激により、MHC クラス抗原および CD86 は、らい菌感染樹状細胞から得られたエクソソームより、多く含まれていた。そこで、直接 T 細胞をエクソソームによって刺激されるか、IFN- γ と TNF- α 分泌量を指標に調べた。その結果、らい菌感染樹状細胞から得られたエクソソームの刺激により、T 細胞が活性化した事が判明し、その活性は LipoK の刺激により、増強された事が確認できた。

この結果を踏まえ、エクソソームが含む miRNA をリアルタイム PCR で分析すると、らい菌感染樹状細胞から得られたエクソソームは幾つかの miRNA をより多く含んでいた。しかしながら、ほとんどの miRNA は感染メカニズム、生理的プロセスを制御していると考えられるが、未だに機能については分かっていないため、miRNA の役割は謎のままである。発現が高かった miR-373 の報告が一

つあり、miR-373 は E-カドヘリンの発現を高める事が判っていた。カドヘリンは糖タンパク質の一群であり、細胞接着に司る分子であり、NF κ B やサイトカインの発現を抑制する因子であることが明らかである。そこで、樹状細胞に発現するカドヘリンをフローサイトメトリーで分析した結果、らい菌感染後はカドヘリンの発現が上がり、LipoK 刺激後には発現量が減少した (図 1)。樹状細胞の活性化マーカーとして CD86 抗原の発現増上が確認できた。さらに、ハンセン病患者血液中に含まれるカドヘリンに対する抗体を ELISA 法で測定すると、ハンセン病患者では正常健常者に比べて抗体価が若干高かった (図 2)。検体数を増やして更なる、測定が必要と考えられる。miRNA の網羅的な解析を行うため、東レは独自に高性能 DNA チップ基盤 3D-Gene を開発したので、樹状細胞から放出される、エクソソームの miRNA を比較検討するため、精製した (図 3)。今後感度の高い 3D-Gene チップを用いて解析する予定である。

D. 考察

本研究で得られたエクソソームは MHC 抗原、CD86 抗原のみならず、らい菌由来抗原を保有し、CD4 陽性 T 細胞を直接活性化することから、エクソソームはハンセン病の免疫療法に活用できる可能性が示唆された。エクソソームのマイクロ RNA の解析を行うと、らい菌感染樹状細胞から放出されるエクソソームは特有の miRNA の発現が高い事から、これら miRNA はハンセン病状悪化に繋がる可能性は高く、LipoK で刺激

し、得たエクソソームの miRNA は T 細胞活性化に関わると考えられる。今後再現性の高い miRNA プロファイリングを行っていく。

E. 結論

LipoK の刺激を受けた、らい菌感染樹状細胞から放出される微小小膜、エクソソームは 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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Wang H, Maeda Y, Fukutomi Y, Makino M. An *in vitro* model of *Mycobacterium leprae* induced granuloma formation. BMC Infect Dis. 13:279. Doi:10.1186/1471-2334-13-279. 2013

2. 学会発表

- 1) Maeda Y, Mukai T, Fukutomi Y, Tamura T, Makino M. Exosomes released from *Mycobacterium leprae* infected human dendritic cells can activate T cells. 18th International Leprosy Congress, Brussels, Belgium, Sept. 16-19, 2013.
- 2) Maeda Y, Tamura T, Mukai T, Fukutomi Y, Makino M. Exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected dendritic cells stimulated with a lipopeptide participate in intercellular communication. US-Japan Co-operative Medical Science Program, Sapporo, Hokkaido, Japan, Aug.17-18, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

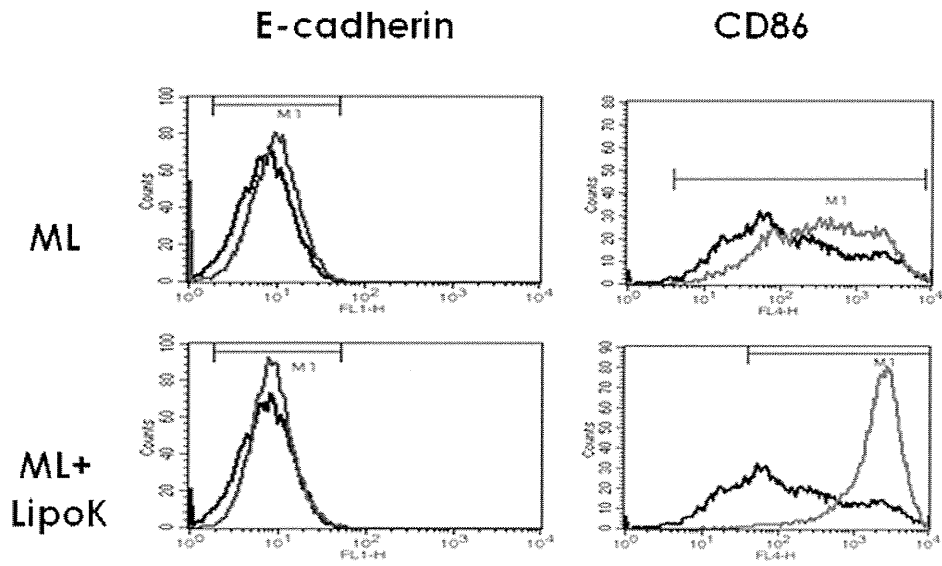


Fig. 1 Expression of E-cadherin on *M. leprae* (ML) infected dendritic cells treated with or without LipoK and CD86 activation marker as a control for activated dendritic cells

O. D.

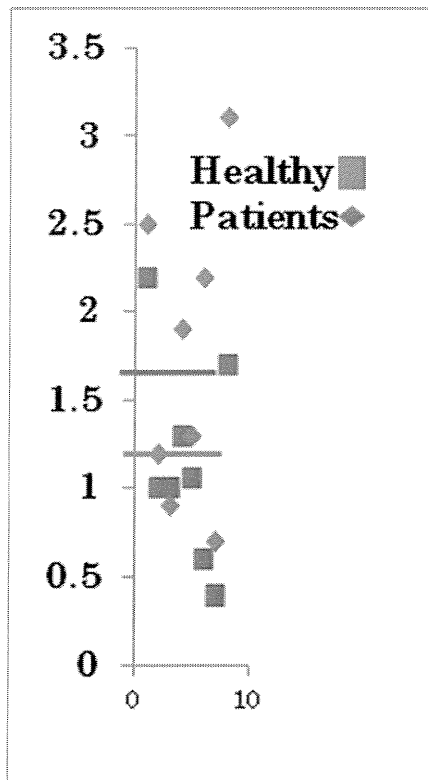


Fig. 2 Anti-E-Cadherin antibody titer

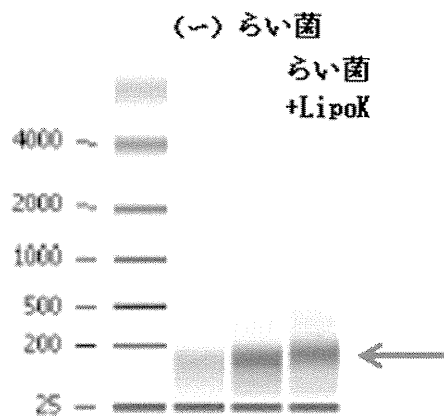


Fig. 3 RNA extracted from exosomes

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・結核共通ワクチンの免疫学的評価

平成25年度 分担研究報告書

研究分担者 牧野 正彦

(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・結核共通ワクチンの免疫学的評価

研究分担者 牧野 正彦 国立感染症研究所 感染制御部長

研究協力者 遠藤 真澄 国立感染症研究所 感染制御部 主任研究官

研究要旨 ハンセン病と結核は抗酸菌感染により発症する慢性感染症であり、弱毒化牛型結核菌 *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) がワクチンとして使われてきた。しかし、BCG の両疾患に対する有効性は限られており改良が必要である。これまでにウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に BCG 由来の HSP70 と結核菌由来の MMP-II を連結して組み込ませたリコンビナント BCG (BCG-DHTM) は、ワクチンとして用いると結核菌のみならずらい菌の生体内増殖を抑制し得ること、すなわち BCG-DHTM は結核・ハンセン病共通ワクチンとなり得ることを見出ししてきた。しかし、BCG-DHTM はウレアーゼ酵素を欠くためライソゾームへ移行し易く、ライソゾーム内でプロセッシングを受ける可能性が大きい。ハンセン病の発症は、らい菌感染後数十年を要するため、1 回のワクチン接種で高齢者のハンセン病発症を完全に抑制することは容易ではない。したがって、追加免疫用ワクチンが必要となる。本研究では、BCG-DHTM のコンポーネントである HSP70-MMP-II 融合蛋白に着目し、かつ、らい菌の特異性を高めるために、BCG 由来の HSP70 にらい菌由来の MMP-II を連結した融合蛋白を作製し、そのメモリーT 細胞産生能及び追加免疫剤としてらい菌の生体内増殖抑制能を検討した。その結果、らい菌由来 MMP-II を用いた融合蛋白は、ナイーブマウス生体内にメモリーT 細胞を作製することは可能であったが、BCG-DHTM のらい菌増殖抑制能を増強することはできなかった。今後追加免疫用ワクチンについて、より詳細な検討が必要であった。

A. 研究目的

ハンセン病はらい菌の慢性持続感染で発症する慢性炎症性疾患である。ハンセン病のワクチンとして *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) が用いられた時代と地域があったが、その有効率は 26%と報告されていて、現在では信頼し得るワクチンは存在しない状況にある。一般的に、らい菌感染は感受性が高い乳幼児期と考えられ、

ハンセン病発症までには個体差はあるものの数十年と考えられている。したがって、乳児期の BCG の 1 回接種のみで、ハンセン病の発症を生涯にわたり抑制することは簡単ではない。そのため、現行の BCG に代わる新しいリコンビナント BCG を開発するとともに、追加免疫用ブースターワクチンを開発する必要性が高い。これまでに、ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG に

BCG 由来 HSP70 とらい菌由来 MMP-II 遺伝子を連結し導入した BCG-D70M、及び同 BCG に HSP70 と結核菌由来 MMP-II 遺伝子を連結して導入した BCG-DHTM は、ともに生体内においてらい菌の増殖を有意に強く抑制した。今回は、これら BCG に主要コンポーネントとなっている HSP70-MMP-II (らい菌) 融合蛋白の免疫原性をナイーブマウスを用いて検討するとともに、BCG-DHTM 接種後マウスにブースターワクチンとして投与した際のらい菌増殖抑制能を検討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。また、HSP70-MMP-II 連結遺伝子または MMP-II 単独遺伝子を非病原性抗酸菌 *M. smegmatis* に導入し、リコンビナント融合蛋白を作製した。本リコンビナント蛋白を C57BL/6 マウスに静脈内接種し、6 週間後肺 T 細胞を採取し、*in vitro* で HSP70・MMP-II 蛋白で再刺激し、T 細胞が産生する IFN- γ 量を ELISA 法で測定した。さらに、BCG-DHTM を C57BL/6 マウスに皮下接種し、4 週間後にリコンビナント蛋白を静脈内投与し、その 6 週間後にらい菌 5,000 菌体をマウス足蹠に感染させ、8 ヶ月後に足蹠で増殖したらい菌数を算出した。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 週間後に脾臓の T 細胞を *in vitro* で MMP-II タンパクで刺激し、IFN- γ の産生量を ELISA 法で測定した。さらに、BCG-261H 及び BCG-DHTM 1×

10⁴ CFU を C57BL/6 マウスに皮下接種し、4 週間後にらい菌 5,000 菌体をマウス足蹠に感染させ、8 ヶ月後に足蹠で増殖したらい菌数を算出した。

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。動物実験は、国立感染症実験動物委員会の審査・承認を受け行った。

C. 研究結果

HSP70-MMP-II リコンビナント蛋白及び MMP-II リコンビナント蛋白のマウス生体内におけるメモリー T 細胞産生能を検討した。両蛋白は、これまでの研究成果から抗原性に富むことが判明していたが、両者はともに HSP70 蛋白・MMP-II 蛋白の再刺激を受けて IFN- γ を産生するメモリー T 細胞を産生することが可能であった。しかし、両者を比較すると HSP70-MMP-II 融合蛋白の方がメモリー T 細胞産生能は強く、本蛋白は BCG-DHTM の重要なコンポーネントであり、ブースター用ワクチンとして有用と考えられた。そこで、BCG-DHTM 皮下接種後 HSP70-MMP-II 融合蛋白を投与し、本リコンビナント蛋白のブースターワクチンとしてのらい菌増殖抑制能を評価した。その結果、

BCG-DHTM の単独投与のみで、らい菌増殖は抑制され、昨年度の研究結果を確認することが可能だったが、リコンビナント蛋白の投与によるらい菌増殖抑制能の増強は残念ながら観察されなかった。

D. 考察

ハンセン病は、宿主高感受性期である乳児期にらい菌の感染を受け、数十年の潜伏期間を経て発症する。したがって、発症を完全に予防するためには、数十年間メモリーT細胞の機能維持を図らなければならない。現行のBCGはファゴゾーム内に寄生性感染するため、その寿命は10年程度と考えられている。しかし、昨年までに開発したリコンビナントBCG、BCG-DHTMはUreC遺伝子を欠如しウレアーゼ活性を放棄しているため、ライソゾームに移行し易く、各種酵素が存在するライソゾームでは容易にプロセッシングを受け死滅する可能性が高い。したがって、未感作T細胞を強く活性化する能力を有しメモリーT細胞を産生し易い一面、現行のBCG-Tokyo株に比し寿命が短い可能性がある。そのため、長期間にわたりメモリーT細胞を生体内に存在させ、その機能を維持するためには再刺激、すなわちブースターワクチンは必須となる。そこで、BCG-DHTMの主要コンポーネントであるHSP70-MMP-II融合リコンビナント蛋白を作製し、そのT細胞活性化能を評価したところ、期待した通りに充分量のメモリーT細胞を産生した。しかし、残念ながらBCG-DHTMのらい菌増殖抑制能を増強することはできなかった。今後より詳細な検討が必要であり、リコンビナント蛋白の組成・投与時期・投与量など検討する予定である。また、リコン

ビナント蛋白投与によるメモリーT細胞の機能についても解析する予定である。

E. 結論

ハンセン病発症予防用ブースターワクチン開発のため、HSP70-MMP-IIリコンビナント蛋白のT細胞活性化能及びらい菌増殖抑制能を検討した。本リコンビナントBCGは、メモリーT細胞産生能は有していたが、らい菌抑制上は十分な効果が観察されなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukai, T., Y. Tsukamoto, Y. Maeda, T. Tamura, and M. Makino. 2013. Efficient Activation of Human T Cells of Both CD4 and CD8 Subsets by Urease Deficient-Recombinant BCG that Produced Heat Shock Protein 70-*Mycobacterium tuberculosis*-Derived Major Membrane Protein-II Fusion Protein. Clin. Vaccine Immunol., *in press*.
- 2) Wang, H., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and M. Makino. 2013. An in vitro model of *Mycobacterium leprae* induced granuloma formation. BMC Infectious Diseases, 13: 279.
- 3) Kai, M., N. Nakata, M. Matsuoka, T. Sekizuka, M. Kuroda, and M. Makino. 2013. Characteristic mutations found in the ML0411 gene of *Mycobacterium leprae* isolated in Northeast Asian countries. Infection, Genetics and Evolution, 19: 200-204.
- 4) Nakanaga, K., Y. Hoshino, R. R. Yotsu, M. Makino, and N. Ishii. 2013.

Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous non-tuberculous mycobacterial infections. *J. dermatol.*, 40: 151-159.

5) Nakanaga, K., R. R. Yotsu, Y. Hoshino, K. Suzuki, M. Makino, and N. Ishii. 2013. Buruli ulcer and Mycolactone-producing mycobacteria. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 66: 83-88.

2. 学会発表

1) Makino, M. Novel vaccine development against leprosy. 18th International Leprosy Congress, 16th-19th September, 2013, Brussels, Belgium.

2) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. The role of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein in the induction of Th1 immune response. 15th International Congress of Immunology. August, 2013. Milano, Italy.

3) Tamura, T., Y. Shimohakamada, and M. Makino. Enhancing effect of Peptide- 25 on the induction of functional activation of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.

4) Shimohakamada, Y., T. Tamura, M. Makino, and S. L. Nutt. The role of follicular helper T cell in mycobacterial infection. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.

5) Tsukamoto, Y., Y. Maede, T. Tamura, T. Mukai, and M. Makino. Development of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG for the inhibition of *M. tuberculosis* multiplication in lung. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.

6) Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, Y. Maeda, and M. Makino. Construction of stable recombinant BCG which secretes HSP70-MMP-II fusion protein by chromosomal integration of the gene for leprosy vaccine. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.

7) Maeda, Y., T. Tamura, T. Mukai, Y. Fukutomi, and M. Makino. Exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected dendritic cells stimulated with a lipopeptide participate in intercellular communication. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.

8) Miyamoto, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Maeda, and M. Makino. Biosynthetic characterization of glucuronic acid-containing glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program: Tuberculosis and Leprosy Panel Meeting in Japan. 17-18 August, 2013, Sapporo, Japan.