

感染症学(生体防御分野)

1 構 成 員

	平成19年3月31日現在
教授	1人
助教授	0人
講師 (うち病院籍)	0人 (0人)
助手 (うち病院籍)	2人 (0人)
医員	0人
研修医	0人
特別研究員	0人
大学院学生 (うち他講座から)	6人 (3人)
研究生	0人
外国人客員研究員	0人
技術職員 (教務職員を含む)	0人
その他 (技術補佐員等)	1人
合 計	10人

2 教員の異動状況

- 小出 幸夫 (教授) (H8. 4. 1~現職)
 内嶋 雅人 (助手) (H5. 4. 1~現職)
 瀬戸真太郎 (助手) (H18. 4. 1~現職)

3 研究業績

数字は小数2位まで。

	平成18年度
(1) 原著論文数 (うち邦文のもの)	5編 (0編)
そのインパクトファクターの合計	20.90
(2) 論文形式のプロシーディングズ数	3編
(3) 総説数 (うち邦文のもの)	0編 (0編)
そのインパクトファクターの合計	0
(4) 著書数 (うち邦文のもの)	0編 (0編)
(5) 症例報告数 (うち邦文のもの)	0編 (0編)
そのインパクトファクターの合計	0

(1) 原著論文 (当該教室所属の者に下線)

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Nagata T, Uchijima M, Uchiyama H, Yamada T, Aoshi T, Koide Y: Immunization with gene encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inserted with a single helper T-

cell epitope of an intracellular bacterium induces a specific T-cell subset and protective immunity. *Vaccine* 24 (21): 4548-4553. 2006.

2. Koide Y: Curcumin for maintenance therapy in ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:642, 2007.

インパクトファクターの小計 [9.82]

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）

1. Nakano H, Nagata T, Suda T, Tanaka T, Aoshi T, Uchijima M, Chida K, Nkamura H, Okada M, Koide, Y: Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to a dominant epitope on Antigen 85A. *Vaccine* 24: 2110-2119, 2006.
2. Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Andoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Sata M, Yamada M, Iwaoka Y, Kanke K, Hiraishi H, Hirayama K, Arai H, Yoshii S, Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Curcumin Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis: Multicenter, Double-Blind, Randomized Clinical Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4: 1502-1506, 2006.
3. Kgeyama Y, Takahashi M, Torikai E, Suzuki M, Ichikawa T, Nagafusa T, Koide Y, Nagano A: Treatment with anti- TNF- α antibody infliximab reduces serum IL-15 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 26 (4): 505-509, 2007.

インパクトファクターの小計 [11.08]

(2) 論文形式のプロシーディングズ

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Koide Y, Hashimoto D, Uchijima M, Suda T, Chida K, Nagata T: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vectors encoding MPT51 from *M. tuberculosis* induces lung-homing specific T cells. *Int J Infect Dis*, 10: s280, 2006.
2. Enomoto N, Nagata T, Suda T, Uchijima M, Chida K, Nakamura H, Koide Y: Immunization with dendritic cells pulsed with α -galactocylceramide and a dominant CTL epitope elicits effective protective immunity against intracellular bacteria infection. *Int J Infect Dis*, 10: s214, 2006.
3. Uchijima M, Batter D, Nagata T, Biragyn A, Koide Y: Chemokine receptor-mediated delivery of the mycobacterial MPT51 antigen efficiently induces antigen-specific T cell responses. US-Japan cooperative Medical Science Program. p.100-104, 2006.

4 特許等の出願状況

	平成18年度
特許取得数（出願中含む）	0件

5 医学研究費取得状況

	平成18年度
(1) 文部科学省科学研究費	5件 (1,300万円)
(2) 厚生科学研究費	2件 (110万円)
(3) 他政府機関による研究助成	0件 (0万円)
(4) 財団助成金	1件 (1,475万円)
(5) 受託研究または共同研究	0件 (0万円)
(6) 奨学寄附金その他(民間より)	2件 (80万円)

(1) 文部科学省科学研究費

小出幸夫(代表者) 基盤研究(B) 結核菌の新規防御抗原MPT51による免疫応答能の解析とヘテロワクチンの開発 540万円(継続)

小出幸夫(代表者) 萌芽研究 2フォトン顕微鏡を用いたT細胞による細胞内寄生菌排除の生体内イメージング解析 110万円(継続)

永田 年(代表者) 基盤研究(B) 結核菌由来T細胞エピトープの同定とマルチエピトープDNAワクチンの開発 300万円(継続)

内嶋雅人(代表者) 基盤研究(C) ケモカインによる分子・細胞標的型抗結核菌ワクチンの開発と作用機構の解析 200万円(新規)

瀬戸真太郎(代表者) 若手研究(B) 歯周病原菌が産生するブチル酸による免疫担当細胞のアポトーシスのメカニズム 150万円(継続)

(2) 厚生科学研究費

小出幸夫(分担者) 厚生科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 75万円(継続) 代表者 独立行政法人国立病院機構 近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター センター長 岡田全司

小出幸夫(分担者) 厚生労働省 厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業) 「抗酸菌感染の国際的対応への貢献を目指した基盤に関する研究」日米医学協力研究会結核ハンセン病専門部会 35万円(継続) 代表者 結核予防会結核研究所 菅原 勇

(4) 財団助成金

小出幸夫(代表者) Broad Medical Research Program Inflammatory Bowel Disease Grants The Eli and Edythe L. Broad Foundation(Los Angeles) A randomized clinical trial of curcumin in the therapy of ulcerative colitis. 1,475万円

7 学会活動

	国際学会	国内学会
(1) 特別講演・招待講演回数	0件	0件
(2) シンポジウム発表数	1件	0件

(3) 学会座長回数	0件	0件
(4) 学会開催回数	0件	0件
(5) 学会役員等回数	0件	6件
(6) 一般演題発表数	2件	

(1) 国際学会等開催・参加

3) シンポジウム発表

1. Aoshi T, Koide Y, Unaue ER, Miller MJ: Multi-photon imaging of antigen presentation during *Listeria monocytogenes* infection. Keystone Symposia: Imaging Immune responses, Feb. 25- March 1, 2007. (Keystone, Colorado, USA)

5) 一般発表

ポスター発表

1. Koide Y, Hashimoto D, Uchijima M, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nagata T: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *M. tuberculosis* induces lung-homing specific T cells. Australasian Society for Immunology Conference 2006, Dec. 3-7, 2006 (Auckland, NZ).
2. Seto S, Koide Y: *Mycobacterium tuberculosis* blocks phagosome-lysosome fusion by dissociation of late endosome protein, Rab7 from phagosome. Keystone Symposia: Imaging Immune responses, Feb. 25- March 1, 2007. (Keystone, Colorado, USA)

(3) 役職についている国際・国内学会名とその役割

小出幸夫 日本細菌学会 (評議員)

小出幸夫 日本細菌学会関東支部会 (評議員, 学術集会委員会委員長)

小出幸夫 日本免疫学会 (評議員)

小出幸夫 日本組織適合学会 (評議員)

小出幸夫 東海遺伝子・再生医療研究会 (評議員)

小出幸夫 中部乳酸菌研究会 (幹事)

8 学術雑誌の編集への貢献

	国内	外国
学術雑誌編集数 (レフリー数は除く)	0件	0件

(3) 国内外の英文雑誌のレフリー

1. Journal of Immunology (米国) 2回
2. Gastroenterology (米国) 2回
3. Vaccine (オランダ) 3回
4. FEMS Immunology & Medical Microbiology (英国) 4回
5. Microbiology and Immunology (日本) 4回

9 共同研究の実施状況

	平成18年度
(1) 国際共同研究	2件
(2) 国内共同研究	2件
(3) 学内共同研究	6件

(1) 国際共同研究

- 1) 「DNA vaccines against Cancer and TB」, Arya Biragyn , Ph.D., National Cancer Institute / National Institutes of Health (米国), Feb., 2003～, 研究材料の交換
- 2) 「Two-photon imaging of T-lymphocytes in vivo」, Mark Miller Ph.D., Washington University (米国), Feb, 2004～, 資料の交換, 研究者の派遣

(2) 国内共同研究

- 1) 岡田全司 (独立行政法人国立病院機構 近畿中央胸部疾患センター) 「レンチウイルスベクターを用いた結核に対するワクチンの開発」
- 2) 永津雅章 (静岡大学工学部 電気・電子工学科) 「マイクロ波放電を用いた低温プラズマ滅菌のメカニズム解明とその医療応用」

(3) 学内共同研究

- 1) 永田 年 (看護学科) 「結核に対する新規ワクチン開発」
- 2) 伊熊睦博 (第一内科) 「炎症性大腸炎の治療法の研究」
- 3) 榎本紀之, 橋本 大, 須田隆文, 千田金吾 (第二内科) 「 α -GalCerを用いた樹状細胞ワクチンの研究」
- 4) 橋本 大, 須田隆文, 千田金吾 (第二内科) 「レンチウイルスベクターを用いた結核に対するワクチンの開発」
- 5) 右藤智啓, 須田隆文, 千田金吾 (第二内科) 「樹状細胞指向性結核ワクチンに関する研究」
- 6) 鈴木大介 (第三内科) 「低分子結核菌分泌抗原群のT細胞エピトープの同定」

10 産学共同研究

	平成18年度
産学共同研究	1件

12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

1. 結核菌感染マクロファージにおけるP-L融合阻害機構のイメージ解析

結核菌はマクロファージに貪食されても, 殺菌機構であるファゴソーム-リソソーム融合 (P-L融合) を阻害することによって, 細胞内寄生性能を獲得している。本研究において, 結核菌によるP-L融合阻害機構の詳細を明らかにするため, 蛍光タンパク質を融合したエンドソームマーカータンパク質を発現するマクロファージに結核菌を感染させて, イメージ解析を行った。その結果,

(1) 結核菌ファゴソームに後期エンドソームやリソソームとの融合は貪食直後には阻害されず,

これらの膜小胞と融合が行われる。(2) その後、後期エンドソーム小胞が結核菌ファゴソームから解離することが明らかになった。このことは、結核菌によるP-L融合阻害機構はファゴソームと後期エンドソームの持続的な融合を阻害することによって行われていることを示唆する。

2. 第三世代レンチウイルス・ベクターの経気道免疫による肺指向性抗結核免疫の誘導

現在、結核に対する生ワクチンとして使用されているBCGは乳幼児期の粟粒結核の予防には有効であるが、成人の肺結核には無効である。そこで、我々は遺伝子導入効率が良く、安全な第三世代レンチウイルスをベクターとして、我々が発見した結核菌の防御抗原(MPT51)を発現するウイルスワクチンを作製した。そして、これを経気道接種することで、肺指向性抗結核T細胞を誘導することを試みた。その結果、以下の成果を得ることができた。

- 1) 抗原提示細胞の動態：ワクチン接種後の気道樹状細胞(CD11c⁺)を、GFPを指標として追跡すると、肺から縦隔リンパ節に移行することが判明した。これによりT細胞は縦隔リンパ節で感作されることが示唆された。
- 2) MPT51特異的T細胞の誘導：テトラマー法により、特異的CD8⁺T細胞を縦隔リンパ節と脾臓で検出した。縦隔リンパ節ではワクチン接種2週後から特異的CD8⁺T細胞が出現し、3週後にピークとなり、その後、終息した。脾臓では特異的CD8⁺T細胞は検出出来なかった。
- 3) IFN- γ 産生：MPT51ペプチド刺激によるIFN- γ 産生で、特異的CD8⁺T細胞の存在を検討したところ、縦隔リンパ節で大量に、脾臓でも少量産生がみられた。脾臓にも若干特異的T細胞が存在すると考えられた。
- 4) 再刺激によるT細胞の誘導：ワクチン接種2ヶ月後にBCGを経気道的に感染させたところ、5日後に肺に特異的CD8⁺T細胞が出現し、記憶T細胞が誘導されていることを確認した。興味あることに、この際に縦隔リンパ節に特異的CD8⁺T細胞は認められず、チャレンジ2ヶ月後に再発現した。このことは、記憶CD8⁺T細胞がBCG感染に伴って、縦隔リンパ節から動員されることを意味する。
- 5) ヘテロ免疫とキラー活性：レンチベクターで感作し、BCGで追加免疫することで、縦隔リンパ節に強いキラー細胞を誘導できた。
- 6) 現在、結核菌の経気道感染に対する感染防御能を検討しているが、良好な成績が得られている。

以上、MPT51を発現するレンチウイルスベクター・ワクチンは1回免疫のみで、肺指向性CD8⁺T細胞を誘導できた。BCGと組み合わせたヘテロ免疫法で、肺結核に対する強力な感染防御免疫を誘導することが期待できる。

3. 分子・細胞標的型抗結核菌ワクチンの開発と作用機構の解析

ケモカインレセプターの発現様式は細胞の種類により異なり、未熟樹状細胞ではCCR1, 2, 3, 5, 6などが発現している。一部のケモカインレセプターは、リガンドが結合すると、それらとともに細胞内に取り込まれることが報告されている。未熟樹状細胞上のケモカインレセプターを標的として、抗原取りこみ効率を上げることによりワクチン効果の増強をはかる、新たなワクチンの検討と作用機構の解析を目的とした。

CCR5を標的として、そのリガンドのひとつであるMIP-1をモデル系に選択した。結核菌の分泌抗原であるMPT51遺伝子との融合型DNAワクチン(pCI-MIP-1 α -MPT51)で免疫した場合、抗原単独発現プラスミド(pCI-MPT51)に比べ、抗原特異的CD8⁺T細胞の数が増加することをこれまでに明らかにしてきた。作用機構の解析をおこなうために、MIP-1 α 遺伝子の下流にGFP遺伝子を連結した発現プラスミドを構築し、これを293細胞に導入することによりMIP-1 α -GFP融合タンパクを調製した。これを樹状細胞株などに作用させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した結果、細胞膜表面上のCCR5と融合タンパクの局在が一致した。細胞内へGFP融合タンパク質が細胞内に取り込まれる、その局在がCCR5と一致することが確認できた。さらに、大腸菌発現系で調製したMIP-1 α -MPT51融合タンパクで免疫した場合、接種の際に他のアジュバントを必要とせずにCD8⁺T細胞が活性化され、抗原特異的IFN- γ の産生を誘導することができた。一方、MIP-1 α 部位に変異をもつ融合タンパクで免疫した場合は、抗原特異的IFN- γ は産生誘導されなかった。これらのことより、未熟樹状細胞に発現しているCCR5を介して抗原を取り込ませることで、効率良くT細胞を感作できることが示唆された。

4. 結核菌由来感染防御抗原分子MPT51のヒトヘルパーT細胞エピトープの同定

〔目的〕結核菌の主要な分泌タンパクのひとつであり、当教室でその感染防御効果を認めたMPT51分子のヒトヘルパーT細胞エピトープを同定する。

〔概要〕HLA-DR0401トランスジェニックマウスにMPT51を発現するDNAワクチンを遺伝子銃法で免疫した。免疫マウス脾細胞をMPT51分子のoverlapping peptidesで刺激しIFN- γ の産生を指標としてMPT51のDR4拘束性T細胞エピトープの同定をした。

〔目的の達成度〕(1) MPT51 DNAワクチン免疫HLA-DR0401トランスジェニックマウス脾細胞は、MPT51 p51-70ペプチドに应答してIFN- γ を産生した。さらにMPT51 p51-70ペプチド内の、p53-62 (TLAGKGISVV) の10mer ペプチドがT細胞エピトープであることが明らかとなった。

(2) 実際にツベルクリン皮内テスト陽性健常者の末梢血を用いて検討したところ、このペプチド刺激に対してIFN- γ の産生を認めた。

5. 結核菌低分子量分泌タンパクのマウスT細胞エピトープの同定

〔目的〕結核菌由来タンパクの中で、抗原性の高い一群の低分子量タンパクのマウスT細胞エピトープを同定する。

〔概要〕BALB/cおよびC57BL/6の各純系マウスに結核菌低分子量タンパクを発現するDNAワクチンを遺伝子銃法で免疫した。本年度用いた結核菌低分子量タンパクは、Rv2433c (CFP-11), Rv1827 (CFP-17), Rv0164 (TB18.5) である。免疫マウス脾細胞を各タンパクのoverlapping peptidesで刺激しIFN- γ の産生を指標としてH2^dおよびH2^b拘束性T細胞エピトープの同定をした。

〔目的の達成度〕(1) DNAワクチン免疫BALB/cおよびC57BL/6マウス脾細胞は、数種のペプチドに应答してIFN- γ を産生した。それらは、Rv2433c p8 (BALB/c), Rv2433c p9 (C57BL/6), Rv1827 p7, p8 (BALB/c), Rv0164 p10 (BALB/c) である。またこれらのペプチド刺激で、IFN- γ 産生性CD8⁺T細胞が増殖することが確認された。これらの結果は、これらのペプチド領域にCD8⁺T細胞エピトープが存在することを示唆する。

(鈴木大介, 永田 年, 小出幸夫)

6. 結核菌DNA結合タンパクMDP1のマウスT細胞エピトープの同定

[目的] 結核菌DNA結合タンパクMDP1のマウスT細胞エピトープを同定する。

[概要] BALB/cマウスにMDP1タンパクを発現するDNAワクチンを遺伝子銃法で免疫した。免疫マウス脾細胞を各タンパクのoverlapping peptidesで刺激しIFN- γ の産生を指標としてH2^d拘束性T細胞エピトープを同定した。

[目的の達成度] DNAワクチン免疫BALB/cマウス脾細胞は、数種のペプチドに応答してIFN- γ を産生した。特にMDP1 p17ペプチドに反応して、高いIFN- γ を産生した。このことはこのペプチド領域にドミナントT細胞エピトープが存在することを示唆する。

7. 免疫賦活性CpG-DNAによる発現誘導される遺伝子の解析

誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 遺伝子はLPSなどの菌体成分により発現誘導される。CpG-DNAによるiNOS遺伝子の転写活性化には、プロモーター中のAP-1様配列が重要であることをこれまで明らかにしてきた。iNOS遺伝子に対するAP-1ファミリーの作用機構を明らかにすることを目的として、AP-1ファミリー構成因子とその変異体を発現するプラスミドを用いて転写活性を解析した。CpG-DNAに対する応答性は、c-Junのみ (ホモダイマー) を発現させた場合が最も高く、c-Fos存在下では逆に、その応答性は低下した。一般的に、AP-1配列をプロモーター領域にもつ遺伝子においてはc-Jun/c-Fosヘテロダイマーの活性が最も高いものである。しかし、iNOS遺伝子におけるCpG-DNAに対する応答性は、他とは異なり、c-Junホモダイマーの方が高く、c-Fosはむしろ抑制的に働くことが明らかになった。

13 この期間中の特筆すべき業績、新技術の開発

1. これまで、結核菌の代謝産物がP-L融合阻害を起こすことが示唆されているが、その阻害機構の詳細な過程は明らかになっていない。結核菌感染マクロファージにおける蛍光タンパク質融合エンドソームタンパク質のイメージ解析によって、結核菌によるユニークなP-L融合阻害機構のメカニズムを明らかにした。

2. レンチウイルスベクターを用いて、経気道的にワクチンを接種する方法を開発した。

14 研究の独創性、国際性、継続性、応用性

1. 結核菌はマクロファージに貪食された後、P-L融合を阻害することによって、マクロファージ内で増殖することが知られている。我々はP-L融合に重要な役割を果たすGTPaseであるRab7に注目し、結核菌を含む食胞は感染初期にはP-L融合を起こしうが、その後、Rab7を食胞より乖離することにより、P-L融合を阻害することを世界で初めて明らかにした。この情報は、今後のワクチンの開発、及び薬剤の開発に有用であると考えられる。

2. 遺伝子導入効率が高いレンチウイルスベクターをDNAワクチンの代わりに用いた。これに結核

菌の防御抗原遺伝子であるMPT51を挿入し、経気道的に接種することで、肺指向性のT細胞を誘導することができた。この手法は国際的にみても、他に類をみない。

3. 未熟樹状細胞に発現しているケモカイン受容体CCR5を利用して、このリガンドであるMIP-1を結核菌の防御抗原に結合し、この抗原を樹状細胞に取り込ませ、効率よくT細胞を感作できたことは、国際的にも評価できる。

4. これまで、結核菌抗原MPT51タンパクのマウスおよびヒトT細胞エピトープの同定の研究をおこなってきたが、本年度は結核菌低分子量分泌タンパクおよびMDP1タンパクのマウスT細胞エピトープの同定をおこなってきている。これらは、結核に対するDNAワクチン、サブユニットワクチンの標的分子として重要であるのみならず、結核感染の診断ツールとして応用性のあるものである。