

# 微生物学

## 1 構成員

	平成 14 年 3 月 31 日現在
教授	1 人
助教授	1 人
講師（うち病院籍）	0 人（ 人）
助手（うち病院籍）	2 人（ 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）	4 人（ 3 人）
研究生	0 人
外国人客員研究員	0 人
技官（教務職員を含む）	0 人
その他（技術補佐員等）	1 人
合 計	9 人

## 2 教官の異動状況

- 小出 幸夫（教授）（H8.4.1 現職）  
 永田 年（助教授）（H9.9.1 現職）  
 内嶋 雅人（助手）（H5.4.1 現職）  
 青枝 大貴（助手）（H12.7.1 現職）

## 3 研究業績

数字は小数 2 位まで。

	平成 13 年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	7 編（0 編）
そのインパクトファクターの合計	24.60
(2) 論文形式のプロシーディングズ数	0 編
(3) 総説数（うち邦文のもの）	0 編（ 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）	1 編（1 編）
(5) 症例報告数（うち邦文のもの）	0 編（ 編）
そのインパクトファクターの合計	0
(6) 国際学会発表数	2 編

### (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. Yoshida A., Nagata T., Uchijima M., Koide Y. : (2001) Protective CTL response is induced in the absence of CD4<sup>+</sup> T cells and IFN- $\gamma$  by gene gun DNA vaccination with a minigene encoding a CTL epitope of *Listeria monocytogenes*. *Vaccine* 19 (30): 4297-4306.
2. Nagata T., Higashi T., Aoshi T., Suzuki M., Uchijima M., Koide Y. (2001) Immunization with plasmid DNA encoding MHC class II binding peptide/CLIP-replaced invariant chain (Ii) induces specific helper T cells *in vivo*: the assessment of Ii p31 and p41 isoforms as vehicles for immunization. *Vaccine* 20 : 105-114.
3. Uchijima M., Raz E., Carson D.A., Nagata T., Koide Y. (2001) Identification of immunostimulatory DNA-induced genes by suppression subtractive hybridization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286 : 688-691.
4. Nagata T., Aoshi T., Suzuki M., Uchijima M., Kim YH, Yang Z, Koide Y (2002) Induction of protective immunity to *Listeria monocytogenes* by immunization with plasmid DNA expressing a helper T-cell epitope that replaces the class II-associated invariant chain peptide of the invariant chain. *Infect Immun.* 70 (5): 2676-80.

インパクトファクターの小計 [12.211]

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. Yokota N., Uchijima M., Nishizawa S., Namba H., Koide, Y. (2001) Identification of differentially expressed genes in rat hippocampus after transient global cerebral ischemia using subtractive cDNA cloning based on PCR. *Stroke* 32 : 168-174.
2. Yamada T., Uchiyama H., Nagata T., Uchijima M., Suda T., Chida K., Nakamura H., Koide Y. (2001) Protective CTL responses induced by DNA immunization against immunodominant and subdominant epitopes of *Listeria monocytogenes* are noncompetitive. *Infect. Immun.* 69 (5): 3427-3430.
3. Kageyama Y., Koide Y., Nagata T., Uchijima M., Yoshida A., Arai T., Miura T., Miyamoto C., Nagano A. (2001) Toxic shock syndrome toxin-1 accelerated collagen-induced arthritis in mice. *J Autoimmun.* 16 (2): 125-31.

インパクトファクターの小計 [12.388]

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

## (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

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）

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

### (3) 総 説

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

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）

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

### (4) 著 書

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. 小出幸夫 (2001) DNA ワクチン [光山正雄編 結核 p.189-201] 医薬ジャーナル社

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）

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

### (5) 症例報告

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

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）

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

### (6) 国際学会発表

1. Nagata, T., Aoshi, T., Suzuki, M., Uchijima, M., Koide, Y. (2002) Immunization with plasmid DNA expressing a helper T cell epitope / CLIP-replaced invariant chain induces protective immunity against an intracellular bacterium. ASM Conference on Immunity to Bacterial, Viral, and Protozoal Pathogens, March, Savannah, Georgia, U.S.A.

2. Tozawa, K., Hanai, H., Sugimoto, K., Koide, Y. (2001) Evidence for the critical role of interleukin-12 but not interferon- $\gamma$  in the pathogenesis of experimental colitis in mice. May, Digestive Disease Week, Atlanta, Georgia, USA

#### 4 特許等の出願状況

	平成 13 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 13 年度
(1) 文部科学省科学研究費	2 件 (440 万円)
(2) 厚生科学研究費	0 件 ( 万円)
(3) 他政府機関による研究助成	1 件 ( 30 万円)
(4) 財団助成金	1 件 ( 45 万円)
(5) 受託研究または共同研究	0 件 ( 万円)
(6) 奨学寄附金その他（民間より）	2 件 ( 60 万円)

##### (1) 文部科学省科学研究費

小出幸夫（代表者）基盤研究（C）(2)「結核ワクチン開発のための HLA 拘束性キラー T 細胞エピトープ同定システムの確立」250 万円（新規）

内嶋雅人（代表者）基盤研究（C）(2)「細菌由来免疫調節性 CpG-DNA により発現が誘導される遺伝子の解析」190 万円（新規）

##### (3) 他政府機関による研究助成

小出幸夫（分担者）日米医学協力計画 結核・ハンセン病専門部会「細胞内寄生菌に対する DN ワクチンの研究」30 万円 代表者 京都大学大学院医学研究科教授 光山正雄

##### (4) 財団助成金

小出幸夫（代表者）財団法人静岡総合研究機構学術教育研究推進事業費補助金「結核に対するエピトープ・ワクチンの研究：アルゴリズムとエピトープ・ヒエラルキーに基づく新規ワクチン開発法の確立」45 万円

#### 6 特定研究などの大型プロジェクトの代表，総括

#### 7 学会活動

	平成 13 年度
(1) 特別講演・招待講演回数	0 件
(2) 国際・国内シンポジウム発表数	2 件
(3) 学会座長回数	1 件
(4) 学会開催回数	0 件
(5) 学会役員等回数	5 件

(2) 国際・国内シンポジウム発表

1. 戸澤孝太郎, 杉本 健, 花井洋行, 小出幸夫 (2001) マウス TNBS 大腸炎における interferon- $\gamma$  と interleukin-12 の役割. 第25回日本リンパ学会総会. 6月, 浜松
2. 永田 年 (2001) DNA ワクチンをめぐる話題: エピトープ DNA ワクチンを用いた細胞内寄生菌に対する防御免疫の解析. 第84回 日本細菌学会関東支部総会, 11月, 横浜

(3) 座長をした学会名

小出幸夫 (2001) 第84回 日本細菌学会関東支部総会シンポジウム

(5) 役職についている学会名とその役割

- 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)  
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 東海遺伝子医療研究会 (評議員)

## 8 学術雑誌の編集への貢献

	平成13年度
学術雑誌編集数	0件

## 9 共同研究の実施状況

	平成13年度
(1) 国際共同研究	0件
(2) 国内共同研究	2件
(3) 学内共同研究	5件

(2) 国内共同研究

1. 大原直也 (長崎大学歯学部) 「結核に対するエピトープ DNA ワクチンの開発」
2. 岡田全司 (国立療養所近畿中央病院臨床研究センター) 「リステリアをキャリアーとした結核に対する DNA ワクチンの開発」

(3) 学内共同研究

1. 山田 孝, 内山 啓, 須田隆文, 千田金吾 (第二内科) 「細胞内寄生菌に対するエピトープ DNA ワクチンの研究」
2. 戸澤孝太郎, 杉本 健, 花井洋行 (第一内科, 光学医療診療部) 「炎症性腸炎の発症機序と治療法の研究」
3. 三鬼慶太, 中村 達 (第二外科) 「リステリアをキャリアーとした結核に対する新規 DNA ワクチンの開発」
4. 中村祐太郎, 中野秀樹, 須田隆文, 千田金吾 (第二内科) 「組換えレトロウイルス導入樹状細胞

胞を用いた細胞内寄生菌に対する感染防御免疫の誘導」

5. 影山康徳, 長野 昭 (整形外科) 「慢性関節リウマチの発症機序と治療法の研究」

## 10 産学共同研究

	平成 13 年度
産学共同研究	1 件

1. 浜松フォトニクス 「新規遺伝子解析法に基づく全自動迅速細菌同定装置の解析」

## 11 受賞 (学会賞等)

## 12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

### 1. 遅延型細胞性免疫誘導型 DNA ワクチンの開発

これまで DNA ワクチンにより特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) や抗体の誘導が効率よく行われることが確認されているが, 特異的ヘルパー T 細胞 (Th) のみを誘導する DNA ワクチンの報告はない。そこで特異的 Th 誘導型 DNA ワクチンの開発を試みた。既知の Th エピトープのみをコードするオリゴヌクレオチドを不変鎖 (Ii 鎖) 分子 cDNA 内に組み込み, この組換え cDNA を DNA ワクチンとして遺伝子銃法を用いてマウスに免疫した。免疫効果は, 免疫マウス脾細胞の抗原特異的増殖反応, 抗原特異的サイトカイン発現で評価した。オブアルブミンおよびリステリオリジン O タンパクの既知 Th エピトープを組み込んだ組換え Ii 鎖 cDNA を作製し, これをマウスに遺伝子銃法で免疫することによりマウス個体で特異的 Th 細胞が誘導されるを確認した。さらに, 抗リステリア Th 誘導型 DNA ワクチンではリステリアに対する感染防御能が誘導されることを確認した。

(永田 年, 鈴木美奈, 青枝大貴, 内嶋雅人, 小出幸夫)

### 2. 弱毒組換えリステリアをキャリアとした抗結核菌 DNA ワクチンの開発

リステリアは細胞内寄生菌であり, 宿主細胞の食胞から細胞質に移行する性質がある。しかも, この菌は細胞内寄生菌に対する防御免疫に必要な Th1 細胞を誘導することができる。このため, リステリアは DNA ワクチンのキャリアとして有用と考えられる。そこで, 我々は弱毒組換えリステリアをキャリアとした抗結核菌 DNA ワクチンを作製しその効果を検討した。ワクチンの標的分子として, 結核菌の主要な分泌タンパクで免疫誘導効果のあることが知られている Ag85 ファミリー遺伝子 (Ag85A, Ag85B, MPB51) を用いた。これらの遺伝子を真核細胞発現プラスミドに挿入し, それらのプラスミドを保持する弱毒組換えリステリア株を作製した。それらのリステリア株を C57BL/6 マウスに腹腔投与し, 抗結核菌免疫が誘導されるか検討した。その結果, Ag85A, Ag85B, MPB51 分子を標的分子にしたいずれの弱毒組換えリステリア DNA ワクチン投与マウスでも有意な結核菌抗原特異的 T 細胞の誘導を確認した。現在, これら組換えリステリア株の結核菌防御免疫誘導能につき検討中である。

(三鬼慶太, 永田 年, 内嶋雅人, 小出幸夫)

### 3. 細菌由来免疫賦活性 DNA (ISS) の作用機構の解析

細菌ゲノム DNA 中の CpG 配列はメチル化されていないことから、脊椎動物の免疫系に非自己 DNA として認識され、自然免疫を誘導する。同じ配列を持つ合成 DNA およびプラスミドも同様の作用をもち、強いアジュバント効果があることが知られている。これらの免疫賦活性 DNA を ISS という。しかしながら、ISS に対する宿主応答機構は TLR9 の関与などが明らかにされているものの、十分な知見は得られていない。そこで、ISS により発現誘導される遺伝子および ISS の作用に関与する遺伝子の解析をすすめた。得られた主な結果は以下の如くである。

- ① サブトラクション法により、ISS による発現誘導が未報告である遺伝子を同定し、その発現の経時的変化を解析した。NF- $\kappa$ B (p105) などが ISS 刺激後 3 時間以内に発現誘導されることを明らかにした。
- ② 昨年度までに ISS による iNOS 遺伝子の発現誘導に AP-1 が関与することを明らかにしてきた。さらに c-Jun の欠失変異体発現プラスミドを作製して解析をすすめた結果、リン酸化部位を欠失させることで ISS に対する応答性が低下することを明らかにした。この結果、c-Jun のリン酸化が ISS の iNOS 遺伝子発現誘導に関与することが示唆された。
- ③ 各種サイトカインによる TLR9 の発現を解析した結果、IFN- $\gamma$  により TLR9 mRNA が発現誘導され、ISS に対する応答性も増大することを明らかにした。

(内嶋雅人, 永田 年, 青枝大貴, Eyal Raz, 小出幸夫)

### 4. T 細胞に対する抗原提示能の抗原修飾および抗原提示細胞修飾による解析

抗原遺伝子にユビキチン遺伝子を数を変えてタンデムに結合した遺伝子を構築した。これをレトロウイルスベクターで細胞株に導入することにより、同じ抗原でユビキチン化の程度が異なる複数の細胞株を樹立した。これにより、T 細胞に対する抗原提示に必要なユビキチン化の程度を解析できる。

また、これと併せて、T 細胞に対する抗原提示細胞上の補助シグナル分子である B7 遺伝子を導入した細胞株も樹立した。これら細胞株を用いて、細胞表面の主要組織適合性複合体 (MHC) - 抗原ペプチド複合体密度と補助シグナルの有無による記憶 T 細胞の応答性について現在解析中である。

(青枝大貴, 永田 年, 内嶋雅人, 小出幸夫)

### 5. クルクミンによるマウス TNBS 大腸炎の予防と治療

クルクミンは抗腫瘍効果、抗炎症効果など様々な薬理学的作用を示すことが知られている。クルクミンのこのような多彩な効果の少なくとも一部は転写因子である NF- $\kappa$ B の阻害によるものである。しかしながら、クルクミンの炎症性腸疾患に与える影響については未だ不明である。本研究ではクルクミンによりマウス TNBS 大腸炎を予防、治療できるかどうかを検討し、その影響を分子レベルで明らかにすることを試みた。その結果、クルクミンを餌に混ぜて経口投与することにより、TNBS 腸炎を予防および治療できることが、組織学的所見そして体重変化から明らかとなった。この効果は大腸粘膜への CD4 陽性 T 細胞の浸潤の抑制および粘膜浸潤マクロファージにおける NF- $\kappa$ B 活性化の阻害と一致した。また、クルクミンは TNBS 腸炎における炎症性サイ

トカインの遺伝子発現を抑制することも判明した。以上より、クルクミンは炎症性腸疾患の治療薬となりうることが示唆された。

(杉本 健, 戸澤孝太郎, 内嶋雅人, 花井洋行, 小出幸夫)

### 13 この期間中の特筆すべき業績, 新技術の開発

1. DNA ワクチンの投与方法には, 筋肉注射法, 遺伝子銃法などがあるが, それらに代わる方法として弱毒組換えリステリアをキャリアとした DNA ワクチン投与方法が, 実際にマウス個体レベルで有効であることを証明できた。DNA ワクチンの長所のひとつは細胞性免疫が誘導できることである。リステリアは, 細胞性免疫の誘導に必須であるマクロファージ, 樹状細胞などの抗原提示細胞に選択的に侵入する性質がある。この際, リステリアは細胞性免疫の中でも細胞内寄生菌の排除に有効な細胞傷害性 T 細胞のみならず, Th1 細胞を誘導することができるという特質を持つ。これらの性質を利用した弱毒組換えリステリア DNA ワクチンが実際に個体レベルで有効であることを示したことは, 新たなワクチンの開発のために重要な知見である。
2. ISS (CpG モチーフ) によるシグナル伝達に重要な役割を果たす TLR9 の発現が IFN- $\gamma$  により増強されることを, 初めて明らかにした。
3. クルクミンが TNBS 腸炎の予防と治療に有効であることを, 初めて明らかにした。

### 14 研究の独創性, 国際性, 継続性, 応用性

1. 当教室は, これまで一貫して, DNA ワクチンの手法を使った細胞内寄生細菌に対する細胞性免疫の誘導について研究してきた。昨年度までは主に遺伝子銃法を使用して, 細胞傷害性 T 細胞, ヘルパー T 細胞をそれぞれ個々に誘導できる DNA ワクチンの開発を行ってきた。これらの研究の一部は国際学会において発表し評価された。平成 13 年度は, 遺伝子銃法と並んで, 弱毒リステリアをキャリアとした DNA ワクチンおよび樹状細胞ワクチンも有効であることを示すことができた。さらに, 当初は細胞内寄生細菌のモデルとして扱いやすいリステリアをワクチンの標的としてきたが, 平成 13 年度以降は, 社会的により需要の大きい結核菌に対する DNA ワクチンの開発に着手している。
2. 免疫賦活作用を示す CpG モチーフ (ISS) によって, 宿主細胞に誘導発現される遺伝子を網羅的に解析した報告は他に例がない。これにより, ISS による免疫賦活作用の全貌を明らかに出来る。
3. ユビキチンおよび B7 による抗原提示能の解析: 抗原提示の基本的な制御システムや新規エピトープマッピング法の開発につながる基礎段階での重要な研究である。
4. クルクミンは天然物質であるターメリックより得られ, 毒性は極めて少ない。これが炎症性腸疾患の予防と治療に有効であることを世界で初めて証明したことは, 臨床応用の可能性の点で意義深い。

### 15 新聞, 雑誌等による報道

1. 小出幸夫 (2001) DNA ワクチンの有効性探る (生命科学の最先端), 静岡新聞