

# 微生物学

## 1 構成員

	平成16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（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）	3人（2人）
研究生	0人
外国人客員研究員	1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15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	21.49
(2) 論文形式のプロシーディングズ数	2編
(3) 総説数（うち邦文のもの）	3編（1編）
そのインパクトファクターの合計	1.77
(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

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. Uenoyama, S, Kobayashi T, Takenouchi Y, Yamashita K, Kazui T, Koide Y : Improvement of intestinal motility using S-methylisothiourea sulfate in a canine postoperative ileus model. *Am J Surg* 187 (1) : 93-937, 2004.
2. Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M, Koide Y : Induction of protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51. *Infect Immun* 72 (4) : 2014-2021, 2004.
3. Kageyama Y, Koide Y, Uchijima M, Nagata T, Yoshida A, Aoshi T, Miura T, Nagafusa T, Nagano A : Plasmid encoding interleukin-4 in the amelioration of murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 50 (3) : 968-975, 2004.

インパクトファクターの小計 [13.176]

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

1. Teramoto K, Kontani K, Ozaki Y, Sawai S, Tezuka N, Nagata T, Fujino S, Itoh Y, Taguchi O, Koide Y, Ohkubo I, Asai T, Ogasawara K : DNA Encoding a Pan-MHC Class II Peptide Analogue Augmented Antigen-specific Cellular Immunity and Suppressive Effects on Tumor Growth Elicited by DNA Vaccine Immunotherapy. *Cancer Res* 63 : 7920-7925, 2003.
2. Nagatsu M, Terashita F, Koide Y : Low-temperature sterilization with surface-wave-excited oxygen plasma. *Jpn J Appl Phys.* 42 : L856-859, 2003.

インパクトファクターの小計 [8.318]

## (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, Miki K, Nagata T, Suzuki M, Aoshi T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Okada M : Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using a DNA vaccine encoding MPB51 antigen carried by attenuated suicide *Listeria monocytogenes* and identification of T-cell epitopes of the antigen. In : Thirty-eighth Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program, p.32-38, 2003.
2. Koide Y, Suzuki M, Aoshi T, Nagata T : Identification of MHC-restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, 8 : s38, 2004.

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

1. Nagata T, Aoshi T, Suzuki M, Uchijima M, Koide Y : Induction of antigen-specific T-cell subsets by DNA vaccination. Recent Research Development in Biophysics and Biochemistry 3 : 89-106, 2003.
2. Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Suzuki M, Koide Y : Cytotoxic T-lymphocyte-, and helper T-lymphocyte-oriented DNA Vaccine. DNA and cell Biology, 23 (2) : 93-106, 2004.
3. 小出幸夫, 永田 年 : Ag85分子DNAワクチンによる抗結核細胞性免疫の誘導 Annual Review免疫2004, 中外医学社, p.233-243, 2003.

インパクトファクターの小計 [1.771]

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

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

## 4 特許等の出願状況

	平成15年度
特許取得数（出願中含む）	1件

1. 「結核菌防御抗原MPT51のHLA-A\*0201拘束性T細胞エピトープ」発明者：鈴木美奈，青枝大貴

永田 年, 小出幸夫

## 5 医学研究費取得状況

	平成15年度
(1) 文部科学省科学研究費	2件 (360万円)
(2) 厚生科学研究費	1件 (120万円)
(3) 他政府機関による研究助成	1件 (17万円)
(4) 財団助成金	1件 (30万円)
(5) 受託研究または共同研究	1件 (500万円)
(6) 奨学寄附金その他(民間より)	0件 (0万円)

### (1) 文部科学省科学研究費

小出幸夫(代表者) 基盤研究(C) 肺ホーミング性Th1細胞, CTLを誘導する抗結核DNAワクチンの新戦略 230万円(新規)

永田 年(代表者) 基盤研究(C) 弱毒リステリアをキャリアーとした抗結核菌DNAワクチンの研究 130万円(継続)

### (2) 厚生科学研究費

小出幸夫(分担者) 新興・再興感染症研究事業「結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究: [抗結核キラーTリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン(サブユニット-DNA-リコンビナントBCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]」120万円(継続) 代表者 国立療養所近畿中央病院臨床研究センター 岡田全司

### (3) 他政府機関による研究助成

小出幸夫(分担者) 日米医学協力研究会結核ハンセン病専門部会 17万円(継続) 代表者 京都大学大学院医学研究科微生物感染症学 光山正雄

### (4) 財団助成金

小出幸夫(代表者) 中部乳酸菌研究会 30万円

### (5) 受託研究または共同研究

小出幸夫: 科学技術振興機構「新規遺伝子解析法による細菌の迅速同定法」500万円

## 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

	国際学会	国内学会
(1) 特別講演・招待講演回数	2件	0件
(2) シンポジウム発表数	1件	0件
(3) 学会座長回数	1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	8件	

### (1) 国際学会等開催・参加

#### 2) 国際学会・会議等における基調講演・招待講演

1. Koide Y : DNA vaccines against intracellular pathogens, A/I/R Conference, University of South Florida (USA), January 14, 2004.
2. Koide Y : DNA vaccines against tuberculosis and identification of T-cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis*, Special lecture, All children's hospital/University of South Florida (USA), January 15, 2004.

#### 3) 国際学会・会議等でのシンポジウム発表

Koide Y, Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M : Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51. Keystone Symposia : Rational Design of Vaccine and Immunotherapeutics : Workshop 2 : Vaccines for Developing Countries, Diseases and Technologies, Keystone (Colorado, USA), Jan. 8, 2004

#### 4) 国際学会・会議等での座長

小出幸夫, 7<sup>th</sup> Asia-Oceania Histocompatibility Workshop and Conference, Karuizawa, Japan, Sept. 16-19, 2003.

#### 5) 一般発表

##### 口頭発表

Koide Y, Miki K, Nagata T, Suzuki M, Aoshi T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Okada M : Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using a DNA vaccine encoding MPB51 antigen carried by attenuated suicide *Listeria monocytogenes* and identification of T-cell epitopes of the antigen. Thirty-eighth Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program, July 21-22, 2003, Newark (USA)

### ポスター発表

1. Nagata T, Aoshi T, Suzuki M, Uchijima M, Uchiyama T, Koide Y : Induction of a single helper T-cell epitope-specific T cells by Th-oriented minigene DNA vaccine against *Listeria monocytogenes*. American Society for Microbiology 103<sup>th</sup> General Meeting, May 18-22, 2003, Washington DC (USA)
2. Koide Y, Miki K, Nagata T, Suzuki M, Aoshi T, Tanaka T, Kim Y-H, Uchijima M, Ohara N, Okada M : Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using a DNA vaccine encoding MPB51 antigen carried by attenuated suicide *Listeria monocytogenes* and identification of T-cell epitopes of the antigen. Thirty-eighth Research Conference on Tuberculosis and Leprosy, US-Japan Cooperative Medical Science Program, July 21-22, 2003, Newark (USA)
3. Nagatsu M, Terashita F, Koide Y : Characterization of low-temperature sterilization using surface-wave plasma. 5<sup>th</sup> International Workshop on Microwave Discharges : Fundamentals & Applications, July 8-12, 2003, Greifswald (Germany).
4. Nagatsu M, Terashita N, Koide Y : Experimental study of low-temperature sterilization using surface-wave plasma excited by a 2.45 GHz microwave. ICPIG XXVI : International Conference on Phenomena in Ionized Gases. July 17, 2003, Greifswald (Germany).
5. Suzuki M, Aoshi T, Nagata T, Koide Y : Identification of MHC-restricted T-cell epitopes in a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. 7<sup>th</sup> Asia-Oceania Histocompatibility Workshop and Conference, Sept. 16-19, 2003, Karuizawa, (Japan)
6. Nagata T, Miki K, Tanaka T, Uchijima M, Ohara N, Nakamura S, Okada M, Koide Y : Induction of protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 complex and MPB/MPT51. Keystone Symposia : The Pathogen-Host Standoff : Persistent and Latent Infection. March 25-30, 2004, Taos (USA)
7. Koide Y, Suzuki M, Aoshi T, Nagata T : Identification of MHC-restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*. 11<sup>th</sup> International Congress on Infectious Diseases, March 4-7, 2004, Cancun (Mexico)

### (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

Vaccine（オランダ）4回

FEMS Microbiology letter（英国）2回

J Infect Dis（米国）1回

Digestive and Liver Disease（イタリア）2回

## 9 共同研究の実施状況

	平成15年度
(1) 国際共同研究	2件
(2) 国内共同研究	3件
(3) 学内共同研究	4件

### (1) 国際共同研究

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

### (2) 国内共同研究

- 1) 大原直也（長崎大学大学院歯学部）「結核に対するDNAワクチンの研究」
- 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」「組換えレトロウイルス導入樹状細胞を用いた結核に対するワクチンの研究」
- 3) 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) 戸澤孝太郎, 杉本 健, 花井洋行（光学医療診療部, 第一内科）「炎症性大腸炎の発症機序と治療法の研究」
- 2) 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を用いた結核に対するワクチンの研究」
- 3) 榎本紀之, 橋本 大, 須田隆文, 千田金吾（第二内科）「各種ウイルス・ベクターを用いた結核に対する新規ワクチンの研究」
- 4) 堀井俊伸（検査部）「新しいフィンガープリント法を用いた細菌の迅速同定法」

## 10 産学共同研究

	平成15年度
産学共同研究	1件

1. 新しいフィンガープリント法を用いた細菌の迅速同定法：浜松フォトニクス，ASTI社，パルステック社

## 11 受賞

## 12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

### 1) 結核菌の新規感染防御抗原であるMPT51のMHC拘束性T細胞エピトープの同定

結核に対するワクチンとしては現在、弱毒生菌であるBCGが用いられている。しかしながら、近年、このBCGの効果は特に成人において疑問視されている。そこでBCGに代わるより有効なワクチンの開発が急務である。このためには、結核菌の主要な防御抗原の同定、免疫防御機構の解析など様々な基礎的研究が必要である。Ag85A, Ag85BなどのAg85複合体はMycobacterium属に共通する主要な分泌タンパクであり、有効な感染防御抗原として機能することが知られている。我々はこれらに加えて、新たにMPT51分子が結核菌の防御抗原として機能する結果を得た。そこで、DNAワクチンを用いてMPT51分子のT細胞エピトープの同定を試みた。

[材料ならびに方法] 1) マウス：BALB/cマウス (H2<sup>d</sup>), C57BL/6マウス (H2<sup>b</sup>) およびH2クラスI KO/HLA-A\*0201トランスジェニック (Tg) マウスを使用した。2) DNAワクチンの作製と免疫：発現ベクターであるpCIのCMVプロモーターの下流にMPT51遺伝子を挿入しpCI-MPT51を作製した。これを遺伝子銃にて、1週おきに4回免疫した。3) T細胞エピトープの同定：免疫マウス脾細胞を、MPT51を網羅するオーバーラッピング・ペプチドライブラリーで刺激した。その後、培養上清中のインターフェロン (IFN)- $\gamma$ をサイトカインELISA法にて測定し、エピトープを含むペプチドを同定した。更に、フローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカイン染色法 (ICS法) にて、ペプチドに対して反応するT細胞のサブセットを決定した。CD8陽性T細胞エピトープの決定は、エピトープを含むことが判明した領域からコンピューター・アルゴリズムにて検索し、候補となるペプチドを合成し、免疫脾細胞に反応させることで行った。4) H2拘束性分子の決定：RMA-S細胞株にH2-k<sup>d</sup>, H2-D<sup>d</sup>, またはH2-L<sup>d</sup>を遺伝子導入した細胞株にエピトープ・ペプチドを反応させることでH2クラスI分子の発現をフローサトメトリーで解析するH2安定化試験を行い、拘束性分子を決定した。

[結果] BALB/cマウス (H2<sup>d</sup>) においては、pCI-MPT51免疫マウス脾細胞でp21 (21-40) ペプチドにのみ、IFN- $\gamma$ の産生誘導がみられた。これをICS法によって調べた結果、CD8陽性T細胞がIFN- $\gamma$ を産生しており、p21にはCD8陽性T細胞エピトープが含まれることがわかった。CD8陽性T細胞エピトープは通常8から10アミノ酸からなり、多くは9アミノ酸である。そこでコンピューター・アルゴリズムにより、p21中のエピトープ候補を検索した。これら候補となるペプチドを合成し、MPT51免疫マウスの脾細胞を刺激して、IFN- $\gamma$ 産生量をサイトカインELISA法にて調べた。また、ICS法でも確認した。その結果、p24-32がエピトープであることが判明した。また、p24-32の拘束性分子を決定するために、各種H2遺伝子を導入したTAP2欠損RMA-S細胞を用いたH2クラスI安定

化試験を行った。その結果、H2-D<sup>a</sup>拘束性のエピトープであることが判明した。C57BL/6マウスにおいては、pCI-MPT51免疫マウス脾細胞でp171 (171-190) とp191 (191-210) ペプチドにIFN- $\gamma$ の産生誘導がみられた。これら二つのエピトープは、CD4陽性T細胞エピトープであった。また、IFN- $\gamma$ の産生誘導能は常に、p171がp191に比べて強く、p171はドミナント、p191はサブドミナントエピトープであることが判明した。

HLA-A\*0201 Tgマウスにおいては、ペプチドライブラリーより、p51-70にT細胞エピトープが存在し、3カラーflow cytometryより反応性T細胞はCD8陽性T細胞であることが明らかになった。コンピューター・アルゴリズムにて検索し、候補となるペプチドを合成したところ、p53-62の10-merがエピトープであることが判明した。

[考察] 結核に対する新たなワクチン開発のためには、主要防御抗原および免疫防御機構の解析が必須である。この点に関し、Ag85A、Ag85Bなどが結核の防御抗原であること、およびこれらのT細胞エピトープが報告されている。我々は新たにMPT51分子が主要防御抗原であることを見出した。そこで、これらのT細胞エピトープをBALB/cマウス、C57BL/6マウス、およびヒトHLA-A\*0201を発現するTgマウスを用いて行った。その結果、BALB/cマウスにおいては、H2-D<sup>a</sup>拘束性CD8陽性T細胞エピトープとしてp24-32の9-merを同定した。また、C57BL/6マウスではCD4陽性T細胞エピトープとして、p171-190およびp191-210を各々ドミナントおよびサブドミナントエピトープとして同定した。CD4陽性T細胞エピトープは通常12-24アミノ酸からなり、H2クラスII分子のペプチド結合溝からはみ出して結合する。このため、CD8陽性T細胞エピトープと異なり、最小単位を決定することは困難である。このため、これら20アミノ酸をCD4陽性T細胞エピトープとした。また、C57BL/6マウスのH2クラスII分子はH2-A<sup>b</sup>のみであるので、この分子がこれらエピトープの拘束性分子と考えられる。更に、ヒトHLA-A\*0201拘束性CD8 T細胞エピトープとしてp53-62を同定した。

これらT細胞エピトープの同定により、MPT51分子に特異的なT細胞の同定が、テトラマー法およびICS法により可能となった。これは、結核菌に対する免疫防御機構の解析およびワクチン開発に資するものである。

[鈴木美奈, 青枝大貴, 永田 年, 小出幸夫]

## 2) レトロウイルスベクターを用いたT細胞エピトープマッピング

ペプチドライブラリーに代わる核酸導入によるCD8T細胞のエピトープマッピング法を開発している。この方法は従来のペプチドライブラリーを用いる場合に比べ、低コストでマッピングが可能で、各種感染症、腫瘍などに対する免疫応答の解析や治療への応用、ワクチン開発に際して、個々のMHC分子に対するエピトープの決定に必要な解析作業を緩和するのに有用である。結核菌由来のMPT51をモデルにペプチドライブラリー法、レトロウイルスベクターによる核酸導入法の両方でマウス、ヒトHLA導入マウスのエピトープマッピングに成功した。現在、ヒトHLA導入マウスで同定した結核菌エピトープ反応性T細胞の機能や有用性をヒトで確認すべく準備中である。

[青枝大貴, 鈴木美奈, 内嶋雅人, 永田 年, 小出幸夫]

## 3) HLA-A\*2402トランスジェニックマウスの作出

HLA-A\*2402は日本人で最も頻度が高いタイプである (60%以上)。そこで、結核菌の防御抗原

のHLA-A2402拘束性T細胞エピトープを同定するため、HLA-A2402トランスジェニックマウスを作出した。まず、ヒト $\beta$ 2m-HLA-A\*2402発現プラスミドを構築した。これを $\beta$ 2mノックアウトマウスの受精卵に導入して作出されたもののうち、5系統で遺伝子の組み込みを確認した。

[内嶋雅人, 小出幸夫]

#### 4) 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

[目的] 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する。BCG由来感染防御抗原遺伝子 (Ag85A, Ag85B, MPB51) を弱毒リステリアに組み込み結核菌に対する感染防御免疫の誘導, 特に細胞性免疫の誘導を図る。

[概要] 弱毒リステリア内で安定に維持される真核細胞用発現プラスミドにBCG由来Ag85A, Ag85B, MPB51遺伝子を組み込みさらにこれらプラスミドを導入した弱毒リステリアを作製する。これをマウスに導入し, その抗結核菌免疫誘導能を抗原特異的T細胞増殖試験, 抗原特異的サイトカイン産生試験, 結核菌感染実験で評価する。

[目的の達成度] Ag85A, Ag85B, MPB51 DNAワクチンプラスミドを保持する弱毒組換えリステリアを作製した。それらをC57/BL6マウスに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有意な結核菌特異的T細胞の誘導を確認した。さらにこれらワクチンの結核菌に対する感染防御効果をBALB/cマウスの系で検討したところ有意な感染防御効果を認め, この結果を論文としてまとめた。

[三鬼慶太, 永田 年, 内嶋雅人, 小出幸夫]

#### 5) 結核に対する樹状細胞ワクチンの開発

[目的] 樹状細胞 (Dendritic Cells; DC) は生体で最も抗原提示能の高い細胞であることが知られている。そこで細胞内寄生菌に対する感染防御にとって必須である強力な細胞性免疫を誘導するため, 感染防御抗原遺伝子をレトロウイルスの系で導入したautologous DCを調製しそれをマウスに免疫し, その免疫効果を検討する。平成14年度はリステリア由来T細胞エピトープ発現DCについて検討したが平成15年度は, 結核菌の主要感染防御抗原であるAg85A, Ag85B発現DCを用いたワクチンについて検討する。

[概要] 結核菌の主要防御抗原であるAg85A, Ag85B遺伝子を導入したレトロウイルスを作製し, それを骨髄由来DCに形質導入する。そのAg85A, Ag85B発現DCを用いたワクチンをマウスに免疫し, 抗結核細胞性免疫の誘導, 結核菌に対する感染防御効果について検討した。

[目的の達成度] Ag85A, Ag85B遺伝子導入DCワクチン免疫により結核菌特異的細胞性免疫が誘導されることを, ツベルクリン液 (PPD), 精製Ag85タンパクを用いた脾細胞増殖反応, IFN- $\gamma$ 産生能を検討することにより確認した。

しかしDCワクチン投与群の結核菌に対する感染防御効果は, 非投与群と比べて明確ではなかった。現在, DCワクチンとBCGワクチンの併用による感染防御効果等を検討中である。

(中野秀樹, 榎本紀之, 橋本 大, 永田 年, 青枝大貴, 内嶋雅人, 小出幸夫)

6) 単一ヘルパーT細胞 (Th) エピトープDNAワクチンを用いた細胞内寄生細菌に対する個々の特異性をもつThの機能, 動態の解析

[目的] 単一のヘルパーT細胞 (Th) エピトープに特異的に反応するTh集団のみを誘導するDNAワクチンを作製する。それを用い, 細胞内寄生細菌 (リステリア, 結核菌) 感染防御におけるThの機能およびその動態を明らかにする。

[概要] 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) 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する。免疫効果は, 免疫マウス脾細胞の抗原特異的サイトカイン発現 (ELISA, 細胞内サイトカイン染色), マウスのリステリア感染実験等で評価する。

[目的の達成度] リステリア優勢ThエピトープLLO189-200, LLO318-329, p60 301-312, p60 367-378を組み込んだ組換えIi鎖cDNAを作製した。これらのThエピトープDNAワクチンをBALB/c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細胞が誘導されることを確認した。またThエピトープの種類によって特異的T細胞のIFN- $\gamma$ , IL-4等のサイトカイン産生能及び防御免疫誘導能に違いのある結果を得た。現在, さらに詳細にThエピトープワクチンの効果の比較検討等を行っている。

[永田 年, 青枝大貴, 鈴木美奈, 内嶋雅人, 小出幸夫]

7) 肺指向性抗結核菌T細胞を誘導するDNAワクチンの研究

我々は既に弱毒リステリア株をDNAワクチンのキャリアとして用いることにより, DNAワクチンを効率よく抗原提示細胞に運び, T細胞を感作できることを明らかにした。特にリステリアは粘膜面から感染することが知られている。そこで, 肺結核の予防, 治療を目指して, 結核菌抗原であるAg85ファミリー分子を発現するDNAワクチンを弱毒リステリア株に導入して, これを経鼻接種した。この方法により, 肺にホーミングする結核菌特異的T細胞を感作することを目指した。その結果, 経鼻免疫は肺, 縦隔リンパ節のみならず脾臓に存在するT細胞をも強力に感作することが判明した。現在, 肺にホーミングするT細胞の特性, 動態なども研究している。

[小出幸夫, 章 暁紅, 永田 年, 青枝大貴, 内嶋雅人]

8) イメージング解析: キラーT細胞による細胞内寄生菌排除機構の解明

(1) in vitroにおける研究

ヒト由来キラーT細胞株 (TALL) をCell Trackerでオレンジに標識し, 標的腫瘍細胞株 (C1R) をカルセインで緑に標識した。標的細胞は傷害を受けると緑色を失う。一方, 細胞内寄生菌であるリステリアにGFP遺伝子を導入した。これをマクロファージに感染させると, 宿主細胞内で緑色のリステリアが観察された。これらのシステムを組み合わせることにより, キラーT細胞が細胞内寄生菌に与える影響を観察する予定である。

[ホルヘ・セルヴァンテス, 青枝大貴, 小出幸夫]

(2) 細胞傷害性T細胞 (CTL) による細胞内寄生菌防御機構の解析

リステリアや結核感染においてCD8T細胞がこれらの感染制御に有効であることが明らかになりつつあるが, その詳細なメカニズムは未だ不明である。GFP発現リステリアや各種蛍光標識

法を組み合わせ、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡で感染細胞とCTLとの相互作用を観察している。

[青枝大貴, 小出幸夫]

### (3) T細胞に対する抗原提示機構の解析および応用

細胞内寄生菌と宿主細胞の間には、互いの生理機構を利用した高度な相互作用が存在している。特に細胞内寄生菌由来のエフェクター分子、病原性因子に対するCD8T細胞応答が引き起こされる過程について解析している。この過程で、リステリア病原因子であるLLOの細胞内での分解過程の違いによりCD8T細胞に対する抗原提示が大きく異なることを見いだした。現在、分解過程に関わる分子の同定を目指して解析中である。

[青枝大貴, 小出幸夫]

### 9) 細菌由来免疫賦活性DNA (ISS) の作用機構の解析

結核菌などの細菌ゲノム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とともに獲得免疫の誘導にも関与する。同じ配列を持つ合成DNAおよびDNAワクチンのベクターとして用いられる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。ISSに対する宿主応答機構を明らかにするために、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。

ISSによるiNOS遺伝子の発現誘導にc-Junが関与することをこれまでに明らかにしてきた。c-Junには複数のリン酸化部位が存在するが、2つのセリンと2つのトレオニンの欠失変異体発現プラスミドを用いて内在性のc-Junの抑制を試みた。プロモーターアッセイにより、プラスミド導入量依存的にISSによるiNOS遺伝子発現が抑制されることが確認された。

宿主による微生物特有成分の認識にはToll様レセプター (TLR) が関与している。抗原提示細胞としてワクチンなどへの応用が期待されている樹状細胞におけるTLRの発現パターンはDCのサブタイプにより異なる。古典的なmyeloid DCをIFN- $\gamma$ で前処理することにより、TLR9のmRNAおよびタンパク質発現量が上昇し、ISSに対する応答性がplasmacytoid DCと同程度に高くなることを見出した。

[内嶋雅人, 小出幸夫]

### 10) ケモカインとの融合蛋白を発現する抗結核DNAワクチンの開発

MIP-1 $\alpha$ , RANTESなどのケモカインの遺伝子をクローニングし、結核菌抗原 (MPT51) との融合タンパク質を発現するDNAワクチンを作製した。

[内嶋雅人, 小出幸夫]

### 11) Finger Printing by Primer Extension (FPPE) 法による細菌の全自動迅速同定法の開発

プライマーの3'側の4塩基を特定な配列に設定し、5'側はランダムに合成した。このプライマーを細菌の16S rDNAにアニールさせると、その塩基配列に応じて異なった複数の部位にアニールし、primer extensionさせると、細菌により異なったサイズのバンドが得られた (特許取得)。現在のところ、1~数プライマーでほとんどの病原細菌を識別できると考えている。このフラグメント解

析にはABI社のキャピラリー・シークエンサーを用いているが、電気泳動に約30分を要す。そこで、微量のサンプル（1 $\mu$ l）で迅速に（5分）に解析できるアジレント社のチップ型電気泳動装置を用いた。その結果、シークエンサーに比べると感度が低く、大まかな細菌の同定（属）には使用可能であることが判明した。

[小出幸夫，細井延行，堀井俊伸，内嶋雅人]

### 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。さらに、このDNAワクチンを用いて新規にMPB51分子が強力な感染防御抗原であることを明らかにした。その感染防御効果は、現在結核菌で最も強力な感染防御抗原のひとつとして注目されているAg85A, Ag85B分子の効果に匹敵するものであり、新たな抗結核成分ワクチンの開発のために重要な知見である。またMPB51分子のH2-D<sup>a</sup>拘束性のCTLエピトープは強力に特異的T細胞を誘導することが明らかとなり今後、結核菌特異的T細胞の生体内動態を調べるためのマーカーとして有効であることが明らかとなった。
2. 21世紀COEプログラムにて、細胞内寄生菌のキラーT細胞による排除機構の解析をin vitroおよびin vivoで開始した。

### 14 研究の独創性，国際性，継続性，応用性

1. 当教室は、これまで遺伝子銃を用いたDNAワクチンにより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。平成15年度は、遺伝子銃法と並んで、結核菌に対する弱毒細菌（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。現在、それらワクチンの併用や投与方法を工夫することで、より強力な感染防御効果のあるワクチンの開発を行なっている。
2. 細胞傷害性T細胞による細胞内寄生菌排除のメカニズムをイメージングで解析した報告は現在のところ他に見あたらない。
3. ISSによる免疫賦活作用について、宿主細胞に発現誘導される遺伝子の発現調節に関する解析はほとんどおこなわれていない。樹状細胞の最適化に関する研究も少ない。これらの解析結果からDNAワクチン、アレルギー治療などへの応用が期待される。
4. 2光子励起顕微鏡，共焦点顕微鏡を駆使して，細胞内寄生菌の細胞傷害性T細胞による排除のメカニズムを探求している。このような研究は世界的にも他に例がなく，先端的な分野である。

### 15 新聞，雑誌等による報道