

感染症学(生体防御分野)

1 構 成 員

	平成21年3月31日現在
教授	0人
准教授	1人
講師 (うち病院籍)	0人 (0人)
助教 (うち病院籍)	2人 (0人)
助手 (うち病院籍)	0人 (0人)
特任教員 (特任教授, 特任准教授, 特任助教を含む)	0人
医員	0人
研修医	0人
特任研究員	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

辻村 邦夫 (准教授) (H19. 4. 1~現職)

内嶋 雅人 (助教) (H5. 4. 1~19. 3. 31 助手; H19. 4. 1~現職)

瀬戸真太郎 (助教) (H18. 4. 1~19. 3. 31 助手; H19. 4. 1~現職)

3 研究業績

数字は小数2位まで。

	平成20年度
(1) 原著論文数 (うち邦文のもの)	12編 (0編)
そのインパクトファクターの合計	50.01
(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 (0編)
そのインパクトファクターの合計	0.00
(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. Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Chemokine receptor-mediated delivery of mycobacterial MPT51 protein efficiently induces antigen-specific T-cell responses. *Vaccine* 26: 5165-5169, 2008.

インパクトファクターの小計 [3.38]

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. Hashimoto D, Nagata T, Uchijima M, Seto S, Suda T, Chida K, Miyoshi H, Nakamura H, Koide Y: Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific CD8⁺ T-cell responses in the lung. *Vaccine* 26: 5095-5100, 2008.
2. Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Koide Y: In vivo hierarchy of individual T-cell epitope-specific helper T-cell subset against an intracellular bacterium. *Vaccine* 26: 5123-5127, 2008.

インパクトファクターの小計 [6.75]

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. Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, Shimato S, Ito M, Kuzushima K, Kondo Y, Sekido Y, Kawatsura H, Narita Y, Yoshida J: The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma. *Int J Cancer* 122: 2542-2553, 2008.
2. Shimato S, Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, Nakahara N, Ishii J, Ito M, Akatsuka Y, Kuzushima K, Yoshida J: Identification of a human leukocyte antigen-A24-restricted T-cell epitope derived from interleukin-13 $\alpha 2$ chain, a glioma-associated antigen. *J Neurosurg* 109: 117-122, 2008.
3. Hara M, Nakanishi H, Tsujimura K, Matsui M, Yatabe Y, Manabe T, Tatematsu M: Interleukin-2 potentiation of cetuximab antitumor activity for epidermal growth factor receptor-overexpressing gastric cancer xenografts through antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Sci* 99: 1471-1478, 2008.
4. Kojima N, Biao L, Nakayama T, Ishii M, Ikehara Y, Tsujimura K: Oligomannose-coated liposomes as a therapeutic antigen-delivery and an adjuvant vehicle for induction of in vivo tumor immunity. *J Control Release* 129: 26-32, 2008.
5. Isomura I, Shintani Y, Yasuda Y, Tsujimura K, Morita A: Induction of regulatory dendritic cells by topical application of NF- κ B decoy oligodeoxynucleotides. *Immunol Lett* 119: 49-56, 2008.
6. Demachi-Okamura A, Ito Y, Akatsuka Y, Tsujimura K, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K: Epstein-Barr virus nuclear antigen 1-specific CD4⁺ T cells directly kill Epstein-Barr virus-carrying natural killer and T cells. *Cancer Sci* 99: 1633-1642, 2008.
7. Namangala B, Yokoyama N, Ikehara Y, Taguchi O, Tsujimura K, Sugimoto C, Inoue N:

Effect of CD4⁺CD25⁺ T cell-depletion on acute lethal infection of mice with *Trypanosoma congolense*. J Vet Med Sci 70: 751-759, 2008.

8. Uenoyama A, Seto S, Nakane D, Miyata M: Regions on Gli349 and Gli521 protein molecules directly involved in movements of Mycoplasma mobile gliding machinery, suggested by use of inhibitory antibodies and mutants. J Bacteriol 191: 1982-1985, 2009.
9. Kamei M, Nannya Y, Torikai H, Kawase T, Taura K, Inamoto Y, Takahashi T, Yazaki M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Ito T, Togari H, Riddell SR, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y: HapMap scanning of novel human minor histocompatibility antigens. Blood 113: 5041-5048, 2009.

インパクトファクターの小計 [39.88]

4 特許等の出願状況

	平成20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20年度
(1) 文部科学省科学研究費	3件 (520万円)
(2) 厚生科学研究費	0件 (0万円)
(3) 他政府機関による研究助成	0件 (0万円)
(4) 財団助成金	0件 (0万円)
(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）	0件 (0万円)

(1) 文部科学省科学研究費

辻村邦夫（代表者）基盤研究（C）糖鎖被覆リポソームを利用した抗結核菌ワクチンの開発 190万円（新規）

辻村邦夫（分担者）特定領域研究 マイナー抗原を標的とした免疫療法の開発 200万円（新規）

瀬戸真太郎（代表者）若手研究（B）結核菌の食胞形成過程における膜小胞輸送機構のリアルタイムイメージ解析 130万円（継続）

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	0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	0件

(6) 一般演題発表数	7件	
-------------	----	--

(1) 国際学会等開催・参加

5) 一般発表

ポスター発表

1. Natsume A, Wakabayashi T, Shimato S, Tsujimura K, Kuzushima K, Yoshida J: The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine induces the expression of cancer-testis antigens in human gliomas: epigenetic target for tumor immunotherapy. The 17th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. June 2008, Tokyo, Japan.
2. Seto S, Koide Y: Live *Mycobacterium tuberculosis* inhibits phagolysosome biogenesis in macrophages by modulating localization of Rab GTPase proteins on its phagosomes. 43rd US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. July 2008, Baltimore, USA.
3. Seto S, Koide Y: *Mycobacterium tuberculosis* mediates the network of Rab GTPases to inhibit phagolysosome biogenesis in macrophage. The 8th Awaji International Conference on Infection and Immunity. September 2008, Awaji, Japan.
4. Tsujimura K, Ikehara Y, Nagata T, Koide Y, Kojima N: Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to intraperitoneal macrophages. Vaccine 2nd Global Congress. December 2008, Boston, USA.
5. Wang L-X, Nagata T, Koide Y: Characterization of an HLA-DR4-restricted CD4⁺ T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* by DNA vaccination. DNA Vaccine 2008. December 2008, Las Vegas, USA.
6. Goto H, Enomoto M, Tomono Y, Kasahara K, Ikegami Y, Tsujimura K, Kiyono T, Inagaki M: Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent kinase 1 promotes mitotic entry. 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. December 2008, San Francisco, USA.
7. Seto S, Koide Y: *Mycobacterium tuberculosis* modulates the network of Rab GTPases in attenuation of phagosome maturation. 2009 Keystone Symposia. Tuberculosis: Biology, Pathology and Therapy. January 2009, Keystone, USA.

8 学術雑誌の編集への貢献

	国内	外国
学術雑誌編集数（レフリース数は除く）	0件	0件

(3) 国内外の英文雑誌のレフリース

Journal of Experimental and Clinical Cancer Research (Italy) 1回

9 共同研究の実施状況

	平成20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	3件
------------	----

(2) 国内共同研究

小島直也（東海大学工学部）糖鎖被覆リポソームを利用した抗結核ワクチンの開発
池原 譲（産業技術総合研究所）糖鎖被覆リポソームを利用した抗結核ワクチンの開発

(3) 学内共同研究

小出幸夫（理事）抗結核ワクチンの開発
永田 年（基礎看護学）抗結核ワクチンの開発
千田金吾，須田隆文，右藤智啓，穂積宏尚（内科学第二）抗結核ワクチンの開発

10 産学共同研究

	平成20年度
産学共同研究	0件

12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

結核は感染症による死因として依然大きな問題となっており，2004年の統計によると，世界で900万人以上が結核を発症し，200万人が死亡している。結核菌感染に対するワクチンとしては，BCGが60年以上前から用いられており，世界の人口の約半分が接種を受けている。しかしながら，BCGの乳幼児粟粒結核に対する有効性は確認されているが，成人の肺結核に対する有効性は疑問視されており，より有効なワクチンの開発が急務である。我々は新しい抗結核ワクチンの開発を目的として，有用な結核防御抗原の探索（プロジェクト1～4）と効果的な免疫方法の確立（プロジェクト5～7）の両面に重点をおいて研究を行っている。

感染した結核菌はマクロファージによって貪食されるが，ファゴソームとリソソームの融合を阻害することによって消化を免れ，細胞内寄生することが知られている。したがって，その阻害機構を明らかにすることは，結核菌に対する免疫応答を考える上で非常に重要な意味を持つ。我々は受容小器官膜と輸送小胞の融合に機能する低分子であるRab GTPaseに焦点を当て，本分子群および関連分子群の細胞内局在のイメージング解析により，その阻害機構の解明を試みている（プロジェクト8）。

1. 潜伏感染・再燃を制御する抗結核ワクチンの開発

本研究では，結核菌が潜伏期／再燃時特異的に発現する遺伝子産物を標的抗原として，結核菌の潜伏感染・再燃を制御する新規ワクチンの開発を試みている。BCGを初回免疫に，抗潜伏期ワクチンを追加免疫に用いることで，成人の肺結核をも制御できるワクチン戦略を樹立することが最終目標である。

潜伏期の結核菌が発現するDosR regulon蛋白（48種類）および結核菌の再活性化に関与するResuscitation promoting factor蛋白（5種類）を標的抗原として，DNAワクチン・ライブラリーの作製を完了した。また，免疫応答測定に用いる抗原遺伝子の蛋白産生用ベクターへの組み込み作業も完了し，これらの試料を用いてマウスでスクリーニングを開始した。

(山村泰弘, 瀬戸真太郎, 内嶋雅人, 穂積宏尚, 永田 年, 辻村邦夫, 小出幸夫)

2. 結核防御抗原MPT51のヒトヘルパーT細胞エピトープの同定

MPT51は結核菌の主要な分泌蛋白の1つであり, その感染防御効果を当教室で報告している。MPT51をコードするDNAワクチンで免疫したHLA-DR0401トランスジェニックマウスの脾細胞をMPT51のoverlapping peptides (各20mer) で刺激し, そのIFN- γ 産生を指標としてDR4拘束性T細胞エピトープの同定を試みた。その結果, MPT51 p191-210ペプチド内にエピトープがあることが判明し, コンピュータ・アルゴリズムからの推測およびIFN- γ 産生試験から, p191-202の12merペプチドが最小エピトープであることを明らかにした。

(王 麗欣, 永田 年, 小出幸夫)

3. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) のマウスT細胞エピトープの同定

MDP1は結核菌の主要な菌体内および膜結合型蛋白であり, DNAと結合して結核菌に対する感染防御に働くことが報告されている。MDP1をコードするDNAワクチンで免疫した純系マウス (BALB/c, C57BL/6およびC3H/He) の脾細胞をMDP1のoverlapping peptides (各20mer) で刺激し, そのIFN- γ 産生を指標として候補ペプチドをスクリーニングした。さらに候補ペプチドについてコンピュータ・アルゴリズムからの推測およびIFN- γ 産生試験により最小エピトープを決定した。その結果, BALB/cでは1つのCD4⁺ T細胞エピトープ, C57BL/6では1つのCD8⁺ T細胞エピトープと2つのCD4⁺ T細胞エピトープ, C3H/Heでは少なくとも3つのCD4⁺ T細胞エピトープを同定した。さらに, C57BL/6では同定したCD8⁺ T細胞エピトープの最小エピトープがp23-31であり, H2-D^bで提示されることを明らかにした

(鈴木大介, 永田 年, 小出幸夫)

4. 結核菌低分子量分泌蛋白のマウスT細胞エピトープの同定

結核菌由来の低分子量分泌蛋白 (TB18.5 (Rv0164), CFP11 (Rv2433c) またはCFP17 (Rv1827)) をコードするDNAワクチンで免疫した純系マウス (BALB/cおよびC57BL/6) の脾細胞を各々のoverlapping peptidesで刺激し, そのIFN- γ 産生を指標として候補ペプチドをスクリーニングした。さらに候補ペプチドについてコンピュータ・アルゴリズムからの推測およびIFN- γ 産生試験により最小エピトープを決定した。その結果, 3種類のタンパク内に2つずつ (すべてBALB/cおよびC57BL/6で各1つ) のT細胞エピトープを同定した。このうち, C57BL/6で現在検討中であるTB18.5のエピトープ以外については最小エピトープを既に決定し, すべてがCD8⁺ T細胞エピトープであった。

(Ghada Eweda, 鈴木大介, 永田 年, 小出幸夫)

5. CD91に対する分子標的ワクチンによる結核の制御

CD91を介して樹状細胞選択的に結核防御抗原MPT51を取り込ませ, 効率良くT細胞を感作できる分子標的ワクチンの開発を試みた。CD91のリガンドであるHeat shock protein (HSP) 70またはThrombospondin-1 (TSP-1) とMPT51の分子融合型DNAワクチンを作製し, その免疫誘導効果を

検討したところ、MPT51単独による免疫に比べ、HSP70融合型ではCD4⁺ T細胞応答の増強効果が、逆にTSP-1融合型ではCD4⁺ およびCD8⁺ T細胞両方に対する抑制効果が得られた。また、HSP70による免疫増強効果には、本分子のC末端側が重要な役割を果たすことが明らかになった。これらの結果から、HSP70のC末端と結核防御抗原の融合分子を用いることにより、より有効な抗結核ワクチンを開発できる可能性が示された。

(右藤智啓, 内嶋雅人, 瀬戸真太郎, 永田 年, 辻村邦夫, 小出幸夫)

6. ケモカインレセプターを標的とする抗結核ワクチンの開発

未熟樹状細胞に発現するCCR5などのケモカインレセプターは、結合したリガンドとともに細胞内に取り込まれる。本研究では結核防御抗原MPT51にCCR5のリガンドの1つであるMIP-1 α を連結させたDNAワクチンを作製し、マウスを用いて免疫誘導効果を検討した。BALB/c (CD8⁺ T細胞応答) およびC57BL/6 (CD4⁺ T細胞応答) とともに抗原単独のDNAワクチン (pCI-MPT51) に比べ、融合型DNAワクチン (pCI-MIP-1 α -MPT51) によって、より強い抗原特異的免疫応答が誘導された。さらに両マウスのF₁を用いた解析により、CD8⁺ T細胞応答の方が優位に誘導されることが明らかとなった。

(内嶋雅人, 辻村邦夫, 小出幸夫)

7. 糖鎖被覆リポソームを利用した抗結核ワクチンの開発

我々はMPT51をはじめとして何種類かの結核防御抗原のT細胞エピトープを同定してきたが、これらを用いた成分ワクチンによって、結核菌に対する免疫応答を効率良く誘導するためには、アジュバントや抗原デリバリーシステムの開発が必須である。本研究では新規開発したオリゴマンノース被覆リポソーム (OML) による免疫誘導効果を検討した。大腸菌で大量発現させた結核防御抗原MPT51をOMLに封入してマウスを免疫し、産生される抗原特異的な抗体のサブクラスを検討したところ、一部のマウスでIgG2a/IgG2cの抗体価の上昇が確認できた。これらの結果から、OMLを免疫に用いる事で、結核菌に対する生体防御反応で重要とされるTh1型の免疫応答を効率よく誘導できることが示唆された。

(山村泰弘, 辻村邦夫, 内嶋雅人, 瀬戸真太郎, 永田 年, 小出幸夫)

8. 結核菌によるファゴリソソーム形成阻害機構の解析

結核菌の感染マクロファージ内における増殖能は、ファゴソームとリソソームの融合 (ファゴリソソーム形成) を阻害することによって獲得される。従来、結核菌ファゴソームにRab7が局在しないため、ファゴリソソーム形成が阻害されると考えられてきた。しかし我々は、結核菌ファゴソームに感染直後からRab7が局在することを示し、その後に結核菌ファゴソームからRab7が分離することによって持続的なファゴリソソーム形成が阻害されることを明らかにした。

Rab GTPaseは受容小器官膜と輸送小胞の融合に機能する低分子GTPaseであり、結核菌はRab7以外のRab GTPaseをも標的としてファゴソーム成熟を阻害することも考えられる。結核菌によるファゴリソソーム形成阻害時における小胞輸送機構の変化を解明するため、本年度は結核菌感染マクロファージにおけるRab GTPase分子群の網羅的局在解析を行った。

黄色ブドウ球菌と結核菌ファゴソームを比較した結果、ファゴソームに局在する20種類のRabのうち15が結核菌ファゴソームからかい離するか若しくは局在しなかった。これらの分子のファゴソーム熟成過程への関与を明らかにするため、ドミナントネガティブ変異株を発現するマクロファージを用いた解析を行い、Rab7, Rab20, Rab39はファゴソームの酸性化に、Rab7, Rab20, Rab32, Rab34, Rab38はカテプシンDのファゴソームへの局在化に関与することを明らかにした。以上の結果から、ファゴソーム熟成とファゴリソソーム形成には数種類のRab GTPaseが関与すること、結核菌はこれらのRabの細胞内局在を変化させることによって細胞内寄生能を獲得していることが示唆された。

(瀬戸真太郎, 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. 結核菌抗原MPT51のヒトヘルパーT細胞エピトープに加え、結核菌低分子量分泌蛋白群 (TB18.5, CFP11およびCFP17) およびMDP1のマウスT細胞エピトープを同定した。
2. 糖鎖被覆リポソームを利用した新たな抗原デリバリーシステムや分子融合型DNAワクチンなど、新たな免疫誘導技術を開発した。
3. これまでにも結核菌によるファゴリソソーム形成阻害機構の解析は行われてきたが、結核菌がファゴリソソーム形成過程のどの段階で阻害するかについては、ほとんど明らかになっていなかった。一般細菌ファゴソームと結核菌ファゴソームの性状を比較した本年度中の研究により、ファゴリソソーム形成の詳細を明らかにするとともに、結核菌ファゴソームのファゴリソソーム形成阻害がどの段階で行われているかを明らかにすることができた。

14 研究の独創性、国際性、継続性、応用性

1. 結核菌防御抗原のマウスおよびヒトT細胞エピトープの同定は、結核に対するワクチン開発に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。現在進行中の潜伏期（休眠期）抗原に関する包括的検索は、さらに大きな情報をもたらすことが期待できる。
2. 結核菌抗原の探索と平行して行っている新しいワクチン技術の開発は、同定した結核菌抗原を用いた抗結核ワクチンのみならず、他の感染症やがんの免疫療法に応用が可能である。
3. 結核菌によるファゴリソソーム形成阻害機構の解析から、将来のワクチンや薬剤の開発に有用な知見が得られることが期待できる。