

感染症学(生体防御分野)

1 構成員

	平成22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)	4人 (2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	8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21年度
(1) 原著論文数(うち邦文のもの)	8編 (0編)
そのインパクトファクターの合計	21.83
(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	0.00

(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. Seto S, Matsumoto S, Ohta I, Tsujimura K, Koide Y: Dissection of Rab7 localization on *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. **Biochem Biophys Res Commun** 387, 272-277, 2009.
2. Tsujimura K, Ikehara Y, Nagata T, Koide Y, Kojima N: Induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposomes targeting to peritoneal macrophages. **Procedia Vaccinology** 1, 127-134, 2009.
3. Wang L-X, Nagata T, Tsujimura K, Uchijima M, Seto S, Koide Y: Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *Mycobacterium tuberculosis* using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination. **Vaccine** 28, 2026-2031, 2010.
4. Seto S, Matsumoto S, Tsujimura K, Koide Y: Interaction of lysosomal markers with phagosome containing *Mycobacterium tuberculosis* in macrophage. **Microbiol Immunol** 54, 170-174, 2010.

インパクトファクターの小計 [7.37]

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. Suzuki D, Nagata T, Eweda G, Matsumoto S, Matsumoto M, Tsujimura K, Koide Y: Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) using DNA vaccination. **Vaccine** 28, 2020-2025, 2010.

インパクトファクターの小計 [3.30]

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. Enomoto M, Goto H, Tomono Y, Kasahara K, Tsujimura K, Kiyono T, Inagaki M: A novel positive feedback loop between Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) and CHK1 in the nucleus during the G2/M transition. **J Biol Chem** 284, 34223-34230, 2009.
2. Ichikawa T, Kageyama Y, Kobayashi H, Kato N, Tsujimura K, Koide Y: Etanercept treatment reduces the serum levels of interleukin-15 and interferon-gamma inducible protein-10 in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int** 30, 725-730, 2010.
3. Mitsui S, Torii K, Fukui H, Tsujimura K, Maeda A, Nose M, Nagatsu A, Mizukami H, Morita A: The herbal medicine compound faltarindiol from *Notopterygii Rhizoma* suppresses dendritic cell maturation. **J Pharmacol Exp Ther** 333, 954-960, 2010.

インパクトファクターの小計 [11.16]

4 特許等の出願状況

	平成21年度
特許取得数（出願中含む）	1件

1. Kojima N, Ikehara Y, Tsujimura K: Liposome composition for induction of immunity. Eurasia patent No. 012618

5 医学研究費取得状況

	平成21年度
(1) 文部科学省科学研究費	3件 (520万円)
(2) 厚生労働科学研究費	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

1. 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 110万円(継続)
2. 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(継続)
3. 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 210万円(新規)

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	4件	

(1) 国際学会等開催・参加

5) 一般発表

ポスター発表

1. Ikehara Y, Ikehara SK, Yokoyama N, Kuzushima K, Takahashi T, Kojima N, Tsujimura K: Cancer vaccine delivery using oligomannose coated liposomes. AACR 100th Annual Meeting. April 2009, Denver, USA.
2. Uto T, Uchijima M, Seto S, Nagata T, Suda T, Chida K, Nakamura H, Tsujimura K, Koide Y: Genetic fusion of heat-shock protein 70 to a mycobacterial antigen enhances the antigen-specific T cell responses. Vaccine 3rd Global Congress. October 2009, Singapore, Singapore.
3. Yamamura Y, Seto S, Uchijima M, Hodumi H, Nagata T, Tsujimura K, Koide Y: Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. DNA vaccine 2010. March 2010, New Orleans, USA.
4. Eweda G, Suzuki D, Nagata T, Tsujimura K, Koide Y: Identification of murine T-cell epitopes

on low-molecular-mass secreted proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis* with DNA immunization. DNA vaccine 2010. March 2010, New Orleans, USA.

8 学術雑誌の編集への貢献

	国内	外国
学術雑誌編集数（レフリー数は除く）	0件	0件

9 共同研究の実施状況

	平成21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21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現在も大きな割合を占め、2008年には世界で940万人が結核を発症し、180万人が死亡している。結核菌感染に対するワクチンとしては、BCGが依然として用いられており、世界の人口の約半分が接種を受けている。しかし、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および2）と効果的な免疫方法の確立（プロジェクト3および4）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。そこで我々は結核菌を貪食したファゴソームに含まれるタンパク質のプロテオーム解析を行い、そ

の阻害機構の解明を試みている（プロジェクト5）。

1. 休眠期結核菌由来遺伝子を用いたDNAワクチンの開発

結核菌が潜伏期に発現するDosR regulon蛋白（48種）および再活性化時に発現するResuscitation promoting factor蛋白（5種）を候補抗原として、DNAワクチン・ライブラリーを作製し、その抗原性を2系統のマウスで検討中である。32種類について検討を終えた時点で、C57BL/6で10種類、BALB/cで13種類の抗原がT細胞応答を誘導できた（両系統で誘導できたものはRv0079, Rv1998c, Rv2031c, Rv2032, Rv2623, Rv2624cおよびRv3132cの7種類）。また、C57BL/6で3種類、BALB/cで11種類の抗原が抗体産生を誘導できた（同Rv2029c, Rv2626cおよびRv3132cの3種類）。同一系統で両免疫応答を誘導できた抗原はC57BL/6で1種類（Rv3132c）、BALB/cで7種類（Rv0079, Rv1738, Rv1998c, Rv2031c, Rv2624c, Rv2626cおよびRv3132c）であった。以上の結果から、Rv3132c（dosS）は両系統で両免疫応答を誘導でき、有望な候補抗原と考えられた。（山村，瀬戸，内嶋，辻村，小出）

2. 結核菌由来感染防御抗原分子のマウスT細胞エピトープの同定

結核菌由来感染防御抗原分子のうち、急性期の主要抗原である低分子量分泌タンパク（CFP11, CFP17, TB18.5）および急性期・休眠期を通じて主要抗原であるMDP1分子のマウスT細胞エピトープを同定した。（Eweda，鈴木，永田，辻村，小出）

3. CD91に対する分子標的ワクチンの開発

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融合蛋白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ではCD4⁺ T細胞応答の増強効果が、TSP-1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蛋白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，内嶋，永田，辻村，小出）

4. ケモカイン融合型DNAワクチンの開発

樹状細胞上のCCR5を標的とするワクチンとして、結核菌の分泌タンパクで防御抗原のひとつであるMPT51の遺伝子に、MIP-1 α またはRANTES遺伝子を連結させたDNAワクチンを作製し、その効果を検討した。MIP-1 α 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DNAワクチン（pCI-MPT51）に比べ、CD8⁺およびCD4⁺ T細胞エピトープペプチド刺激特異的にIFN- γ の発現量が増大した。その発現量は、CD8⁺ T細胞エピトープペプチド刺激によるものの方が、CD4のものよりも高かった。RANTES融合型ワクチン（pCI-RANTES-MPT51）で免

疫した場合も、抗原のみを発現するDNAワクチン（pCI-MPT51）に比べ効果は増強したが、MIP-1 α 融合型のものに比べ低かった。これらのことより、MIP-1 α 融合型DNAワクチンは、CD8⁺ およびCD4⁺ T細胞を抗原単独のものに比べ強く感作できるが、CD8⁺ T細胞が優位であること、同じケモカインレセプターを標的とするRANTES融合型DNAワクチンと比較して効果が高いことが明らかとなった。

（内嶋，永田，辻村，小出）

5. 結核菌ファゴソームに含まれるタンパク質のプロテオーム解析

結核菌ファゴソームの小胞輸送機構の解明をめざし、生化学的に単離した結核菌ファゴソームに含まれるタンパク質のプロテオーム解析を行った。結核菌ファゴソームとラテックスビーズファゴソームからタンパク質を抽出して、2次元電気泳動法によって含有タンパク質の比較を行った。ラテックスビーズファゴソーム画分にはカテプシンなどリソソームに多く含まれるタンパク質が優位を占めていた。結核菌ファゴソーム画分にはGrp78やPDIなど小胞体を構成するタンパク質が多数含まれていた。次に結核菌ファゴソーム含有タンパク質の網羅的同定をLC-MS/MS解析によって行った。結核菌ファゴソーム画分にはRab7やLAMP-1などの後期エンドソーム，リソソームタンパク質が含まれていた。また，ER由来タンパク質やリボソーム構成タンパク質も多数含まれていた。以上の結果は，結核菌ファゴソームは後期エンドソームやリソソームと融合することができるが，結核菌ファゴソームと小胞体との融合が優先的に行われるためファゴリソソーム形成が阻害されることを示唆する。（瀬戸，辻村，小出）

13 この期間中の特筆すべき業績，新技術の開発

1. 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. 潜伏期結核菌が発現する蛋白質群の中で，マウスに対して免疫原性を持つものを多数同定した。
3. ケモカインレセプターや熱ショック蛋白を利用した新たな分子融合型DNAワクチン技術を開発した。

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。