

# 感染症学（生体防御分野）

## 1 構 成 員

	平成 24 年 3 月 31 日現在	
教授	1 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）	1 人	(1 人)
研究生	1 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	7 人	

## 2 教員の異動状況

- 堀井 俊伸（教授）（H24.3.1～現職）  
 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 23 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	13.37	
(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）	2 編	(2 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	
(6) その他（レター等）	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)

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. Sugaya K, Seto S, Tsujimura K, Koide Y: Mobility of late endosomal and lysosomal markers on phagosomes analyzed by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochem Biophys Res Commun* 410: 371-375, 2011.
2. Kono M, Nakamura Y, Kato M, Ozawa Y, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Imui N, Suda T, Uchijima M, Tsujimura K, Nagata T, Koide Y, Giermasz AS, Kalinski P, Nakamura H, Chida K: Enhancement of protective immunity against intracellular bacteria using type-1 polarized dendritic cell (DC) vaccine. *Vaccine* 30: 2633-2639, 2012.
3. Muregi FW, Ohta I, Uchijima M, Kino H, Ishih A: Resistance of a rodent malaria parasite to a thymidylate synthase inhibitor induces an apoptotic parasite death and imposes a huge cost of fitness. *PLoS ONE* 6: e21251, 2011.

インパクトファクターの小計 [10.58]

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. Kageyama Y, Torikai E, Tsujimura K, Kobayashi M: Involvement of IL-33 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the effect of etanercept on the serum levels of interleukin-33. *Mod Rheumatol* 22: 89-93, 2012.
2. Okanami Y, Tsujimura K, Mizuno S, Tabata M, Isaji S, Akatsuka Y, Kuzushima K, Takahashi T, Uemoto S: Intracellular interferon- $\gamma$  staining analysis of donor-specific T-cell responses in liver transplant recipients. *Transplant Proc* 44: 554-560, 2012.

インパクトファクターの小計 [2.79]

### (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. Seto S, Tsujimura K, Koide Y: Localization and function of Coronin-1a in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. 46th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. p. 108-110, 2011.

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. Osada-Oka M, Hirayama Y, Tateishi Y, Ozeki Y, Kitada S, Maekura R, Tsujimura K, Koide Y, Kobayashi K, Matsumoto S: Antibody responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in latent *M. tuberculosis* infection. 46th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy. p. 116-120, 2011.

### (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. 瀬戸真太郎, 辻村邦夫, 小出幸夫: 結核菌ファゴソームの成熟阻害機構. 化学療法の領域 27:

1464-1469, 2011.

2. 瀬戸真太郎, 辻村邦夫, 小出幸夫: 結核菌の細胞内寄生メカニズム. 日本臨床 69: 1373-1377, 2011.

インパクトファクターの小計

[0.00]

#### 4 特許等の出願状況

	平成 23 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 23 年度	
(1) 文部科学省科学研究費	1 件	(170 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	1 件	(170 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

瀬戸真太郎 (代表者) 科学研究費若手研究 (B)、イメージ解析とプロテオミクスによる結核菌ファゴソームにおける小胞輸送の包括的解析 170万円 (継続)

(3) 他政府機関による研究助成

辻村邦夫 (代表者) 独立行政法人 科学技術振興機構 A-STEP 170万円 (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	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	2 件
(6) 一般演題発表数	8 件	

(1) 国際学会等開催・参加

3) シンポジウム発表

1. Seto S, Tsujimura K, Koide Y: Image analysis reveals that *Mycobacterium tuberculosis* mediates the differential recruitment of Rab GTPases to its phagosomes during arresting phagosome maturation. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September, 2011, Sapporo, Japan.

5) 一般発表

口頭発表

1. Seto S, Tsujimura K, Koide Y: Localization and function of Coronin-1a in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. 46th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy, December, 2011, Saitama, Japan.
2. Osada-Oka M, Hirayama Y, Tateishi Y, Ozeki Y, Kitada S, Maekura R, Tsujimura K, Koide Y, Kobayashi K, Matsumoto S: Antibody responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in latent *M. tuberculosis* infection. 46th US-Japan Conference on Tuberculosis and Leprosy, December, 2011, Saitama, Japan.

ポスター発表

1. Tsujimura K, Yamamura Y, Hozumi H, Seto S, Uchijima M, Nagata T, Koide Y: Cellular and humoral immune responses against latency-associated antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. DNA vaccine 2011, July, 2011, San Diego, USA.
2. Nagata T, Eweda G, Suzuki D, Tsujimura K, Koide Y: Identification of T-cell epitopes on low-molecular-mass secretory proteins (CFP11, CFP17, TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September, 2011, Sapporo, Japan.
3. Seto S, Tsujimura K, Koide Y: Localization and function of Coronin-1A in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September, 2011, Sapporo, Japan.
4. Tsujimura K, Yamamura Y, Seto S, Uchijima M, Hozumi H, Nagata T, Koide Y: Immunogenicity of dormancy-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated mice. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September, 2011, Sapporo, Japan.
5. Uchijima M, Nagata T, Tsujimura K, Koide Y: Analysis of antigen-specific CD8+ and CD4+ T-cell responses induced by chemokine fusion DNA vaccination. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September, 2011, Sapporo, Japan.
6. Okanami Y, Tsujimura K, Mizuno S, Tabata M, Isaji S, Uemoto S, Akatsuka Y, Kuzushima K, Takahashi T: Analysis of Donor-specific T-cell reaction in liver transplant recipients. Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST) 2011, September, 2011, Seoul, Republic of Korea.

(3) 役職についている国際・国内学会名とその役割

1. 堀井俊伸 日本感染症学会 (評議員)
2. 堀井俊伸 日本環境感染学会 (評議員)

## 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 23 年度
(1) 国際共同研究	0 件
(2) 国内共同研究	3 件
(3) 学内共同研究	3 件

### (2) 国内共同研究

1. 早川啓史、三輪清一（天竜病院） 抗結核ワクチンの開発
2. 永津雅章（静岡大学創造科学技術大学院） 低温プラズマ滅菌技術の開発と作用機構解析
3. 影山康徳（浜松大学） 関節リウマチにおける免疫機構の解析

### (3) 学内共同研究

1. 小出幸夫（理事） 抗結核ワクチンの開発
2. 永田 年（基礎看護学） 抗結核ワクチンの開発
3. 千田金吾、須田隆文（内科学第二） 抗結核ワクチンの開発

## 10 産学共同研究

	平成 23 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

結核は現在も死因の大きな割合を占め、2010 年には世界で 880 万人が結核を発症し 140 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、標的とする結核防御抗原の探索（プロジェクト 1）と効果的な免疫方法の確立（プロジェクト 2）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、様々な機序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マクロファージのファゴソームの性状解析を行い、その阻害機構の解明を試みている（プロジェクト 3）。

### 1. 結核の再燃制御を目的としたワクチンの開発

成人結核の大部分が内因性再燃に起因することから、潜伏感染者の診断法の確立や結核菌の再燃を制御する新規ワクチンの開発は、二次結核の予防に重要な意義をもつ。その基礎実験として、結核菌が潜伏期特異的に発現する DosR 蛋白質群に対する T 細胞応答を、①結核患者、②潜伏感染者、③健常者で比較検討した（48 種類報告されている蛋白質群のうち 33 種類について検討した）。

結核患者や健常者に比べ、潜伏感染者の DosR 蛋白質群に対する T 細胞応答は、全般的に亢進

している傾向にあった。特に、Rv570、Rv2004、Rv2028c、Rv3133c に対する潜伏感染者の T 細胞応答は、他群と比較して統計学的に有意に上昇していた。一方、Rv2031c に対する T 細胞応答のように、潜伏感染者と結核患者の両方（結核患者 > 潜伏感染者）で上昇しているものもあった。

以上 5 種類の DosR 蛋白質が潜伏期結核菌を標的とするワクチンの候補抗原として有望と考えられた。また Rv570、Rv2004、Rv2028c、Rv3133c に対する T 細胞応答が、潜伏感染者と結核患者の識別に利用できる可能性が示唆された。

（辻村邦夫、瀬戸真太郎、内嶋正人、堀井俊伸、小出幸夫）

## 2. タンパク質機能性ドメインを用いた抗結核ワクチンの開発

細胞内寄生菌に対する効率の良いワクチンを樹立するためには、抗原利用率（取り込み、分解および MHC による抗原提示）を増大させ、キラー T 細胞や Th1 細胞の誘導能を促進する必要がある。未成熟樹状細胞上に発現するケモカインレセプターの CCR5 を標的とする DNA ワクチンでは、そのリガンドである MIP-1 $\alpha$  を抗原に融合することで CD8+ および CD4+ T 細胞を強く感作できたが、特に CD8+ T 細胞を誘導する指向性が高いことが、BALB/c、C57BL/6、および両者の F1 マウスを用いた解析から確認できた。MIP-1 $\alpha$ -EGFP 融合タンパク質を調製し、骨髄由来樹状細胞による取り込みと細胞内挙動を生細胞で経時解析した結果、MIP-1 $\alpha$  を融合することで取り込み速度および効率が増加し、CCR5 と共局在していることが確認できた。また、融合タンパク質を用いた免疫実験により、レセプターへの結合が CD8+ T 細胞を強く誘導するために必要であることが明らかとなった。

自然免疫は初期防御機構としてばかりではなく、獲得免疫の成立においても重要である。自然免疫の活性化に関わる細胞内シグナル伝達因子を強制発現させることで、より効率の良い DNA ワクチンを確立するため、PAMPs による免疫細胞の活性化に関わる TBK1、ASC、Rip2、NLRP3 などをクローニングした。これらを樹状細胞株に導入し、その遺伝子産物の発現を確認し、これらの DNA ワクチンにおける効果について解析を開始した。

（内嶋雅人、永田 年、辻村邦夫、堀井俊伸、小出幸夫）

## 3. 結核菌によるファゴリソソーム形成阻害機構の解析

結核菌は典型的な細胞内寄生性細菌である。結核菌はヒトの肺に感染すると、肺胞マクロファージによって貪食されるが、貪食されたマクロファージ内で増殖することができる。この細胞内増殖能は結核菌によるファゴリソソーム形成阻害機構に依存していると言われている。これまでの研究で、アクチン結合性タンパク質である Coronin 1a (Coro1a) が結核菌ファゴソームに局在することによって、ファゴリソソーム形成の阻害を行っていることが示唆されている。すなわち、Coro1a ノックアウトマウス由来マクロファージやノックダウンマクロファージにおける結核菌ファゴソームにおいて、ファゴリソソーム形成が促進され、これらのマクロファージに感染した結核菌の増殖は阻害されることが示されている。しかし、Coro1a による結核菌ファゴソームのファゴリソソーム形成阻害機構の詳細はいまだ明らかになっていない。我々は Coro1a ノックダウン (KD) マクロファージにおける結核菌増殖阻害機構にオートファジーが関与していることを明らかにした。さらに、Coro1a KD マクロファージにおいて、結核菌ファゴソームにオートファゴソ

ーム形成が促進されることをイメージ解析と生化学的解析によって明らかにした。

以上の結果から、Coro1a は結核菌感染マクロファージにおけるオートファゴソーム形成を阻害することによって、結核菌のマクロファージ内での増殖を支持する可能性が考えられた。

(瀬戸真太郎、辻村邦夫、堀井俊伸、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. 潜伏期結核菌が発現する DosR 蛋白質群の中で、結核菌感染者（潜伏感染者および結核患者）で免疫応答が亢進したものを多数同定した。この結果は DosR 蛋白質群がヒトで抗原性を持つことを示唆しており、将来のワクチン開発に重要なシーズとなる。
2. ケモカインレセプターや細胞内シグナル伝達因子を利用した新たな分子融合型ワクチン技術を開発した。
3. Coronin 1a が結核菌の感染初期におけるマクロファージ内増殖を支持する可能性を示した。

### 14 研究の独創性，国際性，継続性，応用性

現行の抗結核ワクチンである BCG の乳幼児期粟粒結核等に対する効果は広く認められているが、成人の結核の大部分を占める肺結核に対する効果は疑問視されている。しかし、BCG の効果を凌駕する抗結核ワクチンは未だ開発されておらず、その開発は世界的な課題である。これまでの抗結核ワクチンが結核菌の初期感染の阻止を標的としているのに対し、我々が開発中である潜伏感染中の結核菌の再燃制御を目的としたワクチンは全く異なる発想に基づくものである。このようなワクチンを開発できれば、初期免疫に BCG を、追加免疫に本ワクチンを用いることで、新たなワクチン戦略の構築が可能となる。

結核菌防御抗原の検索は、結核に対するワクチン開発に重要であるのみならず、その免疫応答は結核感染の診断ツールとして応用性のあるものである。これまで活動性結核患者と潜伏期感染者を鑑別するバイオマーカーは樹立されていない。現在進行中のヒト検体を用いた潜伏期（休眠期）抗原に対する免疫応答の包括的検索は、これらの分野にも大きな情報をもたらすことが期待できる。

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、他の感染症やがんに対するワクチン開発にも応用が可能である。さらに、結核菌によるファゴリソーム形成阻害機構の解析から、ワクチン効果の増強法や新たな薬剤の開発に有用な知見が得られることが期待できる。