

8. 免疫部

部長 小林和夫

概要

当部は感染症における病原体—宿主関係を宿主応答の視点から制圧研究を推進している。「研究室で得られた研究成果を医療や社会に還元し、すなわち、translational research (橋渡し研究) を推進し、健康増進や感染症による健康被害の減少」を究極の目標として、部員一同、邁進している。また、国立感染症研究所において、免疫部は感染免疫の学問領域から所内横断的協力体制に、加えて、人材育成や国際化に対応するため、研修や国際協力にも参加している。

免疫部では、ウイルス、細菌、原虫・寄生虫やプリオンなど、多種多様な病原体感染症に関する研究、さらに、免疫担当細胞の発生や分化に関する研究を実施した。また、品質管理に関する業務、国際協力関係業務、研修業務や共同大型利用機器管理にも寄与した。

免疫部で実施された研究・業務の概要は以下のとおりである。

調査・研究

I. ウイルス感染症

1. HIV の増殖制御と病態に関する研究
2. インフルエンザに関する研究
3. C 型肝炎ウイルス感染に関する研究

II. 細菌感染症

1. 抗酸菌感染症に関する研究
2. 歯周病菌の病原性因子に関する研究
3. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症に関する研究
4. 細菌の運動性に関する分子機序
5. 破傷風毒素の神経受容体に関する研究

III. 原虫・寄生虫感染症

1. 内蔵リユーシュマニア症の防御免疫に関する研究
2. マラリアの感染防御に関する研究
3. マンソン住血吸虫感染防御に関する研究

IV. プリオン病

1. 異常プリオン蛋白質に関する研究

V. 骨髄不全症に関する研究

1. 難治性疾患の造血幹細胞に関する研究

VI. 免疫機能に関する研究

1. プレ B 細胞受容体の機能に関する研究

2. カドヘリン遺伝子欠損マウスにおける B 細胞分化および抗体応答に関する研究

品質管理に関する業務

国際協力関係業務

研修業務

共同大型利用機器管理

人事異動では、平成 18 年 7 月に小林和夫が大阪市立大学大学院医学研究科から免疫部長として採用された。また、平成 19 年 2 月に大原直也が長崎大学大学院医歯薬学総合研究科から第四研究室長、平成 19 年 3 月に岡部真裕子が大阪大学大学院生命機能研究科から第四研究室研究員として採用された。

業績

調査・研究

I. ウイルス感染症

1. HIV の増殖制御と病態に関する研究

(1) nef 遺伝子特異的な shRNA を用いた HIV-1 増殖制御

3'LTR に重複する Nef 遺伝子の 366 番目の領域の small hairpin (sh)Nef366 発現レンチウイルスを作製した。Lenti shNef366 は RNA interference(RNAi)効果により T 細胞での HIV-1 増殖を抑制した。そこで慢性 HIV 感染者で欠如している Gag 特異的 CD4 陽性 T 細胞の増殖が HIV 増殖抑制によって回復するかどうかを検討した結果、Lenti shNef366 による HIV 増殖抑制は血中ウイルス量の高い慢性 HIV 感染者の Gag 特異的 CD4 陽性 T 細胞の増殖を回復させることが明らかとなり、Lenti ウイルスを用いた遺伝子治療の有用性が示唆された。[山本拓也(東大医科研博士課程・研究生)、Brigitte Autran(パリ大学 Pitie Salpetriere Hospital)、井上純一郎(東大医科学研究所・ウイルス制御)、横田恭子]

(2) HIV-1 感染における特異的 T 細胞の活性化評価システムの確立

IFN- γ のプロモーター活性を検出するインディケーターレンチウイルスとして、minimal IFN- γ プロモーターの下流に β -lactamase を発現するレンチウイルスを作製した。

免疫部

この系は、蛍光を発する CCF2-AM 基質が β -lactamase に切断されて蛍光波長が変化することを利用して(FRET)生細胞で IFN- γ プロモーター活性を解析するものである。実際、自発的に増殖する IFN- γ 持続産生 CD4 陽性 T 細胞クローンにこのレンチウイルスを感染させ、FRET と組合せた多重染色 FACS 解析が可能であることが明らかとなった。[山本拓也(東大医科研博士課程・研究生)、水越文徳(エイズ予防財団リサーチレジデント)、立川 愛(東大医科研・先端医療研究センター・感染症)、岩本愛吉(東大医科研・先端医療研究センター・感染症)、井上純一郎(東大医科研・ウイルス制御)、横田恭子]

(3) HIV-Nef 発現による免疫不全発症の解明

HIV-Nef 発現による T 細胞免疫への影響を明らかにするため、OVA 特異的 T 細胞抗原受容体トランスジェニックマウス(TGM)と、コクサキ・アデノウイルス受容体 TGM をかけあわせた double TGM を作成した。このマウスより精製した CD4 陽性 T 細胞に Nef 発現アデノウイルス、CD4 の発現抑制を起こさない Nef 変異体発現ウイルス(nef CD4)を感染させ、FACS を用いて Nef 発現、Nef CD4 発現、および Nef 非発現 T 細胞を分離後個体に移入し、T 細胞機能を検討した。その結果、Nef 発現細胞は、非発現細胞と比べ抗原刺激に対する活性化が低下し、T 細胞遊走活性障害、また、所属リンパ節への移動も抑制された。さらに、Nef 発現により、二次応答における CD4 陽性 T 細胞のヘルパー機能が低下することが示された。しかし、これらの T 細胞の異常は Nef による CD4 発現抑制とは無関係であった。これらの結果から、Nef 発現により CD4 陽性 T 細胞の抗原刺激に対する活性化が低下し免疫不全の要因の一つとなる可能性が示唆された。[藤猪英樹(協力研究員)、阿戸 学、高橋宜聖、加地友弘(協力研究員)、竹森利忠(理研)]

2 . インフルエンザに関する研究

(1) 高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) の研究に有用なモノクローナル抗体の作製

H5N1 型インフルエンザのワクチン品質管理あるいは診断に有用なモノクローナル抗体を作製するため、UV 照射あるいはホルマリンで不活化したワクチン株 (NIBRG-14 : ベトナム由来) ウイルス精製粒子をマウスに 3 回免疫した。ELISA で NIBRG-14 に反応して PR8(H1N1)に反応しないクローンを選択し、最終的に H5 型 HA に特異的に反応するクローン 6 個と NA に反応するクローン 1 個を樹立した。HA に反応するクローン 6 個のうち、2 つはクレードの異なるインドネシア由来ウイ

ルス株には反応せず、クレード 1 特異的抗体と考えられる。[横田恭子、大西和夫、高橋宜聖、平山中巳、阿戸 学、大島正道、光木裕也 (東京医歯大博士課程・研究生)、水越文徳 (エイズ予防財団リサーチレジデント)、山本拓也 (東大医科研博士課程・研究生)、小林和夫]

(2) 新型インフルエンザ用ワクチンが惹起する感染防御機構の解析

新型インフルエンザ用ワクチン (NIBRG-14) が惹起する感染防御機構を明らかにする目的で、NIBRG-14 ワクチン接種マウスから、血清とリンパ節細胞を調製し、様々な組み合わせで先天的リンパ球欠損 (scid) マウスに移入した。その結果、リンパ球を移入した scid マウスでは、強毒株の攻撃実験に対するマウス生存率の改善が認められない一方で、血清を移入した scid マウスは完全に耐過することが明らかとなった。またヘマグルチニンとノイラミニダーゼのみが異なる PR8 の不活化全粒子を接種したマウス血清では、感染防御効果が付与されないことから、ヘマグルチニンあるいはノイラミニダーゼに対する血清抗体が感染防御に必須な因子であることが判明した。[高橋宜聖、阿戸 学、二宮 愛 (ウイルス第三部)、小田切孝人 (ウイルス第三部)、田代真人 (ウイルス第三部)、小林和夫]

(3) 新型インフルエンザ用ワクチンが惹起する感染防御抗体の作用機構の解析

新型インフルエンザ用ワクチン (NIBRG-14) を接種したマウスでは、従来の中和試験で測定した中和抗体価と生体内での感染防御抗体価とのずれが報告されているものの、その原因は明らかにされていない。本研究では、蛍光標識ウイルス粒子を用いて、ウイルス粒子の細胞付着を定量する方法を確立し、感染防御抗体による細胞付着の阻害効果を検討した。その結果、NIBRG-14 ワクチンが惹起する感染防御抗体は、ウイルス粒子の細胞付着をほとんど阻害しないことが判明した。しかし、血清に含まれる熱失活性の因子により、付着阻害活性が増強されたことから、試験管内の中和抗体価と生体内での感染防御抗体価の相違は、この因子の有無に起因する可能性が示唆された。[高橋宜聖、原ゆかり (実習生)、二宮 愛 (ウイルス第三部)、小田切孝人 (ウイルス第三部)、田代真人 (ウイルス第三部)、小林和夫]

(4) 組換えヘマグルチニンタンパクを用いたインフルエンザウイルス特異的な B 細胞応答の解析

インフルエンザウイルスに対する防御免疫反応では、

免疫部

液性免疫が中心的な役割を担う。しかし、これまでインフルエンザウイルスに特異的な B 細胞応答を追跡する技術が未整備であり、インフルエンザウイルス感染後、あるいはインフルエンザワクチン接種後に誘導される B 細胞応答の詳細は不明である。本研究では、バキュロウイルス発現系を用いて NIBRG-14 (H5N1) と PR8 (H1N1) の組換えヘマグルチニンタンパクを作製し、ヘマグルチニンに特異的な B 細胞応答を解析する技術を開発した。その結果、免疫原性が弱いとされる NIBRG-14 ワクチンを接種したマウスでも、PR8 と同程度の B 細胞応答を誘導することが判明した。[高橋宜聖、北原玄太 (実習生)、小林和夫]

(5) インフルエンザワクチン安全性試験としての白血球減少試験の免疫学的検証

インフルエンザワクチン検定の白血球減少試験における白血球減少活性の免疫学的意義を解析するため、ワクチン投与後のマウス各臓器白血球数と血中サイトカイン濃度を測定した。その結果、全粒子ワクチン投与後の末梢血中白血球減少は T 細胞、B 細胞および顆粒球分画で検出された。同力価の HA ワクチンと全粒子ワクチンの投与比較においては、全粒子ワクチン群のみに、白血球減少と血中インターフェロンアルファ (IFN- α) 濃度の著しい上昇を認めた。さらに、IFN- α/β レセプター欠損マウスでは白血球減少が認められなかった。以上より、ワクチンによる白血球減少は、全粒子ワクチンによって産生誘導された IFN- α を介して起こることが示された。現在、白血球の移動臓器及び、IFN- α 産生を誘導するウイルス分子を検索中である。[論文投稿中] [阿戸 学、高橋宜聖、藤猪英樹 (協力研究員)、加地友弘 (協力研究員)、山本紀一 (協力研究員)、板村繁之、田代真人 (ウイルス第三部)、堀内善信、荒川宜親 (細菌第二部)、竹森利忠 (理研)]

(6) インフルエンザウイルス感染に対する宿主抵抗因子に関する研究

インフルエンザウイルス感染に際し肺胞上皮由来人細胞株 A549 は感受性であり感染ウイルスを排除できずに死滅する。しかし気管上皮由来細胞株 NCI-H292 は 2 4 時間で感染ウイルスを排除し回復する。ウイルス感染により interferon (IFN) をはじめ宿主側抵抗遺伝子が誘導される状況を網羅的に解析した。細胞によるウイルス感染に対する反応性の違いを宿主抵抗因子の観点から検討している。[大島正道、戸高玲子 (臨時職員)、清水一史 (日大医学部ゲノムセンター)、清水洋子 (日大医学部ゲノムセンター、協力研究員)、鈴木和男 (千葉大学大学院、科学技

術特別研究員)、河内正治 (国立国際医療センター、協力研究員)]

3 . C 型肝炎ウイルス感染に見られる short RNA に関する研究

C 型肝炎患者血液中及び肝組織内に HCV ウイルス short RNA が存在しその量比がウイルスの感染性、活動性と逆相関することを明らかにし発表した。この short RNA 産生維持機構の解析を通してウイルス複製のメカニズムを解析し、効率よいウイルス細胞培養系を確立する。C 型肝炎治療におけるインターフェロン (IFN) の治療効果判定に short RNA が有用か調べた。short RNA の量比はウイルスの感染性、活動性と逆相関し IFN 治療効果判定の正解率は 77.1% であった。short RNA は治療効果判定の有用な基準となることが明らかとなった。現在 Short RNA の産生メカニズムについて検討中である。[大島正道、戸高玲子 (臨時職員)、清水洋子 (日大医学部ゲノムセンター、協力研究員)、土方美奈子 (国立国際医療センター)、吉倉廣 (CODEX)]

II . 細菌感染症

1 . 抗酸菌感染症に関する研究

(1) スメグマ菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 由来のプロモーターの有用性の検討

以前にクローニングしたプロモーターの有用性について検討した。このプロモーターと種々の抗酸菌由来のプロモーター (HSP60 プロモーター、G13 プロモーターなど) の BCG における IFN- γ や IL-2 発現について検討したところ、我々がクローニングしたプロモーターは、BCG 由来の HSP60 プロモーターとほぼ同程度のプロモーター活性を認めた。G13 プロモーターなどより強い活性を示した。このことは、同一プラスミド内に同じプロモーターで 2 種類の蛋白を大量に発現することが困難であること、また、プラスミドを混合して投与すると、発現量が抑えられることから、同一プラスミド内に、2 種類の蛋白遺伝子を HSP60 プロモーターとこのプロモーターを用いることにより、二つの蛋白を同時に大量に発現できることが可能になると思われる。[谷山忠義]

(2) 抗酸菌による骨侵襲の分子機構

骨結核の病態および BCG ワクチン接種による骨炎が生じるメカニズムを明らかにするため、BCG 感染による破骨細胞分化への影響を調べた。破骨細胞の分化初期に BCG が感染するとその分化は抑制され、その際破骨細胞分化において中心的な役割を果たす c-fos の上昇が認めら

れず、また細胞表面マーカーの発現パターンは変化した。しかし破骨細胞分化を正に制御する IL-6、MCP-1、RANTES、TNF- α の産生は認められた。分化初期における BCG 感染による破骨細胞分化の抑制は分化の方向性が変化したことによることが示唆された。[大原直也、吉村満美子 (大阪市大)、内藤真理子、庄子幹郎、吉村篤利、佛坂育祉、中山浩二 (長崎大)]

(3) トランスポゾンを用いた抗酸菌由来新規免疫誘導遺伝子の同定

生菌による免疫誘導は、死菌や菌構成成分の投与と比較して強力で、かつ長期にわたるが、未だその分子機構は不明である。本研究は、挿入配列として既知のマウス T 細胞特異的抗原ペプチドをコードするトランスポゾン挿入した非結核抗酸菌 *Mycobacterium fortuitum* 変異株をスクリーニングし、最終的には宿主免疫応答を促進するのに必要な結核菌遺伝子を同定することを目的とする。マウス CD8 陽性 T 細胞特異的抗原ペプチド群のデータベースを作成し、ペプチドを *M. fortuitum* のコドン読み枠に変換した DNA を含むトランスポゾン配列を精製した。現在、細菌ゲノムの異なる部位に挿入され、ペプチドを発現する変異株を作成し、変異株のライブラリーを作成中である。これらをマウスに感染させ、宿主免疫誘導に障害を持つ変異株のトランスポゾン挿入部位を同定することによって、宿主免疫を修飾する新規抗酸菌遺伝子を同定する予定である。[阿戸 学、大西 眞 (細菌第一部)、渡邊治雄 (細菌第一部)、竹森利忠(理研)]

(4) 抗酸菌細胞壁病原因子

結核菌の主な宿主標的細胞はマクロファ-ジであるが、結核菌細胞壁病原因子 (trehalose dimycolate : TDM) --- マクロファ-ジ関係でマクロファ ジスカベンジャー受容体は TDM 刺激による炎症性サイトカイン産生を抑制していた。すなわち、マクロファ ジスカベンジャー受容体は結核菌による過度の炎症を抑制し、病変形成を修飾する可能性を示唆する。[小林和夫、尾関百合子 (大阪市立大学大学院医学研究科)]

(5) 潜在性結核菌感染

多くの活動性結核は潜在性結核菌感染に起因する。潜在性結核菌感染者は全世界の人口で約 30% であり、結核対策に重要である。潜在性結核菌の生物学的特性を脂質代謝から解析し、その結果、結核菌由来脂肪酸合成酵素が関与していた。脂肪酸合成酵素 (KasB) は潜在性結核菌感染の治療標的候補である。[小林和夫、藤原永年(大

阪市立大学大学院医学研究科)、William R. Jacobs (Albert Einstein College of Medicine, New York)]

潜在性結核菌感染における結核菌は代謝の低下した休眠状態であり、菌由来多機能分子である抗酸菌 DNA 結合分子 1 (MDP1) が細胞壁合成に低濃度で増強、高濃度で抑制を示し、休眠状態 (高濃度) における MDP1 の役割が判明した [小林和夫、松本壮吉 (大阪市立大学大学院医学研究科)]

(6) 新規結核診断法の開発

新規結核補助診断法確立のため、抗酸菌遺伝子 Ag85a を組み込んだアデノウイルスベクターをヒト抗原提示細胞に感染させ、抗酸菌遺伝子産物に対する T 細胞免疫反応を測定する系を検討した。その結果、末梢血単球にアデノウイルスを感染させると、既存のアデノウイルス特異的 T 細胞より、多量のインターフェロンガンマ (IFN- γ) が産生された。このため、現在の形では結核診断法として用いることができないことが判明した。一方、ヒト末梢血単核球の細胞亜群を組み合わせ、樹状細胞にアデノウイルスベクターで抗酸菌抗原を導入することにより、CD8 陽性 T 細胞による抗原特異的 IFN- γ 産生応答を測定することが可能であることが示唆された。[論文投稿中] [阿戸 学、藤猪英樹(協力研究員)、竹森利忠(理研)]

(7) *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症の血清診断

非結核性抗酸菌症において最頻原因菌の MAC は環境菌であるため、MAC 感染症は「臨床所見 (画像、経過) および微生物学的検査」を総合的に考慮し診断される。このため、確定診断に長期間 (3 ヶ月以上) を要することが多い。MAC 特異的細胞壁糖脂質蛋白質抗原 (GPL) に対し、宿主が血清抗体産生を示し、血清診断 (所要時間 : 約 3 時間) に有用であることを示した。現在、診断キットを試作し、多施設臨床試験が進行中である。[小林和夫、北田清悟、前倉亮治(独立行政法人国立病院機構刀根山病院)]

(8) MAC 特異的細胞壁糖脂質蛋白質 (GPL) 合成系

GPL は MAC 血清型を規定している細胞壁成分であるが、その合成系は未解明な点が多い。*M. intracellulare* serotype 7 由来の GPL は MAC 共通なコア部分 (fatty acyl-D-Phe-D-allo-Thr-D-Ala-L-alaninol) と糖鎖部分 (hexose rhamnose rhamnose rhamnose 6-deoxytalose) から構成され、分子量は 1,874 であった。特徴として、糖鎖部分に rhamnose が豊富、すなわち、合成系に

rhamnose 転移酵素 (*rtfA* 遺伝子) 群が関与していた。GPL の病原性、また、薬剤標的候補の可能性を探索する予定である。[小林和夫、藤原永年 (大阪市立大学大学院医学研究科)、中田 登 (ハンセン病研究センター)、前田伸司 (結核予防会結核研究所)]

2 . 歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis*) の病原性因子に関する研究

(1) *Porphyromonas gingivalis* 33277 株ゲノムの塩基配列の決定

P. gingivalis 33277 株ゲノムの全塩基配列 2,354,886 塩基対を決定した。ゲノムサイズはすでに決定されている W83 株とほぼ同じであり、GC 比にも差は無かった。rRNA オペロン数は 4 個で 2,091 個の ORF を抽出した。33277 株 ORF の 12.8% は W83 株ゲノムには存在しなかった。また 33277 株と W83 株ゲノム間には全領域にわたり多数の再構成が生じており、ゲノム構造に大きな相違があった。[大原直也、内藤真理子、庄子幹郎、中山浩次 (長崎大)、中山恵介、林 哲也 (宮崎大)、平川秀樹、久原 哲 (九州大)、山下敦士、服部正平 (北里大)、吉村文信 (愛知学院大)]

(2) ECF シグマ因子の解析

嫌気性である *P. gingivalis* の環境ストレスに対するトランス機構を解析する目的で同菌が持つ 6 種の ECF シグマ因子それぞれの遺伝破壊株を作製し解析した。その結果、いずれのシグマ因子も必須ではなく、いずれの欠損株も同様に発育した。その中で PG1318 遺伝子破壊株のみが黒色素産生性が顕著に低下しており、同菌の主要な病原性因子であるプロテアーゼ Kgp、Rgp の活性化に密接に関連していることが示唆された。[大原直也、菊池有一郎、上田青海、平井 要、柴田幸永、藤村節夫 (松本歯大)、中山浩次 (長崎大)]

(3) TPR ドメイン蛋白質の研究

Tetratricopeptide repeat (TPR) ドメインは細菌からヒトに至るまで存在し、蛋白質間相互作用モジュールとしての役割を果たす。病原細菌における病原性因子との関連性を明らかにするため、*P. gingivalis* の TPR ドメイン蛋白質 PG1385 遺伝子破壊株を作製した。同破壊株の集落性状および培養下での発育速度は野生株と同様であったが、マウスにおける病原性は顕著に低下し、TPR ドメイン蛋白質が同菌の病原性因子と相互作用することが示唆された。[大原直也、吉村満美子 (大阪市大)、近藤好夫、庄子幹郎、雪竹英治、内藤真理子、中山浩次、藤原 卓 (長

崎大)]

3 . 劇症型溶血性レンサ球菌感染における宿主防御機構修飾

A 群溶血性レンサ球菌 (GAS) の劇症型感染は致死率の高い病態を形成する。劇症株による重症化が宿主の防御機構の障害に依存する可能性を考え、GAS M49 株の中で劇症型感染分離株と通常感染分離株を、GAS に対する主要な防御担当細胞であるヒト好中球、または線維芽細胞株に *in vitro* で感染させ、貪食能、遊走能、殺菌能をそれぞれ比較解析した。M49 型劇症株の好中球の貪食、また、線維芽細胞株の殺菌抵抗性に関しては、株間の差が大きく、臨床像につながる劇症株の一般的傾向は抽出できなかった。一方、好中球による劇症型菌株の殺菌能は通常株と比較して有意に障害されていることが明らかとなった。また、劇症株が好中球のケモカインに対する遊走を阻害することが判明した。以上より、劇症型感染を引き起こす M49 型 GAS は、好中球に対する殺菌抵抗性および遊走阻害を通じて重症化する可能性が示唆された。[阿戸 学、池辺忠義 (細菌第一部)、渡邊治雄 (細菌第一部)、竹森利忠 (理研)]

4 . 細菌の運動性に関する分子機序

多くの細菌はべん毛と呼ばれる運動器官を持つ。この超分子構造体は 20 数種類のタンパク質で構成され、細胞質内で合成されたのち先端まで運ばれて連続的に重合し伸長する。べん毛基部にはそのための輸送装置が存在し、ATP の加水分解エネルギーを利用してタンパク質を送り出している。FliI はべん毛の輸送に関わる ATPase である。本研究では *Salmonella typhimurium* を用い、FliI の N 末領域について変異体を作成し、FliI の活性抑制因子である FliH との相互作用領域を同定することで FliH の FliI 活性調節機構モデルを提唱した。また調節因子による制御だけでなく、FliI 自身の N 末側領域が積極的に C 末側の ATPase 活性を自己制御するメカニズムを持つことを示唆している。[岡部真裕子、南野 徹、難波啓一 (阪大)、May Kihara (Yale 大学)]

5 . 破傷風神経毒素に対する神経細胞表面受容体分子に関する研究

破傷風神経毒素 (T.Tn) は、末梢運動神経末端の神経筋接合部で受容体と特異的に結合し、神経細胞内に取り込まれ、逆行性輸送により、神経節を飛び越えて中枢神経細胞内に再度取り込まれ、ここで神経生理機能活性を消失させ、宿主の呼吸筋の痙攣麻痺を誘導し、宿主を死に至

らしめる強毒な細菌毒素蛋白である。この T.Tn の神経細胞表面受容体蛋白分子は未だに同定されていない。実験は、この受容体分子の分離同定を目的としている。T.Tn と結合する可能性のある神経細胞株として、以下 3 種を用いた実験が行われている。初めに NSC-34 (マウス運動神経系細胞株) はトロント大学 Cashman 教授より供与を受け、次に HT22 細胞株は米国ソーク研究所 Schubert 教授了解の下、国立精神神経研究センター木村英雄先生からの分与、3 番目に SN56 細胞株はボストン大学 Blusztajn 教授より供与を受けた。後者 2 種の細胞株もマウス由来で、HT22 はミトコンドリア外膜に発現する蛋白が細胞膜上にも発現しているとの報告があるもので、SN56 はコリン作動性の神経系の細胞株で、いずれも傍証的には T.Tn との結合の可能性の高い細胞株である。これまでの実験結果では、T.Tn の直接的な結合性は認められていない。これには、さまざまな要因が原因として考えられ、現在この要因の検討と共に、結合性がさらに調べられている。[平山中己]

III . 原虫・寄生虫感染症

1 . 内蔵リユーシュマニア症における防御免疫成立機構の解析

内蔵リユーシュマニア症は致死的原虫感染症である。ヒトの病態をよく反映する感染マウスモデルを用いて、感染免疫の成立機構を解析した結果、感染初期に脾臓の樹状細胞(DC)が IL-12 を産生し感染特異的 T 細胞免疫を誘導することが判明した。一方、DC の T 細胞領域への移動に必要なケモカイン CCL19/21 を欠損する *plt/plt* マウスでは、感染脾臓 DC の活性化と DC からの IL-12 産生が障害された結果、エフェクター CD4 陽性 T 細胞から抑制性サイトカイン IL-10 の産生が亢進し、肝臓においても肉芽腫反応や T 細胞免疫応答が遅延するなど、感染感受性の亢進が認められた。以上より、感染初期において、DC が脾臓 T 細胞領域へ遊走することが、IL-12 産生誘導および感染免疫の成立に重要であることが考えられた。[阿戸学、中野英樹、垣内史堂 (東邦大)、Asher Maroof、Soombul Zubairi、Paul Kaye (London School of Hygiene and Tropical Medicine)]

2 . マラリア感染防御に関与する免疫細胞の同定

マラリア感染防御に必須な免疫因子を同定することを目的とし、マウスマラリア *Plasmodium chabaudi* 感染モデルを用いて、紫外線 (UV) 照射による抗マラリア免疫応答の抑制機構を解析した。その結果、UV によるマラリア感染感受性の亢進は、抑制性サイトカイン IL-10 非依存

性であることが、IL-10 KO マウスを用いた実験結果から確認された。今後、この UV によるマラリア感染感受性責任分子の究明が課題である。[山本紀一 (協力研究員)、高橋宣聖、藤猪英樹 (協力研究員)、阿戸学、竹森利忠 (理研)]

3 . マンソン住血吸虫感染防御に関する研究

国際寄生虫感染症として、住血吸虫症はマラリアに次いで重要である。本研究は、マンソン住血吸虫症に対する感染防御を誘導する感作方法の確立とワクチンへの応用を目指している。既に海外の報告で、本虫の幼虫弱毒化方法として、放射線照射と UV 照射の 2 方法がある。両方法ともマウスの系で本虫感染を約 60% 防御するが、これ以上の効果は得られていない。本研究では新たな幼虫弱毒化方法として DNA 合成阻害剤を用いた。実験は、感染幼虫を *in vitro* で DNA 合成阻害剤と共に培養し、これをマウスに感作させる系で、感染防御効果を調べた。結果は約 70% の防御効果があった。この効果を強める目的で、アジュバントの併用を試みた。アジュバントとしてはヒトへの使用を前提とし、BCG、PPD、水酸化アルミニウムゲル、市販サボニン、FK565 (藤沢製薬) 等を用いた。結果は、市販サボニンに免疫増強効果が認められ、80% 近く防御した。単独アジュバントでの免疫増強効果はこれ以上得られず、現在 2 種類のアジュバント混合実験を実施している。また、新たな弱毒化感作方法として、感染幼虫とこれらのアジュバントを直接混ぜ、これを用いた感作実験を行った。結果はいずれのアジュバントにも弱毒化効果は認められなかった。[平山中己、朝日博子 (寄生動物部)、吉成正裕 (横浜市立大学)、金澤保 (産業医科大学)、南陸彦 (横浜市立大学)]

IV . プリオン病

1 . 異常プリオン蛋白質の免疫系における増殖・伝播機構の研究

異常プリオン蛋白質を経口摂取した動物において海綿状脳症 (TSE) が発症する過程に、神経系と共に免疫系が関与することが知られている。本研究は、免疫系と神経系に共通した異常プリオン蛋白質形成機構の解明を目的とし、BILL カドヘリンと S100 蛋白質群に焦点を当てて検討している。マウス神経芽細胞 (ScN2a) を用いた異常プリオン蛋白質形成 *in vitro* 実験系では、形成される異常プリオン蛋白質の量は免疫系に発現する分子である BILL カドヘリンと S100A8 で抑制され、S100A9 で促進された。S100B では変化がなかったが、これは ScN2a に内在的に発現する S100B のためと考えられた。また、こ

れまで例のない免疫系細胞株（B細胞、樹状細胞、マクロファージ等）を用いた異常プリオン蛋白質増殖 *in vitro* システムの構築を進めている。[大西和夫、山口沙由里（臨時職員）]

V. 骨髄不全症に関する研究

1. 難治性疾患における造血幹細胞の自己複製に関する研究

骨髄不全症の病因と疾病遺伝子を明らかにするために、Translin 遺伝子欠損マウス(TSN-KO)に認められる造血異常の詳細な解析を行った。その結果、TSN-KO マウスの骨髄では加齢に伴って幼若な骨髄系細胞とBリンパ系細胞が骨髄から消失していた。しかし、造血幹細胞(Lin-Sca1+ c-Kit+)と前駆細胞、さらに間葉系幹細胞が急激に増加するという結果が得られた。また、この現象は骨髄細胞自身によるものではなく、骨髄を取り囲む微小環境(Niche)の影響に起因するものであった。実際、海綿骨の異所的な形成と骨芽細胞数の増加が認められた。以上の結果は、Niche 本体である骨芽細胞や stroma 細胞において、Translin 蛋白が造血幹細胞の複製と分化の振り分けに関与していることを意味している。本研究で得られる成果は、造血に係わる難治性疾患の基盤的研究と医療分野への応用に発展する可能性を示唆している。[石田礼子、福田裕子(臨時職員)、中原一彦(大学評価学位授与機構)、葛西正孝]

VI. 免疫機能に関する研究

1. プレB細胞受容体の機能に関する研究

プレB細胞受容体は抗体重鎖と代替軽鎖からなり、B前駆細胞に発現して抗体の抗原認識多様性を生み出す過程で中心的な役割を果たす。我々はこの受容体のうち非免疫グロブリン(non-Ig)領域が受容体活性化に重要な働きを担うことを明らかにしてきた。Non-Ig 領域は結晶法による立体構造解析が困難であるため、ホモロジーモデリングおよび分子動力学法による解析を行っている。これまでの結果は、1) 5とVpreBのnon-Igドメインは2つの突起状構造を形成する、2) その2つの突起は特異的な電荷の分布を持つ、3) 分子動力学法によるシミュレーションでは電荷分布に依存した強い相互作用が存在する、ことを示唆した。今後さらに詳細な検討を行い、抗体分子の抗原認識多様性発生機構の理解に寄与する。[大西和夫、Lill Martensson (Babraham Institute, UK)、Fritz Melchers (Max Planck Institute for Infection Biology, Germany)、藤本浩文(放射能管理室)]

2. カドヘリン遺伝子欠損マウスにおけるB細胞後期分化および抗体応答に関する研究

BILL カドヘリンは分化過程特異的にB細胞に発現すると共に腸管上皮細胞や肺などの粘膜免疫組織にも発現する。本研究ではB細胞後期分化におけるBILLカドヘリンの機能を知る目的でBILLカドヘリン遺伝子欠損(KO)マウスにおける2次抗体応答を中心に解析した。その結果、1) KOマウスのNP-CG抗原に対する一次抗体応答において、胚中心B細胞数、IgG1抗体価、親和性成熟は野生型(WT)と変わらなかった、2) 二次抗体応答においてKOマウスの抗NP総IgG1抗体価および高親和性抗体価はWTに比べて著しく低下したことから、BILLカドヘリンは一次抗体応答過程には関与せず、二次抗体応答での抗体産生細胞分化という非常に特異的な分化段階で機能することが示唆された。[論文投稿中][窪田真澄(筑波大学大学院生命環境科学)、高橋宜聖、清水健之(札幌医科大学)、柳沢有紀、沼田治(筑波大学大学院生命環境科学)、小林和夫、Fritz Melchers (Max Planck Institute for Infection Biology, Germany)、大西和夫]

品質管理に関する業務

I. 急性A型ウイルス肝炎(HAV)診断薬承認前審査業務

HAV抗体体外診断薬の承認前検査2件について昨年度に引き続き審査を行なった。また、HAV抗体国内血清パネルの整備を進めており、特に、2006年7月末に滋賀県米原市で発生したHAV集団感染に際して、感染研倫理委員会の承認を受けて抗HAV-IgM抗体陽性血清の収集を行った。滋賀県健康推進課、滋賀県衛生科学センター、長浜保健所および医療機関の協力を得て、合計14名分の抗HAV-IgM抗体陽性血清を収集することができた。急性A型ウイルス肝炎の発生報告数は年々減少傾向にあり、HAV抗体陽性血清の確保が困難になってきている。今後さらにHAV抗体陽性血清をインフォームドコンセントの上、提供を受け、その品質を管理してHAV抗体国内血清パネルの整備を続ける予定である。[大西和夫、山口沙由里(臨時職員)、小林和夫]

国際協力関係業務

I. Dr. Jenn-Tyang Chang(国立Cheng-Kung大学、台湾)の研修受入

台湾CDCからの依頼により、Jenn-Tyang Chang医師(国立Cheng-Kung大学医学部)を2006年8月09-31日まで受入、感染疫学を研修した。[横田恭子、谷山忠義、大島正道、阿戸学、前田伸司(結核予防会結核研究所)、小林和夫]

・長崎大学熱帯医学研究所JICA研修員

長崎大学熱帯医学研究所JICA研修員として2名(ギニア共和国およびモザンビーク共和国:各1名)に「結核やHIV感染症」を2006年12月8日、講義した。[小林和夫]

・JICAベトナム社会主義共和国研修員

「感染症の脅威や制圧戦略」に関し、2007年3月14日、講義した。[小林和夫]

研修業務

I. 兵庫県立姫路東高等学校研修

医学、獣医学や生物学領域に進学を考えている高校生に、2006年10月25日、講義や施設見学を実施した。[小林和夫]

・医師卒後臨床研修

医師卒後臨床研修として「結核など抗酸菌感染症」に関し、2006年12月11日、講義した。[小林和夫]

共同大型利用機器管理

平成18年度細胞自動解析装置の使用は、523回、1215時間でその内訳は感染研498回、1157時間、感染研以外の研究機関25回、58時間であった。機器の使用に関して予約の管理を行い、利用申請書を適切に保存した。また、機器使用者が、円滑に実験を遂行できるよう、機器を適正に管理・保全し、故障等のトラブルには早急に対処した。新規使用者に対し講習会を開催するとともに、特殊な操作法に関しては個別に技術指導を行った。[渡辺恵理(臨時職員)、高橋宜聖、小林和夫]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M.J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., Matsuda, J., Sata, T., Kurata, T., Nagashima, K., and Hall, W.W. Development of thymus-Derived T-cell leukemia/lymphoma in mice transgenic for the tax gene of human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *Nat. Med.* 12: 466-471, 2006.
- 2) Ishii, K., Hasegawa, H., Nagata, N., Mizutani, T., Morikawa, S., Tashiro, M., Suzuki, T., Taguchi, F., Takemori, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Miyamura, T. Induction of protective immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV)

infection using highly attenuated recombinant vaccinia virus DIs. *Virology* 351: 368-380, 2006.

- 3) Ishii, K., Hasegawa, H., Nagata, N., Mizutani, T., Morikawa, S., Tashiro, M., Suzuki, T., Taguchi, F., Takemori, T., Miyamura, T., Tsunetsugu-Yokota, Y. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 593-596, 2006.
- 4) Yamamoto, T., Miyoshi, H., Yamamoto, N., Yamamoto, N., Inoue, J-I, Tsunetsugu-Yokota, Y. Lentivirus vectors expressing short hairpin RNAs against the U3-overlapping region of HIV nef inhibit HIV replication and infectivity in primary macrophages. *Blood* 108: 3305-3312, 2006.
- 5) Yamamoto, T., Isogai, M., Ohtake, K., Tsunetsugu-Yokota, Y. High and inducible expression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef by adenovirus vector does not disturb potent antigen-presentation by monocyte-derived dendritic cells. *Microbes Infect.* 8: 2522-2530, 2006.
- 6) Sugawara, I., Udagawa, T., Taniyama, T. Protective efficacy of recombinant (Ag85A) BCG Tokyo with Ag85A peptide boosting against *Mycobacterium tuberculosis*-infected guinea pigs in comparison with that of DNA vaccine encoding Ag85A. *Tuberculosis* 87: 94-101, 2007.
- 7) Shimizu, Y.K., Hijikata, M., Oshima, M., K. Shimizu, Yoshikura, H. Detection of 5' side subgenome of hepatitis C virus terminating at nucleotide 384 in patients' plasma and liver tissues. *J. Viral Hepatitis* 13: 746-755, 2006.
- 8) Rulli, S.J., Jr., Muriaux, D., Nagashima, K., Mirro, J., Oshima, M., Baumann, J.G., Rein, A. Mutant murine leukemia virus Gag proteins lacking proline at the N-terminus of the capsid domain block infectivity in virions containing wild-type Gag. *Virology* 347: 364-371, 2006.
- 9) Ato, M., Maroof, A., Zubairi, S., Nakano, H., Kakiuchi, T., Kaye, P.M. Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice deficient in CCL19 and CCL21. *J. Immunol.* 176: 5486-5493, 2006.
- 10) Ozeki, Y., Tsutsui, H., Kawada, N., Suzuki, H., Kataoka, M., Kodama, T., Yano, I., Kaneda, K., Kobayashi, K. Macrophage scavenger receptor down-regulates

免疫部

mycobacterial cord factor-induced proinflammatory cytokine production by alveolar and hepatic macrophages. *Microb. Pathog.* 40: 171-176, 2006.

- 11) Fujiwara, N., Nakata, N., Maeda, S., Naka, T., Doe, M., Yano, I., Kobayashi, K. Structural characterization of a specific glycopeptidolipid containing a novel N-acyl-deoxy sugar from *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and genetic analysis of its glycosylation pathway. *J. Bacteriol.* 189: 1099-1108, 2007.
- 12) Takahashi, T., Nishizawa, Y., Hato, F., Shintaku, H., Maeda, N., Fujiwara, N., Inaba, M., Kobayashi, K., Kitagawa, S. 2007. Neutrophil-activating activity and platelet-activating factor synthesis in cytokine-stimulated endothelial cells: reduced activity in growth-arrested cells. *Microvasc. Res.* 73: 29-34, 2007.
- 13) Ohtaka-Maruyama, C., Miwa, A., Kawano, H., Kasai, M., Okado, H. Spatial and temporal expression of RP58, a novel zinc finger transcriptional repressor, in mouse brain. *J Comp Neurol.* 502: 1098-1108, 2007.
- 14) Tsunetsugu-Yokota, Y., Ato, M., Takahashi, Y., Hashimoto, S., Kaji, T., Kuraoka, M., Yamamoto, K., Mitsuki, Y., Yamamoto, T., Ohshima, M., Ohnishi, K., Takemori, T. Formalin-treated UV-inactivated SARS coronavirus vaccine retains its immunogenicity and promotes Th2-type immune responses. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 106-112, 2007.
- 15) Nagawa, F., Kishishita, N., Shimizu, K., Hirose, S., Miyoshi, M., Nezu, J., Nishimura, T., Nishizumi, H., Takahashi, Y., Hashimoto, S., Takeuchi, M., Miyajima, A., Takemori, T., Otsuka, A. J., Sakano, H. Antigen receptor genes of the agnathan lamprey are assembled by a process involving copy choice/template shift. *Nat. Immunol.* 8: 206-213, 2006.
- 16) Nakajima-Adachi, H., Ebihara, A., Kikuchi, A., Ishida, T., Sasaki, K., Hirano, K., Watanabe, H., Asai, K., Takahashi, Y., Kanamori, Y., Shimojo, N., Matsuda, H., Kohno, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S. Food antigen intake develops reversible enteropathy in T cell receptor transgenic mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117: 1125-1132, 2006

2. 和文発表

- 1) 阿戸 学：インフルエンザウイルス感染による末梢白血球減少の機序．*臨床免疫・アレルギー科* 46:208-213, 2006 .

- 2) 阿戸 学、小林和夫：結核の免疫．*呼吸器* 6 . 結核・非結核性抗酸菌症（露口泉夫 編）. *新しい診断と治療のABC 最新医学 別冊* .大阪:最新医学社 .55-63、2006 .
- 3) 小林和夫：感染症の現状と制圧戦略．*都市問題研究* 58 : 20-32、2006 .
- 4) 高橋宜聖：免疫記憶を担うリンパ球とその機能を操る分子メカニズム .*蛋白質・核酸・酵素* 52 : 31-36、2007 .
- 5) 高橋宜聖：抗体産生経路の多様性とその生理的意義 .*化学と生物* 45 : 27-33、2007 .

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) Kasai, M. Negative regulation of stem cell self-renewal and osteoblast formation. *Keystone Symposia Conference Stem Cell Interactions with their Microenvironmental Niche.* Keystone, Colorado, USA, March, 2007.

2. 国内学会

- 1) 光木裕也、大島正道、山本拓也、高木弘隆、森川 茂、山岡昇司、永井美之、大西和夫、横田（恒次）恭子：SARS-CoV spike に対する中和抗体のエスケープ変異ウイルスの単離と感染防御に重要な抗体エピソードの同定．第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月、名古屋 .
- 2) 水越文徳、山本拓也、光木裕也、立川(川名)愛、横田（恒次）恭子：抗原の糖鎖による樹状細胞の cross-presentation の影響 .第 36 回日本免疫学会総会、2006 年 12 月、大阪 .
- 3) 大原直也：細菌による破骨細胞分化の制御．ワークショップ骨と感染症研究の新展開 .第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪 .
- 4) 内藤真理子、大原直也、庄子幹郎、中山恵介、吉村文信、林 哲也、中山浩次：*Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 株の全ゲノム塩基配列決定 .第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪 .
- 5) 近藤好夫、吉村満美子、大原直也、庄子幹郎、雪竹英治、内藤真理子、藤原 卓、中山浩次：*Porphyromonas gingivalis* の TPR ドメイン蛋白質欠損株の解析 .第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪 .
- 6) 菊池有一郎、大原直也、上田青海、平井 要、柴田幸永、中山浩次、藤村節夫：*Porphyromonas gingivalis*

免疫部

- ECF シグマ因子群の遺伝子挿入変異株の作製 . 第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪 .
- 7) 藤原永年、中田 登、前田伸司、中 崇、矢野郁也、小林和夫 : 2007 . *Mycobacterium intracellulare* serotype 16 由来特異糖ペプチド脂質の糖鎖構造と合成遺伝子の解析 . 第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪 .
- 8) 松本壮吉、奥山めぐみ、尾関百合子、内藤真理子、西内由紀子、藤原永年、吉村満美子、和田崇之、小林和夫 : 結核菌の細胞壁合成における mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の役割 . 第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪 .
- 9) 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、菅原 勇、青木俊明、和田崇之、西内由紀子、小林和夫、松本壮吉 : 2007 . 抗酸菌の増殖に対するヒアルロン酸の作用 . 第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪 .
- 10) 奥山めぐみ、川崎昌則、松本 真、小林和夫、松本壮吉 : 新規抗結核薬 OPC-67683 の抗菌活性に関わる分子同定の試み . 第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪 .
- 11) 仁木 誠、吉村満美子、和田崇之、小林和夫、松本壮吉 : 休眠期抗酸菌の薬剤抵抗性における MDP1 の役割 . 第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪 .
- 12) 尾関百合子、小林和夫、松本壮吉 : 2007 . BCG 感染における STAT6 の役割 . 第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪 .
- 13) 岡部真裕子 : べん毛輸送装置タンパク質 FliH の N 末側領域による ATPase 活性調節機構 . 第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月、大阪 .
- 14) 岡部真裕子、南野 徹、難波啓一、May Kihara . : N-terminal region of the flagellar type III protein export ATPase FliH regulates its ATPase activity . 2006 年度べん毛研究交流会 . 2007 年 3 月、広島 .
- 15) 阿戸 学、Maroof A.、Zubairi S.、中野英樹、垣内史堂、Kaye P.M. : *Leishmania donovani* 感染感受性マウスにおける IL-10 産生 T 細胞の誘導 . 第 75 回日本寄生虫学会大会、2006 年 4 月、弘前 .
- 16) Okado H, Ohtaka-maruyama C, Miwa A, Kawano H, Kasai M. Cell death and synuclein expression in the embryonic mouse cerebral cortex "Cell cycle-based unifying approach for neurodegeneration and cancer" The 29th Annual Meeting of Japan Neuroscience Society , Kyoto, July 2006.
- 17) 大西和夫、山口沙由里 : BILL カドヘリン(cadherin-17) 遺伝子欠損マウスにおけるプリオン病発症遅延(II) . 第 28 回日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006 年 12 月、名古屋 .
- 18) 大西和夫、藤本浩文 : Homology modeling and molecular dynamics simulation of preB cell receptor. 第 36 回日本免疫学会総会、2006 年 12 月、大阪 .
- 19) 加地友弘、高橋宜聖、橋本修一、竹森利忠 : Pathways for memory B cells. 第 36 回日本免疫学会総会、2006 年 12 月、大阪 .
- 20) 梅田幸子、明間洋子、倉岡雅征、山田潔、橋口昌章、勢涉、高橋宜聖、戸塚護、高津聖志、上野川修一、佐藤隆一郎、八村敏志 : CD3-IL-2R+ Peyer's patch cells respond to poly I:C stimuli and secrete IL-5 . 第 36 回日本免疫学会総会、2006 年 12 月、大阪 .
- 21) 柳橋 努、細野 朗、津田真人、八村敏志、高橋宜聖、平山和宏、伊藤喜久治、高橋恭子、上野川修一 : 無菌・コンベンショナルマウスの比較による大腸部位における IgA 産生に腸内細菌が与える影響について . 第 2 回日本食品免疫学会、2006 年 10 月、東京 .