

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670505

研究課題名(和文)らい菌の鼻粘膜上皮細胞への侵入に係る分子機構を標的とした感染防御ワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of Vaccine for Hansen's Disease-Targeting the M. leprae Molecular Mechanism for Entry into Nasal Mucosal Epithelial Cells

研究代表者

藤村 響男(Fujimura, Takao)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：50209087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：らい菌の鼻粘膜細胞への侵入ペプチドの各部位を標的とした各種抗体を用いて侵入抑制効果を検討した。らい菌の鼻粘膜上皮細胞に対する侵入活性領域を4分割して、夫々の領域に対する高度免疫血清を作製した。抗体処理による鼻粘膜細胞に対する侵入能の変化をらい菌の全侵入活性領域(106-177アミノ酸)を外膜表示した組み換え大腸菌を用いてコロニーカウント法により検討した結果、106-129A.A.および130-151A.A.を免疫原に作製した高度免疫血清に強い侵入抑制効果が認められた。らい菌を用いた侵入抑制実験においても130-151A.A.領域に対する抗体に、侵入抑制効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：We aim at investigating the invasion suppressing effect of various antibodies targeted against different regions of the M. leprae's peptide for the nasal mucosal membrane invasion. 316-532bp (106-177A.A.) are considered to be the invasion-active region. This region was further divided into four sub-regions: 106-129A.A., 130-151A.A., 152-162A.A., and 163-177A.A.. A hyperimmune antisera was prepared for each of these sub-regions. Recombinant E. coli expressing the entire region including 130-151 amino acids in the M. leprae mce1A locus, that is, 106-177 amino acids, were used to observe any changes in the M. leprae's ability to enter the nasal membrane cells, where changes were caused by the treatment with antibodies. The observation revealed that the hyperimmune antisera prepared using 106-129A.A. and 130-151A.A. as immunogen had a strong invasion suppression effect. The hyperimmune antisera prepared with 152-162A.A. as immunogen did not show any invasion suppression effect.

研究分野：皮膚免疫学 細菌学

キーワード：らい菌 ワクチン 抗mec抗体 mce蛋白 らい菌侵入抑制 侵入蛋白

## 1. 研究開始当初の背景

ハンセン病は、*Mycobacterium leprae* (らい菌) の感染により、皮膚、末梢神経が冒される皮膚科領域の慢性感染症である。現在日本におけるハンセン病の新患発症数は年間数名程度であるが、世界的には依然として毎年25万人が発症しており、有効な感染防御ワクチンの開発が望まれている。ハンセン病の原因菌であるらい菌は、体内に侵入後、マクロファージに貪食された後もマクロファージ内の殺菌機構に抵抗し、マクロファージ内で生存、増殖する事から結核菌や赤痢菌、サルモネラ菌と同様に、細胞内寄生菌に分類されている。これら細胞内寄生菌に対する感染抵抗性は、細胞性免疫によって誘導されることが明らかとなっている。しかし、これら細胞内寄生菌に対する細胞性免疫は、生菌免疫(生菌の感染)によってのみ誘導され、死菌や菌体成分では誘導されないため、現時点では細胞内寄生菌に対する真に有効な感染防御ワクチンは存在しない。

本研究は、細胞性免疫を誘導できないのであれば、らい菌の体内への侵入経路である鼻粘膜細胞への侵入に係る分子機構をターゲットとして、菌の侵入自体を阻止しようとするもので極めて斬新な試みである。病原微生物の侵入自体を阻止しようとする試みは、細胞への侵入機構が比較的単純なウイルス感染症で粘膜型ワクチンとして実用化されつつあるが、複雑な侵入機構を有する細菌感染症においては試みられていない。

## 2. 研究の目的

らい菌の人工培養法が確立されていないことが研究の妨げとなり、らい菌の感染様式は解明されないままに隔離政策を経て現在に至った。体内に侵入したらい菌は、末梢神経周囲に存在するシュワン細胞へ laminin-2 及び  $\alpha$ -dystroglycan を介して侵入<sup>1-4</sup>し、

増殖することまでは明らかにされているが、シュワン細胞に到達するまでの過程、即ち、らい菌の感染様式に関しては不明であった。1993年、Lee W. Riley らは、結核菌の病原性因子の研究から、結核菌の上皮系細胞への侵入に係わる mce1 遺伝子を同定し、mce1 を大腸菌にリコンビナント発現させる事で本来上皮系細胞への侵入能を持たない大腸菌に侵入能を賦与できることを示した<sup>5</sup>。我々は Lee W. Riley との共同研究において、らい菌に結核菌の mce1 遺伝子と非常に相同性の高い領域が存在する事を見出し、らい菌に発現する上皮系細胞への侵入蛋白のリコンビナント発現と機能解析を行い、らい菌 mce1A 蛋白の上皮系細胞への侵入活性は、mce1A ローカス中の 130-151 アミノ酸に依存することを明らかにした(平成15年度-18年度、基盤研究C:藤村響男『らい菌に発現する上皮系細胞への侵入蛋白のリコンビナント発現と機能解析』)。

本研究の目的は、これらを踏まえ、本研究をハンセン病の感染予防およびワクチン開発への基礎的検討の最終段階と位置づけ、実用化に向けてらい菌の鼻粘膜細胞への侵入ペプチドの各部位を標的とした各種抗体を用いて侵入抑制効果を検討するところにある。

らい菌の全ゲノム解析の結果、蛋白をコードする 1604 の遺伝子中、実に 1116 の遺伝子が偽遺伝子となっていることが明らかとなった。類似の侵入蛋白(mce 蛋白)を有する結核菌は、91%の遺伝子が機能しており、侵入に係る複数の蛋白の発現が知られているが、らい菌の場合は、現時点では本研究がターゲットとしている mce 蛋白がメジャーな侵入蛋白と考えられることから十分チャレンジする価値のある研究といえる。

## 3. 研究の方法

(1) これまでの研究結果から想定された侵入活性領域(316~532bpの領域)を図1の如く 316-387bp(106-129A.A.), 388-453bp

(130-151A. A.), 454-486bp (152-162A. A.), および 487-532bp(163-177A. A.)に4分割して、夫々の領域に対する高度免疫血清を作製する。

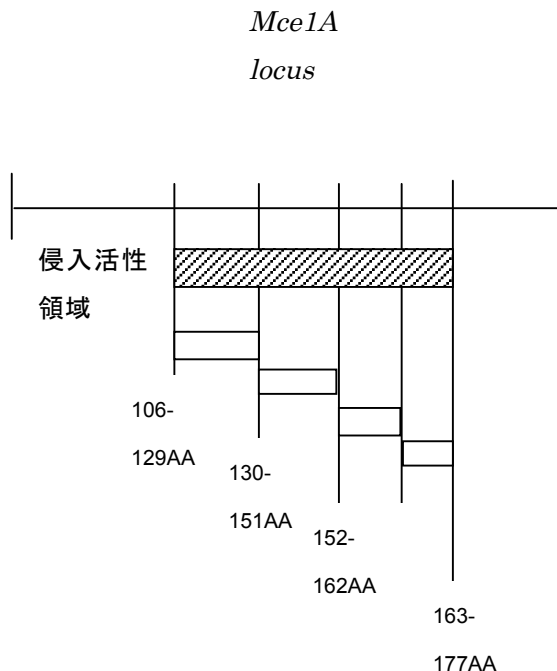


図1 侵入活性領域の分割

(2) 抗体処理による鼻粘膜細胞に対する侵入能の変化をらい菌 *mce1A* ローカス中の130-151 アミノ酸 (*mce1A* 蛋白の最小活性領域) を含む全領域(106-177 アミノ酸)を外膜表示した組み換え大腸菌を用いてコロニーカウント法により検討する。

(3) これらの結果を基に最終年度は、実際にらい菌を用いた侵入抑制実験を行なう。

#### 4. 研究成果

(1) 侵入活性領域 (316~532bp の領域) を 316-387bp (106-129A. A.), 388-453bp (130-151A. A.), 454-486bp (152-162A. A.), および 487-532bp(163-177A. A.)に4分割して、キャリア蛋白を付加した夫々の合成ペプチドを作製し、免疫原とした。常法に従いウサギに免疫し、高度免疫血清を得た。高度免疫血清は、ディープフリーザー内に保管して実験に用いたが、最終年度の夏期休暇中にフリーザーの故障により力価が低下し、最終年度

の後半に再度作製し直すこととなった。

(2) 得られた高度免疫血清と、全侵入領域を外膜表示した組み換え大腸菌を用いて侵入抑制効果をコロニーカウント法により検討した結果、106-129A. A. および 130-151A. A. を免疫原に作製した高度免疫血清に強い侵入抑制効果が認められることが明らかとなった。152-162A. A. を免疫原に作製した高度免疫血清には侵入抑制効果は認められず、163-177A. A. を免疫原に作製した高度免疫血清には弱い侵入抑制効果が認められた。

(3) これらの結果を基に最終年度に、実際にらい菌と、再度作製した一部の高度免疫血清を用いて侵入抑制実験を行った。単層に培養した鼻粘膜上皮細胞に、130-151A. A. 領域に対する抗体で前処理したらい菌を加えて 30℃で一晩培養した。コントロールとして、正常 Rabbit IgG で前処理したらい菌を同様に接種し、培養した。細胞を回収して、電子顕微鏡を用いてらい菌の細胞内への侵入を観察した結果、130-151A. A. 領域に対する抗体で前処理したらい菌は、正常 Rabbit IgG で前処理したらい菌と比較して、鼻粘膜上皮細胞への侵入が抑制されている様に見えた。現在引き続き、残り3領域に対する検討と共焦点レーザー顕微鏡を用いた定量解析を行っている。

実験材料保管用の冷凍庫の故障により研究に遅れが生じたため、研究期間内に最終的な結論を出すに至らなかったが、らい菌の侵入因子を抑制して侵入活性の変化を検討した研究は、世界的にも本研究以外見当たらないことから極めて挑戦的かつ萌芽的研究であったといえる。今後も研究を継続し、最終結果を学会及び専門誌等に報告する予定である。

#### <引用文献>

1. Rambukkana, A., Salzer, J. L., Yurchenco, P. D., Tuomanen, E. I. Natural targeting of

*Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of laminin- $\alpha$ 2 chain. *Cell*. **88**; (1997)811-821.

2. Rambukkana, A., Yamada, H., Zanazzi, G., Mathus, T., Salzer, J. L., Yurchenco, P. D., Campbell, K. P., Fischetti, V. A. Role of  $\alpha$ -dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* **282**; (1998)2076-2079.

3. Shimoji, Y., Ng, V., Matsumura, K., Fischetti, V. A., Rambukkana, A. A 21kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**; (1999)9857-9862.

4. Ng, V., Zanazzi, G., Timpl, R., Talts, J. F., Salzer, J. L., Brennan, P. J., Rambukkana, A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*. **103**; (2000) 511-524.

5. Arruda, S., Bomfim, G., Knights, R., Huima-Byron, T., Riley, L. W. Cloning of an M. tuberculosis DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science* **261**; (1993) 1454-1457.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

①Viesta Fadlitha Beby, Naoya Sato, Irfan Idris, Fatul Rachman, Takao Fujimura, Hiroaki Takimoto .

Unique regions in the *M. leprae* Mce1A protein associated with the initial transmission of leprosy.

第89回日本細菌学会総会、2016年3月24日、大阪国際交流センター、大阪府大阪市

②Haslindah Dahlan, Naoya Sato, Viesta Fadlitha Beby, Hiroaki Tamkimoto, Takao Fujimura.

The nasal epithelial cell invasion of *Mycobacterium leprae* may depend on unique amino acid residues within the Mce1A protein.

第43回日本免疫学会総会学術集会、2014年12月13日、国立京都国際会館、京都府京都市

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称：らい菌による感染症を予防又は治療するためのワクチン、抗体及び医薬

発明者：藤村 響男

権利者：学校法人北里研究所

種類：特許

番号：第5685562号

取得年月日：平成27年1月23日

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤村 響男 (FUJIMURA Takao)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：50209087

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

佐藤 直哉 (SATO Naoya)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50276119

##### (4) 研究協力者

ダハラン ハスリンダ

(DAHLAN Haslindah)

フィスタ ファドリータ ベビ

(Viesta fadlitha beby)

イドリス イルファン

(IDRIS Irfan)

ファトゥーラヒマン

(Fatulrachman)