

医研第310号

(別紙様式第3号)

## 論 文 要 旨

### 論 文 題 目

Mucosal immunization with recombinant heparin-binding haemagglutinin  
adhesin suppresses extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium bovis*  
bacillus Calmette-Guerin (BCG) in infected mice

(遺伝子組み換え HBHA による粘膜免疫はマウス BCG 肺感染後の肺外への播種を  
抑制した)

氏名 小濱 秀泰 

## 論 文 要 旨

【 目 的 】 *Mycobacterium tuberculosis* ( *Mtb* ) と *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin ( BCG ) の 表 層 蛋 白 質 の ひ と つ で あ る Heparin-binding haemagglutinin adhesin ( HBHA ) は 、 約 28 kDa の レ ク チ ン 様 因 子 で あ り 、 赤 血 球 凝 集 能 を も つ こ と が 知 ら れ て い る 。 こ の HBHA は 、 *Mtb* や BCG と 宿 主 肺 上 皮 細 胞 と の 接 着 に 関 与 し て お り 、 菌 の 肺 か ら 他 の 組 織 へ の 播 種 に 重 要 で あ る こ と が 示 さ れ て い る 。 今 回 、 我 々 は 結 核 に 対 す る 粘 膜 ワ ク チ ン の 候 補 抗 原 と し て HBHA を 選 択 し 、 酵 母 *Pichia pastoris* ( *P. pastoris* ) に よ り 作 成 し た 遺 伝 子 組 換 え ( r ) HBHA の 経 鼻 免 疫 に よ る 感 染 防 御 機 能 誘 導 を 解 析 し た 。

【 方 法 】 BCG の ゲ ノ ム DNA か ら HBHA 遺 伝 子 を ク ロ ー ニ ン グ し た 後 、 *P. pastoris* 発 現 ベ ク タ ー に 導 入 し 、 rHBHA を 分 泌 発 現 さ せ た 。 こ の 培 養 上 清 よ り 精 製 し た rHBHA を BALB/c マ ウ ス に 単 独 、 あ る い は 粘 膜 ア ジ ュ バ ン ト で

あるコレラ毒素（CT）と混合（rHBHA/CT）して、一週間間隔で計5回経鼻投与し、その1週間後にBCGを経鼻感染させてHBHA特異的免疫応答及び各臓器の菌数を解析した。

【結果】 rHBHAの生化学的性状を解析した結果、*Mtb*由来のHBHA同様に、ヘパリン結合能を示す蛋白であることが判明した。

rHBHA/CT 経鼻投与では、BCGを認識するHBHA特異的IgG抗体が血中及び肺洗浄液中に、特異的IgA抗体が鼻腔洗浄液中に検出された。rHBHA/CT 経鼻投与マウスにBCGを経鼻接種すると、感染2週目の脾臓内菌数が非免疫群およびrHBHA単独投与群に比べ有意に減少した。また、rHBHA/CT 群では肺及び肺所属リンパ節T細胞のPPD特異的増殖反応とInterferon (IFN)- $\gamma$  産生の増強が確認された。しかし、rHBHA単独経鼻投与群では、以上の特異的免疫応答や菌数の減少は認められなかった。一方、rHBHA/CT 投与群では、肺におけるIFN- $\gamma$  産生増強にも係らず、肺

内菌数の減少は認められなかった。これらの結果は、rHBHAによる経鼻ワクチンが、抗HBHA抗体の誘導により肺感染初期の菌播種を抑制できるが、肺での菌の排除を増強するためには十分な局所防御免疫を惹起していないことを示している。以上の結果から、HBHAを用いた粘膜免疫が菌の播種を抑制する新しいタイプのワクチンとなる可能性が示された。

(別紙様式第 7 号)

## 論文審査結果の要旨

|   |              |         |          |          |
|---|--------------|---------|----------|----------|
| 報告番号  | * 課程博<br>論文博 | 第 号     | 氏 名      | 小 濱 秀 泰  |
| 論文審査委員  |              | 審 査 日   | 平 成 20 年 | 1 月 23 日 |
|   |              | 主 査 教 授 | 渡 部 久 実  |          |
|   |              | 副 査 教 授 | 藤 田 次 郎  |          |
|   |              | 副 査 教 授 | 陣 野 吉 廣  |          |
| ( 論 文 題 目 ) Mucosal immunization with recombinant heparin-binding haemagglutinin adhesin suppresses extrapulmonary dissemination of <i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guerin (BCG) in infected mice  |              |         |          |          |
| (論文審査結果の要旨)   |              |         |          |          |
| 1. 研究の目的と背景：<br><i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb)と <i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guérin (BCG) の表層蛋白質の一つである Heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) は、約 28 kDa のレクチン様因子であり、赤血球凝集能をもつことが知られている。この HBHA は、Mtb や BCG と宿主肺上皮細胞との接着に関与しており、菌の肺から他の組織への播種に重要であることが示されている。本研究では結核に対する粘膜ワクチンの候補抗原として HBHA を選択し、酵母 <i>Pichia pastoris</i> により作成した遺伝子組換え(r)HBHA の経鼻免疫による感染防御機能誘導を解析した。  |              |         |          |          |
| 2. 研究内容<br>BCG のゲノム DNA から HBHA 遺伝子をクローニングした後、 <i>P. pastoris</i> 発現ベクターに導入し、rHBHA を分泌発現させた。この培養上清より精製した rHBHA を BALB/c マウスに単独、あるいは粘膜アジュバントであるコレラ毒素 (CT) と混合(rHBHA/CT)して、一週間間隔で計 5 回経鼻投与して免疫し、その 1 週間後に BCG を経鼻感染させて HBHA 特異的免疫応答及び各臓器の菌数を解析した。   |              |         |          |          |
| 3. 研究の成果の意義と学術的水準<br><i>P. pastoris</i> で作成した rHBHA は、 <i>Mycobacterium</i> 由来の HBHA 同様にヘパリン結合能を示した。rHBHA/CT 経鼻免疫により、HBHA 特異的 IgG 抗体が血中及び肺洗浄液中に、特異的 IgA 抗体が鼻腔洗浄液中に検出された。経鼻免疫マウスに BCG を経鼻接種すると、rHBHA/CT 経鼻投与マウスでは、非免疫群および rHBHA 単独投与群に比べ、感染 2 週目の脾臓内菌数が有意に低下しており、肺及び肺所属リンパ節 T 細胞の PPD 特異的増殖反応と interferon (IFN)- $\gamma$ 産生の増強も確認された。一方、rHBHA/CT 投与群では、肺における IFN- $\gamma$ 産生増強にも係らず、肺内菌数の減少は認められなかった。以上の結果から、rHBHA/CT による経鼻ワクチンが抗 HBHA 抗体の誘導により <i>Mycobacterium</i> 肺感染初期の菌播種を抑制するが、肺での菌の排除に十分な局所防御免疫は誘導できなかったことが示唆され、HBHA を用いた粘膜免疫が菌の播種を抑制する新しいタイプのワクチンとなる可能性が考えられた。 |              |         |          |          |
| 以上の結果から、本論文は学位授与に十分値するものと判断した。  |              |         |          |          |

- 備 考 1 用紙の規格は、A 4 とし縦にして左横書きとすること。  
2 要旨は 800 字～1200 字以内にまとめること。  
3 \*印は記入しないこと。