

- 162 [2] Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel  
163 coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N*  
164 *Engl J Med* 2003;348(20):1967-76. 175
- 165 [3] Peiris JS, Yuen KY, Osterhaus AD, Stohr K. The severe acute respi-  
166 ratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;349(25):2431-41. 176
- 167 [4] Tanaka F, Abe M, Akiyoshi T, et al. The anti-human tumor effect and  
168 generation of human cytotoxic T cells in SCID mice given human pe-  
169 ripheral blood lymphocytes by the in vivo transfer of the Interleukin-6  
170 gene using adenovirus vector. *Cancer Res* 1997;57(7):1335-43. 177
- 171 [5] Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, Yamamura Y, Kishimoto T.  
172 Establishment and characterization of human T hybrid cells se-  
173 creting immunoregulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*  
174 1981;78(12):7717-21. 178
- [6] deMello DE, Mahmoud S, Padfield PJ, Hoffmann JW. Generation of  
an immortal differentiated lung type-II epithelial cell line from the  
adult H-2K(b)tsA58 transgenic mouse. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*  
2000;36(6):374-82. 179
- [7] Gao W, Tamin A, Soloff A, et al. Effects of a SARS-associated coro-  
navirus vaccine in monkeys. *Lancet* 2003;362(9399):1895-6. 180
- [8] Yang ZY, Kong WP, Huang Y, et al. A DNA vaccine induces SARS  
coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature*  
2004;428(6982):561-4. 181
- [9] Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting en-  
zyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*  
2003;426(6965):450-4. 182  
183  
184  
185  
186

## 第79回総会シンポジウム

## II. 結核基礎研究の最前線

座長 <sup>1</sup>光山 正雄 <sup>2</sup>小林 和夫

キーワード：結核，結核菌，基礎研究

シンポジスト：

1. 抗酸菌菌体構成高分子の構造解析と生物活性  
藤田由希子, \*矢野郁也 (日本 BCG 製造株式会社  
中央研究所)
2. 結核菌潜伏感染の分子機構と新規治療戦略  
松本壮吉 (大阪市立大学大学院医学研究科感染防  
御学)
3. 結核の病態と感染防御における各種サイトカインの  
意義  
川上和義 (琉球大学大学院医学研究科感染病態制  
御学講座分子病態感染症学分野)
4. 結核菌による Th1 サイトカイン誘導の意義と責任分  
子  
河村伊久雄 (京都大学大学院医学研究科微生物感  
染症学)
5. 新たな抗結核ワクチンの作製と評価  
岡田全司 (独立行政法人国立病院機構近畿中央胸  
部疾患センター臨床研究センター結核研究部)

ここ20年程の結核基礎研究を眺めてみると、免疫応答機構、結核菌の抗原や活性リガンドの同定、薬剤耐性の分子遺伝学的機構解明などに多くの進歩がみられ、さらにゲノムプロジェクトによって人型菌 H37Rv 株の全ゲノムが解明されてきている。結核菌全ゲノム配列解明は、これまで足踏み状態にあった病原因子の分子遺伝学的解析に新たなインパクトを与えたが、わが国ではその研究は少なく、より多くの研究者の参画が期待される。現有の抗結核薬が近い将来遭遇するかもしれない高度耐性菌の蔓延や compromised host のさらなる増加による集団としての感受性の低下などの可能性を想定すれば、結

核菌の病原性とそれによる病態のメカニズムの解明と、それを基盤とした新たなワクチン開発や新規免疫療法の開発が改めて要請されている。

本シンポジウムでは、わが国における数多くない結核基礎研究者から代表的な方々を選び、現時点で重要なテーマ別に cutting edge をお話しいただき、理解を深めることを目的とした。結核菌細胞壁には他の細菌にはみられない脂質や糖脂質が存在し、結核菌の特有な性格と強い免疫刺激活性を規定しており、病態の理解と感染の診断のいずれにも重要である。その構造と活性の解析における新たな進展、その診断への応用について、矢野郁也氏 (日本 BCG 研) にまとめていただいた。結核菌の遺伝子には、マクロファージ内での殺菌回避と細胞内持続感染、きわめて遅い発育などを規定するものが多数存在すると思われ、それらが特有の感染のみならず、臨床的な休眠状態にも関与する可能性がある。松本壮吉氏 (大阪市立大) には氏が単離した MDP1 の知見を中心に新規病原因子候補遺伝子に関する研究の進展をお話しいただいた。臨床家である川上和義氏 (琉球大) には、各種サイトカインのうちとくに Th1 サイトカインの病態や防御における役割について、マウスでの詳細な実験成績に基づいて臨床での知見への関連を議論いただいた。結核菌に対して誘導される強い Th1 依存型免疫応答には、結核菌リガンドに対する宿主 TLR を介した Th1 サイトカイン応答が必須と考えられるが、そのメカニズムと結核菌側の責任分子について河村伊久雄氏 (京都大) に解析の現状をまとめていただいた。結核の防御免疫誘導には、現在の BCG よりもはるかに安全性と有効性に優れた候補ワクチンの開発が求められている。わが国でも多くのリコンビナント BCG ワクチンや DNA ワクチンが開発さ

<sup>1</sup>京都大学大学院医学研究科微生物感染症学, <sup>2</sup>大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学

連絡先：光山正雄，京都大学大学院医学研究科微生物感染症学，〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町  
(E-mail: mituyama@mb.med.kyoto-u.ac.jp)  
(Received 15 Jul. 2004)

れ、一部はサルでの投与感染実験が実施されている。岡田全司氏（近畿中央病院）にはわが国における多数の候

補ワクチンの開発とその評価の現状をまとめていただいた。

## 1. 抗酸菌菌体構成高分子の構造解析と生物活性

日本 BCG 製造株式会社中央研究所 藤田由希子, 矢野 郁也

結核菌をはじめとする抗酸菌の大きな特徴は、細胞壁に多量のワックス様高分子脂質を含み、これらが菌表層の疎水性や抗酸性に寄与し、宿主体内外における長期間の菌自身の生存を可能にしている点である。宿主に対しては、細胞壁脂質やタンパク抗原の多くが、感染初期に自然免疫を介して生体防御機能を果たす一方で、過剰な免疫反応で肉芽腫形成や空洞化にも関わり、“双刃の剣”的な性質を示す。これらの表層成分は、一般に疎水性の強い脂質分子であるために親水性の生体反応とはなじみ難いものであり、従って長年の研究にもかかわらず、構造活性相関は十分解明されていなかった。最近、新しい質量分析法や NMR 等を駆使して網羅的にプロテオームやリポドーム解析が可能となり、また一方で新しい免疫学的視点から、これらの菌体成分の宿主への作用機作を明らかにし、診断薬抗原やワクチン開発を目指すことにより、結核研究の発展に“breakthrough”を与える可能性も現れてきた。結核菌細胞壁成分を中心に、最近の知見を紹介する。

〈Cord factor (trehalose dimycolate, TDM)〉

結核菌病原因子として最も早くから知られた糖脂質であるが、非病原性抗酸菌にも広く分布し、単独で肉芽腫形成能があり、抗腫瘍性、Th-1 アジュバント活性がある。NK 細胞活性化による IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  産生を示す。TDM 以外に trehalose monomycolate (TMM), -trimycolate (TTM) 等が存在し、TOF MASS 分析では 1600 前後 (TMM) から 2800 前後 (TDM) の分子量の多数の分子種が検出される。構成ミコール酸は菌種により異なり、宿主の樹状細胞の CD1 抗原提示分子により抗原として提示される。結核患者中には、ミコール酸を認識する抗 TDM 抗体が高頻度で検出される。

従来、ミコール酸を含む TDM や TMM の免疫薬理学的生物活性は、これらを構成するミコール酸の鎖長が長いほど活性が高く毒性も強いとされてきたが、最近の研究では、ミコール酸の構造のわずかの違いが菌の表層の性質にも影響し、例えばシクロプロパン環の含量が低いほど抗酸性が低下したり、コード形成が弱くなり、一方ワックスエステルミコール酸を含む極性の高い TDM は、結核菌 TDM より強力な播種性肉芽腫を形成することが判ってきた。TDM や TMM はその含量が高いこと

からも、表層構成分子として菌種特異性が高いことから、感染防御免疫や抗腫瘍性生体防御分子としてはきわめて興味のある物質で、これらの構造・免疫活性相関の網羅的解析がのぞまれる<sup>1)~3)</sup>。

〈LAM (lipoarabinomannan), LM (lipomannan) および PIMx (phosphatidylinositol mannosides)〉

LAM と LM は抗酸菌表層の両親媒性物質で、PIM は core に相当する。近年病原因子としての性質と構造が次第に明らかにされ、T リンパ球の抑制、O<sub>2</sub> スカベンジャー活性、PL-fusion 阻害が報告される一方、TLR-2 依存的に NKT cell を活性化し、IL-8, TNF- $\alpha$  産生、肉芽腫形成を示す。LAM (MW 15000 ~ 45000), LM (MW 6000 ~ 8500) とも菌種により構造が異なり、従って活性にも差がある。グラム陰性細菌内毒素と似て、LAM や LM のアンカー部分 (PIM) に主要活性があり、特に Man 20 mer 近辺の LM の活性が目ざされている。BCG 菌では、parietal LAM と cellular LAM で PIM の脂質部分の構造が異なり、免疫学的活性 (IL-8 と TNF- $\alpha$  産生能) に差がある。抗 LAM 抗体や抗 PIM 抗体の検出も、結核の診断に用いられる。

LM や LAM も抗酸菌に広く分布する表層構成分子であり、抗酸菌共通の構造を有するものと菌種特異的な構造をもつものがあるが、最近 IL-12 産生やヒト由来食細胞に対する apoptosis 活性は LM に最も活性が強く、マンノースキャップを有する LAM には必ずしも強い活性があるとは言えないとされる。これらの成分は両親媒性物質のため、抽出・単離が容易でないことから活性構造相関の解明は遅れているが、生体防御調節物質としてはきわめて興味がある<sup>4)~6)</sup>。

〈Sulfolipids (2, 3, 6, 6'-tetraacyltrehalose 2'-sulfate, SL)〉

結核菌病原因子として TDM と協同して毒性を高める。貪食を促進する一方、PL-fusion を阻害し、細胞内寄生性を高める。SL-欠損株は、弱毒菌とする報告もある。

興味あることに、SL は TDM と同様 trehalose を構成糖とする糖脂質であるにもかかわらずミコール酸を含まず、硫酸基を有する酸性糖脂質であるが、マウスに対する致死毒性はない。TDM と同時に i.v. 投与すると肉芽腫形成を抑制し、体重減少も抑制する (毒性の中和; Yano

ら未発表)。SL自身には肉芽腫形成能はなく、しかもマクロファージの大部分の機能を阻害する点で、TDMとは異なる機構で病原性に寄与していると予想される<sup>9)</sup>。

(GPL (glycopeptidolipids) と PGL (phenolglycolipid))

GPLは *M. avium* complex に特徴的な血清型特異抗原で、lipopeptide core と糖鎖からなる。糖鎖は血清型特異的、core は共通抗原として MAC 症患者 IgG 抗体に認識され、診断抗原となる。PGL は *M. leprae*, *M. tuberculosis* の表層抗原で血清診断に有用であるが、いずれも構成糖は天然ではきわめてユニークな O-メチル化、N-アシル化、酸性糖を含み、構造は MS 分析により解明されつつある。ヒト末梢血では、PPD や抗 CD3<sup>+</sup> 抗体刺激によるリンパ球増殖抑制および IFN- $\gamma$  産生阻害がみられ、血清型により食食促進、PL-fusion 阻害を示す。

近年、MAC 菌感染による非結核性抗酸菌症が増加しているのみならず、AIDS 末期の CD4 リンパ球減少による免疫抑制患者にしばしば重篤な感染を引き起こすことや、結核との合併症が注目されており、MAC 症感染による免疫抑制が、MAC 菌菌体のどのような成分により引き起こされるのかは興味のある点である<sup>10)</sup>。

(CWS (cell wall skeleton))

抗酸菌細胞壁は、arabinogalactan mycolate を主体とする巨大分子で、PG と共有結合して安定な疎水性細胞壁を形成する。TDM や LAM と協同して、TLR-2 および -4 を介して自然免疫に基づく抗腫瘍性や免疫強化活性を示す。天然では特殊な ara-furanoside, gal-furanoside が存在し、末端 ara にミコール酸がエステル結合している。

CWS はこのように、PG と AG-mycolate を含む巨大分子で、糖・脂質・ペプチドを構成成分とする複合体であるために、その構造はなお完全に解明されたとは言い難い。特に CWS 刺激により複数の TLR を誘導することと、ミコール酸や PG 部分を除去すると、いずれも完全に免疫強化活性が失われることから、自然免疫強化活性の中心は親水性および疎水性部分の両方に存在することが予想され、ミコール酸の D-arabinose へのエステル化率は抗酸菌表層の疎水性の強さに反映しているものと考えられている<sup>10)</sup>。CWS 投与によるヒト単球細胞のサイトカイン mRNA 発現は、LPS 等と比べて著しく多様性とみ、抗酸菌感染とヒトの免疫反応における多様なシグナルの交換は、長年にわたる宿主・寄生体関係の進化を想像させる。抗酸菌の細胞壁骨格は、このように抗酸菌細胞の形態維持に役立っているだけでなく、宿主免疫反応や病原性の発現にも深く関わっていると考えられることから、分子進化論的に限りなく興味をそそる構築分子である<sup>11) 12)</sup>。

抗酸菌の病原性や免疫調節活性は、これら多彩な菌体

表層構築分子 (脂質とタンパク抗原) の総合的な働きによるものと考えられ、遺伝子解析後の課題として、新しい細胞壁分子構造の解析法と最新の免疫学的知見に基づく“対結核新戦略”の確立が期待される。

## 文 献

- 1) Noll H, Bloch H, Asselineau J, et al.: The chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biophys Biochim Acta*. 1956; 20: 299-309.
- 2) Ozeki Y, Kaneda K, Fujiwara N, et al.: *In vivo* induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6, 6'-dimycolate). *Inf Immun*. 1997; 65: 1793-1799.
- 3) Ryll R, Kumazawa Y, Yano I: Immunological Properties of Trehalose Dimycolate (Cord Factor) and Other Mycolic Acid-containing Glycolipids—A Review. *Microbiol Immunol*. 2001; 45 (12): 801-811.
- 4) Daffe M, Draper P: The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol*. 1998; 39: 131-203.
- 5) Chatterjee D, Khoo KH: Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology*. 1998; 8: 113-120.
- 6) Dao ON, Kremer L, Guerardel Y, et al.: *Mycobacterium tuberculosis* Lipomannan Induces Apoptosis and Interleukin-12 Production in Macrophages. *Inf Immun*. 2004; 72: 2064-2074.
- 7) Goren MB, Brokl O, Schaefer WB: Lipid of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: correlation of virulence with elaboration of sulfatides and strongly acidic lipid. *Inf Immun*. 1974; 9: 142-149.
- 8) Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, et al.: Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Inf Dis*. 1992; 165: 1082-1085.
- 9) Fukui J: Suppressive effect of glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium-intracellulare* complex serovar 4 and 16 on blastogenesis of human peripheral blood mononuclear cells. *Kekkaku*. 1998; 73: 5-12.
- 10) McNeil M, Daffe M, Brennan P: Location of the Mycolyl Ester Substituents in the cell walls of Mycobacteria. *J Biol Chem*. 1991; 266 (20): 13217-13223.
- 11) Hayashi A, Doi O, Azuma I, et al.: Immunofriendly use of BCG cell wall skeleton remarkably improves the survival rate of various cancer patients. *Proc Jpn Acad*. 1998; 74: 50-55.
- 12) Begum NA, Ishii K, Kurita-Taniguchi M, et al.: *Mycobacterium bovis* BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and c-DNA subtraction in human macrophages. *Inf Immun*. 2004; 72: 937-948.

## 2. 結核菌潜伏感染の分子機構と新規治療戦略

大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学 松本 壮吉

### 結核と潜伏感染

結核は結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) による慢性感染症であるが、菌の感染が成立し直ちに発症する一次結核は5%程度と稀で、多くは不顕性の経過をたどる。一般に、感染した菌は終生、生体から完全に排除されることはなく、一部は休眠菌となり、代謝の著しく低下した状態で生存し続けると考えられている。宿主の抵抗性が低下すると菌は再び増殖を始め、内因性再燃を引き起こす。これを二次結核と呼び、大部分の成人型肺結核はこの機序で発症する。現在、人類の32%に結核菌が潜伏感染しており、既感染の健康人で一生の間に約10%が発病に至る。

### 増殖の停止と抗酸菌の病原性

結核菌は、14時間あまりをかけて分裂するきわめて増殖の緩慢な菌である。抗酸菌属菌種中でも、ハンセン病の原因菌 *Mycobacterium leprae*、非結核性抗酸菌症の主要原因菌である *Mycobacterium avium-intracellulare* complex など、病原性抗酸菌は、ほとんどが遅発育性である。遅発育性と病原性の直接の関わりは明らかでないが、一つには、病原性抗酸菌が細胞内寄生性であり、増殖緩慢であるがゆえに長期の寄生が可能になると考えられる。急速に増殖すれば菌は宿主を殺し、結果として住処を失う。休眠はそのさいたる例で、代謝を著しく抑制することで、自身と感染宿主双方の生存を可能にする。

### 化学療法と休眠結核菌

抗微生物化学療法薬は病原微生物の代謝を阻害する。そのため代謝がきわめて低下した休眠菌に対しては効果が低い。世界保健機関 (WHO) は、標準抗結核化学療法として直接監視下短期化学療法 (DOTS) により、薬剤を6カ月間投与することを推奨している。DOTS戦略は一定の成果をあげているが、制圧に程遠いのが現状である。その原因は、ヒト免疫不全ウイルスとの重感染、薬剤耐性菌の出現、そして現在人類の32%に既感染している潜伏感染菌の存在である。WHOは、今後20年間に、2億人が結核を発病、7000万人が死亡すると予測し対策を喚起している。このように潜伏休眠菌対策はきわめて危急性が高い課題であるが、菌の休眠機構は不明で、効果的な化学療法は開発されていない。

### 結核菌の増殖を停止し得る分子

すべての細胞は、刺激に対して的確に反応し生存を維持している。そのため、例えば、ある転写因子を活性化して特定の遺伝子群を発現させる等、特異的な応答によ

り恒常性を維持している。私達は、結核菌の休眠機構を解明するため、“特異的”な遺伝子発現調節に関与するものではなく、あえて“非特異的”な核酸結合能を有する分子の存在に注目した。非特異的にすべての遺伝子に結合し転写を抑制する分子であれば、生理的環境下において凍結するように細胞全体の代謝を停止せしめ、しかも遺伝子であるDNAを損傷から守り得るのではないかとの考えによる。仮説に基づき私達は、非特異的核酸結合性蛋白質 *mycobacterial DNA-binding protein 1* (MDP1) を同定した。そしてMDP1に関して以下の事実を明らかにしてきた。

### MDP1の性状と菌の遅発育性および休眠

MDP1は、遅発育型抗酸菌の対数増殖期において7~10%を占め、定常期から衰退期にかけて細菌が増殖を停止した状態においては、さらにその含有量が増大する。速育型抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* では、対数増殖期には少量の発現しか見られないが、定常期から発現が顕著になる。つまり、抗酸菌のMDP1の含有量は、増殖速度と逆相関する。

MDP1のアミノ末端部位は大腸菌のヒストン様蛋白質HUと、カルボキシル末端部はヒトのヒストンH1とそれぞれ部分的相同性を有する。このことからMDP1は、一種のヒストン様蛋白質と考えられる。同様の構造を持つ分子は他菌種には見られないが、検討したすべての抗酸菌にはMDP1の発現が認められることから、抗酸菌特異的分子である。

局在：免疫電顕法により、細胞壁、核酸領域、リボソーム領域に反応が見られ、生化学的分析法により少なくとも50Sリボソームサブユニットに局在している。

試験管内で、DNA合成、RNA合成、蛋白質合成をいずれも強く阻害する。複製と転写阻害活性は核酸結合性に依存し、翻訳阻害は核酸結合性に依存しない。

MDP1を発現させることで、*M. smegmatis* や大腸菌は遅発育型菌に形質転換され、遅発育型菌 (BCG) に大量に発現させると菌は増殖を停止する。この活性に、2番目のアミノ酸アスパラギン酸は重要で、その変異により増殖抑制性は減衰する。

これらの知見から、MDP1が抗酸菌の細胞増殖を負に調節し、遅発育性や休眠状態の導入および維持に関与することが推測される。

### 抗酸菌表面のMDP1

MDP1はシグナルペプチドや膜貫通領域を有しない

が、細胞壁にも存在する。私達は、菌体表面のMDP1が菌の細胞侵入を促す接着分子として作用する可能性を検討した。その理由は、核酸結合性蛋白質であるMDP1が、構造類似性から宿主細胞表面の糖とも結合するのではないかと考えたからだ。細胞は細胞外マトリックスに表面を覆われている。グリコサミノグリカン(GAG)はムコ多糖ともよばれ、細胞外マトリックスの主成分である。それは、二糖の繰り返し構造からなり、構成糖の種類により、ヒアルロン酸(HA)、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸などがある。結核菌は、GAGを介して、特に非貪食性の上皮細胞に接着すると報告されている。結核気道系に最も多く存在するのは、非貪食性の肺胞上皮細胞である。肺胞上皮細胞は、結核菌に対する増殖抑制能および殺菌能に乏しく、これに菌が侵入することで、感染の成立が容易となる。また、肺胞上皮細胞への侵入は肺から他臓器への菌の伝播を促し、病気の重篤化を促進する。肺胞上皮細胞は、潜伏感染休眠菌の主要な潜伏細胞でもある。

#### MDP1は宿主細胞表面のGAGに結合する

われわれはまず、MDP1のヘパリン結合性をカラムにて解析した。MDP1は、リン酸緩衝液中でヘパリンを吸着したカラムに結合し、NaCl濃度1Mで溶出された。これは、MDP1がヘパリンに結合することを示唆した。次にMDP1と各種GAGの結合を、ピアコアバイオセンサーを用いて解析した。その結果、MDP1のヘパリン結合性が確認され、またさらに、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸AおよびC、HAに結合することが分かった。一方、結核菌の上皮細胞への侵入を阻害しない、アラビノース、トレハロースに対しては結合性を示さなかった。各種GAGとの結合定数は、 $10^{-8}$ ~ $10^{-12}$ Mで、強い結合性を有することが判明した。

#### MDP1は、A549ヒト肺胞上皮細胞株に接着する

MDP1を蛍光色素で標識し、それを用いてMDP1が肺胞上皮細胞に接着するかを狭焦点レーザー顕微鏡とFACScanを用いて観察した。A549ヒトII型肺胞上皮細胞株の培養液に、 $0.5\mu\text{M}$ となるようにMDP1を加え反応させた。添加後、30分後には、90%以上の細胞がMDP1陽性となり、60分後にはほとんどの細胞に結合し、反応は平衡に達した。この結果から、MDP1が、速やかに肺胞上皮細胞に結合することが判明した。

実際に、MDP1が上皮細胞表面のGAGを介して細胞に結合しているかを検討した。MDP1が細胞に結合する条件下において、ヘパリンやHAを加えると、濃度依存的に結合を阻害した。MDP1がGAGを介して細胞に結合することが示唆された。

MDP1が結合する細胞表面のGAGを特定するため、細胞を特異的GAG分解酵素で処理した後に、MDP1を

反応させ、MDP1-細胞間結合が減衰するか否かを検討した。HA特異的分解処理が、MDP1の結合をほぼ完全に阻害した。MDP1は細胞表面のHAを介して肺胞上皮細胞に接着することが明らかとなった。

#### MDP1はDNA結合領域でGAGと結合する

酵素抗体法を用いて、MDP1とGAGとの結合を検討した。その結果は、ピアコアバイオセンサーを用いた解析と一致し、MDP1はプレートに固相化したHA、コンドロイチン硫酸に結合した。そしてその結合は、外部からDNAを加えることでほぼ完全に阻害された。以上のことから、MDP1はDNA結合領域でGAGと結合することが示された。

上皮細胞への接着において、実際にMDP1がDNA結合サイトを介して結合するかを検討した。蛍光色素でラベルしたMDP1をA549細胞に加えると、2時間後には、95%以上の細胞がMDP1陽性となった。この系にプラスミドDNAを加えるとMDP1-A549細胞間結合が顕著に阻害された。このことから、MDP1はDNA結合領域で細胞表面のHAと結合することが示された。

#### MDP1-HA間結合は、抗酸菌の細胞への接着を促す

GFPを発現する組み換えBCG(GFP-BCG)を作成し、菌の細胞接着および侵入を共焦点レーザー顕微鏡にて可視化、また感染細胞の比率をFACScanを用いて算定する試験管内系を確立した。これを用いて、MDP1が実際に、菌の接着/侵入に関わるかを検討した。同定したMDP1-A549細胞間結合の阻害物質であるDNAや抗MDP1抗体、またMDP1のA549細胞上の標的であるHAの作用を検討した。その結果、DNA、抗MDP1抗体、HAを加えることで、いずれもBCG-A549細胞間の結合を阻害することが分かった。HAの阻害活性が、DNAや抗MDP1抗体よりも強いことから、BCGは、HAに対するMDP1以外の接着物質を有すると考えられる。また、*M. tuberculosis* H37Rv株について、同様の試験管内感染実験を行った結果、GFP-BCGを用いた場合と同様の結果を得た。上記の結果から、MDP1-HA間結合は、抗酸菌の細胞への接着を促すことが明らかとなった。

#### 菌-HA間結合と感染防御効果

肺において、菌-HA間結合阻害の抗酸菌感染に及ぼす影響を、動物モデルを用いて検討した。BCGをマウス気道内に注入し感染を成立させた。その際、HAの有無で肺への定着菌数に変化があるか検討した。感染2週後の感染菌数を算出した結果、陰性対照群では $40,875 \pm 16,585$ の集落形成単位の菌が検出されたのに対し、HA投与群では、 $5,960 \pm 4,530$ であった。HA-抗酸菌間結合阻害が、感染予防に有効であることが示された。

#### 結語および今後

結核菌は、人類の3分の1に一部休眠状態で既感染し

ている。既感染健常人の10%が再燃を引き起こし、今後20年間で7000万人が死亡すると推測されている。休眠菌に対する化学療法は限られており、休眠菌対策は、きわめて危急度が高い。しかし、休眠機構は不明である。結核発病予備群に対する対策を構築するため、メカニズムを知る必要がある。

われわれは、生理的環境において、凍結するように細胞全体の代謝を停止できるのは、すべての遺伝子に結合しうる分子ではないかとの発想から、結核菌の非特異的核酸結合性蛋白質(MDP1)を同定し解析してきた。この分子は、抗酸菌特異的ヒストン様蛋白質で、菌体内ではリボゾームや核酸に結合し、菌の増殖を停止させる活性を有していた。またわれわれは、MDP1は菌体表面にも存在し、菌の細胞接着/侵入に関わることを、その際の肺胞上皮細胞の標的はHAであることを明らかにした。休眠結核菌はマクロファージのみならず、非貪食性の肺胞上皮細胞や繊維芽細胞にも潜伏すると報告されてお

り、MDP1が初期感染のみならず、休眠菌の細胞接着/侵入に関わっていると推測される。このことは、HA-菌体間の結合を阻害する新たな治療法の創成が可能であることを示唆する。

MDP1は結核菌を、殺傷能力に劣る上皮細胞への侵入にうながす。それと同時に、菌体内では代謝を阻害し菌の増殖を抑制して菌/宿主両方の生存を確保するように思われる。そのようにして成立した潜伏感染巣が二次結核における主要な菌のリザーバーとなる可能性がある。今後さらにMDP1の活性を中心に休眠機構を探り、潜伏感染戦略の構築に繋げたい。

## 文 献

Aoki K, Matsumoto S, Kobayashi K, et al.: Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in Mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem.* in press, 2004.

### 3. 結核の病態と感染防御における各種サイトカインの意義

琉球大学大学院医学研究科感染病態制御学講座分子病態感染症学分野 川上 和義

結核菌に対する防御免疫の主体が細胞性免疫であることは周知の事実である。また、MosmannらによるTh1-Th2パラダイムの発見以来、細胞性免疫の分子基盤がTh1サイトカインであることも広くコンセンサスの得られているところである。しかしながら十数年前には、マウスと異なりヒトの結核防御免疫におけるIFN- $\gamma$ の役割が混沌としていた時期があった。一連の研究では、ヒト末梢血単球、あるいは*in vitro*で分化させたマクロファージを用いて結核菌に対する殺菌活性に対するIFN- $\gamma$ の影響が検討され、影響ないか、むしろこれを低下させるとの報告が相次いだ<sup>1)~3)</sup>。しかし近年になって、IFN- $\gamma$ 受容体遺伝子に変異を起こし、そのためにIFN- $\gamma$ がうまく作用しない症例が見出され、このような患者では抗酸菌感染に対する感受性がきわめて亢進していることが明らかにされてきた<sup>4)~6)</sup>。このことからIFN- $\gamma$ は、マウスのみならずヒトにおいても結核感染防御の中心的な役割を担うサイトカインであることが認識された。同様な現象は、IL-12受容体異常症の症例でも報告されている<sup>6)</sup>。

最近十数年の間に、4つのIFN- $\gamma$ 誘導性サイトカイン、すなわちIL-12、IL-18、IL-23、そしてIL-27が発見された。もともとNK細胞活性化因子として見出されたIL-12は、Th1細胞の分化誘導において必須なサイトカインであることが知られている<sup>7)</sup>。一方、IL-18はそれ自

体Th1細胞の分化を誘導し得ないが、IL-12と協調的に作用することでこの反応を飛躍的に亢進させることが報告された<sup>8)</sup>。しかし、条件によってはIL-18がTh2サイトカインの産生にも関与するとの報告もみられるようになり、その作用は当初考えられていたよりも複雑であることが予想されている。最近になって発見されたIL-23とIL-27は、IL-12と同様なヘテロダイマー構造をしている。IL-23はIL-12p40を共有し、IL-12p35とホモロジーを有するp19とヘテロダイマーを構成する<sup>9)</sup>。一方IL-27は、各々IL-12p40、p35とホモロジーを有するEBI3、p28によって構成されている。IL-23、IL-27は、各々メモリーT細胞およびナイーブT細胞に作用しIFN- $\gamma$ 産生を誘導する<sup>10)11)</sup>。その生物活性にはまだ不明な点も多く、結核防御免疫における意義については今後の解析を待ちたい。また、骨や腎臓の分野で研究されてきたオステオポンチン(OPN)がIL-12の産生誘導能を有するとの報告がなされ注目されている。OPN遺伝子欠損(KO)マウスを用いた検討ではBCGやリステリア感染の悪化が観察されている。

われわれは、遺伝子欠損マウスを用いて結核防御免疫における各種Th1関連サイトカインの役割を解析している。IFN- $\gamma$  KO (GKO) マウス、IFN- $\gamma$  誘導サイトカインの中でIL-12p40、IL-18遺伝子を単独(IL-12p40KO、IL-18KO)または同時に欠損(double KO:DKO)したマ

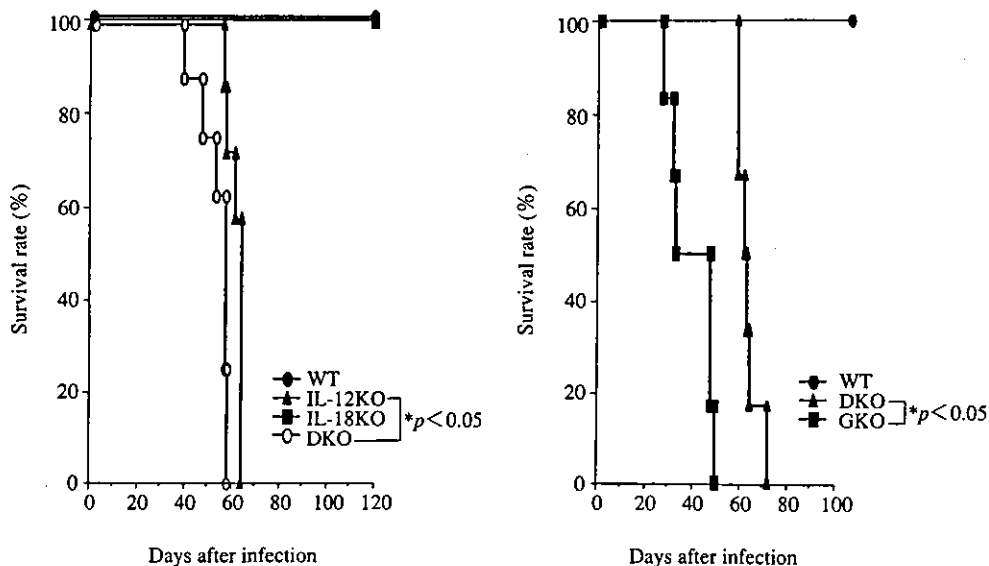


Fig. 1 Effect of Th1-related cytokine deficiency on *M. tuberculosis* infection

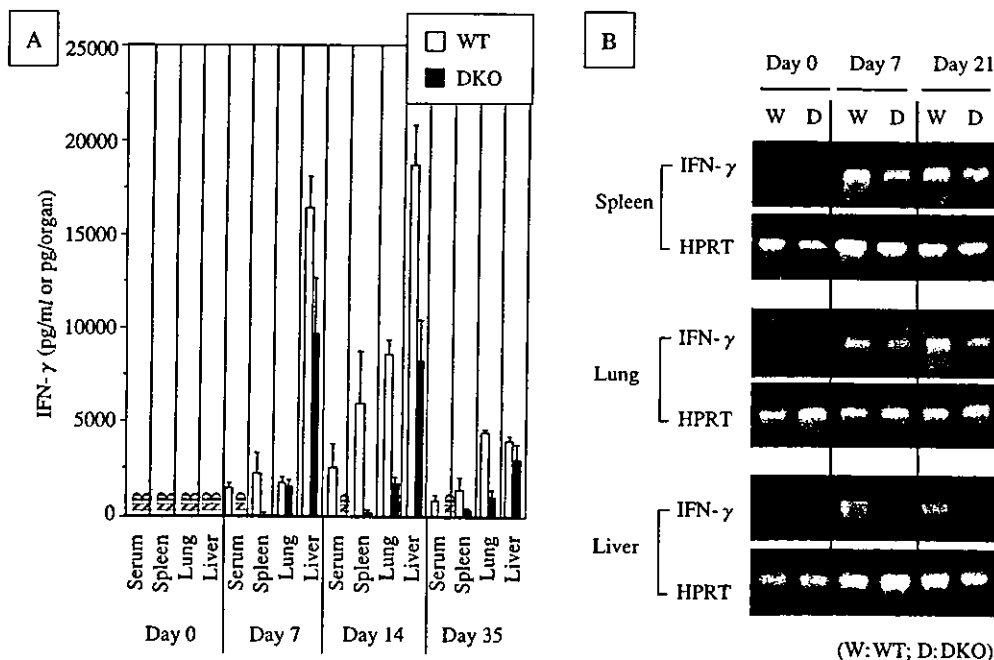


Fig. 2 IL-12, IL-18 and IL-23-independent IFN- $\gamma$  synthesis after infection with *M. tuberculosis*

ウスを用いて結核感染に対する感受性を比較したところ、IL-18KO<IL-12p40KO<DKO<GKOの順に野生型(WT)マウスに比べ感受性の亢進が観察された(Fig. 1)<sup>12)13)</sup>。このことから、IFN- $\gamma$ 誘導サイトカインの中ではIL-12が最も重要であり、IL-18の役割はIL-12に比べると限定して考えざるを得ない。また、DKOマウスがGKOマウスよりも結核感染に対してより抵抗性であったことから、IL-12、IL-18、IL-23に依存しない感染防御機構の存在が推察された。さらに、結核感染後の肺、肝、脾臓、血清中のIFN- $\gamma$ 産生をELISAにて測定したとこ

ろ、肝臓、肺ではDKOマウスでも明らかな産生が認められた(Fig. 2A)。また、結核感染後の各臓器からRNAを抽出し、RT-PCR法にてIFN- $\gamma$  mRNAの発現を調べたところ、肺、肝、脾臓にて明らかな発現が観察された(Fig. 2B)<sup>13)</sup>。これらの結果は、結核感染にともないIL-12、IL-18、IL-23に依存しないIFN- $\gamma$ の産生および感染防御機構が存在することを示している。このことに一致して、DKOマウスでみられる結核感染後の各臓器でのiNOS mRNAの発現および感染抵抗性はIFN- $\gamma$ に対する中和抗体の投与によって有意に抑制された。IFN- $\gamma$ 産生細胞



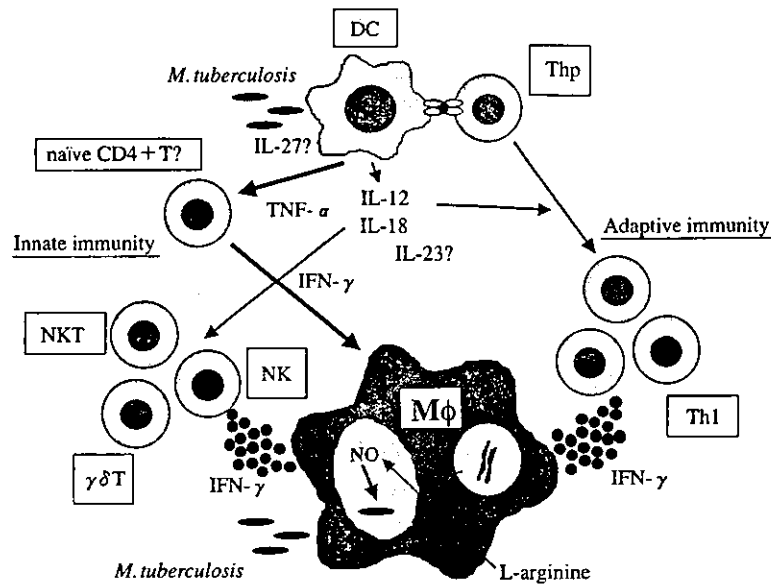


Fig. 3 Role of Th1-related cytokines in host defense to *M. tuberculosis*

については未だ明らかではないが、DKOマウスではIL-12p40KOマウスと同様にPPD特異的なT1細胞が全く検出できなかったことから、獲得免疫細胞よりもむしろ自然免疫細胞が関与している可能性を考えている<sup>13)</sup>。われわれはCD4陽性細胞が部分的に関与することを示すデータを得ており、自然免疫の時相においてこの細胞がIFN- $\gamma$ 産生に関わっているものと推察している。さらには、このDKOマウスでのIFN- $\gamma$ 産生および感染抵抗性は抗TNF- $\alpha$ 抗体投与によって有意に抑制されたことから、TNF- $\alpha$ がIL-12, IL-18, IL-23に依存しないIFN- $\gamma$ 産生、そして結核感染防御に関与していることが示唆された<sup>13)</sup>。

これまでの報告と今回のわれわれの実験結果をもとに、現在考えられる結核に対するTh1依存性感染防御免疫機構についてシエマにまとめて示す(Fig. 3)。結核感染後に樹状細胞からIL-12, IL-18のようなIFN- $\gamma$ 誘導サイトカインが産生されT1型の獲得免疫が誘導されるが、感染早期にはこれらのサイトカインによってNK, NKT,  $\gamma\delta$ T細胞のような自然免疫リンパ球からのIFN- $\gamma$ 産生がマクロファージによるNOを介した殺菌活性を増強すると考えられる。IL-23の役割については現時点では不明である。これらの経路に加えて、おそらく樹状細胞から産生されるTNF- $\alpha$ がnaïve CD4陽性細胞に作用してIFN- $\gamma$ 産生を誘導する経路の存在も予想される。IL-27はnaïve T細胞に作用してIFN- $\gamma$ 産生を誘導するとの報告があり、この経路に関与している可能性もある。このように幾重にも準備されたメカニズムによって、宿主はより効率的に結核感染に対抗しているものと考えられる。今後はこれらの機序をさらに詳細に明らか

にすることで、より有効性の高いワクチンやBRMの開発へつなげていくことが期待される。

#### 文 献

- 1) Rook GAW, Sittler J, Fraher L, et al.: Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Immunology*. 1986; 57: 159-163.
- 2) Rook GAW, Taverne J, Leveton C, et al.: The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumor necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology*. 1987; 62: 229-234.
- 3) Denis M: Killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. *Clin Exp Immunol*. 1991; 84: 200-206.
- 4) Newport MJ, Huxley CM, Huston S, et al.: A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*. 1996; 335: 1941-1949.
- 5) Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, et al.: Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N Engl J Med*. 1996; 335: 1956-1961.
- 6) Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL: Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today*. 1998; 19: 491-494.
- 7) Trinchieri G: Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 133-146.
- 8) Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, et al.: Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*.

- 2001; 19: 423-474.
- 9) Brombacher F, Kastelein RA, Alber G: Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol.* 2003; 24: 207-212.
- 10) Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al.: Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000; 13: 715-725.
- 11) Pflanz S, Timans JC, Cheung J, et al.: IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4 (+) T cells. *Immunity.* 2002; 16: 779-790.
- 12) Kinjo Y, Kawakami K, Uezu K, et al.: Contribution of IL-18 to Th1 response and host defense against infection by *Mycobacterium tuberculosis*: a comparative study with IL-12p40. *J Immunol.* 2002; 169: 323-329.
- 13) Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, et al.: Interferon-gamma production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. *Microbes Infect.* 2004; 6: 339-349.

#### 4. 結核菌による Th1 サイトカイン誘導の意義と責任分子

京都大学大学院医学研究科微生物感染症学 河村伊久雄

##### はじめに

細胞内寄生菌である結核菌は、その細胞壁主成分である mannose-capped lipoarabinomannan や、菌体表層に付着した補体成分を利用してマクロファージを活性化することなくその細胞内に侵入することができる<sup>1)</sup>。細胞内に侵入した結核菌は、ファゴソームとリソソームの融合を阻害することでマクロファージの細胞内殺菌をエスケープし、細胞内で増殖する。また最近、結核菌が樹状細胞 (DC) 上の DC-SIGN を介してシグナルを細胞内に伝達し、積極的に感染初期の防御反応を抑制するメカニズムがあることが明らかにされており、これらはいずれも菌の persistent infection に関与する重要なステップであると考えられる<sup>2)</sup>。

一方、結核菌細胞壁には強いアジュバント活性があり、結核菌の感染では Th1 細胞を中心とした強い細胞性免疫が誘導される。この感染防御を担う T 細胞の分化は、DC あるいはマクロファージによる結核菌の識別およびそれらの抗原提示能に依存することから、防御免疫の誘導を阻害し、宿主体内で生存しようとする結核菌に対して、DC やマクロファージがどのような機序で活性化するのかを分子レベルで明らかにすることは、結核に対する感染防御機構を理解するうえで重要な意味がある。

そこで本稿では、これまでに得られた知見を基に、防御免疫の誘導における感染初期の Th1 サイトカイン産生の重要性と、その誘導にかかわる結核菌因子についてまとめる。

##### 感染防御誘導における感染初期の IFN- $\gamma$ 産生応答の重要性

*M. bovis* BCG をマウスに感染させると、抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生性 CD4 陽性 T 細胞が誘導され、この T 細胞

が中心となる強い防御免疫が発現する。一方、BCG 死菌でマウスを免疫した場合には、生菌免疫でみられる抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生性 T 細胞の誘導は認められず、防御免疫も発現しない<sup>3)</sup>。しかし、BCG 死菌免疫マウスの脾細胞は、生菌免疫マウス脾細胞と同程度に抗原刺激に対して強い IL-2 産生応答を示し、遅延型過敏反応を惹起することができる。これらの結果は、BCG 死菌免疫でも抗原特異的 Th1 細胞が誘導されるが、感染抵抗性を担う T 細胞の分化誘導には生菌による刺激が不可欠であり、生菌刺激に対してのみ誘導される感染初期の宿主免疫応答が存在することを示すものである。

この T 細胞の分化誘導のメカニズムをサイトカイン産生のレベルで解析したところ、Th1 細胞の分化に関与する IFN- $\gamma$  の産生が生菌刺激では認められたが、死菌刺激では認められないことがわかった。この IFN- $\gamma$  を抗体で中和すると感染抵抗性 T 細胞の誘導が阻害されることから、感染初期に産生される IFN- $\gamma$  が T 細胞の分化を方向付け、防御免疫の誘導に重要な役割を果たすことが示された。

##### 感染初期の IFN- $\gamma$ 産生誘導機序

チオグリコレート培地で誘導した腹腔滲出細胞 (PEC) を BCG 生菌で刺激すると、IFN- $\gamma$  産生が誘導される。この実験系に各種サイトカインに対する抗体を加えて IFN- $\gamma$  産生応答を調べた。その結果、抗 IL-12 抗体および抗 IL-18 抗体の添加により IFN- $\gamma$  産生が抑制されることがわかった。また、腹腔滲出マクロファージを BCG 生菌で刺激した場合、IL-12 p40 および IL-18 の産生が認められた。しかし、IFN- $\gamma$  産生の誘導は認められなかった。これらの結果およびこれまでの実験成績を踏まえて BCG 生菌による IFN- $\gamma$  産生誘導機序をまとめると、BCG 生菌はマクロファージを刺激して IL-12 および

IL-18産生を誘導し、それらサイトカインの刺激を受けて主にNK細胞がIFN- $\gamma$ を産生することがわかった。

近年、マクロファージやDC上のToll-like receptor (TLR)が異物識別や、その後の細胞の活性化に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。結核菌では、その主要な細胞壁成分であるリポアラビノマンナンや、フォスファチジルイノシトールマンノシド、19 kDaリポタンパク、あるいは易熱性結核菌体抗原がTLR2やTLR4分子により認識されることが明らかにされている<sup>9-11)</sup>。そこで、BCG生菌が示すTh1型サイトカイン産生誘導にこれらTLR分子が関与するか否かを調べる目的で、TLRノックアウトマウスPECのBCG生菌刺激に対するサイトカイン産生応答を解析した。その結果、正常マウスPECに比較して、TLR2ノックアウトマウスPECではIFN- $\gamma$ およびIL-12 p40産生がほとんど認められず、BCG生菌で誘導されるIFN- $\gamma$ 産生誘導にTLR2が深く関与することが示された。さらに、このTLR2の関与を確認するため、TLR2を発現するHEK 293細胞をBCGで刺激し、NF- $\kappa$ Bの活性化を調べた。HEK 293細胞をBCG生菌で刺激してもNF- $\kappa$ Bの活性化は誘導されなかったが、TLR2を発現したHEK 293細胞ではBCG生菌刺激後、強いNF- $\kappa$ Bの活性化が誘導された。このことから、BCG生菌刺激後のIL-12およびIL-18産生にはマクロファージ上のTLR2分子が重要な役割を果たし、TLR2により認識されるBCG由来因子が、防御免疫を担うT細胞の分化誘導に不可欠であると考えられた。

#### BCGおよび結核菌由来IL-12産生誘導因子

これまでの解析から、BCG生菌にはIFN- $\gamma$ 産生誘導に関与するTLR2リガンドが存在し、このBCG因子が防御免疫を担うT細胞の分化誘導に不可欠であると考えられた。また、BCG死菌のIFN- $\gamma$ 産生誘導能が生菌に比較して著しく弱いことから、この因子は菌体構成成分ではなく、菌の代謝に伴い産生される成分である可能性が考えられた。そこでわれわれは、BCG由来の分泌成分に注目し、そのサイトカイン産生誘導活性を解析した。BCGでマクロファージを刺激した場合、培養24時間後に強いサイトカイン産生が認められることから、対数増殖期のBCGをsorton培地で24時間培養し、得られた上清を限外ろ過で濃縮してculture filtrateを調製した。このサイトカイン産生誘導活性を調べたところ、IL-12 p40産生誘導活性が認められた。一方、同様の方法で調製した死菌由来のculture filtrateにはその活性は認められなかった。さらに、このサイトカイン産生誘導活性はBCGだけでなく結核菌由来のculture filtrateにも認められ、結核菌culture filtrateでTLR2を発現したHEK 293

細胞を刺激したところ、NF- $\kappa$ Bの活性化が誘導された。これらの結果から、BCGあるいは結核菌の早期培養上清中に含まれる分泌因子が生菌刺激で誘導されるIFN- $\gamma$ 産生に関与するものと考えられた。また、この培養上清中のIL-12 p40産生誘導活性は、proteinase K処理あるいは加熱処理により著しく低下したことから、BCGや結核菌が産生するタンパク性因子がこの活性を担うことが示された。ハイドロキシアパタイトカラムを用いてこの因子の精製を試みたところ、いくつかの陽性画分が得られた。そのうち、最も強い活性は、ハイドロキシアパタイトカラムに吸着し、分子量100 kDa以上の比較的大きな分子を含む画分に存在することが示された。さらに、この画分のIL-12 p40産生誘導活性はproteinase K処理により失活したことから、この画分に含まれる分泌性タンパク成分がBCGや結核菌感染後のIFN- $\gamma$ 産生誘導に関与する重要な因子であると考えられた。

#### まとめ

BCGや結核菌に対する防御免疫の誘導には感染初期に産生されるIFN- $\gamma$ が重要な役割を果たしている。このサイトカイン産生にはマクロファージ上のTLR2分子が関与し、菌側のリガンドを認識してサイトカイン産生応答を惹起する。われわれは菌側のどのような因子がこのサイトカイン産生誘導に関与するのかについて解析を行い、BCGおよび結核菌培養早期の上清中に存在する分泌性タンパク因子がその役割を果たすことを示した。現在この因子の精製を試みているが、IFN- $\gamma$ 産生の誘導にはこのIL-12 p40産生誘導因子以外に別な因子が関与することが示唆されており、今後さらに解析を進め、これらの因子を同定して感染初期のサイトカイン産生誘導のメカニズムの全体像を明らかにしていく予定である。

#### 文 献

- 1) Aderem A, Underhill DM: Mechanism of phagocytosis in macrophages. *Ann Rev Immunol.* 1999; 17: 593-623.
- 2) Geijtenbeek TBH, Van Vliet SJ, Koppel EA, et al.: Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med.* 2003; 197: 7-17.
- 3) Kawamura I, Tsukada H, Yoshikawa H, et al.: IFN- $\gamma$ -producing ability as a possible marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. *J Immunol.* 1992; 148: 2887-2893.
- 4) Means TK, Lien E, Yoshimura A, et al.: The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol.* 1999; 163: 6748-6755.
- 5) Jones BW, Means TK, Heldwein KA, et al.: Different Toll-

like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol.* 2001; 69: 1036-1044.

- 6) Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al.: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through

Toll-like receptors. *Science.* 1999; 285: 732-736.

- 7) Means TK, Wang S, Lien E, et al.: Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 1999; 163: 3920-3927.

## 5. 新たな抗結核ワクチンの作製と評価

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター結核研究部 岡田 全司

要旨: BCGよりも強力な結核予防ワクチンである新しいDNAワクチンやリコンビナントBCGワクチンを開発した。(1) IL-12 DNA+HSP65 DNA (HVJ-liposomeベクター)のワクチンはBCGよりも100倍強力な結核予防ワクチンであることを世界に先駆けて明らかにした。このワクチンはキラーTの分化を増強した。結核吸入感染系を用い、モルモットの系でも結核菌数と病理組織より有効な結核感染予防効果を示した。(2) IL-6関連遺伝子ワクチンは強力な治療ワクチンであることを初めて示した。(3) ヒト生体内抗結核免疫解析モデル SCID-PBL/huを初めて開発した。(4) ヒトの結核感染モデルに最も近いカニクイザルを用い、① HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチン、② リコンビナント r72f BCG ワクチン、③ 72f 融合タンパクワクチンの強力な結核予防ワクチン効果を得た。さらに生存率改善、延命効果を認められた。(5) WHO STOP TB VACCINE MEETING: 2004年にWHO会議のメンバーに選ばれ、HSP65 DNA+IL-12 DNA ワクチンはきわめて高い評価を受けた。

### はじめに

いまだに世界の人口の3分の1が結核菌の感染を受け、その中から毎年800万人の結核患者が発生し、200万人が毎年結核で死亡している、最大の感染症の一つである。1998年、米国CDCおよびACETは新世代の結核ワクチン開発の必要性を発表した。しかしながら、BCGに代わる結核ワクチンは欧米でも臨床応用には至っていない。われわれはBCGよりもはるかに強力な新しいDNAワクチン【Hsp65 DNA+IL-12 DNA】やリコンビナントBCGワクチン【リコンビナント72f BCG】、サブユニットワクチンの開発に成功した(Table 1)<sup>1)~3)</sup>。これらの研究成果を中心に、新しい結核ワクチン作製と、評価について述べる。

### 方法と結果

#### (1) 結核ワクチンの種類

① DNA ワクチン、② サブユニットワクチン、③ リコンビナント BCG ワクチン (弱毒化結核菌を含む) に大別

される<sup>1)~3)</sup>。マウスではBCGワクチンをはるかに凌駕する新しい結核ワクチンはきわめて少ない(Table 1)。

#### (2) DNA ワクチン

われわれはIL-12 DNA+HSP65 DNAのワクチンが相乗効果を示し、HVJ-リボソームまたは、gene gunを用いた遺伝子投与でBCGよりもきわめて強力な(約100倍)結核予防ワクチンであることをBALB/cマウスの系で明らかにした(Fig. A)。ワクチン効果は、キラーT細胞やTh1細胞の分化誘導やIFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-6の産生を増強することによって発揮された<sup>1)~4)</sup>。結核死菌を貪食させたJ774.1 M $\phi$ を標的細胞とし、IFN- $\gamma$ の産生でキラー活性を測定した。その結果、ワクチン効果とキラー活性は見事な相関が認められた(Fig. B)。さらに、結核吸入感染系を用い、モルモットの系でも肺、肝、脾の結核菌数と病理組織より有効な結核感染予防効果を示した<sup>4)</sup>。

さらに、今までのAAVベクターより1000倍発現効率がよいAAV(2/5)/HSP65 DNA ワクチンを世界に先駆けて作製した。

#### (3) 治療ワクチン

アデノウイルスベクターに導入したIL-6関連遺伝子(IL-6 gene+IL-6レセプター gene+gp130 gene)はBCGよりも強力な治療ワクチン効果を示した(Table 1)。IL-6関連遺伝子ワクチンは、結核菌に対するキラーT細胞の分化およびIL-2およびIFN- $\gamma$ の産生誘導を増強した(Table 1)<sup>1)2)</sup>。

#### (4) サブユニットワクチン

72f fusion蛋白(Mrb 39とMtb 32のfusion蛋白)ワクチン+BCG Tokyo ワクチン同時接種がカニクイザルでBCGよりも強力な予防ワクチン効果を示すことを明らかにした(Table 1, Table 2)。ヒトの多剤耐性結核患者*in vitro*系でも72f等を用いてT細胞免疫応答(IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-6産生を増強)が増強した<sup>1)2)</sup>。

#### (5) リコンビナント BCG ワクチン

PNN<sub>2</sub>シャトルベクターを用い、BA51 (Ag85A + Ag85B + MPB51) リコンビナント(r)BCGや72f融合タンパクのDNAを導入した72f rBCGの作製に成功し、結核菌

Table 1 The development of novel vaccines against tuberculosis

(1) DNA vaccine HVJ liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA	More effective than BCG (mouse, guinea pig, cynomolgus monkey)
(2) Recombinant BCG vaccine ① recombinant 72f BCG ② recombinant (Ag85A + 85B + MPB51) BCG	More effective than BCG (mouse, guinea pig, cynomolgus monkey) More effective than BCG (mouse)
(3) Subunit vaccine Mtb72f fusion protein	More effective than BCG (monkey) Augmentation of T cell immunity of the patients with MDR-TB Phase I Study
(4) Therapeutic vaccine IL-6 related DNA vaccine (IL-6 DNA + IL-6 receptor DNA + gp130 DNA)	(mouse)
(5) Priming-Booster Method BCG Priming–Novel vaccines (Booster)	(mouse, monkey)
(6) Attenuated (gene knock out) Listeria–TB vaccine (per os)	
(7) Novel vectors AAV vector (1000 fold effective) Adenovirus vector	

→ Selected as WHO STOP TB Partnership and WHO STOP TB Vaccines Working Group

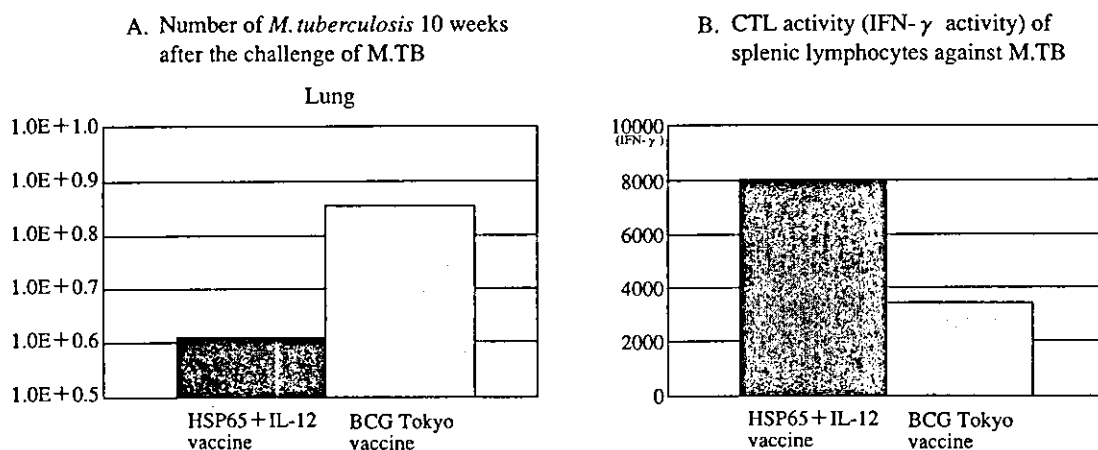


Fig. One hundred fold stronger anti-tuberculosis effect of HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine than that of BCG Tokyo (mouse) and enhancement of cytotoxic T lymphocyte (IFN- $\gamma$  producing) induction.

に特異的な IFN- $\gamma$  産生 T 細胞数の増強を Elispot Assay で明らかにした<sup>12)</sup>。さらに、これらの BCG はマウスおよびモルモットの結核感染の系で BCG よりも強力な予防ワクチンであることを示した (Table 1)。また、融合タンパク 31f, 88f, 59f, 71f, 72f-85B の DNA を導入した rBCG を作製した<sup>12)</sup>。

#### (6) attenuated 結核ワクチン

われわれは (浜松医大 小出教授と) akt 遺伝子を欠失させた無毒化リステリア菌に Ag85A-, 85B-, MPB51-DNA を導入し新しい結核ワクチンを開発した (Table 1)<sup>2)</sup>。

#### (7) 新しいヒト生体内結核免疫解析モデル

SCID-PBL/hu (ヒト結核菌ワクチン解析モデル) を用いた評価：世界に先駆け、結核蛋白に特異的なヒトキラー T 誘導を示す画期的な、ヒト結核ワクチン効果評価モデルを開発した<sup>2)</sup>。ESAT-6 ペプチドを投与し、これに特異的で HLA-A 2 拘束性を示すヒトキラー T を生体内で誘導することに初めて成功した (Table 1)。

#### (8) 新しい結核ワクチンの臨床応用

さらに、ヒトの結核感染モデルに最も近い折り紙つきのカニクイザル (Nature Med 1996) の結核感染モデルを用い、HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン、r72f BCG ワクチン、r72 融合タンパク + BCG 東京ワクチ

**Table 2** The development of novel vaccines using cynomolgus monkey anti-tuberculosis effect of HSP65DNA + IL-12 DNA vaccine, recombinant 72f BCG vaccine and 72f fusion protein + BCG

Three distinct kind of TB vaccines	Prophylactic effect against M.TB	Survival	Improvement of BSR	Increase in body weight	Improvement of chest X-ray finding	Immune responses Proliferative responses of lymphocyte
① HVJ-liposome /HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccine	++	++	++	+	+	+++
② Recombinant 72f BCG vaccine	++	++	+	+	+	+
③ 72f fusion protein + BCG	++	++	+	±	++	++
④ Control (saline)	-	-	-	-	-	-

ンの有効性を得たり<sup>2)</sup>。カニクイザルに3回免疫し、最終免疫4週後にヒト結核菌 Erdman株を経気道投与した。体重、体温、血沈、胸部X線、ツ反および生存率を解析し1年以上経過観察した。これらの群ではワクチン抗原に対する末梢血リンパ球増殖反応およびサイトカイン産生の増強が認められた (Table 2)。また、胸部X線所見、血沈の改善効果、体重減少の阻止効果が認められた。さらに延命効果も認められた。すなわち、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン投与群および r72f BCG ワクチンは著明な延命効果を認めた。Ag85B-ESAT-6 融合タンパク質 (Anderson 博士ら) ワクチニアウイルスに 85A DNA を導入したワクチンや r85B BCG (Horowitz ら) も clinical trial が近い将来考えられている。しかしながら、最も切れ味のするどい臨床応用ワクチン候補の筆頭として HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンがあげられる。最も有力なものとして、① HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチン、② r72f BCG ワクチン、③ 72f fusion 蛋白ワクチン (すでに phase I clinical trial) + BCG 東京があげられる。

### 考 察

これらの新しい結核ワクチンの開発研究が高く評価され WHO STOP TB Partnership および WHO STOP TB VACCINE GROUP MEETING に選出された。われわれの HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンが高く評価された (Table 1)。当センターは呼吸器疾患 (結核を含む) 準ナショナルセンターであり、日本の結核患者数の約 50% の診療を行っている政策医療呼吸器ネットワークを用い、HSP65 DNA + IL-12 DNA ワクチンおよび r72f BCG ワクチンの臨床応用を計画している。

サルにおいては HSP65 DNA + IL-12 DNA, r72f BCG および 72f 融合タンパクが明らかにすぐれていることより、これらのワクチンが結核の発症予防や治療に役立つ

日が来るであろう。

### 謝 辞

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター；田中高生、喜多洋子、桑山さち子、村木裕美子、金丸典子、橋元里実、高井寛子、岡田知佳、福永有可里、坂口弥生、古川いづみ、山田恭子、和泉谷美和、井上義一、武本優次、坂谷光則、自治医大；吉田博士、ハーバード大；Mulligan 教授、Lee 博士、長崎大；山田、大原、内藤各博士、阪大；金田教授、東大；齊藤博士、Corixa 研究所；Reed, Skeiky, Gillis 各博士、Leonard Wood 研究所；Gelber, Tan, Cruz 各博士、Texas A&M 大学；McMurray 博士らとの共同研究。厚生労働科学研究費新興・再興感染症研究事業の支援を受けた。

### 文 献

- 1) 岡田全司：結核感染とサイトカイン。医学のあゆみ。2004 (出版中)。
- 2) 岡田全司：結核菌症の病態解明に基づく新たな治療法等の開発に関する研究：[抗結核キラー Tリンパ球・結核殺傷蛋白による病態解明に基づく結核ワクチン (サブユニット-DNA-リコンビナント BCG-ワクチン)・化学療法剤の開発による新しい治療・予防・診断法]。厚生科学研究費補助金実績報告書・研究報告書。2004；1-128。
- 3) Okada M, Tanaka T, Inoue Y, et al.: Novel (recombinant BCG- and DNA-) vaccination against tuberculosis. Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 2002；171-175。
- 4) Okada M, Yoshimura N, Kaieda T, et al.: Establishment and characterization of human T hybrid cells secreting immunoregulatory molecules. Pro Nat Acad Sci USA. 1981；78：7718-7721。

## The 79th Annual Meeting Symposium

## CUTTING EDGE OF BASIC STUDY ON TUBERCULOSIS

Chairpersons: <sup>1</sup>Masao MITSUYAMA and <sup>2</sup>Kazuo KOBAYASHI

**Abstract** During the past two decades, we have observed outstanding advance in tuberculosis research including immune response, identification of antigens/ligands of *M. tuberculosis* and molecular mechanism of drug resistance. Worldwide genome project enabled the whole genome sequence of *M. tuberculosis* H37Rv and has provided a great impact on the molecular genetics on virulence mechanism. Extensive study by new members is greatly encouraged in our country. Though the number of tuberculosis patients has decreased comparing to some 50 years ago, there are new concerns about the emergence of multi-drug resistant strains and a possible increase due to the increase of immunocompromised population. Now the basic study on the pathophysiology, virulence mechanism and vaccine development are urgently required.

In this symposium, we have invited leading researchers in the field of basic study of tuberculosis/*M. tuberculosis* in order to provide general overview of the cutting edge of basic study. Mycobacterium is rich in lipids or glycolipids that are quite unique in both structure and biological activity, and they contribute a lot to the pathophysiology of tuberculosis. Dr. Ikuya Yano (Japan BCG) reviewed the major classes of glycolipids and presented some applications to clinical and bacteriological diagnosis. *M. tuberculosis* appear to have various genes contributing to the slow growth, escape from macrophage killing and persistence, however, almost nothing has been clarified yet. Dr. Sokichi Matsumoto (Osaka City University) discovered MDP1 as a possible mycobacterial factor responsible for slow growth. He mentioned that MDP1 might be involved in the dormancy during the long course of disease development after primary infection. Dr. Kazuyoshi Kawakami (University of the Ryukyus) presented many interesting data on the importance of various cytokines, especially Th1 cytokines, to resistance against experimental *M. tuberculosis* infection in mice obtained by using cytokine-knock out mice. The relevance of animal data to clinical observation was discussed. Th1-dependent cell-mediated immunity is regarded as the most effective immune response in the protection. Dr. Ikuo Kawamura (Kyoto University) employed animal model in which only viable BCG induces protective Th1 cells while killed BCG does not, and showed that the difference is due to some proteinaceous factor release by viable BCG. He showed preliminary data on the purification of such IFN- $\gamma$ -inducing factor from the culture filtrate of *M. tuberculosis*. BCG is the most widely employed live vaccine for tuberculosis in the world, however, more effective and safe vaccine is requested urgently because of the serious concern about the efficacy of BCG vaccination. In Japan, Dr. Masaji Okada (Kinki-Chuo

Chest Medical Center) has been engaged actively in the development of new tuberculosis vaccines. He showed basic strategy for construction of new candidate vaccines and also presented some preliminary data on the trial using monkeys.

1. Molecular characterization and immunological properties of mycobacterial high molecular weight components: Yukiko FUJITA and Ikuya YANO (Japan BCG Laboratory)

Mycobacterial envelope contains a great variety of wax-like high molecular weight lipids which contribute to its strong hydrophobicity or acid-fastness and also play crucial role against host phagocytic cells at the early step of infection. Cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) and the related mycoloyl glycolipids are one of the most characteristic components in mycobacteria and are recognized to be a key molecule for pathogenicity and immunity. Recent progress of analytical techniques such as MS or NMR reveal the molecular structure-activity relationship. Lipoarabinomannan (LAM), lipomannan (LM) and core phospholipids (PIM<sub>x</sub>) are recently demonstrated to be one of the virulence factor, however some of which are shown to be IL-12 producer and apoptosis inducer. Mycobacterial sulfolipids play important role as a virulence factor together cord factor, but the mechanism seems to differ from TDM. *M. avium* complex produce serotype specific glycolipid (GPL) which suppresses the humans T cell response. The core structure is unique and carbohydrate shows high antigenicity to determine serotypes. Mycobacterial cell wall skeleton (CWS) plays the central role for maintaining the rigid structure and shows antitumor or infection prevention activities via the stimulation of innate immunity. Although at the present, their molecular structure-activity relationship is not fully understood, above components may play pivotal roles with the protein antigens for host immune responses.

2. Molecular mechanism of *M. tuberculosis* dormancy: Sokichi MATSUMOTO (Department of Host Defense, School of Medicine, Osaka City University)

*Mycobacterium tuberculosis* has remarkable ability to persist in the human host and infects both macrophages and nonprofessional phagocytes, such as alveolar epithelial cells. Glycosaminoglycans are considered as the component of mycobacterial adherence to epithelial cells. Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) is suggested one of key molecules in latent infection. Here we show that extracellular MDP1 promotes mycobacterial adherence to A549 human lung epithelial cells through hyaluronan. Simultaneous treatment of intratracheal mycobacteria-infected mice with

HA reduced the growth of bacteria *in vivo*. Taken together, anti-MDP1 antibody or hyaluronan has potential as therapeutic and prophylactic interventions in mycobacterial infection.

3. A host defense mechanism against *Mycobacterium tuberculosis* mediated by Th1-related cytokines: Kazuyoshi KAWAKAMI (Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Graduate School and Faculty of Medicine, University of the Ryukyus)

Th1-related cytokines play a central role in the host defense to *Mycobacterium tuberculosis* infection. IL-12 is a key cytokine for development of Th1 cells and IL-18 potentiates this response. Recently, two novel IFN- $\gamma$ -inducing cytokines, IL-23 and IL-27, have been discovered. In a series of studies, we demonstrated the important roles of IL-12p40 and IL-18 in the host defense to this infection and proposed a possible host protective mechanism mediated by IFN- $\gamma$  which synthesis is independent of IL-12, IL-18 and IL-23. Thus, host is likely protected from *M. tuberculosis* infection by various Th1-related cytokines in a more complicated manner.

4. Possible involvement of TLR2 ligand derived from *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* to generate protective immunity by inducing endogenous IFN- $\gamma$  production: Ikuo KAWAMURA (Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine)

IFN- $\gamma$  plays a pivotal role for development of protective T cells, and both IL-12 and IL-18 which are produced from macrophages are necessary to induce IFN- $\gamma$  production. To identify the mycobacterial factor contributing to the Th1 cytokine productions, we prepared a culture filtrate from Id-culture of *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*, and measured the cytokine-inducing activity. These culture filtrates elicited IL-12p40 production from peritoneal macrophages. They could induce NF- $\kappa$ B activation in HEK293 cells expressing TLR2 and the activity was sensitive to treatment with

proteinase K and heating. These results suggest that an early secreted protein from BCG and *M. tuberculosis* activates macrophages to produce IL-12 via TLR2 dependent pathway. It is likely that this is a critical interaction between mycobacteria and macrophages for the generation of protective immunity.

5. Establishment and evaluation of novel vaccine against tuberculosis: Masaji OKADA (National Hospital Organization Kinki-Chuo Chest Medical Center, Clinical Research Center)

HVJ-liposome/HSP65 DNA + IL-12 DNA vaccination was 100 fold more efficient than BCG on the elimination of *Mycobacterium tuberculosis* (M.TB) in the BALB/c mice. Cytotoxic T cells activity against M. TB was augmented. The recombinant (r) 72f BCG vaccine as well as HSP65 + IL-12 DNA vaccine showed stronger anti-TB immunity than BCG in the mice, and guinea pigs. By using these new vaccines (HSP65 + IL-12 DNA, r72f BCG and 72f fusion protein + BCG) and the cynomolgus monkey models which are very similar to human tuberculosis, the prophylactic effect of vaccines was observed. Thus, these novel vaccines should provide a useful tool for the prevention of human TB infection.

**Key words:** Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Basic research

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine, <sup>2</sup>Department of Host Defense, Graduate School of Medicine, Osaka City University

Correspondence to: Masao Mitsuyama, Department of Microbiology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Yoshidakonoecho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8501 Japan. (E-mail: mituyama@mb.med.kyoto-u.ac.jp)



## STAT1 Knockout Mice are Highly Susceptible to Pulmonary Mycobacterial Infection

ISAMU SUGAWARA, HIROYUKI YAMADA and SATORU MIZUNO

*Mycobacterial Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo 204-0022*

SUGAWARA, I., YAMADA, H. and MIZUNO, S. *STAT1 Knockout Mice are Highly Susceptible to Pulmonary Mycobacterial Infection*. Tohoku J. Exp. Med., 2004, 202 (1), 41-50 — This study was designed to determine the roles of STAT1 protein in defense against mycobacterial infection. Airborne infection of STAT1 knockout (KO) mice with a *Mycobacterium tuberculosis* Kurono strain induced multiple necrotic lesions in lungs, spleen and liver, while that in wild-type (WT) mice did not. The STAT1 KO mice succumbed to mycobacterial infection by the 35 th day after infection. Compared with the levels in WT mice, inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  and IL-12 mRNA levels were significantly lower in the lung of STAT1 KO mice. Interestingly, granulomatous lesion development in STAT1 KO mice was inhibited significantly by treatment with exogenous recombinant murine IL-12. Therefore, STAT1 regulates IL-12 expression and appears to be a critical transcription factor in controlling mycobacterial infection.

— STAT1; *M. tuberculosis*; STAT1 knockout mouse; IL-12

© 2004 Tohoku University Medical Press

Activation mechanisms of signal transducer and activator of transcription (STAT) was clarified in the biological responsive system stimulated with interferon (IFN)- $\gamma$ . STAT family consists of seven transcription factors (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b and STAT6) (Darnell 1997). STAT proteins are cytoplasmic proteins that are activated to participate in gene control when cells encounter various extracellular polypeptides. Among them, STAT1 is activated by stimuli with IFN- $\alpha/\beta$  and IFN- $\gamma$  and is essential for cell growth suppression in response to

IFN- $\gamma$ . The STAT1 signaling pathway appears to negatively regulate the cell cycle by inducing cyclin-dependent kinase inhibitors in response to cytokines (Chin et al. 1996). STAT1 knockout (KO) mice are highly susceptible to vesicular stomatitis virus (VSV) and *Listeria monocytogenes* infections (Meraz et al. 1996).

Tuberculosis is a chronic, airborne infectious disease induced by *M. tuberculosis*. The target cells of *M. tuberculosis* are alveolar macrophages and alveolar macrophages are activated by IFN- $\gamma$  so that they can kill tubercle bacilli

---

Received September 19, 2003; revision accepted for publication November 21, 2003.

Address for reprints: Isamu Sugawara, Mycobacterial Reference Center, The Research Institute of Tuberculosis, 3-1-24 Matsuyama, Kiyose 204-0022, Japan.

e-mail: sugawara@jata.or.jp

(Sugawara et al. 1998). Thus, it is important to study the roles of IFN- $\gamma$  and transcription factors that regulate expression of IFN- $\gamma$ . There are several reports suggesting the roles of STAT proteins in mycobacterial infections. In our previous report, we have shown that STAT4, but not STAT6, was a critical transcription factor in controlling mycobacterial infection (Sugawara et al. 2003). In the absence of STAT4, development of Th1 type helper T cells abrogated. Lymphocyte proliferation and expression induction of IFN- $\gamma$  by IL-12 and natural killer cell activation by IL-12 are also inhibited. There are several in vitro reports suggesting the close relationship between STAT1 protein and mycobacterial infection. *M. tuberculosis* inhibits IFN- $\gamma$  transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1 (Ting et al. 1999). *M. tuberculosis* infection activates JAK2/STAT1-pathway (Rojas et al. 2002). Selective expression of type I IFN genes is induced in human dendritic cells infected with *M. tuberculosis* (Remoli et al. 2002). We have been interested in the roles of transcription factors that regulate cytokine expression in mycobacterial infection. Nuclear factor (NF)-IL-6 is critical in mycobacterial control as well as in the induction of granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) in alveolar macrophages that results in neutrophil activation (Sugawara et al. 2001a). NF- $\kappa$ B p50 KO mice developed multifocal necrotic pulmonary lesions or lobar pneumonia (Yamada et al. 2001). STAT4 KO mice infected with *M. tuberculosis* developed large granulomas with massive neutrophil infiltration over time, while STAT6 KO mice did not (Sugawara et al. 2003). In the absence of STAT6, development of Th2 type helper T cells is abrogated and class switch of immunoglobulins to IgE is not recognized. Thus, STAT6 has nothing to do with the development of tuberculosis. These transcription factors regulate IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-12 that play critical roles in defense against tuberculosis development. These findings prompted us to explore the roles of STAT1 protein in mycobacterial infection further. We report here that STAT1 plays a critical role in

defense against mycobacterial infection.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Six-week-old C57BL/6 wild-type (WT) mice were purchased from Japan SLC Co. Ltd. (Shizuoka), and STAT1 knockout (KO) mice were purchased from Taconic Transgenic Models via Immuno-Biological Laboratories Co. (Gunma)(Meraz et al. 1996). These KO mice showed no developmental abnormalities. All mice were housed in a biosafety level 3 facility and given mouse chow and water *ad libitum* after aerosol infection with virulent mycobacteria.

### Experimental infections

The experimental procedures were in accordance with the ARVO resolution on the use of animals in research. Permission to experiments on animals was granted by the Animal Experiment Committee of the Research Institute of Tuberculosis. A virulent Kurono strain of *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 358121) was grown in Middlebrook 7H9 broth for 2 weeks, then filtered with a sterile acrodisc syringe filter (Pall Corp., Ann Arbor, MI, USA) with a pore size of 5.0  $\mu$  m. Then, the aliquots of the filtrate bacterial solution were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Mice were infected via the airborne route by placing them into the exposure chamber of the Glas-Col aerosol generator (Model 099CA4212; Glas-Col, Inc., Terre Haute, Ind.). The nebulizer compartment was filled with 5ml of a suspension containing  $10^6$  CFU of Kurono strain tubercle bacilli so that approximately 100 bacteria might be deposited in the lung of each animal (Sugawara et al. 1999; Yamada et al. 2001).

### cfu assay

At 1, 3, and 5 weeks after aerosol infection, mice were anesthetized with pentobarbital sodium, and the abdominal cavity was incised, and exsanguination was performed by splenectomy. Lungs, spleens and livers were excised and weighed. The left lobe of each lung and a part of

spleen tissues were separately weighed and used to evaluate *in vivo* growth of mycobacteria. The lung and spleen tissues were homogenized with a set of mortar and pestle, and then 1ml of sterile physiological saline was added. Then, 100 $\mu$ l of homogenate was picked up and plated in a 10-fold serial dilution on 1% Ogawa's egg media. Colonies on the media were counted after a four-week incubation at 37°C (Yamada et al. 2001).

#### RT-PCR

Parts of right lobe of lung and spleen tissues that had been left after cutting off for CFU examination were used to perform RT-PCR analysis for mRNA expression for several cytokines and iNOS in these organs during TB infection. These tissues samples were snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -85°C until use. RNA extraction was performed as described previously (Sugawara et al. 2001b; Yamada et al. 2001). Briefly, frozen tissues were homogenized with a microcentrifuge tube and tip-closed 1ml pipet tip in liquid nitrogen. Then homogenates were treated with total RNA isolation reagent, TRIzol™ Reagent (GIBCO BRL) according to a manufacturer's instructions. After RNA isolation, total RNA was reverse transcribed into cDNA with M-MLV reverse transcriptase (GIBCO BRL) following measurement of total RNA concentration, and agarose gel electrophoresis was performed.

Polymerase chain reaction was performed with gene-specific primer sets for  $\beta$ -actin, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-18, TGF- $\beta$ , and iNOS. DNA sequences of primer sets and corresponding PCR conditions are listed as described previously (Sugawara et al. 2003). The PCR primer sets for ICAM-1 mRNA are as follows: sense, 5'-TGCGTTTTGGAGCTAGCGGACCA-3' antisense, 5'-CGAGGACCATACAGCACGTGCAG-3'. The expected product length is 326 bp. Amplification was carried out with a DNA thermal cycler 480 (Perkin-Elmer Cetus). PCR product (10  $\mu$ l each) was applied for electropho-

resis in 4% agarose and NuSieve GTG (1:3) gel and visualized using ethidium bromide staining. Relative ratios of various cytokines and iNOS mRNA to  $\beta$ -actin mRNA as an internal control were determined (Sugawara et al. 2003).

#### Light microscopic examination

For light microscopic examination, the right middle lobe of each lung was excised and fixed with 20% formalin buffered methanol solution, Mildform 20NM (containing 8% formaldehyde and 20% methanol, Wako Pure Chemical Co., Osaka), dehydrated with grading series of ethanol, treated with xylene, and embedded in paraffin. The 5  $\mu$ m-thick sections were cut from each paraffin block and stained for either hematoxylin and eosin or Ziehl-Neelsen staining.

#### Reconstitution of STAT1 KO mice with exogenous recombinant IL-12

As the IL-12 mRNA level was reduced significantly in the STAT1 KO mice, reconstitution experiments of STAT1 KO mice with exogenous murine IL-12 were performed twice. The three mice were injected subcutaneously with 10  $\mu$ g of recombinant murine IL-12 (210-12, Pepro Tech, London, UK) in PBS or PBS alone four times at weekly intervals. The biological activity of the recombinant murine IL-12 was evaluated by determining the stimulation of IFN- $\gamma$  production by murine splenocytes co-stimulated with IL-12. The ED<sub>50</sub> for this effect was 0.1 ng/ml, corresponding to a specific activity  $1 \times 10^7$  units/mg. The lungs from STAT1 KO mice treated subcutaneously with recombinant IL-12 were retrieved from the infected mice 5 weeks after aerosol infection (Sugawara et al. 1999). The sizes of the 10 granulomas were measured with a micrometer (Nikon Optical Co., Tokyo) (Sugawara et al. 2001a).

#### Statistical methods

The values were compared by Student's *t*-test. For all statistical analyses, differences at  $p < 0.01$  were considered significant.

## RESULTS

*Mycobacterial burden in the lungs and spleens of STAT1 KO mice*

STAT1 KO mice died of disseminated tuber-

culosis by the 35 th day after aerosol infection, whereas WT mice survived until the day they were sacrificed at 60 days (Fig. 1). After one week post-infection, when STAT1 KO mice were infected with Kurono strain, the cfu number was

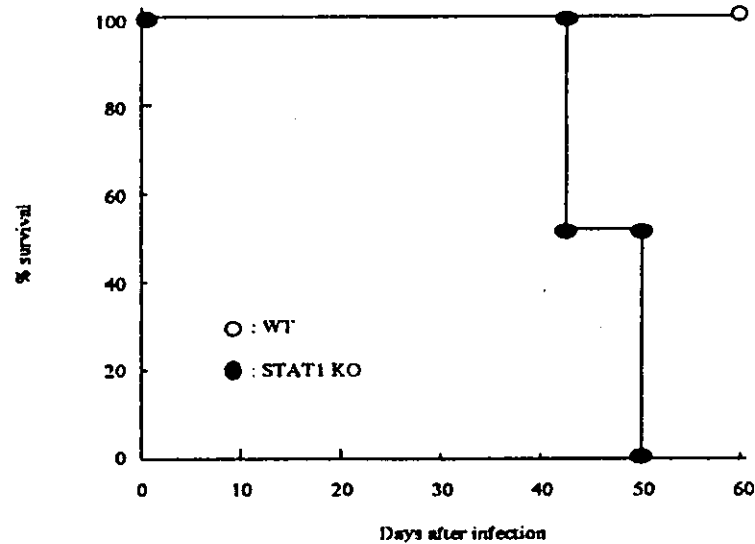


Fig. 1. Survival of mice infected with *M. tuberculosis* Kurono strain. WT and STAT1 KO mice were infected with  $10^6$  cfu of the Kurono strain by an airborne route. Percentages of surviving WT (open circle) and STAT1 KO mice (solid circle) are shown.

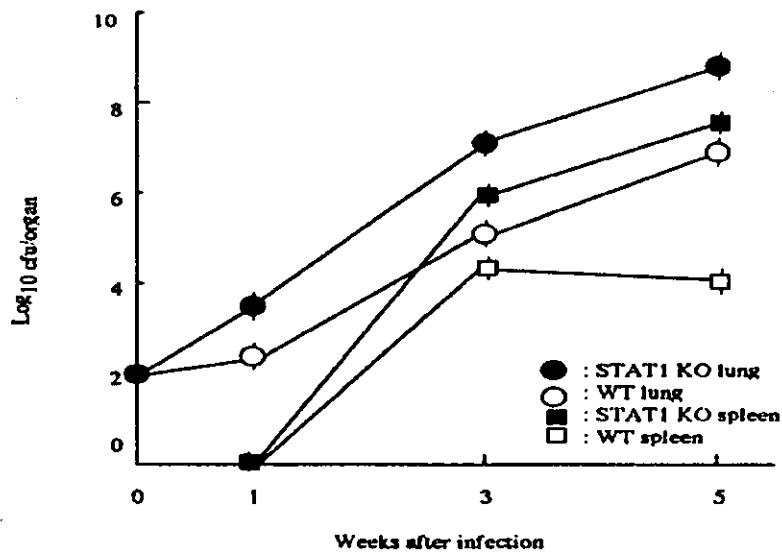


Fig. 2. Mycobacterial titers in lungs (solid circle) and spleens (solid square) of STAT1 KO mice exposed to  $10^6$  cfu *M. tuberculosis* Kurono strain by the airborne route. Lungs (open circle) and spleens (open square) of WT mice were included in each experiment. At the indicated times after infection, four mice from each group were sacrificed and homogenates of lung and spleen tissues were plated on 7H10 agar. Error bars indicate standard deviation (S.D.).