

Fig. 3. Semiquantitative analysis of granulomatous inflammation of the lungs. One hundred microgram of TDM was injected intravenously to both BALB/c and STAT4-deficient mice preimmunized with FCA. As controls, w/o/w micelles without TDM were used. The lung index was calculated as lung weight  $\times$  100/body weight. The areas of granulomatous inflammation were measured using the image analysis program, and quantitated as a percentage value for the areas of lesional lungs. Data represent the mean  $\pm$  SD compiled from three to four mice per group. The asterisks indicate  $P < 0.05$  compared to preimmunized BALB/c mice challenged with TDM.

and reached a peak by 3 days after the challenge. A rapid decrease in such cytokines and chemokine was observed 7–14 days after the challenge. The similar kinetics and amount of cytokines and chemokine were observed in both BALB/c and STAT4-deficient mice. However, no detectable proinflammatory cytokines and chemokine were observed in the lung extract prepared from preimmunized BALB/c and STAT4-deficient mice challenged with w/o/w vehicles alone. Thus, the profile of proinflammatory cytokines and chemokine reflected the histopathologic feature of granulomatous inflammation. In contrast, IL-12 p70 and IFN- $\gamma$  were detectable only 3 days following TDM challenge in both BALB/c and STAT4-deficient mice and rapidly declined thereafter. Although there was no significant difference of IL-12 p70 expression between BALB/c and STAT4-deficient mice, IFN- $\gamma$  expression was significantly reduced in STAT4-deficient mice, when compared to BALB/c mice (Fig. 5). We could not detect IL-4, a Th2 cell-derived cytokine, in both BALB/c and STAT4-deficient mice throughout the course of these experiments (data not shown). Thus, TDM could favor the dominance of Th1 response characterized by the expression of IL-12 and IFN- $\gamma$ .

### 2.5. Expression of Th1 cytokines by lymph node cells stimulated with TDM in vitro

To confirm the polarized Th1 response induced by TDM in vivo, we examined protein expression of IL-12 p40, IFN- $\gamma$ , and IL-4 by lymph node cells from mice stimulated with TDM in vitro. Axillary lymph node cells were prepared 8 days following the immunization with FCA. A significant and similar amount of IL-12 p40 was produced by cells of both BALB/c and STAT4-deficient mice and reached the peak at day 3, whereas IFN- $\gamma$  was only produced by those of BALB/c mice (Fig. 6). However, IL-4 was undetectable in the culture supernatant of lymph node cells stimulated with TDM prepared from both BALB/c and STAT4-deficient mice. As controls,  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GC) and sulfolipid (SL) were used.  $\alpha$ -GC is an antigen for CD1d-restricted NKT cells [17] and could be induced by both Th1 and Th2 cell-derived cytokines [18]. SL is a mycobacterial cell surface component that is unable to induce granulomatous lesions in vivo [5]. Lymph node cells stimulated with  $\alpha$ -GC produced both IFN- $\gamma$  and IL-4, but not IL-12 p40, in a time-dependent manner. IL-4 production by cells from BALB/c mice was significantly increased when compared to STAT4-deficient mice. IFN- $\gamma$  and IL-4 were not produced by lymph node cells stimulated with SL. In contrast, IL-12 p40 was produced by cells stimulated with SL of STAT4-deficient mice, but not BALB/c mice.

### 3. Discussion

In the present study, we have demonstrated for the first time that mycobacterial TDM selectively induces the Th1 response through the STAT4 signaling pathway, because mice lacking STAT4 protein significantly reduced to develop DTH (Figs. 1 and 2), hypersensitivity granulomas (Figs. 3 and 4), and Th1 cytokine responses (Figs. 5 and 6), when compared to BALB/c mice. Thus, the present study clarifies the molecular pathogenesis of mycobacterial infection, in which the development of Th1 responses plays a central role.

Disease progression to active tuberculosis is dependent on the interplay between bacterial and host factors. The major lipid component of mycobacterial cell wall is mycolic acids,  $\alpha$ -branched  $\beta$ -hydroxy long-chain fatty acids (C78–C90). Strains of *M. tuberculosis* have TDM associated with mycolic acids, a surface glycolipid [10]. The pathogenicity of *M. tuberculosis* is related to its ability to induce cell-mediated immunity/delayed-type hypersensitivity. Granulomatous inflammation can be broadly classified as either a hypersensitivity (immunologic, T cell-dependent) type or a foreign-body (non-immunologic, T cell-independent) type [2,11,19]. Our previous studies have demonstrated that mechanisms of granulomatous inflammation in tuberculosis are composed of both foreign-body and hypersensitivity types, because such inflammation induced by either

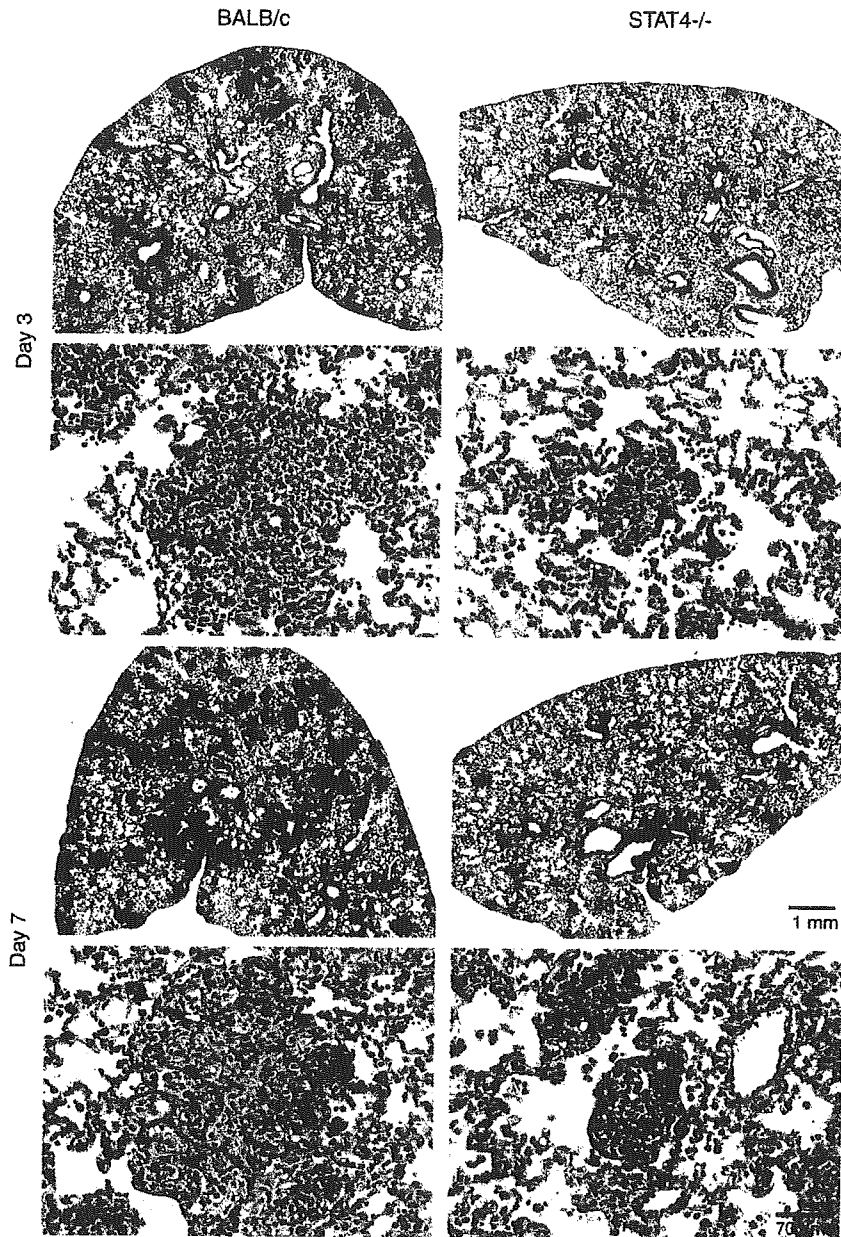


Fig. 4. Histopathologic features of the lungs. Eight days after immunization with FCA, BALB/c or STAT4-deficient mice were injected intravenously with 100  $\mu$ g of TDM in 100  $\mu$ l of w/o/w emulsion. Three to seven days after the challenge, both BALB/c and STAT4-deficient mice showed randomly distributed, well-organized granulomas composed of epithelioid macrophages, and lymphocytes. The lesion was more prominent in BALB/c mice than STAT4-deficient mice.

*Mycobacterium bovis* BCG or TDM of *M. tuberculosis* in mice was developed regardless of preimmunization with BCG or *M. tuberculosis*, although augmented lesions were observed in preimmunized mice [4,20].

We have reported previously that hypersensitivity granulomas induced in preimmunized mice were larger than the lesions induced in unimmunized mice and immunized mice challenged with irrelevant antigens [20–22]. The hypersensitivity lesions are augmented by the result from the amplification of specific Th1 immune responses [11,19]. The defect in the IL-12-IFN- $\gamma$  axis is critical for defense against mycobacterial infection and

associated with impaired development of granulomas [23–25]. In the present study, TDM challenge could induce granulomatous inflammation in mice, although BALB/c mice produced more prominent lesions than STAT4-deficient mice (Figs. 3 and 4). It is likely that granulomatous inflammation in STAT4-deficient mice is a foreign-body type lesion, because such mice are depressed to mount the Th1-mediated immune response, including DTH and cell-mediated immunity [13].

In contrast, a similar amount of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) and chemokine (MIP-1 $\alpha$ ) was detected in granulomatous lesions of BALB/c

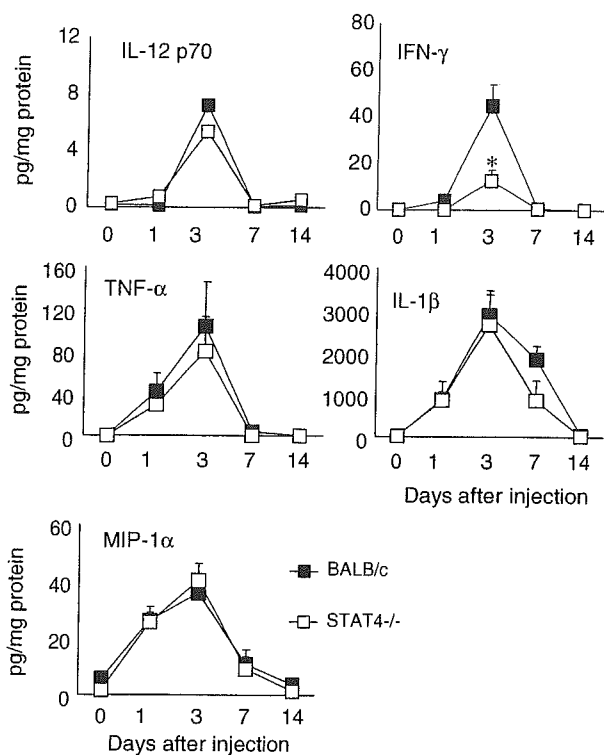


Fig. 5. Protein expression of cytokines and chemokine in the lungs. Data represent the mean  $\pm$  SD compiled from three to four mice per group. The asterisk indicates  $P < 0.05$  compared to preimmunized BALB/c mice challenged with TDM.

and STAT4-deficient mice, because these cytokines play a key role in the expression of both foreign-body and hypersensitivity granulomas [4,19,20,26] and they were regulated by nuclear factor  $\kappa$ B that is independent on the STAT4 signaling pathway [27,28]. Indeed it has been demonstrated that STAT4-deficient mice can produce a comparable amount of proinflammatory cytokines and chemokines from wild-type mice [29].

It is clear that Th1 responses participate in the development of hypersensitivity granulomas induced by TDM in preimmunized BALB/c mice, because STAT4-deficient mice significantly reduced the expression of DTH, granulomatous inflammation, and Th1 cytokine (IFN- $\gamma$ ) response in vivo and in vitro. The mild and lesional expression of IFN- $\gamma$  in STAT4-deficient mice (Fig. 5) may represent the STAT4-independent pathway of IFN- $\gamma$  production [30–32]. It should be noted that there was no significant difference in the level of IL-12 p70 in BALB/c and STAT4-deficient mice challenged with TDM (Fig. 5). In addition, we demonstrated that lymph node cells stimulated with TDM in STAT4-deficient mice significantly reduced production of IFN- $\gamma$  than those of BALB/c mice, although those from both BALB/c and STAT4-deficient mice produced IL-12 p40, but not IL-4, in a similar manner (Fig. 6). The Th1 cytokine response induced by mycobacterial TDM is mediated through the STAT4 signaling pathway. The production of IFN- $\gamma$  from lymph nodes cells

is TDM-specific, because other stimulants, such as SL and  $\alpha$ -GC, showed different patterns of cytokine production. These may be explained by the fact that IL-12 acts the upstream of STAT4 expression in the IL-12-STAT4 cascade/signaling pathway [13].

T, NK and NKT cells are considered to be important as a source of IFN- $\gamma$  [33,34]. In the present study, we found that the time-kinetics of IFN- $\gamma$  production from lymph nodes cells stimulated with TDM peaked at day 3 was different from that produced by NKT cells stimulated with  $\alpha$ -GC peaked at day 5 (Fig. 6). It has been reported that NK cells induce IFN- $\gamma$  within 2 days when mouse splenocytes were stimulated with viable *M. bovis* BCG [35]. Taken together with our previous study that TDM induces foreign-body and hypersensitivity granulomas which are mediated through T cells using euthymic and athymic nude mice [4], these results suggest that the induction of IFN- $\gamma$  by TDM may be dependent on specific T cells. It is an unsolved issue of interaction between TDM and host cells. The receptor molecules related to TDM in humans and mice, and the antigenic epitope of TDM (mycolic acid or trehalose) have not yet been identified, although mycobacterial lipids containing mycolic acid are recognized by CD1b-restricted T cells in humans [36]. Further study will be required to clarify the issue.

In the present study, we have clarified the mechanism of TDM-stimulated expression of IL-12 p70 in vivo, an active form of IL-12, as a Th1 cytokine, although the previous study demonstrated that TDM could induce IL-12 p40 mRNA expression [37]. CD1d-restricted NKT cells stimulated with  $\alpha$ -GC produce both IFN- $\gamma$  and IL-4, and the signaling pathway may be different from the STAT4 pathway, because IL-12 p40 was undetectable by stimulation with  $\alpha$ -GC. It has been shown that activation of murine NKT cells by  $\alpha$ -GC in vivo results in a Th2 pattern in conventional adaptive immune responses [38,39]. It is interested in the decreased protein expression of IL-4 by lymph node cells stimulated with  $\alpha$ -GC in STAT4-deficient mice when compare to those of BALB/c mice (Fig. 6), although the precise mechanism of the decreased expression is not yet elucidated. Further study on the biological effects of SL and  $\alpha$ -GC will be required.

Our previous studies have demonstrated that mycobacterial TDM can induce apoptosis [5] and angiogenesis [40]. Taken together, TDM is a pleiotropic molecule against the host and participates in the pathogenesis.

## 4. Materials and methods

### 4.1. Animals

STAT4-deficient mice with BALB/c background were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Me.) and bred and maintained. Female STAT4-deficient and BALB/c mice of 6–8-weeks-old were used in all

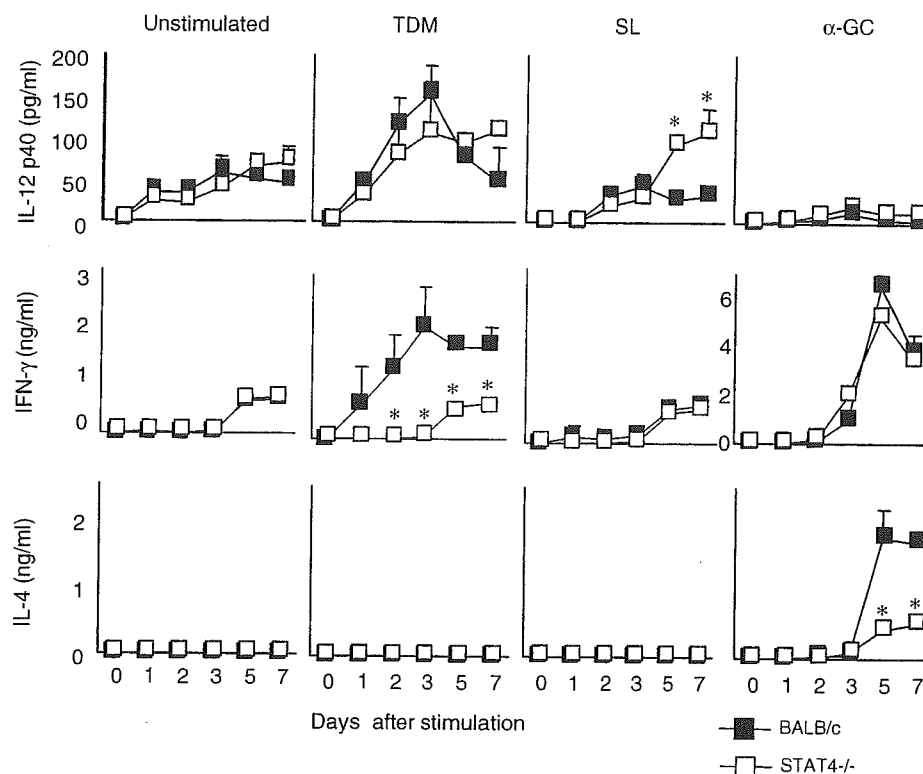


Fig. 6. Expression of Th1 cytokines by lymph node cells stimulated with TDM in vitro. Axillary lymph node cells were prepared 8 days after the immunization with FCA. Cells ( $5 \times 10^6$  cells/ml) were cultured in the presence of 10  $\mu\text{g}/\text{well}$  TDM, 10  $\mu\text{g}/\text{well}$  SL, and 50 ng/ml  $\alpha\text{-GC}$ . Results are expressed as mean  $\pm$  SD compiled from three separate experiments of three to four mice per condition. The asterisk indicates  $P < 0.05$ , compared to preimmunized BALB/c mice challenged with TDM.

experiments. Experiments were conducted according to the standard guidelines for animal experiments of Osaka City University Graduate School of Medicine.

#### 4.2. Mycobacterial glycolipids and KRN7000

*M. tuberculosis* Aoyama B was cultivated in Sauton medium for 5–6 weeks at 37 °C. Mycobacteria were autoclaved, disrupted ultrasonically and then suspended in chloroform–methanol (4:1, 3:1, 2:1, vol%) to extract lipids. The chloroform layer was collected and dried. TDM was partially purified by precipitation with acetone, chloroform–methanol (1:2, vol%) and tetrahydrofuran–methanol (1:2, vol%), and follows to passage through a column of silica gel (Wakogel C-200; Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) with chloroform–methanol (8:2, vol%). The purity of TDM was checked as a single spot on thin-layer chromatography (TLC). Purified TDM contained less than 6 pg of lipopolysaccharide and 1 ng of protein per 1 mg TDM, as determined by a limulus test (Endospey, Seikagaku Co., Tokyo, Japan) for lipopolysaccharide and a protein assay kit (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, CA) for protein. SL was separated by preparative TLC of silica gel (Uniplate; 20  $\times$  20 cm, 250  $\mu\text{m}$ ; Analtech, Inc., Newark, DE). KRN7000, synthetic  $\alpha\text{-GC}$ , was kindly provided by the Pharmaceutical Research Laboratory (Kirin Brewery, Gunma, Japan) [17].

#### 4.3. Immunization and footpad assays for DTH

Mice were immunized by subcutaneous injection of 100  $\mu\text{l}$  of oil-in-water (o/w) emulsion containing FCA into the inguinal region, front footpad, and base of the tail. FCA emulsion was prepared by the mixture of PBS and FCA (1:1, by vol.) that contained heat-killed *M. tuberculosis* Aoyama B in FIA at a concentration of 2 mg/ml [20]. Mice immunized with FIA emulsion were served as controls. Eight days after immunization, mice were challenged with 20  $\mu\text{l}$  of TDM (1 mg/ml) in the form of o/w emulsion containing FIA into the hind footpads. Eight mice were used for each group. Triplicate measurements of footpad thickness were performed with an engineer's micrometer (Mitsutoyo Co., Kanagawa, Japan) before and 24 h after the challenge [4,20]. The difference between the measurements was calculated and expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) in millimeters.

#### 4.4. Induction of pulmonary granulomas

To prepare 100  $\mu\text{l}$  of sample, 100  $\mu\text{g}$  of purified TDM was dissolved in 3.2  $\mu\text{l}$  FIA (Difco Laboratories, Detroit, MI) in a teflon grinder. After adding 3.2  $\mu\text{l}$  of 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), a water-in-oil emulsion was made. Then 93.6  $\mu\text{l}$  of saline containing 0.2% Tween 80

was added at the final concentration (3.2%) of FIA, and water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion was made by mixing [4,40]. As controls, w/o/w micelles without TDM were used. Eight days after immunization, mice were injected intravenously with 100 µg of TDM in 100 µl of w/o/w emulsion or w/o/w micelles alone. To exclude the possibility of boosting with repeated TDM exposures, we used two different sets of mice for DTH footpad assays and induction of lung granulomas throughout the study. Previous reports have indicated that a considerable proportion of the increase in lung weight as a consequence of granulomatous inflammation is due to an increase of cellularity in the organ [19,41,42]. The lung index was calculated as follows: lung index = lung weight (g) × 100 / body weight (g). The areas of granulomatous inflammation were measured using the image analysis program (Scion Image, Scion Corp., Frederick, MD). The level of granulomatous inflammation was quantitated by determining the lesional areas within each section that showed a pixel density greater than a threshold value, and was indicated as a percentage value for the areas of lesional lungs.

#### 4.5. Histopathology

Routine paraffin-embedded, hematoxylin and eosin-stained sections were prepared from the left lobe of lungs. Footpads were removed 24 h after the challenge with TDM and fixed with 10% formalin. Footpads were then decalcified with Plank-Rychlo's solution containing 0.3 M aluminum chloride, 3% HCl and 5% formic acid (Muto Pure Chemicals Co., Tokyo, Japan).

#### 4.6. Protein expression of cytokines and chemokine in the lungs

Aqueous extracts of granuloma-bearing lungs were prepared by the method described previously [4,20]. Briefly, whole lungs (approximately 200–400 mg per lungs) were homogenized in 0.5 ml of PBS using a glass tube with a teflon pestle. Homogenized tissues were then centrifuged at 2000g for 30 min, and the pellet was discarded. Protein concentrations of supernatants were determined by a protein assay kit. Aqueous lung extracts contained 2–4 mg of protein per ml of PBS. The contents of cytokines and chemokine were measured by commercially available enzyme immunoassay (EIA) kits for murine IL-1β, IL-12 p40, IL-12 p70, TNF-α, IFN-γ, and macrophage inflammatory protein (MIP)-1α (Genzyme, Minneapolis, Minn.). The sensitivity was <3.0 pg/ml for IL-1β, <4.0 pg/ml for IL-12 p40, <2.0 pg/ml for IL-12 p70, <5.1 pg/ml for TNF-α, <2.0 pg/ml for IFN-γ, <1.5 pg/ml for MIP-1α, according to the manufacturer's instructions. The EIA was conducted in duplicate. The individual data were expressed as the amount per milligram protein in the lung extract.

#### 4.7. Culture of lymph node cells in vitro

Eight days after the immunization, axillary lymph nodes were obtained from at least three mice per group and single cell suspensions were prepared in Hanks' balanced salt solution by gently teasing the nodes between the frosted ends of two glass slides. This procedure routinely provided single cell suspensions with 90–95% viability as assessed by trypan blue exclusion. Lymph node cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Life technologies, Grand island, NY). TDM or SL dissolved in *n*-hexane was dispersed into 24-well culture plates and the plates were allowed to dry overnight. α-GC dissolved with 0.5% Tween 20/PBS was added to plates. Uncoated plates were served as controls. The optimal concentration of antigens was 10 µg/well; TDM, 10 µg/well; SL, 50 ng/ml; α-GC, that were determined by a dose-responsive study. Lymph node cells (5 × 10<sup>6</sup> cells/ml) were cultured in the plate at 37 °C for 1–7 days. The culture supernatant was assayed for cytokines and chemokine. The EIA was conducted in duplicate.

#### 4.8. Statistical analyses

Data were analyzed with a Power Macintosh G3 using StatView 5.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC) and expressed as the mean ± SD. Data that appeared to be statistically significant were compared by an analysis of variance for comparing the means of multiple groups and were considered significant if *P* values were less than 0.05.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from Ministry of Health, Labour and Welfare (Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Health Sciences Research Grants), Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan Health Sciences Foundation, Inamori Foundation, Osaka City Urban Research, Osaka Tuberculosis Foundation, and The United States–Japan Cooperative Medical Science Program against Tuberculosis and Leprosy.

#### References

- [1] Hingley-Wilson SM, Sambandamurthy VK, Jacobs WR. Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunol* 2003;4:949–55.
- [2] Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:463–96.
- [3] North RJ, Jung Y-J. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2004;22:599–623.

- [4] Yamagami H, Matsumoto T, Fujiwara N, Arakawa T, Kaneda K, Yano I, et al. Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect Immun* 2001;69:810–5.
- [5] Hamasaki N, Isowa K, Kamada K, Terano Y, Matsumoto T, Arakawa I, et al. In vivo administration of mycobacterial cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect Immun* 2000;68:3704–9.
- [6] Indrigo J, Hunter Jr RL, Actor JK. Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages. *Microbiology* 2002;148:1991–8.
- [7] Indrigo J, Hunter Jr RL, Actor JK. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology* 2003;149:2049–59.
- [8] Perez RL, Roman J, Roser S, Little C, Olsen M, Indrigo J, et al. Cytokine message and protein expression during lung granuloma formation and resolution induced by the mycobacterial cord factor trehalose-6,6'-dimycolate. *J Interferon Cytokine Res* 2000;20:795–804.
- [9] Spargo BJ, Crowe LM, Ioneda T, Beaman BL, Crowe JH. Cord factor ( $\alpha,\alpha$ -trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:737–40.
- [10] Karakousis PC, Bishai WR, Dorman SE. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cell Microbiol* 2004;6:105–16.
- [11] Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc Res Tech* 2001;53:241–5.
- [12] Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004;22:503–29.
- [13] O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD, Ortmann RA, Cheng T, Viscornti R, et al. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 2002;109:S121–S31.
- [14] Gollob JA, Veenstra KG, Jyonouchi H, Kelly AM, Ferrieri P, Paka DJ, et al. Impairment of STAT activation by IL-12 in a patient with atypical mycobacterial and staphylococcal infections. *J Immunol* 2000;165:4120–6.
- [15] Kim J, Uyemura K, Van Dyke MK, Legaspi AJ, Rea TH, Shuai K, et al. A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. *J Immunol* 2001;167:779–86.
- [16] Sugawara I, Yamada H, Mizuno S. Relative importance of STAT4 in murine tuberculosis. *J Med Microbiol* 2003;52:29–34.
- [17] Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of  $\alpha\lambda$ 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997;278:1626–9.
- [18] Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000;21:573–83.
- [19] Kobayashi K, Yoshida T. The immunopathogenesis of granulomatous inflammation induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods* 1996;9:204–14.
- [20] Kobayashi K, Allred C, Castriotta R, Yoshida T. Strain variation of bacillus Calmette-Guérin-induced pulmonary granuloma formation is correlated with anergy and the local production of migration inhibition factor and interleukin 1. *Am J Pathol* 1985;119:223–35.
- [21] Kobayashi K, Allred C, Cohen S, Yoshida T. Role of interleukin 1 in experimental pulmonary granuloma in mice. *J Immunol* 1985;134:358–64.
- [22] Sato IY, Kobayashi K, Kasama T, Kaga S, Kasahara K, Kanemitsu H, et al. Regulation of *Mycobacterium bovis* BCG and foreign body granulomas in mice by the *Bcg* gene. *Infect Immun* 1990;58:1210–6.
- [23] Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon  $\gamma$  gene-disrupted mice. *J Exp Med* 1993;178:2243–7.
- [24] Jouanguy E, Doffinger R, Dupuis S, Pallier A, Altare F, Casanova J-H. IL-12 and IFN- $\gamma$  in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol* 1999;11:346–51.
- [25] Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Advances in immunology. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* 2000;343:1703–14.
- [26] Kasahara K, Kobayashi K, Shikama Y, Yoneya I, Soezima K, Ide H, et al. Direct evidence for granuloma-inducing activity of interleukin-1. Induction of experimental pulmonary granuloma formation in mice by interleukin-1-coupled beads. *Am J Pathol* 1988;130:629–38.
- [27] Baldwin Jr AS. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649–81.
- [28] Yang L, Cohn L, Zhang DH, Homer R, Ray A, Ray P. Essential role of nuclear factor  $\kappa$ B in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation. *J Exp Med* 1998;188:1739–50.
- [29] Lentsch AB, Kato A, Davis B, Wang W, Chao C, Edwards MJ, et al. STAT4 and STAT6 regulate systemic inflammation and protect against lethal endotoxemia. *J Clin Invest* 2001;108:1475–82.
- [30] Cai G, Radzanowski T, Villegas EN, Kastelein R, Hunter CA. Identification of STAT4-dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2000;165:2619–27.
- [31] Kaplan MH, Wurster AL, Grusby MJ. A signal transducer and activator of transcription (Stat)4-independent pathway for the development of T helper type 1 cells. *J Exp Med* 1998;188:1191–6.
- [32] Stamm LM, Satoskar AA, Ghosh SK, David JR, Satoskar AR. STAT-4 mediated IL-12 signaling pathway is critical for the development of protective immunity in cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* 1999;29:2524–9.
- [33] Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2001;1:20–30.
- [34] Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Jamieson A, Juarrero MG, Diefenbach A, Raulet DH, et al. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J Immunol* 2003;171:6039–45.
- [35] Yang J, Kawamura I, Zhu H, Mitsuyama M. Involvement of natural killer cells in nitric oxide production by spleen cells after stimulation with *Mycobacterium bovis* BCG. Study of the mechanism of the different abilities of viable and killed BCG. *J Immunol* 1995;155:5728–35.
- [36] Dutronc Y, Porcelli SA. The CD1 family and T cell recognition of lipid antigens. *Tissue Antigens* 2002;60:337–53.
- [37] Oswald IP, Dozois CM, Petit JF, Lemaire G. Interleukin-12 synthesis is a required step in trehalose dimycolate-induced activation of mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1997;65:1364–9.
- [38] Burdin N, Brossay L, Kronenberg M. Immunization with  $\alpha$ -galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur J Immunol* 1999;29:2014–25.
- [39] Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, Van Kaer L, Liu C, et al. Stimulation of host NKT cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J Immunol* 2005;174:551–6.
- [40] Saita N, Fujiwara N, Yano I, Soejima K, Kobayashi K. Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. *Infect Immun* 2000;68:5991–7.
- [41] Behling CA, Perez RL, Kidd MR, Stator Jr GW, Hunter RL. Induction of pulmonary granulomas, macrophage procoagulant activity, and tumor necrosis factor- $\alpha$  by trehalose glycolipids. *Ann Clin Lab Sci* 1993;23:256–66.
- [42] Actor JK, Indrigo J, Beachdel CM, Olsen M, Wells A, Hunter Jr RL, et al. Mycobacterial glycolipid cord factor trehalose 6,6'-dimycolate causes a decrease in serum cortisol during the granulomatous response. *Neuroimmunomodulation* 2003;10:270–82.

私達の研究

# 結核菌の潜伏感染と内因性再燃の分子機構

松本 壮吉\*

毎年約 200 万人の命を奪う結核菌は、現在も 20 億人に潜伏感染している。感染者の 5 ~ 10%が終生の間に結核を発病する。WHO は、今後 20 年間に 7,000 万人の発病を予測し警告している。潜伏結核菌は増殖を停止し休眠菌となる。その結果、菌と宿主双方の生存が確保される。潜伏感染菌の根絶は、結核の根本的な対策となる。なぜなら、この菌は一般に人のみをすみかとしているからだ。潜伏感染菌対策を講じるため、休眠機構を解く必要がある。細胞を凍らすように菌の代謝を生理的にいかに抑制するのか？生物学的にも非常に興味深い。結核菌の核酸およびリポゾーム結合性蛋白質の活性を中心に、休眠機構解明に迫る研究成果を紹介する。

**Key Words** : 再興感染症, 結核, 休眠, パーシスター, 潜伏感染, 再燃

## I 結核菌は人類の 1/3 に感染し、多くの成人型肺結核は内因性再燃による

結核菌は人をすみかとしている。驚くべきことに現在も 20 億人の人類に潜伏感染しており、そこには極めて巧妙な寄生機構が存在する。結核と

いう病気の多くは、潜伏感染菌の再増殖、すなわち“内因性再燃”で、既感染者の 5 ~ 10%が終生の間に発病する(図 1)<sup>1)</sup>。結果として、現在も年間 800 万人が発病し、200 万人が命を失う最大規模の感染症である<sup>2)</sup>。

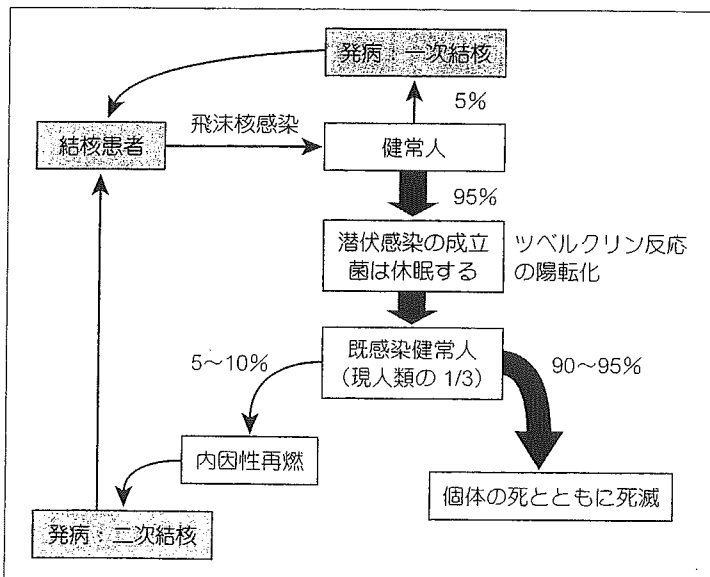


図1 結核菌の生活環と結核の発病

結核菌は、結核患者の痰の飛沫が飛沫核として空中に浮遊し、それを健常人が吸い込むことにより感染する。感染者の約 5%が結核を発症する(一次結核)が、多くは不顕性の経過をたどる。菌は生体内で増殖を停止(休眠)し、潜伏感染が成立する。現在、世界人口の 1/3 に結核菌が感染している。既感染健常人のうち 5 ~ 10%が終生の間に結核を発病する。これを二次結核と呼び、成人の肺結核は多くが二次結核である。

Molecular mechanism of persistent infection of *Mycobacterium tuberculosis* and reactivation

\* Sohkiichi Matsumoto 大阪市立大学大学院医学研究科 感染防御学分野(細菌学講座) 講師

## II 潜伏感染菌対策は根本的な結核対策である

感染した菌は増殖を停止し、一部は休眠する (dormancy)。増殖を続ければ結果的に宿主を死に至らしめ、寄生体にとって都合が悪い。菌は植物の種子のように増殖を停止し、ある時に再び増殖し病気が発症する。潜伏感染した結核菌の根絶は、根本的な結核対策である。なぜなら、結核菌は人以外の生体や生体外の自然環境下での生存が難しいからだ。しかし、菌の潜伏感染の実態は不明であり、休眠菌は化学療法に抵抗性を示す。薬剤の標的代謝が止まっているからである。我々は、潜伏感染菌対策を構築するために、菌の休眠機構を知る必要がある (図2)。

## III 休眠に関わる候補分子の同定

結核菌は、抗酸菌に属する。1998年当時、私は日本で抗酸菌の分子生物学を立ち上げた一人であ

る山田毅教授のもと、結核ワクチン BCG を遺伝子操作により、多価ワクチンとして利用する応用的な研究を行っていた<sup>3)</sup>。BCG は牛型結核菌の弱毒株で、生菌として人に投与する。一方で、生物学の根本に触れるような基礎的課題に取り組みたいという意識もあった。結核菌の休眠は、古くから知られた生命現象であり、前述のように結核対策上、極めて重要である。分子生物学的発想から私は菌の代謝抑制には遺伝子発現の抑制が基本にあると考えた。そして、抗酸菌の DNA 結合性蛋白質の解析に着手した。その結果、ゲル電気泳動で 28kDa (分子量) の蛋白質に強い活性があることを見いだした。また、長期間培養し殆ど増殖しない菌の蛋白質を調べた結果、28kDa 蛋白質を大量に含有していることが分かった (図3 A)。菌の対数的な増殖の後、栄養素の枯渇等で菌数の増加が止む時期を定常期と呼ぶ。これは、休眠の前段階と考えられる。牛型結核菌 BCG も人型結核菌同様に休眠する。BCG や結核菌の定常期に大量

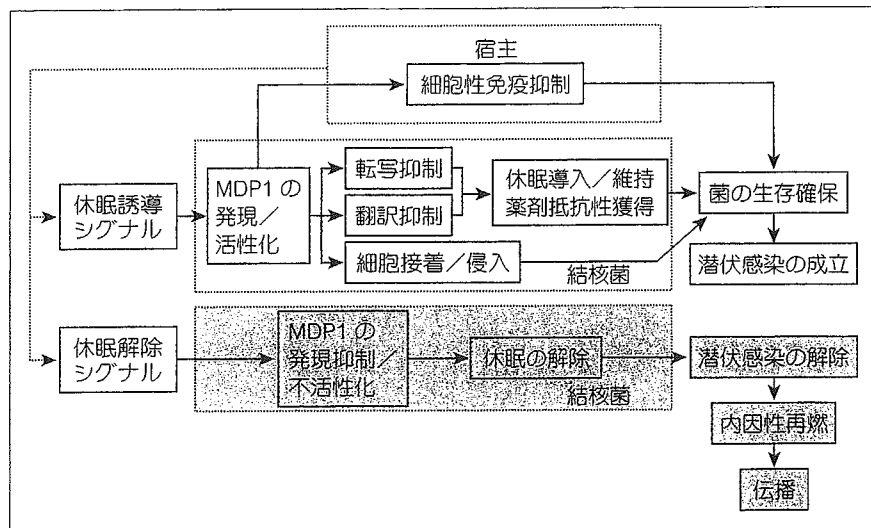


図2 作業仮説モデル；結核菌潜伏感染と内因性再燃における MDP1 の役割

結核は菌-宿主相関上に成り立つ。肺に侵入した結核菌に対し宿主が応答する結果、結核菌は MDP1 の発現 / 活性化を促す。休眠誘導シグナルは、低酸素 (細胞内の酸素分圧が低い) や結核菌殺傷分子の NO ラジカルと推測される。MDP1 は活性化され、菌の高分子合成を抑制し菌は増殖を停止する。菌は自身と宿主 (人) の生存を、自らの増殖を停止することで可能にする。同時に代謝抑制により、擬似的な薬剤抵抗性を獲得する。菌体表面の MDP1 は非貪食性細胞への侵入を促し、菌を安全な潜伏感染場所に誘うとともに、結核防御に必須の細胞性免疫を抑制することで菌の生存を確保する。以下は想像の域を超えないが、内因性再燃の場合は逆に MDP1 の不活化 / 発現抑制が生じ、菌の休眠解除と引き続いて起こる再増殖の結果、結核を発症し、患者由来の痰が飛沫核となり健康人肺に再び感染する。



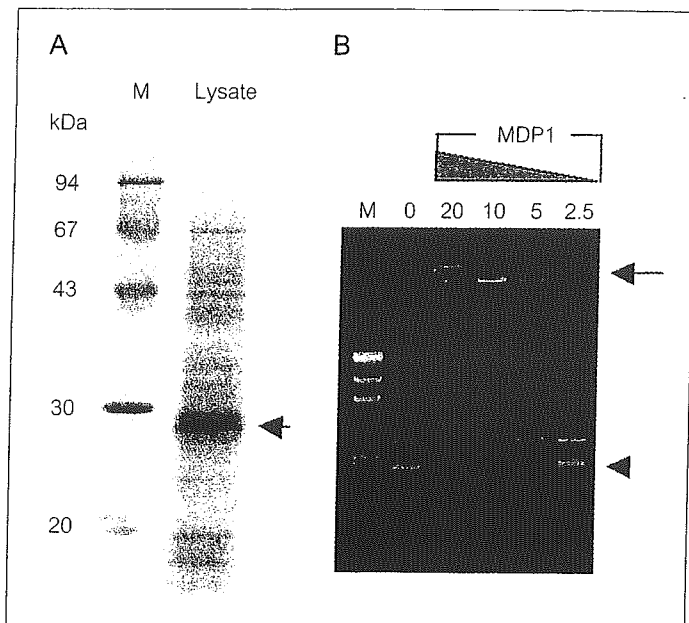


図3 MDP1の結核菌における大量発現とDNA結合性

A. SDS-PAGEゲル電気泳動により結核菌の菌体蛋白質(Lysate)を解析したものである。Mはマーカー蛋白質。矢印で示した最も濃い蛋白質バンドがMDP1である。

B. DNAのゲル電気泳動でMDP1の核酸結合性を検討したものである。MはマーカーDNA。環状DNAを流すと、0レーンのように二つのバンドに分かれて泳動される。これにMDP1を様々な濃度(20, 10, 5, 2.5 $\mu$ M)で加えると、DNAに結合しDNAの移動度が変化する(矢印)。MDP1は下のDNAバンド、すなわちスーパーコイルのDNAに結合しやすい(矢頭)。

の核酸結合性蛋白質が発現していることが分かった。

この蛋白質をBCG菌体から精製し構造を決定した。特異抗体を用いた解析の結果、分子量は菌種で若干異なるが、広く抗酸菌に存在する蛋白質であることが分かり、mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1)と名付けた<sup>4, 5)</sup>(図3B)。

#### IV MDP1は抗酸菌特異的なヒストン様蛋白質である

精製した蛋白質のアミノ酸配列の一部を決定し、その配列を基に遺伝子構造を決定した。データベースを利用して相同性を有する蛋白質を検索した結果、N末端領域は大腸菌の核酸結合性蛋白質HUと、C末端領域はヒトを含む哺乳類のヒストンH1蛋白質と部分的相同性を有していた(図4A)。構造やDNA結合部位の特異性から、MDP1は抗酸菌に特異的分子といえる。また、MDP1は細胞壁、核様体(細菌のDNA)、50Sリボゾームに特異的に存在していることを明らかにした(図4B)。

#### V MDP1はDNA, RNAおよび蛋白質合成を阻害する

我々はまず、DNA合成(複製)におけるMDP1の活性を検討した。DNA合成酵素と鋳型DNAを用い、試験管内DNA合成を行う。その系にMDP1を加えると、濃度依存的に複製を抑制した

(図5A)。5 $\mu$ M以上の濃度でほぼ完全に抑制する。次に、RNA合成(転写)に対する影響を調べた。RNA合成酵素と鋳型DNAを混ぜ、試験管内で転写を行った。この系にMDP1を加えると、これも強く抑制した(図5B)。次に精製リボゾームを用い、RNAを鋳型として試験管内蛋白質合成を行い、MDP1を加えて蛋白質合成(翻訳)に対する作用を観察した。MDP1は翻訳も強く抑制した(図5C)。これらの結果からMDP1は複製、転写、翻訳のいずれの反応も抑制する活性があることが分かった。

#### VI MDP1は細菌の増殖を抑制する

MDP1が実際に菌の増殖を抑制するかを、*Mycobacterium smegmatis*を用いて調べた。BCGのMDP1遺伝子を*M. smegmatis*に導入すると発現し、菌の増殖を実際に抑制した(図5D)。大腸菌にMDP1遺伝子を導入しても、同様に増殖を阻害した<sup>6)</sup>。これらの結果から、MDP1は菌の増殖を負に制御する活性があることが分かった。

#### VII MDP1は定常期以降の菌の生存に必須である

MDP1が抗酸菌の増殖に対する作用を、MDP1欠失株を用いて解析した。液体培地中で野生株と欠失株の増殖を比較した結果、欠失株は定常期以降、速やかに死滅していくことが分かった(図

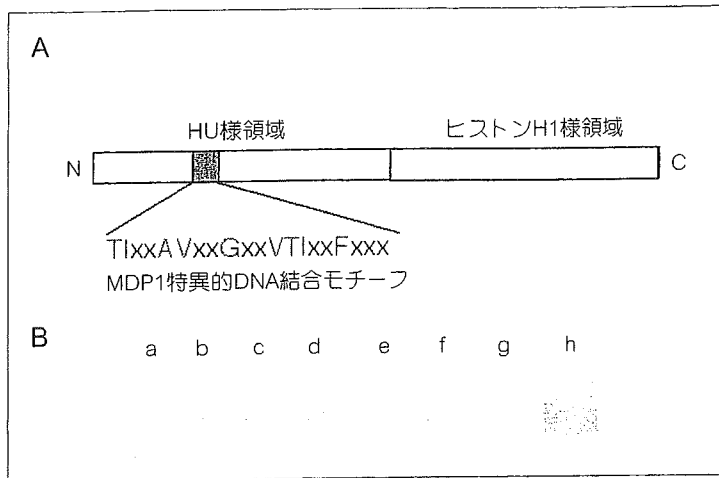


図4 MDP1の構造と局在

A. MDP1の構造。結核菌のMDP1は215アミノ酸からなる。MDP1は、大腸菌の核酸結合性蛋白質HUやヒトのヒストンH1と部分的相同性を有する。31～50の領域はDNA結合サイトで、既存の蛋白質の中でMDP1にのみ見られる配列である。

B. MDP1の局在を抗体で検出したもの(ウエスタンブロット法)。a:分泌蛋白質, b:全菌体蛋白質, c:細胞壁画分, d:膜-核酸画分, e:細胞質画分, f:リボソーム画分, g:30Sリボソーム, h:50Sリボソーム。

6)。つまりMDP1は、定常期への導入もしくは定常期以降の菌の生存に必須であることが判明した。

### VIII 転写阻害を行うMDP1特異的核酸結合配列

MDP1の全合成ペプチドを用いて、活性部位の同定を行った。その結果、核酸に親和性を有する部位が少なくとも4領域存在し、最も強い活性を持つ領域はアミノ酸31～50の領域であった。この領域のアミノ酸を1残基ずつ置換したペプチドを作成し、DNA結合モチーフをTIxxAVxxGxxVTIxxFxxx(x置換可能)と決定した。本モチーフは、抗酸菌のMDP1に完全に保存されていた。しかし、多種のDNA結合性蛋白質には存在せず、特異的DNA結合配列であることが分かった<sup>7)</sup>。MDP1は非特異的にDNAに結合するが、そのターゲットはグアニン(G)とシトシン(C)である<sup>5)</sup>。31～50領域は、MDP1と同様にGとCに結合し、より重要なことは、単独で試験管内でのDNAおよびRNA合成を抑制することである。つまり、MDP1の複製/転写抑制の活性中心は31～50領域と考えられる。

### IX MDP1の蛋白質合成阻害機構

一方、31～50領域に蛋白質合成阻害活性は全くない。また、MDP1の蛋白質合成阻害は、外部からの核酸を加える競合阻害で抑制できない。つまり、翻訳阻害は核酸結合性に依存していない。MDP1は50Sリボソームに結合している(図4B)。我々は、リボソームに結合しないMDP1の変異体は翻訳阻害活性がないことを突き止めてい

る。本活性は休眠中の蛋白質合成抑制とリボソームの保存に関わる、極めて重要な分子機構と考えられるが、公表前であるので具体的な記述は差し控える。

### X 非貪食細胞は潜伏感染菌のリザーバーである

潜伏感染菌は何処に潜んでいるのか? 漠然と病巣である肉芽腫(結核菌を食する細胞[マクロファージ]の集積組織)の中と考えられがちであるが、どうもそうではないらしい。健常者の肉芽腫部位を結核感受性動物に注入しても結核は殆ど発症しない。しかし、肺の健常組織を移入すると、高い確立で結核が生じるといふ。交通事故等で亡くなった健常人の肺を調べたグループは、健常組織のマクロファージや、II型肺胞上皮細胞、繊維芽細胞に結核菌DNAがあることを見いだしている<sup>8)</sup>。潜伏感染菌は、菌の殺傷能力に劣る非貪食性の細胞に積極的に寄生しているようである。非貪食細胞は感染の足がかりが少なく、細胞表面のムコ多糖類を介して結核菌が接着/侵入すると報告されている<sup>9)</sup>。ムコ多糖には、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸などがある。

### XI 結核菌表面のMDP1は肺胞上皮細胞のヒアルロン酸に結合することで菌の細胞侵入を促す

MDP1は細胞壁にも存在している(図4B)。DNAとの構造的相同性から、MDP1が上皮細胞侵入の際ムコ多糖に結合し、細胞侵入を促すのではないかと考えた。ピアコアバイオセンサーを用

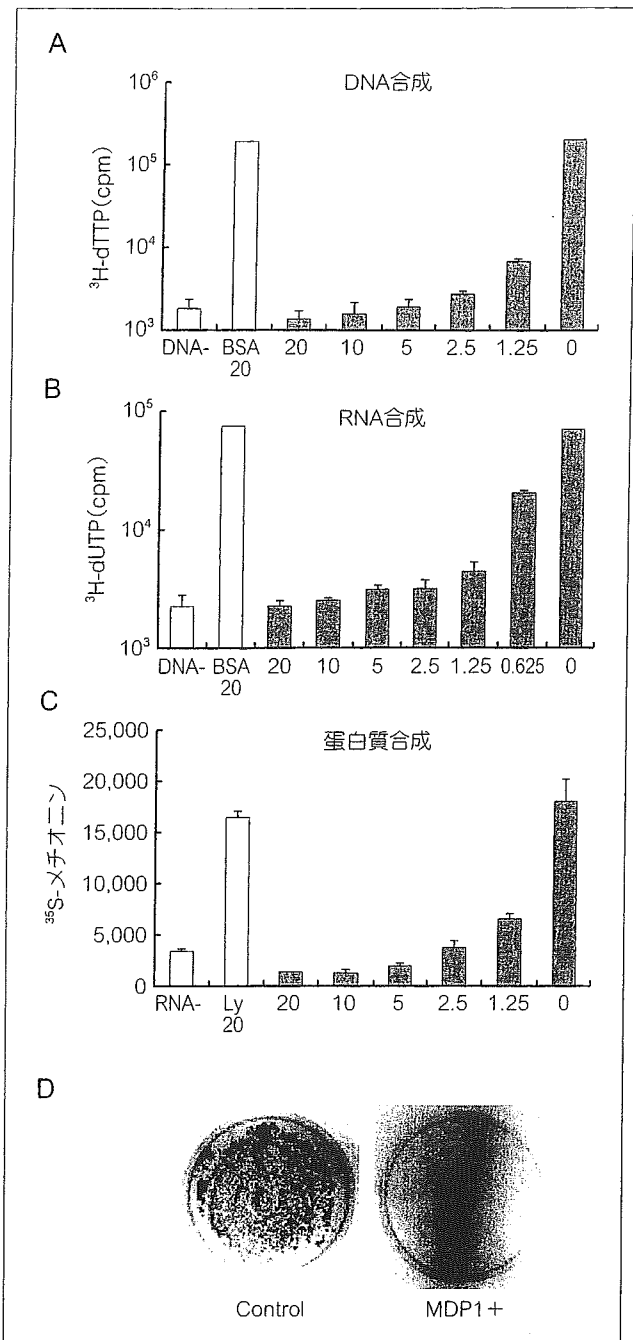


図5 MDP1は生体高分子合成を抑制し、細菌の増殖を止める

A. MDP1によるDNA合成阻害。縦軸はDNA合成量を<sup>3</sup>H-dTTPの取り込み量で表している。DNA-: 鋳型DNA無しの陰性コントロール。BSA20: 牛アルブミンを20 μMの濃度で加えたもの。MDP1を20, 10, 5, 2.5, 1.25および0 μMをそれぞれ加えた。酵素はDNAポリメラーゼ1を用いた。

B. MDP1によるRNA合成阻害。縦軸は、RNAの合成量を<sup>3</sup>H-dUTPの取り込み量で表している。RNA合成酵素は、T7ファージ由来のものを用いた。

C. MDP1による蛋白質合成阻害。縦軸は、蛋白質合成量を<sup>35</sup>S-メチオニンの取り込み量で表している。大腸菌リボゾームとファージRNAを鋳型に蛋白質合成を行った。

D. *M. smegmatis*にBCG由来MDP1を発現させた(MDP1+)。同期間培養しているが、コントロール(左)に比べ、増殖が顕著に抑制されている。

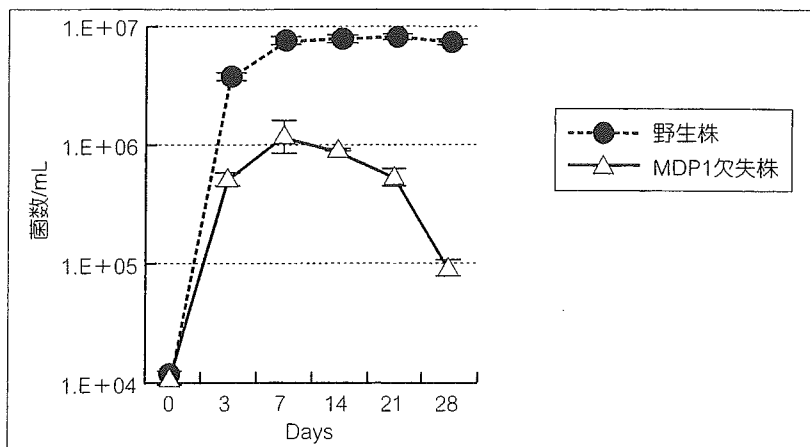


図6 MDP1は定常期以降の抗酸菌生存に必須である

MDP1欠失抗酸菌を液体培地で培養し、生菌数を経時的に算出した。MDP1欠失菌が定常期以降急速に死滅していくことが分かる。

いて、実際に MDP1 が上記のムコ多糖類に結合することが分かった。MDP1 は、実際にヒト II 型肺胞上皮細胞株に結合し(図 7 A), その結合は細胞をヒアルロン酸分解酵素で前処理することで結合が消失することから(図 7 B), ヒアルロン酸を介することが分かった。実際に、ヒアルロン酸や抗 MDP1 抗体により、結核菌のヒト II 型肺胞上皮細胞株への接着 / 侵入は抑制された<sup>10)</sup>。動物においても、菌の肺内増殖がヒアルロン酸(図 8)や MDP1 抗体の気道内投与で阻害された。これらのことから、菌体表面の MDP1 は宿主細胞表面のヒアルロン酸と結合することで、菌の細胞内侵入を促す接着分子であることが明らかとなった<sup>10)</sup>。潜伏感染菌が殺傷能力のあるマクロファージを逃れ、非貪食細胞に MDP1 を介して積極的に侵入している様子が伺える。

## XII MDP1 は宿主応答を制御する

菌は一方向的に眠りにつくのであれば、宿主免疫により殺されてしまうのではないかと考えた。それでは休眠は菌の死を意味する。そこで、休眠菌は宿主応答を制御するのではないかと考えた。実験の結果、MDP1 は細胞性免疫を阻害することが分かった。細胞性免疫は結核菌の排除に必須の宿主応答である。本現象は現在解析中であり、公表前であるので詳細な記述は差し控えるが、潜伏感染菌の生き残り戦略として、重要な意味を持つものと思われる。

## XIII 遺伝子発現の全体制御ー結び

生体の恒常性は、一般に特異的な転写因子の遺伝子発現調節により維持されている。しかし“特異的”では、菌全体の代謝を抑制することは難しい。MDP1 が、結核菌ゲノムに多い G や C に結合

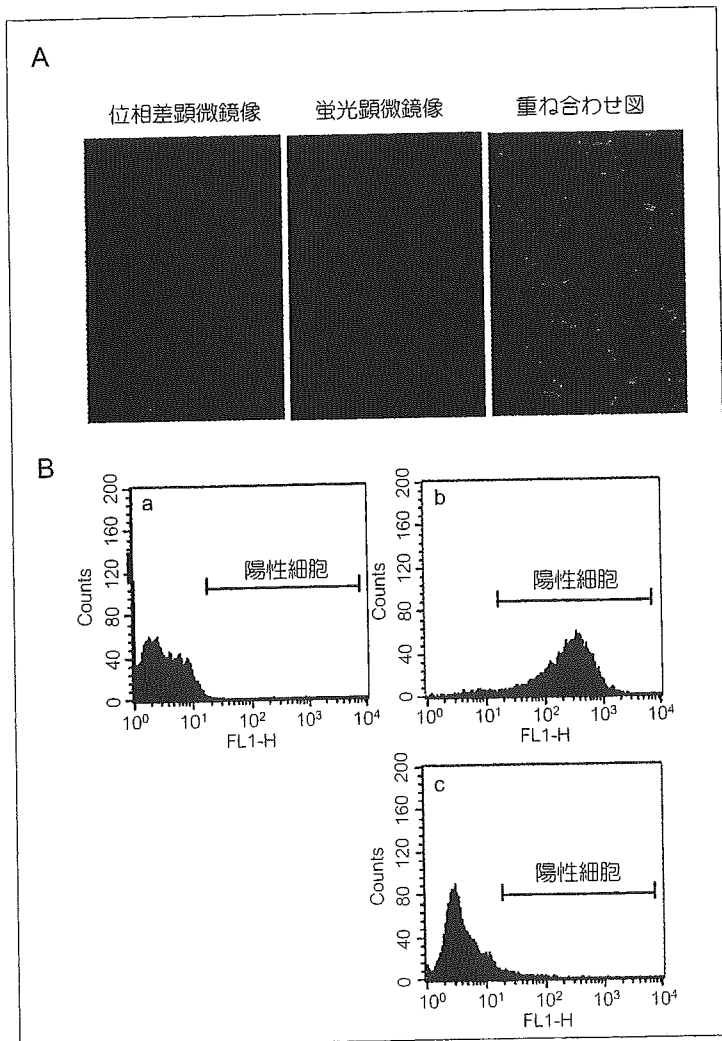


図 7 MDP1 はヒアルロン酸依存的にヒト II 型肺胞上皮細胞株に結合する

A. MDP1 を緑色蛍光色素で標識し、試験管内で培養した肺胞上皮細胞株と 2 時間反応させた。MDP1 が速やかに細胞に接着することが分かる。

B. 蛍光色素で標識した BSA (a, コントロール) と MDP1 (b および c) をヒト II 型肺胞上皮細胞株に加え、緑色蛍光細胞を FACSscan<sup>®</sup> で検出した。MDP1 は細胞に結合するが(b), 細胞をヒアルロン酸分解酵素で処理することにより結合は解除される。

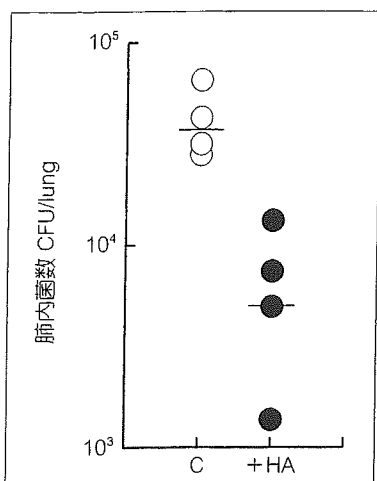


図8 ヒアルロン酸の気道内投与は菌の肺への感染を阻害する

BCGをマウスの気道に感染させる。その際にヒアルロン酸を加えること(+HA)で、菌の肺内増殖が抑制される。肺内菌数は、感染2週間後、動物の肺を取り出し生菌数を算出している。

するために“非特異性”が生じ、その結果生理的溫度下でも、多くの遺伝子の発現制御が可能になると考えられる。休眠中の菌で、最も重要な遺伝子であるDNAを損傷から守る働きもあるだろう。

人の女性のY染色体は2本あり、1本は遺伝子発現が抑制されているが、そこに非特異的なDNA結合性蛋白質が結合しているという。非特異的なDNA結合性蛋白質による遺伝子発現抑制は、様々な生物が利用する基本機構かもしれない。

MDP1の活性は、菌の休眠-潜伏感染機構を矛盾なく証明しうる(図2)。解明すべき現象は山積しているが、結核菌の潜伏感染-内因性再燃のメカニズムを解き、潜伏感染菌対策の構築に直接関わる成果を願い研究を続けている。

### 謝辞

本研究は、旧長崎大学歯学部細菌学講座で山田毅教授のもと、現在は大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学分野 小林和夫教授のもとで行われている。また、本研究は文部科学省科学研究費、ヒューマンサイエンス振興財団、稲森財団により支援されている。

### 文献

- 1) Wayne LG, CD Sohaskey : Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. Annu Rev Microbiol 55 : 139-163, 2001
- 2) Bloom BR : Tuberculosis--the global view. N Engl J Med 346 : 1434-1435, 2002
- 3) Matsumoto S, et al. : Recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin secreting merozoite surface protein 1 (MSP1) induces protection against rodent malaria parasite infection depending on MSP1-stimulated interferon gamma and parasite-specific antibodies. J Exp Med 188 : 845-854, 1998
- 4) 工業所有権：物質特許，出願番号：特願平11-22588，松本 壮吉，山田 毅. 遅発育性抗酸菌ポリペプチド (MDP1) .
- 5) Matsumoto S, et al. : Identification of a novel DNA-binding protein from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. Microbiol Immunol 43 : 1027-1036, 1999
- 6) Matsumoto S, et al. : The gene encoding mycobacterial DNA-binding protein I (MDP I) transformed rapidly growing bacteria to slowly growing bacteria. FEMS Microbiol Lett 182 : 297-301, 2000
- 7) Furugen M, S. Matsumoto, T Matsuo, M Matsumoto, T Yamada : Identification of the mycobacterial DNA-binding protein 1 region which suppresses transcription *in vitro*. Microb Pathog 30 : 129-138, 2001
- 8) Hernandez-Pando R, et al. : Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. Lancet 356 : 2133-2138, 2000
- 9) Menozzi FD, MJ Brennan, C Lochter, et al. : Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. J Exp Med 184 : 993-1001, 1996
- 10) Aoki K, S Matsumoto, Y Hirayama, et al. : Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. J Biol Chem 279 : 39798-39806, 2004

## BCG を用いた抗酸菌の抗原性および病原性に関する研究

大 原 直 也

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔病原微生物学分野  
〒 852-8588 長崎県長崎市坂本 1-7-1

BCG ワクチンは結核に対する安全なワクチンとして、1948 年以降延べ 25 億人以上の人々に使用されてきた。その効果については疑問が持たれており、現行の BCG にかわる著効なワクチンの開発が望まれている。また、抗酸菌による感染症の中で 2 番目に患者数の多いハンセン病についてもワクチンの開発が望まれている。本研究では、BCG の産生する感染防御抗原である Ag85 complex を過剰発現させることで BCG の免疫効果を高めることができることを明らかにした。また、結核菌の特徴である宿主内における休眠状態に同菌の持つ 2 種類の低分子ストレス蛋白質 HspX (Acr) と HrpA が関係し、菌の休眠および再活性化と相関があることを明らかにした。HrpA は一度酸素飢餓状態に陥った後に再度酸素に触れることにより発現することから、菌の再活性化に関与することが示唆された。さらに、骨結核および BCG 接種の副作用である骨炎に関連し、BCG 感染骨芽細胞が、TNF- $\alpha$  受容体ファミリーの 4-1BB (CD137) を産生すること、4-1BB は破骨細胞前駆細胞上の 4-1BB L (CD137L) を介して逆向きのシグナルを細胞内に伝達することにより、破骨細胞への分化・成熟を抑制することを明らかにした。TNF- $\alpha$  受容体ファミリーの、いわゆるリバースシグナルの伝達経路は全く不明であったが、Akt の経路を介すること、NFAT2 の転写を抑制することが明らかになった。

### はじめに

ヒトと抗酸菌とのつきあいは長く、一般には 1 万年から 1 万 5 千年前くらい前からとされている。さらに 10 万年前にはすでに関わり合いを持っていたとする説もある。Robert Koch が 1882 年に結核菌を発見してから 120 年が過ぎ、そのゲノム配列が解明されてから、すでに 7 年が経つ。らい菌が Gerhard Amauer Hansen により発見されたのは結核菌よりも 8 年前で、そのゲノムが解明されたのは 2001 年のことである。しかし、未だに両菌が原因である結核およびハンセン病に悩まされている人の数は多い。WHO の統計によれば、世界人口の 3 分の 1 が結核菌に感染しており、全世界で新たに発生する結核患者は年間 850 万人で、約 180 万人が結核で死亡している。結核による死亡者の 98% 以上は発展途上国であり、特にエイズの合併が拍車をかけている。また多剤耐性結核菌が蔓延しており、その感染者数は約 5000 万人にのぼると考えられている。

結核菌は呼吸器を介して感染するが、感染後すぐに発症

するのは感染者の約 10% であり、ほとんどは持続生残菌 (persister) として冬眠状態 (dormancy) のまま数十年にわたって潜伏している。その中で二次結核 (内因性再燃) として発症するのは 5% 程度のみで、残りの大半のケースはそのまま発症することもなく、宿主の死とともに死滅する。

一方、ハンセン病の日本における最近の年間新規患者数は、日本人では 5 名前後、在日外国人では 10 名前後であり、きわめて少ない。しかし世界的に見れば、現在治療を受けているハンセン病患者は 110 カ国 46 万人であり、また、新規患者数は 2002 年 1 年間に 62 万人と報告されている。2002 年の国外における新患としては、インド (473,658)、ブラジル (38,365)、ネパール (13,830)、タンザニア (6,492)、モザンビーク (5,830)、マダガスカル (5,482) に多数の発生が見られ、これら 6 カ国で世界の 88% を占める。このように結核およびハンセン病は今なお重要な感染症であり、新たな治療法の開発とともに予防法の確立、特に新規ワクチンの開発が強く望まれている。

結核に対しては生菌ワクチンである BCG が広く使用されている。これはパスツール研究所の Albert Calmette と Carnille Guérin によって、強毒菌である牛型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) を 15 年間、231 代にわたってグリセリン胆汁馬鈴薯培地に継代培養して得られた病原性のない弱毒菌である。これまでに 30 億人以上に接種され、持続

Naoya OHARA  
Study on antigenicity and pathogenicity of mycobacteria  
Division of Microbiology and Oral Infection, Nagasaki University  
Graduate School of Biomedical Sciences, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki  
852-8588

性が長く、安価であり、しかも安全性についても十分に証明されているワクチンである。当初は経口投与であったが、すぐに経皮投与に切り替えられ現在に至っている。また、結核だけでなく、他の抗酸菌による感染症に対しても有効と考えられている。しかし、さまざまな疫学調査の結果等からすると、BCG ワクチンの効果については疑問視されており、乳幼児に対しては有効であるが、成人の肺結核に対しては効果があまり無いというのが一般的な見解となっている。

現在の抗酸菌をめぐる問題点として、今述べた、著効なワクチンがないこと、薬剤耐性菌が蔓延していること、他の疾患、特に AIDS との合併による重篤化がある。またどのようにして、どのような状態で長期間ヒト体内に潜伏しているかについては謎の部分が多く、ヒト体内での長期にわたる冬眠状態のメカニズムの解明が重要な課題である。

### 1. 抗酸菌の $\alpha$ 抗原

BCG による感染防御免疫は生菌の接種によって得られるが、死菌では得られないことがよく知られている。生菌と死菌の違いとして、菌体外へ産生分泌される成分の有無があげられる。すなわち、生菌では分泌蛋白質と総称される種々の蛋白質が持続的に菌体外に産生・分泌されるが、死菌ではそれらの分泌はほとんど無い。Pal と Horwitz は結核菌の分泌蛋白質で免疫することによりある程度の結核菌の感染防御ができたことを報告している (30)。分泌蛋白質によって誘導される感染防御免疫はらい菌の感染に対しても有効である (16)。

結核菌、BCG の培養上清中にはさまざまな蛋白質が含まれる。この中で  $\alpha$  抗原は最もよく研究されてきた分泌蛋白質である。 $\alpha$  抗原は約 40 年前に大阪大学微生物病研究所の米田博士と福井博士によって精製、同定された (49)。その結果、結核菌の主要蛋白質抗原であることが明確に示された。 $\alpha$  抗原は抗酸菌に広く分布する蛋白質であり、それぞれの菌種の  $\alpha$  抗原は血清学的に区別することができる (44)。その後、1989 年に当時同研究所にいた山田毅博士と味の素株式会社中央研究所によって BCG の  $\alpha$  抗原遺伝子がクローニングされた (15)。さらにその後海外のグループにより構造の類似した蛋白質抗原が複数あることがわかり、Ag85 complex と総称されている。Ag85 complex は 85A, 85B= $\alpha$  抗原, 85C の 3 種類の蛋白質からなり、結核菌では全分泌蛋白質の約 30% を占める。*M. kansasii* や *M. avium*, *M. intracellulare* では 85B= $\alpha$  抗原の分泌量は結核菌に比し極度に多く、逆に 85A と 85C の産生は僅かである (27)。Nagai らは MPT51 の N 末端アミノ酸配列が Ag85 complex に類似していることを報告したが、その遺伝子クローニングの結果、蛋白質全体にわたり相同性を有することから、Ag85 complex に準ずる蛋白質であることが明らかとなった (17, 22)。

ところで、非結核性抗酸菌の数菌種について  $\alpha$  抗原遺伝

子のクローニングをおこなってみると、 $\alpha$  抗原 C 末端部位に種特異的エピトープが存在していた (10, 11, 21, 23, 41)。菌にとっても Ag85 complex は重要な蛋白質であり、ミコール酸の合成に携わる酵素であることが明らかとなり (3)、また、フィブロネクチン結合能が強いことから感染に重要な役割をしていることが示唆されてきた (20)。Ag85 complex は IFN- $\gamma$  の産生を誘導し、感染を予防する防御抗原であることもわかってきた (7)。Ag85 complex の感染防御免疫誘導能は高く、マウスの感染実験では 85A,  $\alpha$  抗原, 85C のいずれの蛋白質も 2 mg 前後の免疫でらい菌の増殖を抑制した (19)。

### 2. 組換え BCG ワクチン

この約 20 年間に様々なタイプの結核ワクチンの開発が世界中でおこなわれてきた。主要なものとして、DNA ワクチン、菌体蛋白質あるいは細胞壁脂質等を使用したサブユニットワクチン、免疫惹起能の強い蛋白質あるいはサイトカインを産生する組換え BCG ワクチン、弱毒 (栄養要求株) 化したマイコバクテリア、非定型抗酸菌の利用がある。我々が後述の組換え BCG ワクチンを作製した段階で現行の BCG ワクチンを凌駕するものはなかった。

組換え BCG ワクチンの作製は 1980 年後半、抗酸菌に遺伝子組み換え技術が導入されたことによって可能となった。まず米国 Bloom のグループが BCG に形質転換可能な抗酸菌一大腸菌シャトルベクターを開発した (36)。ほぼ同時にフランスパスツール研究所でも同様のベクターが開発された (31)。1991 年、Bloom のグループと Young のグループによって、これらのベクターを利用して外来遺伝子を導入した BCG を作成し、宿主に免疫応答を誘導させた報告がなされた (1, 37)。前述の山田毅博士と味の素株式会社中央研究所のグループは  $\alpha$  抗原の分泌シグナルを応用し、外来抗原を BCG 菌体外に分泌する系を開発した (14)。Stover らは 1993 年に *Borrelia burgdorferi* の表層リポ蛋白質を発現する BCG を動物に投与し、感染を防御できたと報告したが、これが組換え BCG による感染防御の最初の報告である (38)。これまでにさまざまな病原体および疾患を対象に組換え BCG の作製が行われている (29)。

BCG ワクチンの特徴に長期にわたる免疫の持続性があるが、組換え BCG でもその特徴が受け継がれている。HIV-1 の gag p17 の B 細胞エピトープと  $\alpha$  抗原のキメラ蛋白質を発現する組換え BCG を接種したマウスでは最終免疫後このエピトープを認識する抗体の産生が 14 ヶ月以上持続した (47)。またマラリアのエピトープに対しても 7 ヶ月以上にわたり抗体の産生が持続した (13)。

ところで、菌体成分の中で感染防御抗原が明らかとなれば、それを多く産生させることで、BCG のワクチンとしての効果を上昇できる可能性がある。Ag85 complex が感染防御抗原であることから、Ag85 complex 過剰発現株は現行の BCG を上回るワクチン効果を有することが期待できる。Ag85 complex の遺伝子をつないだプラスミドで BCG を形質

転換することによって Ag85 complex 過剰産生株を作製した。BCG の Ag85 complex 遺伝子を使用したか、自身のプロモータを使用した場合には過剰発現するものの、その発現量は十分ではない(26)。そこで、強力なプロモータである *M. kansasii* と *M. avium* の  $\alpha$  抗原プロモータを用いたところ、発現量は増加した(25)。Ag85A 過剰発現株 rBCG/85A あるいは Ag85A,  $\alpha$  抗原 (=85B) および MPB51 の 3 抗原を過剰発現する rBCG/BA51 について感染防御実験をおこなった。rBCG/85A と rBCG/BA51 の免疫効果は C57BL/6 マウスのフットパッドに感染させたい菌の増殖抑制効果で判定した。これらの組換え BCG を  $5.0 \times 10^7$  個接種し、1ヵ月後フットパッドに  $5.0 \times 10^3$  個のらい菌を感染させる。そして 25 週後の抗酸菌数を数える。らい菌の増殖速度が遅いため、実験には長期間必要とする。その結果、親株である BCG Tokyo 株を越える効果があった(図 1)(24)。さらにその効果は初回免疫 5ヵ月後に同じ rBCG/85A を追加免疫することで増強された。抗酸菌に対する感染防御には Th1 タイプの免疫が重要であるが、rBCG/85A 接種マウス脾細胞の IFN- $\gamma$  および NO 産生能は長期間保たれており、BCG 接種マウスよりも強力であった。それでは 1つの菌から複数の感染防御抗原を過剰発現すればより高い効果が得られるのか。rBCG/BA51 は上述のように 3種類の抗原を過剰発現しているが、rBCG/BA51 による免疫応答は rBCG/85A によるものよりも高い結果となった(図 2)(25)。なお Horwitz らはほぼ同時期に異なる作製法により Ag85B を過剰発現する組換え BCG を作製し、結核菌に対する感染防御効果が強いことを報告している(6)。

### 3. 低分子ストレス蛋白質

結核菌に感染したほとんどの人の体内では結核菌は持続生残菌 (persister) として冬眠状態 (dormancy) のまま数十年にわたって潜伏している。どのようにして、どのような状態で長期間ヒト体内に潜伏しているか、また何がきっかけで冬眠状態の菌が目覚め、増殖を始めるのか、未だに解明されていない部分が多い。冬眠状態につながる環境として、酸素飢餓状態が言われている(32, 35, 48)。結核菌は好気性菌であるが、徐々に酸素分圧が低下した場合には嫌気状態下でも死滅することなく長期間生存する。他に栄養物の枯渇(4)、低 pH(5)、酸化窒素の低下(46)等の環境との関係が示されている。

ストレス蛋白質は種々の環境の変化、適応に必要であるが、低分子ストレス蛋白質である  $\alpha$ -crystallin (HspX) は酸素飢餓にしたがい発現してくる(39, 50)。 $\alpha$ -crystallin はマクロファージ内での菌の生存に必要であることが示されている(51)。さらに、蛋白質合成の場であるリボゾームと結合する(39)。これらのことから  $\alpha$ -crystallin は結核菌の dormancy と密接に関係していると考えられている。ところで、BCG に熱ストレスを与えると様々なストレス蛋白質が誘導される。そのひとつ HrpA は熱ストレスで発現するとともにリボゾームへ集積してくる(28)。N 末端のアミノ酸

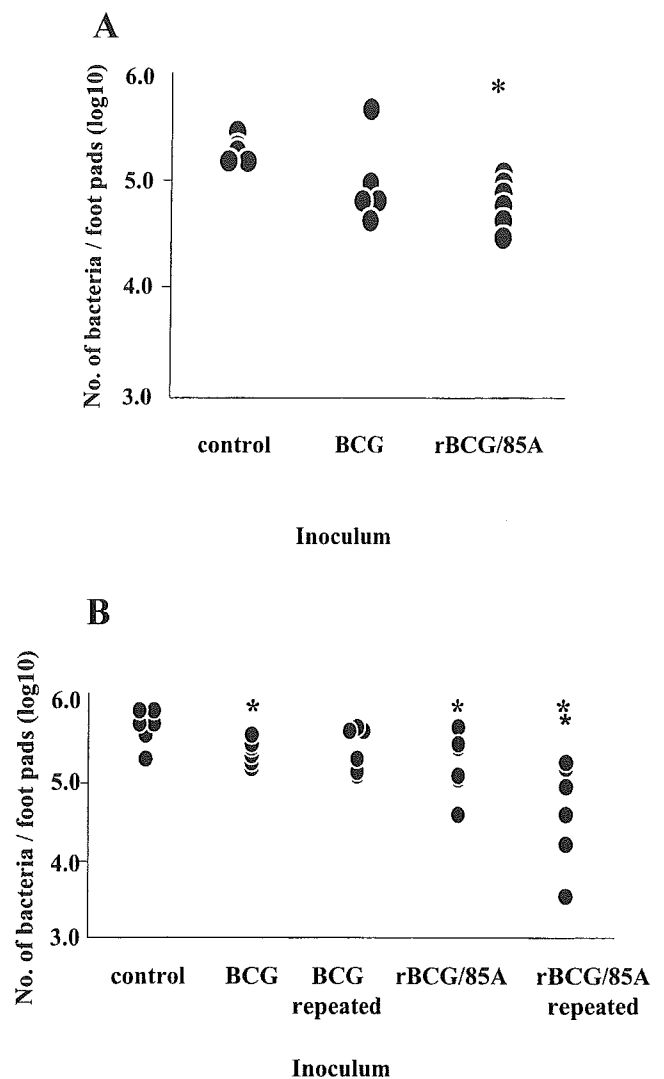


図 1. らい菌感染に対する rBCG/85A 免疫による感染防御効果。(A) 短期間における免疫効果。親株である BCG あるいは rBCG/85A を 6 週齢の C57BL/6 マウスの胸部皮内に 1 個体につき  $5.0 \times 10^7$  個接種した。1ヵ月後、各群のマウスのフットパッドに  $5.0 \times 10^3$  個の *M. leprae* 生菌を接種し、25 週後にフットパッドから検出された抗酸菌数を測定した。rBCG/85A 接種群では対照群と比較して検出される菌数が有意に ( $P < 0.01$ ) 減少した。(B) BCG あるいは rBCG/85A を接種した 5ヵ月後、各群の半数のマウスに同量の BCG あるいは rBCG/85A を接種した。さらに 1ヵ月のちに(最初の接種から 6ヵ月後)、各群のマウスのフットパッドに  $5.0 \times 10^3$  個の *M. leprae* 生菌を接種し、30 週後にフットパッドから検出された抗酸菌数を測定した。rBCG/85A 接種群では対照群と比較して検出される菌数が有意に (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ) 減少した。黒丸はフットパッド中の抗酸菌数を示す。文献 25 より引用、改変。

配列から HrpA は  $\alpha$ -crystallin のホモログであることがわかった。 $\alpha$ -crystallin とは異なり酸素飢餓によって誘導されることはなかったが、興味深いことに BCG を一定期間酸素飢餓状態にした後に、再度酸素に暴露することで発現量が増加した(図 3)(40)。このことは菌の再燃化と関係があることを示唆するが、具体的な役割については不明である。

### 4. 抗酸菌の感染と骨代謝の関係

ところで結核菌は肺以外にも感染し、ほぼすべての臓器



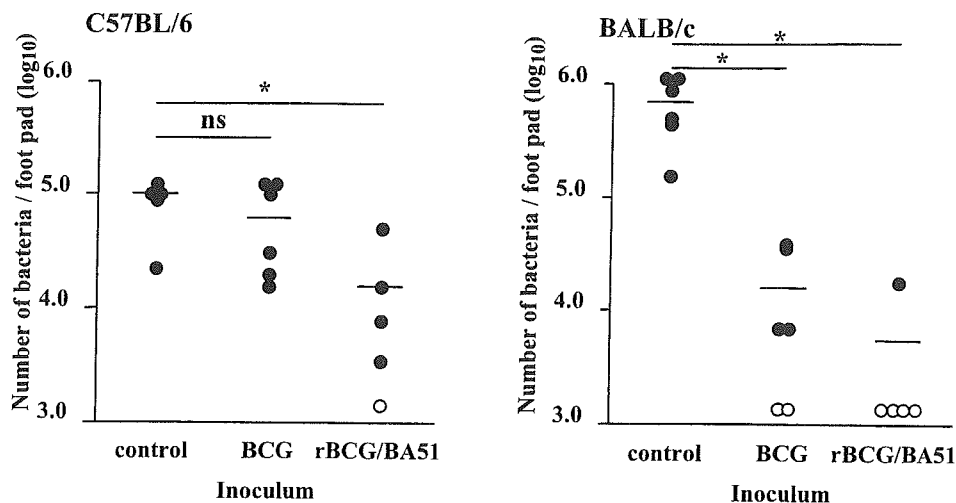


図2. らい菌感染に対する rBCG/BA51 免疫による感染防御効果。黒丸はフットパッド中の抗酸菌数を示す。白丸はフットパッド中に抗酸菌が認められなかったことを示す。文献 25 より引用。

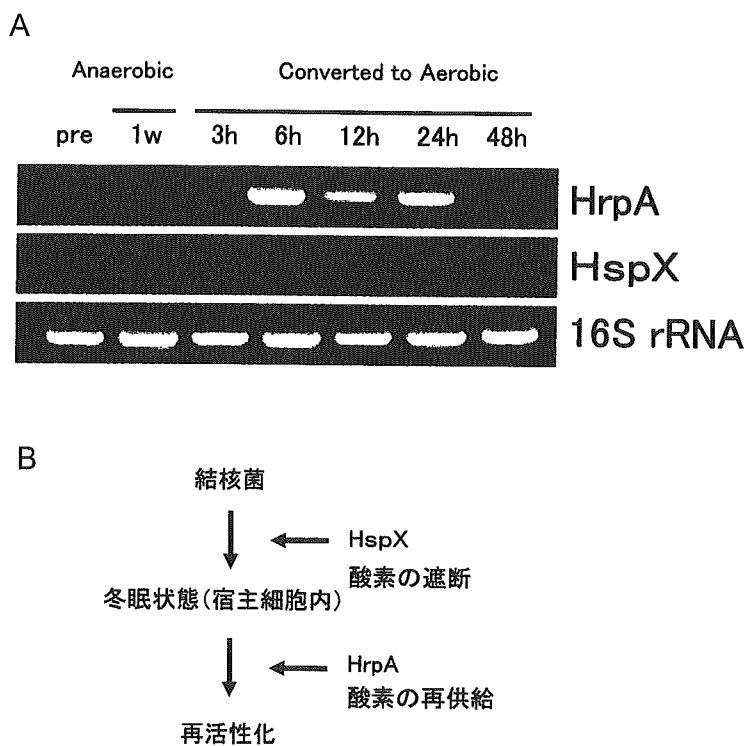


図3. 酸素分圧の変化に対する BCG 低分子ストレス蛋白質の変化。(A) BCG より RNA を抽出し、RT-PCR をおこなった。Sauton 培地で好氣的に2週間培養した BCG を嫌気ジャーの中に移動させると HspX が発現し、一週間後においてもメッセージ RNA は存在している (Anaerobic 1W)。その後好氣状態に戻しても変化しない (converted to aerobic)。一方 HrpA は嫌気条件下では発現しないが、好氣状態に戻すと一時的に発現する。(B) HspX と HrpA の働きについての模式図。HspX と HrpA は同じ低分子ストレス蛋白質ファミリーであるが、菌の冬眠状態に対しては異なる働きをしている可能性がある。

に感染しうる。特に骨組織に感染した場合には脊椎カリエス等の特徴的な病理像を呈する。また BCG ワクチンの副作用として骨炎を生じる。このような病理像がどのようにして生じてくるのかは不明である。このことへの興味がかきかけで骨関連細胞の研究を始めた。骨組織の中で骨芽細胞は骨添加に、破骨細胞が骨吸収を担う中心的かつ直接的な細胞であり、健全な骨は両者がバランスよく働いている。このバランスが崩れると骨の過形成あるいは過吸収

となる。破骨細胞を主にコントロールしているのは骨芽細胞である。破骨細胞は骨芽細胞から産生される M-CSF と RANKL の刺激により前駆細胞である単球・マクロファージ系の前駆細胞から単核の破骨細胞に分化し、その後破骨細胞相互に融合を繰り返して、多核の成熟破骨細胞となる。破骨細胞分化のマーカーの1つに酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) が知られている。

ところで、BCG は骨芽細胞に効率よく感染する (9)。感染骨芽細胞ではその分化マーカーの発現が抑制されるとともに、急性の炎症に関わる蛋白質の発現が顕著に増加した (33)。また TNF 受容体ファミリーである 4-1BB (CD137) が産生されるようになる。4-1BB は抗原提示の際の補助刺激分子として知られている。*in vitro* の M-CSF/RANKL 刺激による破骨細胞形成系において 4-1BB は濃度依存的に破骨細胞の形成を顕著に抑制した。(図 4)

4-1BB の作用は単球・マクロファージ系細胞の細胞膜上にあるリガンド (4-1BBL (CD137L)) を介するリバースシグナルにより、破骨細胞分化に必須の転写因子である NFAT2 の産生が抑制されることによる。TNF スーパーファミリーのリバースシグナルの伝達経路は不明であった。4-1BBL の場合、TRAF6, NF $\kappa$ B シグナリング, MAP キナーゼカスケードに非依存性であるが、Akt を抑制することがわかった。また、4-1BBL 分子内のカゼインキナーゼドメインの活性化を介してフォスファターゼが活性化することが必要であることが明らかになった。しかし、Akt のカスケー

ドが実際に 4-1BB による破骨細胞形成抑制に働いているのかを含め、シグナル伝達経路は虫食い状態であり、今後明らかにしていく必要がある。またリアルタイムに生細胞内における菌の動きをダイナミックに追うことも必要であろう (12, 34)。ところで、細菌感染により骨芽細胞から 4-1BB が産生されるという現象は抗酸菌に特異的ではなかった。また、一般に細菌感染による炎症では骨吸収の方向に進むと考えられている。今回の破骨細胞の形成抑制は逆の方向性を示している。さらに、これまでに INF- $\beta$ , INF- $\gamma$ , IL-12, IL-18 等のサイトカインが同様に破骨細胞の形成を抑制することが示されている (8, 18, 42, 43, 45)。推測の域を出ないが、骨への感染が起きた場合にこれらの破骨細胞分化抑制性のサイトカインが産生されることにより、骨代謝の平衡状態が保たれる。しかし、炎症が進みサイトカインのバランスが崩れると骨吸収が促進されることになる。また結核による特異的な病態形成については長期にわたる慢性感染の間に繰り返される急性期に吸収が進み、それが積み重ねることによってできあがると考えられる。このことを

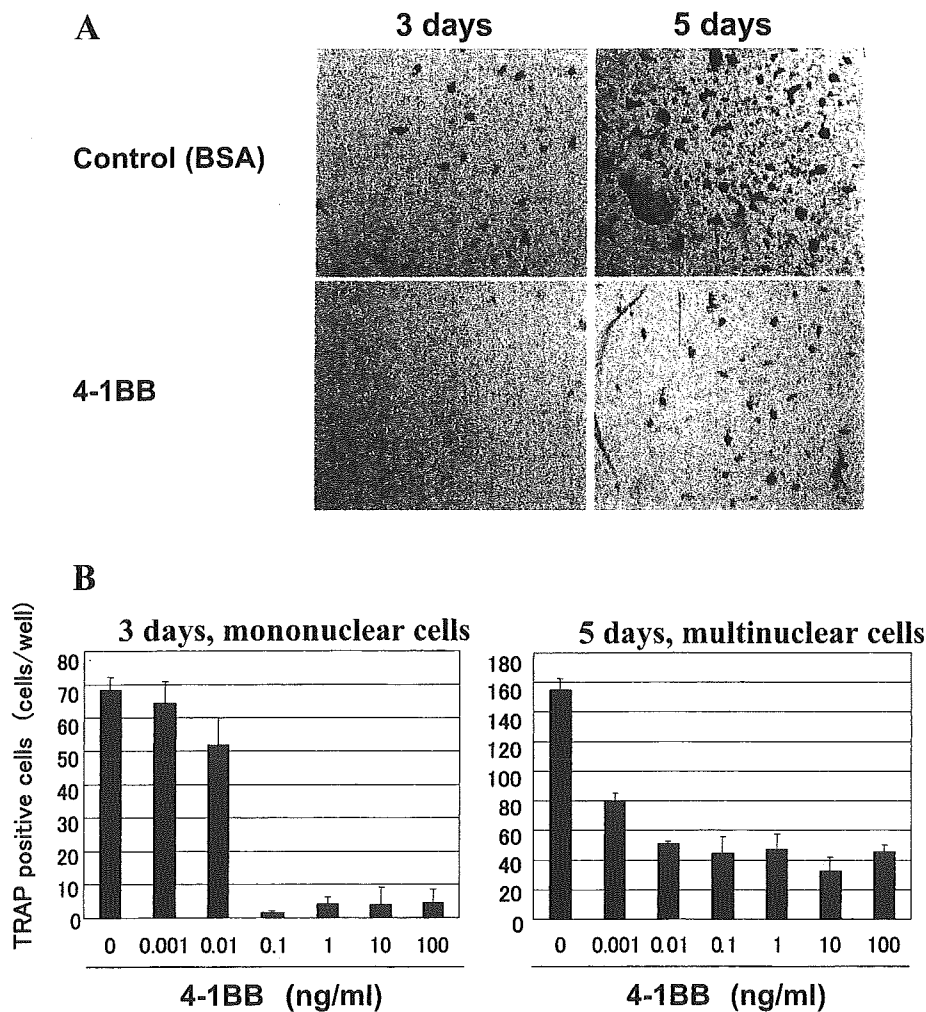


図 4. 4-1BB の破骨細胞分化に対する抑制効果。G-10 カラムを通過したマウス骨髄培養を BSA あるいは 4-1BB でコートしたプレート上で M-CSF (10 ng/ml) と RANKL (20 ng/ml) 存在下に 3 日間あるいは 5 日間培養した。(A) BSA でコートしたプレート上では 3 日目に TRAP 陽性の単核細胞が、5 日目に TRAP 陽性の多核細胞が多数観察されるが、4-1BB でコートしたプレート上では 3 日目における TRAP 陽性単核細胞、および 5 日目における TRAP 陽性多核細胞の形成が著しく阻害される。(B) 4-1BB による単核および多核の TRAP 陽性細胞の形成阻害は濃度依存的である。文献 33 より引用。

証明できる動物モデルを構築して示していきたい。

## おわりに

冒頭にも述べたように Gerhard Amauer Hansen が 1874 年にらい菌を発見し、Robert Koch が 1882 年に結核菌を発見してから今日まで多くのことが解明されてきた。しかし、基本的なことがまだ解明されていないことが多いことも事実である。たとえば、抗酸菌は発育速度が遅い。特に病原性の強い菌にこの傾向が強い。なぜ遅発育性になったのか、遅発育性を担っているメカニズムは何か。これは細菌学的には基本的な疑問であろう。Matsumoto らによって発見された MDP1 が重要な鍵を握っているようであるが (2)、未だに明確な解答は得られていない。らい菌は未だ培養が成功していない菌である。逆に結核菌は Sauton 培地というアスパラギン、クエン酸ナトリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、クエン酸鉄アンモニウム、グリセリンのみからなる培地で十分に増殖する。この違いは何に依存するのか。両菌ともにヒトの体内に住み着くことに高度に適応した菌である。らい菌がその生活を宿主に完全に依存するが如く、ゲノム上の遺伝子をそぎ落としていった結果だと言い切ってしまうのかもしれない。本研究に関連したことでは、どのようなかたちで長期間ヒトの体内に姿をくらし生きていくのか、未だに謎である。また特異的な骨病変ができあがる過程も不明である。今挙げた以外にも基本的なことではあるが、いまだに解明されていないことは多い。今後もこれらの謎解きに挑戦していきたい。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導いただきました山田毅名誉教授（長崎大学）に深く感謝いたします。また、本賞に御推薦いただきました小林和夫教授（大阪市立大学大学院医学研究科）に厚く御礼を申し上げます。最後に本研究に協力してくださいました中山浩次教授をはじめ教室員の方々および共同研究で御協力いただきました先生方に感謝の意を捧げます。

## 文 献

- 1) Aldovini, A., Young, R.A. (1991): Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature* **351**, 479-482.
- 2) Aoki, K., Matsumoto, S., Hirayama, Y., Wada, T., Ozeki, Y., Niki, M., Domenech, P., Umemori, K., Yamamoto, S., Minoda, A., Matsumoto, M., Kobayashi, K. (2004): Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* **279**, 39798-39806.
- 3) Belisle, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P.J., Besra, G.S. (1997): Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**, 1420-1422.
- 4) Betts, J.C., Lukey, P.T., Robb, L.C., McAdam, R.A., Duncan, K. (2002): Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol. Microbiol.* **43**, 717-731.
- 5) Fisher, M.A., Plikaytis, B.B., Shinnick, T.M. (2002): Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J. Bacteriol.* **184**, 4025-4032.
- 6) Horwitz, M.A., Harth, G., Dillon, B.J., Maslesa-Galic, S. (2000): Recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13853-13858.
- 7) Horwitz, M.A., Lee, B.W., Dillon, B.J., Harth, G. (1995): Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 1530-1534.
- 8) Horwood, N.J., Elliott, J., Martin, T.J., Gillespie, M.T. (2001): IL-12 alone and in synergy with IL-18 inhibits osteoclast formation *in vitro*. *J. Immunol.* **166**, 4915-4921.
- 9) Hotokezaka, H., Kitamura, A., Matsumoto, S., Hanazawa, S., Amano, S., Yamada, T. (1998): Internalization of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin into osteoblast-like MC3T3-E1 cells and bone resorptive responses of the cells against the infection. *Scand. J. Immunol.* **47**, 453-458.
- 10) Kitaura, H., Ohara, N., Matsuo, T., Tasaka, H., Kobayashi, K., Yamada, T. (1993): Cloning, sequencing and expression of the gene for  $\alpha$  antigen from *Mycobacterium intracellulare* and use of PCR for the rapid identification of *Mycobacterium intracellulare*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 1466-1473.
- 11) Kitaura, H., Ohara, N., Naito, M., Kobayashi, K., Yamada, T. (1998): Serological analysis of C-terminal region of  $\alpha$  antigen from *Mycobacterium avium-intracellulare* complex and *Mycobacterium tuberculosis*. *APMIS* **106**, 893-900.
- 12) Lee, J.-S., Kamijo, K., Ohara, N., Kitamura, T., Miki, T. (2004): MgcRacGAP regulates membrane blebbing through RhoA during cytokinesis. *Exp. Cell. Res.* **293**, 275-282.
- 13) Matsumoto, S., Yanagi, T., Ohara, N., Wada, N., Kanbara, H., Yamada, T. (1996): Stable expression and secretion of the B-cell epitope of rodent malaria from *Mycobacterium bovis* BCG and induction of long-lasting humoral response in mouse. *Vaccine* **14**, 54-60.
- 14) Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., Terasaka, K., Totsuka, M., Kobayashi, K., Yukitake, H., Yamada, T. (1990): Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. *Infect. Immun.* **58**, 4049-4054.
- 15) Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., Yamada, T. (1988): Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular  $\alpha$  antigen. *J. Bacteriol.* **170**, 3847-3854.
- 16) Matsuo, K., Nomaguchi, H., Yukitake, H., Ohara, N., Matsumoto, S., Mise, K., Yamada, T. (1997): Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by immunization with ribosomal fraction and culture filtrate from *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine* **15**, 1214-1217.
- 17) Nagai, S., Wiker, H.G., Harboe, M., Kinomoto, M. (1991): Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **59**, 372-382.
- 18) Nagata, N., Kitaura, H., Yoshida, N., Nakayama, K. (2003): Inhibition of RANKL-induced osteoclast formation in mouse bone marrow cells by IL-12: involvement of IFN- $\gamma$  possibly induced from non-T cell population. *Bone* **33**, 721-732.
- 19) Naito, M., Matsuo, K., Ohara, N., Nomaguchi, H., Yamada, T. (1999): The antigen 85 complex vaccine against experimental

- Mycobacterium leprae* infection in mice. *Vaccine* **18**, 795–798.
- 20) Naito, M., Ohara, N., Matsumoto, S., Yamada, T. (1998): The novel fibronectin-binding motif and key residues of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **273**, 2905–2909.
  - 21) Naito, M., Ohara, N., Matsumoto, S., Yamada, T. (1998): Immunological characterization of  $\alpha$  antigen of *Mycobacterium kansasii*: B-cell epitope mapping. *Scand. J. Immunol.* **48**, 73–78.
  - 22) Ohara, N., Kitaura, H., Hotokezaka, H., Nishiyama, T., Wada, N., Matsumoto, S., Matsuo, T., Naito, M., Yamada, T. (1995): Characterization of the gene encoding the MPB51, one of the major secreted protein antigens of *Mycobacterium bovis* BCG, and identification of the secreted protein closely related to the fibronectin binding 85 complex. *Scand. J. Immunol.* **41**, 433–442.
  - 23) Ohara, N., Matsuo, K., Yamaguchi, R., Yamazaki, A., Tasaka, H., Yamada, T. (1993): Cloning and sequencing of the gene for  $\alpha$  antigen from *Mycobacterium avium* and mapping of B-cell epitopes. *Infect. Immun.* **61**, 1173–1179.
  - 24) Ohara, N., Matsuoka, M., Nomaguchi, H., Naito, M., Yamada, T. (2000): Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by recombinant Bacillus Calmette-Guérin (BCG). *Vaccine* **18**, 1294–1297.
  - 25) Ohara, N., Matsuoka, M., Nomaguchi, H., Naito, M., Yamada, T. (2001): Protective responses against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice induced by recombinant Bacillus Calmette-Guérin over-producing three putative protective antigen candidates. *Vaccine* **19**, 1906–1910.
  - 26) Ohara, N., Nishiyama, T., Ohara-Wada, N., Matsumoto, S., Matsuo, T., Yamada, T. (1997): Characterization of the transcriptional initiation regions of genes for the major secreted protein antigens 85C and MPB51 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Microb. Pathog.* **23**, 303–310.
  - 27) Ohara, N., Ohara-Wada, N., Kitaura, H., Nishiyama, T., Matsumoto, S., Yamada, T. (1997): Analysis of the genes encoding the antigen 85 complex and MPT51 from *Mycobacterium avium*. *Infect. Immun.* **65**, 3680–3685.
  - 28) Ohara, N., Ohara, N., Naito, M., Miyazaki, C., Matsumoto, S., Tabira, Y., Yamada, T. (1997): HrpA, a new ribosome-associated protein which appears in heat-stressed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *J. Bacteriol.* **179**, 6495–6498.
  - 29) Ohara, N., Yamada, T. (2001): Recombinant BCG vaccines. *Vaccine* **19**, 4089–4098.
  - 30) Pal, P.G., Horwitz, M.A. (1992): Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* **60**, 4781–4792.
  - 31) Ranes, M.G., Rauzier, J., Lagranderie, M., Gheorghiu, M., Gicquel, B. (1990): Functional analysis of pAL5000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*: construction of a “mini” *mycobacterium-Escherichia coli* shuttle vector. *J. Bacteriol.* **172**, 2793–2797.
  - 32) Rosenkrands, I., Slayden, R.A., Crawford, J., Aagaard, C., Barry, C.E.III, Andersen, P. (2002): Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *J. Bacteriol.* **184**, 3485–3491.
  - 33) Saito, K., Ohara, N., Hotokezaka, H., Fukumoto, S., Yuasa, K., Naito, M., Fujiwara, T., Nakayama, K. (2004): Infection-induced up-regulation of the costimulatory molecule 4-1BB in osteoblastic cells and its inhibitory effect on M-CSF/RANKL-induced *in vitro* osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 13555–13563.
  - 34) Saito, S.I., Liu, X.-F., Kamijo, K., Razziudin, R., Tatsumoto, T., Okamoto, I., Chen, X., Lee, C.-C., Lorenzi, M.V., Ohara, N., Miki, T. (2004): Deregulation and mislocalization of the cytokinesis regulator ECT2 activate the Rho signaling pathways leading to malignant transformation. *J. Biol. Chem.* **279**, 7169–7179.
  - 35) Sherman, D.R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M.I., Schoolnik, G.K. (2001): Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding  $\alpha$ -crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 7534–7539.
  - 36) Snapper, S.B., Lugosi, L., Jekkel, A., Melton, R.E., Kieser, T., Bloom, B.R., Jacobs, W.R.Jr. (1988): Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 6987–6991.
  - 37) Stover, C.K., de la Cruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., Bansal, G.P., Young, J.F., Lee, M.H., Hatfull, G.F., *et al.* (1991): New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**, 456–460.
  - 38) Stover, C.K., Bansal, G.P., Hanson, M.S., Burlein, J.E., Palaszynski, S.R., Young, J.F., Koenig, S., Young, D.B., Sadziene, A., Barbour, A.G. (1993): Protective immunity elicited by recombinant bacille Calmette-Guérin (BCG) expressing outer surface protein A (OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine. *J. Exp. Med.* **178**, 197–209.
  - 39) Tabira, Y., Ohara, N., Ohara, N., Kitaura, H., Matsumoto, S., Naito, M., Yamada, T. (1998): The 16-kDa  $\alpha$ -crystallin-like protein of *Mycobacterium bovis* BCG is produced under conditions of oxygen deficiency and is associated with ribosomes. *Res. Microbiol.* **149**, 255–264.
  - 40) Tabira, Y., Ohara, N., Yamada, T. (2000): Identification and characterization of the ribosome-associated protein, HrpA, of Bacillus Calmette-Guérin. *Microb. Pathog.* **29**, 213–222.
  - 41) Takano, M., Ohara, N., Mizuno, A., Yamada, T. (1994): Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the gene for  $\alpha$  antigen from *Mycobacterium scrofulaceum*. *Scand. J. Immunol.* **40**, 165–170.
  - 42) Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., Suzuki, H., Suzuki, T., Sato, K., Yokochi, T., Oda, H., Nakamura, K., Ida, N., Wagner, E.F., Taniguchi, T. (2002): RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon- $\beta$ . *Nature* **416**, 744–749.
  - 43) Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, S., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., Takaoka, A., Yokochi, T., Oda, H., Tanaka, K., Nakamura, K., Taniguchi, T. (2000): T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ . *Nature* **408**, 600–605.
  - 44) Tasaka, H., Nomura, T., Matsuo, Y. (1985): Specificity and distribution of  $\alpha$  antigens of *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and related species of mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**, 173–174.
  - 45) Udagawa, N., Horwood, N.J., Elliott, J., Mackay, A., Owens, J., Okamura, H., Kurimoto, M., Chambers, T.J., Martin, T.J., Gillespie, M.T. (1997): Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J. Exp. Med.* **185**, 1005–1012.
  - 46) Voskuil, M.I., Schnappinger, D., Visconti, K.C., Harrell, M.I., Dolganov, G.M., Sherman, D.R., Schoolnik, G.K. (2002): Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J. Exp. Med.* **198**, 705–713.
  - 47) Wada, N., Ohara, N., Kameoka, M., Nishino, Y., Matsumoto, S.,