

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

抗酸菌細胞壁表層糖脂質の診断応用

分担研究者 小林 和夫（大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学・教授）
研究協力者 松本 壮吉（大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学・助教授）
研究協力者 藤原 永年（大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学・講師）

研究要旨

抗酸菌細胞壁表層構成成分の宿主に対する生物学的活性を免疫原性（抗原決定基、液性および細胞性免疫）、炎症惹起や抗菌防御の視点から分子医学的に解析し、新規診断・治療候補として抗酸菌細胞壁糖脂質や蛋白質の可能性を探索した。*Mycobacterium avium complex* (MAC) 特異的糖脂質蛋白質を抗原とした血清診断はヒト MAC 感染症に高い特異性 (92.5%) や感度 (95.1%) を示した。現在、関西地区を中心として血清診断キット（試作）による多施設臨床試験が進行中である。抗酸菌の宿主細胞への接着・侵入に抗酸菌特異的 DNA 結合蛋白質 (MDP1) が必須の役割を演じ、MDP1 を分子標的とした介入は新規治療・予防戦略として有望であることが判明した。

A. 研究目的

非結核性抗酸菌感染症は結核など抗酸菌感染症の約 20% を占めるが、特に、*Mycobacterium avium complex* (MAC) 感染症は非結核性抗酸菌感染症の 70-80% を占め、最頻である。MAC は環境菌であり、診断確定に臨床経過を考慮するため、長期間を要する。また、MAC は抗微生物薬に対し多剤耐性を示すため、治療に難渋し、根治は困難である。「結核予防法」の適応外であるが、多くの肺 MAC 症患者は喀痰抗酸菌塗抹陽性の時点で保健所長に届けられ、隔離を余儀なくされているのが実情である。MAC は特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) を有し、化学的に GPL は全ての MAC に共通な GPL 核と可変的な糖鎖部分から構成されている。本研究では、GPL 核抗原を用いた迅速・簡便血清診断法の開発を目的とした。

結核など抗酸菌感染症の新規治療・予防方法の開発を目的に、従来の抗微生物化学療法と全く異なった戦略、抗酸菌の宿主細胞接着・侵入物質（菌表層蛋白質）を標的とした新規戦略の開発に着手した。

B. 研究方法

米国胸部疾患学会の診断基準に合致した肺 MAC 感染症 (106 例)、無症候性 MAC 感染 (11 例)、肺 *M. kansasii* 感染症 (30 例)、喀痰培養陽性肺結核 (77 例) および健常者 (126 例) 由来治療前血清を用い、MAC 特異的 GPL 核抗原に対する血清抗体を酵素抗体法により測定した。標準菌株の MAC から GPL 核抗原を分離・精製し、薄層クロマトクロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーにて、化学構造を決定した。なお、患者血清採取に際し、インフォームドコンセントを得た。

結核菌や弱毒ウシ型結核菌 (BCG) などの抗酸菌から抗酸菌特異的 DNA 結合蛋白質 (MDP1、分子量 28 kDa) を精製、遺伝子の塩基配列を決定、生物学的意義（宿主細胞へ接着／侵入、MDP1 の治療・予防効果：動物感染実験および免疫学的奏功機序）を解析した。

C. 研究結果

化学的に GPL は全ての MAC に共通な GPL 核と可変的な糖鎖部分から構成されていることから、抗原決定基を GPL 核と可変的な糖鎖部分を用いて同定した。二次元薄層クロマトグラフィーを用い、GPL 核抗原を単一物質として精製し、質量分析結果から GPL 核抗原は分子量 1,208 であった。血清抗 GPL 抗体 (IgG、IgA、IgM) は GPL 核抗原で吸収されたが、糖鎖部分では吸収されず、GPL 抗原の抗原決定部位は GPL 核であることが判明し、GPL 核抗原を用いた血清診断法の開発に着手した。

肺 MAC 感染症 (106 例) の感度は IgG 抗体 : 72.6%、IgA 抗体 : 92.5%、IgM 抗体 : 78.3%、特異度は IgG 抗体 : 92.2%、IgA 抗体 : 95.1%、IgM 抗体 : 91.0% であり、特に、IgA 抗体は感度および特異度ともに良好な成績を示した。なお、無症候性 MAC 感染 (11 例)、肺 *M. kansasii* 感染症 (30 例)、喀痰培養陽性肺結核 (77 例) および健常者 (126 例) における陽性率はいずれも 10% 以下であった。

健常者や検体提供者の多くが BCG 既接種であることから、抗 GPL 核抗体の測定は BCG 接種の影響を受けないことも判明した。すなわち、体外診断である血清抗 GPL 核抗体の測定は主要な肺抗酸菌感染症 (MAC 感染症、*M. kansasii* や結核) を安全、迅速、かつ、効率的に鑑別することに寄与していた。

次に、抗 GPL 核抗体価と疾患活動性の関連性を解析した。抗菌化学療法反応群 (治療による菌陰性化、14 例) と抗菌化学療法非反応群 (菌陽性持続、13 例) における抗体価の推移を解析した。反応群では治療後に抗体価が有意に減少したが、非反応群では変動はなかった。また、非反応症例で肺葉切除患者 (1 例) の抗体価は切除後に減少した。すなわち、血清抗 GPL 核抗体価の測定は MAC 感染症の診断のみならず、MAC 感染症の疾患活動性を反映することが示唆された。

抗酸菌表層 MDP1 は宿主細胞表面に存在

するグリコサミノグリカン (ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸など) に結合した。抗酸菌-宿主細胞の接着・侵入は抗 MDP1 抗体やグリコサミノグリカン (特に、ヒアルロン酸) で阻害されたことから、MDP1-グリコサミノグリカン相互作用を介して、結核菌が宿主細胞に接着・侵入している。マウスを用いた *in vivo* 感染実験結果から、抗 MDP1 抗体やグリコサミノグリカンの結核菌感染前、或いは、感染後投与は感染生菌数を有意に減少 (約 1-3/10) させ、予防・治療の両者に有効な介入手段であることが判明した。

次に、MDP1 を標的としたワクチン開発に着手した。MDP1 単独や MDP1-DNA 複合体でマウスを前免疫し、その後、結核菌を接種し、菌数や免疫学的指標からワクチン効果を評価した。MDP1-DNA 複合体前投与により、菌数を有意に減少 (約 1/5) させた。なお、MDP1 単独では菌数減少効果を認めなかった。MDP1-DNA 複合体の免疫学的作用機序を解析したところ、1) 抗 MDP1 抗体および 2) interferon- γ (IFN- γ) 産生誘導が認められた。

D. 考察

GPL 核抗原は MAC 特異的抗原であり、かつ、宿主は GPL 核抗原に対し抗体産生など液性免疫応答を発現し、MAC 感染症の診断が可能となった。さらに、抗 GPL 核抗体価の変動/減少は疾患活動性を反映することから、抗 GPL 核抗体価の測定は MAC 感染症の治療評価にも有用である。

血清抗体の測定は体外診断であり、安全、迅速 (所要時間 : 約 3 時間)、簡便、かつ、多検体処理が可能であり、MAC 特異的抗原を用いた血清診断は MAC 感染症の診療に寄与するであろう。GPL 核抗原を用いた血清診断キットを試作し、現在、関西地区を中心として多施設-臨床試験が進行している。その中間結果報告は分担研究者の示した成績と殆ど同様であり、有用性が確認されつつある。今後、解析症例数を増加し、臨床実用化に向け、進捗させる予定である。

結核菌など抗酸菌は細胞内寄生病原体で

あるため、感染の成立には宿主細胞へ接着・侵入・貪食が必須となる。宿主細胞の結核菌貪食に補体受容体やマンノース受容体の関与が報告されていたが、接着・侵入に関する結核菌や宿主細胞の分子機構はほとんど不明であった。結核菌を吸入しても、宿主細胞に接着・侵入を阻止することにより、感染成立や発病を回避することが理論的に可能である。MDP1-DNA 複合体は宿主に 1) 抗 MDP1 抗体や 2) IFN- γ を誘導した。抗 MDP1 抗体は結核菌表層 MDP1 を被覆することにより結核菌の接着/侵入を阻害し、他方、IFN- γ は抗結核菌防御活性を増強し、ワクチン効果を発揮したことが考えられる。新規結核ワクチン候補として、MDP1-DNA 複合体は現行 BCG などの生菌と異なり、成分ワクチンであるため、HIV 感染者や AIDS 患者などの免疫不全者に対しても安全である。現状の課題として BCG に比し、ワクチン効果が劣ることである。今後、他の接着/侵入分子も探索し、MDP1-DNA 複合体を含め、安全で有効なワクチン開発を指向する予定である。

結核菌の接着・侵入分子である MDP1 は有望な治療・予防標的候補であり、その阻害は結核の治療・予防戦略になることが期待される。薬剤標的遺伝子を改変することにより生ずる耐性結核菌にも同様な接着・侵入機構が機能していることが想定され、接着・侵入機構の阻害は薬剤耐性結核にも有効な治療・予防戦略となるであろう。従って、殺菌・静菌を目的とした抗結核化学療法とはまったく異なり、結核菌の細胞接着・侵入機構の阻害を目的とした抗結核療法を狙う戦略であり、従来にない独創的なアプローチであると考えられる。

E. 結論

MAC 特異的抗原 (GPL 核) を用いた迅速・簡便血清診断キット (試作) を開発した。血清抗 GPL 核抗体の測定は MAC 感染症の診断や疾患活動性の評価に有用である。血清抗体の測定は体外診断であり、安全、迅速 (所要時間: 約 3 時間)、簡便、かつ、多検体処理が可能であり、MAC 特異的抗原を

用いた血清診断は MAC 感染症の診療に有効な手段となるであろう。

抗酸菌の宿主細胞への接着・侵入に抗酸菌特異的 DNA 結合蛋白質 (MDP1) が必須の役割を演じ、従って、MDP1 を分子標的とした介入は新規新規治療・予防戦略として有望である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitada, S., R. Maekura, N. Toyoshima, T. Naka, N. Fujiwara, M. Kobayashi, I. Yano, M. Ito, and K. Kobayashi. Use of glycopeptidolipid core antigen for serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in immunocompetent patients. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 12:44-51, 2005.
- 2) Matsumoto, S., M. Matsumoto, K. Umemori, Y. Ozeki, M. Furugen, T. Tatsuo, Y. Hirayama, S. Yamamoto, T. Yamada, and K. Kobayashi. DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. J. Immunol., 175:441-449, 2005.
- 3) Oiso, R., N. Fujiwara, H. Yamagami, S. Maeda, S. Matsumoto, S. Nakamura, N. Oshitani, T. Matsumoto, T. Arakawa, and K. Kobayashi. Mycobacterial trehalose 6,6'-dimycolate preferentially induces type 1 helper T cell responses through signal transducer and activator of transcription 4 protein. Microb. Pathog., 39:35-43, 2005.
- 4) Maekura, R., Y. Okuda, A. Hirotsu, S. Kitada, T. Hiraga, K. Yoshimura, I. Yano, K. Kobayashi, and M. Ito.

Clinical and prognostic importance of serotyping *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex isolates in human immunodeficiency virus-negative patients. J. Clin. Microbiol., 43:3150-3158, 2005.

- 5) Fujiwara, N., and K. Kobayashi. Macrophages in inflammation. Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy, 4:281-286, 2005.
- 6) 小林和夫. 結核における肉芽腫炎症と宿主防御の統御. 日本医事新報 4235 : 20-26, 2005.
- 7) 小林和夫. マイコバクテリウム (抗酸菌) と感染症. 標準微生物学 第9版 (山西弘一 監修, 平松啓一, 中込 治編) 東京: 医学書院. 279-292, 2005.
- 8) 小林和夫. 結核菌. 微生物感染学---新しい感染の科学--- (光山正雄編) 東京: 南山堂. 178-187, 2005.

2. 学会発表

- 1) 結核菌の肺胞上皮細胞への接着/侵入におけるヒアルロン酸-MDP1 結合の役割 (ワークショップ). 平山幸雄、松本壮吉、和田崇之、尾関百合子、梅森清子、山本三郎、西内由紀子、松本真、小林和夫. 日本細菌学会雑誌、60 : 104、2005. 第77回日本細菌学会総会 2005年4月 東京
- 2) 結核菌感染における抑制性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺ regulatory T細胞) の役割 (ワークショップ). 尾関百合子、松本壮吉、小林和夫. 日本細菌学会雑誌、60 : 156、2005. 第77回日本細菌学会総会 2005年4月 東京
- 3) 結核菌の核酸結合性蛋白質と DNA の複合体に対する免疫応答解析. 松本壮吉、松本 真、梅森清子、尾関百合子、山本三郎、山田 毅、小林和夫. 日本細菌学会雑誌、60 : 157、2005. 第77回日本細菌学会総会 2005年4月 東京
- 4) 結核菌由来 cord factor は転写因子

STAT4 蛋白質を介して Th1 応答を誘導する. 大磯龍太、藤原永年、前田伸司、松本壮吉、小林和夫. 日本細菌学会雑誌、60 : 163、2005. 第77回日本細菌学会総会 2005年4月 東京.

- 5) 結核菌の分子疫学的手法としての MIRU-VNTR 法の有用性 (要望課題). 和田崇之、長谷 篤、前田伸司、小林和夫. 結核、80 : 261、2005. 第80回日本結核病学会総会 2005年5月 さいたま
- 6) 結核菌のミコール酸シクロプロパン環が宿主免疫応答に与える影響. 藤原永年、前田伸司、小林和夫. 結核、80 : 265、2005. 第80回日本結核病学会総会 2005年5月 さいたま
- 7) 結核菌のヒストン様蛋白質 mycobacterial DNA-binding protein 1 の抗原性における DNA 介在の意義. 松本壮吉、小林和夫、松本 真、尾関百合子、山本三郎、山田 毅. 結核、80 : 266、2005. 第80回日本結核病学会総会 2005年5月 さいたま
- 8) 抑制性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺ regulatory T 細胞) の結核菌感染における役割. 尾関百合子、松本壮吉、小林和夫、菅原 勇、宇田川忠. 結核、80 : 267、2005. 第80回日本結核病学会総会 2005年5月 さいたま
- 9) 抗酸菌の肺胞上皮細胞侵入における mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) とヒアルロン酸の役割. 平山幸雄、松本壮吉、小林和夫、和田崇之、尾関百合子、西内由紀子、山本三郎. 結核、80 : 268、2005. 第80回日本結核病学会総会 2005年5月 さいたま
- 10) Extracellular occurring mycobacterial DNA-binding protein 1 in involved in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through binding to hyaluronic acid. Ozeki, Y., S. Matsumoto, K. Umemori, S. Yamamoto, and K. Kobayashi. 日本免疫学会・学術集会記録、35 : 69、

2005. 第 35 回日本免疫学会総会・学術総会 2005 年 12 月 横浜

会記録、35 : 171、2005. 第 35 回日本免疫学会総会・学術総会 2005 年 12 月 横浜

- 11) The role of mycobacterial DNA-binding protein-1-DNA complex in the host protection against *Mycobacterium tuberculosis*.
Matsumoto, S., K. Umemori, Y. Ozeki, S. Yamamoto, T. Yamada, and K. Kobayashi. 日本免疫学会・学術集

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成17年度 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

結核菌特異抗原に対する胸水中のリンパ球の反応を指標とした

結核性および癌性胸膜炎の鑑別診断法の検討

分担研究報告書

分担研究者

荒川 宜親

（国立感染症研究所・細菌第二部部長）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌特異抗原に対する胸水中のリンパ球の反応を指標とした
結核性および癌性胸膜炎の鑑別診断法の検討

分担研究者 荒川 宜親（国立感染症研究所・細菌第二部・部長）
研究協力者 石川 暁志（国立感染症研究所・細菌第二部・流動研究員）
研究協力者 森 茂太郎（国立感染症研究所・細菌第二部・研究員）
研究協力者 柴山 恵吾（国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官）

研究要旨.

抗酸菌の特有な細胞壁構造を構築する機構を明らかにすることを目的に、*Mycobacterium smegmatis* においてコロニー形態が通常株（Rough 型）とは異なる変異株（Smooth 型）を作成し、その変異導入部位を同定した。その結果、MSMEG6056 に変異が導入されることにより、コロニー形態が Rough 型から Smooth 型に変化することが明らかとなった。相同性配列を検索した結果、MSMEG6056 は他の抗酸菌中でも高度に保存されていたことから、本遺伝子は抗酸菌において細胞壁の合成に関与している重要な遺伝子であることが示唆された。現在は、本研究で明らかにした細胞壁合成に関与する遺伝子と病原性との関連について調べている。一方、結核菌がマクロファージ内で生存するために必須な遺伝子を同定する目的で、マクロファージ内発現遺伝子群の新規な網羅的選択法を、抗菌薬 XXX 耐性を指標とする手法の構築を目指している。これまでに、*Staphylococcus aureus* 由来の抗菌薬 XXX 耐性遺伝子を導入した *M. smegmatis*、並びに *Mycobacterium bovis* BCG 株の形質転換株が、抗菌薬 XXX に対して耐性を示すことを明らかにした。現在は、マクロファージを用いて新規な網羅的選択法の確立を行っている。

A. 研究目的

Mycobacterium tuberculosis（結核菌）が引き起こす結核は、近年再び新規感染患者や死亡者の増加が懸念されており、今なお重点的な対策が必要な感染症である。さらに1990年頃より、従来から用いられている複数の抗結核薬に耐性を示す多剤耐性結核菌の症例が増加傾向にあり、世界的な規模で深刻な問題となっている。そのため、これまでの治療薬にかわる新たな治療薬、特に結核菌に特異的に作用するような抗結核剤の開発が望まれている。そこで、本研究は結核菌の生育や病原性の発現に必須な遺伝子や分子を同定・解析することにより、新規な結核診断方法や抗結核薬の開発に結びつけることを最終的な目標としている。

結核菌を含む抗酸菌は、脂質に富む頑強な細胞壁構造をしており、その特徴的な細胞壁構造が生育や病原性の発現に深く関与していると考えられている。そこで、本研究では結核菌に特異的な新規抗結核薬の開発に向けて、その標的となりうる抗酸菌に特有の細胞壁構造を構築する機構を明らかにすることを目的としている。今回は、抗酸菌の一種である *Mycobacterium smegmatis* のコロニー形態変異株を作成し、その変異導入部位の解析を行った。

一方、結核菌はマクロファージに貪食された後、様々な殺菌作用から逃れてマクロファージ内で生存しさらに細胞質へ侵入することが可能であり、この生理機能が病原性と深く関連している。従って、結核菌に

においてマクロファージ内でのみ発現する遺伝子を特定することは、病原性因子の解明につながるものと期待される。そこで本研究では、抗菌薬 XXX（新規な網羅的選択法の特許出願に関わるため、詳細な抗菌薬名は伏せる。以下同様）を用いた新規な網羅的選択法の構築を行い、その手法を用いて、結核菌由来マクロファージ内発現遺伝子を同定することを目指している。今回は、*Staphylococcus aureus* 由来の抗菌薬 XXX 耐性遺伝子を用いて、新規な網羅的選択法の構築が可能であるかを検討した。

B. 研究方法

1. 抗酸菌コロニー形態変異株の作成と解析

パスツール研究所より分与された、phAE94 [ファージウイルス：カナマイシン耐性遺伝子を含むトランスポゾン 5367 (Tn5367) を持つ] を用いて、*M. smegmatis* ATCC607 のランダム変異株を作成した。変異株は、カナマイシン耐性を指標としてスクリーニングを行い、コロニー形態が通常株 (Rough 型) とは異なる変異株 (Smooth 型) を取得した。得られた変異株における染色体上のトランスポゾン挿入位置は、変異株の染色体 DNA を調製後、DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit (Seegene, Korea) を用いて決定した。また、決定した配列を用いた遺伝子の同定には TIGR (<http://www.tigr.org/>) を、相同性配列の検索には DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) をそれぞれ利用した。MSMEG6056 遺伝子を PCR により増幅させて抗酸菌ベクター-pvv16 に組込んだプラスミドを構築し、そのプラスミドをコロニー形態変異株にエレクトロポレーターを用いて導入することによって、コロニー形態変異株の相補株を作成した。

2. マクロファージ内発現遺伝子群の新規な網羅的選択法

抗酸菌発現ベクターである pvv16 中の構成性発現プロモーター (*hsp60*) 下流 (NdeI-HindIII サイト) に、*S. aureus* 由来の

抗菌薬 XXX 耐性遺伝子を組込んだプラスミドを構築した。作成したプラスミドを、*M. bovis* BCG 株と *M. smegmatis* にそれぞれエレクトロポレーターを用いて導入し、得られた形質転換株の抗菌薬 XXX への耐性についてディスク法を用いて調べた。また、*hsp60* を、マクロファージ内でのみ発現することが報告されている発現プロモーター配列に置き換え、その下流 (NdeI-HindIII サイト) に *S. aureus* 由来の抗菌薬 XXX 耐性遺伝子を組込んだプラスミドを構築し、*M. bovis* BCG 株と *M. smegmatis* にそれぞれエレクトロポレーターを用いて導入した。

C. 研究結果

1. 抗酸菌コロニー形態変異株の作成と解析

phEA94 を用いて、*M. smegmatis* のランダム変異株を作成した結果、コロニー形態が通常株で見られる Rough 型とは異なり、Smooth 型に変化した変異株を 5 株取得した。得られた変異株において、変異が挿入された配列を解析し、データベース上で同定した結果、5 株中 2 株はそれぞれ、MSMEG1402 と MSMEG6056 にトランスポゾンが挿入されていることが明らかになった。

MSMEG6056 にトランスポゾンが挿入された変異株では、図 1 に示した通り、通常株と比較して明らかにコロニー形態が Rough 型から Smooth 型に変化していた。さらに、MSMEG6056 を相補させた株では、コロニー形態が通常株とほとんど同じ Rough 型に復帰した (図 1)。

他の抗酸菌における相同性配列を検索した結果、MSMEG6056 は、結核菌を含む他の抗酸菌において非常によく保存されていることが示された (表 1)。

2. マクロファージ内発現遺伝子群の新規な網羅的選択法

S. aureus 由来抗菌薬 XXX 耐性遺伝子を発現させた *M. bovis* BCG 株と *M. smegmatis* は、抗菌薬 XXX に耐性を示した [ディスク法: 15 μ g (力価) / ディスク] (図 2)。次に、マクロファージ内でのみ抗菌薬 XXX

耐性遺伝子が発現するように構築した、*M. bovis* BCG 株と *M. smegmatis* の形質転換株を取得した。

D. 考察

本研究では、*M. smegmatis* において MSMEG6056 に変異が導入されることにより、コロニー形態が通常株 (Rough 型) とは異なり Smooth 型に変異することを明らかにした (図 1)。さらに、コロニー形態変異株において、MSMEG6056 を相補させた株ではコロニーの形態が通常株と同じ Rough 型であった (図 1)。これらのことから、本遺伝子は詳細な機能については未定であるが、細胞壁構造の形成に重要な遺伝子であることが示された。さらに、MSMEG6056 は、各種の抗酸菌の菌種間で非常によく保存されていたことから (表 1)、他の抗酸菌においても細胞壁の構成成分の生合成に関与する重要な遺伝子である事が示唆された。

現在は、本研究で明らかにした細胞壁合成に深く関与している MSMEG6056 と高い相同性を示す Mb3628c を破壊した *M. bovis* BCG 変異株を作成中である。今後は、作成した *M. bovis* BCG 変異株を用いた動物接種実験により、細胞壁構造の変異と病原性との関わりについての解析を進める予定である。

他方、本研究では、新規な網羅的選択法の確立を行い、結核菌由来マクロファージ内発現遺伝子を同定することも目的としている。*S. aureus* 由来抗菌薬 XXX 耐性遺伝子を発現させた *M. bovis* BCG 株と *M. smegmatis* の形質転換株は、抗菌薬 XXX に対して耐性を示したことから (図 2)、*S. aureus* 由来の抗菌薬 XXX 耐性遺伝子の発現を指標にした新規な網羅的選択法の開発が可能であることが示された。そこで、図 3 のような新規網羅的選択法を考案している。まず、構成性発現プロモーターである *hsp60* のかわりに、結核菌由来 DNA 断片 (500-1,000bp) をランダムに組込みこんだライブラリーを作成し、BCG 株、並びに *M. smegmatis* に導入する。作成した形質転換株をマクロファージに貪食させ、抗菌薬 XXX

を含む培地で数日培養し、生存が可能な株を選択する。生存が可能な株では、抗菌薬 XXX 耐性遺伝子が発現、すなわち結核菌由来遺伝子断片が発現プロモーターとして機能していると考えられる。このようにして、マクロファージ内で発現する結核菌由来遺伝子群を網羅的に選択する事ができると考えている。さらに詳細な選択条件を検討するため、マクロファージ内のみで抗菌薬 XXX 耐性遺伝子が発現する *M. bovis* BCG 株と *M. smegmatis* の形質転換株を作成した。現在は、両形質転換株を用いて抗菌薬 XXX の濃度や培養日数等の網羅的選択を行う条件の検討を行っている。今後は、確立した新規網羅的選択法を用いて、マクロファージ内で発現する結核菌由来遺伝子の同定を行う予定である。

E. 結論

Mycobacterium smegmatis においてコロニー形態変異株を作成し、その変異導入部位を同定した。変異が導入された遺伝子は、他の抗酸菌中에서도高度に保存されていたことから、本遺伝子は抗酸菌において細胞壁の合成に関与している重要な遺伝子であることが示唆され、菌種の識別や薬剤の標的としての分子として活用する事で、新規検査法の構築や抗結核薬の開発に向けて利用可能と期待される。

また、抗菌薬 XXX に対して耐性を示す *M. bovis* BCG 株と *M. smegmatis* の形質転換株の作成に成功し、抗菌薬 XXX 耐性遺伝子の発現を指標にした新規スクリーニング法の開発が可能であることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表
準備中
2. 学会発表
準備中

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
貪食細胞内で発現する遺伝子を選択

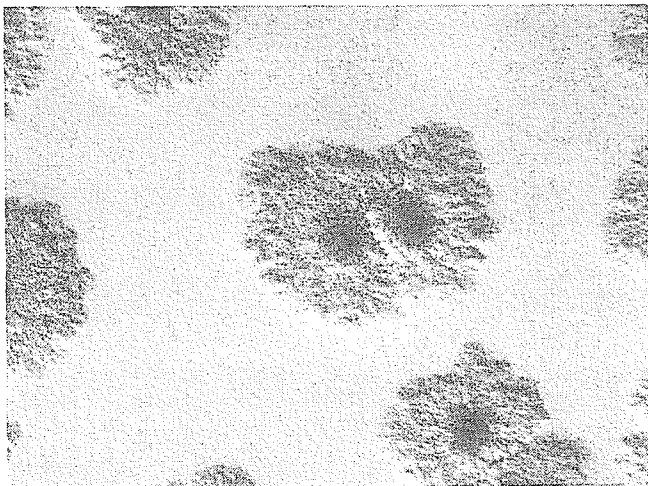
するベクターに関する特許出願を
準備中

3. その他

なし

2. 実用新案登録 なし

A



B



C



図1 *M. smegmatis* コロニー形態変異株

A: *M. smegmatis* ATCC607(Wild Type)

B: *M. smegmatis* ATCC607 Tn5367
(MSMEG6056 mutant)

C: *M. smegmatis* ATCC607 Tn5367
(MSMEG6056 mutant + pvv16/MSMEG6056)

表1 MSMEG6056と高い相同性を示す配列

Organism	Accession No.	Aminoacid sequence	
		Identity	Similarity
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	MSMEG6056	—	—
<i>Mycobacterium avium</i>	MAP0460	90.4%	93.9%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Rv3597c	86.8%	90.4%
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	MT3704	86.8%	90.4%
<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	Mb3628c	86.8%	90.4%
<i>Mycobacterium leprae</i> TN	ML0234	86.8%	91.2%

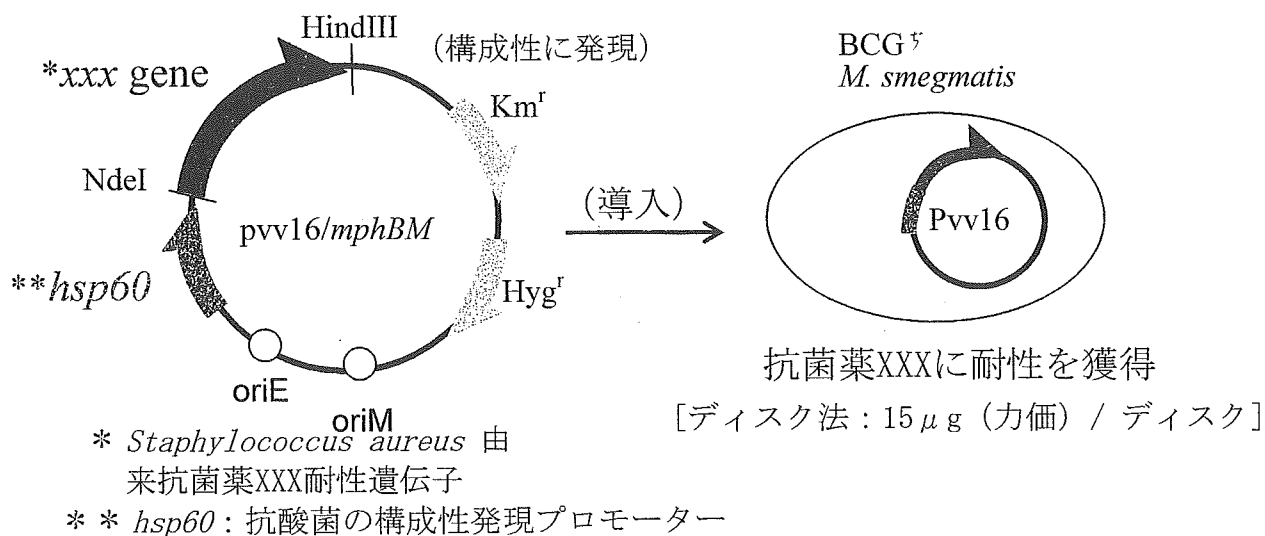


図2 *S. aureus* 由来抗菌薬 XXX 耐性遺伝子を発現させた形質転換株の作成

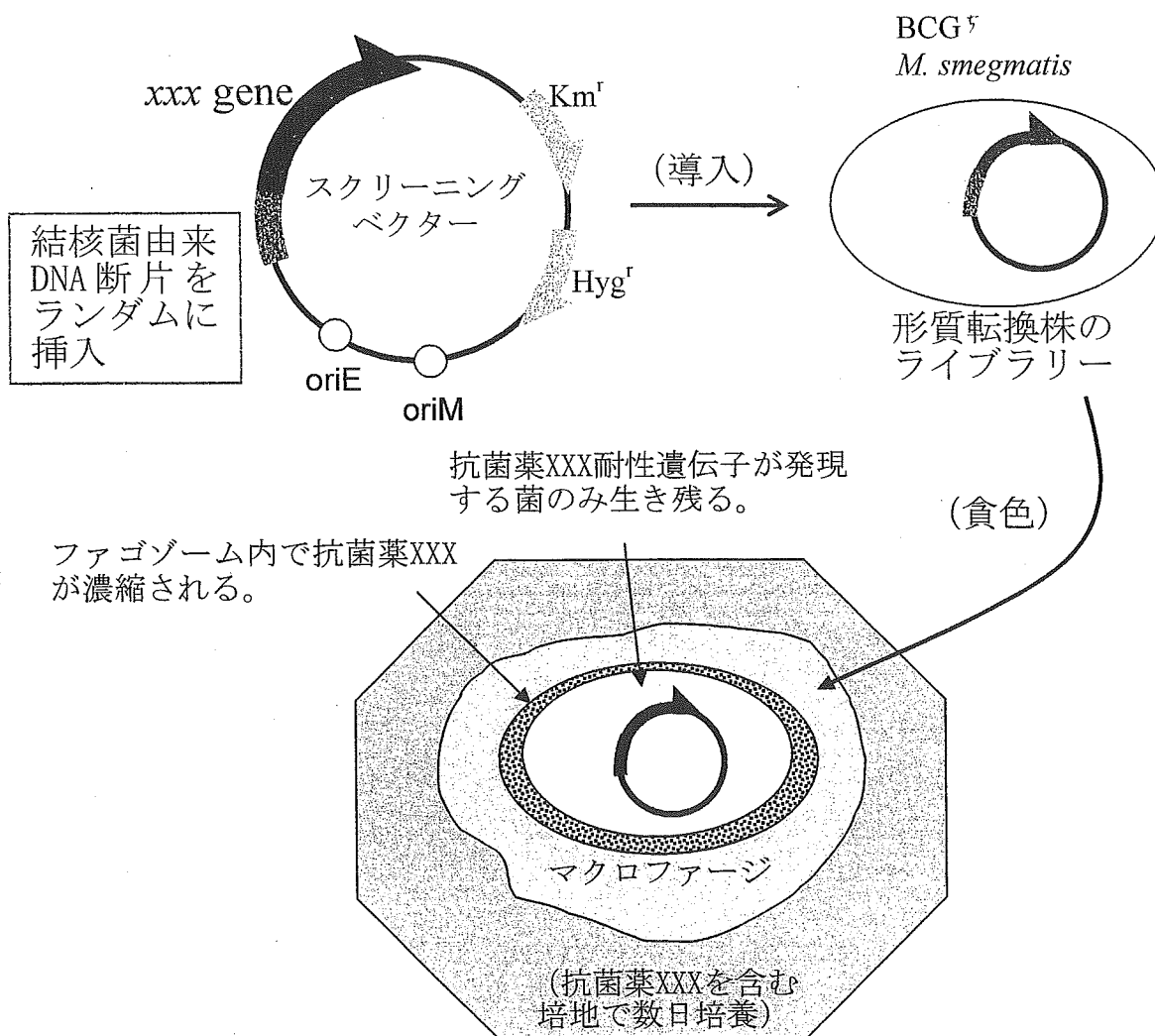


図3 抗菌薬 XXX 耐性遺伝子の発現を指標にした新規なマクロファージ内発現遺伝子群の網羅的選択法

平成17年度 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

新規抗酸菌ワクチンの開発・非結核性抗酸菌遺伝子診断法の確立

分担研究報告書

分担研究者

牧野 正彦

（国立感染症研究所・病原微生物部部長）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

新規抗酸菌ワクチンの開発・非結核性抗酸菌遺伝子診断法の確立に関する研究

分担研究者 牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部・部長）
研究協力者 向井 徹（国立感染症研究所・病原微生物部・第一室室長）

研究要旨

病原性抗酸菌に対する新しいワクチンの開発を最終目的とした。これまでに、らい菌の細胞膜より同定したタンパク Major Membrane Protein-II (MMP-II) は、らい菌に対する生体防御反応すなわちタイプ 1 細胞性免疫を誘導し、病変の限局化をもたらすことを明らかにしてきた。さらに、MMP-II はらい菌のみならず結核菌および非結核性抗酸菌にも保存されているため、病原性抗酸菌共通ワクチンの作製が可能となると想定された。そこで、MMP-II 遺伝子の upstream に Antigen 85B 由来のタンパク分泌シグナルを付加した後 BCG に組み込んだ (BCG-SM の作製)。BCG-SM は、ベクターコントロール BCG (BCG-pMV) に比し、強く T 細胞を活性化させた。T 細胞の活性化は、メモリータイプ T 細胞のみならず、ナイーブ T 細胞でも観察された。その原因は、BCG-SM を樹状細胞に感染させた際、樹状細胞の表面に MMP-II が BCG-pMV に比し強く発現され、かつ MHC 分子、Co-stimulation 分子の樹状細胞表面への発現が増強されたことによると考えられた。BCG-SM は従来の BCG に比べ、より有効なワクチン効果をもたらすものと期待される。

抗酸菌感染症の約 20% を占める非結核性抗酸菌症は、結核と異なり隔離の必要はなく治療法も異なる。しかし、起因菌の同定に長期を要するため、診断が確定するまで結核として治療されることが多い。そのため、迅速な鑑別診断法の開発が望まれる。昨年度は、等温遺伝子増幅法 (LAMP 法) を用い、鑑別が困難である病原性菌 *M. kansasii* と非病原性菌 *M. gastri* の遺伝子鑑別法を、抗酸菌遺伝子領域 *dnaA* 内にある種特異領域を標的とし確立した。本年度は、FD 試薬を用い、より簡易な検出法の開発を行った。その結果、電気泳動法と同程度の検出感度が得られ、かつ増幅産物の検査室内汚染は著しく減少した。簡易な抗酸菌菌種の同定システムによる抗酸菌迅速診断キットの開発が可能となった。本キットは、日本国内のみならず広く開発途上国でも利用可能と想定される。

A. 研究目的

抗酸菌は 20 世紀最大の恐怖を与えた細菌である。BCG が抗酸菌に対するワクチンとして用いられてきたが、その有効性は極めて限られており、小児の粟粒結核を若干抑制するにとどまり、成人の肺結核に対する効果は全く認められていない。一方ハンセン病においても、BCG が有効であったとする報告が一部で認められるが、全く無効であるとする論文も報告されていて、BCG

がハンセン病に対する有効なワクチンと信ずることはできない状況にある。ここでは、結核およびハンセン病を効率良く抑制する新しいワクチン開発を目的とした。昨年度までの研究で、抗酸菌に対する生体防御反応を誘導するワクチン候補分子として、抗酸菌細胞膜に存在する Major Membrane Protein-II (MMP-II) を同定した。MMP-II は、樹状細胞を TLR-2 抗原を介して活性化して大量の IL-12p70 を産生させ、かつ

MMP-II をパルスした樹状細胞は CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を活性化した。さらに、らい菌感染によって発症する少菌型ハンセン病患者の末梢 T 細胞は、MMP-II に感作されていることを見出した。これらの現象は、MMP-II はタイプ 1 細胞性免疫応答を効率良く誘導するタンパクであることを示唆している。そこで本年度は、MMP-II を BCG に組み込み、さらに BCG の持つ欠点を補うために、細胞内感染後細胞内に MMP-II が分泌されるようにタンパク分泌シグナルを同時に組み込ませ、新しいリコンビナント BCG (BCG-SM) を作製し、次いで、作製した BCG-SM の T 細胞活性化能について主に検討を加えた。

また、昨年度確立した電気泳動を用いる LAMP 法は、非常に多量の増幅遺伝子が産生されるため、検査室周囲への遺伝子産物の汚染が著しい。さらに、安定した結果を得るためには熟練を要するなどの問題点があった。そこで、より簡便に検査を遂行でき、かつ安定した結果を得るためのさらなる検討を加えることを目的とした。

B. 研究方法

BCG パスツール株を用いてリコンビナント BCG を作製した。MMP-II 遺伝子の 5' 上流に Antigen 85B 由来タンパク分泌シグナルをコードする遺伝子を組み込み、カナマイシン耐性遺伝子とともに BCG に組み込んだ。組み込み BCG をカナマイシン存在下 7H10 培地で培養し、クローニングを行いリコンビナント BCG (BCG-SM) を得た。正常健常者末梢血よりプラスティック付着性細胞を分離し単球として用いた。末梢単球由来樹状細胞は、単球を rGM-CSF および rIL-4 存在下で 3 日間培養して得た。樹状細胞を BCG-SM あるいはベクターコントロール BCG (BCG-pMV) で刺激した際に、培養上清中に産生されるサイトカインは市販の ELISA キットを用いて定量化した。BCG-SM および BCG-pMV の T 細胞活性化能は、これら BCG を感染させた樹状細胞をマイトマイシン処理した後抗原提示細胞として用い、自己の CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞をレスポ

ンダーとして、T 細胞が産生するインターフェロンガンマー (IFN- γ) を指標に測定した。樹状細胞表面抗原の解析は、市販の抗体を用いて FACScalibur にて行った。また、昨年作製した MMP-II に対するモノクローナル抗体 (M270-13) を用いて、BCG-SM 感染樹状細胞表面への MMP-II の発現程度を測定した。BCG-SM のメモリー T 細胞の産生能は C57BL/6 マウスを用いて行った。本マウスに BCG-SM あるいは BCG-pMV を皮下接種し、7 および 13 週後に脾臓 T 細胞のリコンビナント MMP-II に対する反応性を検索した。T 細胞の活性化は IFN- γ の産生量を指標とし、IFN- γ は ELISA 法で測定した。

らい菌遺伝子特異的領域を増幅するプライマーを用いる LAMP 法により、増幅産物の迅速検出法の検討を行った。検出試薬として、Fluorescent Detection (FD) 試薬(栄研化学)を選択した。同試薬を段階希釈したらい菌ゲノム DNA もしくは、らい菌菌体そのものと混合し、63°C、30 分間反応させた。その後 365 nm の紫外線照射により発色させた際、褐色を発するサンプルを陰性、緑色を呈するサンプルを陽性とし、その検出感度を電気泳動法と比較検討した。

倫理面への配慮 国立感染症研究所倫理委員会の審査を受け、以下の通り行った。血液ドナーのプライバシーを完全に守るため、研究結果発表に際しては個人が特定されないよう配慮し、研究者はドナーのいかなる個人情報も漏出しないよう細心の注意を払った。また、使用目的と使用方法および医学上の貢献予測を十分に説明し、さらに拒否し得ることを説明した上で理解(インフォームドコンセント)を得た。さらに、結果について守秘義務に基づいて知る権利と知りたくない権利を守った。

C. 研究結果

BCG-SM を 7H10 培地を用い *in vitro* で培養すると、その培養上清中にリコンビナント MMP-II と同じ分子量を持つタンパクが分泌されていることがウエスタンブロット法で確認され、さらに培養上清を濃縮し正常健常者樹状細胞を刺激すると、リコンビ

ナント MMP-II と同程度の IL-12p40 を誘導した。そこで、BCG-SM を用い樹状細胞を刺激し、樹状細胞から産生されるサイトカインを測定したが、IL-12・IL-10・TNF α ・IL-1 β いずれも BCG-pMV と同程度であった。ついで、BCG-SM あるいは BCG-pMV を樹状細胞に感染させた後抗原提示細胞として用いて T 細胞の活性化誘導能を測定した。BCG-SM と BCG-pMV の間には大きな差が認められ、ナイーブ T 細胞 (CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞) およびメモリー T 細胞 (CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞) は、BCG-SM を用いた時有意に強く活性化された。さらに、CD8 陽性 T 細胞を用い Cytotoxic T lymphocyte のマーカーである Perforin の細胞内産生能を BCG-SM と BCG-pMV で比較検討した。その結果、BCG-SM を用いるとより大量の Perforin が CD8 陽性 T 細胞内に産生された。そこで、BCG-SM の樹状細胞に及ぼす影響を検討した。BCG-SM を樹状細胞に感染させると、BCG-pMV に比し有意に強く MMP-II が樹状細胞表面に発現した。しかし、樹状細胞を予めクロロキニンで処理するか、BCG-SM を熱処理すると樹状細胞表面の MMP-II の発現は消失した。さらに、BCG-SM を樹状細胞に感染させると BCG-pMV に比し有意に高い HLA-ABC・HLA-DR・CD80 および CD86 抗原の発現が誘導された。BCG-SM あるいは BCG-pMV を C57BL/6 マウスに皮下接種し、その 7 あるいは 13 週後にマウス脾臓 T 細胞のリコンビナント MMP-II あるいは BCG に対する反応性を検討した。その結果、BCG に対する反応性は両者において有意の差はなかったが、MMP-II に対する反応性すなわち IFN- γ 産性能は BCG-SM 投与群において有意に高く、BCG-SM の方がより有効にメモリー T 細胞を産生することが明らかになった。

遺伝子診断法の開発において、FD 試薬による抗酸菌の検出感度は、ゲノム DNA では 5 コピー、菌体では 50 菌体であった。これは、電気泳動法と同等の検出感度であった。また、陰性コントロールを用いて計測した疑陽性サンプルの発現程度は著しく減少した。さらに、電気泳動法を用いないため増

幅遺伝子産物を周囲に飛散させ汚染する確率は著しく減少した。

D. 考察

BCG はこれまでに抗酸菌に対するワクチンとして全世界的に用いられてきた。しかし、その有効性は極めて限られている。BCG の持つ欠点は多いとされ、多くの報告がなされてきた。その中で最も根本的かつ重大な欠点は、BCG が抗原提示細胞に貪食されると phagosome を形成し lysosome との融合を阻み十分にプロセッシングされないこと、すなわち T 細胞を十二分に活性化し得ないことにあった。そこで、BCG のこうした欠点を補うため、BCG が抗原提示細胞に感染した後、その細胞内で生体防御反応を引き起こすタンパク抗原を分泌するリコンビナント BCG を作製した。さらに、タンパク抗原として抗酸菌共通抗原であり、種々存在するタンパク抗原の中で生体防御上重要な役割を果たす MMP-II を用いた。作製したリコンビナント BCG (BCG-SM) は、細胞内で MMP-II を分泌し、lysosome 内の酵素によりプロセッシングされ、主要組織適合抗原と結合した型で樹状細胞の表面に発現された。さらに、BCG-SM はコントロール BCG に比し、より強く樹状細胞を活性化した。その機序は一部不明であるが、MMP-II は TLR-2 と結合し、樹状細胞の NF- κ B を活性化する働きを有していることから、phagosome 内で分泌された MMP-II が phagosome 膜に存在する TLR-2 に結合して、樹状細胞をより強く活性化したものと想定された。このようにして、BCG-SM は従来の BCG に比し、より強く T 細胞を活性化し、その結果として大量のメモリー T 細胞を *in vivo* で産生したものと考えられた。

PCR 法を用いて遺伝子を増幅させると、用いたプライマーのミスアニールによる非特異的に遺伝子を増幅してしまう可能性がある。そのため、電気泳動法による増幅産物の長さの確認もしくは、ハイブリダイゼーション法による特異性の確認を必要とする。しかし、LAMP 法では、プライマー領域が 6 領域におよぶため、非特異的な増幅が

発生する確立は低い。そのため遺伝子増幅の可否のみで病原体遺伝子の有無が判定可能である。しかし、LAMP 法を行った後、さらに電気泳動法を用いる検出法は、非常に多量の産物を周囲へ飛散させ、検査室を汚染してしまう可能性が高い。従って、頻回に検査を行うことが難しい状況にあった。核酸の指示薬にはエチジウムブロマイド、SYBRO Green I 等が存在するが、これらは、DNA への結合を必要とするため、発ガン性が高く、その廃棄には十分な配慮が必要である。しかし、FD 試薬は、ピロリン酸による 2 価イオンの競合による蛍光を発色させ、出現した色により陽性と陰性を識別するため、遺伝子産物に結合することはない。このため、発展途上国においても安心して使用でき、検査室の汚染を心配する必要もない非常に有望な検出法と考えられた。

E. 結論

抗酸菌共通抗原である MMP-II を細胞内で分泌する新しいリコンビナント BCG は、樹状細胞を介してより強く T 細胞を活性化しメモリー T 細胞を産生した。

FD 試薬によるらい菌遺伝子を特異的に検出する簡便な LAMP 法を開発した。その感度は、電気泳動法を組み合わせた LAMP 法と同程度であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, Y., T. Mukai, J. Spencer, and M. Makino. Identification of immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immunity*, 73:2744-2750, 2005.
- 2) Makino, M., Y. Maeda, and N. Ishii. Immunostimulatory activity of major membrane protein-II from *Mycobacterium leprae*. *Cell. Immunol.*, 233:53-60, 2005.
- 3) Miyamoto, Y., T. Mukai, N. Nakata, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. Identification and characterization of the genes

involved in glycosylation pathways of mycobacterial glycopeptidolipids biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 188:86-95, 2006.

- 4) Mukai, T., Y. Miyamoto, T. Yamazaki, and M. Makino. Identification of *Mycobacterium* species by comparative analysis of the *dnaA* gene. *FEMS Microbiol. Lettr.*, 254:232-239, 2006.
- 5) 牧野正彦. 結核・ハンセン病. 倉田毅編, ネオエスカ 感染症・アレルギーと生体防御, 同文書院出版, 105-110, 2005.
- 6) 牧野正彦. 生体防御機構. 牧野正直・長尾栄治・畑野研太郎編, 総説現代ハンセン病医学, 東海大学出版会, in press, 2006.
- 7) 牧野正彦, 鈴木幸一, 福富康夫, 山下康子, 前田百美, 宮本友司, 向井 徹, 中田 登, 甲斐雅規, 山崎利雄, 儀同政一, 松岡正典. ハンセン病基礎医学研究のトピックス. *Jpn. J. Leprosy*, 74:3-22, 2005.

2. 学会発表

- 1) Functional counteraction between toll-like receptor 2 and CORO1A that affects intracellular survival of mycobacteria. Suzuki, K., F. Takeshita, N. Nakata, N. Ishii, and M. Makino. The 14th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage 2005, 3-4 June, 2005, Saitama, Japan.
- 2) IL-1 at the early stage of monocyte differentiation to dendritic cells impairs functional activities of dendritic cells. Makino, M., Y. Maeda, and T. Mukai. Fortieth Annual U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Seattle, USA, July

28-30, 2005.

- 3) Rapid detection of *Mycobacterium leprae* by a loop-mediated isothermal amplification method. Mukai, T., Y. Miyamoto, M. Matsuoka, and M. Makino. Fortieth Annual U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Seattle, USA, July 28-30, 2005.
 - 4) 細胞内寄生に影響を与える抗酸菌糖脂質 Glycopeptidolipids の構造. 宮本友司, 向井 徹, 中田 登, 甲斐雅規, 前田百美, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
 - 5) クロファジミンによるマクロファージの細胞死誘導. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
 - 6) らい菌感染末梢血単球由来サイトカインの樹状細胞による生体防御反応に及ぼす影響 (ワークショップ). 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
 - 7) *Mycobacterium smegmatis* の持つ第 2 の *katG* 遺伝子の機能. 中田 登, 甲斐雅規, 宮本友司, 鈴木幸一, 牧野正彦. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
 - 8) MMP-II を用いたハンセン病血清診断法の開発. 前田百美, 石井則久, 向井 徹, 甲斐雅規, 福富康夫, 北田清悟, 小林和夫, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 78 回日本細菌学会総会 2005 年 4 月 東京
 - 9) リアルタイム PCR 法を利用した薬剤耐性変異検出の試み. 甲斐雅規, Nguyen Phuc Nhu Ha, 松岡正典, 牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
 - 10) クロファジミンによる細胞死誘導. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
 - 11) らい菌偽遺伝子の一部は高レベルで発現しており感染後に発現量が変化する. 鈴木幸一, 中田 登, Pham Dag Bang, 牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
 - 12) らい菌膜免疫調整性蛋白の同定. 前田百美, 向井 徹, 山下康子, 牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
 - 13) LAMP 法によるらい菌遺伝子診断法の確立. 向井 徹, 宮本友司, 松岡正典, 牧野正彦. 第 78 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2005 年 5 月 青森
 - 14) Analysis of mechanisms of multibacillary leprosy development: the role of IL-1 β (ワークショップ). 牧野正彦, 前田百美, 向井 徹. 第 35 回日本免疫学会総会 2005 年 12 月 横浜
 - 15) マクロファージの in vitro における抗らい菌活性発現. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 35 回日本免疫学会総会 2005 年 12 月 横浜
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

平成17年度 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

結核菌体ペプチドによる Th1 生成と結核ワクチン開発への応用研究

分担研究報告書

分担研究者

高津 聖志

（東京大学医科学研究所・免疫調節分野教授）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

結核菌体ペプチドによる Th1 生成と結核ワクチン開発への応用研究

分担研究者 高津 聖志（東京大学医科学研究所・教授）

研究要旨.

本研究は、Th1 免疫応答を惹起しアジュバント活性を示す結核菌由来タンパク質 Ag85B の主たる T 細胞エピトープである Peptide-25 とその修飾分子を用い、抗結核免疫を増強する有効な手法を開発することを目的としている。また、Peptide-25 と I-A^b を認識する TCR (P25 TCR) を発現する TCR-Tg マウスを作出し、ナイーブ T 細胞から Th1 への分化の運命づけに関与する分子機構を遺伝的背景も含め明らかにすることも目的としている。

本年度は、1) 本研究で作出した、Peptide-25 と I-A^b 分子を認識する TCR を発現する P25 TCR-Tg を用いて、Peptide-25 による選択的な Th1 誘導における T-bet の役割を解析した。TCR 刺激による Th1 誘導に T-bet 依存性の経路と非依存性の経路が存在することを初めて見出した。2) Peptide-25 が共免疫抗原にアジュバント活性を示すか、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の生成を指標に検討した。その結果、Peptide-25 は共免疫抗原の CTL 生成を増強することを初めて明らかにした。

A. 研究目的

Th1 細胞 (以下 Th1 と略す) は IFN- γ や TNF- β を産生し抗結核免疫のエフェクター細胞 (マクロファージ) を活性化する。Th1 を有効に活性化できる結核菌体成分を探索しそのエフェクター機構を明らかにできれば、抗結核免疫を増強するワクチン開発に資するところが多く、期待される成果も大きい。

本研究は、結核菌の抗原ペプチドで、Th1 免疫応答とアジュバント活性を示すものを探索し、抗結核免疫の強化に資するか検討するシステムを確立すること、Th1 誘導の分子機構を明らかにすることを、目的としている。

B. 研究方法

結核菌の分泌する Ag85B とその C-末端ペプチドである Peptide-25 を I-A^b とともに認識する TCR α -鎖、 β -鎖 (P25 TCR) を発現するトランスジェニック (P25 TCR-Tg) マウスを用いて、そのナイーブ CD4⁺ T 細胞を試験管内で Peptide-25 やその変異ペプチ

ド (APL) で刺激し、IFN- γ や IL-4 産生を検討した。Peptide-25 のアジュバント活性は、C57BL/6 マウスを卵白アルブミン (OVA) で免疫する際に Peptide-25 を共存させ、OVA 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の生成に及ぼす効果により判定した。

C. 研究結果

(1) P25 TCR-Tg マウスのナイーブ CD4⁺ T 細胞は自然条件下で Peptide-25 に応答し Th1 に分化し、IL-4 存在下に Peptide-25 で刺激すると Th2 に分化した。RAG2^{-/-} P25 TCR-Tg マウスのナイーブ CD4⁺ T 細胞を自然条件下で Peptide-25 により刺激する際、抗 IL-12, 抗 IL-18, 抗 IFN- γ 抗体を添加しても Th1 への分化は影響を受けなかった。また、IL-12/IL-18^{-/-} APC と Peptide-25 刺激しても Th1 への分化が見られた。更に、抗原提示細胞として既知の副刺激分子の発現やサイトカイン産生が認められない I-A^b-CHO 細胞と Peptide-25 で T 細胞を刺激しても Th1 への分化が見られた。

(2) P25 TCR-Tg マウスのナイーブ CD4⁺ T