

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に
係わる分子機構に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 牧野 正彦

(国立感染症研究所・病原微生物部部长)

平成20(2008)年3月

目 次

総括研究報告書：抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に係わる分子機構に関する研究 牧野 正彦（国立感染症研究所）	1
分担研究報告書：抗酸菌感染症への新たな対応戦略の基盤となる感染病態の分子機構に関する研究 河村 伊久雄（京都大学）	9
分担研究報告書：結核菌潜伏感染の分子機構と治療・予防戦略の開発 小林 和夫（国立感染症研究所）	13
分担研究報告書：新規 BCG ワクチンの開発 牧野 正彦（国立感染症研究所）	17
分担研究報告書：新規ワクチン開発のための基礎研究 －長期生存型 CD8 記憶細胞の分化誘導機序の解析－ 田村 敏生（国立感染症研究所）	23
分担研究報告書：ワクチンの検定と結核を増悪させる病態の解析 菅原 勇（結核予防会結核研究所）	27
分担研究報告書：結核菌を含む抗酸菌の細胞壁の生合成に不可欠な遺伝子の検索と解析 荒川 宜親（国立感染症研究所）	31
研究成果の刊行に関する一覧表	37

平成19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）

抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に

係わる分子機構に関する研究

総括研究報告書

主任研究者

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）
総括研究報告書

抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に係わる
分子機構に関する研究

主任研究者 牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部・部長）

研究要旨.

病原性抗酸菌は、代表的細胞内寄生性細菌であり、宿主免疫応答能と長期にわたり凌ぎ合いを続け、種々の機序をもって免疫応答能を凌駕した後、特異な病状を発現させる極めて制御が難しい慢性感染症である。近年、全世界的規模において、様々な観点から診断・予防・治療上の諸問題を解決すべく努力が続いているが、その歩みは決して速いものではない。本研究班においては、病原性抗酸菌感染症の制御に貢献すべく、これら重要研究課題に取り組んだ。結核菌はマクロファージなどの抗原提示細胞に親和性を有し、種々の機序により感染細胞の細胞死を誘導し、炎症を介し組織破壊をもたらす。細胞死として2つの形態が存在するが、組織破壊誘導能力の強い強毒株は感染細胞のネクロシスを誘導し、宿主免疫反応の誘導を阻止する。一方、病原性の弱い株では、感染細胞のアポトーシスを誘導し、宿主免疫反応を惹起する。細胞死の形態を規定する病原性抗酸菌因子の同定が、新しい予防・治療法の開発に繋がることが判明した。また、宿主免疫反応が有効に活性化されると、抗酸菌は休眠状態に入る。これまで休眠状態に抗酸菌を導入するターゲット分子に関わる研究が世界的にも行われてきたが、当研究班の本年度の成果として、細胞壁のミコール酸が重要なターゲットとなり得る可能性を示唆した。一方、抗酸菌と宿主免疫反応の直接的な相互関係の他に、両者のバランスを崩すリスク因子の存在も大きな問題の一つである。HIV-1 感染症など免疫不全がリスクファクターとして大きく脚光を浴びてきたが、これに加え糖尿病が重要な位置を占めることが明らかになった。高血糖値が持続するとマクロファージの機能障害が誘導され、生体防御反応の誘導が妨げられる可能性が示唆された。病原性抗酸菌症の発症を予防する方策として、ワクチンは必要不可欠である。発症予防をつつがなく遂行するためには、初回免疫と追加免疫の両者およびその組み合わせが重要である。免疫担当細胞の中では、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の両者の活性化が必要であり、初回免疫用ワクチンとして BCG をベースとして、これらを活性化する方策が個別に検討された。追加免疫ワクチンの開発においては、CD8 陽性 T 細胞の活性化に焦点を絞った研究が展開され、結核菌表層タンパク抗原 Ag85 の有効性とその機序の解析が行われ、CD8 陽性 T 細胞が抗原提示細胞からシグナルを受ける際、より効率的に抗原提示細胞を活性化することが重要であり、その際には CD4 陽性 T 細胞からのヘルプが重要であることが判明した。多剤耐性結核菌に対する化学療法剤の新しいターゲットを探索する目的で、結核菌の細胞壁の解析が行われ、新しいターゲット遺伝子が同定された。

分担研究者

- 河村 伊久雄 (京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・准教授)
小林 和夫 (国立感染症研究所・免疫部・部長)
田村 敏生 (国立感染症研究所・病原微生物部・室長)
菅原 勇 (結核予防会結核研究所・抗酸菌レファレンスセンター・センター長)
荒川 宜親 (国立感染症研究所・細菌第二部・部長)

A. 研究目的

病原性抗酸菌と人類は 100 年以上に及ぶ長い戦いを続けている。BCG ワクチンの開発やリファンピシンの開発により、人類は結核菌やらい菌に対し勝利を目前にしたかに見えた時代も存在する。しかし、病原性抗酸菌の底力は人類が考えるほど浅いものではなく、多剤耐性菌を生み、BCG 感受性を低下させ、20 世紀最大の恐怖を与えるまで、その力を再燃させている。抗酸菌が獲得している対人類戦略は恐ろしいほどにまで多岐にわたり、ある時は宿主を利用して長い眠りに付き、ある時は自らの存在を隠す蓑として使った細胞に死の宣告を与え、子孫を増やすべく努力をする。こうした抗酸菌の英知に人類がなすべき対処方策は、総合的かつ包括的に取り組むことであると考えられる。本研究班においては、初心に帰り、抗酸菌とこれの防衛に当たる宿主免疫担当細胞の凌ぎあいの原点を省みて、そこに現れる現象を網羅的に解析して、新しい予防・治療方策の開発に結びつけることを第一の目的とした。さらに、いかにして抗酸菌を休眠状態に導入し宿主に一瞬の安堵を与えるか、眠りに付かせるべくターゲット遺伝子の同定を図った。抗酸菌と宿主免疫細胞の長い戦いの中で、抗酸菌に味方し抗酸菌の猛威を助長する因子として重要なものは何か。その因子を一つでも明らかにすることは、抗酸菌感染症の包括的制御に繋がる。ここでは、因子として糖尿病に焦点を絞り、糖尿病が結核増悪リスクファクターの一つであることを実験的に証明し、その機序を探ることを第 3 の目的として掲げた。予防方策の開発には、古くて新しい方策を取り上げた。病原性抗酸菌の予防には、他の病原体と同様に初回免疫ワクチン

と追加免疫ワクチンの両者が必要であろうと想定し、両者の開発を個別に進めた。抗酸菌に対する生体防御反応には、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の両者が、その作用時期は異にして必要であることはコンセンサスが得られている事実であると考えられる。初回ワクチンとしては、安全性が担保されている BCG をベースとした戦略をとることが望ましい。いかにして両 T 細胞サブセットを効率的に賦活するか検討を加えた。追加免疫ワクチンとしては、活性化が難しい CD8 陽性 T 細胞を念頭に置いた研究が望ましい。抗酸菌表層タンパクとして免疫原性が高い Ag85 分子を用いて、効率的 CD8 陽性 T 細胞活性化機構の同定を目標として定めた。多剤耐性菌への対処は、永久に存続する最も大きな研究課題であろう。予防方策と治療方策の両者の開発が活発化されなければならない。従来の方針に左右されない新たな治療薬開発戦略を一刻も早く軌道に乗せる努力が必要であり、そのための基礎的研究を遂行することを第 5 の目的とした。

以下に主な研究課題を挙げる。

1. 病原性の異なる結核菌を用いた細胞死誘導機構の解析 (河村)
2. 結核菌の休眠を誘導するためのターゲット分子の同定 (小林)
3. 結核の増悪因子として糖尿病の果たす役割解明と病変悪化機構の解析 (菅原)
4. 初回免疫用ワクチンとして新しいリコンビナント BCG の開発 (牧野)
5. 追加免疫用ワクチン開発に向けた Ag85 の果たす役割の解析 (田村)
6. 新しい治療薬ターゲット探索として、結核菌細胞壁生合成経路を司る遺伝子の同定 (荒川)

B. 研究方法

1. マウスマクロファージ細胞株 RAW264 細胞に種々の結核菌を MOI 10 で感染させた。感染細胞ネクロシスは 24 時間後の LDH 産生量、アポトーシスは oligonucleosome 産生量を指標に判定した。ミトコンドリア膜傷害は、DIOC₆(3) で感染細胞を染色し、その蛍光強度を指標にして判定した(河村)。
2. 結核菌株 (CDC1551 および H37Rv) を野生株として、 β -ketoacyl carrier protein synthase, KasB) 欠損株を作製した。各種ミコール酸のサブクラスの検出は、結核菌死菌体をアルカリ水解した後、ミコール酸画分を薄層クロマトグラフィーで展開し行った。さらに、精製ミコール酸を MALDI/TOF/MS および NMR 分析し、構造修飾基を決定した(小林)。
3. 1 型糖尿病ラットおよび野生ラットに結核菌をエアロゾル感染させた。尿中および血清グルコース値で糖尿病の推移を経時的に検索した。感染ラットの肺および脾臓の結核菌数をコロニー算出して求めた。肺内の炎症性サイトカインの mRNA 発現レベルを real time PCR にて半定量的に算出した(菅原)。
4. CD4 陽性 T 細胞の効率的活性化を誘導するため、BCG のウレアーゼ遺伝子を除去したリコンビナント BCG (BCG- Δ UT) を開発した。ウレアーゼ遺伝子の除去にはバクテリオファージを用いた。CD8 陽性 T 細胞の活性化は、BCG を基調とする場合、Cross-presentation を促進させる必要がある。病原性抗酸菌共通主要抗原の一つ Major Membrane Protein (MMP)-II の遺伝子上流に HSP70 遺伝子を繋げ、BCG に遺伝子導入して新しいリコンビナント BCG (BCG-70M) を作製した。これら BCG をヒト末梢単球由来樹状細胞に感染させ、CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を刺激した。その活性化は IFN- γ の産生を指標とした(牧野)。
5. 結核菌 Ag85B の病原性を規定するペプチド Peptide-25 と OVA をフロイント不完全アジュバントに懸濁し、C57BL/6 マウス腹部皮下に免疫した。免疫 10 日後に脾臓細胞を回収し、*in vitro* で抗 CD3 抗体で再刺激し、24 時間後に CD4 陽性 T 細胞内の IFN- γ 産生量を FACSCalibur を用いて検索した。また、細胞障害性 CD8 陽性 T 細胞の活性化は、OVA 遺伝子導入した EL-4 胸腺腫細胞 (E. G7) の細胞死誘導能を ⁵¹Cr リリースアッセイで評価した。同時に、CD8 陽性 T 細胞の細胞内グランザイム B 産生能をサイトカイン染色法で評価した(田村)。
6. 抗酸菌に特異的な細胞壁を構築する新規 5 遺伝子を同定した。これらの遺伝子機能を検討するため、遺伝子を破壊するためのプラスミドを作製し、非病原性 *M. smegmatis* に導入し、遺伝子破壊株を作製した。さらに、これらの 5 遺伝子のうち 2 つを利用した抗酸菌の新規検出および鑑別法を開発するための PCR 用プライマーを設定した(荒川)。

倫理面への配慮 国立感染症研究所および当該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。動物実験は、当該研究施設の動物実験委員会の承認を得た上で、実験動物倫理指針に基づいて実施した。

C. 研究結果

1. マクロファージ様細胞株 RAW264 細胞に強毒結核菌 H37Rv を感染させるとネクロシスが誘導され、ネクロシスの誘導には結核菌の病原性関連遺伝子

領域である RD1 領域が重要な役割を果たしていた。一方、弱毒株では感染細胞のアポトーシスが誘導された。抗酸菌に特有な PPE ファミリータンパクである PPE37 の機能を検索した結果、PPE37 は炎症性サイトカインの産生を抑制することが判明した（河村）。

2. KasB 欠損株は親株に比し、小型集落形成、抗酸性の消失、紐状発育の消失が認められたが、in vitro での増殖速度は親株と同様であった。また、マウスを用いて感染実験を行うと、肉芽腫形成の減弱化、宿主マウスの生存延長、肺内生菌数の定常的低下が認められた（小林）。
3. 糖尿病ラットに結核菌を感染させると、感染後 7 週以内に死亡し、肉芽腫が増大し、肉芽腫内の結核菌数が増加していた。還元培養にて結核菌数の増加が確認された。糖尿病ラットでは、感染早期にはマクロファージの機能低下が誘導され、IFN- γ ・TNF α の産生が低下した。結核病変の進行に伴い、これらのサイトカインは増加した（菅原）。
4. MMP-II を樹状細胞内で分泌するリコンビナント BCG は、生体でらい菌の増殖を有意に抑制した。BCG- Δ UT は、BCG 感染ファゴゾームとライソゾームの融合を促進し、樹状細胞を活性化するとともに、樹状細胞を介してナイーブ CD4 陽性 T 細胞を強く活性化して IFN- γ の産生を誘導した。BCG-70M は、MMP-II-HSP70 複合体を細胞外へ分泌し、樹状細胞を活性化するとともに、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞をクロスプレゼンテーションにより活性化し IFN- γ を産生した（牧野）。
5. 結核菌 Ag85B 由来 Peptide-25 の CD8 陽性 T 細胞の機能的活性化について検索したところ、Th1 型活性化 CD4 陽性 T 細胞を抗原提示細胞との相互作用により抗原提示細胞が強く活性化した時のみ、CD8 陽性 T 細胞はグランザイム B を産生した。また、BCG 細胞壁画分に未感作 CD8 陽性 T 細胞を活性化する抗

原が存在することを明らかにした（田村）。

6. 抗酸菌に特異的な細胞壁を構築する新規発見遺伝子を破壊すると、*M. smegmatis* のコロニー形態が Rough 型から Smooth 型に変化した。また、抗酸菌新規検出または鑑別法の開発のために設定したプライマーは、結核菌群・MAC 群など病原性抗酸菌の同定に有用であった（荒川）。

D. 考察

抗酸菌感染症の制御を考える時、そのゴールをどこに設定するのが妥当であるか。ゴール設定の如何によって、人類の抗酸菌に対する接し方は大きく変わってくる。抗酸菌の感染を受けた際、逸早く眠りにつかせ、共存を図ることを目的とするのか、あるいは感染した全ての抗酸菌を体外へ排除して初めてゴールに到達したと考えるべきであるのか、ゴール設定によって採るべき戦略は異なってくる。抗酸菌にとっても宿主を死に追い込むことは、自らの居場所を失うことになり、決して得策ではない筈である。抗酸菌は子孫の存続を図るため分裂する必要があり、そのためには自らも活性化しなければならない。活性化すれば必然的に感染細胞は死に至る。しかし、その際どのような形態をとり、宿主細胞を死に至らしめるかによって、宿主の抗酸菌に対する接し方は変化する。アポトーシスが誘導されれば、やがては細胞性免疫が賦活化され、菌は再び眠るか体外へ排除され、ネクロシスを誘導すれば、細胞性免疫は誘導されず宿主に炎症を起こし、やがて組織破壊を余儀なくされてしまう。本年度は、抗酸菌とマクロファージの関連においてのみ、感染細胞死の形態とその誘導機序が考察された。しかし、マクロファージのみならず他の抗原提示細胞ならびに細胞性免疫担当細胞をも考慮に入れた包括的考察を展開して参りたい。同時に、ネクロシスを誘導する分子の同定も急がれる。また、抗酸菌を眠りにつかせる際の鍵となる分子の同定にメスが入られた。コードファクターを

形成するミコール酸の生合成が最終的な要素となり得る可能性が示唆された。抗酸菌の休眠に関する研究は、日本が世界的には非常に立ち遅れている研究分野の一つである。これまで報告されてきた潜伏化誘導因子、あるいは潜伏感染した抗酸菌に強発現する分子とミコール酸の相互作用を含めた総合的研究が必要である。

抗酸菌感染症の発症を予防する戦略としては、ワクチン開発が最も重要である。抗酸菌感染症においては、ウイルス感染症と異なり中和抗体の産生に大きな期待を掛けることはできない。その代わりに、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞がそれぞれ役割を異にして重責を担うことが可能である。これまで両 T 細胞サブセットをそれぞれマキシマムに活性化することを目指したワクチン開発は全世界的にもなされておらず、日本初のワクチン開発に期待がかかる。一方で、抗酸菌を体内に保有している高齢者に対して、アクティブにかつ強烈に免疫して潜伏化している抗酸菌を根こそぎ生体外へ排除する努力は、その必要性に疑問が残る。あくまで共存を図り、宿主は抗酸菌の影響を受けずに生涯を全うすることを目指すことが望ましいと思われる。日本国内ではこうした努力はこれまでなされてきておらず、その戦略を早急に構築することが必要である。乳幼児期に 1 回接種した BCG に全ての責任を負わせることは到底難しく、たった 1 回のワクチンで 80~90 年の長い年月をコントロールすることは、どのようなワクチンであっても容易くない。本研究班の成果が、その第一歩となることを期待する。同時に、潜伏化した抗酸菌を眠りから覚ませ、活性化させるリスクファクターはできる限り排除することが望ましい。恵まれた社会環境の中で、メタボリックシンドロームで苦しむ国民は増加の一途を辿っている。これまで結核の増悪因子の一つとして糖尿病が疫学調査から疑われてきた。本年度の重要な研究成果の一つとして、高血糖を維持することはマクロファージの機能障害を誘導し、結核菌の増殖を助長する可能性が示唆された。より詳細な研究により、マク

ロファージの機能障害を誘導する機序が解明され、本研究班から糖尿病がリスクファクターであることを立証する確かなる根拠が発信されることを期待する。

E. 結論

抗酸菌感染症における組織障害機構の一端が解明され、抗酸菌の休眠誘導ターゲット分子が同定された。初回免疫ワクチンとしての BCG の改良方策の糸口が明らかになり、CD8 陽性 T 細胞の長期生存誘導に向けた方策が明らかになった。高血糖の持続は、結核のリスクファクターの一つであることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaku, T., I. Kawamura, R. Uchiyama, T. Kurenuma, and M. Mitsuyama. RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected RAW264 cells via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. *FEMS Microbiol. Lett.*, 274:189-195, 2007.
- 2) Uchiyama, R., I. Kawamura, T. Fujimura, M. Kawanishi, K. Tsuchiya, T. Tominaga, T. Kaku, Y. Fukasawa, S. Sakai, T. Nomura, and M. Mitsuyama. Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of RAW 264 cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 75:2894-2902, 2007.
- 3) Bhatt, A., N. Fujiwara, K. Bhatt, S. S. Gurcha, L. Kremer, B. Chen, J. Chan, S. A. Porcelli, K. Kobayashi, G. S. Besra, and W. R. Jacobs, Jr. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in

- immunocompetent mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104:5157-5162, 2007.
- 4) Katsube, T., S. Matsumoto, M. Takatsuka, M. Okuyama, Y. Ozeki, M. Naito, Y. Nishiuchi, N. Fujiwara, M. Yoshimura, T. Tsuboi, M. Torii, N. Oshitani, T. Arakawa, and K. Kobayashi. Control of cell wall assembly by a histone-like protein in mycobacteria. J. Bacteriol., 189:8241-8249, 2007.
 - 5) Sugawara, I., Z. Li, L. Sun, T. Udagawa, and T. Taniyama. Recombinant BCG Tokyo (Ag85A) protects cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) infected with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis, 87:518-525, 2007.
 - 6) Shi, R., J. Zhang, K. Otomo, G. Zhang, and I. Sugawara. Lack of correlation between embB mutation and ethambutol minimal inhibitory concentration in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China. Antimicrob. Agents Chemother., 51:4515-4517, 2007.
 - 7) Yamada, H., S. Mizuno, A. Ross, and I. Sugawara. Retinoic acid therapy attenuates the severity of tuberculosis while altering lymphocyte and macrophage numbers and cytokine expression in rats infected with *M. tuberculosis*. J. Nutr., 137:2696-2700, 2007.
 - 8) Shi, R., J. Zhang, C. Li, Y. Kazumi, and I. Sugawara. Detection of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by denaturing HPLC analysis and DNA sequencing. Microbes Infect., 9:1538-1544, 2007.
 - 9) Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, and T. Mukai. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. Microbes and Infect., 9:70-77, 2007.
 - 10) Maeda, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Fukutomi, H. Nomaguchi, C. Abe, K. Kobayashi, S. Kitada, R. Maekura, I. Yano, N. Ishii, T. Mori, and M. Makino. Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy. FEMS Microbiol. Lett., 272:202-205, 2007.
 - 11) Kai, M., Y. Fujita, Y. Maeda, N. Nakata, S. Izumi, I. Yano, and M. Makino. Identification of trehalose dimycolate (cord factor) in *Mycobacterium leprae*. FEBS Lett., 581:3345-3350, 2007.
 - 12) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, N. Nakata, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. Characterization of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* complex. J. Bacteriol., 189:5515-5522, 2007.
 - 13) Duthie, M. S., W. Goto, G. C. Ireton, S. T. Reece, L. P. V. Cardoso, C. M. T. Martelli, M. M. A. Stefani, M. Nakatani, R. C. de Jesus, E. M. Netto, M. V. F. Balagon, E. Tan, R. H. Gelber, Y. Maeda, M. Makino, D. Hoft, and S. G. Reed. Use of Protein Antigens for early serological diagnosis of leprosy. Clin. Vaccine Immunol., 14:1400-1408, 2007.
 - 14) Wolf, A. J., B. Linas, G. J. Trevejo-Nuñez, E. Kincaid, T. Tamura, K. Takatsu, and J. D. Ernst. *Mycobacterium tuberculosis* Infects dendritic cells with high frequency and impairs their function *in vivo*. J. Immunol., 179:2509-2519, 2007.
 - 15) Ariga, H., Y. Shimohakamada, M. Nakada, T. Tokunaga, T. Kikuchi, A. Kariyone, T. Tamura, and K. Takatsu.

- Instruction of naive CD4⁺ T-cell fate to T-bet expression and T helper 1 development: roles of T-cell receptor-mediated signals. *Immunology*, 122:210-221, 2007.
- 16) Wolf, A. J., L. Desvignes, B. Linas, N. Banaiee, T. Tamura, K. Takatsu, and J. D. Ernst. Initiation of the adaptive immune response to *M. tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J. Exp. Med.*, in press.
2. 学会発表
- 1) Mycobacterium mammalian cell entry protein 1A (Mce1A)-mediated adherence enhances the chemokine production by A549 alveolar epithelial cells. Mitsuyama, M., and I. Kawamura. The 42nd US-Japan tuberculosis and leprosy research conference. 12-14 Sept, 2007, Zhengzhou, China.
- 2) Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. Makino, M., Y. Maeda, Y. Fukutomi, T. Mukai, and T. Mori. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42nd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Zengzhou, Henan, China, September 12-14, 2007.
- 3) Inhibition of the multiplication of *Mycobacterium leprae* vaccination with a recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *M. leprae*. Makino, M., Y. Maeda, M. Matsuoka, and T. Tamura. 17th International Leprosy Congress, Hyderabad, India, January 31-February 4, 2008.
- 4) Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Uchiyama, R., I. Kawamura, K. Tsuchiya, T. Tominaga, S. Sakai, T. Nomura, and M. Mitsuyama. 第 37 回日本免疫学会総会 2007 年 11 月 東京.
- 5) 結核菌の RD1 領域はミトコンドリア傷害と ATP 枯渇により感染マクロファージのネクローシス誘導に關与する Kurenuma, T., R. Uchiyama, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. 第 37 回日本免疫学会総会 2007 年 11 月 東京.
- 6) Critical involvement of pneumolysin in the production of IL-1 α , IL-1 β and IL-18 in infection with *Streptococcus pneumoniae*. Shoma, S., K. Tsuchiya, T. Nomura, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. 第 37 回日本免疫学会総会 2007 年 11 月 東京.
- 7) 抗酸菌研究の最前線(シンポジウム). 岡田全司、小林和夫. 第 82 回日本結核病学会総会 2007 年 6 月 大阪.
- 8) 結核菌病原因子による病変形成と感染防御. 抗酸菌研究の最前線(シンポジウム). 松本壮吉、小林和夫. 第 82 回日本結核病学会総会 2007 年 6 月 大阪.
- 9) 結核菌糖脂質の合成制御における mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の役割. 松本壮吉、藤原永年、吉村満美子、尾関百合子、西内由紀子、和田 崇之、小林和夫. 第 82 回日本結核病学会総会 2007 年 6 月 大阪.
- 10) 抗酸菌の蛋白質発現と薬剤抵抗性における mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の役割. 仁木 誠、吉村満美子、平山幸雄、松本壮吉、和田 崇之、小林和夫. 第 82 回日本結核病学会総会 2007 年 6 月 大阪
- 11) ミコール酸分子種の異なる cord factor の宿主応答. 藤原永年、松本

- 壮吉、前田伸司、矢野郁也、小林和夫。
第 82 回日本結核病学会総会 2007 年
6 月 大阪。
- 12) ヒアルロン酸の抗酸菌増殖に対する
作用。平山幸雄、吉村満美子、仁木 誠、
松本壮吉、尾関百合子、菅原 勇、青
木俊明、和田 崇之、西内由紀子、小
林和夫。第 82 回日本結核病学会総会
2007 年 6 月 大阪。
- 13) BCG 感染時における Th1/Th2 バランス
への STAT6 の役割。尾関百合子、松本
壮吉、小林和夫。第 82 回日本結核病
学会総会 2007 年 6 月 大阪。
- 14) 菅原 勇、宇田川忠、谷山忠義。武漢
大学で行われたカニクイサル結核菌
感染実験。第 82 回日本結核病学会
2007 年 6 月 大阪。
- 15) 抗酸菌糖脂質生合成における fucose
転移酵素遺伝子の解析。宮本友司，向
井 徹，前田百美，甲斐雅規，中田 登，
中 崇，矢野郁也，牧野正彦。第 80
回日本細菌学会総会 2007 年 3 月
大阪。
- 16) 結核菌分泌蛋白による Th1 分化誘導
機構の解析：TCR による抗原認識の役
割。下袴田陽子，田村敏生，牧野正彦，
高津聖志。第 90 回日本細菌学会関東
支部総会 2007 年 10 月 東京。
- 17) *Mycobacterium avium* complex におけ
る fucose 含有糖脂質抗原の生合成解
析。宮本友司，向井 徹，前田百美，
甲斐雅規，中田 登，中 崇，矢野郁
也，牧野正彦。第 90 回日本細菌学会
関東支部総会 2007 年 10 月 東京。
- 18) 結核菌分泌蛋白による Th1 分化誘導
機構の解析：TCR による抗原認識の役
割。下袴田陽子，田村敏生，高津聖志。
第 90 回日本細菌学会関東支部総会
2007 年 10 月 東京。
- 19) P25 CD4⁺ T 細胞活性化とクロスプライ
ミング増強の解析。刈米アイ，田村敏
生，高津聖志。第 37 回日本免疫学会
総会・学術集会 2007 年 11 月 東京
- 20) IL-10 delayed induction of
Mycobacterium tuberculosis (Mtb)-
specific Th1 immune response in the
lung of Mtb-infected
TCR-transgenic mice. Yahagi, A., M.
Umemura, T. Tamura, M. D. Begum, S.
Hamada, K. Oshiro, Y. Okamoto, A.
Kariyone, K. Takatsu, G. Matsuzaki.
第 37 回日本免疫学会総会・学術集会
2007 年 11 月 東京。
- 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19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）

抗酸菌感染症への新たな対応戦略の基盤となる感染病態の

分子機構に関する研究

分担研究報告書

分担研究者

河村 伊久雄

（京都大学・准教授）

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

抗酸菌感染症への新たな対応戦略の基盤となる感染病態の分子機構に関する研究

分担研究者 河村伊久雄（京都大学大学院医学研究科微生物感染症学准教授）
研究協力者 角 泰人（京都大学大学院医学研究科微生物感染症学研究生）
内山良介（京都大学大学院医学研究科微生物感染症学研究生）
Sylvia Daim（京都大学大学院医学研究科微生物感染症学大学院生）
酒井俊介（京都大学大学院医学研究科微生物感染症学大学院生）

研究要旨.

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞に結核菌 H37Rv を感染させたところ、ネクロシスが誘導された。しかし、結核菌の病原性関連遺伝子領域である RD1 欠損株の感染では、ネクロシスの誘導は認められず、結核菌によるネクロシス誘導には RD1 領域が重要であることが示された。さらに、結核菌 H37Rv 感染細胞では、RD1 に依存したミトコンドリア内膜傷害および細胞内 ATP 量の減少が観察され、これがネクロシスの原因であることが示唆された。また、結核菌 H37Rv 感染初期にはカスパーゼ 9 の活性化が誘導され、このカスパーゼ 9 がネクロシスの抑制に関与することが示された。

抗酸菌に特有な PPE ファミリータンパク質のうち、PPE37 は感染マクロファージや宿主体内でその発現が著しく増加することが示されている。そこで、その機能を調べるため、PPE37 を発現する *Mycobacterium smegmatis* を作製し、*in vitro* で感染実験を行った。その結果、PPE37 は感染マクロファージの細胞死に影響することはないが、炎症性サイトカイン産生を抑制することが示され、感染後の宿主免疫応答の制御に関与することが示唆された。

A. 研究目的

結核菌は感染宿主体内では細胞内寄生性を示し、マクロファージに貪食されてもその殺菌機構に抵抗して、長期間生存することが可能である。また、結核菌感染宿主では、抗原特異的 T 細胞を中心とした強い防御免疫が誘導されるが、結核菌はこの防御免疫が発現しても宿主体内から排除されず、生存し続けることができる。多剤耐性結核菌の増加や結核蔓延国からの人的流入などにより今後結核患者の増加が懸念される現状にあるなか、結核を撲滅するためにはその抵抗性メカニズムを理解する必要がある。

細胞内寄生菌である結核菌が感染を成立させ、長期間にわたり体内に生存し続けるためには、宿主細胞であるマクロファージ

の殺菌機構を回避すると同時に、その細胞死を制御するメカニズムを獲得することが重要と考えられる。しかし、病原性の強い結核菌株は感染マクロファージにネクロシスを誘導する能力が高いことが示されている。結核菌が宿主細胞のネクロシスを誘導する意義や、その機序については今のところ明確な解答は得られていないが、これは菌の病原性発現において重要な機序であると考えられる。最近、結核菌の病原性に関与する RD1 遺伝子領域が菌のネクロシス誘導に重要であることが示された。そこで本研究では、RD1 によるネクロシス誘導メカニズムを解析した。また、抗酸菌に特有な PPE ファミリータンパク質のうち、PPE37 タンパク質は感染マクロファージや

宿主体内でその発現が著しく増加することが示されている。この結果は、PPE37 が細胞内生存あるいは宿主感染防御の制御に関与する可能性を示している。そこで、PPE37 が感染後に果たす役割について解析を行った。

B. 研究方法

感染マクロファージの細胞死誘導 マウスマクロファージ細胞株 RAW 細胞に結核菌 H37Rv、H37Rv の RD1 欠損株および RD1 欠損株に RD1 領域を相補した RD1 相補株を MOI=10 で感染させた。細胞のネクロシスは、24 時間後の培養上清中に遊離した lactate dehydrogenase (LDH) 量および propidium iodide (PI) 染色性を指標にして解析した。感染マクロファージのアポトーシスは、結核菌を 24 時間感染させた細胞の oligonucleosome 量を指標にして判定した。また、感染後の細胞内生菌数は、細胞を破碎後、Middlebrook 7H10 培地で 3 週間培養して得られたコロニー数より算出した。

ミトコンドリア膜傷害 RAW264 細胞に結核菌を感染後、経時的にミトコンドリアに局在性のある 3, 3'-dihexyloxy-carbocyanine iodide (DIOC₆(3)) で染色し、その蛍光強度を指標にしてミトコンドリア傷害の程度を調べた。また、結核菌感染後の細胞内活性酸素量は、活性酸素により酸化されると蛍光を発する dichlorodihydrofluorescein (DCFA) の蛍光強度を指標にして解析した。

細胞内 ATP 量 結核菌を感染させた RAW264 細胞を 0.5%トリクロル酢酸溶液で溶解し、cell lysate を調製した。cell lysate 中の ATP 量は、ENLITEN ATP assay system bioluminescence detection kit (Promega) で測定した。

カスパーゼ阻害剤によるネクロシス誘導効果 各種カスパーゼ阻害剤の存在下、RAW264 細胞に結核菌 H37Rv を感染させ (MOI=1)、経時的に感染細胞のネクロシスを PI 染色性を指標にして解析した。結核菌感染後のカスパーゼの活性は、各種カスパーゼ特異的発光性基質の分解により得られ

る発光強度に基づいて調べた。

倫理面への配慮 本年度の研究は、すべてマウス腹腔マクロファージおよびマクロファージ細胞株を用いた実験である。マウスの使用に関しては、動物実験委員会の承認を得た上で、京都大学実験動物倫理指針に基づいて実施した。

C. 研究結果

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞に結核菌 H37Rv を感染させたところ LDH の遊離が認められた。しかし、結核菌の病原性関連遺伝子領域である RD1 欠損株の感染では、その細胞内増殖速度は H37Rv と同じであるにもかかわらず、感染細胞からの LDH の遊離は認められなかった。また、RD1 相補株感染では H37Rv 感染の場合と同様に感染細胞から LDH の遊離が観察された。感染 24 時間後では細胞内 oligonucleosome 量の増加は認められなかったことから、結核菌感染後の LDH の遊離はアポトーシスによるものではなく、細胞がネクロシスに陥ったことを示すものである。またこの結果は、結核菌感染後の RAW264 細胞に誘導されるネクロシスに RD1 が重要な役割を果たすことを示している。さらに、結核菌 H37Rv および RD1 相補株の感染では、感染 2 時間後よりミトコンドリアの内膜傷害を示す DIOC₆(3) の蛍光強度の低下が認められ、その程度は時間経過とともに増大することがわかった。一方、このようなミトコンドリア傷害は RD1 欠損株感染では認められなかった。さらに、H37Rv および RD1 相補株の感染では、感染 6 時間後には細胞内 ATP 量の減少が観察された。しかし、RD1 欠損株では ATP 量に変化は認められなかった。これらの結果から、RD1 領域の遺伝子産物がミトコンドリア膜傷害に関与し、その結果誘導される細胞内 ATP 量の減少がネクロシスの原因となることが示唆された。

上述のように結核菌 H37Rv を RAW264 細胞に高い MOI で感染させると早期にネクロシスが誘導される。一方、低い MOI で感染させた場合には、激しいネクロシス様の細胞形態の変化は認められない。しかし、

この系に広域カスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk を加えるとネクロシスが誘導されることから、感染初期にカスパーゼを介したネクロシス抑制機序が存在することが示された。各種特異的カスパーゼ阻害剤を用いて同様の実験を行った結果、カスパーゼ 9 がネクロシスの抑制に関与することが明らかとなった。また、カスパーゼ 9 の活性化は H37Rv 感染早期より誘導されることが確認された。一方、弱毒株である H37Ra 感染ではカスパーゼ 3 やカスパーゼ 8 の活性化は強く誘導されるが、カスパーゼ 9 の活性化は誘導されないことが示された。

抗酸菌に特有な PPE ファミリータンパク質のうち、PPE37 は感染マクロファージや宿主体内でその発現が著しく増加することが示されている。そこで、その機能を調べるため、PPE37 を発現する *M. smegmatis* を作製した。マウス腹腔マクロファージに感染後、細胞内菌数を比較したところ、PPE37 の発現は *M. smegmatis* の細胞内菌数に影響しないことが示された。また、感染マクロファージの細胞死の誘導にも影響を及ぼさなかった。一方、感染後の炎症性サイトカイン産生を調べたところ、野生株感染では強い IL-6 および TNF- α 産生が認められたが、PPE37 発現株の感染ではそれらサイトカイン産生が有意に抑制されることが示された。

D. 考察

病原性の強い結核菌は、感染したマクロファージのネクロシスを誘導する能力が高い。これは結核菌がミトコンドリア内膜を傷害することで ATP 合成能が低下するためであると考えられる。また、この機序には RD1 領域の遺伝子産物が関与することが明らかとなった。RD1 領域には分泌装置を構成するタンパク質と分泌因子 (ESAT-6 および CFP-10) がコードされている。また最近、ESAT-6 と CFP-10 以外にもこの分泌装置により分泌される成分が存在することが示された。*Salmonella typhimurium* は結核菌と同様にマクロファージに感染後ファゴソーム内で生存するが、この菌は III 型分

泌装置を使ってエフェクター分子 (sopB) を細胞質内に分泌しマクロファージ殺菌機構を回避することが明らかにされている。結核菌においても同様の機序が存在することが考えられ、結核菌の分泌因子が実際に細胞質内に分泌され、ネクロシス誘導あるいはミトコンドリア傷害に関与するか否かを明らかにすることは、菌の病原性メカニズムの解明において重要な情報となる。また本研究では、カスパーゼ 9 が H37Rv 感染で活性化され、ネクロシスを阻害する機序が存在することが示された。弱毒株である H37Ra 感染では強いカスパーゼ 3 やカスパーゼ 8 の活性化が誘導され、細胞はアポトーシスに陥る。しかし、強毒株 H37Rv 感染ではカスパーゼ 3 やカスパーゼ 8 の活性化は明らかに H37Ra 感染に比較すると弱い、カスパーゼ 9 の活性化は強く誘導する。この菌の病原性に関係したカスパーゼ 9 の活性化の誘導が、どのような機序によるのかを明らかにすることも今後の重要な課題である。

さらに、本年度は感染後にその発現が増加する PPE37 の機能について解析し、このタンパク質がサイトカイン産生に影響を及ぼす可能性を示すことができた。最近、PPE ファミリータンパク質が PPE モチーフを含む領域を介して菌体表面に存在することが示唆されている。従って、PPE37 がマクロファージに抑制性のシグナルを送るのか、あるいは菌体表面のリガンドをマクスするためにサイトカイン産生応答が抑制されるなどの可能性が考えられる。この点についてもさらに解析を行い、その抑制機序を明らかにする必要がある。

E. 結論

病原性の強い結核菌はマクロファージのネクロシスを誘導する能力が高く、それには RD1 領域が重要な役割を果たす。しかし、感染初期に結核菌はカスパーゼ 9 の活性化を誘導してネクロシスを抑制し、細胞内増殖を可能にしている。一方、一旦増殖した後は細胞にネクロシスを誘導することで菌は細胞外に拡散し、感染を拡大す

るものと考えられる。また、PPE37 はマクロファージ内での菌の殺菌抵抗性や感染細胞の細胞死に影響を及ぼすことはないが、炎症性サイトカインの産生抑制に関与することが示され、感染後の宿主免疫応答の制御にその役割を果たす可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaku, T., I. Kawamura, R. Uchiyama, T. Kurenuma, and M. Mitsuyama. RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected RAW264 cells via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. *FEMS Microbiol. Lett.*, 274:189-195, 2007.
- 2) Uchiyama, R., I. Kawamura, T. Fujimura, M. Kawanishi, K. Tsuchiya, T. Tominaga, T. Kaku, Y. Fukasawa, S. Sakai, T. Nomura, and M. Mitsuyama. Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of RAW 264 cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 75:2894-2902, 2007.
- 3) 河村伊久雄、光山正雄 抗結核防御免疫と結核菌による免疫制御 実験医学 (羊土社) 25:3183-3189, 2007.
- 4) 河村伊久雄 結核菌の病原性発現機構はどこまで判ったか 化学療法の領域 (医薬ジャーナル社) 23:1750-1756, 2007.

2. 学会発表

- 1) *Mycobacterium mammalian* cell entry protein 1A (Mce1A)-mediated

adherence enhances the chemokine production by A549 alveolar epithelial cells. Mitsuyama, M., and I. Kawamura. The 42nd US-Japan tuberculosis and leprosy research conference. 12-14 Sept, 2007, Zhengzhou, China.

- 2) Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Uchiyama, R., I. Kawamura, K. Tsuchiya, T. Tominaga, S. Sakai, T. Nomura, and M. Mitsuyama. 第37回日本免疫学会総会 2007年11月 東京.
- 3) 結核菌の RD1 領域はミトコンドリア傷害と ATP 枯渇により感染マクロファージのネクロシス誘導に関与する Kurenuma, T., R. Uchiyama, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. 第37回日本免疫学会総会 2007年11月 東京.
- 4) Critical involvement of pneumolysin in the production of IL-1 \cdot , IL-1 \cdot and IL-18 in infection with *Streptococcus pneumoniae*. Shoma, S., K. Tsuchiya, T. Nomura, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. 第37回日本免疫学会総会 2007年11月 東京.

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19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）

結核菌潜伏感染の分子機構と治療・予防戦略の開発

分担研究報告書

分担研究者

小林 和夫

（国立感染症研究所・免疫部部長）

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

結核菌潜伏感染の分子機構と治療・予防戦略

分担研究者	小林 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・部長)
研究協力者	大原 直也	(国立感染症研究所・免疫部・室長)
研究協力者	岡部 真裕子	(国立感染症研究所・免疫部・研究員)
研究協力者	阿戸 学	(国立感染症研究所・免疫部・主任研究官)
研究協力者	大西 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・主任研究官)
研究協力者	松本 壮吉	(大阪市立大学大学院・医学研究科・准教授)
研究協力者	藤原 永年	(大阪市立大学大学院・医学研究科・講師)

研究要旨

世界で約 20 億人が結核菌に既感染、900 万人が結核を発病、200 万人が死亡し、現在でも、結核は甚大な健康被害を提供している（2006 年）。成人結核のほとんどは「長期潜在性・持続感染から発症する二次性結核（内因性再燃）」に起因している。Trehalose dimycolate (TDM) など糖脂質は結核菌に特徴的であるため、糖脂質関連酵素 (β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase : KasB) の潜在性結核菌感染における役割の解明を研究目的とした。kasB 欠損株の細菌学的性状として、1) 小型集落形成、2) 抗酸性の消失、3) 紐状発育（病原性結核菌で増強）の消失や 4) TDM 炭素鎖長の短縮（親株に比しく 10）が認められた。kasB 欠損株に対する宿主応答として、1) 病理組織学的に肉芽腫形成の減弱・消失、2) 組織内で抗酸性の消失、3) 感染マウスの生存延長、4) 肺の臓器内生菌数の定常的低下を示し、親株と対比的であった。結核菌糖脂質関連酵素 (KasB) は「抗酸性」、「病原性」や「休眠および潜在性結核菌感染」に重要であり、KasB を標的とした抗結核化学療法薬の開発や免疫応答は潜在性結核菌感染対策に基盤を提供した。

A. 研究目的

世界で約 20 億人（日本：2,500 万人）が結核菌に既感染、900 万人（日本：2,6 万人）が結核を発病、200 万人（日本：2,3 千人）が死亡し、現在でも、結核は甚大な健康被害を提供している（2006 年）。結核の発症機序には「感染後早期に発症する一次性結核」、「長期潜在性・持続感染から発症する二次性結核（内因性再燃）」や「既感染宿主に再感染し発病（外来性再感染）」があるが、成人結核のほとんどは「内因性再燃」に起因している。結核菌は宿主内で持続感染し、防御機構の破綻（老化、免疫抑制薬／副腎皮質ステロイド薬投与、HIV 感染など）により、発育・増殖を再開し、

結核を発病する。人類の約 1/3 が結核菌に無症候性持続・潜伏感染している事実を考慮すると、持続・潜伏感染機序の解明は新規抗結核薬や感染曝露後（治療的）ワクチン開発を促進し、従来 of 主要な結核対策である活動性結核に対する抗微生物化学療法や感染曝露前 BCG ワクチンと異なる視点から、結核制圧に寄与することが期待される。実際、通常の抗結核薬が増殖期結核菌に有効であるが、代謝活性の低下した休眠菌には無効であること、加えて、休眠菌に対する宿主免疫応答はほとんど不明であり、持続感染に対する治療や発病予防は未確立である。この機構が解明されれば分子標的が可能となり、発病前に治療・予防介入の開

発など、結核対策に資する。

Trehalose dimycolate (TDM) など糖脂質は結核菌に特徴的であるため、糖脂質関連酵素 (β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase : KasB) の生物学的役割の解明を目的とした。

B. 研究方法

常法に従い、結核菌 CDC1551 や H37Rv 株を親株 (野生型) として、*kasB* 欠損株を作製した。*kasB* 欠損株の糖脂質分析は、培養後死菌体をアルカリ水解した。ミコール酸画分を薄層クロマトグラフィー (TLC) で展開し、各種ミコール酸サブクラスを検出した。精製ミコール酸サブクラスを MALDI/TOF/MS、NMR 分析し、構造修飾基を決定した。

感染実験として、C57BL/6 や重症複合型免疫不全マウス (SCID) に *kasB* 欠損株を噴霧 (10^2 CFU) や経静脈 (10^5 CFU) 感染させ、病理組織および生菌数を経時的に解析した。

C. 研究結果

kasB 欠損株の細菌学的性状として、1) 小型集落形成、2) 抗酸性の消失、3) 紐状発育 (病原性結核菌で増強) の消失や 4) TDM 炭素鎖長の短縮 (親株に比しく 10) が認められた。なお、*kasB* 欠損株の倍加時間 (12-15 時間) は親株 (野生型) と同様であった。

kasB 欠損株由来ミコール酸分子は、炭素鎖長が α ; C76-80, methoxy; C81-85, keto; C78-82 であり、野生株由来ミコール酸に比べ、炭素鎖長が α , methoxy ミコール酸では 2 炭素分、keto-ミコール酸では 4-6 炭素分、短鎖となっていた。また、トランス型シクロプロパン環が検出されず、合成中間体である二重結合が蓄積されていることが判明した。

kasB 欠損株に対する宿主応答として、1) 病理組織学的に肉芽腫形成の減弱・消失、2) 組織内で抗酸性の消失、3) 感染マウスの生存延長 (感染後 600 日まで 100% 生存、親株では 356 日までに 100% 死亡)、4) 肺の臓器内生菌数の定常的低下 (*kasB*

欠損株 : $10^{2.5-4}$ CFU、親株 : 10^{6-7} CFU) を示し、親株と対比的であった。なお、相補株 (*kasB* 欠損株に *kasB* 遺伝子を導入) は親株と同様の応答を示した。SCID マウスを用いた *kasB* 欠損株感染実験でも、生存期間の延長を認めた。

D. 考察

結核菌 TDM は病原因子であり、感染宿主に 1) 異物性および過敏性肉芽腫炎症や血管新生、2) 細胞性免疫 (遅延型過敏反応)、3) 免疫・炎症性細胞にアポトーシスや 4) 免疫制御性 (interleukin-12、interferon-gamma) や炎症惹起性サイトカインやケモカイン (腫瘍壊死因子- α 、単球走化性蛋白-1 やマクロファージ炎症性蛋白-1) を誘導する多機能分子である。また、抗結核薬 (isoniazid や OPC67683) は TDM などミコール合成阻害薬であり、TDM は結核菌の生存にも重要な構成成分である。従って、TDM は結核菌および感染宿主の双方に重要な役割を演じ、結核の病態に鍵分子である。TDM の炭素鎖長は 80-90 であり、TDM 炭素鎖長を短縮することにより、病原性 (肉芽腫形成) や毒性 (体重減少) が減弱することから、構造-活性連関解析から炭素鎖長と病原性の関連が示唆されていた。

kasB 欠損株の細菌学的性状として、1) 小型集落形成、2) 抗酸性の消失、3) 紐状発育の消失および 4) 炭素鎖長の短縮 (< 10) を示した。すなわち、KasB は TDM 合成において炭素鎖長を伸長させる機能を示し、この酵素の欠損が結核菌の生物学的特徴に多大な影響を示すことが示唆された。

また、*kasB* 欠損株に対する宿主応答として、1) 病理組織学的に肉芽腫形成の減弱・消失、2) 組織内で抗酸性の消失、3) 感染マウスの生存延長、4) 肺の臓器内生菌数の定常的低下を示した。病変部位における抗酸性の低下は良く知られた事実であるが、結核菌が感染組織内で糖脂質代謝を変換させ、抗酸性を消失している可能性がある。

また、*kasB* 欠損株による肉芽腫形成の減弱、感染宿主の生存延長や臓器内生菌数の

低下は「潜在性結核菌感染」に合致した所見である。潜在性結核菌感染は「宿主」と「結核菌」両因子が関与した病態であるが、休眠菌要因として KasB が関与していることを示唆している。すなわち、結核菌は KasB を制御することにより、病原性を減弱させ、宿内で長期生存を可能にしているであろう。休眠結核菌では「糖代謝から脂質代謝へ変換」が知られ、KasB がこの変換に役割を演じている可能性も示唆される。KasB 制御系の解明は結核菌の生存や発育・増殖に重要な糸口を提供するであろう。悪条件(低栄養や低酸素)における KasB 発現状況の探索、「潜在性結核菌感染」状態における Kas 動態、加えて、KasB に対する宿主応答と潜在性結核菌感染におけるその役割は今後の研究課題である。さらに、通常の抗結核薬が増殖期結核菌に有効であるが、薬剤標的関連遺伝子に変異がないにも拘らず、代謝活性の低下した休眠菌には無効 (phenotypic resistance) である。KasB 欠損結核菌株は休眠菌に対する薬剤感受性試験の開発や薬剤標的候補の探索研究にも有益な情報を提供することが期待される。

「潜在性結核菌感染」の動物モデルは未確立であるが、kasB 欠損結核菌株を用いた感染実験は「潜在性結核菌感染」を解析する上で良質なモデルとなるであろう。

E. 結論

結核菌糖脂質関連酵素 (KasB) は「抗酸性」、「病原性」や「休眠および潜在性結核菌感染」に重要であり、KasB を標的とした抗結核化学療法薬の開発や免疫応答は潜在性結核菌感染対策に基盤を提供した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bhatt, A., N. Fujiwara, K. Bhatt, S. S. Gurcha, L. Kremer, B. Chen, J. Chan, S. A. Porcelli, K. Kobayashi, G. S. Besra, and W. R. Jacobs, Jr. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical

latent tuberculosis in immunocompetent mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104:5157-5162, 2007.

- 2) Katsube, T., S. Matsumoto, M. Takatsuka, M. Okuyama, Y. Ozeki, M. Naito, Y. Nishiuchi, N. Fujiwara, M. Yoshimura, T. Tsuboi, M. Torii, N. Oshitani, T. Arakawa, and K. Kobayashi. Control of cell wall assembly by a histone-like protein in mycobacteria. J. Bacteriol., 189:8241-8249, 2007.
- 3) 松本壮吉、尾関百合子、小林和夫. 結核菌の新規病原因子 MDP1 の感染病態への関わり. 感染・炎症・免疫, 37: 98-101, 2007.
- 4) 岡部真裕子、大原直也、小林和夫. 結核. 特集. 新興・再興感染症の現状と予防. 保健の科学, 49: 691-697, 2007.

2. 学会発表

- 1) 抗酸菌研究の最前線 (シンポジウム). 岡田全司、小林和夫. 第 82 回日本結核病学会総会 2007 年 6 月 大阪.
- 2) 結核菌病原因子による病変形成と感染防御. 抗酸菌研究の最前線 (シンポジウム). 松本壮吉、小林和夫. 第 82 回日本結核病学会総会 2007 年 6 月 大阪.
- 3) 結核菌糖脂質の合成制御における mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の役割. 松本壮吉、藤原永年、吉村満美子、尾関百合子、西内由紀子、和田 崇之、小林和夫. 第 82 回日本結核病学会総会 2007 年 6 月 大阪.
- 4) 抗酸菌の蛋白質発現と薬剤抵抗性における mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) の役割. 仁木 誠、吉村満美子、平山幸雄、松本壮吉、和田 崇之、小林和夫. 第 82 回日本結核病学会総会 2007 年 6 月 大阪.
- 5) ミコール酸分子種の異なる cord factor の宿主応答. 藤原永年、松本壮吉、前田伸司、矢野郁也、小林和夫. 第 82 回日本結核病学会総会 2007 年 6