

- development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med* 1995; **182**:1579–84.
- 16 Tao X, Grant C, Constant S, Bottomly K. Induction of IL-4-producing CD4⁺ T cells by antigenic peptides altered for TCR binding. *J Immunol* 1997; **158**:4237–44.
 - 17 Rulifson IC, Sperling AI, Fields PE, Fitch FW, Bluestone JA. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J Immunol* 1997; **158**:658–65.
 - 18 Kato T, Nariuchi H. Polarization of naive CD4⁺ T cells toward the Th1 subset by CTLA-4 costimulation. *J Immunol* 2000; **164**:3554–62.
 - 19 Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T, Tanaka Y, Baum P, Sergerie M, Hermann P, Delespesse G. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4⁺ T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood* 1998; **92**:3338–45.
 - 20 Akiba H, Miyahira Y, Atsuta M *et al.* Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *J Exp Med* 2000; **191**:375–80.
 - 21 Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001; **409**:97–101.
 - 22 Salomon B, Bluestone JA. LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *J Immunol* 1998; **161**:5138–42.
 - 23 Smits HH, de Jong EC, Schuitemaker JH, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y, Kapsenberg ML, Wierenga EA. Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 ligation favors human Th1 development. *J Immunol* 2002; **168**:1710–6.
 - 24 Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; **100**:655–69.
 - 25 Zhang WX, Yang SY. Cloning and characterization of a new member of the T-box gene family. *Genomics* 2000; **70**:41–8.
 - 26 Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D *et al.* T-bet is rapidly induced by interferon- γ in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**:15137–42.
 - 27 Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2002; **3**:549–57.
 - 28 Mullen AC, High FA, Hutchins AS *et al.* Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 2001; **292**:1907–10.
 - 29 Yanagisawa S, Koike M, Kariyone A, Nagai S, Takatsu K. Mapping of V β 11⁺ helper T cell epitopes on mycobacterial antigen in mouse primed with *Mycobacterium tuberculosis*. *Int Immunol* 1997; **9**:227–37.
 - 30 Kariyone A, Higuchi K, Yamamoto S *et al.* Identification of amino acid residues of the T-cell epitope of *Mycobacterium tuberculosis* α antigen critical for V β 11⁺ Th1 cells. *Infect Immun* 1999; **67**:4312–9.
 - 31 Takatsu K, Kariyone A. The immunogenic peptide for Th1 development. *Int Immunopharmacol* 2003; **3**:783–800.
 - 32 Kariyone A, Tamura T, Kano H, Iwakura Y, Takeda K, Akira S, Takatsu K. Immunogenicity of Peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN- γ . *Int Immunol* 2003; **15**:1183–94.
 - 33 Kikuchi T, Uehara S, Ariga H, Tokunaga T, Kariyone A, Tamura T, Takatsu K. Augmented induction of CD8⁺ cytotoxic T-cell response and antitumour resistance by T helper type 1-inducing peptide. *Immunology* 2006; **117**:47–58.
 - 34 Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satooskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 2002; **295**:338–42.
 - 35 Seki E, Tsutsui H, Tsuji NM *et al.* Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Immunol* 2002; **169**:3863–8.
 - 36 Tamura T, Ariga H, Kinashi T *et al.* The role of antigenic peptide in CD4⁺ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int Immunol* 2004; **16**:1691–9.
 - 37 Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994; **171**:131–7.
 - 38 Constant S, Pfeiffer C, Woodard A, Pasqualini T, Bottomly K. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1995; **182**:1591–6.
 - 39 Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997; **15**:297–322.
 - 40 Oosterwegel MA, Mandelbrot DA, Boyd SD, Lorsbach RB, Jarratt DY, Abbas AK, Sharpe AH. The role of CTLA-4 in regulating Th2 differentiation. *J Immunol* 1999; **163**:2634–9.
 - 41 Radvanyi LG, Mills GB, Miller RG. Religation of the T cell receptor after primary activation of mature T cells inhibits proliferation and induces apoptotic cell death. *J Immunol* 1993; **150**:5704–15.
 - 42 Zhang X, Brunner T, Carter L *et al.* Unequal death in T helper cell (Th) 1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *J Exp Med* 1997; **185**:1837–49.

7. 抗結核防御免疫と結核菌による免疫制御

河村 伊久雄, 光山正雄

結核菌感染宿主では、抗原特異的Th1型T細胞の分化が誘導され、結核菌に対する強い感染防御免疫が出現する。しかし、結核菌は防御免疫が成立しても容易に感染宿主体内から排除されず、長期間生存し続けることができる。結核を撲滅するためにはこの機序を明らかにする必要があるが、いまだ解明には至っていない。本稿では、宿主感染防御免疫の全体像を示すとともに、菌がどのようにして宿主防御免疫に抵抗し、体内で生在し続けるのかについてこれまでに明らかにされたことを示す。

はじめに

結核は世界的に見て今なお単一の病原体による最大の感染症である。WHOはこれまでに世界の約3割が結核の感染を受け、毎年約880万人の結核患者が発生し、約158万人が結核で死亡していると推定している(www.who.int/tb/publications/global_report)。結核患者の発生はアフリカおよびアジアなどの発展途上国に多くみられるが、多剤耐性結核菌の出現頻度の増加

や、結核蔓延国からの人的流入などにより、先進国においても今後結核の増加が懸念される現状にある。我が国においては、これまで減少を続けてきた結核の新規罹患率、有病率が増加に転じ、1999年には厚生省(現、厚生労働省)から結核緊急事態宣言が出されるに至った。現在我が国の結核罹患率は米国の約5倍、欧米主要国の数倍を下らないことから、結核は現在もなお脅威であることを認識する必要がある。

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は生体内で

[キーワード&略語]

結核菌, マクロファージ, 樹状細胞 (DC), T細胞, サイトカイン

ICL : isocitrate lyase (イソクエン酸リアーゼ)

IFN- γ : interferon- γ

(ガンマインターフェロン)

LAM : lipoarabinomannan

(リポアラビノマンナン)

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

(単球走化性因子)

MIP1- α : macrophage migration inhibitory

protein 1- α (マクロファージ遊走阻止因子)

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase (フォスファチジルイノシトール3キナーゼ)

PIM : phosphatidylinositolmannoside (フォスファチジルイノシトールマンノシド)

RANTES : regulated on activation normally T-cell expressed and secreted

TLR : Toll-like receptor (Toll様受容体)

TNF- α : tumor necrosis factor- α

(腫瘍壊死因子)

Anti-mycobacterial immunity and the regulatory mechanism of immune response by *Mycobacterium tuberculosis*

Ikuo Kawamura/Masao Mitsuyama : Department of Microbiology, Graduate School of Medicine, Kyoto University (京都大学大学院医学研究科微生物感染症学)

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細胞内殺菌機構に抵抗して、細胞内で長期間生存することができる。多くの場合、結核菌はそのまま増殖せずにヒトと共存するが、5～10%の感染宿主で結核が再燃し、成人にみられる慢性結核を発症する。ヒトと結核菌は長い共存の歴史があり、旧来より菌がどのようにして宿主防御免疫に抵抗して生し続けるのかという問題について精力的な研究がなされてきたが、その疑問を解決するには至らなかった。しかし、1998年に結核菌の全塩基配列が決定されたことが転機となり¹⁾、現在では菌の病原性に重要と考えられるいくつかの因子が同定されている。また最近、結核に対する感染防御にはCD4⁺T細胞やCD8⁺T細胞以外に、Th17細胞や制御性T細胞が関与することが示されており、抗結核防御免疫がさまざまなT細胞によって形成された複雑なネットワークのうえに成り立っていることが示唆されている。

1 結核菌の感染動態

1) 結核菌の細胞内寄生メカニズム

結核菌は宿主体内に侵入後、肺胞マクロファージ、樹状細胞 (dendritic cell : DC) あるいは単球に積極的に侵入する。この細胞内侵入にはマクロファージ表面の補体受容体、マンノース受容体、Fc受容体、フィブロネクチンあるいはスカベンジャー受容体などが関与する²⁾。これら細胞表面受容体を介した結核菌の細胞内侵入は、マクロファージの殺菌機構や、感染防御に関与するTh1型サイトカイン産生を亢進しないことが示されており、これら細胞表面受容体を介した食細胞と菌とのinteractionは、結核菌が宿主初期防御反応を刺激せずに細胞内寄生を成立させるための重要なメカニズムであると考えられる^{3) 4)}。また、結核菌は菌体表面のmycobacterial mammalian cell entry protein 1Aやmycobacterial DNA-binding protein 1を介して非貪食細胞である肺胞上皮細胞に侵入することができる^{5) 6)}。感染した病原体を排除する能力が弱い上皮細胞への侵入は、結核菌の宿主体内での長期生存をより容易にするものと考えられる。

マクロファージに侵入した菌はファゴソーム内で生存増殖する。通常、ファゴソームの成熟が進むとファゴソームはリソソームと融合してファゴリソソームが形成される。このファゴリソソーム内の環境は結核菌

にとっても殺菌的である。しかし、結核菌はファゴリソソーム形成を阻害し、ファゴソーム内の環境を自身の生存に適したものに変わってしまう。この抑制機序には、結核菌由来のLAM (lipoarabinomannan) と lipid phosphatase である SapM が重要な役割を果たしている⁷⁾。ファゴソームとリソソームの融合にはPI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) により合成されるファゴソーム膜上のPI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) が重要であるが、LAMは細胞内Ca²⁺濃度の上昇を抑えることでPI3Kのファゴソームへの動員を抑制し、ファゴソーム膜上のPI3Pの合成を阻害する。また、SapMはPI3Pの脱リン酸化を引き起こすことで、ファゴリソソーム形成を抑制することが示されている。これらに加えて、Jayachandranらは、マクロファージに存在する coronin 1 が結核菌を含むファゴソームに集積し、Ca²⁺依存性脱リン酸酵素カルシニューリンが活性化することでファゴリソソーム融合が阻害されることを明らかにした⁸⁾。(図1) さらに最近、結核菌を感染させたマクロファージにオートファジー^{*1}を誘導すると、細胞内菌数が減少することが示された。オートファジーは、細胞の恒常性維持に必要と考えられてきた機構であるが、この結果は、オートファジー経路が結核菌の細胞内殺菌にも関与することを示すものである^{9) 10)}。しかし、結核菌感染マクロファージにオートファジーを誘導するためには、IFN- γ (interferon- γ) でマクロファージを活性化することから、結核菌はオートファジーの誘導に必要なPI3K活性を抑制することで、ファゴリソソーム融合だけでなく、オートファジー経路も抑制していることが示唆される。

このようなマクロファージの細胞内殺菌に対する抵抗性に加えて、結核菌強毒株はマクロファージのアポトーシスを抑制するメカニズムを有することが示されている^{11) 12)}。感染マクロファージがアポトーシスに陥ると菌の細胞内増殖が抑制され、カスパーゼ阻害剤を用いてアポトーシス誘導を阻害すると菌の細胞内増殖が回復することから、アポトーシスは結核菌に対する

※1 オートファジー

細胞内のタンパク質を分解するための機構。細胞内での異常なタンパク質の蓄積を防いだり、過剰にタンパク質を合成したときや栄養環境が悪化したときにタンパク質のリサイクルを行い、生体の恒常性維持に関与している。

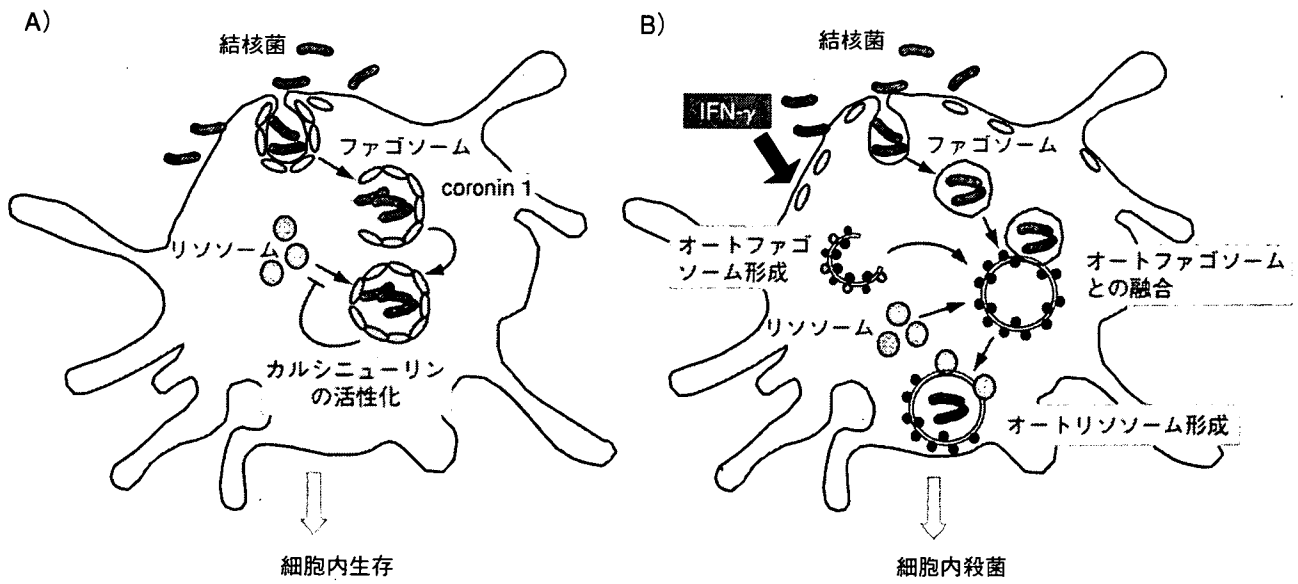


図1 結核菌の細胞内殺菌抵抗性とオートファジーによる殺菌機構

A) 結核菌を含むファゴソームには coronin 1 分子が集積しカルシニューリンが活性化されると、ファゴリソソーム形成が阻害され、菌は細胞内で生存することができる。B) IFN- γ でマクロファージを刺激するとオートファゴソーム形成が誘導される。オートファゴソームは結核菌を含むファゴソームと融合し、最終的にオートリソソームが形成され、細胞内の菌は殺菌処理される

宿主側の初期防御反応と捉えることができる。したがって、結核菌の有するアポトーシス抑制活性は、増殖の場を確保するという意味で重要な機序であり、細胞内寄生を可能にするために必須であると考えられる。

2) 感染成立後の結核菌の抵抗性

さらに感染が進むと、感染病巣部には肉芽腫が形成される。これは感染の拡大を防ぐための一種の封入組織であり、菌を貪食したマクロファージを中心にその周りをランゲルハンス巨細胞、リンパ球やマクロファージが取り囲んだ構造をしている。肉芽腫内部、あるいは宿主組織内は酸素分圧が低く、偏性好気生菌である結核菌には非常に苛酷な環境と考えられる。しかし、結核菌はその代謝系を環境に適応したものに切り替えて細胞内での生存を可能にしていることが示されており、その結果パーシスターとして休眠状態 (dormancy) へと移行するものと考えられる¹³⁾。McKlenneyらは、結核菌が肺で持続感染を成立させるためにはイソクエン酸リアーゼ (isocitrate lyase: ICL) が重要な役割を果たすことを示した¹⁴⁾。ICLは、脂質を材料とした糖の生合成経路、グリオキシル酸サイクルの酵素の1つである。肉芽腫内に存在する結核菌のICL活性が菌の生存に重要であるということは、菌が

酸素分圧の低い環境では脂質を炭素源として利用することを示すものである。その他にも低酸素条件で誘導される遺伝子として熱ショックタンパク質の一種である α -クリスタリンやnitrate reductase, またはEisやKatGなどが細胞内増殖や持続感染に関与する因子として報告されており、菌がパーシスターとして存在するためには非常に複雑なメカニズムが働いていると思われる。(表1)

宿主防御システムが一旦低下しはじめると、休眠状態に移行した菌が再び増殖を始め、結核が再燃する。この場合、菌の増殖が認められた組織には、ネクローシスに陥った細胞が多数認められる。これまでの解析から、菌の病原性とネクローシス誘導能には関連があり、細胞内で増殖した菌が感染細胞を破壊し、細胞外に出て感染を拡大するためには、感染細胞のネクローシス誘導が重要なステップであると考えられている。さらに、分子レベルの解析の結果、結核菌による感染マクロファージのネクローシス誘導には結核菌ゲノム上のRD1^{*2}領域が重要な役割を果たしており、この領域に存在する遺伝子産物が、ミトコンドリア膜障害を引き起こし、細胞内ATP濃度が減少するため、細胞がネクローシスに陥ることが示されている¹⁵⁾。また、

表1 結核菌の持続感染および細胞内寄生に関連する遺伝子

遺伝子番号	遺伝子	機能	文献
Rv0353	<i>hspR</i>	転写阻害	Nat. Med., 7 : 732-727, 2001
Rv0467	<i>icl</i>	イソクエン酸リアーゼ	Nature, 406 : 735-738, 2000
Rv0470c	<i>pcaA</i>	シクロプロパンシンターゼ	Mol. Cell, 5 : 717-727, 2000
Rv0981	<i>mprA</i>	2成分制御系	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 : 12706-12711, 2001
Rv1027/8c	<i>kdpDE</i>	2成分制御系	Infect. Immun., 71 : 1134-1140, 2003
Rv1032c	<i>trcS</i>	2成分制御系	Infect. Immun., 71 : 1134-1140, 2003
Rv1161-4	<i>narGHJI</i>	nitrate reductase	Infect. Immun., 70 : 286-291, 2002
Rv1651c/3812	<i>mag24-1</i>	PE-PGRS	Science, 288 : 1436-1439, 2000
Rv1736v	<i>narX</i>	fused nitrate reductase	Infect. Immun., 70 : 6330-6338, 2002
Rv1737c	<i>narK2</i>	亜硝酸塩/硝酸塩 トランスポーター	FEMS Microbiol. Lett., 188 : 141-146, 2000
Rv1908c	<i>katG</i>	カタラーゼ/ ペルオキシダーゼ	J. Infect. Dis., 177 : 1030-1035, 1998
Rv2031c	<i>hspX</i>	α -クリスタリン	J. Bacteriol., 178 : 4484-4492, 1996
Rv2583c	<i>relA</i>	GTP ピロホスホキナーゼ	J. Bacteriol., 182 : 4889-4898, 2000
Rv3132c	<i>devR</i>	2成分制御系	Infect. Immun., 71 : 1134-1140, 2003
Rv3286c	<i>sigF</i>	RNA ポリメラーゼ σ 因子	Infect. Immun., 68 : 5575-5580, 2000
Rv3764/5c	<i>trcXY</i>	2成分制御系	Infect. Immun., 71 : 1134-1140, 2003

結核菌が細胞内増殖する感染初期には、菌はカスペーゼ9の活性化を誘導してネクローシスを抑制することが明らかにされている¹⁶⁾。このような結核菌による感染マクロファージのプログラムされた細胞死の制御が、生体内での生存増殖に寄与するところは大きいと考えられる。

2 結核菌に対する感染防御

1) 初期感染防御反応

マクロファージやDCの感染局所への動員、あるいは結核菌貪食後のマクロファージの活性化は結核菌に対する初期防御反応だけでなく、特異的免疫応答の誘導においても重要である。マクロファージやDCは細胞表面のTLR (Toll-like receptor) を介して結核菌を認識する。TLR2は結核菌の主要な細胞壁リポ多糖

体成分であるLAM, フォスファチジルイノシトールマンノシド (phosphatidylinositolmannoside : PIM) あるいは19 kDaリポタンパク質を認識することが示されている。また、易熱性結核菌体抗原はTLR4により識別される。その結果、マクロファージやDCが活性化され、炎症性サイトカインが産生される。また、19 kDaリポタンパク質を介したTLR2の刺激はマクロファージのアポトーシスを誘導することや、TLR4リガンドの刺激が、オートファジーを誘導することが最近明らかとなり、これら結核菌成分とTLRリガンドのinteractionが、細胞死を介した初期防御反応の誘導にも関与することが示されている^{17) 18)}。一方、病原性の強い結核菌やBCGのLAMはその先端にマンノース残基が付加しており (Man-LAM), 非定型抗酸菌のLAMとは構造的に異なる。このMan-LAMはTLR2分子を介したマクロファージの活性化を誘導せず、これが結核菌の病原性において重要なメカニズムの1つと考えられる¹⁹⁾。

結核菌を貪食し、活性化したマクロファージはRANTES (regulated on activation normally T-cell expressed and secreted), MIP1- α (macrophage

※2 RD1

結核菌と弱毒ワクチン株である *M. bovis* BCG 株のゲノムを比較し、BCGで欠落している結核菌の遺伝子領域をRD (region of difference) 領域と呼ぶ。現在、16領域が確認されており、そのうちRD1が菌の病原性に深く関係していることが明らかにされている。

migration inhibitory protein 1- α), MIP2, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), MCP-3, MCP-5, IP-10などのケモカインを産生し、感染局所への炎症性細胞を動因する。(図2) また、感染マクロファージが産生するサイトカインのうち、TNF- α (tumor necrosis factor), IL-1 (interleukin-1), IL-12やIL-18はマクロファージを活性化し、肉芽腫形成や感染初期の菌の増殖を抑制するとともに、NK細胞あるいは $\gamma\delta$ 型T細胞からのIFN- γ 産生を誘導する重要な役割を担っている。産生されたIFN- γ はTNF- α とともにマクロファージを活性化し、殺菌活性の非常に強いNO産生を誘導して貪食した菌を殺菌処理する。また、このIFN- γ は感染防御を司るT細胞の分化因子としても作用する。このように結核に対する初期防御反応では、感染局所で産生されたケモカインや炎症性サイトカインがマクロファージ、NK細胞や $\gamma\delta$ 型T細胞を感染部位に集め、それらを活性化し、その結果産生されたIFN- γ がさらにマクロファージを活性化して、特異的防御免疫が成立するまでの期間、菌の増殖を最小限に抑えている。

2) 獲得抵抗性の発現

結核菌を貪食したマクロファージやDCが産生するIL-12やIL-18,あるいはNK細胞や $\gamma\delta$ 型T細胞由来のIFN- γ は、IFN- γ 産生能を有する感染抵抗性Th1細胞を誘導する。このT細胞の分化誘導には、抗原提示細胞としてDCが重要な役割を果たしている。一方、結核菌はDCの機能を抑制することで感染宿主での生存を可能にすることが示されている²⁰⁾。Th1に分化した $\alpha\beta$ 型T細胞は、抗原およびIL-18の刺激を受けて大量のIFN- γ を産生する。このため、感染防御を担うT細胞が出現するとマクロファージの殺菌能が飛躍的に高まる。感染免疫に関与するT細胞としては、クラスII拘束性CD4⁺Th1細胞ばかりではなく、クラスI拘束性CD8⁺キラーT細胞も同時に誘導される。

ファゴソーム内で処理された細菌由来の抗原は通常クラスII分子に結合してT細胞に抗原提示されるため、CD4⁺Th1型T細胞により認識される。しかし、細胞質に存在する細菌由来抗原はプロテオソームにより消化されクラスI分子と会合するため、CD8⁺T細胞による認識を受ける。結核菌感染により誘導されるCD8⁺T細胞は、CD4⁺T細胞と同様IFN- γ を産生すると同時に、多量の菌を貪食して殺菌能の低下したマ

クロファージや菌が感染した非食細胞系細胞を破壊し、新たに動員されてくる活性化マクロファージに菌を処理させるという機構で感染防御に関与すると考えられる。また、CD8⁺キラーT細胞は、結核菌感染細胞を傷害することで内部の菌を殺菌することができ、細胞質顆粒中に含まれるパーフォリンとグラニュリシンがこの殺菌メカニズムに関与することが報告されている²¹⁾。さらに、タンパク質以外のLAM, PIM, glucose monomycolateやisoprenoid glycolipidなどの糖脂質成分がマクロファージ上のCD1分子に結合し、CD8⁺あるいはダブルネガティブT細胞に抗原として提示されることがわかっている²²⁾。これらを認識するCD1拘束性T細胞は、抗原刺激後にIFN- γ 産生やキラー活性を発揮することで防御免疫に関与することが示唆されている。また最近、IL-17産生性T細胞がCXCL9, CXCL10やCXCL11の産生を介して、感染局所へのIFN- γ 産生性T細胞の動員に関与することが示された²³⁾。また、感染初期の肺ではIL-17産生性 $\gamma\delta$ T細胞が結核に対する防御反応に関与することが示されている²⁴⁾。一方、制御性T細胞が結核感染で増加し、結核菌の排除の妨げになっていることも示されている²⁵⁾。このように、防御免疫の発現にはその機能あるいは認識する抗原が異なる多様なT細胞が関与する。感染の経過に伴いそれぞれのT細胞の防御免疫における比重は異なると考えられるが、これらT細胞活性の総和が結果的に結核菌に対する宿主の抵抗性を規定している。

おわりに

結核菌の病原性および宿主感染免疫のメカニズムについて、最近の知見を中心にまとめた。結核菌はヒトを宿主として共生することに成功した微生物であり、そのメカニズムが分子遺伝学的な手法で解析された結果、今までにみられなかった菌の感染動態や病原性の機序が明らかになってきた。今のところ、ヒトの免疫システムを回避する菌側のメカニズムは断片的にしか明らかになっていないが、それらは結核の病原機構を理解するうえでの最も重要な点であることは間違いない。これら研究成果の蓄積が新たな予防ワクチン開発の基礎となり、必ず結核菌の病原性の解明および結核の撲滅に結びつくものと期待される。

初期防御反応

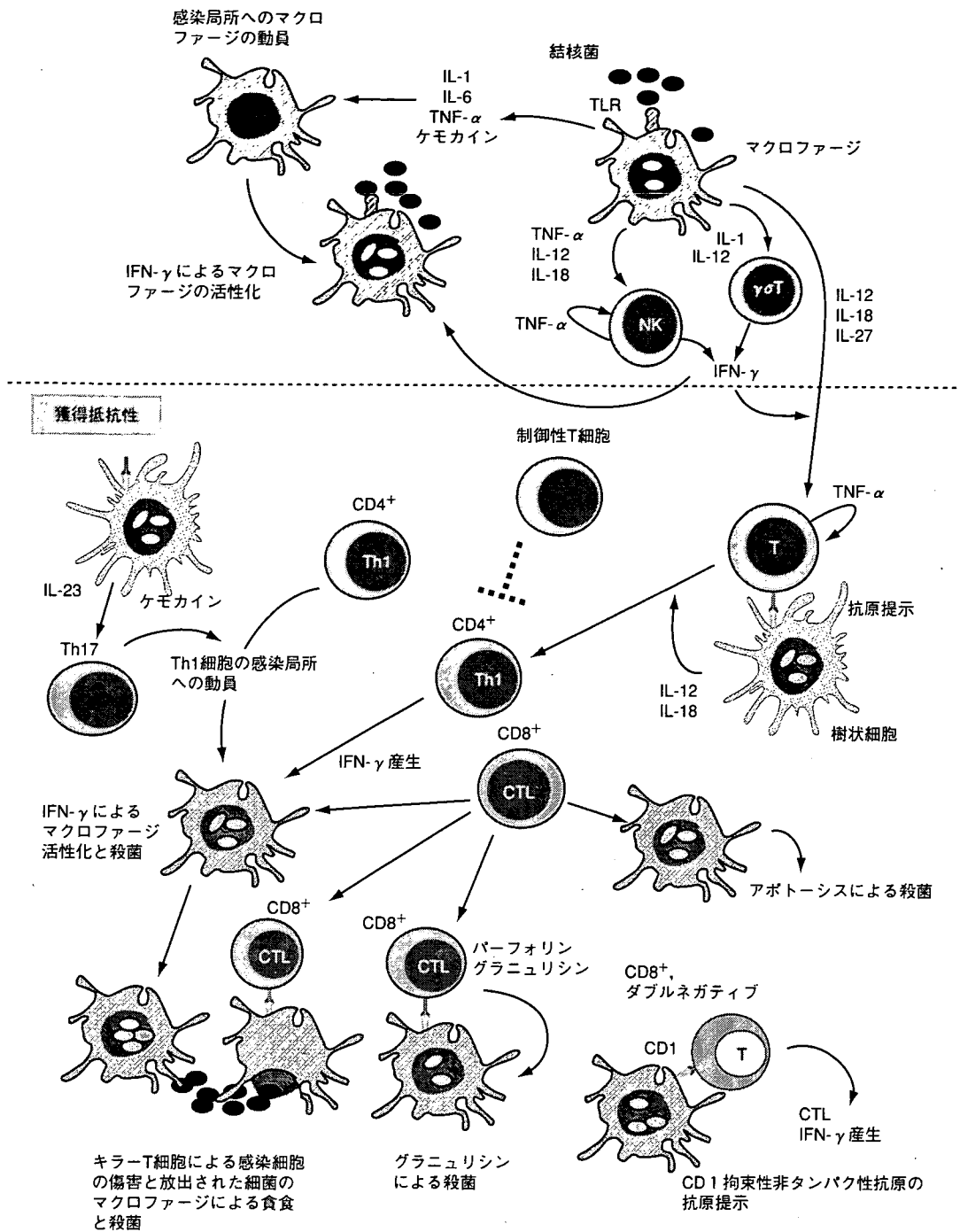


図2 抗結核防御免疫発現のメカニズム

マクロファージはTLRを介して結核菌を認識し、炎症性サイトカインやケモカインを産生してマクロファージおよびT細胞を感染局所に動員する。また、マクロファージが産生するIL-12、IL-18、IL-1およびTNF- α は、NK細胞および $\gamma\delta$ T細胞に作用して初期防御に重要なIFN- γ 産生を誘導する。IFN- γ はマクロファージの細胞内殺菌能を増強するとともにIFN- γ 産生性CD4⁺T細胞の分化を誘導する。抗原特異的CD8⁺T細胞は、大量のIFN- γ を産生するだけでなく、グランジュリンの産生あるいは感染細胞にアポトーシスを誘導することにより菌を排除する。CD1拘束性に非タンパク性抗原を提示されたT細胞はキラー活性およびIFN- γ 産生を介して防御免疫に関与する。また、Th17細胞はケモカインを産生し、IFN- γ 産生性T細胞の感染局所に動員する。さらに、この感染防御免疫の発現は、制御性T細胞による制御を受けている

文献

- 1) Cole, S. T. et al. : Nature, 393 : 537-544, 1998
- 2) Crevel, R. V. et al. : Clin. Microbiol. Rev., 15 : 294-309, 2002
- 3) Nigou, J. et al. : J. Immunol., 166 : 7477-7485, 2001
- 4) Malik, Z. A. et al. : J. Exp. Med., 191 : 287-302, 2000
- 5) Kohwiwattanagun, J. et al. : Microbiol. Immunol., 51 : 253-261, 2007
- 6) Aoki, K. et al. : J. Biol. Chem., 279 : 39798-39806, 2004
- 7) Deretic, V. et al. : Cell Microbiol., 8 : 719-727, 2006
- 8) Jayachandran, R. et al. : Cell, 130 : 37-50, 2007
- 9) Gutierrez, M. G. et al. : Cell, 119 : 753-766, 2004
- 10) Schmid, D. & Munz, C. : Immunity, 27 : 11-21, 2007
- 11) Sly, L. M. et al. : J. Immunol., 170 : 430-437, 2003
- 12) Spira, A. et al. : Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 29 : 545-551, 2003
- 13) Wayne, L. G. & Sohaskey, C. D. : Annu. Rev. Microbiol., 55 : 139-163, 2001
- 14) McKlinney, J. D. et al. : Nature, 406 : 735-738, 2000
- 15) Kaku, T. et al. : FEMS Microbiol. Lett., 274 : 189-195, 2007
- 16) Uchiyama, R. et al. : Infect. Immun. 75 : 2894-2902, 2007
- 17) Lopez, M. et al. : J. Immunol., 170 : 2409-2416, 2003
- 18) Xu, Y. et al. : Immunity, 27 : 135-144, 2007
- 19) Means, T. K. et al. : J. Immunol., 163 : 3920-3927, 1999
- 20) Wolf, A. J. et al. : J. Immunol., 179 : 2509-2519, 2007
- 21) Stenger, S. et al. : Science, 282 : 121-125, 1998
- 22) Schaible, U. E. et al. : Trend Microbiol., 8 : 419-425, 2000
- 23) Khader, S. A. et al. : Nat. Immunol., 8 : 369-377, 2007
- 24) Lockhart, E. et al. : J. Immunol., 177 : 4662-4669, 2006
- 25) Kursar, M. et al. : J. Immunol., 178 : 2661-2665, 2007

<筆頭著者プロフィール>

河村 伊久雄 : 1989年九州大学大学院医学系研究科博士過程を修了し, 新潟大学医学部細菌学助手に採用される。'95~'97年に米国コーネル大学およびカリフォルニア大学バークレー校に留学。Dr. Lee W. Rileyの研究室で, 結核菌の侵入因子 Mce1 について研究を行う。'98年より京都大学医学研究科微生物感染症学助手, 2004年同助教授になる。現在, 結核菌およびリステリアの病原性と感染防御免疫誘導能の関係について研究を行っている。

6. 結核菌の病原性発現機構はどこまで判ったか

河村 伊久雄*

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 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。結核を撲滅するためにはこの結核菌の抵抗性メカニズムを理解する必要があるが、その機序については未だ断片的にしか明らかにされておらず、全容の解明には至っていない。本稿では、菌がどのようにして宿主防御反応に抵抗し、体内で生在し続けるのかについてこれまでに明らかにされたことを紹介する。

Key Words : 結核菌/マクロファージ/樹状細胞/ファゴソーム/リソソーム/
アポトーシス/オートファジー

I はじめに

世界保健機関 (WHO) はこれまでに世界の約30%が結核の感染を受け、毎年約880万人の結核患者が発生していると推定しており、結核は世界的にみて今なお単一の病原体による最大の感染症であるといえる (www.who.int/tb/publications/global_report)。現在、結核患者発生数の多くはアフリカおよびアジアの発展途上国にみられるが、今後、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の増加や結核蔓延国からの人的流入などにより、我が国においても結核の増加が懸念される。

結核の原因菌である結核菌は、宿主に感染後主にマクロファージに貪食される。しかし、この菌はマクロファージ殺菌機構に抵抗して、細胞内で生存し続けることができる。一方、結核菌感染に伴い、宿主では抗原特異的CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞を中心とした細胞性免疫が発現する。これらT細胞は抗原刺激を受けると大量のイ

ンターフェロン- γ (IFN- γ) を産生し、マクロファージの活性化を強く誘導する。従って、感染抵抗性T細胞が出現すると、マクロファージの殺菌活性が飛躍的に高まる。また、CD8⁺T細胞はgranulysinの産生を介して、あるいはキラー活性を発揮して菌の増殖の場を奪うことにより、防御免疫に関与することが示されている。しかし、結核菌は、このような防御免疫が発現しても感染宿主体内から容易には排除されず、数年から数十年の潜伏期を経て5~10%の感染宿主で慢性結核を発症するのである。

結核菌の細胞壁にはムラミルジペプチドを本体とする強いアジュバント活性があり、宿主免疫応答を強く活性化することはよく知られている。その一方、この菌は宿主感染防御反応を抑制する強い活性を有しており、その機序を解明しなければ、結核の撲滅はあり得ないことを認識する必要がある。

Advances in understanding of the virulence mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*.

*京都大学大学院医学研究科微生物感染症学 准教授 Ikuo Kawamura

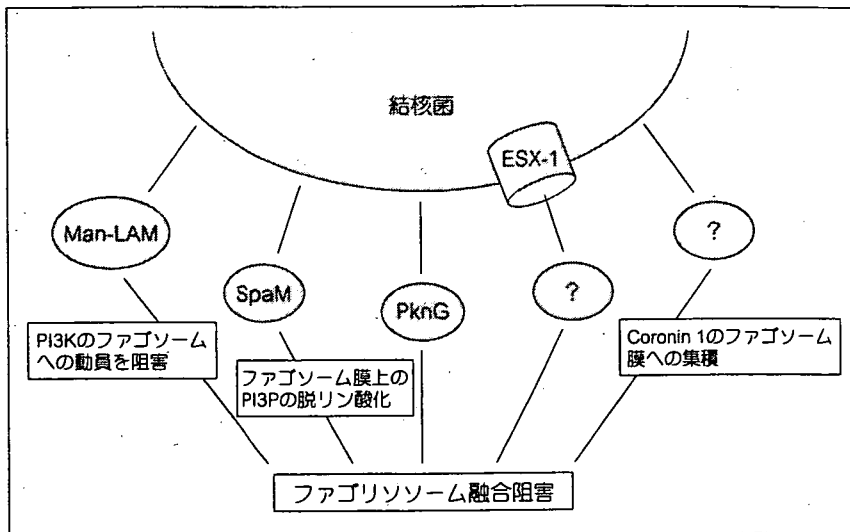


図1 結核菌によるファオゴリソソーム融合阻害機序

結核菌は、様々な機序によりファゴリソソーム融合を阻害して、細胞内での生存を可能なものになっている。

? : 未同定エフェクター分子, LAM : lipoarabinomannan, Man-LAM : mannose-capped LAM, PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase, PI3P : phosphatidylinositol 3-phosphate, PknG : プロテインキナーゼ G, SapM : lipid phosphatase

II 結核菌の殺菌抵抗性

1. ファゴリソソーム融合阻害

結核菌は宿主体内に侵入後、肺胞マクロファージ、樹状細胞 (dendritic cell : DC) あるいは単球に積極的に侵入する。この細胞内侵入にはマクロファージ表面の補体レセプター、マンノースレセプターや Fc レセプターなど、様々なレセプターが関与することが知られている。また、結核菌は菌体表面の mycobacterial mammalian cell entry protein 1A や mycobacterial DNA-binding protein 1 を介して、非貪食細胞である肺胞上皮細胞に侵入することができる^{1, 2)}。これら結核菌侵入因子がマクロファージへの感染にどの程度関与するのかが明らかではないが、病原体を排除する能力が弱い上皮細胞への侵入は、結核菌の宿主体内での長期生存をより容易にするものと考えられる。

マクロファージに侵入した菌は、ファゴソーム内で生存増殖する。通常、ファゴソームの成熟が進むと、ファゴソームはリソソームと融合してファゴリソソームが形成される。このファゴリソソーム内の環境は、結核菌にとっても殺菌的である。しかし、結核菌はファゴリソソーム融合を阻害することで細胞内寄生性を発揮しており、これは結核菌がマクロファージ内で生存するための最も重要な機序であるといえる。最近、この抑制機序に、結核菌細胞壁に豊富に存在するリポ多糖体成分である lipoarabinomannan (LAM) が重要な役割を果たしていることが報告されている (図 1)。

Kangらは、病原性の高い株に存在する mannose-capped LAM (Man-LAM) と細胞表面のマンノースレセプターとの結合が、ファゴリソソーム融合阻害に関与することを示した³⁾。またその機序として、Vergneらは、ファゴソームと

HIV (ヒト免疫不全ウイルス)

IFN- γ (インターフェロン- γ)

DC (dendritic cell ; 樹状細胞)

LAM (lipoarabinomannan)

Man-LAM (mannose-capped LAM)

リソソームの融合には phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) により合成されるファゴソーム膜上の phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) が重要であり, LAM のシグナルは細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度の上昇を抑え, PI3K のファゴソームへの動員を抑制することで発揮されることを示した⁴⁾。さらに Vergne らは, 結核菌が産生する lipid phosphatase である SapM が PI3P の脱リン酸化を惹き起こすことで, ファゴリソソーム融合を抑制することを明らかにした⁵⁾。

これらに加えて, Scherr らは, 結核菌が真核細胞のプロテインキナーゼ類似のタンパク質であるプロテインキナーゼ G (PknG) を産生することを示した。さらに彼らは, この PknG 欠損変異株の感染では, ファゴリソソームが形成され, 菌が殺菌処理されることを示し, PknG が結核菌によるファゴリソソーム融合阻害に関与することを明らかにした⁶⁾。

さらに, Jayachandran らは, マクロファージに存在する coronin 1 が結核菌を含むファゴソームに集積し, Ca^{2+} 依存性ホスファターゼである calcineurin を活性化することで, ファゴリソソーム融合が阻害されることを示した⁷⁾。今のところ, coronin 1 をファゴソーム上に維持するための菌側因子については明らかにされていないが, それが菌の病原性において重要な役割を果たすことは間違いない。

また MacGurn らは, 結核菌の分泌装置である ESX-1 変異株の感染では, 感染後のファゴリソソーム融合が阻害されないことを明らかにした⁸⁾。ESX-1 を構成する遺伝子群は, 菌の病原性に重要な RD1 領域に存在する。この領域には ESX-1 により分泌される重要な T 細胞抗原である early secreted antigenic target protein-6 (ESAT-6) と culture filtrate antigen 10kD (CFP-10) が存在するが⁹⁾, これら因子のファゴ

リソソーム融合阻害への関与は否定的である。しかし, これまで ESX-1 を介して分泌される因子は ESAT-6/CFP-10 以外に報告されていないことから, これら結核菌因子以外に ESX-1 により分泌され, ファゴリソソーム融合阻害に関与する因子が存在することが示唆される。

結核菌はマクロファージのファゴソーム内で生存増殖を行う細胞内寄生戦略をとるが, ファゴソームの成熟過程を阻害するためには, エフェクター分子を細胞質内に放出する必要があると考えられる。このため, 結核菌の分泌装置は, グラム陰性菌が有する分泌装置と同様に, 菌が感染を成立させるための重要な役割を果たしていることが示唆される。

2. アポトーシスの抑制

マクロファージに結核菌弱毒株 (H37Ra) を感染させるとアポトーシスが誘導されるが, カスパーゼ阻害薬を添加してアポトーシスの誘導を抑制すると, 菌の細胞内増殖が改善される。一方, 結核菌強毒株 (H37Rv) の感染では, H37Ra 感染と比較してアポトーシスが抑制され, 菌は細胞内で増殖することが示されている。この結果は, アポトーシスが菌の細胞内生存に影響することを示すものである。

また, 結核菌由来 19kDa リポタンパク質の Toll-like receptor 2 (TLR2) を介した認識が細胞のアポトーシスを誘導することから, 感染後に誘導されるアポトーシスは結核菌に対する一つの宿主初期防御反応と捉えることができる。しかし, 病原性の強い菌は, 抗アポトーシス因子である Mcl 1 の発現を誘導することでアポトーシスを抑制することが示されている¹⁰⁾。結核菌の有するアポトーシス抑制活性は, 菌にとって増殖の場を確保するという意味で重要な機序であり, 細胞内寄生を可能にするために必須であると考えられる。

最近, 結核菌を感染させたマクロファージに

PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)

Ca^{2+} (カルシウムイオン)

ESAT-6 (early secreted antigenic target protein-6)

TLR2 (Toll-like receptor 2)

PI3P (inositol 3-phosphate)

PknG (プロテインキナーゼG)

CFP-10 (culture filtrate antigen 10kD)

オートファジーを誘導すると、細胞内菌数が減少することが示された。また、マクロファージを IFN- γ で刺激した場合には、LRG 47 (p47 GTPase) の誘導を介してオートファジー機構が活性化される。その結果、菌を含むファゴソームはオートファゴソームと融合し、さらにリソソームとともにオートリソソームが形成され、菌が殺菌処理されることが示されている¹¹⁾。オートファジーは細胞の恒常性維持に必要と考えられてきた機構であるが、この結果は、オートファジーが結核菌の細胞内殺菌にも関与することを示すものである。しかし、結核菌は感染後にオートファジーの誘導に必要な PI3K 活性を抑制することで、オートファジーの誘導を抑制するものと考えられ、この抑制機序を解除するために IFN- γ による刺激が必要となる。

III 感染マクロファージの機能制御

マクロファージや DC の感染局所への動員、あるいは結核菌貪食後のマクロファージの活性化は、結核菌に対する初期防御反応だけでなく特異的免疫応答の誘導においても重要である。マクロファージや DC は、細胞表面の TLR を介して結核菌を認識する。TLR2 は LAM, ホスファチジルイノシトールマンノシド (phosphatidylinositol-mannoside: PIM), あるいは 19kDa リポタンパク質を認識する。また、易熱性結核菌体抗原は TLR4 により識別され、炎症性サイトカインが産生される。

一方、結核菌はこれら TLR からのシグナル伝達を修飾する能力があることが最近明らかとなってきた。結核菌の主要な T 細胞抗原である ESAT-6 は、これまでその病原性における機能は明らかにされていなかったが、Pathak らは、ESAT-6 が TLR2 に結合すると Akt キナーゼが活性化され、

その結果 TLR のアダプター分子である MyD88 (myeloid differentiation factor 88) と IRAK4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4) の会合が阻害されるため、TLR を介したシグナルが抑制されることを示した¹²⁾。また、結核菌由来熱ショックタンパク質 hsp70 が³⁾、DC の分化を阻害するとともに、DC からの抗炎症性サイトカインである IL-10 産生を亢進させることが示された¹³⁾。

さらに、病原性の強い結核菌や Bacillus Calmette-Guérin (BCG) の LAM はその先端にマンノース残基が付加しており Man-LAM, 非定型抗酸菌の LAM とは構造的に異なる。この Man-LAM は DC 上に存在する DC-SIGN (DC-specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin) を介してセリン/スレオニンキナーゼである Raf-1 の活性化を誘導する。活性化された Raf-1 は nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 サブユニットのアセチル化を誘導し、その結果、TLR4 を介した刺激により IL-10 産生が亢進することが示されている¹⁴⁾。また、この Man-LAM は DC の分化を阻害することも明らかにされている¹⁵⁾。

このように、結核菌の菌体成分はマクロファージや DC の機能を修飾することができる。さらに、これら糖脂質やタンパク成分は菌体より遊離して exosome の形で細胞外に放出され、近接した細胞に取り込まれることが報告されている^{16,17)}。同様の過程はアポトーシスにおいて観察され、アポトーシス小胞によって運ばれた菌体成分は効率よく抗原提示される (cross priming) ことが示されている。しかし、exosome を介して細胞外に放出された成分が同様に抗原提示されるのか、あるいは取り込んだ細胞の機能に影響を及ぼすのかについては不明であり、今後明らかにしていかなければ

PIM (phosphatidylinositolmannoside ; ホスファチジルイノシトールマンノシド)

MyD88 (myeloid differentiation factor 88)

BCG (Bacillus Calmette-Guérin)

DC-SIGN (DC-specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin)

NF- κ B (nuclear factor- κ B)

IRAK4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4)

表1 結核菌の持続感染および細胞内寄生に関連する遺伝子

遺伝子	機能	文献
<i>icl</i>	isocitrate lyase	Nature 406 : 735-738, 2000
<i>devR</i>	two-component regulator	Infect Immun 71 : 1134-1140, 2003
<i>kdpDE</i>	two-component regulator	Infect Immun 71 : 1134-1140, 2003
<i>mprA</i>	two-component regulator	Proc Natl Acad Sci USA 98 : 12706-12711, 2001
<i>tcrXY</i>	two-component regulator	Infect Immun 71 : 1134-1140, 2003
<i>trcS</i>	two-component regulator	Infect Immun 71 : 1134-1140, 2003
<i>hspR</i>	transcriptional repressor	Nature Med 7 : 732-727, 2001
<i>pcaA</i>	cyclopropane synthase	Mol Cell 5 : 717-727, 2000
<i>narGHJI</i>	nitrate reductase	Infect Immun 70 : 286-291, 2002
<i>mag24-1</i>	pE-PGRS	Science 288 : 1436-1439, 2000
<i>narX</i>	fused nitrate reductase	Infect Immun 70 : 6330-6338, 2002
<i>narK2</i>	nitrate/nitrite transpoter	FEMS Microbiol Lett 188 : 141-146, 2000
<i>katG</i>	catalase-peroxidase	J Infect Dis 177 : 1030-1035, 1998
<i>hspX</i>	α -crystallin	J Bacteriol 178 : 4484-4492, 1996
<i>relA</i>	GTP pyrophosphokinase	J Bacteriol 182 : 4889-4898, 2000
<i>sigF</i>	RNA polymerase σ factor	Infect Immun 68 : 5575-5580, 2000
<i>esxA</i>	inhibition of TLR signaling	ref. 12
<i>eis</i>	intracellular survival	J Biol Chem 282 : 18671-18675, 2007

ばならない。

IV 防御免疫成立後の結核菌の抵抗性

感染の進行に伴い、感染病巣部には肉芽腫が形成される。肉芽腫内部は酸素分圧が低く、偏性好気生菌である結核菌には非常に苛酷な環境と考えられる。しかし、結核菌はその代謝系を環境に適応したものに切り替えて、感染を成立させるものと考えられている。

McKinneyらは、結核菌が持続感染を成立させるためにはイソクエン酸リアーゼ (isocitrate lyase: ICL) が重要な役割を果たすことを示した¹⁸⁾。ICLは脂質を材料とした糖の生合成経路、グリオキシル酸サイクルの酵素の一つである。肉芽腫内に存在する結核菌のICL活性が菌の生存に重要であるということは、菌が酸素分圧の低い環境では脂質を炭素源として利用することを示すものである。その他、熱ショックタンパクの一種である α -

crystallin や nitrate reductase, または Eis や KatG など、多くの因子が細胞内増殖や持続感染に関与することが報告されており、菌が宿主体内で長期間生存するためには複雑なメカニズムが働いていると思われる(表1)。

一方、結核菌の活発な増殖が認められる組織では、ネクローシスに陥った細胞が多数認められる。これまでの解析から、細胞内で増殖した菌が感染を拡大するため、菌は感染細胞のネクローシスを誘導することが示されている。このネクローシス誘導には結核菌ゲノム上のRD1領域が重要な役割を果たしており、この領域に存在する遺伝子産物がミトコンドリア膜障害に関与し、その結果として細胞内アデノシン三リン酸(ATP)濃度が減少するため、細胞がネクローシスに陥ることが示されている¹⁹⁾。また、結核菌感染初期には、増殖に必要な細胞内環境を維持するため、菌はカスペアーゼ9の活性化を誘導してネクローシスを抑制

ICL (isocitrate lyase ; イソクエン酸リアーゼ)

ATP (アデノシン三リン酸)

することが示唆されている²⁰⁾。このような結核菌による感染マクロファージの細胞死の制御が、生体内での生存増殖に寄与するところは大きいと考えられる。

V おわりに

結核菌はヒトを宿主として共生することに最も成功した微生物の一つであり、ヒトへの感染の歴史は紀元前にまで遡ることができる。一方、結核菌の有する宿主防御免疫の回避機構については、今のところ断片的にしか明らかにできていない。しかし、1998年に結核菌のゲノム配列が明らかにされ、遺伝子発現の網羅的な解析が可能になって以来、この研究分野において多くの成果が発表されている。今後、さらなる研究成果の蓄積が、結核菌の病原性の解明だけでなく新たな予防ワクチンの基礎となり、結核の撲滅に結びつくものと期待される。

文 献

- 1) Kohwiwattanagun J, et al : Mycobacterial mammalian cell entry protein 1A (Mce1A)-mediated adherence enhances the chemokine production by A549 alveolar epithelial cells. *Microbiol Immunol* **51** : 253-261, 2007
- 2) Aoki K, 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
- 3) Kang PB, et al : The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med* **202** : 987-999, 2005
- 4) Verne I, et al : Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca²⁺ + /calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *J Exp Med* **198** : 653-659, 2003
- 5) Vergne I, et al : Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* **102** : 4033-4038, 2005
- 6) Walburger A, et al : Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* **304** : 1800-1804, 2004
- 7) Jayachandran R, et al : Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell* **130** : 37-50, 2007
- 8) MacGurn JA, et al : A genetic screen for *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective for phagosome maturation arrest identifies components of the ESX-1 secretion system. *Infect Immun* **75** : 2668-2678, 2007
- 9) Ize B, et al : Mycobacteria's export strategy. *Science* **313** : 1583-1584, 2006
- 10) Sly LM, et al : Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol* **170** : 430-437, 2003
- 11) Gutierrez MG, et al : Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* **119** : 753-766, 2004
- 12) Pathak SK, et al : Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nature Immunol* **8** : 610-618, 2007
- 13) Motta A, et al : *Mycobacterium tuberculosis* heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation in vitro. *Immunol* **121** : 462-472, 2007
- 14) Gringhuis SI, et al : C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF- κ B. *Immunity* **26** : 605-616, 2001
- 15) Dulphy N, et al : Intermediate maturation of Mycobacterium tuberculosis LAM-activated human dendritic cells. *Cell Microbiol* **9** : 1412-1425, 2007
- 16) Beatty WL, et al : Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event. *Eur J Cell Biol*

- 80 : 31-40, 2001.
- 17) Beatty WL, et al : Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages. *Infect Immun* **68** : 6997-7002, 2000
- 18) McKinney JD, et al : Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406** : 735-738, 2000
- 19) Kaku T, et al : 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
- 20) Uchiyama R, et al : Involvement of caspase-9 in the inhibition of necrosis of RAW 264 cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **75** : 2894-2902, 2007

結核菌の新規病原因子MDP1の感染病態への関わり

* 1 大阪市立大学大学院医学研究科
感染防御学分野

* 2 園田学園女子大学人間健康学部
食物栄養学科

* 3 国立感染症研究所免疫部

松本壮吉^{*1}

尾関百合子^{*2}

小林和夫^{*3}

1. 結核菌の増殖と病態

正岡子規、樋口一葉、梶井基次郎など戦前の文化人達が長く結核を煩い、闘病を続けながら多くの作品を残したことはよく知られている。梶井基次郎の代表作である「檸檬」は、結核闘病者に特有の微熱と檸檬(レモン)の冷たい感触が対照的に描かれた象徴的な作品であるが、長期にわたる発熱と療養を余儀なくされる理由は、結核病態の進行が慢性化するからであり、その主要原因は菌の遅発育性にあるといえる。結核菌の倍加時間は12～15時間であり、寒天培地上で肉眼的にコロニーの形成を確認できるようになるまで3～5週間を要する。多くの細菌が発育可能な環境下において可及的早急に分裂するのに対し(例えば大腸菌は20分に1度分裂することができる)、寄生性病原体である結核菌は分裂速度を制限して発病や病気の進行を抑制することで、宿主と菌、双方の生存を可能にする進化を遂げたと思われる。実際、結核菌の遅発育性はゲノム情報からも読みとれる¹⁾。大腸菌が7対のリボゾームRNAの遺伝子を有するのに対し、結核菌は1対のみである。また大

腸菌では遺伝子の複製起点の近くにリボゾームを含む増殖関連分子が存在し、転写方向が一定であるのに対し、結核菌ではゲノムの各領域に散在しているとともに、転写方向がまちまちで効率が悪い。

2. 結核とヒト

結核菌と人類の関係は長く、紀元前7000年のミイラにも肺結核の痕跡が残り、ヨーロッパ人の進出とともに結核菌が新大陸に渡り、感受性の高いnative Americanを苦しめた事実がある。このように結核菌は、ヒトに寄生しながら、時に病気を発症することでヒト-ヒト間を伝播し今日まで生きながらえてきた(図1)。

一方、宿主(ヒト)も結核菌に対する抵抗性(免疫応答)を進化させてきたと思われ、結核菌の菌体成分は強い免疫応答を誘発する。抗酸菌感染に対する獲得免疫で最も重要な役割を果たすのはIFN-gammaであるが²⁾、例えば日本で発見されたサイトカイン、IL-5(高津)³⁾やIL-18(岡村)⁴⁾も抗酸菌の菌体成分による刺激から見いだされ、細菌DNAの抗原性(徳永、山本)も結核菌成分から発見された⁵⁾。牛型結核菌の弱毒株であるBCGが

膀胱癌の治療に使用されたり、アレルギーの抑制や多価ワクチンにBCGを応用しようという試みがあるのは^{6,7)}、結核菌に対するヒトの高い免疫応答性のあるがゆえである。

3. 潜伏感染、休眠、内因性再燃

結核菌は現在も人類の約1/3に感染している。高度蔓延地域を除き、多くの成人型肺結核は潜伏感染菌の再増殖、すなわち内因性再燃により発症する(図1)。梶井基次郎らが結核で命を落とした時代に比べれば、結核患者や死亡者数は激減した印象はあるが、2006年のWHOの報告によると、2004年において891万8千人(日本:2万8千人)が新たに結核に罹患し、結核単独で169万3千人(AIDS結核を除く、日本:2,300人)が死亡している。このように結核は現在も細菌性感染症の中で最大の疾患として人類の脅威であり続けている。後天性免疫不全症候群ウイルス(HIV)との共感染や多剤耐性結核菌の出現がさらに脅威を増強している。

結核の病態は慢性の肉芽腫性炎症であり、病気は緩やかに進行し、その主要原因は菌の遅発育性であることは述べた。潜伏感染する

* 1 〒545-8585 大阪府大阪市阿倍野区旭町1-4-3
E-mail sohkichi@med.osaka-cu.ac.jp

結核菌はさらに増殖を抑制していると考えられており、一部は休眠(dormancy)している⁸⁾。結核菌はヒトを自然宿主とし、その他の生体や自然環境下での生存は難しい。このことは人類の1/3に感染する結核菌を駆逐することで理論的には結核の制圧が可能であることを意味する。代謝や増殖の緩慢な結核菌に対しては長期の化学療法〔直接監視下短期化学療法(DOTS)にて6ヵ月〕を必要とし、さらに休眠菌に対してはほとんどの抗結核薬は効果を示さない。結核菌の増殖制御は生命現象としても興味深いが、臨床的な危急度からも解明すべき重要課題である。

4. 増殖停止分子MDP1

私たちは、長期間ソートン培地で培養し、増殖を停止した静止期の結核菌が最も大量に発現している蛋白質を同定した〔特願平11-22588、遅発育性抗酸菌ポリペプチド(MDP1)分子量21kDa)⁹⁾。この蛋白質はDNA結合性を有し抗酸菌に特異的に存在することから mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) と名付けたが、我々はMDP1がDNAはもとより、リボゾーム、細胞壁合成の基質に結合し、それぞれDNAとRNA合成、蛋白質合成、細胞壁合成を抑制す

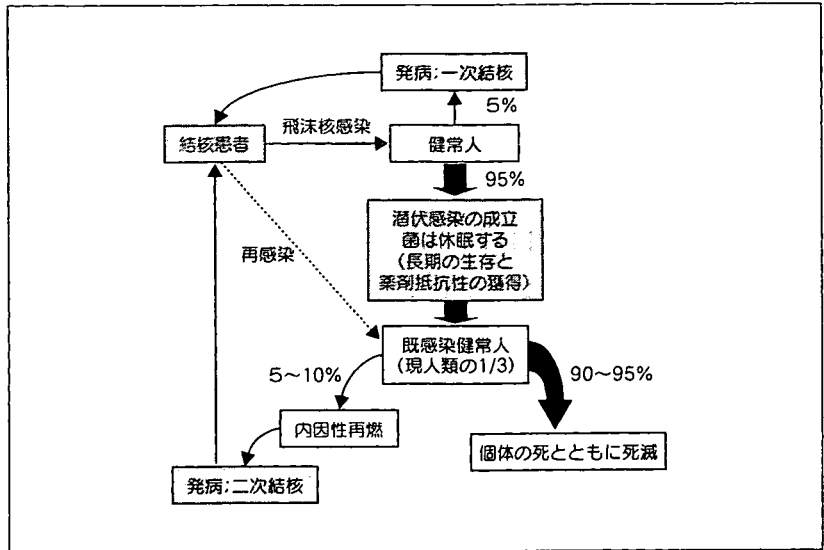


図1 結核菌の生活環と結核(症)
結核患者の飛沫核が健康人の肺胞に侵入し感染が成立する。感染者の5%程度が結核(一次結核)を発症し、残りの95%は無症候キャリアとなるが菌を完全に生体から排除することはできない。現在人類の1/3に結核菌が感染しており、HIV非感染者で終生の間5~10%が、HIV-結核菌感染者で年間10%が結核(二次結核)を発症する。潜伏感染菌は休眠することで長期の生存と薬剤抵抗性を獲得する。

ることで、結核菌の増殖を負に制御することを明らかにした(図2)。MDP1は、抗酸菌の遅発育性や結核菌の休眠現象において中心的な役割を果たす分子と推定される。

MDP1は宿主体内でも発現しているが、DNAと結合することで抗原性を増強し免疫応答を惹起する¹⁰⁾。MDP1-DNA複合体は防御免疫を誘導するが、それに関わらず菌が大量のMDP1を生体内で発現する理由はMDP1が菌の生存に必須の分子であること以外に、一定の防御免疫を惹起し続けることで菌が宿主の生存も確保しているように思われる。菌体内でMDP1は結核菌の増殖を停止させることで潜伏感染を成立させ、逆に結核

の発症時にはMDP1の活性低下や発現抑制が生じると推測される(図2)。このことはMDP1の作用を打ち消すことで既存の抗菌薬の効果を高めたり、反対に、MDP1の作用を増強することで菌の増殖を阻止するという新たな結核治療法の可能性も示唆する。

おわりに—今後

結核菌の増殖制御機構、特に休眠現象は謎であったが我々は遅発育性抗酸菌や静止期の結核菌が大量に発現する分子MDP1を見いだし、それが実際に菌の増殖停止を促すことを発見した。今後MDP1を足がかりとして結核病態の進行と菌の増殖や薬剤標的となる代謝の

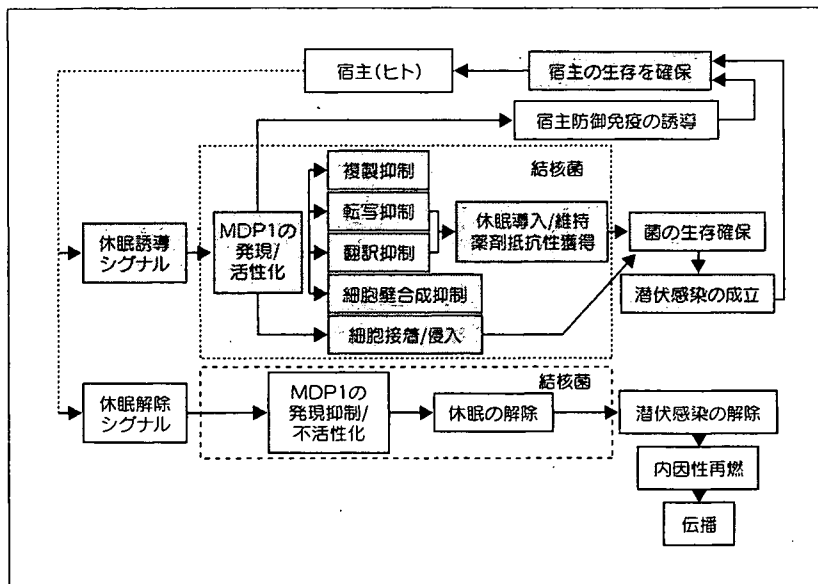


図2 モデル：潜伏感染成立-内因性再燃におけるMDP1の役割
MDP1は結核菌内でDNAと50Sリボソームに局在し、一部は細胞壁にも存在している。MDP1は生体高分子合成(複製、転写、翻訳)をいずれも強く抑制し菌の増殖を停止させ¹¹⁾、菌は休眠する。一方、細胞壁にも定常期以降MDP1は蓄積してくるが、細胞壁のMDP1には少なくとも2つの作用がある。1つは、結核菌の主要な潜伏感染細胞である肺胞上皮細胞への接着/侵入を宿主細胞表面のグリコサミングリカンに接着して促進する¹²⁾。2つ目は、細胞壁の糖脂質に結合することで、定常期以降の細胞壁合成の抑制を行い、細胞(菌)の増殖と細胞壁合成を同調させる(論文投稿中)。DNAと結合したMDP1は強い抗原性を有し防御免疫を誘導するが¹⁰⁾、これは宿主の生存に関わるだろう。以下想像であるが、内因性再燃の場合はMDP1の活性阻害や発現抑制が生じ休眠が解除される結果、菌は増殖を始め宿主は結核を発症すると想定できる。

相関を明らかにすることで、結核制圧のための新たなstrategyの基盤を提供するとともに、細胞の長期生存という生物学的に興味深いメカニズムの解明にもchallengeしたいと考えている。

謝辞

MDP1に関する我々の研究は、文部科学省科学研究費、厚生労働省科学研究費、ヒューマンサイエンス振興財団総合研究事業により支援された。

参 考 文 献

1) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Barrell BG, and *et al.* Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393: 537.
2) Kawamura I, Tsukada H, Yoshikawa H, Fujita M, Nomoto K, and Mitsu-yama M. IFN-gamma-producing ability as a possible marker for the pro-

tective T cells against Mycobacterium bovis BCG in mice. *J Immunol* 1992; 148: 2887.

3) Takatsu K, Tominaga A, and Hamaoka T. Antigen-induced T cell-replacing factor (TRF). I. Functional characterization of a TRF-producing helper T cell subset and genetic studies on TRF production. *J Immunol* 1980; 124: 2414.
4) Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, and *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995; 378: 88.
5) Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, and Tokunaga T. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN[correction of INF]and augment IFN-mediated[correction of INF]natural killer activity. *J Immunol* 1992; 148: 4072.
6) Kanekiyo M, Matsuo K, Hamatake M, Hamano T, Ohsu T, Matsumoto S, Yamada T, Yamazaki S, Hasegawa A, Yamamoto N, and Honda M. Mycobacterial codon optimization enhances antigen expression and virus-specific immune responses in recombinant Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin expressing human immunodeficiency virus type 1 Gag. *J Virol* 2005; 79: 8716.
7) Matsumoto S, Yukitake H, Kanbara H, and Yamada T. Recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin 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* 1998; 188: 845.
- 8) Wayne LG, and Sohaskey CD. Non-replicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 139.
- 9) Matsumoto S, Yukitake H, Furugen M, Matsuo T, Mineta T, and Yamada T. Identification of a novel DNA-binding protein from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Microbiol Immunol* 1999; 43: 1027.
- 10) Matsumoto S, Matsumoto M, Umemori K, Ozeki Y, Furugen M, Tatsuo T, Hirayama Y, Yamamoto S, Yamada T, and Kobayashi K. DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 2005; 175: 441.
- 11) Matsumoto S, Furugen M, Yukitake H, and Yamada T. The gene encoding mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) transformed rapidly growing bacteria to slowly growing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett* 2000; 182: 297.
- 12) Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, Wada T, Ozeki Y, Niki M, Domenech P, Umemori K, Yamamoto S, Mineda A, Matsumoto M, and Kobayashi K. Extracellular mycobacterial DNA-binding Protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem* 2004; 279: 39798.

特集

新興・再興感染症の現状と予防

結核

岡部真裕子¹⁾, 大原 直也²⁾, 小林 和夫³⁾

はじめに

結核は代表的な再興感染症であり、世界および日本においては単一病原体感染症として人類に甚大な健康被害を及ぼしている。2004年の世界の感染症による年間死亡者は、総死亡者数約5,700万人の1/4強にあたる約1,490万人である。感染症死亡者数の内訳は表1のとおりである¹⁾。

世界保健機関（WHO）やG8サミットは、①HIV（ヒト免疫不全ウイルス）／AIDS（後天性免疫不全症候群）、②結核、③マラリア（熱帯熱マラリア）による死亡者数が年間約500万人、患者発生が約3億人であることから、これら3大疾患を最重要感染症に認定し、世界が協調して対策を構築することを宣言している。

1. 結核の発生動向

2007年現在、世界では、全人口の約1/3にあたる約20億人が結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）に既感染（ほとんどは潜在性）し、毎年約880万人が結核を発病、約200万人（AIDS合併を含む）が死亡し、有病者は約2,200万人である²⁾。すなわち、数秒ごとに新規結核患者が発生し、

表1 世界における感染症による死亡者数(2004)
(Morens, 2004.¹⁾より引用改変)

感染症	死亡数
急性呼吸器感染症	396
AIDS（結核合併を含む）	277
下痢性疾患	180
結核	156
マラリア	127
ワクチン予防可能小児疾患	112
その他	242
全感染症	1,490

単位：万人

15秒ごとに1人が結核で死亡、1人の無治療結核患者が年間10～15人の感染者を生じさせ、毎年世界の人口の約1%が結核菌に感染している。なお、結核菌感染後の生涯にわたる発病率は5～10%である。WHOは、今後20年間で約10億人の新規感染者が発生、約1億5,000万人が結核を発病、そして、約3,600万人の結核死亡者を予測している。

2005年、日本では年間約2万8,000人（罹患率：人口10万対22.2人）が結核を発病、約2,300人（死亡率：人口10万対1.8人）が死亡し、結核は甚大な感染症である（表2）³⁾。

日本における結核対策の課題として、①急速な

筆者：1) おかべ まゆこ（国立感染症研究所免疫部第四室研究員）

2) おおはら なおや（国立感染症研究所免疫部第四室長）

3) こばやし かずお（国立感染症研究所免疫部長）