

200804002A

平成 20 年度

厚生労働科学研究費補助金
社会保障国際協力推進研究事業

**抗酸菌感染症への国際的学術貢献
を目指した基盤研究**

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 菅原 勇

平成21年3月

日米医学協力計画

結核・ハンセン病専門部会

U.S.-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM

TUBERCULOSIS AND LEPROSY PANEL

目次

平成 20 年度活動概況	1
平成 20 年度結核・ハンセン病専門部会構成員一覧	2
研究実績報告 (構成員名簿順)	
菅原 勇先生 (研究代表者、結核予防会結核研究所 研究主幹)	3 - 5
光山正雄先生 (パネルメンバー、京都大学大学院医学研究科微生物感染症学 教授)	6 - 10
松岡正典先生 (パネルメンバー、国立感染症研究所ハンセン病研究センター)	11 - 14
吉開泰信先生 (パネルメンバー、九州大学生体防御医学研究所)	15 - 17
牧野正彦先生 (パネルメンバー、国立感染症研究所ハンセン病研究センター)	18 - 23
後藤義孝先生 (宮崎大学農学部微生物学講座)	24 - 28
岩本朋忠先生 (神戸市環境保健研究所 微生物部)	29 - 32
後藤正道先生 (鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 先進治療科学専攻腫瘍学講座)	33 - 34
福富康夫先生 (国立感染症研究所ハンセン病研究センター)	35 - 40
谷口初美先生 (産業医科大学微生物学教室)	41 - 43
岡田全司先生 (国立療養所近畿中央胸部疾患センター)	44 - 48
小出幸夫先生 (浜松医科大学微生物学教室)	49 - 52
鈴木定彦先生 (北海道大学大学院獣医学研究科内 人獣共通感染症リサーチセンター)	53 - 56
長谷 篤先生 (大阪市立環境科学研究所)	57 - 61
大原直也先生 (国立感染症研究所免疫部)	62 - 66
慶長直人先生 (国立国際医療センター研究所)	67 - 70
竹田 潔先生 (大阪大学医学部感染免疫講座)	71 - 75
向井 徹先生 (国立感染症研究所ハンセン病研究センター)	76 - 80
田村 昌生先生 (国立感染症研究所ハンセン病研究センター)	81 - 83
松本智成先生 (大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター)	84 - 88
松本壮吉先生 (大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学)	89 - 93
杉田昌彦先生 (京都大学ウイルス研究所がんウイルス研究部門細胞制御学)	94 - 97
瀧井猛将先生 (名古屋市立大学大学院薬学研究所生体防御機能学)	98 - 101
43 rd Tuberculosis and Leprosy Panel Research Conference (Baltimore, US) Program Workshop Program	102 - 130

市民公開講座 プログラム

平成 20 年度日米医学協力計画結核・ハンセン病専門部会国内会議（清瀬市、東京）プログラム … 133

国際医学協力事業（研究代表者 菅原 勇）研究報告書 …………… 135

（付）平成 20 年度発表論文集 …………… 139

平成 20 年度の活動概況

平成20年度から研究事業の名称が、少し変更になった。社会保障国際協力推進研究事業（国際医学協力研究事業）という長い名前になった。結核・ハンセン病専門部会は、結核とハンセン病を専攻する23名の研究者よりなる。平成20年度の採択研究課題は、抗酸菌感染症への国際的学術貢献を目指した基礎研究（H20-国医-指定-002）である。

第43回日米医学協力計画結核・ハンセン病専門部会合同会議が、アメリカ Baltimore で Johns Hopkins 大学 William Bishai 教授のお世話で、7月8日—10日の日程で開かれた。Bishai 教授の周到的準備のおかげで、盛会に終わった。この会に引き続いて7月11日、Acute respiratory infection panel, Tb Leprosy panel の支援の下に Diagnostic Workshop が開催された。

第13回汎太平洋新興感染症国際会議が、2009年1月12日インドコルカタ市で開催予定だったが、ムンバイでのテロ勃発のため延期になった。返す返すも残念である。2009年4月に開催される予定である。

今回、初の試みとして、市民向けに11月15日、日本学術会議講堂で、日米医学協力計画「市民公開講座」が開かれた。日米医学協力計画の活動を、世間に広く知ってもらおうという目的があった。100余名の参加者があり、最初の試みとしては、成功であった。

菅原 勇部会長が、北大鈴木定彦教授とともに、国際共同研究事業による補助金を受け、ハルビン医科大学 Hong Ling 教授と共同で、「中国黒竜江省における多剤耐性結核に関する基礎的研究」のテーマのもとで共同研究を行った。

国内会議が、平成21年2月27日から28日の日程で、(財)結核予防会結核研究所4階講堂で開催された。以上述べた合同会議、国内会議、ワークショップ、市民公開講座のプログラム、国際共同研究事業の研究報告書が、本報告書の最後に掲載されている。

平成 20 年度日米医学協力計画 結核・ハンセン病専門部会 構成員

菅原 勇	結核予防会結核研究所 研究主幹 sugawara@jata.or.jp
光山 正雄	京都大学大学院医学研究科微生物感染症学 教授 mituyama@med.kyoto-u.ac.jp
松岡 正典	国立感染症研究所ハンセン病研究センター生体 防御部第一研究室 室長 matsuoka@nih.go.jp
吉開 泰信	九州大学生体防御医学研究所 (所長) 附属感染防御研究センター感染制御学分野 教授 yoshikai@bioreg.kyushu-u.ac.jp
牧野 正彦	国立感染症研究所ハンセン病研究センター病原微生物部 部長 mmaki@nih.go.jp
後藤 義孝	宮崎大学農学部微生物学講座 教授 a0d502u@cc.miyazaki-u.ac.jp
岩本朋忠	神戸市環境保健研究所 微生物部 kx2t-iwmt@asahi-net.or.jp
後藤 正道	鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 先進治療科学専攻腫瘍学講座 人体がん病理学 准教授 masagoto@m2.kufm.kagoshima-u.ac.jp
福富 康夫	国立感染症研究所ハンセン病研究センター病原微生物部第二研究室 室長 fukutomi@nih.go.jp
谷口 初美	産業医科大学微生物学教室 教授 hatsumi@med.uoeh-u.ac.jp
岡田 全司	国立療養所近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター長 okm@kch.hosp.go.jp
小出 幸夫	浜松医科大学微生物学教室 教授 koidelb@hama-med.ac.jp
鈴木 定彦	北海道大学大学院獣医学研究科内 人獣共通感染症リサーチセンター教授 suzuki@czc.hokudai.ac.jp
長谷 篤	大阪市立環境科学研究所微生物保健課 研究副主幹 a-hase@city.osaka.lg.jp
大原 直也	国立感染症研究所免疫部第 4 室長 oharan@nih.go.jp
慶長 直人	国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部 部長 Keicho@ri.imcj.go.jp
竹田 潔	大阪大学医学部感染免疫講座 教授 ktakeda@ongene.med.osaka-u.ac.jp
向井 徹	国立感染症研究所ハンセン病研究センター病原 微生物部第 1 室 室長 tmukai@nih.go.jp
田村 敏生	国立感染症研究所ハンセン病研究センター 病原微生物部第 4 室長 toshikit@nih.go.jp
松本智成	大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター部長 tom_matsumoto@sutv.zaq.ne.jp
松本壮吉	大阪市立大学大学院医学研究科感染防御学 准教授 sohkichi@med.osaka-cu.ac.jp
杉田昌彦	京都大学ウイルス研究所がんウイルス研究部門細胞制御学 教授 msugita@virus.kyoto-u.ac.jp
瀧井 猛将	名古屋市立大学大学院薬学研究科生体防御機能学 准教授 ttakii@phar.nagoya-cu.ac.jp

1型および2型糖尿病と結核増悪との関係について

研究代表者 氏名 菅原 勇（財）結核予防会結核研究所

研究要旨

1型および2型糖尿病モデルラットを用いて、「糖尿病と結核増悪」の関係を調べた。1型および2型糖尿病ラットは、野生ラットに比べて、有意に結核菌に罹患しやすかった。インスリン治療した糖尿病ラットは、結核菌に対して抵抗性を示した。この糖尿病ラットから分離された肺胞マクロファージは、野生ラットに比べて、NO産生能が、有意に低下していた。グルコースは、結核菌の増殖を促進させた。逆に、インスリンは、結核菌の増殖を抑制した。マクロファージの機能低下、グルコース増加、インスリン低下が重なって、この糖尿病モデルラットは、結核菌に、より罹患しやすく、かつ増悪しやすくなったと考えられる。

A. 研究目的

Rom と Garay による結核の有名な教科書によると、「糖尿病患者は、結核にかかりやすく、しかも増悪しやすい。」との記載がある。しかし、それが病因の異なる1型糖尿病なのか2型糖尿病なのかそれとも両方なのかははっきりしない。この記載が、正しいか否かを1型および2型糖尿病モデルラットを用いて明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1型(KDP rat という)および2型(GK rat という)糖尿病雌ラットと年齢を合わせた雌野生ラットを用いた。血液と尿のグルコースを調べて血中グルコースが200mg/dl以上のラットを糖尿病ラットとして用いた。これらのラットを、Inhalation Exposure System (米国 Glas Col 社)を用いて、結核菌 Kurono 株 (3,000,000CFU/ml) でエアロソール感染させた。実験直後の肺内結核菌数は、150コロニーであった。感染7週後、ネブタールで、これら感染ラットを安楽死させた。

(1)病理組織検査。臓器の肉眼的観察を行った後、ホルマリンに臓器を固定した後、切り出し、パラフィン包埋し組織切片を作製し、H&E染色、Z-N染色を行い、病変の程度を調べた。(2)Real-time PCRによるサイトカイン mRNAの発現。感染ラットから、素早く肺組織を摘出し、瞬間凍結した。Trizol 試薬を用いて、RNAを抽出し、IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β mRNAの発現をReal-time PCRで調べた。(3)肺、脾中の結核菌数の算定。糖尿病感染ラットと野生感染ラットの肺、脾組織をとり、重さを量り、ホモゲナイズしたのち、生理的食塩水で10倍希釈した後、1%小川培地に播いた。4週間後、出現したコロニーを数え、肺・脾総重量あたりのコロニー数として表した。(4)

インスリン治療の効果。インスリン治療の効果を見るために、感染後、毎日100 μ lのウサギインスリンを、1型糖尿病ラットに朝晩皮下注射した。その臓器の組織学的観察、肺・脾内のコロニー数を算定した。(5)結核菌増殖に対するグルコースの効果。糖尿病では、血中グルコースが増加するので、*in vitro*でグルコースが結核菌増殖にどのような影響を及ぼすかを調べた。7H9液体培地に、0.1%、0.5%、1%の割合でグルコースを加え、1週間培養後、これらの結核菌を回収し、1%小川培地に播いて、4週間後出現したコロニー数を求めた。

(6)1型および2型糖尿病ラット由来肺胞マクロファージのNO産生能。NOは重要な結核菌殺菌分子である。1型糖尿病ラットの肺胞マクロファージによるNO産生能を見るために、分離した肺胞マクロファージに結核菌を1:10の割合で加え、一晚培養後、培養上清中のNOレベルをGriessの方法により測定した

倫理面への配慮 ラットに苦痛を与えないため、ネブタールで安楽死させた。

C. 研究結果

(1)病理組織検査。肉眼で、1型および2型糖尿病感染ラットの肺には灰白色の結節がたくさん見られたのに対し、野生感染ラットでは、少数であった。インスリン投与された1型糖尿病ラットでは、結節が著減し、治療の効果が見られた。脾臓は、糖尿病ラットでは、腫大し、野生ラットとは有意差が見られた。

1型および2型糖尿病ラットの肝臓でも、灰白色の結節が多く認められた。組織学的には、中心性壊死を欠くマクロファージ、リンパ球よりなる肉芽腫が認められた。糖尿病ラットの肉芽腫は、大きく隣の肉芽腫と融合している像が見られた。ラ

ングハンス巨細胞は、両群とも認められなかった。インスリン治療1型糖尿病ラットの組織像は、野生ラットのそれと類似していた。(2)Real-time PCRによるサイトカイン mRNA の発現。1型糖尿病ラットの肺組織の IFN- γ , IL-1 β , TNF- α mRNA 発現は、野生ラットのそれを1とした場合、それぞれ2.9、2.3、4.7であり、統計学的有意差が認められた。

(3)肺・脾中の結核菌数。1型および2型糖尿病ラットの肺、脾内結核菌数は、野生ラットのそれより有意に多かった(p<0.01)。肺内結核菌数は、糖尿病ラットでは、8のオーダーであるのに対し、野生ラットでは、5のオーダーであった。脾内結核菌数は、糖尿病ラットでは、5のオーダーであるのに対し、野生ラットでは、3のオーダーであった。インスリン治療1型糖尿病ラットでは、肺、脾内結核菌数は、それぞれ5、3のオーダーであり、野生ラットのそれと同様な結果が得られた(図1)。(4)生存率曲線。1型および2型糖尿病ラットは感染後90日までにすべて死んだが、野生ラットは感染半年後に解剖されるまで生存した。死因は、結核の増悪であった。インスリン治療1型糖尿病ラットも、感染半年後の解剖まで生存した。(5)結核菌増殖に及ぼすグルコース添加の効果。0.1%グルコース添加では、無添加群に比べ、有意に増加した。0.5%添加では、増加傾向が見られたが、有意差はなかった。1%添加では、逆に減少した。この減少した原因は、グルコースの粘性増加によるものと考えられた。(6)1型および2型糖尿病ラット由来肺胞マクロファージによるNO産生能。1型および2型糖尿病ラット由来肺胞マクロファージは、わずかしかなNOを産生しなかったが、野生ラット由来肺胞マクロファージは、65 μ Mを産生し有意差が認められた。

D. 考察

今回使用した1型および2型糖尿病ラットは、KomedaらおよびGotoらにより樹立されたものである。1型糖尿病ラットでは、脾のランゲルハンス島にリンパ球浸潤が認められ、脾島炎が見られた。1型および2型糖尿病ラットを結核菌に感染させると、野生ラットに比べて感染が成立しやすくなり、長期観察すると結核の増悪により死に至った。しかも、時間とともに、このラットの糖尿病の程度は、血中グルコースが増加し、著明になった。

この原因は、いろいろ考えられる。(1)1型糖尿病ラットの肺胞マクロファージによる殺菌分子であるNOの産生が減少しているため、この不活化マクロファージが結核菌を殺せない。(2)このラットの血中グルコースが高く、結核菌が増殖しやすい環境にある。(3)ごく最近の実験結果では、インスリンそのものが、結核菌増殖抑制作用

があり、この糖尿病ラットでは、インスリンが減少しているため、結核菌が増殖しやすい。このような複雑な要因が絡み合っている糖尿病ラットでは、結核が増悪すると考えられる。しかし、インスリン治療で結核の増悪は防止できるので、糖尿病のコントロールは、非常に重要である。

1型および2型糖尿病は、結核の高危険要因であることが、実験的に証明された。動物実験とはいえ、糖尿病個体は、結核にかかる悪化しやすい。ヒトでも、同様なことが生じていると推察される。結核患者の何人が、糖尿病患者であり、何人が死んだかの詳しい統計解析はない。逆の場合の統計もない。このように、「糖尿病と結核増悪」には相当な因果関係があるので、早急に全国的な実態調査をすべきと提案したい。

糖尿病患者には、肥満が多く見られ、同時に、高コレステロール血症や高脂血症を有することが多い。メタボリックシンドロームの重要な構成要因である。今回用いた1型および2型糖尿病ラットは、脂質代謝に異常は見られなかった。従って、本糖尿病モデルラットは、メタボリックシンドロームの疾患モデルとはならない。

E. 結論

「1型および2型糖尿病と結核増悪」には、実験的に証明がなされ、因果関係が認められた。しかしながら、インスリンで糖尿病をコントロールすると、結核の増悪が防止できた。ヒトでも同様なことが生じていると推察できる。「1型および2型糖尿病と結核増悪」に関する全国の実態調査の早急な施行が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) I. Sugawara, S. Mizuno. Higher susceptibility of type 1 diabetic rats to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tohoku J. Exp. Med.*, 216: 363-370, 2008.
- 2) I. Sugawara, L. Sun, S. Mizuno, T. Taniyama. Protective efficacy of recombinant BCG Tokyo (Ag85A) in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) infected intratracheally with H37Rv *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2008 (in press).
- 3) Y. Murase, S. Mitarai, I. Sugawara, Kato, S. Maeda. Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Microbiol.*, 57, 873-880, 2008.
- 4) K. Hibiya, Y. Kazumi, I. Sugawara, J. Fujita. Histological classification of systemic *Mycobacterium avium* complex infections in

slaughtered domestic pigs.
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.,
31, 347-366, 2008.

- 5) Y. J. Li, H. Takizawa, A. Azuma, T. Kohyama, Y. Yamauchi, S. Takahashi, M. Yamamoto, T. Kawada, S. Kudoh, I. Sugawara.
Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to airway inflammatory responses induced by low-dose diesel exhaust particles in mice.
Clin. Immunol., 128, 366-373, 2008.

- 6) 長野誠、市村禎広、伊藤伸子、
富井貴之、鹿住祐子、武井勝明、
阿部千代治、菅原 勇。
16S rRNA 遺伝子および ITS-1
領域をターゲットとした Invader
法による 23 菌種の抗酸菌の同定。
結核、83, 487-496, 2008.

2. 学会発表 なし

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.

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担研究報告書

BCG 持続感染成立における PD1 シグナル経路の関与および結核菌病原性関連遺伝子領域 RD1 の
カスパーゼ 1 活性化機序の解析に関する研究

研究分担者 光山 正雄（京都大学大学院医学研究科微生物感染症学）

研究要旨.

マウスに BCG を感染させると 3 週間後には強い防御免疫が誘導されるが、菌は宿主体内より容易には排除されない。この菌の抵抗性について解析を進めた結果、BCG 感染 3 週目以降では、PD-1/PD-L1 経路を介した抑制性シグナルが感染防御に関与する CD4⁺T 細胞の機能を抑制することがわかった。この反応は過剰な Th1 応答を制御するための正常な宿主応答であると思われるが、このメカニズムがあるため宿主は感染した BCG を排除できず、菌の持続感染を許す結果になるものと考えられた。

結核菌 H37Rv をマクロファージに感染させると IL-18、IL-1 β 、IL-6 や TNF- α の産生が誘導される。しかし RD1 欠損株の感染では IL-6 や TNF- α 産生は認められるが、その産生に活性型カスパーゼ 1 によるプロセッシングが必要な IL-18 と IL-1 β の産生は著しく低いことが示された。このメカニズムについて解析を進めたところ、RD1 は感染マクロファージの細胞内からのカリウムの放出を誘導し、その結果カスパーゼ 1 が活性化され、前駆体として産生された IL-18 と IL-1 β がプロセッシングを受けて成熟型として培地中に産生されることがわかった。

A. 研究目的

結核菌の病原菌としての特徴は、健康者に感染しても多くの場合結核の症状を発症せず、そのまま長期間にわたり体内で生息し続けることにある。高齢化や HIV 感染などにより宿主免疫能が低下すると感染した菌は宿主体内で増殖を始め、2次感染を引き起こすことで感染のサイクルを維持している。一方、結核菌が感染した宿主では、感染数週間後には強力な Th1 型の防御免疫が発現する。しかし、結核菌は防御免疫が成立して抗原特異的 T 細胞から大量の IFN- γ や TNF- α が産生され、マクロファージの殺菌活性が著しく亢進している環境においても容易には排除されない。その結果として人類は結核の蔓延を許し、宿主の免疫能の低下を転機として結核を発症するのである。近年、抗結核薬による治療が困難な多剤耐性結核菌の出現が報告され、その感染の拡大が懸念されているなかで、結核菌が有する宿主防御免疫に抵抗するメカニズムを明らかにすることは重要である。また、それが結核に対する新たな治療法や感染防御戦略の構築につながる。今年度は以下に示す点について焦点を絞り解析を行ったので報告する。

結核菌や BCG に対する感染防御には IFN- γ や TNF- α などの Th1 型サイトカインが重要な役割を果たしている。マウスに BCG を感染させると、抗原特異的 T 細胞の分化に伴いこれらサイトカインの強い産生が誘導される。しかし、その産生は感染3週目をピークとしてその後低下してしまう。感染3週目以降でも臓器内に菌は存在していることから、この IFN- γ や TNF- α 産生の低下は、菌数の減少に伴い免疫応答が終息していく過程を示しているのではなく、BCG により抗原特異的 T 細胞のサイトカイン産生応答が抑制されたためであると考えられる。そこで、この抑制性機序について、特に最近注目されている抑制性補助分子の関与に注目して解析を行った。その結果、抑制性補助分子の一つである PD-L1 の発現が感染3週目以降で増加することが示され、PD-L1 とそのレセプターである PD-1 を介した抑制経路が抗原特異的 T 細胞由来の IFN- γ や TNF- α 産生の低下に関与することが明らかとなった。

また最近、弱毒ワクチン株である *Mycobacterium bovis* BCG 株と結核菌のゲノム配列の比較から、BCG には存在しない RD 領域が結核菌ゲノムに 16 領域存在することが明らかとなり、これらが結核菌の病原性に重要であると考えられている。特に RD1 領域には、結核菌の分泌装置である ESX-1 の構成因子や、

結核菌の主要な T 細胞抗原である ESAT-6 あるいは CFP-10 をコードする遺伝子が含まれており、結核菌の病原性や宿主防御免疫の発現に寄与する重要な領域であることが明らかにされている。そこで、本研究ではこの RD1 領域が結核菌感染後のサイトカイン産生にどのような影響を有するかを明らかにするため、結核菌 H37Rv と RD1 欠損株 H37Rv Δ RD1 のサイトカイン誘導能を比較した。その結果、両菌株で刺激した場合の IL-6 や TNF- α 産生に違いは認められなかったが、H37Rv Δ RD1 刺激後の IL-18 や IL-1 β の産生は、H37Rv に比べて著しく低いことが示された。また、このサイトカイン産生応答の違いから、RD1 が感染マクロファージのカスパーゼ 1 の活性化に関与することが明らかとなり、その活性化機序について解析を行った。

B. 研究方法

BCG 感染と PD-1/PD-L1 シグナル経路
C57BL/6 および PD-1 欠損マウスに BCG を感染させ、その後の肺および脾臓における菌数の変化を測定した。また、BCG 感染後、脾臓中の I-A 陽性抗原提示細胞上の表面抗原を FACS により解析した。さらに、BCG 感染 1, 3, 6, 12 週後に脾 CD4⁺T 細胞を回収し、抗原刺激後の IFN- γ および TNF- α 産生を測定した。また、得られた CD4⁺T 細胞を正常マウスに移入後、結核菌 H37Rv を攻撃感染させた。感染 10 日後に脾内生菌数を測定して、CD4⁺T 細胞移入による感染防御能について解析した。

結核菌感染マクロファージのサイトカイン産生における RD1 の関与
C57BL/6 または I 型インターフェロン(IFN)レセプター欠損マウスの腹腔内に 3%チオグリコロート培地を注射し、4 日後に腹腔滲出細胞(PEC)を回収した。PEC を 24 穴組織培養用プレートで 2 時間培養後、非附着性細胞を除去してマクロファージを得た。マクロファージに結核菌 H37Rv および RD1 欠損株を感染させ、その後の各種サイトカイン(IL-6、TNF- α 、IL-18 と IL-1 β)の遺伝子発現とそれらの産生を RT-PCR および ELISA で測定した。また、カスパーゼ 1 の活性化はカスパーゼ 1 に対する抗体を用いた Western blotting により解析した。

倫理面への配慮
本研究は、マウスを用いた動物実験を含む。本研究は、京都大学動物実験委員会に承認を受けており、京都大学動物実験指針に基づいて行われた。

C. 研究結果

BCG持続感染の成立におけるPD-1/PD-L1シグナル経路の関与について C57BL/6マウスにBCGを感染させると、感染3週後にはIFN- γ およびTNF- α 産生能を有するTh1型T細胞が誘導される。また、この細胞を含むCD4⁺T細胞集団を正常マウスに移入すると、レシピエントマウスは結核菌による攻撃感染に対して強い抵抗性を示す。これらの結果は、BCG感染3週後には感染抵抗性T細胞が誘導されていることが示すものである。しかし、BCG感染後に誘導されるIFN- γ およびTNF- α 産生能を有するT細胞およびそのT細胞によって担われる防御免疫応答は、菌がまだ臓器内に存在しているにも関わらず、その後の時間経過とともに低下することが示された。感染後の脾臓における制御性T細胞数に変化はなく、抑制性サイトカインであるIL-10産生は防御免疫の低下がみられる感染6週目以降では認められなかった。一方、抗原提示細胞上の抑制性補助因子であるPD-L1の発現が感染3週目以降で増加することが示された。PD-L1はPD-1のリガンドであり、T細胞上に発現したPD-1にPD-L1が結合することにより、T細胞に抑制性シグナルがはいることが示されている。そこで、BCG感染後期に誘導されるT細胞機能の抑制にPD-1/PD-L1経路が関与するか否かを調べるため、PD-1欠損マウスにBCGを感染させ、同様の解析を行った。その結果、PD-1欠損マウスでは正常マウスと異なり、Th1型T細胞由来のIFN- γ およびTNF- α 産生の持続的な産生や、感染3週目以降の菌の排除の亢進が認められた。これらの結果から、BCGに対する感染防御において、PD-1/PD-L1経路は抑制的な作用を発揮することが明らかになった。

結核菌感染マクロファージのサイトカイン産生におけるRD1の関与 マウス腹腔マクロファージに結核菌強毒株H37Rvを感染させ、24時間後の培養上清中のサイトカイン産生を測定した。その結果、IL-6、TNF- α 、IL-18およびIL-1 β の産生が認められた。一方、RD1領域を欠損したH37Rv Δ RD1の感染ではIL-6およびTNF- α 産生は誘導されたが、IL-18とIL-1 β 産生は認められなかった。しかし、H37Rv Δ RD1感染後のIL-18およびIL-1 β mRNAの発現は、H37Rv感染の場合と同程度に誘導されることが示された。従って、H37Rv Δ RD1感染でIL-18およびIL-1 β 産生が誘導されないのは、これらサイトカインの成熟化が進まないためであると考えられた。IL-18およびIL-1 β の成熟過程には、カスパーゼ1が関与することが示されている。そこで、H37RvおよびH37Rv Δ RD1感染

後のカスパーゼ1の活性化を調べた。その結果、活性型のカスパーゼ1はH37Rv感染では誘導されるが、H37Rv Δ RD1感染では誘導されないことが明らかになった。さらに解析を進めた結果、カスパーゼ1の活性化が細胞外塩化カリウム濃度の増加に応じて阻害され、カリウムイオンの流出を誘導するnigericin存在下にH37Rv Δ RD1を感染させると、カスパーゼ1の活性化が誘導されることが明らかとなった。また、I型IFNレセプター欠損マクロファージでもH37Rv感染によりカスパーゼ1の活性化が誘導されたことから、結核菌の感染ではI型IFN非依存的にカスパーゼ1の活性化が誘導されることが示された。以上の結果から、RD1は感染細胞内のカリウムイオンの放出に関与し、その結果カスパーゼ1が活性化され、IL-18やIL-1 β の産生が誘導されるものと考えられた。

D. 考察

BCGに対する感染防御にはIFN- γ とTNF- α が重要な役割を果たしている。BCGをマウスに感染すると、抗原特異的T細胞の分化に伴ってIFN- γ とTNF- α の強い産生が誘導されるが、この産生は、感染3週目をピークとしてその後低下し、このサイトカイン産生の抑制にはPD-L1とそのレセプターであるPD-1を介した抑制経路が関与することを本研究で示した。抗原提示細胞上のPD-L1の発現はIFN- γ 刺激により増強され、T細胞上のPD-1の発現はT細胞抗原レセプターからの刺激で高まることが示されている。従って、PD-1/PD-L1シグナル経路によるT細胞機能の抑制は、持続的な炎症反応を抑えるための一種の防御反応であると考えられる。一方、BCG感染では感染3週目以降でも臓器内に菌は存在していることから、この時期のサイトカイン産生の低下が逆にBCGの生存を可能にする要因となっていることが考えられる。また、PD-1欠損マウスの実験から、PD-1は、感染初期の防御反応に影響しないことが示された。この抑制性シグナル経路を適切に制御することで、防御免疫の発現やワクチン効果を亢進させることが可能になると考えられ、さらにこの分子メカニズムの解析を進める予定である。

結核菌をマクロファージに感染させると種々の炎症性サイトカイン産生が誘導される。これらのうちIL-18およびIL-1 β の成熟過程に必要な活性型カスパーゼ1の誘導にはRD1が必要であることが本研究から明らかとなった。RD1は細胞内カリウムの遊離を促すことでカ

カスパーゼ1の活性化を誘導するが、その機序については今のところ明らかではない。これまでに、細胞内カリウムの遊離がNALP3/ASCにより構成される inflammasome を形成すること。また、この inflammasome 形成にはリソソームからのカテプシン B の放出が必要であることが報告されている。さらに、細胞内カリウムの減少は ASC の重合による pyroptosome を形成し、これがカスパーゼ1の活性化を誘導することが示されている。また、RDI 領域には結核菌分泌装置 ESX-1 の成分およびその分泌因子 (ESAT-6 および CFP-10) がコードされている。従って、ESX-1 より分泌された結核菌因子が細胞内カリウムの遊離を引き起し、それがカスパーゼ1の活性化を誘導するものと考えられる。これまでの報告では、10種類以上の結核菌因子が ESX-1 より分泌されることが示されており、そのうち ESAT-6 と CFP-10 には細胞質膜を傷害する活性が報告されている。今のところ、カスパーゼ1の活性化を誘導する責任因子を同定するまでには至っていないが、RDI とカスパーゼ1活性化の関係は結核に対する感染防御を制御する上で重要であり、今後その分子機序を明らかにしなければならないと考えている。

E. 結論

これまでに、結核菌やBCGの宿主細胞であるマクロファージの活性化を誘導することで菌の排除が亢進することが *in vitro* の実験で示されているが、実際の *in vivo* の感染では、防御免疫が誘導されてマクロファージの殺菌活性が飛躍的に高まる環境においても菌は容易に排除されない。本研究ではこの結核菌の抵抗性メカニズムを明らかにするため、菌がいかにマクロファージ機能や免疫応答を制御して宿主体内での生存を可能にしているのかを分子レベルで明らかにすることを目的として解析を行った。その結果、結核菌の病原性関連遺伝子領域 RDI が細胞内カリウムの遊離を亢進し、その結果カスパーゼ1の活性化およびIL-18やIL-1 β の産生が誘導されることが明らかとなった。また、BCG感染3週目以降ではPD-1/PD-L1経路を介した抑制性シグナルがTh1型免疫応答を抑制することが示された。この反応は過剰なTh1応答を抑制する正常な宿主応答であると思われるが、このメカニズムはBCGが長期間に渡り生体内での生存を可能にする要因になっていることが考えられた。以上のように、本年度の研究では感染した菌と宿主との interaction に関して重要な知見が得られた。今

後さらに解析を進め、そのメカニズムを明らかにしたい。

G. 研究発表

2. 論文発表

- 6) Shoma, S., K. Tsuchiya, I. Kawamura, T. Nomura, H. Hara, R. Uchiyama, S. Daim, and M. Mitsuyama. Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin-1 α and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. *Infect. Immun.*, 76: 1547-1557, 2008.
- 7) Hara, H., K. Tsuchiya, T. Nomura, I. Kawamura, S. Shoma, and M. Mitsuyama. Dependency of caspase-1 activation induced in macrophages by *Listeria monocytogenes* on cytolysin, listeriolysin O, after evasion from phagosome into the cytoplasm. *J. Immunol.* 180: 7859-7868, 2008.

2. 学会発表

- 1) RDI region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected macrophages via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. Kawamura, I., T. Kaku, R. Uchiyama, T. Kurenuma, and M. Mitsuyama. The 43rd Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 8-10 July, 2008, Baltimore, USA.
- 2) Regulatory mechanism of necrosis induction in macrophages by virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Kawamura, I., T. Kaku, R. Uchiyama, and M. Mitsuyama. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology in IUMS 2008, 5-9 August 2008, Istanbul, Turkey.
- 3) 結核菌 RDI 領域の感染マクロファージへの作用。河村伊久雄, 角泰人, 内山良介, 暮沼武士, 光山正雄. 第 78 回実験結核研究会 2008 年 4 月 東京
- 4) 結核菌および BCG の持続感染における免疫抑制受容体 PD-1 の役割。酒井俊祐, 河村伊久雄, 内山良介, 光山正雄. 第 19 回日本生体防御学会学術集会 2008 年 7 月 札幌
- 5) The PD-1:PDL-1 pathway inhibits the protective immunity and contributes to the bacterial persistence in mycobacterial infection. Sakai, S., I. Kawamura, R. Uchiyama, T. Okazaki, and M. Mitsuyama. 第 38 回日本免疫学会総会 2008 年 12 月 京都
- 6) 結核菌ゲノム領域 RDI が関与するカスバ

一ゼ 1 活性化の機序について. 暮沼武士、河村伊久雄、原英樹、内山良介, Sylvia Daim, Sita R. Dewamitta, 酒井俊祐, 土屋晃介, 野村卓正, 光山正雄. 第 7 回感染症沖縄フォーラム 2009 年 2 月

- 7) The PD-1:PD-L1 pathway is involved in the persistent infection of *Mycobacterium bovis* BCG. Sakai, S., Kawamura, I., Uchiyama, R, and Mitsuyama, M. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 8) *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein alters the early cytokine response of macrophages. Daim, S., Kawamura, I., Hara,

H., Shen, Y., Kurenuma, T., and Mitsuyama, M. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋

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

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告

薬剤耐性らい菌の簡易検出法の開発と途上国での適用

分担研究者 松岡正典 国立感染症研究所ハンセン病研究センター 室長

研究要旨

主要ハンセン病治療薬である Dapsone, Rifampin, Quinolone に対する薬剤耐性を検出するために、Drug Resistance Determining Region (DRDR)中の塩基変異を DNA-DNA Hybridization により検出する簡易検査法を開発し、その有用性をフィリピン及びミャンマーにおいて検証した。Direct PCR によるシーケンスの結果とは *folP1*, *rpoB*, *gyrA* それぞれ 97.1%, 99.3%, 100% の一致を示した。

ハンセン病対策は化学療法を専らとしている一方で、らい菌の薬剤感受性検査はほとんど行われていない。ハンセン病高有病率を示す多くの発展途上国においてルーチンに実施可能な方法であり、ハンセン病対策上極めて有用な手段と考えられる。

A. 研究目的

目下のハンセン病対策は患者の早期発見と多剤併用療法を基本として行なわれているが、その一方、耐性菌の報告も多数なされている。らい菌の薬剤感受性検査は長くマウス footpad 法により行われてきたが、その煩雑さのために、ほとんどの国において実施されていない。近年薬剤耐性を惹起する遺伝子変異が明らかにされたことにより、Dapsone, Rifampin, Quinolone について Drug Resistance Determining Region (DRDR)中のアミノ酸置換の有無により感受性の検査が可能となった。しかしながらその検査は DRDR の塩基配列をシーケンスすることにより行われており、実施可能な施設は先進国の一部に限られ、多くの患者発生がみられる途上国においては依然として感受性検査は行われてい

ない。

途上国においても実施可能な耐性菌検出方法の開発を行い、ミャンマーとフィリピンに技術移転を図った後、その方法の現地における感受性検査の方法としての有効性を検証した。

B. 研究方法

マウス footpad 法により Dapsone, Rifampin, Quinolone に対して薬剤耐性を惹起することが明らかになっている DRDR 中の変異、あるいはマウス footpad 法により耐性は確認されていないが、耐性が確認されたらい菌と同じアミノ酸の位置にアミノ酸置換を示す変異に対応する capture probe を設計した。それぞれの遺伝子に対する probe は以下の変異を検出する。*folP1* 遺伝子 53 位: ACC→

GCC, GTC, ATG, AGG, AGA, 53 位 :
CCC→TCG, CGC。 *rpoB* 遺伝子 407 位 :
GAG→GTG, 410 位 : GAT→AAT, TAT,
420 位 : CAC→TAC, GAC, 425 位 : TCG
→ATG, TTG, TTC, 427 位 : CTG→CCG。
gyrA 遺伝子 89 位 : GGC→TGC, 91 位 :
GCA→GTA。それぞれの PCR 産物との
hybridization により最適配列を決定した。
Probe を Polycarbodiimide をコートした
スライドガラス上に塗布した。3 遺伝子
中の DRDR を 1 本のチューブ内でピオチ
ンラベルされた primer を用いた PCR に
より同時に増幅し、その PCR 産物と
DNA-DNA hybridization を行った後、
peroxidase 酸化による基質の発色により
変異を決定した。

開発された方法はミャンマーの
Department of Medical Research とフ
ィリピンの Leonard Wood Memorial へ
技術移転され、両施設において現地で得
た臨床検体を用いて本方法を実施した。
得られた結果と、同一サンプルを日本の
研究室において PCR Direct sequencing
によって検査した結果とを比較し、本検
査法の信頼性と途上国での有用性を検証
した。

C. 研究結果

開発されたキットの性能を検証するた
め、それぞれの薬剤に耐性を示すヌード
マウス継代株を用いて各耐性変異の検出
能を検査した結果、それぞれの変異は特
異的に検出されることが示された。開発
された方法はミャンマーおよびフィリ
ピンの研究所の実験室に技術移転された。
ミャンマーにおいては 63 検体、フィリ

ンにおいては 73 検体について、現地研
究者により本法を用いて変異の有無を決定
した。

ミャンマーにおいてはそれぞれ 59 例
の Dapsone 感受性例、2 例の耐性例、61
例の Rifampin 感受性例と 2 例の耐性例
Quinolone については 62 例の感受性例と 1
例の耐性例について sequencing の結果
と一致し、により Dapsone 感受性と判定
された 2 例が発色が弱かったために判定
不能であった。フィリピンにおいては得
られた結果と sequencing によって得ら
れた結果の間には 2 例の Dapsone 耐性例
1 例の Rifampin 耐性例、計 3 例をのぞい
て一致が見られた。即ち、ミャンマーで
得られた全結果は 166/168 の一致率であ
り、フィリピンで得られた結果との一致
率は 217/219 であった。フィリピンで
得た結果と sequencing によって得た結
果が一致しなかった検体は *folP1* 遺伝
子中の変異を検出する probe に含まれて
いなかった 55 位 : CCC→CGT の変異で
あった。

考察

目下のハンセン病対策は有効なワクチン
が無いことから、もっぱら患者の早期発見
と化学療法剤による多剤併用療法を専らと
している。その一方、再発例あるは新患例
において耐性例が報告され、一部の菌は 2
剤以上に耐性を示すことも報告されている。
治療を有効に行い、また耐性菌の拡散を防
ぐためにも、それぞれの症例についてその
薬剤感受性を明らかにすることが望まれる。
しかしながら、らい菌の薬剤感受性は長い
間マウス Footpad 法以外に無かった。近年、

ようやく主要ハンセン病治療薬である Dapsone, Rifampin, Quinolone に対する薬剤耐性は *folP1*, *rpoB*, *gyrA* 遺伝子の Drug Resistance Determining Region (DRDR) 中の特定の塩基配列における変異により惹起されることが明らかとなり、一部先進国においてはその遺伝子配列の sequencing により耐性菌の検出が可能となった。一方、多くのハンセン病の発生が見られる途上国においては何れの方法によってもほとんど検査が行われていない。そのような国々において実施可能な簡易耐性菌検出法の開発を目指した。

ミャンマー、フィリピンにおいて得られた結果と日本において行った sequencing の結果はそれぞれの遺伝子について 97% 以上の一致率が示され、途上国において有効に機能することが明らかとなった。

sequencing の結果と簡易との結果が一致しなかったフィリピンの *folP1* の 2 例は本方法の probe に含まれていなかった 55 位: CCC→CGT の変異であったが、この変異はその後、他の報告により、マウス footpad 法により Dapsone 耐性を起こすことが確認された。フィリピンで行った簡易法の結果は *folP1* 遺伝子 55 位のいずれにも発色が認められなかった。本方法の probe は殆ど全ての変異を検出すると考えるが、このような結果を示した場合には本法でカバーしていない変異が存在していると考え、耐性菌と判定したうえで、sequencing により確認することが勧められる。

E. 結論

薬剤耐性らい菌の簡易検出法を開発し、

途上国へ技術移転した。本簡易法はハンセン病流行国である発展途上国での薬剤感受性検査に有用であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsuoka M., Khin S. A., Kyaw K., Tan E. V., Balagon M. V., Saunderson P., Gelber R., Makino M., Nakajima C. and Suzuki Y. A novel method for simple detection of mutations conferring drug resistance in *Mycobacterium leprae*, based on a DNA microarray, and its applicability in developing countries. *Journal of Medical Microbiology* Vol. 57 1213-1219, 2008

Matsuoka M. Recent advances in the molecular epidemiology of leprosy. *Japanese Journal of Leprosy* Vol.78 67-73, 2009

Fukutomi Y., Maeda Y., Matsuoka M. and Makino M. Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophage. *Japanese Journal of Leprosy* Vol.78 7-16, 2009

2. 学会発表

Matsuoka M., Budiawan T., Mukail T., Gidoh M. and Izumi S. Quantitation and evaluation of *Mycobacterium leprae* viability found in water in a leprosy endemic area. 43th US-Japan conference on Tuberculosis and Leprosy. Baltimore, USA, July 2008

Matsuoka M. Application of molecular biological methods to monitor the level of drug resistance in leprosy. 17th International Congress of Tropical Diseases and Malaria. Judu, Korea, October 2008

Matsuoka M. Genotyping of *Mycobacterium*

leprae and its application to analysis of leprosy transmission. Second International Symposium on leprosy. Valencia, Spain, January 2009

松岡正典、Thomas Gillis、Teky Budiawan、Indropo Agusni、向井 徹、儀同政一、和泉眞藏：生活用水中のらい菌の感染源としての意義。第 81 回日本ハンセン病学会総会、熊本市、2008 年 5 月

向井 徹、和泉眞藏、Teky Budiawan、宮本友司、Cita Rosita、Indropo Agusni、松岡正典：牧野正彦：常温輸送臨床検体の LAMP 法によるらい菌遺伝子検出。第 81 回日本ハンセン病学会総会、熊本市、2008 年 5 月

松岡正典：らい菌の遺伝子型別とハンセン病の感染様式解析への応用。第 75 回日本細菌学会北海道支部総会 特別講演 札幌市 2008 年 9 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

抗酸菌感染の国際的対応への貢献を目指した基盤に関する研究

（分担）研究者 吉開泰信 九州大学生体防御医学研究所

【要約】

主に T 細胞に発現される TNF ファミリー CD30L とそのレセプター CD30 は T 細胞の機能分化や増殖促進、維持に関与していると考えられる。Mycobacterium bovis BCG に対する感染防御機構における CD30L / CD30 の役割を調べるため、CD30L および CD30 ノックアウト (KO) マウスを用いて BCG 経気道および腹腔感染実験をおこなった。腹腔内、肝臓、脾臓、肺の臓器内菌数は、感染早期の 7、11 日後では、コントロールマウスと顕著な差を認めなかったが、28 日目以降では、CD30L KO マウスで肺または脾臓で有意に増加していた。PPD または Ag85 由来の peptide 25 特異的 CD4+ T 細胞の産生は、感染 28 日目以降で KO マウスで著明に減少していた。CD30L の BCG 感染後の発現を調べると主に CD4T 細胞に発現していた。BCG 感染 CD30L KO マウス由来の CD4T 細胞は CD30L 発現 P815 や CD30L 発現 T 細胞の存在下で抗原刺激による IFN- γ の産生が回復した。以上の結果から CD30L / CD30 は抗原特異的 CD4+ T 細胞の Th1 分化の促進に重要であることが明らかとなった。

A. 研究目的

CD30 リガンド (CD30L, CD153) は 40-kDa type II 粘膜関連糖蛋白質で TNF ファミリーに属する。CD30L は樹状細胞、活性化 B 細胞のみならず活性化 T 細胞に多く発現され、そのレセプターである CD30 は活性化 T 細胞に発現されていることから、CD30L/CD30 シグナルは T 細胞機能分化や増殖促進、維持に関与していると考えられる¹⁾。現在まで CD30L/CD30 シグナルが Th2 への機能分化に関与しているという報告がある²⁾一方で、Th1 や Treg 細胞への機能分化への関与も示唆されており³⁾、その役割は不明である。今回、Mycobacterium bovis BCG に対する感染防御機構における CD30L / CD30 の役割を調べるため、CD30L ノックアウト (KO) マウスを用いて BCG 経気道および腹腔感染実験をおこなった。

B 研究方法

BALB/c および C57BL/6 背景 CD30LKO マウス⁴⁾ に BCG (東京株) を経気道または腹腔投与し、感染後 14、28、42、63 日目の腹腔内、脾臓、肺の臓器内菌数を Middlebrook 7H10 agar でカウントした。肺を EDTA とコラゲナーゼ処理してリンパ球を集めた。経時的にマイコバクテリア抗原 (Ag85B, および PPD) 特異的 T 細胞をサイトカイン FACS および ELISA で調べた。病理組織組織は、緩衝 10%

ホルマリンで保存し、パラフィン封埋・切断後、ヘマトキシリン・エオジン染色した。また一部の実験で Ag85 または卵白アルブミン (OVA) を発現する BCG 株 (BCG-OVA) を使い、フローサイトメーターを用いてリンパ球表面マーカー、Ag85、OVA 抗原特異的な細胞内 IFN- γ 産生および MHC テトラマー陽性細胞の解析を行った。細胞増殖及びアポトーシス感受性の測定を行った。In vitro culture に CD30L 遺伝子発現 P815 細胞、agonistic anti-CD30L (RM153) mAb または sterilized culture plate inserts (Millipore Co. USA) を加えた。naïve CD30LKO またはコントロールマウスの CD4+ T cells (Ly5.2) を Ly5.1 CD30L+/+ mice, に移入して rBCG-Ag85BCG を感染させた。

C 研究結果

腹腔内、肝臓、脾臓、肺の臓器内菌数は、感染早期の 7、14 日後では、コントロールマウスと顕著な差を認めなかったが、28 日目以降では、CD30LKO マウスで肺または脾臓で有意に増加していた。CD30L の BCG 感染後の発現を調べると主に CD4T 細胞に発現していた。PPD または Ag85 由来の peptide 25 特異的 CD4+ T 細胞の産生は、感染 28 日目以降で CD30LKO マウスで著明に減少していた。CD44+CD127-effector タイプと CD44+CD127+ の effector/memory タイプともに CD30LKO マウス

で減少していた。BCG 感染 10 日目の CD30LKO マウス由来の CD4T 細胞を CD30L 発現 P815 や CD30L 発現 T 細胞の存在下で抗原刺激すると IFN- γ の産生が回復したが、sterilized culture plate inserts で細胞間の直接の接触を阻害すると回復しなかった。naïve CD30LKO マウスからの CD4+ T 細胞 (Ly5.2) を Ly5.1 CD30L+/+ マウスに移入して rBCG-Ag85BCG を感染させると正常レベルの IFN γ を産生した。

D 考察

ヒトおよびマウスの *in vitro* の培養系をもちいた解析から CD30L/CD30 シグナルは Th2 細胞の分化と T-B 相互作用に関与していることが示唆されている。しかし、*in vivo* 実験では CD30L の中和でも *Leishmania* に対する抵抗性の変化は認められない。また CD30KO マウスでは二次免疫による抗体産生障害がみられる一方で Graft versus host disease (GVHD) が抑制されるという報告があるように、現在までに T 細胞活性化における CD30/CD30L の役割は不明な点が多い。我々はマウス炎症性腸炎モデルにおいて Th1 型 trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) -induced colitis が CD30LKO マウスでは軽減し、Th2 型である oxazolone (OXA)-induced colitis が悪化したことを見いだした⁶⁾。これらの結果は CD30L が Th1/Th2 応答を制御していることが予想される。

結核菌などの細胞内寄生性細菌に対する感染防御機構では、 γ インターフェロン (γ IFN) 産生の CD4 Th1 細胞が菌の排除に重要である。今回の研究において、CD30L は CD4TH1 細胞応答に重要な役割を担うと考えられる。CD30LKO マウスは BCG 感染抵抗性が減弱しており、CD30L は BCG 感染においては

抗原特異的 Th1 応答が減弱していた。興味あることに CD30, CD30L 発現は感染後の活性化 CD4 T 細胞に一過性にみられ、T-T 細胞の接触が Th1 応答増強に重要であることがわかった。CD30L/CD30 シグナルによる Th1 応答の増強作用の機序としては、Th1 機能分化、細胞増殖促進、細胞死の抑制が考えられる。今後、シグナル伝達の解析でその作用機序を明らかにする必要がある。

E. 参考文献

1. Watts, T. H. 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 23-68.
2. Kennedy, M. K., C. R. Willis, and R. J. Armitage. 2006. Deciphering CD30 ligand biology and its role in humoral immunity. *Immunology.* 118:143-152.
3. Dai, Z., Q. Li, Y. Wang, G. Gao, L. S. Diggs, G. Tellides, and F. G. Lakkis. 2004. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress allograft rejection

mediated by memory CD8+ T cells via a CD30-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 113: 310-317.

4. Blazar, B. R., R. B. Levy, T. W. Mak, A. P. Mortari, H. Muta, M. Jones, M. Roskos, J. S. Serody, H. Yagita, and E. R. Podack. 2004. CD30/CD30 ligand (CD153) interaction regulates CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease. *J. Immunol.* 173: 2933-2941.
5. Sun, X., S. Somada, K. Shibata, H. Muta, H. Yamada, H. Yoshihara, K. Honda, K. Nakamura, R. Takayanagi, K. Tani, E. R. Podack, and Y. Yoshikai. 2008. A critical role of CD30 ligand/CD30 in controlling inflammatory bowel diseases in mice. *Gastroenterology.* 134: 447-458.

F. 結論

以上の結果から CD30L /CD30 は抗原特異的 CD4+ T 細胞の Th1 分化の促進に重要であることが明らかとなった。

G 研究発表

1. Tang C., Yamada H., Shibata K., Maeda N., Yoshida S., Wajjwalku W., Ohara N., Yamada, T. and Yoshikai Y. Efficacy of recombinant BCG vaccine secreting IL-15/Ag85B fusion protein on protection against *Mycobacterium tuberculosis* **J.Infectious Dis** 197:1263-1274. 2008
2. Kagimoto Y., Yamada H., Ishikawa T., Maeda N., Goshima F., Nishiyama Y., Furue M., and Yoshikai Y., A regulatory role of interleukin 15 in wound healing and mucosal infection in mice **J.Leukoc. Biol.** 83:165-72 2008
3. Nishimura J., Saiga H., Sato S., Okuyama M., Kayama H., Kuwata H., Matsumoto S., Nishida T., Sawa Y., Akira S., Yoshikai Y., Yamamoto M., and Takeda K. Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor **J.Immunol.** 180:4032-9. 2008
4. Tang C., Yamada, H., Shibata, K., Muta H., Wajjwalku W., Podack, E.R. and Yoshikai Y. A novel role of CD30L/CD30 signaling by T-T cell interaction in Th1 response against

- mycobacterial infection **J.Immunol.** 181: 6316-6327, 2008
5. Mousavi, S. F., Soroosh, P., Takahashi, T., Yoshikai, Y., Shen, H., Lefrançois, L., Borst, J., Sugamura, K., and Ishii, N.: OX40 costimulatory signals potentiate the memory commitment of effector CD8⁺ T cells. **J.Immunol** 181: 5990-6001, 2008
6. Saiga H., Nishimura J., Kuwata H., Okuyama M., Matsumoto S., Sato S., Matsumoto S., Akira S., Yoshikai Y., Honda K., Yamamoto M., and Takeda K. Lipocalin 2 dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar endothelium" **J.Immunol.** 181:8521-7.2008