

USA, July 8-10, 2008.

- 4) *Mycobacterium avium* complex 血清型 8 型株における糖脂質抗原の生合成経路の解析. 宮本友司, 向井 徹, 甲斐雅規, 前田百美, 中 崇, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 5) 遺伝子破壊による BCG 菌ミコール酸のサブクラス変換. 甲斐雅規, 宮本友司, 向井 徹, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 6) らい菌由来免疫原生タンパク、MMP-II を用いた血清診断. 甲斐雅規, 前田百美, 福富康夫, 宮本友司, 向井 徹, 牧野正彦. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2008 年 5 月 熊本
- 7) 常温輸送臨床検体の LAMP 法によるらい菌遺伝子検出. 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. 第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2008 年 5 月 熊本
- 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

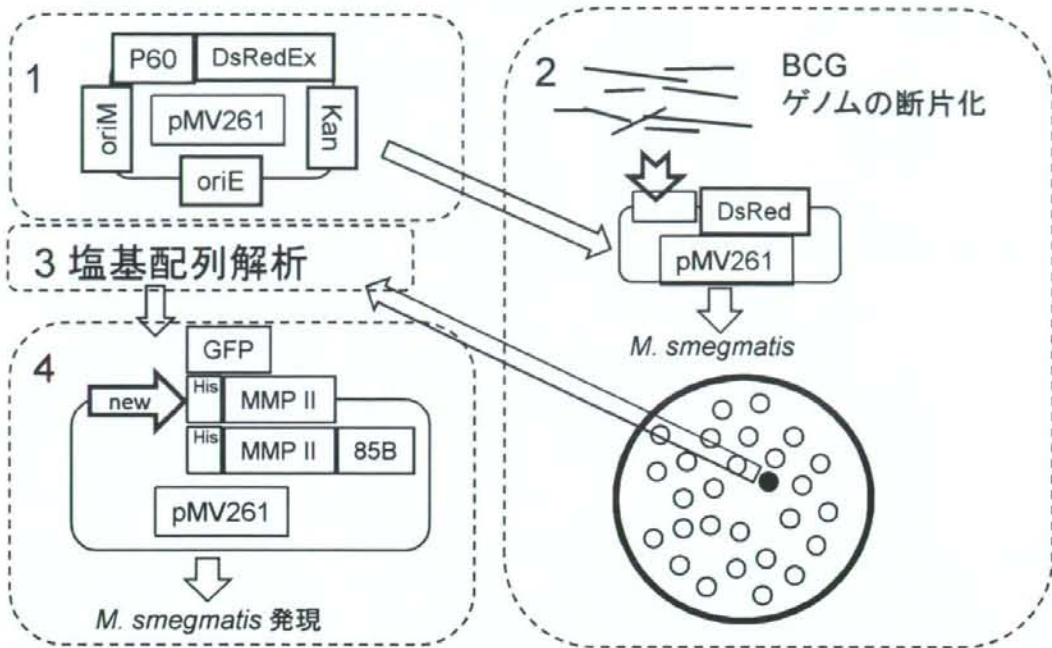


図1: 実験方法の概要図

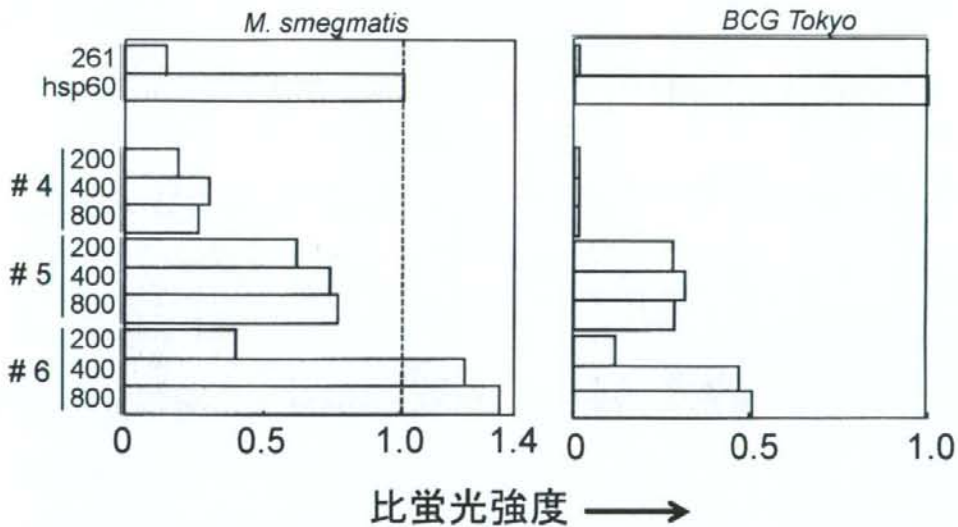


図2. 各領域の蛍光強度比較

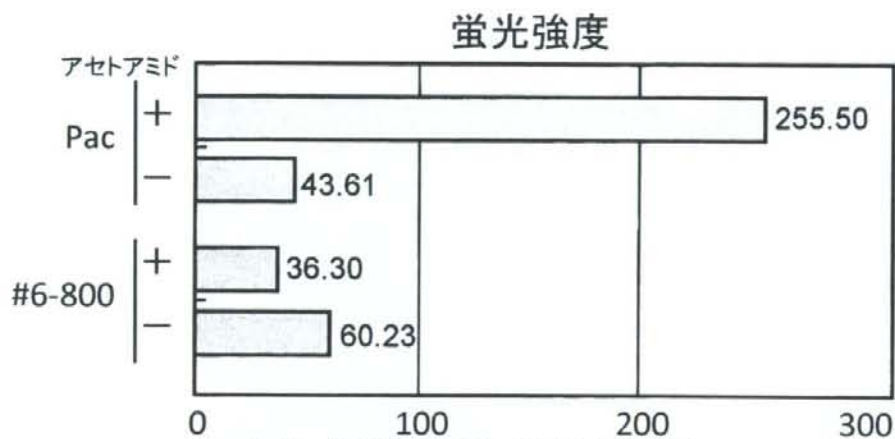


図3. 各領域のGFP蛍光強度比較

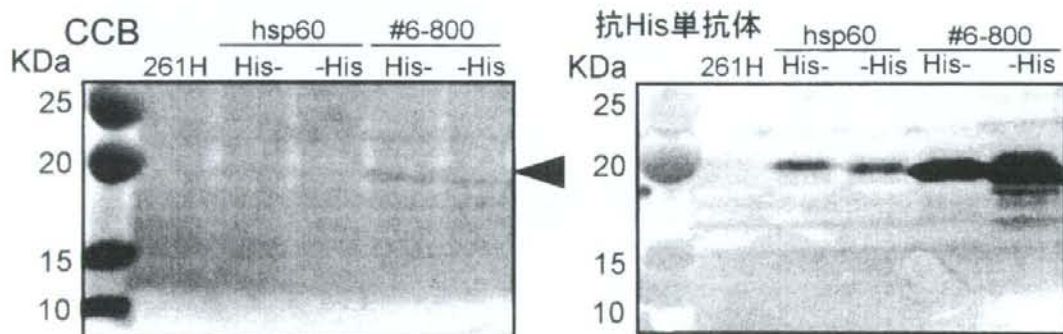


図4. らい菌蛋白MMP II 発現比較

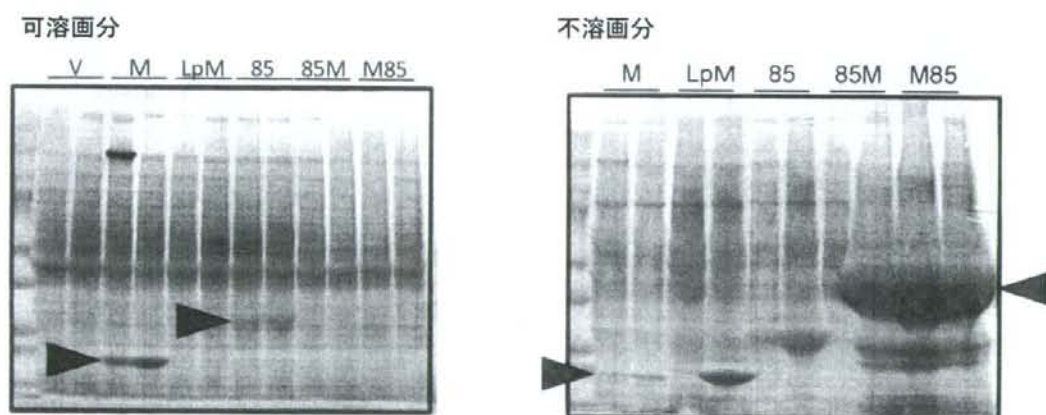


図5. acetamidase promoterによる各種らい菌蛋白発現

結核菌由来因子による宿主免疫応答の誘導機構に関する研究

研究分担者 田村 敏生 (国立感染症研究所 ハンセン病研究センター)

研究要旨

本研究は、結核菌分泌タンパクよりTh1免疫応答を選択的に誘導することで、長期生存型メモリーCD8⁺細胞障害性T細胞を誘導する活性を有するペプチドを検索し、抗結核免疫応答を強化するシステムを確立することを目的としている。

昨年度までに結核菌分泌タンパクAg85B由来のペプチド; Peptide-25(アミノ酸配列: FQDAYNAAGGHNAVF)が①選択的且つ強力でTh1細胞分化を誘導できること、さらに我々が作出したPeptide-25特異的T細胞抗原受容体(TCR)を発見するトランスジェニックマウスを用いた解析から、②Peptide-25はMHC分子を介したTCRとの会合により、ZAP-70、ERKの活性化を誘導しサイトカイン非依存的、副刺激分子非依存的にTh1細胞分化を誘導すること、③*ifn-γ*遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導することでTh1細胞分化を規定する分子であると考えられているT-betを欠損したナイーブCD4⁺ T細胞においてもPeptide-25は*ifn-γ*遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導しTh1細胞への分化を誘導できることを明らかにし、Peptide-25がT-betと同様の機能を有する未同定のTh1分化誘導因子の発現を誘導することでナイーブCD4⁺ T細胞をTh1細胞へと分化させる特性を有していることを示唆した

本年度はPeptide-25で誘導されるT-betとは異なるTh1分化誘導を制御する分子機構を明らかにすることを目的とし、DNAマイクロアレイ法を用いてPeptide-25刺激後ナイーブCD4⁺ T細胞に発現誘導される転写調節活性を有する分子を網羅的に解析した結果、ナイーブCD4⁺ T細胞において*ifn-γ*遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導できる転写調節因子を1遺伝子を同定した。

研究協力者

下袴田 陽子 (国立感染症研究所・病原微生物部)

A. 研究目的

ワクチンの目的は主に獲得免疫を惹起し、長期生存型メモリーCD8⁺細胞障害性 T 細胞(CTL)を効果的に誘導することである。この長期生存型メモリーCTLの誘導にはIFN- γ 、TNF- α を産生するCD4⁺ Th1細胞の存在が不可欠であると考えられている。

本研究は、結核菌分泌タンパクよりTh1免疫応答を選択的に誘導することで、長期生存型メモリーCTLを誘導する活性を有するペプチドを検索し、抗結核免疫応答を強化するシステムを確立することを目的としている。

これまでの解析から、①結核菌分泌タンパクAg85Bのヘルパーエпитープを検索し、15個のアミノ酸からなる Peptide-25

(FQDAYNAAGGHNAVF)が、I-A^b拘束性に選択的且つ強力でTh1免疫応答を誘導できること、②Peptide-25特異的TCRを発見するトランスジェニックマウス(P25 TCR-Tg)を用いた解析から、Peptide-25はIL-12やIFN- γ などのサイトカイン非依存的、LFA-1やCTLA-4などの副刺激分子非依存的にTh1分化を誘導できること、③Peptide-25はTCRを介しナイーブCD4⁺ T細胞のチロシンリン酸化酵素の活性化を誘導し、TCR- ζ 鎖のリン酸化、それに続きZAP-70、ERKの活性化を誘導し、一過性のT-betの発現上昇とGATA-3の持続的な発現抑制を誘導できること、④*ifn-γ*遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導することでTh1細胞分化を規定する分子と考えられているT-betを欠損したナイーブCD4⁺ T細胞に対してもPeptide-25はTh1細胞分化を誘導できることを明らかにしてきた。

本年度はPeptide-25で誘導されるT-betとは異なる

る Th1 分化誘導を制御する分子機構を明らかにすることを目的とし、DNA マイクロアレイ法を用いて解析した。

B. 研究方法

(1) DNA マイクロアレイ法による発現遺伝子の網羅的解析

P25 TCR-Tg(C57BL/6 バックグランド)または T-bet 欠損 P25 TCR-Tg(C57BL/6 バックグランド)脾臓細胞より I Mag システム (BD Bioscience)、FACS Aria(Beckton Dickinson) を用いて CD44^{low}CD62L^{high} ナイーブ CD4⁺ T 細胞を精製した。抗原提示細胞として I-A^b 分子を遺伝子導入した Chinese hamster ovary 細胞(I-A^b-CHO)を用いた。ナイーブ CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 を取り込ませた I-A^b-CHO と共培養し、3 時間後、6 時間後に CD4⁺ T 細胞の mRNA を調製し、Affymetrix 社の GeneChip® Expression Array を用いて発現遺伝子の網羅的解析を行なった。得られたデータの解析は ArrayAssist(Stratagene)解析ソフトを用いて行なった。

(2) 候補遺伝子の経時的発現変化の確認

ArrayAssist 解析にて絞り込まれた候補遺伝子の P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞または T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞における Peptide-25 刺激後の経時的発現変化は Real-Time PCR 法にて確認した。

(3) 候補遺伝子の機能解析法

PCR 法を用いて候補遺伝子をクローニングし、レトロウィルス発現ベクター pMY-IRES-GFP(東京大学・医科学研究所 北村俊雄博士より供与)に組み込んだ。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞を抗 IL-4 抗体、抗 IFN- γ 抗体、抗 IL-12 抗体存在下に固相化抗 CD3 抗体+可溶性抗 CD28 抗体を用いてエフェクター細胞(Th1、Th2 細胞)への分化誘導を行なう際に、候補遺伝子を組み込んだ pMY-IRES-GFP を添加し、CD4⁺ T 細胞に候補遺伝子を導入した。5 日間培養した細胞を固相化抗 CD3 抗体で再刺激し、候補遺伝子が導入された(GFP 陽性)細胞のサイトカイン産生能を細胞内サイトカイン染色法にて評価した。また、5 日間培養して得た GFP 陽性細胞を FACS Aria にて分取し、抗アセチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行ない、*ifn- γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングの解析を行なった。

倫理面への配慮

実験に供したマウスの飼育、維持は国立感染症研究所の実験動物指針に従い実施した。

C. 研究結果

(1) Th1 分化を誘導する転写調節因子の解析

我々は①Th1 分化のマスター遺伝子と考えられて

いる T-bet mRNA の発現が抗原刺激後 3 時間で上昇し、その後一旦低下した後、刺激後 15 時間頃から再度上昇すること、この刺激 15 時間後の発現誘導はサイトカイン依存性であるのに対し、刺激 3 時間後の発現誘導はサイトカインや副刺激分子非依存性に誘導されること、②Peptide-25 刺激は T-bet 欠損ナイーブ CD4⁺ T 細胞においてもサイトカインや副刺激分子非依存性に *ifn- γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導し、Th1 細胞への分化を誘導できることを明らかにしている。これらの結果から Peptide-25 と TCR の相互作用によってサイトカイン非依存性に Th1 分化を誘導する因子の活性化が誘導されていると考えた。そこで、DNA マイクロアレイ法にて得た発現遺伝子情報を①P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞及び T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞のいずれの場合にも T-bet と同様に刺激後 3 時間で発現が誘導され、6 時間後には低下する遺伝子、②T-bet と同様に *ifn- γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導する転写調節活性を有する遺伝子であることを条件に候補遺伝子の絞り込みを行なった。その結果、T-bet と同様の発現様式を示し、転写調節活性を有する可能性のある 53 種類の候補遺伝子を得た。

そこで P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞及び T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 で刺激し、候補遺伝子の発現を Real-Time PCR 法にて確認した結果、3 種類の遺伝子が T-bet と同様の発現様式を示したことからこの 3 種類の遺伝子を候補とした。これら候補遺伝子を PCR 法にてクローニングし、CD4⁺ T 細胞に導入するためにレトロウィルス発現ベクター pMY-IRES-GFP に組み込んだ。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞を抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体で刺激し分化誘導する際に候補遺伝子を組み込んだ pMY-IRES-GFP を添加し T-bet 欠損 CD4⁺ T 細胞に候補遺伝子を導入した。陰性対照として pMY-IRES-GFP のみを、陽性対照として T-bet-pMY-IRES-GFP を用いた。培養 5 日後に回収した細胞を抗 CD3 抗体で再刺激し、そのサイトカイン産生を指標に導入遺伝子の Th1 分化誘導能を評価した結果、pMY-IRES-GFP が導入された細胞では Th2 細胞への分化が優位に誘導されたのに対し、3 種類の候補遺伝子のうちの 1 つ(FactorX)が導入された細胞では T-bet 遺伝子を導入した場合と同程度の Th1 分化が誘導された。そこで、培養 5 日後の FactorX が導入された細胞の *ifn- γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングを抗アセチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降法にて検討した。その結果、pMY-IRES-GFP が導入された細胞では *ifn- γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングはほとんど誘導されていないのに対し、FactorX が導入された細胞では T-bet が導入された細胞と同様に *ifn- γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングが誘導された。

D. 考察

DNA マイクロアレイ法にて絞り込んだ転写調節活性を有した候補遺伝子 3 種類の内の FactorX が *ihn-γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導し、ナイーブ CD4⁺ T 細胞を Th1 細胞へと分化させる機能を有していることが示された。これまでに T-bet 欠損 CD4⁺ T 細胞が IL-12 依存性に Th1 細胞へと分化できることから、T-bet 以外にも IL-12- Stat4 経路が Th1 分化誘導に重要な役割を果たしていることが報告されている。我々が用いている Peptide-25 による Th1 分化誘導システムでは IL-12 が関与しないシステム (IL-12 産生能を有していない細胞を抗原提示細胞として用いる系、固相化抗 CD3 抗体+可溶性抗 CD28 抗体による刺激系)であり、さらに IL-12 の中和抗体を添加している。したがって、我々が見出した FactorX による Th1 分化誘導機構はこれまでに報告されている T-bet 及び IL-12-Stat4 経路とは異なる新たな Th1 分化誘導経路であることが示された。我々が用いている T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞には Stat4 は発現しており、今後 FactorX と Stat4 の関与について検討を進めて行く予定である。さらに、我々は T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞でも、Peptide-25 刺激で IL-12 レセプターβ2 鎖の発現が IL-12, IFN-γ 非依存性に誘導されること、GATA-3 の発現が抑制されることを見出している。FactorX 導入細胞での IL-12 レセプターβ2 鎖、GATA-3 の発現変化を今後解析して行く予定である。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. CD4⁺ T-cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis bacillus Calmette -Guérin*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 53:96-106, 2008.
- 2) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. GM-CSF-mediated T-cell activation by macrophages infected with recombinant BCG that secretes major membrane protein-II of *Mycobacterium leprae*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 55:39-46, 2009.

2. 学会発表

- 1) 結核菌肺感染における免疫応答制御機構への抑制性サイトカインの関与。矢作綾野, 梅村正幸, 田村敏生, Dilara Begum, 大城清哲, 岡本祐子, 刈米アイ, 高津聖志, 松崎吾朗. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 2) LipoK の細胞障害性 T 細胞の活性化及びエキソゾーム産生に及ぼす影響。前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. 第 81 回日本細菌学会総会 2008 年 3 月 京都

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

『抗 TNF 製剤と結核』

分担研究者 松本智成

大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 臨床研究部長

A. 研究目的

2001年にKeane等によって、マウス-ヒトキメラ型抗TNF α 抗体であるinfliximab投与後28週以内に結核の発症頻度が上昇するという報告がthe New England Journal of Medicineに報告されて以来(1)、抗TNF- α 製剤と結核の問題が提起される様になった。Infliximab投与時の結核発症の特徴は、通常見られる空洞や結節病変は形成する事が少なく、粟粒結核や播種性結核の様相を呈する事が多い。また症状、画像所見に今まで知られている結核の特徴がないために診断が遅れ死に至る事もあった。

事実、Wolfe等は、米国の関節リウマチ患者の結核発症率は、6.2/10万人(1999-2000)と合衆国の結核罹患率5.8-6.4/10万人と変化が無いのに、infliximab投与された関節リウマチ患者の結核発症率は、52.5/10万人(1年間にinfliximab投与を受けた場合)と約9倍に跳ね上がることを報告して

いる(2)。ただし結核を発症した患者は、精細な結核のスクリーニングや、予防内服を行わなかった患者に発症したという。

世界的に見て結核患者は増加傾向にあり、しかも関節リウマチの治療において早期より積極的に抗TNF α 抗体製剤を中心とした生物学製剤投与が推奨される現在、抗TNF製剤と結核は無視できない問題である。

日本におけるinfliximab投与と結核の問題点としては、

1. 結核感染のスクリーニングが難しい
2. 結核発症予防法における問題点
 1. 結核発症予防法が確立していない
3. 結核の発病診断が難しい
4. Paradoxical response 出現時結核加療およびリウマチ加療

をいかにするか

5. 結核加療後の関節リウマチの加療をいかにするか
6. 結核加療時の医療機関連携をいかにするか

が挙げられる。

infliximab によって発病した結核患者を診ると paradoxical response による臨床症状の激しさから、もう二度とこのような経験はしたくないということと、結核と関節リウマチのコントロールの難しさから再投与はするべきでないという意見が大多数をしめる。筆者は、infliximab により結核発症し結核治癒した関節リウマチ患者に対する infliximab 再投与は可能であり、有効な抗結核薬の存在下では初回時の投与と比較して以下の点で結核再発の危険性は低いと考えた。

1. 結核を発症した事が既にわかっている。
2. 結核菌が採取出来、抗結核薬に対して感受性がある事が判明している。
3. infliximab 投与後であっても抗結核薬にて結核をコントロール出来た。
4. 抗結核薬治療中に副作用が出ていない事を確認出来、仮に再発しても副作用無く加療出来

る保証がある。

5. 抗結核治療期間でINHの長期投与可能である事が確認出来ている。
6. 前回の infliximab 投与にて、結核以外の副作用が無くしかも infliximab が有効である事を確認している。

既存の抗リウマチ薬が無効で、最後の手段として発売を待ち望んだ infliximab を投与して、不幸にも結核発症して当院に転院になった患者がいた。当院に転院後、抗結核薬による治療を行い無事に結核加療は終了したが、やはり既存の抗リウマチ薬ではコントロール不良であった。転院直後から患者の infliximab 再投与の希望が強く、しかも休薬期間が一年近くになり最後の再投与の機会であった。上記の判断から infliximab の再投与を行った(3)。

B. 研究方法

結核を発病した難治性関節リウマチ患者 7 名(内3名は infliximab 投与にて結核発症)に対して、感受性のある抗結核薬を投与しながら infliximab 加療を行った。

C. 研究結果

再投与後4年経過するが結核の再発はない。しかも関節リウマチも寛解にコントロールでき infliximab 投与を終了した。以後も関節リウマチの悪化は認められない。さらに2人のレミケードにより結核発病した患者に infliximab 再投与を行い現在再発なしに加療できた。これらのことにより有効な結核薬のもとではたとえ結核を発病しても infliximab を投与できることが明らかとなった。

D. 考察

現在の抗結核化学療法後にステロイド投与を行うと60%に菌の再発がおこると言われている。また Wolfe 等の報告では、infliximab 未投薬の関節リウマチ患者に対して infliximab 投与は結核の発症率を、9倍発病率をあげると報告している。しかしながら、当症例では、抗結核加療を終了した後でも infliximab 投与を行っても結核再発が認められていないこと、日本の7,000人 infliximab を投与された患者において INH 予防内服と同時に infliximab を投与された患者では、INH 耐性結核の発病は報告されているが、感受性株の発病はない。また、INH 予防内服を先に行い、INH 予防内服終了後に infliximab を投与したら結核が発病したという報告もあることより、infliximab と INH を同時に投与す

ることが結核薬を有効に効かせる為には重要であると判断する。

infliximab 投与中の INH 予防内服をいつまでやるかというもんだいであるが、Fitzgerald 等の報告の南アフリカの炭坑夫のデータでは、結核加療後の INH 予防内服は長ければ長いほど結核の再発は低かったということ(4)、ならびに Arend 等は infliximab 投与中に結核菌暴露を受け結核発病したクローン病患者を報告している。これらから考えると結核の中蔓延地域である大阪では、再感染発病も考えられ可能であるならば INH の予防内服は長期間行うのも必要かもしれない。

E. 結論

有効な結核薬のもとではたとえ結核を発病しても infliximab を投与できることが明らかとなった。

1. Keane J, et al: Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor- α neutralizing agent. *N. Engl. J. Med.* 345: 1098-1104, 2001.
2. Wolfe F, et al.: Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. *Arth &*

- Rheum 50 (2), 2004, 372-379.
3. Matsumoto T, et al. : Infliximab for the patient of rheumatoid arthritis. N. Engl. J. Med. 355 (7): 740-741, 2006.
 4. Fitzgerald DW, et al: Effect of post-treatment isoniazid on prevention of recurrent tuberculosis in HIV-1-infected individuals: a randomized trial. Lancet 356: 1470-1474, 2000.
 5. Arend. S, et al: A patient with de novo tuberculosis during anti-tumor necrosis factor- α therapy illustrating diagnosis pitfalls and paradoxical response to treatment. C.I.D. 45 (1 Dec) 1470-1475, 2007.

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 該当無し

2. 学会発表

1. 結核発症関節リウマチ患者における抗 TNF- α 製剤治療, 松本智成, 山口統彦, 日本臨床免疫学会会誌 30 巻 4 号 Page307 (2007. 08)

2. 感染症とサイトカイン レミケード投与により結核発症した関節リウマチ患者へのレミケード再投与(その後の経過), 松本智成, 山口統彦, 永井崇之, 田村嘉孝, 感染症学雑誌 81 巻 4 号 Page508 (2007. 07)
3. 膠原病の肺合併症 高蔓延地域大阪での膠原病治療中の結核患者 50 症例の検討, 山口統彦, 松本智成, 鳥羽宏和, アレルギー 56 巻 3-4 Page318 (2007. 04)
4. QFT-2G による活動性結核補助診断の落とし穴, 松本智成, 久原華子, 山口徹, 田村嘉孝, 永井崇之, 高松勇, 土居悟, 阿野裕美, 河原邦光, 高嶋哲也, 結核 82 巻 6 号 Page552 (2007. 06)
5. 粟粒結核 11 症例における QFT-2G の有用性の検討, 久原華子, 山口徹, 田村嘉孝, 永井崇之, 松本智成, 高嶋哲也, 結核 82 巻 6 号 Page552 (2007. 06)
6. 結核発症関節リウマチ患者に対するインフリキシマブ投与, 松本智成, 山口統彦, 史賢林, 日本リウマチ学

- 会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウムプログラム・抄録集 51回・16回 Page250(2007.04)
7. 膠原病、関節リウマチ治療中の結核発症についての検討(続報), 山口統彦, 松本智成, 永井崇之, 田村嘉孝, 高嶋哲也, 石原英樹, 南俊行, 鳥羽弘和, 日本呼吸器学会雑誌 45巻増刊 Page198(2007.04)
8. レミケード投与により結核発症した関節リウマチ患者へのレミケード再投与(その理論と実際)の経過, 松本智成, 山口統彦, 阿野裕美, 永井崇之, 田村嘉孝, 高嶋哲也, 結核 82巻4号 Page442(2007.04)
9. 膠原病治療中に発症した結核感染症についての検討(後報), 山口統彦, 松本智成, 永井崇之, 田村嘉孝, 高嶋哲也, 鳥羽宏和, 結核 82巻4号 Page441(2007.04)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)
該当なし

結核菌の新規病原因子に関する分子生物学的解析

分担研究者 松本 壮吉 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨: BCG がヒアルロニダーゼ活性を有すること、またその阻害剤により菌の *in vitro* および *in vivo* での増殖が抑制されることを明らかにした。

A 研究目的

結核菌は、人類の 32% に一部休眠状態で潜伏感染している。成人型肺結核の多くが潜伏感染菌による内因性の再燃であり、毎年 200 万人が結核で死亡している。通常結核菌は初感染時に結核を発症することが少なく、大部分は肺の細胞に接着・侵入したのちそこで長期間潜伏感染することが知られており、成人性肺結核のほとんどがこれらの潜伏感染菌の再燃により発症するといわれている。

宿主細胞への結核菌の感染はグリコサミノグリカンがそのレセプターの役割を果たすことが明らかになっており、我々はこれまでの研究でヒアルロン酸が結核菌の細胞接着／侵入の足がかりとなることを証明してきた。ヒアルロン酸は N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の直鎖状高分子多糖であり、軟骨や細胞外マトリックスの主成分である。気道表面にも粘膜繊毛エレベーターに逆らって繋留されている。結核菌は宿主細胞表面のヒアルロン酸と抗酸菌特異的蛋白質 mycobacterial DNA-binding protein 1

(MDP1) を介して結合する。(Aoki K et al. J Biol Chem 2004)。さらにこれまでの研究より、細胞感染後の菌の増殖をヒアルロン酸が促進すること、また結核病巣においてヒアルロン酸合成酵素の発現が増強していることなどを明らかにした。

ではなぜヒアルロン酸存在下で結核菌の増殖が促進されるのか？ 先に記したようにヒアルロン酸は N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸からなる多糖である。*Staphyrococcus aureus* など、いくつかの微生物にはヒアルロン酸を分解する酵素(ヒアルロニダーゼ)の存在が知られており、組織の分解することにより感染および毒素の拡散を容易にしたり、分解したヒアルロン酸から得られた糖を栄養源としたりすることが知られている。そこで我々は結核菌がそれらを栄養源として利用しているのではないかと推察し、実験を行った。また、この酵素をターゲットとした新規抗結核薬開発の試みについても報告する。

B 研究方法

Mycobacterium bovis BCG 菌体蛋白質抽出およびヒアルロン酸との反応

M. bovis BCG 菌体を PBS で数回洗浄したのち、0.05% Tween 80 を含む PBS (pH 8.0) で懸濁し、37 度で一晩加温する。その後遠心して上清を回収したものを BCG 菌体表層蛋白粗抽出液とする。これにヒアルロン酸を最終濃度が 1 mg/ml になるように添加し、37 度で加温した。

比色法を用いたヒアルロニダーゼ活性検出

比色法を用いたヒアルロニダーゼ活性の検出は Morgan-Elson assay により行った。この方法は酵素によって分解されることにより生じた N-アセチルグルコサミンの断端を定量する方法である。まず、BCG 菌体抽出蛋白質とヒアルロン酸の反応産物 130 ml に 25 ml の 0.8M potassium tetraborate を添加し、100 度で 3 分加熱した後氷上で冷却する。その後、発色液 (1%

Dimethylaminobenzaldehyde, 1.1% HCl in acetic acid) を 0.75 ml 添加して 37 度で加温し、吸光度 (585 nm) を測定する。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いたヒアルロニダーゼ活性検出

既知のヒアルロニダーゼは長鎖のヒアルロン酸をランダムに切断し、さまざまな分子量の断片が産生されるため、電気泳動によりラダーを観察することができる。BCG 抽出蛋白質と反応させたヒアルロン酸は、フェノール/クロロホルム処理により除蛋白をおこなったのち、12%ポリアクリルアミドゲルにて分離した。その後、1%アルシアンブルー水溶液で染色し、ラダーの有無を比較した。

培養細胞感染後の BCG 増殖におけるヒアルロニダーゼ阻害剤の効果

10%牛胎児血清含有 RPMI1640 培地にて 5%炭酸ガス存在下 37°C にて A549 細胞の継代培養を行なった。ルシフェラーゼ発現組み換え BCG (J. Bacteriol 2007, vol 189, p8241-8249 にて作成済み) は、カナマイシンを 10 µg/ml 含有する 7H9-ADC 培地で培養し、対数増殖期の菌をグリセロール 15%溶液で -80°C にて保存して使用前に融解し感染に使用した。A549 細胞を 2×10^5 /穴 /24 穴プレート(ファルコン社)に播種し、ルシフェラーゼを発現する組み換え BCG を 2×10^6 集落形成数(CFU)/ml の濃度で加えた。16 時間 37°C で保温後、細胞外の菌を取り除きヒアルロン酸 2 µg を加え、さらに L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル (Vcpal) を 25 mM 添加した。さらに培養を続けた後経時的にトライトン X で処理して細胞を溶解させ、組み換え BCG 由来のルシフェラーゼ活性を測定、もしくは菌液を段階希釈して 7H11-OADC 培地上に釣菌し 37°C にて 20-25 日間培養後、生菌数を算定した。

マウス-BCG 感染モデルにおけるヒアルロニダーゼ阻害剤の効果

BALB/c マウスに BCG を経静脈的に感染させ、2 日後から毎日 Cremophor (negative control), Vcpal (5-20 mM in Cremophor), Amikacin (50 mg/ml in saline) を 1 個体につき 200 µl 腹腔内投与した。その後、経時的にマウスを屠殺して回収した肺をすりつぶし、寒天培地に接種して 20-25 日後に生菌数を測定した。

C. 研究成果

BCG はヒアルロニダーゼ活性を有する。

BCG を Triton X-100 で処理して得られた抽出蛋白

質とヒアルロン酸を混合し加温したところ、Morgan-Elson 法にて明るい赤紫色に呈色した。一方、抽出蛋白質と混合しないヒアルロン酸では無色のままであった。これは菌体抽出蛋白質によってヒアルロン酸が分解され、反応液中に N-アセチルグルコサミンの断端が増加したことによる。また、この呈色反応はヒアルロン酸に加える菌体抽出蛋白質の濃度依存的に増強した。ポリアクリルアミド電気泳動による解析では、未反応のヒアルロン酸が高分子部分に塊状に観察されるのに対し、菌体抽出蛋白質と反応させたヒアルロン酸はラダー状の泳動像が観察された。さらに、この現象は菌体抽出蛋白濃度および反応時間依存的に促進することがわかった。以上のことから BCG はヒアルロニダーゼ活性を有することが明らかになった。

培養細胞感染 BCG の増殖はヒアルロニダーゼ阻害剤により抑制される。 先述したように、結核菌は宿主細胞表面のヒアルロン酸を介して接着/侵入することが明らかになっている。また、長鎖のヒアルロン酸を分解することで栄養源として利用することも明らかになった。よって、菌のヒアルロニダーゼ活性を阻害することが宿主細胞への感染・増殖に何らかの抑制効果をもたらすのではないかと推察される。既知のヒアルロニダーゼに対して阻害作用を示す薬剤として、アスコルビン酸パルミチン酸エステル (Vcpal) が知られているため、これを利用して実験を行った。その結果、Vcpal を添加した培養条件では BCG の増殖が抑制されることがわかった。

マウス感染モデルにおける BCG の増殖はヒアルロニダーゼ阻害剤で抑制される。 *In vitro* での Vcpal による BCG 増殖抑制効果が確認されたので、マウス感染モデルにおいても同様の作用がみられるかを実験した。経静脈的に BCG を感染させたマウスに Vcpal を投与すると、組織中での BCG の増殖が顕著に抑制された。以上のことから、BCG は生体内での増殖にヒアルロン酸を利用している可能性が示唆された。

D. 考察

ヒアルロン酸は細胞間マトリックスとして肺をはじめとして広く組織中に存在することが知られており、気道における細菌感染防御に重要な役割を担うことが示されていたが、結核感染におけるヒアルロン酸の役割は明らかにされていなかった。こ

れまでの研究から、肺の結核病巣中にはヒアルロン酸の集積が認められることや、*in vitro*において結核菌がヒアルロン酸濃度依存的に増殖することを明らかにしてきた。しかしながらこれまでに抗酸菌がヒアルロニダーゼを有するという報告はなく、他の細菌からクローニングされたヒアルロニダーゼの塩基配列を基にデータベース検索をかけても相同性の高い ORF は検出できなかった。

我々は BCG より抽出した蛋白画分がヒアルロニダーゼ活性を有することを世界で初めて発見し、以前より推察していたように一部の抗酸菌がヒアルロン酸を切断し、得られた糖を栄養源として利用することを明らかにした。結核菌はマクロファージ以外にも II 型肺胞上皮細胞に接着/侵入し、ヒアルロン酸が菌の接着/侵入の足がかりになっていることをこれまでに明らかにしてきた。また、結核病巣ではヒアルロン酸合成酵素の一つである HAS1 が発現し、ヒアルロン酸の集積が認められることも発見した。以上から、結核菌はまず MDP1 を介して宿主細胞表面に存在するヒアルロン酸に接着し、その一方で細胞間および細胞表面に豊富に存在するヒアルロン酸を栄養源として増殖しながら感染を拡大させているのではないかと推察される。

本報告では、菌のもつこのヒアルロニダーゼ活性が感染の増悪因子の一つとして働いているのではないかと仮説のもとに、この酵素活性をターゲットとした新規抗結核薬の開発の可能性を検討した。ヒアルロニダーゼは原核・真核生物で広くその存在が知られており、その阻害剤についてもいくつかの報告がなされている。なかでも Vcpal はその阻害作用が強力であること、またアスコルビン酸の誘導体であり、抗酸化剤として食品添加物に利用されていることなどから今回の実験に利用した。その結果、*in vitro*, *in vivo* において BCG の(ヒアルロニダーゼ依存的)増殖を抑制することが明らかになった。

本研究で我々は、これまでに報告のない抗酸菌ヒアルロニダーゼの存在を明らかにした。このことから結核菌は気道系のヒアルロン酸を利用し、宿主への接着/侵入に利用するのみならず、それを栄養源として組織内で増殖している可能性が示唆された。また、既知のヒアルロニダーゼ阻害剤を利用することで、菌が生体内で実際にヒアルロン酸を分解して生存・増殖している可能性を明らかにした。以上のことから、菌のヒアルロン酸代謝酵素は、結核菌の生体内増殖に強く関わると考えられ、それらの阻害剤は新たな薬剤標的となりう

るであろう。そのため、ヒアルロン酸分解酵素や代謝酵素の同定が今後の重要課題と考えられる。

E. 結 論

本研究は、ウシ型結核菌弱毒株 BCG がヒアルロニダーゼ活性を有することを示した。また、ヒアルロニダーゼの阻害剤により、組織中での菌の増殖が抑制されることを明らかにした。これらの結果から、ヒアルロニダーゼが感染増悪因子として働いていること、また新規抗結核薬のターゲットとなりうる事が判明した。

F. 研究発表

論文発表

原著論文

1. Nishimura, J., H. Saiga, S. Sato, M. Okuyama, H. Kayama, H. Kuwata, S. Matsumoto, T. Nishida, Y. Sawa, S. Akira, Y. Yoshikai, M. Yamamoto, and K. Takeda. 2008. Potent anti-mycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J Immunol* 180:4032-4039.
2. Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P.J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. 2008. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J Bacteriol* 190:3613-3621.
3. Saiga H., Nishimura J, Kuwata H, Okuyama M, Matsumoto S, Sato S, Matsumoto M, Akira S, Yoshikai Y, Honda K, Yamamoto M and K Takeda. 2008 Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in thin alveolar epithelium. *J Immunol* 181: 8521-8527
4. Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J. Kang, A. Shibata, K. Hirata, K. Kitada, S. Kitada, R. Maekura, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. 2009. Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immune-competent patients. *Microb Pathog* 46:6-12.
5. Okazaki M, Ohnishi H, Ohkusu K, Hata H, Fujiwara N, Matsumoto S, Nishiuchi Y, Yonetani S, Fukugawa Y, Yamamoto M, Wada H, Sugawara K, Sejimo A, Kawamura C, Ebina A, Ezaki T, Goto H, and Watanabe T. *Mycobacterium kyorinense* sp.nov., a novel slowly growing *Mycobacterium* sp. related to *Mycobacterium celatum* isolated from three

patients with infections. *Int J Syst Evol Microbiol* in press.

総説

1. 松本 壮吉、小林 和夫、結核ワクチン研究の現状と展望、臨床検査 Vol 52 p1149-1153, 2008

学会発表

1. 平山 幸雄、吉村 満美子、尾関 百合子、菅原 勇、青木 俊明、西内 由紀子、小林 和夫、松本 壮吉。結核病巣におけるヒアルロン酸の産生と局在。日本細菌学会雑誌、63:1. 第81回日本細菌学会総会(京都、3月)
2. 藤原 永年、中田 登、前田 伸司、中 崇、水野 浄子、牧野 正彦、松本 壮吉、矢野 郁也。Mycobacterium intracellulare 由来血清型 7,12 型 glycopeptidolipid 糖鎖合成遺伝子の機能解析。日本細菌学会雑誌、63:1. 第81回日本細菌学会総会(京都、3月)
3. 尾関 百合子、小林 和夫、松本 壮吉。結核菌感染における制御性 T 細胞の役割(2)日本細菌学会雑誌、63:1. 第81回日本細菌学会総会(京都、3月)
4. 西内 由紀子、松本 壮吉、立石 善隆。家庭浴室由来 Mycobacterium avium complex の多型性と臨床分離株との相同性。日本細菌学会雑誌、63:1. 第81回日本細菌学会総会(京都、3月)
5. 松本 壮吉、奥山 めぐみ、尾関 百合子、内藤 真理子、西内 由紀子、藤原 永年、吉村 満美子、小林 和夫。抗酸菌における増殖と細胞壁合成の同調機構。日本細菌学会雑誌、63:1. 第81回日本細菌学会総会(京都、3月)
6. 仁木 誠、吉村満美子、和田 崇之、小林 和夫、松本 壮吉。抗酸菌の遺伝子発現および薬剤感受性における MDP1 の役割。日本細菌学会雑誌、63:1. 第81回日本細菌学会総会(京都、3月)
7. 松本 壮吉、尾関 百合子、西内 由紀子、藤原 永年、吉村 満美子、小林 和夫。Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) による増殖と細胞壁合成の同調メカニズム。結核、83:3. 第83回日本結核病学会(東京、4月)
8. 平山 幸雄、吉村 満美子、尾関 百合子、菅原 勇、青木 俊明、西内 由紀子、小林 和夫。ヒアルロン酸の結核病巣における産生と局在。結核、83:3. 第83回日本結核病学会(東京、4月)
9. 仁木 誠、吉村満美子、松本 壮吉、和田 崇之、小林 和夫。抗酸菌の薬剤感受性における MDP1 の調節機構の解析。結核、83:3. 第83回日本結核病学会(東京、4月)
10. MATSUMOTO Sohkiichi. Protection of DNA by mycobacterial DNA-binding protein 1(MDP1) by preventing the ironinduced Fenton reaction. (USA, July)
11. 松本 壮吉、尾関 百合子、吉村 満美子、藤原 永年、西内 由紀子、立石 善隆、小林 和夫。Mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) に見いだされた Ferritin-super family 蛋白質様活性。第61回日本細菌学会関西支部総会(京都、11月)
12. Suzuki Daisuke, NAGATA Toshi, MATSUMOTO Sohkiichi, KOIDE Yukiko. MDP1 タンパクのマウス T 細胞エピトープの解析/ Characterization of murine T-cell epitopes in Mycobacterial DNA-binding protein 1. 日本免疫学会雑誌 38 巻、第 38 回日本免疫学会総会(京都、12月)

G. 知的所有権の取得状況

① 特許取得

1. 出願番号:特願 2008-172640、発明者:山本法明、松本 壮吉、発明の名称:MDP1 による微生物を凝集および/または沈殿させる方法、出願人:コニカミノルタホールディングス株式会社、公立大学法人大阪市立大学、出願日:平成 20 年 7 月 1 日
2. 出願番号:特願 2008-277012、発明者:松本 壮吉、山本 法明、発明の名称:MDP1 を用いた炭水化物を有する物質の分離方法 出願人:コニカミノルタホールディングス株式会社、出願日:平成 20 年 10 月 28 日

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）
分担研究報告書

抗酸菌脂質を提示するサル CD1 抗原提示分子の解析

分担研究者 杉田 昌彦
京都大学・ウイルス研究所・教授

研究要旨

ヒトグループ 1CD1 分子 (CD1a, CD1b, CD1c) は、抗酸菌脂質を結合し T 細胞に提示する新しいタイプの抗原提示分子である。ヒト由来 T 細胞株を用いたこれまでの解析から、CD1 分子を介した免疫応答が抗酸菌制御に寄与する可能性が示唆されている。しかし、免疫研究に有用なマウスやラットはこのシステムをもたないため、個体レベルでの詳細な解析研究が遅れている。サルはヒト結核の有望なモデル動物であるが、サルにおけるグループ 1CD1 分子の存在や機能は不明である。そこでアカゲザルのグループ 1CD1 遺伝子を単離同定し、その遺伝子産物の発現や機能を明らかにする研究を展開した。得られた 3 つのサル CD1 遺伝子は、それぞれヒト *CD1A*、*CD1B*、*CD1C* 遺伝子と高い相同性を示した。さらにその遺伝子産物は、それぞれ抗ヒト CD1a 抗体、抗ヒト CD1b 抗体、抗ヒト CD1c 抗体により特異的に認識されたことから、これら 3 つの遺伝子はサルグループ 1CD1 遺伝子と結論づけた。またサル CD1b 分子は抗酸菌由来のグルコースモノミコール酸 (GMM) を結合し、ヒト GMM 特異的 CD1b 拘束性 T 細胞に抗原提示できることがわかった。以上の研究成果は、サルグループ 1CD1 システムの解明に貢献するだけでなく、脂質免疫の観点からサルがヒト結核の動物モデルとして極めて有用であることを示している。

A. 研究目的

結核防御において、タンパク質抗原を認識する MHC クラス I あるいは MHC クラス II 拘束性 T 細胞だけでなく、脂質抗原を認識するグループ 1CD1 拘束性 T 細胞が重要な働きをすると考えられる。しかし、グループ 1CD1 分子の機能を個体レベルで検証するのに適した動物モデルがまだ確立されていないため、詳細な解析が遅れている。

近年、結核やエイズなどのヒト感染症の病態解明ならびに治療薬やワクチンの開発において、サルの重要性が高く評価されている。しかしながら、サルグループ 1CD1 遺伝子の存在や核酸配列、遺伝子産物の構造や機能は、ほとんど解明され

ていない。そこで本研究は、将来の抗結核脂質ワクチンの開発も視野に入れ、サルグループ 1CD1 遺伝子を同定し、サル CD1 分子の機能を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

アカゲザルグループ 1CD1 遺伝子の単離
アカゲザル (*Macaca mulatta*) を用いた研究は、京都大学ウイルス研究所霊長類モデル研究領域の五十嵐樹彦教授の協力のもと、当該委員会の承認を得て行った。アカゲザルリンパ節より RNA を抽出し、それを鋳型とした RT-PCR 法によりサル *CD1A*、*CD1B*、*CD1C* 遺伝子を単離した。用いたプライマーの配列を下に示す。*CD1A*:

GCG GTA CCA AAT AAC ATC TGC AAA TGA C (sense), GCC TCG AGG GAG CAG ACA TGG TGA GGG C (anti-sense); *CD1B*: GCG GTA CCA GTA AGA AGT TGC ATC TCC C (sense), GCC TCG AGG GAG CAG ACA TGG TGA GGG C (anti-sense); *CD1C*: GCG GGT ACC ACC ATG CTG TTT CTG CAG TTT (sense), GCG GCG GCC GCA TTG TAC TAG GCT CCT GG (anti-sense)

得られた PCR 産物を pcDNA3.1(+)
ベクターにクローニングし、核酸配列を決定した。なおこの手順を独立して 2 回繰り返し、PCR に関連したエラーがないことを確認した。

トランスフェクション サル CD1 遺伝子を含む pcDNA3.1(+)
プラスミドをリン酸カルシウム沈殿法によりヒト上皮細胞株 HeLa およびサル上皮細胞株 LLC-MK2 にトランスフェクションし、0.5 mg/ml の G418 を含む培地で培養した。pCEP4 ベクターを用いてクローニングしたサル CD1 遺伝子をエレクトロポレーション法によりヒトリンパ芽球細胞株 T2 にトランスフェクションし、0.2 mg/ml のハイグロマイシン B を含む培地で培養した。薬剤耐性細胞を特異抗体でラベルしたのち、磁石ビーズを用いて CD1 陽性細胞をソーティングした。

フローサイトメトリー 上記のトランスフェクタントおよびサルより得た胸腺細胞における CD1 分子の発現を、BD FACSCant II を用いたフローサイトメトリーにより解析した。用いたマウスモノクローナル抗体は下記の通りである。10H3 抗ヒト CD1a 抗体、SN13 抗ヒト CD1b 抗体、M241 抗ヒト CD1c 抗体。

T 細胞トランスフェクタント刺激アッセイ T 細胞抗原受容体 (TCR) の発現を欠如したヒト T 細胞株 (J. RT3) に、抗酸菌脂質特異的 CD1a 拘束性 T 細胞株 (CD8-2)、CD1b 拘束性 T 細胞株 (LDN5)、あるいは CD1c 拘束性 T 細胞株 (CD8-1) より単離した TCR 遺伝子を発現させ、その IL-2 産生を測定することにより、サル

CD1 分子の脂質抗原提示能を検証した。抗原として *M. tuberculosis* (H37Ra 株) より抽出した総脂質あるいは *Rhodococcus equi* より精製したグルコースモノミコール酸 (GMM) を用い、抗原提示細胞として上記のサル CD1 遺伝子トランスフェクタントを使用した。

サル CD1b タンパク質の分子モデリング GMM を結合したサル CD1b 複合体の分子モデリングは、ヒト CD1b/GMM 複合体の結晶構造を参照し、ホモロジーモデリングソフトウェア PDFAMS を用いて行った。

C. 研究結果

サルのゲノム遺伝子配列ならびにヒト CD1 遺伝子の情報をもとに特異的 PCR プライマーを作製し、サルリンパ節より抽出した RNA を鋳型として RT-PCR を施行したところ、予想されたサイズ (約 1 kb) の DNA の増幅を認めた。この PCR 産物をクローニングし核酸配列を決定したところ、サル CD1a 分子、CD1b 分子、CD1c 分子はそれぞれヒト CD1a 分子、CD1b 分子、CD1c 分子と高い相同性を有することがわかった (アミノ酸レベルでそれぞれ 85.6%、94.6%、90.4%)。またドメイン内ジスルフィド結合の形成に関わるシステイン残基や N-結合型糖鎖付加アミノ酸モチーフ、また細胞内輸送を制御する細胞質ドメインアミノ酸モチーフは、サルとヒトの間で保存されていた。サル *CD1A* 遺伝子、サル *CD1B* 遺伝子、サル *CD1C* 遺伝子のタンパク質発現を検証するため、抗ヒト CD1 抗体の交差反応性を期待し、本来グループ 1CD1 分子を発現していると考えられるサル胸腺細胞を用いてフローサイトメトリーを行ったところ、10H3 抗ヒト CD1a 抗体、SN13 抗ヒト CD1b 抗体、M241 抗ヒト CD1c 抗体がサル胸腺細胞と特異的に反応することがわかった。さらに個々のサル *CD1A* 遺伝子、サル *CD1B* 遺伝子、サル *CD1C* 遺伝子を発現したトランスフェクタントを用いたフローサイトメトリーの結

果から、10H3 抗ヒト CD1a 抗体はサル *CD1A* 遺伝子産物を、SN13 抗ヒト CD1b 抗体はサル *CD1B* 遺伝子産物を、また M241 抗ヒト CD1c 抗体はサル *CD1C* 遺伝子産物を特異的に認識することが明らかとなった。以上の解析結果から、得られた遺伝子は真性のサル *CD1A* 遺伝子、サル *CD1B* 遺伝子、サル *CD1C* 遺伝子と確定し、DDBJ/GenBank/EMBL データベースに登録した（アクセッション番号はそれぞれ AB458511、AB458512、AB458513）。

上記の解析結果により、サルがヒトと酷似したグループ 1CD1 分子を発現することが明らかになった。次いで、サルグループ 1CD1 分子が抗酸菌脂質抗原の提示能を持つかどうかの検証を行った。これまでサルグループ 1CD1 拘束性 T 細胞株は樹立されていない。そこで、抗酸菌脂質をグループ 1CD1 拘束性に認識するヒト T 細胞抗原受容体を、T 細胞抗原受容体を欠如したヒト T 細胞株に再構築して応答細胞とした。その結果、少なくともサル CD1b 分子は抗酸菌由来糖脂質である GMM を結合し、特異的 T 細胞 (LDN5) に抗原提示できることが明らかとなった (BBRC 377:889, 2008)。さらに、ヒト CD1b:GMM 複合体の結晶構造をもとに、サル CD1b:GMM 複合体の分子モデリングを行ったところ、サル CD1b 分子はヒト CD1b 分子と極めてよく似た抗原結合部位の構造を有することがわかった。

これらの事実は、サルグループ 1CD1 分子ファミリーが、構造や機能の面でヒトと相同であることを示しており、サルがヒト結核における脂質免疫応答の解析に有用な動物モデルであると考えられた。

D. 考察

これまでのいかなる解析においても、グループ 1CD1 分子の動物種を超えた交差反応性は認められていない。本研究において、CD1b 分子がヒトとサルの間で交差反応性を有することが初めて明らかにな

った。CD1b 分子は抗酸菌特有の脂質であるミコール酸やミコール酸含有糖脂質を結合し T 細胞に抗原提示できる唯一の抗原提示分子であると考えられている。したがって、CD1b 分子の機能がヒトとサルの間で保存されている事実は、ヒト結核のモデルとしてサルが他の動物種には代え難い特質を有していることを示唆する。

ヒト結核患者末梢血を用いた解析や細胞株を用いた解析から、CD1a 分子や CD1c 分子もまた結核防御免疫の誘導に貢献すると想定されている。本研究においてヒトとサルの交差応答性は認めなかったが、いずれもアミノ酸レベルで高い相同性を有していること、また組織発現分布がヒトとサルの間できわめてよく似ていることから、サル CD1a 分子、サル CD1c 分子もまた機能的であると考えられる。

本研究によりサルはヒトと相同の抗酸菌脂質特異的免疫応答システムを有することが示された。サルはヒトと類似した結核病理を示す。したがって、今後抗結核脂質ワクチンの開発、有効性の検証に向けて、貴重な動物モデルとなることが期待される。

E. 結論

本研究により、抗酸菌脂質を標的としたサルグループ 1CD1 免疫システムの分子基盤が初めて解明され、今後の抗結核脂質ワクチン開発への礎が構築された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hava, D.L., N. van der Wel, N. Cohen, C.C. Dascher, D. Houben, L. Leon, S. Agarwal, M. Sugita, M. van Zon, S.C. Kent, H. Shams, P.J. Peters, and M.B. Brenner. 2008. Evasion of peptide, but not lipid antigen presentation, through pathogen-induced dendritic cell maturation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 11281-11286.

Matsunaga, I., T. Naka, R.S. Talekar, M.J. McConnell, K. Katoh, H. Nakao, A. Otsuka, S.M. Behar, I. Yano, D.B. Moody, and M. Sugita. 2008. Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 283: 28835-28841.

Matsunaga, I., T. Komori, A. Ochi, N. Mori, and M. Sugita. 2008. Identification of antibody responses to the serotype-nonspecific molecular species of glycopeptidolipids in *Mycobacterium avium* infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 165-169.

Morita, D., K. Katoh, T. Harada, Y. Nakagawa, I. Matsunaga, T. Miura, A. Adachi, T. Igarashi, and M. Sugita. 2008. Trans-species activation of human T cells by rhesus macaque CD1b molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 889-893.

Otsuka, A., I. Matsunaga, T. Komori, K. Tomita, Y. Toda, T. Manabe, Y. Miyachi, and M. Sugita. 2008. Trehalose dimycolate elicits eosinophilic skin hypersensitivity in mycobacteria-infected guinea pigs. *J. Immunol.* 181: 8528-8533.

2. 学会発表

大塚篤司、松永勇、小森崇矢、富田和沙、戸田好信、真鍋俊明、宮地良樹、杉田昌彦. 2008. Eosinophilic DTH: 脂質を標的とした新しい皮膚アレルギー応答. 第11回京都免疫ワークショップ学術集会(京都、3月).

Otsuka, A., I. Matsunaga, T. Komori, K. Tomita, Y. Toda, T. Manabe, Y. Miyachi, and M. Sugita. Eosinophilic skin reactions to glycolipids in mycobacterial infection represent a novel form of delayed-type hypersensitivity. 2008. The International Investigative Dermatology 2008. (Kyoto, Japan, 5月).

Sugita, M. Eosinophilic skin hypersensitivity to glycolipids in mycobacteria-infected guinea pigs. 2008. 43rd Tuberculosis and

Leprosy Research Conference. (Baltimore, MD, USA, 7月).

Otsuka, A. I. Matsunaga, Y. Miyachi, and M. Sugita. Eosinophilic skin reactions to glycolipids define a novel form of hypersensitivity in mycobacterial infection. 2008. 第38回日本免疫学会総会(京都、12月).

松永勇、中崇、加藤久美子、中尾瞳、大塚篤司、矢野郁也、杉田昌彦. 2008. ミコール酸転移酵素による脂質T細胞抗原の生合成. 第81回日本生化学会総会(神戸、12月).

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし