

図2. 低酸素環境における休眠結核菌蛋白質発現

*Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症の血清診断の所要時間は約3時間、簡便、迅速であった。血清抗 GPL 核 IgA 抗体価は肺 MAC 感染症において、他の疾患群（肺結核、慢性閉塞性肺疾患、特発性間質性肺炎、肺がん、細菌性肺炎、サルコイドーシスや気管支拡張症）および健常者に比し、有意に高値を示した ( $p < 0.0001$ )。血清抗 GPL 核 IgA 抗体価のカットオフ値を 0.7 U/mL に設定した場合、6 医療機関から得られた成績は感度：84.3%、特異度：100%であった（図3）。すなわち、血清診断は肺 MAC 感染症のみを検出し、無症候性 MAC 感染、肺結核、その他の肺疾患（慢性閉塞性肺疾患、特発性間質性肺炎、肺がん、細菌性肺炎、サルコイドーシス、気管支拡張症）および健常者は検出感度以下であった。

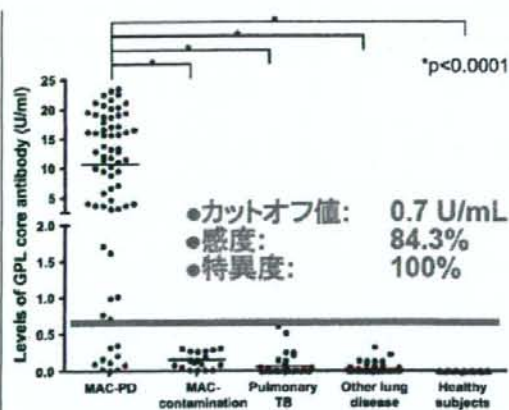


図3. 多施設共同研究による肺 MAC 感染症の血清診断：GPL 抗体価

肺 MAC 感染症のコンピューター断層撮影 (CT) 解析による病型（結節-気管支拡張型：NBE および線維空洞型：FC）と血清抗 GPL 核-IgA 抗体価の関連について解析した。結節-気管支拡張型：NBE は線維空洞型：FC に比し、有意に高値を示した ( $p < 0.05$ 、図4)。

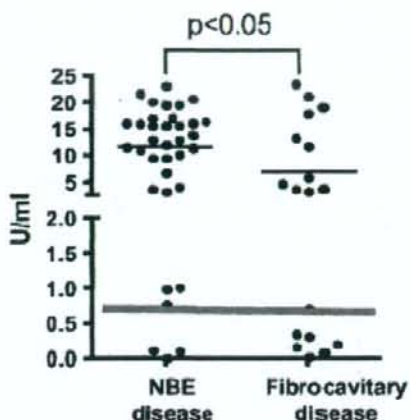


図4. 肺 MAC 感染症の病型（結節-気管支拡張型：NBE、線維空洞型：FC）と血清抗体価

#### D. 考察

潜在性結核菌感染には「結核菌」と「宿主」の要因が関与し、成立していることが考えられる。しかし、活動性結核の発病は感染者の約 10%であり、発病に対する宿主防御機構の解明は結核対策に寄与することが考えられる。さらに、潜在性結核菌感染者を早期に発見し、治療・予防介入することにより、結核の発病を未然に防止することが可能となる。現在、潜在性結核菌感染を検出する方法として1) ツベルクリン皮内反応および2) 末梢血細胞を用いた interferon-gamma 産生遊離試験 (IGRA、Quantiferon-2G) が頻用されている。1) ツベルクリン皮内反応は抗酸菌由来精製蛋白質群を診断抗原としているため、結核菌感染のみならず、非結核性抗酸菌感染や BCG 接種でも陽性となる。他方、2) 末梢血細胞を用いた interferon-gamma 産生遊離試

験 (IGRA, Quantiferon-2G) は結核菌特異的蛋白質抗原を用いているが、この特異抗原は分泌性蛋白質のため、分裂・増殖期結核菌に発現し、休眠期結核菌感染の検出には不十分である。本研究において、低酸素環境における休眠結核菌に発現する蛋白質を誘導し、さらに、分離精製することが可能となった。今後、潜在性結核菌感染や休眠期結核菌におけるこれらのタンパク質の生物学的意義、さらに、医療応用として、診断抗原、薬剤標的やワクチン候補の可能性を探索する。

多施設共同研究により、肺 MAC 感染症の診断における免疫学的血清診断に GPL 核抗原および血清 IgA 抗体の検出が有用であることが確認された。さらに、肺 MAC 感染症の CT 病型 (結節-気管支拡張型 : NBE、線維空洞型 : FC) は、結節-気管支拡張型 : NBE (中年以降の女性に好発、基礎疾患はない、緩徐に進行性) は線維空洞型 : FC (中年以降の男性に好発、基礎疾患 : 喫煙や飲酒、急速進行性) に比し、有意に高値であることも判明し、抗 GPL 核血清 IgA 抗体の検出は診断のみならず、病型分類にも有用である。アメリカ合衆国胸部疾患学会・感染症学会の診断基準 (2007) に準拠した場合、臨床所見と複数回の喀痰培養を必要とするため、肺 MAC 感染症の確定診断には数か月を要するが、抗体測定の所要時間は約 3 時間であり、迅速であり、また、手技も簡便、かつ、多検体処理が可能である。加えて、血清を用いた体外診断であるため、安全性についても問題はない。

GPL 核抗原は MAC (*Mycobacterium avium* と *M. intracellulare* 複合体、遅発育菌 : 培養で集落形成に 1 週間以上を要する)、*M. scrofulaceum*、*M. chelonae* や *M. fortuitum* に存在するが、肺 *M. scrofulaceum* 感染症は稀であること、*M. chelonae* や *M. fortuitum* は迅速発育菌のため、数日で培養結果が判明することから、GPL 核抗原を用いた血清診断は臨床的に有用性が高いと考えられる。なお、本成果 (Am. J. Respir. Crit. Care Med. 177: 793-797, 2008.) に発表した、論説 (Am. J. Respir.

Crit. Care Med. 177: 677-679, 2008.) で解説され、臨床の有用性について評価された。

#### E. 結論

・結核菌潜伏感染の分子機構、特に、菌情報に関し、低酸素環境で誘導した休眠菌から、遺伝子・蛋白質発現や精製に成功した。  
・多施設共同研究結果から、MAC 特異的 GPL 核を抗原に用いた血清 IgA の検出は迅速  
・簡便な血清診断 (感度 : 84.3%、特異度 : 100%) として有用であった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kitada, S., K. Kobayashi, S. Ichiyama, S. Takakura, M. Sakatani, K. Suzuki, T. Takashima, T. Nagai, I. Sakurabayashi, M. Ito, and R. Maekura. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 177: 793-797, 2008.
- 2) Nakata, N., N. Fujiwara, T. Naka, I. Yano, K. Kobayashi, and S. Maeda. 2008. Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure on glycopeptidolipids of *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol. 190: 1064-1071, 2008.
- 3) 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. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol. 190: 3613-3621, 2008.
- 4) 小林和夫. 再興した感染症「結核」の診断・治療・予防法. Biophilia 4: 30-34, 2008.

- 5) 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 52 : 1149-1153、2008.
- 6) 大原直也、小林和夫、結核菌. パイオセーフティの辞典. 病原微生物とハザード対策の実際 (バイオメディカルサイエンス研究会 編) 東京: みみずく舎. 194-197、2008.
2. 学会発表
- 1) ワクチン研究の現状と将来 (ミニシンポジウム). 小林和夫、菅原 勇. 第83回日本結核病学会総会 2008年4月 東京.
- 2) 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. 松本壮吉、藤原永年、吉村満美子、尾関百合子、西内由紀子、小林和夫. 第83回日本結核病学会総会 2008年4月 東京.
- 3) ヒアルロン酸の結核病巣における産生と局在. 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. 第83回日本結核病学会総会 2008年4月 東京.
- 4) 抗酸菌の薬剤感受性における MDP1 の調節機構の解析. 仁木 誠、松本壮吉、和田崇之、小林和夫. 第83回日本結核病学会総会 2008年4月 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
  2. 実用新案登録 なし
  3. その他 なし

平成20年度 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

新規 BCG ワクチンの開発

分担研究報告書

研究分担者

牧野 正彦

（国立感染症研究所・病原微生物部部長）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

新規 BCG ワクチンの開発

研究分担者 牧野 正彦（国立感染症研究所・病原微生物部・部長）

研究要旨

弱毒化牛型結核菌 *Mycobacterium bovis* BCG に改良を加え、病原性抗酸菌症の発症を予防し得る新規リコンビナント BCG の作製を目的とした。病原性抗酸菌の増殖を抑制する宿主側主因子は、タイプ 1 CD4 陽性 T 細胞とタイプ 1 CD8 陽性 T 細胞であるため、両者を強く活性化することが可能な BCG を作製することが極めて重要である。そこで、BCG 菌由来の heat shock protein (HSP) 70 とらい菌由来の Major Membrane Protein (MMP)-II の融合タンパクを分泌する BCG (BCG-70M) を作製した。BCG-70M は、HSP70-MMP-II 融合タンパクを菌体外へ分泌し、分泌された融合タンパクは Toll-like receptor 2 (TLR2) を介して樹状細胞 (DC) を活性化し、IL-12p70 の産生を誘導した。BCG-70M 感染 DC は従来の BCG に比し、顕著に強くナイーブタイプおよびメモリータイプの CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を活性化し、大量の IFN- $\gamma$  の産生を誘導した。これらの T 細胞の活性化は、DC 表面上の MHC および CD86 抗原に依存していた。未感染未熟 DC をクロロキニンで処理すると、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の活性化は抑制され、また、DC を brefeldin A や lactacystin で前処理した後 BCG-70M を感染させると、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化は強く抑制された。したがって、CD4 陽性 T 細胞の活性化には、分泌された HSP70-MMP-II 融合タンパクが強く関与し、CD8 陽性 T 細胞は、この融合タンパクが TAP および proteasome 依存性に cytosolic pathway を通じた cross-presentation 機構により活性化されたことが明らかになった。BCG-70M は、両 T 細胞サブセットを活性化するため、CD8 陽性 T 細胞を CD4 陽性 T 細胞存在下で BCG-70M で刺激すると、CD8 陽性 T 細胞は効率良く CD62L 抗原の発現を抑制し、さらに、細胞内にパーフォリンを産生した。さらに、BCG-70M を C57BL/6 マウス皮内に接種すると、MMP-II 反応性のタイプ 1 CD4 陽性メモリー T 細胞および CD8 陽性メモリー T 細胞が産生された。したがって、BCG-70M は、DC および T 細胞を強く活性化することが可能であり、HSP70 と病原性抗酸菌主要抗原である MMP-II の融合タンパクを分泌させることは、生体防御反応を惹起する上で極めて有効な方法であると考えられた。

A. 研究目的

代表的病原性抗酸菌は結核菌とらい菌である。らい菌の感染によって誘導されるハンセン病は、少菌型と多菌型に大別されるが、少菌型ハンセン病では細胞性免疫が活性化され、そのためにらい菌の分散および

病変の拡大は抑制される。したがって、ハンセン病は病原性抗酸菌症に対するワクチン開発を遂行する上で良いモデルとして考えられてきている。細胞性免疫反応においては、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞が中心となって営まれる獲得免疫が中心

的役割を果たす。CD4 陽性 T 細胞は抗酸菌感染初期に働き、抗酸菌の増殖を抑制する上で重要な役割を果たす。CD8 陽性 T 細胞は慢性期に働き、抗酸菌が再燃した場合これを殺戮する上で重要となる。したがって、ワクチンは両サブセットのメモリー細胞を作製するために用いられる。これまで抗酸菌に対するワクチンとして BCG が使われてきたが、その有効性は極めて部分的であって、現在では信頼し得るワクチンとして汎用されるには至っていない。BCG に改良を加え、より有効なワクチンを作製することが急務となっている。BCG がワクチンとして不十分な原因は、BCG が十分に T 細胞を活性化し得ないことにある。BCG が T 細胞を活性化し得ない最大の原因は、BCG が抗酸菌であり、抗酸菌特有の欠点を有していることにある。種々の欠点が知られているが、最大の欠点は、BCG が細胞内とりわけ抗原提示細胞に感染すると、ファゴゾームを形成しライソゾームとの融合を阻止することにある。そこで、この欠点を凌駕するために、BCG が細胞に感染した際細胞内でらい菌の主要抗原の一つである MMP-II を分泌するリコンビナント BCG (BCG-SM) を作製した。BCG-SM は CD4 陽性 T 細胞を現行の BCG より強く活性化し、同時に現行の BCG では活性化できないナイーブ CD8 陽性 T 細胞をも活性化した。そこで、マウスを用い、BCG-SM をワクチンとして用い、らい菌の増殖を抑制し得るか検索したところ、現行の BCG よりは有効であったが、100%抑制するには至らなかった。そこで、より強く CD4 陽性 T 細胞も CD8 陽性 T 細胞も活性化する BCG の作製を目指して、新しいリコンビナント BCG の作製を試みた。本目的のためには、免疫活性化作用を有することが知られる HSP70 を利用することが有効と考え、HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌する BCG (BCG-70M) を作製し、その有効性を評価することを目的とした。

## B. 研究方法

らい菌由来 MMP-II 遺伝子に BCG 由来の HSP-70 遺伝子を結合させ、BCG (Tokyo 株)

に遺伝子導入しリコンビナント BCG (BCG-70M) を作製した。正常健康人末梢血より、CD3 モノクローナル抗体付着ダイナビーズを用い T 細胞を除去した後、プラスチック付着性単球を得て樹状細胞のプレカーサーとして用いた。単球に対して、リコンビナント (r) GM-CSF 50ng/ml および rIL-4 (10ng/ml) を添加して 4 日間培養することで、未熟樹状細胞を分化誘導した。この未熟樹状細胞に対して、リコンビナント BCG あるいはベクターコントロール BCG (BCG-261H) を感染させ、GM-CSF および IL-4 存在下で、さらに 2 日間培養することで成熟樹状細胞を得た。BCG 感染樹状細胞の T 細胞活性化能は、BCG 感染樹状細胞をマイトマイシン C 処理した後、自己の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞と 4 日間混合培養し、T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  および IL-2 を ELISA 法で測定して評価した。T 細胞は、CD4 モノクローナル抗体あるいは CD8 モノクローナル抗体付着ダイナビーズを用いて精製し、ナイーブ T 細胞分画は、これら T 細胞から CD45RO 陽性 T 細胞を除去して得た。CD45RO 抗体は市販の抗体を用い、さらに抗マウス IgG 抗体ダイナビーズ抗体 (市販) を用いて精製した。IFN- $\gamma$  および IL-2 の ELISA は、市販のキットを用いて測定した。樹状細胞から産生される各種サイトカインも市販のキットを用いて ELISA 法で測定した。BCG 感染樹状細胞における T 細胞活性化の抗原特異性は、樹状細胞を抗 MHC 抗原抗体および抗 CD86 抗体で処理することで T 細胞の活性化の減弱の有無で評価した。樹状細胞表面の抗原の発現程度は、FACSCalibur を用いて行った。抗体は市販の抗体を用いた。BCG-70M 感染 DC による T 細胞活性化機構を探索する目的で、DC を市販の Chloroquine、Brefeldin A、Lactacystin で処理し、T 細胞の活性化抑制能を T 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生量により評価した。さらに、BCG-70M のメモリー T 細胞産生能を測定する目的で、C57BL/6 マウスに BCG-70M およびベクターコントロール BCG (BCG-261H) を皮内接種し、4 週間後に脾臓を摘出し、脾中 CD4 陽性 T 細胞および

CD8 陽性 T 細胞を *in vitro* で MMP-II タンパクで刺激した際に、T 細胞内に IFN- $\gamma$  を産生している細胞を FACSCalibur を用いて測定した。

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

### C. 研究結果

BCG-70M を *in vitro* で培養し、その培養上清を濃縮した後、MMP-II に対するモノクローナル抗体を用いて精製した。精製したタンパクを MMP-II および HSP70 に対するモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロット法で検索すると、両抗体と反応する 90 kDa バンドが検出された。したがって、BCG-70M は HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌することが明らかになった。そこで、精製した HSP70-MMP-II 融合タンパクで DC を刺激すると、DC から IL-12p70 が産生され、DC を予め TLR2 に対する antagonistic 抗体で処理しておく、DC からの IL-12p70 の産生は強く抑制された。したがって、本融合タンパクは DC 表面の TLR2 に結合して、IL-12p70 の産生を誘導することが明らかになった。BCG-70M により T 細胞を活性化するためには、BCG-70M は DC を活性化する能力を有する必要がある。そこで、BCG-70M で DC を刺激すると、ベクターコントロール BCG (BCG-261H) に比し、強く HLA-ABC、HLA-DR、CD86 および CD83 抗原の発現程度を増強させた。同時に BCG-70M は、DC から IL-12p70、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などのサイトカイン産生を誘導した。したがって、BCG-70M は BCG-261H に比し強く DC を活性化した。そこで BCG-70M 感染 DC を用い、自己のメモリータ

イプおよびナイーブ CD4 陽性 T 細胞を刺激したところ、これらの T 細胞は強く活性化され IFN- $\gamma$  を産生した。BCG-70M による CD4 陽性 T 細胞の活性化機構を検索するため、BCG-70M 感染 DC 表面の HLA-DR および CD86 抗原の発現を抗体を用いてマスクすると T 細胞の活性化は抑制され、同時に DC を Chloroquine 処理しても T 細胞の活性化は抑制された。自己の CD8 陽性 T 細胞を Responder として用いた場合も全く同様の現象が観察された。このことは、CD4 陽性 T 細胞も CD8 陽性 T 細胞も BCG-70M が分泌した融合タンパクにより抗原特異的に活性化されていることを示唆している。細菌感染した DC による CD8 陽性 T 細胞の活性化には、クロスプレゼンテーション機構が関与していることが知られている。また、本機構には種々細胞内器官が関与していることも知られている。そこで、BCG-70M による CD8 陽性 T 細胞の活性化機構を詳細に検索する目的で、DC を Brefeldin A あるいは Lactacystin で処理した後 BCG-70M を感染させ、T 細胞の活性化にこれらの薬剤が及ぼす影響を検討した。その結果、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化は、Brefeldin A を用いても Lactacystin を用いても抑制された。したがって、BCG-70M による CD8 陽性 T 細胞の活性化は、TAP および Proteasome に依存した Cytosolic pathway によるものであることが判明した。BCG-70M は CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の両者を活性化したことから、CD8 陽性 T 細胞を CD4 陽性 T 細胞存在下で刺激したところ、CD8 陽性 T 細胞は CD62L 抗原の発現を抑制し、同時に細胞内にパーフォリンを産生した。BCG-70M がメモリー T 細胞を産生し得るか検討するため、C57BL/6 マウスに BCG-70M を皮内接種したところ、4 週間後に MMP-II に反応して大量の IFN- $\gamma$  を産生する T 細胞が産生された。IFN- $\gamma$  を産生する T 細胞を同定するため、細胞内 IFN- $\gamma$  を測定すると CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の両者が MMP-II に反応して IFN- $\gamma$  を産生していた。したがって、BCG-70M は、両サブセットのメモリー T 細胞を産生することが判明した。

#### D. 考察

病原性抗酸菌に対する生体防御反応は、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の両者により営まれている。したがって、ワクチンもまた両タイプ T 細胞を強く活性化し、メモリー T 細胞を産生する能力が求められている。これまで用いられてきた BCG は、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化する能力は有するものの、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化する能力は有していない。このことは、BCG は抗原提示細胞内でファゴゾームを形成しライソゾームとの融合を阻止するため、BCG 由来の抗原が細胞表面に発現されず、また BCG の菌体成分が細胞質に放出されないために、CD8 陽性 T 細胞の活性化に必須の Cross-presentation 機構が活性化されないことに起因している。このことを凌駕するため、これまでにらい菌の主要抗原である MMP-II を菌体外へ分泌するリコンビナント BCG (BCG-SM) を作製し、そのワクチン効果を評価してきた。BCG-SM は現行の BCG に比し、有意に強くない菌の生体内増殖を抑制したものの完全抑制を果たすまでには至らず、より強く CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を活性化し得る新たな BCG の作製が求められてきた。本年度は、両 T 細胞をアジュバント的に強く活性化作用を有する HSP70 に着目し、菌体外に HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌するリコンビナント BCG (BCG-70M) を作製した。BCG-70M は期待した通り非常に強くナイーブ T 細胞 (CD4 陽性と CD8 陽性) を活性化し、MMP-II あるいはリコール抗原に反応するメモリー T 細胞を産生した。さらに、BCG-SM は MMP-II のみに反応する T 細胞がより大量に作製されていたのに対し、BCG-70M は種々の BCG-70M 由来抗原に反応する T 細胞がポリクローナルに産生する可能性が高い。このことは、ワクチン接種を受けるヒトの主要組織適合抗原の多様性を考えれば重要なことと考えられる。HSP70 は免疫担当細胞を活性化するばかりか、分泌能を併せ有している。そのため、HSP70 と MMP-II が融合した型で分泌され、それが

故により強く DC および T 細胞を活性化し得るものと推定される。HSP70・MMP-II・BCG を組み合わせたワクチンはこれまでに作製されておらず、今後 BCG-70M のワクチン効果を早急に検討したい。

#### E. 結論

HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌する新しいリコンビナント BCG は、樹状細胞および T 細胞を強く活性化し、生体内でメモリー T 細胞を効率良く作製した。HSP70 と病原性抗酸菌主要抗原の組み合わせは、ナイーブ T 細胞の活性化を誘導する上で有用な手段と考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. CD4<sup>+</sup> 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) 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. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol., 190:3613-3621, 2008.
- 3) Kai, M., N. P. N. Ha, H. T. T. Huong, N. H. An, Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, T. Fujiwara, N. T. Tan, and M. Makino. Serological diagnosis of leprosy in patients in Vietnamese by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein-II. Clin. Vaccine Immunol., 15:1755-1759, 2008.
- 4) Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, M.



Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. *Mycobacterium avium* complex *gtfTB* gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid. *J. Bacteriol.*, 190:7918-7924, 2008.

- 5) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophages. *Jpn. J. leprosy*, in press, 2009.
- 6) 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.*, in press, 2009.

## 2. 学会発表

- 1) CD4<sup>+</sup> T cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant BCG. Makino, M., T. Mukai, Y. Maeda, Y. Miyamoto, and T. Tamura. 43<sup>rd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
- 2) Construction of *ureC*-disrupted BCG which expressing *M. leprae* MMP II antigen. Mukai, T., Y. Miyamoto, and M. Makino. 43<sup>rd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
- 3) *Mycobacterium avium* complex serovar 8. Miyamoto, Y., T. Mukai, Y. Maeda, and M. Makino. 43<sup>rd</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Baltimore, Maryland, USA, July 8-10, 2008.
- 4) Genetic analysis of the glycosylation pathway of

glycopeptidolipids in *Mycobacterium intracellulare* serotype 16 and serotype 17. Maeda, S., N. Nakata, I. Yano, M. Makino, and N. Fujiwara. ASM Meeting, June, 2008, Boston, USA.

- 5) The three different methyltransferase genes determine the divergence between *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and 12. Nakata, N., N. Fujiwara, S. Maeda, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. ASM Meeting, June, 2008, Boston, USA.
- 6) Structure and biosynthesis gene cluster of an antigenic serotype 16 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, K. Kobayashi, M. Makino, and S. Maeda. ASM Meeting, June, 2008, Boston, USA.
- 7) Vaccines for mycobacterial diseases. Makino, M. The fifth Taiwan-Japan symposium on International Collaboration and TB. September 11-13, 2008, Taipei, Taiwan.
- 8) *Mycobacterium intracellulare* 由来血清型7、12型 glycopeptidolipid 糖鎖合成遺伝子の機能解析. 藤原永年, 中田 登, 前田伸司, 中 崇, 水野淨子, 牧野正彦, 松本壮吉, 矢野郁也. 第81回日本細菌学会総会 2008年3月 京都
- 9) *Mycobacterium intracellulare* 血清型12の glycopeptidolipid 生合成遺伝子領域の解析. 中田 登, 藤原永年, 前田伸司, 中 崇, 矢野郁也, 小林和夫, 牧野正彦. 第81回日本細菌学会総会 2008年3月 京都
- 10) *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
- 11) クロファジンにより誘導されるマ  
クロファージの細胞死と caspase 等  
細胞内情報伝達分子の動態. 福富康夫,  
前田百美, 牧野正彦. 第 81 回日本細  
菌学会総会 2008 年 3 月 京都
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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, 和泉眞蔵,  
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
- 16) ヒトマクロファージ内におけるらい  
菌の生存機構. 福富康夫, 前田百美,  
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
- 17) *Mycobacterium intracellulare*  
serotype13 由来新規特異糖ペプチド  
脂質の糖鎖構造と生合成. 水野淨子,  
中 崇, 中田 登, 前田伸司, 合田麗  
奈, 小林貴美子, 牧野正彦, 藤原永年.  
日本生化学・日本分子生物学会合同  
年会 2008 年
- 18) らい菌感染ヒトマクロファージの  
IFN- $\gamma$  刺激による phox 発現. 福富康  
夫, 牧野正彦. 第 38 回日本免疫学会  
総会 2008 年 12 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

平成20年度 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

新規ワクチン開発のための基礎研究

－長期生存型 CD8 記憶細胞の分化誘導機序の解析－

分担研究報告書

研究分担者

田村 敏生

（国立感染症研究所・病原微生物部室長）

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

新規ワクチン開発のための基礎研究  
-長期生存型 CD8 記憶細胞の分化誘導機序の解析-

研究分担者 田村 敏生（国立感染症研究所・病原微生物部・室長）  
研究協力者 下袴田 陽子（国立感染症研究所・病原微生物部・客員研究員）

研究要旨.

ワクチンの目的は主に獲得免疫を惹起し、最終的には長期生存型細胞障害性 CD8 記憶細胞を効果的に誘導することである。この長期生存型細胞障害性 CD8 記憶細胞の分化誘導はナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞が最初に抗原感作を受ける時点で決定され、その際に CD4<sup>+</sup> T 細胞による 'Help' が必須であることが示されているが、その機序については未だ明らかではない。本研究では、我々が見出した Th1 分化を選択的に誘導するペプチド：Peptide-25（結核菌分泌タンパク Ag85B 由来）を用いて、ナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞から細胞障害性 T 細胞への分化誘導における CD4<sup>+</sup> T 細胞の 'Help' 機能を明らかにすることで、新たな結核ワクチンの開発戦略を得ることを研究目的とした。

本年度は、(1) Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導は T 細胞抗原受容体からの活性化シグナルで誘導される T-bet とは異なる転写調節因子が重要な役割を果たしていること、(2) CD8<sup>+</sup> T 細胞に対しグランザイム B の発現を伴う機能的活性化を誘導する抗原提示細胞の活性化には Th1 型免疫応答の制御に重要な役割を果たしている IFN- $\gamma$ 、IL-12、CD40-CD40 リガンド相互作用以外の Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と抗原提示細胞の相互作用が重要な役割を果たしていること、(3) Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用で活性化した抗原提示細胞との相互作用によって誘導される CD8<sup>+</sup> T 細胞のグランザイム B の発現には CD8<sup>+</sup> T 細胞上の Notch2 と抗原提示細胞上の Notch リガンドである Delta-like1 (DL1) との相互作用は必須ではないことを明らかにした。

A. 研究目的

ワクチンの目的は主に獲得免疫を惹起し、結果として長期生存型細胞障害性 CD8 記憶細胞を効果的に誘導することである。

この長期生存型 CD8 記憶細胞はエフェクター細胞障害性 CD8 細胞からさらに分化すると考えられているが、この分化はナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞が最初に抗原提示細胞より抗原の情報を受け取る時点で決定される。この決定には CD4<sup>+</sup> T 細胞の存在が不可欠であり、CD4<sup>+</sup> T 細胞の 'Help' が存在しない場合には CD8 記憶細胞の分化が誘導されないことが報告されている。一旦分化した CD8

記憶細胞の維持に関しては IL-15 などのサイトカインが重要な役割を果たしていることが報告されているが、CD4<sup>+</sup> T 細胞による 'Help' の機序に関しては未だ明らかではない。

昨年度までに我々が見出した Th1 分化を選択的に誘導するペプチド：Peptide-25（結核菌分泌タンパク Ag85B 由来（アミノ酸配列：FQDAYNAAGGHNAVF））と我々が作出した Peptide-25 特異的 T 細胞抗原受容体 (TCR) を発現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、① Peptide-25 は T-bet を欠損したナイーブ

CD4<sup>+</sup> T 細胞に対しても *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、②Peptide-25 を介した Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用によって活性化した抗原提示細胞のみが CD8<sup>+</sup> T 細胞にグランザイム B の発現を伴う機能的活性化を誘導できることを明らかにした。

本年度は①Peptide-25 刺激で誘導される T-bet とは異なる Th1 分化誘導を制御する分子機構、②CD8<sup>+</sup> T 細胞に対し機能的活性化を誘導する抗原提示細胞の活性化を誘導する Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と抗原提示細胞間相互作用の分子機構③グランザイム B の発現を制御する活性化抗原提示細胞と CD8<sup>+</sup> T 細胞間相互作用の分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 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 IMag システム (BD Bioscience)、FACS Aria (Beckton Dickinson) を用いて CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup> ナイプ CD4<sup>+</sup> T 細胞を精製した。抗原提示細胞として I-A<sup>b</sup> 分子を遺伝子導入した Chinese hamster ovary 細胞 (I-A<sup>b</sup>-CHO) を用いた。ナイプ CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 を取り込ませた I-A<sup>b</sup>-CHO と共培養し、3 時間後、6 時間後に CD4<sup>+</sup> T 細胞の mRNA を調製し、Affymetrix 社の GeneChip® Expresson 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<sup>+</sup> T 細胞または T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> 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、レトロウイルス発現ベクター 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-ナイプ CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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。

### (4) *in vitro* における細胞障害性 CD8 細胞の誘導及び活性の評価

P25 TCR-Tg 脾臓細胞より IMag システムを用い、CD4<sup>+</sup> T 細胞を調製した。OVA 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス (OT-1: C57BL/6 バックグランド) 脾臓細胞より IMag システムを用い CD8<sup>+</sup> T 細胞を調製した。C57BL/6 マウス脾臓細胞より IMag システムを用いて樹状細胞を調製し、抗原提示細胞として用いた。

P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞と Peptide-25 または TCR に対して低親和性の Peptide-25 変異体 APL:G248A (FQDAYNAAAGHNAV) が共存する条件で樹状細胞に OVA を取り込ませた。培養 1 日後、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞及び余剰の抗原を取り除き、OT-1-CD8<sup>+</sup> T 細胞と培養した。培養 3 日後の OT-1-CD8<sup>+</sup> T 細胞の細胞分裂回数及びグランザイム B 産生を指標に細胞障害性 CD8 細胞の活性化を評価した。また、Peptide-25 または APL と共培養した後の樹状細胞における Notch リガンド (L): Delta-like 1 (DL1) の発現量は Real-Time PCR 法を用いて定量した mRNA 量にて評価した。

### 倫理面への配慮

実験に供したマウスは国立感染症の動物

実験指針に基づき行った。

### 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<sup>+</sup> 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- $\gamma$*  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<sup>+</sup> T 細胞及び T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> 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- $\gamma$*  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<sup>+</sup> T 細胞及び T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T 細胞に導入するためにレトロウイルス発現ベクター pMY-IRES-GFP に組み込んだ。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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- $\gamma$*  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- $\gamma$*  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- $\gamma$*  遺伝子座のクロマチンリモデリングが誘導された。

#### (2) CD8<sup>+</sup> T 細胞に対し機能的活性化を誘導する樹状細胞の活性化を制御する CD4<sup>+</sup> T 細胞-樹状細胞間相互作用の解析

我々は①フロイント不完全アジュバントに懸濁した Peptide-25 と OVA または APL と OVA を C57BL/6 マウス腹部皮下に免疫し、*in vivo* における OVA 特異的細胞障害性 CD8 細胞の活性化を評価した結果、Peptide-25 と OVA を共免疫すると OVA 特異的細胞障害性 CD8 細胞の活性が OVA 単独免疫に比べ増強するのに対し、APL と OVA の共免疫では OVA 特異的細胞障害性 CD8 細胞の活性の増強は見られないこと、②樹状細胞の活性化における Peptide-25 または APL を介した樹状細胞と P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用の役割を *in vitro* にて解析した結果、APL と共培養した樹状細胞では CD8<sup>+</sup> T 細胞の分裂増殖は誘導できるがグランザイム B の発現は誘導できないこと、一方 Peptide-25 と共培養した樹状細胞では CD8<sup>+</sup> T 細胞の分裂増殖、グランザイム B の発現を誘導できることを明らかにしている。そこで、グランザイム B の発現を誘導する樹

状細胞の活性化を誘導する Peptide-25 を介した Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞間相互作用の分子機構の解析を行った。Peptide-25 と共培養した場合には CD4<sup>+</sup> T 細胞からは顕著に IFN- $\gamma$  の産生が誘導されるのに対し、APL と共培養した場合には IFN- $\gamma$  の産生はほとんど誘導されない。そこで、Peptide-25 と共培養する際には IFN- $\gamma$  の中和抗体を、APL と共培養する際にはリコンビナント IFN- $\gamma$  を添加し、樹状細胞の活性化における IFN- $\gamma$  の役割を検討した。その結果、いずれの場合も加えない場合と比べ変化が全く見られなかった。次に、Peptide-25 または APL と共培養した樹状細胞上の表面分子の発現を比較検討した。その結果、CD40、CD54、CD80、CD86、H-2K<sup>b</sup>、I-A<sup>b</sup> の発現には差は見られなかった。一方 CD4<sup>+</sup> T 細胞上の CD40L の発現は APL に比べ Peptide-25 と共培養した場合の方が有意に高かった。そこで、Peptide-25 と共培養する際には CD40-CD40L 相互作用を阻害する抗体を、APL と共培養する際にはリコンビナント CD40L を添加し、CD40-CD40L 相互作用の役割を検討した。その結果、Peptide-25 と共培養する際に阻害抗体を加えても全く影響を受けなかった。一方、APL と共培養する際にリコンビナント CD40L を添加すると IL-12 の産生は亢進したが、グランザイム B の発現は誘導できなかった。

### (3) CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的活性化を誘導する

#### CD8<sup>+</sup> T 細胞-樹状細胞間相互作用の解析

CD8<sup>+</sup> T 細胞上の Notch2 と樹状細胞上の DL1 との相互作用が CD8<sup>+</sup> T 細胞のグランザイム B の発現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。そこで、P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞と Peptide-25 または APL と共培養した樹状細胞における DL1 の発現量を Real-Time PCR 法にて定量した DL-1 mRNA 量にて評価した。その結果、Peptide-25、APL いずれの場合も樹状細胞に発現する DL1 mRNA 量は刺激前に比べ低下していた。

## D. 考察

### (1) Th1 分化を誘導する転写調節因子に関して

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 *ifn- $\gamma$*  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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T 細胞でも、Peptide-25 刺激で IL-12 レセプター  $\beta$ 2 鎖の発現が IL-12、IFN- $\gamma$  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  $\beta$ 2 鎖、GATA-3 の発現変化を今後解析して行く予定である。

### (2) CD8<sup>+</sup> T 細胞に対し機能的活性化を誘導する樹状細胞の活性化を制御する CD4<sup>+</sup> T 細胞-樹状細胞間相互作用に関して

P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞と Peptide-25 または APL と共培養した樹状細胞はいずれの場合も CD8<sup>+</sup> T 細胞の分裂増殖を同程度に誘導できることから、樹状細胞に提示されている MHC クラス 1 抗原量はほぼ等しいと考えられる。したがって、Peptide-25 と APL 間におけるグランザイム B の発現誘導の差は樹状細胞上の MHC クラス 1 抗原量によるものではない。

Peptide-25 を介した P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T

細胞と樹状細胞の相互作用によって Th1 分化に重要な役割を果たす IFN- $\gamma$ 、IL-12 が産生され、さらに CD40L の発現が誘導される。一方、APL を介した相互作用では IFN- $\gamma$ 、IL-12 産生は誘導されず、CD40L の発現量も Peptide-25 に比べ半減していた。これら Th1 分化に重要な役割を果たしている分子が樹状細胞の活性化に関与している可能性を考え、リコンビナントタンパクや中和抗体を添加し、その影響を検討した。その結果、いずれの場合もリコンビナントタンパクや中和抗体を加えても影響を受けなかったことから、CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的活性化を誘導する樹状細胞の活性化には IFN- $\gamma$ 、IL-12、CD40-CD40L 相互作用は必須ではないことが明らかとなった。今後、トランスウェル培養システムを用い、グランザイム B の発現を誘導する樹状細胞の活性化に Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞間相互作用によって誘導されるサイトカインが重要なのか、直接相互作用が重要なのか検討して行く予定である。

(3) CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的活性化を誘導する CD8<sup>+</sup> T 細胞-樹状細胞間相互作用に関して

CD8<sup>+</sup> T 細胞のグランザイム B の発現が T 細胞上の Notch2 と樹状細胞上の DL1 によって調節されていることが報告されている。そこで、Peptide-25 または APL と共培養した樹状細胞上の DL1 の発現を比較検討した。現在 DL1 に対する抗体が入手不可であるため、DL1 の発現量は DL1 mRNA 量を Real-Time PCR 法にて定量した。報告では DL1 は不活性化型樹状細胞に既に発現しており、TLR を介した活性化によってその発現が上昇することが示されている。しかしながら、Peptide-25、APL いずれの場合も DL1 mRNA 量は刺激前に比べ、刺激後経時的に減少した。この結果から、CD4<sup>+</sup> T 細胞を介した活性化樹状細胞によるグランザイム B の発現誘導には Notch2-DL1 の関与は極めて低いことが示唆された。今後、CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能的活性化を誘導する CD8<sup>+</sup> T 細胞-樹状細胞間相互作用に関して DNA マイクロアレイ法を用いた発現遺伝子の網羅的解析を行な

う予定である。

## E. 結論

(1) Peptide-25 による選択的 Th1 分化誘導は TCR からの活性化シグナルで誘導される T-bet とは異なる転写調節因子が重要な役割を果たしている。

(2) CD8<sup>+</sup> T 細胞に対しグランザイム B の発現を伴う機能的活性化を誘導する抗原提示細胞への活性化には Th1 型免疫応答の制御に重要な役割を果たしている IFN- $\gamma$ 、IL-12、CD40-CD40L 相互作用以外の Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と抗原提示細胞の相互作用が重要な役割を果たしている。

(3) Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞との相互作用で活性化した抗原提示細胞との相互作用によって誘導される CD8<sup>+</sup> T 細胞のグランザイム B の発現には CD8<sup>+</sup> T 細胞上の Notch2 と抗原提示細胞上の DL1 との相互作用は必須ではない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, Y. Miyamoto, and M. Makino. CD4<sup>+</sup> 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ソ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 |

平成20年度 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

ワクチンの検定と結核を増悪させる病態の解析

分担研究報告書

研究分担者

菅原 勇

（結核予防会結核研究所・抗酸菌レファレンスセンター長）

ワクチンの検定と結核を増悪させる病態の解析

研究分担者 菅原 勇（結核予防会結核研究所・研究主幹）

研究要旨

1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型糖尿病ラットは、野生ラットに比べて、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。この記載が、正しいかを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) でエアロゾル感染させた。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、ネンブタールで、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- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  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  $\mu$ l のウサギインスリンを朝晩皮下注射した。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 週後出現したコロニー数を求めた。

(6) 1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、ネン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。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。糖尿病ラットの肺組織の IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  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。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。糖尿病ラットは感染後 49 日までにしてすべて死んだが、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、グルコースの粘性によるものと考えられた。(6) 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 型糖尿病ラット由来肺胞マクロファージは、25  $\mu$ M の NO を産生したが、野生ラット由来肺胞マクロファージは、65  $\mu$ M を産生し有意差が認められた。

### D. 考察

今回使用した 1 型糖尿病ラットは、Komeda らが 1998 年に LETL rat から分離、樹立したものである。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。この 1 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ので、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 (図 1)。

菅原らは、2004 年に、2 型糖尿病ラットモデルである Goto-Kakizaki ラットを用いて、同様な所見を得て報告している。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、結核にかかるると悪化しやすい。