

200904002A

平成 21 年度

地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）

厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究(国際医学協力研究)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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦

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

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業
(国際医学協力研究事業)

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 牧野 正彦
(国立感染症研究所・感染制御部部長)

平成22(2010)年3月

目 次

総括研究報告書：抗酸菌感染症への国際的学術貢献を目指した基盤研究 牧野 正彦（国立感染症研究所）	1
分担研究報告書：抗酸菌に対する生体防御反応賦活法の開発及び総括 牧野 正彦（国立感染症研究所）	7
結核菌が宿主に及ぼす影響 菅原 勇（結核研究所）	13
抗酸菌の病原性と免疫誘導機構 光山正雄（京都大学）	17
抗酸菌感染における免疫防御誘導機構 吉開泰信（九州大学）	23
抗酸菌感染症と神経障害 後藤正道（国立療養所星塚敬愛園）	27
結核菌の分子遺伝学 谷口初美（産業医科大学）	31
非結核性抗酸菌の感染・発病に関する基礎的研究 後藤義孝（宮崎大学）	35
抗酸菌症に対する予防、診断、治療に関する細菌学的・免疫学的な基礎研究 瀧井猛将（名古屋市立大学）	39
宿主への侵入および宿主内生存に関わる抗酸菌の分子と宿主要因に関する研究 大原直也（岡山大学）	45
結核菌・非結核性抗酸菌の遺伝的多様性とその進化・疫学・臨床的意義の解明 岩本朋忠（神戸市環境保健研究所）	51
ハンセン病におけるマクロファージの機能解析 福富康夫（国立感染症研究所）	55
新規結核ワクチンの開発と応用 岡田全司（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター）	61
結核菌によるファゴリソソーム形成阻害過程の研究 小出幸夫（浜松医科大学）	67

薬剤耐性結核菌の迅速検出法	
鈴木定彦（北海道大学）	71
ゲノム疫学の創出を目的とした結核菌の遺伝的多様性解析	
長谷 篤（大阪市立環境科学研究所）	75
自然免疫系による結核感染防御機構の解析	
竹田 潔（大阪大学）	79
抗酸菌症発症の宿主要因解明のための研究	
慶長直人（国立国際医療センター研究所）	81
抗酸菌感染症の予防・診断に関する研究	
向井 徹（国立感染症研究所）	85
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	
田村敏生（国立感染症研究所）	91
結核疫学解析、結核の臨床研究	
松本智成（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター） ..	95
結核病態に関する分子生物学的研究	
松本壮吉（大阪市立大学）	99
抗酸菌脂質の免疫認識の分子機序	
杉田昌彦（京都大学ウイルス研究所）	105
研究成果の刊行に関する一覧表	109

平成21年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌感染症への国際的学術貢献を目指した基盤研究

総括研究報告書

研究代表者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進感染症研究事業）
総括研究報告書

抗酸菌感染症への国際的学術貢献を目指した基盤研究

研究代表者 牧野 正彦（国立感染症研究所・感染制御部・部長）

研究要旨.

結核は年間 800 万人の新規発症患者と 200 万人の死亡者を生み、世界人口の 3 分の 1 が感染している 20 世紀最大の恐怖を与えた細菌感染症であり、我国でも年間 2.5 万人もの新患発生がみられ、減少率の鈍化が著明になっている再興感染症である。対策として定期検診や BCG 予防接種が徹底されてきたが、成人に対する BCG 予防効果は期待できないことが判明した。新規抗結核薬による治療は奏功したものの、近年、多剤耐性結核の増加が著しくなり、今後の対応には大きな懸念が抱かれている。一方、同じく抗酸菌に分類されるらい菌によるハンセン病は、アジア諸国では今なお年間 30 万人の新規患者が発生している。我国では、抗酸菌の研究はかつて一世を風靡したが、現在研究者は減少している。このような現状に鑑みて、近年著しく発展した分子微生物学、免疫学、分子疫学的手法を活用し、新たな対策の確立に貢献すべき基礎的臨床的研究を中心に活発な研究が展開された。本研究では、結核、ハンセン病の二大抗酸菌感染症を標的とし、40 年来培われてきた日米医学協力計画における研究の蓄積も活かしながら、種々の新たな研究手法により、我国のみならずアジア諸国での新たな抗酸菌対応策の樹立に向けた基盤的研究を展開した。同時に、感染症対策には人的交流を通じた近隣アジア諸国との連携も重要である。近隣アジア諸国の研究者と積極的に交流を図りながら、抗酸菌研究をもすすめた。

研究分担者

菅原 勇（(財)結核研究所・研究主幹）
光山正雄（京都大学・教授）
吉開泰信（九州大学生体防御医学研究所・教授／研究所長）
後藤正道（国立療養所星塚敬愛園・園長）
谷口初美（産業医科大学・教授）
後藤義孝（宮崎大学・教授）
瀧井猛将（名古屋市立大学・准教授）
大原直也（岡山大学・教授）
岩本朋忠（神戸市環境保健研究所・副部長）
福富康夫（国立感染症研究所・室長）
岡田全司（国立病院機構近畿中央胸部疾患センター・臨床研究センター長）
小出幸夫（浜松医科大学・理事）
鈴木定彦（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・教授）
長谷 篤（大阪市立環境科学研究所・課長）
竹田 潔（大阪大学・教授）
慶長直人（国立国際医療センター研究所・部長）
向井 徹（国立感染症研究所・室長）

田村敏生 (国立感染症研究所・室長)

松本智成 (大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター・部長)

松本壮吉 (大阪市立大学・准教授)

杉田昌彦 (京都大学ウイルス研究所・教授)

A. 研究目的

病原性抗酸菌感染症においては、BCG 接種による予防や従来の抗結核薬による治療は、ほぼ限界に至っている。本研究班では、結核菌による感染・発病の機構、感染病態の解明などの基礎的研究に加え、新たな予防方策の開発、迅速診断法の開発など、学術的研究と実際的応用研究を組み合わせ、包括的な基盤研究を行う。培養不能な菌によって発症するハンセン病についても、同様に感染病態の把握に立脚した予防・治療法の新規開発と新規迅速検査診断法の開発を主目的とした研究を行う。島国である日本は、最早近隣アジア諸国との外交関係なしには存在し得ず、近隣諸国への国際的対応は日本とアジア諸国の科学的併行的進展に必要不可欠である。とりわけ、近年目覚ましい発展を遂げた分子生物学的技法を用いた最新技術を確立し、近隣諸国とその手法を共有することは、結核やハンセン病の制圧を目指す上で、大きな貢献に繋がるものである。また、抗酸菌に既存感染した日本人高齢者への対応に有用な直接的研究成果が得られるものと期待される。さらに、減少傾向に鈍化がみられる現在、とくに意識的対応が必要とされる感染症であることは間違いない。結核菌およびらい菌の分子生物学、結核症およびハンセン病の免疫生物学は、学術的観点からも、いまだに重要なテーマである。本研究により、基本的な病態機構に新たな理解が深まることは、生命科学的にも大きなインパクトを与える。新規抗酸菌ワクチン、新規迅速診断法などの確立は、直ちに国内外での実際的応用として貢献することが期待できる。

B. 研究方法

結核菌／結核に関する研究：

1. 結核菌が強い病原性を発揮するにもかかわらず、潜伏性慢性持続感染を誘導

する機構を、細菌遺伝子のノックアウト、候補遺伝子産物のリコンビナント蛋白作製等の手法で解析(光山、谷口、松本壮)

2. 組織傷害、肉芽腫形成などの結核に特徴的病態発現は、サイトカインを主体とした宿主応答に依存する。その分子機構を動物モデルを用いて主に免疫学的、分子生物学的手法を用いて解明(菅原、竹田、大原)
3. 抗結核防御免疫応答を司る抗原提示細胞と T 細胞を中心とした、細胞性免疫の誘導と発現機構を免疫生物学的観点から解析。同時に、ワクチンを含めた免疫治療開発の基礎理論を構築(牧野、吉開、田村、杉田、瀧井)
4. 結核や非結核性抗酸菌症の発症や増悪は、個人の遺伝的素因が関与すると想定されてきたが未だ明確でない。集団遺伝学と候補遺伝子の SNP 検索の技法を用いて、疾患感受性遺伝子の特定また動物種による感受性や病態の違いから、系統発生的なアプローチを試行(慶長、後藤義、岩本、長谷)
5. 多剤耐性結核の増加はグローバル化した新たな脅威である。培養に長期間を要する結核菌の耐性検査を迅速かつ確実に行う新たな手法を開発し、かつ、耐性獲得機構を解明(鈴木)
6. BCG 非依存性高免疫性新規ワクチンの開発および有効な新規ワクチン開発に向けた理論基盤の整備を多方面から遂行(岡田、小出)

らい菌／ハンセン病に関する研究：

1. ハンセン病およびその近縁疾患の標的組織である末梢神経の侵襲機構について、臨床材料とモデル感染を平行して病理学的に解析(後藤正)
2. BCG の有効性は 26%と報告されてい

る。BCGの欠点を凌駕し、かつらい菌の主要抗原を有効利用したより強いT細胞活性化能を有するリコンビナントBCGを作製評価(牧野)

3. かつらい菌の宿主免疫応答誘導機構およびかつらい菌殺戮機構をヒトおよび動物細胞レベルで解析(福富)
4. かつらい菌特有の因子を用いた、新規かつ迅速な診断検査法およびハンセン病発症予防法の確立に向けた基礎の整備(向井)

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

C. 研究結果

1. BCGを用いヒト未感作CD8陽性T細胞を活性化する方策として、HSP70-MMP-II融合蛋白を分泌し、Cytosolic経路を介してクロスプレゼンテーション機構で未感作CD8陽性T細胞を活性化し得るリコンビナントBCGが有効であった(牧野)。
2. 肺において抗酸化作用を誘導する転写因子Nrf2をノックアウトしたマウスにおいては、結核菌感染後の肉芽腫形成は抑制され、タイプ1サイトカインの生体防御における有用性が確認された(菅原)。
3. T細胞の活性化抑制に関与するPD-1は、肺結核においては抗結核菌生体防御免疫応答を正常に維持するために重要な役割を果たしていた(光山)。
4. BCGワクチン接種の抗結核菌生体防御反応を増強するため、レコンビナントIL-15の投与効果を検討した。抗酸菌抗原特異的メモリーCD8陽性T細胞数を有意に増加したが、強い結核防御反応の誘導は難しかった(吉開)。
5. ブルーリ潰瘍に対する化学療剤の治療効果を病理学的に検索すると、治療過程には肉芽腫形成を伴うことが判明した(後藤正)。
6. 抗酸菌が宿主細胞内生存および増殖を可能とする抗酸菌因子としapolar GPLの欠落とRNAポリメラーゼの ω サブユニット*rpoZ*遺伝子が重要であった(谷口)。
7. *Mycobacterium avium*は、ヒトおよびヒト伴侶動物に感染し難治性病変を形成するが、遺伝的背景の異なる種々の純系マウスでは、薬剤に対する感受性と免疫応答能において異なる反応性を示した(後藤義)。
8. 結核ワクチンとして用いられるBCG亜株の生化学的性状解析を行ったところ、宿主免疫応答および環境ストレスに抵抗性を有することが判明した(瀧井)。
9. BCGのチミジル酸合成酵素ThyXは、チミジル酸合成のみならずNADPH酸化活性にも関与し、BCGの生理機能維持に重要な役割を果たしていた(大原)。
10. 北京型結核菌集団構造を誕生年コホート解析したところ、若年層と高齢者層間で結核菌集団構造は大きく異なっていた。新興型菌は、高いクラスター形成率を示した(岩本)。
11. ヒトマクロファージに寄生性感染したかつらい菌の殺戮を誘導するためには、IFN- γ が有用な役割を果たし、NADPHオキシダーゼが産生するphoxタンパクサブユニットの発現増強が重要であることが判明した(福富)。
12. 結核に対する治療用および予防用ワクチンとして、HVJ-エンベロープ/HSP65 DNA + IL-12 DNAワクチンが有

用であることが、マウスおよびカニクイザルで証明された(岡田)。

- 1 3. 結核菌ファゴゾームの特性をラテックスビーズファゴゾームを対象として検討した。結核菌ファゴゾームには、小胞体を構成するタンパク質が多く含まれており、結核菌ファゴゾームは小胞体と優先的に融合する可能性が得られた(小出)。
- 1 4. 結核菌のニューキノロン高度耐性獲得機構は、DNA ジャイレースの薬剤感受性と酵素活性の両者が関与していることが明らかとなった(鈴木)。
- 1 5. 日本の臨床分離結核菌株の網羅的ポイント突然変異(SNP)を1,100箇所確認した。そのうち約200箇所は各菌株固有の変異であった(長谷)。
- 1 6. 結核菌感染早期に肺内に産生されるリポカリン2およびSLPIは、ともに結核菌の増殖を抑制した。リポカリン2は、結核菌の鉄イオンの取り込みを抑制し代謝阻害を誘導し、SLPIは結核菌の細胞膜の透過性を亢進させた(竹田)。
- 1 7. HIV陰性結核患者とHIV結核合併患者の血漿中およびリンパ球より分泌される細胞障害性顆粒の濃度を解析したが、疾患群により両者に乖離が見られた(慶長)。
- 1 8. 抗酸菌ワクチン株BCG菌の染色体へ十分量の抗原発現を誘導するための外来遺伝子の挿入を可能とする強力なプロモーターを抗酸菌ファージより同定した(向井)。
- 1 9. 結核菌特異抗原の一つPeptide-25によるT細胞レセプターを介した刺激により活性化される新規転写因子としてTATA box binding protein associated factor (TAF)7を同定し、TAF7には*ifn- γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導可能であることを確認した(田村)。
- 2 0. リウマチ等自己免疫疾患に対し抗TNF α 治療剤を用い治療し、結核の発症を誘発したとしても抗結核薬が有効に作用することが判明した(松本智)。

2 1. 結核菌は、ヒアルロン酸を炭素源として利用し増殖することが判明した(松本壮)。

2 2. 結核免疫に重要な役割を果たす脂質特異的免疫応答の解析に有用な脂質特異的免疫反応システムを導入・再構築したマウスモデルの作製に成功した(杉田)。

D. 考察

結核・ハンセン病を中心とした病原性抗酸菌感染症に対する診断・治療・予防の各分野において幅広い基礎研究が展開された。これらに関する研究成果の中には、すぐにも臨床の場へ応用し得る成果が散見され、また、アジア諸国の医療従事者にとって非常に有用な臨床的検査技法の開発・改良もなされ、病原性抗酸菌感染症の制圧に向けて大きな前進があったと言える。

研究成果は、日米医学結核・ハンセン病専門部会合同会議で発表され、高い評価が得られた。本国際会議においては、米国の専門家との共同研究体制も強化され、同時にアジア諸国の中心的研究者との情報交換の場も提供された。今後の国際協力研究の体制確保への足固めがなされた。

E. 結論

本研究班は、日本を代表する抗酸菌研究者により組織されており、それぞれが限りある研究費の中で最大限の努力を払い、目的とした研究において十分なる研究成果が上がった。更なる発展が期待できる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表
刊行一覧表の通り質の高い論文が20数本発表された。
2. 学会発表
それぞれの研究者の発表は、国内では主に日本細菌学会・日本免疫学会・日

本結核病学会・日本ハンセン病学会・
日本感染症学会・日本生体防御学会な
どの総会・学術集会で発表された。国
際学会では、第44回日米医学協力計画
結核ハンセン病専門部会合同会議（福
岡市）において発表された。

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21年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

抗酸菌に対する生体防御反応賦活法の開発

分担研究報告書

研究分担者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・部長)

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進感染症研究事業）
分担研究報告書

抗酸菌に対する生体防御反応賦活法の開発

研究分担者 牧野 正彦（国立感染症研究所・感染制御部・部長）

研究要旨.

らい菌に対する生体防御反応を賦活するため、弱毒化牛型結核菌 *Mycobacterium bovis* BCG に改良を加え、ワクチンとして用いる新規リコンビナント BCG の作製を目的とした。らい菌の増殖を抑制する宿主因子は、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、強くナイーブ CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を活性化し、大量の IFN- γ 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。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 とらい菌主要抗原である MMP-II の融合タンパクを分泌させることは、生体防御反応を賦活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

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。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 細胞はらい菌感染初期に働き、らい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、らい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。これまでらい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。その最大の欠点は、BCG が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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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。精製したタンパクはウェスタンブロット法で検索すると、抗 MMP-II 抗体および抗 HSP70 抗体と反応し 90 kDa であった。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。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した。同時に BCG-70M は、DC から IL-12p70、TNF α 、IL-1 β などのサイトカイン産生を誘導した。そこで BCG-70M 感染 DC を用い、自己のナイーブ CD4 陽性 T 細胞を刺激すると、T 細胞は強く活性化され IFN- γ を産生した。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。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 を用いて 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。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- γ を産生する T 細胞が産生された。IFN- γ を産生する T 細胞を同定するため、細胞内 IFN- γ 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- γ を産生していた。

D. 考察

らい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 細胞を中心に営まれている。ワクチンもまた両ナイーブ 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る。従来の 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ソームを形成しライソソ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。これらの欠点を凌駕するため、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、有意に強いら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 細胞をポリクローナルに産生する可能性が強い。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 細胞を活性化したものと推定された。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) 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) Maeda, Y., T. Tamura, M. Matsuoka,

and M. Makino. Inhibition of the multiplication of *Mycobacterium leprae* by vaccination with a recombinant *M. bovis* BCG strain that secretes major membrane protein-II in mice. Clin. Vaccine Immunol., 16:1399-1404, 2009.

- 3) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. Induction of cross-priming of naïve CD8⁺ T lymphocytes by recombinant *Bacillus Calmette-Guérin* that secretes heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. J. Immunol., 183:6561-6568, 2009.

2. 学会発表

- 1) The role of T cell receptor-mediated signals in Th1 subset differentiation of naïve CD4⁺ T cells primed with Peptide-25 of Ag85B. Tamura, T., Y. Shimohakamada, M. Makino, and K. Takatsu. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
- 2) Identification of Strong Mycobacterial Promoters from Mycobacteriophage TM4. Mukai, T., Y. Maeda, Y. Miyamoto, and M. Makino. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
- 3) Biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. Miyamoto, Y., and M. Makino. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
- 4) Apoptosis-inducing activity of

- clofazimine in macrophages and expression of ER stress proteins in the cells. Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
- 5) The fate of mycobacteria in human dendritic cells and macrophages. Maeda, Y., Y. Fukutomi, H. Wang, T. Tamura, and M. Makino. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 6) *Mycobacterium avium* complex における glycopeptidolipid 生合成遺伝子群の転写制御解析. 宮本友司, 向井 徹, 中 崇, 甲斐雅規, 前田百美, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 7) BCG 菌ミコール酸のサブクラス合成遺伝子の解析. 甲斐雅規, 藤原永年, 宮本友司, 向井 徹, 矢野郁也, 牧野正彦. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 8) *Mycobacterium intracellulare* 由来血清型 7, 12, 13 型糖ペプチド脂質の構造類似性とオリゴ糖解析. 藤原永年, 中田 登, 中 崇, 水野浄子, 合田麗奈, 牧野正彦, 吉村満美子, 松本壮吉, 前田伸司. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 9) Evaluation of exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected dendritic cells. 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 10) *Helicobacter pylori luxS* 変異株の外膜蛋白の解析. 大崎敬子, 甲斐雅規, 米澤英雄, 牧野正彦. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 11) クロファジミンにより誘導されるマクロファージの細胞死と小胞体ストレスタンパクの動態. 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 12) 抗酸菌分泌タンパク Ag85B 由来 Peptide-25 による Th1 型免疫応答誘導機序の解析. 下袴田陽子, 田村敏生, 牧野正彦, 高津聖志. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 13) らい菌 Thai53 ゲノム由来新規 SNPs の探索. 甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 椎名 隆, 猪子英俊, 牧野正彦. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲市
- 14) らい菌蛋白調整に用いる発現用プロモーターの同定. 向井 徹, 宮本友司, 前田百美, 牧野正彦. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲市
- 15) Major membrane Protein-II を用いた血清診断法. 前田百美, Mochammad Hatta, Ratnawati, Mashudi, Yadi, Muhammad Sabir, Nataniel Tandirogang, Luh Made Mas Rusyati, 甲斐雅規, 向井 徹, 宮本友司, 福富康夫, 牧野正彦. 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲市
- 16) 結核・ハンセン病に対するワクチンの開発研究の最前線. 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. (シンポジウム) 第 82 回日本ハンセン病学会総会・学術大会 2009 年 5 月 出雲市
- 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 2 1 年度 厚生労働科学研究費補助金

地球規模保健課題推進研究事業

(国際医学協力研究事業)

結核菌が宿主に及ぼす影響

分担研究報告書

研究分担者

菅原 勇

(結核研究所・研究主幹)

結核菌が宿主に及ぼす影響

研究分担者 菅原 勇 （（財）結核予防会結核研究所・研究主幹）

研究要旨.

結核の免疫には、Th1 細胞が関係すると言われる。以前に、Th2 細胞より産生される IL-4 が結核の進展を、逆に促進することを見出した。今回、さらに Th1-Th2 パラダイムを再検討するために、Th2 に傾いた Nrf2 KO マウスに、結核菌を感染・発病させたところ結核肉芽腫は、有意に縮小した。Nrf2 の存在は、結核の進展を促進すると考えられる。やはり、結核は、Th1 細胞の働きと密接に関係するが厳密ではない。

A. 研究目的

Th1 細胞が、結核の免疫に関係すると考えられている。以前、われわれは、Th2 細胞により産生される IL-4 が結核の進展を促進することを報告した。今回、Th2 の機能が優位になる Nrf2 KO マウスに結核菌を感染させて、この Th1-Th2 パラダイムを再検討した。

B. 研究方法

肺における抗酸化作用に関係する転写因子である Nrf2 の機能を破壊して作成した Nrf2 KO マウスに結核菌をエアロソール感染させた。Nrf2 は、nuclear erythroid 2 p45-related factor 2 の略である。主として、細胞による抗酸化作用発現に関係する転写因子である。300 百万個の結核菌 Kurono 株を Inhalation Exposure System(米国 Glas-Col 社製)を用いて、90 分間、エアロソール感染させた。実験直後の肺内結核菌数は、約 200 コロニーであった。陽性対照として野生 BALB/c 雌マウス（6 週齢）を用いた。時系列の変化を追うために感染後 27 週まで観察した。感染後 1, 3, 5, 7, 12, 27 週に組織を取り出し、病理学的変化を調べた。

肺、脾内の結核菌数を調べるために、重さを量った後、一部の組織をすりつぶし、希釈して 3% 小川培地に播き 4 週後に出現

したコロニー数を求めて肺、組織あたりのコロニー数を算定した。

また一部の肺を摘出し、Real-time PCR を行い TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-13 mRNA 発現の程度を野生マウスと比較した。内部対照として GAPDH mRNA を用いた。

倫理面への配慮 動物を処分するに際しては、麻酔薬を用いて安楽死させた。研究所の動物実験規程を遵守して実験を遂行し、すべて研究所 P3 実験室で行われた

C. 研究結果

1. 肺、脾内結核菌コロニー数の経時的変化

図 1 としてデータを添付している。野生マウス肺内の結核菌コロニーは、感染後 3 週をピークに以後漸減し、再度 27 週で微増した。Nrf2 KO マウス肺内のコロニー数は、野生マウスのそれとほぼ同じ経過をたどったが、肝炎後 12 週から減少に転じ 27 週では、野生マウスより、有意に減少し、統計的有意さがみられた。

野生マウス脾内結核菌コロニー数は、経時的に漸増していき、500 万コロニーに達した。他方、Nrf2 KO マウス脾内結核菌コロニー数も、漸増し 27 週で漸減したが統計的有意差は見られなかった。

2. 経時的組織像の変化

感染後 12 週までは、肉芽腫の大きさに

有意さがなかったが、27週では、Nrf2 KO マウス肺肉芽腫は小さくなった。壊死は見られず、泡沫状マクロファージ、リンパ球の集塊が見られた。小さくなった肉芽腫内にはほとんど結核菌が見られなかった。野生株の肉芽腫には、少数結核菌が認められた。

3. Real-time PCRによる mRNA 発現

Th1 サイトカインである IL-2 は、感染後 12 週から発現が強くなり 30 週でも強かった。Th2 サイトカインである IL-4 は、有意に Nrf2 KO マウスで低かった。逆に、IL-13 は、感染後 12, 30 週で比較的強かった。TNF- α は、両群で有意差が見られなかった。

D. 考察

今回、Nrf2 KO マウスを用いて Th1-Th2 パラダイムを再検討してみた。

結核の免疫は、Th1 細胞とそのサイトカインが関係し、気管支喘息は、Th2 細胞とそのサイトカインが関係するといわれる。

2000年に、われわれは、結核免疫における Th2 サイトカインである IL-4 を欠損したマウスを用いて、結核の進展後期に、IL-4 は、結核肉芽腫の形成を促進することを見出した。従来の枠組みだと肉芽腫は小さくなるはずである (I. Sugawara et al. *Microbiol. Immunol.*, 44:971-979, 2000)。このときのわれわれの説明は、IL-4 は、抗中球スーパーオキシド産生を制御する、IL-4 は、結核菌特異的 T 細胞の誘導に関係する、というものであった。

その後、マウスを用いた気管支喘息の研究中に、Nrf2 KO マウスを用いたところ、このマウスは、気道過敏性が亢進し、IL-12, IL-13 mRNA の発現が高いことを見出した。すなわちこの欠損マウスは、Th2 優勢であることが判明した (Y. Li et al. *Clin. Immunol.*, 128:366-373, 2008)。

以上の研究史を踏まえて、再度この Nrf2 KO マウスを用いて Th1-Th2 パラダイムが完全かどうかを検証しようとしたのである。

結果は、Th2 優勢なこの欠損マウスで、

肉芽腫が縮小したので、このパラダイムの基本的枠組みは保たれていると考えられている。しかしながら、サイトカインの発現で、とくに IL-4 の発現で、面白い挙動が見られたので、この枠組みは、それほど堅固なものではないと考えられる。この研究成果を、将来の結核の免疫療法の研究に取り入れていきたい。

E. 結論

やはり、結核の免疫は、Th1 細胞とそのサイトカインで制御されているらしい。しかし、Th2 サイトカインも、結核の免疫に絡むので、それほど強固な枠組みではない。Nrf2 の欠損は、結核の抑制の方向に作用する。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugawara, I., T. Udagawa, T. Aoki, and S. Mizuno. Establishment of a guinea pig model of latent tuberculosis with GFP-introduced *M. tuberculosis*. *Tohoku J. Exp. Med.*, 219:257-262, 2009.
- 2) Q. Zhang, H. Xiao, and I. Sugawara. Tuberculosis complicated by diabetes mellitus at Shanghai pulmonary hospital, China. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 62:390-391, 2009.
- 3) Sugawara, I., J. Zhang, and C. Li. Cross-resistance of *M. tuberculosis* isolates among streptomycin, kanamycin and amikacin. *Ind. J. Exp. Biol.*, 47:520-522, 2009.

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. その他 なし

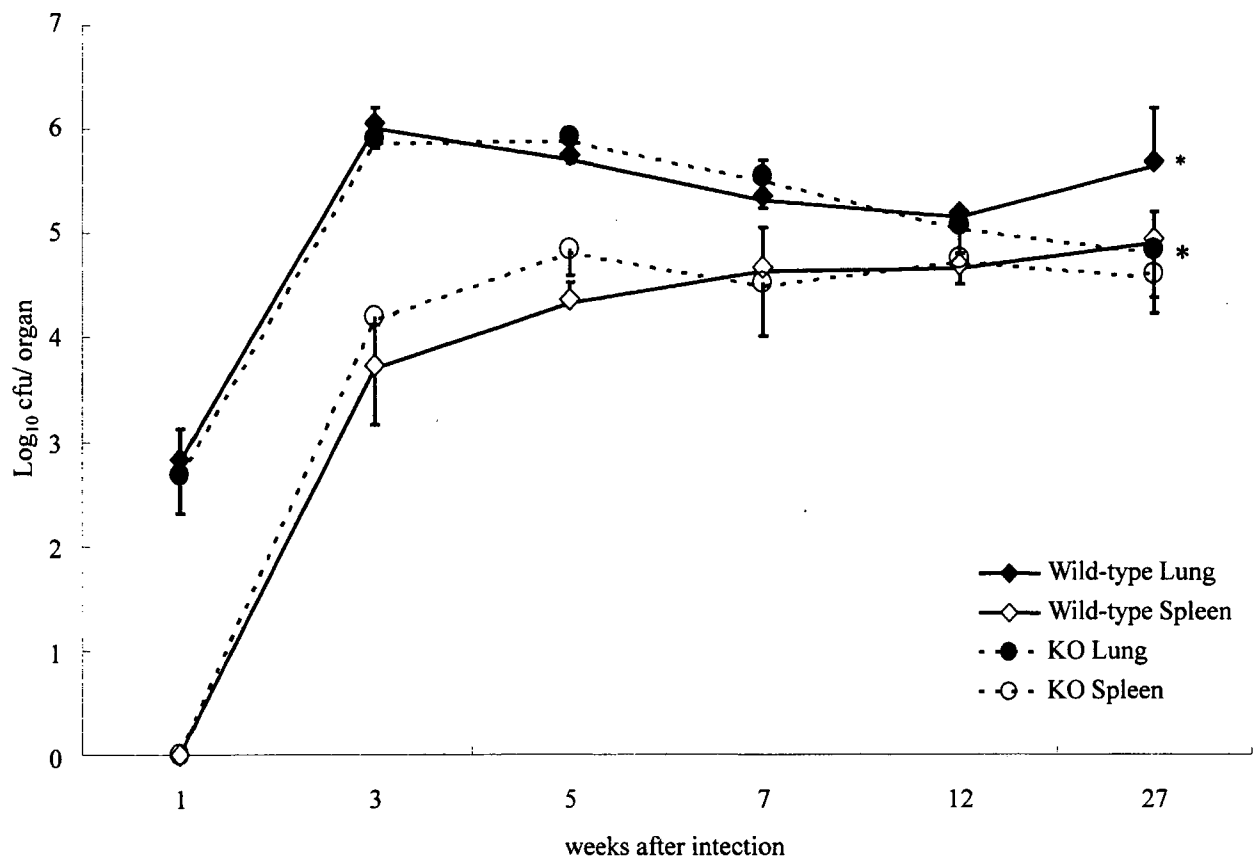


図 1. Nrf2 KOマウス肺および脾内結核菌コロニー数の経時的変化