

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)

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

分担研究報告書

研究分担者

田村 敏生

(国立感染症研究所・室長)

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研究事業）
分担研究報告書

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・感染制御部・室長）

研究協力者 下袴田 陽子（国立療養所栗生楽泉園・医師

国立感染症研究所・感染制御部・協力研究員）

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最終目的としている。

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 が①選択的且つ強力に Th1 細胞分化を誘導できること、②Peptide-25 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス (P25 TCR-Tg) 及び既知のサイトカイン産生や副刺激分子の発現が認められない Chinese Hamster Ovary 細胞に I-A^b 遺伝子を導入した細胞 (I-A^b-CHO) を抗原提示細胞として用いた解析から、Peptide-25 を介した TCR からのみの刺激によってサイトカイン非依存的、副刺激分子非依存的、さらに T-bet 非依存的な Th1 分化が誘導されること、③この分化には Peptide-25 刺激によって誘導される TATA box binding protein associated factor である TAF7 が重要な役割を果たしていることを明らかにし、結核菌分泌タンパク由来ペプチド特異的な Th1 分化誘導機構が存在する可能性を示唆してきた。

本年度はレトロウイルス発現ベクターを用いて Peptide-25 による Th1 分化誘導機構における TAF7 の役割を検討した。その結果、TAF7 には *ifn-γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導する活性があることが確認された。また、IL-12 レセプター (R) β2 鎖の発現誘導活性を有する STAT4 の Peptide-25 を介した TCR 刺激による活性化を検討した結果、刺激 24 時間後から持続的な STAT4 のチロシンリン酸化が誘導されることが明らかとなり、Peptide-25 刺激が STAT4 の活性化を誘導することで IL-12Rβ2 鎖の発現を誘導している可能性が示唆された。

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。

特異抗原を認識したナイーブ CD4⁺ T 細胞は少なくとも 4 種類の亜集団に分化するが、この分化は抗原を認識する場に存在するサイトカインによって決定されるというのが現在最も受け入れられている考え方である。

Th1 細胞への分化では IFN- γ 、IL-12 が重要な役割を果たしており、IFN- γ は T-bet の発現を、IL-12 は STAT4 の活性化を誘導し、これら転写因子の活性によって Th1 分化が決定されると考えられている。

我々のこれまでの解析から、①結核菌分泌タンパク Ag85B のヘルパーエピトープを検索し、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に Th1 免疫応答を誘導できること、②Peptide-25 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス (P25 TCR-Tg) 及び既知のサイトカイン産生や副刺激分子の発現が認められない Chinese Hamster Ovary 細胞に I-A^b 遺伝子を導入した細胞 (I-A^b-CHO) を抗原提示細胞として用いた解析から、Peptide-25 を介した TCR からのみの刺激によってサイトカイン非依存的、副刺激分子非依存的、さらに T-bet 非依存的な Th1 分化が誘導されること、③この分化には DNA マイクロアレイ法を用いた解析から Peptide-25 刺激によって誘導される TATA box binding protein associated factor である TAF7 が重要な役割を果たしていることを明らかにし、結核菌分泌タンパク由来ペプチド特異的な Th1 分化誘導機構が存在する可能性を示唆してきた。

本年度は Peptide-25 特異的な Th1 分化誘導機構における TAF7 の役割及び Peptide-25 刺激による IL-12R β 2 鎖の発現誘導機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) TAF7 の機能解析

TAF7 の Th1 分化誘導を評価するために、I-A^b-CHO 細胞存在下に Peptide-25 で刺激した T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞より得た cDNA より PCR 法を用いて TAF7 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。ナイーブ CD4⁺ T 細胞に TAF7 を導入するために、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 抗体で刺激を行なう際に、TAF7 を組み込んだ pMY-IRES-GFP を添加した。陰性対照として pMX-IRES-GFP のみを、陽性対照として T-bet-pMX-IRES-GFP を用いた。TAF7 の IL-12R β 2 鎖発現誘導能は、TAF7 が導入された活性化 CD4⁺ T 細胞 (GFP 陽性) を経時的に回収し、精製抗 IL-12R β 2 抗体 (ハムスター IgG) + PE 標識抗ハムスター IgG 抗体で経時的に染色し、FACSCantoII を用いて評価した。TAF7 の *ifn- γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリング誘導能は、TAF7 が導入された活性化 CD4⁺ T 細胞を 5 日間培養した後、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法を行ない評価した。

(2) STAT4 の活性化の検討

STAT4 の活性化には 693 番目のチロシン残基のリン酸化が必須である。そこで、STAT4 のチロシンリン酸化を指標に STAT4 の活性化を評価した。具体的には、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激を行ない、活性化した CD4⁺ T 細胞を経時的に回収し、PE 標識抗チロシンリン酸化 STAT4 抗体を用いて CD4⁺ T 細胞内の STAT4 のチロシンリン酸化を FACSCantoII にて解析した。

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) TAF7 の機能解析

ifn- γ 遺伝子座のクロマチンリモデリング及び IL-12R β 2 鎖の発現を誘導することで Th1 分化を決定できる転写調節活性を有する可能性がある遺伝子を DNA マイクロアレイ法を用いて絞り込んだ結果、TAF7 が候補であること、TAF7 を組み込んだレトロウイルス発現ベクター pMY-IRES-GFP を T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞に導入し、Th1 分化誘導能を評価した結果、TAF7 は T-bet と同程度の Th1 分化誘導能を有していることを昨年度報告した。

そこで、今年度は TAF7 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検討した。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 TAF7 を組み込んだ pMY-IRES-GFP を添加し T-bet 欠損 CD4⁺ T 細胞に TAF7 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 TAF7 が導入された細胞を精製分取し、*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、TAF7 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。

次に TAF7 が導入された細胞の IL-12R β 2 鎖の経時的な発現量変化を検討した。抗 IL-12R β 2 抗体には標識した抗体が市販されておらず、標識した 2 次抗体を使用しなければならない。しかしながら CD4⁺ T 細胞を刺激する際に用いる抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体がいずれも抗 IL-12R β 2 抗体と同じハムスター由来の抗体であるため、CD4⁺ T 細胞に TAF7 を導入するための刺激として抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体は使用できない。そこで、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4⁺ T 細胞を ConA を用いて刺激した。刺激 36 時間後に精製 IL-12R β 2 抗体及び PE 標識抗ハムスター IgG を用いて染色し、IL-12R β 2 鎖の発現量を測定した。その結果、抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体刺激 120 時間後(5 日後)に、2-4% 程度の細胞に TAF7 が導入されるのに対し、ConA 刺激 36 時間後では 0.1% 程度しか TAF7 が導入されず、TAF7 が導入されたわずかの CD4⁺ T 細胞を解析したが TAF7 が IL-12R β 2 鎖の発現誘導活性を有するかに関しては明確な結果を得ることができなかった。

(2) Peptide-25 刺激による STAT4 の活性化の検討

活性化した STAT4 が IL-12R β 2 鎖の発現誘導能を有していることが報告されている。我々が作出した T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナ

イープ CD4⁺ T 細胞にも STAT4 が発現している。そこで、Peptide-25 を介した TCR 刺激で誘導される Th1 分化における STAT4 の関与を検討した。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイープ CD4⁺ T 細胞を I-A^b-CHO 細胞存在下に Peptide-25 で刺激し、1、6、24、48 時間後の CD4⁺ T 細胞内の STAT4 のチロシンリン酸化を FACS を用いて検討した。その結果、刺激 1 時間、6 時間後では STAT4 のチロシンリン酸化は全く検出されなかったが、24 時間、48 時間後では著明な STAT4 のチロシンリン酸化が認められた。Peptide-25 刺激では CD4⁺ T 細胞から IL-2、IFN- γ が産生される。そこで、これらのサイトカイン及び IL-12 の関与を検討するために刺激の際にこれらサイトカインに際する抗体を添加し、影響を検討したが、いずれの抗体も Peptide-25 刺激で誘導される STAT4 のチロシンリン酸化に影響を与えなかった。

D. 考察

ナイープ CD4⁺ T 細胞が Th1 細胞へと分化するためには IFN- γ が産生できるように *ifn- γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングが誘導されること、さらにその機能を固定するためには IL-12-IL-12R-STAT4 を介したシグナルが必要であると考えられている。しかしながら、ナイープ CD4⁺ T 細胞は IL-12R β 2 鎖を発現していないため機能的な IL-12R を構成できず、IL-12 に反応することができない。そのため、Th1 細胞への分化を固定するためには IL-12R β 2 鎖の発現を誘導しなければならない。我々のクロマチン免疫沈降法を用いた解析結果から、TAF7 には *ifn- γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導する活性があることが確認された。しかしながら、IL-12R β 2 鎖の発現誘導能に関しては、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法では効率が非常に悪く、TAF7 の IL-12R β 2 鎖の発現誘導活性を確定させるには至らなかった。今後は非分裂ナイープ CD4⁺ T 細胞に対しても遺伝子導入効率が良いことが報告されているレンチウイルスベクターを用い、再検討して行く予定である。

T-bet 及び STAT4 は IL-12Rβ2 鎖の発現を誘導する活性を有していることが報告されている。我々の実験系では IL-12 産生能が全くない I-A^b-CHO 細胞を抗原提示細胞として用いているため、IL-12 を介して STAT4 が活性化される可能性はないが、Peptide-25 を介した TCR シグナルが STAT4 の活性化を誘導する可能性が考えられる。そこで、Peptide-25 刺激で誘導される Th1 分化における STAT4 の関与を検討した。その結果、刺激 24 時間後に STAT4 の活性化の指標である 693 番目のチロシン残基のリン酸化が誘導されていた。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4⁺ T 細胞を Peptide-25 で刺激した際の IL-12Rβ2 鎖のタンパクレベルでの発現は刺激 39 時間後初めて確認できることから、Peptide-25 刺激 24 時間後に誘導された STAT4 の活性化が IL-12Rβ2 鎖の発現に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後は TAF7 の STAT4 の関わり合い、また、TCR を介した STAT4 の活性化誘導機序に関して詳細に解析していく予定である。

E. 結論

Peptide-25 を介した TCR 刺激で誘導される TAF7 が *ifn-γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導する活性を有していることが確認され、また Peptide-25 を介した TCR 刺激が STAT4 を活性化し IL-12Rβ2 鎖の発現を誘導している可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, Y., T. Tamura, M. Matsuoka, and M. Makino. Inhibition of the multiplication of *Mycobacterium leprae* by vaccination with a recombinant BCG that secretes major membrane. Clin. Vaccine Immunol., 16:1399-1404, 2009.
- 2) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino.

Induction of cross-priming of naive CD8⁺ T lymphocytes by recombinant *bacillus Calmette-Guerin* that secreted 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 naive CD4⁺ T cells primed with Peptide-25 of Ag85B. Tamura, T. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th US-JAPAN Conference on Tuberculosis and Leprosy, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
 - 2) 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 愛知
 - 3) 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 愛知
 - 4) 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. 第 82 回日本ハンセン病学会総会 2009 年 5 月 島根
 - 5) The influence of CD11c⁺ lung cells in induction of mycobacterial Ag-specific Th1 response to the lung. Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, D. Begum, Y. Yoshida-Okamoto, K. Shinjo, A. Kariyone, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 2009 年 12 月 大阪
- #### 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)

結核疫学解析、結核の臨床研究

分担研究報告書

研究分担者

松本 智成

(大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター・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

結核疫学解析、結核の臨床研究

研究分担者 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・部長）

研究要旨.

世界的に見て結核患者は増加傾向にある。一方、関節リウマチの治療において、早期より積極的に抗 TNF 抗体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。抗結核薬 INH 予防内服と同時に抗 TNF 製剤を投与された患者では、薬剤感受性結核の発病はないと報告されている。この事実から、有効な結核薬の元では、抗 TNF 製剤投与下においても結核はコントロールできる可能性がある。抗 TNF 製剤である infliximab もしくは, adalimumab にて結核を発病した難治性関節リウマチ患者 4 名 (内 3 名は infliximab 投与、内 1 名は adalimumab 投与) に対して、抗結核薬を投与しながら infliximab もしくは adalimumab 再加療を行い、現在のところ、最長 5 年経過するが結核の再発はみられていない。有効な結核薬のもとでは、たとえ結核を発病しても抗 TNF 製剤を投与できる可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

2001 年に Keane 等は、関節リウマチ治療薬の抗 TNF 製剤 infliximab 投与後 28 週以内に結核の発症頻度が上昇すると報告した (1)。事実、Wolfe 等の報告では、米国の関節リウマチ患者の結核発症率は 6.2/10 万人であり、合衆国の結核罹患率 5.8-6.4/10 万人と差が無いにもかかわらず、infliximab 投与された関節リウマチ患者の結核発症率は 52.5/10 万人と約 9 倍に跳ね上がっていた (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限られていた。

世界的に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 抗体製剤投与が推奨される現在、結核患者への抗 TNF 製剤投与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、以下のようなものが考えら

れる。

1. 結核感染のスクリーニングが難しい
2. 結核発症予防法が確立していない
3. 結核の発症診断が難しい
4. Paradoxical response 出現に、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

治療者の立場からは、infliximab によって発病した結核患者の paradoxical response による臨床症状の激しさを診ると、もう二度とこのような経験はしたくないと考える。このような、結核と関節リウマチのコントロールの難しさから、infliximab 再投与はすべきでないという意見が大多数をしめる。しかしながら、筆者は、infliximab 投与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

能であると考える。

その理由は、有効な抗結核薬の存在下では、初回時の infliximab 投与と比較して、以下の点で結核再発の危険性が低いからである。

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経験がある。
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. 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。

B. 研究方法

結核を発病した難治性関節リウマチ患者 4 名(内 3 名は infliximab 投与にて結核発症、内 1 名は adalimumab 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 もしくは adalimumab 加療を行った。

このうちの 1 名は、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 を投与したが、不幸にも結核発症して当院に転院になった患者であった。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。しかし、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ため、infliximab の再投与を行った(3)。

倫理面の配慮 抗 TNF 製剤投与再希望をする結核合併難治性関節リウマチ患者で、患者に抗 TNF 製剤と結核の問題点・考えられる危険性を文章にて説明し同意を得た。なお、抗 TNF 製剤の添付文章上では、活動性結核以外は投与可能なのでこの面でも倫理的に問題ないと考える。

C. 研究結果

抗 TNF 製剤を再投与した 4 名の患者(最長投与後 5 年 3 ヶ月経過)において結核の再発はない。以後も関節リウマチの悪化は認められない。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, adalimumab を含む抗 TNF 製剤を投与できることが明らかとなった。

D. 考察

第一に、infliximab と抗結核薬の投与のタイミングが問題である。抗結核化学療法後にステロイド投与を行うと、60%に結核の再発がおこると言われている。また Wolfe 等は、関節リウマチ患者に対しての infliximab 投与は、結核の発症率を 9 倍上げると報告している。しかしながら、当症例では、抗結核加療を終了後で infliximab 投与を行っても、結核再発が認められていない。日本の場合、INH 予防内服と同時に infliximab を投与された患者では、薬剤感受性結核の発病は報告されていない。一方、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がある。この事実から、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。

第二に、infliximab 投与中の INH 予防内服の投与期間が問題である。Fitzgerald 等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(4)。また、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。これらの事実から、結核の中蔓延地域である大阪では、結核の再感染発病も考えられる。可能であるならば INH の予防内服は長期間行なう必要がある。

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抗 TNF 製剤を投与できることが明らかとなった。

引用文献

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.
- G. 研究発表
1. 論文発表
なし
 2. 学会発表
 - 1) 結核合併関節リウマチ患者に対する抗 TNF 製剤療法. 松本智成. 第 41 回 O. I. D Conference 2009 年 9 月 大阪
 - 2) Anti-TNF Therapy for Rheumatoid Arthritis in Patients with Tuberculosis. Matumoto, T. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
 - 3) 関節リウマチ治療における結核発病の問題点—ステロイドから抗 TNF- α 製剤について. 松本智成. 第 84 回日本結核病学会総会ミニシンポジウム 2009 年 7 月 札幌
 - 4) 結核合併関節リウマチ患者 5 名に対する抗 TNF 製剤投与の安全性. 松本智成. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会 2009 年 6 月 東京
 - 5) *Mycobacterium avium* complex における関節リウマチ最新治療と病診連携. 松本智成. 羽曳野市医師会学術講演会 2009 年 5 月 大阪
 - 6) 結核合併関節リウマチ患者 5 名に対する抗 TNF 製剤投与. 松本智成. 第 83 回日本感染症学会総会・学術講演会 2009 年 4 月 東京
 - 7) 結核合併関節リウマチ患者 5 名に対するレミケード投与の安全性と有効. 松本智成. 第 53 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 2009 年 4 月 東京
 - 8) Infliximab for Rheumatoid Arthritis in patients with Tuberculosis. Matsumoto, T. 南大阪リウマチ研究会 2009 年 3 月 大阪
 - 9) Anti-TNF Agents for Rheumatoid Arthritis in Patients with Tuberculosis. Matsumoto, T. 平成 20 年度日米医学協力事業国内会議 2009 年 2 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 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)

結核病態に関する分子生物学的研究

分担研究報告書

研究分担者

松本 壮吉

(大阪市立大学・准教授)

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研究事業）
分担研究報告書

結核病態に関する分子生物学的研究

研究分担者 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）

研究要旨

人型結核菌が、牛型結核菌同様にヒアルロン酸を炭素源として利用し増殖
す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牛型結核菌
BCG やヒト型結核菌の細胞接着/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
繫留されている。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BCGの増殖をヒアル
ロン酸が促進すること、BCGは、宿主ヒア
ルロン酸合成酵素(HAS)1とHAS3が産生す
るヒアルロン酸を炭素源として利用するこ
と、ヒアルロン酸を利用する際に、ヒアル
ロン酸分解酵素の活性が必須であることを

明らかにしてきた。

今回我々は、人型結核菌でも同様に宿主
ヒアルロン酸を利用するのかを検討したの
で報告する。

B. 研究方法

細胞培養、結核菌の調整と感染、増殖の
モニタリング

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。*Mycobacterium*
tuberculosis H37Rvを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 /ml/穴/24
穴プレート（ファルコン社）に播種し、*M.*
*tuberculosis*を 2×10^6 集落形成数(CFU)/ml
の濃度で加え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を様々な量
(0, 1 μ g, 10 μ g, 100 μ g/穴など)加え、
経時的にトライトンX（最終0.5%）で処理
して細胞を溶解させ、段階希釈して
7H11-OADC培地上にちょう菌し37°Cにて
20-25日間培養後、生菌数を算定した。

C源枯渇培地

7H9培地に食塩のみを加えた培地をC源
枯渇培地とした。またC源枯渇培地にヒア
ルロン酸、グルコース、ヘパラン硫酸、ヘ
パリンをそれぞれ0.5 mg/mlになるように
加えた培地を作成し菌の培養を行なった。

ヒアルロン酸合成酵素トランスフェク
タント細胞

ヒト由来ヒアルロン酸合成酵素 (HAS1、HAS2、HAS3) のトランスフェクタント細胞およびコントロールの空ベクター (Mock) を導入した 3Y1 細胞を、10%不活化牛胎児血清、0.05 mM メルカプトエタノール、L-グルタミン酸、50U/ml ペニシリン/ストレプトマイシン含有 D-MEM 培養液にて 5%炭酸ガス存在下 37° C にて培養した。各トランスフェクタント細胞を 2.5×10^5 /well に播種し、A549 細胞と同様の系にて *M. tuberculosis* を感染させ、感染後の菌の増殖をモニターした。

結核菌の増殖におけるヒアルロニダーゼ阻害剤の効果

A549 細胞を 2×10^5 /ml/穴/24 穴プレート (ファルコン社) に播種し、*M. tuberculosis* H37Rv 株を 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を 100 μ g 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 になるように添加した。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、菌液を段階希釈して 7H11-OADC 培地上に釣菌し 37° にて 20-25 日間培養後、生菌数を算定した。

C. 研究結果

ヒアルロン酸は、A549 細胞に感染した結核菌の増殖を増強する *M. tuberculosis* を A549 細胞に感染後、ヒアルロン酸を加え、経時的に菌の発育を集落形成数にてモニターすると、ヒアルロン酸の濃度依存的な菌の増殖増強が観察された。次に、ヒアルロン酸による増殖増強効果が、細胞内増殖菌に対するものか、細胞外増殖菌に対するものかを明らかにするためゲンタマイシン処理を行った。細胞外の菌を殺傷するゲンタマイシンを加えることで、結核菌の増殖やヒアルロン酸による増殖加速は、ほぼ完全に消失した。このことから、結核菌は A549 細胞に感染後、細胞表面で増殖し、ヒアルロン酸は細胞外の菌の増殖を助長させることが判明した。

結核菌はヒアルロン酸を C 源として増

殖することができる ヒアルロン酸は多糖であることから、結核菌が BCG と同様にヒアルロン酸を C 源として利用することができるかを次に検討した。C 源を含まない 7H9 培地にヒト由来ヒアルロン酸を加え、経時的に結核菌の増殖をモニターした結果、ヒアルロン酸の濃度依存的に結核菌が増殖することが分かった。ヒアルロン酸以外の GAG、すなわちヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸についても同様の試験を行なった。その結果、結核菌はヘパリンもしくはヘパラン硫酸入りの培地で増殖できず、コンドロイチン硫酸入りの培地では増殖できるが、ヒアルロン酸添加培地での増殖率に及ばないことから、結核菌は BCG 同様ヒアルロン酸を最も好んで C 源として利用することが判明した。

M. tuberculosis は HAS1 と HAS3 で合成されたヒアルロン酸を利用できる 上記の実験から結核菌が精製したヒアルロン酸を C 源として利用することが明らかとなった。次に我々は、宿主細胞が実際に産生するヒアルロン酸を利用できるか否かを検討した。ほ乳類は 3 種類のヒアルロン酸合成酵素を有しており、HAS1、HAS2、HAS3 と呼ばれる。それぞれの遺伝子を 3Y1 細胞に導入したトランスフェクタント細胞に結核菌を感染させ、感染後の菌の増殖をモニターした。その結果、結核菌は BCG と同様に HAS1 のトランスフェクタント細胞で最も顕著に増殖し、次に HAS3 のトランスフェクタント細胞で増殖したが、HAS2 のトランスフェクタント細胞では Mock トランスフェクタント細胞感染時と同様に増殖しなかった。この結果から、結核菌は HAS1 と HAS3 で合成されるヒアルロン酸を C 源として利用できるが、HAS2 によって合成されるヒアルロン酸を利用できないことが示唆された。

肺胞上皮細胞感染結核菌の増殖はヒアルロニダーゼ阻害剤により抑制される。 結核菌は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を明らかにした。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結核菌の増殖が抑制されることがわかった。

D. 考察

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／侵入することが明らかとなっていたが、我々は結核菌の A549 細胞への試験管内感染系において、菌がヒアルロン酸を介して細胞に接着／侵入することを見だし、結核領域において初めてヒアルロン酸の重要性を示した (J Biol Chem 2004)。今回更に解析を継続し、結核菌がヒアルロン酸を足がかりとする意義について検討した結果、BCG に加え、人型結核菌がヒアルロン酸を C 源として利用し増殖することを発見した。

本報告は、結核菌がヒアルロン酸分解酵素を有すること示した最初の報告である。しかしながら結核菌ゲノムにヒアルロン酸分解酵素はアノテートされておらず、他菌種のヒアルロン酸分解酵素様遺伝子も検出できていない。したがって結核菌のヒアルロン酸分解酵素は新しいタイプの酵素である可能性が高い。

我々のデータは、結核菌が利用しやすいのは BCG と同様 HAS1 と HAS3 によって合成されたヒアルロン酸であることを示唆している。HAS2 は細胞外マトリックスを形成するヒアルロン酸の合成酵素で、最も効率良く最も長いヒアルロン酸を合成する酵素である。結核菌が HAS2 で合成されたヒアルロン酸を利用できにくい理由は不明だが、大量に合成された長鎖ヒアルロン酸が高次構造を形成し菌のヒアルロン酸分解酵素が切断できない、もしくは切断に時間を要するなどの可能性が考えられる。

一方、HAS1 や HAS3 は HAS2 に比べヒアルロン酸合成能に劣り、合成されるヒアルロン酸も短い。肺における主要なヒアルロン酸合成酵素が HAS1 であることから、結核

菌はヒアルロン酸を効率良く利用し増殖に利用できることが示唆され、ヒアルロン酸は結核の増悪因子であることが示唆される。HAS1 は免疫担当細胞などが発現するヒアルロン酸合成酵素である。肺や結核病態においてどのような細胞がヒアルロン酸を合成しているかは今後の検討課題である。

ヒアルロン酸は気道における感染防御に重要な役割を担うことが示されていたが、結核領域において、その役割は未解析であった。本研究で我々は、牛型結核菌に加え、ヒト型結核菌が気道系のヒアルロン酸を利用し、己の生存/増殖に利用できることを示した。我々はヒアルロン酸が結核病変に蓄積していることも示しており、ヒアルロン酸を C 源として利用できる結核菌に生存のアドバンテージがあることを示唆している。

E. 結論

人型結核菌も、牛型結核菌と同様にヒアルロン酸を分解して C 源として利用し増殖することが判明した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirayama, Y., M. Yoshimura, Y. Ozeki, I. Sugawara, T. Udagawa, S. Mizuno, N. Itano, K. Kimata, A. Tamaru, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. *Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication*. PLoS. Pathog., 5:e1000643, 2009.
- 2) Tateishi, Y., Y. Hirayama, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Yoshimura, J. Kang, A. Shibata, K. Hirata, S. Kitada, R. Maekura, H. Ogura, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. *Virulence of Mycobacterium avium complex strains isolated from immunocompetent patients*. Microb. Pathog., 46:6-12, 2009.
- 3) Okazaki, M., K. Ohkusu, H. Hata, H. Ohnishi, K. Sugahara, C. Kawamura, N. Fujiwara, S. Matsumoto, Y. Nishiuchi,

K. Toyoda, H. Saito, S. Yonetani, Y. Fukugawa, M. Yamamoto, H. Wada, A. Sejimo, A. Ebina, H. Goto, T. Ezaki, and T. Watanabe. *Mycobacterium kyorinense* sp. nov., a novel, slow-growing species, related to *Mycobacterium celatum*, isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 59:1336-1341, 2009.

2. 学会発表

- 1) Tuberculosis, from biology to development of control strategies. 松本 壮吉、小林 和夫. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 2) 急速な臨床経過に合致した高病原性 *Mycobacterium avium-intracellulare* complex 菌株の同定. 立石善隆、平山幸雄、尾関百合子、西内由紀子、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 3) 結核菌の増殖に対するヒアルロン酸の作用. 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、菅原勇、小林和夫、松本壮吉. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 4) 生活環境に分布する *Mycobacterium avium* complex と臨床分離株の多型解析. 西内由紀子、松本壮吉、立石善隆、鈴木定彦. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 5) *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、水野淨子、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
- 6) 結核菌感染マクロファージにおける hypoxia-inducible factor-1alpha の作用機構. 岡真優子、小林和夫、松本壮吉. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 7) DNA ワクチンを用いた *Mycobacterium* DNA-binding protein 1 (MDP1) のマウス T 細胞エピトープの同定. 鈴木大介、永田年、辻村邦夫、松本壮吉. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 8) 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、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 9) 抗結核菌薬スクリーニング系の確立と実践. 尾関百合子、原田誠、西内由紀子、山本三郎、小林和夫、松本壮吉. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 10) 集団感染事例における VNTR 型と IS6110-RFLP パターンの比較. 田丸亜貴、松本壮吉. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 5 月 札幌
- 11) MLPA 法による多剤耐性結核菌の検出. 田丸亜貴、河原隆二、松本壮吉、鈴木定彦. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 5 月 札幌
- 12) 肺 *Mycobacterium avium* complex 症患者由来 *M. avium* と豚由来 *M. avium* の血清型比較. 西内由紀子、田栗貴博、松本壮吉、立石善隆、北田清悟、田丸亜貴、鈴木定彦、前倉亮治. 第 84 回日本結核病学会総会 2009 年 5 月 札幌
- 13) A ferritin superfamily-like protein in mycobacteria. Osada-Oka, M., M. Takatsuka, F. E. Sato, Y. Ozeki, M. Yoshimura, M. Inoue, K. Kobayashi, and S. Matsumoto. THE9TH AWAJI INTERNATIONAL FORUM 2009 年 9 月 淡路島
- 14) 気道ヒアルロン酸を利用した、結核菌の感染と増殖のストラテジー. 松本壮吉. 第 50 回日本熱帯医学学会大会 2009 年 10 月 沖縄
- 15) 結核菌感染における制御性 T 細胞の役割検討. 尾関百合子、菅原勇、岡真優子、小林和夫、松本壮吉. 第 62 回日本細菌学会関西支部総会 2009 年 11 月 大阪

- 16) 抗酸菌は宿主ヒアルロン酸を利用して細胞外増殖を行う. 平山幸雄、吉村満美子、尾関百合子、田丸亜貴、小倉壽、小林和夫、松本壮吉. 第62回日本細菌学会関西支部総会 2009年11月 大阪
- 17) 休眠時における抗酸菌の遺伝子発現解析. 吉村満美子、仁木誠、立石善隆、小林和夫、松本壮吉. 第62回日本細菌学会関西支部総会 2009年11月 大阪
- 18) Mycobacterial DNA-binding protein-1の新機能-鉄の酸化活性と貯蔵性. 岡真優子、高塚正樹、尾関百合子、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉. 第7回感染症沖縄フォーラム 2009年2月 沖縄
- 19) 抗酸菌の休眠誘導と遺伝子発現解析. 吉村満美子、仁木誠、岡真優子、尾関百合子、原田誠、田丸亜貴、立石善隆、西内由紀子、小林和夫、松本壮吉. 第7回感染症沖縄フォーラム 2009年2月 沖縄
- 20) 急速な臨床経過に合致した高病原性MAC菌株の同定-臨床病態と細菌学的病原性との関連. 立石善隆、西内由紀子、吉村満美子、小林和夫、前倉亮治、松本壮吉. 第7回感染症沖縄フォーラム 2009年2月 沖縄
- 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)

抗酸菌脂質の免疫認識の分子機序

分担研究報告書

研究分担者

杉田 昌彦

(京都大学ウイルス研究所・教授)

抗酸菌脂質の免疫認識の分子機序

研究分担者 杉田 昌彦（京都大学ウイルス研究所・教授）

研究要旨

抗酸菌細胞壁には、抗酸菌に固有の脂質、糖脂質群が存在し、その多くは菌の生存や病原性を規定している。近年、これらの脂質、糖脂質を認識する宿主免疫経路の存在が明らかとなり、それを利用した診断法や感染制御法が模索されている。これらの解析では小動物モデルが必須であるが、免疫研究によく活用されるマウスやラットは、この脂質特異的免疫応答システムを欠如している。そこで本研究では、ヒト脂質特異的免疫応答システムを導入、再構築したマウスモデルを作製した。さらに、このマウスにおいて、タンパク質特異的免疫応答を遺伝的に欠如したラインの樹立に成功した。これらのマウスは、結核免疫における脂質特異的免疫応答の解析に有用であり、結核の新たな診断法や感染制御法の確立に大きく貢献することが期待される。

A. 研究目的

タンパク質抗原を標的とした MHC クラス I 拘束性 CD8 陽性キラーT 細胞と MHC クラス II 拘束性 CD4 陽性ヘルパーT 細胞は、獲得免疫機構の中心的なエフェクター細胞である。結核を含め、多くの病原体に対する生体防御がこの経路を介して行われ、さらにこの経路の賦活化を目指したワクチンの開発も進められている。一方、最近の研究から、結核菌脂質を標的とした新しい獲得免疫機構の存在が明らかとなってきた。ヒトグループ 1CD1 分子 (CD1a, CD1b, CD1c) は、結核菌の宿主細胞である樹状細胞や活性化マクロファージにおいて発現し、結核菌脂質抗原を結合する。これによって活性化されたグループ 1CD1 拘束性 T 細胞群は、感染細胞のアポトーシス誘導や殺菌物質、インターフェロン γ (IFN- γ) の産生を介して結核防御に大きな役割を果たしていることが想定されているが、その実証には適切な小動物モデルが必要である。

結核免疫応答の詳細な解析に有用なマウスやラットは、グループ 1CD1 機能を欠如している。そこで本課題では、ヒト *CD1A* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス

を作製し、CD1a 分子機能をマウスにおいて再構築する試みを進めた。さらにこのマウスに MHC クラス II 遺伝子欠損を導入し、結核菌脂質特異的免疫応答を選択的かつ効率的に解析できるモデル動物を作出することを目的として研究を展開した。

B. 研究方法

CD1A Tg マウスの作製 完全長のヒト *CD1A* ゲノム遺伝子を定法に従って C57BL/6 マウス受精卵前核に注入し、CD1a Tg マウスを作製した。個体のスクリーニングは、尾より抽出したゲノム DNA を鋳型とし、ヒト *CD1A* ゲノム DNA に特異的なセンスプライマー (5' -GGA AAT ACC ATC TGC AAA TGA TAT-3') とアンチセンスプライマー (5' -CCG AAT GGT GCG TAT ACG GGA TAA-3') を用いた PCR 法により行った。また、樹立した CD1a Tg マウスを MHC class II ノックアウト (MHC-II KO) マウスと交配し、CD1a Tg/MHC-II KO マウスを得た。これらのマウスは SPF 環境下で飼育し、個々の実験には 8-12 週齢のマウスを使用した。すべての動物実験プロトコールは、当該施設の動物委員会の承認を得たのち実施された。

抗酸菌脂質の調製 結核菌 (H37Ra 株) 凍結乾燥菌体を超音波破碎後、クロロホルム：メタノール (2:1) に懸濁した。さらにクロロホルム層を回収して窒素ガス下で乾燥し、新たにクロロホルムに溶解したものを「結核菌総脂質」として使用した。また、BCG (Tokyo 172 株) 乾燥菌体をクロロホルム：メタノール (2:1)、クロロホルム：メタノール (1:1)、クロロホルム：メタノール (1:2) に順次懸濁し上清を回収した。これらの上清をまとめて乾固し、クロロホルム：メタノール (2:1) に溶解したものを「BCG 総脂質」として用いた。

組織および細胞の調整 マウス胸腺細胞、脾臓細胞は定法により調整した。マウス表皮シートおよび表皮細胞の調整においては、まず耳介を採取し、皮膚を背側面と腹側面に分離した後、37 度 1 時間ジスパーゼ酵素処理を行って、表皮シートを剥離した。さらに表皮シートを 37 度 30 分トリプシン酵素処理を施し、表皮細胞の single cell suspension を得た。骨髄由来樹状細胞については、まずマウス大腿骨より骨髄細胞を採取し、リコンビナント GM-CSF (20ng/ml) を含む培地で 3 日間培養した後、新しい培地を加え、計 6 日間培養した。引き続き 2 日毎に培地交換を計 3 回行い、最後の培地交換から 2 日後に浮遊細胞を回収し、「骨髄由来樹状細胞」として使用した。

免疫染色およびフローサイトメトリ 冷アセトン固定を施した表皮シートを 0.2% サポニン含有バッファーに浸し、透過処理を行った。さらにビオチン化抗 CD1a 抗体 (10H3) およびストレプトアビジン-FITC を室温で 30 分反応させ、免疫染色を行った。染色を終えた表皮をスライドガラス上に載せ、蛍光顕微鏡観察を行った。フローサイトメトリは定法に従い、BD FACS canto II を使用した。またデータの解析には Flowjo を用いた。

T 細胞応答の解析 ヒト T 細胞抗原受容体欠損 T 細胞株 (J. RT3) にマイコバクチン特異的 CD1a 拘束性 T 細胞 (CD8-2) 由来 T 細胞抗原受容体を再構築した細胞株 (J. RT3/CD8-2) を作製し、IL-2 産生を指標に T 細胞活性化を評価した。IL-2 の測定には市販のヒト IL-2 ELISA キット (BD)

を用いた。また、マウス脾臓細胞を樹状細胞の存在下で抗原刺激し、抗マウス IFN- γ 抗体 (AN18) 固相化プレートにおいて培養した。上清と細胞を除去した後、市販のマウス IFN- γ ELISPOT キット (MABTECH) を用いて活性化細胞数を測定した。

C. 研究結果

ヒト *CD1A* ゲノム遺伝子を C57BL/6 マウス受精卵に導入し、そこから生まれた仔 17 匹中 2 匹がゲノム中に *CD1A* 遺伝子を有していた。このうち 1 匹を野生型 C57BL/6 マウスと交配し、*CD1a* Tg マウスラインを確立した。このマウスにおいて、表皮ランゲルハンス細胞、胸腺未熟 T 細胞に局限した *CD1a* 分子の発現が観察された。また骨髄由来樹状細胞において *CD1a* 分子の発現が誘導された。以上の事実は、導入したヒト *CD1A* ゲノム遺伝子がマウス組織内で適切に発現制御を受け、ヒト個体内と同様の組織・細胞タイプ特異的な *CD1a* 発現が構築できていることを示している。また、このマウスより得た *CD1a* 陽性骨髄由来樹状細胞を抗原提示細胞とし、結核菌総脂質 (CD8-2 の認識抗原であるマイコバクチンを含む) に対する J. RT3/CD8-2 の反応を、IL-2 産生を指標として検討したところ、抗原特異的で *CD1a* 拘束性の T 細胞応答が検出された。したがって、このマウスに発現した *CD1a* 分子が脂質抗原提示機能を有していることが確認された。

次いで、この *CD1a* Tg マウスにおける抗酸菌感染応答の成立を検証する目的で、BCG 接種を行った *CD1a* Tg マウスより脾臓細胞を採取し、BCG 総脂質に対する *CD1a* 拘束性 T 細胞の存在を、IFN- γ ELISPOT 法を用いて検討した。図 1 に示すように、BCG 総脂質抗原存在下で活性化 T 細胞数の増加を認め、この応答はコントロール抗体 (RPC) では阻害を受けないが、抗 *CD1a* 抗体 (10H3) により阻害された。以上のことから、この *CD1a* Tg マウスにおいて、BCG 感染に伴い、BCG 脂質特異的 *CD1a* 拘束性 T 細胞応答が誘導されることが実証された。

しかしながら、この応答は微弱であり、詳細な解析には困難が予想された。抗酸菌感染に対する獲得免疫機構においてはタン

パク質を標的とした MHC 依存性経路と脂質を標的とした CD1 依存性経路が存在する。そこで前者を低減することにより、後者の経路が容易に検出できるのではないかと考え、この視点からの研究を開始した。CD1a Tg マウスを MHC-II KO マウスと交配し、その仔のなかから CD1a Tg マウスを選択した。さらにこの仔を MHC-II KO と交配し、その仔のなかから CD1a Tg/MHC-II KO マウスを選択した。このマウスを MHC-II KO マウスと交配することにより、安定的な CD1a Tg/MHC-II KO ラインを確立した。このマウスにおいて、脾臓での MHC クラス II 分子の発現はまったく観察されず、また骨髓由来樹状細胞は CD1a 分子を発現していた (図 2)。

D. 考察

抗酸菌感染応答の研究において、マウスモデルは大変有用であり、多くの重要な知見をもたらしてきたことは言うまでもない、しかし、グループ 1CD1 拘束性 T 細胞や Vd2 ガンマデルタ T 細胞など、ヒト結核の防御に貢献すると考えられる T 細胞群はマウスでは欠如している。CD1a Tg マウスの確立を目指した本研究は、このギャップを埋め、ヒトの免疫応答をマウスでよりよく再現しようとする試みと位置づけることができる。

さらにマウスでは、とりわけ MHC クラス II 拘束性 CD4 陽性 T ヘルパー 1 細胞が、結核防御に大きく寄与している。このマウスに CD1a 分子を介した免疫応答を上乗せしてもその効果をみることは困難であろう。この視点から、本研究ではさらに MHC クラス II 分子の機能を欠如した CD1a Tg マウス

の作製を試み、安定的なラインの作出に成功した。このことにより、結核防御や肉芽腫形成における MHC 依存性免疫経路と CD1 依存性免疫経路の相対的比重の評価が可能となり、結核免疫の新たなアспектとその分子・細胞機序が解明されることが期待できる。

E. 結論

ヒト CD1a 機能を再構築したマウスの作出に成功した。さらにこのマウスにおいて MHC クラス II 遺伝子の欠損を導入したラインを確立した。これらのマウスモデルの樹立により、結核免疫における脂質特異的免疫応答を詳細に解析するための研究基盤が確立された。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in mycobacteria. Sugita, S. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.

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

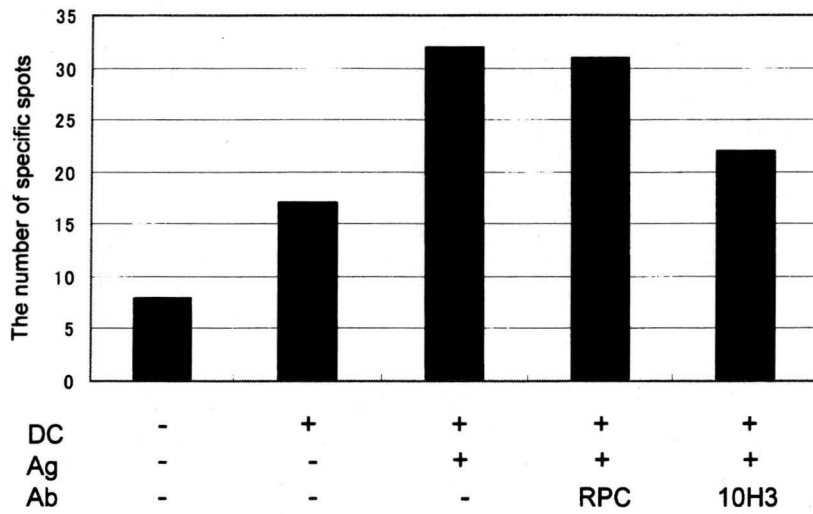


図1 BCG接種CD1a TgマウスにおけるBCG脂質特異的CD1a拘束性T細胞の検出

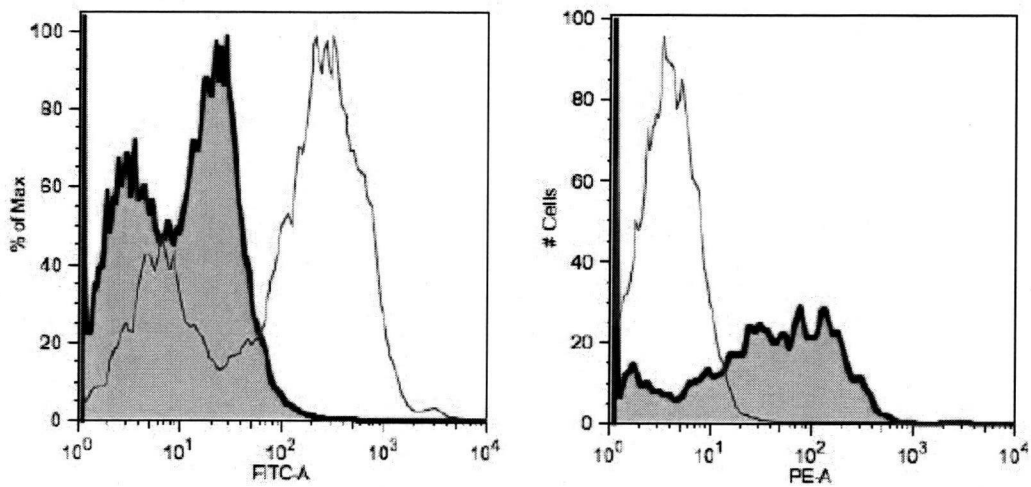


図2 CD1a Tg/MHC-II KOマウスにおけるMHCクラスII分子(左パネル、塗りつぶし)とCD1a分子の発現(右パネル、塗りつぶし)。線のみのはistogramは、野生型マウスの染色パターンを示す。