

200931006A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に
係わる分子機構に関する研究

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

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に
係わる分子機構に関する研究

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：抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に係わる分子機構に関する研究 牧野 正彦（国立感染症研究所）	1
分担研究報告書：抗酸菌感染症への新たな対応戦略の基盤となる感染病態の分子機構に関する研究 河村 伊久雄（京都大学）	11
分担研究報告書：結核菌潜伏感染の分子機構と治療・予防戦略の開発 小林 和夫（国立感染症研究所）	17
分担研究報告書：新規 BCG ワクチンの開発 牧野 正彦（国立感染症研究所）	23
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－ 田村 敏生（国立感染症研究所）	29
分担研究報告書：ワクチンの検定と結核を増悪させる病態の解析 菅原 勇（結核予防会結核研究所）	35
分担研究報告書：結核菌を含む抗酸菌の細胞壁の生合成に不可欠な遺伝子の検索と解析 荒川 宜親（国立感染症研究所）	39
研究成果の刊行に関する一覧表	45

平成21年度 厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に

係わる分子機構に関する研究

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（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

抗酸菌感染症の発症・診断・治療・新世代予防技術に係わる
分子機構に関する研究

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

結核など病原性抗酸菌感染症は、未だに地球規模で猛威を振り回している。栄養状態の改良・環境の整備により、結核の新規発症者および死亡者数は近年減少傾向を示してきていたが、その低下率は鈍化しつつある。病原性抗酸菌症の制圧には、細菌学あるいは免疫学などを主とした一元的なアプローチでは不十分であり、感染から組織破壊までの過程を総合的に理解して初めて可能となる。本研究班では、病原性抗酸菌症の診断法の開発・慢性持続性感染の誘導機構・病原性抗酸菌症の予防方策の確立に向けた基礎研究および結核の増悪因子の解析について取り組んだ。診断技術の開発・改良においては、*Mycobacterium avium complex* (MAC)の血清診断用キットを開発し、その有用性について重症度との相関をも念頭において多施設において幅広く検討し、良好な成績が得られた。また、遺伝子診断法の開発に当たっては、結核菌・種々の非結核性抗酸菌を1回の検査で鑑別する方策を開発する目的で、鑑別診断上有用となる遺伝子の同定に成功した。抗酸菌の持続潜伏感染機構の解析では、抗酸菌と宿主因子の両面から検討を加えた。菌側に因子としては正と負の二つの因子があり、特にMDP-1の発現が抗酸菌の潜伏化に深く関与していることが明らかとなった。宿主因子としては、免疫抑制性補助因子PD-1に焦点を絞り解析した。PD-1は、脾臓など免疫臓器では結核菌に対する生体防御反応を抑制する作用を有するのに対し、肺においては逆に結核菌の増殖を抑制する方向に働く可能性が示唆された。病原性抗酸菌症の発症を予防するワクチンの開発を目指し、BCGの改良を昨年引き続き行った。CD4陽性T細胞を活性化するためには、BCGのウレアーゼ除去が有効であり、CD8陽性T細胞を活性化するためには、BCGにHSP70-MMP-II融合遺伝子を導入することが有効であったため、その両者を組み合わせ新しいリコンビナントBCG (BCG-D70M)を作製した。BCG-D70Mは、これまで作製した全てのリコンビナントBCGに比し、最も強く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 の産生を誘導することが可能であった。小動物を用いたワクチン効果の検証が急がれる。高齢者の結核の発症を予防するためには、結核菌の再燃と同時に細胞傷害活性を有するCD8陽性キラーT細胞が産生される必要がある。そのため、未感作CD8陽性T細胞から一旦実効型のCD8陽性キラーT細胞を活性化し、その後にメモリーT細胞へと分化誘導する必要があるが、そのためには抗原提示を司る樹状細胞上に未知なる分子の誘導が求められる。本分子に関する解析を進め、T細胞から産生されるIL-17Fが樹状細胞の活性化に極めて重要であることが明らかとなった。結核を悪化させる増悪因子として、糖尿病が重要と想定される。糖尿病と結核の関係について、結

核患者の臨床像を解析し一定の成果が上がった。

研究分担者

河村 伊久雄 (京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・准教授)
小林 和夫 (国立感染症研究所・免疫部・部長)
田村 敏生 (国立感染症研究所・病原微生物部・室長)
菅原 勇 (結核予防会結核研究所・研究主幹)
荒川 宜親 (国立感染症研究所・細菌第二部・部長)

A. 研究目的

結核菌を代表とする病原性抗酸菌は、多くの人々に潜伏感染しており、強い恐怖を与え続けている慢性持続性感染症である。以前は、高齢化とともに出現する細胞性免疫機構の低下に伴い再活性化した結核菌により発症する例が中心であったが、近年では強毒株によるアウトブレイクを引き起こす新規感染による発症も非常に多く観察されている。特筆すべきは、両ケース共に BCG ワクチン接種を受けているにも関わらず発症することにある。つまり、ワクチン接種を受けているにも関わらず結核菌は慢性潜伏化し、老齢化とともに宿主を倒す。さらに、細胞性免疫機構が十分保たれている青年期においても、BCG ワクチンは結核菌を有効に生体外へ排除できない。こうした現象は、診断・治療・予防の全ての分野において、より一層の科学の進展が必要であることを指し示している。本研究班では、こうした諸問題に対峙するため、焦点を絞り研究を推進した。第一は、より良い診断法の開発である。環境菌であるが故に診断が難しい非結核性抗酸菌の血清診断法の研究と、結核菌や非結核性抗酸菌を迅速に診断し得る遺伝子診断法の開発を目指した。何れも臨床応用が可能で、キットとして樹立し得るものである。第二は、抗酸菌の潜伏化・慢性化を誘導する菌の因子と宿主の因子の同定である。抗酸菌を生体外排除することなく潜伏化させてしまう宿主因子は何か、また、その因子を活性化する菌の因子は何かを明らかにすることを目的とした。こうした機序が明らかになれば、ワクチンが有さなければならない新たなファクターの同定にも繋がる。第三は、予防方策の開

発である。強毒型によるアウトブレイクを引き起こす結核菌に対処するためには、より強力な初回免疫ワクチンが必要で、BCG に改良を加えることでアウトブレイクを避ける方策を樹立したい。一方、高齢者に多い結核菌の再燃による農村型結核の発症予防には、CD8 陽性キラー T 細胞の役割が重要である。未感作 CD8 陽性 T 細胞を効率的に活性化し、細胞傷害活性を有する実効型の CD8 陽性 T 細胞を産生し、その後にメモリー T 細胞にまで分化させるために有効な分子の解析に取り組んだ。第四の目的として、結核の病像を悪化させる因子として糖尿病に着目し、糖尿病が何故結核を増悪させるのか、その責任因子は何か、また、多くの結核症例を対象に臨床的解析を加え、果たして糖尿病が真に危険因子であるか明確化させることを目的とした。

以下に主な研究課題を挙げる。

1. 結核菌感染に伴い活性化した CD4 陽性 T 細胞の脱活性化を誘導する分子機構の解析 (河村)
2. MAC 細胞壁表層に発現する GPL を用いた血清診断用キットの確立のための多施設間評価および結核菌の潜伏化を誘導する菌側因子の同定 (小林)
3. ヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を強く活性化する新規リコンビナント BCG の作製 (牧野)
4. 細胞障害活性を有する実効型 CD8 陽性 T 細胞を容易に作製するメモリー CD8 陽性 T 細胞を産生する分子機構の解明 (田村)
5. 結核菌および主要非結核性抗酸菌を鑑別診断する遺伝子領域の同定とそれを用いた鑑別診断用キットの作製 (荒川)

6. 結核病変増悪化因子としての糖尿病の果たす役割解明と病変悪化機構の解析 (菅原)

B. 研究方法

1. C57BL/6 および PD-1 欠損マウスに結核菌を経鼻感染させ、その後の肺および脾臓の菌数の変化並びのマウスの生存率を測定した。結核菌感染後の肺胞内細胞を分離し、ケモカイン等の産生能を検討した (河村)。
2. MAC 感染症の血清診断に関し、アメリカ合衆国胸部疾患学会・感染症学会の診断基準 (2007 年) に合致したヒト肺 MAC 感染症、無症候性 MAC 感染、肺結核、その他の疾患 (慢性閉塞性肺疾患など) および正常健常者由来治療前血清を用い、MAC 特異的 GPL 核抗原に対する IgA 抗体を酵素抗体法により測定した。さらに、潜伏化を誘導する分子 MDP-1 の血清中の抗体価を測定した (小林)。
3. *UreC* 遺伝子を除去した BCG- Δ UT-11-3 にらい菌の主要抗原 MMP-II をコードする遺伝子の上流に BCG 菌由来 HSP70 遺伝子を連結し組み込ませることで、HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌する新規リコンビナント BCG (BCG-D70M) を作製した。BCG-D70M の樹状細胞を介したヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の活性化能を IFN- γ の産生を指標に解析した。BCG-D70M の CD8 陽性 T 細胞活性化機構を Chloroquinin, Brefeldin A, Lactacystin を用いて解析した (牧野)。
4. 結核菌分泌タンパク Ag85B の抗原性を規程するペプチド Peptide-25 (P25) と P25 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) を用いて、抗原刺激により活性化する転写因子を DNA マイクロアレイを用いて探索した。さらに、P25 TCR-Tg マウス由来 CD4 陽性 T 細胞と樹状細胞を用い、T 細胞から産生されるサイトカインを同定した (田村)。

5. *Mycobacterium avium* complex (MAC)、*M. kansasii* および結核菌群の迅速鑑別遺伝子診断ならびにこれらの菌の伝播ルート解析に用いるため、IS1642 を用いて Genotyping を行った。また、結核菌に対する新規薬剤開発のため、機能未知遺伝子 Rv2613 の機能解析を行った (荒川)。
6. 結核の増悪因子として糖尿病の重要性を明らかにするため、2008~2009 年の 1 年間に中国上海市で新規に結核と診断された 2,141 名に関し、糖尿病合併率・多剤耐性菌の出現率・再発率について検討した (菅原)。

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. 獲得免疫を司る T 細胞の活性化を抑制するシグナル PD-1 をノックアウトした遺伝子改変マウスに結核菌を経鼻的に感染させ、予後、肺病変の病理学的解析、肺胞に集積した細胞のケモカイン・サイトカインの産生能を検討した (河村)。
2. 血清抗 GPL 核抗体価は肺 MAC 感染症において、他の肺疾患および正常健常者に比し有意に高値を示した ($p < 0.0001$)。また、6 医療機関から得られた成績は、MC 感染症は、感度、特異度ともに良好であった。結核菌潜伏感染を同定する目的で、活動期肺結核患者・治療終了

後結核患者の血清中の抗 MDP-1 抗体および CFP-10 抗体を測定した (小林)。

3. BCG-D70M は、これまでに作製した種々のリコンビナント BCG に中で、最も強く CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を活性化し、IFN- γ を誘導した。同時に、樹状細胞を強く活性化し、IL-12p70 の産生を誘導した。また、マクロファージを介しても CD4 陽性 T 細胞を活性化した。これらの T 細胞の活性化は、BCG-D70M が分泌する HSP70-MMP-II 融合タンパクに依存していた (牧野)。
4. T cell receptor (TCR) を介した抗原刺激によりタイプ 1 T 細胞を選択的に活性化する新規転写因子として TATA box binding protein associated factor (TAF)7 を同定した。さらに、樹状細胞を介しナイーブ CD8 陽性 T 細胞から killing activity を有する実効型 CD8 陽性 T 細胞の分化誘導に重要な役割を果たす因子として IL-17F を同定した (田村)。
5. IS1642 は、菌株の数回の継代培養によりゲノム上の転移を獲得することにより、MAC の伝播ルートの解明に有用な遺伝子であることが判明した。Rv3789 と Rv3783 遺伝子を用いることにより結核菌・*M. kansasii* と MAC の鑑別診断が可能であった。さらに、結核菌の Rv2613 遺伝子をノックアウトすると結核菌の増殖が低下することから、本遺伝子領域は新規抗結核菌薬のターゲットになり得ることが判明した (荒川)。
6. 新規に肺結核と診断された結核患者の 9.5% に糖尿病が合併しており、糖尿病合併肺結核患者では、多剤耐性菌の出現率・再発率はともに非合併肺結核患者に比し高値を示した (菅原)。

D. 考察

近年欧米で実施された臨床治療実績により、肺胞内にインターフェロンガンマ (IFN- γ) を吸入投与し、肺内および所属リンパ節の IFN- γ を高濃度に保てば、結核菌の生体外排除を早期に誘導可能であるこ

とが判明した。このことは、結核菌がエアロゾル感染し肺胞または所属リンパ節に達した際、ワクチン等により産生されたメモリー T 細胞が有効に作用し、大量の IFN- γ を産生することが可能であれば、結核菌の生体外排除を誘導し得ることを示唆している。一方で、CD8 陽性キラー T 細胞が結核菌の殺戮に重要な働きをすることも古くから報告されている。したがって、結核菌に対し迅速かつ強く反応するメモリー T 細胞を効率的に産生し維持することは、結核菌に対する生体防御反応の一つとして極めて重要な位置を占める。その一方で、PD-1 を介した免疫抑制性シグナルは、脾臓等においては結核菌の生体外排除を阻止し、結核菌の持続感染または潜伏感染を誘導する。しかし、PD-1 分子のカウンターレセプターである PD-L1 は結核菌感染初期においては、抗原提示細胞に発現し T 細胞の活性化を誘導する。さらに、肺内においては PD-1/PD-L1 のシグナル伝達はむしろ抗菌的に作用する。このことは、肺内は免疫学上極めて特殊な臓器であり、T 細胞の活性化とこれを阻止する種々の因子が極めて複雑に相互作用していて、さらには、結核菌感染後の時間的推移により、その様相を変化させている可能性も考えられる。同時に、T 細胞がアレルギー的に過度に活性化されると、むしろ組織破壊を進行させる。CD8 陽性 T 細胞の活性化においても、結核菌を殺戮可能な実効型キラー T 細胞から分化したメモリー T 細胞の産生には、IL-17F を介し抗原提示細胞上に未知なる分子の発現が求められることが明らかになった。本年度の研究においては、初回免疫用ワクチンとして改良型 BCG の作出に成功している。本リコンビナント BCG は、CD4 陽性 T 細胞を活性化する因子と、CD8 陽性 T 細胞を活性化する因子の両者を組み合わせたものであり、事実これまでに作製された全てのリコンビナント BCG の中で、最も強く CD4 陽性 T 細胞も CD8 陽性 T 細胞も活性化可能であり、超大量の IFN- γ の産生を可能とした。前述の IFN- γ の吸入療法を経験を考えれば一定の成果が上がったと言える。結核の制圧は予防法の樹立の

みでは不可能であり、増悪因子の除去・有効な早期診断法の開発・新規治療薬の開発が必要不可欠である。牛歩ではあるが、これらの諸問題においても成果が上がりつつある。

E. 結論

主要病原性抗酸菌の迅速遺伝子診断法の開発および非結核抗酸菌症の血清診断キットの確立に一定の成果が上がった。ヒト未感作 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を同時に活性化する BCG の開発に成功した。実効型 CD8 陽性 T 細胞産生分子機構の一端が明らかとなった。結核の増悪化を防ぐ一方策として糖尿病のコントロールが重要であることが判明した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, Y., T. Tamura, M. Matsuoka, and M. Makino. 2009. 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.
- 2) Mukai, T., Y. Maeda, T. Tamura, M. Matsuoka, Y. Tsukamoto, and M. Makino. 2009. 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.
- 3) Fukutomi, Y., Y. Maeda, M. Matsuoka, and M. Makino. 2009. Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophages. *Jpn. J. Leprosy*, 78: 7-16.
- 4) Makino, M., Y. Maeda, M. Kai, T. Tamura, and T. Mukai. 2009. 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.
- 5) Hatta, M., M. Makino, Ratnawati, Mashudi, Yadi, M. Sabir, N. Tandirogang, L. M. M. Rusyati, M. Kai, Y. Fukutomi, Y. Miyamoto, T. Mukai, and Y. Maeda. 2009. Detection of serum antibodies to *M. leprae* Major Membrane Protein-II in leprosy patients from Indonesia. *Leprosy Review*, in press.
- 6) 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. 2009. Virulence of *Mycobacterium avium* complex strains isolated from immunocompetent patients. *Microb. Pathog.*, 46: 6-12.
- 7) 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. 2009. Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. *PLoS Pathog.*, 5: e1000643.
- 8) Kurenuma, T., I. Kawamura, H. Hara, R. Uchiyama, S. Daim, S. R. Dewamitta, S. Sakai, K. Tsuchiya, T. Nomura, and M. Mitsuyama. 2009. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to activation of caspase-1 via induction of potassium ion efflux in infected macrophages. *Infect. Immun.* 77: 3992-4001.
- 9) Mori, S., K. Shibayama, JI. Wachino, and Y. Arakawa. 2010. Purification and molecular characterization of a novel diadenosine

- 5', 5' ' ' -P¹, P⁴-tetrphosphate phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Protein Expr. Purif., 69: 99-105.
- 10) Mori, S., K. Shibayama, JI. Wachino, and Y. Arakawa. 2010. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the diadenosine 5', 5' ' ' -P¹, P⁴-tetrphosphate phosphorylase of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Acta Crystallogr. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun., in press.
- 11) Sugawara, I., T. Udagawa, T. Aoki, and S. Mizuno. 2009. Establishment of a guinea pig model of latent tuberculosis with GFP-introduced *M. tuberculosis*. Tohoku J. Exp. Med., 219: 257-262.
- 12) Zhang, Q., H. Xiao, and I. Sugawara. 2009. Tuberculosis complicated by diabetes mellitus at Shanghai pulmonary hospital, China. Jpn. J. Infect. Dis., 62: 390-391.
- 13) Sugawara, I. 2009. Why does tuberculosis lead to specific inflammation? Jpn. J. Leprosy, 78: 263-269.
- 14) Sugawara, I., J. Zhang, and C. Li. 2009. Cross-resistance of *M. tuberculosis* isolates among streptomycin, kanamycin and amikacin. Ind. J. Exp. Biol., 47: 520-522.
2. 学会発表
- 1) Tamura, T., Y. Shimohakamada, M. Makino, and K. Takatsu. The role of T cell receptor-mediated signals in Th1 subset differentiation of naïve CD4+ T cells primed with Peptide-25 of Ag85B. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 2) Mukai, T., Y. Maeda, Y. Miyamoto, and M. Makino. Identification of Strong Mycobacterial Promoters from Mycobacteriophage TM4. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 3) Miyamoto, Y., and M. Makino. Biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 4) Fukutomi, Y., Y. Maeda, and M. Makino. Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages and expression of ER stress proteins in the cells. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 5) Maeda, Y., Y. Fukutomi, H. Wang, T. Tamura, and M. Makino. The fate of mycobacteria in human dendritic cells and macrophages. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 6) Kawamura, I., S. Sakai, and M. Mitsuyama. US-Japan cooperative medical science program. PD-1-dependent signal impairs protective T cell response in chronic *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.

- 7) 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. *Mycobacterium avium* complex における glycopeptidolipid 生合成遺伝子群の転写制御解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 8) 甲斐雅規, 藤原永年, 宮本友司, 向井徹, 矢野郁也, 牧野正彦. BCG 菌ミコール酸のサブクラス合成遺伝子の解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 9) 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. *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. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 10) 前田百美, 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. Evaluation of exosomes derived from *Mycobacterium leprae* infected dendritic cells. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 11) 大崎敬子, 甲斐雅規, 米澤英雄, 牧野正彦. *Helicobacter pylori luxS* 変異株の外膜蛋白の解析. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 12) 福富康夫, 前田百美, 牧野正彦. 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. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 13) 下袴田陽子, 田村敏生, 牧野正彦, 高津聖志. 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. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 14) 甲斐雅規, 中田 登, 松岡正典, 椎名隆, 猪子英俊, 牧野正彦. らい菌 Thai53 ゲノム由来新規 SNPs の探索. 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) 向井 徹, 宮本友司, 前田百美, 牧野正彦. らい菌蛋白調整に用いる発現用プロモーターの同定. 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) 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. Major membrane Protein-II を用いた血清診断法. 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
- 17) 田村敏生, 福富康夫, 牧野正彦. 結核・ハンセン病に対するワクチンの開発研究の最前線. (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
- 18) Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, D. Begum, Y. Yoshida-Okamoto, K. Shinjo, A. Kariyone, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. The influence of CD11c⁺ lung cells in induction of mycobacterial Ag-specific Th1 response to the lung. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 2009 年 12 月 大阪
- 19) Dewamitta, S. R., 野村卓正, 原英樹, 土屋晃介, 暮沼武士, 申艶那, S. Daim, 酒井俊祐, 屈慧新, 山本武司, 河村伊久雄, 光山正雄. LL0-dependent entry of *Listeria monocytogenes* into cytoplasm is essential for calcium dependent calpain activation and IL-1 α secretion in infected macrophages. 第 20 回日本生体防御学会学術総会 2009 年 7 月 東京
- 20) 野村卓正, 申艶那, 土屋晃介, 原英樹, 酒井俊祐, 屈慧新, 河村伊久雄, 光山正雄. マクロファージのリステリア貪食能の TLR2 シグナルによる増幅. 第 20 回日本生体防御学会学術総会 2009 年 7 月 東京
- 21) Yanna, S., T. Nomura, K. Tsuchiya, H. Hara, S. Sakai, H. Qu, S. Daim, S. R. Dewamitta, T. Yamamoto, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. TLR2-dependent signal is involved in the efficient

- phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by macrophages. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月 大阪
- 22) Tsuchiya, K., H. Hara, T. Nomura, S. D. Dewamitta, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. Mechanism of the inflammasome activation upon infection with *Listeria monocytogenes*. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月 大阪
- 23) Hara, H., K. Tsuchiya, I. Kawamura, T. Yamamoto, T. Nomura, and M. Mitsuyama. LLO participates in caspase-1 activation in *Listeria monocytogenes*-infected macrophages via induction of IFN- β production. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月 大阪
- 24) Dewamitta, S. R., I. Kawamura, H. Hara, R. Uchiyama, S. Daim, S. Sakai, K. Tsuchiya, T. Nomura, and M. Mitsuyama. RD1 locus in *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to the activation of caspase-1 via induction of potassium efflux in infected macrophages. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月 大阪
- 25) Nomura, T., S. R. Dewamitta, H. Hara, K. Tsuchiya, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. Bacterial cytoplasmic entry-inducing intracellular calcium signaling is required for IL-1 α/β production in *Listeria monocytogenes*-infected macrophages. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月 大阪
- 26) Sakai, S., I. Kawamura, K. Tsuchiya, T. Okazaki, and M. Mitsuyama. The PD-1:PD-L1 coinhibitory pathway is a critical determinant of host resistance to pulmonary tuberculosis. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月 大阪
- 27) 松本壮吉、小林和夫. Tuberculosis, from biology to development of control strategies (シンポジウム). From the functions of a protein to molecular pathogenesis of mycobacteria (国際シンポジウム). 第82回日本細菌学会総会 2009年3月 名古屋
- 28) 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. 抗酸菌感染症研究における新たな視点 (ワークショップ15). 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. 第82回日本細菌学会総会 2009年3月 名古屋
- 29) 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. 抗酸菌感染症研究における新たな視点 (ワークショップ15). 結核菌の増殖に対するヒアルロン酸の作用. 第82回日本細菌学会総会 2009年3月 名古屋
- 30) 大原直也、岡部真裕子、吉村満美子、尾関百合子、中山浩次、小林和夫. 抗酸菌感染症研究における新たな視点 (ワークショップ15). BCGにおけるチミジル酸合成酵素 ThyX の意義. 第82回日本細菌学会総会 2009年3月 名古屋
- 31) 岡部真裕子、大原直也、山本三郎、小林和夫. BCG Tokyo 172-I型および-II型における sliding 能の差異. 第82回日本細菌学会総会 2009年3月 名古屋
- 32) 岡 真優子、小林和夫、松本壮吉. 結核菌感染マクロファージにおける hypoxia-inducible factor-1 α の作用機構. 第82回日本細菌学会総会 2009年3月 名古屋
- 33) 仁木 誠、吉村満美子、小林和夫、松本壮吉. 抗酸菌の薬剤感受性における MDP1 の調節機構の解析. 第82回日本細菌学会総会 2009年3月 名古屋
- 34) 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. 抗結

核薬スクリーニング系の確立と実践.
第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3
月 名古屋

- 35) 森茂太郎、柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親. 結核菌由来新規 diadenosine
5',5''-P¹,P⁴-tetrphosphate 加リン
酸分解酵素の結晶構造解析. 日本農芸

化学会 2010 年度大会 2010 年 3 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

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

抗酸菌感染症への新たな対応戦略の基盤となる感染病態の

分子機構に関する研究

分担研究報告書

研究分担者

河村 伊久雄

(京都大学・准教授)

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）
分担研究報告書

抗酸菌感染症への新たな対応戦略の基盤となる感染病態の分子機構に関する研究

研究分担者 河村伊久雄（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・准教授）

研究協力者 酒井 俊介（京都大学大学院医学研究科・微生物感染症学・研究生）

研究要旨.

抑制性補助因子である PD-1 は、その特異的リガンドである PD-L1 との会合を介して T 細胞の活性化を抑制することが知られている。昨年度、BCG を用いた感染実験系で、この PD-1 シグナル経路の活性化が BCG 感染後に誘導され、その結果感染後期の抗原特異的 T 細胞機能が抑制されることを明らかにした。さらに、これが菌の長期生存を可能にする原因となることが考えられた。そこで本年度は、結核菌感染モデルを用いて PD-1 経路の関与について解析した。結核菌 H37Rv を Wild type (WT) および PD-1 欠損マウスに感染させたところ、PD-1 欠損マウスは感染後早期に全例死亡した。また、WT マウスと比較して PD-1 欠損マウスの肺では著しい菌数の増加が認められた。さらに、PD-1 欠損マウスの肺ではマクロファージおよび好中球を中心とした炎症細胞の著明な浸潤と、壊死を伴う炎症性病変が観察された。また、各種炎症性サイトカインおよびケモカイン産生の亢進が認められた。以上の結果から、PD-1 経路は結核菌感染後の肺における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ることが示唆された。

最近、IL-1R を介したシグナルが、結核に対する防御免疫に重要であることが示されている。また、これまでの結核菌感染後の IL-1 β 産生誘導機序の解析から、ASC と NLRP3 が結核菌感染後の caspase-1 活性化および IL-1 β の成熟化や分泌に重要な役割を果たすことが示されている。そこで ASC、NLRP3 あるいは caspase-1 欠損マウスに結核菌を感染させたところ、ASC 欠損マウスの生存率のみが感染 4 週目以降に著しく減少した。また、PD-1 欠損マウスと同様に、ASC 欠損マウスの肺では結核菌数の著明な増加とマクロファージを中心とした強い炎症性細胞の浸潤が観察された。caspase-1 や NLRP3 欠損マウスの結核菌に対する抵抗性は WT と同程度に維持されていたことから、ASC は caspase-1 の活性化以外に結核菌に対する感染防御の発現に重要な役割を果たしていることが示された。

A. 研究目的

結核菌は感染しても多くの場合結核を発症せず、そのまま長期間に渡り体内で生存し続ける。高齢化、栄養不良、糖尿病あるいは HIV 感染などにより宿主の抵抗性が低下すると感染した菌が再び増殖し、結核を発症する。一方、結核菌が感染した宿主では、感染数週間後には抗原特異的 Th1 型 T 細胞が誘導され、防御免疫が発現する。し

かし、防御免疫が発現しても菌の増殖を抑えることはできるが、菌を体内から排除することは容易ではない。結核を撲滅するためには、この結核菌が有する宿主防御免疫に抵抗するメカニズムを明らかにすることが必要であり、そこから得られた知見は必ず新たな治療法や予防法の開発に有益な情報となる。

抑制性補助因子である PD-1 は、その特異

的リガンドである PD-L1/2 との会合を介して T 細胞レセプターからのシグナル伝達を阻害し、T 細胞の活性化を抑制することが知られている。この抑制経路は、self-tolerance に関与し、自己免疫病の発症を抑えるための重要な役割を果たしている。BCG 感染においても PD-L1 の発現が上昇する感染 3 週間目以降に PD-1 経路の活性化が認められ、感染抵抗性 T 細胞の機能が阻害されることが示された。この PD-1 シグナル経路による T 細胞機能の抑制は、感染後の過剰な炎症反応をおさえるための防御反応であると考えられる。しかし、BCG 感染では感染 3 週間目以降でも臓器内に菌が存在することから、この時期の T 細胞機能の低下が逆に菌の生存を可能にする要因になっているものと考えられた。また、この抑制性シグナル経路を適切に制御することで、防御免疫やワクチンの効果を亢進させることが可能になると考えられた。

昨年度は BCG を用いて解析を行ったが、BCG はヒトに病原性を示さないワクチン株であり、病原性を有する結核菌の感染でも同様に PD-1 経路が防御免疫の発現調節に関与するか否かは今のところ明らかではない。そこで本年度は、BCG 感染実験で得られた成績を踏まえて、結核菌のマウス感染モデルを用いて、感染後に誘導される免疫応答の制御に PD-1/PD-L1 シグナル経路が関与するか否かについて解析を行った。

最近、IL-1R を介したシグナルが結核に対する感染防御に重要であることが示されている。また、結核菌刺激後の IL-1 β 産生には caspase-1 の活性化が必要であり、その活性化には ASC と NLRP3 が重要な役割を果たすことが明らかとなっている。そこで本研究では、caspase-1、ASC および NLRP3 欠損マウスに結核菌を感染させ、それらの感染抵抗性および感染経過についても解析を行った。

B. 研究方法

結核菌感染実験

C57BL/6 (wild type) および PD-1、caspase-1、ASC、NLRP3 欠損マウスに結核

菌(300 cfu)を経鼻感染させ、その後のマウスの生存数を調べた。さらに、感染後経時的に肺、脾臓および肝臓を採取し、各臓器中の結核菌生菌数を測定した。また、感染 3-4 週目に肺を採取し、その肉眼所見を比較した。さらに、HE 染色および Ziehl-Neelsen 染色を施して、炎症の程度および菌数変化を観察した。肺内への炎症性細胞の浸潤を調べるため、感染後経時的に採取した肺をコラゲナーゼ処理した後、回収された細胞の表面抗原を FACS で解析した。

サイトカインおよびケモカイン産生応答

結核菌感染後経時的に WT および各種欠損マウスの肺を採取し、ホモジネートを作製した。ホモジネート中の各種サイトカイン量を ELISA で測定した。また、感染後経時的に採取した肺より RNA を抽出し、各種ケモカインの発現量を real-time RT-PCR で解析した。さらに、感染マウスの肺における抗原特異的 Th1 型 T 細胞の誘導を明らかにするため、感染後経時的に肺より T 細胞を回収し、抗原提示細胞と共に特異的ペプチド抗原で刺激し、産生される IFN- γ 量を ELISA で測定した。

IL-17 中和実験

WT および PD-1 欠損マウスに結核菌を経鼻感染させた。感染 15 日目より 2 日毎に IL-17 に対する中和抗体を 3 回腹腔内投与し、感染 21 日目に肺における菌数およびマクロファージや好中球の肺への浸潤の程度について解析した。

倫理面への配慮

本研究は、マウスを用いた感染動物実験を含み、実験は京都大学動物実験指針に基づいて行われた。

C. 研究結果

I. PD-1 シグナル経路の役割

結核菌感染後の WT および PD-1 欠損マウスの生存率と臓器内菌数

結核菌感染後 250 日を経過しても WT マウスに死亡例は認められなかった。しかし、

PD-1 欠損マウスは感染 50 日後には全例死亡した。感染 32 日後、WT マウスの肺には目立った所見は見当たらなかったが、PD-1 欠損マウスの肺には多数の病変部位が認められた。肺組織切片を HE 染色して観察したところ、感染後 21 日目の WT マウス肺には炎症性細胞の浸潤を伴う肉芽腫様の炎症像が認められ、感染後 32 日目にも同様の所見が観察された。一方、PD-1 欠損マウスの肺では、感染後 21 日目より広範な炎症像が認められ、感染 32 日目にはその範囲がさらに拡大し、中心部にネクロシスを伴う炎症像が観察された。また、感染 32 日目の肺を Ziehl-Neelsen 染色して観察したところ、WT マウスの肺に比較して PD-1 欠損マウスの肺には多数の結核菌が認められた。

WT マウスと PD-1 欠損マウスの肺では感染後の病変形成および細胞浸潤に著しい違いが認められたので、結核菌感染後経時的に浸潤細胞数を調べるとともにその分類を行った。WT および PD-1 欠損マウスの肺では、感染後 14 日目から 21 日目にかけて浸潤してくる細胞数の増加が認められ、その数は PD-1 欠損マウスの肺で明らかに多いことが示された。浸潤してくる細胞の種類を解析したところ、B 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞数には目立った変化は認められなかった。しかし、 $\alpha\beta$ T 細胞数は PD-1 マウスの方が有意に多いことが明らかとなった。また、PD-1 欠損マウスの肺ではマクロファージおよび好中球の著明な増加が認められ、特にマクロファージは全浸潤細胞の半数以上を占めることが明らかとなった。

サイトカイン産生応答

これまでの解析から、PD-1 欠損マウスの肺では結核菌感染を引き金として強い炎症反応が誘導されるものと考えられた。そこで、結核菌感染後経時的に WT と PD-1 欠損マウスの肺ホモジネートを調製し、肺におけるサイトカイン産生を調べた。感染後 21 日から 27 日目にかけて IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A および IL-6 産生誘導が認められた。これらサイトカイン産生はいずれも WT に比べて PD-1 欠損マウスで高値を示した。一方、抑制性サイトカインである IL-10 産生につい

ては WT と PD-1 欠損マウスの間で明らかな差は認められなかった。この結果、PD-1 欠損マウスでは、感染後に強い炎症性サイトカイン産生を伴う炎症反応が誘導されていることが明らかとなった。

さらに、PD-1 欠損マウスでは結核菌感染後にマクロファージや好中球の著しい浸潤がみられたことから、肺におけるケモカイン産生が WT よりも PD-1 欠損マウスで亢進していることが予想された。そこで、感染後経時的に肺における各種ケモカイン mRNA 発現量を real-time RT-PCR で調べた。その結果、Ccl11 (KC)、Ccl12 (MCP-1)、Ccl13 (MIP-1a)、Ccl15 (RANTES)、Ccl11 (Eotaxin)、Cxc12 (MIP-2)、Cxc19 (MIG)、Cxc110 (IP-10) のいずれの発現も WT より PD-1 欠損マウスの方が高く、感染後 17 日目から 28 日目にかけて著しい発現の上昇が認められた。

最近、炎症反応の惹起に IL-17 が関与することが明らかにされている。また、本研究成績でも、IL-17A 産生が WT マウスよりも PD-1 欠損マウスの肺で高いことが示されたことから、PD-1 欠損マウスでみられる強い炎症反応には IL-17 が関与する可能性が考えられた。そこで、結核菌感染後、IL-17 に対する中和抗体をマウスに投与し、その後の肺内生菌数と細胞浸潤への影響を調べた。その結果、抗 IL-17 抗体は産生された IL-17 を完全に中和することができたが、PD-1 欠損マウスの肺でみられる菌数の増加や細胞浸潤を抑制することはできなかった。この結果から、IL-17 は、PD-1 欠損マウスの肺における炎症反応には関与しないことが示唆された。

WT および PD-1 欠損マウス肺において、結核に対する防御免疫に関与する Th1 および Tc1 細胞の出現を調べるため、結核菌感染後経時的に肺より T 細胞を回収し、抗原提示細胞存在下に ESAT-6₁₋₂₀ (CD4⁺ T 細胞エピトープ) や TB10.4₃₋₁₁ (CD8⁺ T 細胞エピトープ) で刺激後の IFN- γ 産生量を測定した。その結果、CD4⁺ T および CD8⁺ T 細胞の IFN- γ 産生は感染 17 日目以降に認められ、17 日目および 21 日目の IFN- γ 産生量はいずれも

PD-1 欠損マウスで有意に高いことが明らかとなった。この結果から、PD-1 欠損マウスの肺ではより早期に抗原特異的 T 細胞が誘導されることが示された。

II. 抗結核感染防御における ASC の重要性

結核菌感染後の WT および ASC、NLRP3、caspase-1 欠損マウスの生存率と臓器内菌数

結核菌感染後 10 週間に渡り、WT、ASC、NLRP3、および caspase-1 欠損マウスの生存率を調べた。その間、WT、caspase-1 欠損マウスおよび NLRP3 欠損マウスに死亡は認められなかった。しかし、ASC 欠損マウスは感染 4 週目以降徐々に死亡数が増加し、感染 10 週目の生存率は 20%以下であった。また、結核菌感染後の脾臓および肝臓の臓器内菌数は感染後 1-7 週にかけて増加したが、WT と caspase-1 欠損マウスおよび ASC 欠損マウスの間に違いは認められなかった。また、WT と caspase-1 欠損マウスの肺における菌数の経時的変化にも違いはなかった。しかし、ASC 欠損マウスの肺では感染 3 週目以降に菌数の著明な増加が観察された。さらに、感染 30 日後の WT および caspase-1 欠損マウスの肺には目立った変化はなかったが、ASC 欠損マウスの肺では多数の病変部位が認められた。

結核菌感染後の肺内浸潤細胞の解析

結核菌感染後経時的に肺内に浸潤する細胞を解析した。WT および caspase-1 欠損マウスの肺では、感染後の時間経過とともに浸潤してくる細胞の数が同程度に増加した。一方、ASC 欠損マウスの肺では感染 7 日目以降にマクロファージおよび好中球を中心とした著しい細胞の浸潤が認められた。

D. 考察

本研究では、結核菌感染後の防御免疫誘導における PD-1 シグナル経路の役割について解析を行った。WT マウスと PD-1 欠損マウスに結核菌を経鼻感染したところ、WT マウスは感染後 250 日を経過しても全例生

存していたが、PD-1 欠損マウスは肺における菌数の著明な増加を特徴として感染後約 1 ヶ月で全例死亡した。肺の組織染色から、PD-1 欠損マウスの肺では中心部の壊死を伴う広範な炎症反応が起きており、マクロファージを中心とする細胞の広範な浸潤が誘導されていることが示された。また、PD-1 欠損マウスでは感染 14 日目以降に炎症性サイトカインやケモカインの産生が強く誘導されていたことから、PD-1 経路が肺における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るものと考えられた。

PD-1 は抑制性補助因子である PD-L1 のレセプターであり、PD-1 を介したシグナルが T 細胞抗原受容体からのシグナルを抑制することで抗原特異的 T 細胞のサイトカイン産生応答を阻害することが示されている。この PD-1 シグナル経路は、自己免疫疾患の発症を抑えるための免疫抑制システムとして見いだされた。しかし最近の研究では、長期間宿主体内で生存可能なウイルスや細菌感染の成立にも PD-1 シグナル経路が関与していることが報告されている。我々も昨年、BCG 感染では WT マウスに比較して PD-1 欠損マウスで菌の排除が亢進することを明らかにした。一方、BCG 感染実験の成績から PD-1 欠損マウスは結核菌感染でも抵抗性を示すものと考えられたが、予想に反して PD-1 欠損マウスは感受性であった。今のところこの原因を説明することはできない。しかし、予備実験の結果、結核菌感染では感染 7 日目には肺における PD-1 の発現が増強されるが、BCG にはその能力が無いことが示されている。従って、BCG 感染では肺の PD-1 シグナル経路が機能しないにも関わらず結核菌感染でみられた炎症反応が起こらないことから、これは両菌の間に存在する病原性の違いを示すものと考えている。一方、結核菌感染では、病原性に相関して強い炎症反応が惹起されたが、これを制御するためには PD-1 経路の活性化が必要になるものと考えられる。

また、本研究では PD-1 欠損マウスと同様に ASC 欠損マウスでも結核菌感染後の肺で

過剰な免疫反応が誘導されることが示され、ASC が結核に対する感染防御に重要な役割を果たしていることも明らかとなった。ASC は PYRIN ドメインと CARD ドメインを有し、各種 NLR 分子と caspase-1 の結合を仲介して inflammasome を形成することで caspase-1 活性化に関与することがわかっている。しかし本研究結果から、caspase-1 の活性化は結核に対する感染防御には必要ないことが示された。従って、ASC は感染防御に重要な他のシグナル経路の活性化に関与するものと考えられる。また、臓器内菌数の測定結果から、感染防御における ASC の必要性は肺において特に高いことが示された。今後さらに解析を進め、ASC および PD-1 シグナル経路がどのように結核菌に対する感染防御の制御に関与するのかを分子レベルで明確にしていきたい。

E. 結論

結核菌感染に対して ASC および PD-1 欠損マウスは高い感受性を示した。その原因は、肺における過剰な免疫応答の結果であると考えられる。従って、PD-1 シグナル経路や ASC は、結核感染では肺における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るものと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kurenuma, T., I. Kawamura, H. Hara, R. Uchiyama, S. Daim, S. R. Dewamitta, S. Sakai, K. Tsuchiya, T. Nomura, and M. Mitsuyama. 2009. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to activation of caspase-1 via induction of potassium ion efflux in infected macrophages. *Infect. Immun.* 77: 3992-4001.
2. 学会発表
- 1) Dewamitta, S. R., 野村卓正, 原英樹, 土屋晃介, 暮沼武士, 申艶那, S. Daim, 酒井俊祐, 屈慧新, 山本武司, 河村伊久雄, 光山正雄. LLO-dependent entry

of *Listeria monocytogenes* into cytoplasm is essential for calcium dependent calpain activation and IL-1 α secretion in infected macrophages. 第 20 回日本生体防御学会学術総会 2009 年 7 月 東京

- 2) 野村卓正, 申艶那, 土屋晃介, 原英樹, 酒井俊祐, 屈慧新, 河村伊久雄, 光山正雄. マクロファージのリステリア食能の TLR2 シグナルによる増幅. 第 20 回日本生体防御学会学術総会 2009 年 7 月 東京
- 3) Kawamura, I., S. Sakai, and M. Mitsuyama. US-Japan cooperative medical science program. PD-1-dependent signal impairs protective T cell response in chronic *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. The 44th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
- 4) Yanna, S., T. Nomura, K. Tsuchiya, H. Hara, S. Sakai, H. Qu, S. Daim, S. R. Dewamitta, T. Yamamoto, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. TLR2-dependent signal is involved in the efficient phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by macrophages. 第 39 回日本免疫学会総会 2009 年 12 月 大阪
- 5) Tsuchiya, K., H. Hara, T. Nomura, S. D. Dewamitta, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. Mechanism of the inflammasome activation upon infection with *Listeria monocytogenes*. 第 39 回日本免疫学会総会 2009 年 12 月 大阪
- 6) Hara, H., K. Tsuchiya, I. Kawamura, T. Yamamoto, T. Nomura, and M. Mitsuyama. LLO participates in caspase-1 activation in *Listeria monocytogenes*-infected macrophages via induction of IFN- β production. 第 39 回日本免疫学会総会 2009 年 12

- 月 大阪
- 7) Dewamitta, S. R., I. Kawamura, H. Hara, R. Uchiyama, S. Daim, S. Sakai, K. Tsuchiya, T. Nomura, and M. Mitsuyama. RD1 locus in *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to the activation of caspase-1 via induction of potassium efflux in infected macrophages. 第 39 回日本免疫学会総会 2009 年 12 月 大阪
- 8) Nomura, T., S. R. Dewamitta, H. Hara, K. Tsuchiya, I. Kawamura, and M. Mitsuyama. Bacterial cytoplasmic entry- inducing intracellular calcium signaling is required for IL-1 α/β production in *Listeria monocytogenes*-infected macrophages. 第 39 回日本免疫学会総会 2009 年 12 月 大阪
- 9) Sakai, S., I. Kawamura, K. Tsuchiya, T. Okazaki, and M. Mitsuyama. The PD-1:PD-L1 coinhibitory pathway is a critical determinant of host resistance to pulmonary tuberculosis. 第 39 回日本免疫学会総会 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