

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)

結核菌潜伏感染の分子機構と治療・予防戦略の開発

分担研究報告書

研究分担者

小林 和夫

(国立感染症研究所・免疫部部長)

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）  
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

研究分担者	小林 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・部長)
研究協力者	前倉 亮治	(国立病院機構刀根山病院・副院長)
研究協力者	北田 清悟	(国立病院機構刀根山病院・内科・医長)
研究協力者	松本 壮吉	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・准教授)
研究協力者	藤原 永年	(大阪市立大学大学院医学研究科・細菌学・講師)
研究協力者	阿戸 学	(国立感染症研究所・免疫部・室長)
研究協力者	大西 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・主任研究官)
研究協力者	高橋 宜聖	(国立感染症研究所・免疫部・主任研究官)
研究協力者	岡部 真裕子	(国立感染症研究所・免疫部・研究員)
研究協力者	大原 直也	(岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・ 口腔微生物学 教授)

研究要旨

結核菌潜伏感染の分子機構を解明するため、分裂増殖期結核菌（活動性結核）と分裂休眠期結核菌（潜伏感染）の蛋白質発現を比較解析した。分裂増殖期結核菌は culture-filtrate protein 10 kDa (CFP-10) を発現、他方、休眠菌は抗酸菌 DNA 結合蛋白質 1 (MDP1) を発現していた。分裂増殖期結核菌産生 CFP10 や休眠期結核菌発現 MDP1 を抗原として、ヒト血清における抗体の検出を試みた。血清抗 CFP10 抗体価は活動性肺結核において治癒後結核に比し、有意に高値を示した。他方、血清抗 MDP1 抗体価は治癒後結核において活動性肺結核に比し、有意に高値を示した。なお、健常者では両抗体価は低値を示した。

喀痰培養陰性、気管支洗浄液培養陽性ヒト肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症の診断における免疫学的血清診断に抗 MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) 核成分に対する血清 IgA 抗体の検出（酵素抗体法）が有用であることが確認された（感度：74%、特異度：97%）。喀痰培養陰性 MAC 感染症の診断でアメリカ合衆国胸部疾患学会の診断基準（2007）に準拠した場合、臨床所見と気管支洗浄液培養陽性を必要が必要である。気管支洗浄液の採取は気管支内視鏡を用いるため、侵襲性、かつ、培養検査結果に約 1 か月を要するが、抗体検出の所要時間は約 3 時間であり、迅速、手技も簡便、かつ、多検体処理が可能である。加えて、体外診断であるため、安全性についても問題はなく、血清診断は喀痰培養陰性 MAC 感染症の診断にも有用性が高いと考えられる。

A. 研究目的

世界で約 20 億人（日本：2,500 万人）が結核菌に既感染、927 万人（日本：2,500 万人）が結核を発病、176 万人（日本：2,200 万人）が死亡し、現在でも、結核は甚大な健康被害を提供している（2008 年）。結核の

発症機序には「感染後早期に発症する一次性結核」、「潜在性感染から発症する二次性結核（内因性再燃）」や「既感染宿主に再感染し発病（外来性再感染）」があるが、成人結核のほとんどは「内因性再燃」に起因している。潜在性感染機序の解明は新規

抗結核薬や感染曝露後（治療的）ワクチン開発を促進し、結核制圧に寄与することが期待される。本研究では、潜在性感染における分裂や代謝活性の低下した休眠期結核菌の蛋白質発現を解析し、治療やワクチン標的候補の探索を目的とした。

非結核性抗酸菌感染症は結核など抗酸菌感染症の約 20% を占めるが、特に、*Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症は非結核性抗酸菌感染症の 70-80% を占め、最頻である。MAC は特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) を有し、化学的に GPL は全ての MAC に共通な GPL 核と可変的な糖鎖部分から構成される。喀痰培養陰性、気管支洗浄液培養陽性 MAC 感染症に関し、感度や特異度を指標として、MAC 共通抗原である GPL 核抗原に対する血清 IgA 抗体検出の診断的有用性について検証した。

## B. 研究方法

潜在性感染における分裂や代謝活性の低下した休眠期結核菌の蛋白質発現に関し、低酸素環境 (1% O<sub>2</sub>) 培養により休眠菌を人工的に誘導し、遺伝子や蛋白質発現を分裂増殖期結核菌 (20% O<sub>2</sub>) と比較解析した。また、発現遺伝子を大腸菌 BL21 株に導入し、遺伝子組み換え蛋白質を発現、精製した。なお、遺伝子操作に関し、DNA 組み換え実験指針に準拠し、機関承認を得て、実施した。

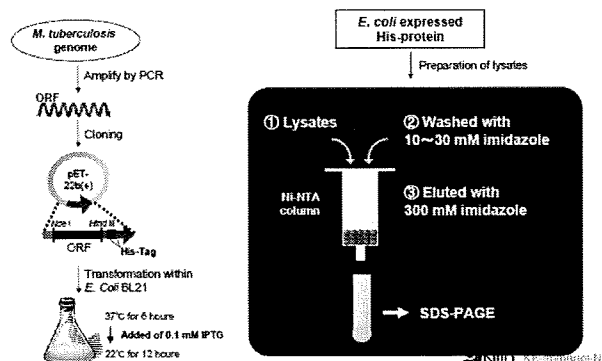


図 1. 低酸素環境における休眠結核菌蛋白質発現の精製

喀痰培養陰性、気管支洗浄液培養陽性ヒト肺 *Mycobacterium avium* complex (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) に合致したヒト肺 MAC 感染症 (28 例)、肺非 MAC 感染症 (28 例、緑膿菌肺炎: 5 例、*Haemophilus influenzae* 肺炎: 3 例、肺炎球菌性肺炎: 2 例、*Klebsiella* 肺炎: 2 例、肺炎球菌性肺炎: 2 例、肺結核: 1 例、*Mycobacterium fortuitum* 感染症: 1 例、原因病原体未検出: 13 例) を用い、MAC 特異的 GPL 核抗原に対する血清 IgA 抗体を酵素抗体法により測定した。診断キットは株式会社タウンズ (静岡県沼津市) が試作したものを使用した。被験対象者は全例 HIV-1 および-2 抗体陰性であった。標準 MAC 株 (血清型 4) 由来 GPL 核抗原を分離・精製し、薄層クロマトクロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーにて、化学構造を決定した。患者血清採取に際し、医療機関 (国立病院機構刀根山病院) で倫理審査の承認後、インフォームドコンセントを得た。なお、利益相反は存在しなかった。

表 1. 患者背景

	MAC-PD MA/MI: 20/5 Unclassified: 3	Non-MAC disease	P value
N	28	28	
Male/female, n	0/28	10/18	P<0.01
Age, years	65.8 ± 8.8	62.5 ± 13.7	NS
BMI	18.7 ± 2.5	19.6 ± 2.3	NS
Smokers, n (%)	0 (0)	7 (25.0)	P<0.01
ESR, mm/hr	24.6 ± 17.6	30.2 ± 20.3	NS
WBC, /μL	4825 ± 1107	6202 ± 1345	P<0.01
CRP, mg/dL	0.1 ± 0.0	1.6 ± 3.1	P<0.01

Definition of abbreviations: MAC-PD = *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease; BMI = body mass index; ESR = erythrocyte sedimentation rate; WBC = white blood cells; CRP = C-reactive protein; NS = not significant

Organisms	n = 28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
<i>Haemophilus influenzae</i>	3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	2
<i>M. tuberculosis</i>	1
<i>M. fortuitum</i> (Rapid grower)	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
None	13

## C. 研究結果

休眠期結核菌は抗酸菌 DNA 結合蛋白質 1 (MDP1)、alpha crystalline-like protein (Acr)、heat-stress-induced ribosome

binding protein A (HrpA、Acr2) や heparin binding haemagglutinin (HBHA) を発現した。他方、分裂増殖期結核菌は early secreted antigen target 6-kDa (ESAT-6) や culture-filtrate protein 10 kDa (CFP-10) を発現した。これらの遺伝子をクローニングし、DNA 配列を確認後、pET22b+ に挿入しヒスチジン (His) タグの融合蛋白質とし発現するベクターを構築した。大腸菌 BL21 株に各プラスミドを導入し、各蛋白質が発現することを確認した (図 2)。

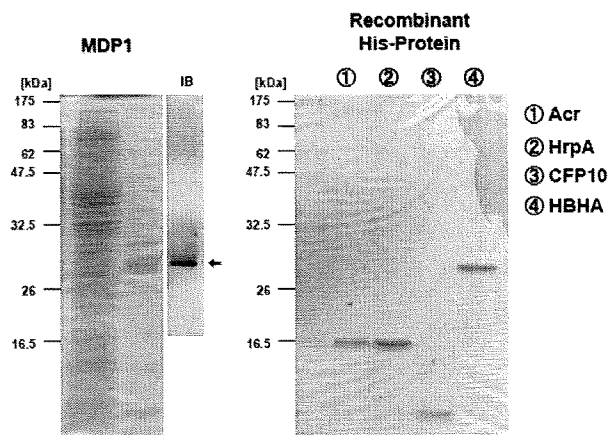


図 2. 低酸素環境における休眠結核菌蛋白質発現

分裂増殖期結核菌が産生・分泌する蛋白質 (CFP10) や休眠期結核菌が発現する非分泌性蛋白質 (MDP1) を抗原として、ヒト血清における抗体の検出を試みた。被験血清として、活動性肺結核：14 例、治癒後・陳旧性肺結核：17 例、健常大学生：17 例を登録した。血清抗 CFP10-IgG 抗体価は活動性肺結核： $0.66 \pm 0.84$  であり、治癒後結核： $0.18 \pm 0.31$  に比し、有意に高値を示した。他方、血清抗 MDP1-IgG 抗体価は治癒後結核： $0.51 \pm 0.22$  であり、活動性肺結核： $0.27 \pm 0.15$  に比し、有意に高値を示した (表 2)。なお、健常者では両抗体価ともに低値を示した。

表 2. 結核菌蛋白質に対する抗体応答

血清抗体	活動性肺結核 (n=14)	治癒後肺結核 (n=17)	健常大学生 (n=17)
CFP10 抗体 (増殖期)	$0.66 \pm 0.84^*$	$0.18 \pm 0.31$	$0.07 \pm 0.09$
MDP1 抗体 (休眠期)	$0.27 \pm 0.15$	$0.51 \pm 0.22^*$	$0.12 \pm 0.14$

喀痰培養陰性、気管支洗浄液培養陽性ヒト肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症において、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、感度：73.6%、特異度：96.5%であった (図 3)。なお、非 MAC 感染症で GPL 保有 *M. fortuitum* 感染症 (1 例) のみが高値を示した。*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。

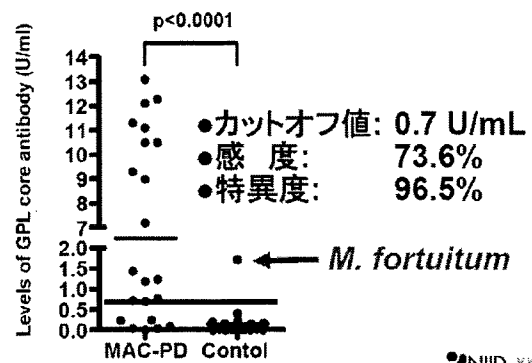


図 3. 喀痰培養陰性、気管支洗浄液培養陽性ヒト肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症における血清診断

#### D. 考察

潜在性結核菌感染機構には「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% (90%は無症候性潜在性結核菌感染) 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、分離精製することが可能となった。活動性肺結核において分裂増殖期結核菌が産生・分泌する蛋白質 (CFP10) に対する血清抗体価は活動性肺結核 > 治癒後・陳旧性肺結核、他方、休眠期結核菌が発現する非分泌性蛋白質 (MDP1) に対する血清抗体価は活動性肺結核 < 治癒後・陳旧性肺結核であり、今後、症例を蓄積・懐石し、活動性と治癒後・陳旧性肺結核 (潜在性結核菌感染) における血清診断の有用性を検索する。

MAC 感染症の診断はアメリカ合衆国胸部疾患学会・感染症学会の診断基準 (2007) に準拠する。喀痰培養が陰性の場合、診断には気管支内視鏡を用いた洗浄液の培養や開胸肺生検試料の培養が必要となる。気管支内視鏡や開胸肺生検は侵襲性であり、かつ、培養を要するため、検査結果 → 確定診断に少なくとも約 2 週間以上を要する。他方、血清診断は体外診断であるため安全、そして、迅速 (所要: 約 3 時間) であり、有用性が高いと考えられる。また、手技も簡便、かつ、多検体処理が可能である。今後、症例を蓄積し、MAC 感染症における血清診断を普及させる予定である。

#### 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。これらの結核菌由来蛋白質に対するヒト血清抗体価の測定は活動性と治癒後・陳旧性肺結核 (潜在性結核菌感染) の鑑別に可能性がある。

・喀痰培養陰性、気管支洗浄液培養陽性ヒト肺 *Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染症における 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: 73.6%、特異度: 96.5%) として有用である。

#### G. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) 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.
  - 2) 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.
2. 学会発表
  - 1) 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
  - 2) 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
  - 3) 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
  - 4) 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

- 5) 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
- 6) 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-1alpha の作用機構. 第 82 回日本細菌学会総会 2009 年 3 月 名古屋
- 7) 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.

- 8) 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

#### 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)

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・感染制御部部长)

## 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・感染制御部・部長）

### 研究要旨

弱毒化牛型結核菌 *Mycobacterium bovis* BCG は、これまで抗酸菌症の発症を予防するワクチンとして結核・ハンセン病に対し幅広く用いられてきた。しかし、近年ではその有効性は極めて限られており、新規リコンビナント BCG の開発が強く求められている。抗酸菌症の発症を予防するためには、効率的に CD4 陽性メモリー T 細胞及び CD8 陽性メモリー T 細胞を作出する必要性が高く、そのためには両サブセット T 細胞を強く活性化する必要がある。これまでに CD4 陽性 T 細胞の活性化には、BCG の持つウレアーゼ活性を除去すること、CD8 陽性 T 細胞の活性化には、HSP70-MMP-II 融合遺伝子を BCG に導入することが有効であることを報告してきた。本年度は両者を組み合わせ、ウレアーゼ欠損 BCG に HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入した新しいリコンビナント BCG (BCG-D70M) を作製し、その免疫学的効果を中心に解析した。BCG-D70M は、これまで作製した全てのリコンビナント BCG の中で、最も強く樹状細胞・マクロファージ・ナイーブ CD4 陽性 T 細胞及びナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化した。また、これまでに作製したリコンビナント BCG では不可能であった、マクロファージを介しての CD4 陽性 T 細胞の活性化を可能とした。CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の活性化は抗原特異的であった。さらに、BCG-D70M を用いると、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞から effector 機能を有するパーフォリン産生性 CD8 陽性 T 細胞の分化誘導が可能であった。また、C57BL/6 マウスを用いて、BCG-D70M の *in vivo* での免疫学的効果を検討すると、MMP-II に反応するメモリータイプの CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞が効率的に産生されることが判明した。したがって、BCG-D70M は、抗酸菌症の発症を予防する際に必要な CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を強く活性化する予防用ワクチンになり得ることが明らかとなった。

### A. 研究目的

BCG は病原性抗酸菌症に対するワクチンとして、全世界的に幅広く用いられてきた。結核及びハンセン病に対して一定の予防効果があると考えられてきたが、近年では、結核では小児の粟粒結核及び結核性髄膜炎に対してのみ有効で、成人あるいは高齢者の肺結核を予防することはできないと考えられている。一方ハンセン病においても、BCG の予防効果は 26% にすぎないと結論付けられ、これら病原性抗酸菌症の発症を予

防する新規ワクチンの開発が強く求められるに至っている。BCG は、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化し、IFN- $\gamma$  などのタイプ 1 サイトカインの産生を誘導する点、各種病原性抗酸菌と共通の分子を有する点は大きなメリットであり、その点が高く評価され、新たなワクチンの開発においては、BCG に改良を加えることが最も早道であると考えられている。BCG に改良を加えるにあたっては、BCG が何故有効ではないのか、その弱点をきちんと理解し、その弱点を克服



する手段を打ち立てなければならない。BCGの最大の欠点は、マクロファージなどの抗原提示細胞に貪食された際、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方策を有していることにある。したがって、BCG固有の欠点を凌駕するためには、ファゴゾームとライソゾームの融合を促進させることが最も大切となる。これまでに我々は種々の方法でこの問題に取り組んできた。第1の方法は、BCGの有する *UreC* 遺伝子を除去し、*UreC* がコードするウレアーゼを取り除くことで、ファゴゾーム内のアンモニアの産生を抑制し、ファゴゾームの酸性化を促進してライソゾームと融合し易い環境を作ることである。第2の方法は、BCGから積極的に病原性抗酸菌の主要抗原を分泌させ、分泌された抗原がライソゾームへ取り込まれ易い環境を作ることである。これまでに主要抗原として Major Membrane Protein-II (MMP-II) を用い、さらに、シャペロン効果を有しアジュバント活性を持つ heat shock protein (HSP) 70 を併用した。すなわち、HSP70 遺伝子と MMP-II 遺伝子を融合させ、これを BCG に遺伝子導入した。*UreC* 遺伝子を取り除いたリコンビナント BCG (BCG- $\Delta$ UT) は CD4 陽性 T 細胞の活性化に有効であり、HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入したリコンビナント BCG (BCG-70M) は CD8 陽性 T 細胞の活性化に有効であった。そこで、本年度は両方法を組み合わせ、BCG- $\Delta$ UT に HSP70-MMP-II 遺伝子を導入した新規リコンビナント BCG (BCG-D70M) を作製し、その免疫学的効果を検討した。

## B. 研究方法

本研究班で作出した *UreC* 遺伝子欠損リコンビナント BCG (BCG- $\Delta$ UT-11-3) に、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、遺伝子導入しリコンビナント BCG (BCG-D70M) 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 は、市販の ELISA 用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-D70M 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-D70M 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-D70M のナイーブ CD4 陽性 T 細胞の活性化能を、活性化した T 細胞から産生される IFN- $\gamma$  の量を指標に検討した。コントロール BCG としてベクターコントロール (BCG-261H) とこれまでに作出したリコンビナント BCG である BCG- $\Delta$ UT-11-3 と BCG-70M を用いた。その結果、BCG-D70M が最も強く、かつその濃度依存性に、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を活性化した。また、BCG-D70M はマクロファージを介しても CD4 陽性 T 細胞を活性化することが可能で、大量の IFN- $\gamma$  が刺激された CD4 陽性 T 細胞から産生された。これら樹状細胞及びマクロファージを介した BCG-D70M による CD4 陽性 T 細胞の活性化は抗原特異的であり、BCG-D70M を感染させた抗原提示細胞を HLA-DR あるいは CD86 抗原に対する抗体で処理すると、その活性化は 90% 以上抑制された。次いで、BCG-D70M のナイーブ CD8 陽性 T 細胞活性化を検討すると、BCG-D70M は、BCG-261H、BCG- $\Delta$ UT-11-3 あるいは BCG-70M より強くナイーブ CD8 陽性 T 細胞を活性化し IFN- $\gamma$  の産生を誘導した。この T 細胞の活性化は抗原特異的であって、BCG-D70M 感染樹状細胞表面を抗 HLA-ABC 抗体あるいは抗 CD86 抗体で処理すると、その T 細胞活性化能は強く抑制された。BCG-D70M が T 細胞を強く活性化するためには、BCG-D70M は抗原提示細胞をも強く活性化する必要がある。そこで、BCG-D70M の IL-12p70 産生誘導能を検討した。その結果、BCG-D70M はこれまで作出した全てのリコンビナント BCG の中で、最も強く樹状細胞を刺激し、大量の IL-12p70 の産生を誘導した。さらに、

BCG-D70M は強く IL-1 $\beta$ ・TNF $\alpha$  の産生をも誘導し、同時に、樹状細胞表面上の HLA-DR・CD86・CD83 抗原の発現を増強させた。BCG-D70M による T 細胞活性化機構を探る目的で、樹状細胞を予めクロロキニンで処理し、その後に BCG-D70M を感染させると、BCG-D70M の感染によって誘導される MMP-II の発現が著しく抑制され、同時に、樹状細胞をクロロキニン処理することで BCG-D70M によるナイーブ CD4 陽性 T 細胞及びナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化が有意に抑制された。マクロファージによる CD4 陽性 T 細胞活性化もクロロキニン処理で抑制された。一方、樹状細胞を Brefeldin A あるいは Lactacystin で処理しても、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞の活性化は同様に抑制された。このことから、BCG-D70M は HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌し、分泌された融合タンパクが CD4 陽性 T 細胞の活性化と CD8 陽性 T 細胞の活性化をもたらし、CD8 陽性 T 細胞の活性化はクロスプレゼンテーション機構によって生じているものと考えられた。また、BCG-D70M は、CD8 陽性 T 細胞のみならず CD4 陽性 T 細胞をも活性化した。CD4 陽性 T 細胞存在下で CD8 陽性 T 細胞を BCG-D70M で刺激すると、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞からパーフォリン産生性実効 T 細胞が産生され、さらに、遊走能を有するメモリー T 細胞が産生された。また、C57BL/6 マウスに BCG-D70M を皮下接種すると、ベクターコントロール BCG に比し、効率良く MMP-II あるいは HSP70 に反応し、IFN- $\gamma$  を産生するメモリー T 細胞が産生された。

### D. 考察

BCG を病原性抗酸菌感染症に対するワクチンとして用いる場合、その最も期待される効果は、CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞を強く活性化し、それぞれのメモリー T 細胞を産生することにある。現行の BCG では、どちらの T 細胞をも活性化する能力が弱く、そのため改善が求められている。何故 T 細胞を強く活性化し得ないのか、その最大の原因は、BCG が抗原提示細胞に取り

込まれた場合、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で、機能的な Phago-lysosome を形成し得ないことにある。この欠点を凌駕するため、我々は種々の試みを行ってきたが、基本となる考え方は二つに大別される。一つは、BCG 感染ファゴゾームを酸性化することでライソゾームとの融合を促進させることであり、この目的のため *UreC* 遺伝子を欠損させた BCG- $\Delta$ UT-11-3 を作製した。その結果、BCG- $\Delta$ UT-11-3 は容易にライソゾームに取り込まれることが確認できた。第二の試みは、ファゴゾームの中でタンパクを分泌させることであった。分泌されたタンパクにより、CD8 陽性 T 細胞がより強く活性化されることを期待し、抗酸菌主要抗原である MMP-II と HSP70 が融合したタンパクをファゴゾームの中で分泌し得るリコンビナント BCG (BCG-70M) を作製したところ、期待した通りこの融合タンパク特異的に CD8 陽性 T 細胞が活性化された。そこで、本年度は両方法を組み合わせた新しいリコンビナント BCG (BCG-D70M) を作製した。BCG-D70M は、*UreC* 遺伝子を欠く一方で、HSP70-MMP-II 融合タンパクをコードする遺伝子を持つ BCG である。結果として BCG-D70M は、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞もナイーブ CD8 陽性 T 細胞も非常に強く活性化し、その程度は BCG- $\Delta$ UT-11-3 及び BCG-70M より強力であった。この T 細胞の活性化は抗原特異的であり、BCG-D70M は BCG-70M と同様に HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌していたことから、本融合タンパクが両サブセット T 細胞の活性化に強く関与しているものと考えられた。その最大の理由は、BCG-D70M は *UreC* 遺伝子を欠くため、BCG-D70M はファゴゾーム内に留まらず、ライソゾームへ容易に取り込まれ、ライソゾーム内で融合タンパクを分泌したため、分泌タンパクがより効率良くプロセッシングを受けたためと想定された。

したがって、BCG の固有の欠点であるライソゾームとの融合阻止を凌駕する二つの独立した方策は、相乗的に有用して強い T 細胞の活性化を誘導したものと考えられた。

## E. 結論

BCG の T 細胞活性化能を向上させる上で、*UreC* 遺伝子の除去、HSP70 及び MMP-II 遺伝子の導入は極めて有効であって、強い T 細胞活性化能を有する BCG を作製することが可能となった。

## 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<sup>+</sup> 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.

## 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. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
- 2) Mukai, T., Y. Maeda, Y. Miyamoto, and M. Makino. Identification of Strong Mycobacterial Promoters from Mycobacteriophage TM4. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
- 3) Miyamoto, Y., and M. Makino. Biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
- 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. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 29-31 July, 2009, Fukuoka, Japan.
- 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. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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

14) 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

15) 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

16) 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

#### 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)

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・感染制御部室長)

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

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傷害性 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傷害性 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 細胞から細胞傷害性 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)ナイーブ 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分化を誘導する抗原提示細胞の活性化には Th1 分化を誘導する環境下で活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞が産生する IL-17F を介した活性化 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、(2) T 細胞抗原受容体 (TCR) 刺激によって誘導される Th1 分化では *ifn-γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導する TATA box binding protein associated factor である TAF7 と IL-12 レセプター (R)β2 鎖の発現を誘導する STAT4 が重要な役割を果たしていることを明らかにし、これらの分子が結核ワクチンの新たな標的分子となり得る可能性を示した。

#### A. 研究目的

ワクチンの目的は主に獲得免疫を惹起し、長期生存型細胞傷害性 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 記憶細胞はグランザイム B を産生するエフェクター細胞傷害性 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 と我々が作出した Peptide-25 特異的 T 細胞抗原受容体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、①CD8<sup>+</sup> T 細胞に対しグランザイム B の発現を伴う機能的分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-γ、IL-12、CD40-CD40 リガンド相互作用以外の活性化 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、②Peptide-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こと、③DNA マイクロアレイ法を用いた解析から TATA box binding protein associated factor である TAF7 が Peptide-25 による選択的 Th1 分化を調節している可能性があることを明らかにした。

本年度は DNA マイクロアレイ法を用いて 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分化を誘導する抗原提示細胞の活性化を制御する Th1 型活性化 CD4<sup>+</sup> T 細胞と抗原提示細胞の相互作用を司る因子を同定すること、Peptide-25 を介した TCR 刺激による選択的 Th1 分化誘導機構における TAF7 の役割及び TCR 刺激による IL-12Rβ2 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) DNA マイクロアレイ法を用いたエフェクター細胞傷害性 CD8 細胞の分化を誘導する CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞間相互作用を司る因子の網羅的解析

C57BL/6 マウス脾臓由来の樹状細胞を抗原提示細胞として P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 (アミノ酸配列: FQDAYNAAAGHNAV) または TCR に対して低親和性の Peptide-25 変異体 APL:G248A (アミノ酸配列: FQDAYNAAAGHNAV) で刺激し、6 時間後、12 時間後に CD4<sup>+</sup> T 細胞及び樹状細胞が混在するサンプルの mRNA を調製し、東レ社の 3D-Gene を用いて発現遺伝子の網羅的解析を行なった。

3D-Gene 解析にて絞り込まれた候補遺伝子の P25 TCR-Tg-CD4<sup>+</sup> T 細胞または樹状細胞における Peptide-25 または APL 刺激後の経時的発現変化を Real-Time PCR 法にて確認した。

(2) TCR 刺激による Th1 分化誘導における TAF7 の機能の検討

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) を抗原提示細胞

とし、Peptide-25 で刺激した T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> 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。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ 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 抗体で刺激を行なう際に、TAF7 を組み込んだ pMY-IRES-GFP を添加し、ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞に TAF7 を導入した。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。*ifn-γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングは、TAF7 が導入された活性化 CD4<sup>+</sup> 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。

(3) TCR 刺激による IL-12Rβ2 鎖の発現解析  
野生型 P25 TCR-Tg または T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を I-A<sup>b</sup>-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、活性化した CD4<sup>+</sup> T 細胞を経時的に回収し、精製抗 IL-12Rβ2 抗体(ハムスター IgG)+PE 標識抗ハムスター IgG 抗体を用いて CD4<sup>+</sup> T 細胞上の IL-12Rβ2 鎖を染色し、FACSCanto にて解析した。

(4) TCR 刺激による 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、T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を I-A<sup>b</sup>-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、活性化した CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T 細胞内のチロシンリン酸化 STAT4 を染色し、FACSCanto 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) エフェクター細胞傷害性 CD8 細胞の分



化を誘導する CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞間相互作用を司る因子の検討

エフェクター細胞傷害性 CD8 細胞への分化には Th1 細胞への分化を誘導するような環境下での CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞との IFN- $\gamma$ 、IL-12、CD40-CD40 リガンド相互作用以外の相互作用によって誘導される樹状細胞の活性化が重要な役割を果たしていることを昨年度報告した。そこで、この相互作用を司る因子を DNA マイクロアレイ法にて検索した。APL 刺激では誘導されず Peptide-25 刺激のみで早期に発現が誘導される遺伝子であること、サイトカイン用活性、または受容体機能、または細胞膜に存在する因子であることを条件に絞り込んだ結果、27 種類の候補遺伝子を得た。これら候補遺伝子の Peptide-25 及び APL 刺激後の CD4<sup>+</sup> T 細胞または樹状細胞における発現様式を Real-Time PCR 法にて検討した結果、Peptide-25 刺激でのみ CD4<sup>+</sup> T 細胞にのみ発現が誘導される因子として IL-17F が同定された。

(2) TCR 刺激による Th1 分化誘導機構の解析

*ifn- $\gamma$*  遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導することで Th1 分化を開始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<sup>+</sup> 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 の *ifn- $\gamma$*  遺伝子座のクロマチンリモデリング誘導能を検討した。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 TAF7 を組み込んだ pMY-IRES-GFP を添加し T-bet 欠損 CD4<sup>+</sup> T 細胞に TAF7 を導入した。培養 5 日後に TAF7 が導入された細胞を精製分取し、*ifn- $\gamma$*  遺伝子座のクロマチンリモデリングを検討した結果、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、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- $\gamma$*  遺伝子座のクロマチンリモデリングが誘導された。

Th1 細胞への不可逆的な分化の決定には IL-12 が重要な役割を果たしていることが報告されている。一方、ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞には機能的 IL-12R の構成分子である IL-12R $\beta$ 2 鎖が発現していない。そこで、I-A<sup>b</sup>-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激した後の野生型 P25 TCR-Tg または T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞上の IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現を検討した。その結果、野生型及び T-bet 欠損いずれの場合も Peptide-25 刺激 40 時間後から IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現がサイトカイン (IL-2、IFN- $\gamma$ ) 非依存性に誘導された。

IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現は活性化 STAT4 によって制御され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-ナイーブ CD4<sup>+</sup> 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 IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現における STAT4 の関与を検討した。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を I-A<sup>b</sup>-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、1、6、24、48 時間後の CD4<sup>+</sup> T 細胞内の STAT4 のチロシンリン酸化を検討した。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<sup>+</sup> T 細胞から IL-2、IFN- $\gamma$  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

(1) エフェクター細胞傷害性 CD8 細胞の分化を誘導する CD4<sup>+</sup> T 細胞と樹状細胞間相互作用を司る因子に関して

DNA マイクロアレイ法にて絞り込まれた 27 種の mRNA の発現を Real-Time PCR 法に

て確認した結果、IL-17F が Th1 分化を誘導する Peptide-25 刺激でのみ CD4<sup>+</sup> T 細胞に発現が誘導される因子として同定された。IL-17F は IL-17 ファミリーに属し、活性化 T 細胞及び自然免疫担当細胞からホモダイマーとして分泌され、細胞傷害活性を増強することで腫瘍の増悪を防ぐこと、また最近の知見で細菌感染防御に関与することが報告されている分子である。今後 siRNA を用い IL-17F を欠損させた CD4<sup>+</sup> T 細胞を作出し、IL-17F の機能を確定させる予定である。

(2) TCR 刺激による Th1 分化誘導機構に関して

ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞が Th1 細胞へと分化するためには IFN- $\gamma$  が産生できるように *ifn- $\gamma$*  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、ナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞は IL-12R $\beta$ 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 $\beta$ 2 鎖の発現を誘導しなければならない。TAF7 には *ifn- $\gamma$*  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が、IL-12R $\beta$ 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 $\beta$ 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ブ CD4<sup>+</sup> 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。

STAT4 は IL-12R $\beta$ 2 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<sup>b</sup>-CHO 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<sup>+</sup> T 細胞を Peptide-25 で刺激した際の IL-12R $\beta$ 2 鎖のタンパクレベルでの発現は刺激 40 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-12R $\beta$ 2 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 の活性化誘導機構に関して詳細に解析していく予定である。

## E. 結論

(1) Th1 細胞へと分化している CD4<sup>+</sup> T 細胞が産生する IL-17F がグランザイムの発現を伴うエフェクター細胞傷害性 CD8 細胞への分化を誘導する樹状細胞の活性化を制御している可能性が示唆された。

(2) TCR 刺激で誘導される TAF7 が *ifn- $\gamma$*  遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導し、その後活性化した STAT4 が IL-12R $\beta$ 2 鎖の発現を誘導することで Th1 分化が決定されるというサイトカイン非依存的な Th1 分化誘導機構が存在することが示された。

## 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 BCG that secretes major membrane. 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 naive CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by recombinant *bacillus Calmette-Guerin* that secreted heat shock protein 70-major membrane protein-II fusion protein. J. Immunol., 183: 6561-6568.

## 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. 44<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Fukuoka, Japan, July 29-31, 2009.
- 2) 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 愛知
- 3) 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 愛知

- 4) 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. 第 82 回日本ハンセン病学会総会 2009 年 5 月 島根
- 5) Yahagi, A., M. Umemura, T. Tamura, D. Begum, Y. Yoshida-Okamoto, K. Shinjo, A. Kariyone, K. Takatsu, and G. Matsuzaki. The influence of CD11c<sup>+</sup> 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

## 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)

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・研究主幹)