

200931006B

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19年度～平成21年度 総合研究報告書

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19年度～平成21年度 総合研究報告書

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

総合研究報告書

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

研究成果の刊行に関する一覧表 39

平成19年度～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

総合研究報告書

研究代表者

牧野 正彦

(国立感染症研究所・感染制御部部長)

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.

病原性抗酸菌症の発症機構及び予防・治療等に関して解析を行った。結核菌強毒株 H37Rv は、感染マクロファージにネクロシスを誘導する能力が高いが、ゲノム上の RD1 領域を欠損した株は病原性が弱く、ネクロシス誘導能も低い。RD1 は caspase-1 依存的なサイトカイン産生の誘導にも関与することが示されている。そこでこの詳細な機序を明らかにするため、RD1 とネクロシスおよびサイトカイン産生誘導の関係について解析した。病原性の強い結核菌は RD1 に依存したネクロシス誘導能を有するが、その一方で感染初期に菌の細胞内増殖を可能にするため、結核菌はカスパーゼ 9 に依存したネクロシス抑制機序を有することが示された。また、RD1 は感染マクロファージからのカリウム放出を誘導し、その結果活性化されたカスパーゼ 1 が前駆体として産生された IL-18 と IL-1 β をプロセッシングし、成熟型サイトカインとして培地中に産生されることが明らかになった。

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 細胞の活性化を抑制することが知られている。そこで *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) を用いた感染実験を行ったところ、PD-1 シグナル経路の活性化が BCG 感染 3 週目に誘導され、それ以降の抗原特異的 T 細胞の活性化が抑制されることが示された。この結果から、PD-1 シグナル経路は BCG の長期生存に関与することが明らかとなった。また、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ところ、Wild type (WT) マウスに比べて PD-1 欠損マウスは感染後早期に死亡することがわかった。さらに、WT マウスに比較して PD-1 欠損マウスの肺では著明な菌数の増加や、マクロファージと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。さらに、PD-1 欠損マウスの肺では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ことが示された。

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 caspase-1 の活性化および 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 欠損マウスのみが感受性を示し、感染 4 週目以降に生存率が著しく減少した。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。これらの結果から、ASC は inflammasome 形成に関与する以外に、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。

病原性抗酸菌症に対する新しいワクチンの開発を目指し、新たにリコンビナント BCG を作製した。結核菌およびらい菌に対するワクチンとして BCG が長年用いられてきたが、その有効性は結核およびハンセン病いずれにおいても極めて限局されており、有効で信頼し得る新しいワクチンの開発が切望されている。抗酸菌に対する生体防御反応は、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の両者により司られており、ワクチンは両サブセット強く活性化し、メモリー T 細胞を作製する能力が強く求められる。第 1 のリコンビナント BCG として、BCG が有するウレアーゼを除去した BCG- Δ UT-11-3 を作製した。BCG- Δ UT-11-3 は、抗原提示細胞内でファゴゾームを形成した後ライソゾームと融合し、MHC クラス II 経路を賦活し、CD4 陽性 T 細胞の活性化を促進させた。C57BL/6 マウス生体内では、病原性抗酸菌由来タンパクと交叉反応するメモリー CD4 陽性 T 細胞を効率的に作製した。第 2 のリコンビナント BCG として、抗酸菌の主要抗原の一つ Major Membrane Protein (MMP)-II 遺伝子上流に抗酸菌由来の HSP70 遺伝子を繋ぎ BCG に導入した BCG-70M を作製した。BCG-70M 感染樹状細胞によりナイーブ CD8 陽性 T 細胞は強く活性化され、大量の IFN- γ を産生した。CD8 陽性 T 細胞は、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。第 3 のリコンビナント BCG は、第 1 と第 2 のリコンビナント BCG の組み合わせ、ウレアーゼ欠損 BCG に HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入して作製した (BCG-D70M)。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、これまでのリコンビナント 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。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。

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 陽性 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 陽性 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。結核菌分泌タンパク Ag85B 由来の Th1 分化を選択的に誘導するペプチド (Peptide-25) を用いて、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞から細胞傷害性 T 細胞への分化誘導における CD4 陽性 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。Th1 分化を選択的に誘導する Peptide-25 と Peptide-25 特異的 T 細胞抗原受容体 (TCR) を発現するトランスジェニックマウスを用いた解析から、(1) CD8 陽性 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

示細胞の活性化において Th1 細胞へと分化している活性化 CD4 陽性 T 細胞が産生する IL-17F を介した活性化 CD4 陽性 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) 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) β 2 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た。

結核菌を含む抗酸菌のゲノム解析は進んでいるものの、機能が未知の遺伝子やタンパク質が数多く残されている。これらの機能未知遺伝子・タンパク質の中には、抗酸菌の新規診断法や新規抗結核薬の開発に有用なものが存在していると考えられる。そこで、抗酸菌に特徴的な細胞壁の生合成に関連する遺伝子を含む新規遺伝子・タンパク質の解析を行うことにより、抗酸菌に関する新たな知見を得るとともに、新規診断法や新規抗結核薬の開発に結びつけることを目的としている。*Mycobacterium avium complex* (MAC) の新規タイピング法、抗酸菌の新規鑑別法、及び新規抗結核薬の開発につながる成果が得られた。MAC の新規タイピング法の開発では、MAC 感染患者由来の臨床分離株より見いだした新規挿入配列 (IS) が、ゲノム上で比較的頻繁に転移すること、そしてこの IS を遺伝子タイピングのプロープとして用いると、ATCC 株と臨床分離株のパターンが非常に多様であることを見出し、この IS が識別力の高い遺伝子タイピングのツールとして用いることが出来る可能性を示した。抗酸菌の新規鑑別法の開発では、細胞壁合成に関連する遺伝子の情報を利用して設計した 2 種類のプライマーセットを用いて PCR 反応を行うことにより、主要な抗酸菌種が簡便に鑑別できることを示した。本鑑別法は、既存の遺伝子検査と比較してより多くの病原性抗酸菌を鑑別することが可能な特長を持っていた。また、本鑑別法の主要な病原性抗酸菌種に対する特異度・感度は、ともに 96%以上であった。新規抗結核薬の開発に関しては、結核菌のゲノム上に存在する機能未知遺伝子 *Rv2613c* が特異な一次構造と活性を持つ新規 diadenosine polyphosphate 加リン酸分解酵素をコードしていることを明らかにし、本酵素が新規抗結核薬の有望な標的候補の 1 つであることを示した。さらに X 線結晶構造解析により、本酵素の立体構造を決定し、構造既知の diadenosine polyphosphate 関連酵素と比較した。その結果、構造骨格部分では相同性を示すが、活性中心部位ではアミノ酸残基の種類が異なっていることを明らかにした。

糖尿病 1, 2 型糖尿病ラットを用いて、結核菌を感染させ、糖尿病は、結核の高危険要因であることを証明した。その原因として、グルコースが結核菌の増殖を促進し、インスリンは、その増殖を抑えた。糖尿病ラット由来肺胞マクロファージは、結核菌を殺菌するほど活性化されていなかった。次いで、中国上海市で、糖尿病患者が、非糖尿病患者と比較して、結核にかかりやすいか否かを調べたところ、有意に糖尿病患者の方が、結核に罹患する割合が高かった。

結核菌潜伏感染の分子機構を解明するため、菌要因について分裂増殖期結核菌 (活動性結核) と分裂休眠期結核菌 (潜伏感染) の遺伝子・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。宿主要因に関し、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 (潜伏感染) 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。多施設共同研究により、喀痰培養陽性ヒト肺 MAC 感染症の診断における免疫学的血清診断に MAC 特異的細胞壁表層糖ペプチド脂質 (GPL) 核抗原に対する血清 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: 84.3%、特異度: 100%)。また、喀痰培養陰性、気管支洗浄液培養陽性ヒト肺 MAC 感染症の診断における血清診断では、感度: 74%、特異度: 97%であった。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、臨床所見と複数回の喀痰培養や気管支洗浄液培養陽性が必要である。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、培養検査結果に少なくとも 2 週間を要するが、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 MAC 感染症の診断に有用性が高いと考えられる。

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・感染制御部・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。

結核菌は感染宿主体内では細胞内寄生性を示し、マクロファージに貪食されてもそ

の殺菌機構に抵抗して長期間生存することが可能である。また、病原性の強い結核菌株は感染マクロファージにネクロシスを誘導する能力が高いことが示されている。結核菌が宿主細胞のネクロシスを誘導する意義や、そのメカニズムについては必ずしも明確ではないが、これは菌の病原性発現に関連する重要な機序であると考えられる。ワクチン株である BCG 株と結核菌のゲノム配列の比較から、BCG には存在しない領域 (RD) が結核菌ゲノムに 16 領域存在することが明らかとなり、これらが結核菌の病原性に重要であると考えられている。特に RD1 領域には、結核菌の分泌装置である ESX-1 の構成因子や、結核菌の主要な T 細胞抗原である ESAT-6 あるいは CFP-10 をコードする遺伝子が含まれており、結核菌の病原性や宿主防御免疫の発現に寄与する重要な領域であることが明らかにされている。

また、RD1 遺伝子領域が菌のネクロシス誘導に重要であることが示されている。そこで、RD1 によるネクロシス誘導メカニズムについて解析した。また、結核菌 H37Rv と RD1 欠損株 Δ RD1 のサイトカイン誘導能を比較したところ、両菌株で刺激した場合の IL-6 や TNF- α 産生に違いは認められなかったが、 Δ RD1 刺激後の IL-18 や IL-1 β の産生は、H37Rv に比べて著しく低いことが示された。そこで、RD1 がどのようにこれらサイトカイン産生に関与するのかを調べた。

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。そこで、BCG および結核菌をマウスに感染させ、その後に誘導される免疫応答および菌数の変化から、感染防御における PD-1 経路の役割について解析した。

さらに、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 が必要となることが明らかにされている。そこで、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。

結核菌およびハンセン病を予防するワクチンとして、BCG が長い間地球規模で使われてきた。しかし、その有効性は極めて限られており、結核においては小児の粟粒結核および結核性髄膜炎の発症予防にのみ有効であって、成人および高齢者の肺結核には全く無効であると報告されている。ハンセン病においては、これまでの全世界の研究レポートが網羅的にコンピューター解析され、全体としての有効性は 26% にすぎなかったと報告された。結核菌およびらい菌に対する生体防御反応は共通であって、抗酸菌感染初期には CD4 陽性 T 細胞、特にインターフェロンガンマー (IFN- γ) 産生性

タイプ 1 CD4 陽性 T 細胞が働き、生体内における抗酸菌量を一定水準に保ち、抗酸菌を細胞内へ潜伏化させる。一方、感染後期すなわち潜伏化した抗酸菌が何らかの機序により再活性化した場合には、CD8 陽性 T 細胞が重要な役割を演じ、抗酸菌を生体外へ排除する役割を担う。

BCG は、牛型結核菌に由来する弱毒化生ワクチンであり、生体内においては抗原提示細胞に対し強い親和性を有する。しかし、抗原提示細胞内ではファゴゾームを形成しライソゾームとの結合を阻止することで、MHC クラス II 経路の活性化を抑制し、さらに Cross-priming 機構を通じての CD8 陽性 T 細胞の活性化を抑制する。したがって、CD4 陽性 T 細胞の活性化・CD8 陽性 T 細胞の活性化の両面において改良の余地を残す生ワクチンである。より効率良く CD4 陽性 T 細胞を活性化させる目的で、BCG の有するウレアーゼ遺伝子を除去したりコンビナント BCG (BCG- Δ UT) を作製した。ウレアーゼは、ファゴゾームの pH 環境を中性に保つ機能を有するため、Phagosome-Lysosome fusion (P-L fusion) が促進され、そのために MHC class II 経路の活性化が促進すると理論的に考えられる。一方、CD8 陽性 T 細胞の活性化には Cross-priming 機構の活性化が重要であり、HSP70 がシャペロン効果を発揮し、HSP70 存在下では Cross-priming 効果が促進されると期待される。そこで、病原性抗酸菌に共通して存在する主要抗原の一つである MMP-II 遺伝子に HSP70 遺伝子を結合させ、BCG に遺伝子導入した新しいコンビナント BCG を作製した。UreC 遺伝子を取り除いたコンビナント BCG (BCG- Δ UT-11-3) 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、第 3 のコンビナント BCG として、両方法を組み合わせ、BCG- Δ UT に HSP70-MMP-II 遺伝子を導入した新規コンビナント BCG (BCG-D70M) を作製し、その免疫学的効果を検討した。

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 陽性 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 陽性 T 細胞の存在が不可欠であり、CD4 陽性 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 陽性 T 細胞による 'Help' の機序に関しては未だ明らかではない。

本研究では、結核菌分泌タンパク Ag85B 由来の Th1 型免疫応答を選択的に惹起するペプチド：Peptide-25 を用いて、長期生存型 CD8 記憶細胞誘導における CD4 陽性 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。

結核菌を含む抗酸菌のゲノム解析は進んでいるものの、機能が未知の遺伝子やタンパク質が多数存在している。これらの機能未知遺伝子・タンパク質の中には、抗酸菌の新規診断法や新規抗結核薬の開発に有用なものが存在していると考えられる。特に結核菌を含む抗酸菌の細胞壁構造は、抗酸菌に特異的であり病原性とも深く関わっていることから、新規診断法や新規抗結核薬の有望な標的部位として予想される。本研究では、抗酸菌の細胞壁構造に関連する遺伝子を含む新規遺伝子・タンパク質の解析や機能の同定を行うことにより、抗酸菌に関する新たな知見を得るとともに、新規診断法や新規抗結核薬の開発に結びつけることを目的とした。

非結核性抗酸菌症、特に MAC 感染症においては、原因菌である *M. avium* や *M. intracellulare* が通常的环境中に存在する菌種であることから、感染源を特定することや複数回 MAC 感染症を発症した同一患者の原因菌が内因性再燃であるのか外因性再

感染であるのかを調べるのが感染対策に有用である。しかしながら、MAC 感染症の原因菌に対して有効な遺伝子タイピング法等が存在していないのが現状である。そこで本研究課題では、MAC 感染患者由来の臨床分離株のゲノム上に新規挿入配列 (IS) を見だし、その配列を解析するとともに、疫学的調査を目的とした遺伝子タイピング等のツールとして応用が可能か検討を行った。

抗酸菌症の治療では、原因となる抗酸菌の種類によって隔離の有無や治療薬の選択等が異なるため、臨床現場では迅速な起炎菌の同定が求められている。抗酸菌の簡便な鑑別として、近年では遺伝子検査が行われているものの、同定可能な菌種が限られており、より多種の抗酸菌が鑑別可能な方法が求められている。そこで本研究では、抗酸菌に特徴的な細胞壁構造の合成に関与する遺伝子の情報に基づいてプライマーを設計し、PCR 反応による新しい抗酸菌鑑別法を開発した。具体的には、抗酸菌の細胞壁合成に関与している 2 つの遺伝子 (結核菌では *Rv3783* 遺伝子と *Rv3789* 遺伝子に相当) に着目した。この 2 つの遺伝子の塩基配列は、ゲノムが既に解読されている抗酸菌種において、高度に保存されているが、その 2 つの遺伝子の間に存在する ORF の数や長さは菌種により大きく異なっている。従って、この 2 つの遺伝子上にプライマーを設計し、PCR 反応を行い、得られたバンドのサイズを比較することにより、主要な病原性抗酸菌を鑑別することが可能であると予想された。さらに、結核菌のみを特異的に鑑別するために、結核菌由来 *Rv1330c* 遺伝子のみに対応するプライマーセットも設計した。設計した 2 種類のプライマーセットを用いた抗酸菌の新規鑑別法を確立するとともに、その有用性について、ATCC 株や臨床分離株を用いて検討を行った。

新規抗結核薬の開発では、既存の抗結核薬の作用機序とは異なる標的部位を持ち、結核菌に特異的に作用するような抗結核薬が求められている。そこで本研究課題では、新規抗結核薬の標的部位になり得ると考え

られる新規遺伝子・タンパク質の詳細な機能と構造の解析を行うことにより、新規抗結核薬の開発に結びつけることを目的とした。具体的には、結核菌のゲノム上に存在する機能未知遺伝子 *Rv2613c* に着目した。本遺伝子の破壊株では野生株と比較して生育能が低下することが既に報告されていること、並びに本遺伝子が細胞壁合成酵素をコードしている遺伝子群と同一のオペロン上に存在していることから、本遺伝子は結核菌の生体内において重要な役割を果たしていることが予想された。さらに、本遺伝子と高い相同性を示す配列がヒトを含めた真核生物のゲノム上には存在しないことから、本遺伝子は結核菌に特異的に作用するような新規抗結核薬の標的部位になり得ると考えられた。そこで本遺伝子がコードするタンパク質について、詳細な酵素学的諸性質を明らかにするとともに、X線結晶構造解析による立体構造の決定を試みた。

糖尿病ラットモデルを用いて、結核菌に感染しやすいかを調べる。次に、その原因を調べる。最後に、ヒト糖尿病患者が結核にかかりやすいかを、中国上海市で実地調査を行う。

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：2,5 万人）が結核を発病、176 万人（日本：2,2 千人）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、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。喀痰培養陽性（複数回）、喀痰培養陰性-気管支洗浄液培養陽性 MAC 感染症で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 抗体の検出の診断的有用性について検証した。

B. 研究方法

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 および腹腔滲出マクロファージに結核菌 H37Rv、 Δ RD1 および RD1 欠損株に RD1 領域を相補した RD1 相補株を MOI=10 で感染させた。細胞のネクロシスは、感染 24 時間後に上清中に遊離した lactate dehydrogenase (LDH) 量および感染細胞の propidium iodide (PI) 染色性を指標にして解析した。感染マクロファージのアポトーシスは、感染 24 時間後の oligonucleosome 量を ELISA で測定した。また、感染後ミトコンドリアに局在性を示す 3, 3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DIOC₆(3)) で細胞を染色し、経時的にその蛍光強度を測定してミトコンドリア内膜傷害の程度を調べた。さらに、結核菌を感染させた RAW264 細胞中の ATP 量を ENLITEN ATP assay system bioluminescence detection kit (Promega) で測定した。感染後のサイトカイン産生は ELISA で測定し、caspase-1 の活性化は Western blotting で解析した。

C57BL/6 (WT) および PD-1 欠損マウスに BCG を感染させ、その後の肺および脾臓における菌数の変化を測定した。また、BCG 感染後、脾臓中の I-A 陽性抗原提示細胞上の表面抗原を FACS により解析した。さらに、BCG 感染 1, 3, 6, 12 週後に脾 CD4 陽性 T 細胞を回収し、抗原刺激後の IFN- γ および TNF- α 産生を測定した。また、得られた CD4 陽性 T 細胞を正常マウスに移入後、結核菌 H37Rv を攻撃感染させた。感染 10 日後に脾内生菌数を測定して、CD4 陽性 T 細胞移入による感染防御能について解析した。

C57BL/6 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。また、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。また、結核菌感染後経時的に肺内の各種サイトカイン量を ELISA で測定した。さらに、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。また、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。また、WT および PD-1 欠損マウスに結核菌を経鼻感染させ、感染後 15 日目より 2 日毎に IL-17 に対する中和抗体を 3 回腹腔内投与した。感染 21 日目に肺を採取し、菌数およびマクロファージや好中球の肺への細胞浸潤の程度を解析した。

BCG-Tokyo 株を親株として、ウレアーゼ欠損 BCG (BCG- Δ UT-11-3) 株を作製した。ウレアーゼ遺伝子の除去には、フェージシステムを用いた。らい菌由来 MMP-II 遺伝子に HSP70 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。さらに、同様に BCG- Δ UT-11-3 に HSP70-MMP-II 融合遺伝子を導入して 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、プラスティ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 または親 BCG あるいはベクターコントロール BCG 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。リコンビナント BCG 感染樹状細胞による T 細胞活性化機構を探索する目的で、樹状細胞を市販の 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、リコンビナント BCG のメモリー T 細胞産生能を測定する目的で、C57BL/6 マウスに各種リコンビナント BCG 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。

Peptide-25 (FQDAYNAAGHNAV) と卵白アルブミン (OVA) または T 細胞抗原受容体 (TCR) に対して低親和性の Peptide-25 変異体 APL:G248A (FQDAYNAAAGHNAV) と OVA をフロイント不完全アジュバントに懸濁し、C57BL/6 マウス腹部皮下の同一場所、もしくは左右別々の部位に免疫した。また、PBS

に懸濁した Peptide-25 または APL を Peptide-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 マウス: C57BL/6 バックグランド) 腹腔に投与した。生体内で抗原刺激を受けた CD4 陽性 T 細胞のエフェクター細胞への分化様式は免疫 10 日後に回収した脾臓細胞を、*in vitro* で固相化抗 CD3 抗体再刺激を行い、細胞内サイトカイン染色法を用いて 1 日後の CD4 陽性 T 細胞のサイトカイン産生様式にて評価した。また OVA 特異的細胞傷害性 CD8 細胞の活性は、標的細胞として OVA 遺伝子導入 EL-4 胸腺腫細胞 (E. G7) を用いた一般的な ^{51}Cr 遊離試験にて評価した。

P25 TCR-Tg マウス脾臓細胞より CD4 陽性 T 細胞を、OVA 特異的 TCR を発現するトランスジェニックマウス (OT-1: C57BL/6 バックグランド) 脾臓細胞より CD8 陽性 T 細胞を、C57BL/6 マウス脾臓細胞より樹状細胞を調製した。P25 TCR-Tg-CD4 陽性 T 細胞と Peptide-25 または APL が共存する条件で樹状細胞に OVA を取り込ませ、培養 1 日後に P25 TCR-Tg-CD4 陽性 T 細胞及び余剰の抗原を取り除き、CFSE 標識した OT-1-CD8 陽性 T 細胞と培養した。培養 3 日後の OT-1-CD8 陽性 T 細胞の細胞分裂回数及びグランザイム B 産生を指標に細胞傷害性 CD8 細胞の誘導及び活性化を評価した。

P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を C57BL/6 マウス脾臓由来の樹状細胞を抗原提示細胞として Peptide-25 または APL で刺激し、6 時間後、12 時間後に CD4 陽性 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 陽性 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。

P25 TCR-Tg または T-bet 欠損 P25 TCR-Tg (C57BL/6 バックグランド) 脾臓細胞よりナイーブ CD4 陽性 T 細胞を調製した。抗原提示細胞として I-A^b-CHO を用いた。Peptide-25 を取り込ませた I-A^b-CHO とナイーブ CD4 陽性 T 細胞を共培養し、3 時間後、

6 時間後に CD4 陽性 T 細胞の mRNA を調製し、Affymetrix 社の GeneChip® Expresson Array を用いて発現遺伝子の網羅的解析を行なった。GeneChip® Expresson Array 解析にて絞り込まれた候補遺伝子の P25 TCR-Tg-CD4 陽性 T 細胞または T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4 陽性 T 細胞における Peptide-25 刺激後の経時的発現変化を Real-Time PCR 法にて確認した。

さらに候補遺伝子の Th1 分化誘導を評価するために、I-A^b-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 陽性 T 細胞より得た cDNA より PCR 法を用いて候補遺伝子をクローニングし、レトロウイルス発現ベクター pMY-IRES-GFP (東京大学・医科学研究所北村俊雄博士より供与) に組み込んだ。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4 陽性 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、候補遺伝子を組み込んだ pMY-IRES-GFP を添加し、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞に候補遺伝子を導入した。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。候補遺伝子の *ifn- γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリング誘導能は、候補遺伝子が導入された活性化 CD4 陽性 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。

野生型 P25 TCR-Tg または T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を I-A^b-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、活性化した CD4 陽性 T 細胞を経時的に回収し、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 抗体を用いて CD4 陽性 T 細胞上の IL-12R β 2 鎖を染色し、FACSCanto にて解析した。

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 陽性 T 細胞を I-A^b-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、活性化した CD4 陽性 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 陽性 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。

MAC 感染患者由来臨床分離株のゲノム上に存在する新規 IS についてシーケンス解析を行い、その配列を決定した。また、本 IS の保有状況を調べるために、MAC 感染患者由来の臨床分離株 9 株と *M. avium* ATCC 株 3 株についてサザンブロッティングを行った。さらに、本 IS が転移を起こす頻度を調べるため、本 IS を保有する臨床分離株の継体培養を行い、各継体段階の菌体から抽出したゲノムを用いたサザンブロッティングにより、本 IS のバンドパターンを調べた。

Rv3783 と *Rv3789* 遺伝子に対応するプライマーセット 1 と、*Rv1330c* 遺伝子に対応するプライマーセット 2 を用いたマルチ PCR 反応を行った後に、電気泳動でバンドを確認することによって、抗酸菌の鑑別を試みた。PCR 反応条件の最適化は、*M. tuberculosis*、*M. avium*、*M. smegmatis*、及び *Escherichia coli* のゲノムを用いて行った。決定した条件を用いて、ATCC 株と臨床分離株を含めた 52 菌種 158 株の抗酸菌 (*M. tuberculosis* 5 株、*M. bovis* 6 株、*M. bovis* BCG 1 株、*M. kansasii* 9 株、*M. marinum* 5 株、*M. asiaticum* 1 株、*M. scrofulaceum* 5 株、*M. xenopi* 1 株、*M. ulcerans* 1 株、*M. gordonae* 6 株、*M. szulgai* 6 株、*M. avium* 15 株、*M. intracellulare* 8 株、*M. malmoense* 9 株、*M. nonchromogenicum* 5 株、*M. shimoidei* 1 株、*M. triviale* 1 株、*M. abscessus* 1 株、*M. chelonae* 1 株、*M. fortuitum* 1 株、*M. thermoresistibile* 11 株、*M. smegmatis* 9 株、*M. mucogenicum* 1 株、*M. neoaurum* 7 株、*M. porcinum* 1 株、*M. aichiense* 1 株、*M. austroafricanum* 1 株、*M. chitae* 2 株、*M. chubuense* 1 株、*M. diernhoferi* 1 株、*M. duvalii* 1 株、*M. flavescens* 1 株、*M. gadium* 5 株、*M. gilvum* 1 株、*M. komossense* 1 株、*M. moriokaense* 1 株、*M. parafortuitum* 1 株、*M. phlei* 1 株、*M. pulveris* 2 株、*M. rhodesiae* 5 株、*M. sphagni* 1 株、*M. vaccae* 1 株、*M. obuense* 1 株、*M. novun* 1 株、*M. gallinarum* 1 株、

M. acepulgensis 1 株、*M. paraffricum* 1 株、*M. butyricum* 1 株、*M. goodfellow* 1 株、*M. shinshuense* 1 株、*M. tokaiense* 1 株、及び *M. lactae* 1 株) のコロニーをテンプレートとして PCR 反応を行い、DNA を電気泳動で確認して、新規鑑別法の有用性について評価した。

結核菌由来 *Rv2613c* 遺伝子がコードするタンパク質を *E. coli* 内で大量発現させた後、2 段階のカラムクロマトグラフィーにより SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで精製を行った。HPLC を用いて反応産物のピークを測定することにより、精製タンパク質の機能を同定した。X 線結晶構造解析では、スクリーニングキットを用いて本タンパク質の結晶化条件を決定した後、回折データの収集を放射光科学研究施設で行った。初期位相はセレノメチオニンを用いた単波長異常散乱法により求め、coot プログラムと ccp4 プログラムを利用してモデルの構築と精密化を繰り返して行うことにより、本タンパク質の立体構造を決定した。

糖尿病 1 型ラットを結核菌で噴霧感染させた。経時的に肺組織をとり、結核菌数、病理組織像、主要なサイトカイン mRNA 発現を調べた。対照ラットとして、野生ラットを使用して比較検討した。2008 年 4 月から 2009 年 3 月まで、上海市肺科病院を受診した結核患者を対象とした。糖尿病の有無、治療内容、多剤耐性結核の有無を非糖尿病結核患者と比較検討した。糖尿病患者血清を用いて、この血清が、結核菌増殖促進作用があるかを調べた。一部、グルコースを加えて、結核菌増殖促進作用を調べた。

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% O₂) 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% O₂) 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。喀痰培養陽性 (複数回)、喀痰培養陰性-気管支洗浄液培養陽性ヒト肺 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 感染症由来血清を用い、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、各医療機関で研究倫理審査承認後、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。

倫理面への配慮 国立感染症研究所及び当該研究機関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。実験計画について安全委員会の承認を受けた。大臣確認実験を必要とする実験（組換え DNA 実験）については、必要書類を文部科学省に提出し認可されている。実際の実験では、関連法令を遵守した上で、安全性等に十分に配慮して行った。

C. 研究結果

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 に結核菌 H37Rv を感染させたところ、LDH の遊離が認められた。しかし、 Δ RD1 の感染では、感染細胞からの LDH の遊離は認められなかった。また、RD1 相補株の感染では H37Rv 感染の場合と同様に感染細胞から

LDH の遊離が観察された。これら 3 菌株の感染では、感染後の細胞内菌数に有意な違いが認められず、細胞内 oligonucleosome 量の増加も観察されなかった。さらに、H37Rv および RD1 相補株の感染では、感染 2 時間後よりミトコンドリア内膜傷害を示す DIOC₆ (3) の蛍光強度の低下が認められ、その程度は時間経過とともに増大することが示された。一方、このようなミトコンドリア傷害は Δ RD1 の感染では認められなかった。また、H37Rv および RD1 相補株の感染では、感染 6 時間後には細胞内 ATP 量の減少が観察された。しかし、 Δ RD1 感染では ATP 量の減少は認められなかった。これらの結果から、RD1 領域の遺伝子産物がミトコンドリア膜傷害に関与し、その結果細胞内 ATP 量が減少して細胞がネクローシスに陥るものと考えられた。上述の感染実験では、MOI=10 で H37Rv を感染させることで菌のネクローシス誘導能について解析を行った。しかし、低い MOI (MOI=1) で結核菌を感染させた場合には、激しいネクローシス様の細胞形態の変化は認められなかったことから、結核菌のネクローシス誘導能が細胞内菌数に依存して発揮されることを示された。一方、結核菌を MOI=1 で感染させる系にカスパーゼ 9 阻害剤を加えると感染細胞にネクローシスが誘導されることが示された。このことから、結核菌は感染初期にカスパーゼを介してネクローシスを抑制する機序を有することが示唆された。

マウス腹腔マクロファージに結核菌強毒株 H37Rv を感染させ、24 時間後の培養上清中のサイトカイン産生を測定した。その結果、IL-6、TNF- α 、IL-18 および IL-1 β の産生が認められた。一方、 Δ RD1 の感染では IL-6 および TNF- α 産生は誘導されたが、IL-18 と IL-1 β 産生は認められなかった。しかし、 Δ RD1 感染後の IL-18 および IL-1 β mRNA の発現は、H37Rv 感染の場合と同程度に誘導されることが示された。IL-18 および IL-1 β の成熟過程には、カスパーゼ 1 が関与することが示されている。そこで、H37Rv および Δ RD1 感染後のカスパーゼ 1 の活性化を調べた。その結果、活性型のカ

スパーゼ 1 は H37Rv 感染では誘導されるが、 Δ RD1 感染では誘導されないことが明らかになった。さらに解析を進めた結果、カスパーゼ 1 の活性化が細胞外塩化カリウム濃度の増加に応じて阻害され、カリウムイオンの流出を誘導する nigericin 存在下に Δ RD1 を感染させると、カスパーゼ 1 の活性化が誘導されることが明らかとなった。以上の結果から、RD1 は感染細胞内のカリウムイオンの放出に関与し、その結果カスパーゼ 1 が活性化され、IL-18 や IL-1 β の産生が誘導されるものと考えられた。

C57BL/6 マウスに BCG を感染させると、3 週間後には感染抵抗性 T 細胞が誘導された。しかし、BCG 感染後に誘導される IFN- γ および TNF- α 産生能を有する T 細胞およびその T 細胞によって担われる防御免疫応答は、菌がまだ臓器内に存在しているにも関わらず、その後の時間経過とともに低下した。抗原提示細胞上の抑制性補助因子である PD-L1 の発現は、感染 3 週目以降に増加した。PD-L1 は PD-1 のリガンドであり、T 細胞上に発現した PD-1 に PD-L1 が結合することにより、T 細胞に抑制性シグナルがはいることが示されている。そこで、BCG 感染後期に誘導される T 細胞機能の抑制に PD-1/PD-L1 経路が関与するか否かを調べるため、PD-1 欠損マウスに BCG を感染させ、同様の解析を行った。その結果、PD-1 欠損マウスでは正常マウスと異なり、Th1 型 T 細胞由来の IFN- γ および TNF- α 産生の持続的な産生や、感染 3 週目以降の菌の排除の亢進が認められた。

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 マウスの肺には特記すべき所見はなかったが、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 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。また、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。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わかった。肺におけるサイトカイン産生を調べたところ、感染 21 から 27 日目にかけて IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A、IL-6 産生および各種ケモカインの発現が誘導された。これらケモカインおよび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。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。一方、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。

結核菌感染後 10 週間に渡り、マウスの生存数を観察した。その間、WT、caspase-1 欠損マウスおよび NLRP3 欠損マウスの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 1-7 週目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認められなかったが、ASC 欠損マウスの肺では多数の病変部位が認められた。また、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。

ウレアーゼ欠損リコンビナント BCG (BCG- Δ UT-11-3) の T 細胞活性化能を検討した。BCG- Δ UT-11-3 は末梢単球由来樹状細胞を活性化し、BCG-Tokyo に比し有意に強く T 細胞を活性化し、IFN- γ および IL-2 の産生を誘導した。また、BCG- Δ UT-11-3 および BCG-Tokyo 株 100 個を C57BL/6 マウスに皮内接種し、4 週間後の脾臓 T 細胞のリコール抗原あるいはらい菌由来の細胞膜タンパクに対する反応性を検討したところ、BCG- Δ UT-11-3 接種マウス脾 T 細胞は BCG-Tokyo 株由来の細胞質に反応し IFN- γ を産生した。さらに、脾臓 T 細胞の IFN- γ 産生細胞を特定するために細胞内サイトカイン染色を行うと IFN- γ は主に CD4 陽性 T 細胞から産生されていることが明らかになった。

次いで、HSP70-MMP-II 融合遺伝子挿入リコンビナント BCG (BCG-70M) のナイーブ CD8 陽性 T 細胞活性化能を検討した。BCG-70M は、親 BCG-Tokyo に比し有意に強く樹状細胞を活性化した。そこで、BCG-70M 感染樹状細胞を用い、自己のナイーブ CD8 陽性 T 細胞を刺激したところ、BCG-70M を用いた場合のみ IFN- γ の産生が誘導され、かつ、本反応は抗原特異的であることが判明した。BCG-70M による T 細胞活性化機構を検討するため、BCG-70M を *in vitro* で培養し、その培養上清を濃縮した後、MMP-II に対するモノクローナル抗体を用いて精製した。精製したタンパクを MMP-II および HSP70 に対するモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロット法で検索すると、両抗体と反応する 90 kDa バンドが検出された。したがって、BCG-70M は HSP70-MMP-II 融合タンパクを分泌することが明らかになった。そこで、精製した HSP70-MMP-II 融合タンパクで樹状細胞を刺激すると、樹状細胞 C から

IL-12p70 が産生され、樹状細胞を予め TLR2 に対する antagonistic 抗体で処理しておく、樹状細胞からの IL-12p70 の産生は強く抑制された。したがって、本融合タンパクは樹状細胞表面の TLR2 に結合して、IL-12p70 の産生を誘導することが明らかになった。そこで BCG-70M 感染樹状細胞を用い、自己のナイーブ CD4 陽性 T 細胞を刺激したところ、CD8 陽性 T 細胞と同様、CD4 陽性 T 細胞も強く活性化され IFN- γ を産生した。BCG-70M による CD4 陽性 T 細胞の活性化機構を検索するため、樹状細胞を Chloroquine 処理すると T 細胞の活性化は抑制された。自己の CD8 陽性 T 細胞を Responder として用いた場合も全く同様の現象が観察された。このことは、CD4 陽性 T 細胞も CD8 陽性 T 細胞も BCG-70M が分泌した融合タンパクにより抗原特異的に活性化されていることを示唆している。さらに、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、樹状細胞を Brefeldin A あるいは Lactacystin で処理した後 BCG-70M を感染させたところ、CD8 陽性 T 細胞の活性化は、Brefeldin A を用いても Lactacystin を用いても抑制された。したがって、BCG-70M による CD8 陽性 T 細胞の活性化は、TAP および Proteasome に依存した Cytosolic pathway によるものであることが判明した。BCG-70M は CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の両者を活性化したことから、CD8 陽性 T 細胞を CD4 陽性 T 細胞存在下で刺激したところ、CD8 陽性 T 細胞は CD62L 抗原の発現を抑制し、同時に細胞内にパーフォリンを産生した。BCG-70M がメモリー T 細胞を産生し得るか検討するため、C57BL/6 マウスに BCG-70M を皮内接種したところ、4 週間後に MMP-II に反応して大量の IFN- 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。したがって、BCG-70M は、両サブセットのメモリー T 細胞を産生することが判明した。

次いで、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- γ 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- Δ UT-11-3 と BCG-70M を用いた。その結果、BCG-D70M が最も強くナイーブ 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- γ が刺激された CD4 陽性 T 細胞から産生された。さらに、BCG-D70M のナイーブ CD8 陽性 T 細胞活性化能を検討すると、BCG-D70M は、BCG-261H、BCG- Δ 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- γ の産生を誘導した。また、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。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、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 BCG-70M 同様 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す、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、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 および HSP70 に反応し、IFN- γ を産

生するメモリー T 細胞が産生された。

PBS に懸濁した Peptide-25 または APL を P25 TCR-Tg マウス腹腔に免疫し、10 日後に脾臓細胞を回収し、*in vitro* にて固相化抗 CD3 抗体刺激を行い、Peptide-25 及び APL の *in vivo* における CD4 陽性 T 細胞分化誘導能を評価した。その結果、*in vivo* において Peptide-25 は Th1 分化を、APL は Th2 分化を選択的に誘導することが明らかになった。

フロイント不完全アジュバントに懸濁した Peptide-25 と OVA または APL と OVA を C57BL/6 マウス腹部皮下に免疫し、10 日後に脾臓細胞を回収し、常法に従い OVA 特異的細胞傷害性 CD8 細胞の活性化を評価した。その結果、Peptide-25 と OVA を共免疫すると OVA 特異的な細胞傷害性 CD8 細胞の活性が OVA 単独免疫に比べ増強した。一方、APL と OVA の共免疫では OVA 特異的細胞傷害性 CD8 細胞の活性の増強は見られなかった。また、Peptide-25 と OVA を別々の部位に免疫すると Peptide-25 による OVA 特異的細胞傷害性 CD8 細胞の活性化増強効果が全く見られなかった。そこで、Peptide-25 による細胞傷害性 CD8 細胞の活性化増強機構を明らかにするため、*in vitro* での OVA 特異的細胞傷害性 CD8 細胞の分化・活性化誘導システムを構築した。まず、OVA を樹状細胞に取り込ませる際に P25 TCR-Tg-CD4 陽性 T 細胞と Peptide-25 または APL を 1 日共培養した。培養後 CD4 陽性 T 細胞と取り込まれなかった抗原を除き OVA パルス樹状細胞として用いた。CFSE 標識 OT-1-CD8 陽性 T 細胞と OVA パルス樹状細胞を共培養し、3 日後の OT-1-CD8 陽性 T 細胞の分裂回数およびグランザイム B の発現を検討した。その結果、Peptide-25 と共培養した OVA パルス樹状細胞を用いた場合には、OT-1-CD8 陽性 T 細胞の増殖促進やグランザイム B の発現増強が見られた。一方、APL と共培養した OVA パルス樹状細胞では OT-1-CD8 陽性 T 細胞の増殖は同程度に誘導されたが、グランザイム B の発現は誘導されなかった。さらに Peptide-25 と APL を介した樹状細胞の活性化の違いが何に起因しているかに関して検

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

我々は①Th1 分化のマスター遺伝子と考えられている T-bet mRNA の発現が抗原刺激後 3 時間で上昇し、その後一旦低下した後、刺激後 15 時間頃から再度上昇すること、この刺激 15 時間後の発現誘導はサイトカイン

依存性であるのに対し、刺激 3 時間後の発現誘導はサイトカインや副刺激分子非依存性に誘導されること、②Peptide-25 刺激は T-bet 欠損タイプ CD4 陽性 T 細胞においてもサイトカインや副刺激分子非依存性に *ifn- γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導し、Th1 細胞への分化を誘導できることを明らかにしている。これらの結果から Peptide-25 と TCR の相互作用によってサイトカイン非依存性に Th1 分化を誘導する因子の活性化が誘導されていると考えた。この分化を制御する転写調節因子を DNA マイクロアレイ法を用いて解析し、P25 TCR-Tg-CD4 陽性 T 細胞及び T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4 陽性 T 細胞のいずれの場合にも刺激後早期に発現が誘導される遺伝子、*ifn- γ* 遺伝子座のクロマチンリモデリングを誘導する転写調節活性を有する遺伝子であることを条件に候補遺伝子の絞り込みを行なった。その結果、53 種類の候補遺伝子を得た。

まず P25 TCR-Tg-CD4 陽性 T 細胞及び T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4 陽性 T 細胞を Peptide-25 で刺激し、候補遺伝子の発現を Real-Time PCR 法にて確認した結果、3 種類の遺伝子が Peptide-25 刺激後早期に発現が誘導されることからこの 3 種類の遺伝子を候補とした。これら候補遺伝子を PCR 法にてクローニングし、CD4 陽性 T 細胞に導入するためにレトロウイルス発現ベクター pMY-IRES-GFP に組み込んだ。T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-CD4 陽性 T 細胞を抗 CD3 抗体+抗 CD28 抗体で刺激し分化誘導する際に候補遺伝子を組み込んだ pMY-IRES-GFP を添加し T-bet 欠損 CD4⁺ T 細胞に候補遺伝子を導入した。陰性対照として pMY-IRES-GFP のみを、陽性対照として T-bet-pMY-IRES-GFP を用いた。培養 5 日後に回収した細胞を抗 CD3 抗体で再刺激し、そのサイトカイン産生を指標に導入遺伝子の Th1 分化誘導能を評価した結果、pMY-IRES-GFP が導入された細胞では Th2 細胞への分化が優位に誘導されたのに対し、3 種類の候補遺伝子のうちの TATA box binding protein associated factor である TAF7 が導入された細胞のみ

が T-bet 遺伝子を導入した場合と同程度の Th1 分化が誘導された。そこで、培養 5 日後の 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。

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 陽性 T 細胞には機能的 IL-12R の構成分子である IL-12R β 2 鎖が発現していない。そこで、I-A^b-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 陽性 T 細胞上の IL-12R β 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-2 刺激 40 時間後から IL-12R β 2 鎖の発現がサイトカイン(IL-2、IFN- γ)非依存性に誘導された。IL-12R β 2 鎖の発現は活性化 STAT4 によって制御される。我々が作出した T-bet 欠損 P25 TCR-Tg-ナイーブ CD4 陽性 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-ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を I-A^b-CHO 存在下に Peptide-25 で刺激し、1、6、24、48 時間後の CD4 陽性 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 陽性 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。

MAC 感染患者由来の臨床分離株より抽出したゲノム上には、細胞壁関連遺伝子の近傍に新規 IS が存在するのを見いだした。この新規 IS についてシークエンスを行った結果、*M. smegmatis* 由来の IS4 ファミリーに属する IS1549 の Transposase と高い相同性を示した。そこで、この新規 IS を IS1642 と名付けた。IS1642 では、Transposase 遺伝子の上流と下流に 14bp の Inverted repeat があり、その外側に 161 bp の Direct Repeat (DR) が存在した。この DR の長さは IS1642 のコピーにより多様であった。また、ATCC 株と臨床分離株、計 12 株についてサザンブロッティングを行い、本 IS のバンドパターンを比較したところ、菌株によって多様であることが分かった。さらに IS1642 を見いだした臨床分離株について、10 回の継体培養を行い、各継体段階の菌株についてそれぞれサザンブロッティングにより解析したところ、継体培養 10 回目の菌株由来のゲノム上に本 IS の新しいバンドが認められた (図 2)。このことから、本 IS1642 は比較的頻繁に転移することが明らかとなった。

Rv3783 と *Rv3789* 遺伝子に対応するプライマーセット 1 と *Rv1330c* 遺伝子に対応するプライマーセット 2 の 2 種類のプライマーセットを同時に利用して PCR 反応を行った後、バンドの泳動パターンを調べることにより、抗酸菌の簡便な鑑別を試みた。*M. tuberculosis*、*M. avium*、*M. smegmatis*、及び *E. coli* のゲノムを用いて PCR 反応の最適な条件を決定した。決定した PCR 反応条件を用いて、52 菌種 158 株のコロニーをテンプレートとして本鑑別法の有用性について検討を行った結果、本鑑別法は、*M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. bovis* BCG、*M. kansasii*、*M. asiaticum*、*M. parafortuitum*、*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. scrofulaceum*、*M. smegmatis*、*M. rhodesiae*、及び *M. malmoense* の 12 種類の菌種を、結核菌群のグループ (*M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. bovis* BCG)、*M. kansasii* のグループ (*M. kansasii*、*M.*